愛媛大学農学部紀要 65 号: 27-33 (2020)

Bulletin of Faculty of Agriculture, Ehime University, 65: 27-33 (2020)

Hirotaka TODA, Hiroshi INOUE, Shoya OGAWA, and Takashi YAENO

Optimization of the CEL I Endonuclease Reaction in the TILLING Screening System of the Hull-less Barley

Abstract

TILLING (Targeting Induced Local Lesions IN Genomes) is a reverse genetic method based on the combination of "generation of the mutant population", "preparation of genomic DNA library" and "detection of a gene of interest". Simultaneous screening of mutations in a huge number of plants can reduce the breeding time, cost, and space. In addition, mutant strains obtained by TILLING are not genetically modified organisms and therefore can be grown in the field. In this study, to establish the TILLING-based screening system in the hull-less barley cultivar 'Mannenboshi', we developed a recombinant expression system in *Nicotiana benthamiana* for the large-scale synthesis of a mismatch-specific endonuclease, CEL I, which is a key component of the screening, and optimized the reaction conditions of the recombinant enzyme. As a result, various single nucleotide polymorphisms could be detected by the recombinant CEL I, and the activity was higher at 27.5 mM and 50 mM potassium chloride in the reaction buffer. These results demonstrate that the recombinant CEL I and the reaction system can be used to screen the mutant population of approximately 8,000 lines that we have already generated.

Key words: barley, Targeting Induced Local Lesions In Genomes (TILLING), breeding

1. 緒言

オオムギは種子の形態により,実に穎がついたまま の皮麦と穎が容易に外れるはだか麦に分けられる.日 本のはだか麦の主要産地は愛媛県であり,その収穫量 は全国の約35%を占め,34年連続日本一である.愛媛 県の主要品種'マンネンボシ'は,2001年に奨励品種 に採用された,良質多収で耐倒伏性が強い優良品種で ある(兼頭ら2005).しかしながら,気象条件や栽培 条件によって硝子率が高くなるという問題があり,さ らなる品種改良が必要とされている.

従来の育種方法では,遺伝的背景の異なる個体同士 の交雑により多くの系統を作出し,得られた各系統に ついて形質を評価して,優れた系統のみを選抜するこ

2020年9月7日受領

*愛媛大学農学部植物病学教育分野(責任著者)

とで新品種を作出してきた.しかしこの方法では,多 くの系統ごとに形質を確認しながら選抜を行う必要が あるため,長い期間と労力がかかることが課題とされ ている.

TILLING (Targeting Induced Local Lesions IN Genomes) は、突然変異集団の中から任意の遺伝子の変異個体を スクリーニングするためのハイスループットな逆遺伝 学的な手法である (McCallum et al., 2000). 任意の遺伝 子について多くの個体を同時にスクリーニングするこ とで、時間短縮、コスト削減、省スペース化が可能に なる. また遺伝子組み換えではないため、社会に広く 受け入れられる技術であり、形質転換が困難な生物種 にも適用できるだけでなく、屋外での大規模栽培が可 能である. 実際に TILLING の技術を用いて、低グルテ ン且つ高リジンのコムギが開発されている (Moehs et al., 2019).

TILLING は一般的に以下の手順で実施される(図1

²⁰²⁰年11月21日受理



図1 はだか麦の TILLING の概要

; Kurowska et al., 2011; Wang et al., 2012). まず, アジ化 ナトリウム (NaN₃) などの変異原を種子に処理して変 異を誘発する. その変異原処理した種子を M1 種子と して播種し,形質を固定させるために自家受粉させて 得られた次世代を M2 とする. M2 世代で1 個体ごとに ゲノム DNA を抽出してゲノム DNA ライブラリーを作 製すると共に、1個体ごとに M3種子を収穫する.変異 検出を迅速に行うために 4~8 個体のゲノム DNA をま とめた DNA プールを作製し、これを鋳型に任意の遺 伝子領域を PCR により増幅する. その PCR 産物を熱 変性して一本鎖にした後、徐々に冷やして再び二本鎖 に戻すことでヘテロ鎖を形成させる. そこヘミスマッ チ特異的エンドヌクレアーゼ CEL I を反応させてアガ ロースゲル電気泳動でヘテロ二本鎖の切断の有無を調 べ,任意の遺伝子の変異個体の存在を検出する.最終 的にそれぞれの個体ごとにシーケンス解析等を行うこ とで、変異個体の単離が可能になる.

TILLING における変異の検出には CEL I を用いて行 うことが多い. CEL I はセロリ(Apium graveolens) で 発見された,塩基のミスマッチを特異的に認識して切 断するエンドヌクレアーゼであり,一塩基多型(SNP) の検出にも使われている. この CEL I を大量に抽出す

るために、我々はベンサミアナタバコを用いてリコン ビナント CEL I タンパク質の大量合成系を構築してき た. 多数の集団の中から正確に変異個体を検出するた めには CEL Iエンドヌクレアーゼの反応系の最適化 を行う必要がある.そこで本研究では、数多くの SNP が報告されているオオムギの MLO (mildew resistance *locus O*) 遺伝子の DNA 断片を反応基質として用いて 反応系の最適化を行った. MLO 遺伝子は7回膜貫通型 タンパク質をコードしている (Devoto et al., 1999). そ の機能は未だに判明していないが, MLO 遺伝子に変異 が入ることでオオムギの重要病害であるオオムギうど んこ病菌 (Blumeria graminis f. sp. hordei) に対して、レ ース非特異的な侵入抵抗性が発揮されることが知られ ている(Jørgensen, 1992). mlo は変異箇所によって MLO タンパク質の蓄積量が異なり、オオムギうどんこ病菌 に対する抵抗性の強さに違いが見られることが報告さ れている (Reinstadler et al, 2010). 本研究では, 484 番 目のチミン (T) がアデニン (A) に変異している mlo-1 $(T^{484} \rightarrow A)$ に加え、mlo-12 (C⁷²⁰ → A)、mlo-13 (T⁸⁹ → A), mlo-26 ($T^{809} \rightarrow A$), mlo-27 ($G^{953} \rightarrow A$), mlo-28 (C^{665} \rightarrow T), mlo-29 (C¹⁰⁰¹ \rightarrow T), mlo-41 (G⁶²⁶ \rightarrow A), mlo-42 (C⁵⁶⁰→T) を解析対象とした.

表 1	本研究に用いた	pGEM-MLO	プラスミド
-----	---------	----------	-------

プラスミド名	mlo 変異箇所
pGEM-MLO	野生型
pGEM-mlo-1	$T^{484} \rightarrow A$
pGEM-mlo-12	$C^{720} \rightarrow A$
pGEM-mlo-13	$T^{89} \rightarrow A$
pGEM-mlo-26	$T^{809} \rightarrow A$
pGEM-mlo-27	$G^{953} \rightarrow A$
pGEM-mlo-28	$C^{665} \rightarrow T$
pGEM-mlo-29	$C^{1001} \rightarrow T$
pGEM-mlo-41	$G^{626} \rightarrow A$
pGEM-mlo-42	$C^{560} \rightarrow T$

2. 材料および方法

2.1. リコンビナントCEL I タンパク質を用いた塩基 のミスマッチの検出

pGEM-MLO 及び pGEM-mlo プラスミド (表 1) をテ ンプレートに, DNA Polymerase (タカラバイオ株式会 社, Prime STAR Max もしくは TaKaRa Ex Taq)を用い て PCR を行った. 図 3,4 では, プライマーAcs1_MLO-F 及び MLO_Not1-R のセット, 図 5, 6, 7 ではプライマ ーcaccMLO-F 及び MLOmorex-R のセットを使用した (表 2). PCR 産物をアガロースゲル電気泳動した後,

目的のバンドを切り出し, FastGene Gel/PCR Extraction (日本ジェネティクス株式会社)を用いて *MLO* (*mlo*) 遺伝子の DNA 断片を精製した.サーマルサイクラー

(Gene Touch, 日本ジェネティクス株式会社)を用い て,図2のサイクルで熱変性及びアニーリングを行い, ヘテロ鎖及びホモ鎖を作製した.

ヘテロ鎖及びホモ鎖をそれぞれ別々の 200 μ L チュ ーブへ入れた.そこへ 10x CEL I 反応バッファー2 μ L, リコンビナント CEL I タンパク質を加え, dH₂O で全量 を20 μ Lにした. 10x 反応バッファーの組成は 200 mM HEPES pH 7.5, 100 mM KCl, 30 mM MgCl₂ であり,反 応バッファーの組成の検証の際には,適宜組成を変更 して同様の手順でミスマッチ特異的エンドヌクレアー ゼ活性を調査した.サーマルサイクラーを用いて 45°

表2 本研究に用いたプライマー

プライマー	配列(5'→3')
caccMLOmorex-F	CACCATGTCGGACAAAAAAGGGGGT
MLOmorex-R	TCATCCCTGGCTGAAGGAAAAATC
Ascl_MLO-F	ctaggcgcgccATGTCGGACAAAAAAGGGGT
MLO_Notl-R	ctagcggccgcTCATCCCTGGCTGAAGGAAAAATC

C で 30 分間反応させた後,2%アガロースゲルにロー ドして電気泳動し,エチジウムブロマイド(EtBr)溶 液を用いて染色することでミスマッチの切断を確認し た.



3. 結果

pGEM-MLO 及び pGEM-mlo-1 を鋳型として, *MLO* あるいは *mlo* を増幅し, 精製して得られた DNA 断片 を用いて調査した(図 3). *mlo-1* は 484 番目のチミン (T) がアデニン(A) に置換したアレル($T^{484} \rightarrow A$) であり, ヘテロ鎖がミスマッチ特異的に切断された場 合 495 bp と 1129 bp のバンドが見られる. リコンビナ ント CEL I タンパク質を反応させたホモ鎖では *MLO* 遺 伝子の DNA 断片(1624 bp)だけが見られた. 一方, ヘテロ鎖にリコンビナント CEL I タンパク質を反応さ せると, *MLO*(*mlo*)遺伝子の DNA 断片以外に, 切断 されてできた 2 本のバンドが想定された位置に見られ た(図 3). そのため, リコンビナント CEL I タンパク 質がミスマッチを特異的に認識して切断するエンドヌ クレアーゼ活性を有することが示された.

次に T→A 以外の塩基置換,及び T⁴⁸⁴→A 以外の箇 所での T→A 塩基置換の検出が可能かどうかを検証し た(図 4).作製した pGEM-MLO 及び pGEM-mlo(表 1) を鋳型に *MLO* あるいは *mlo* 断片を増幅し,精製して得 られた DNA 断片を用いた.リコンビナント CEL I タン パク質によって,*mlo-12* (C^{720} →A) (図 4A), *mlo-26* (T^{809} →A) (図 4B), *mlo-27* (G^{953} →A) (図 4A), *mlo-28* (C^{665} →T) (図 4C), *mlo-42* (C^{560} →T) (図 4D) のへ テロ鎖の切断を明確に確認できたが, *mlo-29* (C^{1001} →T) (図 4C), *mlo-41* (G^{626} →A) (図 4D) では切断が起こ っているように見られるがバンドの検出が難しく, *mlo-13* (T^{89} →A) (図 4A) では切断を確認することが できなかった.



図3 リコンビナント CELI タンパク質のミスマッチ特異的エンドヌクレアーゼ活性 A,本実験に用いた MLO遺伝子断片の塩基配列.__は塩基置換の箇所,矢印の先のアルファベットは変異体の塩基を 示す. B, pGEM-MLO 及び pGEM-mlo-1を鋳型にプライマーAcsl_MLO-F 及び MLO_Not I-R で PCR した後に精製した MLO (mlo-1) 断片 (1624 bp)を用いた.全量 20 µL の系でリコンビナント CELI タンパク質を 45℃で 30 分間反応さ せた. M は分子量マーカー,矢頭は切断された DNA 断片を示す. hm はホモ鎖, ht はヘテロ鎖を示す.

CEL I エンドヌクレアーゼについての報告は複数存 在するが、CEL I を反応させる際に用いる反応バッフ ァーの組成は様々である.そこで本研究では、緩衝剤、 KCI 濃度、金属イオンについて CEL I 活性が高まる最 適な反応条件の検討を行った.セロリから粗抽出した CEL I を用いる場合、反応バッファー中の緩衝剤とし て HEPES が用いられている(Colbert et al., 2001; Till et al., 2004; Till et al., 2006; Zolala et al., 2009; Jiang et al., 2013). 一方、ゲルろ過精製した CEL I やリコンビナン ト CEL I タンパク質では、反応バッファーの緩衝剤と して Tris が用いられることがある(Oleykowski et al., 1998).我々が以前作製したリコンビナント CEL I タン パク質の反応において、両者の間に違いが見られるか 否かを調査した(図 5, 6, 7).結果として、いずれの 緩衝剤を用いてもリコンビナント CEL I タンパク質に よってヘテロ鎖を切断することができ、その程度に差 は見られなかった.

CEL I 反応バッファー中の KCl 終濃度を 10 mM とし ている報告(Yang et al., 2000; Pimkin et al., 2007)と, 25 mM としている報告(Oleykowski et al., 1998)があ る. 最適な KCl 濃度を調査するため, CEL I 反応バッ ファー中の終濃度を 0 mM, 10 mM, 25 mM, 50 mM, 100 mM にして, リコンビナント CEL I タンパク質のミ スマッチ特異的エンドヌクレアーゼ活性を調査した (図 6).本研究では KCl 濃度 50 mM を含むホモ鎖断 片及びヘテロ鎖断片の溶液をそれぞれ 2 µL 用いたた め,リコンビナント CEL I タンパク質反応系全体とし ての KCl 濃度は,それぞれ 5 mM, 14 mM, 27.5 mM, 50 mM, 95 mM となっている.CEL I 反応バッファー 中の KCl 濃度が 25 mM 及び 50 mM, すなわち,反応



図4 リコンビナント CELI タンパク質を用いた様々な塩基置換の検出

pGEM-MLO 及び pGEM-mlo を鋳型にプライマーAscl_MLO-F 及び MLO-Notl-R を用いて PCR した後に精製した *MLO* (*mlo*) 断片 (1624 bp) を使用し,全量 20 µL の系でリコンビナント CEL I タンパク質を 45℃, 30 分間反応させた. A, ミスマッチ 箇所で切断された場合, mlo-12 は 731 bp と 893 bp, mlo-13 は 100 bp と 1524 bp のバンドが見られる. B, ミスマッチ箇所で 切断された場合, mlo-26 は 820 bp と 804 bp, mlo-27 は 964 bp と 660 bp のバンドが見られる。C, ミスマッチ箇所で切断さ れた場合, mlo-28 は 676 bp と 948 bp, mlo-29 は 1012 bp と 612 bp のバンドが見られる. D, ミスマッチ箇所で切断された場 合, mlo-41 は 637 bp と 987 bp, mlo-42 は 571 bp と 1053 bp のバンドが見られるようになる. M は分子量マーカー, 矢頭は 切断された DNA 断片を示す. hm はホモ鎖, ht はヘテロ鎖を示す.



図 5 リコンビナント CEL I タンパク質の反応バッファーに おける緩衝剤の検証

pGEM-MLO 及び pGEM-mlo-1 を鋳型にプライマーcaccMLO-F 及び MLOmorex-R を用いて, PCR した後に精製した *MLO* (*mlo-1*) 断片 (1606 bp)を使用した. ヘテロ鎖及びホモ鎖 2 µL, 1×PCR buffer 8 µL に CEL I 反応バッファー (20 mM HEPES pH 7.5/20 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM KCl, 3 mM MgCl₂)を 2 µL 加え, 全量 20 µL の系でリ コンビナント CEL I タンパク質を 45℃, 30 分間反応させた. M は 分子量マーカー, 矢頭は切断された DNA 断片を示す.hm はホモ鎖, ht はヘテロ鎖を示す.

系全体の KCl 濃度が 27.5 mM 及び 50 mM でヘテロ鎖 の切断が明確に見られた.

セロリ由来の CEL II は、CEL I 同様ミスマッチ特異 的エンドヌクレアーゼであり、反応バッファー中の金 属イオンを Ca^{2+} や Sr^{2+} に替えることで活性が上昇する ことが報告されている(Mon et al., 2013).ことが報告 されている(Mon et al., 2013).そこで、反応バッファ ー中の金属イオンとして Mg^{2+} , Ca^{2+} , Sr^{2+} を用いて、



図 6 リコンビナント CEL I タンパク質の反応バッファーに おける KCI 濃度の検証

pGEM-MLO 及び pGEM-mlo-1 を鋳型にプライマーcaccMLO-F 及び MLOmorex-R を用いて, PCR した後に精製した *MLO* (*mlo-1*) 断片 (1606 bp) を使用した. A, HEPES バッファー及び B, Tris バッフ アー. ヘテロ鎖及びホモ鎖 2 μ L, 1×PCR buffer 8 μ L に CEL I 反応バ ッファー中の HEPES 及び Tris の終濃度を 20 mM に MgCl₂の終濃度 を 3 mM, KCl の終濃度を 0, 10, 25, 50, 100 mM として, 全量 20 μ L の系でリコンビナント CEL I タンパク質を 45°C, 30 分間反応さ せた. M は分子量マーカー, 矢頭は切断された DNA 断片を示す. hm はホモ鎖, ht はヘテロ鎖を示す.



図 7 リコンビナント CEL I タンパク質の反応バッファーに おける金属イオンの検証

pGEM-MLO 及び pGEM-mlo-1 を鋳型にプライマーcaccMLO-F 及び MLOmorex-R を用いて, PCR した後に精製した *MLO* (*mlo-1*) 断片 (1606 bp)を使用した. ヘテロ鎖及びホモ鎖 2 µL, 10×CEL I 反応 バッファー (200 mM HEPES pH 7.5/200 mM Tris-HCl pH 7.5, 500 mM KCl, 30 mM MgCl₂, CaCl₂, SrCl₂) 2 µL 加え, 全量 20 µL の系でリ コンビナント CEL I タンパク質を 45℃, 30 分間反応させた. M は 分子量マーカー, 矢頭は切断された DNA 断片を示す. hm はホモ鎖, ht はヘテロ鎖を示す.

それぞれで CEL I のミスマッチ特異的エンドヌクレア ーゼ活性を調査した(図7).その結果,全ての条件に おいてエンドヌクレアーゼ活性を示したことから,反 応バッファー中の金属イオンの種類によって,CEL I 活性に明確な差が生じないことが示唆された.

4. 考察

種々の変異を持つ MLO 遺伝子領域の DNA 断片を用 いることで、リコンビナント CELI タンパク質がミス マッチ特異的エンドヌクレアーゼ活性を有することが 強く示唆された(図3,4).しかしながら、リコンビ ナント CELI タンパク質を反応させるとホモ鎖、ヘテ ロ鎖に関わらず非特異的な切断によるスメアが見られ た. そのため、切断された DNA 断片のバンドを検出 できず,変異を見逃してしまう恐れがある. さらに, 本実験では MLO と mlo-1 の DNA 断片を 1:1 の割合で 混合して作製したヘテロ鎖を用いているが、実際の TILLING では4系統ごとにゲノム DNA を混合する予 定であり、多くても3:1の割合でしか変異が含まれな いため、本実験よりも少ない割合の変異を検出する必 要がある. そのため CELI 反応バッファーや CELI タ ンパク質の量などの反応条件をさらに最適化する必要 がある.

mlo-1 ($T^{484} \rightarrow A$) 以外の塩基置換や,置換箇所が異なる *mlo* アレルを用いて,リコンビナント CEL I タン パク質の活性についてさらに調査した.その結果 T→A だけでなく,G→A,C→T の塩基置換を検出できるこ とが明らかになった(図 4).しかし,*mlo-27* で検出で きた G→A の変異や *mlo-28* と *mlo-42* で検出できた C→T の変異を,それぞれ同じ塩基置換を有する *mlo-41*, *mlo-29* で検出することは難しかった. そのため,塩基 置換の周辺の配列がリコンビナント CEL I タンパク質 の活性に影響を与える可能性が考えられた.また, *mlo-13* (T^{98} →A) ではミスマッチの切断を確認するこ とができなかった. *mlo-13* は変異箇所で切断された場 合にできる断片がおおよそ 100 bp及び 1500 bpであり, 100 bp ほどの短い断片を検出するために,より多くの 切断された DNA 断片が必要である. 1500 bp 付近のバ ンドは切断前の DNA 断片の近傍にあるために,確認 が難しかったと考えられる.これらを検出するために は反応条件だけでなく,アガロースゲル電気泳動の条 件を検討する必要があるだろう.

最適な CEL I 反応バッファーについて検討するため に,緩衝剤の種類, KCl 濃度,金属イオンの種類につ いて調査した(図5, 6, 7). CEL I 反応バッファーの 緩衝剤として HEPES と Tris を比較したが, 両者の間に 明確な差は見られなかった(図 5, 6, 7). 一般的に, HEPES は pH 6.8~8.2 の範囲で緩衝能があり、 Tris は pH 7.2~9.2 の範囲で有効な緩衝能を発揮することが知 られている.両方の緩衝能がある範囲に CEL I が高い 活性を示す pH の範囲が収まっている (Kulinski et al., 2000) ことから、リコンビナント CEL I タンパク質の 活性に違いが見られなかったと考えられる. リコンビ ナント CEL I タンパク質の反応系における最適な KCl 終濃度について調査した結果, 25 mM 及び 50 mM で特 に活性が見られることが明らかになった(図 6). それ よりも多い 100 mM では、反応液中の KCI 濃度が過剰 となり、リコンビナント CEL I タンパク質の活性が阻 害され, 切断しづらくなったと考えられる. 一方, 0 mM, 10 mM では KCI 濃度が低すぎるため、リコンビナント CEL I タンパク質の特異性が低くなり、切断された断 片が見づらく、スメアが見られるようになったと考え られる. KCl 終濃度は、CEL I 反応系に入れる PCR 産 物の量によって若干変化してしまう. 例えば, CEL I 反応バッファー中の KCl 終濃度を 10 mM にして全量 20 µLの反応系にしたところに, KCl 濃度 50 mMの PCR 産物が10 μL 入ると, KCl 終濃度は30 mM となる. -方で PCR 産物が 2 μL 入ると, KCl 終濃度は 14 mM と なる. そのため,実際に TILLING を行う際は,任意の 遺伝子領域を安定的に増幅し、CEL I 反応系に入れる PCR 産物の量をなるべく一定にして、反応系全体の KCl 終濃度を 27.5 mM から 50 mM の間に収まるように する必要がある. CEL I 反応バッファーの 2 価の金属

イオンを Mg²⁺から Ca²⁺及び Sr²⁺に替えて, リコンビナ ント CEL I タンパク質を反応させたが, 活性に違いは 見られなかった(図7).本研究では CEL I 反応バッフ ァーにおける金属イオンの最適濃度については検証し ていない.しかし, 膨大な量の集団の中から迅速かつ 正確に変異個体を特定するためには最適な反応系を構 築することが必須であるため, 金属イオンの最適濃度 についても今後検証を行う.

引用文献

- Colbert, T., Till, B.J., Tompa, R., Reynolds, S., Steine, M.N., Yeung, A.T., McCallum, C.M., Comai, L., and Henikoff, S. (2001) High-throughput screening for induced point mutations, Plant Physiology 126: 480-484.
- Devoto, A., Piffanelli, P., Nilsson, I., Wallin, E., Panstruga, R., von Heijne, G., and Schulze-Lefert, P. (1999) Topology, subcellular localization, and sequence diversity of the Mlo family in plants, Journal of Biological Chemistry 274: 34993-35004.
- Jiang, G.Q., Yao, X.F., and Liu, C.M. (2013) A simple CEL I endonuclease-based protocol for genotyping both SNPs and InDels, Plant Molecular Biology Reporter. 31: 1325-1335
- Jørgensen, J.H. (1992) Discovery, characterization and exploitation of Mlo powdery mildew resistance in barley, Euphytica 63:141-152.
- 兼頭明宏・秋山勉・池内浩樹 (2005): 裸麦奨励品種 'マ ンネンボシ'の特性. 愛媛農試研報. 39:68-72..
- Kulinski, J., Besack, D., Oleykowski, C.A., Godwin, A.K., and Yeung, A.T. (2000) The CEL I enzymatic mutation detection assay, BioTechniques 29:44-48.
- Kurowska, M., Daszkowska-Golec, A., Gruszka, D., Marzec, M., Szurman, M., Szarejko, I., and Maluszynski, M. (2011) TILLING: a shortcut in functional genomics, Journal of Applied Genetics 52: 371-90.
- McCallum, C.M., Comai, L., Greene, E.A., and Henikoff, S. (2000) Targeted screening for induced mutations, Nature Biotechnology 18: 455-457.
- Moehs, C.P., Austill, W.J., Holm, A., Large, T.A.G.,

Loeffler, D., Mullenberg, J., Schnable, P.S., Skinner, W., Boxtel, J., Wu, L., and McGuire, C. (2019) Development of decreased-gluten wheat enabled by determination of the genetic basis of lys3a barley, Plant Physiology 179: 1692-1703.

- Mon, H., Lee, J., Fukushima, M., Nagata, Y., Fujii, M., Xu, J., Nishi, O., Iiyama, K., and Kusakabe, T. (2013) Production and characterization of celery mismatch endonuclease CEL II using baculovirus/silkworm expression system, Applied Microbiology and Biotechnology 97: 6813-6822
- Oleykowski, C.A., Bronson Mullins, C.R., Godwin, A.K., and Yeung, A.T. (1998) Mutation detection using a novel plant endonuclease, Nucleic Acids Research 26: 4597-4602.
- Pimkin, M., Caretti, E., Canutescu, A., Yeung, J.B., Cohn, H., Chen, Y., Oleykowski, C., Bellacosa, A., and Yeung, A.T. (2007) Recombinant nucleases CEL I from celery and SP I from spinach for mutation detection, BMC Biotechnology 7:29
- Reinstadler, A., Muller, J., Czembor, J.H., Piffanelli, P., and Panstruga, R. (2010) Novel induced mlo mutant alleles in combination with site-directed mutagenesis reveal functionaly important domains in the heptahelical barley Mlo protein, BMC Plant Biology 19: 10: 31.
- Till, B.J., Reynolds, S.H., Weil, C., Springer, N., Burtner, C., Young, K., Bowers, E., Codomo, C.A., Enns, L.C., and Odden, A.R., Greene, E.A., Comai, L., Henikoff, S. (2004) Discovery of induced point mutations in maize genes by TILLING, BMC Plant Biology 4:12.
- Till, B.J., Zerr, T., Comai, L., and Henikoff, S. (2006) A protocol for TILLING andEcotilling in plants and animals, Nature Protocols 1: 2465-2477.
- Wang, T.L., Uauy, C., Robson, F., and Till, B. (2012) TILLING in extremis, Plant Biotechnology Journal 10: 761-772.
- Yang, B., Wen, X., Kodali, N.S., Oleykowski, C.A., Miller, C.G., Kulinski, J., Besack, D., Yeung, J.A., Kowalski, D., and Yeung, A.T. (2000) Purification, cloning, and characterization of the CEL I nuclease, Biochemistry 39: 3533-3541.
- Zolala, J., Bahrami, A., Farsi, M., and Matin, M.M. (2009) Comparison of CEL I gene expression and mismatch-cleavage activity in some Apiaceae plants, Molecular Breeding 24: 17-24.