



Transformacja wybranych genotypów pomidora za pośrednictwem *A. tumefaciens*

Grzegorz Bartoszewski, Olga Fedorowicz, Robert Malinowski, Agnieszka Niedziela, Katarzyna Niemirowicz-Szczytt

Katedra Genetyki Hodowli i Biotechnologii Roślin
Wydział Ogrodnictwa i Architektury Krajobrazu
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego, Warszawa

Transformation of selected genotypes of tomato with *A. tumefaciens*

Summary

Tomato belongs to important crops widely cultivated all over the world. It is also one of the five most popular vegetables grown in Poland. At the same time, tomato is known to be a model species in modern biology and biotechnology. Since 1985 a lot of reports on tomato transformation with the use of *Agrobacterium* have been published. Recently, first transgenic varieties of this species have also been developed. Flavr Savr™ obtained by Calgene, USA was the first cultivar obtained as a result of genetic engineering, officially registered in the United States.

In our Department the methods of tomato transformation with *Agrobacterium tumefaciens* have been adapted and optimised. Numerous transgenic plants have been obtained, such as commercial varieties (Beta, Potentat), inbred lines as well as tomato mutants (*non-ripening*, *lateral suppressor*). The following genes were introduced to the above forms: β -glucuronidase reporter gene (*gusA*), thaumatin gene (sweet protein), isopentenyl transferase gene (*ipt*, coding the key enzyme in cytokinin metabolic pathway) and thus homozygous lines were developed (T₂ generation).

Most recently, attempts have been made to incorporate *mgfp5-ER* gene coding green fluorescence protein, nucleoprotein (N) gene from tomato spotted wilt virus (TSWV) and cDNA of putative P450 cytochrome (CYP72) in order to test gene expression and interaction.

Key words:

tomato, transformation, *Agrobacterium*.

Adres do korespondencji

Grzegorz Bartoszewski,
Katedra Genetyki Hodowli
i Biotechnologii Roślin,
Wydział Ogrodnictwa
i Architektury Krajobrazu,
Szkoła Główna
Gospodarstwa Wiejskiego,
ul. Nowoursynowska 166,
02-787 Warszawa;
e-mail:
bartoszewski@alpha.sggw.
waw.pl

1. Wprowadzenie

Pomidor jest ważną rośliną uprawną na świecie. W Polsce zalicza się do grupy pięciu najważniejszych warzyw. Pomidor jest równocześnie jednym z podstawowych gatunków modelowych we współczesnej biologii i biotechnologii. Trwa prowadzone na dużą skalę sekwencjonowanie EST-ów (*expressed sequence tags*) u pomidora. Ogłoszono już ponad 65 000 tych sekwencji. Począwszy od 1985 r. opublikowano wiele prac dotyczących transformacji pomidora za pomocą *Agrobacterium*. W ostatnich latach w uprawie pojawiły się pierwsze transgeniczne odmiany pomidora. Odmiana FlavrSavr™ wytworzona przez kalifornijską firmę Calgene była pierwszą odmianą rośliny uprawnej otrzymaną metodami inżynierii genetycznej, która została oficjalnie dopuszczona do uprawy w Stanach Zjednoczonych (1).

2. Materiały i metody

W Katedrze Genetyki Hodowli i Biotechnologii Roślin SGGW zaadaptowano i zoptymalizowano metodykę regeneracji (2,3), a następnie transformacji pomidora za pośrednictwem *Agrobacterium tumefaciens* (4). Uzyskano liczne transgeniczne rośliny (5,6).

Do transformacji pomidora wykorzystano następujące plazmidy binarne: pBI121 (7), pRUR528 (8) oraz pHCKn312 (9). Plazmid pBI121 posiadał w obszarze T-DNA gen markerowy *nptII* nadający roślinom oporność na kanamycynę oraz gen reportery *gusA* (*uidA*) kodujący β -D-glukuronidazę. Plazmid pRUR528 został skonstruowany na bazie plazmidu pBI121. Różnił się tym od pBI121, że zamiast sekwencji kodującej *gusA* posiadał cDNA taumatyny (8). Taumatyna jest naturalnym słodkim białkiem wykorzystywanym jako słodzik, wytwarzanym w owocach przez afrykańską roślinę *Thaumatococcus daniellii*. Plazmid pHCKn312 posiadał w obszarze T-DNA także gen markerowy *nptII* oraz chimeralny gen *hsp70-ipt* (9). Konstrukcja *hsp70-ipt* składała się z promotora genu białka szoku cieplnego *hsp70* z *Drosophila melanogaster* (*hsp70*), sekwencji kodującej enzym transferazę izopentenyłową pochodzącą z plazmidu Ti (pTIB6S3) *A. tumefaciens* oraz sygnału poliadenylacji małej podjednostki karboksylazy RuBP groszku (*rbcS* 3'). Transferaza izopentenyłowa (*ipt*) jest głównym enzymem w szlaku metabolicznym syntezy cytokinin typu zeatyny. Dzięki zastosowaniu promotora *hsp70* w opisanej konstrukcji ekspresja genu *ipt* powinna zachodzić tylko po podwyższeniu temperatury do około 42-45°C, a pojawienie się produktów transkrypcji i translacji genu *ipt* powinno prowadzić do wzmożenia syntezy cytokinin w roślinie.

Wymienione konstrukcje wykorzystano do transformacji 3 różnych genotypów pomidora: odmiany Beta (odmiana gruntowa, sztywnołodogowa), linii „ls” (*lateral suppressor*, nie wytwarza pędów bocznych) oraz linii „nor” (*non-ripening*, owoce tej linii nie dojrzewają).

3. Wyniki i dyskusja

W wyniku transformacji konstruktem pBI121 (7) uzyskano 36 transgeniczných roślin, w tym 25 transgeniczných roślin odmiany Beta oraz 11 transgeniczných roślin linii „nor”. Tylko 2 rośliny odmiany Beta i 2 rośliny linii „nor” wykazywały ekspresję β -D-glukuronidazy (GUS) na poziomie pozwalającym na histochemiczną wizualizację jej aktywności. W przeprowadzonych analizach wykazano, że część zregenerowanych roślin posiadała zmieniony poziom ploidalności (4,5). Uzyskano 1 roślinę tetraploidalną dla odmiany Beta i 5 roślin tetraploidalnych w przypadku linii „nor”. W przeprowadzonych analizach molekularnych PCR i *Southern blot* wykazano, że tylko te rośliny, które wskazywały aktywność GUS posiadały poprawnie zintegrowany transgen – gen *gusA*. W przypadku pozostałych roślin doszło do niepoprawnej integracji genu *gusA* bądź do rearanżacji transgeny w obszarze tego transgeny. Nie jest jasne dlaczego tak mało roślin posiadało poprawnie zintegrowany gen *gusA*. Dla dwóch roślin odmiany Beta i jednej rośliny linii „nor” uzyskano potomstwo T1, wytypowano homozygotyczne pojedynki i uzyskano homozygotyczne pokolenie T2.

Przeprowadzone transformacje konstruktem pRUR528 (8) pozwoliły na uzyskanie 25 transgeniczných roślin, w tym 14 transgeniczných roślin odmiany Beta, 7 transgeniczných roślin linii „ls” oraz 4 transgeniczných roślin linii „nor”. W wyniku przeprowadzonej selekcji spośród tych roślin uzyskano 14 homozygotycznych transgeniczných linii (T2) w tym 8 dla odmiany Beta, 3 dla linii „ls” oraz 3 dla linii „nor”. Wszystkie linie odmiany Beta posiadały poprawnie zintegrowany chimeralny gen taumatyny w jednym *locus*. Uzyskane transgeniczne linie „ls” również posiadały poprawnie zintegrowany transgen, ale jedna z nich posiadała aż 4, a inna 2 miejsca integracji. Jeżeli chodzi o transgeniczne linie „nor” to tylko jedna z trzech posiadała poprawnie zintegrowany transgen. Wszystkie 3 badane linie posiadały tylko 1 miejsce integracji. W przeprowadzonych analizach *Northern blot* oraz *Western blot* wykazano, że wprowadzony transgen ulega ekspresji. Linie różniły się poziomem ekspresji transgeny. Najniższy poziom ekspresji na poziomie mRNA w liściach stwierdzono w przypadku linii „ls” posiadającej 4 miejsca integracji transgeny. Co ciekawe, transgeniczne linie „nor”, które nie posiadały poprawnie zintegrowanego transgeny charakteryzowały się najwyższym poziomem mRNA i białka taumatyny w owocach.

Transformacje z wykorzystaniem konstruktu pHCKn312 (9) wykonano głównie na roślinach linii „ls” oraz linii „nor” i odmiany Beta. Obserwowano, że efektywność regeneracji transgeniczných pędów dla linii „ls” (linia ta charakteryzuje się tym, że nie wytwarza pędów) jest znacznie wyższa w porównaniu z linią „nor” i odmianą Beta (2,3). Jednakże dużo zregenerowanych pędów tracono podczas ukorzenia oraz przenoszenia do szklarni ze względu na jednopędowy charakter wzrostu tych roślin. W wyniku przeprowadzonych eksperymentów uzyskano około 80 transgeniczných roślin. Spośród nich tylko część wytypowano do dalszych badań i dla 9 roślin uzyskano homozygotyczne pokolenie T2. Otrzymano 5 transgeniczných linii

„ls”, 2 transgeniczne linie „nor” oraz 2 transgeniczne linie odmiany Beta. W przeprowadzonych analizach molekularnych wykazano, że 6 spośród tych linii posiada poprawnie zintegrowany gen *hsp-ipt*. Tylko 4 z 8 linii posiadały pojedyncze miejsce integracji, pozostałe 4 linie posiadały po 2 miejsca integracji transgenów. Linie te posiadały wprowadzony gen *ipt*, którego ekspresja jest regulowana przez promotor genu białka szoku cieplnego *hsp70* z muszki owocowej. Tak zatem gen *ipt* powinien ulegać tylko po przejściu przez roślinę stresu cieplnego. W przeprowadzonych analizach *Northern blot* wykazano, że gen *ipt* ulega ekspresji po potraktowaniu roślin wysoką temperaturą. Stwierdzono jednak, że w przypadku jednej z linii gen *ipt* nie ulegał w ogóle ekspresji. Okazało się także, że w przypadku 2 linii gen *ipt* ulegał ekspresji podczas wzrostu roślin w normalnych, nie stresowych warunkach.

4. Konkluzje i perspektywy

W przeprowadzonych eksperymentach pokazano, że skuteczność transformacji pomidora za pośrednictwem *A. tumefaciens* jest zależna od wielu czynników. Są one związane zarówno z konstrukcją genową wprowadzaną do genomu biorcy, jak i z genotypem biorcy. Pełna kontrola warunków transformacji jest trudna co powoduje, że często trudno jest powtórzyć udany eksperyment transformacji.

Obecnie trwają prace nad wprowadzeniem do pomidora genu kodującego białko N wirusa TSWV (nadaje odporność na tego wirusa). Uzyskano pierwsze transgeniczne rośliny. Rozpoczęto także prace nad wprowadzeniem do pomidora genu kodującego białko zielonej fluorescencji (*mgfp5-ER*), oraz cDNA przypuszczalnego cytochromu P450 (CYP72) w celu badania ekspresji i interakcji transgenów.

Praca ta była wykonywana w ramach grantu KBN 5 P06A 02511 oraz grantu II Funduszu M. Skłodowskiej-Curie MR/USDA-97-295.

Literatura

1. Bartoszewski G., Niemirowicz-Szczytt K., (1997), *Biotechnologia*, 1 (40) 43-63, 1998.
2. Bartoszewski G., Zielińska-Dziadczyk E., (1994), *Prace Ogrodu Botanicznego PAN*, 5/6, 271-276.
3. Bartoszewski G., Malepszy S., Niemirowicz-Szczytt K., (1996), *J. Appl. Genet.*, 37A, 101-104. *Proc. of the Int. Conf. Perspectives in Plant Genetics*, September 16-17, Warszawa.
4. Bartoszewski G., Malepszy S., Niemirowicz-Szczytt K., (1996), *J. Appl. Genet.*, 37A, 97-100. *Proc. of the Int. Conf. Perspectives in Plant Genetics*, September 16-17, Warszawa.
5. Bartoszewski G., Malepszy S., Niemirowicz-Szczytt K., (1997), *Biotechnologia*, 4 (39), 62-70.
6. Fedorowicz O., Bartoszewski G., Smigocki A., Malinowski R., Niemirowicz-Szczytt K., (1999), *Int. Symp. Food Biotechnology*, (9-12 May), Zakopane, Book of Abstracts, 25.
7. Jefferson R. A., Kavanagh T. A., Bevan M. W., (1987), *EMBO J.*, 6, 3901-3907.
8. Szwaacka M., Burza W., Palucha A., Malepszy S., (1997), *Biotechnologia*, 4(39), 20-26.
9. Smigocki A. C., (1991), *Plant Mol. Biol.*, 16, 105-115.