



Uzyskiwanie roślin transgenicznych wolnych od genów selekcyjnych

Sabina Zuzga, Wojciech Burza, Stefan Malepszy

Katedra Genetyki Hodowli i Biotechnologii Roślin, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego, Warszawa

Generation of selectable marker-free transgenic plants

Summary

Since the first reports of successful plant transformation appeared, there have been steady improvements of the transformation methods. Nowadays, transgenic plants without the incorporation of selection genes for antibiotic or herbicide resistance would be the only ones acceptable to the public, so elimination of these genes from transgenic crops prior to their field release and commercialization seems inevitable. Several strategies have been developed to generate marker-free transgenic plants, including: positive selection, alternative marker genes, co-transformation, site-specific recombination, transposon-mediated approaches and intrachromosomal homologous recombination. The efficiency of these methods is various as comparing to the traditional marker assisted selection - higher in case of alternative procedures and lower in others.

Key words:

genetic transformation, elimination of marker/selectable genes, marker-free transgenic plants, co-transformation, site-specific recombination, transposition, positive selection, alternative marker genes.

Adres do korespondencji

Stefan Malepszy,
Katedra Genetyki Hodowli
i Biotechnologii Roślin,
Szkoła Główna
Gospodarstwa Wiejskiego,
ul. Nowoursynowska 166,
02-787 Warszawa.

biotechnologia

4 (63) 32-46 2003

1. Wstęp

Transformacja genetyczna jest w biotechnologii podstawową metodą umożliwiającą otrzymywanie roślin transgenicznych. Pozwoliła ona ulepszyć określone właściwości lub wprowadzić nowe cechy u wielu gatunków uprawnych (1-3). Odmiany transgeniczne są uprawiane w wielu krajach i w roku 2001 światowy areal uprawy osiągnął 50 mln hektarów (4). W procesie transformacji uczestniczą dwie strony – dawca DNA i biorca. Dawcami

mogą być wektory zawierające transgen, jak bakterie lub wirusy. Do transformacji można także używać DNA plazmidowego lub DNA innego pochodzenia. Biorcami są protoplasty, pojedyncze komórki oraz komórki zorganizowane w tkanki i organy pochodzące z kultury *in vitro*, jak też *in planta*. W zasadzie każda skuteczna procedura otrzymywania roślin transgenicznych przewiduje konieczność szybkiego, prostego i jednoznacznego odróżnienia komórek, które uległy transformacji. W tym celu są używane markery selekcyjne, najczęściej geny warunkujące oporność na antybiotyki lub odporność na herbicydy. Stosowanie takich markerów selekcyjnych rodzi kilka problemów. Podstawowym jest negatywny wpływ na regenerację. Okazuje się, że na pożywce selekcyjnej komórki, które nie uległy transformacji zamierają i to może negatywnie wpływać na stan fizjologiczny komórek transgenicznych oraz znacząco utrudniać regenerację roślin (5,6). Również komórki i różne organy roślin transgenicznych mogą ujemnie reagować na ekspozycję na czynnik selekcyjny. Natężenie tych negatywnych efektów w dużym stopniu zależy od gatunku. Są jeszcze inne mankamenty używania genów oporności, spośród których do najbardziej istotnych należą wysoki brak akceptacji społecznej oraz wymogi prawne. Te ostatnie wyznaczyły skalę czasową, w której ma nastąpić zaprzestanie używania tych genów w roślinach uprawnych (7,8).

Stało się to bodźcem do opracowania różnych strategii pozwalających na regenerację z używania genów selekcyjnych (9-14). Jedną z nich jest tzw. pozytywna selekcja oraz użycie alternatywnych genów markerowych. Inne podejścia polegają na eliminacji genu selekcyjnego z transgenicznej tkanki lub rośliny. Są to kotransformacja, rekombinacja zlokalizowana, transpozycja oraz homologiczna rekombinacja wewnątrz chromosomu. U niektórych gatunków opracowano także transformację *in planta* (15). Nie wymaga ona regeneracji roślin w kulturze *in vitro*, i tym samym nie powoduje wspomnianych komplikacji wynikających z działania czynnika selekcyjnego na nietransgeniczne komórki. Dzięki temu poprawia się stan fizjologiczny roślin i zmniejsza ich zmienność. Także identyfikacja genów biorących udział w embriogenezie somatycznej i organogenezie daje w perspektywie możliwość manipulacji potencjałem regeneracyjnym w miejsce dotychczas stosowanego sposobu selekcji.

2. Alternatywne geny selekcyjne

Alternatywne geny markerowe umożliwiają selekcję tkanek transgenicznych bez dodawania do pożywki antybiotyków lub herbicydów. Geny alternatywne, takie jak: *uidA* (GUS, β -glukuronidaza) (16), *luc* (lucyferaza) (17), *gfp* (białko zielonej fluorescencji) i jego mutacje (*bfp*, *cfp* i *yfp*) (18) oraz *dsRED* (białko czerwonej fluorescencji) (19) umożliwiają wizualną identyfikację tkanki i organów transgenicznych. Są one zazwyczaj stosowane w kombinacji z typowymi genami selekcyjnymi. Podejmowane są udane próby stosowania tych genów reporterowych jako genów selekcyjnych.

Histochemiczna analiza ekspresji GUS wiąże się z destrukcją badanej tkanki, jednak pozwoliła na skuteczną identyfikację transgenicznych korzeni włośnikowatych kalafiora i brokuła bez użycia antybiotyków selekcyjnych (20). Do identyfikacji i selekcji transgenicznego ryżu, tytoniu i *Arabidopsis* użyto nowego genu GUSplus ze *Staphylococcus* sp. Gen ten koduje stabilną β -glukuronidazę o wysokiej aktywności, dzięki czemu tkanka poddana analizie histochemicznej nie ulega destrukcji i zachowuje potencjał regeneracyjny (21). Aktywność lucyferazy można monitorować *in vivo*, ale wymaga to egzogenego substratu oraz dodatkowego wyposażenia. Bardziej przydatne do selekcji jest, jak się wydaje, *gfp*, które daje prostą w detekcji fluorescencję w świetle niebieskim lub UV. Dokonywana przy użyciu mikroskopu odwróconego z przystawką fluorescencyjną obserwacja obecności białka genu reporterowego w tkance nie jest metodą inwazyjną, nie wymaga stosowania dodatkowych substratów i może być przeprowadzona z zachowaniem sterylnych warunków kultury. Mimo wcześniejszych doniesień o utrudnionej regeneracji roślin *Arabidopsis* wykazujących ekspresję *gfp* (22) opisano efektywną selekcję i regenerację transgenicznego tytoniu przy użyciu tego genu, pozwalającą także na identyfikację homozygot (23). Selekcja była wydajna, przeprowadzona we wczesnej fazie regeneracji i całkowicie eliminowała fałszywe transformanty. Obiecujące jest, jak się wydaje, że *dsRED* jest łatwe do odróżnienia od *gfp*, co daje możliwość jednoczesnego użycia tych genów.

Skuteczną identyfikację tkanek i roślin transgenicznych umożliwia gen *ipt* pochodzący z *Agrobacterium*. Koduje on transferazę izopentylenową odpowiedzialną za syntezę cytokinin, powodującą intensywną proliferację komórek transgenicznych i różnicowanie się licznych pędów przybyszowych na pożywece bez regulatorów wzrostu. Powstaje charakterystyczny fenotyp „*ipt*-shooty”, pozbawiony dominacji wierzchołkowej i nie wytwarzający korzeni. U tytoniu selekcja ta była prawie 3-krotnie bardziej skuteczna niż przy użyciu kanamycyny (24). Ponieważ konstytutywna ekspresja tego genu powoduje zaburzenia rozwojowe, dla potrzeb selekcji wprowadza się go pod promotorem indukowanym (25) lub usuwa z genomu. Zastosowanie *ipt* w połączeniu z technikami wycinającymi marker będzie szczegółowo opisane w dalszej części pracy.

Daniell i in. (26) użyli do selekcji gen BADH (dehydrogenaza aldehydu betainy) i zastosowali aldehyd betainy do selekcji po transformacji chloroplastów tytoniu. BADH przekształca aldehyd betainy do nietoksycznego związku, występującego pospolicie w chloroplastach niektórych gatunków odpornych na suszę i zasolenie (z rodzin *Chenopodiaceae* i *Poaceae*), gdzie służy jako osmoprotektant. Do selekcji zastosowano tu gen naturalnie występujący w roślinach i uznany za bezpieczny. Użycie tej procedury spowodowało 25-krotne zwiększenie efektywności transformacji i skrócenie o połowę czasu potrzebnego do uzyskania zregenerowanych roślin w porównaniu do stosowanej dotychczas selekcji na spektynomycynie.

Do selekcji transgenicznej soi użyto ostatnio inhibitora biosyntezy lizyny, AEC (2-aminoetylo-L-cysteiny). Somatyczne zarodki soi z wprowadzonym genem DHPS

z *E. coli* były odporne na 2,5 mM AEC, co jest koncentracją toksyczną dla zarodków dzikiego typu (27).

3. Selekcja pozytywna

Selekcja pozytywna polega na stworzeniu komórkom transgenicznym preferencyjnych warunków wzrostu, podczas gdy tkanka typu dzikiego nie namnaża się, ale nie obumiera. Dzięki temu nie występują negatywne efekty spowodowane obecnością zamierającej tkanki, a dodatkowo zwiększa się efektywność selekcji w wyniku umożliwienia wzrostu także komórkom o niskiej ekspresji genu selekcyjnego.

Joersbo i Okkels (28) zastosowali u tytoniu gen GUS jako gen reporterowy i selekcyjny równocześnie. Ponieważ tylko komórki z genem GUS przekształcały glukuronidową pochodną cytokininy do aktywnej cytokininy, to zarazem możliwa była regeneracja z komórek transgenicznych na pożywce bez tego regulatora wzrostu. Komórki typu dzikiego nie namnażały się, a efektywność selekcji była dwukrotnie wyższa niż z użyciem kanamycyny. Jako czynniki selekcyjne zaproponowano glukuronidowe pochodne benzyloadeniny i izopentyloadeniny (29). Nowy gen kodujący β -glukuronidazę zastosowano do selekcji przy użyciu CBA, który jest hydrolizowany do glukozy i kwasu glukuronidowego (21). W tym przypadku tylko komórki transgeniczne produkujące glukozę dzielą się na pożywce nie zawierającej źródła węgla.

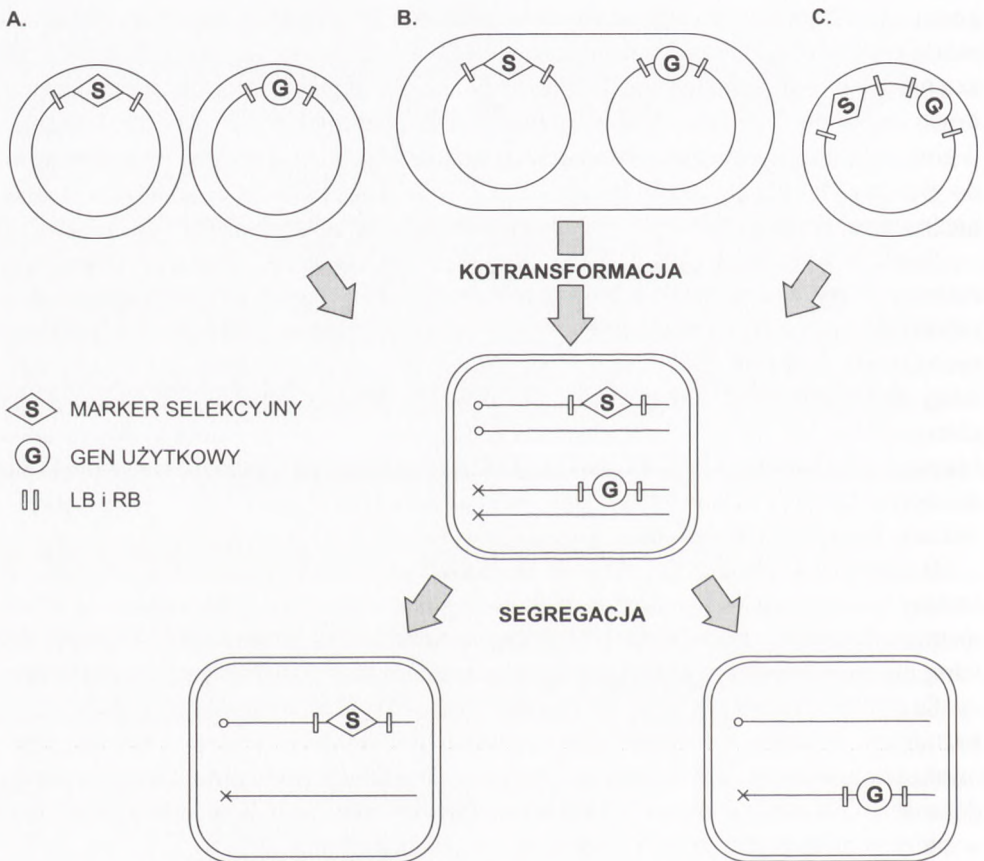
Selekcję wykorzystującą gen *pmi* (*manA*) z *Escherichia coli*, kodujący izomerazę fosfomannozy, zastosowano u buraka cukrowego (30). Większość gatunków nie metabolizuje mannozy, co powoduje gromadzenie się fosforanu mannozy i zahamowanie wzrostu komórek. Selekcja z użyciem mannozy była nie tylko 10-krotnie bardziej efektywna niż z kanamycyną, ale również istotnie poprawiała zdolność do ukorzeniania się transgenicznych pędów. Gen *pmi* z powodzeniem wykorzystano również u kukurydzy (31-33) i pszenicy (33), uzyskując zwiększoną, w porównaniu do dotychczasowych metod selekcji, efektywność transformacji oraz zmniejszenie udziału fałszywych transformantów.

U ziemniaka, pomidora i tytoniu zastosowano selekcję pozytywną przy użyciu ksylozy (34,35). Gen *xylA* pochodził ze *Streptomyces rubiginous* lub *Thermoanaerobacterium thermosulfurogenes*. Koduje on izomerazę ksylozy, która przekształca nieprzyswajalną dla psiankowatych D-ksylozę do metabolizowanej przez te gatunki D-ksylulozy. Enzym ten (nazywany również izomerazą glukozy) katalizuje także reakcję przekształcania glukozy w fruktozę i jest powszechnie uznany za bezpieczny dla przemysłu spożywczego. Zastosowanie ksylozy dało korzyść podwójną: zwiększyło wydajność transformacji około 9 razy i umożliwiło szybsze o 2 tygodnie uzyskanie w pełni rozwiniętych roślin w porównaniu z kanamycyną.

4. Kotransformacja

Kotransformacja polega na jednoczesnym wprowadzeniu do genomu rośliny genu użytkowego oraz genu selekcyjnego, ale umieszczonych na oddzielnych odcinkach T-DNA. Jeśli obydwa geny znajdują się w niesprzężonych *loci*, to w wyniku segregacji w potomstwie powstaną rośliny pozbawione genu selekcyjnego.

Istnieją trzy warianty metody kotransformacji (rys. 1). Gen użytkowy i gen selekcyjny mogą być umieszczone na: 1) jednym plazmidzie w oddzielnych odcinkach T-DNA; 2) oddzielnych plazmidach w jednym szczepie *Agrobacterium*; 3) oddzielnych plazmidach w różnych szczepach *Agrobacterium*. W podejściach tych zakłada się zarówno wysoką częstotliwość kotransformacji, jak i integracji genów do różnych chromosomów lub w znacznej odległości na tym samym chromosomie. Transformacja metodą *Agrobacterium* jest tutaj bardziej przydatna niż mikrowstrzeliwanie, któ-



Rys. 1. Otrzymywanie roślin transgeniczných bez genów selekcyjnych/markerowych metodą kotransformacji. A-2 plazmidy/2 szczepy; B-2 plazmidy/1 szczep; C-2 T-DNA/1 plazmid [za (10) zmienione].

re wprawdzie pozwala uzyskać wysoką (do 70%) efektywność kotransformacji, jednak obydwie geny są umieszczane w wielu kopiach w tym samym miejscu na chromosomie, co uniemożliwia eliminację genu markerowego na drodze segregacji w następnym pokoleniu (36).

Na częstotliwość kotransformacji z użyciem *Agrobacterium* wpływa kilka czynników. Głównie zależy ona od zastosowanej metody wprowadzania obydwu genów i rodzaju eksplantatu. Bardzo ważne jest stworzenie takich warunków transformacji, które zapewnią wysoką kompetencję komórek dawcy i biorcy oraz przyłączanie się wielu komórek bakteryjnych do komórki roślinnej. Przy użyciu dwóch szczepów bakteryjnych co najmniej jedna komórka każdego z nich musi przekazać tej samej komórce roślinnej swoje T-DNA. Przy zastosowaniu szczepu z dwoma T-DNA wystarczy przyłączenie jednej komórki bakterii, co teoretycznie powinno podnosić częstotliwość kotransformacji. Depicker i in. (37) uzyskali wyższą efektywność kotransformacji protoplastów tytoniu przy użyciu jednego szczepu *Agrobacterium* niosącego dwa odcinki T-DNA w jednym plazmidzie (67%) aniżeli po zastosowaniu mieszaniny dwóch szczepów (45%). Ten ostatni sposób dał efektywność zbliżoną do dwóch niezależnych zdarzeń transformacyjnych. Jednakże de Block i Debrouwer (38) uzyskali u hipokotyli rzepaku wynik przeciwny, gdyż użycie mieszaniny dwóch szczepów dało większą efektywność (do 85%) kotransformacji aniżeli dwie transformacje niezależne.

Istotna jest także liczba kopii plazmidu w komórce bakteryjnej i jego budowa. Jacob i Veluthambi (39) wykazali, że umieszczenie genu użytkowego w wielokopijnym (10-15 kopii) wektorze binarnym, a genu markerowego w pojedynczym wektorze kointegracyjnym tego samego szczepu bakteryjnego, spowodowało około 6-krotny wzrost liczby otrzymanych roślin bezmarkerowych w porównaniu do konfiguracji odwrotnej. Ostatnio wykazano także, że odległość między dwoma fragmentami T-DNA w tym samym plazmidzie nie musi być znaczna (co najmniej 15 kb) (40). Dzięki temu nie ma konieczności konstruowania dużych, tzw. superbarnych wektorów. Również użycie standardowego, prostego wektora z dodatkową krótką sekwencją graniczną RB/LB oddzielającą oba T-DNA pozwala otrzymać rośliny transgeniczne bez markera selekcyjnego (41,42).

Istotnym czynnikiem wpływającym na częstotliwość rozdzielenia genu markerowego i użytkowego podczas segregacji jest rodzaj zastosowanego szczepu bakteryjnego. Wykazano, że szczepy oktopinowe dają co prawda niższe efektywności kotransformacji niż nopalinowe, jednak przy użyciu tych ostatnich poszczególne fragmenty T-DNA ulegają integracji w sprzężonych *loci* (43-45).

Uzyskiwane efektywności kotransformacji mieszczą się w zakresie od kilkunastu do około 90%, natomiast udział kotransformantów, w których potomstwie poszczególne T-DNA segregują waha się od 40 do 100% (12). Procedura ta wymaga dysponowania 4-krotnie większą liczbą pierwotnych transformantów niż transformacja standardowa.

W ostatnich latach opracowano efektywne metody eliminacji genu markerowego za pomocą kotransformacji zarówno u roślin jedno- jak i dwuliściennych (41,46,47)

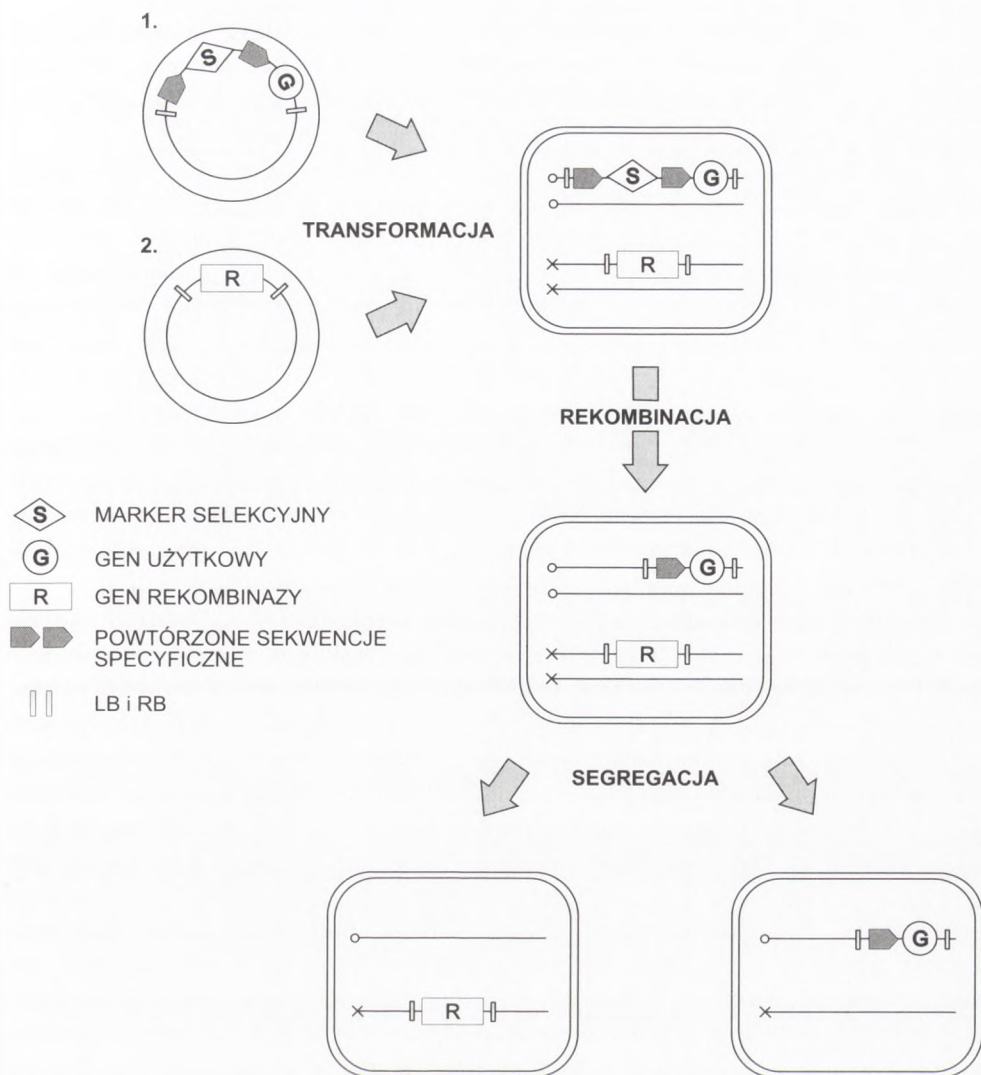
oraz uzyskano rośliny kotransformowane kilkoma genami użytkowymi przy użyciu pojedynczego markera selekcyjnego (48). Jednak wyniki, jakie uzyskano, są zróżnicowane na tyle, że istnieje konieczność dalszego doskonalenia procedury.

5. Rekombinacja zlokalizowana

Eliminacja genu selekcyjnego za pomocą rekombinacji zlokalizowanej polega na usunięciu markera, znajdującego się pomiędzy zorientowanymi w tym samym kierunku dwoma sekwencjami, rozpoznawanymi przez odpowiednią rekombinazę specyficzną miejscowo. Gen użytkowy i marker selekcyjny znajdują się w jednym fragmencie T-DNA, natomiast gen rekombinazy jest wprowadzany w oddzielnym plazmidzie za pomocą powtórnej transformacji lub przez zapylenie pyłkiem rośliny transgenicznej zawierającej ten gen (rys. 2). Używane są trzy typy rekombinacji: *Cre/loxP*; *FLP/ftt* oraz *R/RS*.

Rekombinacja typu *Cre/loxP* pochodzi z bakteriofaga P1. U roślin została po raz pierwszy zaadaptowana do usunięcia markera selekcyjnego u tytoniu. Dale i Ow (49) oraz Russel i in. (50) uzyskali bardzo wysoką wydajność procesu wycinania (powyżej 90%), wprowadzając rekombinazę za pomocą retransformacji (powtórnej transformacji), a wycięte fragmenty DNA nie ulegały reintegracji w innym miejscu genomu. Rekombinaza wprowadzona za pomocą krzyżowania roślin transgenicznych nie była tak efektywna. Wynika to prawdopodobnie z niskiej ekspresji *cre* w zarodku i merystemie apikalnym albo z niskiej frekwencji rekombinacji w tych tkankach. W przypadku wprowadzenia rekombinazy przez powtórny transformację wycięcie markera selekcyjnego następuje bardzo wcześnie, przed rozpoczęciem organogenezy. Na efektywność rekombinacji, jak się zdaje, nie ma wpływu ani miejsce integracji *loxP* T-DNA, ani to czy gen rekombinazy jest w roślinie zapylanej czy zapyłającej. System ten opisano także u ryżu (51), gdzie gen *cre* wprowadzono za pomocą krzyżowania. Efektywność wycięcia genu selekcyjnego wynosiła około 58% i nie było istotnej różnicy między sytuacją gdy *cre* był niesiony przez roślinę mateczną czy ojcowską.

Uzyskanie tymi metodami roślin wolnych od genu selekcyjnego wymaga rozmnożenia generatywnego, ponieważ oddzielenie markera selekcyjnego wprowadzonego wraz z genem *cre* od genu użytkowego odbywa się dzięki segregacji. Metodę tę dostosowano do gatunków rozmnażanych wegetatywnie lub o długim cyklu rozwojowym, wykorzystując ekspresję przejściową. Gleave i in. (52) wykorzystali ekspresję przejściową genu rekombinazy do uzyskania roślin tytoniu pozbawionych markera selekcyjnego bez konieczności krzyżowania, jednakże z bardzo niską wydajnością (<0,3%). Innym rozwiązaniem jest wstawienie genu *cre* i markera selekcyjnego pomiędzy sekwencją *loxP*, a genu użytkowego na zewnątrz (53), z tym, że *cre* znajduje się pod promotorem regulowanym światłem. Ekspresję *cre* wywoływano dopiero po zregenerowaniu roślin, a z ich chimeralnych liści regenerowano rośliny bezmarkerowe (bez *cre* i markera selekcyjnego) z częstotliwością 6-92% w zależno-



Rys. 2. Otrzymywanie roślin transgenicznych bez genów selekcyjnych/markerowych metodą rekombinacji zlokalizowanej. 1,2 – oddzielne wektory [za (10) zmienione].

ści od rośliny matcznej. Zważywszy na duży wybór promotorów indukowanych i wydajność tej metody, jest to ciekawa alternatywa. Podobne podejście (indukcja *cre* w obecności β -estradolu) zastosowali Zuo i in. (54). Tutaj wycięcie fragmentu pomiędzy sekwencjami *loxP* występowało z częstotliwością 30-60%. U ziemniaka skuteczna była podobna konstrukcja z promotorem *hsp70* indukowanym wysoką temperaturą (55).

Rekombinację typu *Cre/loxP* zaadaptowano nie tylko do usunięcia genu markerowego, ale także do wycięcia wielokrotnych tandemowych kopii transgeny u pszenicy (56). Jest to szczególnie przydatne u roślin zbożowych, gdzie trudno uzyskać integrację pojedynczej kopii genu – nawet za pomocą *Agrobacterium*.

Tego typu rekombinację stosowano także do usuwania genów selekcyjnych z transgenicznymi plastydów (3). Gen *cre* wprowadzany był do genomu jądrowego tytoniu przez powtórny transformację lub krzyżowanie (57,58). Transportowana do plastydów rekombinaza wycinała geny selekcyjne, a jej eliminację uzyskiwano na drodze segregacji w potomstwie. To postępowanie jest o wiele bardziej wydajne od stosowanej wcześniej dla plastydów rekombinacji homologicznej (59), ponieważ umożliwia zsynchronizowane i szybkie wycięcie markerów selekcyjnych ze wszystkich kopii genomu plastydowego (a jest ich 1000-10 000 w komórce).

Rekombinację typu *FLP/frt* zaobserwowano u *Saccharomyces cerevisiae* i przebiega analogicznie do rekombinacji *Cre/loxP*. Zastosowano ją do eliminacji genów selekcyjnych u kukurydzy (60) i tytoniu (61), jednak w potomstwie pojawiały się rośliny chimeralne. Ponadto konstytutywna ekspresja *FLP* może być szkodliwa dla niektórych gatunków, co uniemożliwia jej wykorzystanie, np. u *Arabidopsis* (61).

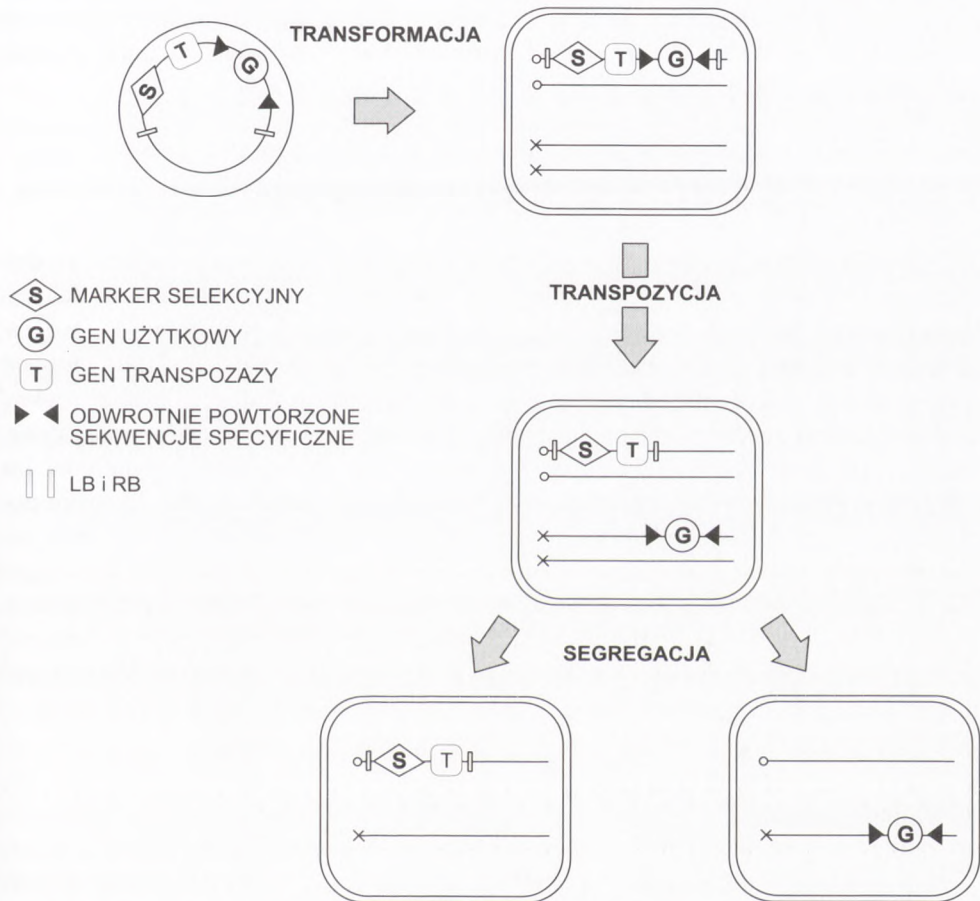
Rekombinacja typu *R/RS* zachodzi u *Zygosaccharomyces rouxi*. Ostatnio ukazało się wiele prac, w których bezmarkerowe rośliny uzyskiwano dzięki rekombinacji typu *R/RS* w połączeniu ze wspomnianym już genem *ipt*. Skonstruowano wektor *MAT* (*multi-auto-transformation*) (62-64), który dawał możliwość selekcji transgenicznych roślin tytoniu na podstawie fenotypu „*ipt*-shooty”, a następnie identyfikację tych u których nastąpiło wycięcie markera na podstawie przywrócenia fenotypu dzikiego. Procedura ta nie wymaga krzyżowania i segregacji, co jest niewątpliwą zaletą. Ponadto częstotliwość powstawania roślin bezmarkerowych była wysoka (do 70%). Dzięki zastosowaniu promotora rekombinazy (*GST-II-27*), indukowanego przez herbicyd *Safener* uzyskane rośliny posiadały pojedynczą kopię transgeny. Wektor ten został z powodzeniem wykorzystany do wprowadzenia kolejnych genów użytkowych przez powtórny transformację z użyciem tego samego genu selekcyjnego (65). U otrzymanych roślin nie stwierdzono rearanżacji pierwotnie wprowadzonych genów, co mogłoby nastąpić w wyniku rekombinacji pomiędzy kolejno wprowadzanymi sekwencjami *RS*. Udoskonalona wersja wektora *GST-MAT*, zawierającego oprócz *ipt* geny *iaaM/H*, pozwoliła zwiększyć efektywność regeneracji o około 20% w porównaniu z wektorem zawierającym tylko *ipt* (66). Skonstruowano także wektory typu *rol-MAT*, zawierające gen *rol* z *Agrobacterium rhizogenes* (67-69).

Niewątpliwą wadą opisanych procedur jest to, że po wycięciu fragmentu między specyficznymi sekwencjami jedna z nich pozostaje w genomie rośliny. Przy kolejnych transformacjach może to prowadzić do delekcji, inwersji lub translokacji. Rozwiązaniem byłoby stosowanie za każdym razem innego wariantu sekwencji specyficznych. Czas potrzebny do uzyskania roślin pozbawionych markerów selekcyjnych jest dłuższy niż w przypadku kotransformacji jeśli wprowadzenie genu rekombinazy wymaga retransformacji lub krzyżowania, ale potrzebna liczba pierwotnych trans-

formantów jest 4-krotnie mniejsza. Opisany wektor MAT znacznie skraca czas pracy (do 1/3) i szczególnie nadaje się do gatunków o długim cyklu rozwojowym oraz rozmnażanych wegetatywnie.

6. Transpozycja

Transpozycja polega na przemieszczaniu się określonych odcinków DNA w genomie. Odcinki te są ograniczone odwrotnie powtórzonymi sekwencjami specyficznymi. Jeżeli pomiędzy tymi sekwencjami zostanie umieszczony gen selekcyjny (albo użytkowy), to w wyniku transpozycji zostanie on przemieszczony w inne miejsce genomu, a segregacja doprowadzi do uzyskania roślin posiadających tylko gen użytkowy (rys. 3).



Rys. 3. Otrzymywanie roślin transgenicznych bez genów selekcyjnych/markerowych z wykorzystaniem transpozycji [za (10) zmienione].

Do otrzymania roślin pozbawionych markera selekcyjnego wykorzystano pochodzący od kukurydzy transpozon *Ac/Ds*, a technikę tę po raz pierwszy zastosowano u pomidora (70). Między sekwencjami *Ds* umieszczono gen selekcyjny, albo gen użytkowy i w segregującym potomstwie powstały rośliny pozbawione markera selekcyjnego z częstotliwością do 7%. Korzystne było umieszczenie genu użytkowego między sekwencjami specyficznymi, gdyż dało to możliwość nie tylko rozdzielenia go od genu selekcyjnego, ale także lokalizację w różnych miejscach genomu (efekt pozycji związany z różnym poziomem ekspresji genu). Jednocześnie umieszczenie markera selekcyjnego między odcinkami *Ds* daje pewność pozbycia się tych odcinków, co umożliwia wprowadzanie kolejnych genów z wykorzystaniem tej metody.

Ponieważ około 10% wyciętych przez transpozazę elementów nie ulega reintegracji w genomie, tylko zostaje przemieszczona do chromatydy siostrzanej i utraczona w wyniku somatycznej segregacji (71), to identyfikacja takich przypadków pozwala zrezygnować z krzyżowania w celu uzyskania eliminacji przez segregację. Takie wycięcie markera selekcyjnego wraz z genem transpozazy uzyskano za pomocą wektora typu *ipt-MAT* (68), ale rośliny bezmarkerowe powstawały z bardzo niską częstotliwością (0,03%).

7. Rekombinacja homologiczna wewnątrz chromosomu

Rekombinacja homologiczna wewnątrz chromosomu zachodzi u roślin z bardzo niską częstotliwością (ok. 10^{-6}). Zubko i in. (73) podjęli próbę zwiększenia tej frekwencji przez zastosowanie sekwencji *attP* z faga λ . Sekwencja ta służy do integracji faga w genomie *E. coli*, przez rekombinację w miejscu *attB* przy udziale fagowej integrazy (*int*) i bakteryjnego czynnika integracyjnego (*IHF*). Autorzy uzyskali rośliny tytoniu pozbawione markerów selekcyjnych na skutek rekombinacji homologicznej między *attP* z nadspodziewanie wysoką frekwencją, mimo braku czynników *int* i *IHF*. W przeprowadzonych analizach molekularnych pokazali, że 2 z 23 roślin pozbawionych genów selekcyjnych uzyskano właśnie w ten sposób. Do tej pory nie wyjaśniono jednoznacznie przyczyn tak pozytywnego wyniku (9,74). Przypuszcza się, że może to być efektem zwiększonej podatności niezróżnicowanych komórek kalusa na tego typu rekombinację, chociaż bardziej prawdopodobna jest obecność tzw. gorącego miejsca (w sekwencji transgeny lub w miejscu integracji). Miejsca *attP* mogą również rekombinować same z siebie, bez obecności dodatkowych białek.

8. Podsumowanie

Wprowadzanie do genomu rośliny DNA pochodzącego z odległych filogenetycznie gatunków stało się metodą rutynową. Jest ona nadal ulepszana. Stopniowo rezygnuje się ze stosowania genów selekcyjnych nadających odporność na antybiotyki

lub herbicydy, metody transformacji ulegają uproszczeniu, zwiększa się ich efektywność oraz powtarzalność. Pod naciskiem opinii publicznej priorytetem stało się zapewnienie maksymalnego bezpieczeństwa uprawy i spożycia roślin modyfikowanych genetycznie (75). Pełną realizację tych ambitnych zamierzeń, m.in. przy użyciu omówionych strategii przewiduje się w ciągu najbliższych 5-10 lat (76).

W tej pracy skoncentrowano się na przedstawieniu strategii umożliwiających rezygnację z dotychczas używanych genów selekcyjnych. Można podzielić je na dwie grupy: pierwsza bazuje na eliminacji z genomu rośliny transgenicznej markera użytego do selekcji, a druga na zastosowaniu alternatywnych, uznanych za bezpieczne genów selekcyjnych lub stworzeniu komórkom transgenicznym preferencyjnych warunków wzrostu. Można to uczynić na drodze zmian w metabolizmie albo poprzez zwiększenie potencjału regeneracyjnego. Metody te pod względem pracochłonności nie różnią się zasadniczo od dotychczasowych, natomiast często przewyższają je znacznie pod względem skuteczności. Oczekuje się również, że prace nad identyfikacją genów biorących udział w somatycznej embriogenezie i organogenezie znacząco przyczynią się do wzrostu efektywności transformacji poprzez zwiększenie efektywności regeneracji. Potencjalnymi kandydatami do wykorzystania są zidentyfikowane geny biorące udział w embriogenezie somatycznej: LEC (77,78), SERK (79) i AMP1 (80) oraz niezależniające komórkę od egzogennych cytokinin: CKI1 (81), CRE1 (82) i CHK (83).

Na podstawie dostępnych danych trudno natomiast jednoznacznie ocenić przydatność metod polegających na usunięciu genu selekcyjnego z genomu roślinnego. Wynika to z dużego zróżnicowania gatunków, eksplantatów i warunków eksperymentalnych. Ponadto autorzy podają niepełne dane dotyczące efektywności procesu (np. informują tylko o częstotliwości kotransformacji czy rekombinacji, nie podając liczby uzyskanych roślin bezmarkerowych). Generalnie ta grupa metod wydłuża o rok (jedno pokolenie) czas potrzebny do uzyskania założonego efektu. W tabeli zestawiono podstawowe strategie eliminacji genów selekcyjnych. Procedura jest wydłużona w czasie wszędzie tam, gdzie rośliny bez markerów selekcyjnych uzyskiwane są w wyniku segregacji dopiero w następnym pokoleniu. Dotyczy to kotransformacji oraz części strategii wykorzystujących transpozycję lub rekombinację zlokalizowaną. Dodatkowo, w przypadku rekombinacji, wprowadzenie genu rekombinazy wymaga powtórnej transformacji albo przekrzyżowania, co także zwiększa pracochłonność w porównaniu z tradycyjną metodyką transformacji. Najbardziej perspektywiczne w uzyskiwaniu roślin transgenicznych pozbawionych markerowych genów selekcyjnych, jak się wydaje, są wektory typu *ipt*-MAT. Łączą one użycie dominującego genu umożliwiającego selekcję wizualną z usunięciem go za pomocą rekombinacji *R/RS*. Gen rekombinazy jest tu wprowadzany w tym samym wektorze co gen użytkowy. Nie jest wymagana powtórna transformacja ani rozmnożenie generatywne, a czas i niezbędna liczba pierwotnych transformantów są zbliżone do metod wykorzystujących tradycyjne geny selekcyjne. Przy użyciu tego wektora rośliny bezmarkerowe uzyskiwano z wysoką, w porównaniu z pozostałymi strategiami, częstotliwością (do 70%).

Tabela

Porównanie niektórych metod stosowanych do eliminacji genów markerowych z roślin transgenicznych pod względem czasochłonności i efektywności

Metoda i jej modyfikacje	Powtórna transformacja	Krzyżowanie	Efektywność	Autorzy
kotransformacja (2 plazmidy/2 szczepy; 2 plazmidy/1 szczep; 2 T-DNA/1 plazmid)	–	niezbędne w celu segregacji	40-100% roślin bezmarkerowych	Komari i in. (1996); Daley i in. (1998)
rekombinacja zlokalizowana Cre/lox – wprowadzenie rekombinazy przez powtórna transformację	w celu wprowadzenia genu rekombinazy	niezbędne w celu segregacji	>90% częstotliwość rekombinacji; do 25% roślin bezmarkerowych	Dale i Ow (1991); Russell i in. (1992)
rekombinacja zlokalizowana Cre/lox – wprowadzenie rekombinazy przez krzyżowanie	–	w celu wprowadzenia genu rekombinazy, a kolejne niezbędne w celu segregacji	54% częstotliwość rekombinacji	Dale i Ow (1991)
rekombinacja zlokalizowana Cre/lox z wykorzystaniem ekspresji przejściowej genu rekombinazy	w celu wprowadzenia genu rekombinazy	–	0,25% roślin bezmarkerowych	Gleave i in. (1999)
rekombinacja zlokalizowana Cre/lox – wprowadzenie rekombinazy w tym samym plazmidzie pod promotorem indukowanym	–	–	30-60% częstotliwość rekombinacji	Zuo i in. (2001)
rekombinacja zlokalizowana FLP/frt	w celu wprowadzenia genu rekombinazy	–	20-25% częstotliwość rekombinacji	Lyznik i in. (1995)
rekombinacja zlokalizowana FLP/frt	–	w celu wprowadzenia genu rekombinazy	10% częstotliwość rekombinacji	Kilby i in. (1995)
rekombinacja zlokalizowana R/RS – wektor MAT	–	–	25-70% roślin bezmarkerowych	Sugita i in. (1999); Sugita i in. (2000); Endo i in. (2002)
transpozycja – wprowadzenie transpozazy w tym samym plazmidzie	–	niezbędne w celu segregacji	2-7% roślin bezmarkerowych	Goldsbrough i in. (1993)
transpozycja – wektor MAT z wykorzystaniem błędów transpozycji	–	–	0,032% roślin bezmarkerowych	Ebinuma i in. (1997b)

Literatura

1. Hansen G., Wright M., (1999), *Trends Plant Sci.*, 4(6), 226-231.
2. Sharma H., Crouch J., Sharma K., Seetharama N., Hash C., (2002), *Plant Sci.*, 163, 381-395.
3. Maliga P., (2003), *Trends Biotech.*, 21(1), 20-28.
4. Malepszy S., (2001), *Genetycznie modyfikowane organizmy - Kto ma rację*, 25-33, Fundacja Na Rzecz Rozwoju Polskiego Rolnictwa, Warszawa.
5. Lindsey K., Gallois P., (1990), *J. Exp. Bot.*, 41, 529-536.
6. Bowen B., (1993), *Transgenic Plants*, vol. 1, Eds. Kung S., Wu R., 89-146, Academic Press, New York.
7. Daniell H., (1999), *Trends Plant Sci.*, 4, 467-469.
8. Peerenboom E., (2000), *Nat. Biotechnol.*, 18, 374.
9. Puchta H., (2000), *Trends Plant Sci.*, 5(7), 273-274.
10. Ebinuma H., Sugita K., Matsunaga E., Endo S., Yamada K., Komamine A., (2001), *Plant Cell Rep.*, 20, 383-392.
11. Hohn B., Levy A., Puchta H., (2001), *Curr. Opin. Biotech.*, 12, 139-143.
12. Gleave A., (2002), *Mol. Meth. Plant Anal.*, 22, 73-93.
13. Hare P., Chua N., (2002), *Nat. Biotechnol.*, 20, 575-580.
14. Zuo J., Niu Q-W., Ikeda Y., Chua N-H., (2002), *Curr. Opin. Biotech.*, 13, 173-180.
15. Clough S., Bent A., (1998), *Plant J.*, 16, 735-743.
16. Jefferson R., Ravanagh T., Bevan M., (1987), *EMBO J.*, 6, 3901-3907.
17. Ow D., Wood K., DeLuca M., Wet J. de, Helinski D., Howell S., (1986), *Science*, 234, 856-859.
18. Kaeppler H., Menon G., Skadsen R., Nuutila A., Carlson A., (2000), *Plant Cell Rep.*, 19, 661-666.
19. Jach G., Binot E., Frings S., Luxa K., Schell J., (2001), *Plant J.*, 28(4), 483-491.
20. Puddephat I., Robinson H., Fenning T., Barbara D., Morton A., Pink D., (2001), *Mol. Breed.*, 7, 229-242.
21. Jefferson R., Mitchell H., Weir B., Mayer J., Kreunen S., Smith L., Nguyen T., Wenzel P., (2003), 7th International Congress of Plant Molecular Biology, Barcelona, June 23-28, 438.
22. Hasseloff J., Siermering K., Prasher D., Hodge S., (1997), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 2122-2127.
23. Molinier J., Himber C., Hahne G., (2000), *Plant Cell Rep.*, 19, 219-223.
24. Endo S., Kasahara T., Sugita K., Matsunaga E., Ebinuma H., (2001), *Plant Cell Rep.*, 20, 60-66.
25. Kunkel T., Niu Q., Chan Y., Chua N., (1999), *Nat. Biotechnol.*, 17, 916-919.
26. Daniell H., Muthukumar B., Lee S., (2001), *Curr. Genet.*, 39, 109-116.
27. Rao S., Lewamy M., Polisetty R., Hildebrand D., (2003), 7th International Congress of Plant Molecular Biology, Barcelona, June 23-28, 439.
28. Joersbo M., Okkels F., (1996), *Plant Cell Rep.*, 16, 219-221.
29. Okkels F., Ward J., Joersbo M., (1997), *Phytochemistry*, 46(5), 801-804.
30. Joersbo M., Donaldson I., Kreiberg J., Petersen S., Brunstedt J., Okkels F., (1998), *Mol. Breed.*, 4, 111-117.
31. Negrotto D., Jolley M., Beer S., Wenck A., Hansen G., (2000), *Plant Cell Rep.*, 19, 798-803.
32. Wang A., Evans R., Altendorf P., Hanten J., Doyle M., Rosichan J., (2000), *Plant Cell Rep.*, 19, 654-660.
33. Wright M., Dawson J., Dunder E., Suttie J., Reed J., Kramer C., Chang Y., Novitzky R., Wang H., Arim-Moore L., (2001), *Plant Cell Rep.*, 20, 429-436.
34. Haldrup A., Petersen S., Okkels F., (1998), *Plant Cell Rep.*, 18, 76-81.
35. Haldrup A., Petersen S., Okkels F., (1998), *Plant Mol. Biol.*, 37, 287-296.
36. Wakita Y., Otani M., Iba K., Shimada T., (1998), *Gen. Genet. Syst.*, 73, 219-226.
37. Depicker A., Herman L., Jacobs A., Schell J., van Montagu M., (1985), *Mol. Gen. Genet.*, 20, 477-484.
38. de Block M., Debrouwer D., (1991), *Theor. Appl. Genet.*, 82, 257-263.
39. Jacob S., Veluthambi K., (2002), *Plant Sci.*, 163, 801-806.
40. Komari T., Hiei Y., Saito Y., Murai N., Kumashiro T., (1996), *Plant J.*, 10, 165-174.
41. Matthews P., Wang M.-B., Waterhouse P., Thornton S., Fieg S., Gubler F., Jacobsen J., (2001), *Mol. Breed.*, 7, 195-202.

42. Gilbertson L., Ekena J., House I., Huang S., Krieger E., Luethy M., Petersen M., Staub J., Ye X., Zhang W., (2003), 7th International Congress of Plant Molecular Biology, Barcelona, June 23-28, 438.
43. Spielmann A., Simpson R., (1986), *Mol. Gen. Genet.*, 205, 34-41.
44. Jorgenson R., Snyder C., Jones J., (1987), *Mol. Gen. Genet.*, 207, 471-477.
45. de Neve M., de Buck S., Jacob M., van Montagu M., Depicker A., (1997), *Plant J.*, 11, 15-29.
46. Daley M., Knauf V., Summerfelt K., Turner J., (1998), *Plant Cell Rep.*, 17, 489-496.
47. McCormac A., Fowler M., Chen D.-F., Elliott M., (2001), *Transgen. Res.*, 10, 143-155.
48. Chang M.-M., Culley D., Choi J., Hadwiger L., (2002), *Plant Sci*, 163, 83-89.
49. Dale E., Ow D., (1991), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 10558-10562.
50. Russel S., Hoopes J., Odell J., (1992), *Mol. Gen. Genet.*, 234, 49-59.
51. Hoa T., Bong B., Huq E., Hodges T., (2002), *Theor. Appl. Genet.*, 104, 518-525.
52. Gleave A., Mitra D., Mudge S., Morris B., (1999), *Plant Mol. Biol.*, 40, 223-235.
53. Surin B., de Feyter R., Graham M., Waterhouse P., Keese P., Shahjahan A., (1997), Patent WO 97/37012.
54. Zuo J., Niu Q.-W., Geir M., Chua N.-H., (2001), *Nature Biotechnol.*, 19, 157-161.
55. Cuellar W., Nopo L., Solorzano D., Ghislain M., (2003), 7th International Congress of Plant Molecular Biology, Barcelona, June 23-28, 438.
56. Srivastava V., Anderson O., Ow D., (1999), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96, 11117-11121.
57. Corneille S., Lutz K., Svab Z., Maliga P., (2001), *Plant J.*, 27(2), 171-178.
58. Hajdukiewicz P., Gilbertson L., Staub J., (2001), *Plant J.*, 27(2), 161-170.
59. Iamtham S., Day A., (2000), *Nat. Biotechnol.*, 18, 1172-1176.
60. Lyznik L., Rao K., Hodges T., (1996), *Nucleic Acid Res.*, 24, 3784-3789.
61. Kilby N., Davies G., Snaith M., Murray J., (1995), *Plant J.*, 8, 637-652.
62. Sugita K., Matsunaga E., Ebinuma H., (1999), *Plant Cell Rep.*, 18, 941-947.
63. Sugita K., Kasahara T., Matsunaga E., Ebinuma H., (2000), *Plant J.*, 22, 461-469.
64. Ebinuma H., Komamine A., (2001), *In Vitro Cell. Dev. Biol.*, 37, 103-113.
65. Sugita K., Matsunaga E., Kasahara T., Ebinuma H., (2000b), *Mol. Breed.*, 6, 529-536.
66. Endo S., Kasahara T., Sugita K., Ebumina H., (2002), *Plant Cell Rep.*, 20, 923-928.
67. Ebinuma H., Sugita K., Matsunaga E., Yamakodo M., Komamine A., (1997), *Plant Biotechnol.*, 14, 133-139.
68. Cui M., Takayanagi K., Kamada H., Nishimura S., Handa T., (2000), *Plant Sci.*, 159, 273-280.
69. Cui M., Takayanagi K., Kamada H., Nishimura S., Handa T., (2001), *Plant Cell Rep.*, 20, 60-66.
70. Goldsbrough A., Lastrella A., Yoder J., (1993), *Biotechnology*, 11, 1286-1292.
71. Gorbunova V., Levy A., (2000), *Genetics*, 155, 349-359.
72. Ebinuma H., Sugita K., Matsunaga E., Yamakodo M., (1997), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 2117-2121.
73. Zubko E., Scutt C., Meyer P., (2000), *Nat. Biotechnol.*, 18, 442-445.
74. Scutt C., Zubko E., Meyer P., (2002), *Biochimie*, 84, 1119-1126.
75. Nadolska-Orczyk A., (2002), *Biotechnologia*, 4 (59), 227-238.
76. Zuo J., Niu Q.-W., Ikeda Y., Chua N.-H., (2002), *Curr. Opin. Biotech.*, 13, 173-180.
77. Lotan T., Ohto M., Yee K., West M., Lo R., Kwong R., Yamagishi K., Fisher L., Goldberg R., Harada J., (1998), *Cell*, 93, 1195-1205.
78. Stone S., Kwong L., Yee K., Pelletier J., Lepiniec L., Fischer R., Goldberg R., Harada J., (2001), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98, 11806-11811.
79. Hecht V., Vielle-Calzada J.-P., Hartog M., Schmidt E., Boutillier K., Grossniklaus U., de Vries S., (2001), *Plant Physiol.*, 127, 803-816.
80. Helliwell C., Chin-Atkins A., Wilson L., Chapple R., Dennis E., Chaudhury A., (2001), *Plant Cell*, 13, 2115-2125.
81. Hwang I., Shenn J., (2001), *Nature*, 413, 383-389.
82. Inoue T., Higuchi M., Hashimoto Y., Seki M., Kobayashi M., Kato T., Tabata S., Shinozaki K., Kakimoto T., (2001), *Nature*, 409, 1060-1063.
83. Kubo M., Kakimoto T., (2000), *Plant J.*, 23, 385-394.