

Od Redakcji



Zadziwiający postęp w metodyce transformacji roślin

Stefan Malepszy
Katedra Genetyki Hodowli
i Biotechnologii Roślin
Szkoła Główna Gospodarstwa
Wiejskiego
Warszawa

1. Wstęp

Transformacja jest to metoda za pomocą której wprowadza się do genomu określony fragment DNA. Czyni się to albo w celu zbadania jaką funkcję dany fragment pełni albo uzyskania ściśle zamierzonego efektu — jeżeli wiadomo jaki fenotyp jest przez fragment wywoływany.

Transformacja jest używana w dwóch obszarach: 1) w badaniach podstawowych przy poznawaniu roli określonych części informacji genetycznej, 2) w pracach aplikacyjnych przy uzyskiwaniu roślin zwanych transgenicznymi, które mają zmienioną konkretną(e) właściwość(i). Z tych też względów skuteczność transformacji w decydującym stopniu wyznacza szybkość postępu w pracach badawczych oraz aplikacji.

2. Postęp w transformacji

W moim przekonaniu w ostatnim okresie dokonał się niezwykle postęp w zakresie doskonalenia metodyki transformacji. Wyraża się on przede wszystkim: 1) ogromnym zwiększeniem skuteczności głównie przez opracowanie nowych „super wektorów”, dzięki czemu stała się możliwa transformacja roślin jednoliściennych za pomocą *Agrobacterium tumefaciens* oraz transformowanie bez potrzeby użycia kultur *in vitro*, 2) opracowaniem oryginalnego i uniwersalnego markera GFP (*Green Fluorescent Protein*), 3) kontrolą miejsca insercji transgenu. Skutki tych prac są wielorakie. Przede wszystkim transformacja staje się coraz bardziej prostym zabiegiem, który może być zrealizowany na zamówienie (w USA są nawet ośrodki, które wyspecjalizowały się w świadczeniu tej usługi u poszczególnych gatunków — tab.1). Oznacza to, że weryfikacja efektów fenotypowych wszelkich konstrukcji genowych będzie coraz prostsza i szybsza. Dzięki temu ogromnie przyspieszy się tempo prac z zakresu genetyki molekularnej oraz biotechnologii. Zyskują zatem badania podstawowe i aplikacyjne.

TABELA 1
PRZYKŁADY USŁUGOWYCH MOŻLIWOŚCI W ZAKRESIE TRANSFORMACJI RÓŻNYCH GATUNKÓW ROŚLIN
W RÓŻNYCH OŚRODKACH W USA

Instytucja	Roślina	Kontakt
Cornell University	pomidor, glony, grzyby	Karen Kindle
Iowa State University	kukurydza, soja	Kan Wang
Texas A&M University	bawełna, ryż, sorgo, banan	Keerti Lathore
Texas A&M University	topola, sosna	Jean Gould
University of Georgia University of Kentucky Ohio State University	soja	Glenn Collins
University of Nebraska Lincoln	pszenica, soja	Paul Staswik
University of Wisconsin at Madison	lucerna, ziemniak	Sandra Austin Philips

2.1. Skuteczność transformacji

Skuteczność transformacji jest głównie pochodną trzech czynników: 1) częstości integracji transgenu do genomu biorcy; 2) rozdzielczości metody selekcji czyli możliwości odróżnienia komórek lub innych obiektów, które uległy transformacji, od typu dzikiego oraz 3) możliwości zastosowania u dowolnego gatunku lub odmiany. Rośliny jednoliścienne były uważane za niezwykle trudne do transformacji z dwóch zasadniczych powodów. Po pierwsze, twierdzono, że nie ulegają transformacji za pomocą naturalnego i powszechnie używanego wektora jakim jest *Agrobacterium tumefaciens*. Po drugie zaś,

u większości z jednoliściennych bardzo trudno uzyskiwano regenerację w kulturach *in vitro*, będących podstawowym, a właściwie jedynym materiałem do transformacji. Tymczasem właśnie rośliny jednoliścienne są najbardziej znaczącą ekonomicznie grupą w światowym rolnictwie. Z tych też względów sceptycznie zapatrywano się na możliwości szybkich sukcesów ekonomicznych, przez wprowadzenie transgenicznych odmian.

Myśląc o zwiększeniu efektywności transformacji u roślin jednoliściennych, zwracano się przede wszystkim ku metodzie biolistycznej, polegającej na mikrowstrzeliwaniu DNA do komórek i tkanek. Przełom, który nastąpił był zupełnie niespodziewany. Najpierw okazało się, że za pomocą *A. tumefaciens* można uzyskać transgeniczne rośliny ryżu, i to z wcale niemałą efektywnością. Dokonali tego Japończycy z Japan Tobacco Company. W ubiegłym roku, ta sama grupa użyła do transformacji kukurydzy specjalnego „superbinarnego” wektora i *A. tumefaciens* uzyskała zadziwiająco wysoką skuteczność, wynoszącą do 30% zarodków, nieosiągalną za pomocą metod biolistycznych. W tym samym czasie dokonano transformacji innej niezwykle ważnej w rolnictwie trzeciego świata rośliny jednoliściennej, tj. manioku. W jednym z zespołów zastosowano metodę biolistyczną, a w drugim wykorzystano *A. tumefaciens*. Skuteczność tę osiągnięto dzięki ustaleniu roli kilku czynników takich jak: stadium i genotyp niedojrzałych zarodków używanych do kultury, stężenie bakterii użytych do kokultury, skład pożywki używanej do kultury, rodzaj i konstrukcja genu markerowego. Zastosowanie genu markerowego GUS, zawierającego intron w obrębie kodującej sekwencji zapewniło „czystość” ekspresji tylko w komórce roślinnej, a nie w bakteriiach infekujących tkankę.

Dzięki temu jednoznacznie można było rozpoznać efekt transformacji. Na przestrzeni ostatnich czterech lat skuteczność transformacji, np. ryżu wzrosła przeszła 100-krotnie. W każdej z prac bardzo dużą uwagę przywiązywano do właściwego stanu materiału z kultury *in vitro* używanego do transformacji.

Obecnie, grupa roślin nie dwuliściennych u których dokonano transformacji za pomocą *A. tumefaciens* obejmuje: jednoliścienne — pszenica, kukurydza, ryż, maniok, narcyz, asparagus i mietczyk oraz drzewa — orzech włoski i ananas.

Kolejny przełom w metodyce transformacji polega na tym, że nie jest konieczne stosowanie kultury *in vitro*, można używać nasion, wprawdzie niezwykle drobnych bo *Arabidopsis thaliana*, ale jednak! (1). Można też transformować *in planta* (2).

Geny markerowe i selekcyjne są bardzo ważnym elementem w transformacji. Ich rola pozornie prosta, jest jednak złożona. Stosowane dotychczas geny markerowe miały kilka wad utrudniających jednoznaczne odróżnienie tych komórek i roślin, które uległy transformacji od typu dzikiego. Do najważniejszych należą: konieczność stosowania substratu do reakcji i zapewnienie jej odpowiedniego przebiegu (np. gen GUS) i możliwość ujemnego wpływu na komórki lub środowisko (oporność na herbicydy, antybiotyki). Ciągłe też jest podnoszona, szczególnie w prowadzonych w środkach masowego przekazu dyskusjach, możliwość przedostania się takich genów mar-

kerowych do innych roślin w naturalnym środowisku i powstaniu komplikacji ekologicznych. Za pomocą dotychczasowych markerów jest bardzo trudno monitorować taką zaszłość. Można powiedzieć, że u podstaw niezadowolenia z dotychczasowych markerów transgenów leżą albo niewygodna i niepewność efektu albo obawa przed narażeniem się na krytykę organizacji proekologicznych. Nowym markerem (3), należącym do tzw. markerów *in vitro* jest gen kodujący białko zielonej fluorescencji. Użyty do tych badań GFP pochodzi z meduzy i jest 27-KD monomerem o unikatowej właściwości polegającej na emisji światła zielonego po naświetleniu ultrafioletem (~ 395 nm) lub światłem niebieskim (~ 490 nm). Efekt ten obserwowano po wprowadzeniu genu do bakterii, nicieni, owadów, myszy i roślin. Jest to zatem uniwersalny marker transgenicznego, bo niezależny od gatunku i dodatkowo nie wymagający substratu, enzymu czy kofaktora. Ciekawostką jest to, że oryginalny gen GFP został tak zmodyfikowany, za pomocą metod inżynierii genetycznej, aby poziom jego ekspresji umożliwiał zastosowanie w pracach monitorowania ekologicznego. Modyfikacje jakich dokonano polegały na eliminacji ukrytych miejsc łączenia oraz zamianie słabych kodonów na silniejsze. Śledzenie „losu” transgenu w środowisku staje się dzięki temu proste, szybkie i jednoznaczne.

2.2. Kontrola miejsca insercji transgenu

Jest ona bardzo ważnym czynnikiem kształtującym efektywność transformacji. Zmieniające się miejsca insercji transgenu, a tym samym różne sąsiedztwo genów wobec transgenu, jest uważane za główny czynnik zmienności fenotypowej transformantów niosących ten sam transgen. W przypadku zamiaru wytworzenia transgenicznej odmiany, powoduje to konieczność przetestowania większej liczby niezależnie powstałych transformantów określaną na minimum ok. 30-100 w zależności m.in. od gatunku, transgenu i warunków transformacji. Proces integracji DNA przy bezpośrednich transformacjach (elektroporcja, chemiczne inkubacje protoplastów, metody biolistyczne) jest mało poznany. Systemy transformacji wykorzystujące wektory Ti zachowują elementy naturalnego systemu integracyjnego w postaci lewych i prawych sekwencji granicznych oraz wirulentnych genów kodowanych przez Ti plazmidy lub bakteryjne DNA. W takim przypadku integracje są katalizowane przez białka będące składnikami systemów integrujących. Podstawowym mechanizmem umożliwiającym precyzyjne, ukierunkowane integracje transgenów w wybrane miejsca w genomie są homologiczne rekombinacje. Ich wydajność jest jednak bardzo niska, tj. jedna na ok. 10^5 - 10^6 niehomologicznych, przypadkowych rekombinacji; co eliminuje jakiegokolwiek praktyczne zastosowania metod polegających na ukierunkowanej genetycznej transformacji roślin. Obecnie uzyskano transgeniczne rośliny zawierające proste systemy specyficznej integracji m.in. *Cre/lox* z bakterii lub FLP/FRT u tytoniu (4) z 2 μ m plazmidu drożdżowego u kukurydzy (5 i 6). Przy ich użyciu wykazano, że jest możliwa niezwykle wysoka sprawność działania systemów w takich roślinach jak tytoń i kukurydza. Metoda ta wymaga najpierw przygotowania biorecy do transfor-

macji przez odpowiednie usytuowanie w jego genomie określonych sekwencji, a dopiero potem przeprowadzana jest transformacja genem użytkowym. Sprawa to, że procedura staje się dwuetapowa.

Systemy specyficznej rekombinacji mogą być wykorzystane do wycinania zbędnych fragmentów obcego DNA po transformacji. Obecnie dostarczono dowody, że u kukurydzy są możliwie dokładne genowe rekombinacje specyficznych miejsc rekombinacyjnych (FRT) indukowane przez FLP rekombinazę. Używając tego systemu, a także doskonale przemyślanych konstrukcji wektorów rekombinacyjnych, dokonano wycięcia markerowego genu *neo* z wydajnością rzędu 61%.

Osiągnięcie to stwarza jednocześnie możliwość spełnienia jednego z żądań organizacji proekologicznych, tj. aby odmiany transgeniczne nie zawierały genów selekcyjnych i/lub markerowych powodujących oporność na antybiotyki czy herbicydy.

Systemy specyficznej rekombinacji mogą zostać również wykorzystane do tego, aby reakcje z nimi związane i ekspresja transgeny zachodziły w określonym miejscu lub czasie. Stwarza to nie tylko dodatkowe i wartościowe możliwości aplikacyjne, ale również i badawcze, szczególnie nad procesami rozwojowymi.

Literatura

1. Feldman K. A., Marks M., (1987), *Molec. Gen. Genet.*, 208, 1-9.
2. Bechtold N., Ellis J., Pelletier G., (1993), *C. R. Acad. Sci. Paris, Sciences de la vie*, 316, 1194-1199.
3. Haseloff J., Amos B., (1995), *TIG*, 11, 328-329.
4. Albert H., Dale E. C., Lee E., Ow D. W., (1995), *The Plant Journal*, 7, 649-659.
5. Łyżnik L., Rao K. V., Hodges T. K., (1996), *Nucleic Acid Res.*, 24(19), 3784-3789.
6. Hodges T., Łyżnik L., (1996), *J. Appl. Genetics*, 37A, 36-49.

An amazing progress in plant transformation methods

Summary

A great progress in the higher plants transformation methodology has been observed. It includes the following events: increasing efficiency, development of new markers which are ecologically acceptable, transformation of new monocotyledonous species using *A. tumefaciens* „superectors”, control of recombination site.

Key words:

plant transformation, efficiency, control of recombination site, green fluorescence protein.

Adres do korespondencji:

Stefan Malepszy, Katedra Genetyki Hodowli i Biotechnologii Roślin, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego, ul. Nowoursynowska 166, Warszawa.