

# 快速筛选拟南芥受精和早期胚胎发生相关基因的方法

黄洁, 李鑫波, 严海龙, 陈丹, 孙蒙祥, 彭雄波\*

(武汉大学生命科学学院, 杂交水稻国家重点实验室, 武汉 430072)

**摘要:** 阐明拟南芥受精和早期胚胎发生过程对理解被子植物生殖发育有着重要的指导意义, 而利用正向遗传学方法研究拟南芥突变体的表型及其分子机理是探究植物基因功能最常用的一种方法。基于常规的插入突变(包括 T-DNA 和转座子)、化学诱变(如 ethylmethane sulfonate, EMS)和高能射线方法构建的突变体库中假阳性突变体多, 难以高效筛选到受精和早期胚胎发生相关基因的突变体。为解决这一难题, 本研究建立了一种构建 T-DNA 插入突变体文库的新方法。即在载体 pCAMBIA1302 的 T-DNA 元件上增加花粉特异荧光标记基因(*pLAT52::EGFP*), 并遗传转化具有四分体花粉的 Columbia 野生型拟南芥突变体 *qrt1-2*; 对获得的突变体库可利用花粉荧光快速排除假阳性突变体, 并采用反向 PCR (inverse-PCR) 扩增技术确定突变位点。此方法在筛选拟南芥受精和早期胚胎发生相关基因突变体上的成功应用表明, 其是一种效率高、针对性强、操作相对快捷方便的拟南芥突变体筛选方法。

**关键词:** 拟南芥; T-DNA; 受精; 早期胚胎发生; 突变体筛选

中图分类号: 944.4

文献标识码: A

文章编号: 2095-0837(2015)04-0564-08

## A Convenient Method for Screening Genes Related to Fertilization and Embryogenesis in *Arabidopsis*

HUANG Jie, LI Xin-Bo, YAN Hai-Long, CHEN Dan, SUN Meng-Xiang, PENG Xiong-Bo\*

(State Key Laboratory of Hybrid Rice, College of Life Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072)

**Abstract:** Research on early embryogenesis and fertilization is a central issue for understanding sexual reproduction in higher plants. The forward genetic method e. g. mutation, is commonly used to explore the physiological functions of genes in plants. However, the high false positive rate in mutant libraries based on regular mutagenesis methods, for example T-DNA insertion, transposon, ethylmethane sulfonate and high-energy rays, retard the screening of mutants related to fertilization and early embryogenesis. To solve this problem, we developed a new method to construct mutant stock. We introduced a pollen-specific fluorescence marker (*pLAT52::EGFP*) into the T-DNA element of the plasmid pCAMBIA1302, then transferred it into the *qrt1-2* mutant, in which the four products of microsporogenesis remained fused and pollen grains were released as tetrads, to construct a T-DNA insertion mutant library. This allowed us to discard the false positive mutants rapidly by simply visualizing the fluorescence of pollen. In addition, we could determine the mutated gene locus of candidate mutants through inverse-PCR. Results showed that this method could help screen mutants related to fertilization and early embryo development rapidly and identify the mutated gene locus efficiently.

**Key words:** *Arabidopsis*; T-DNA; Fertilization; Early embryogenesis; Mutant screening

收稿日期: 2015-02-11, 退修日期: 2015-03-13。

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(31070280)。

作者简介: 黄洁(1990-), 女, 硕士研究生, 研究方向为植物发育生物学(E-mail: huangjie@whu.edu.cn)。

\* 通讯作者(Author for correspondence. E-mail: bobopx@whu.edu.cn)。

拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 是十字花科 (Cruciferae) 的模式植物, 具有生长周期短、易于遗传转化、基因组小、重复序列少、生物信息学资源丰富等优点<sup>[1]</sup>, 也是第一个基因组被完整测序的高等植物, 其基因组物理图谱已于 2000 年 12 月公布<sup>[2]</sup>, 因此对拟南芥的分子生物学研究对于阐明植物的生长和发育过程具有重大意义<sup>[3]</sup>。通过分析拟南芥突变体的表型性状定位到控制这一性状的基因, 并对该基因表达的蛋白进行功能分析, 从而解析其在植物体内的具体信号调控途径, 是目前正向遗传学研究中最常用、最有效的手段。

构建突变体库常采用物理诱变(射线)、化学诱变如 EMS (Ethylmethane Sulfonate)<sup>[4-6]</sup> 和传统意义上的 T-DNA 插入突变<sup>[7-9]</sup> 等。物理诱变和 EMS 化学诱变都具有操作简单、突变频率高、多效性等优点<sup>[10]</sup>。但物理辐射突变为非特异性, 存在突变方向难以掌握、突变体后代鉴定的工作量大等缺点; EMS 化学诱变的优点虽具有突变专一性, 但会对植株造成损伤且确定突变位点比较困难, 同时用此方法筛选突变体要求诱变群体样本容量大, 也导致突变体表型分析与突变位点确认等检测工作量大大增加, 十分耗时费力。传统的 T-DNA 插入突变因易于进行正向和反向遗传学研究受到重视<sup>[11]</sup>, 但不能高效定向筛选受精及早期胚胎发生<sup>[12]</sup> 相关突变体。在总结前人筛选突变体经验的基础上, 我们经过长时间的摸索与比较建立了快速筛选拟南芥受精和早期胚胎发生相关基因突变体的方法。即在载体 pCAMBIA1302 的 T-DNA 元件上增加花粉特异启动子驱动绿色荧光蛋白 (enhanced green fluorescence protein, EGFP) 表达元件 (*pLAT52::EGFP*), 并转化具有四分体花粉的 *Col*-0 野生型拟南芥突变体 *qrt1-2* (CS8846)<sup>[13]</sup>, 构建适合筛选拟南芥受精和早期胚胎发生相关基因的 T-DNA 插入突变体文库。此方法相较于物理诱变、EMS 化学诱变和传统的 T-DNA 插入突变方法更省时、高效, 且可以快速鉴定 T-DNA 插入位点。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料的种植与培养

T-DNA 突变体文库筛选的背景材料是拟南芥

突变体 *qrt1-2*。将 *qrt1-2* 的种子放入消毒液 (次氯酸钠:水 = 2:1, 每 1 mL 消毒液含 10  $\mu$ L 10% Triton X-100) 中浸泡 15 min, 再以无菌水冲洗 4 次, 铺于 1/2 MS 固体培养基<sup>[14]</sup> 上, 并置于拟南芥恒温培养箱中培养, 约 1 周后移苗至温室栽培。栽培基质为营养土:蛭石 = 3:1; 浇灌营养液 (配方详见附录) 至浸透; 光照周期为 16 h 光照/8 h 黑暗, 照明光源为日光灯; 温度 22℃。在拟南芥生长过程中, 应及时喷洒农药除虫和浇灌营养液, 并剪除侧枝以保证主枝的良好生长。同时, 根据需要选取生长旺盛的拟南芥营养器官或生殖器官进行实验。

### 1.2 植株的转化

构建拟南芥 T-DNA 突变体文库: 在二元载体 pCAMBIA1302 的插入元件上增加花粉特异荧光筛选标记基因 (*pLAT52::EGFP*), 并利用农杆菌菌株 GV3101 进行转化; 采用拟南芥浸花法<sup>[15]</sup> 将已开花 1 ~ 2 d 的拟南芥突变体 *qrt1-2* 的花序浸入农杆菌转化菌液 (含 5% 蔗糖、0.02% ~ 0.05% SilwetL-77) 中, 停留 30 s 取出, 加盖保湿过夜; 第二天移除盖子后继续栽植培养, 待转基因植株荚果充分成熟后收获  $T_0$  代种子。

### 1.3 突变体的筛选和鉴定

突变体的筛选与鉴定过程详见图 1。将  $T_0$  代转基因种子消毒后均匀铺于 1/2 MS 潮霉素 (浓度为 50 mg/L) 抗性培养基上, 4℃避光培养 2 d; 然后转移到温室培养 7 ~ 10 d, 再选出现绿色真叶的  $T_1$  代阳性拟南芥突变体幼苗移栽到蛭石基质中; 当阳性植株开花时用荧光显微镜 (型号为 FV1000) 对花粉进行荧光筛选, 并保留四分体花粉中仅有 2 个具 GFP 荧光花粉粒的植株, 待其成熟时解剖角果分析种子的败育情况。针对有种子败育表型的  $T_1$  代杂合突变体植株 (部分败育, 自交结实), 自交并收取  $T_1$  代种子后, 均匀铺于 1/2 MS 潮霉素抗性培养基上筛选, 开花时通过观察花粉荧光判断  $T_2$  代转基因植株是纯合子还是杂合子; 针对没有产生种子败育表型的  $T_1$  代植株, 自交后收取种子直接播种于蛭石基质中, 开花时通过观察花粉荧光判断  $T_2$  代植株是否为纯合子。若  $T_2$  代植株全部为杂合子, 自交并进行  $T_3$  代突变体植株的筛选, 判断在

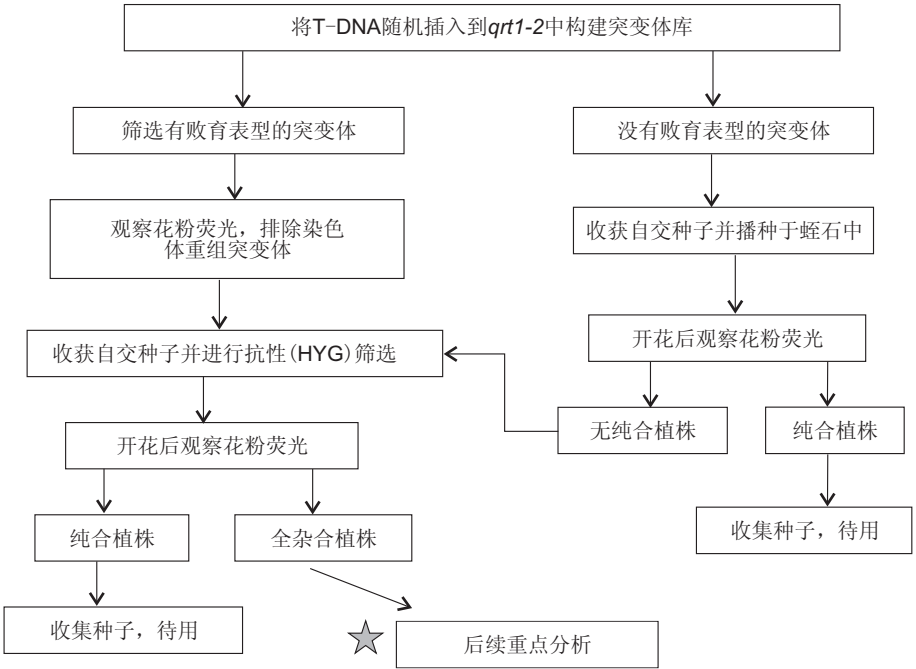


图 1 拟南芥转基因突变体的筛选步骤  
Fig. 1 Steps of *Arabidopsis thaliana* transgenic mutant screening method

纯合突变的情况下能否出现败育表型(纯合突变表型可能为种子不萌发或幼苗期死亡)。

1.4 T-DNA 插入位点的确定

采用反向 PCR 扩增技术确定 T-DNA 的插入位点：(1)采用 CTAB 法提取拟南芥突变体植株新鲜叶片(40 mg)的基因组 DNA，并溶于 100 μL 双蒸水中；(2)采用单酶切基因组 DNA(图 2：A)。内切酶常常用 EcoR I 和 Hind III (NEB 公司)，也可选用 Sac I、Kpn I、BamH I、Xba I、Pst I 等，酶切体系为 50 μL，37℃反应过夜；(3)连接。用普通回收试剂盒回收酶切产物后用 30 μL 双蒸水洗脱，连接体系为 50 μL，4℃连接过夜；(4)以每份连接产物为模板进行巢式 PCR 扩增，其反应体系为 50 μL (图 2：B)。巢式 PCR 第一轮扩增引物为 AP1 (5'-CCCAGGCTTTACACTTTATGCTTC-3') 和 AP2 (5'-CTATAGGGTTTCGCTCATGTGTTG-3')；将第一轮扩增产物稀释 40 倍作为第二轮 PCR 反应的模板，扩增引物为 AP3 (5'-GCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTG-3') 和 AP4 (5'-TCTAATTCCTAAACCAAAATCCAGTAC-3')；第二轮 PCR 扩增产物经割胶回收后使用引物 LB-S (5'-CCAAAATC-CAGTACTAAAATCCAG-3') 测序。

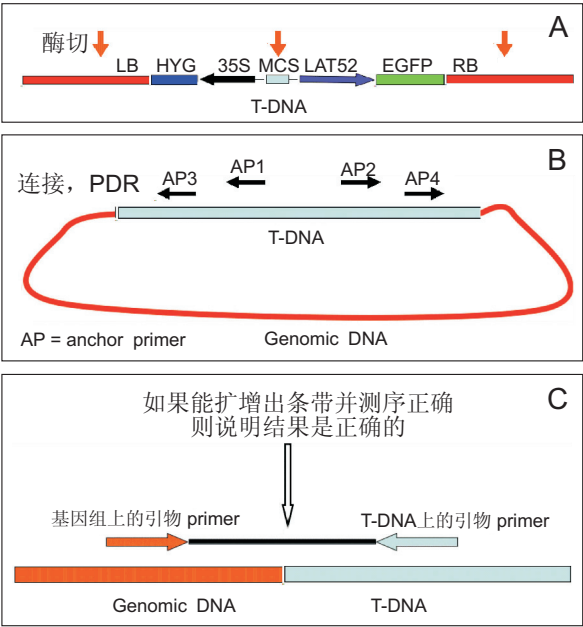


图 2 反向 PCR 确定 T-DNA 插入位点和验证 T-DNA 插入位点结果的正确性  
Fig. 2 Identification of the T-DNA insertion site by inverse-PCR and verifying the T-DNA insertion site

1.5 验证 T-DNA 插入位点的正确性

将反向 PCR 扩增产物的测序结果与拟南芥基因组序列进行 BLAST 比对，并根据相符的(序列一致性 > 90%)拟南芥基因组序列设计特异引物，并与 T-DNA 元件序列引物 LBVS (5'-CCAAAATC-CAGTACTAAAATCCAG-3') PCR 扩增对应的突变体基因组，验证筛选到的突变体植株 T-DNA 插入位点的正确性(图 2: C)。

2 结果与分析

2.1 背景材料的确定

突变体库构建和筛选体系中，我们选用 Columbia 野生型拟南芥 *quartet* 突变体 (*qrt1-2*) 作为背景材料。Columbia 野生型拟南芥的小孢子在四分体发育至成熟花粉粒阶段会分开(图 3: A)，而 *quartet* 突变体的小孢子在四分体发育至成熟花粉粒阶段不分开，其花粉被称为四分体花粉(图 3: B)，但不影响植株的花粉竞争性与角果育性。

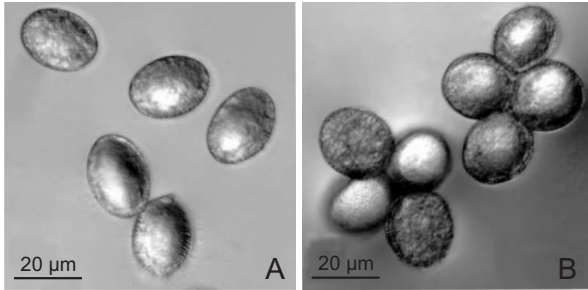


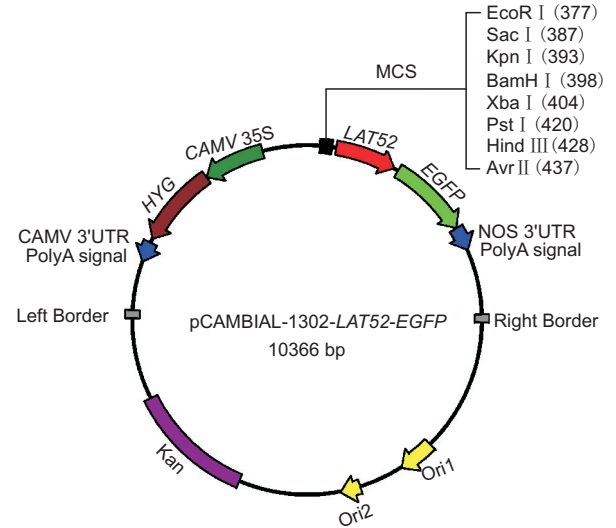
图 3 Columbia 野生型拟南芥的花粉 (A) 及突变体 *qrt1-2* 的花粉 (B)  
Fig. 3 Wild-type *Arabidopsis thaliana* pollen (A) and *qrt1-2* pollen (B)

*qrt1-2* 花粉母细胞减数分裂形成的小孢子四分体联结在一起，相比 Columbia 野生型拟南芥更有利于进行遗传分析，当转入荧光蛋白后其四分体花粉在杂合背景下表现为 2 个花粉有荧光、2 个花粉无荧光。因为 T-DNA 插入位点与荧光标记连锁，在 *qrt1-2* 突变体库中可以轻易排除多位点插入突变体。如果突变体含有多拷贝 T-DNA 插入，则  $T_1$  代转基因植株的四分体花粉中有 3 个或 4 个花粉粒具荧光，该突变体植株将会被丢弃。如果采用 Columbia 野生型拟南芥作为突变体库筛选的背景材料则需要统计荧光花粉的比例才能确定是否为单拷

贝插入突变体，拟南芥突变体 *qrt1-2* 作为背景材料则大大提高了我们定向筛选突变体的效率。

2.2 T-DNA 载体元件的改造

在载体 pCAMBIA1302 的基础上，我们对其 T-DNA 元件进行了一些改造(图 4)。即在载体



HYG: Hygromycin; CAMV35S: CAMV35S promoter; MCS: Multiple cloning sites; EGFP: Enhanced Green Fluorescent Protein; Kan: Kanamycin.

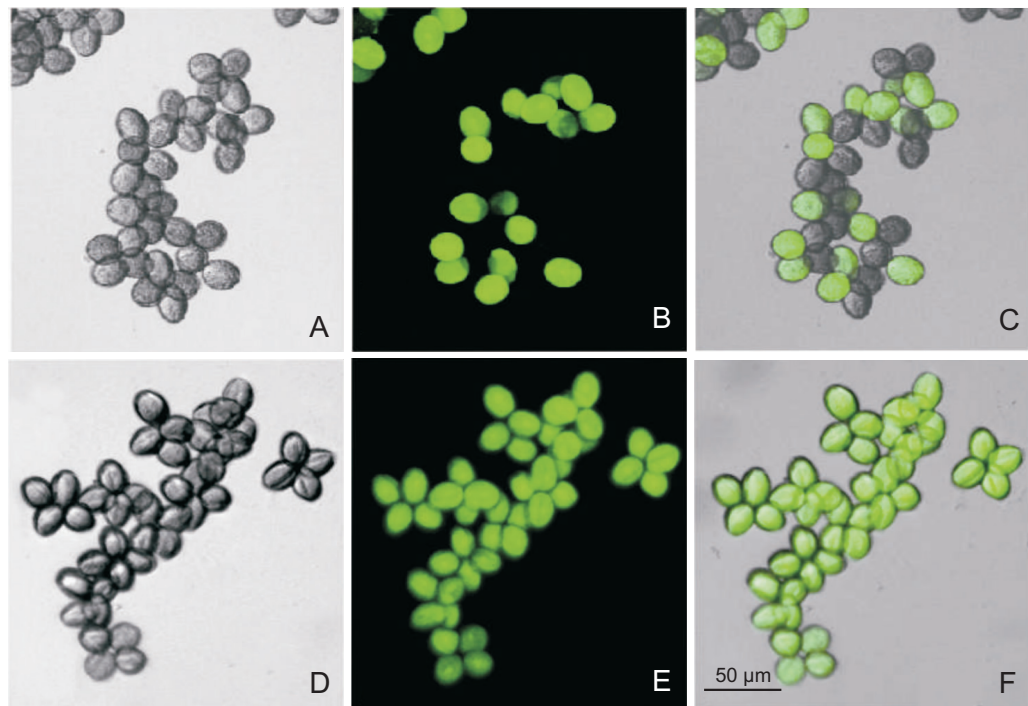
图 4 pCAMBIAL-1302-LAT52-EGFP 质粒图谱  
Fig. 4 Plasmid map of pCAMBIAL-1302-LAT52-EGFP

pCAMBIA1302 的 T-DNA 元件上引入一个在花粉中大量表达的启动子 *pLAT52* 驱动的 EGFP 花粉荧光标记，使载体 T-DNA 与花粉荧光连锁，这样就可在不明确插入位点位置的情况下，通过观察花粉荧光快速鉴定突变体植株是纯合还是杂合。另外，在多克隆位点 (MCS) 处预留足够的单酶切位点，以利于后续 T-DNA 位点的确定。

2.3 杂合植株与纯合植株的筛选

为了定向筛选受精及早期胚胎发生相关突变体，需要快速确定转基因植株是否为纯合突变体(有可能出现纯合致死现象)。花粉启动子 *pLAT52* 驱动的 EGFP 的表达会使突变体花粉发出绿色荧光，我们可以根据四分体花粉的荧光区分  $T_2$  代转基因植株是纯合突变体还是杂合突变体(图 5)。在  $T_1$  代拟南芥转基因植株中，如果突变体含有单拷贝 T-DNA 插入，则其四分体花粉中会出现 2 个具有 GFP 荧光的花粉粒，说明其基因组中含有 T-DNA 插入片段，而另外 2 个观察不到荧光的花粉粒是野





A、B、C：杂合突变体植株，四分体花粉中仅有两个花粉具绿色荧光；D、E、F：T<sub>2</sub>代纯合突变体植株，四分体花粉中 4 个花粉粒都具有绿色荧光；A、D：明场通道；B、E：绿色荧光通道；C、F：叠加。  
A, B, C: Heterozygous mutant. Two of the four mature pollen from the same meiotic product have green fluorescence; D, E, F: Homozygous mutant plants screened in T<sub>2</sub> generation. All four mature pollen from the same meiotic product show green fluorescence; A, D: Bright images; B, E: GFP images; C, F: Overlay images.

图 5 通过花粉荧光快速鉴定杂合或纯合突变体植株

Fig. 5 Rapid identification of heterozygous and homozygous mutants through pollen fluorescence

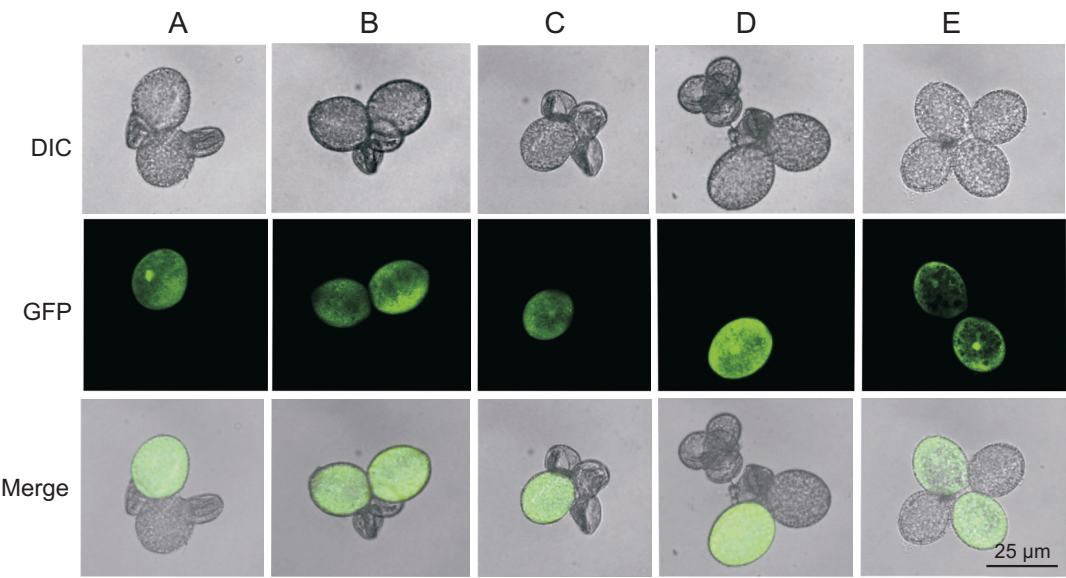
生型花粉 (图 5: C)。含有单拷贝 T-DNA 插入的 T<sub>2</sub>代转基因突变体植株中，如果四分体花粉中 4 个花粉粒都具有荧光，则表明该植株是纯合突变体 (图 5: E、F)。如果所有 T<sub>2</sub>代转基因突变体植株的四分体花粉中都只有两个花粉具有荧光，表明该 T<sub>2</sub>代突变体植株中无纯合突变体。

2.4 假阳性败育突变体的排除

T-DNA 插入突变的花粉可以发出绿色荧光，且花粉的表型与花粉所发出的 EGFP 荧光连锁，若所有具荧光的花粉表型都具有相似缺陷，则可判断为该表型缺陷是由 T-DNA 插入突变引起的，反之则不是。T-DNA 插入常导致很高频率的染色体易位<sup>[16]</sup>，从而使 50%的配子体败育，呈现典型的配子体突变体表型，但这是一种由染色体的不对称引起的假阳性，不是由于 T-DNA 插入导致的单基因突变引起<sup>[17]</sup>，因此在筛选受精及早期胚胎发生相关突变体的过程中必须将假阳性突变体排除。本实验中不具有荧光的花粉是野生型花粉，其发育应该

是正常的，但在染色体易位突变体中不具有荧光的花粉发生了败育 (图 6)，显示败育与荧光 (T-DNA) 并不连锁，且败育也不是由于 T-DNA 插入导致的单基因突变引起的。染色体易位具体表现为四分体花粉中无荧光的花粉粒皱缩，而且败育是随机的，花粉群体中四分体花粉败育 1 ~ 4 个花粉的情况均存在 (图 6: A ~ D)，并以 2 个花粉败育的比例最高。T-DNA 单拷贝插入的突变体花粉表型 (图 6: E) 是我们需要筛选的理想表型。

由表 1 可见，突变体库中染色体易位突变的频率非常高，达到 946 个，占突变体总数的 12.5%。染色体易位突变体都具有败育表型，而真正的受精和早期胚胎发生相关突变体数只有 38 个，仅占突变体总数的 0.50%。如果用传统的方法从众多的突变体中筛选出真正的受精和早期胚胎发生相关突变体会非常的困难，而利用本研究建立的筛选新方法会大大加速这一进程，并节省大量的人力、物力和时间。



A ~ D: 染色体易位导致的假阳性败育突变体，但具有绿色荧光的花粉没有败育；E: T-DNA 单拷贝插入的突变体对照。  
A – D: Mutants with chromosome translocation with aborted pollen. Pollen with green fluorescences show no abortion; E: Control mutant with single copy T-DNA insertion with no evident phenotype in pollen.

图 6 染色体易位导致的假阳性败育突变体  
Fig. 6 False positive sterility mutants caused by chromosome translocation

表 1 突变体库数据统计  
Table 1 Statistics of mutant library

突变体 总数 No. total mutants	双插入突 变体数 No. double insertion mutants	染色体易位 突变体数 No. chromosomal translocation mutants	候选受精和早 期胚胎发生相 关突变体数 No. candidate fertilization and embryogenesis mutants
7583	844	946	38

2.5 T-DNA 插入位点的确定

获得目标突变体后，需进一步确认突变的位点。与诱变突变体相比，T-DNA 插入突变体的优势在于其 T-DNA 插入位点可以快速确定。基于改造的载体序列，利用反向 PCR 能够快速批量得到 T-DNA 插入位点(图 2)。反向 PCR 主要是用限制性内切酶对突变体基因组 DNA 进行酶切，并将酶切片段自连接形成环状 DNA 分子<sup>[18,19]</sup>，然后利用特异引物对环形 DNA 分子进行 PCR 扩增<sup>[20]</sup>。由于两轮 PCR 采用的都是特异引物，因此扩增效率非常高。

3 讨论

被子植物的受精是世代交替的一个转折点，也

是新一代孢子体发育的起点，受精与早期胚胎发生的进程对植物有性生殖繁育具有决定作用。为了深入研究受精与早期胚胎发生的分子调控机制，需要构建突变体库并进行筛选以获得相关重要基因的突变体。模式植物拟南芥受精和早期胚胎发生相关基因突变体的筛选是一个工作量大、耗时长、获得有效突变体植株少的艰难过程。笔者所在课题组经过优化改良的筛选拟南芥受精和早期胚胎发生相关基因突变体的新方法，相较于物理辐射诱变、化学诱变及常规的插入突变凸显出如下优势：

(1)突变位点与荧光标记连锁，可在不确定插入位点位置的情况下快速鉴定 T<sub>2</sub>代拟南芥突变体植株是纯合还是杂合。而传统意义上的 T-DNA 插入突变必须在 T-DNA 插入位点已知的前提下，才能通过 PCR 扩增方法确定 T<sub>2</sub>代植株是否为纯合体，或者在 T<sub>3</sub>代植株中通过抗性筛选确定是否为纯合突变体植株，因此鉴定常规的插入诱变产生的突变体是否为纯合突变植株显得较为困难。本研究建立的鉴定拟南芥受精与早期胚胎发生相关基因的新方法能够简单、快速、准确地鉴定突变体植株是否为纯合体，这对于定向筛选与受精和早期胚胎发生相关的重要基因有特殊意义，因

为与配子发育、受精等重要过程相关的基因突变常常纯合致死。

(2) 突变位点与花粉荧光连锁, 可在 *quartet* 突变体背景材料中轻易排除多位点插入突变。传统意义上的插入突变需要确定插入元件是否为单拷贝, 才能明确插入位点位置。如 Chen 等用农杆菌介导 Ds 转座因子转化拟南芥植株, 得到了一个突变体 CCG<sup>[21]</sup>, 但在突变体筛选过程中, 为了确定 Ds 转座子插入的拷贝数, 需要设计一段与其互补的探针并和待筛选材料进行 DNA 杂交, 此实验操作步骤繁琐、工作量大。本研究建立的鉴定拟南芥受精与早期胚胎发生相关基因的新方法能够通过检测花粉荧光快速鉴定突变体植株是否具有多拷贝的 T-DNA 插入, 如果突变体含有多拷贝 T-DNA 插入, 则 T<sub>1</sub> 代转基因植株四分体花粉中有 3 个或 4 个花粉粒具荧光, 该突变体植株将被丢弃。

(3) 易于排除染色体交换和染色体易位导致的假阳性败育突变体。染色体易位会导致 50% 配子体的败育, 呈现典型的配子体突变体表型。将染色体易位突变体当成配子体败育突变体进行研究会浪费研究者的时间与精力。传统的突变体构建方法很难将染色体易位这种突变与真正的配子体突变体区分开, 但本研究建立的鉴定拟南芥受精与早期胚胎发生相关基因的新方法可通过检测花粉荧光, 在 *quartet* 突变体背景中轻易排除染色体易位导致的假阳性败育突变体。

(4) 易于扩增 T-DNA 侧翼序列, 确认突变基因。获得目标配子体突变体后, 需进一步确认突变的位点。化学诱变突变的位点确认需要进行图位克隆, 实验花费时间较长(约 6 个月)<sup>[22]</sup>, 而本研究基于改造的 pCambia1302 载体序列, 利用反向 PCR 扩增技术能够快速批量确定 T-DNA 插入位点。

我们探索出的新方法已在筛选拟南芥受精和早期胚胎发生相关基因突变体上得到了成功应用, 并得到了一系列受精过程发生障碍以及早期胚胎败育的拟南芥突变体, 如表现为卵细胞不成熟、中央细胞极核不融合的 *GCD1* 突变体<sup>[23]</sup>。因此, 本研究建立的鉴定拟南芥受精与早期胚胎发生相关基因的新方法是一种效率高、针对性强、操作相对快捷方

便的拟南芥突变体筛选方法。

## 参考文献:

- [1] 曹冬梅, 范喜英, 王云山, 唐黎芳. 拟南芥激活标签突变体库的构建及突变体表型的分析[J]. 农业生物技术学报, 2008, 16(2): 292-298.
- [2] The *Arabidopsis* Genome Initiative. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*[J]. *Nature*, 2000, 408(6814): 796-815.
- [3] 孙万刚. 拟南芥突变体构建方法及目的基因分离鉴定技术[J]. 安徽农业科学, 2010, 38(18): 9433-9434.
- [4] Greene EA, Codomo CA, Taylor NE, Henikoff JG, Till BJ, Reynolds SH, Enns LC, Burtner C, Johnson JE, Odden AR, Comai L, Henikoff S. Spectrum of chemically induced mutations from a large-scale reverse-genetic screen in *Arabidopsis*[J]. *Genetics*, 2003, 164(2): 731-740.
- [5] Parry MA, Madgwick PJ, Bayon C, Tearall K, Hernandez-Lopez A, Baudo M, Rakszegi M, Hamada W, Al-Yassin A, Ouabbou H, Labhili M, Phillips AL. Mutation discovery for crop improvement[J]. *J Exp Bot*, 2009, 60(10): 2817-2825.
- [6] 宋磊, 杨仲南, 吴世福, 崔永兰. 拟南芥网状突变体 E-210 基因精细定位[J]. 植物科学学报, 2008, 26(5): 437-442.
- [7] Springer PS. Gene traps: tools for plant development and genomics[J]. *Plant Cell*, 2000, 12(7): 1007-1020.
- [8] An G, Lee S, Kim SH, Kim SR. Molecular genetics using T-DNA in rice[J]. *Plant Cell Physiol*, 2005, 46(1): 14-22.
- [9] Schneeberger RG, Zhang K, Tatarinova T, Troukhan M, Kwok SF, Drais J, Klinger K, Orejudos F, Macy K, Bhakta A, Burns J, Subramanian G, Donson J, Flavell R, Feldmann KA. Agrobacterium T-DNA integration in *Arabidopsis* is correlated with DNA sequence compositions that occur frequently in gene promoter regions[J]. *Funct Integr Genomics*, 2005, 5(4): 240-253.
- [10] 崔清志, 刘晓红, 陈惠明. EMS 诱变技术研究进展[J]. 湖南农业科学, 2013, 13(5): 7-9.
- [11] 阎双勇, 谭振波, 李仕贵. 水稻插入突变体库构建研究进展[J]. 中国生物工程杂志, 2004, 24(6): 48-53.
- [12] Brink RA, Cooper DC. Double fertilization and de-



velopment of the seed in angiosperms[J]. *Botanical Gazette*, 1940, 102(1): 1–25.

[13] Preuss D, Rhee SY, Davis RW. Tetrad analysis possible in *Arabidopsis* with mutation of the QUARTET ( QRT ) genes [ J ]. *Science*, 1994, 264 ( 5164 ): 1458–1460.

[14] Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures [ J ]. *Physiologia Plantarum*, 1962, 15(3): 473–497.

[15] Clough SJ, Bent AF. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*[ J ]. *Plant J*, 1998, 16(6): 735–743.

[16] 曾凡锁, 詹亚光. 转基因植物中外源基因的整合特性及其研究策略[ J ]. 植物学通报, 2004, 21(5): 565–577.

[17] 梁春莉, 刘孟军, 赵锦. 植物种子败育研究进展 [ J ]. 分子植物育种, 2005, 3(1): 117–122.

[18] Mathur J, Szabados L, Schaefer S, Grunenberg B, Lossow A, Jonas-Straube E, Schell J, Koncz C, Koncz-Kalman Z. Gene identification with sequenced T-DNA tags generated by transformation of *Arabidopsis* cell suspension[ J ]. *Plant J*, 1998, 13(5): 707–716.

[19] Souer E, Quattrocchio F, de Vetten N, Mol J, Koes R. A general method to isolate genes tagged by a high copy number transposable element[ J ]. *Plant J*, 1995, 7(4): 677–685

[20] 赵霞, 周波, 李玉花. T-DNA 插入突变在植物功能基因组学中的应用[ J ]. 生物技术通讯, 2009, 6 ( 20 ): 880–885.

[21] Chen YH, Li HJ, Shi DQ, Yuan L, Liu J, Sreenivasan R, Baskar R, Grossniklaus U, Yang WC. The central cell plays a critical role in pollen tube guidance in *Arabidopsis*[ J ]. *Plant Cell*, 2007, 19 ( 11 ): 3563–3577.

[22] Gross-Hardt R, Kagi C, Baumann N, Moore JM, Baskar R, Gagliano WB, Jurgens G, Grossniklaus U. LACHESIS restricts gametic cell fate in the female gametophyte of *Arabidopsis*[ J ]. *PLoS Biol*, 2007, 5(3): 494–500.

[23] Wu JJ, Peng XB, Li WW, He R, Xin HP, Sun MX. Mitochondrial GCD1 dysfunction reveals reciprocal cell-to-cell signaling during the maturation of *Arabidopsis* female gametes [ J ]. *Dev Cell*, 2012, 23 ( 5 ): 1043–1058.

附录：浇灌拟南芥的营养液配方

50 倍浓度的大量元素母液：		
硝酸钾 KNO <sub>3</sub>		95 g/L
硝酸铵 NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>		82.5 g/L
七水硫酸镁 MgSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O		18.5 g/L
磷酸二氢钾 KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>		8.5 g/L
100 倍微量元素母液：		
硼酸 H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>		0.62 g/L
碘化钾 KI		0.083 g/L
四水硫酸锰 MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O		2.23 g/L
二水钼酸钠 Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O		0.025 g/L
七水硫酸锌 ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O		0.86 g/L
五水硫酸铜 CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O		0.0025 g/L
六水氯化钴 Cl <sub>2</sub> Co·6H <sub>2</sub> O		0.0025 g/L
100 倍铁盐母液：		
七水硫酸亚铁 FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O		5.56 g/L
乙二醇四乙酸二钠 EDTA		7.46 g/L
100 倍钙盐母液：		
二水氯化钙 CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O		44 g/L

注：以上营养液配方是在 1/2 MS 培养基的基础上改良的。浇灌营养液时，将以上 4 种母液按大量元素溶液：微量元素溶液：钙盐溶液：铁盐溶液 = 4：2：2：1 的比例混合，再加水稀释成 0.5 倍浓度溶液即可。

(责任编辑：刘艳玲)