



Transformacja genetyczna zbóż za pomocą *Agrobacterium*

Anna Nadolska-Orczyk, Anna Przetakiewicz, Waclaw Orczyk
Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin, Radzików

Agrobacterium-mediated genetic transformation of cereal crops

Summary

The results published in recent years proved that *Agrobacterium* based system for genetic transformation was also suitable for cereal crops. Several research groups were able to obtain transgenic rice, corn, wheat and barley using hypervirulent strains Agl1 and EHA101 (or EHA105) or "regular" LBA4404 strain with superbinary vector pTOK233. The first phase of our research was designed to establish transformation susceptibility of two wheat, two barley and one triticale cultivars using three different bacterial systems. Two of those systems were based on hypervirulent strains: Agl1 (pDM805) and EHA101 (pGAH). The third one combined strong virulence of pTOK233 vector and commonly-used LBA 4404 strain.

Putative transgenic plants (regenerated and rooted under selective pressure of appropriate factor and further confirmed with GUS or PCR) were obtained for barley (cultivar Scarlett), wheat (Torka and Kontesa) and triticale (Wanad) with *Agrobacterium* strain Agl1. Kontesa's putative transgenics were also obtained with the strain EHA101. The highest rate of plant selection was for Agl1 / phosphinothricine and ranged from 9 to 15% for wheat cultivars. The lowest rate for the same strain and selection was 0,5% for barley cv. Scarlett.

Inoculation of 700 immature embryos of barley cv. Lot with three bacterial systems (strains, vectors and selection factors) failed to produce putative transformants. Also no putative transgenics of barley Scarlett, wheat Torka and triticale Wanad were obtained after transformation with EHA101 and selection on hygromycin. Selection with kanamycin and hygromycin + kanamycin after transformation with EHA101 and LBA4404 respectively also failed to give positive results.

Key words:

cereals, genetic transformation, *Agrobacterium tumefaciens*, wheat, barley.

Adres do korespondencji

Anna Nadolska-Orczyk,
Instytut Hodowli
i Aklimatyzacji Roślin,
Radzików, 05-870 Błonie.

1. Wstęp

Transformacja genetyczna roślin jest techniką wykorzystywaną od kilkunastu lat w badaniach podstawowych i aplikacyjnych zmierzających do modyfikacji odmian uprawnych. Metoda wykorzystująca bakterię glebową *Agrobacterium tumefaciens* należy do najszerzej stosowanej w grupie roślin dwuliściennych. Przełom w użyciu tej bakterii do transformacji roślin jednoliściennych, a zwłaszcza zbóż nastąpił dopiero w ciągu ostatnich paru lat, kiedy przedstawiono wiarygodne procedury oraz uzyskano transgeniczne rośliny ryżu, kukurydzy, pszenicy i jęczmienia (1). Do zalet tego systemu należy dość wysoka wydajność transformacji, integracja zdefiniowanego odcinka DNA oraz mendelowskie dziedziczenie. Wydajność procesu zależy od wielu czynników: szczepu bakteryjnego, genotypu, rodzaju eksplantatu, plazmidu, czynników fizycznych i in.

Celem naszych prac jest przygotowanie systemów transformacji za pomocą *Agrobacterium tumefaciens* wybranych zbóż. W pierwszym etapie, na podstawie opracowanych wcześniej systemów regeneracji wybraliśmy po dwie odmiany pszenicy i jęczmienia oraz jedną pszenżyta i porównaliśmy zdolność do transformacji trzech systemów bakteryjnych. Sprawdziliśmy również skuteczność następujących czynników selekcyjnych: kanamycyny, fosfotrycyny, higromycyny oraz kanamycyny w połączeniu z higromycyną.

2. Materiały i metody

2.1. Materiał roślinny

Do doświadczeń użyto niedojrzałe zarodki dwóch odmian jęczmienia: Lot i Scarlett, dwóch odmian pszenicy: Kontesa i Torka oraz jednej odmiany pszenżyta Wana. Były one wykładane na pożywkę podstawową wg Murashige i Skoog (1962) z dodatkiem 3 mg/l auksyny (2,4-D lub Picrolam lub Dicamba). Po dwóch dniach kultury wstępnej zarodki infekowano *Agrobacterium* i po dalszych dwóch dniach hodowli przekładano na pożywkę zawierającą odpowiedni czynnik selekcyjny oraz 150 mg/l timentyny. Stężenia substancji selekcyjnych były dobrane eksperymentalnie. Po 4-5 tygodniach kultury embriogeniczny kalus przenoszono na pożywkę MS zawierającą 0,2 mg/l IAA i 1 mg/l BAP. Wzrost i ukorzenianie zregenerowanych roślin prowadzono na pożywce z obniżonym do połowy składem substancji mineralnych MS. Selekcja regenerującego kalusa oraz roślin w kombinacjach traktowanych *Agrobacterium* była prowadzona przez cały czas kultury.

2.2. Szczepy bakteryjne

Użyto trzy szczepy bakterii zawierające wektory, których symbole podano w nawiasach: AGL1 (pDM805) dar od Dr R. Brettell (2), LBA4404 (pTOK233) dar od Dr T. Komari (3) i EHA101 (pGAH) dar od Dr N. Murata (4). Plazmid binarny pierwszego z nich zawierał gen selekcyjny *bar* natomiast dwa następne geny *nptII* oraz *hpt*. Selekcję prowadzono odpowiednio na 2 mg/l fosfotrycyny, 50 mg/l kanamycyny i 15 mg/l higromycyny. W eksperymentach po transformacji EHA 101 oraz LBA 4404 zastosowano również podwójną selekcję oporności na kanamycynę i higromycynę.

2.3. Testy GUS i PCR

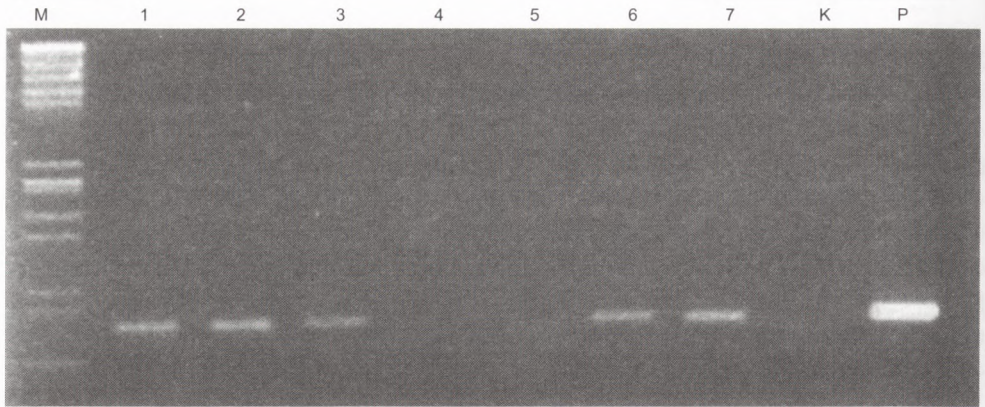
Testy histochemiczne na obecność β -glukuronidazy w kalusie embriogenicznym oraz tkankach liści, korzeni i pylników zregenerowanych na pożywkach selekcyjnych roślin przeprowadzono zgodnie z procedurą opisaną przez Jeffersona (4).

Izolację DNA z tkanek liści młodych roślin wykonano metodą CTAB (5). Do reakcji PCR użyto dwóch par specyficznych starterów dla genu *nptII* amplifikujących fragment o długości 732 par zasad oraz dla genu *gus* amplifikujących fragment o długości 1097 par zasad. Warunki reakcji PCR były następujące: 92°C – 1 min, 60°C – 1 min, 72°C – 2 min.

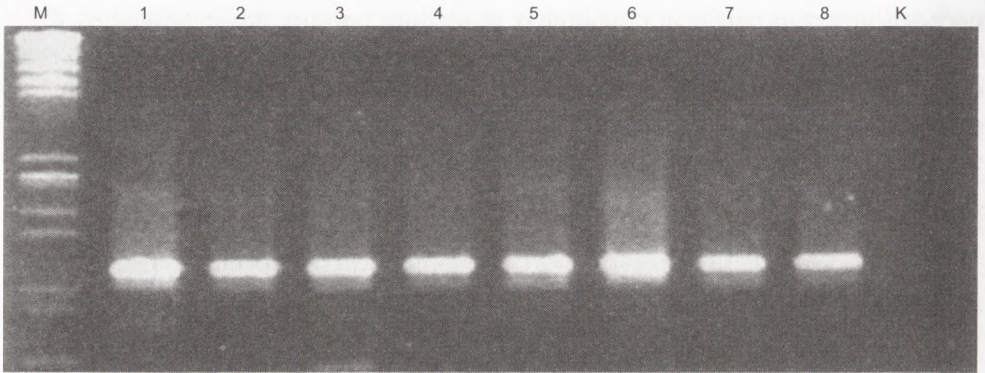
3. Wyniki i dyskusja

W pierwszej części naszych doświadczeń nad transformacją wybranych odmian pszenicy, jęczmienia i pszenżyta użyto trzech systemów bakteryjnych, za pomocą których uzyskano transgeniczne rośliny zbóż w innych laboratoriach. Szczep Agl1(pDM805) skutecznie infekował niedojrzałe zarodki jęczmienia Golden Promise (2), EHA 101 – merystemy wierzchołkowe kukurydzy i ryżu oraz niedojrzałe zarodki lub embriogeniczny kalus tarczkowy ryżu, a LBA4404(pTOK233) – różne eksplantaty ryżu oraz niedojrzałe zarodki kukurydzy (1). Dwa pierwsze szczepy należą do hiperwirulentnych, odznaczających się silną wirulencją, natomiast trzeci zawiera wektor binarny (nazwany superbinarnym) z wbudowanymi genami *vir*. Ekspresja tych genów może spowodować silniejszą infekcyjność określonego szczepu. Z danych zamieszczonych w tabeli 1 wynika, że regenerację roślin na pożywkach selekcyjnych otrzymano u dwóch odmian jęczmienia przy użyciu trzech systemów bakteryjnych. Jednak dorosłe, ukorzenione rośliny wykazujące pozytywne testy GUS (nie prezentowane) i PCR (fot. 1) uzyskano tylko u odmiany Scarlett po transformacji Agl1. Wydajność wynosiła 0,5% w przeliczeniu na 100 wyłożonych zarodków. Znacznie lepsze wyniki uzyskano po transformacji tym samym szczepem u obu testowanych odmian pszenicy. Wydajności te dla Kontesy wynosiły 9,1%, a dla Torki 15%. Ponadto

a)



b)



Fot. 1 a, b. Amplifikacja fragmentu genu *npt II* (a) na matrycy DNA wyizolowanego z pszenicy transformowanych szczepem EHA101 oraz genu *gus* (b) na matrycy DNA roślin jęczmienia transformowanych szczepem Agl1. M – marker molekularny; P – amplifikacja na matrycy plazmidowego DNA; K – amplifikacja na matrycy rośliny kontrolnej; 1-8 – kolejne numery testowanych roślin.

pozytywne po testach GUS i PCR rośliny Kontesy z wydajnością 2,5% otrzymano po transformacji szczepem EHA101. Nie uzyskano takich roślin u żadnej z testowanych odmian po transformacji LBA4404(pTOK233). Niedojrzałe zarodki pszenżyta Wanad były transformowane przy użyciu tylko dwóch szczepów Agl1 oraz EHA105, gdzie zastosowano selekcję na higromycynie (tab. 1). Potencjalnie transgeniczne roślinki otrzymano, podobnie jak w przypadku jęczmienia, tylko po infekcji Agl1 i selekcji na fosfotrycynie.

Skuteczność selekcji można analizować jedynie w doświadczeniach, gdzie do transformacji użyto EHA101(pGAH) oraz LBA4404(pTOK233). Obydwa te szczepy zawierają wektory binarne, które w odcinku T-DNA mają wbudowane dwa geny selek-

Tabela 1

Średnia liczba roślin zregenerowanych z zarodka oraz procentowy udział roślin ukorzenionych, wykazujących pozytywny gus lub test PCR (pogrubiona trzcionka) na pożywce kontrolnej i pożywkach selekcyjnych po infekcji trzema szczepami *Agrobacterium*

| | Kontrola | | AGL1 (pDM805) | | EHA101 (pGAH) | | | LBA4404(pTOK233) | | | | | | | | |
|----------|-------------|-------|---------------|-------------------|---------------|-------------------|--------------------------|------------------|------------|--------------------------|------|------|------|----------------|------|----------------|
| | higromycyna | | fosfotrycyna | | higromycyna | kanamycyna | higromycyna + kanamycyna | higromycyna | kanamycyna | higromycyna + kanamycyna | | | | | | |
| Lot | 1,96 | (242) | 0,03 | 0% (199) | 0,01 | 0% (328) | 0,23 | 0% (13) | 0,00 | (13) | 0,00 | (58) | 0,09 | 0% (43) | 0,00 | (43) |
| Scarlett | 1,73 | (217) | 0,51 | 0,5% (407) | 0,00 | (187) | 0,31 | 0% (26) | 0,08 | 0% (26) | 0,00 | – | 0,13 | 0% (95) | 0,08 | 0% (95) |
| Kontesa | 1,61 | (18) | 0,33 | 9,1% (110) | 0,03 | 2,5% (120) | 0,07 | 0% (30) | 0,00 | (30) | 0,00 | – | 0,00 | (30) | 0,00 | (30) |
| Torka | 1,64 | (55) | 0,17 | 15% (60) | 0,00 | (62) | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – |
| Wanad | 3,71 | (21) | 0,21 | 4,8% (42) | 0,05 | 0% (42) | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – |

W nawiasach podano liczby testowanych eksplantatów.

– brak danych

cyjne – *nptII* i *hpt* pod promotorami CaMV35S i *nos*. Regenerację roślin jęczmienia uzyskano zarówno na higromycynie jak i kanamycynie lub obydwu jednocześnie, jednak żadna z tych roślin nie ukorzeniła się na pożywce selekcyjnej. Jedynie u pszenicy Kontesa uzyskano 2,5% potencjalnie transgenicznych roślin na pożywce selekcyjnej zawierającej higromycynę.

Na obecnym etapie badań trudno stwierdzić dlaczego system bakteryjny Agl1(pDM805) okazał się najskuteczniejszy do transformacji zarówno pszenic jak i jęczmienia oraz pszenżyta. Różni się on od pozostałych dwóch: szczepem bakteryjnym, wektorem binarnym oraz genem selekcyjnym z podłączonym do niego silnym, konstytutywnym promotorem roślinnym ubiquityny *Ubi1*. Prawdopodobnie wszystkie te elementy mogły przyczynić się do wysokiej wydajności selekcji potencjalnie transgenicznych roślin. W celu porównania zdolności do infekcji należy przygotować i przeprowadzić transformację przy użyciu różnych szczepów zawierających taki sam plazmid binarny (badania w toku).

Odmiany jęczmienia wykazały istotne różnice w zdolności do transformacji. U odmiany Lot nie uzyskano potencjalnie transgenicznych roślin z prawie 700 wyłożonych niedojrzałych zarodków. Otrzymano je natomiast u odmiany Scarlett po transformacji Agl1 z wydajnością 0,5%. Różnice te nie były związane ze zdolnością do regeneracji, ponieważ regeneracja roślin kontrolnych u odmiany Lot była nieco wyższa niż u odmiany Scarlett. Obydwie odmiany pszenic charakteryzowały się dobrą zdolnością do transformacji. Potencjalnie transgeniczne rośliny Kontesy uzyskano zarówno po transformacji Agl1 i selekcji na fosfotrycynie jak i EHA101 oraz selekcji na higromycynie. Należy podkreślić, że w dotychczas opisanych dwóch procedurach transformacji roślin pszenicy za pomocą *Agrobacterium* używano jedynie nopalinowego szczepu C58 (pMON18365) (5) oraz C58C1 (pGPTV3850::1103*neo*) (6). Jeżeli zatem potwierdzimy ich transgeniczny charakter metodą hybrydyzacji typu *Southern* (badania w toku), będzie to pierwsze doniesienie o możliwości transformacji roślin pszenicy szczepami hiperwirulentnymi Agl1 i EHA101 oraz roślin pszenżyta szczepem Agl1.

Praca jest finansowana z grantu Komitetu Badań Naukowych nr 5P06A 02117.

Literatura

1. Nadolska-Orczyk A., Orczyk W., Przetakiewicz A., (2000), *Acta Physiol. Plant.*, 22, 77-88.
2. Tingay S., McElroy D., Kalla R., Fieg S., Wang M., Thornton S., Brettell R., (1997), *Plant J.*, 11, 1369-1376.
3. Hiei Y., Ohta S., Komari T., Kumashiro T., (1994), *Plant J.*, 6, 271-282.
4. Hayashi H., Alia, Mustardy L., Deshniun P., Ida M., Murata N., (1997), *Plant J.*, 12, 133-142.
5. Cheng M., Fry J.E., Pang S., Zhou H., Hironaka C.M., Duncan D.R., Conner T.W., Wan Y., (1997), *Plant Physiol.*, 115, 971-980.
6. Hess D., Dressler K., Nimmrichter R., (1990), *Plant Sci.*, 72, 233-244.