

MONIKA RAKOCZY-TROJANOWSKA

Katedra Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin,  
SGGW, Nowoursynowska 166, 02-787 Warszawa

## GENETYCZNA TRANSFORMACJA ROŚLIN

### WSTĘP

Genetyczna transformacja roślin polega na wprowadzeniu do komórek rośliny egzogennej DNA a następnie jego integrację z genomem roślinnym.

W przyrodzie istnieje unikalny, naturalny system transformacji roślin bakteryjnym DNA. Proces ten zachodzi podczas tumorogenezy, czyli tworzenia nowotworów na korzeniach roślin — choroby wywołanej przez bakterie glebowe *Agrobacterium tumefaciens*.

Wykorzystanie tego naturalnego systemu przenoszenia genów do prac nad sztuczną transformacją roślin było możliwe dzięki rozwojowi dwóch bardzo ważnych dziedzin biotechnologii. Pierwsza z nich to inżynieria genetyczna zapoczątkowana odkryciem i poznaniem mechanizmu działania enzymów restrykcyjnych. Jest to zespół technik biochemicznych pozwalających na izolowanie i dowolne łączenie fragmentów DNA różnych organizmów. Druga to kultury *in vitro* tkanek, organów i komórek, która umożliwia selekcję i namnożenie pojedynczych komórek zawierających wprowadzone geny a następnie regenerację z nich roślin.

### OGÓLNA CHARAKTERYSTYKA KONSTRUKTÓW WPROWADZANYCH DO ROŚLIN

Geny, które w procesie transformacji wprowadza się do komórek roślinnych, muszą być w odpowiedni sposób przygotowane, to znaczy zawierać promotor, terminator oraz inne specjalne sekwencje nukleotydów umożliwiające sprawna transkrypcję w nowym środowisku. Nie muszą to być fragmenty DNA naturalnie występujące w genomie roślinnym, dlatego też nazywa się je genami chimeralnymi. Dość często używanym promotorem przy konstruowaniu genów chimerycznych jest promotor 35S z wirusa mozaiki kalafiora (CaMV), który zapewnia wydajną transkrypcję wprowadzanych genów u wielu gatunków, głównie roślin dwuliściennych. Powszechnie stosowanym terminatorem jest *nos* z genu kodującego syntazę nopalinową u *A. tumefaciens*. Najczęściej wprowadza się jednocześnie dwa lub trzy geny, odpowiednio zorganizowane jako tak zwane konstrukty, które przygotowuje się i namnaża w komórkach bakterii. Konstrukty takie

na ogół zawierają oprócz (lub zamiast) genu „głównego” także geny selekcyjne i geny reporterowe (w doświadczeniach optymalizacyjnych używa się raczej konstruktów zawierających tylko geny selekcyjne i reporterowe). Produkty pierwszej grupy genów pozwalają na rozdzielenie tkanek, które uległy transformacji od nietransformowanych. Mogą to być, na przykład, geny warunkujące odporność na antybiotyki. Jeżeli do pożywki selekcyjnej doda się odpowiedni antybiotyk i umieści na niej tkankę po transformacji, to w takich warunkach przeżyją tylko te, które posiadają „geny odporności” na dany antybiotyk. Coraz częściej jako markerów selekcyjnych używa się genów warunkujących odporność na herbicydy. W ten sposób jednocześnie można wprowadzać cechę użytkową. Natomiast geny reporterowe umożliwiają szybkie stwierdzenie, czy w ogóle doszło do wprowadzenia całego konstruktów do komórki oraz wstępną ocenę wydajności procedury, ponieważ produkty tych genów są łatwe do wykrycia w bardzo krótkim czasie (we wprowadzanym odcinku DNA mogą znajdować się geny, których efekt działania nie zawsze jest od razu widoczny). Bardzo popularnym genem reporterowym jest *uid A*. Gen ten koduje enzym  $\beta$ -glukuronidazę, dla którego substratem jest 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-moczan (X-gluc). Wynikiem reakcji enzymatycznej jest produkt o barwie niebieskiej. Jeżeli transformowaną tkankę umieści się w roztworze X-gluc to pojawienie się w niej sektorów zabarwionych na niebiesko świadczy o obecności aktywnego genu *uid A*. Oczywiście stwierdzenie ekspresji genów reporterowych nie świadczy o ich integracji z genomem biorcy. W licznych badaniach wykazano jednak, że istnieje pozytywna korelacja między ekspresją przejściową a stabilną (co oznacza ich integrację z genomem biorcy) genów reporterowych i innych, znajdujących się w tym samym konstrukcie.

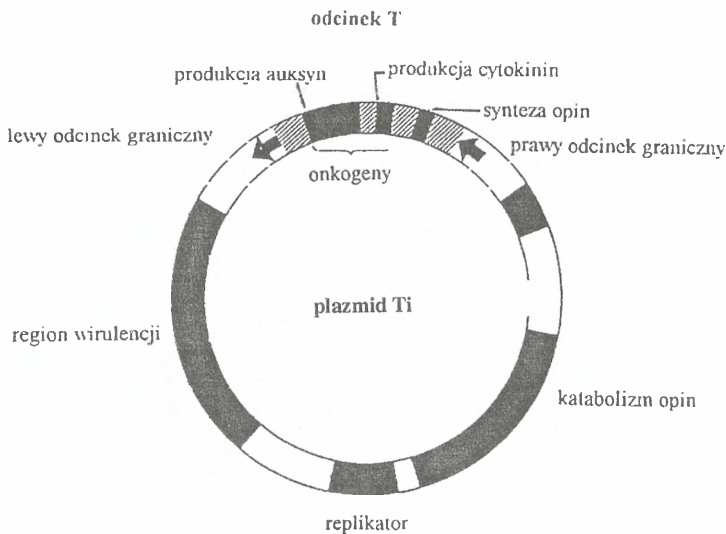
W trakcie wieloletnich badań nad transformacją roślin opracowano kilka metod wprowadzania genów, z których najczęściej są stosowane trzy: (1) transformacja z użyciem *Agrobacterium tumefaciens* lub (rzadziej) *A. rhizogenes* jako wektorów, (2) bezpośrednia transformacja protoplastów i (rzadziej) komórek z pomocą elektroporacji lub glikolu polietylenowego — PEG, (3) mikrowstrzeliwanie cząsteczek metali pokrytych DNA lub (rzadziej) RNA. Metody te zostaną poniżej omówione szczegółowo.

## METODY WPROWADZANIA GENÓW

### TRANSFORMACJA ZA POŚREDNICTWEM AGROBACTERIUM

Ta metoda transformacji wykorzystuje naturalną zdolność *Agrobacterium* do przekazywania swojego materiału genetycznego komórkom roślinnym w trakcie tumorogenezy. Po raz pierwszy zjawisko to zaobserwowali Zaenen i współautorzy w 1974 roku (HOOPYKAAS i SCHILPEROORT 1992 za ZAENEN i współaut. 1974). Początkowo sądzono, że jest przekazywany DNA faga bakteryjnego, ale wyniki dalszych prac wykazały, że jest to fragment dużego (ponad 200 kb) kolistego plazmidu egzystującego niezależnie od chromosomu bakteryjnego. Plazmid ten nazwano Ti (ang. tumor inducing) a przekazywany odcinek — T (ang. transfer-red). W odcinku T plazmidu Ti znajdują się onkogeny, geny odpowiedzialne za syntezę auksyn i cytokinin — regulatorów wzrostu wpływających na morfogene-

zę tumorów oraz geny warunkujące syntezę opin — charakterystycznych związków będących produktem kondensacji pewnych aminokwasów z cukrami, indukowanych podczas tumorogenezy. Jest on z obu stron otoczony sekwencjami granicznymi, które biorą udział w procesie wycinania i integracji odcinka T. Poza odcinkiem T w plazmidzie Ti są obecne geny odpowiedzialne za katabolizm opin, wycinanie odcinka T (zlokalizowane w regionie wirulencji) oraz miejsce startu replikacji (ryc. 1). Dla bakterii sygnałem do infekcji są związki fenolowe uwalniane ze zranionej tkanki. W trakcie infekcji następuje wycięcie odcinka T, włączenie go do genomu roślinnego i rozpoczęcie transkrypcji genów bakteryjnych. Efektem ich ekspresji jest wytworzenie tumorów. Podobne właściwości stwierdzono w przypadku *A. rhizogenes*, bakterii powodującej powstawanie u zainfekowanych roślin nadmiernej liczby korzeni.



Ryc. 1. Schemat plazmidu Ti (wg HOYKAAS i SCHILPERORT 1992)

Poznanie natury tych procesów otworzyło drogę transformacji roślin. Już w trzy lata po odkryciu plazmidu Ti doniesiono o udanym, sztucznym wprowadzeniu odcinka T oraz integracji z genomem roślinnym (CHILTON i współaut. 1977). W pierwszej połowie lat osiemdziesiątych opracowano sposoby wprowadzania w obszar odcinka T pomiędzy sekwencje graniczne sztucznych konstrukatów, co było możliwe dzięki odkryciu, że poza tymi sekwencjami żaden z genów odcinka T nie jest potrzebny w procesie zakażenia. Drugą bardzo ważną przesłanką adaptacji systemu *Agrobacterium* do genetycznej transformacji roślin był fakt, że odcinek T jest w naturalny sposób zabezpieczony otoczką białkową uniemożliwiającą jego uszkodzenia i degradację przez system obronny komórki roślinnej.

Opracowano dwa systemy transformacji za pośrednictwem *Agrobacterium*: (1) kointegracyjny, w którym geny wprowadza się do odcinka T plazmidu Ti drogą homologicznej rekombinacji i (2) binarny, w którym geny zostają najpierw wklonowane do odcinka T dowolnego plazmidu zdolnego do replikacji w komórce



*Agrobacterium*, która zawiera plazmid Ti bez odcinka T, ale posiadający inne geny potrzebne w procesie transformacji (SZCZYGŁOWSKI i BOROŃ 1990)

Metodyka transformacji za pośrednictwem *Agrobacterium* składa się z następujących etapów: (1) kokultywacja — umieszczenie eksplantatów, na przykład fragmentów liści, liścieni, korzeni w roztworze bakterii, (2) odpłukanie bakterii, (3) umieszczenie eksplantatów na pożywce z antybiotykiem w celu zabicia bakterii, (4) umieszczenie eksplantatów na podłożu z odpowiednim czynnikiem selekcyjnym, na przykład antybiotykiem o ile *Agrobacterium* użyte do transformacji zawierało w odcinku T gen kodujący odporność na ten antybiotyk, (5) regeneracja roślin (najczęściej w warunkach selekcyjnych). Często eksplantaty po okresie kokultywacji z bakteriami są przenoszone na pożywkę, do której jednocześnie dodano antybiotyk zabijający je oraz czynnik selekcyjny.

Transformacja za pośrednictwem *Agrobacterium* jest historycznie najstarszą metodą transformacji roślin. Otrzymano dzięki niej szereg roślin transgenicznych u wielu gatunków, między innymi tak ważnych gospodarczo jak bawełna, len, rzepak, ziemniak i pomidor, w tym wszystkie obecnie zarejestrowane lub będące w badaniach transgeniczne odmiany. Atrakcyjność tej metody polega głównie na jej wysokiej wydajności wynikającej z wysokiej częstości integracji odcinka T z genomem roślinnym. Jej wysoka skuteczność ogranicza się jednak głównie do roślin dwuliściennych. W odniesieniu do roślin jednoliściennych okazała się mało skuteczna, ponieważ rośliny te nie są naturalnymi gospodarzami *Agrobacterium*. Ukazały się wprawdzie nieliczne doniesienia o udanej transformacji roślin jednoliściennych za pomocą *Agrobacterium*, ale nie została w nich potwierdzona integracja wprowadzanych genów w następnych pokoleniach płciowych. Wykazana ekspresja przejściowa i stabilna w pierwszym pokoleniu przepuszczalnych transformantów mogła być jedynie artefaktem bakteryjnym.

W tej sytuacji zaczęto poszukiwać innych metod transformacji tej grupy roślin. Jedną z takich metod jest bezpośrednia transformacja protoplastów plazmidowym DNA.

#### TRANSFORMACJA BEZPOŚREDNIA

Metoda ta polega na umieszczeniu płynnej kultury protoplastów w roztworze plazmidowego DNA a następnie spowodowanie jego przeniknięcia do wnętrza komórki. Błona komórkowa stanowi jednak barierę dla egzogenego DNA i dlatego też konieczne jest zastosowanie specjalnych warunków pozwalających na jego penetrację do wnętrza komórki. Znane są dwa sposoby umożliwiające bezpośrednią transformację protoplastów: (1) użycie polietylenu glikolu (PEG), (2) elektroporacja. Dodanie PEG-u do zawiesiny protoplastów powoduje zmianę właściwości fizyko-chemicznych błony komórkowej — zostaje zwiększona jej półprzepuszczalność. Umieszczenie natomiast protoplastów w zmiennym polu elektrycznym o określonej długości trwania i częstości mikroimpulsów powoduje powstanie w błonie komórkowej mikroporów. Oba te czynniki ułatwiają penetrację DNA znajdującego się w roztworze do wnętrza komórek.

Stosując metodę bezpośredniej transformacji protoplastów uzyskano dotychczas szereg stabilnych transformantów u wielu gatunków, między innymi u kukurydzy, pszenicy, jęczmienia i ryżu. Poważnym ograniczeniem tej metody

okazała się trudność w uzyskiwaniu totipotentnych protoplastów, których źródłem u roślin jednoliściennych jest głównie zawiesina komórkowa złożona z kalusa typu II — rzadkiej i trudnej do uzyskania postaci kalusa występującego tylko u niektórych gatunków i ponadto zależnego od genotypu. Nadal też efektywność regeneracji z protoplastów jest u roślin jednoliściennych niska z wyjątkiem ryżu z grupy *japonica*, u którego otrzymywanie totipotentnych protoplastów i regeneracja z nich roślin nie stanowi obecnie większego problemu (VASIL 1994).

#### MIKROWSTRZELIWANIE

Mikrowstrzelianie (ang. particle bombardment) jest metodą transformacji materiału biologicznego polegającą na wprowadzeniu z bardzo dużą prędkością rzędu kilkuset metrów na sekundę do komórek cząsteczek metali pokrytych DNA (rzadziej RNA). Prędkość tę uzyskuje się w specjalnie skonstruowanych akceleratorach zwanych aparatami do mikrowstrzeliania (ang. particle bombardment device lub particle bombardment apparatus). Czynnikiem przyspieszającym cząsteczki metali jest proch strzelniczy lub, w urządzeniach nowszego typu, hel. O zastosowaniu tej metody w transformacji cebuli po raz pierwszy doniesiono w 1987 roku (KLEIN i współaut. 1987, SANFORD i współaut. 1987). W krótkim czasie stała się ona bardzo popularna, szczególnie w odniesieniu do roślin jednoliściennych, ponieważ tą metodą można transformować praktycznie wszystkie rodzaje tkanek, co u tej grupy roślin jest faktem o pierwszorzędym znaczeniu.

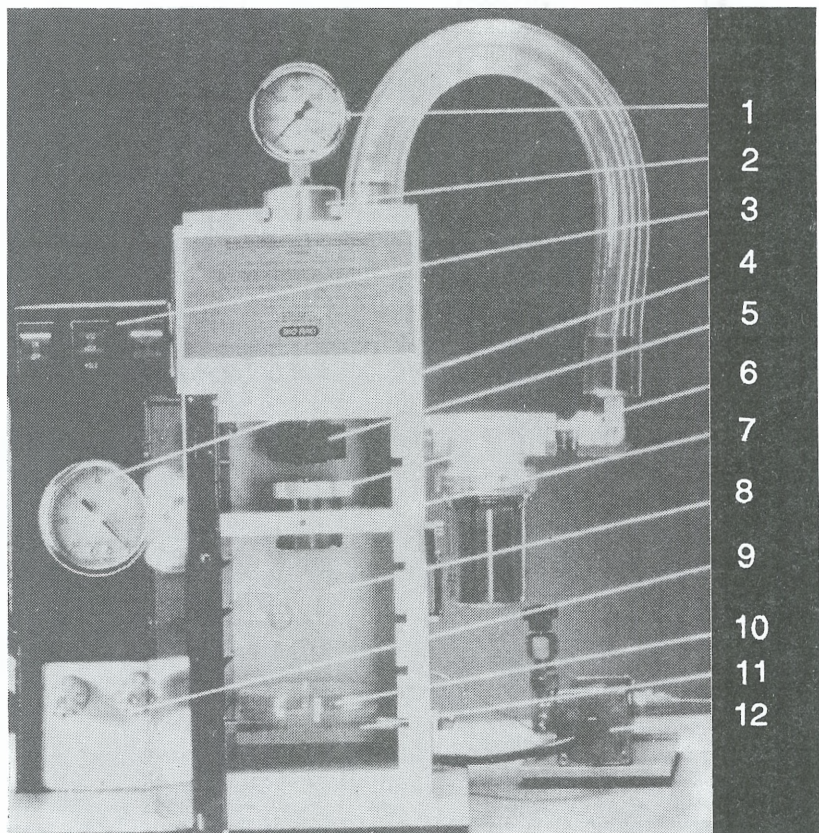
W ciągu ostatnich sześciu lat otrzymano rośliny transgeniczne w obrębie wielu gatunków jednoliściennych, w tym we wszystkich gatunkach zbóż oraz tak ważnych gospodarczo gatunków, jak trzcina cukrowa i tulipan. Potwierdzona została także jej wysoka skuteczność w odniesieniu do roślin nagonasiennych i niektórych gatunków roślin dwuliściennych, na przykład soi i fasoli, u których zawiodły inne metody transformacji. Najczęściej poddawano transformacji trzy rodzaje tkanek: niedojrzałe zarodki, kalus embriogeniczny powstały z niedojrzałych zarodków lub niedojrzałych kwiatostanów i zawieszinę komórkową.

Obecnie coraz więcej autorów wybiera do transformacji niedojrzałe zarodki ze względu na krótki (w porównaniu z innymi rodzajami tkanek) czas, który upływa od wyizolowania zarodków do otrzymania dojrzałych roślin. Kwitnące rośliny transgeniczne pszenicy otrzymano już po 7–9 miesiącach od wyizolowania niedojrzałych zarodków, podczas gdy w przypadku zawiesziny komórkowej trwało to ponad dwa lata (VASIL i współaut. 1994).

Mimo, że transformacja za pomocą mikrowstrzeliania jest coraz częściej stosowaną metodą transformacji roślin, wciąż jeszcze jest to metoda niedoskonała wymagająca wielu udoskonaleń. Niska wydajność transformacji wynika głównie z niskiej przeżywalności komórek spowodowanej uszkodzeniami mechanicznymi oraz szokiem akustycznym. Dlatego większość prac jest poświęcona optymalizacji różnych czynników zwiększających skuteczność mikrowstrzeliania. Dobrym sposobem dla pszenicy okazało się podniesienie ciśnienia osmotycznego pożywki indukcyjnej (poprzez zwiększenie zawartości sacharozy) powodującego podwyższenie turgoru komórek. Wprowadzenie przez firmę Du Pont nowego typu aparatu do transformacji — PDS 1000/He (ryc. 2), w którym



cząsteczki metali są przyspieszane za pomocą helu, znacznie ograniczyło szok akustyczny i tym samym poprawiło wydajność transformacji. Wpływ rodzaju użytych cząsteczek metali oraz sposób ich oplaszczania przez DNA (przez sonifikację lub precypitację) na efektywność transformacji roślin jednoliściennych nie został dotychczas potwierdzony. Kolejnymi poważnymi problemami związanymi z mikrowstrzeliwaniem są możliwość degradacji podczas oplaszczania cząsteczek metalu lub jego oderwanie w czasie rozpędzania w aparacie oraz wprowadzanie do genomu roślinnego zbyt dużej liczby kopii genów jednocześnie.



Ryc. 2. Aparat do transformacji roślin — PDS 1000/He.

1 — Wskaźnik ciśnienia helu, 2 — rura przyspieszająca gaz, 3 — przełączniki kontrolne, 4 — wskaźnik poziomu próżni, 5 — uchwyt przepony, 6 — pokrywa makropocisku, 7 — układ wyrzutni makropocisków, 8 — komora strzelania, 9 — regulacje prędkości odpowietrzania i napowietrzania, 10 — tkanka poddawana transformacji, 11 — półka na naczynie z tkanką, 12 — zawór dozujący.

W połowie 1994 roku ukazała się bardzo obiecująca praca, w której po raz pierwszy doniesiono o użyciu komórek bakterii — *Escherichia coli* i *A. tumefaciens* jako biologicznych „pocisków” do transformacji kukurydzy i tytoniu (RASMUSEN i współaut. 1994). Autorzy uważają, że opracowana przez nich metoda może rozwiązać oba te problemy. Wykorzystanie bakterii umożliwi także wprowadzanie DNA o dużej masie molekularnej, na przykład w postaci sztucznych chromosomów drożdżowych — YAC-ów (ang. yeast artificial chromosomes). Me-

toda ta wydaje się być szczególnie przydatna w transformacji roślin jednoliściennych, które mają duże komórki a wielkość komórek jest głównym ograniczeniem jej stosowania.

Każda z przedstawionych metod transformacji ma zarówno wady jak i zalety oraz ograniczony zakres zastosowania.

#### PERSPEKTYWY

Trwające od prawie piętnastu lat prace nad transformacją roślin przyniosły niekwestionowany wkład zarówno w poznanie molekularnych podstaw dziedziczenia, jak i w rozszerzenie zmienności genetycznej w świecie roślin. Następuje ciągle udoskonalanie metod transformacji a dotychczasowe wyniki potwierdziły jej użyteczność i celowość szczególnie w odniesieniu do gatunków ważnych dla gospodarki. Z praktycznego punktu widzenia transformacja roślin stwarza bowiem możliwość wprowadzania do materiałów hodowlanych nowych cech i w perspektywie szybkiego tworzenia nowych, atrakcyjnych odmian, które sprostać wymogom nowoczesnego rynku. Pierwsze odmiany transgenicznych pomidorów, ziemniaków i papryki już zostały zarejestrowane a wiele znajduje się w badaniach rejestrowych. Kilka transgenicznych odmian już zostało zarejestrowanych. Tworzone są specjalne programy rządowe wspierające uzyskiwanie transgenicznych roślin. Przykładem może być powstały w 1992 roku w USA program hodowli pszenicy, który zakłada wyhodowanie, przy wykorzystaniu metod biotechnologicznych nowych odmian między innymi odpornych na herbicydy, o poprawionym składzie skrobi ze zredukowaną zawartością amylopektyny i o wysokiej masie cząsteczkowej gluteiny (KURECZKA 1992).

#### GENETIC TRANSFORMATION OF PLANTS

##### Summary

Plant transformation can be achieved by introduction of exogenous DNA in the form of specially constructed fragments into the plant genome. Several transformation methods were elaborated during the last fifteen years. The methods which are in the most frequent use are: (1) transformation using bacterial vectors — *Agrobacterium tumefaciens* or *A. rhizogenes*, (2) direct transformation of protoplasts by means of electroporation or polyethylene glycol, (3) particle bombardment. The usefulness of the first method was proved in the case of dicot species whereas the second can be applied only for those genotypes which are capable of efficient plant regeneration from protoplasts. The third one seems to be the only effective transformation method for most of the monocots.

#### LITERATURA

- CHILTON M. -D., DRUMMOND M. H., MERLO D. J., SCIACKY D., MONTOYA A. L., GORDON M. P., NESTER E. W., 1977. *Stable incorporation of plasmid DNA into higher plant cell, the molecular basis of crown gall tumorigenesis*. Cell 11, 263-271.
- HOOGKAAS P. J. J., SCHILPEROORT R. A., 1992. *Agrobacterium and plant genetic engineering*. Plant.Biol. 19, 15-38.
- KLEIN T. M., WOLF E. D., WU R., SANFORD J. C., 1987. *High-velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells*. Nature 327, 70-73.

- KURECZKA J. E., 1992. *Genetic ngineering and hybridization of wheat*. Cereal Foods World 37(8), 640-642.
- MCELROY D., BRETTTELL R. I. S., 1994. *Foreign gene expression in transgenic cereals*. Tibtech 12, 62-68.
- RAKOCZY-TROJANOWSKA M., 1995. *Transformacja roślin jednoliściennych przy pomocy mikrowstrzelania — stan obecny badań i perspektywy*. V Ogólnopolski Zjazd Hodowców Roślin Ogrodniczych, Skierniewice, 23-24 luty, 235-242.
- RASMUSSEN J. L., KIKKERT J. R., ROY M. K., SANFORD J. C., 1994. *Biolistic transformation of tobacco and maize cells using bacterial cells as microprojectiles*. Plant Cell Rep. 13, 212-217.
- SANFORD J. C., KLEIN T. M., WOLF E. D., ALLEN N., 1987. *Delivery of substances into cells and tissues using a particle bombardment process*. Part. Sci. Tech. 5, 27-37.
- SZCZYGŁOWSKI K., BOROŃ L., 1990. *Wektory transformacyjne*. [W:] *Transformowanie i regeneracja roślin*. Poradnik laboratoryjny pod red. A. Legockiego. Wyd. Inst. Chemii Bioorg. PAN w Poznaniu, rozdz.III.
- VASIL I. K., 1994. *Molecular improvement of cereals*. Plant Mol. Biol. 25, 925-937.