

## TILLING I FOX-HUNTING: NOWE METODY ANALIZY FUNKCJONALNEJ GENÓW\*

TILLING AND FOX-HUNTING:  
NEW METHODS IN FUNCTIONAL ANALYSIS OF GENES

Krystyna RYBKA

Zakład Biochemii i Fizjologii Roślin, Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin  
w Radzikowie

*Streszczenie:* TILLING (ang. *Targeting Induced Local Lesions IN Genomes*) i FOX-hunting (ang. *Full-length cDNA Over-expressing gene hunting system*) to nowe metody badawcze, które umożliwiają masową i szybką analizę funkcjonalną genów. Przyspieszenie prac w tym obszarze nauk biologicznych jest konieczne do systematyzowania danych uzyskiwanych w programach sekwencjonowania genomów, genów oraz EST (ang. *Expressed Sequence Tag*), a także w programach badań zmian ekspresji genów, prowadzonych przy zastosowaniu analizy mikromacierzy DNA. Klasyczne metody badań funkcjonalnych były i są prowadzone drogą „od cechy do genu” (ang. *Top-down/Forward*). Najpierw, przy stosowaniu metod mapowania jakościowego lub ilościowego poszukuje się markerów genetycznych silnie sprzężonych z cechą. Kosegregujące z cechą markery nanosi się na mapy fizyczne kontigów klonów bibliotek genomowych w celu wyboru klonu zawierającego poszukiwany gen, co sprawdzane jest w teście komplementacji. Wynik pozytywny tego testu potwierdza przewidziane funkcje biologiczne badanego genu, jednakże brak oczekiwanych zmian fenotypowych w transformantach nie stanowi negacji przyjętych założeń, ze względu na często zachodzące wyciszenie genów. Innym typem rozwiązań w analizie funkcjonalnej genów jest droga „od mutacji do genu” (ang. *Bottom-up/Reverse*), zakładająca wytwarzanie, poszukiwanie oraz analizę mutantów i to właśnie podejście jest wykorzystywane w obydwu omawianych technikach. Technika TILLING, to połączenie tradycyjnej mutagenyzy chemicznej z nowoczesną i czułą, techniką identyfikacji mutantów punktowych, SNP (ang. *Single Nucleotide Polymorphism*), opartą na analizie PCR. Metoda ta polega na namnażaniu mieszaniny równych ilości DNA poszczególnych mutantów w reakcji PCR, a następnie na trawieniu produktów endonukleazą *CelI* rozpoznającą niesparowane zasady w podwójnej nici DNA. Ważnym i trudnym etapem wstępnym jest uzyskanie odpowiednio dużej i wystarczająco wysyczonej populacji mutantów, co zależy zarówno od czynnika chemicznego, jak i od modyfikowanego genomu. Drugim krytycznym krokiem jest przygotowanie DNA matrycowego, które jest kolekcjonowane w 96-dołkowych mikroplatkach. Do pojedynczej reakcji PCR przygotowuje się mieszaniny DNA zbierając do 8 probówek DNA z poszczególnych rzędów dołków, a potem (do 12 probówek) DNA z dołków kolejnych kolumn, tak że materiał z jednej mikroplátky można przeanalizować w 20 (8 + 12), a nie 96 reakcjach. Analizę DNA wielu płytek można

\*Praca zrealizowana w ramach tematu IHAR/1-1-01-4-05.

dotatkowo usprawniać zbierając DNA z tych samych dołków różnych płytek. W celu identyfikacji mutantów każdy z produktów reakcji PCR jest poddawany denaturacji, a następnie renaturacji, co powoduje powstawanie heterodupleksów z niesparowanymi zasadami w miejscu mutacji. Trawienie tego DNA endonukleazą *CelI* specyficzną do niedopasowanych zasad umożliwia ich identyfikację po rozdziale elektroforetycznym na żelu sekwencyjnym. W metodzie TILLING identyfikacja mutantów jest szybsza niż klasyczna metoda identyfikacji mutantów SNP, gdyż: i/ zamiast kosztownego i czasochłonnego sekwencjonowania wykorzystuje się enzym restrykcyjny trawiący renaturowane produkty PCR w miejscach niedopasowanych nukleotydów i standardową elektroforezę DNA; ii/ reakcja PCR prowadzona jest na skalę masową, na matrycy DNA będącej mieszaniną kilku/kilkunastu próbek. Technika FOX-hunting, to nowa metoda nadekspresji genów roślinnych, która umożliwia szybkie wyodrębnianie i sekwencjonowanie równoległe z analizą funkcjonalną. Jest ona modyfikacją/rozwinięciem metody transformacji rzodkiewnika wektorami binarnymi wprowadzanymi do komórek roślinnych przez *A. tumefaciens*, przez zamaczanie młodych kwiatostanów w zawiesinie biblioteki binarnej. Wektory binarne stosowane w systemie FOX-hunting zawierają pomiędzy sekwencjami granicznymi: i/ dwa tandemowe powtórzenia wzmacniacza transkrypcji (sekwencji –490 do –90 pz poprzedzającej promotor 35S wirusa mozaiki kalafiora CaMV); ii/ promotor 35S (sekwencja –90 do –1 pz wirusa CaMV); iii/ sekwencję W – 5' liderowy, nieulegający translacji odcinek RNA wirusa mozaiki tytoniu (TMV), zwiększający efektywność translacji wprowadzanego genu; iv/ kasetę zawierającą gen, którym chcemy transformować *A. thaliana* w otoczeniu sekwencji starterów (GS4 i GS6) ułatwiających jego identyfikację w mutancie oraz sekwencji rozpoznawanych przez endonukleazę *SfiI*; v/ terminator transkrypcji genu syntazy nopaliny (*nos*) z plazmidu Ti oraz *vi/* gen selekcyjny odporności na higromycynę. Do konstrukcji biblioteki w wektorze binarnym wykorzystywane są pojedyncze kopie każdego z genów zgromadzonych w bibliotekach cDNA skonstruowanych w wektorach Lambda ZAP i Lambda FLC-1-B. Zalety systemu FOX-hunting, to: i/ mały procent kosupresji genów wskutek stosowania pełnej długości klonów cDNA i znormalizowanych bibliotek w wektorach binarnych; ii/ liczebne ograniczenie ekspresji genów metabolizmu podstawowego (ang. *house-keeping genes*) w znormalizowanych bibliotekach; iii/ ułatwienia w analizie fenotypowej wynikające z krótkiego cyklu życiowego *A. thaliana*; iv/ dość łatwa izolacja i sekwencjonowanie genów. Wadą tego systemu jest ograniczenie analizy funkcjonalnej jedynie do genów wykorzystanych do konstrukcji biblioteki w *A. tumefaciens*. Obydwie techniki, TILLING i FOX-hunting, pozwalają na przyspieszenie analizy genów. Programy je wykorzystujące mogą być również dodatkowym źródłem zróżnicowanego materiału dla hodowli. System TILLING z tej racji, iż został opracowany do badania mutantów indukowanych chemicznie, pozwala na natychmiastowe i bezpośrednie wprowadzanie uzyskanych materiałów do hodowli. System FOX-hunting otwiera głównie perspektywy w analizie funkcjonalnej, generując cenne mutanty, w których obserwuje się nadekspresję genów.

*Słowa kluczowe:* TILLING, FOX-hunting, analiza funkcjonalna genów, mutageniza.

*Summary:* TILLING (*Targeting Induced Local Lesions IN Genomes*) and FOX-hunting (*Full-length cDNA Over-expressing gene hunting system*) are new research methods which enable quite fast functional analysis of genes on a mass scale. Accelerating of functional analysis of genes is required in biological sciences. It is crucial for systematization of data gathered from programs of genomes, genes, and EST (Expressed Sequence Tag) sequencing as well as from studies of gene expression profiles, based on DNA microarray analysis. Classical methods of functional studies have been fulfilled using Top-Down (Forward) approach. Firstly genetic markers cosegregating or at least strongly conjugated with the trait of interest are searched for, using quantitative or qualitative mapping methods. Subsequently those markers are mapped physically on contigs of genomic library clones spanning the region between cosegregating markers in order to select the clone carrying the gene to be tested by complementation. Positive result of that test confirms biological functions of the gene, however lack of changes in transformant phenotypes do not negate the assumptions due to frequent gene silencing. Newer breakthrough tactic in gene functional analysis is the bottom-up approach. This procedure assumes generation of mutants followed by mutant population screening and analysis. The TILLING technique is a combination of traditional chemical mutagenesis with modern and sensitive method of point mutations – SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) identification. The TILLING bases on PCR amplification of template DNA which is a mixture of equal amounts of mutants DNA, followed by digestion with endonuclease *CelI*, recognizing unpaired bases of the double-helix DNA. Crucial and difficult preliminary step of this method is generation of

appropriate population of mutants, which depends not only on chemical mutagen but also on genome to be modified. The second crucial step is preparation of a template DNA, which is collected in 96-well microplates. For single PCR reaction DNAs are combined from each row of wells into 8 test-tubes and then DNA from the columns into 12 tubes so that the material from one plate can be analyzed in 20 (12+8) not in 96 reactions. DNA analysis from several plates can be additionally improved by collecting the DNAs from the same wells of different plates. Finally, in order to identify mutants, each of PCR reaction products is denatured and then renatured which induces heteroduplex formation with unpaired bases in the point of mutation. Digestion of this DNA by *CeI1* endonuclease, specific to unpaired bases, enables their identification after the electrophoresis on sequencing gel. In the TILLING method the identification of SNP mutants is faster than in the classical approach because: i/ the standard electrophoresis on sequencing gels of *CeI1* digested, renatured PCR products is run instead of costly and time-consuming sequencing reaction; ii/ the PCR reaction is carried out on a mass scale due to the DNA template which is a mixture of few/several different DNAs. The FOX-hunting is a novel gain-of-function system, which enables the plant genes overexpression as well as genes isolation and sequencing parallelly to functional analysis. This method is a modification of the protocol of *A. thaliana* transformation by floral dip in a suspension of *A. tumefaciens* carrying the full-length cDNA library in binary vectors. The binary vector used in the FOX-hunting system contains between the border sequences: i/ two tandem repeats of sequence strengthening the transcription (5'-upstream sequence of CaMV 35S promoter -419 to -90 bp); ii/ P35S, CaMV 35S promoter -90 to -1 bp; iii/ W - 5'-upstream sequence of TMV, which increases translation effectiveness of inserted gen; iv/ a gene cassette flanked by sequences of PCR starters to identify the gene in the mutant and restriction sites for *SfiI* endonuclease; v/ polyadenylation signal of nopaline synthase gene from Ti plasmid; vi/ hygromycin resistance gene. To construct the library in the binary vector, single copies of each gen gathered in cDNA libraries (in Lambda ZAP and Lambda FLC-1-B vectors) are used. The advantages of FOX-hunting system: i/ low percentage of gene cosuppression due to use of full length cDNA clones and normalized libraries in binary vectors; ii/ reduction of the expression of housekeeping genes in normalized libraries; iii/ simplification in phenotype analysis due to *A. thaliana's* short life cycle; iv/ quite easy genes isolation and sequencing. The disadvantage of FOX-hunting system is limitation of functional analysis only to the genes selected to construction of the library in *A. tumefaciens*. Both methods, TILLING and FOX-hunting enable more rapid functional analysis of genes. Projects using one of that protocol can be used as an additional source of diversified material for plant breeding. The TILLING system, developed to study of chemically induced mutants, enables immediate and direct implementation of gathered results to breeding programs. FOX-hunting system which generates valuable mutants with gene overexpression gives the new perspectives to functional analysis.

*Key words:* TILLING, FOX-hunting, functional analysis of genes, mutagenesis.

## 1. WSTĘP

Początek XXI wieku został nazwany epoką po-genomową (ang. *post-genomic era*) z tej przyczyny, iż obecnie jest poznanych ponad 180 pełnych sekwencji genomów począwszy od sekwencji faga  $\Phi$ X174 w 1977 roku (5368 pz), bakterii *Haemophilus influenzae* w roku 1995, muszki owocówki i rzodkiewnika w roku 2000, człowieka w 2001 r., ryżu w 2002 r., a w roku 2007 pierwszego pełnego genomu, 6 miliardów nukleotydów, jednego człowieka [22]. Znajomość sekwencji genomu nie oznacza znajomości liczby i funkcji genów. Tak na przykład, w genomie ryżu, najmniejszym wśród zbóż i przez to przyjętym za modelowy (430 Mpz), pierwotnie, *in silico*, zidentyfikowano ok. 50 000 potencjalnych sekwencji kodujących, w większości o nieznanym funkcjach. Po dokładniejszych badaniach sekwencji, w tym cDNA, liczbę tę zmniejszono do 32 tys. [28].

Dodatkowo od przeszło dekady obserwujemy kompleksowe gromadzenie danych na temat zmian ekspresji genów (głównie ilościowe). W roku 1996, firma Affymetrix wprowadziła na rynek pierwszą komercyjną mikromacierz DNA (bio-chip), umożliwiającą kompleksowe badania zmiany ekspresji genów. Na przykład: na podstawie hybrydyzacji cDNA otrzymanych z odmian ryżu, o zróżnicowanej odporności na suszę, do nowej generacji mikromacierzy (syntetycznych oligonukleotydów), łącznie zidentyfikowano prawie 16 000 genów różnicowych, wśród których jedynie ok. 30% miało zdefiniowaną funkcję [5]. Również za pomocą opracowanej w połowie lat dziewięćdziesiątych techniki SAGE (ang. *Serial Analysis of Gene Expression*) i w roku 2000 metody MPSS (ang. *Massively Parallel Signature Sequencing*), które umożliwiają masowe sekwencjonowanie fragmentów cDNA, generowane są duże zbiory danych [21, 24]. By ta lawina danych mogła zostać uporządkowana potrzebne jest szybkie poszerzenie wiedzy na temat funkcji genów, a także rozwój nowych narzędzi informatycznych do obsługi i analizy wieloparametrowych baz danych [25, 33, 34].

Analiza funkcjonalna genów przez wiele lat była prowadzona zgodnie z zasadami genetyki klasycznej: „od cechy do genu” (ang. *Top-down/Forward*). Rozwój technik biologii molekularnej umożliwił podejście odwrotne: „od mutacji do genu” (ang. *Bottom-up/Reverse*) (tab. 1).

W połowie lat 90. analiza funkcjonalna genów nabrała tempa w związku z opracowaniem w USA techniki TILLING (ang. *Targeting Induced Local Lesions IN Genomes*), opartej na amplifikacji DNA ze starterami genów wybieranych przez badacza, a pozwalającej na masową i szybką identyfikację mutacji [36]. Dodatkowo tempo kumulacji danych na temat funkcji genów wzrasta wskutek rozwoju, opracowanej w Japonii, metody FOX-hunting (ang. *Full-length cDNA Over-Expressing gene hunting system*). Metoda, opatentowana w roku 2001, a udostęp-

TABELA 1. Porównanie metod analizy funkcjonalnej: klasycznej (ang. *TOP-DOWN/FORWARD*) i molekularnej (ang. *BOTTOM-UP/ REVERSE*) [30, zmodyfikowano]

TABLE 1. Comparison of methods of gene functional analysis: Top-down vs. Bottom-up approaches [30, modified]

ANALIZA FUNKCJONALNA	
Klasyczna (ang. <i>Top-down</i> )	Molekularna (ang. <i>Bottom-up</i> )
↓ ↓ Białko Fenotyp ↓ ↓ Mapowanie QTL/asocjatywne Gen/Geny ↓ ↓ Transformacja Wybranymi klonami DNA Mutanty ↓ ↓ Identyfikacja fenotypów Test komplementacji	↑ ↑ Białko fenotyp ↑ ↑ Wytwarzanie i analiza białek Gen/Geny ↑ ↑ Identyfikacja genów Mutanty ↑ ↑ Identyfikacja fenotypów Mutageneza

niona szerszemu gronu badaczy niecałe 3 lata temu umożliwia szybkie wyodrębnianie, rozpoznawanie sekwencji kodującej oraz funkcji genów roślinnych w warunkach ich nadekspresji [17].

Dynamiczny rozwój analizy funkcjonalnej genów skłania do pogładowego przedstawienia koncepcji technik TILLING i FOX-hunting na tle klasycznej metody poszukiwania mutantów oraz fizycznych, chemicznych i molekularnych metod generowania mutacji.

## 2. ANALIZA FUNKCJONALNA GENÓW wg zasad genetyki klasycznej

Analiza funkcjonalna, zgodnie z zasadami genetyki klasycznej zakłada poszukiwanie genu kodującego określone białko/fenotyp. Przykładem takiego podejścia jest klonowanie pozycyjne genu, w którym najpierw poszukuje się markerów genetycznych silnie sprzężonych z cechą. W zależności od charakteru badanej cechy wykorzystywane są metody mapowania jakościowego lub ilościowego (QTL) albo asocjatywnego polegającego na analizie nierównowagi sprzężeń (ang. *LD-Linkage Disequilibrium*). W przypadku genomu roślinnego mapowanie prowadzone jest przy wykorzystaniu populacji segregujących: potomstwa BC<sub>2</sub> lub F<sub>2</sub>, linii podwojonych haploidów (DH), linii rekombinacyjnych (RILs), jak również linii bliskoizogenicznych (NILs), aneuploidów i linii substytucyjnych [15]. Silnie sprzężone markery nanoszone są na mapy fizyczne (kontigów klonów bibliotek genomowych) w celu wyboru klonu

TABELA 2. Lokalizacja genów pszenicy zidentyfikowanych w programach klonowania pozycyjnego [12, zmodyfikowano]

TABLE 2. Wheat genes localized in positional cloning programs [12, modified]

Gen/QTL	Lokalizacja	Cecha	Placówka/ Lider zespołu
<i>Lr1</i>	5DL	Odporność na rdzę liściową	University of Zurich/ B. Keller
<i>Lr10</i>	1AS	" " rdzę liściową	University of Zurich/ B. Keller
<i>Lr21</i>	1DS	" " rdzę liściową	Kansas State University/ B. S. Gill
<i>Qfhs.Ndsu-3bs</i>	3BS	" " fuzariozę kłosa	Kansas State University/ B. S. Gill
<i>Pm3b</i>	1AS	" " mączniaka prawdziwego	University of Zurich/ B. Keller
<i>Yr5</i>	2BL	" " rdzę brunatną	USDA-ARS, Wheat Genetics/ K.G Campbell
<i>Sr2</i>	3BS	" " rdzę żdźbłową	CSIRO Plant Industry, Australia/ ES Lagudah
<i>Tsn1</i>	5BL	Odporność na toksynę, <i>Ptr Tox</i>	North Dakota State University/ J. D. Faris
<i>Bo1</i>	7BL	Odporność na jony boru	University of Adelaide/ P. Langridge
<i>Fr2</i>	5BL	Odporność na mróz	University of California, Davis/ J. Dubcovsky
<i>VRN1</i>	5A	Gen odpowiedzi na wernalizację	University of California, Davis/ J. Dubcovsky
<i>VRN2</i>	5A	Gen odpowiedzi na wernalizację	jw.
<i>VRN-B3</i>	7BS	Gen odpowiedzi na wernalizację	jw.
<i>EPS-1</i>	IAL	Gen determinujący termin kwitnienia	jw.
<i>Q</i>	5AL	Gen regulatorowy warunkujący m.in. wysoką zawartość glutenu	Kansas State University/ B. S. Gill
<i>GPC-B1</i>	6BS	Wysoka zawartość białka w ziarnie	University of California, Davis/ J. Dubcovsky
<i>Ph1</i>	1A/5B	Koniugacja chromosomów homologicznych w trakcie mejozy	John Innes Centre, Colney, Norwich/ G. Moore

zawierającego poszukiwany gen. Po zsekwencjonowaniu wytypowane fragmenty DNA są wykorzystywane do transformacji roślin dzikich; zmiana fenotypu regenerantów potwierdza przewidziane funkcje biologiczne genu. Brak oczekiwanych zmian fenotypowych nie stanowi negacji przyjętych założeń ze względu na częste wyciszanie genów w transformantach [27]. Przykładem takich badań mogą być poszukiwania genu *Pi-ta2* warunkującego odporność ryżu na *Pyricularia grisea* [31]. W genomie pszenicy metodą klonowania pozycyjnego zidentyfikowano kilkanaście genów. Głównie są to geny: odporności na stresy i odpowiedzi na wernalizację, a także gen regulatorowy udomowienia pszenicy z chromosomu 5AL m.in. warunkujący wysoką zawartość glutenu w ziarnie, a także locus warunkujący koniugację chromosomów homologicznych w trakcie mejozy (tab. 2).

Efektywniejszym podejściem do analizy funkcjonalnej jest wytwarzanie, poszukiwanie i analiza mutantów. Mutanty wprowadzono do hodowli, w latach trzydziestych XX w., kiedy to odkryto możliwość indukowania mutacji. Rozwój technik biologii molekularnej pozwolił na wykorzystanie tego podejścia do poszukiwania genów i poznawania ich funkcji bez znajomości fenotypu i/lub produktów białkowych.

### **3. ANALIZA FUNKCJONALNA GENÓW wg zasad genetyki molekularnej**

#### **3.1. Metody uzyskiwania mutantów**

##### **3.1.1. Mutageniza fizyczna**

Mutageniza czynnikami fizycznymi lub chemicznymi jest najczęściej indukowana w nasionach. Fizyczne czynniki mutagenne to przede wszystkim promieniowanie: gamma (źródło: izotopy promieniotwórcze), X (źródła: lampy rentgenowskie, synchrotrony), ultrafioletowe, elektronów o wysokiej i niskiej energii kinetycznej (źródło: akcelatory) [3]. Energia promieniowania powoduje zmiany charakteru wiązań pomiędzy atomami w cząsteczkach polimeru, prowadząc do niszczenia lub powstawania nieistniejących w naturze wiązań kowalencyjnych, co zakłóca prawidłowy metabolizm DNA i w efekcie ostatecznym generuje mutacje. Zjawisko mutagenyzy indukowanej promieniowaniem rentgenowskim zostało po raz pierwszy opisane dla genomu jęczmienia, w okresie międzywojennym. W latach 60. wdrożono kompleksowe programy generowania zmienności w kolekcjach roślin uprawnych; współdziałanie FAO (ang. *Food & Agriculture Organization*) oraz IAEA (ang. *International Atomic Energy Agency*) w zakresie pokojowego wykorzystania energii atomowej zaowocowało w świecie wieloma programami hodowlanymi. Zarejestrowano 2570 mutantów, w tym 1020 mutantów głównych zbóż: ryżu – 439, jęczmienia – 305, pszenicy – 204 i kukurydzy – 71 [26], wytworzonych głównie z wykorzystaniem promieni  $\gamma$  (30%) i w mniejszym stopniu przez promieniowanie rentgenowskie (3%). Dwie trzecie z tych mutantów zostało wygenerowanych w Chinach. Do spektakularnych osiągnięć mutagenyzy fizycznej należy odmiana peruwiańska



jęczmienia dobrze plonująca w Andach powyżej 5 000 m n.p.m. Ewentualnym przyrodniczym jest również odmiana ryżu rosnącego w wodzie o wysokim zasoleniu, uprawiana w Delcie Mekongu w południowym Wietnamie [38]. W Polsce znaczącym osiągnięciem mutagenetyki promieniami  $\gamma$  było uzyskanie form samookończących się bobików [1].

### 3.1 2. Mutageniza chemiczna

Mutageniza chemiczna (najczęściej punktowa) zachodzi pod wpływem zmian konformacyjnych jednej z par zasad w komplementarnych łańcuchach DNA. Związki indukujące zmiany konformacyjne to: i/ analogi zasad, np. 5-bromouracyl lub 2-aminopuryna; ii/ związki hydroksylujące, np. hydroksylamina; iii/ związki alkilujące, np. metanosulfonian etylu (EMS) lub dimetylonitrozoamina; iv/ związki deaminujące, np. kwas azotowy lub siarczyn sodu. Interkalacja cząsteczek związków aroma-

TABELA 3. Realizowane i uruchamiane obecnie projekty analizy funkcjonalnej genów traw w oparciu o mutagenizację chemiczną i system analityczny TILLING [37, zmodyfikowano]  
TABLE 3. Existing and proposed projects of gene functional analysis in grass species based on chemical mutagenesis and TILLING analytical system [37, modified]

Gatunek	Nazwa projektu	Muta-gen	Adres strony internetowej
<b>JĘCZMIEN</b>			
cv. Optic	DIStilling (SCRI)	EMS	<a href="http://germinate.scri.sari.ac.uk/barley/mutants/">http://germinate.scri.sari.ac.uk/barley/mutants/</a>
cv. Barke	GABI-TILL	EMS	<a href="http://www.gabi-till.de/project/ipk/barley.html">www.gabi-till.de/project/ipk/barley.html</a>
cv. Morex	TILLMore	EMS	<a href="http://www.distagenomics.unibo.it/TILLMore/">www.distagenomics.unibo.it/TILLMore/</a>
cv. Lux	Ris @National Labs, KVL Denmark	EMS	<a href="http://www.pgrc.ipk-gatersleben.de/barleynet/organisation_kvl.php">www.pgrc.ipk-gatersleben.de/barleynet/organisation_kvl.php</a>
KUKURY-DZA	Maize TILLING Project, Purdue CropTailor AB	EMS	<a href="http://genome.purdue.edu/maizetilling/">http://genome.purdue.edu/maizetilling/</a>
OWIES RYŻ (ssp. <i>japonica</i> )	RiceTILL (UC Davis) Mishima	EMS lub MNU+NaN <sub>3</sub> MNU	<a href="http://www.croptailor.com/Engelsk/engindex.htm">www.croptailor.com/Engelsk/engindex.htm</a> <a href="http://www.tilling.ucdavis.edu/index.php/Rice_Tilling">www.tilling.ucdavis.edu/index.php/Rice_Tilling</a>
<b>PSZENICA</b>			
<i>T. aestivum</i>	Arcadia Biosciences	EMS	
<i>T. monococcum</i>	Rothamstead Research (RRes)	EMS	<a href="http://www.rothamsted.ac.uk">www.rothamsted.ac.uk</a> <a href="http://www.rothamsted.ac.uk/cpi/optiwheat/indexcontent.html">www.rothamsted.ac.uk/cpi/optiwheat/indexcontent.html</a>
<i>T. durum</i>	OPTIWHEAT	EMS	
SORGO PROSO	USDA, Lubbock, TX Purdue TILLING Project	EMS EMS	<a href="http://genome.purdue.edu/">http://genome.purdue.edu/</a>
RÓZGOWE <i>Brachypodium</i>	Ris @National Labs, KVL Denmark	NaN <sub>3</sub>	<a href="http://www.risoe.dk/rispubl/BIO/biopdf/ris-r-510.pdf">www.risoe.dk/rispubl/BIO/biopdf/ris-r-510.pdf</a>

Wyjaśnienia skrótów: EMS – metanosulfonian metylowy; MNU – N-metylo-N-nitromocznik; NaN<sub>3</sub> – azydek sodu

tycznych, takich jak: proflawina czy bromek etydyny, do helis DNA prowadzi do zaburzeń replikacji, naprawy lub rekombinacji DNA.

Skuteczność otrzymywania mutantów o charakterze dominującym wynosi dla zbóż mniej niż pół promila [18]. Przejrzystą ilustrację jej wykorzystania stanowią prace zespołu Finkelstein, które, na podstawie badań mutantów *A. thaliana* niewrażliwych na kwas abscyzynowy, wyjaśniły wiele aspektów przekazywania sygnałów zależnych od tego hormonu [9]. Istotnym osiągnięciem naszej hodowli było wytworzenie form rzepaku ozimego o podwyższonej zawartości kwasu oleinowego oraz niższej zawartości kwasu linolenowego w oleju nasion w porównaniu z odmianami podwójnie ulepszonymi [32].

Mutageniza chemiczna jest, od przeszło półwiecza, ważną metodą pozyskiwania mutantów, a w ostatnim dziesięcioleciu dzięki wprowadzenia techniki TILLING są uruchamiane nowe, kompleksowe projekty badawcze (tab. 3).

### 3.1.3. Mutageniza insercyjna

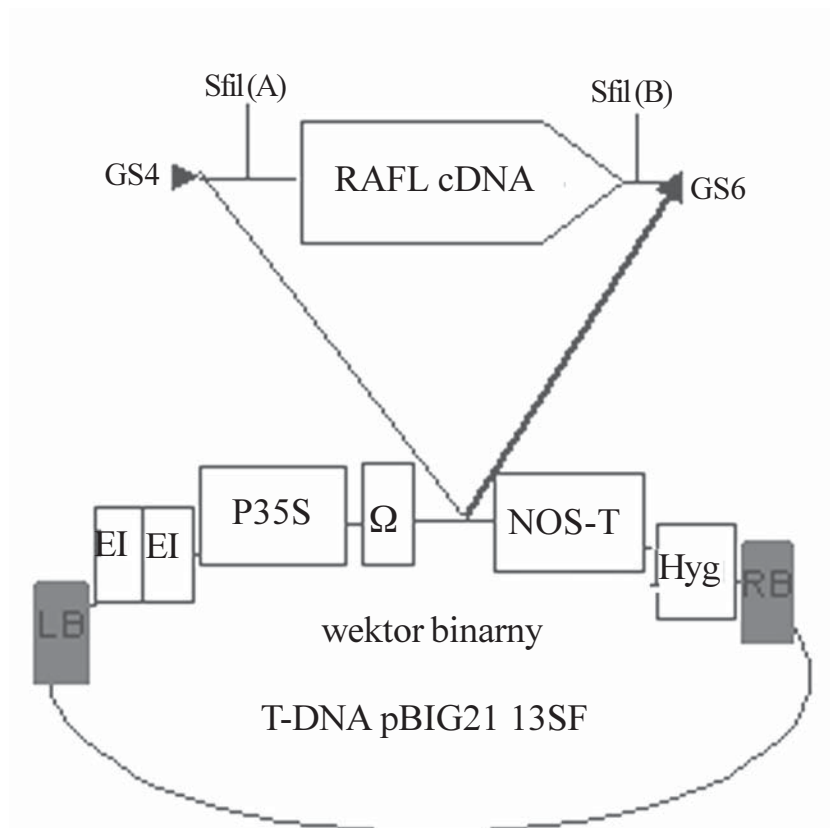
Mutanty insercyjne uzyskuje się metodą transformacji roślin przez naturalnie występujące retrotranspozony i T-DNA [20, 35]. Dominującą formą uzyskiwanych mutantów są mutanty, w których wyciszenie genu (ang. *knock out/loss-of-function*) zachodzi pod wpływem insercji w sekwencję kodującą [40]. Początkowo badano naturalnie występujące mutanty insercyjne kukurydzy, gdyż gatunek ten ma aktywne elementy transpozonowe [23], co po raz pierwszy opisała Barbara McClintok (1948), wyróżniona za to odkrycie Nagrodą Nobla. Sklonowanie transpozonów *Ac* i *Ds* kukurydzy [7] umożliwiło transformacje gatunków, których genomy nie miały aktywnego systemu transpozonowego [2]. Pierwszym genem, znalezionym dzięki transpozonowym mutantom insercyjnym w genomie rośliny użytkowej, był gen odporności na *Cladosporium fulvum*, *Cf-9*, warunkujący odporność na brunatną plamistość liści u pomidora [16]. Taka strategia analizy funkcjonalnej dominowała w laboratoriach świata przez prawie dwie dekady, tak więc nic dziwnego, że liczba wytworzonych w ten sposób mutantów roślinnych wynosi przeszło 290 tysięcy [11]. Czynnikiem limitującym wykorzystanie tych mutantów jest, na przykład, niemożność analizy genów występujących w wielu transkrybowanych kopiach, jak również niemożność badania genów warunkujących stadia wczesnego rozwoju rośliny, gdyż ich wyciszenie prowadzi zazwyczaj do powstania mutantów letalnych. Dodatkowo mutanty te, w przeciwieństwie do mutantów T-DNA, są niestabilne, co wynika bezpośrednio z właściwości transpozonów. Mutanty T-DNA są stabilne; T-DNA jest integrowany z genomem roślinnym przeciętnie jako 1,5 kopii w genomie *Arabidopsis* lub ryżu [8]. W tabeli 4 zestawiono dostępne dla badaczy kolekcje mutantów insercyjnych ryżu.

Zarówno transformacja z użyciem transpozonów, jak i przez T-DNA, prowadzi głównie do powstania mutantów recesywnych. Dlatego też wybór odpowiedniego mutantu do dalszych badań wymaga szeregu krzyżowań i analizy fenotypów licznego potomstwa; w przypadku genu *Cf-9* było to ok. 160 000 mutantów pomidora [16].

Podnoszenie wydajności transformacji przy jednoczesnym upraszczaniu systemów regeneracji i analizy mutantów zaowocowało opracowaniem systemu FOX-hunting.



W systemie tym omijany jest etap kultur *in vitro*, gdyż transformacji przez zamaczanie młodych kwiatostanów w roztworze *Agrobacterium tumefaciens* poddawane są zarodki [4]. Wektory binarne T-DNA wykorzystywane w tych eksperymentach niosą pełnej długości cDNA genów badanego organizmu [14]. Promuje to powstawanie mutantów charakteryzujących się nadekspresją pojedynczych, określonych genów (ang. *gain-of-function*) (ryc. 1).



RYCINA 1. Wektor binarny *pBIG2113SF* wykorzystywany w metodzie FOX-hunting: *LB/RB* – sekwencje graniczne T-DNA; *EI* – wzmacniacze transkrypcji (sekwencje –490 do –90 pz powyżej końca 5' promotora 35S wirusa mozaiki kalafiora CaMV); *P35S* – promotor 35S (sekwencja –90 do –1 pz wirusa CaMV); *W* – 5'-liderowy nieulegający translacji odcinek RNA wirusa mozaiki tytoniu (TMV); *NOS-T* – terminator transkrypcji genu syntazy nopaliny (*nos*) z plazmidu Ti; *Hyg* – gen odporności na higromycynę; *GS4*, *GS6* – startery do reamplifikacji RAFL cDNA z mutantą; *SfiI(A)*, *SfiI(B)* – miejsce restrykcyjne endonukleazy *SfiI*; *RAFL cDNA* (*RIKEN Arabidopsis Full-Length cDNA*) – pełnej długości cDNA z bibliotek cDNA *A. thaliana* skonstruowanych w RIKEN/Japonia

FIGURE 1. The binary vector *pBIG2113SF* used in the FOX-hunting system: *LB/RB* – T-DNA border sequences; *EI* – two tandem repeats of sequence strengthening the transcription (5'-upstream sequence of CaMV 35S promoter –419 to –90 bp); *P35S* – P35S, CaMV 35S promoter –90 to –1 bp; *W* – 5'-upstream sequence of TMV, which increases translation effectiveness of inserted gen; *NOS-T* – polyadenylation signal of nopaline synthase gen from Ti plasmid; *Hyg* – hygromycin resistance gene; *GS4*, *GS6* – sequences of PCR starters to GS4 and GS6 primers used to recover the cDNAs; *SfiI(A)*, *SfiI(B)* – restriction sites for *SfiI* endonuclease; *RAFL cDNA* – RIKEN *Arabidopsis* Full-Length cDNA

Rozwijana w ostatnich latach technologia RNAi jest również potężnym narzędziem analizy funkcjonalnej, jednakże z tego względu, że bazuje na potranskrypcyjnym wyciszaniu genów [27, 29] nie jest przedmiotem obecnego artykułu.

### 3.2. Metody poszukiwania i analizy mutantów

#### 3.2.1. Zarys metody TILLING [36]

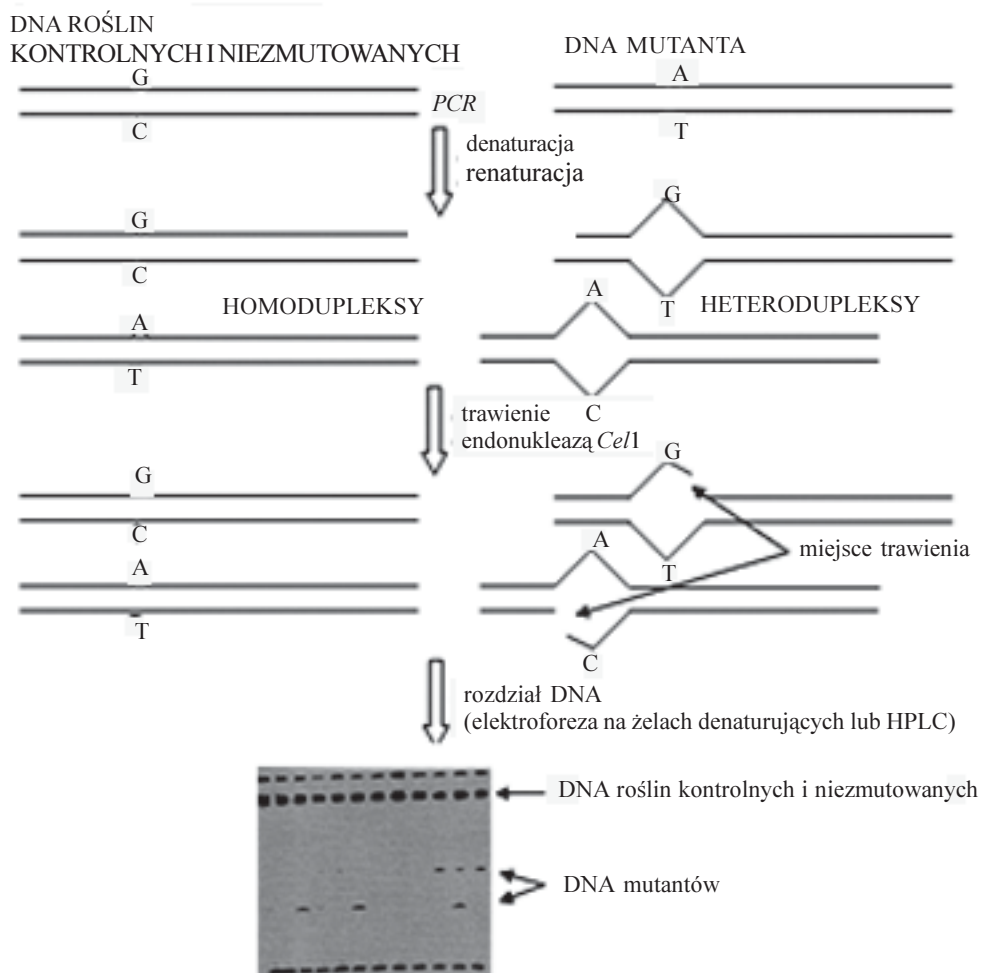
Technika TILLING, to połączenie tradycyjnej mutagenyzy chemicznej z nowoczesną, opartą o analizę PCR, techniką identyfikacji mutantów punktowych, SNP (ang. *Single Nucleotide Polymorphism*). Ważnym i trudnym etapem wstępnym jest samo uzyskanie odpowiednio dużej i wystarczająco wysyczonej populacji mutantów, co zależy zarówno od czynnika chemicznego, jak i od modyfikowanego genomu. Drugim krytycznym krokiem jest przygotowanie DNA matrycowego. Jednakowa ilość DNA z poszczególnych osobników jest kolekcjonowana w 96-dołkowych mikropłytkach. Do pojedynczej reakcji PCR przygotowuje się mieszaniny DNA zbierając do 8 próbek DNA z poszczególnych rzędów dołków, a potem (do 12 próbek) DNA z dołków kolejnych kolumn, tak że materiał z jednej mikropłytki można przeanalizować w 20 (8 + 12), a nie 96 reakcjach. Analizę DNA wielu płytek można dodatkowo usprawniać zbierając DNA z tych samych dołków różnych płytek. W takim układzie analiza DNA 960 osobników (10 płytek × 96 dołków) wymaga jedynie 296 reakcji PCR [(10 × 8) + (10 × 12) + 96 = 296].

W celu identyfikacji mutacji każdy z produktów reakcji PCR jest poddawany denaturacji, a następnie renaturacji, co powoduje powstawanie heterodupleksów z niesparowanymi zasadami w miejscu mutacji. Trawienie tego DNA endonukleazą *Cel1* specyficzną do niedopasowanych zasad umożliwia ich identyfikację po rozdziale elektroforetycznym na żelu sekwencyjnym (ryc. 2).

Klasyczna metoda identyfikacji mutantów SNP polega na namnażaniu, a następnie sekwencjonowaniu wybranych genów oddzielnie dla każdego osobnika badanej populacji. W metodzie TILLING identyfikacja mutantów jest szybsza, gdyż: i/ zamiast kosztownego i czasochłonnego sekwencjonowania wykorzystuje się enzym restrykcyjny trawiący renaturowane produkty PCR w miejscach niedopasowanych nukleotydów i standardową elektroforezę DNA; ii/ reakcja PCR prowadzona jest na skalę masową, na matrycy DNA będącej mieszaniną kilku/kilkunastu próbek. Ponieważ każde DNA występuje w 3 różnych mieszaninach DNA matrycowego, wynik prawidłowo przeprowadzonej analizy dokładnie wskazuje mutant, co pozwala nie tylko na jego bezpośrednie typowanie do wykorzystania w badaniach funkcjonalnych, lecz również, w przypadku roślin, na natychmiastowe i bezwarunkowe włączenie do programów hodowlanych. Obecnie, na świecie, jest realizowanych 17 projektów typu TILLING dotyczących genomów zbóż (tab. 3).

#### 3.2.2. Zarys metody FOX- hunting [14, 17]

Koncepcję tę opracował zespół z RIKKEN (Japonia) i opublikował pod nazwą FOX-hunting. Strategia została opracowana dla *A. thaliana* i jest modyfikacją –



RYCINA 2. Ideogram techniki TILLING: Równa ilość DNA badanych roślin a także DNA rośliny kontrolnej są mieszane i amplifikowane w reakcji PCR ze starterami wybranych genów. Trawienie endonukleazą *CelI* specyficzną do niesparowanych zasad w helisie DNA, a następnie elektroforeza w żelu sekwencyjnym wskazuje zmutowane DNA [10, 13, zmodyfikowano]

FIGURE 2. Ideogram of the TILLING technique. Equal amounts of mutant DNAs as well as the DNA of the wild plant are mixed and amplified in PCR reaction with primers of particular genes. Digestion of that DNA by *CelI* endonuclease, specific to unpaired bases of the double-helix DNA, enables mutant identification after the electrophoresis on sequencing gel [10, 13, modified]

rozwinięciem metody transformacji rzodkiewnika wektorami binarnymi wprowadzanymi do komórek roślinnych przez *A. tumefaciens*.

Istotnymi, dla skuteczności transformacji są sekwencje wzmacniaczy i terminatorów transkrypcji wbudowane pomiędzy sekwencje graniczne T-DNA (ang. *LB/RB left/right border*). Wektory binarne stosowane w systemie FOX zawierają pomiędzy sekwencjami granicznymi: i/ dwa tandemowe powtórzenia wzmacniacza transkrypcji (sekwencji –490 do –90 pz poprzedzającej promotor 35S wirusa mozaiki

TABELA 4. Kolekcje dostępnych mutantów inerscyjnych ryżu [19, zmodyfikowano] – TABLE 4. Rice mutant resources [19, modified]

Ośrodek badawczy	Genotyp	Mutagen	Liczba mutantów		Adres www.	Lider/Adres e-mail
			Całkowita	Skłasyfk.		
POSTECH <i>Korea Pd</i>	Dongjin, Hwayoung	T-DNA ET/AT Tos17	150 000 400 000	84 680	RISD http://an6.postech.ac.kr/pfg	G. An genean@postech.ac.kr
CIRAD-INRAIRD CNRS, Genoplante <i>Francja</i>	Nipponbare	T-DNA, ET Tos17	45 000 100 000	14 137 13 745	http://urgi.versailles.inra.fr/OryzaTagLine	E. Guiderdoni guiderdoni@cirad.fr
IPMB, Academia Sinica; <i>Tajwan</i>	Taimung 67	T-DNA AT	30 000	18 382	TRIM http://trim.sinica.edu.tw	Y.C. Hsing bohling@gate.sinica.edu.tw
Huazhong Agricul- tural University <i>Chiny</i>	Zhonghua 11 Zhonghua 15 Nipponbare	T-DNA ET	113 262 14 197 1 101	16 158	RMD http://rmd.ncpgr.cn	Q. Zhang qifazh@mail.hzau.edu.cn
SIPP <i>Chiny</i>	Zhonghua 11	T-DNA ET	97 500	8 840	http://ship.plantsignal.cn/home.do	F. Fu ship@sibs.ac.cn
Zhejiang University <i>Chiny</i>	Nipponbare Zhonghua 11	T-DNA		1 009	http://www.genomics.zju.edu.cn/rietdna	P. Wu elspwu@nias.affrc.go.jp
NIAS <i>Japonia</i>	Nipponbare	Tos17	500 000	34 844	http://tos.nias.affrc.go.jp	H. Hirochika hirohiko@nias.affrc.go.jp
UC Davis <i>USA</i>	Nipponbare	Ac-Ds GT Spm/dSpm	20 000	Ds 4 735 dSpm 9 469	http://www-plb.ucdavis.edu/Labs/sundar	V. Sundaresan sundar@ucdavis.edu
Gyeongsang National University; <i>Korea Pd</i>	Dongjin Byeo	Ac-Ds GT	30 000	4 820	KRDD http://www.niab.go.kr/RDS	C.-D. Han edhan@nongae.gsnu.ac.kr
Temasek Lifesciences, <i>Singapur</i>	Nipponbare	Ac-Ds GT	20 000	3 500		R. Srinivasan
EU-OSTID <i>Francja</i>	Nipponbare	Ac-Ds ET	25 000	1 380	http://orygenesdb.cirad.fr	E. Guiderdoni guiderdoni@cirad.fr
CSIRO Plant Industry <i>Australia</i>	Nipponbare	Ac-Ds GT/ET	16 000	611	http://www.pi.csiro.au/figrtpub	N.M. Upadhyaya narayana.upadhyaya@csiro.au

TABELA 5. Realizowane i uruchamiane obecnie projekty FOX-hunting w badaniach genomów zbóż  
 TABLE 5. Existing and proposed FOX-hunting projects in studies of cereal genomes

Linie FOX [literatura]	Badany genom	Cel pracy	Lider grupy adres e-mail
<i>A. thaliana</i> [14, 17]	ryż	selekcja i poszukiwanie genów odporności, szczególnie na wysoką temperaturę; l. mutantów: 23 000	Ichikawa Y. youichi@psc.riken.jp
ryż [28]	ryż	wykorzystanie promotora ubikwityny; uzyskanie i analiza fenotypowa mutantów l. mutantów: całkowita – 12 000 z pojedynczą wstawką – 8322	Ichikawa Y youichi@psc.riken.jp
<i>A. thaliana</i> [6]	<i>Bruguiera</i> <i>Gymnorhiza</i>	poszukiwanie genów odporności na stres zasolenia	Tada Y. tadayui@bs.teu.ac.jp
pszenica [39]	pszenica	projekt w fazie wstępnej, uzyskano stabilne mutanty, ale w małej liczbie	Steber C. jzale@utk.edu

kalafiora CaMV); ii/ promotor 35S (sekwencja –90 do –1 pz wirusa CaMV); iii/ sekwencję  $\Omega$  – 5'-liderowy nieulegający translacji odcinek RNA wirusa mozaiki tytoniu (TMV), zwiększający efektywność translacji wprowadzanego genu; iv/ kasetę zawierającą gen, którym chcemy transformować *A. thaliana* w otoczeniu sekwencji starterów (GS4 i GS6) ułatwiających jego identyfikację w mutancie oraz sekwencji rozpoznawanych przez endonukleazę *SfiI*; v/ terminator transkrypcji genu syntazy nopaliny (*nos*) z plazmidu Ti oraz vi/ gen selekcyjny odporności na higromycynę (ryc. 2).

Do konstrukcji biblioteki w wektorze binarnym wykorzystywane są pojedyncze kopie każdego z genów zgromadzonych w bibliotekach cDNA skonstruowanych w wektorach LambdaZAP i Lambda FLC-1-B; unikalność każdego klonu sprawdzana jest przez sekwencjonowanie i odrzucanie powtarzających się klonów. W celu normalizacji biblioteki autorzy techniki wykorzystali cztery geny bakteryjne wywołujące znane zmiany fenotypowe i sterility roślin. Geny te zostały wklonowane w miejscu cięcia przez enzym restrykcyjny *SfiI*. Mieszaninę cDNA genomowego oraz bakteryjnego przygotowano w takim stężeniu, by w mutantach obserwować ekspresję genów bakteryjnych z częstością 1/7500 klonów. Mieszaninę poddano trawieniu enzymem *SfiI*, a następnie ligacji ze zmodyfikowanym wektorem binarnym pBIG2113N. W wektorze tym w miejscu trawienia *XbaI* dołączono adaptory *SfiI*, tak by ligacja wstawki DNA następowała w orientacji „sens”. Bakterie *Echerichia coli* DH10B transformowano mieszaniną ligacyjną przez elektroporację. Z uzyskanej w ten sposób biblioteki plazmidowej wyizolowano plazmidy i transformując nimi *Agrobacterium tumefaciens* przygotowano bibliotekę do projektów FOX.

O ile przygotowanie biblioteki jest kosztowną i czasochłonną częścią eksperymentu, o tyle sama transformacja *A. thaliana* nie wymaga kultur *in vitro*. Biblioteka w *A. tumefaciens*, po namnożeniu, jest rozcieńczana w roztworze 5% sacharozy zawierającym środek powierzchniowo-czynny 0,05% Silwet L-77, w ilości 100–200 ml do transformacji 2–3 roślin. Kwiatostany *A. thaliana* są zanurzane w tym roztworze na 2–3 sekundy, z delikatnym mieszaniem, tak by pokryć je warstwą

zawiesziny *A. tumefaciens*. Po transformacji rośliny trzymane są w kamerze o podwyższonej wilgotności, a następnie pielęgnowane w standardowy sposób. Zebrane nasiona zostają poddane selekcji przez kiełkowanie na agarze zawierającym higromycynę, a po tygodniu żywe siewki są przenoszone do doniczek z ziemią. W ten sposób autorzy techniki uzyskali ponad 15 000 płodnych transformantów FOX, które teoretycznie powinny reprezentować 77% cDNA użytych do konstrukcji biblioteki w *A. tumefaciens*. By stwierdzić skuteczność transformacji przebadano 24 linie FOX. Sprawdzone obecność genu odporności na higromycynę techniką hybrydyzacji Southerna. Wszystkie badane linie były transgeniczne, a średnia liczba zintegrowanych wektorów w genomie pojedynczej linii FOX wynosiła 2,6. Średnia długość wstawek DNA w populacji FOX była około 30% mniejsza niż średnia długość cDNA w bibliotece *A. tumefaciens* i kształtowała się w zakresie od 0,2 do 4,6 kbp, z medianą 1–1,4 kbp. Zaobserwowano nieznaczną liczbę transformantów o wstawkach mniejszych lub większych niż wstawki biblioteki w wektorze binarnym. Liczba transformantów o fenotypie indukowanym przez geny bakteryjne była wyższa od wartości oczekiwanych. Zjawisko to autorzy techniki FOX tłumaczyli różnym tempem wzrostu bakterii z wektorami binarnymi niosącymi pełnej długości cDNA roślinne i bakteryjne w czasie namnażania biblioteki. Na świecie jest obecnie realizowanych i uruchamianych kilka projektów typu FOX-hunting dotyczących genomów zbóż (tab. 5).

Zalety systemu FOX-hunting, to: i/ mały procent kosupresji genów wskutek stosowania pełnej długości klonów cDNA i znormalizowanych bibliotek w wektorach binarnych; ii/ liczebne ograniczanie ekspresji genów metabolizmu podstawowego (ang. *housekeeping genes*) w znormalizowanych bibliotekach; iii/ ułatwienia w analizie fenotypowej wynikające z krótkiego cyklu życiowego *A. thaliana*; iv/ dość łatwa izolacja i sekwencjonowanie genów. Wadą tego systemu jest ograniczenie analizy fenotypowej jedynie do genów wykorzystanych do konstrukcji biblioteki *A. tumefaciens*.

#### 4. PODSUMOWANIE

Techniki TILLING i FOX-hunting pozwalają na przyspieszenie analizy funkcjonalnej genów. Programy je wykorzystujące mogą być również dodatkowym źródłem zróżnicowanego materiału dla hodowli. System TILLING, z tej racji iż został opracowany do badania mutantów indukowanych chemicznie, pozwala na natychmiastowe i bezpośrednie wprowadzanie uzyskanych materiałów do hodowli. System FOX-hunting otwiera głównie perspektywy w analizie funkcjonalnej genów, generując cenne mutanty, w których obserwuje się nadekspresję genów.

#### PODZIĘKOWANIE

Pani dr hab. Annie Goc, z Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu, dziękuję serdecznie za wnikliwą dyskusję i uwagi.



## LITERATURA

- [1] ARSENIUK E, KRZYMUSKI J, MARTYNIAK J, OLEKSIK T. Bobik – odmiany rejestrowane. W: KRZYMUSKI J [red.] Historia hodowli i nasiennictwa na ziemiach polskich w XX wieku. Poznań, IHAR 2003: 323–324.
- [2] ASSAAD F. Generation of *Arabidopsis* transposon lines. *Genome Biol* 2000; **1**, reports018; doi:010.1186/gb-2000-1181-1181-reports1018.
- [3] CHOPRA VL. Mutagenesis: Investigating the process and processing the outcome for crop improvement. *Cur Sci* 2005; **89**: 353–360.
- [4] CLOUGH SJ, BENT AF. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium* – mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 1998; **16**: 735–743.
- [5] DEGENKOLBE T, THI DO P, ZUTHER E, REPSILBER D, WALTHER D, HINCHA DK, KOHL KI. Expression profiling of rice cultivars differing in their tolerance to long-term drought stress. *Plant Mol Biol* 2009; **69**: 133–153.
- [6] EZAWA S, TADA Y. Identification of salt tolerance genes from the mangrove plant *Bruguiera gymnorhiza* using *Agrobacterium* functional screening. *Plant Sci* 2009; **176**: 272–278.
- [7] FEDOROFF N, WESSLER S, SHURE M. Isolation of the transposable maize controlling elements *Ac* and *Ds*. *Cell* 1983; **35**: 235–242.
- [8] FELDMANN KA. T-DNA insertion mutagenesis in *Arabidopsis*: mutational spectrum. *Plant J* 1991; **1**: 71–82.
- [9] FINKELSTEIN R, REEVES W, ARIIZUMI T, STEBER C. Molecular Aspects of Seed Dormancy. *Annu Rev Plant Biol* 2008; **59**: 387–415.
- [10] GAO H, HUANG J, BARANY F, CAO W. Switching base preferences of mismatch cleavage in endonuclease V: an improved method for scanning point mutations. *Nucleic Acids Res* 2007; **35**: e2.
- [11] GUIDERDONI E, AN G, YU SM, HSING YI, and WU C. T-DNA insertion mutants as a resource for rice functional genomics. W: UPADHYAYA N [red.] Rice Functional Genomics: Challenges, Progress and Prospects. New York, Springer. 2007: 181–221.
- [12] GUPTA PK, MIR RR, MOHAN A, KUMAR J. Wheat Genomics: present status and future prospects. *Int J Plant Genomics* 2008; Article ID 896451.
- [13] HENIKOFF S, COMAI L. Single-nucleotide mutations for plant functional genomics. *Annu Rev Plant Biol* 2003; **54**: 375–401.
- [14] ICHIKAWA T, NAKAZAWA M, KAWASHIMA M, IZUMI H, KURODA H, KONDOU Y, TSUHARA Y, SUZUKI K, ISHIKAWA A, SEKI M, FUJITA M, MOTOHASHI R, NAGATA N, TAKAGI T, SHINOZAKI K, MATSUI M. The FOX hunting system: an alternative gain-of-function gene hunting technique. *Plant J* 2006; **45**: 974–985.
- [15] IYER-PASCUZZI AS, SWEENEY MT, SARALA N, McCOUCH S. Natural variation and functional genomics. Utilizing germplasm to identify useful alleles. W: UPADHYAYA N [red.]. Rice Functional Genomics: Challenges, Progress and Prospects. New York, Springer 2007: 116–132.
- [16] JONES DA, THOMAS CM, HAMMOND-KOSACK KE, BALINT-KURTI PJ, JONES JD. Isolation of the tomato *Cf-9* gene for resistance to *Cladosporium fulvum* by transposon tagging. *Science* 1994; **266**: 789–793.
- [17] KONDOU Y, HIGUCHI M, TAKAHASHI S, SAKURAI T, ICHIKAWA T i in. Systematic approaches to using the FOX hunting system to identify useful rice genes. *Plant J* 2009; **57**: 883–894.
- [18] KOOMNEEF M, ALONSO-BLANCO C, PEETERS AJM. Genetic approaches in plant physiology. *New Phytol* 1997; **137**: 1–8.
- [19] KRISHNAN A, GUIDERDONI E, AN G, HSING Y-C, HAN C-D, LEE MC, YU S-M, UPADHYAYA N, RAMACHANDRAN S, ZHANG Q, SUNDARESAN V, HIROCHIKA H, LEUNG H, PEREIRAA. Mutant resources in rice for functional genomics of the grasses. *Plant Physiol* 2009; **149**: 165–170.
- [20] KUMAR A, BENNETZEN JL. Plant retrotransposons. *Annu Rev Genet* 1999; **33**: 479–532.
- [21] LEADER DJ. Transcriptional analysis and functional genomics in wheat. *J Cereal Sci* 2005; **41**: 149–163.
- [22] LEVY S, SUTTON G, NG PC, FEUK L, HALPERN AL, i in/ Celera Genomics/. The diploid genome sequence of an individual human. *PLoS Biology* 2007; **5**: e254. doi:10.1371/journal.pbio.0050254
- [23] MAČKO A. Opracowano kompletny system klasyfikacji ruchomych elementów genetycznych. *Biotechnologia* 2008; <http://www.biotechnologia.pl/biotechnologia/9/960>

- [24] MCINTOSH S, WATSON L, BUNDOCK P, CRAWFORD A, WHITE J, CORDEIRO G, BARBARY D, ROOKE L, HENRY R. SAGE of the developing wheat caryopsis. *Plant Biotechnol J* 2007; **5**: 69–83.
- [25] MUKHERJEE G, ABEYGUNAWARDENAN, PARKINSON H, CONTRINO S, DURNICK S i in. Plant-based microarray data at the european bioinformatics institute. Introducing AtMIAMExpress, a submission tool for *Arabidopsis* gene expression data to ArrayExpress. *Plant Physiol* 2005; **139**: 632–636.
- [26] MUTANT VARIETIES DATABASE 6. 05. 2009 <http://www-mvd.iaea.org/MVD/default.htm>
- [27] NADOLSKA-ORCZYK A. Transgene expression and gene silencing in cereals. *Biotechnologia* 2006; **4**: 168–180.
- [28] NAKAMURA H, HAKATA M, AMANO K, MIYAO A, TOKI N i in. A genome-wide gain-of-function analysis of rice genes using the FOX-hunting system. *Plant Mol Biol* 2007; **65**: 357–371.
- [29] PAPROCKA M, WOŁOSZYŃSKA M. Potranskrypcyjne wyciszenie genów u roślin. *Kosmos* 2004; **53**: 193–200.
- [30] ROSS-IBARRA J, MORRELL PL, GAUT BS. Plant domestication, a unique opportunity to identify the genetic basis of adaptation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; **104**(Suppl. 1): 8641–8648.
- [31] RYBKA K, MIYAMOTO M, ANDO I, SAITO A, KAWASAKI S. High resolution mapping of the indica-derived rice blast resistance genes II. *Pi-ta2* and *Pi-ta* and a consideration of their origin. *Mol Plant Microbe Interact* 1997; **10**: 517–524.
- [32] SPASIBIONEK S. New mutants of winter rapeseed (*Brassica napus* L.) with changes in fatty acid composition. *Plant Breeding* 2006; **125**: 259–267.
- [33] SREENIVASULU N, USADEL B, WINTER A, RADCHUK V, SCHOLZ U, STEIN N, WESCHKE W, STRICKERT M, CLOSE TJ, STITT M, GRANER A, WOBUS U. Barley grain maturation and germination: metabolic pathway and regulatory network commonalities and differences highlighted by new MapMan/PageMan profiling tools. *Plant Physiol* 2008; **146**: 1738–1758.
- [34] SRINIVASAINAGENDRA V, PAGE GP, MEHTA T, COULIBALY I, LORRAINE AE. CressExpress: a tool for large-scale mining of expression data from *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 2008; **147**: 1004–1016.
- [35] SZOPA J, WRÓBEL M. Transfer i regulacja ekspresji genu. *Biotechnologia* 2001; **1**: 63–72.
- [36] TILL BJ, ZERR T, COMAI L, HENIKOFF S. A protocol for TILLING and Ecotilling in plants and animals. *Nat Protocols* 2006; **1**: 2465–2477.
- [37] WEIL CF. TILLING in Grass Species. *Plant Physiol* 2009; **149**: 158–164.
- [38] WILDER M, THANH-PHUONG N. The Status of Aquaculture in the Mekong Delta Region of Vietnam: Sustainable Production and Combined Farming Systems. *Fisheries Sci* 2002; **68**(Suppl. 1): 1–5.
- [39] ZALE J, AGARWAL S, LOAR S, STEBER C. Evidence for stable transformation of wheat by floral dip in *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Rep* 2009; **28**: 903–913.
- [40] ZIEMIENOWICZ A, MERKLE T, SCHOUMACHER F, HOHN B, ROSSI L. Import of *Agrobacterium* T-DNA into plant nuclei: two distinct functions of VirD2 and VirE2 proteins. *Plant Cell* 2001; **13**: 369–384.

Redaktor prowadzący – Maria Olszewska

Otrzymano: 18.05. 2009 r.

Przyjęto: 27.07. 2009 r.

Dr Krystyna Rybka,

Zakład Biochemii i Fizjologii Roślin

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin w Radzikowie

05-870 Błonie

e-mail: k.rybka@ihar.edu.pl