



Konsekwencje transformowania embriogenicznej komórki *Triticale* w analizie wielopokoleniowej

J. Zimny, A. Czaplicki, I. Menke-Milczarek, S. Oleszczuk, S. Sowa
Pracownia Kultur Tkankowych Zbóż
Zakład Biotechnologii i Cytogenetyki Roślin
Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin, Radzików

Consequences of Transformation of Embryogenic *Triticale* Cell

Summary

Plants carrying foreign genes have been obtained for many crops including wheat, rice, maize, barley and *Triticale*. The most important aspect of practical breeding is the regeneration of whole plants from a specific cell possessing the desired agronomic properties. Particle bombardment provided the necessary breakthrough for the efficient transformation of cereals. Efficient regeneration is a prerequisite for all transformation techniques.

The aim of the presented work was to study the progeny of transgenic plants of the allohexaploid cereal species *Triticale*. By combining an efficient regeneration system with the successful particle bombardment method we were able to obtain transgenic *Triticale* plants. Transgene expression was sometimes unstable and generally resulted in the decline of the expression, although some lines showing stable expression were also selected. In our laboratory several generations of androgenic doublehaploid transgenic lines have been regenerated and multiplied. The integrated transgenes were detected in *Triticale* lines by *in situ* hybridisation method. The stability of transgenes has been studied on ten generations.

A regeneration system from a single cell to a plant combined with micro-projectile bombardment appeared to be the most efficient transformation method for *Triticale*. Numerous chimeric genes are now available for research. Some of these genes may appear useful in the future breeding of *Triticale*.

Adres do korespondencji

J. Zimny,
Pracownia Kultur
Tkankowych Zbóż,
Zakład Biotechnologii
i Cytogenetyki Roślin,
Instytut Hodowli
i Aklimatyzacji Roślin,
Radzików,
05-870 Błonie.

biotechnologia

2 (49) 64–71 2000

Key words:

cell, embryogenesis, transformation, *Triticale*.

1. Wstęp

W ostatnich latach obserwuje się coraz szybszy postęp w dziedzinie otrzymywania roślin zmodyfikowanych genetycznie. Wzrosła też skuteczność transformacji. Przyczyną tego jest opanowanie nowych technik i udoskonalenie wektorów. Rośliny dwuliścienne były od wielu lat transformowane za pomocą *Agrobacterium tumefaciens*. Ostatnio metoda ta jest z powodzeniem stosowana także w przypadku roślin jednoliściennych, w tym zbożowych. Z czasem będzie zapewne bardziej skuteczna niż stosowana od kilku lat strzelba genowa. Na podstawie publikowanych ostatnio wyników badań można sądzić, że niebawem możliwa będzie transformacja ukierunkowana na określone miejsce w genomie co pozwoli na precyzyjne lokowanie obcych genów w genomie biorcy. W sferze badań są jeszcze systemy specyficznej rekombinacji, które w założeniu mają posłużyć do wycinania fragmentów obcego DNA użytych do selekcji, a zbędnych w dalszej hodowli. Taki zabieg spowoduje np. spełnienie postulatu pozbycia się z genomu genów oporności na antybiotyki. Obecnie możliwe jest uzyskiwanie metodą transformacji odporności na: herbicydy, choroby wirusowe, choroby grzybowe, szkodniki, mikroorganizmy i warunki stresowe. Istnieje możliwość modyfikowania produktów roślinnych, wpływania na procesy fizjologiczne jak fotosynteza i fotooddychanie, a także na proces wiązania azotu.

Mija trzydzieści lat od pierwszych prób wprowadzenia obcego DNA do komórek kukurydzy. Prace te, choć nie zakończone sukcesem, unaocznily problemy, które wiążą się z transformacjami komórek roślinnych. Zasadniczą przeszkodą była ściana komórkowa, która stanowi barierę nie do przebycia dla większych molekuł, takich jak DNA. Następnie pojawiły się inne problemy biologiczne związane z transferem genu. Rośliny transgeniczne można uzyskać z komórek kompetentnych, zarówno pod względem przyjęcia i włączenia obcego DNA, jak i regeneracji roślin. Takich komórek jest bardzo mało, a ich liczba zależy od: gatunku, genotypu, organu, stadium rozwojowego i od przebiegu rozwoju rośliny.

2. Systemy regeneracyjne w kulturach *in vitro* zbóż

Istnieją dwie drogi regeneracji roślin w kulturach *in vitro*: somatyczna embriogeneza i organogeneza. Obydwa sposoby regeneracji były obserwowane w kulturach roślin zbożowych. Materiał roślinny użyty do regeneracji powinien być morfogeny i mieć zdolności do regeneracji.

2.1. Regeneracja roślin z tkanki somatycznej

Somatyczne zarodki, zwane czasem embrioidami, odznaczają się budową dwubiegunową. Jednocześnie powstają u nich merystemy pędu i korzeni. W przypadku

organogenezy zawiązki pędu i korzeni rozwijają się niezależnie. U niektórych roślin zbożowych zarodki somatyczne są wyraźne i oddzielają się od kalusa (żyto, pszenżyto, jęczmień). U kukurydzy i pszenicy rozgraniczenie między embriogenezą i organogenezą jest raczej płynne. O mechanizmach indukcji somatycznej embriogenezy niewiele wiadomo. Kontrowersyjny pozostaje ciągle problem jedno- lub wielokomórkowego pochodzenia somatycznych zarodków. Somatyczna embriogeneza jest najbardziej bezpośrednią drogą regeneracji roślin. Embriogenne kultury mogą być zainicjowane z ontogenetycznie młodych eksplantatów zawierających aktywne merystematycznie komórki. Z tego powodu w badaniach wykorzystuje się najczęściej części roślin zawierające tkankę o silnym potencjale podziałowym komórek, tj. młode pylniki, niedojrzałe zarodki, podstawę liścia, młode kwiatostany, merystemy wierzchołkowe pędu i korzenia.

Rośliny pszenżyta regenerowano w przeszłości drogą organogenezy lub somatycznej embriogenezy z takich eksplantatów jak: młode kwiatostany, podstawa liścia. Najlepszym eksplantatem, jak się okazało, były niedojrzałe zarodki. Dane eksperymentalne wskazują, że stadium koleoptylarne jest optymalne dla zainicjowania kultury. Efektywność i jakość embriogenego kalusa zależy też od zastosowanej pożywki. Wśród czynników ważnych dla skutecznej kultury *in vitro* wymienić trzeba przede wszystkim: stadium rozwojowe eksplantatu, skład pożywki i genotyp rośliny.

2.2. Kultury pylników i uzyskiwanie podwojonych haploidów

Wytworzenie linii homozygotycznych drogą płciową wymaga siedmiu lub więcej pokoleń. Przez zastosowanie kultur pylnikowych lub kultur mikrospor, w połączeniu ze spontanicznym lub indukowanym podwojeniem liczby chromosomów, homozygoty można uzyskać w ciągu dwóch pokoleń. Hodowcy pszenżyta borykają się z brakiem wyrównania rodów, co jest przyczyną poważnych trudności w procesie rejestracji odmian. Z problemem tym można uporać się bardzo szybko otrzymując podwojone haploidy z pylników lub izolowanych mikrospor metodą androgenezy.

Wśród regenerantów obserwowano różnego rodzaju zmienność morfologiczną, zwłaszcza kształtu kłosa, wielkości plew, grubości słomy i długości blaszki liściowej. Na poziomie komórek obserwowano także aneuploidalny i poliploidalny skład chromosomów. Wielu autorów stwierdza częste pojawianie się roślin albinotycznych wśród regenerantów. Albinizm wiązano z temperaturą wzrostu roślin wyjściowych i innymi warunkami kultury.

2.3. Kultury zawiesin komórkowych i protoplastów

Uzyskanie embriogenych zawiesin komórkowych jest, u zbóż, procesem bardzo trudnym. Zdolność do regeneracji w tych kulturach szybko zanika. Rege-

neranty wykazują często silną zmienność genotypową i fenotypową. Obserwuje się albinizm, karłowatość, sterylność, co często skorelowane jest z aberacjami chromosomalnymi. Zmienność taką określa się ogólnie mianem zmienności somaklonalnej.

Potencjalnie zawiesiny komórkowe mogą być z powodzeniem wykorzystywane do selekcji w kulturach *in vitro*, a także jako znakomite źródło protoplastów. Kultury zawiesinowe można uzyskać wykorzystując u zbóż tkanki aktywne merystematycznie znajdujące się w tarczках niedojrzałych zarodków, młodych kwiatostanach lub kalusie z mikrospor. Zawiesiny inicjuje się z embriogenego kalusa. W ostatnich latach wykazano silny potencjał regeneracyjny zawiesin jęczmienia i pszenicy pochodzących od mikrospor. Wadą zawiesin komórkowych zbóż jest ich krótkotrwała zdolność do regeneracji. U pszenżyta wykorzystywano, jak dotąd, tylko embriogeny kalus indukowany z niedojrzałych zarodków (1,2). Z takiej zawiesiny uzyskiwano rośliny, ale w ciągu kilku miesięcy jej zdolność do regeneracji zanikła (3), była jednak wykorzystywana jako bardzo wydajne źródło protoplastów.

Istotną rolę w biotechnologii roślin odgrywają techniki związane z izolacją i kulturą komórek pozbawionych ściany komórkowej – protoplastów. Protoplasty stanowią jednorodną populację, do której każdy czynnik eksperymentalny dociera w tym samym czasie i z takim samym nasileniem. Zakłada się, że wskutek fuzji protoplastów roślin odległych systematycznie i somatycznej hybrydyzacji będzie można otrzymać odmiany, a nawet gatunki o pożądanym cechach użytkowych.

Wprowadzenie do protoplastów obcego DNA umożliwia powstawanie roślin transgenicznych mających cechy kodowane przez sztucznie wprowadzone geny oraz pozwala na bezpośrednie przenoszenie genów niezależnie od pokrewieństwa między dawcą i biorcą.

Właściwa metoda otrzymywania protoplastów powinna być powtarzalna i zapewniać wysoki udział protoplastów zdolnych do podziałów komórkowych i tworzenia kolonii. Prace prowadzone w tym kierunku są skierowane ku optymalizacji warunków kultury w celu otrzymania dużej ilości protoplastów. Pierwszej mechanicznej izolacji dokonał w 1892 r. Klerker, ale dopiero zastosowanie w 1960 r. przez zespół Cockinga enzymów do usuwania ściany komórkowej było impulsem do szybkiego rozwoju badań w tej dziedzinie (4). Pierwszy raport o regeneracji z protoplastów dotyczył mchów (5), a u roślin wyższych tytoniu (6). Całkowita liczba gatunków, z których protoplastów zregenerowano rośliny lub zarodki przekroczyła 300. Są to jednak głównie rośliny dwuliścienne. Najlepiej opracowane są techniki dla przedstawicieli rodzin *Solanaceae* i *Brassicaceae*. Zregenerowano też rośliny z protoplastów zbóż, a zatem z ryżu, kukurydzy, pszenicy, jęczmienia. Regeneracja roślin z protoplastów zbóż jest jednak ciągle procesem bardzo precyzyjnym i zależy od czynników, które wymykają się spod kontroli. Pierwszym problemem jest uzyskanie podziałów komórkowych, potem wyprowadzenie kalusa, a następnie zregenerowanie rośliny. W przypadku pszenżyta udało się zregenerować kalus i somatyczne zarodki (7). Z zarodków tych nie udało się zregenerować roślin.

Przez wiele lat czynnikiem limitującym rozwój inżynierii genetycznej roślin zbożowych był brak efektywnej metody transformacji oraz trudności ze zregenerowaniem roślin z protoplastów. Ten problem można było obejść poprzez zastosowanie metody wstrzeliwania do komórek plazmidów, zawierających pożądane sekwencje DNA, zaadsorbowanych na mikroskopijnych cząstkach złota. Ta metoda wymaga doskonałego systemu regeneracji, ale już nie z protoplastów, lecz z embriogennej tkanki roślinnej.

3. Jak wprowadzić obcy gen do rośliny?

W ciągu ostatnich dziesięciu lat opracowano kilka metod transformowania roślin. Jedną z nich, najbardziej powszechną, jest metoda z użyciem *Agrobacterium tumefaciens*. Metoda ta opiera się na zachodzącym w naturze zjawisku agroinfekcji. Główną rolę w tej grze odgrywa bakteria glebowa *Agrobacterium tumefaciens*. Bakterie te zasiedlają zranioną tkankę roślin i indukują wytwarzanie w komórkach roślinnych związków zwanych opinami, które umożliwiają rozmnażanie bakterii. Jak to się dzieje? Bakterie te posiadają kolisty fragment DNA zwany plazmidem Ti (*tumor inducing*). Część tego plazmidu zwana T-DNA jest wprowadzana przez bakterię do komórki roślinnej i łączy się z genomem roślinnym tej komórki. Fragment ten zawiera geny opinowe, a także geny enzymów, które powodują rozregulowanie wytwarzania roślinnych substancji wzrostowych. W trakcie podziałów geny te są przenoszone do kolejnych komórek potomnych i powodują powstawanie zrakowaceń na roślinach. Zjawisko to wykorzystano do wprowadzania do roślin obcych genów. Najpierw jednak trzeba było pozbyć się genów powodujących zrakowacenia. Tak zmienne T-DNA wbudowano do plazmidu, który może namnażać się w różnych bakteriach i który można przenosić z jednej bakterii do innej. W taki plazmid możemy teraz wbudowywać geny, które chcemy przenieść do roślin. Osiągają one swoje miejsce przeznaczenia, jakim jest komórka roślinna, w trzech etapach. Najpierw plazmid lokowany jest w bakteriach *E. coli*, które stanowią „przechowalnik” dla naszego T-DNA. Plazmid ten przekazywany jest do *Agrobacterium* poprzez koniugację. Na koniec gen razem z resztą T-DNA przenoszony jest przez *Agrobacterium* do komórki roślinnej. W opisany sposób udało się w latach osiemdziesiątych stransformować wiele roślin dwuliściennych. Przez wiele lat przyjmowano, że rośliny jednoliścienne są niewrażliwe na działanie *Agrobacterium*, ponieważ nie są one jego naturalnymi gospodarzami. Ostatnio pojawiło się jednak kilka doniesień o przeniesieniu DNA z *Agrobacterium* do komórek roślin jednoliściennych takich jak kukurydza, ryż i pszenica. Być może w dalszych badaniach uda się ustalić jakie czynniki determinują powinowactwo roślin jednoliściennych w stosunku do *Agrobacterium*. Tymczasem jednak większość badaczy starała się rozwijać alternatywne metody transformacji. Bezpośredniego przeniesienia DNA do protoplastów można dokonać metodą elektroporacji oraz z użyciem glikolu polietylenowego (PEG). Jednakże w obu przypadkach ko-

nieczne jest dysponowanie totipotentnymi, czyli zdolnymi do zregenerowania rośliny protoplastami, a także dobrze opracowanym systemem regeneracji tkanki kalusowej. W przypadku metody elektroporacji etap uzyskiwania protoplastów może być całkowicie pominięty. Transgeniczne rośliny kukurydzy otrzymywano tą metodą z niedojrzałych zarodków i embriogenego kalusa. Natomiast w innej, stosowanej obecnie, metodzie „strzelby genowej” poruszające się z dużą prędkością cząstki metalu (ok. 1 μm) są używane do przenoszenia DNA poprzez ściany komórkowe i membrany do wnętrza komórek roślinnych.

Metoda ta szybko upowszechniła się pozwalając także na wydajne transformowanie roślin zbożowych. Dzięki zastosowaniu strzelby genowej stało się możliwe wykorzystanie do transformowania obok niedojrzałych zarodków, takich eksplantatów jak merystem wierzchołkowy lub młody kwiatostan. Transformowana komórka powinna charakteryzować się zdolnością do podziałów oraz wykazywać totipotentcję. Na efektywność transformacji roślin mają wpływ takie czynniki jak parametry transformacji i genotyp. Olbrzymie znaczenie mają też warunki wzrostu roślin co potwierdza wielu autorów.

4. Transformacja pszenżyta

Stosując dwa geny markerowe, jak w przypadku konstruktu plazmidu pDB1 (8), możliwa jest selekcja na podstawie testu histochemicznego, który wykazuje ekspresję genu *uidA* (glukuronidazy) lub na podstawie odporności na herbicyd determinowanej genem *bar*. W ten sposób w roku 1993 stransformowano pierwsze rośliny pszenżyta (9). Rośliny te oraz ich potomstwo badano w kolejnych pokoleniach. W przeprowadzonej analizie enzymatycznej, molekularnej oraz selekcji poprzez oprysk herbicydem roślin pochodzących z czterech niezależnie stransformowanych linii pszenżyta wykazano, że w niektórych przypadkach możliwe jest samoczynne wycięcie wprowadzonego genu. W taki sam sposób wykonano analizę potomstwa tych roślin i uzyskano ten sam wynik.

W przeprowadzonej analizie molekularnej potomstw roślin transgenicznych pszenżyta wykazano zanik genu *bar* u niektórych roślin jednej linii. U innej linii obserwowano wyciszenie genu (*gene silencing*), co przejawiało się brakiem aktywności glukuronidazy, mimo że obecność genu wykazano za pomocą hybrydyzacji do sondy DNA metodą *Southerna* lub metodą PCR. Problemy związane ze stabilnością linii transgenicznych komplikują ich wprowadzanie do praktyki hodowlanej.

Z przeprowadzonych badań wynika, że każda z roślin reprezentuje aktywność glukuronidazy na różnym poziomie. Nawet rośliny nie posiadające genu wykazują śladową aktywność enzymu. Silna aktywność PAT (fosfotransferaza neomycynowa – produkt genu *bar*), obserwowana w dwóch przypadkach, nie zawsze jest skorelowana z silną aktywnością GUS. Możliwe jest zatem wyselekcjonowanie roślin o silnej ekspresji jednego genu i słabej drugiego.

W przeprowadzonej analizie pokoleń T_1 i T_2 pod względem segregacji wprowadzonych genów wykazano zróżnicowaną stabilność poszczególnych linii. W celu uzyskania stabilnych transformantów zastosowano metodę androgenozy, która prowadzi do zregenerowania płodnych i homozygotycznych roślin z mikrospor. W ramach przeprowadzonego eksperymentu zregenerowano z pylników pięciu linii transgenicznych rośliny haploidalne. Dla różnych linii, z tysiąca wyłożonych pylników zregenerowano od 0 do 102 roślin. Z 295 zielonych regenerantów – 99 było płodnych, a na podstawie analizy cytologicznej wykazano u nich diploidalną liczbę chromosomów ($2n = 42$). Potomstwo tych roślin zapylano wsobnie i otrzymano w ten sposób linie homozygotyczne, stabilne pod względem wprowadzonych genów. Testem x-Gluc (test na obecność glukuronidazy – produktu genu *uidA*) sprawdzono 1600 roślin z kilku linii pokolenia TDH3. Wszystkie rośliny wykazywały aktywność glukuronidazy co oznacza, że linie homozygotyczne nie wykazywały segregacji cechy determinowanej przez wprowadzony gen *uidA*. Otrzymano 11 pokoleń roślin transgenicznych pochodzących od androgenicznych haploidów. Odporność na herbicyd nie została przełamana. Badania prowadzono w warunkach szklarniowych. Obecnie, dzięki pojawieniu się odpowiednich przepisów, możliwe jest przeprowadzenie doświadczeń polowych z organizmami modyfikowanymi genetycznie i przeprowadzenie prac hodowlanych z wykorzystaniem transgenicznego pszenżyta.

5. Zakończenie

Konsekwencją wprowadzenia obcego genu do genomu komórki było zregenerowanie roślin transgenicznych pszenżyta. Naturalną dalszą konsekwencją winno być zarejestrowanie i wprowadzenie do uprawy odmiany transgenicznej. W pierwszej połowie lat dziewięćdziesiątych w USA zaczęto uprawiać rośliny zmodyfikowane genetycznie. W roku 1993 powstały pierwsze polskie transgeniczne rośliny uprawne. Ze względu na ryzyko związane ze stosowaniem w żywieniu ludzi i zwierząt produktów pochodzących z organizmów modyfikowanych genetycznie, a także z uwagi na ekologiczne aspekty uwalniania ich do środowiska oraz pojawiające się zastrzeżenia natury moralnej powstała potrzeba prawnego uregulowania zasad prowadzenia doświadczeń nad GMO oraz ich praktycznego wykorzystania. Jednocześnie podjęte przez Polskę zobowiązania międzynarodowe powodują, że prawo dotyczące GMO winno pozostawać w zgodzie z dokumentami normatywnymi o zasięgu międzynarodowym.

W Stanach Zjednoczonych wydano dotąd ponad 2000 zezwoleń na eksperymenty polowe z roślinami transgenicznymi, w Europie kilkadziesiąt, a w Polsce kilkanaście.

W ostatnich latach firmy zachodnie zaczęły zabiegać o wprowadzenie swoich odmian i produktów transgenicznych na rynki Europy Wschodniej, a w tym na rynek Polski. Począwszy od 1997 r. na mocy indywidualnych zezwoleń ministra rolnictwa i gospodarki żywnościowej transgeniczne odmiany roślin uprawnych pojawiły się

w ściśle kontrolowanych doświadczeniach polowych w Polsce, gdzie nie istniały dotąd regulacje prawne sankcjonujące stosowanie organizmów transgenicznych w produkcji żywności czy medycynie. Rozwijanie metod biotechnologicznych będzie miało w najbliższej przyszłości przełożenie na wyniki ekonomiczne rolnictwa także w Polsce. Implikuje to konieczność powstania przepisów regulujących postępowanie z GMO. Temu problemowi poświęcone były ostatnio zorganizowane w Radzikowie warsztaty pt. „Krajowy program bezpieczeństwa biologicznego, realizowane w ramach projektu UNEP GF/1200-98-84. Celem warsztatów było dokonanie przeglądu i oceny dotychczasowego stanu bezpieczeństwa stosowania biotechnologii w Polsce, a materiały pochodzące z tych warsztatów posłużą do tworzenia polskiego „prawa genowego”. Regulacje takie wyjdą naprzeciw potrzebom rolnictwa i umożliwią prace hodowlane z wykorzystaniem roślin transgenicznych, także pszenżyta.

Literatura

1. Stolarz A., Lörz H., (1986), *Z. Pflanzenzüchtg.*, 96, 353-362.
2. Zimny J., Rybczyński J. J., (1986), *Genetic Manipulations in Plant Breeding*, Eds. Horn, Jensen, Odenbach, Schieder, W. de Gruyter, Berlin, 503-505.
3. Zimny J., (1992), *Regulation of plant somatic embryogenesis*, Sumpark. Proceedings, 4-9.
4. Thomas E., Davey M. R., (1975), *From single cells to plants*, Wykeham publications (London) LTD.
5. Binding H., (1966), *Z. Pflanzenphysiol.*, 55, 305-321.
6. Takebe I., Labib G., Melchers G., (1971), *Naturwissenschaften*, 58, 318-320.
7. Stolarz A., (1990), *Proceedings of the Second International Triticale Symposium*, Passo Fundo, Brazil., 286-289.
8. Becker D., Brettschneider R., Lörz H., (1994), *Plant Journal*, 5, 299-307.
9. Zimny J., Becker D., Brettschneider R., Lörz H., (1995), *Mol. Breeding*, 1, 155-164.