



Transgeniczna truskawka zawierająca gen syntetazy estru glukozowego kwasu indolilo-3-octowego (*iaglu*) z kukurydzy

Danuta Wawrzyńczak, Iwona Sowik, Lech Michalczuk
Instytut Sadownictwa i Kwiaciarstwa, Skierniewice

Transgenic strawberry carrying maize IAA-glucose synthetase gene (*iaglu*)

Summary

Strawberry leaves (*Fragaria x ananassa* Duch.) cv. Kaster were transformed with the aid of *Agrobacterium tumefaciens*, strain 4404, carrying pBIN19 plasmid with *nptII* gene and *iaglu* gene under the control of constitutive CaMV-35S promoter. The incorporation of the transgene was confirmed in PCR with *iaglu*-specific primers and its expression by Northern blot. The level of esterified IAA in the leaves of transgenic plants was higher and free IAA lower than in the leaves of control plants. Of 15 transgenic clones analysed, 10 have smaller leaves and 13 shorter petioles than control plants. It was also found that 8 transgenic strawberry clones started flowering 1-2 weeks earlier than control plants and 5 clones did not form any runners.

Key words:

strawberry, transformation, indoleacetic acid.

1. Wstęp

Kwas indolilo-3-octowy (IAA) jest hormonem regulującym wiele procesów fizjologicznych u roślin, m.in. dojrzewania owocu u truskawki (1). Jednakże trwała zmiana jego poziomu, np. w celu spowolnienia dojrzewania i przedłużenia trwałości owocu poprzez egzogenną aplikację, jest trudna z uwagi na jego szybki metabolizm (2). Wykazano natomiast, że konstytutywną

Adres do korespondencji

Danuta Wawrzyńczak,
Instytut Sadownictwa
i Kwiaciarstwa,
ul. Pomologiczna 18,
96-100 Skierniewice.

biotechnologia

4 (51) 103-105 2000

zmianę poziomu endogennego IAA w tkankach roślinnych można uzyskać dzięki transformacji roślin genami odpowiedzialnymi za metabolizm auksyn (3).

Jednym z procesów odpowiedzialnych za regulację stężenia auksyn w tkankach roślin jest tworzenie form związanych (4). W kukurydzy cukrowej (*Zea mays*) proces ten odbywa się w cyklu reakcji enzymatycznych, w których podstawową rolę spełnia reakcja syntezy indolilo-3-acetylo-1-O- β -D-glukozy (5-7). Enzym katalizujący tę reakcję został oczyszczony do stanu homogeniczności, a jego gen – *iaglu*, sklonowany (8). We wstępnych wynikach badań wykazano, że ekspresja genu *iaglu* w tytoniu spowodowała obniżenie poziomu wolnego IAA i zwiększenie poziomu form związanych tego hormonu. Taki sam efekt spodziewamy się uzyskać w transgenicznej truskawce.

2. Materiał i metody

Transformację liści truskawek odmiany Kaster przeprowadzono za pomocą *Agrobacterium tumefaciens*, szczepu LBA 4404, zawierającego plazmid binarny pBIN19 z genem selekcyjnym *nptII* oraz genem *iaglu* pod kontrolą konstytutywnego promotora z wirusa mozaiki kalafiora (CaMV-35S). Inkorporację transgeny potwierdzono w reakcji PCR z primerami specyficznymi dla *iaglu*. Ekspresję genu analizowano metodą *Northern*. Jako sondy do hybrydyzacji użyto fragmentu genu *iaglu* o wielkości 619 pz znakowanego [α^{32} P]dCTP.

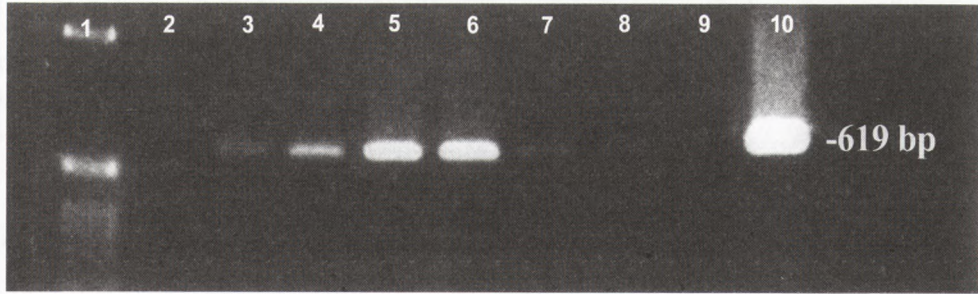
Zregenerowane transgeniczne pędy ukorzeniono *in vitro* na pożywce z dodatkiem 25 mg/l kanamycyny, a następnie wysadzono do doniczek i umieszczono w szklarni. Prowadzono obserwacje wzrostu i rozwoju 15 transgenicznych klonów oraz roślin kontrolnych (rośliny nie transformowane, uzyskane przez regenerację z eksplantatów liściowych). Poziom wolnego i związanego kwasu indolilooctowego w liściach transgenicznych i kontrolnych roślin oznaczano za pomocą chromatografu gazowego sprzężonego ze spektrometrem masowym (9).

3. Wyniki i dyskusja

W reakcji PCR prowadzonej na matrycy DNA izolowanego z transgenicznych roślin uzyskano specyficzne produkty, co potwierdza inkorporację genu *iaglu* (rys. 1).

We wstępnej analizie RNA za pomocą metody *Northern* wykazano obecność transkryptów hybrydujących z sondą specyficzną dla *iaglu*.

Zgodnie z oczekiwaniem, transformacja genem *iaglu* spowodowała zmiany w metabolizmie IAA. W liściach kilku przebadanych klonów poziom estryfikowanego IAA był wyższy, a poziom wolnego hormonu niższy niż w kontroli (tab. 1).



Rys. 1. Produkty amplifikacji fragmentu 619 pz genu *iaglu*.

1 – standard masowy DNA (1 kb), 2 – roślina kontrolna, 3-8 – rośliny transformowane, 9 – kontrola negatywna reakcji (brak DNA), 10 – kontrola pozytywna reakcji (reakcja z plazmidem pBIN19-*iaglu*).

Tabela 1

Zawartość wolnego i związanego kwasu indolilo-3-octowego w liściach truskawek transformowanych genem syntetazy IAA-glukozy (*iaglu*)

Klon	Zawartość IAA (ng g ⁻¹ ś.m.)		
	wolnego	pochodnych estrowych	pochodnych amidowych
kontrola	38 ± 17	50 ± 4	91 ± 16
klon nr 6	40 ± 7	111 ± 16	117 ± 9
klon nr 11	7 ± 7	177 ± 20	103 ± 17
klon nr 14	18 ± 7	103 ± 17	98 ± 11

Morfologia transgenicznych roślin różniła się od kontroli. Spośród piętnastu przebadanych klonów, dziesięć miało istotnie mniejsze blaszki liściowe, a trzynaście krótsze ogonki liściowe. Pięć transgenicznych klonów w ogóle nie wytworzyło rozłogów – pozostałe tworzyło rozłogi podobnie jak rośliny kontrolne. Trzy klony wytworzyły pierwsze kwiaty 2 tygodnie wcześniej niż kontrola, natomiast pięć klonów tydzień wcześniej.

Literatura

- Manning K., (1994), *Planta*, 194, 62-68.
- Andreae W. A., van Ysselstein M. W., (1956), *Plant Physiol.*, 31, 335-340.
- Hobbie L., Estelle M., (1994), *Plant, Cell and Environment*, 17, 525-540.
- Bandurski R. S., (1980), *Plant Growth Substances*, Ed. Skoog F., 37-49, Springer-Verlag, Berlin and Heidelberg.
- Corcuera L. J., Michalczuk L., Bandurski R. S., (1982), *Biochem. J.*, 207, 283-290.
- Michalczuk L., Bandurski R. S., (1980), *Biochem Biophys Res Commun*, 93, 588-592.
- Michalczuk L., Bandurski R. S., (1982), *Biochem J.*, 207, 273-281.
- Szerszen J. B., Szczyglowski K., Bandurski R. S., (1994), *Science*, 265, 1699-1701.
- Chen K.-H., Miller A. N., Patterson G. W., Cohen J. D., (1988), *Plant Physiol.*, 80, 822-825.