



Regeneracja i transformacja żyta (*Secale cereale* L.) w kulturach *in vitro*

Sławomir Sowa, Aleksander Sowa, Janusz Zimny
Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin, Radzików

In vitro regeneration and transformation of rye (*Secale cereale* L.)

Summary

In vitro cultures are an integral part of plant transformation process. Genetic manipulation can be performed only on a single cell level. Therefore *in vitro* culture and regeneration of plants from a single cell are very important for successful transformation *in vitro* culture of rye is more difficult to conduct than of others cereals. Difficulties with *in vitro* regeneration of rye seems to be the main factor limiting the development of rye transformation systems. Genetic transformation process includes three main steps; single cell transformation, selection of transgenic cells and regeneration of plants from single cells. Efficiency of each of these steps can influence the result of the transformation process. Therefore optimisation of these steps is very important.

Transformation has been performed using the microprojectile bombardment with scutella of rye embryos as a target. Two constructs pDB1 and pAWact-Sec have been used in cotransformation. The pDB1 contained marker *bar* gene (phosphinotricine acetyltransferase) for Basta herbicide resistance and reporter *uidA* gene (β -glucuronidase). The pAWact-Sec contained 196 bp fragment of a *sec-1* gene in antisense orientation. Using pAWact-Sec construct we tried to block the expression of the endogenous gene *sec-1* coding for ω -secalin, a storage protein of rye grain. We were able to regenerate transgenic rye plants containing all introduced genes. The efficiency of *sec-1* expression blocking was analysed by SDS-PAGE method. Among 50 analysed kernels of T₁ generation we found 5 with lower ω -secalin level. Complete blocking of ω -secalin was not observed.

Adres do korespondencji

Sławomir Sowa,
Instytut Hodowli
i Aklimatyzacji Roślin,
Radzików, 05-870 Błonie;
e-mail:
s.sowa@ihar.edu.pl

Key words:

rye, somatic embryogenesis, transformation, microprojectile, antisense.

1. Wprowadzenie

Rośliny uprawne podlegają ciągłemu procesowi udoskonalenia poprzez prace hodowlane. Metody hodowli tradycyjnej mają jednak swoje ograniczenia i są bardzo czasochłonne. Chociaż tradycyjna hodowla pozwala na wymianę materiału genetycznego pomiędzy różnymi formami lub nawet gatunkami to proces przenoszenia genów jest ograniczony tylko do tych form, które mogą się między sobą krzyżować. Zastosowanie inżynierii genetycznej w hodowli roślin otworzyło szereg nowych możliwości. Inżynieria genetyczna pozwala na przeniesienie wybranego, określonego fragmentu DNA z genomu dawcy (od którego pochodzi DNA) do genomu biorcy (który przyjmuje DNA) z pominięciem procesu krzyżowania. Dzięki uniwersalności kodu genetycznego możliwe jest przenoszenie genów pomiędzy wszystkimi organizmami żywymi. Inżynieria genetyczna uzależniona jest z jednej strony od klonowania i poznawania funkcji poszczególnych genów w organizmach, z drugiej zaś od technologii wprowadzania tych genów do organizmów biorcy.

Chociaż metody klonowania i poznawania genów są w zasadzie takie same dla wszystkich organizmów, to metody przenoszenia genów różnią się znacznie i muszą być dostosowane do gatunku biorcy. Dlatego też niezwykle istotne jest opracowanie metod transformacji dla gatunków ważnych ekonomicznie. Dzięki transformacji możemy skutecznie modyfikować rośliny. Zakres tych modyfikacji jest ograniczony przede wszystkim dostępnością genów. Poprzez transformacje możemy zwiększać odporność na choroby, szkodniki, zmieniać właściwości fizjologiczne czy skład białek w ten sposób podnosić plon i jakość uprawianych roślin. Transgeniczne rośliny można wykorzystać do produkcji substancji biologicznych stosowanych w medycynie, wolnych od ludzkich lub zwierzęcych czynników chorobotwórczych. Wykorzystanie roślin do tego celu jest ze względów etyki i bezpieczeństwa jak najbardziej pożądane. Transformacja roślin może być też doskonałym narzędziem w pracach badawczych. Modyfikowanie ekspresji genów w roślinach transgenicznych przynosi wiele informacji na temat funkcji genów i ich produktów. Stosowanie konstruktorów plazmidowych w systemie „sens” i „antysens” staje się zatem ważnym elementem badań podstawowych.

Transformacja roślin jest nierozłącznie związana z regeneracją roślin *in vitro*. Manipulacje genetyczne łatwiej jest przeprowadzić na poziomie pojedynczych komórek niż całych tkanek. Dlatego też istotnymi czynnikami warunkującymi powodzenie w transformacji są kultury *in vitro* i regeneracja roślin z pojedynczych komórek.

Żyto (*Secale cereale* L.) jest rośliną ciągle popularną w krajach Europy Środkowej i Wschodniej. W Polsce uprawiane jest na obszarze 2298 tys. ha, co wśród zbóż zapewnia mu drugą pozycję pod względem arealu uprawy (1). Ze względu na fakt, że żyto jest rośliną obcocylną jego hodowla jest bardzo utrudniona (2-3). Wiele istniejących odmian to odmiany populacyjne co oznacza, że składają się z osobników podobnych tylko morfologicznie. Otrzymywanie homozygotycznych linii na drodze

chowy wsobnego pociąga za sobą jednak dużą depresję wsobną. Ponieważ znaczenie gospodarcze żyta ograniczone jest do krajów Europy Środkowej i Wschodniej stosunkowo niewiele prac badawczych poświęcono kulturom *in vitro* żyta. Prowadzenie kultur *in vitro* żyta jest także trudniejsze niż innych zbóż ze względu na brak genetycznego wyrównania odmian. Trudności z regeneracją żyta w kulturach *in vitro* są głównym czynnikiem ograniczającym opracowanie skutecznych systemów transformacji tego gatunku.

2. Cel pracy

Głównym celem pracy było opracowanie metody transformacji żyta metodą strzelby genowej (4) oraz otrzymanie płodnych roślin transgenicznych. Pierwszym krokiem w kierunku opracowania metody transformacji żyta było uzyskanie somatycznej embriogenezy oraz identyfikacja genotypów i warunków hodowli *in vitro* zapewniających wysoką efektywność tego procesu. Kolejnym krokiem było zoptymalizowanie sposobu dostarczania obcego DNA do komórek żyta. Dodatkowym celem było zastosowanie systemu kotransformacji jako sposobu niezależnego wprowadzania genów markerowego i użytkowego, a także uzyskanie modyfikacji ekspresji endogennego genu żyta poprzez antysensowe RNA.

3. Transformacja

Proces genetycznej transformacji roślin składa się z trzech głównych etapów: transformacji pojedynczych komórek, selekcji transgenicznych komórek oraz regeneracji roślin *in vitro* z pojedynczych komórek. Efektywność każdego z tych etapów wpływa na wynik procesu transformacji.

4. Znaczenie pożywki dla somatycznej embriogenezy

W wielu pracach nad regeneracją różnych gatunków roślin dowiedziono, że skład pożywki ma istotne znaczenie dla procesu somatycznej embriogenezy. W przedstawionych badaniach przetestowano pożywki, często stosowane w kulturach *in vitro* roślin jednoliściennych: MS (5), CC (6) Kao (7). Kalus otrzymany z niedojrzałych zarodków w stadium koleoptylarnym pięciu genotypów żyta hodowano na tych pożywkach i oceniano pod względem efektywności i intensywności embriogenezy. Najwyższą efektywność około 70% i intensywność embriogenezy u wszystkich pięciu testowanych odmian uzyskano na pożywce MS. Dalsze badania były prowadzone na bazie tej pożywki.

5. Znaczenie genotypu

Zdolność do inicjowania somatycznej embriogenezy jest warunkowana genetycznie (8-9), dlatego istotne znaczenie dla transformacji ma przebadanie różnych genotypów i selekcja tych, które charakteryzują się wysoką intensywnością i efektywnością embriogenezy. Znalezienie takich genotypów w dużym stopniu ułatwia uzyskanie roślin transgenicznych. Właśnie z tego względu u roślin, dla których opracowano już metody transformacji większość prac wykonywana jest na tych samych genotypach, bo tylko one dają gwarancje powodzenia badań. W doświadczeniu porównano intensywność i efektywność embriogenezy trzech odmian jarych i pięćdziesięciu linii ozimych żyta. Materiałem wyjściowym dla kultur *in vitro* były izolowane, niedojrzałe zarodki żyta w stadium koleoptylarnym (10). Efektywność somatycznej embriogenezy wahała się od 16 do 88%. Badane genotypy różniły się także znacząco intensywnością embriogenezy. Ze względu na wysoką intensywność i efektywność embriogenezy do transformacji wybrano następujące genotypy: Petka, Sorom, Karshulder i mieszańce trójliniowe Tur, TD 1407 (1993 x 4475) x 2803 TD 1409-1410, TD 1415 (2592 x 2650) x 2803 TD 1409-1410, TD 1416 (1792 x 2683) x 2803 TD 1409-1410.

6. Optymalizacja parametrów transformacji metodą strzelby genowej

Optymalizacja transformacji tarczki zarodkowej niedojrzałych zarodków żyta była oparta na analizie transformacji typu przejściowego genem markerowym *uidA*. Aktywność enzymatyczna genu *uidA* była badana histochemicznie. Badano wpływ ciśnienia w komorze sprężania na częstotliwość wprowadzania DNA do komórek tarczki niedojrzałych zarodków żyta. Wraz ze wzrostem siły strzału rośnie liczba sygnałów ekspresji typu przejściowego średnio od 27 sygnałów na zarodek przy ciśnieniu 900 psi do 54 sygnałów przy ciśnieniu 1550 psi. Dalsze zwiększanie ciśnienia powodowało zmniejszenie liczby sygnałów.

7. Kotransformacja konstrukcjami pDB1 i pAWact-Sec

Transformacje przeprowadzono stosując dwa konstrukty jednocześnie, pDB1 (11) zawierający gen markerowy *bar* kodujący acetylotransferazę fosfotrycyny pod kontrolą promotora 35S wirusa mozaiki kalafiora i gen reporterowy *uidA* kodujący β -glukuronidazę pod kontrolą promotora aktywny ryżu i pAWact-Sec zawierający fragment 196 pz 5' genu *sec-1* żyta (12) w orientacji antysensowej pod kontrolą promotora Act-1. Ostrzelano 6914 niedojrzałych zarodków 2-6 dni po izolacji, z których w procesie selekcji zregenerowano 117 roślin. Oprysk herbicydem Basta przeżyło 15 roślin. W przeprowadzonej analizie PCR i *Southern blot* na obecność genów

bar i *uidA* wykazano obecność obydwu wprowadzonych genów w genomie siedmiu roślin. Uzyskano 3 transgeniczne rośliny genotypu Petka, 3 rośliny genotypu Tur oraz jedną genotypu TD 1407 (1993 x 4475) x 2803 TD 1409-1410. W przeprowadzonej analizie *Southern blot* tych siedmiu roślin wykazano obecność konstruktów pAWact-Sec w genomie dwóch roślin.

8. Antysensowe wyciszanie genu *sec-1*

W pracy podjęto próbę wyciszenia endogennego genu żyta, *sec-1* kodującego białko zapasowe ω -sekalinę poprzez transformację konstruktem pAWact-Sec zawierającym 196 pz 5' fragment genu *sec-1* w orientacji antysensowej pod kontrolą promotora aktywiny (*Act-1*). Otrzymano dwie transgeniczne rośliny, w których udokumentowano wprowadzenie konstruktów pAWact-Sec za pomocą analizy *Southern blot*. Przeprowadzenie analizy efektywności antysensowego wyciszenia genu *sec-1* jest niemożliwe na poziomie roślin T_0 , ponieważ dotyczy białka zapasowego żyta gromadzonego w nasionach, a zatem w pokoleniu T_1 . Efektywność antysensowego wyciszenia genu *sec-1* analizowano elektroforetycznie metodą SDS-PAGE. Wśród pięćdziesięciu przebadanych nasion pokolenia T_1 rośliny Tur 15 pięć charakteryzowało się obniżoną zawartością ω -sekaliny. W żadnym przypadku nie odnotowano jednak całkowitego zahamowania ekspresji genu *sec-1*.

Ostatecznym dowodem transformacji jest przekazanie wprowadzonych genów do roślin potomnych (13). Wszystkie transgeniczne rośliny żyta będące efektem wykonanej pracy były płodne i wydały transgeniczne potomstwo, które przeanalizowano metodami PCR i *Southern blot*.

Literatura

1. *Rocznik statystyczny*, (1988), ZWS, Warszawa.
2. Hoffman W, Mudra A., Plarre W., (1979), *Szczegółowa hodowla roślin*, PWRiL, Warszawa.
3. Tarkowski Cz., (red.) (1983), *Biologia żyta*, PWN, Warszawa.
4. Sanford J. C., Klein T. M., Wolf E. D., Allen N., (1987), *J. Part. Sci. Technol.*, 5, 27-37.
5. Murashige T., Skoog F., (1962), *Physiol. Plant.*, 15, 473-497.
6. Potrykus I., Harms C. T., Lörz H., (1979), *Theor. Appl. Genet.*, 54, 209-214.
7. Kao i Michayluk, (1975), *Planta*, 126, 105-110.
8. Maddock S. E., Lancaster V. A., Risiott R., Franklin J., (1983), *J. Exp. Bot.*, 34, 915-926.
9. Mathias R., Simpson E. S., (1986), *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 7, 31-37.
10. Zimny J., (1993), *Somatyczna embriogeneza żyta (Secale cereale L.) w kulturach in vitro*, IHAR, Radzików.
11. Becker D., Brettschneider R., Lörz H., (1994), *Plant J.*, 5, 299-307.
12. Hull G. A., Halford N. G., Kreis M., Shewry P. R., (1991), *Plant Mol. Biol.*, 17 (5), 1111-1115.
13. Potrykus I., (1991), *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 42, 205-225.