

# Tilling 技术及其在作物遗传育种学中的应用

陈波, 张燕

(西昌学院, 四川 西昌 615013)

**【摘要】**近10年来, Tilling 技术作为一种诱导和鉴定遗传变异的反向遗传学方法逐渐建立起来, 并在模式生物拟南芥、玉米、果蝇上得到成功的应用。近来, Tilling 技术已进入遗传育种研究领域, 并且在功能基因和作物主要性状的研究中显示了巨大的潜力。

**【关键词】**Tilling 技术; DNA 多态性; 遗传变异

**【中图分类号】**S330 **【文献标识码】**A **【文章编号】**1673-1891(2006)02-0013-03

基因组局部定向诱导损伤技术 (Targeting Induced Local Lesions In Genomes, 简称 Tilling) 是最近几年发展起来的一种反向遗传学研究方法, 该技术结合了化学诱变剂随机诱变和 PCR 定向筛选的方法, 具有通量高、实验成本低、高效快速的特点, 目前已被广泛应用于遗传学研究, 是功能基因组研究中用于发现遗传多样性和大规模筛选基因突变的有效手段<sup>[1,2]</sup>。

从农作物的驯化开始, 人类就着手对作物产量相关性状的选择, 直到上世纪绿色革命的进行才大大推进了这一进程; 随着分子生物学技术的发展, 用于作物遗传育种研究的手段也越来越丰富, 特别是转基因技术的成功应用, 打破了作物之间的遗传界限, 然而对于一些有重要经济价值的农作物而言, 转基因技术在基因功能研究和新品种的选育中的应用却相当有限。随着 Tilling 技术的发展, 它作为一种非转基因技术, 在农作物基因型和表现型的相关研究方面显示了强大的功能, 在新品种的选育中显示了巨大的潜力。

## 1 Tilling 技术原理及其操作

### 1.1 Tilling 技术原理

Tilling 技术是 20 世纪 90 年代末, 美国 Fred Hutchinson 癌症研究中心, 基础科学研究所的 Claire M. McIallum 在做博士课题, 研究拟南芥的基因型和表型时建立的一种反向遗传学技术<sup>[1]</sup>。

Tilling 的基本原理是: 使用化学诱变剂, 诱变实验对象并提取 DNA, 把多个样品 DNA 混合进行 PCR, 得到异源双链。如果样品发生突变, 在形成的异源双链中必定含有错配碱基, 利用特异性内切核酸酶在错配处将异源双链切开, 最后进行电泳检测, 如果发现阳性结果, 再在混合样品中逐一检测, 最后确定阳性样本。可见, Tilling 技术的核心原理就是“异源双链、错配碱基”<sup>[4]</sup>。在此基础上又建立了不需要化学诱变的, 可以用来发现人类基因多态性和筛查致病基因的 Ecotilling 技术 (the tilling technique to survey natural variation in gene), 该技术也可用于研究自然变异的遗传群体<sup>[3]</sup>。

### 1.2 Tilling 技术操作

Tilling 应用在分子生物学和遗传学上, 用于发现基因的单个碱基发生的突变。Tilling 操作的基本步骤是: 1、使用化学诱变剂处理作物种子或花粉, 使之发生突变; 2、培育诱变种子或花粉, 得到 M1 代, 自交得到 M2 代; 3、在 M2 代提取单株 DNA, 并保存种子; 4、根据单个目标基因设计 PCR 引物, 将 6~8 份 M2 代植株 DNA 样本混合, 进行 PCR 扩增; 5、设计荧光标记引物, 再次对 PCR 产物进行扩增; 6、用限制性内切酶酶切 PCR 产物; 7、电泳并分析结果<sup>[1,2]</sup>。

### 1.3 Tilling 技术的特点

#### 1.3.1 适用范围广

Tilling 采用化学诱变剂进行诱变, 对多数植物和动物都可以使用。对于大多数农作物而言, 通过诱变, 建立包含突变并稳定遗传的 M2 群体只需要 1~2 年时间。

收稿日期: 2006-04-15

作者简介: 陈波 (1978-), 男, 主要从事作物遗传育种研究。

### 1.3.2 通量高、成本低

当建立 M2 群体后,提取单株 DNA,为了提高筛选效率,可以将 4~8 份 DNA 混合进行 PCR 扩增;扩增的有效片段长度范围在 0.3~1.6kb 之间,若使用 8 份材料混合,其扩增的有效片段长度为 1.4kb;使用 96 孔板进行扩增,则每次可以分析的片段长度可以达到上百万碱基对,样本容量可达到数百份单株样本<sup>[1]</sup>。

### 1.3.3 准确度高

进行第一次 PCR 时,通过设计特异性引物可以大大提高 Tilling 分析的特异性,特别是对基因家族进行分析时,设计特异性引物尤其重要。进行第二次 PCR 扩增时,应在两端引物上分别标记不同的荧光,如一端标记 IR Dye 700,另一端标记 IR Dye 800,则 PCR 产物经过酶切后将产生两个分别标记 IR Dye 700 和 IR Dye 800 的片段,在 700 和 800 通道双色红外光下检测能产生两个凝胶电泳图,若两条片段的分子量正好等于野生型的分子量,则可以确定为突变型。

用于 Tilling 检测的限制性内切酶常用 CEL I, CEL I 能从错配碱基的 3' 端将异源双链切开,片段的大小同时也表明了突变发生的位置<sup>[5]</sup>。

## 2 Tilling 在作物育种学中的应用

### 2.1 在小麦研究中的应用

Tilling 技术是在对模式植物拟南芥的研究中发展成熟起来的,目前,在基因组比拟南芥大得多的小麦(小麦基因组约为拟南芥基因组的 140 倍)上也得到了成功的应用。小麦是异源六倍体作物,具有重要的经济价值,其自然变异往往由于等位基因的覆盖作用而很难通过表型来进行鉴定。Slade 等<sup>[6,7]</sup>使用 Tilling 技术,研究了硬粒小麦和面包小麦具有重要商业价值的 *waxy* 基因,发现了 250 个新的突变位点,通过生物信息学分析发现,其中的 94 个突变能够改变 *waxy* 基因的编码产物。他们还发现了一个同质结合三倍体的突变系,该系缺失了第三个 *waxy* 等位基因位点(野生型具有 3 个 *waxy* 等位点),在剩下的两个位点也发生了多处突变。这些突变体的发现不仅为小麦的遗传研究提供了丰富的多样性资源,也为改良小麦淀粉品质提供了有用的育种材料。同时,该研究也证实 Tilling 技术对于复杂基因组的研究是有效的。

### 2.2 在玉米研究中的应用

玉米是重要的粮食和经济作物,利用常规育种方法,已使玉米育种达到了相当高度。为了通过育种使得玉米生产进一步提高,近年来育种学家尝试了各种方法,包括各种分子标记和转基因技术等。其中转基因技术是一种重要的反向遗传学方法,尽管转基因理论基础和实践操作技术都相当成熟,但在玉米中获得成功的例子却很少;另外 Mu 和 Ac 转座子也是玉米反向遗传学研究的常用资源,但由于技术难度大,实验成本高,现在已经很少使用<sup>[8]</sup>。

Tilling 技术的发展为玉米反向遗传学研究提供了一种新的方法。利用 Tilling 通量高、成本低的特点,可以在大规模的玉米遗传群体中筛选突变基因,研究其遗传多样性。Till 等<sup>[8]</sup>,通过 Tilling 技术,以 750 株通过花粉诱变得到的 M2 代植株为材料,研究了玉米 11 个基因的长度为 1kb 的片段,从中发现了 17 个点突变,其中在 DMT102 基因上发现了三个有害的错意突变。这些突变体将成为进一步选育的基础材料。

### 2.3 在多态性研究中的应用

随着分子生物学技术的发展,用于发现 DNA 多态性的常用方法有测序、单链构象异构多态性(SSCP)、杂交和微阵列等。测序的花费较高,时间也较长;SSCP 的通亮虽高,但对于新突变的检出率较低,且片段一般只能在 200~300bp;杂交和微阵列不但花费高,而且检出率不到 50%<sup>[5]</sup>。与以上方法相比,Tilling 技术具有高通量、高灵敏度和低成本的特点,而且检测片段可以达到 1kb。

Tilling 技术已经被证明是一种很好的发现新 SNP 的方法。在同样或者较低的多态性频率下,在从新产生的变异中发现 SNP 时,Tilling 的灵敏度远远高于其他方法。Slade 等运用该技术,在普通遗传背景下,分别在花生中发现了 1 个、在大豆中发现了 3 个、在斑马鱼中发现了 2 个新的 SNPs<sup>[6]</sup>。

## 3 前景展望

长期以来,作物遗传育种都依赖于育种学家丰富的田间选育经验,而真正在育种当中得到成功应用的分子生物学方法还十分有限。虽然利用转基因技术,已经在很多作物育种中取得了成功,但是转基因技术一直以来都因存在生物安全和食品安全等问题而受到质疑,并且转基因在重要粮食作物中应用

成功的例子也不多。

为了加快作物育种进程,提高育种效率,研究人员建立了一系列分子生物学实验方法,如 SSR、RFLP、RAPD 等,用于基础研究和辅助育种。Tilling 技术是一种能够直接从大量的遗传群体中发现新

的变异的一种反向遗传学技术,能够直接用于新品种选育。同时,该方法在运用中具有高效率、高通量、低成本等特点,一旦建立后能够进行大规模的突变检测,因而在农业研究中具有广阔的应用前景。

#### 参考文献:

- [1] Steven Heniko. S, Till BJ and Comai L . TILLING. Traditional Mutagenesis Meets Functional Genomics. *Plant Physiol*[J] , 2004, 135: 630 - 636.
- [2]Bradley J. Till, Steven H. Reynolds, Elizabeth A. Greene, Large - Scale Discovery of Induced Point Mutations With High - Throughput TILLING, *Genome Res*[J].,2003, 13: 524 - 530.
- [3]Comai L, Young K, Till BJ, Efficient discovery of DNA polymorphisms in natural populations by Ecotilling, *plant J.* [J], 2004, 37: 778 - 786.
- [4] Luca Comai, and Steven Henikoff, TILLING: practical single - nucleotide mutation discovery, *The Plant Journal*[J], 2006, 45, 684 - 694.
- [5]张宁,杨泽 .Tilling 技术及其在遗传学中的应用[J]. *生命的化学*,2004,24(6):516 - 517.
- [6]Ann J. Slade , Vic C. Knauf, TILLING moves beyond functional genomics into crop improvement, *Transgenic Research*[J] , 2005, 14: 109 - 115.
- [7]Ann J. Slade, Slade AJ, Fuerstenberg SI, A reverse genetic, nontransgenic approach to wheat crop improvement by TILLING. *Nat Biotechnol*[J], 2005, 23: 75 - 81.
- [8]Bradley J Till, Steven H Reynolds, Clifford Weil, Discovery of induced point mutations in maize genes by TILLING, *BMC Plant Biology*[J] 2004, 4: 12.

## TILLING: A Reverse Genetics Tool and Use In Plant Breeding

CHEN Bo, ZHANG Yan

(Xichang College, Xichang Sichuan 615013)

**Abstract:** In the last 10 years, a nontransgenic method for reverse genetics called Targeting Induced Local Lesions In Genomes (TILLING) has been developed as a method for inducing and identifying novel genetic variation, and has been demonstrated in the model plant, *Arabidopsis thaliana*. Recently, TILLING has been extended to the improvement of crop plants and shows great promise as a general method for both functional genomics and modulation of key traits in diverse crops.

**Key words:** Tilling; DNA polymorphisms; Genetic variation

(责任编辑:张荣萍)