

植物功能基因组研究中的基因敲除技术

陈其军¹ 肖玉梅^{2,*} 王学臣^{2,**} 周海梦¹

¹清华大学生物科学与技术系, 北京 100084; ²中国农业大学生物学院植物生理生化国家重点实验室, 北京 100094

Gene Knockout in Plant Functional Genomics

CHEN Qi-Jun¹, XIAO Yu-Mei^{2,*}, WANG Xue-Chen^{2,**}, ZHOU Hai-Meng¹

¹Department of Biological Science and Biotechnology, Tsinghua University, Beijing 100084; ²The National Key Laboratory of Plant Physiology and Biochemistry, College of Biological Sciences, China Agricultural University, Beijing 100094

提要 综述了T-DNA插入突变和转座子插入突变等基因敲除技术的原理及其在植物功能基因组研究中的应用, 并简要介绍了向国际有关机构索要或购买拟南芥插入突变体的方法。

关键词 基因敲除; 功能基因组; T-DNA插入突变体; 转座子插入突变体

随着拟南芥等模式植物和水稻等作物的基因组序列测定工作相继完成, 大量新基因 (novel genes, 与已知基因同源) 和功能未知基因 (unknown genes, 与已知基因没有同源性) 的功能有待鉴定。例如, 拟南芥是第一个完成基因组测序的开花植物, 但其中90%以上基因的功能仍未研究^[1]。采用反向遗传学鉴定基因功能是基因组计划由结构基因组学过渡到功能基因组学的必然要求^[2]。研究手段包括基因的互补实验、超表达、反义抑制、基因敲除、基因诱捕、基因激活等手段。其中基因敲除技术 (又称为无义突变, null mutations) 可为基因产物的功能提供直接证据, 其它研究基因功能的方法如基因芯片等多数只是相关性, 不能证明基因序列和基因功能之间的因果关系。目前基因功能的直接证据仍是来自对缺失相应基因的突变体进行的功能分析。基因敲除包括定点敲除, T-DNA或转座子随机插入突变。

定点敲除 (即定点突变的方法使目的基因完全失活) 是最直接的研究基因功能的方法, 但是对开花植物而言, 现在还没有高效、实用的定点突变技术。目前较为有效的方法是大规模的随机插入突变, 它为在基因组范围内敲除掉拟南芥任何一个基因提供了可能。这项技术具有效率高、基因失活完全、容易分离鉴定被插入引起失活的目的基因等优点^[2]。随机插入突变可分为T-DNA插入突变和转座子插入突变。

1 T-DNA插入突变

农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 介导

的T-DNA转化可用于不同的植株中进行插入突变。使用T-DNA插入突变的优点有: (1) 能直接在基因组DNA中产生稳定的插入突变, 不需要额外的步骤来稳定T-DNA插入序列; (2) 尽管最近的研究表明, T-DNA标签在拟南芥基因组中的分布并非完全是随机的, 而是偏好插入基因密度高的染色体区以及基因的5'和3'调控区^[3], 但这种偏好性并不影响用T-DNA插入突变位点来饱和基因组。另一方面, T-DNA插入突变也有不利的因素: 它只适用于那些容易被T-DNA转化的植物; T-DNA整合还会出现一些复杂的模式, 如T-DNA边界的质粒序列随T-DNA一起整合到基因组DNA中, 同一植物常常会有多个拷贝的插入序列等复杂情况的出现, 使得用PCR方法进行的反向遗传学分析变得困难; 此外, 它常常会出现由T-DNA整合引起的各种染色体重排现象, 以致突变体表型与T-DNA插入无关, 而难以对插入位点进行遗传学分析^[2]。尽管如此, 但近年来发展了农杆菌介导的T-DNA转化拟南芥的高效方法, 可以快速获得成千上万的拟南芥T-DNA插入突变体^[4], 因此T-DNA插入突变在拟南芥中得到广泛利用。

收稿 2003-04-28 修定 2003-07-21

资助 国家重点基础研究专项经费项目(G1999011700)。

* 同为第一作者。

** 通讯作者(E-mail:xcwang@public.bta.net.cn, Tel:010-62892706)。

2 转座子插入突变

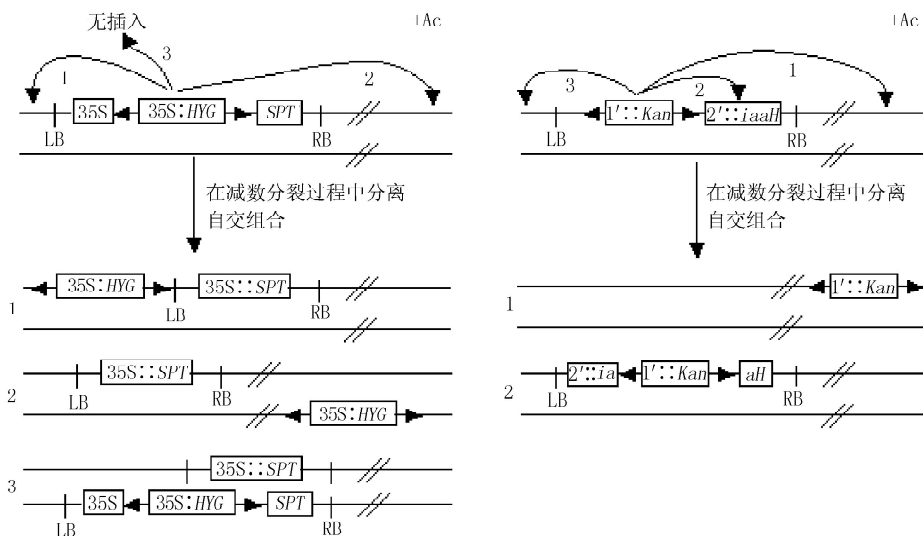
使用转座子进行插入突变的优点有：(1) 转座子能够在转座酶的存在下从插入位点剪切下来，造成突变体反转。采用这种方法可进一步确证突变体表型是否由转座子插入突变引起。(2) 大多数转座的位点偏好于连锁位点，所以如果一个可转座的元件靠近目的基因，那么可转座的元件即会高效地移动并插入目的基因。因此，即使在突变体库中没有发现期望的插入位点，仍可以采用转座子在连锁位点上的转座获得目的基因被插入失活的品系。(3) 当一个基因家族的多个成员沿染色体串连排列时，可采用复制型的转座系统（供体位点的转座子元件被复制而不是被剪切，由复制形成的转座子元件转座到新的位点）创建该基因家族全部成员均被敲除的突变体。如果目标是用转座子随机插入的方法获得插入位点在基因组达到饱和的突变体库，转座位点的偏好性则是一个明显的缺点。为了解决这个问题，人们发展了双组分的转座系统，如激活/解离 (*Activator/Dissociation, Ac/Ds*) 转座系统和增强子/抑制子-突变子 (*Enhancer/Suppressor-mutator, En/Spm*) 转座系统。在双组分的转座系统中，可以用负选（反选）的方法去掉紧密连锁的转座位点；同时，还可以用负选的方法去掉转座酶，获得稳定的插入品系。对于一些自身没有适合的转座系统可用的物种来说，可以采用来自其它物种的异源转座系统。目前，已将两套来自玉米的可转座元件 *Ac/Ds* 和 *En/Spm* 改造修饰后用在烟草、番茄和拟南芥等植物中^[2]。

2.1 *Ac/Ds* 转座系统 *Ac/Ds* 系统由自主性元件 (*Ac*) 和非自主性元件 (*Ds*) 构成。*Ac* 元件编码的转座酶与 *Ac* 和 *Ds* 元件的末端倒转重复序列结合，催化 *Ac* 和 *Ds* 元件转座到基因组的新位点，*Ds* 元件能够在转座酶的作用下移动。去除 *Ac* 元件的末端倒转重复序列可使其自身不能转座，但可以产生转座酶。采用这种改造过的两组分系统可以产生稳定的插入。这时，通过遗传杂交引入自主性元件，转座子插入序列可以重新移动。因此，*Ac/Ds* 转座子插入系统只需要少量的转基因品系（启动品系）作为转座源即可。

用可转座元件插入突变时，应当仔细考虑重

新获得新的插入位点的策略。最常用的两个策略是正选策略和反选策略。如图 1-a 所示，正选策略是根据转座子元件是否从抗性基因内部剪切掉，从而使抗性基因恢复抗性来筛选。正选策略存在两个问题：首先，尽管大多数情况下可转座的元件 (*Ds* 元件) 的转座作用（即剪切事件）发生在减数分裂之前，但有时转座子的转座也能在减数分裂后发生。由于 *Ac* 和 *Ds* 元件均是杂合状态，经减数分裂后含 *Ac* 元件和含 *Ds* 元件的染色体可能随机分配到同一个大孢子或小孢子，也可能随机分配到不同的大孢子或小孢子中。前者由于有 *Ac* 元件的存在，因此 *Ds* 元件仍然可以发生转座；而后者由于不存在 *Ac* 元件，所以 *Ds* 元件不会发生转座，造成一些精、卵细胞含有没有转座的 *Ds* 元件，从而形成假阳性 F_2 代植株。其次，由于大于 50% 以上的转座发生在连锁位点，采用这种策略获得的许多转座子元件与供体位点是连锁的。这样，为了使转座子插入位点覆盖整个基因组范围，需要进行大量的筛选工作。不过，如果我们的目标是把与供体位点连锁的基因作为插入突变的靶基因时，这种策略尤其有效。因此，这种策略可以作为一种定点敲除基因的方法。人们正在系统地构建各种转座子插入突变体中转座子位点的遗传图谱，将来可以用这些转座子插入突变体品系在基因组范围内定点敲除目的基因，即采用转座子距离目的基因最近的插入突变体品系，根据转座子在连锁位点的转座频率较高的特性，定点敲除目的基因。

反选策略是根据转座子元件是否与反选标记基因分离筛选的（图 1-b）。反选标记基因是通过将无毒的复合物转化为对植物细胞有毒的物质而起作用。因此，当反选标记基因表达时，植物对相应的复合物敏感；当植株对相应的复合物显示出抗性时，表明植株已不带有反选标记基因。在反选策略中，连锁的位点在反选时得以去除，非连锁位点得到富集。因此，这个策略允许在基因组范围内高效地获得转座插入位点。反选策略存在的一个问题是：当转座子元件从供体位点插入到反选标记基因（如 *iaaH*）的内部时会造成反选标记基因的失活，导致假阳性植株的产生。事实上，在双抗幼苗中，这种假阳性植株占

图1 可转座元件的标记策略^[5]

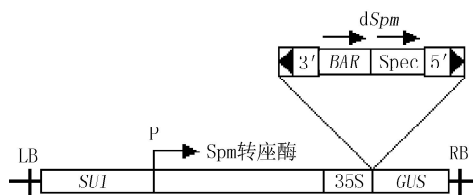
a. 正选策略。在同一 T-DNA 上, 带有一个抗生素抗性基因 (35S::HYG) 的供体 *Ds* 元件插入到第二个抗生素抗性基因 35S::SPT 的前导序列中。在 *Ac* 元件存在时, *Ds* 被剪切, 35S::SPT 基因的抗性得以恢复, 导致对链霉素产生抗性。对链霉素和潮霉素 (hygromycin) 都具有抗性的 F_2 代植株含有从 T-DNA 上的原始位点剪切下来的 *Ds* 元件。*Ds* 元件转座到连锁位点 (第 1 类) 和非连锁位点 (第 2 类) 的植株被选择。第 3 类植株是可能会被筛选的假阳性植株。当 *Ds* 元件在卵细胞中被剪切而在精细胞中没有被剪切 (或者相反) 时, 会导致这种假阳性植株的出现。

b. 反选策略。在同一 T-DNA 上, 带有一个抗生素抗性基因 (1'::Kan) 的供体 *Ds* 元件与反选标记基因 2'::*iaaH* 毗邻。反选标记基因 *iaaH* 编码的产物可将无毒的萘己酰胺 (NAM) 转化为对植物细胞有毒的物质, 因此当植株中存在并表达反选标记基因 *iaaH* 时植株对 NAM 复合物敏感。在 *Ac* 元件存在时, *Ds* 被剪切。对卡那霉素 (Kan) 和 NAM 都具有抗性的 F_2 代植株含有 *Ds* 元件, 而不含有 *iaaH* 基因, 因而 *Ds* 元件转座到非连锁位点的植株 (第 1 类) 被选择。转座到连锁位点的 F_2 代植株 (第 3 类) 因含有 *iaaH* 基因而不被筛选。第 2 类植株为可能会被筛选的假阳性植株。当 *Ds* 转座的连锁位点处于 *iaaH* 基因的内部时, 会导致 *iaaH* 基因的失活, 使植株对 NAM 产生抗性, 从而导致这种假阳性植株的出现。

5%~15%。要解决这个问题, 可以在 T-DNA 上引入两个拷贝的反选标记基因。但需要注意的是, 2 个拷贝的标记基因可能会因为共抑制现象, 造成反选标记基因的失活。反选策略中另一个值得注意的问题是, 尽管 *Ds* 元件的转座没有明显的位点特异性, 但研究发现, 采用反选策略筛选的非连锁的转座位点在整个基因组中并非是随机分布的, 而是存在明显的“热点” (hotspot) 部位。例如, 在拟南芥 2 号和 4 号染色体的核仁组织中心插入位点较密集, 插入位点偏向于基因的 5' 端等^[6]。

2.2 *En/Spm* 转座系统 Tissier 等^[7] 对上述 *Ac/Ds* 转座系统进行了改进, 设计成 *En/Spm* 转座系统。其中一个改进是可以直接对土壤中生长的植物进行抗性筛选, 而不需要在平板上培养和筛选, 这就大大降低了工作量。另一个改进是 *En/Spm* 系统的可转座元件 *dSpm* 和 *Spm* 转座酶构建到同一 T-DNA 上, 反选位点只有一个, 因此可以降低筛选后代

的数目。图 2 是 *En/Spm* 转座系统, 其中 *dSpm* 元件携带膦丝菌素 (phosphinothricin, PPr) 抗性基因 *BAR*, 可采用该基因检测对 PPT 有抗性的 T-DNA 有否整合到拟南芥中和 *dSpm* 元件有否插入新位点。*BAR* 基因的方向与 *dSpm* 元件的方向相反, 在 *BAR* 基因的 3' 端构建有 *nos* 基因的终止区, 这样, 当 *dSpm* 元件插入基因的内含子中时, 无论 *dSpm* 元件的插入方向如何, 均可保证被插入基因

图2 *En/Spm* 转座系统^[7]

含 *Spm* 转座酶和 *dSpm* 可转座元件的 T-DNA 结构。LB 和 RB: T-DNA 的左右边界; P: 驱动转座酶表达的启动子 (*Spm*, 35S 或 *AtDMC1* 启动子); *BAR*: 膦丝菌素抗性基因; *Spec*: 奇霉素抗性基因用于载体构建过程中筛选阳性菌; *SU1*: 反选标记基因。

的完全失活。反选标记基因 *SUI* 基因编码的产物细胞色素 P450 对磺酰基脲前体除草剂 R7402 敏感。GUS 基因可用于检测 d*Spm* 元件的转座活性。

筛选新的插入突变体的流程大体上是: 将每一株杂合的 T-DNA 转化植物经自交产生的种子 (F₂ 代或 F₃ 代) 播种到土中, 发芽几天后用 PPT 和 R7402 喷洒幼苗, 筛选对 PPT 和 R7402 均产生抗性的植株即双抗植物。双抗植株就是转座子稳定插入的新的突变植株。其原理是: 如果 d*Spm* 元件在减数分裂之前或减数分裂过程中转座到同一染色体或不同染色体的非连锁位点, T-DNA 和 d*Spm* 元件在后代中分离, 那些携带有 d*Spm* 元件而缺乏 T-DNA 的植物对 PPT 和 R7402 均产生抗性。当 d*Spm* 元件转座到与 T-DNA 连锁的位点时, 多数情况下产生单抗植株, 但如果在减数分裂过程中含 d*Spm* 元件和 T-DNA 连锁位点的染色体与同源染色体发生连锁互换, 那么 d*Spm* 元件和 T-DNA 可能会分配到不同的大孢子或小孢子中, 最终可能形成双抗植株。尽管大部分的双抗植株是 d*Spm* 转座子元件插入到新位点的突变体, 但也有少数双抗植株是由于 *SUI* 基因本身的失活而产生。例如当 d*Spm* 元件插入 *SUI* 基因的内部时或当 *SUI* 基因发生沉默时就会导致 *SUI* 基因失活而产生假阳性的双抗植株。但这类假阳性的双抗植株可以通过检测 GUS 活性来排除掉。

在 *En/Spm* 转座系统中, 由于 d*Spm* 元件与 *Spm* 转座酶共存于同一 T-DNA 上, 所以 d*Spm* 会不断地转座。维持和使用几个启动转基因品系作为转座源是不可能的, 因此需要产生大量独立的杂合转基因品系 (F₁) 作为转座源, 在 F₃ 代自交后代中筛选双抗个体。

2.3 增强子-抑制子(*enhancer-inhibitor*)转座子突变系统 *enhancer-inhibitor* 转座子系统^[8]用含多个 *Inhibitor I* (d*Spm*) 元件的植物作为奠基品系 (founder lines)。这套系统的优点是可以使用较少的品系饱和基因组。每个奠基品系含 7~10 个 *I* (d*Spm*) 元件。7 个奠基品系用作启动品系, 在 *En* (*Spm*) 转座酶的作用下 *I* (d*Spm*) 元件发生转座, 繁殖代数后, 得到 2 592 个含多转座子的品系。每品系含 20~25 个 *I* 元件, 相当于共有 50 000~65 000 插入位点。由于拟南芥的基因

密度较高, 因此每个品系种有 20~25 个插入位点就很可能造成多个基因的失活, 从而导致突变体出现复杂的表型。然而, 由于基因功能的冗余现象在拟南芥基因组中广泛存在, *enhancer-inhibitor* 转座子系统可以有效地用于研究那些被敲除后而没有查明其确切功能的基因。当产生的多转座子品系的数量足够大时, 就会提高几个独立的元件插入同一基因的概率, 采用这些品系就可以确证突变体的表型。对 *enhancer-inhibitor* 转座子系统来说, 同样可采用三维建库的反向遗传学策略筛选目的基因被敲除的品系。

3 反向遗传学筛选插入突变体的策略

可以用建库策略和测序策略筛选 T-DNA 或转座子插入突变体品系。建库策略是: 将已获得的各种插入突变体品系依据一定的规则组成由小到大的突变体库, 并制备各类突变体库的 DNA 库; 以各类 DNA 库为模板, 根据目的基因的 5' 和 3' 端以及 T-DNA 或转座子左右边界序列设计引物进行 PCR 扩增, 按由大到小的顺序分别以上述各类突变体库的混合 DNA 为模板进行 PCR 扩增和鉴定, 最终筛选到目的基因被 T-DNA 插入突变的品系。建库策略适用于尚未完成基因组测序的植物或尚未展开大规模系统测序的随机插入突变体库。建库策略可以大大降低 DNA 制备和 PCR 扩增的工作量, 一个库一旦经 PCR 鉴定为阳性就可以在其中鉴定目的基因被插入失活的突变体品系。建库策略可分为二维建库、三维建库和基于 IDI 技术建库。

二维建库一般是将每 20~100 个插入品系组成一个库 (pool), 从这些库里提取 DNA 用作 PCR 筛选目的基因的模板。为了进一步降低 DNA 制备和 PCR 扩增的工作量, 可以将若干个库组成超级库 (superpool), PCR 筛选可分级进行: 即按筛选阳性超级库→筛选阳性库→筛选阳性亚库→筛选阳性个体的顺序进行。具体策略可参照 Wisconsin 大学生物技术中心植物基因敲除的研究机构对 60 480 个拟南芥 T-DNA 插入突变品系进行建库和筛选的策略^[9]。这一研究机构隶属于拟南芥功能基因组协会 (*Arabidopsis* Functional Genomics Consortium, AFGC), 拥有超过 6 万多个拟南芥 T-DNA 插入突变品系。

插入突变体也可以按三维网格的方式建库。例如, 1 000 插入品系可按 10 行 (rows)、10 列 (columns)、10 组 (blocks) 的方式组成三维网格, 每行、每列或每组制备一个 DNA 样品, 这样只需制备 30 个 DNA 样品, 根据 PCR 鉴定为阳性的 DNA 样品的行、列、组号即可定位 1 000 个插入品系中目的基因被 T-DNA 插入的突变体品系。

此外, 也可以采用插入序列反向显示 (inverse display of insertion, IDI) 技术筛选插入突变体。IDI 技术筛选插入突变体的原理是: 以各种 DNA 库为模板, PCR 扩增各个插入位点的各种旁侧序列, 各个 DNA 库的 PCR 扩增产物按一定的阵列固定到杂交膜上, 以要筛选的目的序列为探针进行杂交, 根据杂交信号的分布筛选相应的阳性突变体库, 最后筛选得到阳性突变体。用这种建库策略进行筛选具有快速、省力、省时的优点。

随机插入突变的最终目标是获得所有基因的敲除突变体, 因此对插入突变体库的所有敲除突变体的旁侧序列进行系统地测序是基因组水平上大规模产生随机插入突变体的要求。可利用质粒营救 (plasmid rescue)、反向 PCR、热不对称交错 PCR 等技术鉴定所有敲除突变体的旁侧序列。但测序策略的工作量较大, 需要较长的时间才能完成。一旦每个插入品系的 T-DNA 或转座子元件的旁侧序列得到鉴定, 就可以建立数据库, 研究者们只需根据目的基因的序列检索数据库就可以找到并进而索取目的基因被敲除的突变体品系。目前, 已经可以登录到 Salk 研究所的基因组实验室 (The Salk Institute Genomic Analysis Laboratory, SIGnAL) 的网站检索敲除目的基因的 T-DNA 插入突变体。如果相关的突变体已经发布, 就可以向有关机构 (美国的 ABRC 或英国的 NASC) 索要或购买。也可以从日本 Shinozaki 实验小组索要拟南芥敲除突变体^[10]。最近, 我们实验室已从英国的 NASC 索要到几个拟南芥基因突变体。

分离、鉴定敲除突变体是获知基因功能的第一步。在分离一个突变体品系之后, 需要得到纯合突变体并将纯合突变体进行异型杂交, 以确认

只有一个 T-DNA 或转座子元件插入, 以后, 确定突变体的表型与突变基因的关系。Wisconsin 大学生物技术中心植物基因敲除机构计划将来用包含转座子的 T-DNA 产生突变体品系。这样的突变体品系 (T-DNA 插入突变) 由于转座子 (位于 T-DNA 内) 的转座可以使邻近的基因发生转座子插入突变从而可以创建双突变体。

然而, 基因敲除也有其无法克服的缺点, 敲除掉某个基因并不一定就能获知该基因的功能, 其原因是: (1) 许多基因在功能上是冗余的, 敲除掉一个在功能上冗余的基因, 并不能造成容易识别的表型, 因为基因家族的其它成员可以提供同样的功能; (2) 拟南芥有 1 000~2 000 个必需基因, 它们在细胞生长和分裂中发挥作用。敲除这些基因会造成配子体或早期胚的致死性, 因而无法获得必需基因的纯合突变体, 也就谈不上对必需基因的纯合突变体的表型进行评估^[5]。基因诱捕技术^[5]和基因激活技术^[11]则可以弥补基因敲除技术的不足。

4 结语

植物基因组研究的最终目标是鉴定所有的基因 (结构基因组学) 并解析所有基因的功能 (功能基因组学)。随着拟南芥等植物基因组测序的完成, 结构基因组的研究目标已经达到, 而基因功能的研究是目前摆在人们面前的首要任务。在此背景下, 基因敲除等反向遗传学方法得到迅速发展, 它和基于基因芯片的基因表达谱分析方法构成了当前功能基因组研究的两个主要方法。这两个方法在功能基因组研究中的应用使得植物功能基因组的研究进入工业化大生产时代: 对基因功能的研究正在快速地从对个别基因功能的研究转向对整个基因组所有基因功能的研究^[12]。随着水稻 (*Oryza sativa*)^[13] 和玉米 (*Zea mays*)^[14] 等作物基因组测序的开展及相继完成, 人们已开始采用基因敲除等反向遗传学方法对作物的功能基因组展开研究。

展望未来, 进入工业化大生产时代的植物功能基因组学研究必将为人们提供新的机遇和挑战。例如, 随着基于基因芯片技术的大规模基因表达谱分析的展开及相应数据库的建立, 人们可以根据基因的表达信息选择感兴趣的基因进行

功能研究, 而大规模随机插入突变体库及相应的数据库的建立, 可以帮助人们轻易地获得敲除目的基因的突变体材料, 进而对目的基因的功能开展反向遗传学研究。相信通过世界各个研究室的共同努力, 拟南芥等模式植物整个基因组中基因的功能将会全部得到阐明, 到那时, 采用生物技术对植物进行高效而安全的遗传改良将成为可能^[15]。

参考文献

- 1 The *Arabidopsis* Genome Initiative. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature*, 2000, 408:796~815
- 2 Parinov S, Sundaresan V. Functional genomics in *Arabidopsis*: large-scale insertional mutagenesis complements the genome sequencing project. *Curr Opin Biotechnol*, 2000, 11(2): 157~161
- 3 Szabados L, Kovacs I, Oberschall A et al. Distribution of 1000 sequenced T-DNA tags in the *Arabidopsis* genome. *Plant J*, 2002, 32:233~242
- 4 Bent AF. *Arabidopsis* in plant transformation. Uses, mechanism and prospects for transformation of other species. *Plant Physiol*, 2000, 124:1540~1547
- 5 Springer PS. Gene traps: tools for plant development and genomics. *Plant Cell*, 2000, 12(7): 1007~1020
- 6 Parinov S, Sevugan M, Ye D et al. Analysis of flanking sequences from *Dissociation* insertion lines: A database for reverse genetics in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 1999, 11:2263~2270
- 7 Tissier AF, Marillonnet S, Klimyuk V et al. Multiple independent defective *Suppressor-mutator* transposon insertions in *Arabidopsis*: a tool for functional genomics. *Plant Cell*, 1999, 11: 1841~1852
- 8 Speelman E, Metz PLJ, Van AG et al. Two-component *Enhancer-Inhibitor* transposon mutagenesis system for functional analysis of the *Arabidopsis* genome. *Plant Cell*, 1999, 11(10):1853~1866
- 9 Krysan PJ, Young JC, Sussman MR. T-DNA as an insertional mutagen in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 1999, 11:2283~2290
- 10 Ito T, Motohashi R, Kuromori T et al. A new resource of locally transposed *Dissociation* elements for screening gene-knockout lines in silico on the *Arabidopsis* genome. *Plant Physiol*, 2002, 129: 1695~1699
- 11 Weigel D, Ahn JH, Blazquez MA et al. Activation tagging in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 2000, 122(4):1003~1013
- 12 Meinke D, Tanksley S. The maturation and specialization of plant genomics. *Curr Opin Plant Biol*, 2000, 3:95~96
- 13 Jeon JS, Lee S, Jung KH. T-DNA insertional mutagenesis for functional genomics in rice. *Plant J*, 2000, 22:561~570
- 14 Martienssen RA. Functional genomics: Probing plant gene function and expression with transposons. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95:2021~2026
- 15 Chory J, Ecker JR, Briggs S et al. National Science Foundation-Sponsored Workshop Report: 'The 2010 Project': functional genomics and the virtual plant. A blueprint for understanding how plants are built and how to improve them. *Plant Physiol*, 2000, 123:423~426