УДК 631.522/.524:577.21:575.224.46

doi: 10.15389/agrobiology.2015.3.288rus

# TILLING — СОВРЕМЕННАЯ ТЕХНОЛОГИЯ «ОБРАТНОЙ» ГЕНЕТИКИ РАСТЕНИЙ $^{\circ}$

(обзор)

### А.С. СУЛИМА, В.А. ЖУКОВ

В генетических исследованиях существует два основных подхода, получивших названия «прямой» и «обратной» генетики. В то время как «прямая» генетика занимается изучением закономерностей наследования признаков (фенотипа) у живых организмов в ряду поколений и выявляет генетические факторы, которые влияют на проявление данных признаков (работает по принципу «от фенотипа к генотипу»), «обратная» генетика, имея в качестве отправной точки ген с неизвестной функцией, выясняет его роль в организме путем изменения структуры или активности такого гена с последующим анализом ассоциированных изменений в фенотипе (принцип «от генотипа к фенотипу»). С развитием технологий широкомасштабного геномного секвенирования «обратная» генетика получила существенную поддержку, заняв лидирующее положение как в фундаментальной науке, так и в прикладных областях. В представленном обзоре изложены принципы, лежащие в основе одного из новейших методов «обратной» генетики, получившего название TILLING (от англ. Targeting Induced Local Lesions in Genomes — поиск индуцированных локальных нарушений в геномах). Метод совмещает классический мутационный анализ с современными способами точного выявления нуклеотидных замен в заданном локусе. Отличительные особенности метода — высокая эффективность и применимость к широкому кругу биологических объектов, благодаря чему он успел завоевать широкое признание в научном мире. Подробно описаны ключевые этапы подготовки к TILLING-анализу: получение мутагенизированной популяции исследуемых организмов и создание на ее основе так называемой TILLING-платформы, включающей организованную коллекцию мутантов и связанную с ней базу данных с информацией о коллекции. Приведены основные подходы к детекции точечных мутаций, применяемые в настоящее время мировыми исследовательскими группами, в том числе новейшие подходы на основе методов NGS (от англ. Next Generation Sequencing - «секвенирование следующего поколения»). Особое внимание уделено требованиям, предъявляемым к исследователям для успешного проведения TILLING-анализа, а также существующим вариациям и модификациям метода, призванным решать различные задачи. Отдельно представлены результаты, полученные коллективом авторов с применением методики TILLING в их исследованиях специфичности распознавания партнеров при установлении мутуалистического симбиоза между горохом посевным (Pisum sativum L.) и клубеньковой бактерией Rhizobium leguminosarum bv. viciae. Благодаря TILLING-анализу авторам удалось выявить ряд мутантов гороха по гену рецепторной киназы LykX, который представляется наиболее вероятным кандидатом на роль детерминанты повышенной избирательности растения к бактериальному микросимбионту. Исследование полученных мутантов поможет сделать окончательное заключение о роли гена LykX в симбиозе гороха и клубеньковых бактерий.

Ключевые слова: генетика растений, «обратная» генетика, TILLING, выявление мутаций, горох посевной, «афганский» фенотип.

Современная генетика вступила в «постгеномную эру» (1-3), когда информация о структуре генома стала доступной для широкого круга биологических объектов. В этих условиях особую важность приобретает выявление биологической функции генов, последовательности которых уже известны. Одним из наиболее успешных приемов при решении такой задачи служит методика TILLING, основанная на объединении особенностей и подходов «прямой» и «обратной» генетики.

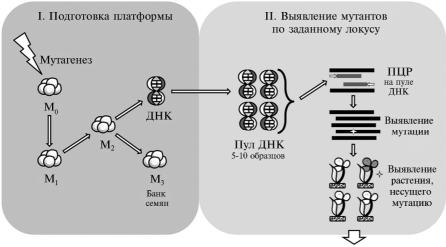
«Прямая» и «обратная» генетика в изучении развития растений. Со времен открытий Грегора Менделя (1865 год) (4) классическая, или «прямая», генетика занимается изучением закономерностей наследования признаков (фенотипа) у живых организмов в ряду поколений. Имея фенотип в качестве отправной точки, «прямая» генетика выявляет

<sup>\*</sup> Работа поддержана грантами РФФИ 14-04-32289-мол\_а и 14-04-01442-а. 288

генетические факторы, влияющие на проявление какого-либо признака. Таким образом, «прямая» генетика направлена от фенотипа к генотипу. Один из ключевых этапов экспериментального применения этого подхода — получение обширных мутагенизированных популяций для последующего поиска внутри них интересующих фенотипических изменений. На протяжении десятилетий для множества модельных растительных объектов, в частности Arabidopsis thaliana (L.) Heynh., Medicago truncatula Gaertn., Solanum lycopersicum L., Zea mais L. и др., были созданы крупные коллекции мутантов, при анализе которых удалось выявить ряд генов, контролирующих развитие растений (5).

С 1980-х годов накопленные за предыдущий период знания (открытие ДНК в качестве носителя генетической информации, расшифровка генетического кода, разработка методов секвенирования и модификации геномов) (6) открыли новый подход, предполагающий анализ не фенотипа и его генетического контроля, а самой последовательности ДНК и эффектов, вызванных ее изменениями (мутациями). Эта концепция получила название «обратной» генетики (7, 8).

Объектом изучения «обратной» генетики обычно становится ген с неизвестной функцией, обнаруженный при помощи секвенирования EST (от англ. Expressed Sequence Tag — фрагмент экспрессирующейся последовательности), полного генома или его отдельного участка и т.д. Стратегия исследования заключается в изменении структуры или активности такого гена с последующим анализом ассоциированных изменений в фенотипе. С развитием технологий широкомасштабного геномного секвенирования «обратная» генетика получила существенную поддержку, заняв лидирующее положение как в фундаментальной науке, так и в прикладных областях. В настоящее время существует ряд методик направленного мутагенеза (с использованием T-ДНК, транспозонов/ретротранспозонов, РНК-сайленсинга, системы CRISPR-Cas) (9-16), однако их применение, как правило, ограничено модельными объектами с небольшим геномом, такими как арабидопсис (*A. thaliana*), рис (*Oryza sativa* L.) и люцерна слабоусеченная (*M. truncatula*).



III. Фенотипический анализ мутантов

Общая схема процедуры выявления растительных мутантов по методу TILLING (Targeting Induced Local Lesions in Genomes):  $M_0$ - $M_3$  — поколения мутантов ( $M_0$  — изначальная мутагенизированная популяция). Пул ДНК — результат смешивания проб ДНК, выделенных из нескольких (от 5 до 10) мутантных растений. Подробнее см. текст статьи.

Метод TILLING (от англ. Targeting Induced Local Lesions in Genomes — поиск индуцированных локальных нарушений в геномах) был разработан около 15 лет назад в качестве альтернативы направленному мутагенезу (17) и в настоящее время получает все большее распространение. В нем сочетаются классический мутагенез и высокоточное обнаружение полиморфных сайтов в пределах известной нуклеотидной последовательности (рис.). Главное преимущество TILLING-подхода «обратной» генетики заключается в том, что он применим практически к любому растительному объекту, независимо от размеров генома, плоидности и способа размножения (17, 18). Методика TILLING находится в состоянии бурного развития. Так, разрабатываются более совершенные способы детекции нуклеотидных замен в мутагенизированных популяциях, создаются инструменты биоинформатики для обработки результатов. Возникают научные центры, предоставляющие платформы TILLING для фундаментальных и прикладных исследований. Наряду с этим появляются специфические модификации метода, предназначенные для решения более широкого круга задач, такие как EcoTILLING и De-TILLING, которые будут рассмотрены ниже.

Методика TILLING: подготовка платформы. Важный начальный этап состоит в создании коллекции мутантов интересующего объекта. Как правило, предпочтение отдается химическому мутагенезу, зарекомендовавшему себя в исследованиях классической генетики. Он обеспечивает высокую частоту возникновения различных точечных мутаций, распределенных в геноме случайным образом. Анализ 192 генов A. thaliana после обработки этилметансульфонатом (ethylmethane sulphonate, EMS) на выборке из 3000 растений М2 показал, что частота нуклеотидных замен составляет примерно 10 на ген (19). Каждое растение М2 в среднем несет 720 мутаций (18), в то время как инсерционный мутагенез с использованием агробактерий дает примерно лишь 1,5 инсерций Т-ДНК на одну мутантную линию (20). Таким образом, применение химических мутагенов позволяет использовать значительно меньшие популяции, тем самым ускорив и упростив работу исследователей. Еще одно существенное преимущество химического мутагенеза заключается в том, что с его помощью можно получить широкий спектр мутаций, включая миссенс-мутации (замену аминокислоты в кодируемом белке), нонсенс-мутации (раннее возникновение стоп-кодона, приводящее к синтезу укороченного белка) и нарушения сайтов сплайсинга. Это дает возможность создать целый ряд различных аллелей интересующего гена (локуса), в том числе аллели с приобретением функции и гипоморфные (вызывающие ослабленное проявление признака) аллели (9). Наконец, мутации, вызванные химическими агентами, стабильны в ряду последующих поколений, что не всегда справедливо для альтернативных методов мутагенеза (5, 21)

Среди мутагенов, применяемых в генетике растений, наибольшее распространение имеют два агента сходного действия — EMS и N-нитрозо-N-метилмочевина (1-methyl-1-nitrosourea, MNU). Оба вещества вызывают алкилирование оснований, в первую очередь гуанина (G), нарушая тем самым комплементарность цепей ДНК. Алкилированный гуанин взаимодействует не с цитозином (С), а с тимином (Т), из-за чего в результате репликации ДНК возникает транзиция — замена пары G-C на A-T (22). Использовался также азид натрия, для которого была показана даже более высокая частота индуцирования мутаций, чем для EMS, — в среднем одна мутация на 374 kb по сравнению с одной мутацией на 1 Мb у EMS (23, 24). Однако применение азида натрия ограничивает то, что это

вещество проявляет сильные мутагенные свойства только в отношении некоторых видов организмов, таких как *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Hordeum vulgare* L., *O. sativa* (25).

Для De-TILLING (от англ. Deletion TILLING, делеционный TILLING) (26) вместо химического мутагенеза используется бомбардировка быстрыми нейтронами, приводящая к возникновению большого числа делеций (27). С помощью такого подхода можно, в частности, «нокаутировать» широко представленные у растений тандемно повторяющиеся гены (27-29). Метод De-TILLING хорошо подходит для улучшения качества сельскохозяйственных сортов, поскольку характеризуется малой частотой фоновых мутаций (26).

Преобразование коллекции мутантов в платформу для TILLING-анализа включает получение растений поколения  $M_2$ , сбор образцов ДНК и семян и создание базы данных. Готовая TILLING-платформа может, разумеется, служить ресурсом, используемым в целях как «обратной», так и «прямой» генетики (для выявления мутантов с интересующим фенотипом).

Большинство уже существующих TILLING-платформ содержит от 3 до 5 тыс. образцов, хотя в некоторых случаях их число может доходить до 10 тыс. (30). Как правило, для созданных платформ осуществляется подробное описание фенотипа растений  $M_2$  и  $M_3$ , что позволяет заранее обогатить анализируемую выборку образцами с нужными свойствами. Примером успешного применения подобного подхода может служить работа J.A. Реггу с соавт. (31) по исследованию генов контроля азотфиксирующего симбиоза у лядвенца японского *Lotus japonicus* (Regel.) К. Larsen, в которой был произведен предварительный отбор мутантов с нарушением формирования симбиотических клубеньков.

Вся информация о TILLING-платформе сводится в базу данных, которая обычно размещается в открытом доступе в сети Интернет. Основу базы составляет фенотипическое описание коллекции, проведенное индивидуально для каждой мутантной линии на всех стадиях развития растения. Для удобства эти сведения организованы в иерархические группы и в ряде случаев дополнительно проиллюстрированы фотографическими материалами. Некоторые базы данных также содержат информацию о проанализированных на текущий момент генах и обнаруженных в них мутациях, однако нередко такая информация закрыта, поскольку представляет коммерческую ценность.

Несмотря на то, что анализ мутантов по методу TILLING позволяет существенно упростить изучение функций генов, подготовка платформы для его осуществления остается долгим и трудоемким процессом. На сегодняшний день ряд крупных научных центров предоставляют доступ к TILLING-платформам, созданным для широко используемых в исследованиях видов растений: M. truncatula, L. japonicus и Brassica rapa L. в John Innes Centre (Великобритания) (RevGenUK) (32); Pisum sativum L., S. lycopersicum, Capsicum annum L., Cucumis sativus L. и Cucumis melo L. в Институте сельскохозяйственных исследований (INRA, Франция) (UTILLdb) (33); O. sativa, S. lycopersicum и A. thaliana в Калифорнийском университете (США) (34); Z. mays в Университете Пердью (США); Glycine max (L.) Метг. в Университете Южного Иллинойса (США); Avena sativa L. в CropTailor AB (Швеция) (35); A. thaliana, Brassica oleracea L. и Brasica napus L. в Университете Британской Колумбии (Канада) (CAN-TILL) (36); H. vulgare в Департаменте агроэкологических наук и технологии (DiSTA) Болонского университета (Италия) (TILLMore) (23).

Способы детекции мутаций. В основе TILLING-анализа ле-

жит высокоточное выявление мутаций внутри определенной области интереса. С момента появления методики в 2000 году (17) были последовательно разработаны несколько подходов к решению этой задачи, каждый из которых был менее затратным и более эффективным по сравнению с предыдущими. Начальные этапы подготовки материала (выделение ДНК из растений коллекции мутантов, объединение ДНК в пулы по 8-10 образцов и амплификация целевого участка с помощью специально сконструированных ДНК-праймеров) остаются общими для всех стратегий (см. рис.). До появления NGS-технологий (см. ниже) все методы детекции так или иначе основывались на принципе формирования гетеродуплексов с использованием плавления двуцепочечной ДНК и последующего отжига гетероаллельных фрагментов.

В первом описанном применении метода TILLING (17) для выявления мутантов использовалась денатурирующая высокоэффективная жидкостная хроматография (Denaturing High-Performance Liquid Chromatography, DHPLC), которая в тот период была наиболее чувствительным методом сравнения амплифицированных фрагментов ДНК. DHPLC представляет собой ион-парную обращеннофазную жидкостную хроматографию на алкилированных непористых частицах (37) и способна разделять гомо- и гетеродуплексы ДНК в условиях частичной денатурации. Несмотря на высокую разрешающую способность, длительность проведения процедуры и высокая стоимость ограничивали использование DHPLC в масштабных исследованиях. Первым шагом к удешевлению и повышению автоматизации процесса TILLING стала замена DHPLC на расщепление гетеродуплексов особыми эндонуклеазами с последующим электрофорезом продуктов в полиакриламидном геле и визуализацией результатов при помощи высокочувствительной системы анализа гелей LI-COR (38). Для описанного метода применялись эндонуклеазы, специфичные в отношении одноцепочечной ДНК, такие как нуклеаза S1 из Aspergillus oryzae, P1 из Penicillium citrinum и нуклеаза бобов мунг (mung bean nuclease) из проростков Vigna radiata (L.) R. Wilczek (21). Общий недостаток всех вышеупомянутых ферментов — необходимость сохранения кислого рН (~ 5) для их оптимальной работы. При таких значениях рН двойная цепь ДНК может расплетаться в АТ-богатых участках, что приводит к ее неспецифичному расщеплению. Эндонуклеаза CEL1, выделенная из сельдерея (Apium graveolens L.) (39), напротив, демонстрирует оптимум работы при нейтральных показателях рН, что сделало ее наиболее популярным ферментом для TILLING-анализа. Кроме того, было показано, что грубый экстракт сока сельдерея обладает не меньшей ферментной активностью, чем дорогостоящая очищенная CEL1 (40).

В качестве альтернативы CEL1 может применяться обнаруженная у арабидопсиса эндонуклеаза ENDO-1 из семейства S1, способная эффективно функционировать при рH = 7,5 и обладающая высокой специфичностью (41). ENDO-1 была задействована в TILLING-анализе гороха (*P. sativum*) (41, 42), томата (*S. lycopersicum*) (43), а также в EcoTILLING (методика проведения TILLING на природных популяциях для изучения вариабельности определенных локусов) с *A. thaliana* (42).

Применение технологий NGS для TILLING. Высокопроизводительные методы NGS (от англ. Next Generation Sequencing, секвенирование следующего поколения), позволяющие в одном эксперименте секвенировать миллионы последовательностей ДНК, за последние 10 лет получили широчайшее распространение в молекулярной генетике (44, 45). Благодаря NGS появилась возможность секвенировать полные геномы как модельных, так и практически ценных организмов. В TILLING-анализе NGS применяется в качестве быстрого и надежного способа детекции мутаций, не требующего никаких предварительных процедур, кроме амплификации целевого фрагмента.

Доступные современные платформы NGS включают 454-геномный секвенатор FLX и его меньшую версию, GS Junior, работающие по принципу пиросеквенирования (производитель «Roche Applied Science», Германия); системы HiSeq и HiSeqX на основе метода секвенирования синтезом (производитель «Illumina, Inc.», США); систему SOLiD (производитель «Applied Biosystems», США), и другие. Наиболее серьезным препятствием при внедрении NGS-технологий остается сравнительно высокая стоимость оборудования и реактивов, а также сложности, связанные с обработкой массива полученных данных методами биоинформатики. Тем не менее, NGS постепенно вытесняет устаревшие методы скрининга на основе расщепления эндонуклеазами; в настоящее время NGS используют такие крупные научные центры, как UC Davis Genome Center при Калифорнийском университете (США) и Unité de Recherche en Génomique Végétale (URGV) при Национальном институте сельскохозяйственных исследований (INRA, Франция).

Использование TILLING для изучения контроля симбиотической специфичности у гороха. Преимущества метода TILLING были оценены авторами настоящего обзора при изучении контроля специфичности взаимодействия гороха посевного (*P. sativum* L.) с эндосимбиотической клубеньковой бактерией Rhizobium leguminosarum bv. viciae. Известно, что у растений семейства бобовые (Fabaceae), к которому относится горох, важную роль в распознавании бактериальных симбионтов играют белки семейства LysM-RLK (от англ. LysM-receptor-like kinase, рецептор-подобная киназа с LysM доменами) (46-48). Благодаря этим белкам растение имеет возможность различить «своего» симбионта среди пула почвенных микроорганизмов, ориентируясь на специфическую структуру его сигнальной молекулы — Nod-фактора (от англ. Nodulation factor, фактор клубенькообразования). Рецептор и лиганд в этом случае работают по принципу «ключ-замок», и бактерия получает доступ в клетки хозяина только в том случае, если ее молекулярный «ключ» оказывается подходящим.

Предел специфичности бобово-ризобиального взаимодействия, как правило, находится на уровне видов. Однако в рамках вида у гороха посевного можно выделить контрастную группу генотипов, обладающих повышенной избирательностью к микросимбионту. Для успешного узнавания ризобии представителям указанной группы требуется особая модификация Nod-фактора (двойное ацетилирование), которая не имеет значения для всех прочих разновидностей гороха. Этот признак впервые был описан более 80 лет назад у растений, происходящих из Передней Азии, и получил название «афганского» фенотипа (49).

Ген, определяющий «афганский» фенотип, был назван *Sym2* (50) и картирован в I группе сцепления генома гороха (51). Природа, нуклеотидная последовательность гена *Sym2* и функция его белкового продукта остаются неизвестными до сих пор. Исходя из проявления «афганского» фенотипа, было высказано предположение, что белок Sym2 — это рецептор Nod-фактора, имеющий структурные и, как следствие, функциональные различия у «афганских» линий и линий с нормальной специфичностью симбиоза (так называемых «европейских» линий). Авторами был выявлен ген-кандидат на роль *Sym2* — неизвестный ранее ген LysM-RLK, назван-

ный *LykX*. К настоящему времени показано, что *LykX* обладает рядом признаков *Sym2*, в частности имеет аллельные состояния, строго коррелирующие с проявлением «афганского» фенотипа (52). Однако для того, чтобы сделать окончательное заключение о роли *LykX*, необходимо было обнаружить мутанты по этому гену и изучить их фенотип и аллельные взаимоотношения с «афганскими» генетическими линиям. Такая работа была осуществлена с использованием платформы TILLING, предоставленной Отделом изучения геномики растений Национального института сельскохозяйственных исследований (INRA, Франция).

Поиск мутаций был проведен в пределах четырех фрагментов гена LykX размером  $\sim 400$  п.н. В результате скрининга выявили 20 мутантных семей, в восьми из которых мутация потенциально приводит к нарушению функции белкового продукта (согласно in silico предсказаниям, программа SIFT) (53). В настоящее время проводится тест на аллелизм между индивидами, несущими мутацию в гене LykX, и «афганскими» генетическими линиями, по результатам которого можно будет окончательно подтвердить или опровергнуть гипотезу о соответствии LykX гену Sym2.

Таким образом, в современной науке изучение биологического процесса невозможно без изучения контролирующих его генов. Несмотря на успехи молекулярной генетики и появление высокоточных методов полногеномного секвенирования, работа с мутантами и в настоящее время остается одним из важнейших этапов генетических исследований. Метод TILLING, объединяющий в себе преимущества классического химического мутагенеза и современных подходов к обнаружению мутаций в заданном регионе, открывает новые горизонты не только в фундаментальной, но и в прикладной биологии, позволяя обнаруживать новые аллели исследуемых генов у любых, в том числе хозяйственно значимых, видов растений. Одним из примеров успешности применения стратегии TILLING может служить выявление авторами ряда мутантов гороха посевного по гену *LykX*, для которого предполагается важная роль в установлении азотфиксирующего симбиоза с клубеньковыми бактериями.

Несмотря на кажущуюся простоту метода TILLING, его использование сопряжено с рядом сложностей. Наиболее важным этапом остается создание коллекции мутантов надлежащего качества. Необходимо, в частности, соблюсти баланс между высокой частотой мутаций и выживаемостью мутагенизированных растений. Поколение  $M_2$  должно быть достаточно большим, чтобы обеспечить возможность нахождения мутации в любом гене интереса. Дополнительные затруднения могут возникнуть с видами, размножающимися преимущественно вегетативно, а также видами с долгим жизненным циклом. Наконец, значительную роль играет возможность точного обнаружения мутаций в любом анализируемом участке генома. Следует также помнить, что мутанты по некоторым генам получить невозможно, поскольку мутации в этих генах летальны для растения.

Итак, растущий интерес среди исследователей, создание новых платформ и разработка модификаций свидетельствуют о том, что метод TILLING (Targeting Induced Local Lesions in Genomes — поиск индуцированных локальных нарушений в геномах), предложенный около 15 лет назад в качестве альтернативы направленному мутагенезу, занял прочное место в арсенале инструментов современных молекулярных биологов и генетиков, изучающих развитие растений, и область его применения в дальнейшем будет только расширяться.

Авторы выражают благодарность А.Ю. Борисову (ВНИИСХМ, г. Санкт-Петербург) за дискуссии, пробудившие интерес к методологии TILLING.

### ФГБНУ Всероссийский НИИ сельскохозяйственной микробиологии,

196608 Россия, г. Санкт-Петербург—Пушкин, ш. Подбельского, 3, e-mail: sulan555@mail.ru

Поступила в редакцию 30 марта 2015 года

Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [Agricultural Biology], 2015, V. 50, № 3, pp. 288-297

## TILLING: THE MODERN TECHNOLOGY IN «REVERSE» GENETIC OF PLANTS

(review)

A.S. Sulima, V.A. Zhukov

All-Russian Research Institute for Agricultural Microbiology, Federal Agency of Scientific Organizations, 3, sh. Podbel'skogo, St. Petersburg, 196608 Russia, e-mail sulan555@mail.ru
Supported by Russian Foundation for Fundamental Research (grants 14-04-32289-mol\_a and 14-04-01442-a)
Received March 30, 2015

doi: 10.15389/agrobiology.2015.3.288eng

#### Abstract

There are two basic approaches in genetic studies called «forward» and «reverse» genetics. While the «forward» genetics studies the inheritance of traits (phenotype) in living organisms and identifies genetic factors that influence the expression of these traits (working on the principle of «from phenotype to genotype»), the «reverse» genetics reveals the function of gene by changing its structure or activity with subsequent analysis of the associated changes in phenotype (the «from genotype to phenotype» principle). With the development of large-scale genomic sequencing technologies the «reverse» genetics received substantial support, taking the leading position both in scientific and applied fields. Basic principles underlying the novel method of «reverse» genetics called TILLING (for Targeting Induced Local Lesions IN Genomes) are reviewed in this paper. TILLING combines the classic mutation analysis with modern approaches to detecting the nucleotide substitutions in a target locus in genome. The method is highly effective and is applicable to a wide range of biological objects, thereby winning a world-wide recognition. The key stages of preparation for TILLING analysis are described: obtaining of mutagenized population and development of TILL-ING platform, which includes the organized collection of mutants and database with information about the collection. The main approaches to the detection of point mutations currently used worldwide, including new approaches based on NGS methods (Next Generation Sequencing), are presented. The technical requirements crucial for the successful conducting of TILLING-analysis, as well as variations and modifications of existing techniques designed to solve various scientific tasks, are highlighted. The results obtained using the TILLING method by the group of authors in their research of specificity of partners recognition during the development of mutualistic symbiosis between the garden pea (Pisum sativum L.) and nodule bacteria Rhizobium leguminosarum bv. viciae are also presented. Authors were able to identify a number of mutants in pea receptor kinase gene LykX, which is the most likely candidate for the determinant of plant's increased selectivity toward bacterial microsymbionts. Further study of obtained mutants will help to reveal the function of LykX and its role in symbiosis between pea and nodule bacteria.

Keywords: plant genetics, «reverse» genetics, TILLING, detection of mutations, pea, «Afghan» phenotype.

### REFERENCES

- 1. Eisenberg D., Marcotte E.M., Xenarios I., Yeates T.O. Protein function in the post-genomic era. *Nature*, 2000, 405(6788): 823-826 (doi: 10.1038/35015694).
- 2. Griffiths P.E., Stotz K. Genes in the postgenomic era. *Theor. Med. Bioeth.*, 2006, 27(6): 499-521 (doi: 10.1007/s11017-006-9020-y).
- 3. H s i a o A., K u o M.D. High-throughput biology in the postgenomic era. *J. Vasc. Interv. Radiol.*, 2009, 20(7 Suppl.): S488-496 (doi: 10.1016/j.jvir.2009.04.040).
- 4. Mendel' G. *Opyty nad rastitel'nymi gibridami* /Pod redaktsiei A.E. Gaisinovicha [Experiments on Plant Hybrids. A.E. Gaisinovicha (ed.)]. Moscow, 1965.
- 5. Lutova L.A., Ezhova T.A., Dodueva I.E., Osipova M.A. *Genetika razvitiya rastenii: dlya biologicheskikh spetsial'nostei universitetov*/Pod redaktsiei S.G. Inge-Vechtomova [Genetics of plant development. S.G. Inge-Vechtomova (ed.)]. St. Petersburg, 2010.
- 6. In ge-Vechtomov S.G. *Genetika s osnovami selektsii* [Genetics and the basic breeding principles]. St. Petersburg, 2010.
- 7. Struhl K. The new yeast genetics. *Nature*, 1983, 305: 391-397 (doi: 10.1038/305391a0).
- 8. Reski R. *Physcomitrella* and *Arabidopsis*: the David and Goliath of reverse genetics. *Trends Plant Sci*, 1998, 3(6): 209-210 (doi: 10.1016/S1360-1385(98)01257-6).
- 9. Alonso J.M., Ecker J.R. Moving forward in reverse: genetic technologies to enable genome-

- wide phenomic screens in Arabidopsis. Nat. Rev. Genet., 2006, 7: 524-536 (doi: 10.1038/nrg1893).
- S m all I. RNAi for revealing and engineering plant gene functions. Curr. Opin. Biotechnol., 2007, 18: 148-153 (doi: 10.1016/j.copbio.2007.01.012).
- 11. Boutros M., Ahringer J. The art and design of genetic screens: RNA interference. *Nat. Rev. Genet.*, 2008, 9: 554-566 (doi: 10.1038/nrg2364).
- 12. Hirochika H. Insertional mutagenesis with Tos17 for functional analysis of rice genes. *Breed. Sci.*, 2010, 60: 486-492 (doi: 10.1270/jsbbs.60.486).
- 13. Bolle C., Schneider A., Leister D. Perspectives on systematic analyses of gene function in *Arabidopsis thaliana*: new tools, topics and trends. *Curr. Genomics*, 2011, 12(1): 1-14 (doi: 10.2174/138920211794520187).
- Upadhyaya N.M., Zhu Q.-H., Bhat R.S. Transposon insertional mutagenesis in rice.
   In: Plant reverse genetics, methods and protocols, methods in molecular biology. A. Pereira (ed.). Springer Science + Business Media, LLC, 2011 (doi: 10.1007/978-1-60761-682-5 12).
- 15. Barrangou R., Fremaux C., Deveau H., Richards M., Boyaval P., Moineau S., Romero D.A., Horvath P. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science*, 2007, 315(5819): 1709-1712 (doi: 10.1126/science.1138140).
- Liu L., Fan X.D. CRISPR-Cas system: a powerful tool for genome engineering. *Plant Mol. Biol.*, 2014, 85(3): 209-218 (doi: 10.1007/s11103-014-0188-7).
- 17. McCallum C.M., Comai L., Greene E.A., Henikoff S. Targeting Induced Local Lesions IN Genomes (TILLING) for plant functional genomics. *Plant Physiol.*, 2000, 123: 439-442 (doi: 10.1104/pp.123.2.439).
- 18. Till B.J., Reynolds S.H., Greene E.A., Codomo C.A., Enns L.C., Johnson J.E., Burtner C., Odden A.R., Young K., Taylor N.E., Henikoff J.G., Comai L., Henikoff S. Large-scale discovery of induced point mutations with high-throughput TILL-ING. *Genome Res.*, 2003, 13: 524-530 (doi: 10.1101/gr.977903).
- 19. Greene E.A., Codomo C.A., Taylor N.E., Henikoff J.G., Till B.J., Reynolds S.H., Enns L.C., Burtner C., Johnson J.E., Odden A.R., Comai L., Henikoff S. Spectrum of chemically induced mutations from a large-scale reverse-genetic screen in *Arabidopsis. Genetics*, 2003, 164(2): 731-740.
- 20. Alonso J.M., Stepanova A.N., Leisse T.J., Kim C.J., Chen H., Shinn P., Stevenson D.K., Zimmerman J., Barajas P., Cheuk R., Gadrinab C., Heller C., Jeske A., Koesema E., Meyers C.C., 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 D.E., Marchand T., Risseeuw E., Brogden D., Zeko A., Crosby W.L., Berry C.C., Ecker J.R. Genome-wide insertional mutagenesis of Arabidopsis thaliana. Science, 2003, 301: 653-657 (doi: 10.1126/science.1086391).
- 21. 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(4): 371-390 (doi: 10.1007/s13353-011-0061-1).
- 22. Henikoff S., Comai L. Single-nucleotide mutations for plant functional genomics. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 2003, 54: 375-401 (doi: 10.1146/annurev.arplant.54.031902.135009).
- 23. Talamè V., Bovina R., Sanguineti M.C., Tuberosa R., Lundqvist U., Salvi S. TILLMore, a resource for the discovery of chemically induced mutants in barley. *Plant Biotechnol. J.*, 2008, 6: 477-485 (doi: 10.1111/j.1467-7652.2008.00341.x).
- 24. Caldwell D.G., McCallum N., Shaw P., Muehlbauer G.J., Marshall D.F., Waugh R. A structured mutant population for forward and reverse genetics in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant J.*, 2004, 40: 143-150 (doi: 10.1111/j.1365-313X.2004.02190.x).
- 25. Sadiq M.F., Owais W.M. Mutagenicity of sodium azide and its metabolite azidoalanine in *Drosophila melanogaster. Mutat. Res.*, 2000, 469: 253-257 (doi: 10.1016/S1383-5718(00)00079-6).
- 26. Rogers C., Wen J., Chen R., Oldroyd G. Deletion-based reverse genetics in *Medicago truncatula*. *Plant Physiol.*, 2009, 151: 1077-1086 (doi: 10.1104/pp.109.142919).
- 27. Li X., Song Y., Century K., Straight S., Ronald P., Dong X., Lassner M., Zhang Y. A fast neutron deletion mutagenesis-based reverse genetics system for plants. *Plant J.*, 2001, 27: 235-242 (doi: 10.1046/j.1365-313x.2001.01084.x).
- 28. Achaz G., Netter P., Coissac E. Study of intrachromosomal duplications among the eukaryote genomes. *Mol. Biol. Evol.*, 2001, 18: 2280-2288 (doi: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a003774).
- 29. Jander G., Barth C. Tandem gene arrays: a challenge for functional genomics. *Trends Plant Sci.*, 2007, 12: 203-210 (doi: 10.1016/j.tplants.2007.03.008).
- 30. Gottwald S., Bauer P., Komatsuda T., Lundqvist U., Stein N. TILLING in the two-rowed barley cultivar «Barke» reveals preferred sites of functional diversity in the gene HvHox1. *BMC Res. Notes*, 2009, 2: 258 (doi: 10.1186/1756-0500-2-258).
- 31. Perry J.A., Wang T.L., Welham T.J., Gardner S., Pike J.M., Yoshida S., Parniske M. A TILLING reverse genetics tool and a web accessible collection of mutants of the legume *Lotus japonicus*. *Plant Physiol.*, 2003, 131: 866-871 (doi: 10.1104/pp.102.017384).
- 32. Stephenson P., Baker D., Girin T., Perez A., Amoah S., King G.J., Østergaard L. A rich TILLING resource for studying gene function in *Brassica rapa. BMC Plant*

- Biol., 2010, 10: 62 (doi: 10.1186/1471-2229-10-62).
- 33. Dalmais M., Schmidt J., Le Signor C., Moussy F., Burstin J., Savois V., Aubert G., Brunaud V., de Oliveira Y., Guichard C., Thompson R., Bendahmane A. UTILLdb, a *Pisum sativum* in silico forward and reverse genetics tool. *Genome Biol.*, 2008, 9: R43 (doi: 10.1186/gb-2008-9-2-r43).
- 34. Till B.J., Cooper J., Tai T.H., Colowit P., Greene E.A., Henikoff S., Comai L. Discovery of chemically induced mutations in rice by TILLING. *BMC Plant Biol.*, 2007, 7: 19 (doi: 10.1186/1471-2229-7-19).
- 35. Chawade A., Sikora P., Bräutigam M., Larsson M., Vivekanand V., Na-kash M.A., Chen T., Olsson O. Development and characterization of an oat TILLING-population and identification of mutations in lignin and β-glucan biosynthesis genes. *BMC Plant Biol.*, 2010, 10: 86 (doi: 10.1186/1471-2229-10-86).
- 36. Himelblau E., Gilchrist E.J., Buono K., Bizzell C., Mentzer L., Vogelzang R., Osborn T., Amasino R.M., Parkin I.A., Haughn G.W. Forward and reverse genetics of rapid-cycling *Brassica oleracea*. Theor. Appl. Genet., 2009, 118: 953-961 (doi: 10.1007/s00122-008-0952-7).
- 37. Underhill P.A., Jin L., Lin A.A., Mehdi S.Q., Jenkins T., Vollrath D., Davis R.W., Cavalli-Sforza L.L., Oefner P.J. Detection of numerous Y chromosome biallelic polymorphisms by denaturing high-performance liquid chromatography. *Genome Res.*, 1997, 7(10): 996-1005 (doi: 10.1101/gr.7.10.996).
- 38. Colbert T., Till B.J., Tompa R., Reynolds S., Steine M.N., Yeung A.T., McCallum C.M., Comai L., Henikoff S. High-throughput screening for induced point mutations. *Plant Physiol.*, 2001, 126: 480-484 (doi: 10.1104/pp.126.2.480).
- 39. Oleykowski C.A., Bronson Mullins C.R., Godwin A.K., Yeung A.T. Mutation detection using a novel plant endonuclease. *Nucl. Acids Res.*, 1998, 26: 4597-4602 (doi: 10.1093/nar/26.20.4597).
- 40. Till B.J., Burtner C., Comai L., Henikoff S. Mismatch cleavage by single-strand specific nucleases. *Nucl. Acids Res.*, 2004, 32: 2632-2641 (doi: 10.1093/nar/gkh599).
- 41. Triques K., Sturbois B., Gallais S., Dalmais M., Chauvin S., Clepet C., Aubourg S., Rameau C., Caboche M., Bendahmane A. Characterization of *Arabidopsis thaliana* mismatch specific endonucleases: application to mutation discovery by TILLING in pea. *Plant J.*, 2007, 51(6): 1116-1125 (doi: 10.1111/j.1365-313X.2007.03201.x).
- 42. Triques K., Piednoir E., Dalmais M., Schmidt J., Le Signor C., Sharkey M., Caboche M., Sturbois B., Bendahmane A. Mutation detection using ENDO1: application to disease diagnostics in humans and TILLING and Eco-TILLING in plants. *BMC Mol. Biol.*, 2008, 9: 42 (doi: 10.1186/1471-2199-9-42).
- Minoia S., Petrozza A., D'Onofrio O., Piron F., Mosca G., Sozio G., Cellini F., Bendahmane A., Carriero F. A new mutant genetic resource for tomato crop improvement by TILLING technology. *BMC Res. Notes*, 2010, 3: 69 (doi: 10.1186/1756-0500-3-69).
- 44. Niedring haus T.P., Milanova D., Kerby M.B., Snyder M.P., Barron A.E. Landscape of next-generation sequencing technologies. *Anal. Chem.*, 2011, 83: 4327-4341 (doi: 10.1021/ac2010857).
- 45. Pareek C.S., Smoczynski R., Tretyn A. Sequencing technologies and genome sequencing. *J. Appl. Genet.*, 2011, 52: 413-435 (doi: 10.1007/s13353-011-0057-x).
- 46. Radutoiu S., Madsen L.H., Madsen E.B., Felle H.H., Umehara Y., Grønlund M., Sato S., Nakamura Y., Tabata S., Sandal N., Stougaard J. Plant recognition of symbiotic bacteria requires two LysM receptor-like kinases. *Nature*, 2003, 425: 585-592 (doi: 10.1038/nature02039).
- 47. Limpens E., Franken C., Smit P., Willemse J., Bisseling T., Geurts R. LysM domain receptor kinases regulating rhizobial Nod factor-induced infection. *Science*, 2003, 302(5645): 630-633 (doi: 10.1126/science.1090074).
- 48. Zhukov V., Radutoiu S., Madsen L.H., Rychagova T., Ovchinnikova E., Borisov A., Tikhonovich I., Stougaard J. The pea Sym37 receptor kinase gene controls infection-thread initiation and nodule development. *Mol. Plant Microbe Interact.*, 2008, 21(12): 1600-1608 (doi: 10.1094/MPMI-21-12-1600).
- 49. Razumovskaya Z.G. Mikrobiologiya, 1937, 6(3): 321-328.
- 50. Lie T.A. Temperature-dependent root-nodule formation in pea cv. *Iran. Plant Soil*, 1971, 34: 751-752 (doi: 10.1007/BF01372829).
- 51. Kozik A., Geurts R., Heidstra R., Kulikova O., Ellis T.H.N., Bisseling T., La Rue T., Weeden N. Detailed map of the *sym2* region of pea linkage group I. In: *Fine mapping of the sym2 locus of pea linkage group I. PhD thesis.* Wageningen University. Wageningen, 1996.
- 52. Zhukov V.A., Sulima A.S., Porozov Y.B., Borisov A.Y., Tikhonovich I.A. Polymorphism in gene sequence of LysM receptor kinase is associated with Sym2-controlled nodulation in pea (*Pisum sativum L.*). *Proc. 18th Int. Conf. on Nitrogen Fixation*. Myazaki, Japan, 2013: 76.
- 53. Sim N.-L., Kumar P., Hu J., Henikoff S., Schneider G., Pauline C. Ng. SIFT web server: predicting effects of amino acid substitutions on proteins. *Nucl. Acids Res.*, 2012, 40(Web Server issue): W452-W457 (doi: 10.1093/nar/gks539).