

Generation of Chemical Inducible Activation Tagging T-DNA Insertion Lines of *Arabidopsis thaliana*

ZHANG Jian^{1,*}, XU Jin-Xiang^{1,*}, KONG Ying-Zhen^{2,*}, JI Zhen-Dong^{1,3,*}, WANG Xing-Chun^{1,3,*}, AN Feng-Ying^{1,3,*}, LI Chao^{1,3,*}, SUN Jia-Qiang^{1,3}, ZHANG Su-Zhi^{1,3}, YANG Xiao-Hui¹, MU Jin-Ye^{1,3}, LIU Xin-Fang¹, LI Jia-Yang¹, XUE Yong-Biao², ZUO Jian-Ru¹^①

(1. State Key Laboratory of Plant Genomics, Institute of Genetics and Developmental Biology,

Chinese Academy of Sciences Beijing 100101, China.

2. Laboratory of Molecular and Developmental Biology, Institute of Genetics and Developmental Biology,

Chinese Academy of Sciences Beijing 100101, China.

3. The Graduate School, Chinese Academy of Sciences Beijing 100039, China)

Abstract Using an estrogen inducible expression XVE (LexA-VP16 Estragon Receptor) system we have generated approximately 40 000 independent T-DNA insertion lines of *Arabidopsis thaliana*. Segregation analyses of about 18 000 lines indicated that 51.6% of them contain single T-DNA insertions and that the average insertion number is 1.38 copies per line. Mutants displaying a variety of morphological alterations were identified including those that affect development of roots, hypocotyls, leaves, floral organs and seeds as well as the flowering time.

Key words *Arabidopsis thaliana*; inducible activation tagging mutants; T-DNA; XVE

化学诱导激活型拟南芥突变体库的构建及分析

张健^{1,*}, 徐金相^{1,*}, 孔英珍^{2,*}, 纪振东^{1,3,*}, 王兴春^{1,3,*}, 安丰英^{1,3,*}, 李超^{1,3,*}, 孙加强^{1,3}, 张素芝^{1,3}, 杨晓辉¹, 牟金叶^{1,3}, 刘新仿¹, 李家洋¹, 薛勇彪², 左建儒¹^①

(1. 中国科学院遗传与发育生物学研究所 植物基因组学国家重点实验室, 北京 100101;

2. 中国科学院遗传与发育生物学研究所分子发育生物学重点实验室, 北京 100101;

3. 中国科学院研究生院, 北京 100039)

摘要: 利用化学诱导激活 XVE (LexA-VP16 ER) 系统构建了一个包含 40 000 余个独立转化株系的拟南芥突变体库, 并对其中的 18 000 余个株系进行了初步的遗传学和表型分析鉴定。卡那霉素抗性分离比表明, 51.6% 的株系为单位点插入株系, T-DNA 插入的平均拷贝数为每株系 1.38 个。部分 T₁ 代和 T₂ 代植株表现出了可见的形态变异, 包括下胚轴长度、根长度、植株大小和颜色、叶子颜色和形态、开花时间、种皮颜色及结实情况等。对数个代

收稿日期: 2005-05-20 修回日期: 2005-06-26

基金项目: 国家高科技研究发展计划 (863) 项目 (编号: 2001AA225021 和 2003AA225021); 国家自然科学基金优秀创新团队项目 (编号: 30221002); 中国科学院知识创新工程重要方向性项目 (编号: KSCX2-SW-308) [Supported by Chinese National Programs for High Technology Research and Development (No. 2001AA225021 and 2003AA225021), the National Natural Science Foundation of China (No. 30221002) and Chinese Academy of Sciences (No. KSCX2-SW-308)]

*表示具有同等贡献

作者简介: 张健 (1964-), 女, 实验师, 研究方向: 植物功能基因组学

① 通讯作者。左建儒 (1962-), 男, 研究员, 博士生导师, 研究方向: 遗传学。E-mail: jrzuo@genetics.ac.cn

(C)1994-2021 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

表性突变株系表型及 T-DNA 插入位点侧翼序列进行了分析, 结果表明突变体的表型是由于 T-DNA 的插入造成的, 而且这些突变体中包括前人发现的 *AP2* 和 *AGAMOUS* 的等位基因。由于 T-DNA 标记或相邻的基因可被 XVE 系统诱导性的激活, 或被 T-DNA 破坏导致功能缺失, 该突变体库可以用于大规模筛选鉴定功能缺失性和功能获得性突变体。

关键词: 拟南芥; 诱导性激活; 突变体; T-DNA XVE

中图分类号: Q943 文献标识码: A 文章编号: 0379-4172(2005)10-1082-07

模式植物拟南芥全基因组测序的完成给植物生物学家们带来了海量的生物信息数据^[1], 大量基因的功能亟待鉴定。基于反向遗传学理论的插入敲除突变技术, 为此提供了强有力的手段。目前, 一些用于拟南芥基因鉴定和功能研究的大规模突变体库, 如 SALK^[2]、SAIL^[3] 等已经公开释放。此外, 还有大量用于特定筛选目的而构建的小规模突变体库, 如孙加强等^[4,5] 构建的 *pga22* 抑制子突变体库等。这些突变体库的应用, 极大的促进了高等植物基础理论的研究, 但仍存在着诸多缺陷, 如难以鉴定功能冗余基因以及胚胎和配子致死突变等^[6,7]。

插入突变体库的构建方法有许多种, 而目前应用较多的是 T-DNA 插入突变和转座子插入突变两种, 其原理都是在染色体上插入一段外源 DNA 序列而造成插入位点附近基因功能缺失或改变。相对于转座子的稳定性较差(如 *En1* 转座子)、工作量大(如 *Ac-Ds* 系统的组培、杂交), T-DNA 插入突变法具有很多优势。如: 易通过农杆菌转化, 插入的拷贝数低、稳定性高等^[8,9]; 而且, 现已证实 T-DNA 在基因组的整合位点基本上是随机分布^[10,11]。通过插入的外源 DNA 标签, 可迅速克隆鉴定突变基因, 因而 T-DNA 插入突变法已被广泛应用于各种植物的功能基因组研究^[2,4,5,7,9~17]。

传统的 T-DNA 插入突变体库, 是由携带抗性基因的 T-DNA 插入到基因内部或启动子区域而破坏基因的编码区域或表达方式, 因而可以用来筛选功能缺失性突变体, 该方法构建的突变体库已广泛用于基因功能研究并取得了很大成就。但正如前文所述传统的 T-DNA 插入突变体库存在明显的不足, 即不能筛选鉴定植物生长发育的关键基因(如胚胎发生或配子发育必需基因)和一些功能冗余基因, 而拟南芥和水稻等模式植物的基因组测序已经发现它们的基因组内普遍存在大量高度同源的功能冗余基因^[1,18,19]。因此而发展起来的激活标签法在一定程度上解决了这些问题^[6,7,13~15]。最初, 激活标签只是一种分离功能获得性突变体的方法^[14]。后来经过

改进, 携带有多拷贝 35S 启动子的 T-DNA 才用来构建突变体库。Kakimoto^[20] 用该方法转化拟南芥组织培养细胞, 成功地筛选鉴定出一个细胞分裂素信号转导的关键组分 CK II。

利用携带有 35S 启动子的 T-DNA 构建的功能获得性突变体库在一定程度上克服了传统方法的局限性, 但 35S 启动子近于组成型的表达水平同样会造成一些致死突变或不能得到突变体后代种子。因而, Zuo 等人^[21,22] 发展了一种高效的、严格依赖于动物雌激素诱导的植物表达系统, 即化学诱导型启动子 XVE 系统, 从而解决了致死性突变的难题。XVE 是一个融合转录因子的缩写, 分别表示细菌转录抑制子 LexA 的 DNA 结合域 (X)、VP16 的转录激活域 (Acidic transactivating domain V)、人类雌激素受体的调节亚基 (Regulatory region of estrogen receptor E)。XVE 表达载体上有 3 个转录单位: G10-90 为一种人工合成的强组成型启动子^[23], 用来启动 XVE 融合转录因子的转录; 选择性抗性标记基因; -46 35S 基础启动子与 8 个拷贝的 LexA 操纵子序列融合形成的人工启动子。其工作原理为: 在 G10-90 启动子控制下, XVE 融合转录因子组成型表达; 当加入雌激素, 雌激素和其受体结合, 导致 XVE 融合蛋白构象发生变化, 并由细胞质转移进入核内; 在细胞核内, LexA 的 DNA 结合域特异性识别 LexA 操纵子区, 以至使 VP16 的转录激活域激活 -46 35S 启动子, 高水平表达其下游的目标基因。靶位基因的功能获得和缺失将被 XVE 化学诱导表达系统紧密且相互交叉地控制, 使得被标记遗传学位点的表型可以在给定的发育时期表达。现已证明, XVE 系统除严格依赖于雌激素外, 还可根据雌激素的加入剂量严格地控制下游基因的表达水平^[4]。我们利用该系统构建了一个超过 40 000 个独立突变株系的拟南芥突变体库, 其中部分突变体已经向国内非盈利性科研机构公开释放(详见 <http://www.genetics.ac.cn/IGDB/new/tz146.htm>)。我们也对其中 18 000 株 T₁ 和 T₂ 代株系进行了初

步的遗传学和表型特征分析及其部分分子生物学分析。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 拟南芥材料、农杆菌和质粒

本实验构建突变体库所用材料为拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 的 Columbia 0 (Col0) 生态型和 Wassilewskija (WS) 生态型。在获得的突变体中, Col0 生态型的突变体约有 30 000 株系, WS 生态型的突变体约有 10 000 株系。

转化用农杆菌菌株为 GV3101。XVE 系列表达载体质粒为 pER16^[21, 22], 其 T-DNA 区域物理图谱如图 1 所示, 筛选标记基因为卡那霉素抗性基因 *NPTII*。

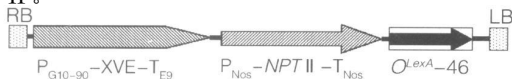


图 1 XVE 系列载体 pER16 中 T-DNA 区域物理图谱
T-DNA 的右边界和左边界间包含有两个转录单位和 $O^{LexA-46}$ 启动子; G10 90 强启动子组成型表达 XVE 融合基因, T_{E9} 为 *RBCS E9* 的 poly(A) 加尾序列; *Nopaline Synthase* (*NOS*) 基因启动子表达的卡那霉素抗性基因 *Neomycin Phosphotransferase II* (*NPT II*), T_{Nos} 为该基因的 poly(A) 加尾序列; $O^{LexA-46}$ 为 8 个拷贝的 LexA 操纵子序列与 CaMV-46 35S 基础启动子融合而成的人工启动子(改编自 Zuo 等^[21, 22])。

Fig 1 A diagram of the chemical inducible activation tagging vector pER16

Only the T-DNA region is shown in the diagram. Two transcription units are included between the right border (RB) and the left border (LB). The G10 90 promoter constitutively drives the XVE chimeric gene which is terminated by a *RBCS E9* poly(A) addition sequence. The *Nopaline Synthase* (*NOS*) promoter controls expression of the *Neomycin Phosphotransferase II* (*NPT II*) gene terminated by a *NOS* polyadenylation sequence. The $O^{LexA-46}$ promoter consists of eight copies of the LexA operator sequence fused to the CaMV-46 35S promoter (Modified from Zuo *et al.*^[21, 22]).

1.1.2 基本植物和培养基

MS 培养基: 1×MS 盐^[24], 3% 蔗糖, 0.8% 琼脂, pH 5.7, 121℃ 湿热灭菌 20 min。卡那霉素为鼎国生物工程公司生产, 雌激素为 Sigma 公司生产的 17-β 雌二醇 (17-β-estradiol), 3-17-β-dihydroxy-

1, 3, 5(10)-estratriene)。

LB 液体培养基: Trypton 10 g, Yeast extract 5 g, NaCl 10 g, 溶解后调 pH 7.0, 定容至 1 L。固体 LB 培养基每升另加入 15 g 青岛产琼脂粉。

1.2 方法

1.2.1 拟南芥的生长与真空转化

拟南芥种子用 10% 漂白水浸泡灭菌 10~15 min, 无菌水洗 3~4 次, 然后播种于 1/2 MS 固体培养基上。4℃ 下春化处理 3 d 后, 在 22℃、16 h 光照下生长 2 w, 转移到 1/3 B5 培养液浸泡过的蛭石中, 待长出花蕾 (40 d 左右) 后进行农杆菌抽真空转化。真空转化参照 Bechold 等^[25] 的方法并稍加修改: 将剪枝后 4~6 d 的植株倒置于含转化缓冲液的玻璃瓶中, 抽真空, 维持 0.05 Pa 压力 5 min, 取出种植盆, 侧放并覆盖塑料薄膜以便维持湿润, 24 h 后直立常规培育。为提高转化效率, 1 w 后可再重复抽真空一次。

本实验除特别说明外, 所采用的培养温度为 22℃, 光照强度为 80~120 μE²/m²/s, 光照周期为 16 h 光照/8 h 黑暗。

1.2.2 转基因植物的筛选和 T₁ 代植物的抗性分离鉴定

将 T₀ 代种子播种于含有 50 mg/L 1/2 卡那霉素的 MS 培养基上萌发, 挑选抗性植株转移到 MS 培养基生长 10 d 左右, 再转至 1/3 B5 培养液浸泡过的蛭石基质上培养。

T₁ 代种子播于含有 20 mg/L 卡那霉素和 10 mmol/L 17-β 雌二醇的 MS 培养基上。经 3 d 春化处理, 在 22℃、16 h 光照下萌发。5~7 d 后进行抗性分离统计分析以及表型观察, 同时挑选抗性植株转移到常规 MS 培养基上继续生长 10 d 左右, 再转移到蛭石基质扩繁种子。

1.2.3 T-DNA 插入位点的鉴定

T-DNA 插入位点的鉴定利用 TAIL-PCR (Thermal Asymmetric Interlaced Polymerase Chain Reaction) 方法^[26] 进行。根据 pER16 表达载体 T-DNA 插入片段的左边界设计的巢式 PCR 引物为:

LexA3: 5'-ATCATCCCCTCGACGTACTGTAC-3';

LexA4: 5'-CTGGTTTTATATACAGCAGTCG-ACG-3';

LexA5 5'-AGTCGAGGTAAGATTAGATATGG-3';

LexA6 5'-TTGGAGAGGACACGCTGAAGC-3';

随机引物为:

AD1 5'-NTCGA(G/C)T(A/T)T(G/C)G(A/T)GTT-3';

AD2 5'-NGTCGA(G/C)(A/T)GANA(A/T)GAA-3';

AD3 5'-(A/T)GTGNAG(A/T)ANCANAGA-3';

AD4 5'-NGTA(G/C)A(G/C)(A/T)GTNA(A/T)CAA-3'.

2 结果

2.1 拟南芥 T-DNA 插入突变体的获得

利用农杆菌介导的方法抽真空转化拟南芥 Col0 和 WS 花蕾, 收获种子后播种于含有适量卡那霉素 (50 mg/L) 的 MS 培养基。培养 1 w 左右, 挑选 T₁ 抗性植株转移到 MS 培养基上生长 10 d 左右, 再转移到蛭石基质培养, 并收获 T₁ 种子。到目前为止, 已经获得 40 000 余个独立转化株系。

2.2 拟南芥 T-DNA 插入突变体的抗性鉴定及结果分析

由于 NOS 启动子较弱并且突变体中抗性基因表达水平存在差异, 我们在分析鉴定 T₂ 后代的预实验中选取了两个筛选条件, 即卡那霉素浓度分别为 50 mg/L 和 20 mg/L。结果表明, 在卡那霉素浓度为 50 mg/L 时, T₂ 植株抗性较差, 而浓度为 20 mg/L 时抗性分离比较好。此外, 50 mg/L 卡那霉素浓度下的非抗性植株或抗性较弱的株系在 20 mg/L 条件下具有明显的抗性; 分子生物学分析证明其均为 T-DNA 插入突变体。因此, 在后续实验中, 我们主要选用 20 mg/L 卡那霉素的筛选条件。

我们对 18 000 个 T₂ 代突变体进行卡那霉素抗性的遗传分离分析, 结果见表 1。表 1 的统计结果表明, 约有 10% 的 T₂ 群体对卡那霉素敏感, 可能为没有插入的株系或 NPT II 基因沉默导致。在分析的群体中, 单位点插入、双位点插入和 3 位点插入突变体的比例分别为 51.6%、29.2%、9.5%。需要指

出的是, 卡那霉素抗性分离比为 1:1 和 2:1 的突变株系可能分别为配子和胚胎致死突变体, 我们将其归为单位点插入株系。统计分析表明, 每株系平均插入 T-DNA 拷贝数为 1.38 与已知的 T-DNA 插入突变体库^[2, 27]基本一致。

表 1 T₂ 代转基因植株的抗性卡那霉素分离比分析
Table 1 Segregation analysis of T₂ transgenic lines

Kan ^R / Kana ^S	Number of lines	%	Insertion
0	1 746	9.7	0
1:1	646	3.6	1
2:1	1 059	5.9	1
3:1	7 583	42.1	1
15:1	5 251	29.2	2
63:1	1 715	9.5	3
Total	18 000	100	-

2.3 部分突变体的表型分析及分子生物学鉴定

在正常生长条件下, 大部分 T₁ 代转基因植株能够正常生长并产生种子, 与野生型相比无明显可见表型。但也有一些突变体具有明显异常的表型特征, 如下胚轴长度、根的长度、植株大小或颜色、叶子形态、花的形态和开花时间、种皮颜色以及结实情况等。以下将选几个有代表性的特例进行分析。

转基因株系 d240 (图 2 A)、e511 的 T₁ 代植株表型均正常, 但 T₂ 代分离出约 1/3 的黄化或白化植株。叶片的黄化从较老的叶片开始, 以后逐渐枯萎以至于死亡。与这 2 个突变体不同, v35 是一个条件性黄化突变体 (图 2 B): 该突变体在培养皿中生长完全正常, 但是若直接播种在蛭石中, 从出现第一对真叶开始出现黄化现象 (子叶正常), 在开花前整株死亡。进一步的实验表明, 该突变体的这种表型可能与湿度有关。d240 卡那霉素抗性分离比为 3:1 且黄化表型与抗性基因共分离, 表明 d240 是由于单插入造成的隐性突变。上述突变体由于长势较弱, 育性较低, 纯合植株很难收到种子, 突变体要靠杂合植株保存。

除以上植株黄化突变体外, 还有一些突变体颜色正常而形态发生了改变。j62 (图 2 C) 植株矮小, 生长缓慢, 不能正常结实。突变体 d464 (图 2 D) 植株大小与野生型无明显差异, 但该突变体叶柄较短 (或无叶柄), 而且叶片较圆, 为显性突变体。

下胚轴长度受光、乙烯、生长素等因素的影响。在我们构建的突变体库中也有一些下胚轴异常突变体, 如 q572 (图 2 E) 和 q625 等。突变体 c587 和

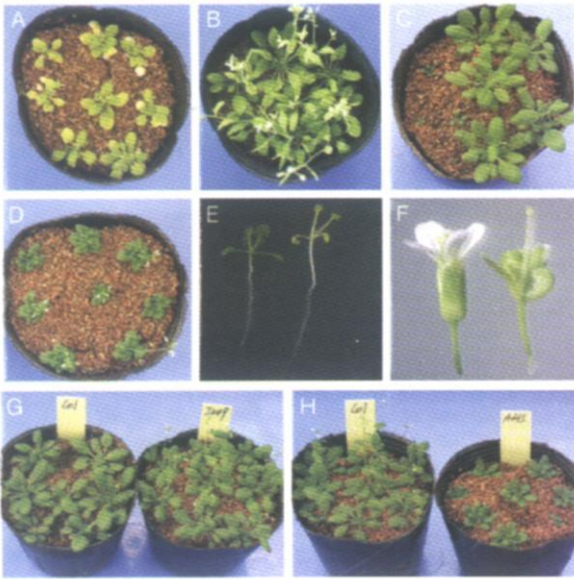


图 2 部分突变体表型特征分析

A d240的黄色或白化表型; B i735的黄色或白化表型; C j262的矮化表型; D d464叶柄显性突变表型; E q572(右)下胚轴异常突变表型, 左边为野生型对照; F c587(右)花形态突变表型, 左边为野生型对照; G: p249(右)隐性早花突变表型, 左边为野生型对照; H: a645(右)晚花突变表型, 左边为野生型对照。

Fig 2 Phenotypic analysis of representative mutants

A B each phenotype of d240; B B each phenotype of i735; C: Dwarf phenotype of j262; D: Dwarf phenotype of d464 (dominant); E: Abnormal hypocotyl development of q572 (right left is a WT Co-10 seedling); F: Abnormal flower development of c587 (right left is a WT Co-10 flower); G: Early flowering phenotype of p249 (right left WT Co-10); H: Late flowering phenotype of a645 (right left WT Co-10).

a592花形态发生了改变, 其表型分别类似前人报道的 ap2 (apetalab2)和 ag (agamous)突变体^[28]; c587的萼片变成了叶片, 而花瓣变成了雄蕊(图 2 F); a592的雄蕊变成了花瓣。侧翼序列分析表明, 突变体 c587中, T-DNA的左边界插在了 AP2 基因(AT4G36920) 1 306 bp处, 该基因可能完全被敲除。而分别利用 4 条 LexA 引物与 AG 基因(AT4G18960)的特异引物配对, 从 a592突变体中可以扩增出预期的梯度片段。这说明 C587和 A592分别是 AP2和 AG 的等位基因。除此之外, 还有一些花期发生了明显改变的突变体。突变体 i183、p249(图 2 G)和 261 3 个转基因株系都是隐性早花突变体, 在培养温度为 22℃左右, 光照强度

为 80~120 μ E²S 光照周期为 16 h光照/8 h黑暗的条件下, 开花时间比 Co-10 早 10 d左右; 而 a645(图 2 H)则明显为一个晚花突变体。我们也通过特异性筛选分离鉴定了若干细胞分裂素^[4,5]和细胞凋亡突变体(待发表)。

XVE系统是一个化学诱导性激活表达系统。我们通过筛选约 5 000个独立株系, 分离鉴定了两个依赖于雌二醇诱导剂的功能获得性显性突变体 oij1和 oij2。上述两个突变体分别为胚胎和胚胎后致死突变(待发表)。

3 讨论

我们通过农杆菌介导的 T-DNA抽真空转化法, 筛选获得拟南芥 40 000余个 T-DNA 独立转化株系。通过对 18 000个 T₂代突变体的遗传分离分析, 我们发现单插入突变体占 51.6%, 而平均插入 T-DNA 拷贝数为 1.38个, 和目前已知的 T-DNA 插入突变体库基本一致^[2,27]。表型分析发现了许多具有明显异常表型的突变体, 其中包括已发表的 ap2和 agamous等。对几个典型突变体的分析表明, 本突变体库完全可以用于正向遗传学研究, 通过筛选鉴定具有特定表型效应的突变体(包括功能获得性和功能缺失性突变体), 来研究突变基因及其功能。通过特异性筛选, 我们分别分离鉴定了数十个细胞凋亡和细胞分裂素突变体(待发表)。目前已有部分突变体面向国内非盈利性科研机构免费公开释放(详见 <http://www.genetics.ac.cn/GDB/new/tz146.htm>)。

突变体 T₂代的筛选鉴定过程中, 发现了 646株突变体抗性分离比为 1:1株系, 该类突变体可能为配子发育缺陷的突变体。除此之外, 还有 1 059株突变体单株表现为 2:1的抗性分离比, 可能是胚胎致死突变体。我们在目前的小规模筛选中, 分离鉴定了两个受雌二醇诱导剂调控的功能获得性突变体。由于两个突变体都是显性致死, 通过常规的组成型激活标签系统是很难分离鉴定的, 由此证明了诱导性激活系统的优点。但是我们目前分离到的依赖于诱导剂的、具有明显形态表型的突变体较少(仅两个)。其原因可能是该类突变体需要 T-DNA 左边界插在启动子区域(图 1), 相对而言机率较低。另一方面, 过量表达后具有明显形态表型的基因数量较少, 但利用特异性或条件性筛选可能分离到特

异性的功能获得性突变体。

目前, 我们已对小部分插入突变体进行了侧翼序列分析(待发表)。化学诱导性激活突变体库的构建以及通过分子生物学方法大规模鉴定 T-DNA 插入位点, 建立侧翼序列的数据库, 将为植物功能基因组学研究提供独特的实验材料。

致谢: 周明、石安静和张纯花同志参加部分工作, 储成才研究员认真审阅本文并提出宝贵建议, 在此一并致谢。

参考文献 (References):

- [1] *Arabidopsis* Genome Initiative. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 2000 408(6814): 796~815.
- [2] Alonso JM, Stepanova AN, Leisse TJ, Kim C, Chen H, Shinn P, Stevenson D, Zimmernan J, Barajas P, Cheuk R, Gadriñab C, Heller C, Jeske A, Koeseema E, Meyers C, Parker H, Prednis L, Ansari Y, Choy N, Deen H, Geait M, Hazari N, Hohn E, Kames M, Muholand C, Ndubaku R, Schmidt I, Guzman P, Aguilar Henonin L, Schmidt M, Weigel D, Carter D, E Marchand T, Risseuw E, Boudgen D, Zeko A, Crosby W, L Berry C, Ecker J R. Genome wide insertional mutagenesis of *A. thaliana*. *Science* 2003 301(5633): 653~657.
- [3] Sessions A, Burke E, Presting G, Aux G, McElver J, Patton D, Detric B, Ho R, Baowaden J, Ko C, Clarke J, D, Cotton D, Bullis D, Snel J, Mguel T, Hutchison D, Kimmerly B, Mittel T, Katagiri F, Glazebrook J, Law M, Goff S A. A high throughput *Arabidopsis* reverse genetics system. *Plant Cell* 2002 14(12): 2985~2994.
- [4] Sun J, Niu Q, W. Takowski R, Zhen G, B. Takowska D, Sandberg G, Chua N H, Zuo J. The *A. thaliana* *AtIPT8/PGA22* gene encodes an isopentenyl transferase that is involved in *de novo* cytokinin biosynthesis. *Plant Physiol* 2003 131(1): 167~176.
- [5] Sun J, Hirose N, Wang X, Wen P, Xue L, Sakakibara H, Zuo J. *Arabidopsis* *SOB3/AENT8* gene encodes a putative equilibrative nucleoside transporter that is involved in cytokinin transport in plants. *J Integrative Plant Biol* 2005 47(5): 588~603.
- [6] Jeong D H, An S, Kang H G, Moon S, Han J J, Park S, Lee H S, An K, An G. T-DNA insertional mutagenesis for activation tagging in rice. *Plant Physiol* 2002 130(4): 1636~1644.
- [7] Nakazawa M, Ichikawa T, Ishikawa A, Kobayashi H, Tsuhara Y, Kawashina M, Suzuki K, Mub S, Matsuim. Activation tagging: a novel tool to dissect the functions of a gene family. *Plant J* 2003 34(5): 741~750.
- [8] Jeon JS, Lee S, Jung K H, Jun S H, Jeong D H, Lee J, Kim C, Jang S, Yang K, Nam J, An K, Han M, J, Sung R, J, Choi H S, Yu J H, Choi J H, Cho S Y, Cha S S, Kim S J, An G. T-DNA insertional mutagenesis for functional genomics in rice. *Plant J* 2000 22(6): 561~570.
- [9] Azpiroz, Leehan R, Feldmann K A. T-DNA insertion mutagenesis in *Arabidopsis*: going back and forth. *Trends Genet* 1997 13(4): 152~156.
- [10] Barakat A, Gallois P, Rayna I M, Mestre-Oreja D, Sallaud C, Guiderdoni E, Delseny M, Bernardi G. The distribution of T-DNA in the genomes of transgenic *Arabidopsis* and rice. *FEBS Lett* 2000 471(2~3): 161~164.
- [11] Barakat A, Carels N, Bernardi G. The distribution of genes in the genomes of *Gramineae*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997 94(13): 6857~6861.
- [12] YAN Shuang Yong, ZHI Qing Wen, LIU Xin Jie, ZHANG Hong Wei, TAN Zhen Bo, LI Shi Gui. Generation and identification of rice T-DNA insertion mutant lines. *Acta Genetica Sinica* 2004 31(12): 1388~1394.
- 闫双勇, 智庆文, 刘欣洁, 张红伟, 谭振波, 李仕贵. 水稻 T-DNA 插入突变体库的构建及突变类型的分析. 遗传学报, 2004 31(12): 1388~1394.
- [13] Weigel D, Ahn J H, Bazquez M A, Boevitz J O, Christensen S K, Fankhauser C, Fernandez C, Kardalisky J, Manchanaruvil E, J, Neff M, M, Nguyen J T, Sato S, Wang Z Y, Xia Y, Dikon R A, Harrison M, J, Lamb C, J, Yanofsky M, F, Chory J. Activation tagging in *A. thaliana*. *Plant Physiol* 2000 122(4): 1003~1013.
- [14] Walden R, Fritze K, Hayashi H, Mikashevichs E, Harting H, Scheil J. Activation tagging: a means of isolating genes implicated as playing a role in plant growth and development. *Plant Mol Biol* 1994 26(5): 1521~1528.
- [15] Qin G, Kang D, Dong Y, Shen Y, Zhang L, Deng X, Zhang Y, Li S, Chen N, Ni W. Obtaining and analysis of flanking sequences from T-DNA transformants of *A. thaliana*. *Plant Sci* 2003 165(5): 941.
- [16] Nishal B, Tantikanjana T, Sundaresan V. An inducible targeted tagging system for localized saturation mutagenesis in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 2005 137(1): 3~12.
- [17] Krysan P J, Young J C, Sussman M R. T-DNA as an insertional mutagen in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 1999 11(12): 2283~2290.
- [18] Goff S A, Ricke D, Lan T H, Presting G, Wang R, Dunn M, Glazebrook J, Sessions A, Oeller P, Vama H, Hadley D, Hutchison D, Martin C, Katagiri F, Lange B M, Moughamer T, Xia Y, Budworth P, Zhong J, Mguel T, Paszkowski U, Zhang S, Colbert M, Sun W L, Chen L, Cooper B, Park S, Wood T C, Mao L, Quail P, Wang R, Dean R, Yu Y, Zharkikh A, Shen R, Sahasrabudhe S, Thomas A, Cannings R, Gutin A, Pruss D, Reid J, Tavtigian S, Mitchell J, Eldredge G,

- Scholl T, Miller R M, Bhatnagar S, Adey N, Rubano T, Tusneem N, Robinson R, Feldhaus J, Macalino T, Olliphant A, Briggs S. A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *japonica*). *Science* 2002 296(5565): 92~100.
- [19] Yu J, Hu S, Wang J, Wong G K, Li S, Lu B, Deng Y, Dai L, Zhou Y, Zhang X, Cao M, Liu J, Sun J, Tang J, Chen Y, Huang X, Li W, Ye C, Tong W, Cong L, Geng J, Han Y, Li L, Li W, Hu G, Huang X, Li W, Li J, Liu Z, Li L, Liu J, Qi Q, Liu J, Li L, Li T, Wang X, Lu H, Wu T, Zhu M, Ni R, Han H, Dong W, Ren X, Feng X, Cui R, Li X, Wang H, Xu X, Zhai W, Xu Z, Zhang J, He S, Zhang J, Xu J, Zhang K, Zheng X, Dong J, Zeng W, Tao L, Ye J, Tan J, Ren X, Chen X, He J, Liu D, Tian W, Tian C, Xia H, Bao Q, Li G, Gao H, Cao T, Wang J, Zhao W, Li R, Chen W, Wang X, Zhang Y, Hu J, Wang J, Liu S, Yang J, Zhang G, Xiong Y, Li Z, Mao L, Zhou C, Zhu Z, Chen R, Hao B, Zheng W, Chen S, Guo W, Li G, Liu S, Tao M, Wang J, Zhu L, Yuan L, Yang H. A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *indica*). *Science* 2002 296(5565): 79~92.
- [20] Kakimoto T, Clark A. A histidine kinase homolog implicated in cytokinin signal transduction. *Science* 1996 274(5289): 982~985.
- [21] Zuo J, Niu Q W, Chua N H. Technical advance: An estrogen receptor based transactivator XVE mediates highly inducible gene expression in transgenic plants. *Plant J* 2000 24(2): 265~273.
- [22] Zuo J, Chua N H. Chemical inducible systems for regulated expression of plant genes. *Curr Opin Biotechnol* 2000 11(2): 146~151.
- [23] Ishige F, Takaichi M, Foster R, Chua N, Oeda K. A G-box motif (GCCACGTGCC) tetramer confers high level constitutive expression in dicot and monocot plants. *Plant J* 1999 18(4): 443~448.
- [24] Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol Plant* 1962 15: 473~497.
- [25] Bechtold N, Pelletier G. In planta *Agrobacterium*-mediated transformation of adult *Arabidopsis thaliana* plants by vacuum infiltration. *Methods Mol Biol* 1998 82: 259~266.
- [26] Liu Y G, Mitsukawa N, Oosumi T, Whittier R F. Efficient isolation and mapping of *Arabidopsis thaliana* T-DNA insert junctions by the maternal asymmetric interfacial PCR. *Plant J* 1995 8(3): 457~463.
- [27] McEver J, Tzafir, J, Aux G, Rogers R, Ashby C, Smith K, Thomas C, Schetter A, Zhou Q, Cushman M, A, Tossberg J, Nickle T, Levin J Z, Law M, Meinke D, Patton D. Insertional mutagenesis of genes required for seed development in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* 2001 159(4): 1751~1763.
- [28] Bowman J, Smyth D, Meyerowitz E. Genetic interactions among floral homeotic genes of *Arabidopsis*. *Development* 1991 112(1): 1~20.

欢迎订阅《棉花学报》

《棉花学报》(双月刊)是中国科协主管,中国农学会主办,中国农业科学院棉花研究所承办的国家级学术类棉花专业期刊。由国内本领域著名专家教授组成编委会。以报道国内外棉花基础研究和应用基础研究进展为主,展示我国棉花科研动态和研究水平,报导国外同类研究进展状况,是世界三大农业数据库收录对象。主要栏目有研究与进展、专题与述评、学术论坛、研究简报、学术动态等。读者对象:从事棉花及相关学科的科研人员、大专院校师生和关注棉花科研动态的学者。

本刊为大 16 开本,每期 64 码,逢单月 15 日出版,国内邮发代号 36-63 国外发行代号 BM6545 全年 6 期定价 60 元,海外发行价 US \$90。全国各地邮政局(所)均可订阅。

刊号: ISSN 1002-7807 CN41-1163/S

地址:河南省安阳市开发区黄河大道西段 中国农业科学院棉花研究所 中国棉花杂志社

邮编: 455000

电话: (0372)2525361, 2525362, 2525369 E-mail: Jcotton@vip.371.net /jurnal@cicaas.com.cn