

JÓZEF KAPUSTA

*Instytut Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk
Noskowskiego 12/14, 61-704 Poznań*

TRANSFORMOWANIE ROŚLIN DWULIŚCIENNYCH PRZY UŻYCIU AGROBACTERIUM

AGROBACTERIUM JEST PATOGENEM WYWOŁUJĄCYM CHOROBE W WYNIKU KOŁONIZACJI GENETYCZNEJ ROŚLINY GOSPODARZA

W roku 1907 ukazał się w *Science* artykuł SMITHA i TOWNSEENDA, w którym autorzy wykazali, że przyczyną powstawania tumorowatych narośli na szyjce korzeniowej niektórych gatunków roślin są bakterie. Stąd wywodzi się angielska nazwa choroby crown gall disease co po polsku tłumaczy się jako choroba szyjki korzeniowej lub rak szyjki korzeniowej. Wiadomo obecnie, że czynnikiem sprawczym choroby jest wolno żyjąca bakteria glebowa *Agrobacterium tumefaciens*. Ponieważ rozwój choroby następuje w wyniku infekcji tkanki uprzednio zranionej, stąd u roślin uprawnych, które są poddawane mechanicznym zabiegom pielęgnacyjnym, guzowate narośla tworzą się najczęściej właśnie na szyjce korzeniowej. Inne bakterie o nazwie gatunkowej *Agrobacterium rhizogenes* wywołują schorzenie objawiające się powstawaniem w miejscu infekcji obfitej masy korzeni włosowatych. Zarówno *A. tumefaciens* jak i *A. rhizogenes* należą do rodziny *Rhizobiaceae*. Do tej samej rodziny należy także *A. radiobacter*, gatunek niewirulentny, niezdolny do infekcji oraz bardzo liczne gatunki rizobiów, które cechuje zdolność wchodzenia w związki symbiotyczne z roślinami motylkowatymi. Wiadomo obecnie, że agrobakteria poza nielicznymi wyjątkami infekują efektywnie jedynie rośliny dwuliścienne.

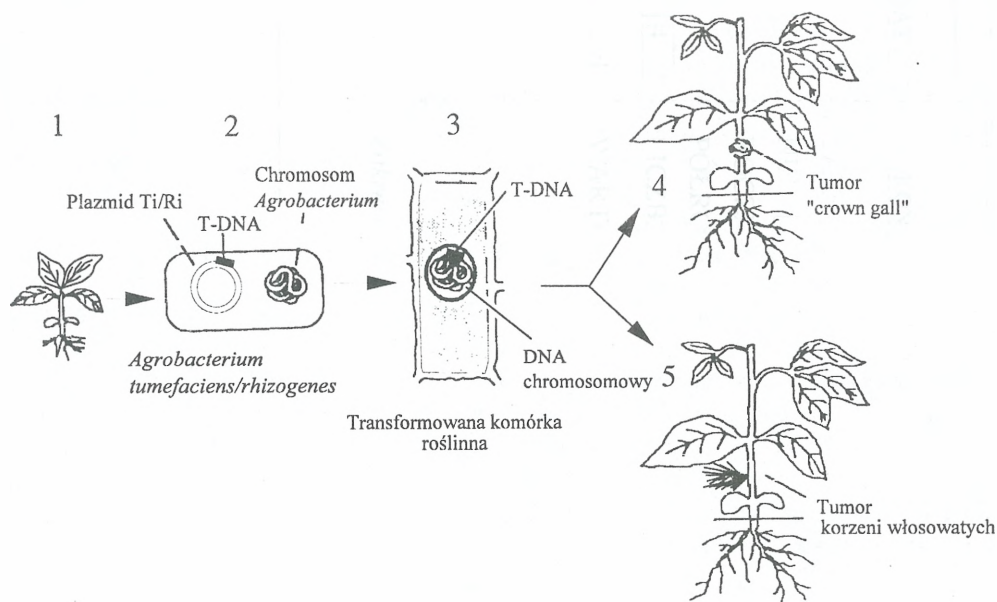
Badania prowadzone w Polsce na początku lat pięćdziesiątych przez Czosnowskiego po raz pierwszy wykazały, że sterylne tkanki tumorowe powstałe w wyniku infekcji bakterii charakteryzują się w warunkach *in vitro* zdolnością do wzrostu bez dodatku hormonów (CZOSNOWSKI 1952).

Kluczowym odkryciem dla zrozumienia mechanizmu powstawania tumorów roślinnych było stwierdzenie obecności u wirulentnych szczepów *A. tumefaciens* dużego pozachromosomalnego DNA w formie kowalentnie zamkniętego plazmidu, który zawiera geny uczestniczące w rozwoju tumoru (ZAENEN i współaut. 1974). Plazmid ten wielkości około 200 tys. par zasad (pz), mobilizowany do szczepu *A. tumefaciens* niezdolnego do infekcji powodował nabycie przezeń

właściwości tumorogennych, stąd nadano mu nazwę plazmidu indukującego tumory Ti (ang. tumor inducing plasmid) (Van LAREBEKE i współaut. 1975). Analogicznie plazmid, który w szczepach *A. rhizogenes* determinuje rozwój korzeni włosowatych, oznaczono Ri (ang. roots inducing plasmid). W wyniku badań nad biologią indukowania tumorów roślinnych prowadzonych w latach siedemdziesiątych w wielu laboratoriach na świecie wykazano, że skutkiem infekcji powodowanej przez *Agrobacterium* jest przeniesienie fragmentu plazmidu Ti do komórki roślinnej, a powstała w wyniku podziałów tej komórki narośl posiada właściwości tumorowe. Przenoszony do komórki roślinnej w następstwie infekcji przez *Agrobacterium* fragment DNA został oznaczony jako T-DNA (ang. transfer DNA). Fragment ten o wielkości około 20 tys. pz zostaje następnie włączony do genomu jądrowego komórki. Konsekwencją fizjologiczną wprowadzenia bakteryjnego DNA do komórki roślinnej jest przestawienie metabolizmu komórkowego na potrzeby patogena. Transformowane w ten sposób komórki roślinne rozpoczynają nieograniczoną biosyntezę znacznych ilości hormonów (auksyn i cytokinin), która stymuluje ich niekontrolowaną proliferację co prowadzi do powstania narośli o właściwościach tumoru. Ponadto są wytwarzane metabolity, pochodne aminokwasów, głównie argininy, jak na przykład oktopina lub nopalina oraz inne tak zwane opiny, które przez *Agrobacterium* są wykorzystywane jako źródło węgla i azotu.

Przedstawiony na rysunku 1 schemat interakcji *Agrobacterium* z komórką roślinną stanowi unikalny w przyrodzie przykład naturalnego przenoszenia genów pomiędzy światem bakterii i roślin. Dla określenia tego zjawiska przyjęł się termin „kolonizacja genetyczna”.

Odkrycie zasady przenoszenia informacji genetycznej z bakterii do komórek roślinnych spowodowało daleko idące praktyczne i teoretyczne konsekwencje

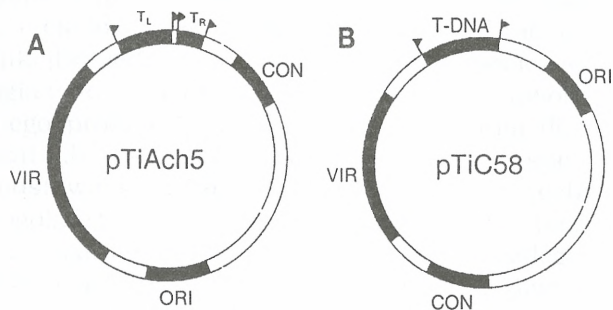


dla dalszego rozwoju biologii molekularnej i szeroko rozumianej biotechnologii roślin.

MOLEKULARNY MECHANIZM PRZENOSZENIA MATERIAŁU GENETYCZNEGO Z AGROBACTERIUM DO KOMÓRKI ROŚLINNEJ

Plazmidy stanowią bardzo ważny dla życia bakterii, dodatkowo, pozachromosomalny nośnik informacji genetycznej, który decyduje o dużej ich zmienności i potencjale adaptacyjnym. Charakterystyczną właściwością plazmidów jest zdolność do autonomicznej replikacji, w wyniku której często powstają dodatkowe kopie plazmidu. Plazmid Ti występuje w komórkach *Agrobacterium* w niewielkiej liczbie kopii (1–2), głównie z racji swej wielkości. Plazmid Ti o wielkości około 180–220 tys. pz znacznie przewyższa rozmiarami inne plazmidy bakteryjne. Podobnie jak większość plazmidów, plazmid Ti może być przenoszony z jednej komórki *Agrobacterium* do drugiej na drodze koniugacji.

Plazmidy *Agrobacterium* zawierają geny biosyntezy i katabolizmu opin, których występowanie u poszczególnych szczepów bakterii stało się podstawą dla ich klasyfikacji. Znaczny fragment plazmidu Ti stanowią geny odpowiedzialne za następujące funkcje: replikację, katabolizm opin i zdolność koniugacji. Na pozostałą część plazmidu składają się geny regionu wirulencji *vir* oraz region T-DNA, którego geny są przenoszone do komórki roślinnej (rys. 2). Na ogół



Rys. 2. Ogólny schemat organizacyjny plazmidu Ti szczepu oktopinowego (A) i nopalinowego (B) *Agrobacterium tumefaciens* (wg DRAPER i współaut. 1988).

Oznaczenia: T_L — lewy T-DNA, T_R — prawy T-DNA, CON — region kodujący funkcje koniugacji, ORI — region kodujący funkcje replikacji, VIR — region kodujący funkcje wirulencji.

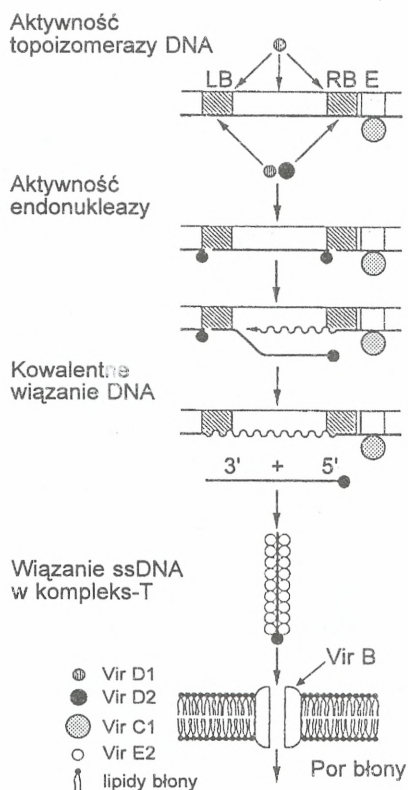
Rys. 1. Przenoszenie materiału genetycznego z *Agrobacterium tumefaciens* lub *A. rhizogenes* do komórki roślinnej. Wirulentny szczep *Agrobacterium* infekuje roślinę w miejscu zranienia (1). *Agrobacterium* oprócz DNA chromosomalnego zawiera plazmid Ti lub Ri (2). Region plazmidu Ti/Ri zwany T-DNA zostaje przeniesiony do komórki roślinnej, gdzie integruje z DNA na chromosomie roślinnym (3). Przeniesiony T-DNA koduje geny odpowiedzialne za produkcję hormonów wzrostu i opin. Podwyższony poziom hormonów (auksyn i cytokinin) stymuluje podziały i tworzenie tumoru z komórki stransformowanej przez *A. tumefaciens* (4). W przypadku *A. rhizogenes* przeniesione do komórki roślinnej geny dla auksyn oraz zmieniające wrażliwość na hormony geny rol powodują wyrastanie korzeni włosowatych (5). (wg BOND i GRESSHOFF 1993 — zmodyfikowane).

plazmidy Ti zawierają jeden region T-DNA, jedynie szczepy oktopinowe *A. tumefaciens* posiadają na plazmidzie Ti dwa odrębne odcinki T-DNA, lewy czyli T_L-DNA i prawy T_R-DNA. Każdy z tych regionów może być niezależnie przenoszony do komórki roślinnej. Znamionną właściwością genów znajdujących się w regionie T-DNA jest fakt, że ulegają one ekspresji w roślinie, ponieważ odcinki kodujące tych genów są otoczone sekwencjami regulacyjnymi — zarówno TATA od strony 5' odpowiadającą za start transkrypcji, jak i AATAAA na 3' końcu, która reguluje terminację transkrypcji, i stanowi sygnał poliadenylacji. Geny z regionu T-DNA posiadają również sekwencje, które są rozpoznawane przez eukariotyczne czynniki transkrypcji i podlegają częściowo roślinnym mechanizmom regulacyjnym. Jakkolwiek geny regionu T-DNA posiadają własne sygnały transkrypcyjne, to jednak poziom ich ekspresji jest kontrolowany przez sekwencje chromosomowe, w sąsiedztwie których nastąpiła integracja T-DNA. Uzależniony jest również od tkanki, do której przynależy transformowana komórka.

Szczegółowe badania struktury T-DNA wykazały, że u różnych szczepów *A. tumefaciens* występują identyczne onkogeny: *ipt* — gen izopentynylotransferazy katalizującej biosyntezę cytokininy oraz geny biosyntezy auksyn: *iaaM* — gen monooksygenazy tryptofanu, *iaaH* — gen hydrolazy indoliloacetoamidu. W obrębie T-DNA są zlokalizowane ponadto geny katabolizmu odpowiednich, specyficznych dla danego szczepu, opin. Region T-DNA plazmidu Ti jest ograniczony z prawej i lewej strony tak zwanymi sekwencjami granicznymi, które tworzą odwrócone powtórzenia 25 par zasad. Sekwencje te, oznaczone jako LB — lewa sekwencja graniczna, RB — prawa sekwencja graniczna, oddzielają T-DNA od reszty plazmidu i wraz z zawartymi tam genami są przenoszone do jądra komórki roślinnej. Za proces przenoszenia T-DNA są odpowiedzialne geny zlokalizowane w regionie wirulencji *vir* plazmidu Ti oraz geny *chv* na chromosomie bakteryjnym. Przebadano dotychczas dość precyzyjnie większość genów z regionu *vir*. Są one zgrupowane w siedem operonów oznaczonych literami od A do G, z których każdy koduje jeden do kilku genów. Białka VirA i VirG w odróżnieniu od pozostałych produktów regionu *vir* ulegają ekspresji konstytutywnej. Białka te tworzą dwuczłonowy kompleks, który uruchamia ekspresję pozostałych genów wirulencji. Pod wpływem substancji fenolowych pochodzenia roślinnego, takich jak acetosyringon, alkohol koniferolowy, kwas ferulowy bądź innych prekursorów lignin, kompleks ulega indukcji. Białko VirA zlokalizowane w błonie *Agrobacterium* działa jako receptor substancji fenolowych. Jego domena zwrócona na zewnątrz ściany komórkowej bakterii działa jako sensor wrażliwy na pH i temperaturę. Recepcja sygnału fenolowego jest możliwa jedynie w przedziale pH 5,0–5,8. Domena białka VirA zwrócona do wnętrza komórki aktywuje białko VirG, które działa jak aktywator transkrypcji. Składający się z 12 pz odcinek DNA nazywany *vir*-box znajduje się na 5' nie kodującym końcu każdego operonu *vir*. Postuluje się, że prawdopodobny mechanizm działania białka VirG polega na jego zdolności do wiązania się do tego regionu i stymulacji tą drogą transkrypcji mRNA dla odpowiednich białek. Nie jest bliżej poznany mechanizm regulacji, w którym uczestniczy białko VirG. Przypuszczalnie powinowactwo białka VirG do *vir*-box jest regulowane na drodze cyklicznej fosforylacji i defosforylacji.

Kluczowym etapem infekcji jest przeniesienie T-DNA do jądra zainfekowanej komórki roślinnej. Jest rzeczą charakterystyczną, że we wstępnej fazie tego procesu geny *vir* plazmidu Ti kooperują ściśle z genami, które są kodowane przez chromosom *Agrobacterium*. Geny te, *chvA*, *chvB*, *pscA* i *att* uczestniczą w nawiązywaniu przez *Agrobacterium* i komórkę roślinną fizycznego kontaktu oraz są odpowiedzialne za biosyntezę odpowiednich składników błony komórkowej. Opisano szereg mutantów dla genów zlokalizowanych na chromosomie *Agrobacterium*, które utraciły zdolność do biosyntezy niektórych z tych składników. Mutanty te wykazując różnego rodzaju zaburzenia w procesie agregacji z komórkami roślinnymi nie są zdolne do infekcji. Etap asocjacji komórki roślinnej i bakteryjnej obejmuje na wstępie wymianę sygnałów molekularnych, która inicjuje wytworzenie struktur niezbędnych do przeniesienia materiału genetycznego do komórki roślinnej. Postuluje się, że pewną rolę w agregacji bakterii i komórek roślinnych odgrywa białko vitronectyna. Białko to, po raz pierwszy opisane w ludzkich hodowlach komórkowych, dodane do kultury *Agrobacterium* tuż przed inokulacją tkanki roślinnej uniemożliwiało asocjację bakterii z komórkami marchwi. Białka o własnościach vitronectyny opisano w oddziaływaniach jakie zachodzą po zapyleniu pomiędzy łagiewką pyłkową i znamieniem słupka oraz w przypadku niektórych interakcji patogennych bakterii z komórkami roślinnymi.

Właściwy proces przeniesienia T-DNA rozpoczyna się od wycięcia z plazmidu Ti jednoniciowego odcinka DNA, czyli ssDNA (rys. 3). W procesie tym uczestniczą



Rys. 3. Model syntezy nici T w *Agrobacterium*. Białko VirD1 i VirD2 rozpoznają prawą sekwencję graniczną T-DNA (RB). Czynniki VirD1 posiada aktywność topoizomerazy DNA. Białko VirD2 o aktywności endonukleazy wiąże się kowalennie z wyseparowaną nicią DNA, co zabezpiecza ją przed degradacją eksonukleolityczną. Białko VirC1 wiąże się do regionu enhanserowego E przylegającego do prawej sekwencji granicznej T-DNA, co jest niezbędne do optymalnego formowania nici T. Produkt genu *virE2* tworzy kompleks z wyseparowanym jednoniciowym DNA (ssDNA) w sposób niezależny od jego sekwencji. Białka VirB zlokalizowane w porach błon komórkowych pośredniczą w transporcie kompleksu nici T i białek VirE2 przez błony (wg HOOYKAAS i BEIJERSBERGEN 1994 — zmienione).

dwa białka: VirD1 i VirD2. Białko VirD1 o aktywności topoizomerazy zapewnia rozplecenie helisy DNA, VirD2 zaś jest endonukleazą, która po przecięciu dolnej nici T-DNA wiąże się kowalentnie do jej 5' końca. Wytworzenie jednoniciowego T-DNA zapoczątkowane przecięciem dolnej nici DNA przy prawej sekwencji granicznej, zachodzi prawdopodobnie równolegle z syntezą nowej nici. Inne białko VirC1 charakteryzuje się powinowactwem do specyficznej sekwencji wzmacniającej E o nazwie *overdrive*. Odcinek *overdrive* znajduje się w kierunku 3' od prawej sekwencji granicznej, w jej bezpośrednim sąsiedztwie. Uważa się, że sekwencja *overdrive* warunkuje optymalne wytworzenie ssDNA, jak również zwiększa częstotliwość transformacji. Przypuszczalnie kompleks białka VirC1 z sekwencją *overdrive* umożliwia rozpoznanie przez endonukleazę VirD2 prawej sekwencji granicznej. Bliższa analiza struktury białka VirD2 wykazała ponadto, że N terminalny koniec tej cząsteczki posiada tak zwany sygnał lokalizacji jądrowej NLS, który odgrywa istotną rolę w transporcie nici T do jądra komórki roślinnej. Wytworzony jednoniciowy DNA jest opłaszczony przez cząsteczki białka VirE2, które wiążą się kooperatywnie z ssDNA. Uważa się, że tworzenie kompleksu ssDNA z nicią T nie zależy od jego sekwencji. Stwierdzono, że również białko VirE2 posiada domenę NLS odpowiedzialną za transport w kierunku jądra. Kompleks nici ssDNA oraz białek VirD2 i VirE2 jest odporny na działanie enzymów nukleolitycznych: DNA-azy, nukleazy S1 i egzonukleazy VII. W transporcie nici T uczestniczą ponadto inne białka — produkty operonu B. Szereg białek tego operonu: VirB4, VirB8, VirB9, VirB10 i VirB11 jest zlokalizowanych w błonie bakteryjnej i pośredniczy, jak się sądzi, w transporcie kompleksu nici T przez błony. Najmniej poznanym etapem w procesie przenoszenia kompleksu nici T do komórki roślinnej jest etap, który odbywa się na terenie gospodarza roślinnego. Wiadomo jedynie, że w proces ten oprócz białek VirD2 i VirE2 jest zaangażowane również białko VirF. Jakkolwiek nie jest obecnie jasna funkcja białka VirF, to nie ulega wątpliwości, że docelowym miejscem jego działania jest komórka roślinna. Jeśli bowiem do transformowania rośliny, u której uprzednio uzyskano ekspresję białka VirF, używano szczepu *Agrobacterium* defektywnego w operonie F, to cały proces przebiegał bez zakłóceń. Jeśli jednak defektywny szczep *Agrobacterium* użyto do transformowania rośliny dzikiej (niezdolnej do biosyntezy białka VirF) to transformacja nie była możliwa. Jest zadziwiające, że wymienione wyżej białka Vir funkcjonują w naturalny sposób na terenie komórki roślinnej. Fakt ten sprawia, że w konsekwencji proces transformowania przy użyciu wektora jakim jest *Agrobacterium* zachodzi bardziej efektywnie niż przy zastosowaniu innych metod transformowania komórek roślinnych.

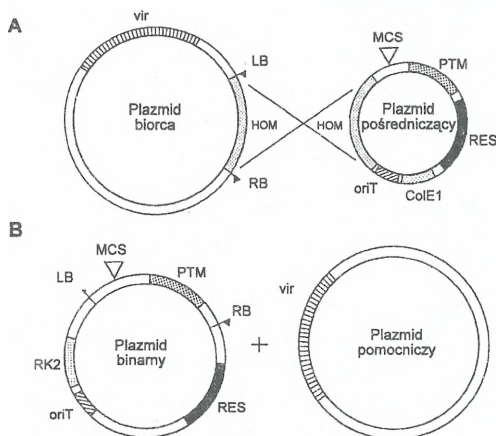
Mechanizm przenoszenia informacji genetycznej u *A. rhizogenes* przebiega zasadniczo podobnie jak w przypadku *A. tumefaciens*. Główna różnica pomiędzy tymi obydwoma patogenami tkwi w budowie plazmidów. Różnice w rodzaju kodowanych na plazmidach Ri genów do biosyntezy odpowiednich opin, stanowią podstawę klasyfikacji *A. rhizogenes*. Wyróżnia się na tej podstawie szczepy agropinowe, mannopinowe, kukumopinowe i mikimopinowe. Podobnie jak w przypadku oktopinowych *A. tumefaciens*, w szczepach agropinowych *A. rhizogenes* wyróżnia się dwa regiony T-DNA, T_L-DNA — lewy T-DNA i T_R-DNA — prawy T-DNA. Każdy wielkości około 15–20 tys. pz. Zarówno lewy jak i prawy segment T-DNA są przenoszone niezależnie do komórki roślinnej. Na prawym

T-DNA znajdują się oprócz sekwencji odpowiedzialnej za kodowanie syntezy agropiny, inaczej niż w oktopinowych *A. tumefaciens* jedynie geny do syntezy auksyn *iaaM* i *iaaH*. Na T_L-DNA zaś są zlokalizowane cztery loci: *rolA*, *rolB*, *rolC* i *rolD* odpowiedzialne za formowanie korzeni włosowatych. Geny *rol* decydują o specyficznych właściwościach tumoru korzeniowego, który różni się pod wieloma względami od typowych korzeni danej rośliny. Nie są obecnie znane funkcje tych genów. Przypuszcza się jedynie, że zmieniają one między innymi wrażliwość korzeni włosowatych na hormony, w szczególności auksyny. Molekularny mechanizm przenoszenia T-DNA z *Agrobacterium* do komórki roślinnej został omówiony wyczerpująco w opublikowanych w ostatnich latach pracach przeglądowych (HOOYKAAS i BEIJERSBERGEN 1994, ZUPAN i ZAMBRYSKI 1995).

ROZBROJONE SZCZEPY AGROBACTERIUM STANOWIĄ PODSTAWOWE NARZĘDZIE INŻYNIERII GENETYCZNEJ ROŚLIN DWULIŚCIENNYCH

Wykazano wcześniej, że transgeniczne komórki uzyskane z pomocą dzikich szczepów *A. tumefaciens* zawierają dodatkowe geny syntezy regulatorów wzrostu. Cecha ta uniemożliwia regenerowanie z nich roślin. Z tkanek tumorowych korzeni włosowatych, powstałych w następstwie transformowania za pośrednictwem *A. rhizogenes* u wielu gatunków istnieją możliwości regenerowania roślin, jednak regeneranty wyraźnie różnią się pod wieloma względami od roślin macierzystych i wykazują szereg cech tkanki tumorowej. Regeneranty otrzymane z korzeni włosowatych mają zmienione cechy morfologiczne i fizjologiczne, pomarszczone liście, zaburzoną dominację wierzchołkową pędu, nietypową skłonność do wytwarzania masy korzeni włosowatych nawet na liściach. Fakty te skłoniły wielu badaczy do zainteresowania się możliwościami rozbrojenia plazmidu *A. tumefaciens*. Obecnie nie ulega wątpliwości, że poza T-DNA żadna inna część plazmidu Ti nie jest przenoszona do komórki roślinnej. Długo jednak trwała debata wokół tego zagadnienia (BEVAN i CHILTON 1982). W roku 1983 wykazano, że jest możliwe fizyczne rozdzielenie plazmidu Ti na dwa oddzielne plazmidy (replikony), z których jeden zawierał region wirulencji a drugi odcinek T-DNA bez utraty funkcji przenoszenia genów do komórki roślinnej (HOEKEMA i współaut. 1983). Badania genetyczne nad mechanizmem wirulencji udowodniły, że żaden z genów regionu T-DNA nie uczestniczy w tym procesie i nie jest niezbędny do efektywnej transformacji. Konstatacje powyższe uitorowały drogę nowym rozwiązaniom. Polegały one na skonstruowaniu tak zwanych szczepów rozbrojonych, które zawierają plazmidy z całkowicie wydeletowanym T-DNA, a zachowują jednak wszystkie niezbędne funkcje do przeniesienia T-DNA, to znaczy region *vir* i zespół genów *chv* na chromosomie. Zmodyfikowane w ten sposób *Agrobacterium* może przenosić do komórki roślinnej dowolne geny dostarczone na odrębnych plazmidach, pod warunkiem że plazmidy te zawierają sekwencje graniczne, a w szczególności prawą sekwencję, która jest miejscem inicjacji całego procesu. Konstrukcję taką nazwano układem binarnym a rozbrojony plazmid Ti (bez T-DNA) przyjęto nazywać plazmidem pomocniczym (rys. 4). Wyprowadzanie roślin z komórek transformowanych tą drogą nie różni się zasadniczo od typowej procedury regeneracji. Wyłączając przypadki tak zwanej

zmienności somaklonalnej, rośliny transgeniczne zregenerowane tą drogą, poza nową cechą związaną z wprowadzonym genem, niczym nie różnią się od materiału matecznego. Od czasu kiedy po raz pierwszy zaproponowano metodę opartą na wykorzystaniu plazmidów binarnych, transformowanie roślin z wykorzystaniem tej metody zyskało dużą popularność, przede wszystkim dlatego, że manipulacje genetyczne na małych plazmidach binarnych są bardzo ułatwione.



Rys. 4. Schemat organizacyjny plazmidów *Agrobacterium* do transformowania w systemie kointegracyjnym (A) i binarnym (B).

A. Region homologiczny (HOM) plazmidu biorcy i plazmidu pośredniczącego umożliwia w wyniku integracji obu plazmidów wprowadzenie roślinnego markera selekcji (PTM) w obręb sekwencji granicznych (LB i RB). Geny regionu wirulencji *vir* po integracji plazmidu biorcy i plazmidu pośredniczącego funkcjonują w układzie *cis* w obrębie tego samego replikonu. B. Plazmid binarny mobilizowany do szczepu *Agrobacterium* zawierającego rozbity plazmid pomocniczy nie ulega integracji z plazmidem gospodarza. Geny *vir* z plazmidu pomocniczego działają w systemie *trans*. Oznaczenia: HOM — miejsce homologii, w obrębie której zachodzić może kointegracja plazmidów, LB, RB — odpowiednio lewa i prawa sekwencja graniczna, PTM — roślinny marker selekcyjny (np. *nptII*), RES — gen dla antybiotyku markera selekcji plazmidu w komórce biorcy, *ColE1* — sekwencja początku replikacji z plazmidu *ColE1*, *oriT* — sekwencja inicjacji transferu plazmidu w trakcie koniugacji *Agrobacterium*, RK2 — sekwencja zapewniająca szeroki zakres gospodarza, MCS — uniwersalne miejsce klonowania dodatkowych genów.

Inna strategia rozbicia plazmidu Ti, która jednakże jak dotychczas zyskała wyraźnie mniejsze zastosowanie, polega na wprowadzeniu w miejsce wydeletowanego T-DNA sekwencji, które zapewniają miejsca homologiczne z innym plazmidem, do którego wklonowuje się geny do transformowania (ZAMBRYSKI i współaut. 1983). Zabieg ten umożliwia integrację plazmidu zawierającego wklonowany gen z rozbitym plazmidem Ti. Układ do transformowania w tym systemie nazwano kointegracyjnym (rys. 4).

GENY MARKEROWE I REPORTEROWE UMOŻLIWIAJĄ SELEKCJĘ I MONITOROWANIE EFEKTYWNOŚCI TRANSFORMOWANIA

Ogólnie, metoda transformowania roślin przy użyciu *Agrobacterium* polega na zainfekowaniu odpowiednich eksplantatów roślinnych określonym szczepem

Agrobacterium. Po upływie 1–3 dni kokultury, w warunkach *in vitro* bakterie obrastają eksplantaty. Procedura przewiduje na tym etapie odmycie bakterii, a następnie zastosowanie odpowiednich pożywek regeneracyjnych oraz zestawu właściwych czynników selekcyjnych, dzięki którym wzrost transgenicznych komórek będzie stymulowany, nie transformowanych zaś hamowany (DRAPER i współaut. 1988, KAPUSTA i współaut. 1990). Selekcja ma na celu wyeliminowanie także *Agrobacterium*, co uzyskuje się dzięki użyciu antybiotyków carbeniciliny lub cefotaximu. Antybiotyki te nie są toksyczne dla większości gatunków roślin. Geny markerowe zawarte w obrębie sekwencji granicznych na plazmidach binarnych lub kointegracyjnych kodują białka enzymatyczne, warunkujące oporność na określone czynniki selekcyjne, na które komórki dzikie, nie transformowane są wrażliwe. Dzięki temu komórki transformowane zyskują w warunkach selekcji *in vitro* przewagę i mogą się namnażać. Zależnie od rodzaju stosowanego czynnika selekcji, nie transformowane komórki nie namnażają się bądź zamierają.

Oprócz genów markerowych, konstruowane do transformowania plazmidy *Agrobacterium* zawierają także tak zwane geny reporterowe. Geny te są odpowiedzialne za kodowanie produktów, które łatwo wykrywa się prostymi testami enzymatycznymi lub histochemicznymi. Zarówno produkty genów markerów selekcji, jak i tak zwanych genów reporterowych nie występują w roślinach w sposób naturalny. Fakt ten pozwala z jednej strony na selekcionowanie komórek transgenicznych, z drugiej zaś równolegle umożliwia potwierdzenie efektywności selekcji dzięki wykrywaniu ekspresji genów reporterowych. Ekspresja niektórych genów następuje już po 24 h od zainfekowania *Agrobacterium* a dotyczy to zwłaszcza genów zawierających sekwencje regulatorowe warunkujące ekspresję konstytutywną. Podział na markery selekcji i geny reporterowe ma znaczenie głównie systematyczne. O ile bowiem ze swej natury tylko niektóre geny pozwalają na selekcionowanie komórek transformowanych, to opracowane metody umożliwiają wykrywanie produktów większości genów zarówno na etapie pierwotnego transkryptu (hybrydyzacja typu northern), jak i białka enzymatycznego (western blotting).

GENY MARKEROWE UŻYWANE DO SELEKCONOWANIA TRANSGENICZNYCH TKANEK ROŚLINNYCH

Do selekcji transformowanych komórek wykorzystuje się geny, które kodują oporność na wybrane antybiotyki lub herbicydy. W zależności od potrzeb stosuje się dodatkowe systemy pozwalające selekcionować transformowane komórki.

Najbardziej rozpowszechnionym markerem selekcji jest gen dla enzymu fosfotransferazy neomycynowej *nptII*, pochodzący z transpozonu Tn 5 (FRALEY i współaut. 1983). Enzym ten warunkuje oporność na szereg antybiotyków aminoglikozydowych, takich jak: neomycyna, kanamycyna i genetycyna (G418). *NptII* inaktywuje wymienione antybiotyki na drodze fosforylacji. Podobny gen bakteryjny, kodujący enzym *N*-acetylotransferazę-3-gentamycyny AAC(3), charakteryzuje się zdolnością detoksyfikacji wzmiankowanych wyżej antybiotyków aminoglikozydowych a także gentamycyny i paromomycyny.

Inny dość szeroko stosowany gen *hpt* koduje fosfotransferazę hygromycyny. Działanie *hpt* podobnie jak *nptII* polega na inaktywacji antybiotyku na drodze jego fosforylacji.

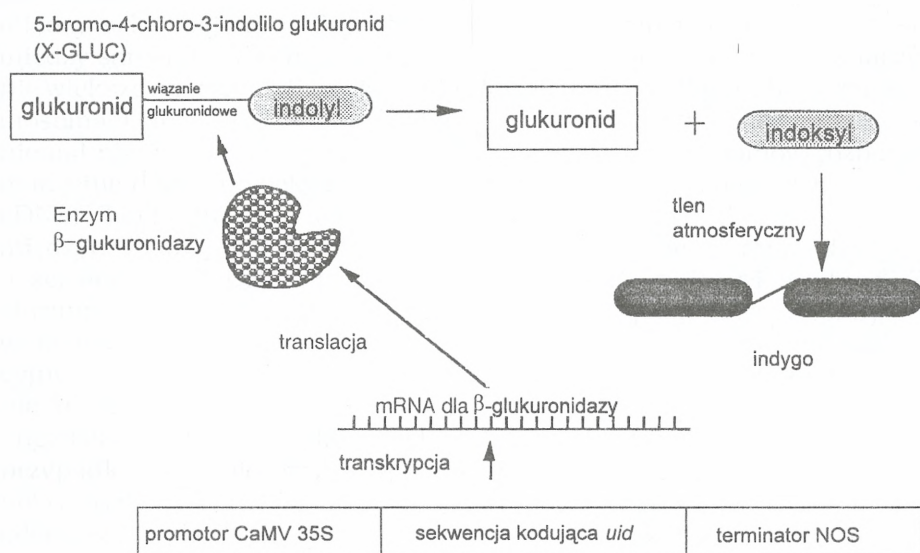
Do efektywnych markerów pozwalających selekcjonować transformowane komórki roślinne należą geny, które warunkują cechę oporności na herbicydy. Spośród tych genów wymienić należy gen *aro*, który koduje zmutowaną izoformę syntazy EPSP (syntaza enolopirogronowo-fosfoszikiowa) (COMAI i współaut. 1985). Syntaza EPSP jest miejscem działania herbicydu Roundup, którego substancja aktywna *N*-fosfonometylo-glicyna w sposób nieodwracalny inaktywuje enzym przerywając tym samym biosyntezę aminokwasów aromatycznych. Niedobór aminokwasów aromatycznych, a w szczególności nagromadzanie się w toksycznym stężeniu kwasu szikimowego w tkankach poddanych działaniu herbicydu, w krótkim czasie prowadzi do ich zamierania. Obecność w transgenicznym komórkach genu *aro*, który koduje niewrażliwą na herbicyd syntazę EPSP, umożliwia przeżywanie transformowanych komórek i regenerowanych z nich roślin. Podobny co do zasady system selekcji oparty na tolerancji na herbicyd opracowano dla herbicydu Glean. Miejscem działania tego herbicydu jest syntaza acetylomleczanowa (ALS) (SATHASIVAN i współaut. 1991). Niewrażliwość na działanie herbicydu enzym ALS chroni przed zaburzeniami szlak biosyntezy aminokwasów z rozgałęzionym łańcuchem bocznym w sposób analogiczny, jak w przypadku Roundupu odporny EPSPS zabezpiecza normalny metabolizm w szlaku przemian kwasu szikimowego. Gen *bar* warunkuje oporność na herbicyd Basta lub Bialofos. Fosfinotrycyna — czynnik aktywny tych herbicydów w sposób nieodwracalny hamuje syntazę glutaminową (GS). W wyniku przerwania łańcucha przyswajania azotu nagromadza się w komórkach toksyczny dla nich amoniak. Gen *bar* koduje enzym acetylotransferazę fosfinotrycyny, który detoksyfikuje herbicyd.

Dobierając warunki selekcji uwzględnia się na ogół fakt, że rośliny cechuje zróżnicowana wrażliwość na każdy z czynników selekcyjnych z osobna. Zdolność tolerowania antybiotyku czy herbicydu zależy także od typu eksplantatu, wieku rośliny, statusu fizjologicznego, a również genotypu i właściwości odmianowych. Ustalenie zatem optymalnej dawki czynnika selekcyjnego w pożywce, obok wyboru odpowiedniego eksplantatu i sposobu regeneracji, stanowi klucz do powodzenia transformowania niezależnie od stosowanego wektora.

GENY REPORTEROWE POZWALAJĄ NA SZYBKĄ IDENTYFIKACJĘ TRANSFORMOWANYCH TKANEK

Spośród genów reporterowych powszechne zastosowanie znalazła β -glukuronidaza (*GUS*), którą koduje gen pochodzenia bakteryjnego *uid*. Enzym β -glukuronidaza odznacza się zdolnością rozkładu wiązania glukuronidowego. Wiązanie takie występuje w syntetycznym substracie x-glukuronidzie (5-bromo-4-chloro-3-indolyl glukuronid). W wyniku rozpadu substratu powstaje glukuronid i indoksył, który pod wpływem tlenu natychmiast dimeryzuje do niebieskiego barwnika indygo (rys. 5) (STOMP 1992). Dzięki tym właściwościom można śledzić tkankowo specyficzną ekspresję *GUS* w komórkach roślin transgenicznych nawet przyżyciowo, względnie w materiale utrwalonym po uprzednim wyekstrahowaniu chlorofilu. Do oznaczania ekspresji tego enzymu opracowano również

bardzo czuły pomiar fluorymetryczny. Szerokie zastosowanie znalazła metoda analizy odcinków promotorowych genów, które sfuzjonowane z sekwencją kodującą genu *uid* umożliwiają prześledzenie *in situ* ekspresji *GUS* pod wpływem określonego promotora. Skonstruowano dla tych celów szereg plazmidów binarnych zawierających miejsca restrykcyjne umożliwiające wklonowanie odcinka promotorowego dowolnego genu.



Rys. 5. Gen dla β -glukuronidazy *uid* ulega ekspresji w transformowanych komórkach. Enzym rozkłada syntetyczny substrat x-glukuronid (5-bromo-4-chloro-3-indolilo glukuronid) do glukuronidu i indoksylu. Pod wpływem tlenu indoksyl tworzy na drodze dimeryzacji niebieski barwnik indygo.

Do genów reporterowych, których również używa się jako markerów transformowania zalicza się także lucyferazę (*LUC*), acylotransferazę chloramfenikolu (*CAT*), enzymy uczestniczące w syntezie antocyjanów (R i C1) i inne.

ROŚLINY TRANSGENICZNE POWINNY BYĆ REGENEROWANE Z POJEDYNCZYCH, TRANSFORMOWANYCH KOMÓREK

Konieczność regenerowania roślin z pojedynczych transformowanych komórek wynika z samej natury transformowania przez *Agrobacterium*, która polega na przeniesieniu z bakterii do jądra komórki roślinnej jednoniciowego T-DNA. Do otrzymywania roślin transgeniczných na drodze regenerowania z pojedynczych komórek skłaniają również względy genetyczno-hodowlane. Hodowcy oczekują bowiem jednorodnego pod względem genetycznym materiału roślinnego. Postulat, żeby rośliny transgeniczne cechowała genetyczna jednorodność narzuca konieczność skrócenia fazy *in vitro*, ponieważ dotychczasowe doświadczenia nad regeneracją roślin wskazują, że im krótszy jest okres hodowli *in vitro*

tym większe prawdopodobieństwo, że regenerowany materiał zachowa cechy rośliny macierzystej. Wiadomo obecnie, że jedynie niektóre spośród stosowanych obecnie technik regeneracji pozwalają na otrzymanie materiału roślinnego genetycznie jednorodnego. Zalicza się do nich przede wszystkim procedury polegające na stymulacji wzrostu merystemów istniejących w pierwotnym eksplanacie. Inne metody regeneracji, polegające na odróżnicowaniu, proliferacji a następnie ponownym różnicowaniu tkanek, są obciążone możliwością występowania zmienności wśród regenerantów. Część zmienności, uwarunkowana genetycznie, jest określana jako zmienność somaklonalna. Pozostała zmienność nie stanowi problemu, ponieważ nie jest dziedziczona przez potomstwo. Ten rodzaj zmienności nazwano zmiennością epigenetyczną.

Konkludując stwierdzić należy, że możliwość transformowania za pomocą *Agrobacterium* w zdecydowanej większości przypadków zależy od tego, czy dany gatunek rośliny można regenerować *in vitro*. Jakkolwiek generalnie przebieg regeneracji nie ulega zasadniczym modyfikacjom ze względu na konieczność równoczesnej selekcji, to jednak warto nadmienić, iż właśnie fakt selekcji, odmiennie niż w systemie regeneracji bez selekcji, pozwala częściej zregenerować rośliny z pojedynczych (transgeniczných) komórek.

PODSUMOWANIE

Transformowanie roślin dwuliściennych za pomocą *Agrobacterium* stanowi najbardziej powszechną metodę otrzymywania genotypów transgeniczných w tej grupie roślin. U wielu gatunków roślin, ze względu na naturalny mechanizm biologicznego transferu materiału genetycznego, dużą wydajność oraz precyzję z jaką obcy DNA zostaje wprowadzony do genomu biorecy, transformowanie z użyciem *Agrobacterium* jako wektora nie posiada alternatywy. Istnieje jednak liczna grupa roślin, głównie z rodziny motylkowatých oraz roślin drzewiastých, u których poza nielicznymi wyjątkami, transformowanie niezależnie od stosowanej metody nastęrcza w dalszym ciągu znaczne problemy. Wydaje się, że również w przypadku tych gatunków roślin, wykorzystanie *Agrobacterium* odegrać powinno istotną rolę, jakkolwiek nie należy rezygnować z poszukiwania innych podejść na przykład techniki mikrowstrzeliwania lub równoległego zastosowania *Agrobacterium* i mikrowstrzeliwania.

TRANSFORMATION OF DICOTYLEDONOUS PLANTS USING *AGROBACTERIUM*

Summary

Agrobacterium tumefaciens transfers a part of its Ti plasmid, named the transferred DNA (T-DNA), to plant cells during tumor induction. Expression of *Agrobacterium* genes in plant cells results in their transformation into tumor cells. Expression of *A. rhizogenes* T-DNA segment of Ri plasmid in a plant cell causes hairy roots tumor formation. A comprehensive history of using *Agrobacterium* as a plant vector transformation system is presented. Recent advances in the molecular mechanism of T-DNA transfer, as well as plasmid vector transformation vehicles and plant transformation gene markers are reviewed.

LITERATURA

- BEVAN M., CHILTON M. D. 1982. *T-DNA of the Agrobacterium Ti and Ri plasmids*. Annu. Rev. Genet. 16, 357-384.
- COMAI L., FACCIOTTI D., HIATT W. R., THOMPSON G., ROSE R. E., STALKER D. M., 1985. *Expression in plants of a mutant aroA gene from Salmonella typhimurium confers tolerance to glyphosate*. Nature 317, 741-744.
- CZOSNOWSKI J., 1952. *Charakterystyka fizjologiczna trzech typów tkanek Vitis vinifera: normalnej, tumora bakteryjnego (crown gall) i tumora chemicznego hodowanych in vitro*. Spr. Poz. Tow. Przyj. Nauk. Prace Kom. Biol. 13, 1-20.
- DRAPER J., SCOTT R., HAMIL J., 1988. *Transformation of dicotyledonous plant cells using the Ti plasmid of Agrobacterium tumefaciens and the Ri plasmid of A. rhizogenes*. [W:] Plant Genetic Transformation and Gene Expression. DRAPER J., SCOTT R., WALDEN R. (red.). London: Blackwell Scientific Publisher. str. 69-158.
- FRALEY R. T., ROGERS S. G., HORSCH R. B., SANDERS P. R., FLICK J. S., ADAMS S., BITTNER M., BRAND L., FINK C. L., FRY J., GALLUPPI G., GOLDBERG S., HOFFMAN N. L., WOO S., 1983. *Expression of bacterial genes in plant cells*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80, 4803-4807.
- HOEKEMA A., HIRSCH P. R., HOOYKAAS P. J. J., SCHILPEROORT R. A., 1983. *A binary plant vector strategy based on separation of vir and T-region of the Agrobacterium tumefaciens Ti plasmid*. Nature 303, 179-180.
- HOOYKAAS P. J. J., BEIJERSBERGEN A. G. M., 1994. *The virulence system of Agrobacterium tumefaciens*. Annu. Rev. Phytopathol. 32, 157-179.
- KAPUSTA J., MOL R., KONCZAK-ISLAM I., BURZA W., 1990. *Transformacja roślin za pośrednictwem Agrobacterium tumefaciens i Agrobacterium rhizogenes*. [W:] Transformowanie i regeneracja roślin. LEGOCKI A. B. (red.). Poznań: Inst. Chemii Bioorganicznej PAN str. IV1-IV23.
- SATHASIVAN K., HAUGHN G. W., MURAI N., 1991. *Molecular basis of imidazolinone herbicide resistance in Arabidopsis thaliana var. Columbia*. Plant Physiol. 97, 1044-1050.
- SMITH E. F., TOWNSEND C. O., 1907. *A plant tumor of bacterial origin*. Science 25, 671-673.
- STOMP A. M., 1992. *Histochemical detection of GUS*. [W:] GUS protocols. Using the GUS gene as a reporter of gene expression. GALLAGER S. R. (red.). San Diego: Academic Press, Inc. str., 103-114.
- VAN LAREBEKE N., GENETELLO C., SCHELL J., SCHILPEROORT R. A., HERMANS A. K., HERNALSTEENS J. P., VAN MONTAGU M., 1975. *Acquisition of tumor-inducing ability by non-oncogenic agrobacteria as a result of plasmid transfer*. Nature 255, 742-743.
- ZAENEN I., VAN LAREBEKE N., TEUCHY H., VAN MONTAGU M., SCHELL J., 1974. *Supercoiled circular DNA in crown-gall inducing Agrobacterium strains*. J. Mol. Biol. 86, 109-127.
- ZAMBRYSKI P., JOOS H., GENETELLO C., LEEMANS J., VAN MONTAGU M., SCHELL J., 1983. *Ti plasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal regeneration capacity*. Eur. Molecular Biol. Org. Journal 2, 2143-2150.
- ZUPAN J. R., ZAMBRYSKI P., 1995. *Transfer of T-DNA from Agrobacterium to the plant cell*. Plant Physiol. 107, 1041-1047.