

# 植物突变体库的作用及构建研究进展

高志勇<sup>1,2</sup> 谢恒星<sup>1,2</sup> 王志平<sup>1,2</sup> 刘史力<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>渭南师范学院化学与环境学院, 714099, 陕西渭南; <sup>2</sup>陕西省河流湿地生态与环境重点实验室, 714099, 陕西渭南)

**摘要** 发生突变的个体叫作突变体。突变体往往具有与野生型不同的表型, 这样就为缺失组分的功能研究提供了有益的信息。主要介绍了植物突变体库的作用及构建方法, 重点论述了自发突变体库、理化诱变突变体库及 T-DNA 插入突变体库的构建原理与特征, 并对植物突变体库的研究前景进行了展望。

**关键词** 植物; 突变体库; 功能基因组; 构建

分子生物学的迅速发展, 积累了大量的基因序列和 EST 等信息, 基因组学研究也随之进入后基因组时代。后基因组时代是功能基因组学的时代。功能基因组学是在研究生物有机体内各种基因生物学功能的基础上, 进一步解析所有基因协调发挥作用的机制, 以及完成一系列生长发育的过程<sup>[1]</sup>。要准确揭示每个基因的功能及它们之间的相互联系, 就要进行单个基因和多个基因的突变表型及其时空表达特征的分析<sup>[2]</sup>。随着分子生物学新技术、新方法的不断发展与创新, 越来越多的方法用于基因功能的分析鉴定, 其发展使得功能基因组学的分支学科逐渐形成<sup>[3]</sup>。多种分析鉴定基因功能的方法逐渐成熟, 其中构建饱和基因突变体库是最直接和有效的方法, 基因功能的鉴定可以通过对突变体的分析来完成<sup>[4]</sup>。在功能基因组学研究中, 构建有效的突变体库是一个重要的方法。

## 1 突变体库的作用

在遗传学的研究中, 必须要有相应的突变体材料, 才能开展相关基因的功能研究工作。由于存在自发突变, 所以在自然环境中, 也会出现不同表型的突变体。早期的遗传学研究通常是采用正向遗传学的研究方法, 通过所获得的特定性状的突变体来挖掘和确定控制特定性状的基因, 对基因功能作出相应分析<sup>[5]</sup>。随着基因组测序工作的大规模开展, 大量核酸序列信息的获得, 依靠自发突变获得的突变体进行基因功能的研究已远远不能满足当今

分子生物学的研究需要。要搞清楚获得的基因序列所代表的生物学信息, 寻找基因片段序列发生改变的相应突变体材料是最直接高效的基因功能研究方法<sup>[6]</sup>。要高通量地对植物基因进行功能研究, 就必须要有足够的突变体材料, 就要开展植物物种的大型突变体库的创制工作。利用已经取得的植物物种的全基因组序列信息, 借助于反向遗传学的研究方法, 对突变体库进行大规模的高通量筛选, 从理论上讲, 最终就能得到所有不同基因的突变体, 以实现解释基因组中所有基因功能的目的<sup>[7]</sup>。

突变体是遗传学研究所必需的基础材料, 并且突变体还在作物的遗传育种和品质改良上有重大的作用。从遗传学研究的发展历程中可以看到, 自三大遗传学规律的发现, 到现代农业生产上发生的两次绿色革命, 无一不与突变体的发现和研究有着密切的关系。

首先, 突变体在基础研究中, 是必不可少的试验材料。在植物功能基因组学的研究中, 创建大型的突变体库, 无疑将对研究工作的开展具有重大的意义。豌豆花色、种子形态, 果蝇眼睛的颜色、翅膀的有无, 矮牵牛花色等大批突变体的获得, 对经典遗传学的发展起到了重大的推动作用, 为孟德尔的分离规律、自由组合规律以及摩尔根的连锁与互换规律的创立提供了依据。现代分子遗传学、植物功能基因组学等的发展过程表明, 许多成果的取得都与突变体库的构建发展有着紧密的关系。在玉米中许多功能基因的克隆和功能分析都是首先获得突变体材料, 而后对相应基因进行研究的<sup>[8]</sup>。伴随着后基因组时代的来临和多种植物全基因组序列测序的顺利完成, 对基因进行大规模的克隆, 分析解释基因的功能, 已经提上日程。通过筛选大量突变体

作者简介: 高志勇, 副教授, 研究方向为植物生物学

基金项目: 陕西省教育厅 2016 年重点科学研究计划项目 (16JS031);

渭南师范学院理工类人才基金项目 (2015ZRRC02);

渭南师范学院科研计划项目 (15YKF003)

收稿日期: 2016-08-12; 修回日期: 2016-09-27

或特种质材料进行定位群体创建的传统方法已远远不能满足这种高通量、大规模的功能基因组研究。所以，饱和突变体库的建立成为进行功能基因组学研究的必要组成部分，也是进行功能基因组学研究获得成功的关键因素。

其次，突变体库的建立对作物的品种选育、品质改良以及遗传基础的拓宽也有重要意义。往往通过对突变体的研究，发现一些有利基因。突变可能在染色体组的水平上，如多倍体、单倍体、非整倍体的产生等；也可能发生在染色体水平上，如缺失、重复、倒位、易位等；还可能发生在细胞核基因组水平上，如半矮秆、光敏核不育等；还可能发生在细胞质 DNA 水平上，如细胞质雄性不育等，都是由细胞质基因控制的。突变的产生，既可以在自然条件下自发产生，也可以由人工诱变而产生。农业育种史上引发第一次“绿色革命”的 *sdl* 基因、促使第二次“绿色革命”的野败型胞质雄性不育基因都是来源于自发突变。人工诱变会显著提高物种的突变频率，是进行人工遗传育种的一个有效手段。全世界利用人工诱变进行植物改良的物种数已超过 150 种，其中大部分是进行种子繁殖的植物，另外也有一些进行无性繁殖的作物和果树等。目前，拟南芥、水稻、玉米等突变体库的建立，在研究植物功能基因组学上发挥了重大的作用。

## 2 植物突变体库的构建

依据突变体库建立的方法，突变体库分为自发突变体库、理化诱变突变体库和插入突变体库三类。

### 2.1 自发突变体库

自然界中，经过自然选择和人工选择长久的积累，可形成自发突变体库<sup>[9]</sup>。在自发突变体库中存在着大量的突变，但其中突变体的遗传背景却是异常复杂的，这势必给研究者的工作带来很大的困难，并且自发突变的频率很低，难以满足高通量、大规模的功能基因组学研究。在对自发突变的研究中，可以把各种自发突变体和同一亲本进行多次回交，建立近等基因系。近等基因系遗传背景相近，在遗传学研究上和品种改良上有着重大的作用。

### 2.2 理化诱变突变体库

利用有诱变作用的理化因素对植物进行处理，可以构建植物理化诱变突变体库。诱变过程中，常采用的物理诱变因素有伽玛射线、快中子等；化学

诱变中，常使用的化学诱变剂有 DES、EMS 等<sup>[10]</sup>。理化诱变处理一般效应较强，往往只引起个别或者少量位点的 DNA 结构发生变化，因而在总体上，所构建的理化突变体库，其遗传背景还是一致的。由于存在这个特征，所以在分子生物学的研究中，特别是在进行基因克隆和功能分析的研究上，理化诱变得到了极大关注。理化诱变操作方便，诱变效率高，会产生 DNA 的点突变、缺失或重排等。目前理化诱变在拟南芥、水稻等突变体库的创建上已得到广泛应用。同 T-DNA 或转座子标签相比，理化诱变的突变位点不含有已知标签的序列信息，所以通过理化诱变获得的突变体，对它进行基因分离，一般只能利用图位克隆的办法，这就需要构建一个突变性状分离的群体进行基因定位<sup>[11]</sup>。对获得的理化突变体库，要对突变体的相关基因进行筛选，一般采用两种办法：(1) 设计该基因区段的特异引物，利用 PCR 扩增方法，进行突变体库的筛选，如果 DNA 片段的缺失存在于所设计引物的区段内，那么运用 PCR 所扩增出的产物会出现 DNA 片段长度的多态性<sup>[12]</sup>；(2) 针对 EMS 引起的植物基因组单碱基变化，一般利用 TILLING 技术，将包含目的片段的引物设计出来，进行 PCR，以得到扩增产物，在 PCR 扩增产物中，如果有单碱基突变的存在，就可以将突变型 DNA 扩增片段和野生型变性后再复性，也可以利用变性高效液相色谱 (DHPLC) 或者识别错配位点的酶来检测这种错配碱基。TILLING 技术现已实现了高通量和自动化的操作。进行理化诱变时，通常会导致植物基因组中的多位点突变，所以覆盖全基因组需要构建的突变体库不用太大，而且操作过程又比较方便，使得突变体库的构建相对容易一些。另外，在理化诱变中，不用涉及植物遗传转化及植物组织培养等过程，所以也就没有遗传转化和组织培养过程中存在的与基因型相关的限制因素。

虽然理化诱变技术较为简单，构建突变群体也比较容易，但其诱变过程却难以控制，往往在一个突变体中，包含了较多的点突变，可能由多个点突变共同作用，才出现了突变表型。而且，经过理化诱变的处理，植物基因组还可能发生 DNA 大片段的重排或缺失，还可能促使逆转座子的转座，使得对功能基因进行鉴定，会有着更大的困难。目前，通常采用反向遗传学的方法，对由理化诱变构建的

突变体库进行大规模的分析,如 TILLING 技术取得了较大的成效。但 TILLING 技术的局限性在于只能针对功能已知的基因,或者是基于数据库中 EST 和 cDNA 的信息进行突变体库的筛选和鉴定,这使得理化突变体库的应用在很大程度上受到限制<sup>[13]</sup>。在理化诱变中,所处理的材料一般为植物的种子,而由处理过的种子发育形成的突变体,会不可避免地出现大量的嵌合体,给研究带来困难。

### 2.3 插入突变体库

插入突变体库主要是由插入诱变而构建的突变体库,插入的元件主要是转座子或 T-DNA,相应地可创建转座子插入突变体库和 T-DNA 插入突变体库。一般插入诱变的效率较高,目前已普遍应用于突变体库的构建中,在功能基因组学中起到了重要的作用。

**2.3.1 转座子插入突变体库** 由转座子构建的转座子突变体库中,可以利用转座子标签进行插入位点基因的分选和克隆。在玉米和金鱼草中对转座子的研究最多,也最清楚。目前已利用玉米和金鱼草的转座子标签,克隆出了一些基因,解释了相应基因的功能。在玉米中,主要有 Activator/Dissociation(Ac/Ds)、Mutator(Mu)、Enhancer/Suppressor-mutator(En/Spm)转座子系统,金鱼草中研究比较多的是 Tam3 转座子<sup>[14-15]</sup>。

**2.3.2 T-DNA 插入突变体库** 由 T-DNA 插入构建的突变体库称为 T-DNA 插入突变体库。利用农杆菌进行转化时,通过其中的 Ti 质粒,使携带外源基因的 T-DNA 侵染植物,经过复杂的生化过程,穿越核膜,进入到细胞核中,随机地整合到核基因组中。整合到核基因组中的 T-DNA 能够较稳定地遗传下去。T-DNA 插入到基因组的位置不同,会引起不同的基因突变,产生不同表型的突变体。T-DNA 在外源植物基因组中的插入整合一般都是稳定的,但也有可能使外源植物基因组发生重排,当转入的外源 DNA 片段较大时,这种大范围的染色体重组发生的频率会更高。T-DNA 一般是单拷贝插入到外源植物基因组中,而以较低频率进行多拷贝串联重复插入。由于运用 T-DNA 进行插入诱变方便高效,目前已在植物突变体库的构建中得到大量的应用。在拟南芥中,利用 T-DNA 标签法克隆了近一半的突变体基因。在植物 T-DNA 插入突变体库中,每一转基因单株的发生都是一个独

立的事件,因而利用 T-DNA 插入进行诱变,是高效产生基因突变的方法。T-DNA 的序列是已知的,相当于给插入基因标示了一个序列标签,使得可以通过这个标签来分离克隆插入诱变的基因。伴随着植物功能基因组学研究的进一步发展,T-DNA 标签方法越来越显示出其在基因克隆及功能研究上的重要性。如 T-DNA 插入到基因的编码区或者启动子区,就可能引起插入位点基因的失活,产生相应基因功能丧失的突变体;当 T-DNA 插入到增强子或启动子附近时,就有可能使这一部位的基因发生异常表达,从而产生相关功能的突变体。

虽然利用插入突变有以上诸多优势,但插入突变的研究仍存在一定的缺陷。比如,这种方法不能鉴定到功能重复性的基因。研究发现,执行重要功能的基因往往有多个基因拷贝,破坏其中一个并不能导致生物发育异常。这种情况每个物种都存在,特别是在拟南芥中尤其明显。到目前为止,拟南芥突变体有 50 万个,覆盖了 90% 左右的拟南芥基因。拟南芥基因组测序工作表明,17% 的拟南芥基因是高度重复的,而在玉米等植物的基因组中,这种重复性更高。因此,必须运用新的策略解决这些问题。

## 3 展望

目前,拟南芥和水稻的 T-DNA 转化体系较为成熟,由 T-DNA 插入构建的插入突变体库在相应功能基因组学研究中已发挥出了巨大的作用。但在其他一些物种中,如玉米等,还没有建立起高效的农杆菌转化体系<sup>[16]</sup>,并且农杆菌介导的 T-DNA 转化过程耗时长,花费大,突变体中常会有嵌合体的存在,这些都增加了利用 T-DNA 在其他物种构建突变体库的难度。因此,发展简便有效的植物突变体库的构建方法,将会大大促进植物功能基因组学的研究。

### 参考文献

- [1] Schnable P S, Ware D, Fulton R S, et al. The B73 maize genome: complexity, diversity, and dynamics. *Science*, 2009, 326(5956): 1112-1115.
- [2] Holloway B, Luck S, Beatty M, et al. Genome-wide expression quantitative trait Loci (eQTL) analysis in maize. *BMC Genomics*, 2011, 12(1): 336.
- [3] Zheng J, Fu J, Gou M, et al. Genome-wide transcriptome analysis of two maize inbred lines under drought stress. *Plant Molecular Biology*, 2010, 72(4/5): 407-421.
- [4] Lunde C F, Morrow D J, Roy L M, et al. Progress in maize gene discovery: a project update. *Functional & Integrative Genomics*, 2003,

- 3(1/2):25–32.
- [5]Masuka B, Araus J L, Das B, et al. Phenotyping for abiotic stress tolerance in maize. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2012, 54(4): 238–249.
- [6]Tian F, Bradbury P J, Brown P J, et al. Genome-wide association study of leaf architecture in the maize nested association mapping population. *Nature Genetics*, 2011, 43(2): 159–162.
- [7]Seki M, Kamei A, Yamaguchi-Shinozaki K, et al. Molecular responses to drought, salinity and frost: Common and different paths for plant protection. *Current Opinion in Biotechnology*, 2003, 14(2): 194–199.
- [8]Li L, Hao Z, Li X, et al. An analysis of the polymorphisms in a gene for being involved in drought tolerance in Maize. *Genetica*, 2011, 139(4): 479–487.
- [9]Lai J, Li Y, Messing J, et al. Gene movement by helitron transposons contributes to the haplotype variability of maize. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005, 102(25): 9068–9073.
- [10]杨镇, 刘晓丽, 李刚. EMS诱变剂对玉米自交系改造效果的研究. *辽宁农业科学*, 2006(5): 7–10.
- [11]Bommert P, Nagasawa N S, Jackson D. Quantitative variation in maize kernel row number is controlled by the FASCIATED EAR2 locus. *Nature Genetics*, 2013, 45(3): 334–337.
- [12]Liu L X, Spoerke J M, Mulligan E L, et al. High-throughput isolation of caenorhabditis elegans deletion mutants. *Genome Research*, 1999, 9(9): 859–867.
- [13]Lin Z, Li X, Shannon L M, et al. Parallel domestication of the shattering1 genes in cereals. *Nature Genetics*, 2012, 44(6): 720–724.
- [14]Benito M-I, Walbot V. Characterization of the maize mutator transposable element MURA transposase as a DNA-binding protein. *Molecular and Cellular Biology*, 1997, 17(9): 5165–5175.
- [15]陈果, 李见坤, 王国英, 等. Mu转座子介导的玉米插入突变体的鉴定. *分子植物育种*, 2011, 9(5): 572–578.
- [16]刘德璞, 袁英, 郝文媛, 等. 农杆菌介导的玉米合子基因转化. *分子植物育种*, 2008, 6(5): 874–880.

## Progress on the Function and Construction of Plant Mutant Library

Gao Zhiyong<sup>1,2</sup>, Xie Hengxing<sup>1,2</sup>, Wang Zhiping<sup>1,2</sup>, Liu Shili<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>School of Chemistry and Environment, Weinan Normal University, Weinan 714099, Shaanxi, China; <sup>2</sup>Key Laboratory for Ecology and Environment of River Wetlands of Shaanxi Province, Weinan 714099, Shaanxi, China)

**Abstract** The mutated individual is called a mutant. Mutants often have different phenotypes different from the wild type, which can provide useful information for the mutated components. This paper mainly introduces the function and construction method of plant mutant library. The construction principle and characteristics of spontaneous mutants, the physical and chemical mutagenesis and T-DNA insertion mutant library, the progress on plant mutant library are prospected.

**Key words** Plant; Mutant library; Functional genome; Construction