

通过正向遗传学探究突变体 *Inc161*表型产生的机制

完成人：黄添 2015级生物科学

指导老师：任国栋 研究员

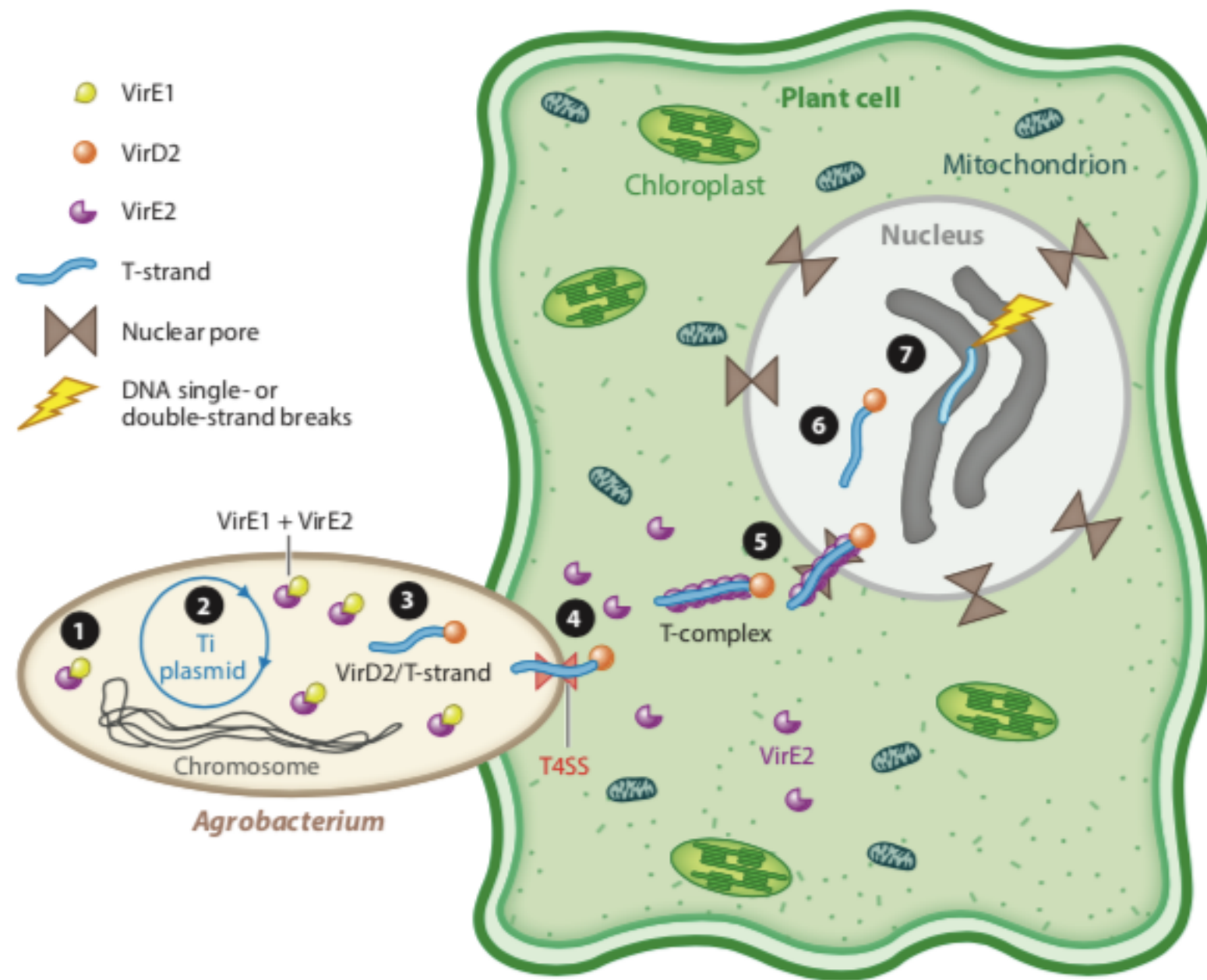
目 录

- 背景
- 前期工作
- 研究结果
- 总结与讨论
- 致谢

目 录

- 背景
- 前期工作
- 研究结果
- 总结与讨论
- 致谢

农杆菌可以介导T-DNA插入植物细胞的基因组



农杆菌转化法在植物基因工程中 可以被用于构建突变体株系

GENOMICS ARTICLE

A High-Throughput Arabidopsis Reverse Genetics System

Allen Sessions,^{a,1} Ellen Burke,^a Gernot Presting,^a George Aux,^b John McElver,^b David Patton,^b Bob Dietrich,^b Patrick Ho,^a Johana Bacwaden,^a Cynthia Ko,^a Joseph D. Clarke,^a David Cotton,^a David Bullis,^a Jennifer Snell,^a Trini Miguel,^a Don Hutchison,^a Bill Kimmerly,^{a,2} Theresa Mitzel,^c Fumiaki Katagiri,^a Jane Glazebrook,^a Marc Law,^b and Stephen A. Goff^a

^aTorrey Mesa Research Institute, Syngenta, 3115 Merryfield Row, San Diego, California 92121

^bSyngenta Biotechnology Incorporated, 3054 Cornwallis Road, Research Triangle Park, North Carolina 27709

^cSyngenta Seeds Incorporated, 7240 Holsclaw Road, Gilroy, California 95020

2002 SAIL Line

Genome-Wide Insertional Mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*

José M. Alonso,^{1*} Anna N. Stepanova,^{1*} Thomas J. Leisse,¹
Christopher J. Kim,¹ Huaming Chen,¹ Paul Shinn,¹
Denise K. Stevenson,¹ Justin Zimmerman,¹ Pascual Barajas,¹
Rosa Cheuk,¹ Carmelita Gadrinab,¹ Collen Heller,¹ Albert Jeske,¹
Eric Koesema,¹ Cristina C. Meyers,¹ Holly Parker,¹
Lance Prednis,¹ Yasser Ansari,¹ Nathan Choy,¹ Hashim Deen,¹
Michael Geralt,¹ Nisha Hazari,¹ Emily Hom,¹ Meagan Karnes,¹
Celene Mulholland,¹ Ral Ndubaku,¹ Ian Schmidt,¹ Plinio Guzman,¹
Laura Aguilar-Henonin,¹ Markus Schmid,^{1†} Detlef Weigel,^{1†}
David E. Carter,² Trudy Marchand,² Eddy Risseuw,²
Debra Brogden,² Albana Zeko,² William L. Crosby,²
Charles C. Berry,³ Joseph R. Ecker^{1‡}

2003 SALK Line

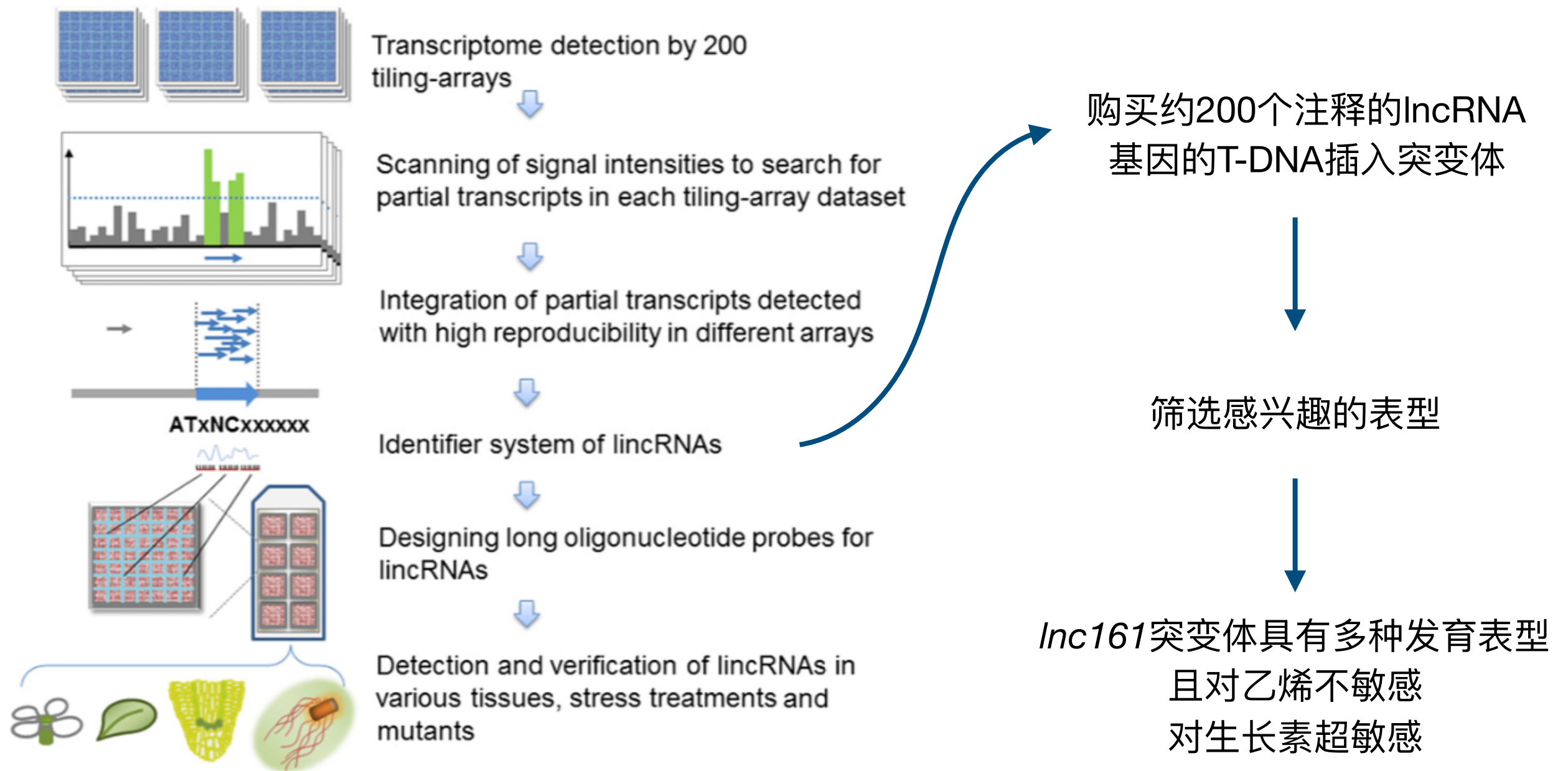
在T-DNA插入突变体中屡次发现 各类染色体畸变的案例

- 1998年，Nacry, P.等人发现T-DNA插入突变体ton1中存在染色体**易位和臂内倒位**的现象；
- 1999年，Laufs, P.等人发现在遗传距离相距26 cM的两个T-DNA插入位点之间存在**倒位**，并给出了T-DNA插入产生倒位的模型；
- 2001年，Tax, F. E.和Vernon, D. M.发现由T-DNA插入引起的片段**重复**；
- 2009年，Kinoshita, N.等人发现了一个~5.7 Mb区段**重复**的T-DNA插入突变体；
- 2010年，Clark, K. A.和Krysan, P. J.发现染色体**易位**在T-DNA插入突变体中是非常普遍的现象（12/64）；
- 2017年，Hu, Y.等人发现在一个T-DNA插入突变体中由一个T-DNA的插入引起了**倒位、重复、缺失**等现象

目 录

- 背景
- 前期工作
- 研究结果
- 总结与讨论
- 致谢

筛选到具有明显表型的 T-DNA插入突变体*Inc161*



***Inc161* 具有明显表型**

*Inc161*突变体发育表型



Col-0

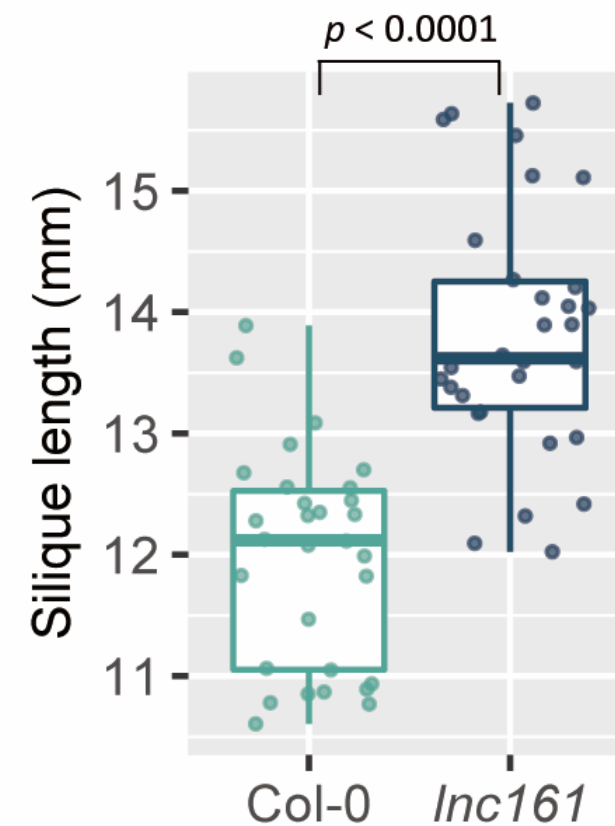
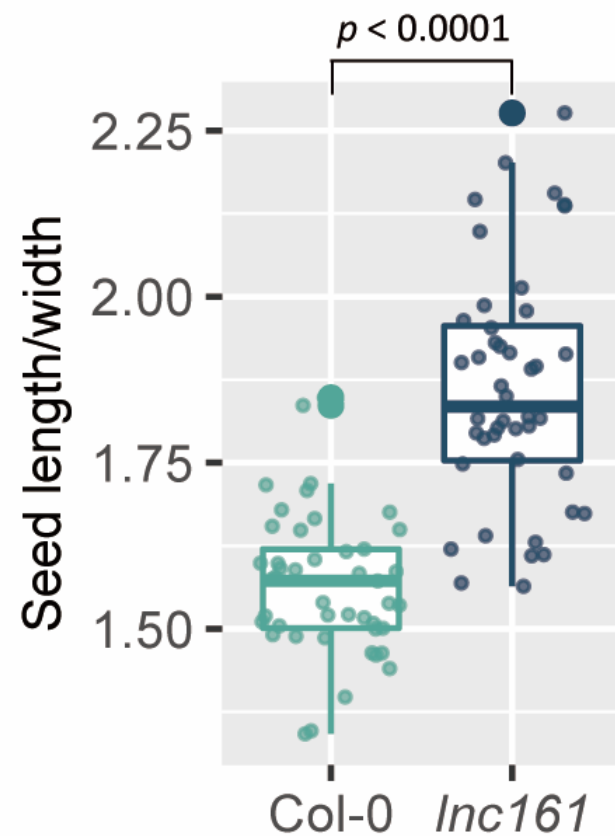


Inc161

*Inc161*莲座叶的叶柄与叶片狭长

比例尺为1 mm

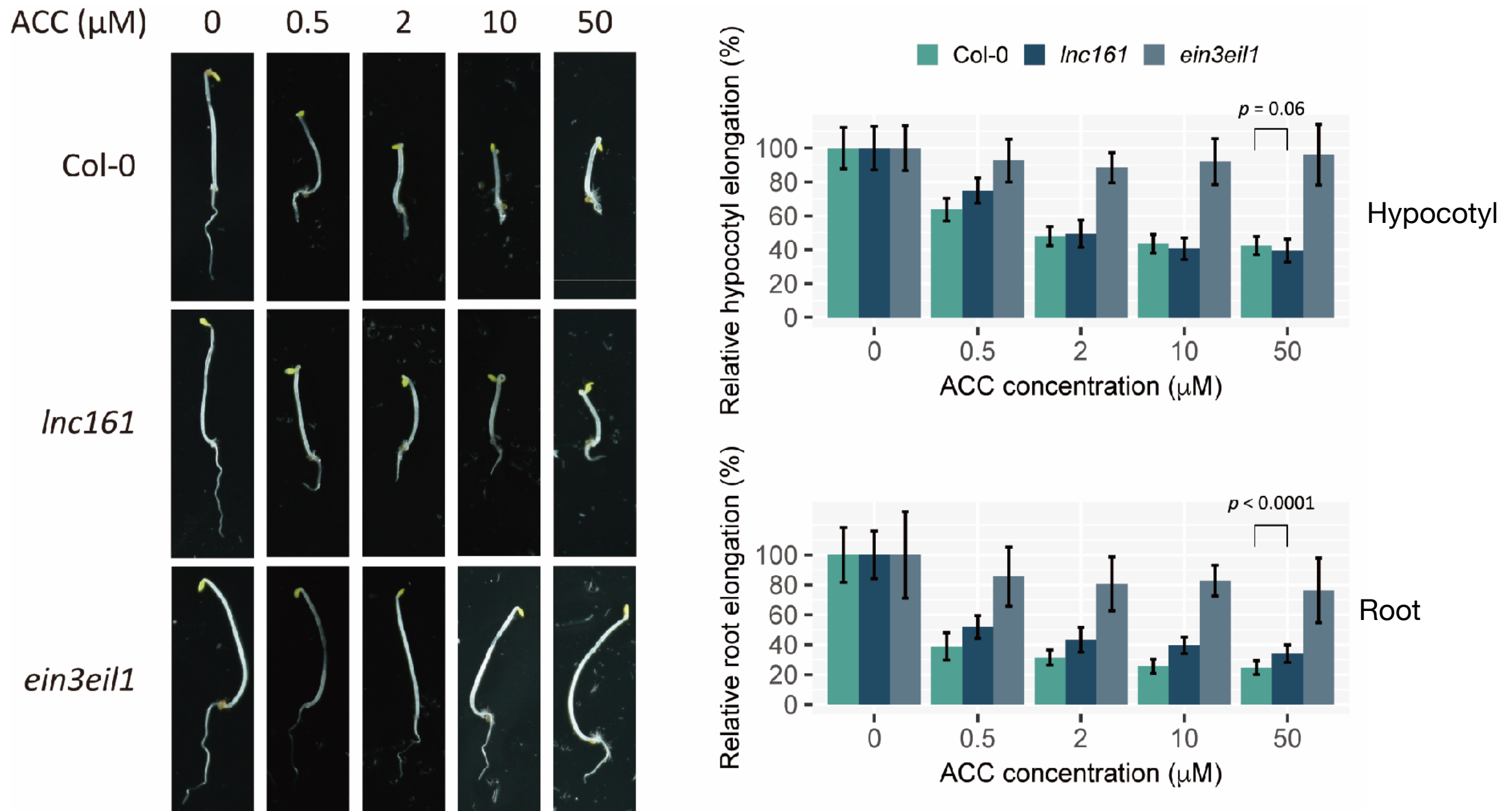
Inc161 突变体发育表型



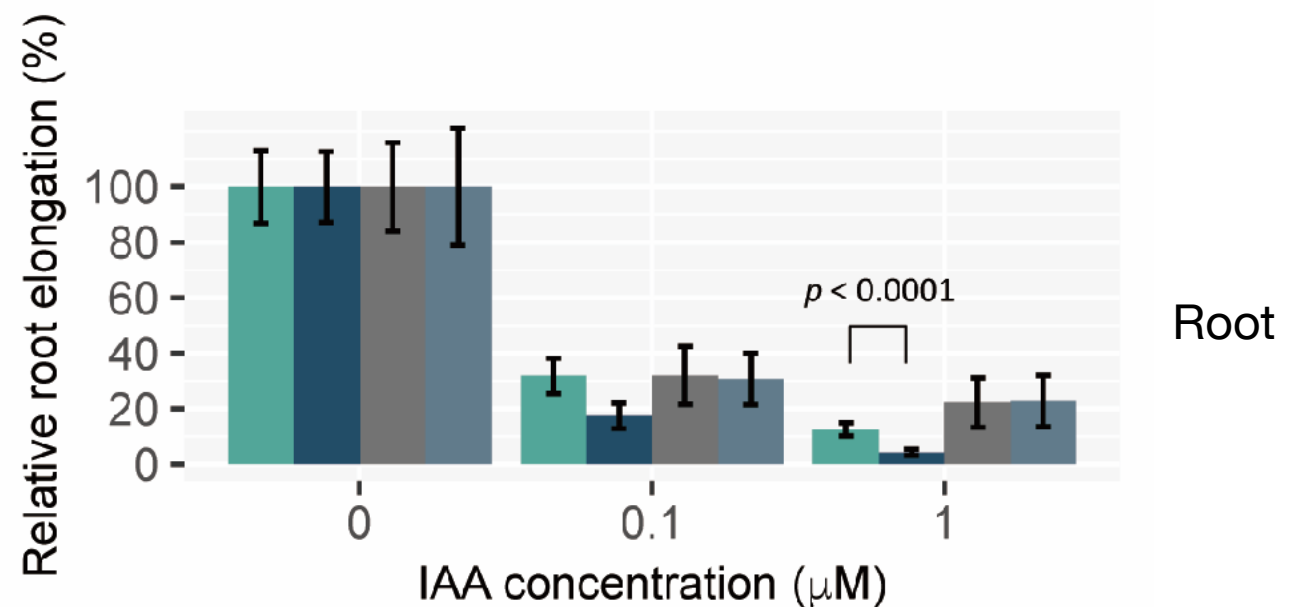
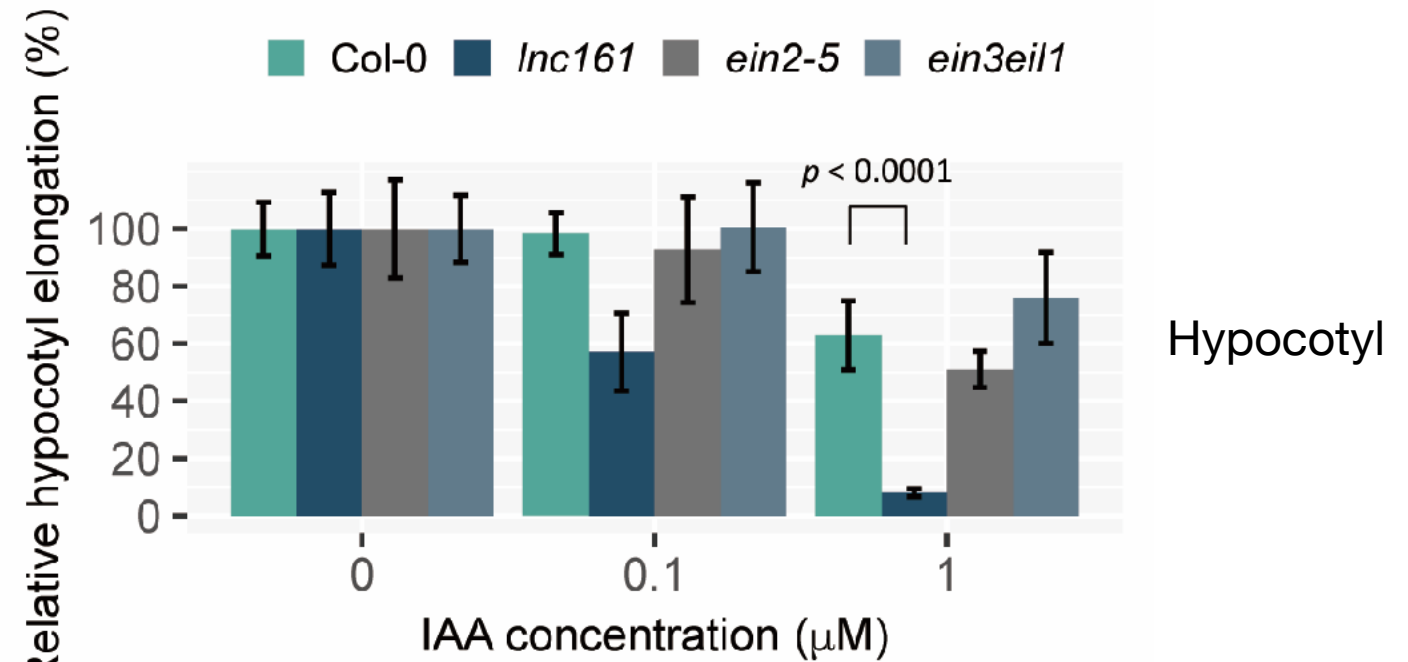
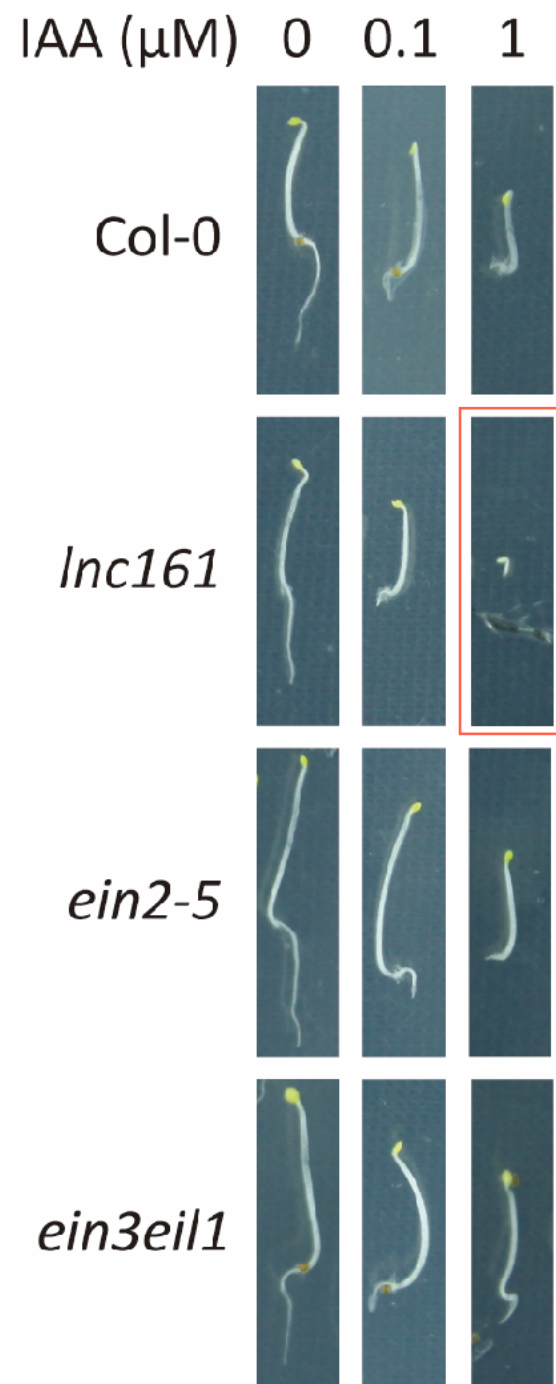
Inc161 的种子和果荚狭长

比例尺为1 mm

Inc161 突变体黄化幼苗根的伸长对乙烯处理较不敏感



Inc161 突变体黄化幼苗根和下胚轴的伸长对生长素处理更加敏感



***LNC161*的基因组序列
无法互补*Inc161*表型**

*LNC161*的基因组序列

无法互补*Inc161*表型



Col-0

Inc161

Comp-5

Comp-9

Comp-12

比例尺为10 mm

问：

导致突变体*Inc161*表型
产生的机制是什么？

目 录

- 背景
- 前期工作
- 研究成果
- 总结与讨论
- 致谢

通过正向遗传学方法探究 *Inc161*表型产生的机制

Inc161 × Col-0 回交 F2 代重测序

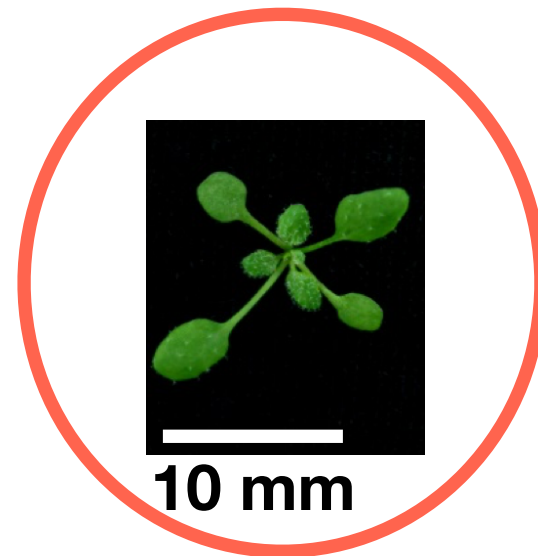
♀ *Inc161* × ♂ Col-0



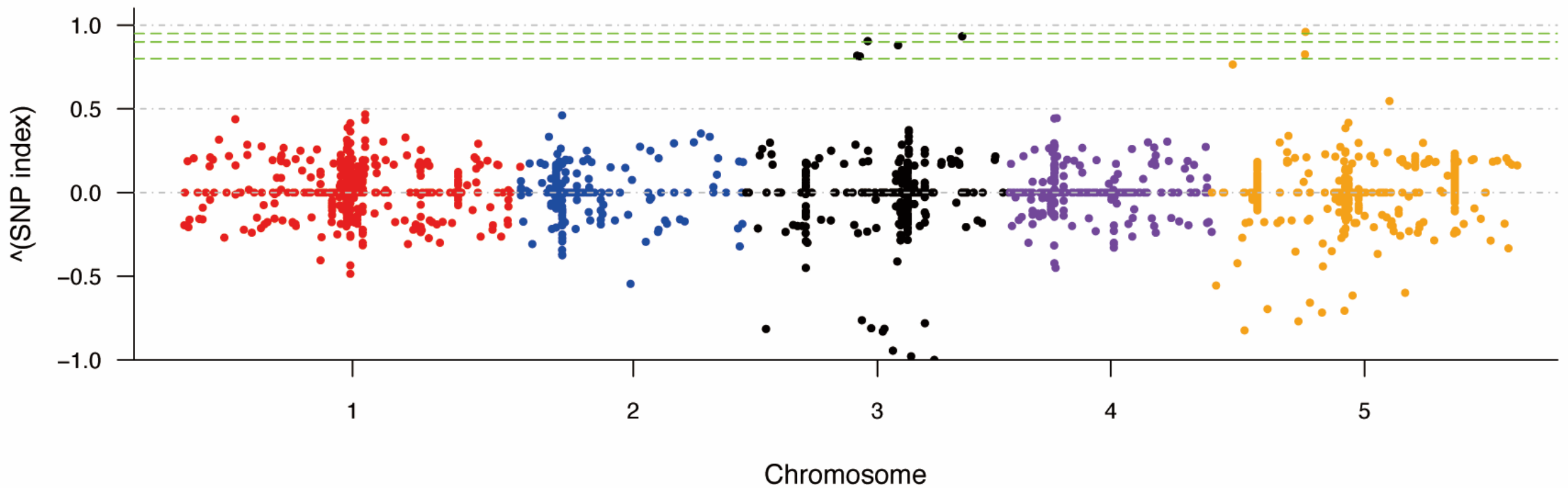
F1 ⊗



F2

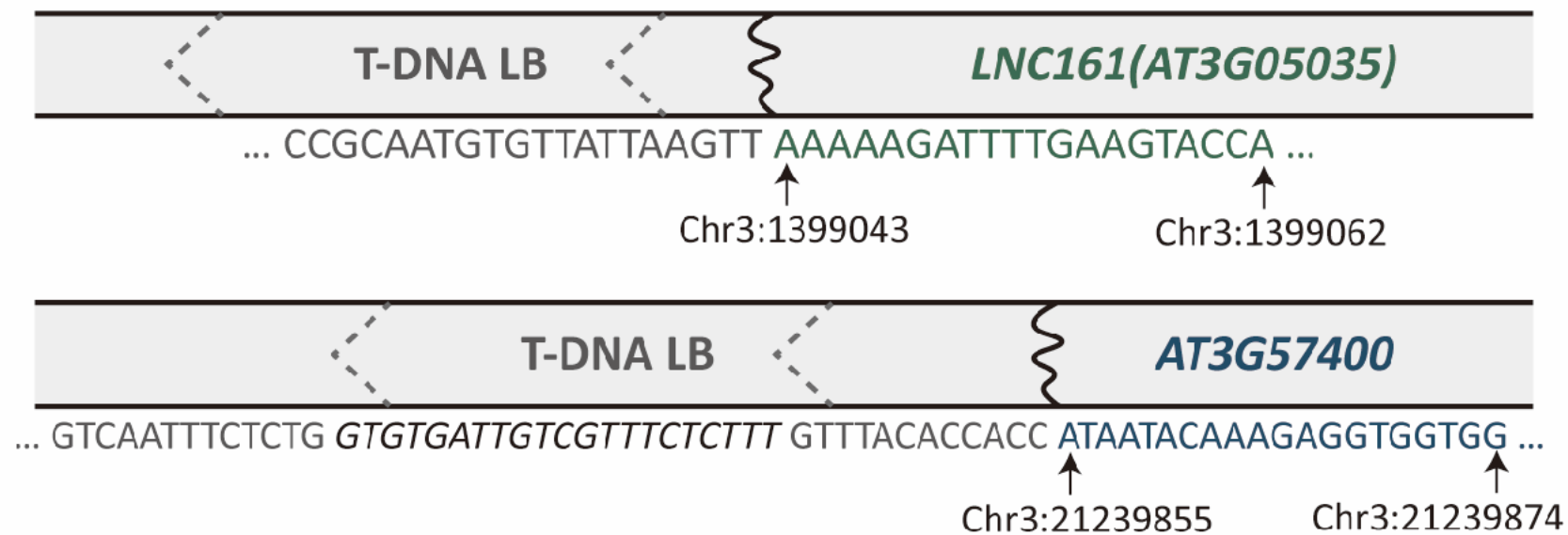


MutMAP分析没有得到有用的信息

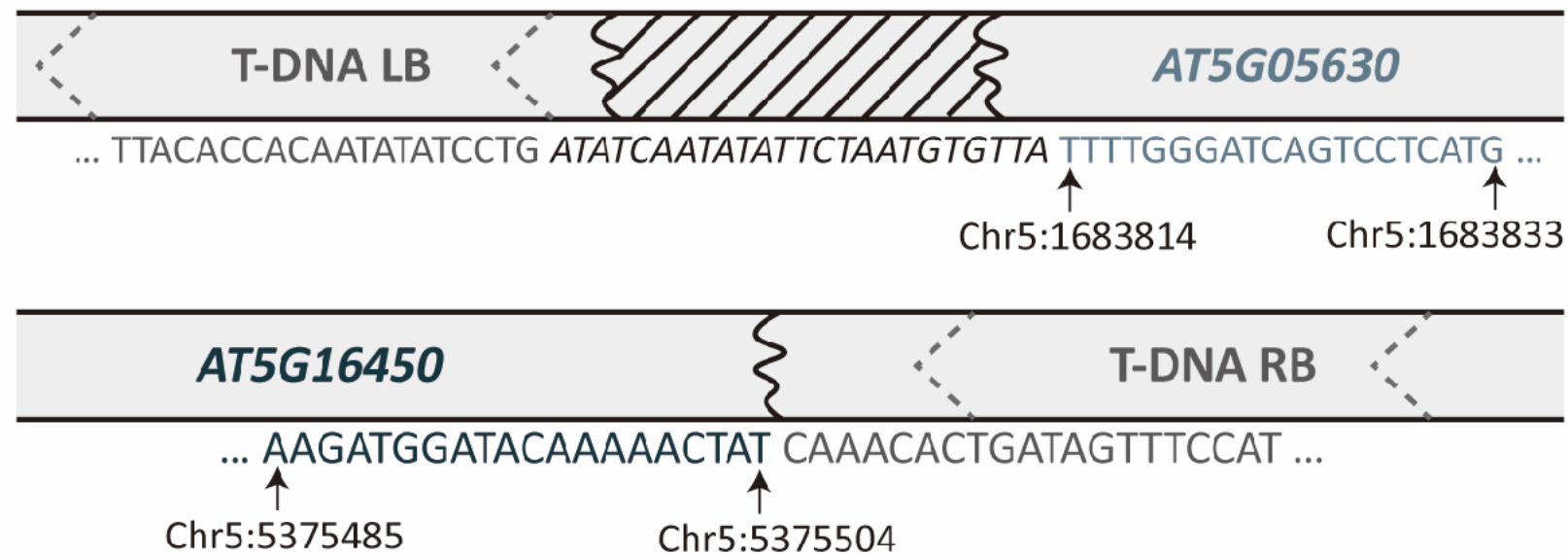


重测序发现另外 3个T-DNA插入位点

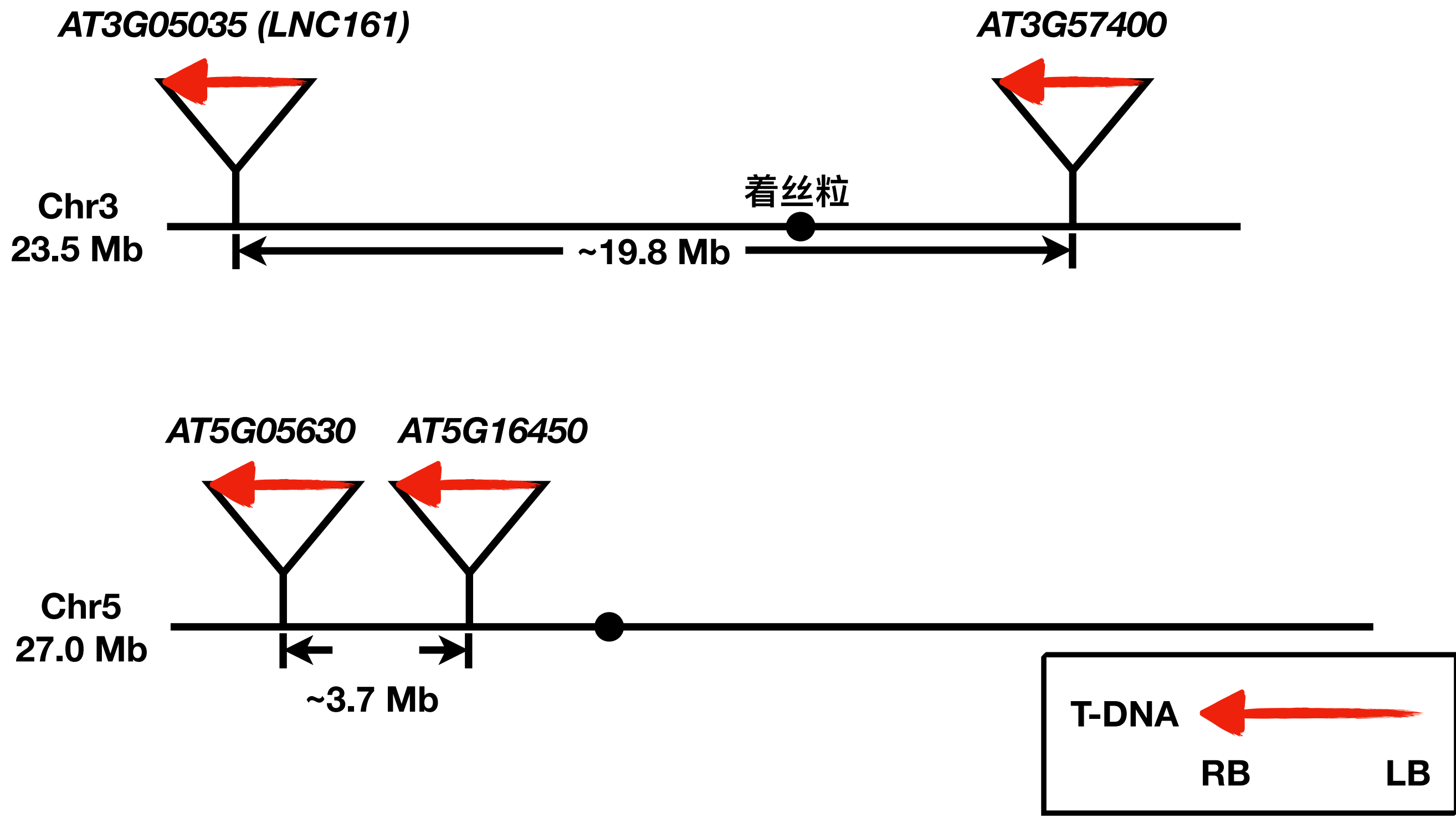
Chromosome 3



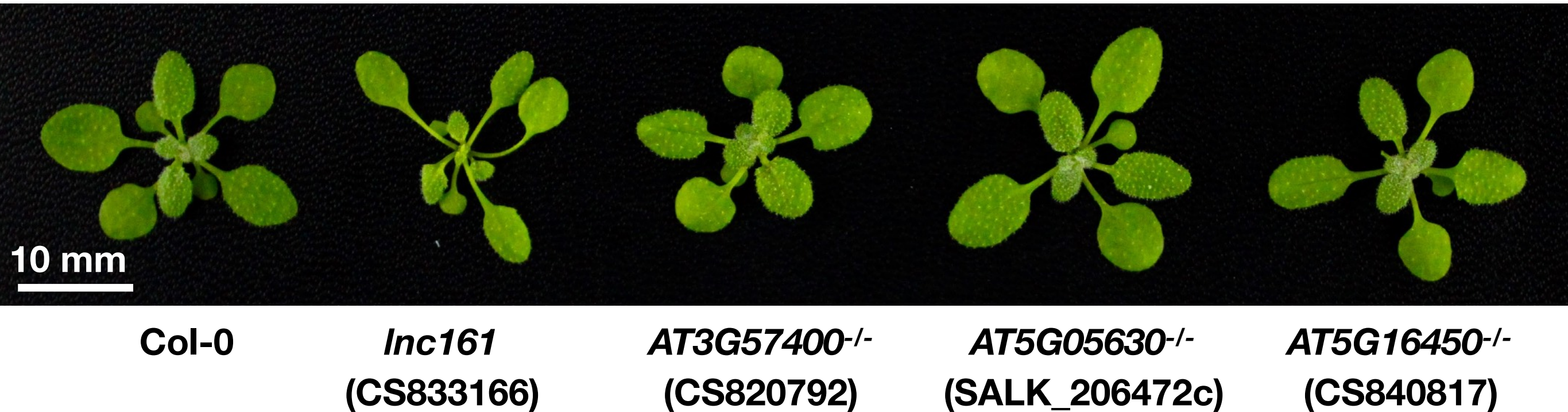
Chromosome 5



重测序发现另外 3个T-DNA插入位点



表型不是由其他 几个位点突变导致



***Inc161* 3号染色体
存在大片段倒位**

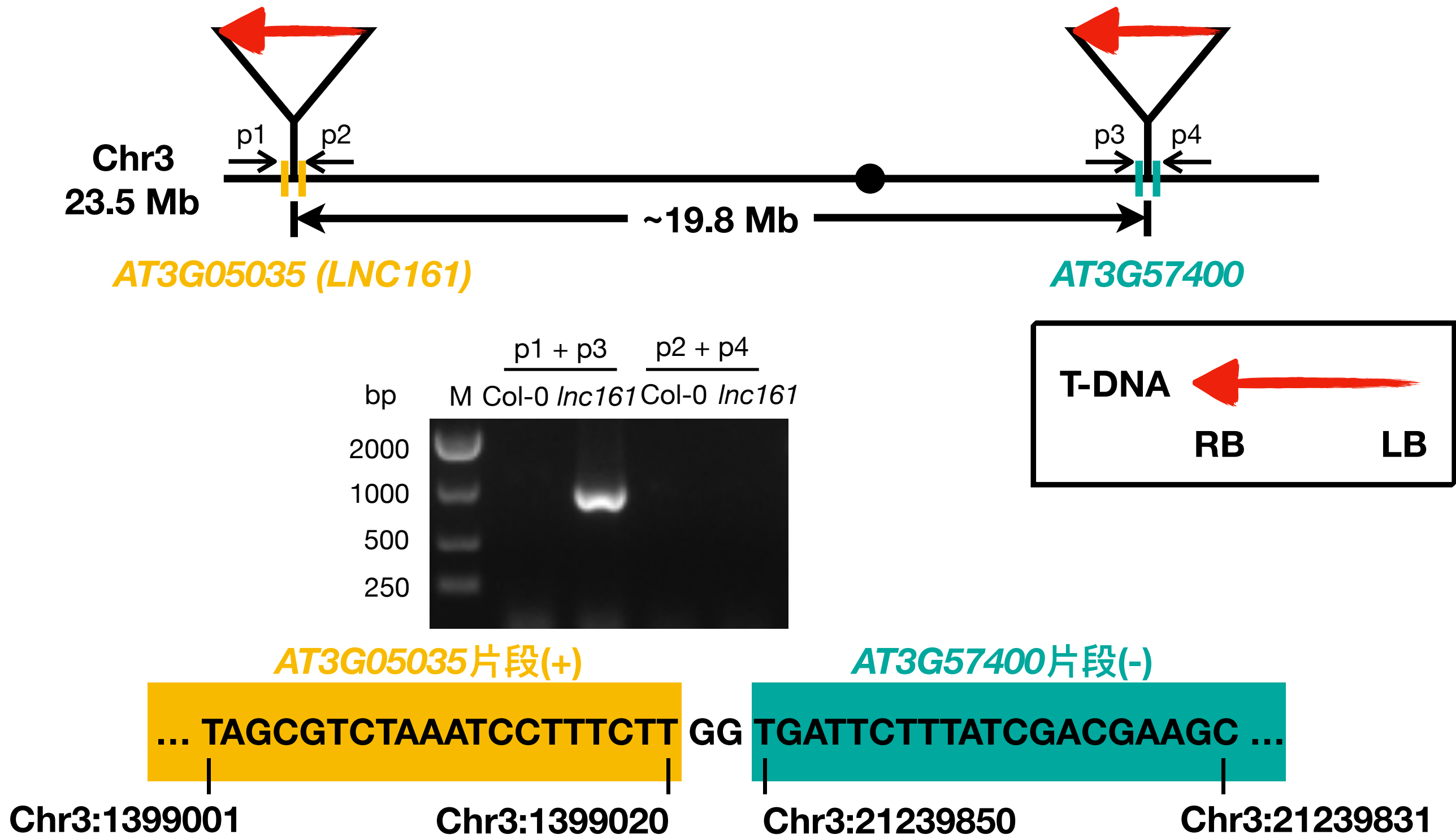
在回交F2代中没有鉴定到Chr3上 两个T-DNA插入位点的重组个体



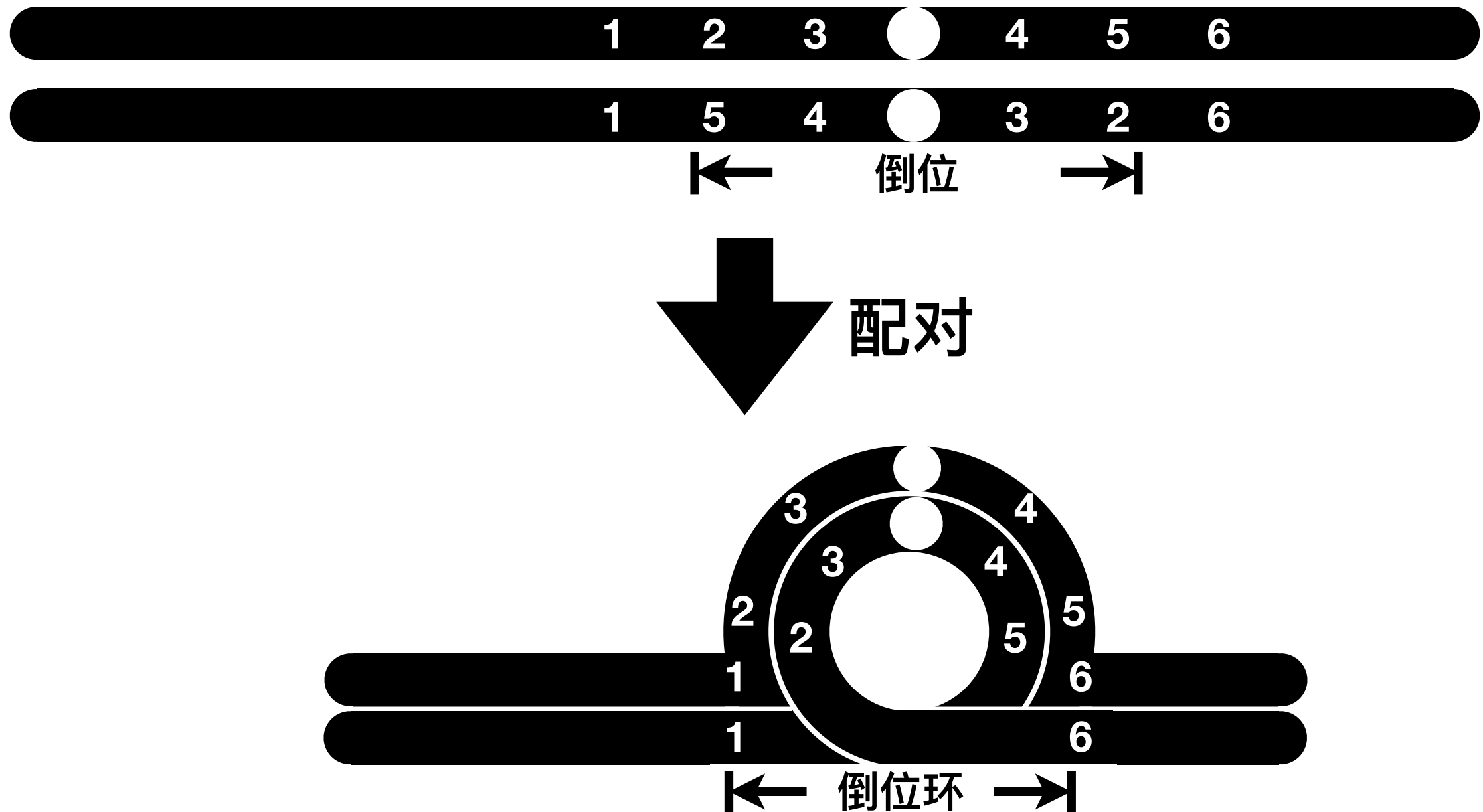
10 mm

F2 基因型	数量	百分比 (%)
<i>LNC161</i> ^{+/+} <i>AT3G57400</i> ^{+/+}	83	32.9
<i>LNC161</i> ^{+/-} <i>AT3G57400</i> ^{+/-}	124	49.2
<i>LNC161</i> ^{-/-} <i>AT3G57400</i> ^{-/-}	45	17.9
总数	252	100.0

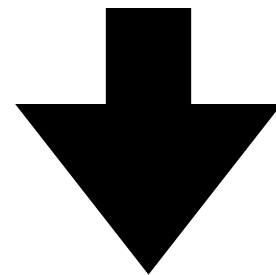
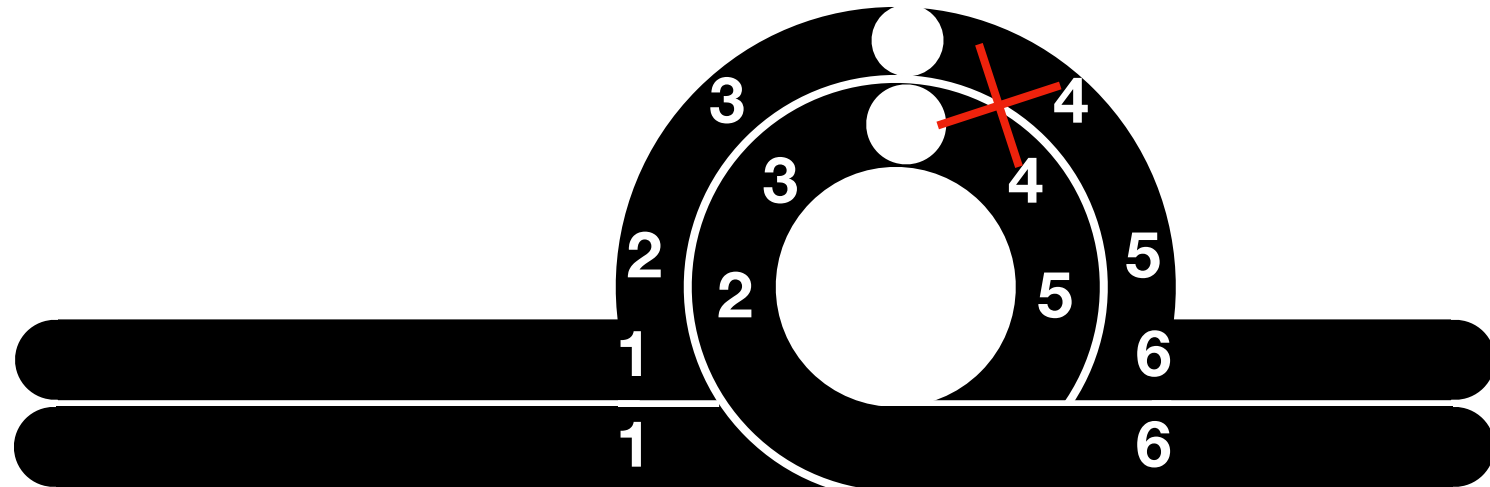
*Inc161*的Chr3在两个T-DNA 位置之间发生倒位



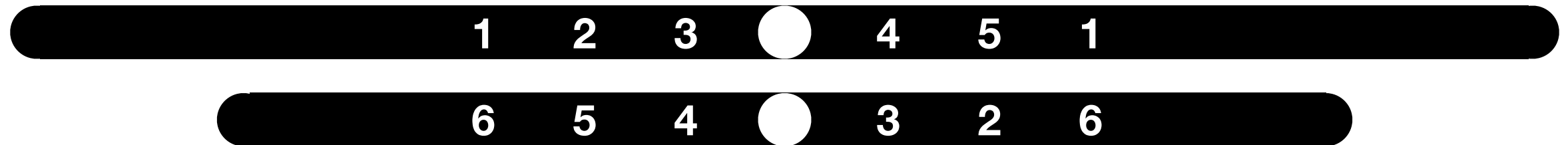
若存在染色体臂间倒位，F1代减数分裂染色体配对时会出现倒位环



倒位环内发生重组事件 会产生不育配子



重组

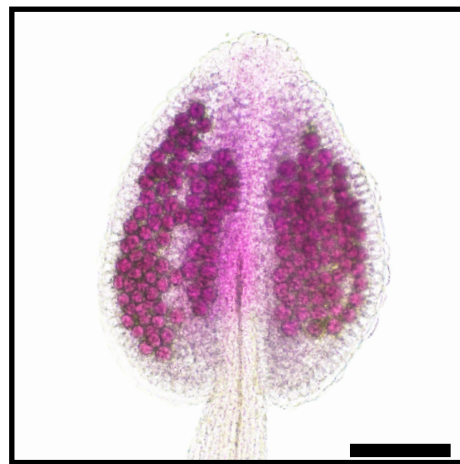


染色体片段丢失及重复

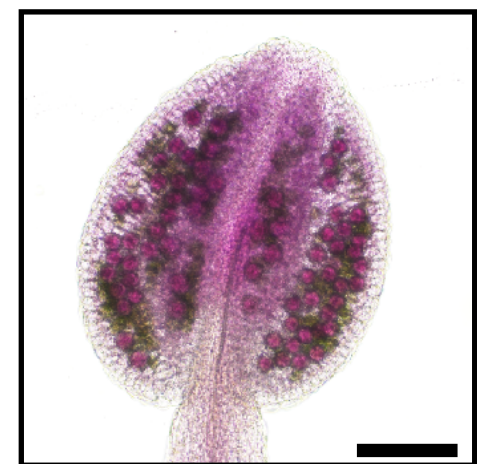
Inc161 × Col-0 F1代花药败育佐证 染色体倒位事件



Col-0



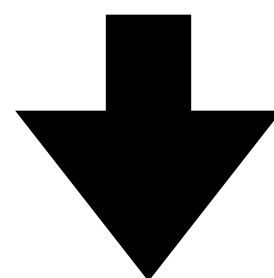
Inc161



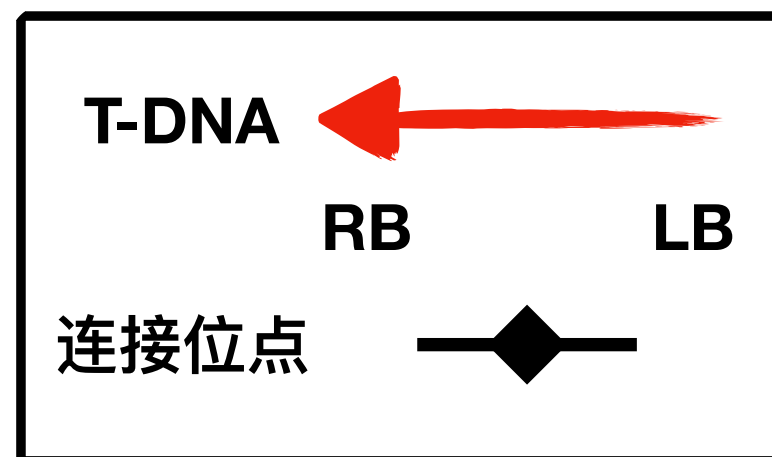
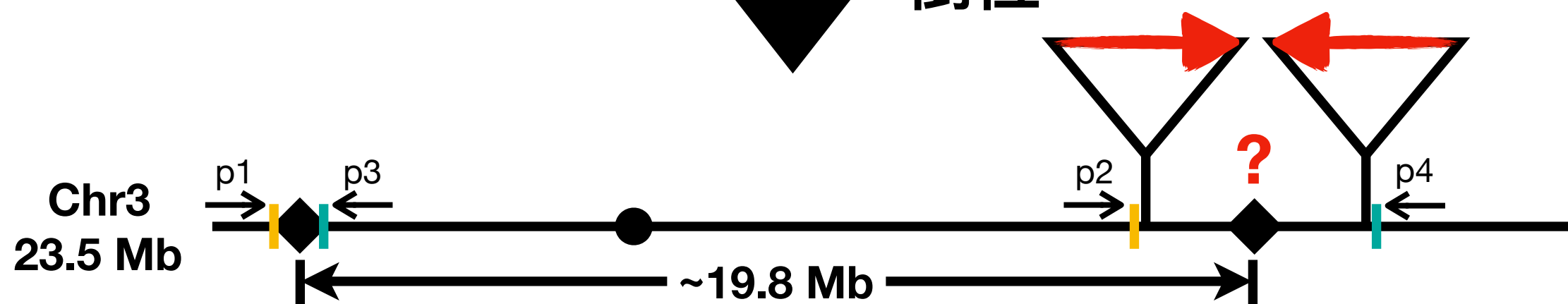
F1

比例尺为100 μm

*Inc161*的Chr3在两个T-DNA 位置之间发生倒位



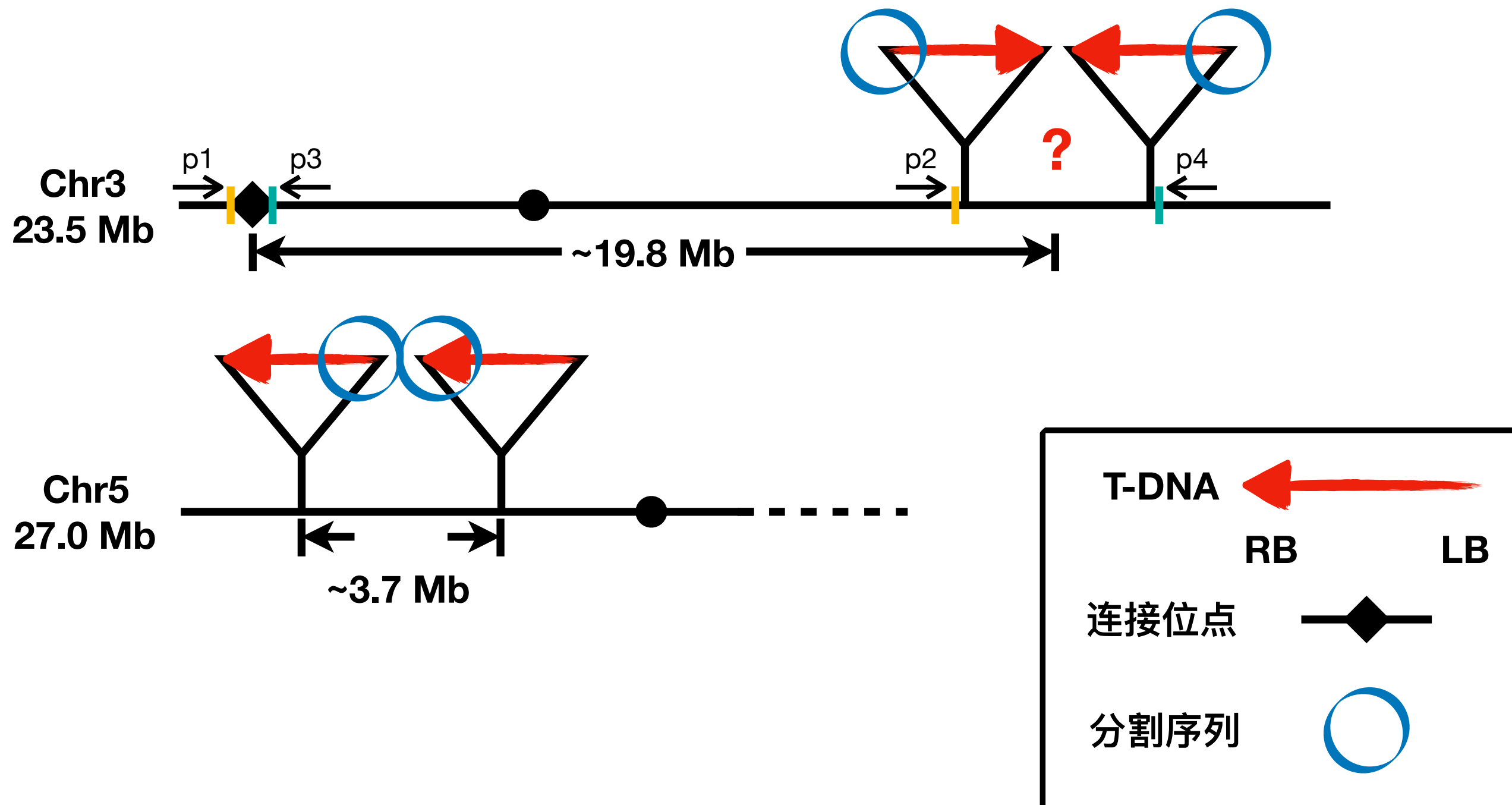
倒位



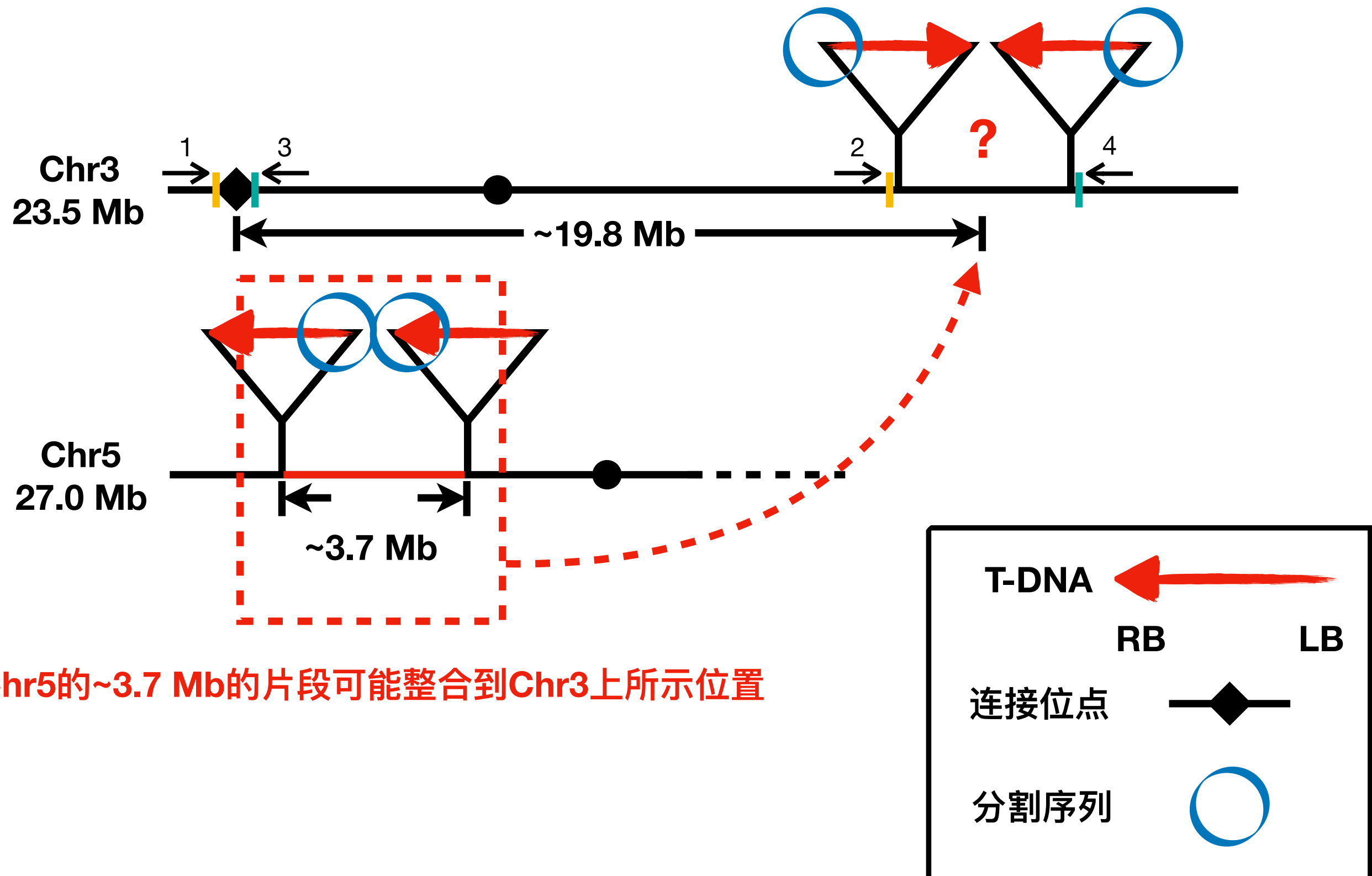
Inc161 5号染色体部分
片段重复

T-DNA与基因组的交界

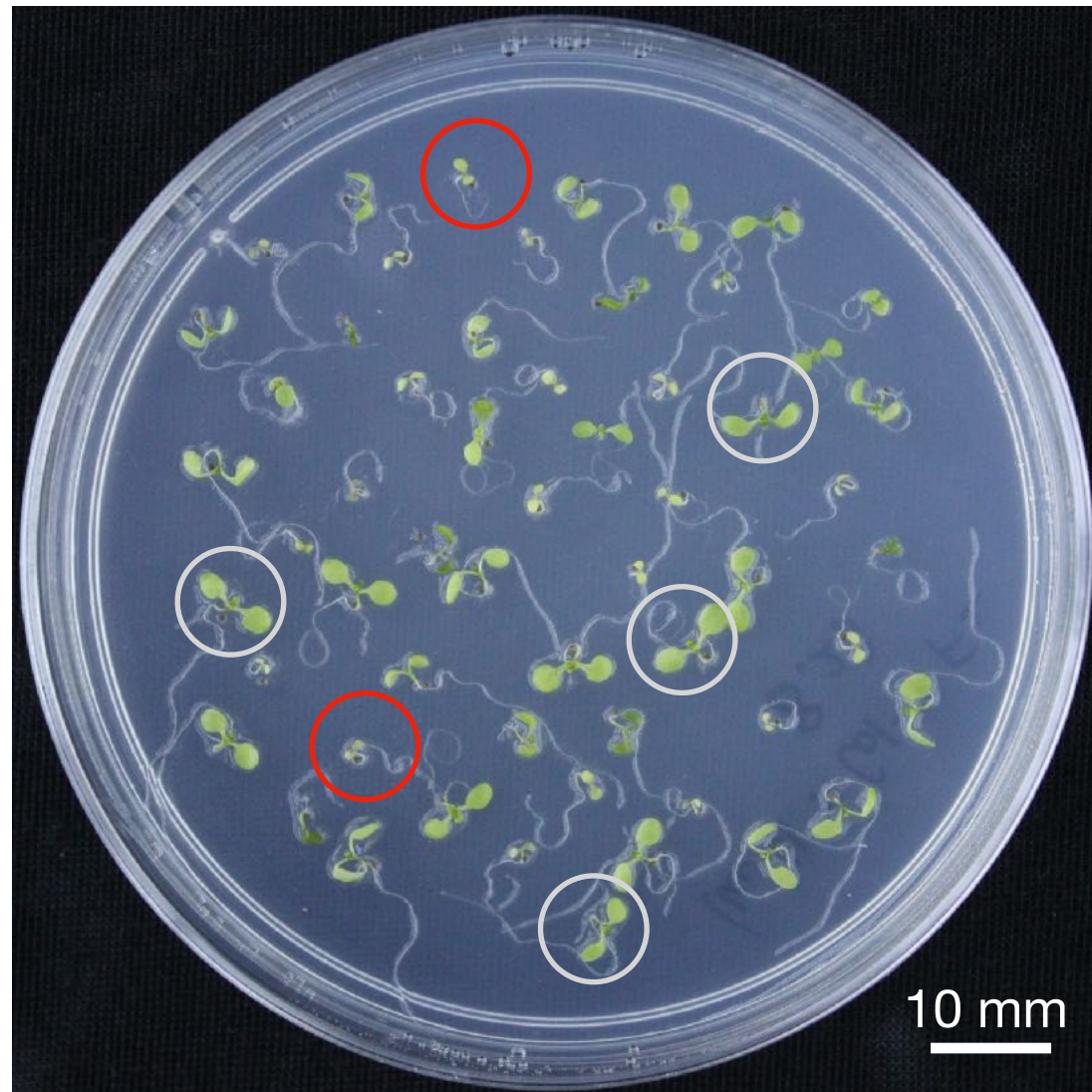
在突变体测序数据中一端比对在T-DNA上一端比对在基因组上的分割序列
仅发现了4种（每个T-DNA理应产生2个这样的Reads）



Inc161 Chr3的可能结构



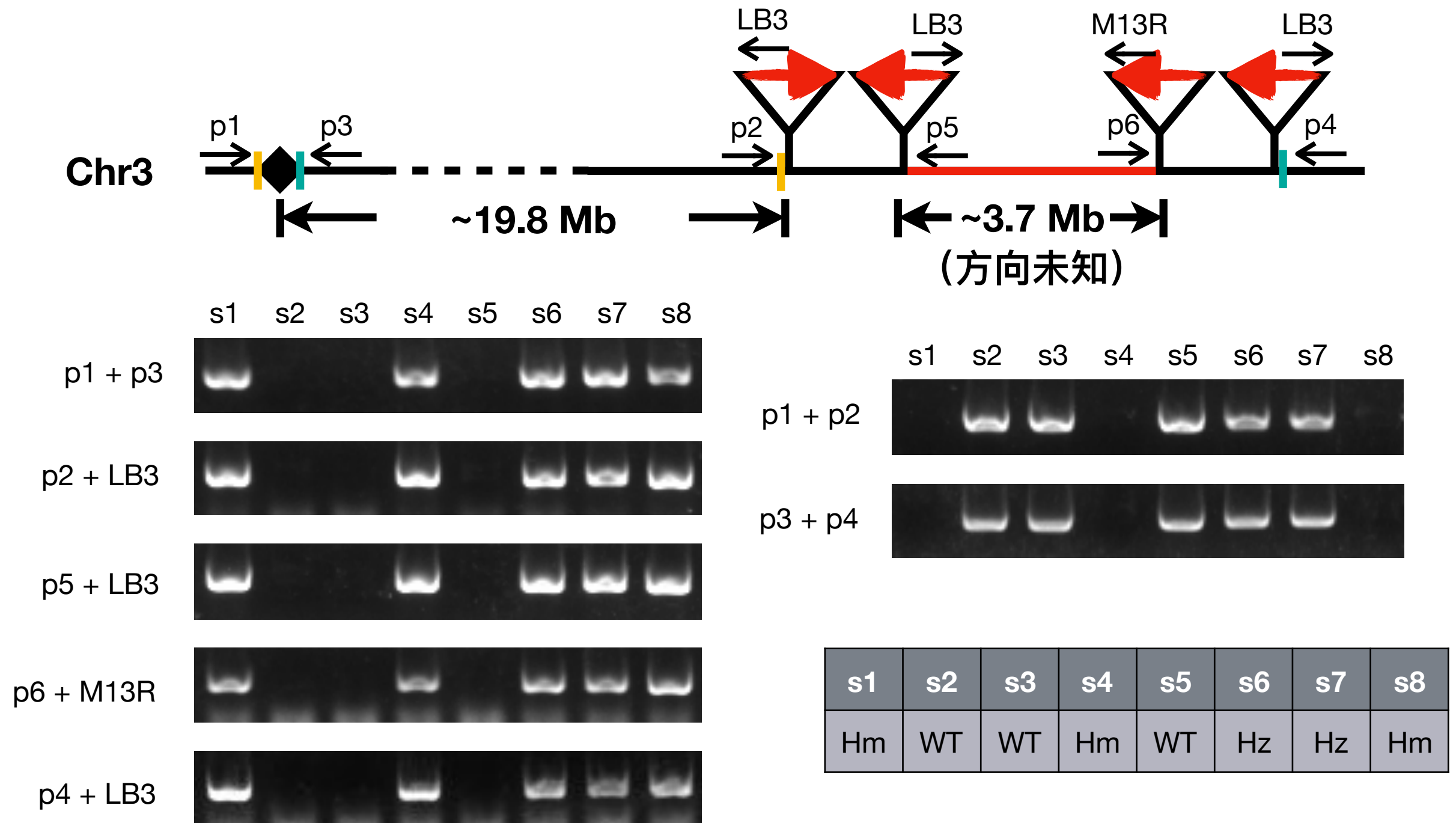
F2中BASTA抗性显示仅仅在一对染色体上有T-DNA存在



- 有BASTA抗性
- 无BASTA抗性

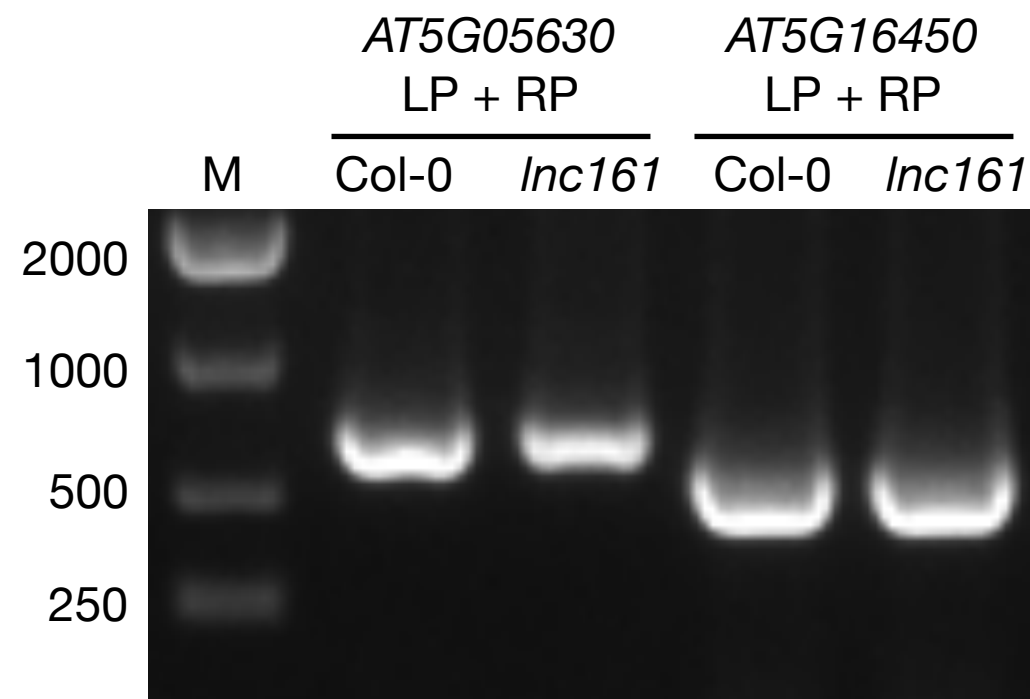
BASTA抗性	数量	百分比 (%)
无抗性	84	36.7
有抗性	145	63.3
总数	229	100.0

5个突变体位点和2个野生型位点在F2中连锁 (96 / 96)

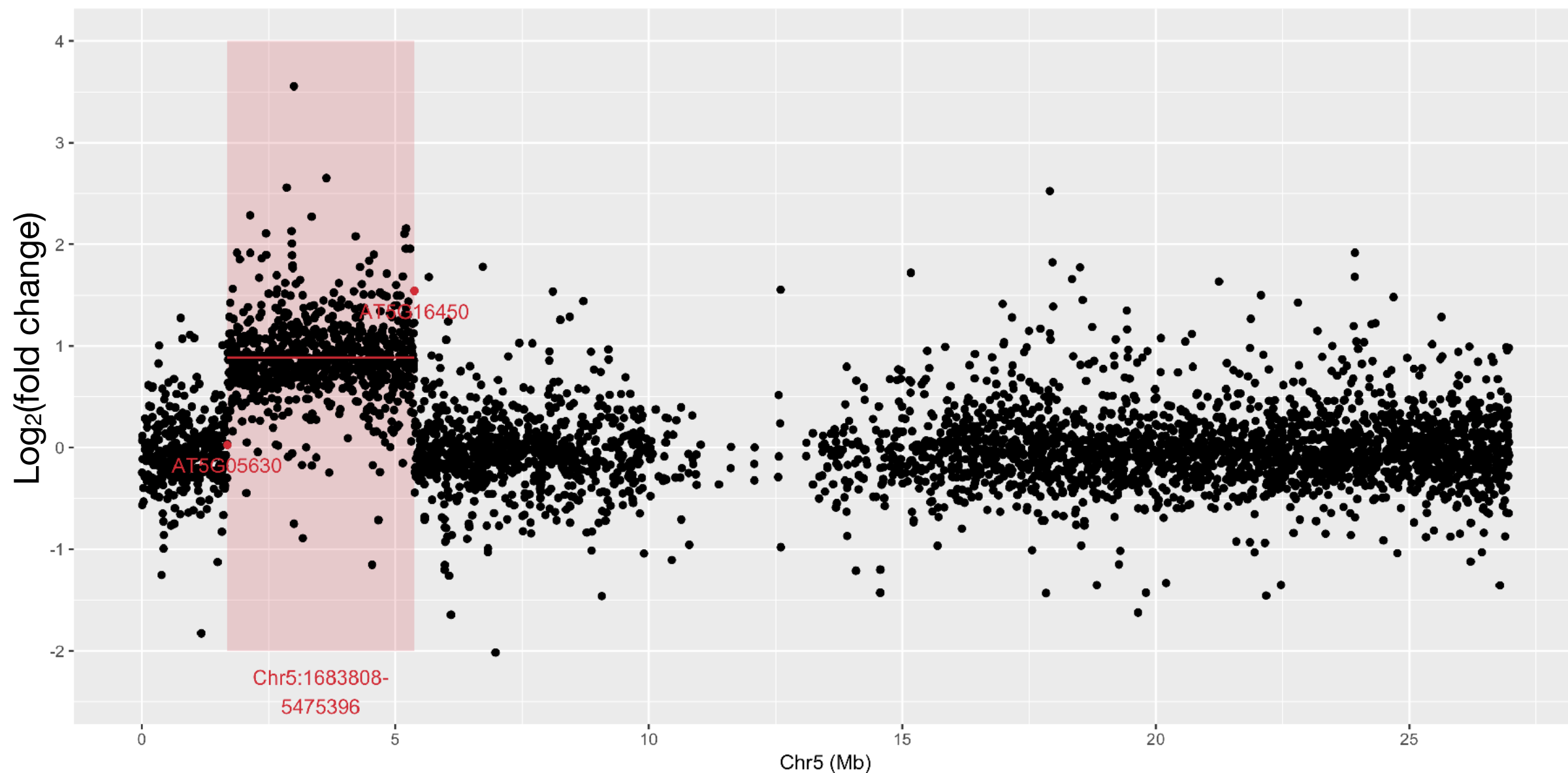


**片段重复引起区域内
基因高表达**

*Inc161*当中存在正常的Chr5

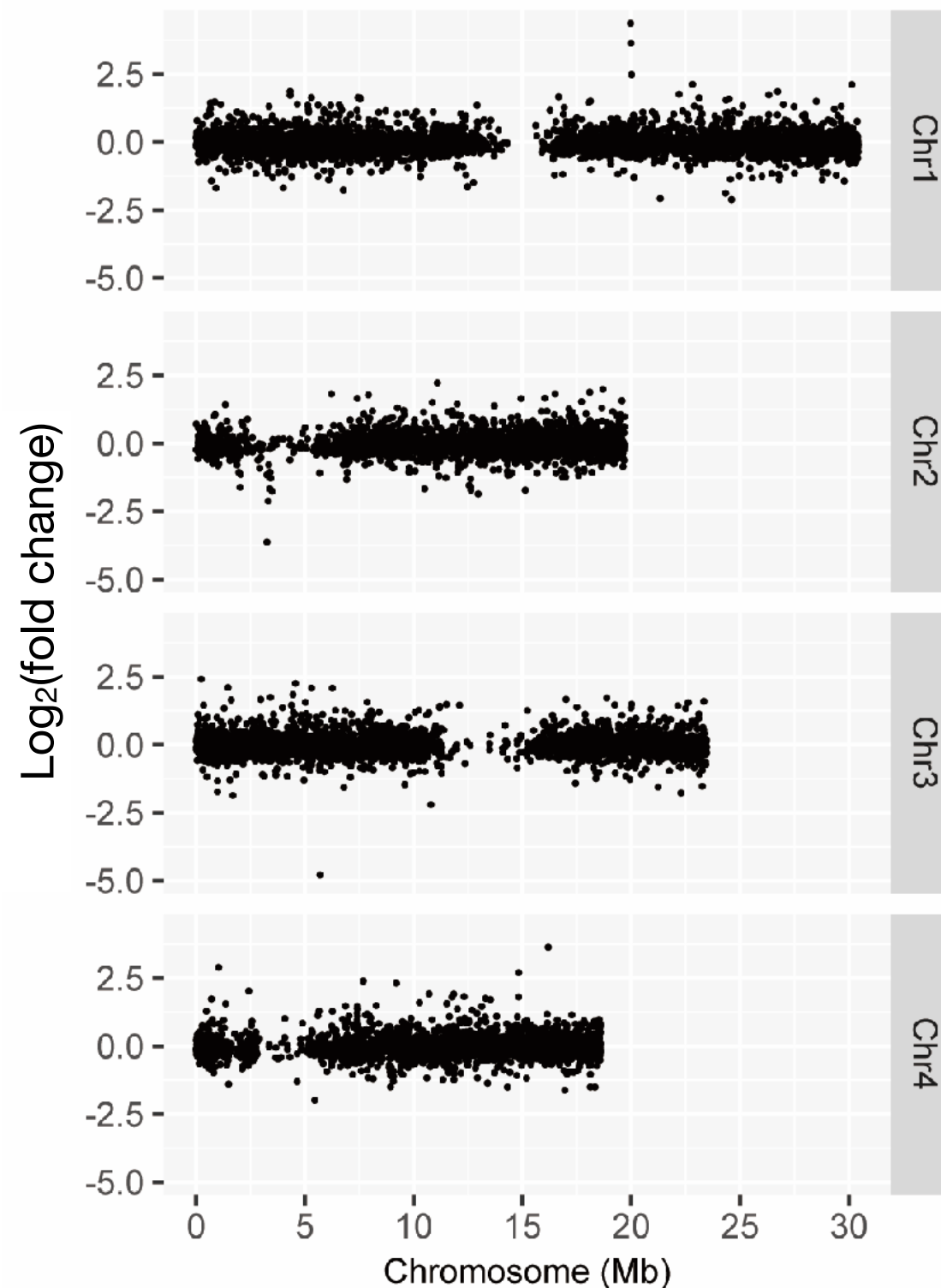


Chr5上~3.7 Mb片段中 基因高表达

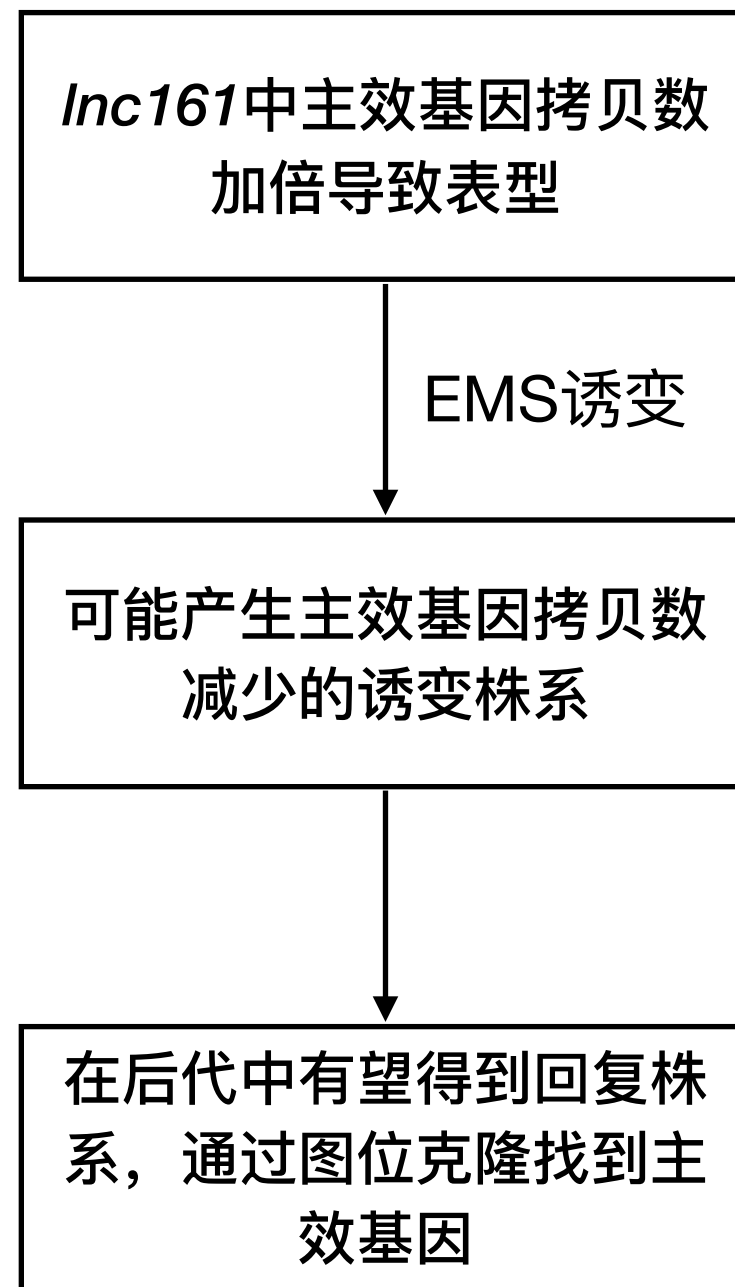


区间内816个基因（不包括端部两个基因）中，801个调高表达

其他染色体上没有出现 与Chr5类似的现象



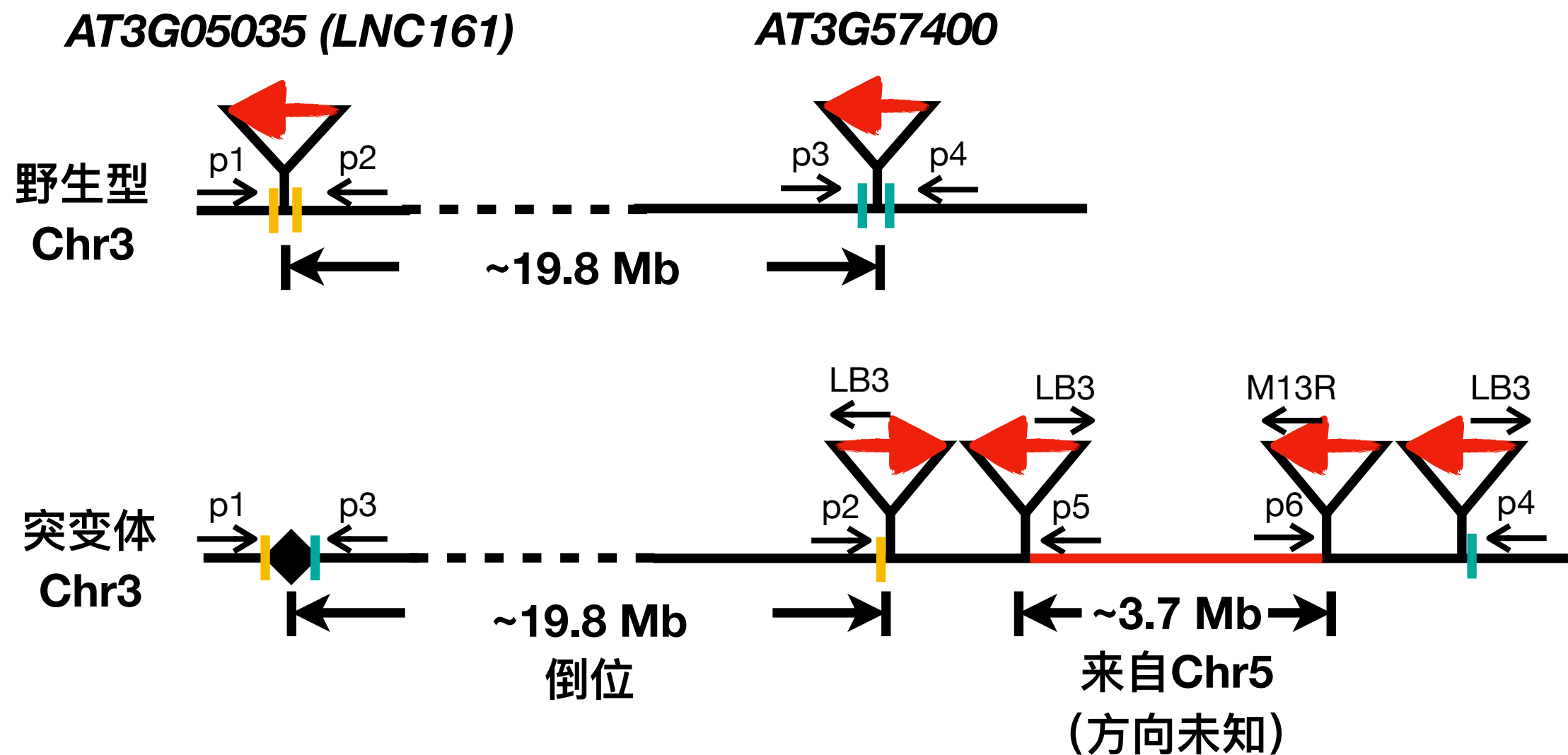
可以通过EMS诱变找到*Inc161*中 产生表型的主效基因



目 录

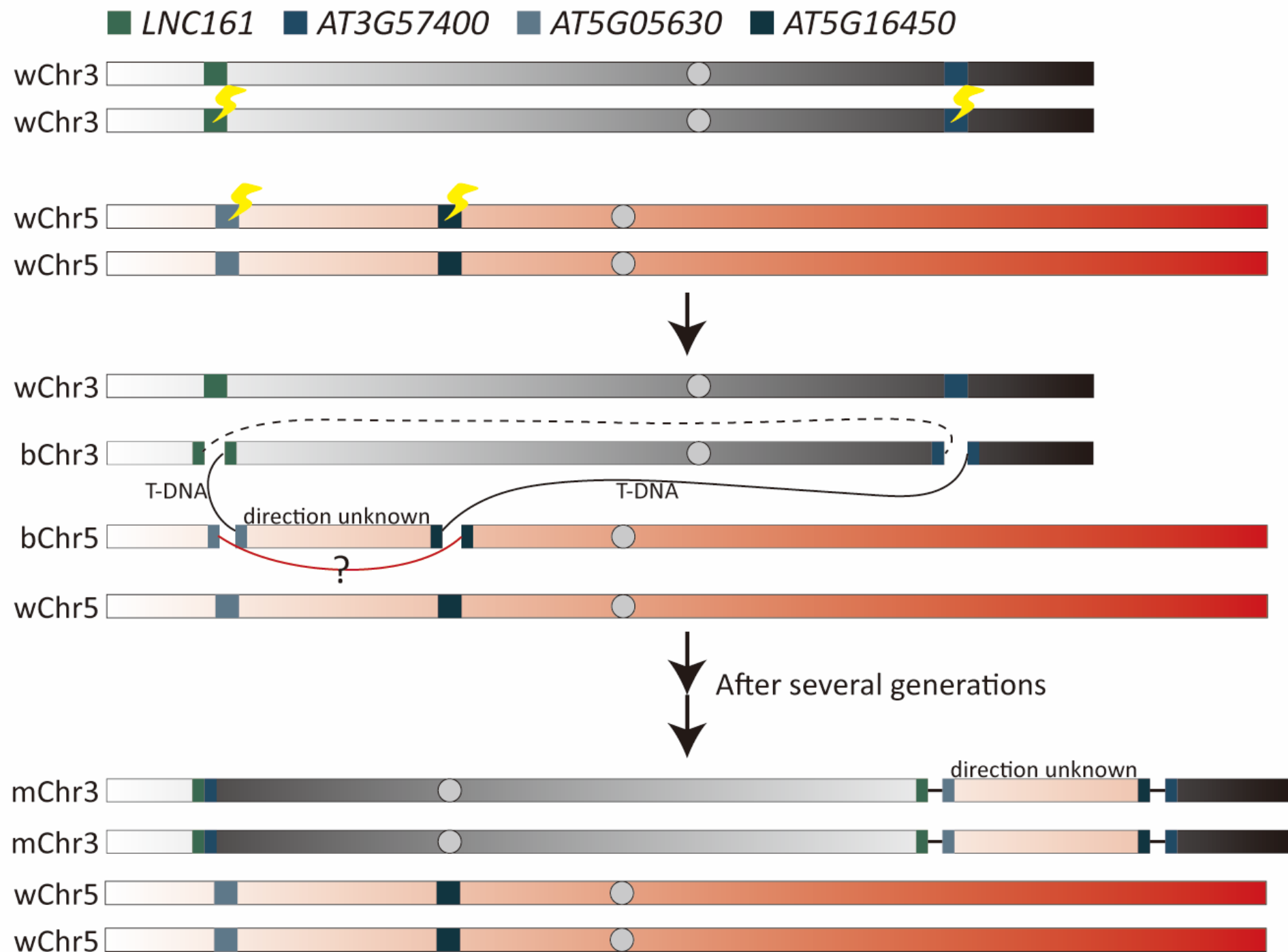
- 背景
- 前期工作
- 研究结果
- 总结与讨论
- 致谢

突变体*Inc161*染色体突变模型



T-DNA插入产生*lnc161*

染色体畸变的可能过程



目 录

- 背景
- 前期工作
- 研究结果
- 总结与讨论
- 致谢

致 谢

- 任国栋 老师
- 姜宁 老师
- 任国栋课题组成员：
高帅、李宁、王俊丽、王渊、陈素素、王镜谕、方宜潇、
杨林、梅俊、李中朋、陈露

谢谢聆听