

TILLING 技术在作物突变研究中的应用现状与前景

潘娜¹, 郭会君¹, 赵世荣¹, 王广金², 刘录祥¹

(¹中国农业科学院作物科学研究所/国家农作物航天诱变技术改良中心, 北京 100081;

²黑龙江省农业科学院生物技术研究所, 哈尔滨 150086)

摘要:定向诱导基因组局部突变(targeting induced local lesions in genomes, TILLING)技术将化学诱变与高通量突变检测技术相结合,可高效、快速地从突变群体中鉴定出目标基因突变位点。本文在概述 TILLING 技术应用于水稻、小麦、玉米、大豆等作物突变研究现状的基础上,重点综述了 TILLING 分析群体构建与突变位点检测方法的技术改进与发展,探讨了 TILLING 技术目前存在的问题与前景。

关键词:作物; TILLING; 点突变; 突变基因检测; 进展

Current Status and Perspectives of TILLING Technique for Crop Mutagenesis Research

PAN Na¹, GUO Hui-jun¹, ZHAO Shi-rong¹, WANG Guang-jin², LIU Lu-xiang¹

(¹National Center of Space Mutagenesis for Crop Improvement/Institute of Crop Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081; ²Biotechnology Research Institute, Heilongjiang

Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150086)

Abstract: TILLING (targeting induced local lesions in genomes) is a complete reverse genetics approach for rapid and high throughput detecting of the target point mutations induced by chemical mutagen—Ethyl Methane Sulfonic acid (EMS). This paper briefly introduced the application status of TILLING on main crops, i. e., rice, wheat, corn and soybean, etc, with the emphasis on a review of the advances in methodology of mutagenized population construction and novel mutant alleles detect. The problems and future prospects of TILLING were also discussed.

Key words: Crop; TILLING; Point mutation; Novel mutant allele detection; Progress

诱发突变技术作为一种有效的育种途径,在作物遗传改良、新材料创制和优良新品种选育等方面发挥了巨大的作用^[1]。传统诱变育种采用正向遗传学策略,从选择突变表型入手,经过不断筛选最终培育成新种质、新品种。这种选择容易受到环境条件的影响,选择过程比较复杂,效率较低。如何快速、高效地筛选变异个体尤其是对于不能直接观测的性状变异,一直是育种中亟需解决的关键问题。

定向诱导基因组局部突变(targeting induced local lesions in genomes, TILLING)技术^[2]则是基

于反向遗传学策略,将化学诱变、PCR 技术和高通量突变检测技术相结合,可高通量、快速准确地鉴定出由例如 EMS 等化学诱变剂诱变产生的 SNPs (single nucleotide polymorphisms, 单核苷酸多态性) 和 INDELS (insertions/deletions)。TILLING 提供了从分子水平上定向规模化筛选突变体的技术平台,尤其对品质和营养成分等无法从植株表型上加以选择或耐逆性、恢复性、不育性等难以快速评价的性状筛选尤为有利,提高了突变体筛选效率^[3]。

随着多个物种基因组序列的明确,进一步推

收稿日期:2011-01-06 修回日期:2011-03-29

基金项目:国家航天育种工程(发改高技[2003]138号);国家科技支撑计划(2009BAA24B05);国际原子能机构项目(CRP14195, CPR5017)

作者简介:潘娜,在读硕士。

通讯作者:刘录祥,研究员,主要研究方向为作物诱发突变与生物技术育种。E-mail:luxiang@263.net.cn

动了 TILLING 技术的广泛应用。目前国内外 TILLING 技术主要应用于功能基因组学、作物品种改良、突变资源创制、突变特性及突变位点检测和由 TILLING 发展而来的 EcoTILLING 技术在自然资源多态性评估中的应用等多方面的研究,同时还包括在 TILLING 应用过程中对技术本身所做出的改进与优化。迄今 TILLING 技术已广泛应用于小麦、水稻、大麦、玉米、莲子、香蕉等 20 多种作物^[4],产生并检测出大量的目标基因变异位点,获得了多个不同类型的突变体,为作物育种提供了新材料、新种质。然而与国外的研究进展相比,我国 TILLING 技术的发展还有待提高与推进。本文结合 TILLING 技术在作物突变研究中的应用现状,重点分析了 TILLING 分析群体构建与突变位点检测方法的技术改进与发展,并对 TILLING 技术目前存在问题与前景进行初步探讨。

1 TILLING 技术原理与流程

TILLING 技术是由美国华盛顿 Fred Hutchinson 癌症研究中心以 Steven Henikoff 为首的科学家发展建立的^[5],McCallum 等^[6]最初将 TILLING 技术应用于拟南芥基因功能研究中。传统 TILLING 技术,利用化学诱变方法处理种子或组织器官构建诱变群体,对群体提取 DNA 后,将多个样品的 DNA 混合并经 PCR 特异性扩增得到异源双链,利用 CEL I 等特异性核酸内切酶对变异位点切割,最后电泳检测酶切片段,鉴定出变异位点。TILLING 集成 DNA 建池、高通量的电泳检测和 96 孔微量滴定板自动加样等多种技术,具备高通量、自动化及快速的特点。2001 年,Colbert 等^[7]将双红外荧光扫描系统引入 TILLING 中,有效地排除了假阳性条带,提高了检测效率,其所描述的 TILLING 技术具体流程见图 1。

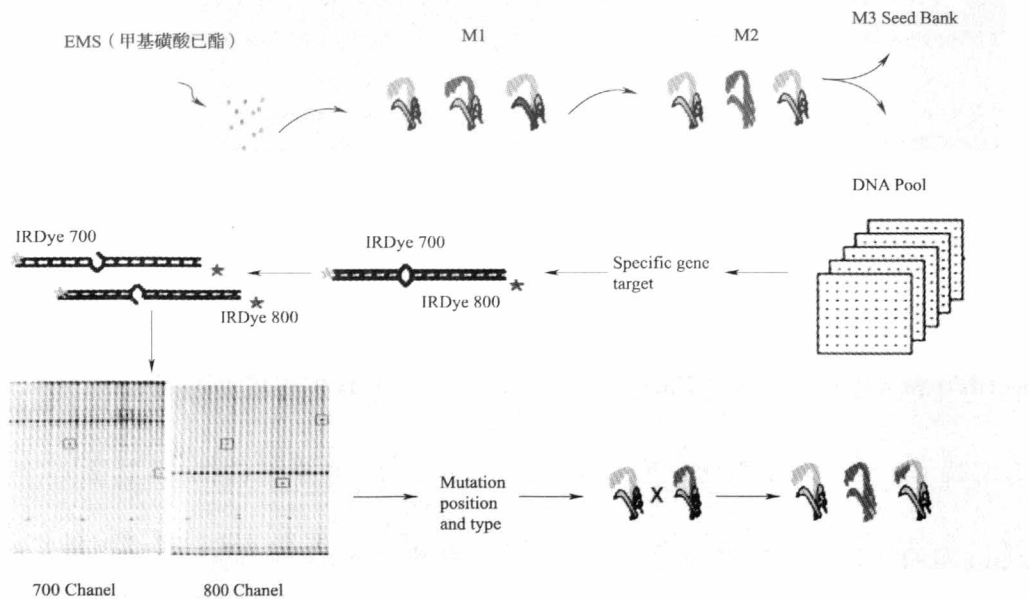


图 1 植物中传统 TILLING 技术流程

Fig. 1 The strategy of TILLING in plants

2 TILLING 技术在作物突变研究中的应用

TILLING 技术可以在大量突变群体中灵敏、准确地鉴定出突变,且没有物种局限性,在作物突变位点检测中得到了广泛应用。在小麦、水稻、大豆、大麦、玉米、燕麦等作物中(表 1),鉴定出大量的目的

基因突变位点并培育出具有优良性状的突变体。在 TILLING 基础上发展起来的 EcoTILLING,无需借助化学诱变群体,直接在自然群体中高效地检测单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)、插入/缺失多态性(insertion/deletion polymorphisms)、简单序列重复(simple sequence repeat, SSR)等^[8],目前已在拟南芥^[8]、小麦^[9]、杨树^[10]、大麦^[11]等多种植物上应用。

表 1 目前植物研究中利用 TILLING 检测出的目标基因数目及突变频率

Table 1 A list of the number of target genes and mutation frequency detected by TILLING from previously published plants studies

物种 Species	目的片段数日 No. of genes	诱变剂 Mutagen	诱变剂量 Mutagen Dose	突变频率 Mutation density	倍性 Ploidy	文献 Reference
小麦 Wheat	3	EMS	0.75% ~ 1.2%	1/24 kb	6X	[12]
		EMS	0.75% ~ 1%	1/40 kb	4X	
	5	EMS	0.7% ~ 0.75%	1/58Kb	6X	[13]
		EMS	0.9% ~ 1%	1/69Kb	4X	
	8	EMS	0.6% or 0.9%	—	6X	[14]
3	EMS	0.5% ~ 0.7%	1/23.3 ~ 1/37.5Kb	6X	[15]	
水稻 Rice	2	EMS	0.8% ~ 1%	0.5/Mb	2X	[16]
		EMS	1.6%	1/Mb	2X	
	10	Az-MNU	1mmol/L Az ~ 15mmol/L MNU	1/265 kb	2X	[17]
		EMS	1.5%	1/294 kb	2X	
	3	MNU	1mmol/L	1/135kb	2X	[18]
25	Gamma ray	500Gy	1/6190Kb	2X	[19]	
玉米 Maize	11	EMS	1%	2/Mb	2X	[20]
		EMS	0.0625%	0.93/kb B73	2X	[21]
		EMS	0.0625%	2.10/kb W22	2X	
大豆 Soybean	7	NMU	2.5mmol/L	1/140 kb	2X	[22]
		EMS	50mmol/L	1/250 kb		
		EMS	40mmol/L	1/550 kb		
豌豆 Pea	5	EMS	—	1/669Kb	2X	[23]
高粱 Sorghum	4	EMS	0.25%	1/526Kb	2X	[24]
大麦 Barely	2	EMS	20mmol/L ~ 30mmol/L	1/Mb	2X	[25]
	4	NaN3	10mmol/L	1/374 kb	2X	[26]
拟南芥 Arabidopsis	192	EMS	20 ~ 40mmol/L	1/300kb	2X	[27]
蒺藜苜蓿 Medicago truncatula	56	EMS	0.2% (16mmol/L)	1/970 kb	4X	[28]
芜菁 Brassica rapa	6	EMS	0.15% (12mmol/L)	1/485 kb		
芜菁 Brassica rapa	6	EMS	0.3% ~ 0.4%	1/60Kb	2X	[29]
马铃薯 Potato	3	Gamma ray	—	15/Kb	4X	[30]
番茄 Tomato	7	EMS	1%	1/322Kb	2X	[31]
		EMS	0.7%	1/574Kb		
燕麦 Oat	2	EMS	0.9%	1/38Kb	6X	[32]

2.1 在小麦中的应用

TILLING 技术首次在小麦中的应用是 Slade 等^[12]将其用于小麦淀粉品质改良,在 1920 个 EMS 诱变的 M₂单株中,通过检测 3 个同源片段,共获得 246 个独立的等位变异位点,突变频率为 1/24 ~ 1/

40 kb。有 94 种被认为与改变编码蜡质基因产物有关, *Waxy* 的酶活性表现为从近似野生型到几乎完全丧失等一系列变化。表型分析后,将一个 *Waxy* 基因在 D 基因组中发生的缺失突变体与一个在 A 基因组中产生的错义突变体杂交,获得了 *Waxy* 完

全丧失的糯质突变体。Uauy 等^[13]将 TILLING 技术应用于 EMS 诱变的四倍体与六倍体小麦中,在两个诱变群体中对淀粉支链合成酶基因 *SBEIIa*、*SBEIIb* 与小麦抗条锈病基因 *WKS1* 与 *WKS2* 的 11 个目标基因片段检测,共鉴定出 275 个突变位点,在六倍体与四倍体小麦中的突变频率分别为 1/38Kb 和 1/51Kb。

由于淀粉在作物中的重要作用,不断改善直链淀粉与支链淀粉的比例一直是研究热点。Sestili 等^[14]利用 SDS-PAGE 技术与 TILLING 技术,分析小麦中控制支链淀粉合成的淀粉合成酶基因 *SSII* 和控制直链淀粉合成的颗粒结合淀粉合成酶基因 *Waxy*。利用 SDS-PAGE 技术检测群体,获得了编码蛋白完全丧失的突变体。利用 TILLING 技术在小麦 Cadenza 品种的 EMS 诱变群体中,检测 *SSII* 基因的 3 个同源片段,共发现 33 个突变位点。所有突变均为 G/C 转换为 A/T,部分突变导致密码子的变换,改变了氨基酸编码或使翻译提前终止。发生在内含子或是密码子第三位碱基上的突变,没能导致表型变异。Dong 等^[15]利用 TILLING 技术,对小麦糯质基因 *Waxy* 及硬度基因 *Pina/Pinb* 进行检测,突变频率在 1/23.3 ~ 1/37.5Kb 之间。在 2348 株 EMS 诱变的 M_2 单株中对糯质基因 *Wx-A1* 及 *Wx-D1* 进行检测,共获得 121 个突变体,包括有沉默突变、错义突变及缺失突变。通过杂交两个基因缺失突变体(*Wx-A1* 缺失突变与 *Wx-D1* 缺失突变;这两个突变体中 *Wx-B1* 自然缺失)成功地培育出一个完全糯性的小麦品系。在 1420 株 EMS 诱变的 QAL2000 (软质小麦品种) M_2 单株中检测 *Pina* 与 *Pinb* 基因,获得 19 个突变体。其中 *Pinb* 基因的一个突变使得翻译提前终止,获得了一个硬粒突变体。

2.2 在水稻中的应用

Wu 等^[16]利用 EMS、DEB(双环氧丁烷)、快中子及 γ 射线诱导印度水稻品种 IR64,获得不同的突变群体,共约 60000 单株。对于 DEB、快中子与 γ 射线诱变群体,采用 PCR 扩增检测大片段缺失。利用 TILLING 技术分析不同浓度的 EMS 诱变群体,当 EMS 浓度为 0.8% 和 1% 时,通过检测 10 个基因,在 2 个基因 *pp2A4* (丝氨酸蛋白磷酸酶催化亚基) 与 *cal7* (胍肌质合成酶) 中发现不同的突变位点,突变频率为 0.5/Mb,突变序列测序验证后,为 G/C 到 A/T 的转变。EMS 浓度提高到 1.6% 时,突变频率提高到 1/Mb。Till 等^[17]分别用 EMS、Az-MNU 创造

了两个突变群体,每个群体均选择 768 个 M_2 单株用于 TILLING 检测。通过检测 *OsBZIP*、*OsDREB* 等 10 个基因,在 EMS 诱变群体中发现 27 个突变位点,Az-MNU 诱变群体中鉴定出 30 个突变位点,点突变频率分别为 1/294 kb 与 1/265 kb。Sato 等^[19]在 2130 个 γ 射线诱变的水稻 M_2 单株中,通过对 25 个目标基因(扩增引物选自 CAPS 标记)片段检测,发现了 6 个突变位点,其中 4 个为单碱基突变,2 个为小片段(2 ~ 4bp)缺失突变,突变频率约为 1/6190Kb。

2.3 在玉米中的应用

Till 等^[20]以 EMS 诱变玉米花粉得到的 750 株 M_1 个体为材料,利用 TILLING 技术检测 DNA 甲基转移酶(*DMT*)、组蛋白脱乙酰基酶(*HDA*)等 11 个不同基因,目的片段长度都约为 1Kb,共发现了 17 个点突变。对于 *DMT102* 基因,在群体中检测到 3 个错义突变,经 SIFT(sorting intolerant from tolerant) 与 PARSESNP(project aligned related sequences and evaluate SNPs)程序分析后,预测可能会导致蛋白保守区域的改变。2005 年,在 the Seattle TILLING Project(早期为 the Arabidopsis TILLING Project)的帮助下,玉米 TILLING 计划(the Maize TILLING Project)在美国普林斯顿大学实施^[21]。该计划构建了两个自交系的 EMS 诱变群体 B73 和 W22,目前已检测 105 个基因片段,共发现 576 个突变位点(<http://genome.purdue.edu/maizetilling/>)。检测获得的突变位点与突变体,加深了基因功能研究,丰富了玉米种质资源。

2.4 在大豆中的应用

Cooper 等^[22]利用 TILLING 技术分析大豆的 3 个 EMS 诱变群体(A,大豆品种为 Forrest,40mM EMS;B,大豆品种为 Williams82,40mM EMS;C,大豆品种为 Williams82,50mM EMS),1 个 NMU 诱变群体(D,Williams82,2.5mM NMU)。在 4 个群体中均检测 *CLVIA*、*NARK*、*PPCK4* 等 7 个基因,共发现 116 个突变位点,A、D 群体的突变频率为 1/140Kb,B、C 分别为 1/550Kb 与 1/250Kb。Dierking 等^[33]将 TILLING 技术运用于大豆种子油脂成分性状的研究,在 EMS 诱变群体中对棉子糖合成酶基因 *RS2* 及 ω -6 脂肪酸脱氢酶基因 *FAD2-1A* 检测突变位点,分别鉴定出 4 个与 3 个独立的突变体。在 *RS2* 基因中鉴定出的突变体中,2 个突变位点导致氨基酸的变化,其中一个突变使种子低聚糖含量降低,蔗糖含量升高。在 *FAD2-1A* 基因中鉴定出的 3 个突变体,都

使氨基酸发生了错义突变,其中一个突变改变了种子中脂肪酸含量,使种子油酸含量升高,亚麻油酸含量下降。

2.5 在燕麦中的应用

Chawade 等^[32]构建了用于 TILLING 分析的燕麦 EMS 诱变群体,对 M_2 全生育期表型观测,约有 5% 的植株产生了如失绿、矮秆、开花期推迟等的表型变异。利用基于 MALDI-TOF (matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight mass spectrometer) 的方法在 2600 个 M_2 单株中检测 β -葡聚糖合成基因 *AsCslF6* 与苯丙氨酸裂合基因 *AsPAL1* 的突变位点,分别鉴定出 5 个和 6 个多态性位点,突变频率约为 1/38Kb。同时用 DNA 直接测序的方法在 M_2 群体中鉴定这两个基因,除了检测出利用 MALDI-TOF 方法发现的所有突变外,在 *AsCslF6* 基因中又鉴定出 5 个新的突变位点,突变频率约为 1/22.4Kb。这些突变体经 SIFT 和 PSSM 表型估测后,并不能引起表型变异。

3 TILLING 技术改进研究

为了进一步扩大 TILLING 技术的应用范围,提高突变检测效率,在各国科学家的努力下,TILLING 技术不断发展,主要包括 TILLING 检测群体创建与突变位点凝胶检测系统的改进,本文将结合具体实例一一介绍。

3.1 TILLING 分析群体的构建

诱变群体的构建是利用 TILLING 技术检测突变的基础,适合的突变群体是能检测到目的基因突变位点的保证。通常 TILLING 技术流程中,于 M_2 代提取基因组 DNA 后将多个样本的 DNA 等量等浓度混合构成 DNA 池,提高检测效率。目前发展起来的其他几种群体构建方法如下所示。

Dong 等^[15]将 TILLING 技术用于小麦育种时,从每个 M_1 单株上取 5 个不同的穗子,单株保存,单穗种植,构建成 M_2 检测群体。同一单株上的不同穗子可能起源于同一分生组织细胞也可能起源于不同的分生组织,因此来源于同一单株上的不同穗子可能会出现相同的突变或不同的突变。 M_1 群体数量相对较少时,通过这种方法构建 M_2 突变检测群体,可以更方便、更多地保存 DNA 遗传多样性。Signor 等^[28]利用 TILLING 分析蒺藜苜蓿,构建了两个 EMS 诱变群体 EMS1 与 EMS2,两个群体具有相同的 M_2 群体数量,但 M_1 群体数量不相同。EMS1 群体来源于 500 个 M_1 单株,是从每个 M_1 单株中收获 12 粒种

子种植形成 4500 个 M_2 单株。EMS2 群体,通过单粒传法构建,即由 4350 个 M_1 单株产生了 4350 个 M_2 单株。通过对 56 个目标基因片段检测,共鉴定出 546 个突变位点。EMS2 群体的突变频率为 1/485Kb,是 EMS1 诱变群体的两倍。单粒传法的 EMS2 群体诱变效率要高于 EMS1 检测群体,不过 EMS1 群体构建方法可以估测种子诱变后基因发生突变的细胞数目。

传统 TILLING 检测群体多以化学诱变群体为主,目前 TILLING 也已成功应用于物理诱变群体分析。Sato 等^[19]采用 γ 射线处理水稻种子,采用单粒传法构建 M_2 检测群体,共 2130 个单株。在 M_2 群体中通过对 25 个基因区域检测,鉴定出 6 个突变位点,其中 4 个突变为 SNP,另两个分别为 2bp 与 4bp 的缺失突变, γ 射线诱导的突变频率为 1/6190Kb。 γ 射线诱变的点突变频率低于 EMS 诱变,小片段缺失频率却比 EMS 诱变高的多。

3.2 DNA 建池策略

Sreelakshmi 等^[34]将 NEATTILL (nucleic acid extraction from arrayed tissue for TILLING) 技术应用于番茄 TILLING 分析群体的构建,它是一种改进了的高通量 DNA 提取技术,在 DNA 提取之前采用 2-D (2-dimensional,即同一个样本同时存在于 DNA 池中横排与竖列的两个混合样本中)法混合不同植株的叶片。即 M_2 种子在发芽 7~10 天子叶完全展开时,取 8 个不同植株的叶片等量混合,提取基因组 DNA。这种方法的优势在于:(1)样品组织提前等量混合,减少了 DNA 提取数目与试剂消耗,节约了工作时间。(2)操作步骤的减少,从而降低了 DNA 降解的机率。(3)采用 2-D 法混合样品,若某个样品发生突变,这个突变会同时出现在 DNA 池中的两个样本中,通过凝胶图像可以直接鉴定出突变样本,提高了效率。NEATTILL 不足之处在于,样品组织混合后提取 DNA,会受到提取试剂及实验器械的限制,也就限制了样品的混合倍数。总之,当 TILLING 检测群体数量较大时,为了提高效率、减少耗费,采用 NEATTILL 技术是较好的选择。

3.3 突变位点鉴定

最初 TILLING 利用变性高效液相色谱 (DH-PLC) 检测 DNA 池中的突变,为了进一步提高突变筛选效率,Colbert 等^[7]对 TILLING 作了改进。即由野生型与突变体的目的扩增片段形成的异源双链经特异性核酸内切酶切割后,用具备双色红外荧光检测功能的 LI-COR 4300 DNA 遗传分析系统检测酶

切片段。由于双红外荧光检测的背景低,灵敏度高,而且可以有效地排除假阳性位点,大大提高了 TILLING 筛选效率^[35]。

Dong 等^[15]运用 TILLING 技术分析小麦 EMS 诱变群体时,通过改进的琼脂糖凝胶寻找基因突变位点。PCR 扩增产物经 CEL I 酶切后,酶切产物直接用 2% 的琼脂糖凝胶电泳检测,当凝胶厚度控制在 4mm 以内时,可以有效地检测到 8 倍 DNA 池中的酶切片段。Sato 等^[19]利用 TILLING 技术分析水稻 γ 射线诱变群体时,采用加有 SYBR Green I 染料的琼脂糖凝胶检测突变,在 25 个目标基因中检测到 6 个突变位点。琼脂糖凝胶检测突变,优势在于简化了 TILLING 流程,降低了实验成本,但同时检测灵敏度降低。

CEL I 是单链切割酶,当酶浓度优化到一个合适范围时,CEL I 可以在突变位点对双链进行切割,凝胶也就不需要变性处理。Uauy 等^[13]在小麦 EMS 诱变群体中,将非变性聚丙烯酰胺凝胶引入 TILLING 技术。用非荧光标记引物扩增目的片段,酶切产物直接用电泳检测,EB 染色观察。这种方法简化了传统 TILLING 流程,由于不采用荧光引物,使目的片段特异性扩增相对容易。为了检测本系统与 LI-COR 系统检测灵敏度,分别利用 LI-COR 系统与 3% 非变性聚丙烯酰胺凝胶对 *WKS1* 与 *WKS2* 基因的 4 个区域检测突变。两种方法鉴定出的突变数目相近,突变频率分别为 1/40Kb 与 1/41.5Kb,因此利用非变性聚丙烯酰胺凝胶在小麦 4 倍 DNA 池中的检测灵敏度没有降低。

CEL I 既能从 3' 端切割含有错配碱基的异源双链,又能切割 5' 末端带有荧光标记的 PCR 产物,削弱了产物的荧光信号。Lee 等^[36]将 EMAIL (endonucleolytic mutation analysis by internal labelling) 引入 TILLING 技术,使毛细管凝胶电泳与 PCR 扩增产物内部荧光标记结合,高灵敏度地检测酶切产生的峰值变化。PCR 产物合成时,以具有荧光标记的 dUTP 为原料,合成内部具有荧光信号的目的片段。当 CEL I 酶切时,具有内部荧光标记的 PCR 产物既保护了荧光信号又降低了检测背景,使得检测灵敏度提高,尤其有利于对于小片段酶切产物的检测。检测灵敏度的提高增加了 DNA 混合的倍数,由此提高了突变检测的通量与效率。Suzuki 等^[18]利用非荧光标记引物与毛细管凝胶电泳系统 HAD-GT12 检测突变,通过引入 EB 来检测酶切片段。

4 结论

4.1 TILLING 技术目前存在的问题

目前,大量研究报告表明 TILLING 技术在突变位点检测方面发展成熟,在多个物种中建立起突变检测平台,但没有完善的表型鉴定服务。而且对于多倍体物种,设计特异性引物至关重要,否则会影响到检测效率,这也是限制 TILLING 技术高效应用的一个瓶颈。特异性引物可通过设计特异性引物^[12]或是切割掉非特异性条带来获得^[22]。在未来 TILLING 技术发展中,应加速表型鉴定进展,发展高通量表型鉴定,使 TILLING 技术在作物育种及品种改良中发挥应有的作用。

4.2 TILLING 技术发展趋势与前景

TILLING 作为一种高通量鉴定突变位点的技术,在作物品种改良、突变资源创制中发挥着重要的作用,将传统诱变育种推向分子突变育种新时代。为了方便、高效地将 TILLING 技术服务于作物遗传改良与品种选育,目前已在多个物种中建立了 TILLING 技术服务平台。拟南芥^[27] TILLING 计划 (ATP, arabidopsis TILLING project) 的成功实施,带动了多种作物包括玉米、水稻、大麦 (TILLMore)、莲子、番茄 (TOMATILL)、豌豆 (PETILL) 及油菜 (RAPTIL) 等 TILLING 检测服务系统。这些专项 TILLING 计划,通过建立标准化的 TILLING 技术平台,共享突变体网络数据库资源,提高了突变检测效率,降低了成本,可以有效地服务于科研及企事业单位,提高 TILLING 技术应用效率。正在建立的 TILLING 计划有木薯 TILLING 及 EcoTILLING 技术平台,旨在提高木薯的产量与品质^[37]。

2010 年 4 月 15 - 16 日,由英国研究理事会 (RCUK), 英国生物技术和生物科学研究委员会 (BBSRC), RevGenUK 和中国科学院植物研究所联合主办的“中 - 英双边 TILLING 及相关技术研讨会”在中国科学院植物研究所举行。会议的主题就 TILLING 及 EcoTILLING 在基因功能分析与作物改良中的应用展开交流,报告了定向检测 SNP 的最新研究进展及相关技术内容。此次会议及论文报告集中反映了当前 TILLING 技术研究与应用的最新进展和未来发展趋势,并就如何选择及建立 TILLING 技术平台给出详细讲解^[38]。

随着越来越多物种基因组序列的破译,将会进一步扩大 TILLING 技术的物种检测范围及其更多的目标基因,这为 TILLING 技术的广泛应用奠定了

基础。科研工作者之间对 TILLING 的技术要点、改进及其最新的研究进展开展的深入交流与探讨,将会让更多的研究人员掌握 TILLING 技术平台的建立和应用,推动该技术的快速发展。同时不断增加的专门物种 TILLING 技术服务平台的设立,使得 TILLING 技术更为高效、普遍地应用到突变体的检测及其他研究中。总之,TILLING 技术作为一种高效的反向遗传学研究方法,将会在作物突变研究中发挥着越来越重要的作用。

参考文献

- [1] 刘录祥,郭会君,赵林姝,等.植物诱发突变技术育种研究现状与展望[J].核农学报,2009,23(6):1001-1007
- [2] 吴海滨,朱汝财,赵德刚,等.TILLING 技术的原理与方法述评述[J].分子植物育种,2004,2(4):574-580
- [3] 李春寿,阮关海,张琳琳,等.TILLING 技术的原理、特点及其在点突变筛选中的应用[J].核农学报,2005,19(4):317-321
- [4] IAEA Book Abstracts of FAO/IAEA International Symposium on Induced Mutations in Plants[M]. Vienna,2008:12-15
- [5] McCallum C M,Comai L,Green E A, et al. Targeted screening for induced mutations[J]. Nat Biotechnol,2000,18:455-457
- [6] McCallum C M,Comai L,Green E A, et al. Targeting Induced Local Lesions IN Genomes (TILLING) for Plant Functional Genomics[J]. Plant Physiol,2000,123:439-442
- [7] Colbert T,Till B J,Henikoff S, et al. High-throughput screening for induced point mutation[J]. Plant Physiol,2001,126:480-484
- [8] Comai L,Young K,Till B J, et al. Efficient discovery of DNA polymorphisms in natural populations by EcoTilling[J]. Plant,2004,37(5):778-786
- [9] Wang J,Sun J Z,Zhang A M, et al. Analysis of Pina and Pinb alleles in the micro-core collections of Chinese wheat germplasm by EcoTilling and identification of a novel Pinb allele[J]. J Cereal Sci,2008,48(3):836-866
- [10] Gilchrist E,Codomo C A,Taylor N E, et al. Use of EcoTILLING as an efficient SNP discovery tool to survey genetic variation in wild populations of *Populus trichocarpa*[J]. Mol Ecol,2006,15(5):1367-1378
- [11] Mejlhede N,Kyjojska Z,Backes G, et al. EcoTILLING for the identification of allelic variation in the powdery mildew resistance genes *mlo* and *m1a* of barley[J]. Plant Breed,2006,125(5):461-467
- [12] Slade A J,Fuerstenberg S I,Loeffler D, et al. A reverse genetic nontransgenic approach to wheat crop improvement by TILLING[J]. Nat Biotechnol,2005,23:75-81
- [13] Uauy C,Paraiso F,Colasuonno P, et al. A modified TILLING approach to detect induced mutations in tetraploid and hexaploid wheat[J]. BMC Plant Biol,2009,9:115-128
- [14] Sestili F,Bedo Z,Phillips A, et al. Production of novel allelic variation for genes involved in starch biosynthesis through mutagenesis[J]. Mol Breed,2010,25:145-154
- [15] Dong C M,Morgan J D,Sharp P, et al. A Modified TILLING Method for Wheat Breeding[J]. The Plant Genome,2009,2:39-47
- [16] Wu J L,Wu C,Leung H, et al. Chemical and irradiation-induced mutants of indica rice IR64 for forward and reverse genetics[J]. Plant Mol Biol,2005,59:85-97
- [17] Till B J,Cooper J,Comai L, et al. Discovery of chemically induced mutations in rice by TILLING[J]. BMC Plant Biol,2007,7:19-30
- [18] Suzuki T,Eiguchi M,Kurata N, et al. MNU-induced mutant pools and high performance TILLING enable finding of any gene mutation in rice[J]. Mol Genet Genomic,2008,279:213-223
- [19] Sato Y,Shirasawa K,Nishio T, et al. Mutant selection from progeny of gamma-ray irradiated rice by DNA heteroduplex cleavage using brassica petiole extract[J]. Breed Sci,2006,56:179-183
- [20] Till B J,Reynolds S H,Henikoff S, et al. Discovery of induced point mutations in maize genes by TILLING[J]. BMC Plant Biol,2004,4:12-19
- [21] Weil C F,Monde R A. Getting to the point Mutations in maize[J]. Crop Sci,2007,47:S60-S67
- [22] Cooper J L,Till B J,Henikoff S, et al. TILLING to detect induced mutations in soybean[J]. BMC Plant Biol,2008,8:9-18
- [23] Triques K,Sturbois B,Bendahmane A, et al. Characterization of *Arabidopsis thaliana* mismatch specific endonucleases; application to mutation discovery by TILLING in pea[J]. Plant J,2007,51:1116-1125
- [24] Xin Z G,Wang M L,Burke J, et al. Applying genotyping (TILLING) and phenotyping analyses to elucidate gene function in a chemically induced sorghum mutant population[J]. BMC Plant Biol,2008,8:103-116
- [25] Caldwell D G,McCallum N,Waugh R, et al. A structured mutant population for forward and reverse genetics in Barley (*Hordeum vulgare* L.) [J]. Plant J,2004,40:143-150
- [26] Talamè V,Bovina R,Salvi S, et al. TILLMore, a resource for the discovery of chemically induced mutants in barley[J]. Plant Biotechnol J,2008,6:477-485
- [27] Greene E A,Codomo C A,Henikoff S, et al. Spectrum of chemically induced mutations from a large-scale reverse-genetic screen in *Arabidopsis*[J]. Genet,2003,164:731-740
- [28] Signor C L,Savois V,Thompson R, et al. Optimizing TILLING populations for reverse genetics in *Medicago truncatula*[J]. Plant Biotechnol J,2009,7:430-441
- [29] Pauline S,David B,Lars stergaard, et al. A rich TILLING resource for studying gene function in *Brassica rapa*[J]. BMC Plant Biol,2010,10:62-71
- [30] Elias R,Till B J,Al-Safadi B, et al. Optimizing TILLING and EcoTilling techniques for potato (*Solanum tuberosum* L.) [J]. BMC Res Notes,2009,2:141-152
- [31] Minoia S,Petrozza A,Carriero F, et al. A new mutant genetic resource for tomato crop improvement by TILLING technology[J]. BMC Res Notes,2010,3:69-76
- [32] Chawade A,Sikora P,Olsson O, et al. Development and characterization of an oat TILLING-population and identification of mutations in lignin and β -glucan biosynthesis genes[J]. BMC Plant Biol,2010,10:86-98
- [33] Dierking E C,Bilyeu K D. New sources of soybean seed meal and oil composition traits identified through TILLING[J]. BMC Plant Biol,2009,9:89-99
- [34] Sreelakshmi Y,Gupta S,Sharma R, et al. NEATTILL: A simplified procedure for nucleic acid extraction from arrayed tissue for TILLING and other high-throughput reverse genetic applications[J]. Plant Methods,2010,6:3-13
- [35] Middendorf L R,Bruce J C,Bruce R C, et al. Continuous on-line DNA sequencing using a versatile infrared laser scanner/electrophoresis apparatus[J]. Electrophoresis,1992,13:487-494
- [36] Lee S L,Cross M J,Henry R J. EMAIL - A Highly Sensitive Tool for Specific Mutation Detection in Plant Improvement Programs in "Induced Plant Mutations in the Genomics Era" (Edited by Shu Q Y) [M]. Vienna,2009:243-244
- [37] Tadele Z,Mba C,Till B J. Tilling for mutations in Model Plants and Crops in "Molecular Techniques in Crop Improvement" (Edited by S Mohan Jain and D S Brar) [M]. SpringerLink,2009,3:307-332
- [38] Wang T,Uauy C,Liu C M, et al. TILLING and Associated Technologies[J]. J Integrative Plant Biol,2010,52(11):1027-1030

作者: 潘娜, 郭会君, 赵世荣, 王广金, 刘录祥, PAN Na, GUO Hui-jun, ZHAO Shi-rong, WANG Guang-jin, LIU Lu-xiang

作者单位: 潘娜, 郭会君, 赵世荣, 刘录祥, PAN Na, GUO Hui-jun, ZHAO Shi-rong, LIU Lu-xiang (中国农业科学院作物科学研究所/国家农作物航天诱变技术改良中心, 北京, 100081), 王广金, WANG Guang-jin (黑龙江省农业科学院生物技术研究所, 哈尔滨, 150086)

刊名: 植物遗传资源学报 **ISTIC PKU**

英文刊名: Journal of Plant Genetic Resources

年, 卷(期): 2011, 12(4)

参考文献(38条)

1. Lee S L; Cross M J; Henry R J EMAIL-A Highly Sensitive Tool for Specific Mutation Detection in Plant Improvement Programs in "Induced Plant Mutations in the Genomics Era" (Edited by Shu Q Y) Vienna 2009
2. Middendorf L R; Bruce J C; Bruce R C Continuous on-line DNA sequencing using a versatile infrared laser scanner/electrophoresis apparatus 1992
3. Sreelakshmi Y; Gupta S; Sharma R NEATTILL: A simplified procedure for nucleic acid extraction from arrayed tissue for TILLING and other high-throughput reverse genetic applications 2010
4. Dierking E C; Bilyeu K D New sources of soybean seed meal and oil composition traits identified through TILLING 2009
5. Chawade A; Sikora P; Olsson O Development and characterization of an oat TILLING-population and identification of mutations in lignin and β -glucan biosynthesis genes 2010
6. Minoia S; Petrozza A; Carriero F A new mutant genetic resource for tomato crop improvement by TILLING technology 2010
7. Wang T; Uauy C; Liu C M TILLING and Associated Technologies 2010(11)
8. Tadele Z; Mba C; Till B J Tilling for mutations in Model Plants and Crops in "Molecular Techniques in Crop Improvement" (Edited by S Mohan Jain and D S Brar) 2009
9. Weil C F; Monde R A Getting to the point Mutations in maize 2007
10. Till B J; Reynolds S H; Henikoff S Discovery of induced point mutations in maize genes by TILLING 2004
11. Sato Y; Shirasawa K; Nishio T Mutant selection from progeny of gamma-ray irradiated rice by DNA heteroduplex cleavage using brassica petiole extract 2006
12. Suzuki T; Eiguchi M; Kurata N MNU-induced mutant pools and high performance TILLING enable finding of any gene mutation in rice 2008
13. Till B J; Cooper J; Comai L Discovery of chemically induced mutations in rice by TILLING 2007
14. Elias R; Till B J; Al-Safadi B Optimizing TILLING and Ecotilling techniques for potato (Solanum tuberosum L.) 2009
15. Pauline S; David B; Lars stergaard A A rich TILLING resource for studying gene function in Brassica rapa 2010
16. Signor C L; Savoie V; Thompson R Optimizing TILLING populations for reverse genetics in Medicago truncatula 2009
17. Greene E A; Codomo C A; Henikoff S Spectrum of chemically induced mutations from a large-scale reverse-genetic screen in Arabidopsis 2003
18. Talamè V; Bovina R; Salvi S TILLMore, a resource for the discovery of chemically induced mutants in barley 2008
19. Caldwell D G; McCallum N; Waugh R A A structured mutant population for forward and reverse genetics in Barley (Hordeum vulgare L.) 2004
20. Xin Z G; Wang M L; Burke J Applying genotyping (TILLING) and phenotyping analyses to elucidate gene function in a chemically induced sorghum mutant population 2008
21. Triques K; Sturbois B; Bendahmane A Characterization of Arabidopsis thaliana mismatch specific endonucleases: application to mutation discovery by TILLING in pea 2007

22. [Wu J L;Wu C;Leung H Chemical and irradiation-induced mutants of indica rice IR64 for forward and reverse genetics 2005](#)
23. [Cooper J L;Till B J;Henikoff S TILLING to detect induced mutations in soybean 2008](#)
24. [刘录祥;郭会君;赵林姝 植物诱发突变技术育种研究现状与展望 2009\(06\)](#)
25. [McCallum C M;Comai L;Greene E A Targeted screening for induced mutations 2000](#)
26. [IAEA Book Abstracts of FAO/IAEA International Symposium on Induced Mutations in Plants 2008](#)
27. [李春寿;阮关海;张琳琳 TILLING技术的原理、特点及其在点突变筛选中的应用 2005\(04\)](#)
28. [吴海滨;朱汝财;赵德刚 TILLING技术的原理与方法述评述 2004\(04\)](#)
29. [Dong C M;Morgan J D;Sharp P A Modified TILLING Method for Wheat Breeding 2009](#)
30. [Sestili F;Bedo Z;Phillips A Production of novel allelic variation for genes involved in starch biosynthesis through mutagenesis 2010](#)
31. [Uauy C;Paraiso F;Colasuonno P A modified TILLING approach to detect induced mutations in tetraploid and hexaploid wheat 2009](#)
32. [Slade A J;Fuerstenberg S I;Loeffler D A reverse genetic nontransgenic approach to wheat crop improvement by TILLING 2005](#)
33. [Mejhlhedel N;Kyjovska Z;Backesl G EcoTILLING for the identification of allelic variation in the powdery mildew resistance genes mlo and mla of barley 2006\(05\)](#)
34. [Gilchrist E;Codomo C A;Taylor N E Use of EcoTILLING as an efficient SNP discovery tool to survey genetic variation in wild populations of Populus trichocarpa 2006\(05\)](#)
35. [Wang J;Sun J Z;Zhang A M Analysis of Pina and Pinb alleles in the micro-core collections of Chinese wheat germplasm by Ecotilling and identification of a novel Pinb allele 2008\(03\)](#)
36. [Comai L;Young K;Till B J Efficient discovery of DNA polymorphisms in natural populations by Ecotilling 2004\(05\)](#)
37. [Colbert T;Till B J;Henikoff S High-throughput screening for induced point mutation 2001](#)
38. [McCallum C M;Comai L;Greene E A Targeting Induced Local Lesions IN Genomes \(TILLING\) for Plant Functional Genomics 2000](#)

本文链接: http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical_zwyczyxb201104016.aspx