

突变率与突变频率的概念及估算

胡延吉 梁红

(仲恺农业工程学院,生命科学学院,广东广州 510225)

摘要:突变率是指单位时间内某种突变发生的几率,可表示为每个位点、每个基因、每个核苷酸或每个配子在每个世代或每次 DNA 复制时发生突变的几率。突变频率是指群体内发生某种突变的细胞或个体数的比例。突变的鉴定方法可分为表型鉴定和基因型鉴定两大类。基因型鉴定是继表型鉴定以后发展起来的检测突变的新方法。其中,微卫星技术在突变率的估算中得到较广泛的应用,但应用于植物突变率的估算却相对较少。本文以植物突变遗传和育种为例,简述了突变率和突变频率的估算方法,重点介绍了在硬粒小麦、鹰嘴豆、玉米、普通小麦和豌豆等作物中估算微卫星突变率的研究进展。对 TILLING 技术在突变检测中的应用进行了简要介绍。

关键词:突变率;突变频率;表型鉴定;基因型鉴定;估算

The Concept and Estimation of Mutation Rate and Mutation Frequency

HU Yan-ji LIANG Hong

(College of Life Sciences, Zhongkai University of Agriculture and Engineering, Guangzhou, Guangdong 510225)

Abstract: Mutation rate is the probability that a particular kind of mutation occurs per unit of time which can be expressed as mutations per locus, per gene, per nucleotide, or per gamete in each generation or at each DNA replication. Mutation frequency is the proportion of the number of mutated cell or individual in a population. Mutation can be identified from either phenotype or genotype. Genotypic identification is a new method after phenotypic identification for estimating the mutation rate, in which microsatellites have been widely used for estimation of the mutation rate, but very few data are available in plants. This article summarizes the estimation methods of mutation rate and mutation frequency from the point of view of plant mutation genetics and breeding, especially paying attention to the research advances in estimation methods of microsatellite mutation rate in crops including durum wheat, chickpea, corn, common wheat and pea. Furthermore, the application of TILLING (Targeting Induced Local Lesions IN Genomes) technology in mutation screening is briefly summarized.

Key words: Mutation rate; Mutation frequency; Phenotypic identification; Genotypic identification; Estimation

基因突变(Gene mutation)是指染色体上某一基因位点发生了化学性质的变化,与原来基因形成对性关系。从 DNA 结构的角度看,突变是 DNA 分子中碱基序列发生改变的过程。在突变遗传和突变育种研究中,经常使用“突变率”与“突变频率”这两个术语。但在一些科技论文和书刊中,对这两个概念的表述不够

一致,难免引起误解和迷惑。毛炎麟^[1]在 1992 年曾对这一问题专门进行过阐述,但至今仍时常有人将二者的概念混为一谈。在理论层面上,对概念的准确理解和诠释是构建学科基本原理和知识体系的基础;从实践方面看,直接影响到不同研究结果的相互比较和借鉴。因此,作者对突变率与突变频率的概念以及它们

收稿日期:2012-03-23 接受日期:2013-01-16

基金项目:广东省科技项目(2011B090400165)

作者简介:胡延吉(1955-),男,山东章丘人,硕士,教授。研究方向:植物遗传育种。E-mail:yanjihu@163.com

之间的关系进行简要阐述,并以植物突变遗传和育种为例,简述其估算方法。

1 突变率和突变频率的概念

突变率指的是重复发生事件的一种测定,它是DNA每次复制时发生突变的几率(Probability),亦即每个世代每个染色体组出现的突变几率,对有性生殖的生物来讲,就是每个世代每个配子所表现的突变几率;对于无性生殖的生物如细菌来讲,则是每个世代每个细胞的突变几率^[2]。这一概念是从染色体组或者配子的角度来讲的,据估计,高等生物中的突变率为 $1 \times 10^{-5} \sim 1 \times 10^{-8}$,即在10万至1亿个配子中有一个发生突变;在低等生物如细菌中,突变率为 $1 \times 10^{-4} \sim 1 \times 10^{-10}$,即在1万至100亿个细菌中有一个发生突变。从等位基因的角度,突变率指每个世代一个等位基因的拷贝转变为另一种等位形态的几率^[3]。突变率可从每个位点(Locus)、每个基因(Gene)、每个核苷

酸(Nucleotide)和每个配子(Gamete)的突变等不同层次予以表述,它们均表示在每个世代(高等真核生物)或者每次DNA复制(微生物)过程中发生的特定突变类型,反映的是单位时间内突变的发生几率。

所谓突变频率则指的是在一个群体中一定时间内实际发生的突变次数^[1,2]。许多学者给出了相似的定义,如Russell^[4]给出的概念是“突变频率是指群体内发生某种突变的细胞或个体数的比例”。因此,与突变率一个重要的不同点是:突变频率不是局限于每个世代或每次细胞分裂,而是根据在一定时间内或经过若干世代最终形成的某一群体内突变体出现的频率的估算。所谓突变体是表现某一突变性质的个体。因此如果在一定时间内,如一年,比较大肠杆菌和人的突变频率时,大肠杆菌显然会大大超过人。但是如果我们用每个世代作为比较的标准,人的基因突变率则超过大肠杆菌^[2]。图1可以较清楚地解释突变率和突变频率二者概念的差异^[3]。

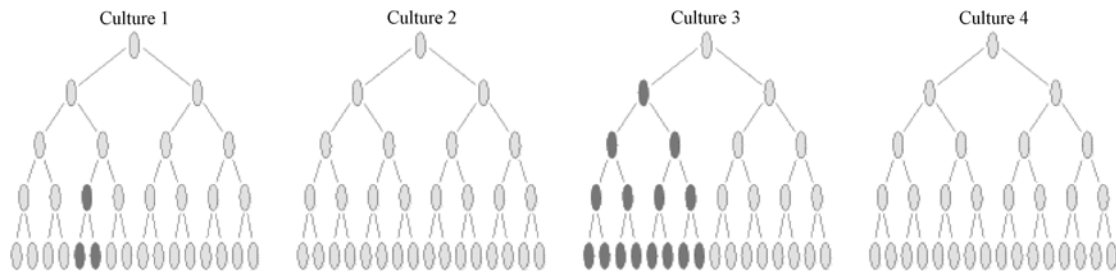


图1 突变率与突变频率的区别

Fig. 1 Difference between mutation rate and mutation frequency

引自:Tassi di mutazione, <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.5/deed.it>

Data from: Tassi di mutazione, <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.5/deed.it>

图1中表示在细菌培养中分别由4个野生型细胞进行分裂形成的群体,原始的4个细胞为 G_0 ,最终世代为 G_4 ,绿色实心的个体表示发生突变的细胞。为了估算突变率,需要估算出经过多少次细胞分裂而形成最终的群体,还要估算出在这些细胞分裂过程中发生的突变事件数。从图中可以看出,在最终群体中的突变细胞数(M)等于10,而总的细胞数(N)为 $16 \times 4 = 64$,则突变频率(M/N)为 $10/64 = 1.6 \times 10^{-1}$ 。突变率 μ 则根据总的细胞分裂次数(D)为 $15 \times 4 = 60$ 中发生的突变事件次数 ν (=2)估算,因此, $\mu = \nu/D = 3.3 \times 10^{-2}$ 。

一般说来,直接估计突变率是比较困难的,在植物

诱变育种研究中,往往是利用诱变2代(M_2)群体估算突变频率。Kondrashov等^[5]概括了估算突变率之所以困难的6个主要原因:首先,单核苷酸突变率非常低,真核生物尤其如此,估算如此低的突变率往往需要极其精细和费力的方法;其次,突变是一个完全随机的过程,不知道何时在何位点发生突变;第三,突变可分为不同类型,包括点突变(如单核苷酸的替换、插入和缺失等)和大规模突变(如长片段的插入、缺失和倒位等),对其突变率估算的方法不同;第四,突变率受遗传背景的影响,特别是受相邻位点的影响;第五,环境和生理等因素影响突变率;第六,突变率还受到选择和进化过程等因素的影响。然而,随着科技的发展和试

验方法及技术的改进,上述许多问题已经在很大程度上得到解决,特别是 DNA 测序技术的开发应用使我们可以在 DNA 水平上直接估算突变率。一般说来,突变的鉴定方法可分为表型鉴定和基因型鉴定两大类,本文以高等植物为例,简述其在突变率和突变频率估算中的应用。

2 基于表型鉴定的估算方法

对于最终会导致表现型变异的突变可以采取此种方法,这是人们最早采用的传统的或经典的方法。某些可见的形态变异能相当准确地鉴定出来,而生理生化变异的鉴定就较为复杂一些,需要一定的仪器和分析技术。由于该方法要求突变具有可观测到的表现型效应,因此, DNA 非编码区的突变、同义密码子突变、产生化学性质相似的氨基酸的突变以及冗余基因的突变(一个基因突变后的功能可由其他基因补偿)等都难以导致表型改变,从而不能观测计数。另外,生物体的突变修复反应的概率也会影响群体中最终得到的突变体数。

2.1 利用 M_2 突变体计算突变频率

植物诱变育种中计算突变频率的主要方法^[2]有:

若 M_1 按穗(株)收获, M_2 按穗行或株行种植,则:

突变频率% = M_2 发生突变的穗(株)行数/ M_2 种植的总穗(株)行数 $\times 100\%$ (1)

M_2 突变体个体数与群体总株数之比。即:

突变频率% = M_2 发生突变的株数/ M_2 群体的总株数 $\times 100\%$ (2)

采用两个公式得到的数值往往是不一致的,公式(2)是目前普遍采用的方法,也是 M_2 突变体混合种植时统计突变频率的方法。因此,在比较不同文献的研究结果时,应该注意试验设计和统计方法是否相同。采用该方法,人们已分别对小麦、大麦、水稻、大豆、烟草等作物的突变频率进行了研究^[6-10]。

在这里需要提及毛炎麟^[1]介绍的计算突变频率和突变体频率的相关公式。

突变体频率% = 突变体总数/ M_2 植株总数 $\times 100\%$ (3)

可见实际上等于上述由公式(2)计算的突变频率。毛炎麟提出的计算突变频率的公式为:

若统计每 100 个 M_1 穗后代,即 100 个 M_2 穗行里出现的突变次数,则:

突变频率% = 突变次数/ M_2 穗行数 $\times 100\%$ (4)

若统计每 100 个 M_1 株后代,即每 100 个 M_2 株行

里出现的突变次数,则:

突变频率% = 突变次数/ M_2 株行数 $\times 100\%$ (5)

突变穗行包括一次突变穗行和两次突变穗行两类。所谓两次突变穗行是指同一穗行里出现两种突变类型,如叶绿素缺失突变类型(即白化苗和黄化苗)。假如 M_2 共有 100 个穗行,有 4 个穗行发生了突变,其中 2 个穗行内各发生了一种白化突变,另 2 个穗行内各出现了两种突变(白化苗和黄化苗),则总的突变次数等于 6。按照公式(1),突变频率% = M_2 发生突变的穗行数/ M_2 种植的总穗行数 $\times 100\%$ = $4/100 = 4 \times 10^{-2}$;按照公式(4),突变频率% = 突变次数/ M_2 穗行数 $\times 100\%$ = $6/100 = 6 \times 10^{-2}$ 。可见公式(4)和公式(1)的内涵是不同的。因此在比较参考不同的文献时,需要注意采用的统计方法是否一致。

2.2 用花粉直感现象估算配子的突变率

经典的例子是用花粉直感现象估算玉米配子的突变率。例如,为了测定玉米子粒由非甜粒变为甜粒($Su \rightarrow su$)的突变率,用甜粒玉米纯种($susu$)作母本,由诱变处理非甜粒玉米纯种($SuSu$)的花粉作父本进行杂交。已知非甜粒(Su)对甜粒(su)为显性,理论上授粉后的果穗应该完全结成非甜粒子粒,但实际并不是这样。假定在 2 万个子粒中出现了 2 粒甜粒玉米,说明在父本的 2 万粒花粉中有 2 粒花粉的基因已由 Su 变为 su ,这样就测知基因 Su 的突变率为万分之一^[11]。

3 基于基因型鉴定的估算方法

直接通过 DNA 序列检测而鉴别筛选突变体解决了表型鉴定不能有效识别非编码区序列变异、同义突变、冗余基因突变等困难,成为继表型鉴定后发展起来的鉴别突变体的行之有效的的新方法。其中,微卫星(Microsatellite)技术在基因突变率的估测中得到较广泛的应用。微卫星或简单序列重复[Simple sequence repeats (SSRs)]是由 1~6 个碱基为基序的串联重复 DNA 序列。由于它们比其他中性标记(Neutral markers)具有更大的变异性以及共显性的特点,因此在亲缘关系、连锁、群体遗传以及进化研究中得到广泛应用。微卫星体现了一种特定的突变过程,导致原始等位基因和突变等位基因之间基序重复次数的差异。一般认为,微卫星突变的主要形成机制是 DNA 复制过程中聚合酶滑动(Polymerase slippage)^[12,13],即在 DNA 复制时,聚合酶从其位置上脱离,模板链和新合成链暂时分离,重新配对时,新生链和模板链偶尔会错位而产生错配, DNA 聚合酶在这种错配的 DNA 链上继续合

成,就会导致新生链上基序重复次数的不同。该机制亦称为链滑动(Strand slippage)、滑链错配(Slipped-strand mispairing)和复制滑动(Replication slippage)等^[14-16]。

总结前人研究微卫星突变率的方法,可大体分为四类:一是以系谱分析为依据的估算方法^[17-19];二是利用突变积累品系(Mutation accumulation lines)进行估算^[20,21];三是对反映物种间趋异时期的化石资料进行比较分析^[22];四是通过研究物种内等位基因的分布进行估算^[23,24]。从所研究的材料的时标(Timescale)角度看,第1类和第2类方法属于短时标研究方法,而后两种方法则属于长时标研究方法。短时标方法由于以新突变的直接观测为基础,故认为偏倚性较小,但为了提高估算的准确度,需要足够大的样本以检测到稀有突变事件。长时标方法的优点是充分体现种群或物种趋异后所积累的大量减数分裂事件,但由于受到选择、种群统计学因素等混合效应的影响,可能会导致估算的偏差。上述研究方法均表明不同位点微卫星突变率存在很大差异,突变率与微卫星的基序类型和重复数量有关,用长时标研究材料获得的突变率低于用短时标材料获得的突变率^[25]。许多研究估算了人和动物中微卫星的突变率,显示出不同物种间存在很大差异,对植物的研究则相对较少。在栽培作物中,2001年 Udupa 等^[26]首次以鹰嘴豆为材料研究了微卫星的突变率,随后,又有人对硬粒小麦、玉米、普通小麦、豌豆等作物进行了研究^[20,27,29,30]。另外,将人工诱变与现代分子生物学技术相结合鉴定基因突变的方法亦显示出广阔的应用前景。

3.1 硬粒小麦微卫星位点突变率的估算

Thuillet 等^[27]直接估算了硬粒小麦(*Triticum turgidum* L.)10个微卫星位点的突变率。试验材料为500个突变积累品系,它们由一个纯合的基因型通过控制自交的方式形成,其过程如下:用玉米花粉给硬粒小麦(品种为 Sham I, ICARDA)授粉,进行胚抢救,然后用秋水仙素加倍形成原始的双单倍体。对该双单倍体(G_0)自交得到 G_1 ,然后采用单粒传的方法连续控制自交(即在 G_1 群体中每株套袋1穗,从套袋穗中取1粒种子混合, G_2 混合种植,以后各代都是如此),连续自交15代。期间,分别在第8、10和11代群体中选单株,每个单株再经3代自交繁殖形成品系,共形成500个品系。每个品系以及原始品种 Sham I用0.2g新鲜叶片提取基因组DNA,对10个微卫星位点进行PCR扩增,扩增产物进行聚丙烯酰胺凝胶电泳,然后对品种 Sham I的原始等位基因和突变等位基因进行克隆和

测序。

对每个位点突变率的计算是用检测到的突变数除以可能观察到的突变事件数(n)。为了计算 n 值,考虑一个品系中在世代1发生的一个突变(在 g_0 世代,所有品系对原始等位基因A都是纯合的)。这个品系在 g_1 世代对所研究的位点的基因型为Aa,在世代 g ,该突变处于杂合状态Aa的概率是 $(1/2)^{g-1}$,处于纯合状态aa的概率为 $1/2[1 - (1/2)^{g-1}]$ 。这样,在世代 g_1 首次发生的突变到世代 g 时可观察到的总概率为 $(1/2)^{g-1} + 1/2[1 - (1/2)^{g-1}]$ 。此公式可简化为 $1/2[1 + (1/2)^i]$, $i = (g - \text{该突变被首次观察到的世代数})$ 。每个品系每个世代均可能发生突变,因此 i 的值可以是 $g-1$ 到 $g-g$,即从0到 $g-1$ 。可能观察到的突变事件数(n)可用下列公式表示:

$$n = \sum_{i=0}^{g-1} 2l[1/2(1 + 1/2^i)] = \sum_{i=0}^{g-1} l(1 + 1/2^i) = l(2 - 2^{1-g} + g) \quad (6)$$

式中, l 为品系数, g 为世代数。对于位点 Xgwm148, Xgwm153, Xgwm257, Xgwm312, Xgwm372, Xgwm374和 Xgwm526,在第8代得到469个品系,所以每个位点的 $n_8 = 469(2 - 2^{1-8} + 8) = 4686$ 。对于 Xgwm99, Xgwm495和 Xgwm537等3个位点,在第10代得到435个品系,第11代得到36个品系,则每个位点总的 n 值为 $n_{10} + n_{11} = 5,687$ 。

在所研究的10个微卫星位点中,共检测到12个突变事件,则每世代每个等位基因的平均突变率为 $12/(7 \times 4,686 + 3 \times 5,687) = 2.4 \times 10^{-4}$ 。因为突变率在微卫星位点之间存在很大差异,Thuillet 等还计算了各个位点的突变率,如 Xgwm153位点的突变率为 10^{-3} ,而 Xgwm312位点的突变率为 6.4×10^{-4} 。检测到的12个突变均只涉及到1个重复基序的改变,其中,8个突变是由于增加了1个重复基序,4个突变则均是减少了1个重复基序。

3.2 鹰嘴豆(TAA)n微卫星位点突变率的估算

鹰嘴豆(*Cicer arietinum* L.)是二倍体自花授粉豆科作物($2n = 16$), Udupa 等^[26]选用两个地方品种 Ghab 2 和 Syrian Local。每个品种随机选择一个纯合植株(世代 G_0)进行自交,自交种子(G_1)在下一季节按粒播种。在 G_1 ,从 Ghab 2 品种的群体中选择107株,每株取50粒种子混合;从 Syrian Local 品种的群体中选择104株,每株亦取50粒种子混合。将按照品种混合的种子在春季种植并辅之以灌溉。在后续的3个世代($G_3 - G_5$)于春季采用相同的方法种植。每代群

体大约 8,00 株,以最大限度地减少遗传漂变效应。在第 5 代群体中形态性状和抗病性均表现一致,表明无异交或混杂产生。从第 5 代群体中分别随机取 107 株 Ghab2 和 104 株 Syrian Local,利用幼苗茎尖提取总 DNA 并用作 PCR 扩增的模板。利用 15 个(TAA)_n 微卫星位点进行分析,这 15 个位点是从 Ghab 2 品种基因组 DNA 的 120 个标记中随机选取的,这些微卫星位点的原始等位基因的两侧引物序列和 TAA 的重复数目是已知的。扩增的 DNA 片段进行测序并估算等位基因的大小(TAA 的重复数)。检测出的突变体等位基因的大小通过重复 PCR 扩增和片段分析进行验证。

计算突变率的公式为 $\mu = n/(2GLK)$,式中 n 是突变的数, G 为世代数, L 是近交系(Inbred lines)数, K 为位点数。在两个品种形成的近交群体的 15 个微卫星位点中,Ghab 2 品种的 13 个位点发生 167 个自然突变,Syria Local 品种的 7 个位点发生 60 个自然突变。用上述公式求得 Ghab 2 所有位点的平均突变率为 1×10^{-2} ,Syria Local 所有位点的平均突变率为 3.9×10^{-3} 。正如品种间突变率存在很大差异一样,品种内不同位点间的突变率也存在很大差别,Ghab 2 品种 13 个微卫星位点的突变率范围为 $9.3 \times 10^{-4} \sim 4.5 \times 10^{-2}$;Syria Local 品种 7 个微卫星位点的突变率范围为 $1.9 \times 10^{-3} \sim 3.7 \times 10^{-2}$ 。影响这些位点突变率的一个重要因素是位点的大小(TAA 重复的次数),原始等位基因的大小与突变数之间存在显著的正相关关系(对于品种 Ghab 2, $r = 0.66, P \leq 0.01$;对于品种 Syria Local, $r = 0.50, P \leq 0.055$)。两个品种的微卫星位点突变中绝大多数(96.9%)是由于增加或减少 1 个 TAA 重复基序形成的,其他突变包括 2 个(2.2%)或 4 个(0.9%)重复基序的变化。

3.3 玉米微卫星位点突变率的估算

Vigouroux 等^[20]通过两个独立设计的试验估算了玉米(*Zea mays* L.)微卫星位点的突变率。两个试验原理相似,限于篇幅仅简介试验 I。试验采用 6 个玉米近交系(B73, Mo17, Oh43, PHAA0, PH24E, 和 PHN46),它们分别由不同亲本杂交后然后通过至少 7 代自交选择形成。该试验首先对上述近交系进行两代自交,利用 55~78 个微卫星鉴别并去除这些近交系中可能由于其基础原种(Founding seed stocks)受到花粉污染而产生的异型株。第 1 次自交于 1998 年种植在 Johnston, Iowa。第 2 次于 1999 年在两个地方 Johnston, Iowa 和 York, Neb 种植,只采用没发生花粉污染的植株做试验材料。于 1999 年每个地点 6 个近交系各取两穗共 24 穗用于进一步研究。每穗各取 23 粒

(共 552 个后代植株),与亲本同时进行分析比较以鉴定新的突变。

用 10d 苗龄的幼苗叶片提取 DNA,利用 48 个微卫星位点对每个近交系后代和亲本进行 PCR 扩增,两次重复。微卫星位点的重复基序分别为 2 个核苷酸、3 个核苷酸、4 个核苷酸、5 个核苷酸、6 个核苷酸以及双 4 核苷酸。检测出的突变等位基因和它们的原始亲本等位基因再进行扩增、克隆和测序,突变体的基序重复数与原始亲本进行比较。

为了计算突变率,用检测到的突变数除以最终世代中两个等位基因经历的独立世代数(等位基因-世代数)。试验中仅考察了一个世代,所以等位基因-世代数 = 23 粒 \times 2 等位基因 \times 4 穗 \times 6 近交系 \times 48 位点(52,992) - 任何丢失的数据。试验所用的 7 个双碱基微卫星位点中,有一个位点检测到突变。等位基因-世代数 = 23 粒 \times 2 等位基因 \times 4 穗 \times 6 近交系 \times 7 位点(7728) - 10 个丢失数据 = 7718,所以每个世代双碱基微卫星位点的突变率 = $1/7718 = 1.3 \times 10^{-4}$ 。该试验检测到的一个突变位点比亲本的等位基因位点减少了 1 个重复基序。对于重复基序大于 2 个核苷酸的微卫星位点没有检测到突变。

除了上述用微卫星位点测定植物的突变率以外,Clark 等^[28]将遗传学研究和考古学研究相结合,从玉米核苷酸自然置换率的角度估算突变率。遗传研究表明,玉米的野生祖先大刍草(*Z. mays* ssp. *parviglumis*)的 *tb1* 基因是玉米驯化过程中主要的选择目标,*tb1* 基因编码序列 5'端方向的基因间隔区序列的多样性很低。该区域的多态性与驯化过程中少数 *tb1* 单倍型(Haplotype)发生的可固定的新突变是一致的。考古学研究表明^[28],玉米大约在 6250~10000 年以前完成驯化,然后其群体迅速扩大。试验选用了位于 *tb1* 核心选择范围内 6 个区域的序列(1.7-, 2.5-, 7.1-, 35.6-, 45.8-, 和 58.6-kb 区域,指从 5'端距离 *tb1* cDNA 序列的距离)进行研究。利用前人对这 6 个区域序列的测序数据以及该试验在 *tb1* 区域检测到的突变数、玉米驯化的大致时间以及系谱图,Clark 等估算出这 6 个区域的单个核苷酸置换率为 $1.0 \times 10^{-8} \sim 7.2 \times 10^{-8}$ 。

3.4 普通小麦和豌豆微卫星位点突变率的估算

Raquin 等^[29]选用 16 个普通小麦(*Triticum aestivum* L.)纯合基因型作亲本,采用人工逐步聚合杂交的方法形成一个分离群体。然后对该群体连续进行 3 代混合繁殖,形成的试验群体定为 0 代群体(G_0)。于 1984 年在 Le Moulon(位于巴黎附近)种植 G_0 种子,

随后将该群体连续种植 16 代(每年 1 代),每代种植 5000 ~ 10000 个植株,成熟时将种子混合收获,从中取 10000 粒种子播种,使下一代群体达到 5000 ~ 10000 株。冷藏保存 16 个亲本的种子并间隔种植 4 次以保持种子的发芽力。提取 16 个亲本和 G_{15} 世代 287 个植株的 200mg 幼叶的总 DNA,选用 21 个微卫星进行 PCR 扩增、克隆和测序。与亲本相比较,在 G_{15} 代中检测出 23 个新等位基因,分布在所研究的 21 个位点中的 9 个位点,有证据表明这些新等位基因是通过突变产生的,估算的每代的突变率为 $0 \sim 4.97 \times 10^{-3}$ 。

Cieslarova 等^[30] 选用 7 个豌豆(*Pisum sativum* L.) 品种,在温室中采用单粒传的方法连续繁殖 10 代,每年在春季和秋季各繁殖 1 代。每个世代分单株收获种子,然后从中取 5 粒种子种植繁殖下一代。对第 1 代和第 10 代样品的 3 个微卫星位点进行比较分析。3 个微卫星位点分布在豌豆基因组的的不同位置,A9 位点位于高丰度反转录转座子的 LTR 区域,AD270 位点位于基因间隔区,AF016458 位点位于表达基因的 5' 端非翻译区。估算微卫星突变率(R)的公式为: $R = N/T$, N 为突变等位基因的数目, T 等于所研究位点 1 个世代所传递的等位基因总数。结果表明在第 10 代样品的 AD270 位点增加了 1 个“ATCT”重复基序。估算的每代每个位点的突变率为 4.76×10^{-3} ,95% 的置信区间为 $1.2 \times 10^{-4} \sim 2.7 \times 10^{-2}$ 。

3.5 利用 TILLING 技术检测诱发突变

以上介绍的基于基因型鉴定的估算方法实例主要是利用非诱变群体。将人工诱变和现代分子生物学技术相结合进行基因突变的检测亦取得良好进展,其中较为成功的是 TILLING 技术。TILLING (Targeting Induced Local Lesions IN Genomes) 技术即定向诱导基因组局部损伤技术,是一种全新的反向遗传学研究方法。该技术将人工诱变、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点突变或小片段缺失^[31]。传统的 TILLING 技术先用化学诱变剂诱发产生一系列的点突变,再用设计的特异性引物进行 PCR 扩增得到同源双链,再用一种特异切割错配的内切酶酶切,最后电泳检测酶切片段,鉴定出变异位点^[32]。Colbert 等^[33] 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。

在植物中最先利用 TILLING 技术进行突变检测的是拟南芥(*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh)^[34],随后很快应用于其它作物中。Slade 等^[35] 首次将 TILLING 技术应用于普通小麦的淀粉品质改良,在

1920 个 EMS 诱变的 M_2 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(亦称突变密度, Mutation density) 为 $1/24\text{kb} \sim 1/40\text{kb}$ 。Uauy 等^[36] 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 $1/38\text{kb}$ 和 $1/51\text{kb}$ 。潘娜^[37] 以冬小麦品种新麦 18 空间诱变 SP_2 群体为试验材料,探索基于 CEL I 酶切的高通量 TILLING 筛选体系,检测小麦品质、抗逆及抗病等性状相关的目标基因片段,并结合 PCR 技术检测小麦 *Lr34* 基因大片段缺失突变。在品种新麦 18 SP_2 群体 2304 个样本中,共检测到 12 个样本发生 *Lr34* 基因片段缺失突变,突变频率为 0.52%。Till 等^[38] 以 EMS 诱变玉米花粉得到的 750 个单株为材料,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,目的片段长度均约为 1 kb,共发现了 17 个点突变,其中包括 10 个错义突变和 7 个沉默突变。Wu 等^[39] 利用 EMS、DEB(双环氧丁烷)、快中子及 γ 射线诱导水稻品种 IR64,获得不同的突变群体,共约 60000 单株。利用 TILLING 技术分析不同浓度 EMS 诱变的 M_2 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* 与 *cal7* 中发现不同的突变位点,突变频率为 0.5/1Mb。EMS 浓度提高到 1.6% 时,突变频率提高到 1/1Mb。Cooper 等^[40] 利用 TILLING 技术分析大豆的 3 个 EMS 诱变的 M_2 群体(A: 品种为 Forrest, 40mM EMS; B: 品种为 Williams82, 40mM EMS; C: Williams82, 50mM EMS) 和 1 个 NMU 诱变的 M_2 群体(D: Williams82, 2.5mM NMU)。在 4 个群体中均检测 *CLAV*、*NARK*、*PPCK4*、*RHG1B* 等 7 个基因,共发现 116 个突变位点(A 群体 32 个,B 群体 12 个,C 群体 25 个,D 群体 47 个)。A、D 群体的突变频率为 $1/140\text{kb}$,B、C 分别为 $1/550\text{kb}$ 与 $1/250\text{kb}$ 。Sabetta 等^[41] 将 TILLING 技术应用于向日葵(*Helianthus annuus* L.) 基因突变的检测研究,用 0.7% EMS 处理品种 GV342,在 M_2 群体中检测 *kasII*、*kasIII* 等 4 个基因,估算的平均突变频率为 $1/475\text{kb}$ 。目前,TILLING 技术已广泛应用于 20 多种作物的基因突变的鉴定,应用前景十分广阔^[42]。

4 结论

突变率与突变频率是两个不同的概念,二者具有

不同的含义。估算突变率和突变频率在进化生物学、突变遗传和突变育种研究中具有重要意义。突变的鉴定方法可分为表型鉴定和基因型鉴定两大类。人们最早采用表型鉴定的方法估算突变率和突变频率。基因型鉴定是继表型鉴定以后发展起来的检测突变的新方法。其中,微卫星技术得到较广泛的应用。利用 TILLING 技术进行诱发突变的检测亦取得良好进展。在比较参考不同的研究文献时,需要注意采用的试验设计和计算方法,避免对研究结果的误读或进行不恰当的比较。

参考文献:

- [1] 毛炎麟. 突变率与突变频率[J]. 核农学通报, 1992, 13, (2): 94 - 95
- [2] 蔡旭. 植物遗传育种学[M]. 北京: 科学出版社, 1998:188 - 189,565
- [3] Presciuttini S. Tassi di mutazione [EB/OL]. [2012 - 12 - 25]. <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.5/deed.it>.
- [4] Russell P J. Fundamentals of Genetics [M]. San Francisco: Addison Wesley Longman, Inc., 2000:412
- [5] Kondrashov F A, Kondrashov A S. Measurements of spontaneous rates of mutations in the recent past and the near future [J]. Philosophical Transactions of THE Royal Society B, 2010, 365: 1169 - 1176
- [6] 李新华, 邱登林, 孙桂芝, 徐相波. 山东省小麦诱变育种[J]. 核农学报, 2006, 20(1):51 - 53
- [7] 张雄. 大辐辐射育种中突变频率修正法的比较[J]. 原子能农业应用, 1984, 4:50 - 54
- [8] 杨鹤峰, 陈秀兰, 何震天, 顾世梁, 徐辰武, 杜华章. 诱发籼稻早熟突变频率和早熟范围的研究[J]. 江苏农学院学报, 1991, 12(2):11 - 15
- [9] 王志国, 杜连恩, 魏玉昌, 于秀普. 大豆化学诱变遗传学效应及育种技术的研究[J]. 邯郸农业高等专科学校学报, 2004, 21(3):7 - 11
- [10] 任学良, 王轶, 杨春元, 史跃伟, 王茂胜. γ 射线与 Na₃ 复合处理对烟草几种主要农艺性状的诱变效应[J]. 中国烟草学报, 2008, 14(1):23 - 16
- [11] 朱军. 遗传学(第三版)[M]. 北京: 中国农业出版社, 2002: 255 - 256
- [12] Marriage T N, Hudman S, Mort M E, Orive M E, Shaw R G, Kelly J K. Direct estimation of the mutation rate at dinucleotide microsatellite loci in *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae) [J]. Heredity, 2009, 103:310 - 317
- [13] 张涛, 路宏朝, 李新生. 微卫星进化属性及其功能的研究进展[J]. 中国农学通报, 2010, 26(01):44 - 47
- [14] Lapan S W, 王勇. An introduction to molecular biology with Chinese translation[M]. 北京: 化学工业出版社, 2008:201
- [15] 李成华, 李太武, 宋林生. 微卫星 DNA 技术及其应用的探讨[J]. 浙江海洋学院学报:自然科学版, 2003, 22(4):352 - 355
- [16] Schlotterer C. Evolutionary dynamics of microsatellite DNA [J]. Chromosoma, 2000, 109:365 - 371
- [17] Whittaker J C, Harbord R M, Boxall N, Mackay I, Dawson G, M. Sibly R M. Likelihood-based estimation of microsatellite mutation rates[J]. Genetics, 2003, 164:781 - 787
- [18] Brohede J, Moller A P, Ellegren H. Individual variation in microsatellite mutation rate in barn swallows [J]. Mutation Research, 2004, 545:73 - 80
- [19] Gow J L, Noble L R, Rollinson D, Jone C S. A high incidence of clustered microsatellite mutations revealed by parent-offspring analysis in the African freshwater snail, *Bulinus forskalii* (Gastropoda, Pulmonata) [J]. Genetica, 2005, 124(1):77 - 83
- [20] Vigouroux Y, Jaqueth J S, Matsuoka Y, Smith O S, Beavis W D, Smith J S C, Doebley J. Rate and pattern of mutation at microsatellite loci in maize[J]. Molecular Biology and Evolution, 2002, 19(8):1251 - 1260
- [21] Seyfert A L, Cristescu M E, Frisse L, Schaack S, Thomas W K, Lynch M. The rate and spectrum of microsatellite mutation in *Caenorhabditis elegans* and *Daphnia pulex* [J]. Genetics, 2008, 178:2113 - 2121
- [22] Kayser M, Vowles E J, Kappeid D, Amos W. Microsatellite length differences between humans and chimpanzees at autosomal loci are not found at equivalent haploid Y chromosomal loci [J]. Genetics, 2006, 173:2179 - 2186
- [23] Thuillet A C, Batallon T, Souraille P, David J L. Factors affecting polymorphism at microsatellite loci in bread wheat [*Triticum aestivum* (L.) Thell]; effects of mutation processes and physical distance from the centromere[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2004, 108:368 - 377
- [24] Symonds V V, Lloyd A M. An analysis of microsatellite loci in *Arabidopsis thaliana*: mutational dynamics and application [J]. Genetics, 2003, 165:1475 - 1488
- [25] Zhivotovsky L A, Underhill P A, Feldman M W. Difference between evolutionarily effective and germline mutation rate due to stochastically varying haplogroup size [J]. Molecular Biology and Evolution, 2006, 23(12):2268 - 2270
- [26] Udupa S M, Buzm M. High mutation rate and mutational bias at (TAA)_n microsatellite loci in chickpea (*Cicer arietinum* L.) [J]. Molecular Genetics and Genomics, 2001, 265:1097 - 1103
- [27] Thuillet A C, Bru D, David J, Roumet P, Santoni S, Sourdille P, Bataillon T. Direct estimation of mutation rate for 10 microsatellite loci in durum wheat, *Triticum turgidum* (L.) Thell. ssp *durum* desf [J]. Molecular Biology and Evolution, 2002, 19(1):122 - 125
- [28] Clark R M, Simon T, Doebley J. Estimating a nucleotide substitution rate for maize from polymorphism at a major domestication locus[J]. Molecular Biology and Evolution, 2005, 22(11):2304 - 2312.
- [29] Raquin A L, Depaulis F, Lambert A, Galic, N, Brabant P, Goldringer I. Experimental estimation of mutation rates in a wheat Population with a gene genealogy approach [J]. Genetics, 2008, 179:2195 - 2211
- [30] Cieslarovo J, Hanáček P, Fialova E, Hybl M, Smykal P. Estimation of pea (*Pisum sativum* L.) microsatellite mutation rate

- based on pedigree and single-seed descent analyses[J]. *Journal of Applied Genetics*, 2011, 52:391 - 401
- [31] 吴海滨, 朱汝财, 赵德刚. TILLING 技术的原理与方法述评述[J]. *分子植物育种*, 2004, 2(4):574 - 580
- [32] 李春寿, 阮关海, 张琳琳, 吴殿星. 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
- [33] Colbert T, Till B J, Tompa R, Reynolds S, Steine M N, Yeung A T, McCallum C M, Comai L. High-throughput screening for induced point mutation[J]. *Plant Physiology*, 2001, 126:480 - 484
- [34] Hughes H. Reverse genetics in zebrafish by TILLING[J]. *Briefings in Functional Genomics & Proteomics*, 2008, 7(6):454 - 459
- [35] Slade A J, Fuerstenberg S I, Loeffler D, Steine M N, Facciotti D. A reverse genetic nontransgenic approach to wheat crop improvement by TILLING[J]. *Nature Biotechnology*, 2005, 23:75 - 81
- [36] Uauy C, Paraiso F, Colasuonno P, Tran R K, Tsai H, Berardi S, Comai L, Dubcovsky J. A modified TILLING approach to detect induced mutations in tetraploid and hexaploid wheat[J]. *BMC Plant Biology*, 2009, 9:115 - 128
- [37] 潘娜. 空间环境诱发小麦突变体的 TILLING 分析[D]. 北京: 中国农业科学院, 2011:1 - 2
- [38] Till B J, Reynolds S H, Weil C, Springer N, Burtner C, Young K, Bowers E, Codomo C A, Enns L C, Odden A R, Greene E A, Comai L, Henikoff S. Discovery of induced point mutations in maize genes by TILLING[J]. *BMC Plant Biology*, 2004, 4:12 - 19
- [39] Wu J L, Wu C, Lei C, Baraoidan M, Bordeos A, Madamba M R S, Pamplona M R, Mauleon R, Portuga A, Ulat V J, Bruskiewich R, Wang G, Leach J, Khush G, Leung H. Chemical and irradiation-induced mutants of indica rice IR64 for forward and reverse genetics[J]. *Plant Molecular Biology*, 2005, 59:85 - 97
- [40] Cooper J L, Till B J, Laport R G, Darlow M C, Kleffner J M, Jamai A, Mellouki T E, Liu S, Ritchie R, Nielsen N, Bilyeu K D, Meksem K, Comai L, Henikoff S. TILLING to detect induced mutations in soybean[J]. *BMC Plant Biology*, 2008, 8:9 - 18
- [41] Sabetta W, Alba V, Blanco A, Montemurro C. sunTILL: a TILLING resource for gene function analysis in sunflower[J]. *Plant Methods*, 2011, 7(1):7 - 20
- [42] 刘录祥, 郭会君, 赵林妹, 李军辉, 古佳玉, 赵世荣, 王晶. 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