

Wykorzystanie strategii TILLING w hodowli roślin*

Marzena Kurowska, Mirosław Maluszynski, Iwona Szarejko
Katedra Genetyki, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Śląski,
40-032 Katowice, ul. Jagiellońska 28
e-mail: mkurowsk@us.edu.pl

Słowa kluczowe: platformy TILLING, odwrotna genetyka, mutagenеза, nowe allele

Wstęp

Wykorzystanie mutagenów, czyli związków, które zwiększają częstotliwość mutacji ponad poziom zmian spontanicznych, ma długą historię. Pionierskimi pracami z mutagenезы były badania Stadlera [26] nad wykorzystaniem promieniowania do indukowania genetycznej zmienności u roślin, Mullera [16] nad wpływem promieniowania X na *Drosophila melanogaster* i Auerbach [1] nad mutagenicznymi efektami iperytu. Prowadzone od tego czasu badania nad indukowaniem mutacji wykazały, że wiele różnych czynników fizycznych i ogromna ilość czynników chemicznych działają mutagenicznie na wszystkie organizmy żywe, od pro- do eukariontów. Mutagenеза jest ważnym narzędziem wykorzystywanym do ulepszenia gatunków roślin uprawnych i nie jest objęta restrykcjami dotyczącymi genetycznie zmodyfikowanych organizmów (GMO). Duże sukcesy w wykorzystaniu mutagenезы w hodowli nowych odmian roślin uprawnych, przekładają się na olbrzymie korzyści ekonomiczne. W bazie danych IAEA/FAO (<http://mvgs.iaea.org>) jest zarejestrowanych ponad 2700 odmian roślin uprawnych, otrzymanych po traktowaniu mutagenicznym różnych gatunków zbóż, roślin strączkowych, drzew owocowych, roślin przemysłowych, ozdobnych i innych. Najważniejsze ulepszone cechy roślin to: plon, biomasa, odporność na wyleganie, odporności na choroby, odporność na stresse abiotyczne (susza, zasolenie), wcześniejsze dojrzewanie, wcześniejsze kwitnienie, jakość owoców, strąków, ziarna, nasion czy zawartość i skład substancji odżywczych [12].

* Niniejsza praca została wykonana w ramach projektu: „Stworzenie platformy TILLING *Hordeum vulgare* jako trwałego narzędzia genomiki funkcjonalnej i doskonalenia cech użytkowych”, projekt badawczy zamawiany PBZ/MNiSW/2/3/2006/8.

Nowe narzędzia genomiki i bioinformatyki w badaniach roślin uprawnych

Obecnie rośnie lawinowo liczba powszechnie dostępnych informacji dotyczących sekwencji całych genomów, zarówno roślin uprawnych, jak i modelowych. Projekty sekwencjonowania całych genomów rozwijają się bardzo szybko wraz z nowymi technologiami; ma to wymiar ekonomiczny, sekwencjonowanie staje się coraz tańsze i bardziej wydajne. U gatunków dwuliściennych projekty sekwencjonowania całych genomów prowadzono lub nadal prowadzi się dla: *Arabidopsis thaliana* (L.) HEYNH., *Populus trichocarpa* TORR. & A. GRAY ex HOOK., *Arabidopsis lyrata* (L.) O'KANE & AL-SHEHBAZ, *Capsella rubella* REUT., *Brassica rapa* L., *Solanum lycopersicum* L., *Solanum tuberosum* L., *Medicago truncatula* GAERTN., *Lotus japonicus* L., *Mimulus guttatus* DC., *Glycine max* (L.) MERR., *Manihot esculenta* CRANTZ, *Vitis vinifera* L., *Aquilegia formosa* FISCH. ex DC., *Eucalyptus grandis* HILL ex MAIDEN, *Carica papaya* L. i *Ricinus communis* L. Natomiast u gatunków jednoliściennych są to: *Oryza sativa* L. ssp. *japonica*, *Oryza sativa* L. ssp. *indica*, *Zea mays* L., *Sorghum bicolor* (L.) MOENCH, *Brachypodium distachyon* (L.) P.BEAUUV., *Triticum aestivum* L. i *Hordeum vulgare* L. [15]. Wraz ze zwiększającą się zawartością baz danych z sekwencjami DNA, a także liczbą gatunków roślin, dla których te informacje są dostępne, rośnie również liczba narzędzi bioinformatycznych służących do ich analizy. W ostatnich latach opracowano wiele markerów molekularnych wykorzystanych w nowoczesnej hodowli roślin, zwiększyły się również możliwości identyfikacji genów tzw. 'target genes', które mogą być poddane analizie funkcjonalnej z wykorzystaniem transgenicznych metod prowadzących do zmiany w ekspresji genów. Nowoczesnym narzędziem genomiki funkcjonalnej jest jednak – jak się wydaje – strategia TILLING (Targeting Induced Local Lesions in Genomes) [13]. W hodowli roślin metoda ta może być wykorzystana niezależnie od ploidalności i wielkości genomu roślin uprawnych. Do jej zastosowania konieczna jest jednak znajomość sekwencji DNA konkretnego genu, który jest przedmiotem zainteresowania genetyków czy hodowców. Dzięki przeprowadzaniu analizy polimorfizmu DNA w badanym genie już w drugim pokoleniu (M_2) po traktowaniu mutagennym, w stosunkowo krótkim czasie można uzyskać serię nowych alleli genu, a wśród nich allel czy allele warunkujące wystąpienie pożądanej cechy. Strategia TILLING znajduje zastosowania zarówno w analizie funkcji genów, jak i w identyfikacji loci, które są związane z ważnymi agronomicznymi cechami. Hodowla roślin jest nauką wielodyscyplinarną. Dobrym przykładem zastosowania wielu nowoczesnych narzędzi w tzw. 'molekularnej hodowli' jest program realizowany u pszenicy – WGIN (Wheat Genetic Improvement Network), którego celem jest uzyskanie ulepszonych genotypów pszenicy. Został on sfinansowany przez DEFRA (The Department for Environment, Food and Rural Affairs) i BBSRC (Biotechnology and Biological Sciences Research Council) w Wielkiej Brytanii i program Optiwheat Unii Europejskiej [9].

Strategia TILLING i EcoTILLING – metodyka

Strategia TILLING obejmuje trzy etapy: tworzenie populacji TILLING po traktowaniu mutagenicznym, identyfikację mutacji w roślinach pokolenia M_2 , fenotypowanie roślin ze zidentyfikowaną mutacją. Pierwszym etapem strategii TILLING jest wytworzenie populacji otrzymanej po traktowaniu czynnikami mutagenicznymi, a następnie izolacja DNA z osobników pokolenia M_2 . Pokolenie M_1 po traktowaniu mutagenicznym charakteryzuje się chimeralnością, czyli występowaniem w roślinach sektorów o zmienionym składzie genetycznym. Tylko komórki znajdujące się na szlaku generatywnym utworzą następne pokolenie, przekazując mu wyidukowaną zmienność DNA – mutację. Wyizolowany DNA może być przechowywany przez wiele lat, a dzięki utworzeniu banku nasion M_3 , zapewniona jest dostateczna ilość materiału siewnego służącego do weryfikacji zidentyfikowanych z zastosowaniem strategii TILLING mutacji. Do traktowania mutagenicznego można wykorzystać całe spektrum różnych mutagenów, jednak do tej pory w większości badań stosowano czynnik alkilujący – ester etylowy kwasu metanosulfonowego (EMS). Mutagen ten, alkilując nukleotydy DNA, prowadzi do zmian w komplementarności zasad azotowych, co z kolei powoduje powstanie mutacji punktowych po replikacji. EMS indukuje głównie tranzycje G/C do A/T. Strategię TILLING z wykorzystaniem EMS zastosowano już do uzyskania nowych alleli u wielu gatunków roślin [8]. Natomiast zastosowanie innych mutagenów, jak np. N-metylo-N-nitrozomocznika (MNU) u *Oryza sativa* [27], czy kombinacji dwóch mutagenów – azydku sodu (Az) i MNU (Az-MNU) również u *O. sativa* [29] lub samego Az u *Hordeum vulgare* [28] było do tej pory rzadsze. Nie tylko mutageny chemiczne znalazły zastosowanie w tworzeniu populacji TILLING u roślin, ale również mutageny fizyczne takie jak: promieniowanie gamma, prędkie neutrony oraz promieniowanie alfa i beta odpowiednio u *O. sativa*, *Medicago truncatula* i *Triticum aestivum* [7, 22, 23].

W populacji TILLING poszukiwanie mutacji początkowo prowadzi się w pulach otrzymanych po zmieszaniu DNA pochodzącego zwykle z 8 osobników, co usprawnia metodę. Zmiany w DNA, których detekcję umożliwia ta metoda to mutacje punktowe, jak również małe insercje i delecje. Identyfikacja mutacji polega na rozpoznaniu błędnego parowania w heterodupleksach DNA przez endonukleazę np. CEL I, która zapewnia odpowiedni poziom specyficzności, umożliwiając detekcję pojedynczego allelu mutanta w puli alleli bez zmian w sekwencji DNA analizowanego genu. Pierwszym etapem identyfikacji mutacji z użyciem tej techniki, jest amplifikacja analizowanej sekwencji z wykorzystaniem reakcji PCR, do której stosuje się fluorescencyjnie znakowane startery. Heterodupleksy powstają między DNA mutanta i DNA osobnika bez zmian w badanej sekwencji, w procesie podgrzewania i schładzania produktów PCR. Heterodupleksy są następnie poddawane działaniu endonukleazy, która przecina miejsca niedopasowania zasad DNA, a produkty tej reakcji są rozdzielane w czasie elektroforezy poliakrylamidowej z wykorzystaniem np. sekwenatora

Li-COR. Jest to najczęściej stosowany system do identyfikacji mutacji w tej metodzie. Enzymy, które przecinają ssDNA (single stranded DNA) należą do grupy nukleaz S1, pierwszy z nich został wyizolowany z *Vigna radiata* (L.) WILCZEK (fasola złota). Jednak jego efektywność była niewystarczająca do detekcji wszystkich typów mutacji punktowych. Dużym udoskonaleniem tej metody było wyizolowanie endonukleazy nazwanej CEL I otrzymanej z selera liściowego. Charakteryzuje się ona optimum działania w neutralnym pH i przecina niedopasowanie zasad po stronie 3' w obu niciach DNA [19]. CEL I działa bardzo wydajnie i jest powszechnie stosowana w strategii TILLING. Kolejnym etapem jest ocena wpływu zidentyfikowanych mutacji na funkcję białka kodowanego przez analizowany gen. Wyprowadzenie linii homozygotycznych niosących nowe allele oraz ich fenotypowanie, zarówno morfologiczne jak i z wykorzystaniem odpowiednich testów fizjologicznych, kiedy jest to wymagane dla scharakteryzowania mutantu pod względem analizowanej cechy, stanowi ostatni etap w strategii TILLING.

Wpływ zidentyfikowanych mutacji na funkcje białka

Stosując strategię TILLING można zidentyfikować szereg mutacji w analizowanym genie, które mogą mieć całkowicie różny wpływ na funkcję kodowanego białka. Od mutacji cichych (milczących), przez mutacje zmiany sensu (missensowne), po mutacje nonsensowne, czy też mutacje powodujące zmiany w splicingu. Mutacje zmiany sensu powodują zastąpienie pojedynczej zasady prowadząc do odczytania innego kodonu i w rezultacie wbudowanie innego aminokwasu w kodowanym przez gen białku. Degeneracja kodu genetycznego powoduje, że największy wpływ na zmianę kodowanego aminokwasu ma mutacja pierwszej i drugiej zasady kodonu. Zatem mutacje zmiany sensu mogą powodować zarówno zmianę synonimiczną, gdy nowy kodon odpowiada za ten sam aminokwas co kodon niezmutowany, ale również zmiany niesynonimiczne, gdy mutacja zmieni kodon tak, że odpowiada on innemu aminokwasowi. Przy zmianie niesynonimicznej białko kodowane przez gen będzie zawierało jeden zmieniony aminokwas, co często nie ma znaczącego wpływu na jego aktywność biologiczną, ale może mieć również poważny skutek, kiedy zmieniony aminokwas znajduje się np. w centrum aktywnym enzymu. Mutacje nonsensowne to mutacje zmieniające kodon aminokwasowy na kodon terminacyjny, co prowadzi do przedwczesnego zakończenia translacji mRNA i powstania krótszego białka, pozbawionego fragmentu po stronie C-końcowej. Wpływ takiej mutacji na aktywność białka zależy od wielkości fragmentu polipeptydu, który został utracony. Możliwa jest również sytuacja odwrotna, gdy kodon terminacyjny zostanie zamieniony na kodon odpowiadający jakiemuś aminokwasowi, a w rezultacie powstanie dłuższe białko. Z kolei mutacje ciche nie powodują zmiany aminokwasów z powodu degeneracji kodu genetycznego i dotyczą zmian w trzeciej zasadzie kodonu [11]. Wiele mutacji powoduje zmiany sekwencji nukleotydowej, które nie mają żadnego wpływu

na funkcjonowanie genomu. Do takich mutacji cichych należą praktycznie wszystkie zmiany zachodzące w DNA pozagenowym oraz w niekodujących elementach genów. Natomiast mutacje powodujące przesunięcie ramki odczytu są wynikiem insercji lub delecji pojedynczych nukleotydów w genie. Może to w istotny sposób prowadzić do zmiany sekwencji aminokwasów kodowanego białka, gdyż z DNA odczytywany jest inny zestaw kodonów. Ma to miejsce również wtedy, gdy liczba utraconych lub wstawionych nukleotydów nie jest równa trzem lub wielokrotności trzech, co powoduje przesunięcia fazy odczytu. Ma to zwykle duży wpływ na funkcję białka, gdyż ta część polipeptydu ma sekwencję zupełnie inną niż prawidłowa. Do analizy zmian w funkcjonowaniu białka *in silico* można wykorzystać publicznie dostępne serwisy takie jak: PARSESNP (Project Aligned Related Sequences and Evaluate SNPs; <http://www.proweb.org/input/>), czy SAS (Sequences Annotated by Structure; <http://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/sas/>). Natomiast do analizy alternatywnego splicingu można wykorzystać serwis AS (Alternative Splicing Database Project; <http://www.ebi.ac.uk/asd/>).

Istnieje szereg modyfikacji strategii TILLING, a jedną z pierwszych zwaną EcoTILLING, zaproponowali Comai i in. [4]. Polega ona na poszukiwaniu polimorfizmu w naturalnych populacjach roślin, a nie w populacjach otrzymanych po traktowaniu związkami mutagenicznymi. Od pierwszych badań prowadzonych z wykorzystaniem tej metody u *Arabidopsis thaliana*, zastosowano ją u wielu gatunków roślin, w tym również roślin uprawnych.

Sukcesy w hodowli roślin z wykorzystaniem strategii TILLING i EcoTILLING

Od pierwszego zastosowania strategii TILLING u rośliny modelowej *Arabidopsis thaliana* minęło już 10 lat [13]. Niedługo po jej opublikowaniu zastosowano ją u roślin uprawnych do analizy ważnych pod względem biologicznym i agronomicznym genów. Ciągłe jednak wiele badań prowadzonych z wykorzystaniem strategii TILLING koncentruje się na metodach detekcji mutacji, analizie typów mutacji indukowanych przez różne mutageny czy analizie efektywności zastosowanego mutagenu do tworzenia populacji TILLING poprzez obliczanie frekwencji i gęstość mutacji dla konkretnej populacji. Obecnie w coraz większym stopniu badania prowadzone są na genach ważnych dla współczesnej hodowli, a ich celem staje się weryfikacja wpływu identyfikowanych mutacji na zmianę badanej cechy przez fenotypowanie uzyskanych mutantów. Jest wiele przykładów sukcesów wynikających z zastosowania strategii TILLING i EcoTILLING w hodowli roślin. Duża liczba genów związanych z różnymi cechami, które zostały wybrane do badań u wielu gatunków roślin, potwierdza skuteczność zastosowania obu strategii w ulepszaniu odmian gatunków uprawnych.

W roślinach występują dwie formy zapasowe cukrów: skrobia i sacharoza. Skrobia jest polimerem reszt glukozy, składa się z dwóch polisacharydów: nierozgałęzianej amylozy łatwiej rozpuszczalnej w wodzie i rozgałęzianej amylopektyny nierozpuszczalnej w wodzie. Ziarna zbóż i bulwy ziemniaka są szczególnie bogate w skrobię. Skrobia tzw. waxy (woskowa) charakteryzuje się obecnością amylopektyny z niewielką ilością lub brakiem amylozy. Zarówno skrobia bogata, jak i uboga w amylozę u zbóż ma różne zastosowania w produkcji mąk czy kasz. Skrobia bogata w amylozę może wpływać korzystnie na zdrowie, gdyż zwiększa się w niej udział tzw. skrobi odpornej (resistant starch). Nie jest ona trawiona w jelicie cienkim, ale ulega fermentacji w jelicie grubym. Ma to dobroczynny wpływ na zdrowie i chroni przed chorobami takimi jak: rak okrężnicy, cukrzyca typu II, otyłość i osteoporoza [24]. Z kolei u pszenicy skrobia uboga w amylozę ma zastosowanie w produkcji wysokiej jakości makaronu, czy też mrożonek. Jej zastosowanie wydłuża okres przydatności żywności do spożycia, opóźniając jej twardnienie [24]. Uzyskanie pszenicy praktycznie pozbawionej amylozy miałooby duże znaczenie ekonomiczne i stanowiło poważny sukces hodowlany. W celu identyfikacji mutantów o fenotypie waxy, w dwóch populacjach *Triticum aestivum* i *Triticum turgidum* ssp. *durum* otrzymanych po zastosowaniu EMS, wykorzystano strategię TILLING [25]. Badano gen *GBSSI* (granule bound starch synthase I), zwany locus waxy, odpowiedzialny za syntezę amylozy w tkankach magazynujących ziaren. Utrata ekspresji wszystkich kopii tego genu u heksaploidalnej pszenicy prowadzi do produkcji waxy skrobi. W analizowanych obu populacjach zidentyfikowano 250 wyindukowanych alleli tego genu, z czego 94 allele prowadziły do zmian w kodowanym białku, co przewidziano przeprowadzając analizę bioinformatyczną. W badanej populacji *T. aestivum* zidentyfikowano potrójnego homozygotycznego mutantów, który miał indukowane mutacje w dwóch loci waxy i naturalnie występującą delecję w trzecim locus, który prezentował fenotyp zbliżony do fenotypu waxy. Był to bardzo duży sukces hodowlany, zwłaszcza, że przez długi czas nie udało się tego osiągnąć stosując konwencjonalną hodowlę. Gen związany z syntezą amylopektyny *Sgp-1* (starch granule protein 1), nazywany również *SSII* (starch synthase II), który koduje syntezę skrobi II oraz gen *GBSSI* były badane w innej populacji TILLING stworzonej dla odmiany pszenicy ‘Cadenza’ po działaniu EMS [24]. W obu genach udało się zidentyfikować mutacje powodujące utratę funkcji kodowanego białka, dlatego uzyskane mutanty mogą mieć zastosowanie w hodowli.

Ziemniak (*Solanum tuberosum*) tak jak pszenica wytwarza w bulwie dwa rodzaje skrobi: amylopektynową i amylozową. W przemyśle papierniczym, włókienniczym czy przy wytwarzaniu klejów przydatna jest tylko skrobia amylopektynowa. Oddzielanie obu składników jest nieekonomiczne. ‘Amflora’ to genetycznie zmodyfikowana odmiana ziemniaka, której niedawne wprowadzenie na rynek europejski spowodowało wiele kontrowersji. Jej twórcą jest firma BASF, której wprowadzenie na rynek tej odmiany zajęło 13 lat. Ten sam efekt, otrzymano po zastosowaniu strategii

TILLING; zidentyfikowano ziemniaka, który wytwarza wyłącznie skrobię amylopektynową (<http://www.eurekalert.org>). Z kolei Muth i in. [17] w populacji ziemniaka otrzymanej po traktowaniu EMS zidentyfikowali mutację punktową w genie *GBSSI*, warunkującą utratę funkcji tego genu. Mutację tę zidentyfikowano w 5' miejscu donorowym intronu 1. Powoduje ona błąd w splicingu i w rezultacie powstanie krótszego białka. Fenotypowanie potwierdziło, że mutant ten produkuje skrobię amylopektynową i dzięki temu został wykorzystany do wyprowadzenia zaawansowanej linii hodowlanej.

W populacji *T. aestivum* po traktowaniu EMS identyfikowano nowe allele dwóch genów puroindolinowych *Pina* i *Pinb* [6]. Geny te zlokalizowane są w locus *Ha* (*Hardness*), kontrolującym teksturę ziarna. Twardość endospermu odgrywa ważną rolę w charakterystyce jakościowej ziarna pszenicy uprawnej i ma znaczący wpływ na mielenie, wypiek i jakość końcową produktu. Zidentyfikowano 18 nowych alleli, z tego 8 nie powodowało zmian w kodowanym białku. Natomiast 4 allele zostały ocenione pod kątem wpływu na twardość ziarna. Nowe mutacje były odpowiedzialne za 28–94% obserwowanej zmienności w twardości ziarna. Jęczmień (*Hordeum vulgare*) jest ekonomicznie ważnym zbożem, a poprawienie plonu i jakości ziarna wymaga lepszego zrozumieniem genetycznych uwarunkowań komercyjnie ważnych cech. Jedną z nich jest twardość ziarna. Gen warunkujący tę cechę u jęczmienia to *Hin-a* (hordoinoline-a). Po przebadaniu populacji TILLING otrzymanej po zastosowaniu EMS zidentyfikowano 4 mutacje, z czego 3 zmiany sensu [2].

Dojrzewanie owocu i jego mięknięcie to podstawowe cechy, które mają wpływ na wartość odżywczą owocu melona (*Cucumis melo*) oraz łatwość jego dystrybucji. Etylen indukuje dojrzewanie owocu, dlatego do analiz wybrano gen *CmACO1* (*ACC oxidase 1*), kodujący enzym biorący udział w biosyntezie etylenu. Wydłużenie czasu przechowywania owocu ma dużą wartość ekonomiczną. Po przebadaniu 4023 roślin M_2 populacji TILLING, otrzymanych po działaniu mutagenu EMS, zidentyfikowano 7 mutacji. Jedna mutacja, zamiana glicyny na asparaginian (G194D) w wysoce konserwowanej domenie, doprowadziła do znacznego opóźnienia dojrzewania i żółknięcia, a więc wydłużenia czasu przechowywania owocu [5]. Sorgo (*Sorghum bicolor*) jest piątym co do ważności zbożem na świecie, wykorzystywanym zarówno jako pożywienie człowieka, jak i pasza dla zwierząt. Zmniejszenie zawartości ligniny wpływa na wzrost przyswajalności pożywienia. Do analiz z wykorzystaniem strategii TILLING wybrano gen *COMT* (coffeic acid 0-methyltransferase), kodujący 0-metylotransferazę kwasu kawowego. W populacji M_2 zidentyfikowano dwie mutacje w tym genie. Analiza histochemiczna tych linii potwierdziła zmniejszoną zawartość ligniny, co może wpłynąć na wzrost przyswajalności ziarna [33]. Owies (*Avena sativa*) jest szóstym, pod względem upraw, najważniejszym zbożem na świecie. Obecnie używany jest głównie jako pasza dla zwierząt. Jednak jego szczególne właściwości sprawiają, że jest on również wykorzystywany jako pożywienie człowieka. Wzrost popytu na nowe produkty powstałe z owsa stawia przed hodowcami

Tabela 1. Wykorzystanie strategii TILLING do identyfikacji mutacji genów ważnych dla współczesnej hodowli roślin

Cecha	Gatunek rośliny	Gen	Mutagen	Liczba roślin M ₂	Liczba mutacji	Literatura
Jakość skrobi	<i>Triticum aestivum</i>	GBSS 1	EMS	1152	196	[25]
	<i>Triticum turgidum</i>	GBSS 1	EMS	768	50	[25]
	<i>Triticum aestivum</i>	GBSS 1, Sgp-1	EMS	4244	13	[24]
	<i>Solanum tuberosum</i>	GBSS 1	EMS	864	19	[17]
Twardość ziarna	<i>Triticum aestivum</i>	<i>Pina</i> , <i>Pinb</i>	EMS	630	18	[6]
	<i>Hordeum vulgare</i>	<i>Hin-a</i>	EMS	460	84	[2]
Jakość owocu, długość przechowywania	<i>Cucumis melo</i>	<i>CmACO1</i>	EMS	4023	7	[5]
Przyswajalność paszy, zmniejszenie zawartości ligniny	<i>Sorghum bicolor</i>	COMT	EMS	768	2	[33]
Przyswajalność, zmniejszenie zawartości ligniny, wzrost zawartości β-glukanu	<i>Avena sativa</i>	<i>AsPAL1</i> , <i>AsCslF6</i>	EMS	259	16	[3]
Odporność na smugowatość ziemniaka (PVY) i wzerkowatą plamistość tytoniu (TEV)	<i>Solanum lycopersicum</i>	<i>eIF4E</i>	EMS	4759	7	[20]

duże wyzwanie związane z wyprowadzeniem nowych odmian o ulepszonych cechach, takich jak: wzrost zawartości β -glukanu i kwasów tłuszczowych omega-3, modyfikacja skrobi i wzrost zawartości białka w ziarnach. β -glukany wpływają na wzrost przyswajalności pożywienia i obniżają poziom cholesterolu we krwi, a także zmniejszają indeks glikemiczny trawionego pożywienia, mają właściwości chroniące przed rakiem okrężnicy. Strategia TILLING została wykorzystana do identyfikacji mutacji w genach: *AsPAL1* (phenylalanine ammonia-lyase) i *AsCslF6* (cellulose synthase-like) w populacji owsa otrzymanej po traktowaniu mutagenicznym. Są to geny kluczowe odpowiednio w biosyntezie ligniny i β -glukanu. Zidentyfikowano łącznie 8 mutacji powodujących zmiany w kodowanym białku (tab. 1), mogą one zostać wykorzystane w programach hodowlanych tego gatunku [3].

Obecnie dostępnych jest wiele serwisów komercyjnych (tab. 2), w których można zamówić TILLING konkretnego genu wybranego gatunku roślin. Jest to wygodna alternatywa dla hodowców i może się przyczynić do większego wykorzystania tej strategii w ulepszaniu odmian uprawnych. Przy korzystaniu z serwisu nie jest konieczne tworzenie nowej populacji TILLING, co wymaga nakładów, a w naszym klimacie co najmniej dwóch lat, gdyż analizy DNA przeprowadza się w pokoleniu M_2 po traktowaniu mutagenicznym. Dodatkowo przy tworzeniu populacji TILLING konieczna jest umiejętność przeprowadzenia poprawnego traktowania mutagenicznego tak, aby obserwowana częstotliwość mutacji była wystarczająco wysoka, a wielkość populacji wystarczająco duża do zidentyfikowania poszukiwanych mutacji we wszystkich potencjalnie możliwych do analizy genach. Sprzęt potrzebny do analizy może się również okazać zbyt drogi dla poszczególnych ośrodków hodowlanych. Wprowadzenie nowej technologii do laboratorium jest związane niewątpliwie z wysiłkiem na różnych poziomach organizacji, dlatego wykorzystanie już istniejących populacji TILLING w ramach współpracy między ośrodkami lub komercyjnie działających serwisów wydaje się bardzo wskazane, aby owocnie wykorzystać już istniejące materiały.

Strategię EcoTILLING wykorzystuje się w hodowli roślin głównie do poszukiwania nowych alleli w genach odporności na choroby czy herbicydy, ale także i w innych genach ważnych z agronomicznego punktu widzenia (tab. 3). Gatunki roślin uprawnych, z powodu intensywnej selekcji prowadzonej przez człowieka, charakteryzują się na ogół ograniczoną zmiennością genetyczną. Natomiast populacje dzikich form roślin uprawnych mogą być wykorzystane do poszukiwania naturalnej zmienności z zastosowaniem strategii EcoTILLING. W dalszej perspektywie, odkryta zmienność może zostać użyta do udoskonalania nowych odmian. Do tej pory wiele ważnych genów (EcoTILLed geny) badano w naturalnych populacjach u różnych gatunków roślin z wykorzystaniem tej metody. Gen *FAEI* (fatty acid elongase 1), który jest zaangażowany w kontrolę syntezy kwasu erukowego był przedmiotem EcoTILLING u gatunków *Brassica*. Olej z niską zawartością kwasu erukowego jest zalecany w diecie. Zidentyfikowano 3 mutacje w genie *FAEI* u *B. napus*, które są

Tabela 2. Komercyjne serwisy TILLING roślin

Gatunek	Ośrodek	Kraj	Link
<i>Medicago truncatula</i> , <i>Lotus japonicas</i> , <i>Brassica rapa</i>	RevGenUK John Innes Center	Wielka Brytania	http://revgenuk.jic.ac.uk/about.htm
<i>Pisum sativum</i> , <i>Solanum lycopersicum</i>	UTILLdb INRA	Francja	http://urgv.evry.inra.fr/UTILLdb
<i>Oryza sativa</i> , <i>Solanum lycopersicum</i> , <i>Arabidopsis thaliana</i>	University of California Davis Genome Center	USA	http://tilling.ucdavis.edu/index.php/Main_Page
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Seattle TILLING Project	USA	http://tilling.fhcr.org/
<i>Zea mays</i>	Purdue University	USA	http://genome.purdue.edu/maizetilling/
<i>Glycine max</i>	Southern Illinois University	USA	http://www.soybeanfilling.org/index.jsp
<i>Avena sativa</i>	NordGen CropTailor AB	Szwecja	http://www.nordgen.org , http://www.croptailor.com
<i>Arabidopsis thaliana</i> , <i>Brassica oleracea</i> , <i>Brassica napus</i>	CAN-TILL University of British Columbia	Kanada	http://www.botany.ubc.ca/can-til/
<i>Hordeum vulgare</i>	TILLMore University of Bologna	Włochy	http://www.distagenomics.unibo.it/TILLMore/

Tabela 3. Wykorzystanie strategii EcoTILLING dla genów ważnych dla współczesnej hodowli roślin

Cecha	Gatunek rośliny	Gen	Liczba zidentyfikowanych nowych alleli	Literatura
Jakość oleju, zawartość kwasu erukowego w nasionach	<i>Brassica rapa</i> <i>Brassica oleracea</i> <i>Brassica napus</i>	<i>FAE1</i>	3	[32]
Alergenność białka zapasowego	<i>Arachis duranensis</i>	<i>ara d 2.01</i>	1	[21]
Twardość ziarna	<i>Triticum aestivum</i>	<i>Pina-D1, P1nb-D1</i>	1 (<i>P1nb-D1</i>)	[31]
Odporność na herbicyd sulfonilomocznik	<i>Monochoria vaginalis</i>	<i>ALS</i>	2 znane wcześniej	[30]
Odporność na smugowatość ziemniaka (PTV)	<i>Capsicium annuum</i>	<i>eIF4E i eIF(iso)4E</i>	5	[10]
Odporność na wirusa nekrotycznej plamistości liści (MNSV)	<i>Cucumis sp.</i>	<i>eIF4E</i>	1	[18]
Odporność na mączniaka zbożowego	<i>Hordeum vulgare</i>	<i>milo i Mla</i>	11 (<i>milo</i>) znane wcześniej	[14]

związane z różną zawartością kwasu erukowego w nasionach i mogą zostać wykorzystane w hodowli tego gatunku [32]. Innym badanym genem był *ara d 2.01* u *Arachis duranensis*, ortolog genu *ara h 2.01*, kodujący białko zapasowe, które jest silnym alergenem dla człowieka. Celem badań była identyfikacja naturalnych, hypoalergiczných izoform w populacji dzikiego krewnego orzeszka ziemnego tak, aby móc je wykorzystać w immunologicznych i terapeutycznych badaniach, a także w hodowli tego gatunku. Zidentyfikowano 5 różnych cichych mutacji, z których żadna nie powodowała znaczących zmian w strukturze białka. Jednak jedna z nich powodowała redukcję (56–99%) możliwości wiązania przeciwciał IgE, co może wpływać na skuteczność immunoterapii [21]. Alleliczne warianty dwóch genów: *Pina-D1* i *Pinb-D1*, warunkują twardość ziarna u *Triticum aestivum*. Jest to cecha, która warunkuje końcowe właściwości mąki. Identyfikowano nowy allel *Pinb* w chińskiej kolekcji pszenicy, który może być wykorzystany w programach hodowlanych [31]. Inną ważną cechą roślin uprawnych jest odporność na herbicydy. Gen kodujący syntetazę acetylolaktazy (*ALS*, acetolactate synthase) inhibuje działanie kilku rodzajów herbicydów, które są wykorzystywane jako środki chwastobójcze w uprawie wielu gatunków roślin. Strategię EcoTILLING wykorzystano do detekcji mutacji w tym genie u odpornego na sulfonilomocznik (herbicyd) chwastu ryżu – *Monochoria vaginalis* (BURM. F.) C. PRESL ex KUNTH (*Pontederiaceae*). Badania te pomogły wyjaśnić przyczyny odporności tego chwastu na stosowany herbicyd. Identyfikowano dwie mutacje w genie *ALS* u tego gatunku. Te typy mutacji scharakteryzowano już we wcześniejszych badaniach i prowadziły one do odporności na sulfonilomocznik również wielu innych chwastów [30].

Poszukiwanie nowych alleli genów warunkujących odporność na wirusy w naturalnych populacjach roślin jest innym, bardzo ważnym aspektem hodowli. Jest wiele przykładów sukcesów, które udało się osiągnąć w tej dziedzinie dzięki wykorzystaniu strategii EcoTILLING. Czynniki inicjujące translację: 4E i 4G warunkują odporność na kilka roślinnych wirusów RNA w naturalnych populacjach [18]. Ibiza i in. [10] badali geny kodujące czynniki inicjujące translację: *eIF4E* i *eIF(iso)4E* u papryki (*Capsicum annuum*). Możliwość wykorzystania w hodowli roślin nowo zidentyfikowanych alleli genów była sprawdzona przez testy badające odporność roślin na smugowatość ziemniaka (PTY, *Potato virus Y*). Zidentyfikowano 5 nowych alleli genu *eIF4E* warunkujących odporność na PTV u papryki. Ten sam gen – *eIF4E* był badany u gatunków *Cucumis*, a warunkuje on odporność na wirus nekrotycznej plamistości liści (MNSV, *Melon necrotic spot virus*) [18]. Zidentyfikowano jeden nowy allel u *Cucumis zeyheri*, dzikiego krewnego melona, który może warunkować odporność na MNSV. Kolejny raz ten sam gen – *eIF4E* był badany u pomidora (*Solanum lycopersicum*), ale tym razem z wykorzystaniem strategii TILLING, w populacji otrzymanej po działaniu EMS. Zidentyfikowano mutację, która prowadziła do zmian w splicingu. Drugi i trzeci egzon tego genu został wycięty z transkryptu, co doprowadziło do powstania krótszego mRNA. Ta linia mutanta nie wykazała żadnych

defektów we wroście, ale była odporna na wirus smugowatości ziemniaka (PTY) i wirus pstrości papryki (PMV, *Pepper mottle virus*), natomiast wrażliwa na wirus wżerkowej plamistości tytoniu (TEV, *Tobacco etch virus*). Zidentyfikowany nowy allel może stanowić źródło genetycznej zmienności dla odporności na niektóre wirusy roślinne i zostać wykorzystany w programach hodowlanych pomidora [20]. EcoTILLING został także wykorzystany do identyfikacji alleli genów warunkujących odporność na mączniaka zbożowego – *mlo* i *Mla* u *H. vulgare* [14]. Dzięki ich identyfikacji możliwe będzie wykorzystanie tej zmienności do uzyskania bardziej odpornych na mączniaka odmian. Przedstawione powyżej przykłady potwierdzają możliwość wykorzystania strategii TILLING (tab. 1) i EcoTILLING (tab. 3) jako narzędzi odwrotnej genetyki w doskonaleniu roślin uprawnych.

Podsumowanie – wady i zalety strategii TILLING

TILLING, podobnie jak inne strategie badawcze, ma swoje zalety i wady. Niewątpliwą zaletą jest możliwość generowania i identyfikacji nowych alleli genów w stosunkowo krótkim czasie i w małych populacjach. Mutanty uzyskane z zastosowaniem tej metody są stabilne genetycznie. Jest to metoda nietransgeniczna, a więc w pełni akceptowana społecznie. Z kolei EcoTILLING może być użyty do identyfikacji pożądaných alleli, naturalnie występujących w populacjach, które następnie mogą być wykorzystane w programach hodowlanych. Ograniczenia strategii TILLING związane są głównie z kosztem analizy, choć – gdy korzysta się z samodzielnie wyizolowanego enzymu CEL I – ulegają one znacznemu ograniczeniu. Samodzielne tworzenie populacji TILLING jest jednak przedsięwzięciem czasowo- i kosztochłonnym. Wyprowadzenie populacji TILLING roślin, które rozmnażają się wegetatywnie i z długim okresem rozwoju, może być trudne. TILLING genu, który ma paralogi w tym samym genomie, jest bardziej skomplikowany, gdyż konieczne jest zaprojektowanie specyficznych starterów, które będą amplifikować tylko jeden określony gen. Dotychczas prowadzone badania nad wieloma genami zaangażowanymi w różne aspekty rozwoju roślin z wykorzystaniem strategii TILLING i EcoTILLING, dowodzą skuteczności wykorzystania tych narzędzi w udoskonalaniu gatunków roślin uprawnych. W przyszłości wymiar ekonomiczny tych badań może być bardzo duży.

Literatura

- [1] Auerbach C.L., Robson J.M., Carr J.G. 1947. The chemical production of mutations. *Science* 105: 243–247.
- [2] Caldwell D.G., McCallum N., Shaw P., Muehlbauer G.J., Marshall D.F., Waugh R. 2004. A structured mutant population for forward and reverse genetics in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant J.* 40: 143–150.
- [3] Chawade A., Sikora P., Bräutigam M., Larsson M., Vivekanand V., Nakash M.A., Chen T., Olsson O. 2010. Development and characterization of an oat TILLING-population and identification of mutations in lignin and β -glucan biosynthesis genes. *Plant Biol.* 10: 86. doi: 10.1186/1471-2229-10-86.

- [4] Comai L., Young K., Till B.J., Reynolds S.H., Grene E.A., Codomo C.A., Enns L.C., Johnson J.E., Burtner C., Henikoff J.C., Henikoff S. 2004. Efficient discovery of DNA polymorphism in natural populations by EcoTILLING. *Plant J.* 37: 778–786.
- [5] Dahmani-Mardas F., Troade C., Boualem A., Leveque S., Alsadon A.A., Aldoss A.A., Dogimont C., Bendahmane A. 2010. Engineering melon plants with improved fruit shelf life using the TILLING approach. *PLoS ONE*. 5(12): e15776. doi: 10.1371.
- [6] Feiz L., Martin J.M., Giroux M.J. 2009. Creation and functional analysis of new Puroindoline alleles in *Triticum aestivum*. *Theor. Appl. Genet.* 77: 289–311.
- [7] Fitzgerald T.L., Kazan K., Li Z., Morell M.K., Manners J.M. 2010. A high-throughput method for the detection of homoologous gene deletions in hexaploid wheat. *BMC Plant Biol.* 10: 264. doi: 10.1186/1471-2229-10-264.
- [8] Gottwald S., Bauer P., Komatsuda T., Lundqvist U., Stein N. 2009. TILLING in the two-rowed barley cultivar ‘Barke’ reveals preferred sites of functional diversity in the gene *HvHox1*. *BMC Res. Not.* 2: 258. doi: 10.1186/1756-0500-2-258.
- [9] Gupta P.K., Mir R.R., Mohan A., Kumar J. 2008. Wheat genomics: present status and future prospects. *Inter. J. Plant Genomics* 896451. doi: 10.1155/2008/896451.
- [10] Ibiz V.P., Canizares J., Nuez F. 2010. EcoTILLING in *Capsicum* species: searching for new virus resistances. *BMC Genomics* 11: 631. doi: 10.1186/1471-2164-11-631.
- [11] Maluszynski M., Szarejko I., Maluszynska J. 2003. Mutation techniques. W: Crop improvement. Elsevier Ltd: 186–201.
- [12] Maluszynski M., Szarejko I., Bhatia C.R., Nichterlein K., Lagoda P.J.L. 2009. Mutation techniques. W: Methodologies for generating variability. Guimares E., Ceccarelli S., Weltzien E., Rajendran P.G. (red.) Plant Breeding Book, FAO, Rome: 159–194.
- [13] McCallum C.M., Comai L., Greene E.A., Henikoff S. 2000. Targeting induced local lesions in genomes (TILLING) for plant functional genomics. *Plant Physiol.* 123: 439–442.
- [14] Mejlhede N., Kyjovska Z., Backes G., Burhenne K., Rasmussen S., Jahoor A. 2006. EcoTILLING for the identification of allelic variation within the powdery mildew resistance genes *mlo* and *Mla* of barley. *Plant Breeding* 125: 461–467.
- [15] Mochida K., Shinozaki K. 2010. Genomics and bioinformatics resources for crop improvement. *Plant Cell Physiol.* 51(4): 497–523.
- [16] Muller H.J. 1927. Artificial transmutation of the gene. *Science* 66: 84–87.
- [17] Muth J., Hartje S., Twyman R.M., Hofferbert H.R., Tacke E., Prüfer D. 2008. Precision breeding for novel starch variants in potato. *Plant Biotech. J.* 6: 576–584.
- [18] Nieto C., Piron F., Dalmais M., Marco C.F., Moriones E., Gómez-Guillamón M.L., Truniger V., Gómez P., Garcia-Mas J., Aranda M.A., Bendahmane A. 2007. EcoTILLING for the identification of allelic variants of melon eIF4E, a factor that controls virus susceptibility. *BMC Plant Biol.* 7: 34. doi: 10.1186/1471-2229-7-34.
- [19] Oleykowski C.A., Mullins C.R.B., Godwin A.K., Yeung A.T. 1998. Mutation detection using a novel plant endonuclease. *Nucleic Acids Res.* 26: 4597–4602.
- [20] Piron F., Nicolai M., Minoia S., Piednoir E., Moretti A., Salgues A., Zamir D., Caranta C., Bendahmane A. 2010. An induced mutation in tomato eIF4E leads to immunity to two potyviruses. *PLoS One* 5(6): e11313. doi: 10.1371/journal.pone.0011313.
- [21] Ramos M.L., Huntley J.J., Maleki S.J., Ozias-Akins P. 2009. Identification and characterization of a hypoallergenic ortholog of Ara h 2.01. *Plant Mol. Biol.* 69: 325–335.
- [22] Rogers C., Weng J., Chen R., Oldroyd G. 2009. Deletion-based reverse genetics in *Medicago truncatula*. *Plant Physiol.* 151: 1077–1086.
- [23] Sato Y., Shirotsava K., Takahashi Y., Nishimura M., Nishio T. 2006. Mutant selection from progeny of gamma-ray-irradiated rice by DNA heteroduplex cleavage using *Brassica* petiole extract. *Breeding Science* 56: 179–183.
- [24] Sestili F., Botticella E., Bedo Z., Philips A., Lafiandra D. 2010. Production of novel allelic variation for genes involved in starch biosynthesis through mutagenesis. *Mol. Breeding* 25: 145–154.
- [25] Slade A.J., Fuerstenberg S.I., Loeffler D., Steine M.N., Facciotti D. 2005. A reverse genetic, nontransgenic approach to wheat crop improvement by TILLING. *Nature Biotech.* 23(1): 75–81.
- [26] Stadler L.J. 1928. Mutations in barley induced by X-rays and radium. *Science* 68: 186–187.
- [27] Suzuki T., Eiguchi M., Kumamaru T., Satoh H., Matsusaka H., Moriguchi K., Nagato Y., Kurata N. 2008. MNU-induced mutant pools and high performance TILLING enable finding of any gene mutation in rice. *Mol. Genet. Genomics* 279(3): 213–223.

- [28] Talame V., Bovina R., Sanguineti M.C., Tuberosa R., Lundqvist U., Salvi S. 2008. TILLMore, a resource for the discovery of chemically induced mutants in barley. *Plant Biotechnol. J.* 6: 477–485.
- [29] Till B., Cooper J., Tai T.H., Colowit P., Greene E.A., Henikoff S., Comai L. 2007. Discovery of chemically induced mutations in rice by TILLING. *BMC Plant Biol.* 7: 19. doi: 10.1186/1471-2229-7-19.
- [30] Wang G.X., Tan M.K., Rakshit S., Saitoh H., Terauchi R., Imaizumi T., Ohsako T., Tominaga T. 2007. Discovery of single-nucleotide mutations in acetolactate synthase genes by EcoTilling. *Pest. Biochem. Physiol.* 88: 143–148.
- [31] Wang J., Sun J., Liu D., Yang W., Wang D., Tong Y., Zhang A. 2008. Analysis of *Pina* and *Pinb* alleles in the micro-core collections of Chinese wheat germplasm by EcoTilling and identification of a novel *Pinb* allele. *J. Cereal Science* 48: 836–842.
- [32] Wang N., Shi L., Tian F., Ning H., Wu X., Long Y., Meng J. 2010. Assessment of *FAEI* polymorphisms in three *Brassica* species using EcoTILLING and their association with differences in seed erucic acid contents. *BMC Plant Biol.* 10: 137. doi: 10.1186/1471-2229-10-137.
- [33] Xin Z., Wang M.L., Barkley N.A., Burow G., Franks C., Pederson G., Burke J. 2008. Applying genotyping (TILLING) and phenotyping analyses to elucidate gene function in a chemically induced sorghum mutant population. *BMC Plant Biol.* 8: 103. doi: 10.1186/1471-2229-8-103.

TILLING strategy in plant breeding

Key words: TILLING platforms, mutagenesis, reverse genetic, new alleles

Summary

TILLING (**T**argeting **I**nduced **L**ocal **L**esions **i**n **G**enomes) is a reverse genetics strategy that combines the high density of point mutations provided by conventional mutagenesis with rapid screening of targeted genes. The identified mutations can be used in breeding for creating improved cultivars. EcoTILLING, modification of the TILLING strategy, allows discovery of nucleotide polymorphism in natural population of plants. New virus resistant alleles are valuable application of this strategy. Till now, many important genes were screened for mutations in natural and mutagenized populations of different plant species to discover new alleles providing material for modern breeding of crop plants.