

## MUTANTY W BADANIACH FUNKCJI GENÓW U ROŚLIN

### PLANT MUTANTS IN THE GENE FUNCTION STUDIES

Karol Seweryn KUCZERSKI, Kamila NAWROCKA, Anita WIŚNIEWSKA

Katedra Fizjologii Roślin, Wydział Rolnictwa i Biologii,  
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

*Streszczenie:* Otrzymanie mutantów stanowi punkt wyjścia do analizy funkcjonalnej wybranych genów. Klasyczne metody generowania różnych typów mutacji genowych bądź chromosomowych oparte są na stosowaniu czynników fizycznych lub chemicznych. Metodą pozwalającą na identyfikację w kolekcji mutantów rośliny z mutacją w wybranym genie jest TILLING. Szczególne znaczenie w badaniach nad roślinami mają obecnie mutanty insercyjne T-DNA, otrzymywane metodą transformacji genetycznej z wykorzystaniem bakterii *Agrobacterium tumefaciens*. W zależności od rodzaju insertu oraz miejsca jego integracji do genomu, możliwe jest zahamowanie, obniżenie bądź wzmocnienie poziomu ekspresji genu. Mutagenezę przeprowadzać można również poprzez wprowadzenie do genomu rośliny konstrukcji genetycznej zawierającej sekwencję transpozonu. Transpozony mogą wpływać na regulację transkrypcji pobliskich genów, inaktywację genów, a także powodować ich delecje. Największe ograniczenie wymienionych wyżej metod mutagenetyzacji stanowi losowość miejsca mutacji bądź insercji w obrębie genomu. Z tego powodu coraz większą popularnością cieszą się techniki edycji genomu polegające na ukierunkowanej mutagenecie z użyciem programowanych nukleaz. Zastosowanie miejscowo specyficznych endonukleaz pozwala na wprowadzenie określonych zmian w wybranym miejscu w genomie. Stosowane dotychczas nukleazy to meganukleazy, nukleazy z domeną palca cynkowego, białka TALEN oraz system CRISPR-Cas. Miejscowo specyficzne nukleazy rozpoznają i przecinają wybrane sekwencje DNA. Pęknięcia podwójnej helisy są następnie łączone przez wewnątrzkomórkowe systemy naprawcze. Szczególnie obiecującymi narzędziami edycji genomów wydają się białka TALEN oraz technika CRISPR-Cas. W odróżnieniu od meganukleaz, białka TALEN mają zdolność do identyfikacji krótkich fragmentów DNA. Natomiast w systemie CRISPR-Cas rozpoznawanie sekwencji DNA umożliwia komplementarny fragment RNA połączony z białkiem Cas, które odpowiada za cięcie podwójnej nici DNA. Niniejsza praca stanowi przegląd najnowszych danych literaturowych na temat stosowanych obecnie metod otrzymywania kolekcji mutantów w kontekście ich zastosowania do badań funkcji genów.

*Słowa kluczowe:* mutageniza, mutant insercyjny, edycja genomów, miejscowo specyficzne nukleazy

*Summary:* Mutants are the key element of functional gene analysis. Classical methods of generating different types of gene or chromosomal mutations are based on the use of physical or chemical factors. TILLING is a method that allows to identify plant with a mutation in the selected gene in the mutant collection. Currently, T-DNA insertional mutagenesis is of particular importance in plant studies. T-DNA mutants can be obtained by genetic transformation via *Agrobacterium tumefaciens*. Depending on the type of the insert and the insertion site in the genome, modifications such as knock-out, knock-down or knock-on a gene can be triggered. Genetic mutagenesis can also be carried out by transformation with a DNA construct containing a transposon sequence. Transposons can affect the transcription regulation of nearby genes, gene inactivation or even gene deletion. All methods of mutagenesis mentioned above are limited because mutation sites are located randomly within the genome. That is why gene editing techniques based on site-directed mutagenesis using programmable nucleases became more and more commonly applied. Site-specific endonucleases enable particular modifications at the site selected by the experimenter. The following nucleases are used: meganucleases, zinc finger nucleases, TALE nucleases and CRISPR-Cas system. Site-specific nucleases recognise and cut DNA sequences. Double-strand DNA breaks are re-joined by intracellular repair mechanisms. In particular, TALE nucleases and CRISPR-Cas systems appear as promising tools for genome editing. Unlike meganucleases, TALEN identify and break short DNA fragments. On the other hand CRISPR-Cas recognize specific DNA fragments via complementary RNA sequence linked to the Cas protein, which breaks double-strand DNA. This paper is an overview of the latest literature data on currently used methods for obtaining collections of mutants and their application to functional analysis of genes.

*Keywords:* mutagenesis, insertion mutant, gene editing, site-specific nucleases

## WSTĘP

Jednymi z najczęściej wykorzystywanych mutantów rzodkiewnika pospolitego (*Arabidopsis thaliana*) są mutanty uzyskane poprzez insercję T-DNA. Od blisko dwóch dekad genotypy uzyskane w ten sposób pełnią istotną rolę zarówno w badaniach podstawowych jak i aplikacyjnych. Ich dogłębna analiza na poziomie molekularnym umożliwia zrozumienie wielu ważnych z biochemicznego oraz fizjologicznego punktu widzenia procesów. Pomimo zgromadzenia licznych genotypów w kolekcjach mutantów insercyjnych zaledwie 12% genów *A. thaliana* poddanych zostało analizie funkcjonalnej [57]. Insercję T-DNA potwierdzono dla 81,5% zadnotowanych genów, natomiast 11% z nich reprezentowanych jest przez pojedynczy allel [52]. Rozwój technik sekwencjonowania nowej generacji NGS (ang. *Next-Generation Sequencing*) pozwala obecnie na uzyskiwanie coraz liczniejszych i lepiej scharakteryzowanych populacji mutantów roślin.

Dotychczas w celu oceny skuteczności uszkodzenia struktury genu poprzez insercję T-DNA poddano analizie ponad 755 genów z użyciem 1084 mutantów insercyjnych T-DNA [77]. Obecnie intensywnie rozwijane są nowe metody ukierunkowanej mutagenazy roślin takie jak CRISPR/Cas-9 oraz TALENs. Jednakże badania prowadzone w zakresie biologii molekularnej oraz innych pokrewnych nauk nadal wymagają dostępności mutantów *knock-out* (zawierających nieaktywny allel) lub

w przypadku mutacji letalnych (powodujących śmierć osobnika) mutantów *knock-down* (o obniżonym poziomie syntezy produktu zmutowanego genu) uzyskiwanych metodą mutagenyzy insercyjnej, w tym z zastosowaniem T-DNA [35].

## METODY MUTAGENEZY ROŚLIN I DETEKCJI MUTACJI

### MUTAGENEZA FIZYCZNA

Mutagenezie fizycznej najczęściej poddawane jest DNA w komórkach nasion. Do czynników fizycznych stosowanych w mutagenezie zalicza się: promieniowanie jonizujące w postaci promieni X i  $\gamma$  oraz cząstki  $\alpha$  i  $\beta$ , protony, neutrony, wzbudzone jony, promieniowanie UV oraz ciepło [50].

Promieniowanie jonizujące w postaci promieni X,  $\gamma$  oraz wzbudzonych jonów wpływa bezpośrednio na strukturę DNA lub pośrednio prowadząc do radiolizy wody, w wyniku której powstają wysoce reaktywne molekuly jak rodnik hydroksylowy (OH<sup>\*</sup>) oraz wolne elektrony (e<sup>-</sup>) oddziałujące z łańcuchem polinukleotydowym. Promieniowanie podczerwone (IR) generuje pęknięcia podwójnej helisy DNA, prowadząc do jej fragmentacji. Jonizacja powoduje powstawanie nietypowych pochodnych zasad azotowych w postaci 8-oksyguaniny i glikolu tyminy oraz delecje pojedynczych nukleotydów [45].

Neutrony prędkie powodują powstawanie delecji. W roku 2002 opracowano metodę Deleteagene, w której z zastosowaniem strumienia prędkich neutronów z powodzeniem otrzymano mutanty *knock-out A. thaliana*. W metodzie tej kolekcje roślin, które wyrosły z nasion poddanych działaniu czynnika mutagennego przeszukuje się w celu identyfikacji miejsca mutacji w określonym genie. Mutacje typu delecji identyfikuje się stosując technikę PCR z wykorzystaniem starterów oskrzydlających badany gen. Długości delecji wynoszą od kilku do ponad 30 tysięcy pz [41].

Promieniowanie gamma najczęściej powoduje powstawanie delecji, w większości poniżej 20 pz [48] oraz pęknięcia dwuniciowych cząsteczek DNA, które zazwyczaj naprawiane są poprzez NHEJ (ang. *Non-Homologous End Joining*), jeden z systemów naprawy dwuniciowych pęknięć DNA poprzez łączenie końców niehomologicznych. W NHEJ biorą udział: kompleks ligazy DNA IV, w skład której wchodzi katalityczna podjednostka oraz jej kofaktor XRCC4, DNA-zależna kinaza białkowa i heterodimeryczne białko Ku (Ku70/Ku80). Dwuniciowe pęknięcie rozpoznawane jest przez białko Ku, które następnie kieruje katalityczną podjednostką zależnej od DNA kinazy białkowej do miejsca uszkodzenia i tworzy z nią aktywny kompleks. Kompleks ten aktywuje białko XRCC4, które oddziałuje z ligazą DNA IV, naprowadzając to białko naprawcze w miejsce dwuniciowego pęknięcia [45].

Promieniowanie UV indukuje najczęściej dimeryzację sąsiadujących ze sobą zasad pirymidynowych powodując powstanie dimeru cyklobutyłowego oraz fo-

toproduktu 6-4, w którym atomy węgla C4 oraz C6 w sąsiadujących ze sobą pirymidynach tworzą wiązania kowalencyjne [26].

Ciepło powoduje hydrolizę wiązania  $\beta$ -N-glikozydowego. Obserwuje się ją częściej w przypadku puryn niż pirymidyn i powoduje ona powstawanie miejsca pozbawionego zasady określane jako AP (apurynowe/apirymidynowe). Pozostający fosforan cukru jest niestabilny i ulega szybkiej degradacji, tworząc w przypadku dwuniciowego DNA lukę. Miejsca AP są z natury niestabilne i mogą powodować powstawanie pęknięć nici DNA w reakcji  $\beta$ -eliminacji, w której rozerwaniu ulega wiązanie fosfodiesterowe [5].

### MUTAGENEZA CHEMICZNA

Czynniki alkilujące w postaci metanosulfonianu etylowego (EMS) oraz metyloвого (MMS) są najczęściej stosowanymi związkami chemicznymi w mutagenezie roślin. Powodują one przyłączanie grup alkilowych do nukleotydów w cząsteczkach DNA. Efekt alkilacji zależy od pozycji, w której nukleotyd ulega modyfikacji oraz od rodzaju dodanej grupy alkilowej. Metylacja prowadzi często do powstania zmodyfikowanych nukleotydów: N<sup>7</sup>-metyloguaniny, O<sup>6</sup>-metyloguaniny oraz N<sup>3</sup>-metyloadeniny o odmiennych właściwościach tworzenia wiązań komplementarnych, co powoduje mutacje punktowe [45]. EMS powoduje alkilację guaniny efektem czego jest błędne parowanie tyminy z O<sup>6</sup>-etyloguaniną. Prowadzi to do tranzycji cytozyny na tyminę oraz guaniny na adeninę. Potwierdzili to Shirasawa i in. w roku 2016 [65] dokonując analizy mutacji powstałych w wyniku mutagennego działania EMS na rośliny pomidora *Solanum lycopersicum* L. odmiany Micro-Tom. Na podstawie odczytów sekwencjonowania NGS metodą Illumina spośród zidentyfikowanych 5920 mutacji ponad 90% stanowiły wyżej wymienione tranzycje.

Związki interkalujące zazwyczaj związane są z delecjami. Bromek etydyny oraz inne czynniki interkalujące jak np. hydrochlorek 9-aminoakrydyny (9AA) ze względu na swoją płaską budowę wsuwają się pomiędzy pary zasad w podwójnej helisie indukując delecje oraz addycje podczas replikacji [67].

W mutagenezie roślin stosuje się również azydek sodu (NaN<sub>3</sub>). Efekt mutageny NaN<sub>3</sub> w dużej mierze zależy od poziomu pH roztworu w jakim się znajduje. Powoduje on najczęściej mutacje typu tranzycji [25].

### MUTAGENEZA INSERCYJNA T-DNA

W naturalnych warunkach obserwuje się transformację roślin z udziałem gramujemnej wolnożyjącej bakterii glebowej *Agrobacterium tumefaciens*. Genom tej bakterii o długości 5,67 miliona pz, oprócz typowego dla prokariotów genomu kolistego, posiada również nieobserwowane u innych bakterii dwa kliste megaplazmidy: pTiC58 oraz pAtC58. Mniejszy z nich pTiC58, oznaczany symbolem Ti

(ang. *Tumor-inducing*) jest czynnikiem powodującym transformację zainfekowanej rośliny [37, 54]. Proces koniugacji oraz amplifikacji plazmidu Ti regulowany jest przez system *TraI/TraR quorum-sensing* (QS) [38].

Wyjątkowe znaczenie *A. thumefaciens* zarówno w badaniach podstawowych jak i aplikacyjnych spowodowało, że genom tej bakterii został zsekwencjonowany [81]. *A. thumefaciens* jest patogenem wielu gatunków roślin dwuliściennych. W wyniku infekcji fragment plazmidu Ti określane jako T-DNA (ang. *transferred DNA*) ulega trwałej integracji z jądrowym DNA komórki roślinnej. Transfer T-DNA odbywa się poprzez system sekrecji typu IV (T4SS) [37]. W obrębie T-DNA zidentyfikowano trzy grupy genów: odpowiedzialne za biosyntezę opin i hormonów roślinnych (auksyn i cytokinin) oraz za sekrecję opin – pochodnych aminokwasu argininy, które stanowią źródło węgla i azotu nieodzownych dla życia bakterii. Synteza tych związków zaburza bilans hormonów w komórce roślinnej i prowadzi do utworzenia rakotwórczych narośli w miejscu zakażenia [23].

Fragment T-DNA odgraniczony jest od pozostałej części plazmidu dwoma 25 nukleotydomi wysoce homologicznymi sekwencjami granicznymi – lewą LB i prawą RB (ang. *Left, Right Border*). Funkcje ich wiążą się z procesem wycinania T-DNA. Geny znajdujące się w rejonie T-DNA nie odgrywają żadnej roli w procesie zarówno wycinania jak i przenoszenia DNA, możliwe jest więc umieszczenie w ich miejsce innych sekwencji DNA, co stanowi podstawę do przeprowadzenia dowolnych modyfikacji genetycznych [39]. Plazmid Ti z *A. thumefaciens* poza obszarem T-DNA posiada również rejon wirulencji (*vir*) zawierający geny bezpośrednio zaangażowane w proces transformacji. Położone są one w obrębie ośmiu operonów: *virA*, *virB*, *virC*, *virD*, *virE*, *virF*, *virG* oraz *virH* [70].

Naturalna zdolność bakterii *A. thumefaciens* do transformacji komórek roślinnych posłużyła do opracowania pierwszej metody genetycznej transformacji roślin. Komórka bakteryjna, wraz z decydującym o transformacji plazmidem Ti wykorzystywana jest jako wektor przenoszący wybrany fragment obcego DNA. Fragment ten wbudowywany jest najpierw do segmentu T-DNA. Szczep *A. thumefaciens* ze zrekombinowanym pTi wykorzystuje się następnie do zakażenia podatnej rośliny lub kultury tkankowej. Zmodyfikowany T-DNA jest transportowany z komórki bakteryjnej do jądra komórki roślinnej, gdzie ulega integracji z genomem. Tak przeniesione geny ulegają replikacji i ekspresji w komórkach gospodarza [53]. Na podstawie wyników badań z ostatnich lat dowiedziono, że integracja T-DNA do genomu gospodarza zachodzi nawet, gdy białka kluczowe dla procesu NHEJ są inaktywowane poprzez mutację *knock-out* [23]. Insercja T-DNA może zajść w każdym miejscu w obrębie genu. Mutacja typu *knock-out* prowadzi do przerwania ciągłości genu. Insercja typu *knock-down* w rejonie promotora lub 3'UTR genu hamuje jego ekspresję. Natomiast integracja T-DNA, zawierającego silny promotor 35S z wirusa mozaiki kalafiora CaMV (ang. *Cauliflower Mosaic Virus*) w rejonie promotorowym danego genu wzmacnia poziom jego ekspresji (ang. *knock-on*) [35].

## MUTAGENEZA Z ZASTOSOWANIEM TRANSPOZONÓW

Transpozony (elementy transpozycyjne; ang. *Transposable Elements*), inaczej „skaczące geny”, to ruchome elementy genetyczne mogące przemieszczać się z jednego miejsca do drugiego w obrębie genomu. Transpozycję zalicza się do rekombinacji nieuprawnionej, gdyż nie wymaga homologii między sekwencjami. Gen, w którym doszło do insercji transpozonu zwykle ulega inaktywacji, natomiast geny znajdujące się między dwiema kopiami transpozonu mogą ulec delecji po uruchomieniu transpozycji [55]. Większość genomów organizmów eukariotycznych składa się w przeważającej części z niekodujących sekwencji DNA. Do elementów tych zalicza się introny, sekwencje międzygenowe oraz elementy repetytywne, w tym wysokokopijne elementy transpozycyjne. Rekombinacja jest naturalnym procesem zachodzącym w obrębie genów, lecz rzadko obserwuje się ją w transpozonach [20].

Przyjmując jako kryterium podziału mechanizm transpozycji elementy transpozycyjne dzieli się na transpozony klasy I, II oraz helitrony. Transpozony klasy I określane jako retrotranspozony dokonują transpozycji za pośrednictwem RNA. Dzieli się je na retrotranspozony LTR (ang. *Long Terminal Repeats*) posiadające na końcach powtórzenia sekwencji o długości od kilkuset do kilku tysięcy pz oraz retrotranspozony, które nie posiadają na swych końcach powtórzeń (*non-LTR*). Transpozony klasy I dodatkowo można podzielić na 5 rzędów, składających się z licznych rodzin i podrodzin, w zależności od struktury i funkcjonalności. Klasę II stanowią transpozony DNA dokonujące transpozycji na zasadzie „tnij i włączaj”. Do przebiegu transpozycji niezbędne są transpozazy, rozpoznające krótkie, odwrócone powtórzenia sekwencji nukleotydowych na końcach TE (ang. *Terminal Inverted Repeat*, TIR). Do transpozonów klasy II należą autonomiczne i nieautonomiczne elementy transpozycyjne oraz MITEs (ang. *Miniature Inverted-repeat Transposable Elements*). Helitrony licznie występujące w genomach roślin dokonują transpozycji za pomocą mechanizmu „*rolling circle*”, w którym transpozaza dokonuje cięcia w obrębie sekwencji transpozonu, które następnie hybrydyzuje z DNA ulegającym inwazji tworząc heterodupleks. W efekcie w wyniku replikacji DNA helitron ulega powieleniu [79, 43].

Retrotranspozon *ONSEN* z *A. thaliana* charakteryzuje się jednym z najbardziej skomplikowanych mechanizmów transpozycji, wpływającym na regulację transkrypcji pobliskich genów. Jego aktywacja następuje w momencie zadziałania stresu ciepła oraz wymaga obecności miejsc wiązania w DNA dla białek szoku cieplnego [4].

Retrotranspozon *Tnt1* zidentyfikowany po raz pierwszy w genomie tytoniu (*Nicotiana tabacum* L.) działa jako mutagen zarówno w gospodarzu jak i w genomach innych gatunków roślin. *Tnt1* z powodzeniem został wykorzystany w genomice funkcjonalnej sałaty (*Lactuca sativa*) [46], ziemniaka (*Solanum tuberosum*) [19] oraz

soi (*Glycine max*) [12]. *Tnt1* posłużył również do uzyskania ponad 12 000 linii mutantów lucerny (*Medicago truncatula*) reprezentowanych przez 300 000 insercji [7].

Insercje TE w obrębie sekwencji promotorowych oraz wzmacniających powodują obniżenie poziomu ekspresji genów. Insercja retrotranspozonu w rejonie promotora genu kodującego czynnik transkrypcyjny MYB spowodowała utratę pigmentacji niektórych odmian winorośli (*Vitis vinifera*) [33]. Jeden z alleli genu *teosinte branched1 (tb1)*, pożądany w procesie udomowienia kukurydzy, powstał w wyniku insercji transpozonu *Hopscotch* w obrębie sekwencji regulatorowej tego genu [69].

### UKIERUNKOWANA MUTAGENEZA Z UŻYCIEM PROGRAMOWANYCH NUKLEAZ

Pęknięcia DNA w komórkach eukariotycznych, w tym u roślin, naprawiane są poprzez rekombinację homologiczną lub łączenie nici w procesie niehomologicznej naprawy rekombinacyjnej (*NHEJ*). Modyfikacji w genomach z użyciem programowanych nukleaz dokonuje się poprzez generowanie dwuniciowych pęknięć w helisie DNA (ang. *Double-Strand Breaks*, DSBs) przez te enzymy w miejscu wybranym przez badacza [49, 47].

Miejscowo specyficzne nukleazy (ang. *Site-Specific Nucleases*, SSNs) to białka należące do grupy endonukleaz, które umożliwiają wprowadzenie konkretnej zmiany w sekwencji nukleotydowej DNA w określonym miejscu w genomie. Rozpoznają one i tną dwuniciowe cząsteczki DNA o ściśle określonej sekwencji. Poznane do tej pory techniki mutagenezy roślin z udziałem SSNs opierają się na generowaniu pęknięć nici DNA oraz jej odbudowy przez jeden ze szlaków naprawczych. U eukariotów, w tym u roślin, dominuje szlak naprawy pęknięć nici DNA poprzez NHEJ [63].

Zmiany w genomach roślin dokonuje się stosując meganukleazy, nukleazy z domeną palca cynkowego (ang. *Zinc-Finger Nucleases*, ZFNs), białka TALEN (ang. *TALE Nucleases*) oraz system CRISPR-Cas9 (ang. *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats-CRISPR-associated*) [47].

Meganukleazy, zwane również samonaprowadzającymi endonukleazami (ang. *homing endonucleases*) rozpoznają sekwencje w DNA liczące od 14 do 40 par zasad [68]. Odkryto je po raz pierwszy u prokariotów i niższych eukariotów [31]. Biorąc pod uwagę strukturę oraz sekwencje aminokwasową meganukleazy dzieli się na 6 rodzin: LAGLIDADG, GIY-YIG, HNH, His-Cys Box, PD-(D/E)xK oraz EDxHD [2]. Długość rozpoznawanej sekwencji jest zarówno zaletą, gdyż warunkuje dużą swoistość, jak również największym ograniczeniem, ponieważ rozpoznawane sekwencje występują bardzo rzadko w genomach roślin. Enzym *I-CreI* pochodzący z zielenicy *Chlamydomonas reinhardtii* posłużył badaczom do inaktywacji genu *MS26*, a w efekcie do uzyskania kukurydzy z cechą męskiej sterylności [17]. Zasto-

sowanie meganukleazy COT-5/6 pozwoliło na wprowadzenie do genomu bawełny genów *hppd* oraz *epsps* warunkujących odporność na herbicydy, odpowiednio glifosat oraz tembotrion [16].

ZFNs to białka fuzyjne łączące domeny wiążące DNA z motywem palca cynkowego z nieswoiście działającą domeną nukleazową enzymu restrykcyjnego *FokI*, aktywną wyłącznie jako dimer. Do powstania pęknięć w cząsteczce DNA niezbędna jest para ZFNs, w której każda z domen wiążących DNA rozpoznaje sekwencję o długości 9-18 par zasad. Każdy z palców cynkowych odpowiada za rozpoznanie trzech sąsiadujących nukleotydów. Palce cynkowe wykazują pełną funkcjonalność wyłącznie jako monomery, co umożliwia łączenie kilku z nich w zależności od sekwencji nukleotydowej [6]. Nukleazy z motywem palca cynkowego z powodzeniem zastosowano w edycji genomów roślin. Po raz pierwszy technikę tę wykorzystano u *A. thaliana* [11]. W kolejnych latach za pomocą ZFNs inaktywowano geny u innych gatunków roślin, w tym u soi [13], kukurydzy [66] oraz tytoniu [74].

Białka TALEN wykazują podobieństwo do ZFNs, z tą różnicą, że domeny z motywem palca cynkowego zastąpiono domenami wiążącymi DNA pochodzącymi z białek bakterii z rodzaju *Xanthomonas*. U bakterii białka TALE (ang. *Transcription Activator-Like Effectors*) odpowiadają za regulację transkrypcji. W skład domeny odpowiedzialnej za wiązanie DNA białka TALE wchodzi od kilkunastu do kilkudziesięciu powtórzeń sekwencji od 33 do 35 aminokwasów. Pojedyncze nukleotydy w DNA rozpoznawane są przez każdy z segmentów [30]. W ostatnich latach mutagenezę z zastosowaniem nukleaz TALE wykorzystano u gatunków roślin poliploidalnych. Z powodzeniem uzyskano mutanty tetraploidalnego ziemniaka, u którego inaktywowano cztery kopie genu kodującego wakuolarną inwertazę odpowiedzialną za hydrolizę wiązania fruktofuranozydowego sacharozy. Bulwy otrzymanych mutantów charakteryzowały się dłuższą trwałością w trakcie przechowywania w warunkach obniżonej temperatury [9]. Kolejnym przykładem jest pozyskanie mutantów heksploidalnej pszenicy, u której znokautowano sześć alleli genu *Mlo*, odpowiedzialnego za podatność na mączniaka prawdziwego. Pozwoliło to wygenerować mutanty odporne na tego patogena [76].

Obecnie najwięcej uwagi w ukierunkowanej mutagenzie roślin poświęca się systemowi CRISPR-Cas (ang. *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats-CRISPR-associated*), w którym główną rolę odgrywa nukleaza Cas9. W odróżnieniu od nukleaz z motywem palca cynkowego oraz TALE za swoistość rozpoznawania sekwencji DNA zamiast, domeny białkowej odpowiada krótka komplementarna cząsteczka RNA. CRISPR-Cas to naturalny system oporności nabytej archeonów i bakterii chroniący je przed obcymi elementami genetycznym [80]. W zależności od mechanizmu działania i organizacji systemu CRISPR-Cas podzielono na dwie klasy oraz sześć typów [34]. W działaniu systemu CRISPR-Cas jako mechanizmu oporności mikroorganizmów wyróżnia się etapy adaptacji, ekspresji i interferencji. W trakcie adaptacji *protospacer*, czyli

krótki fragment pochodzący z wirusowego lub plazmidowego DNA, włączany jest do *locus* CRISPR. Za wybór sekwencji włączanej do *locus* CRISPR odpowiada 2-6 nukleotydowy motyw PAM (ang. *Protospacer Adjacent Motif*). Po adaptacji następuje ekspresja, w wyniku której powstaje długi pierwotny transkrypt, obejmujący wszystkie sekwencje powtórzone i wszystkie sekwencje rozdzielające, który podlega obróbce do dojrzałych CRISPR RNA (crRNA), częściowo komplementarnych do sekwencji obcych elementów genetycznych. Ostatni etap procesu to interferencja, która prowadzi do degradacji egzogenego materiału genetycznego. W wyniku połączenia crRNA z białkami Cas powstają kompleksy zdolne do rozpoznawania swoistych sekwencji nukleotydowych (zarówno w obszarze kodującym jak i poza nim) i hydrolizy wiązań 3',5'-fosfodiesterowych w ich obrębie. System CRISPR-Cas9 stosowany do modyfikacji genomowego DNA różni się od systemu naturalnego brakiem etapu adaptacji [78, 28]. System CRISPR-Cas9 z powodzeniem wykorzystano do modyfikacji genomów *A. thaliana* [29], ryżu [86], tytoniu [21], a także do uzyskania linii pomidora o wysokiej wartości przechowalniczej [85].

### **STRATEGIA IDENTYFIKACJI INDUKOWANYCH LOKALNYCH USZKODZEŃ W GENOMACH – TILLING**

Do klasycznych metod mutagenazy zaliczamy traktowanie komórek, tkanek lub całych organizmów mutagenami chemicznymi lub fizycznymi i uzyskiwanie kolekcji mutantów. Wybór form roślin o nowych korzystnych cechach odbywał się na zasadzie oceny fenotypu. Dopiero odkrycie metody TILLING (ang. *Targeted Induced Local Lesions in Genomics*) pozwoliło na przeszukiwanie kolekcji pod kątem obecności mutacji punktowych w konkretnym genie. Analizę przeprowadza się na DNA uzyskanym nawet z kilku tysięcy pojedynczych pokolenia M2 otrzymanych po samozapyleniu. Strategia wykorzystuje technikę PCR, za pomocą której amplifikuje się sekwencję określonego genu. W reakcji wykorzystuje się oligonukleotydy specyficzne dla genu wyznakowane fluorochromami. W 96-dołkowych płytkach tworzy się zbiorcze pule ekstraktów DNA z różnych roślin. Dzięki temu zmniejsza się ilość koniecznych reakcji. Amplikony ulegają denaturacji i po wolnym schłodzeniu tworzą się dupleksy. W przypadku, gdy wśród roślin występuje genotyp zawierający zmutowany allel, tworzą się heterodupleksy. W miejscach niesparowanych DNA trawiony jest przez endonukleazę *CEL I*. Prowadzi to do otrzymania skróconych fragmentów DNA, wykrywanych za pomocą znacznika fluorescencyjnego po rozdziale elektroforetycznym. Metoda ta poza wykryciem polimorfizmu DNA pozwala poznać przybliżoną lokalizację mutacji wzdłuż amplifikowanego odcinka DNA [36, 60]. Na podstawie analizy kolekcji mutantów u *A. thaliana* otrzymanych po zastosowaniu EMS wykazano powstawanie średnio 10 mutacji na gen w populacji M2 liczącej ponad 3000 roślin [24]. Oszacowano również, że pojedyncza roślina *A. thaliana* z pokolenia M2 posiada średnio ponad 700 mutacji w genomie [72].

Jedną z pierwszych modyfikacji metody TILLING jest wersja EcoTILLING, w której do stworzenia kolekcji wykorzystano 192 ekotypy *A. thaliana* reprezentujące naturalną zmienność gatunku. Zidentyfikowano 55 haplotypów 5 genów z ponad 150 roślin [10]. Dzięki metodzie EcoTILLING poznano funkcje wielu genów gatunków roślin uprawnych, w tym: genu *FAE1* (ang. *Fatty Acid Elongase 1*) odpowiedzialnego za kontrolę biosyntezy kwasu erukowego u roślin rodzaju *Brassica* [75], *Alk* kodującego syntazę IIa skrobi u ryżu [32] oraz *Ara d 2.01* kodującego białko zapasowe nasion *Arachis duranensis*, które uważa się za potencjalny alergen u ludzi [56].

Inną wersją metody TILLING zaprojektowaną z myślą o roślinie modelowej *A. thaliana* jest iTILLING (ang. *individualized TILLING*), w której nasiona roślin pokolenia M1 zbierane są łącznie, natomiast rośliny pokolenia M2 uprawiane są w specjalnych 96-dołkowych płytkach wypełnionych podłożem z agaru [3]. Materiał do izolacji DNA genomowego z siewek pobierany jest metodą *Ice-cap* [8]. W celu identyfikacji mutacji dokonuje się analizy krzywej topnienia produktów PCR. Po wykryciu mutacji siewka przenoszona jest z podłoża z agarem do gleby celem określenia fenotypu oraz uzyskania nasion, niezbędnych do dalszych analiz.

## KOLEKCJE MUTANTÓW INSERCYJNYCH

Dotychczas uzyskano ponad 325 tysięcy linii mutantów insercyjnych *A. thaliana* [52]. Linie te zostały zgromadzone w licznych kolekcjach: Salk [1], SAIL [64], GABI-Kat [59], WiscDSlox (WISC) [82], Saskatoon (SK), FLAGdb [61], CSHL [71], RIKEN [27], IMA, SLAT, JIC-SM. Większość z nich (głównie z kolekcji Salk, SAIL, WISC oraz GABI-Kat) można uzyskać z Arabidopsis Biological Resource Center (ABRC) oraz Nottingham Arabidopsis Stock Center (NASC), natomiast mutanty kolekcji FLAGdb bezpośrednio z l'institut National de la Recherche Agronomique (INRA). Mutanty z kolekcji Salk, GABI, SAIL oraz WISC uzyskano dla ekotypu Colombia (Col-0), mutanty z kolekcji FLAGdb dla ekotypu Wassilewskija, a mutanty kolekcji CSHL i RIKEN dla odpowiednio ekotypu Landsberg erecta i Nössen [51]. Kolekcje CSHL, RIKEN, IMA uzyskano z zastosowaniem transpozycji ruchomego elementu genetycznego *Ds* podobnie jak w przypadku kolekcji SLAT i JIC-SM z tą różnicą, że transpozonomem wykorzystanym do uzyskania mutantów był transpozon *En/Spm* pochodzący z genomu kukurydzy [73].

Wymienione kolekcje mutantów insercyjnych są źródłem potwierdzonych oraz potencjalnych mutantów *loss-of-function* (charakteryzujących się brakiem syntezy naturalnego produktu danego genu lub inaktywacją produktu genu) większości genów *A. thaliana*. Miejsca insercji T-DNA u mutantów wszystkich kolekcji obejmują rejony znajdujące się 500 pz przed miejscem rozpoczęcia transkrypcji do miejsca występowania kodonu terminalnego. Pomimo zgromadzenia olbrzymiej liczby mu-

tantów, ponad 18,5% zadnotowanych genów nie posiada insercji T-DNA, natomiast 11% posiada tylko jedną insercję wśród linii dostępnych w ABRC oraz NASC. Liczba genów z insercją wzrosła, gdy weźmiemy pod uwagę wszystkie dostępne linie mutantów (T-DNA i transpozonowych), jednakże nadal 12,2% genów nie posiada mutacji insercyjnej, a dla 8,2% liczba insercji wynosi jeden [52].

Brak pełnego sukcesu uzyskania mutacji w każdym znanym genie może być spowodowany kilkoma czynnikami. Stwierdzono, że insercje T-DNA zachodzą częściej w rejonach niekodującego DNA [1]. Na podstawie analizy sekwencji flankujących miejsca insercji T-DNA w mutantach kolekcji Salk, FLAGdb i GABI wykazano, że insercja zachodzi najczęściej w miejscach inicjacji transkrypcji oraz w rejonie 3'UTR genu [42]. Prawdopodobnie odpowiedzialne są za to elementy kompleksu transkrypcyjnego oraz czynniki zaangażowane w przebudowę struktury chromatyny w procesie integracji T-DNA. Dla genów nieposiadających miejsc restrykcyjnych dla enzymów zastosowanych w procedurze do analizy sekwencji flankujących rejon integracji (ang. *Flanking Sequence Tag*, FST) również nie wykazano insercji [42].

Cechą łączącą wszystkie kolekcje mutantów insercyjnych T-DNA jest wspólna metoda ich pozyskiwania, chociaż do przygotowania każdej zastosowano fragmenty T-DNA o innej sekwencji nukleotydowej. W przypadku kolekcji WISC i Salk, w procesie uzyskiwania mutantów użyto jednego rodzaju wektora w przeciwieństwie do kolekcji SAIL i GABI, gdzie zastosowano odpowiednio dwa i cztery rodzaje wektorów [52].

## WPLYW MIEJSCA INSERCJI T-DNA NA SKUTECZNOŚĆ INAKTYWACJI GENU

W roku 2008 Wang przeprowadził badania dotyczące wpływu lokalizacji insercji T-DNA na skuteczność inaktywacji genu. W swojej pracy wykorzystał 1084 linii mutantów insercyjnych T-DNA dla 755 genów *A. thaliana* opisanych w 648 pracach oryginalnych [77].

Brak syntezy transkryptu potwierdzono za pomocą techniki RT-PCR dla 97,7% mutacji insercyjnych. Podwyższony poziom ekspresji zmutowanego genu stwierdzono dla zaledwie 0,6% insercji, z czego najwięcej (8% spośród nich) dla insercji w rejonie występującym za kodonem terminacyjnym. Podwyższenie poziomu ekspresji zaobserwowano również w przypadku insercji T-DNA w rejonie promotorowym genu *PIP5K9* kodującego kinazę fosfatydoinozytolu, negatywnie regulującą wzrost korzeni roślin *A. thaliana* [44]. W przypadku 136 badanych linii mutantów stwierdzono brak syntezy białka dla 80% insercji. Insercje występujące przed kodonem startowym skutkowały brakiem syntezy białka w przeanalizowanych 41% przypadkach [77].

Insercje zarówno w obrębie egzonów jak i intronów są równie efektywne w powodowaniu mutacji typu *knock-down/knock-out*. Brak wpływu insercji T-DNA w obrębie egzonów na poziom transkrypcji genu stwierdzono dla zaledwie 1,1% mutacji insercyjnych, natomiast w przypadku intronów dla 0,7% mutacji [77]. Na przykład insercja T-DNA w drugim egzonie genu *CSN5B* nie wpłynęła na zmianę ilości białka, jednakże uzyskano fenotyp odmienny od typu dzikiego [18]. Insercja T-DNA w rejonie 3'UTR genu *PGL3* okazała się być mutacją letalną [83]. Niekiedy insercja T-DNA w obrębie intronu nie powoduje inaktywacji genu, np. u mutantu *nbr1 A. thaliana* nie stwierdzono utraty funkcji genu [58]. W wyniku alternatywnego splicingu T-DNA uległ wycięciu wraz z intronem. W przypadku mutantów *annAt2-1* oraz *annAt2-2*, u których insercja T-DNA nastąpiła w ostatnim egzonie genu *AnnAt2*, nie stwierdzono obniżenia poziomu ekspresji genu [40]. Krzyżowanie mutantów *A. thaliana*, u których insercja T-DNA nastąpiła w intronach prowadzi często do modyfikacji epigenetycznych, w wyniku których nie stwierdza się inaktywacji zmutowanego uprzednio genu. Na przykład skrzyżowanie mutantu *cobra* z mutantem *srf6-1 A. thaliana* doprowadziło do osłabienia skutku mutacji genu *COBRA*. Było to skorelowane z podwyższoną metylacją DNA, która spowodowała wzrost poziomu ekspresji genu [84]. Zniesienie mutacji genu *AGAMOUS* potwierdzono również po skrzyżowaniu mutantu *ag-TD* z mutantem *yuc1-1* [22]. Efekt osłabienia mutacji wywołanej insercją T-DNA w intronie stwierdzono także po skrzyżowaniu potrójnego mutantu *bas1-2 sob7-1 ben1-1* z mutantem *ben1-1* [62].

Insercja T-DNA może powodować również dodatkowe mutacje w genomie gospodarza typu delecji i translokacji. U 73% mutantów insercyjnych, u których odnotowano delecje, wystąpiła utrata odcinka DNA o długości poniżej 100 pz. U 17 spośród 31 analizowanych mutantów posiadających delecje o długości powyżej 100 pz utraty odcinków DNA wystąpiły w genach związanych z replikacją oraz mechanizmami naprawy DNA, remodelingiem chromatyny i mitozą oraz mejozą [77]. Wydaje się to uzasadnione, ponieważ geny związane z mechanizmami naprawy DNA odgrywają istotną rolę w procesie integracji T-DNA [14], który zachodzi w wysoce aktywnych metabolicznie i podziałowo tkankach organu generatywnego, poddawanego transformacji metodą „*floral dip*” [15].

## PODSUMOWANIE

Kolekcje mutantów stanowią nieodzowne narzędzie współczesnych badań. Różnorodność dostępnych metod mutagenyzy pozwala na uzyskanie licznych kolekcji mutantów. Dotychczas największym ograniczeniem mutagenyzy była przypadkowość miejsca mutacji – zarówno wywoływanej mutagenami fizycznymi oraz chemicznymi, jak i insercji T-DNA. Dzięki zastosowaniu programowanych

nukleaz możliwa jest mutagenезa ukierunkowana, pozwalająca na precyzyjne wprowadzenie zmian w wybranych pozycjach łańcucha polinukleotydowego. Możliwość dowolnej edycji genomu otworzyła nowe perspektywy analizy funkcjonalnej genów organizmów roślinnych.

## PODZIĘKOWANIA

Publikacja została sfinansowana ze środków Narodowego Centrum Nauki przyznanych na podstawie decyzji numer DEC-2015/17/B/NZ9/01767

## LITERATURA

- [1] ALONSO JM, STEPANOVA AN, LEISSE TJ, KIM CJ, CHEN H, SHINN P, STEVENSON DK, ZIMMERMAN J, BARAJAS P, CHEUK R, GADRINAB C, HELLER C, JESKE A, KOESEMA E, MEYERS CC, PARKER H, PREDNIS L, ANSARI Y, CHOY N, DEEN H, GERALT M, HAZARI N, HOM E, KARNES M, MULHOLLAND C, NDUBAKU R, SCHMIDT I, GUZMAN P, AGUILAR-HENONIN L, SCHMID M, WEIGEL D, CARTER DE, MARCHAND T, RISSEUW E, BROGDEN D, ZEXO A, CROSBY WL, BERRY CC, ECKER JR. Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science* 2003; **301**: 653-657.
- [2] BELFORT M, BONOCORA RP. Homing endonucleases: from genetic anomalies to programmable genomic clippers. *Methods Mol Biol* 2014; **1123**: 1-26.
- [3] BUSH SM, KRYSAN PJ. iTILLING: a personalized approach to the identification of induced mutations in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 2010; **154**: 25-35.
- [4] CAVRAK VV, LETTNER N, JAMGE S, KOSAREWICZ A, BAYER LM, MITTELSTEN SCHEID O. How a retrotransposon exploits the plant's heat stress response for its activation. *PLoS Genet* 2014; **10**: e1004115.
- [5] CHATTERJEE N, WALKER GC. Mechanisms of DNA damage, repair, and mutagenesis. *Environ Mol Mutagen* 2017; **58**: 235-263.
- [6] CHEN K, GAO C. Targeted genome modification technologies and their applications in crop improvements. *Plant Cell Rep* 2014; **33**: 575-583.
- [7] CHENG X, WEN J, TADEGE M, RATET P, MYSORE KS. Reverse genetics in *Medicago truncatula* using *Tnt1* insertion mutants. *Methods Mol Biol* 2011; **678**: 179-190.
- [8] CLARK KA, KRYSAN PJ. Protocol: An improved high-throughput method for generating tissue samples in 96-well format for plant genotyping (Ice-Cap 2.0). *Plant Methods* 2007; **3**: 8.
- [9] CLASEN BM, STODDARD TJ, LUO S, DEMOREST ZL, LI J, CEDRONE F, TIBEBU R, DAVISON S, RAY EE, DAULHAC A, COFFMAN A, YABANDITH A, RETTERATH A, HAUN W, BALTES NJ, MATHIS L, VOYTAS DF, ZHANG F. Improving cold storage and processing traits in potato through targeted gene knockout. *Plant Biotechnol J* 2016; **14**: 169-176.
- [10] COMAI L, YOUNG K, TILL BJ, REYNOLDS SH, GREENE EA, CODOMO CA, ENNS LC, JOHNSON JE, BURTNER C, ODDEN AR, HENIKOFF S. Efficient discovery of DNA polymorphisms in natural populations by EcoTilling. *Plant J* 2004; **37**: 778-786.
- [11] COURTIAL B, FEUERBACH F, EBERHARD S, ROHMER L, CHIAPELLO H, CAMILLERI C, LUCAS H. *Tnt1* transposition events are induced by *in vitro* transformation of *Arabidopsis thaliana*, and transposed copies integrate into genes. *Mol Genet Genomics* 2001; **265**: 32-42.
- [12] CUI Y, BARAMPURAM S, STACEY MG, HANCOCK CN, FINDLEY S, MATHIEU M, ZHANG Z, PARROT WA, STACEY G. *Tnt1* Retrotransposon mutagenesis: a tool for soybean functional genomics. *Plant Physiol* 2013; **161**: 36-47.

- [13] CURTIN SJ, ZHANG F, SANDER JD, HAUN WJ, STARKER C, BALTES NJ, REYON D, DAHLBORG EJ, GOODWIN MJ, COFFMAN AP, DOBBS D, JOUNG JK, VOYTAS DF, STUPAR RM. Targeted mutagenesis of duplicated genes in soybean with zinc-finger nucleases. *Plant Physiol* 2011; **156**: 466-473.
- [14] DAFNY-YELIN M, LEVY A, TZFIRA T. The ongoing saga of *Agrobacterium*-host interactions. *Trends Plant Sci* 2008; **13**: 102-105.
- [15] DESFEUX C, CLOUGH SJ, BENT AF. Female reproductive tissues are the primary target of *Agrobacterium*-mediated transformation by the *Arabidopsis* floral-dip method. *Plant Physiol* 2000; **123**: 895-904.
- [16] D'HALLUIN K, VANDERSTRAETEN C, VAN HULLE J, ROSOLOWSKA J, VAN DEN BRANDE I, PENNEWAERT A, D'HONT K, BOSSUT M, JANTZ D, RUITER R, BROADHVEST J. Targeted molecular trait stacking in cotton through targeted double-strand break induction. *Plant Biotechnol J* 2013; **11**: 933-941.
- [17] DJUKANOVIC V, SMITH J, LOWE K, YANG M, GAO H, JONES S, NICHOLSON MG, WEST A, LAPE J, BIDNEY D, CARL FALCO S, JANTZ D, ALEXANDER Lyznik L. Male-sterile maize plants produced by targeted mutagenesis of the cytochrome P450-like gene (*MS26*) using a re-designed I-CreI homing endonuclease. *Plant J* 2013; **76**: 888-899.
- [18] DOHMANN EMN, KUHNLE C, SCHWECHHEIMER C. Loss of the CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC9 signalosome subunit 5 is sufficient to cause the *cop/det/fus* mutant phenotype in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 2005; **17**: 1967-1978.
- [19] DUANGPAN S, ZHANG W, WU Y, JANSKY SH, JIANG J. Insertional mutagenesis using *Tnt1* retrotransposon in potato. *Plant Physiol* 2013; **163**: 21-29.
- [20] Fu H, Zheng Z, Dooner HK. Recombination rates between adjacent genic and retrotransposon regions in maize vary by 2 orders of magnitude. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; **99**: 1082-1087.
- [21] GAO J, WANG G, MA S, XIE X, WU X, ZHANG X, WU Y, ZHAO P, XIA Q. CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis in *Nicotiana tabacum*. *Plant Mol Biol* 2015; **87**: 99-110.
- [22] GAO Y, ZHAO Y. Epigenetic Suppression of T-DNA Insertion mutants in *Arabidopsis*. *Mol Plant* 2013; **6**: 539-545.
- [23] GELVIN SB. Integration of *Agrobacterium* T-DNA into the plant genome. *Annu Rev Genet* 2017; **51**: 195-217.
- [24] GREENE EA, CODOMO CA, TAYLOR NE, HENIKOFF JG, TILL BJ, REYNOLDS SH, ENNS LC, BURTNER C, JOHNSON JE, ODDEN AR, COMAI L, HENIKOFF S. Spectrum of chemically induced mutations from a large-scale reverse-genetic screen in *Arabidopsis*. *Genetics* 2003; **164**: 731-740.
- [25] GRUSZKA D, SZAREJKO I, MALUSZYNSKI M. Sodium azide as a mutagen. In SHU QY, FORSTER BP, NAKAGAWA H eds. *Plant Mutation Breeding and Biotechnology*. Wallingford: CABI, 2012; 159-166.
- [26] IKEHATA H, ONO T. The mechanisms of UV mutagenesis. *J Radiat Res* 2011; **52**: 115-125.
- [27] ITO T, MOTOHASHI R, KUROMORI T, MIZUKADO S, SAKURAI T, KANAHARA H, SEKI M, SHINOZAKI K. 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.
- [28] JIANG F, DOUDNA JA. CRISPR-Cas9 structures and mechanisms. *Annu Rev Biophys* 2017; **46**: 505-529.
- [29] Jiang W, Yang B, Weeks DP. Efficient CRISPR/Cas9-mediated gene editing in *Arabidopsis thaliana* and inheritance of modified genes in the T2 and T3 generations. *PLoS One* 2014; **9**: e99225.
- [30] JOUNG JK, SANDER JD. TALENs: a widely applicable technology for targeted genome editing. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2013; **14**: 49-55.
- [31] JURICA MS, STODDARD BL. Homing endonucleases: structure, function and evolution. *Cell Mol Life Sci* 1999; **55**: 1304-1326.
- [32] KADARU SB, YADAV AS, FJELLSTROM RG, OARD JH. Alternative ecotilling protocol for rapid, cost-effective single-nucleotide polymorphism discovery and genotyping in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Mol Biol Report* 2006; **24**: 3-22.
- [33] KOBAYASHI S, GOTO-YAMAMOTO N, HIROCHIKA H. Retrotransposon-induced mutations in grape skin color. *Science* 2004; **304**: 982.
- [34] KOONIN EV, MAKAROVA KS, ZHANG F. Diversity, classification and evolution of CRISPR-Cas systems. *Curr Opin Microbiol* 2017; **37**: 67-78.
- [35] KRYSAN PJ, YOUNG JC, SUSSMAN MR. T-DNA as an insertional mutagen in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 1999; **11**: 2283-2290.

- [36] KUROWSKA M, DASZKOWSKA-GOLEC A, GRUSZKA D, MARZEC M, SZURMAN M, SZAREJKO I, MALUSZYNSKI M. TILLING: a shortcut in functional genomics. *J Appl Genet* 2011; **52**: 371-390.
- [37] LACROIX B, CITOVSKY V. The roles of bacterial and host plant factors in *Agrobacterium*-mediated genetic transformation. *Int J Dev Biol* 2013; **57**: 467-481.
- [38] Lang J, Faure D. Functions and regulation of quorum-sensing in *Agrobacterium tumefaciens*. *Front Plant Sci*. 2014; **5**: 14.
- [39] LEE L-Y, GELVIN SB. T-DNA binary vectors and systems. *Plant Physiol* 2008; **146**: 325-332.
- [40] LEE S, LEE EJ, YANG EJ, LEE JE, PARK AR, SONG WH, PARK OK. Proteomic identification of annexins, calcium-dependent membrane binding proteins that mediate osmotic stress and abscisic acid signal transduction in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 2004; **16**: 1378-1391.
- [41] LI X, LASSNER M, ZHANG Y. Deleteagene: A fast neutron deletion mutagenesis-based gene knockout system for plants. *Comp Funct Genomics* 2002; **3**: 158-160.
- [42] LI Y, ROSSO MG, ULKER B, WEISSHAAR B. Analysis of T-DNA insertion site distribution patterns in *Arabidopsis thaliana* reveals special features of genes without insertions. *Genomics* 2006; **87**: 645-652.
- [43] LISCH D. How important are transposons for plant evolution? *Nat Rev Genet* 2013; **14**: 49-61.
- [44] LOU Y, GOU J-Y, XUE H-W. PIP5K9, an *Arabidopsis* phosphatidylinositol monophosphate kinase, interacts with a cytosolic invertase to negatively regulate sugar-mediated root growth. *Plant Cell* 2007; **19**: 163-181.
- [45] MANOVA V, GRUSZKA D. DNA damage and repair in plants – from models to crops. *Front Plant Sci* 2015; **6**: 885.
- [46] MAZIER M, BOTTON E, FLAMAIN F, BOUCHET J-P, COURTIAL B, CHUPEAU M-C, CHUPEAU Y, MAISON-NEUVE B, LUCAS H. Successful gene tagging in lettuce using the *Tnt1* retrotransposon from tobacco. *Plant Physiol* 2007; **144**: 18-31.
- [47] MOHANTA TK, BASHIR T, HASHEM A, ABD ALLAH EF, BAE H. Genome editing tools in plants. *Genes* 2017; **8**: 399.
- [48] MORITA R, KUSABA M, IIDA S, YAMAGUCHI H, NISHIO T, NISHIMURA M. Molecular characterization of mutations induced by gamma irradiation in rice. *Genes Genet Syst* 2009; **84**: 361-370.
- [49] NEGRITTO CM. Repairing Double-Strand DNA Breaks. *Nat Educ* 2010; **3**: 26.
- [50] OLADOSU Y, RAFII MY, ABDULLAH N, HUSSIN G, RAMLI A, RAHIM HA, MIAH G, USMAN M. Principle and application of plant mutagenesis in crop improvement: a review. *Biotechnol Biotechnol Equip* 2016; **30**: 1-16.
- [51] O'MALLEY RC, BARRAGAN CC, ECKER JR. A user's guide to the *Arabidopsis* T-DNA insertion mutant collections. *Methods Mol Biol* 2015; **1284**: 323-342.
- [52] O'MALLEY RC, ECKER JR. Linking genotype to phenotype using the *Arabidopsis* unimutant collection. *Plant J* 2010; **61**: 928-940.
- [53] PARK S-Y, VAGHCHHIPAWALA Z, VASUDEVAN B, LEE LY, SHEN Y, SINGER K, WATERWORTH WM, ZHANG ZJ, WEST CE, MYSORE KS, GELVIN SB. *Agrobacterium* T-DNA integration into the plant genome can occur without the activity of key non-homologous end-joining proteins. *Plant J* 2015; **81**: 934-946.
- [54] PLATT TG, MORTON ER, BARTON IS, BEVER JD, FUQUA C. Ecological dynamics and complex interactions of *Agrobacterium* megaplasmids. *Front Plant Sci* 2014; **5**: 635.
- [55] PRAY LA. Transposons: The Jumping Genes. *Nat Educ* 2008; **1**: 204.
- [56] RAMOS ML, HUNTLEY JJ, MALEKI SJ, OZIAS-AKINS P. Identification and characterization of a hypoallergenic ortholog of Ara h 2.01. *Plant Mol Biol* 2009; **69**: 325-335.
- [57] RHEE SY, MUTWIL M. Towards revealing the functions of all genes in plants. *Trends Plant Sci* 2014; **19**: 212-221.
- [58] Rodríguez MC, Wawrzyńska A, Sirko A. Intronic T-DNA insertion in *Arabidopsis NBR1* conditionally affects wild-type transcript level. *Plant Signal Behav* 2014; **9**: e975659.
- [59] ROSSO MG, LI Y, STRIZHOV N, REISS B, DEKKER K, WEISSHAAR B. An *Arabidopsis thaliana* T-DNA mutagenized population (GABI-Kat) for flanking sequence tag-based reverse genetics. *Plant Mol Biol* 2003; **53**: 247-259.
- [60] RYBKA K. TILLING I FOX-hunting: nowe metody analizy funkcjonalnej genów. *Postępy Biologii Komórki* 2009; **36**: 539-554.

- [61] SAMSON F, BRUNAUD V, DUCHÊNE S, DE OLIVEIRA Y, CABOCHE M, LECHARNY A, AUBOURG S. FLAGdb<sup>++</sup>: a database for the functional analysis of the *Arabidopsis* genome. *Nucleic Acids Res* 2004; **32**: D347-D350.
- [62] SANDHU KS, KOIRALA PS, NEFF MM. The *ben1-1* brassinosteroid-catabolism mutation is unstable due to epigenetic modifications of the intronic T-DNA insertion. *G3 (Bethesda)* 2013; **3**: 1587-1595.
- [63] SEGA P, LINKIEWICZ A. Wykorzystanie miejscowo-specyficznych nukleaz do modyfikacji genomów roślinnych. *Postępy Biologii Komórki* 2014; **41**: 701-720.
- [64] SESSIONS A, BURKE E, PRESTING G, AUX G, MCELVER J, PATTON D, DIETRICH B, HO P, BACWADEN J, KO C, CLARKE JD, COTTON D, BULLIS D, SNELL J, MIGUEL T, HUTCHISON D, KIMMERLY B, MITZEL T, KATAGIRI F, GLAZEBROOK J, LAW M, GOFF SA. A High-Throughput Arabidopsis Reverse Genetics System. *Plant Cell* 2002; **14**: 2985-2994.
- [65] SHIRASAWA K, HIRAKAWA H, NUNOME T, TABATA S, ISOBE S. Genome-wide survey of artificial mutations induced by ethyl methanesulfonate and gamma rays in tomato. *Plant Biotechnol J* 2016; **14**: 51-60.
- [66] SHUKLA VK, DOYON Y, MILLER JC, DEKELVER RC, MOEHLE EA, WORDEN SE, MITCHELL JC, ARNOLD NL, GOPALAN S, MENG X, CHOI VM, ROCK JM, WU Y-Y, KATIBAH GE, ZHIFANG G, MCCASKILL D, SIMPSON MA, BLAKESLEE B, GREENWALT SA, BUTLER HJ, HINKLEY SJ, ZHANG L, REBAR EJ, GREGORY PD, URNOV FD. Precise genome modification in the crop species *Zea mays* using zinc-finger nucleases. *Nature* 2009; **459**: 437-441.
- [67] Sobkowiak Ł, SZWEYKOWSKA-KULIŃSKA Z. Fizyczne, chemiczne i genetyczne metody mutagenyzy roślin. *Biotechnologia* 2007; **4**: 157-169.
- [68] STODDARD BL. Homing endonucleases: from microbial genetic invaders to reagents for targeted DNA modification. *Struct Lond Engl* 2011; **19**: 7-15.
- [69] STUDER A, ZHAO Q, ROSS-IBARRA J, DOEBLEY J. Identification of a functional transposon insertion in the maize domestication gene *tb1*. *Nat Genet* 2011; **43**: 1160-1163.
- [70] SUBRAMONI S, NATHOO N, KLIMOV E, YUAN Z-C. *Agrobacterium tumefaciens* responses to plant-derived signaling molecules. *Front Plant Sci* 2014; **5**: 322.
- [71] SUNDARESAN V, SPRINGER P, VOLPE T, HAWARD S, JONES JD, DEAN C, MA H, MARTIENSSSEN R. Patterns of gene action in plant development revealed by enhancer trap and gene trap transposable elements. *Genes Dev* 1995; **9**: 1797-1810.
- [72] TILL BJ, REYNOLDS SH, GREENE EA, CODOMO CA, ENNS LC, JOHNSON JE, BURTNER C, ODDEN AR, YOUNG K, TAYLOR NE, HENIKOFF JG, COMAI L, HENIKOFF S. Large-scale discovery of induced point mutations with high-throughput TILLING. *Genome Res* 2003; **13**: 524-530.
- [73] TISSIER AF, MARILLONNET S, KLIMYUK V, PATEL K, TORRES MA, MURPHY G, JONES JD. Multiple independent defective *Suppressor-mutator* transposon insertions in *Arabidopsis*: a tool for functional genomics. *Plant Cell* 1999; **11**: 1841-1852.
- [74] TOWNSEND JA, WRIGHT DA, WINFREY RJ, FU F, MAEDER ML, JOUNG JK, VOYTAS DF. High-frequency modification of plant genes using engineered zinc-finger nucleases. *Nature* 2009; **459**: 442-445.
- [75] WANG N, WANG Y, TIAN F, KING GJ, ZHANG C, LONG Y, SHI L, MENG J. A functional genomics resource for *Brassica napus*: development of an EMS mutagenized population and discovery of *FAE1* point mutations by TILLING. *New Phytol* 2008; **180**: 751-765.
- [76] WANG Y, CHENG X, SHAN Q, ZHANG Y, LIU J, GAO C, QIU J-L. Simultaneous editing of three homoalleles in hexaploid bread wheat confers heritable resistance to powdery mildew. *Nat Biotechnol* 2014; **32**: 947-951.
- [77] WANG YH. How effective is T-DNA insertional mutagenesis in *Arabidopsis*? *J Biochem Tech* 2008; **1**: 11-20.
- [78] WESTRA ER, BUCKLING A, FINERAN PC. CRISPR-Cas systems: beyond adaptive immunity. *Nat Rev Microbiol* 2014; **12**: 317-326.
- [79] WICKER T, SABOT F, HUA-VAN A, BENNETZEN JL, CAPY P, CHALHOUB B, FLAVELL A, LEROY P, MORGANTE M, PANAUD O, PAUX E, SANMIGUEL P, SCHULMAN AH. A unified classification system for eukaryotic transposable elements. *Nat Rev Genet* 2007; **8**: 973-982.

- [80] WIEDENHEFT B, STERNBERG SH, DOUDNA JA. RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea. *Nature* 2012; **482**: 331-338.
- [81] WOOD DW, SETUBAL JC, KAUL R, MONKS DE, KITAJIMA JP, OKURA VK, ZHOU Y, CHEN L, WOOD GE, ALMEIDA NF Jr, WOO L, CHEN Y, PAULSEN IT, EISEN JA, KARP PD, BOVEE D Sr, CHAPMAN P, CLENDENNING J, DEATHERAGE G, GILLET W, GRANT C, KUTYAVIN T, LEVY R, LI MJ, MCCLELLAND E, PALMIERI A, RAYMOND C, ROUSE G, SAENPHIMMACHAK C, WU Z, ROMERO P, GORDON D, ZHANG S, YOO H, TAO Y, BIDDLE P, JUNG M, KRESPAN W, PERRY M, GORDON-KAMM B, LIAO L, KIM S, HENDRICK C, ZHAO ZY, DOLAN M, CHUMLEY F, TINGEY SV, TOMB JF, GORDON MP, OLSON MV, NESTER EW. The genome of the natural genetic engineer *Agrobacterium tumefaciens* C58. *Science* 2001; **294**: 2317-2323.
- [82] WOODY ST, AUSTIN-PHILLIPS S, AMASINO RM, KRYSAN PJ. The WiscDsLox T-DNA collection: an arabidopsis community resource generated by using an improved high-throughput T-DNA sequencing pipeline. *J Plant Res* 2007; **120**: 157-165.
- [83] XIONG Y, DEFRAIA C, WILLIAMS D, ZHANG X, MOU Z. Characterization of *Arabidopsis* 6-phosphogluconolactonase T-DNA insertion mutants reveals an essential role for the oxidative section of the plastidic pentose phosphate pathway in plant growth and development. *Plant Cell Physiol* 2009; **50**: 1277-1291.
- [84] XUE W, RUPRECHT C, STREET N, ET AL. Paramutation-like interaction of T-DNA loci in *Arabidopsis*. *PLoS One* 2012; **7**: e51651.
- [85] YU Q, WANG B, LI N, TANG Y, YANG S, YANG T, XU J, GUO C, YAN P, WANG Q, ASMUTOLA P. CRISPR/Cas9-induced targeted mutagenesis and gene replacement to generate long-shelf life tomato lines. *Sci Rep* 2017; **7**: 11874.
- [86] ZHANG H, ZHANG J, WEI P, ZHANG B, GOU F, FENG Z, MAO Y, YANG L, ZHANG H, XU N, ZHU JK. The CRISPR/Cas9 system produces specific and homozygous targeted gene editing in rice in one generation. *Plant Biotechnol J* 2014; **12**: 797-807.

Redaktor prowadzący – Maciej Zabel

Otrzymano: 14.03.2018

Przyjęto: 10.04.2018

Anita Wiśniewska,

Katedra Fizjologii Roślin, Wydział Rolnictwa i Biologii, SGGW

ul. Nowoursynowska 159, 02-776 Warszawa

tel.: +48 22 59 325 33

e-mail: [anita\\_wisniewska@sggw.pl](mailto:anita_wisniewska@sggw.pl)

