



Wpływ transformacji genem *iaglu* na wzrost i rozwój transgenicznej truskawki w kulturach *in vitro*

Danuta Wawrzyńczak, Iwona Sowik, Lech Michalczuk
Zakład Fizjologii i Biochemii Roślin, Instytut Sadownictwa
i Kwaciarnictwa, Skierniewice

The effect of transformation with *iaglu* gene on growth and development of transgenic strawberry in *in vitro* cultures

Summary

The aim of the presented work was to study the effects of changes of endogenous indole-3-acetic acid (IAA) metabolism on *in vitro* shoot proliferation and rhizogenesis of transgenic strawberry shoots carrying maize IAA-glucose synthase gene (*iaglu*). Four *iaglu*-transformed strawberry clones and non-transformed 'Kaster' shoots served as a plant material for the study. The analysis of free and conjugated IAA level in leaves of transgenic and control strawberry plants showed that *iaglu*-containing strawberry clones had significantly higher level of ester conjugated IAA, but the level of free hormone was only slightly decreased or comparable to the control plants. *iaglu*-transformed clones had significantly higher proliferation rate and formed more roots than the control shoots. One of the *iaglu*-transformed clones had significantly shorter and other two – longer roots than the control plantlets.

Key words:

auxin homeostasis, genetic transformation, proliferation rate, rooting ability, strawberry.

Adres do korespondencji

Danuta Wawrzyńczak,
Zakład Fizjologii
i Biochemii Roślin,
Instytut Sadownictwa
i Kwaciarnictwa,
ul. Pomologiczna 18,
96-100 Skierniewice;
e-mail:
dwawrzyn@insad.pl

1. Wstęp

Auksyny są hormonami roślinnymi odgrywającymi główną rolę w regulacji wzrostu i rozwoju roślin, wpływają one m.in. na wzrost wydłużeniowy łodyg, zjawisko dominacji wierzchołkowej, tworzenie korzeni przybyszowych, zrzucanie organów oraz

wzrost i dojrzewanie owoców (1). Auksyną powszechnie występującą w roślinach jest kwas indolilo-3-octowy (ang. *indole-3-acetic acid*, IAA). W tkankach roślinnych tylko niewielka część IAA występuje w postaci wolnego kwasu, który uważany jest za formę aktywną biologicznie tego hormonu, natomiast przeważającą jego część jest związana estrowo lub amidowo z cukrami, mezoinozytolem, aminokwasami i białkami (2,3). Odwracalna synteza i hydroliza form związanych IAA uważana jest za jeden z mechanizmów wpływających na poziom wolnego hormonu w tkankach roślinnych (2,4,5).

Większość informacji na temat roli auksyn w regulacji wzrostu i rozwoju roślin uzyskano do tej pory w wyniku doświadczeń z egzogenną aplikacją hormonu. W ostatnich latach został osiągnięty znaczny postęp w badaniach nad metabolizmem i rolą fitohormonów w roślinach dzięki zastosowaniu metod biologii molekularnej i wykorzystaniu naturalnych lub indukowanych mutantów. Trwałą zmianę poziomu endogennego IAA w tkankach roślinnych otrzymano w wyniku transformacji roślin genami kodującymi enzymy odpowiedzialne za metabolizm tego hormonu (6). Jednym z takich genów jest gen *iaglu* z kukurydzy, kodujący syntazę estru glukozowego kwasu indolilo-3-octowego (transferazę glukozylu UDPG : IAA). Reakcja katalizowana przez ten enzym spełnia główną rolę w cyklu reakcji odpowiedzialnych za syntezę form związanych IAA w kukurydzy (7). Badania nad transformacją roślin genem *iaglu* oraz zbadaniem wpływu ekspresji tego genu na poziom endogenego IAA oraz procesy rozwojowe roślin prowadzone są obecnie w kilku laboratoriach w Europie i USA, w tym także w Instytucie Sadownictwa i Kwaciarnictwa w Skierniewicach. W wyniku prac prowadzonych przez nasz zespół uzyskano transgeniczne rośliny truskawki (8) i petunii (9) zawierające w swoim genomie sekwencję cDNA genu *iaglu* pod kontrolą konstytutywnego promotora CaMV 35S oraz wykazujące ekspresję tego transgenu.

Celem prezentowanej pracy było zbadanie wpływu zmiany metabolizmu endogenego kwasu indolilo-3-octowego wywołanego ekspresją transgenu *iaglu* na namnażanie oraz rizogenezę *in vitro* transgenicznych pędów truskawki.

2. Materiał i metody

2.1. Materiał roślinny

Materiał do badań stanowiły 4 klony transgenicznej truskawki oznaczone numerami: IV, VII, VIII i X, zawierające w swoim genomie cDNA genu syntazy estru glukozowego kwasu indolilo-3-octowego (*iaglu*) z kukurydzy pod kontrolą promotora CaMV 35S, uzyskane w wyniku transformacji truskawki odmiany 'Kaster'. Kontrolę dla roślin transgenicznych stanowiły pędy truskawki odmiany 'Kaster' nietransformowane, otrzymane przez organogenezę z kalusa w analogiczny sposób jak rośliny

transgeniczne. Transgeniczne klony truskawki oraz rośliny klonu kontrolnego namnażano w kulturach *in vitro* na standardowej pożywce namnożeńiowej wg Boxusa (10) z dodatkiem $0,5 \text{ mg l}^{-1}$ IBA (kwas indolilo-3-masłowy), $0,5 \text{ mg l}^{-1}$ BAP (6-benzyloaminopuryna), $0,1 \text{ mg l}^{-1}$ GA₃ (kwas giberelinowy) i 0,8% agaru. Rośliny były przenoszone na świeże pożywki co 4 tygodnie. Kultury inkubowano w komorach hodowlanych, w temperaturze 23/18°C (dzień/noc), przy świetle białym (lampy fluorescencyjne Philips 'TL'D 36W) o natężeniu napromieniowania $55 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ i 16-godzinnym fotoperiodzie.

2.2. Analizy poziomu wolnego IAA i jego pochodnych estrowych

Zawartość kwasu indolilo-3-octowego w materiale roślinnym oznaczano zmodyfikowaną metodą wg Chena i in. (11). Do analiz pobierano po 0,5 g liści z roślin transgenicznych klonów truskawki oraz roślin kontrolnych. Zawartość IAA oznaczano za pomocą chromatografu gazowego sprzężonego ze spektrometrem masowym (Hewlett-Packard, Gas Chromatograph 5890/5971A). Zawartość pochodnych estrowych kwasu indolilo-3-octowego wyliczano z różnicy zawartości wolnego IAA w próbkach przed i po hydrolizie. Analizy wykonano w trzech powtórzeniach, uzyskane wyniki analizowano statystycznie testem „t” Duncana przy poziomie istotności 0,05. Kombinację stanowił pojedynczy klon truskawki.

2.3. Obserwacje wzrostu i rozwoju pędów w kulturach *in vitro*

Przeprowadzono obserwacje proliferacji oraz rizogenezy transgenicznych i kontrolnych pędów truskawki w kulturach *in vitro*. Do doświadczenia użyto pędów uzyskanych po piątym pasażu namnożeńiowym. Pędy wielkości ok. 1 cm przeszczepiano na 4 pożywki wg Boxusa, zawierające $0,5 \text{ mg l}^{-1}$ BAP, $0,1 \text{ mg l}^{-1}$ GA₃, 0,8% agaru, różniące się zawartością auksyny (IBA): jedna pożywka nie zawierała dodatku auksyny, a trzy pozostałe zawierały $0,5 \text{ mg l}^{-1}$, 1 mg l^{-1} lub 2 mg l^{-1} IBA. Po 4 tygodniach kultury obliczono współczynnik namnażania roślin, a także oznaczono świeżą i suchą masę mikroroślinek rosnących na pożywce z dodatkiem $0,5 \text{ mg l}^{-1}$ IBA (standardowa pożywka namnożeńiowa). Suchą masę oznaczano po suszeniu w 80°C przez 48 godzin. Doświadczenie wykonano w trzech powtórzeniach, powtórzenie stanowiła jedna kolbka z 5-7 pędami.

Zdolność do rizogenezy w kulturach *in vitro* poszczególnych klonów oznaczano na 12 pędach z każdego transgenicznego klonu oraz roślin kontrolnych umieszczonych na pożywce ukorzeniającej (pożywka stała wg Boxusa bez regulatorów wzrostu). Doświadczenie prowadzono w trzech powtórzeniach, powtórzeniem była jedna kolbka z rosnącymi w niej czterema pędami. Po 30 dniach korzenie liczone, zmierzono ich długość i oznaczono ich świeżą i suchą masę.

Wszystkie uzyskane wyniki analizowano statystycznie (analiza wariancji i szacowanie istotności różnic testem „t” Duncana przy poziomie istotności 0,05). Kombinację stanowił pojedynczy klon truskawki.

3. Wyniki

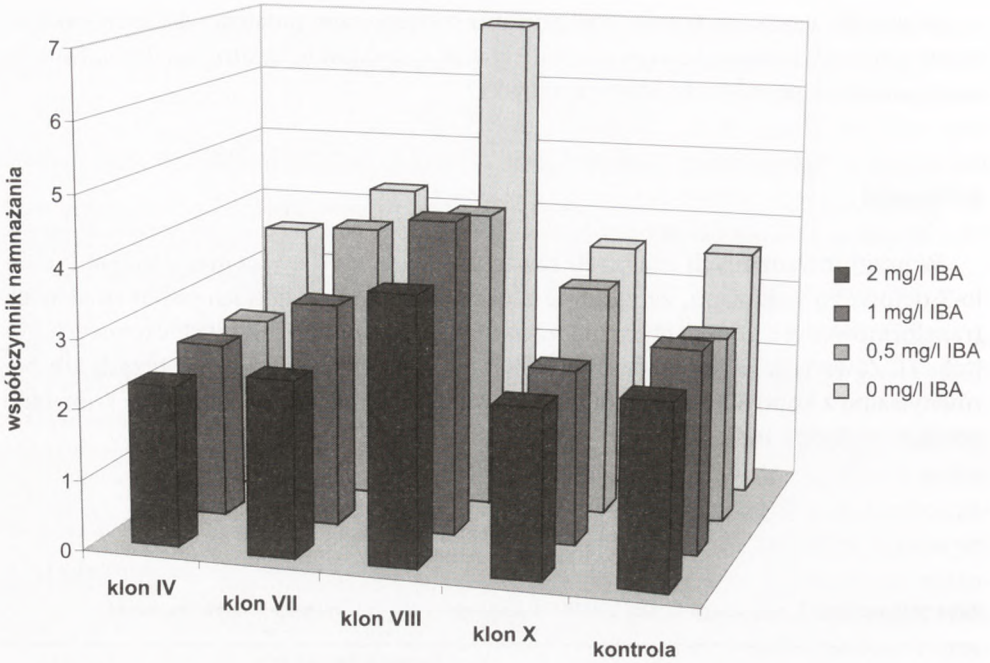
W przeprowadzonych analizach zawartości wolnego i związanego kwasu indolilo-3-octowego wykazano, że zgodnie z oczekiwaniami, w liściach roślin truskawek transformowanych genem *iaglu* znacząco wzrósł poziom pochodnych estrowych IAA (tab. 1). Zawartość wolnego hormonu była jednak tylko nieznacznie niższa lub porównywalna z kontrolą (tylko klony VII i X miały istotnie niższy niż rośliny kontrolne poziom wolnego IAA).

Tabela 1

Zawartość wolnego i związanego kwasu indolilo-3-octowego w liściach różnych klonów truskawki

Klon	Zawartość IAA [ng g ⁻¹ ś. m.]	
	wolny	pochodne estrowe
IV	34,0 bc	115,5 b
VII	21,7 ab	141,7 c
VIII	29,0 abc	105,3 b
X	16,7 a	103,3 b
kontrola	37,3 c	62,2 a

Pomimo niewielkich zmian w poziomie wolnego IAA zaobserwowano istotne różnice w rozwoju transgenicznych klonów truskawki w warunkach *in vitro* w porównaniu z pędami kontrolnymi, różnice wystąpiły zarówno w poziomie proliferacji, jak i w zdolności pędów do rizogenezy. Najwyższy współczynnik namnażania zaobserwowano u klonu VIII, proliferacja tego klonu na wszystkich stosowanych pożywkach była istotnie wyższa w porównaniu z kontrolą oraz pozostałymi klonami transgenicznymi (rys.). Na pożywce zawierającej 0,5 mg l⁻¹ IBA także współczynnik namnażania pędów klonów VII i X był istotnie wyższy niż pędów roślin kontrolnych. Istotne różnice pomiędzy roślinami kontrolnymi oraz transgenicznymi stwierdzono w świeżej i suchej masie mikroroślinek (roślinek powstałych przez proliferację z jednego pędu wyszczepionego na pożywkę namnożeńiową) rosnących przez cztery tygodnie na standardowej pożywce namnożeńiowej (tab. 2). Największą świeżą i suchą masę miały mikroroślinki klonu VIII, który tworzył najwięcej pędów. Klon X,



Rys. Namnażanie transgenicznych i kontrolnych pędów truskawki po 4 tygodniach kultury na pożywkach o różnym stężeniu auksyny (IBA).

pomimo że na pożywce namnożeniowej wytwarzał większą liczbę pędów niż kontrola, miał istotnie mniejszą świeżą i suchą masę mikroroślinek niż rośliny kontrolne.

Tabela 2

Masa mikroroślinek transgenicznych i nietransformowanych truskawek po czterech tygodniach kultury na standardowej pożywce namnożeniowej

Klon	Świeża masa mikroroślinek [mg]	Zawartość suchej masy [%]
IV	99,6 ab	20,9 a
VII	157,0 cd	19,8 a
VIII	164,9 d	20,2 a
X	93,3 a	20,7 a
kontrola	128,9 bc	23,2 b

Wszystkie transgeniczne klony wytworzyły średnio większą liczbę korzeni w porównaniu z roślinami kontrolnymi po trzydziestu dniach kultury na pożywce ukoźnającej (tab. 3). Klon IV miał istotnie krótsze, a klony VII i VIII – dłuższe korzenie niż rośliny kontrolne. Dwa transgeniczne klony – VII i VIII wytwarzały korzenie

cieńsze niż rośliny kontrolne, co miało swoje odbicie w niewielkiej masie ich systemu korzeniowego przy wzięciu pod uwagę, że liczba korzeni była większa i były one dłuższe (tab. 3).

Tabela 3

Liczba korzeni wytworzonych przez różne kłony truskawki po trzydziestu dniach kultury *in vitro* na pożywce ukorzeniającej oraz ich charakterystyka

Klon	Liczba korzeni	Długość korzeni [cm]	Świeża masa korzeni [mg]	Zawartość suchej masy [%]
IV	5,8 c	1,09 a	32,1 a	15,3 c
VII	7,0 d	8,87 d	94,4 c	14,1 b
VIII	4,9 b	6,69 c	39,9 a	15,6 c
X	5,2 bc	5,26 b	54,5 b	14,1 b
kontrola	3,9 a	4,63 b	63,8 b	11,3 a

Zaobserwowano również różnice w uwodnieniu tkanek pomiędzy roślinami transgenicznymi i kontrolnymi. Pędy wszystkich transgenicznych klonów w warunkach *in vitro* były bardziej uwodnione niż pędy roślin kontrolnych (tab. 2), natomiast w korzeniach tworzonych *in vitro*, zawartość suchej masy była większa u wszystkich transgenicznych klonów niż u roślin kontrolnych (tab. 3).

4. Dyskusja

Niewielki wpływ transformacji genem syntazy IAA-glukozy na zawartość wolnego kwasu indoliloctowego można wytłumaczyć zwiększeniem jego syntezy *de novo* lub/i zwiększoną intensywnością hydrolizy form związanych na skutek zadziałania systemu homeostatycznego. W efekcie wzrósł poziom pochodnych estrowych, a poziom wolnego IAA spadł tylko nieznacznie lub wcale. Ponieważ ekspresja transgeny pod kontrolą promotora CaMV 35S jest konstytutywna, a natywnych genów metabolizmu IAA specyficzna, nie jest wykluczone, że lokalnie, na poziomie komórkowym lub tkankowym, zmiany w poziomie IAA są znaczne, pomimo braku takich różnic przy oznaczaniu tego hormonu w całych liściach.

Zmiana równowagi hormonalnej przez transformację genem *iaglu* spowodowała zmiany we wzroście i rozwoju transgenicznych roślin truskawki, aczkolwiek efekt był różny dla różnych transgenicznych klonów, co było prawdopodobnie spowodowane różnicami w poziomie ekspresji genu *iaglu*. Transformacja genetyczna roślin z reguły prowadzi do otrzymania klonów o różnym poziomie ekspresji transgeny (12). Uważa się, że jednym z czynników wpływających na poziom ekspresji transgeny, obok m.in. liczby jego kopii oraz rodzaju promotora, jest miejsce insercji w genomie rośliny (12-14).

Można przypuszczać, że zwiększona proliferacja niektórych klonów truskawki zawierających gen *iaglu* była wynikiem zmniejszonej dominacji wierzchołkowej u tych roślin, spowodowanej zmianami w metabolizmie IAA. Równowaga ilościowa pomiędzy różnymi grupami związków regulatorowych, a w szczególności między auksynami i cytokininami, wyznacza kierunek rozwoju tkanek w kulturach *in vitro* (15). U roślin o obniżonym poziomie wolnego IAA można spodziewać się zmiany tej równowagi na korzyść cytokinin czego efektem jest zwiększona proliferacja pędów. Jednak trudno dopatrzeć się prostej zależności pomiędzy spadkiem poziomu wolnego IAA a zwiększeniem współczynnika namnażania u klonów truskawki transformowanych genem *iaglu*, np. klon VIII miał istotnie wyższy współczynnik namnażania niż pędy kontrolne oraz pędy pozostałych klonów transgenicznych, lecz poziom wolnego IAA u tego klonu nie różnił się istotnie od kontroli.

Tworzenie większej liczby korzeni przez rośliny o obniżonym poziomie IAA jest wynikiem zaskakującym, gdyż auksyny zarówno endo- i egzogenne indukują wytwarzanie korzeni w kulturach *in vitro* (15,16). Podobnie trudny do wyjaśnienia jest zróżnicowany wpływ ekspresji genu *iaglu* na długość korzeni, np. klon IV, który miał porównywalny z kontrolą poziom wolnego IAA, tworzył aż trzykrotnie krótsze korzenie, natomiast u klonu X przy znacznie niższym poziomie wolnego hormonu rozwój korzeni następował analogicznie jak u pędów kontrolnych (tab. 3).

Wiadomo, że auksyny wpływają na akumulację substancji pokarmowych w komórkach tworząc tzw. zlew fizjologiczny (1), przypuszczać zatem można, że zmiana równowagi hormonalnej miała wpływ na akumulację suchej masy w tkankach. Zjawisko większego uwodnienia pędów *in vitro* można łączyć również z wpływem cytokinin. Cytokiny powodują zwiększoną akumulację wody w pędach utrzymywanych w kulturach *in vitro*, co w skrajnych przypadkach prowadzi do szklistości tkanek (17).

Brak korelacji pomiędzy wzrostem i rozwojem transgenicznych klonów truskawki a zawartością wolnego i związanego kwasu indolilo-3-ocetowego wskazuje, że efekt powodowany przez auksyny nie zależy tylko od jej stężenia w tkance, lecz przypuszczalnie także od dystrybucji (kompartamentacji) hormonu na poziomie tkankowym i/lub komórkowym.

Badania przedstawione w pracy były finansowane z grantu KBN nr 6 P06A 011 20.

Literatura

1. Jankiewicz L. S., (1997), *Regulatory wzrostu i rozwoju roślin. Własności i działanie*, red. Jankiewicz L. S., 17-40, PWN, Warszawa.
2. Cohen J. D., Bandurski R. S., (1982), *Ann. Rev. Plant. Physiol.*, 33, 403-430.
3. Michalczyk L., Baldi B. G., Cohen J. D., (1990), *Inositol Metabolism in Plants*, Eds. Morre D. J., Boss W. F., Loewus F. A., 93-106, Wiley-Liss, New York.
4. Bandurski R. S., (1980), *Plant Growth Substances*, Ed. Skoog F., 37-49, Springer-Verlag, Berlin and Heidelberg.

5. Bandurski R. S., Schulze A., Reinecke D. M., (1986), *Plant Growth Substances*, Ed. Bopp M., 83-91, Springer-Verlag, Berlin and Heidelberg.
6. Hobbie L., Estelle M., (1994), *Plant, Cell and Environment*, 17, 525-540.
7. Szerszen J. B., Szczygłowski K., Bandurski R. S., (1994), *Science*, 265, 1699-1701.
8. Wawrzyńczak D., Sowik I., Michalczuk L., (2000), *Biotechnologia*, 4(51), 103-105.
9. Michalczuk L., Michalczuk B., (2001), 17th International Conference on Plant Growth Substances, 1-6 July, Brno, Czech Republic, Abstracts, 90.
10. Boxus P., (1974), *J. Hort. Sci.*, 49, 209-210.
11. Chen K.-H., Miller A. N., Patterson G. W., Cohen J. D., (1988), *Plant Physiol.*, 86, 822-825.
12. Szopa J., Wróbel M., (2001), *Biotechnologia*, 1(52), 63-72.
13. Niemirowicz-Szczytt K., Bartoszewski G., (2000), *Biotechnologia*, 4(51), 11-23.
14. Orlikowska T., (2001), *Folia Horticulturae*, 13/1A, 39-48.
15. Młodzianowski F., (1984), *Hodowla komórek i tkanek roślinnych*, red. Zenkteler M., 11-110, PWN, Warszawa.
16. Orlikowska T., (1997), *Regulatory wzrostu i rozwoju roślin. Zastosowanie w ogrodnictwie, rolnictwie, leśnictwie i w kulturach tkanek*, red. Jankiewicz L. S., 219-248, PWN, Warszawa.
17. Pâques M., (1991), *Acta Horticulturae*, 289, 283-290.