

Systemy selekcyjne w inżynierii genetycznej roślin

Marcin Morąg
Przemysław Lehmann
Instytut Genetyki Roślin
Polska Akademia Nauk
Poznań

1. Wstęp

Tylko część komórek roślinnych, które poddawane są transformacji włącza obcy gen w swój genom. Takie transgeniczne komórki stanowią materiał, który wykorzystuje się w dalszych etapach pracy do regeneracji z nich roślin transgenicznych. Dlatego niezależnie od zastosowanej techniki transformacyjnej, istnieje potrzeba wyłonienia z całej puli komórek użytych podczas transformacji tych, których genom został wzbogacony w obcy gen. W tym celu wykorzystywane są dwie grupy genów selekcyjnych: markerowe i reporterowe. W skład pierwszej grupy wchodzi geny: oporności na antybiotyki i oporności na herbicydy. Strategia, w której zakłada się użycie podczas selekcji tych genów, polega na zastosowaniu w podłożu hodowlanym jednego ze znanych czynników selekcyjnych (antybiotyku lub herbicydu) zakłócającego w istotny sposób metabolizm komórkowy. Komórki transgeniczne, które obok wprowadzanego genu włączyły w swój genom również gen oporności (lub oporności) są zdolne do zneutralizowania użytego czynnika selekcyjnego i normalnego rozwoju. Zupełnie odmienna jest reakcja komórek, które nie uległy transformacji i nie włączyły w swój genom genu markerowego. Takie komórki zamierają w wyniku zablokowania ich podstawowych szlaków metabolicznych. Geny reporterowe — stanowiące drugą grupę genów umożliwiających selekcję komórek transgenicznych — kodują produkty, które mogą być wykrywane bezpośrednio lub też białka enzymatyczne umożliwiające tworzenie się łatwo wykrywalnego produktu w komórkach roślinnych.

Użycie w systemach selekcji transgenicznych komórek roślinnych genów markerowych budzi obawy ekologów i innych grup związanych z ochroną przyrody. Środowiska te wskazują na możliwość przeniesienia się w naturalnych warunkach genów oporności na herbicydy do gatunków pokrewnych i niezamierzone wprowadzenie do środowiska „superchwastu”, odpornego na herbicydy. W przeprowadzonych ostatnio badaniach nad możliwością takiego horyzontalnego transferu genów z roślin transgenicznych wyka-

ziano bardzo niskie prawdopodobieństwo realizacji takiego scenariusza (1). Z ostatnio opublikowanych wyników prac holenderskich badaczy z Instytutu Żywności i Żywności w Zeist (TNO Nutrition and Food Research Institute) nad możliwością przeniesienia genów oporności na antybiotyki stosowane podczas selekcji transformantów do bakterii przewodu pokarmowego zwierząt, wnioskować można, że taki proces nie zachodzi. Do doświadczenia użyto zmodyfikowanych genetycznie bakterii *Lactobacillus* oraz transgenicznych pomidorów Flavr Savr firmy Calgene. Autorzy pracy stwierdzają jednak, że w pewnych bardzo specyficznych warunkach, może dojść do przeniesienia genów oporności na antybiotyki do genomu bakterii jelitowych (2).

Przedstawione obawy skłoniły do poszukiwania rozwiązań, w których geny oporności na antybiotyki i odporności na herbicydy byłyby usuwane z genomu roślin transgenicznych przed ich ostatecznym przeniesieniem z kontrolowanych w pełni warunków (hodowla *in vitro*, szklarnia itp.) w pole. Kilka systemów uzyskiwania transformantów, które umożliwiają eliminację genów markerowych z genomów roślin transgenicznych jest już używanych w inżynierii genetycznej roślin.

W prezentowanej pracy opisano większość stosowanych obecnie genów oporności na antybiotyki i genów odporności na herbicydy oraz genów reporterowych. Przedstawiono ponadto zasady działania i przykłady kilku systemów, stosowanych w inżynierii genetycznej roślin, które umożliwiają eliminację genów selekcyjnych z genomu roślin transgenicznych.

2. Geny oporności na antybiotyki

2.1. Fosfotransferaza neomycynowa II (NPT-II)

Gen *npt-II* pochodzący z transpozonu Tn5 z *Escherichia coli* K12 (tab. 1) to najczęściej wykorzystywany w inżynierii genetycznej gen oporności na antybiotyki. Produkt genu, enzym fosfotransferaza neomycynowa II, fosforyluje aminoglikozydowe pochodne neomycyny (paramomycynę, kanamycynę i genetycynę), powodując ich dezaktywację, czyli utratę zdolności wiązania się z rybosomami i blokowania na tej drodze biosyntezy białka (3). Wiele gatunków roślin zostało transformowanych przy udziale genu *ntp-II* jako genu markerowego. Dobrym przykładem są modelowe rośliny: tytoń (4) i rzodkiewnik (5) oraz istotne gospodarczo: kukurydza (6), ryż (7), soja (8) i bawełna (9). Stężenia kanamycyny podczas selekcji transgenicznych komórek i tkanek w warunkach *in vitro* w przypadku roślin dwuliściennych mieszczą się w granicach od 2,5 do 100 mg/l. Na przykład dla gerbery stosowano stężenie 2,5 mg/l (10), dla rzepaku jarego optymalne stężenie kanamycyny podczas selekcji wynosi 15 mg/l (11), dla koniczyny (12) i ziemniaka 50 mg/l (13), a tytoń i ogórek wymagają do selekcji 100 mg kanamycyny na litr pożywki (14,15). W przypadku roślin jednoliściennych selekcja transformantów na kanamycynie jest trudna. Powodem jest między innymi obserwowany nie-

kiedy brak wrażliwości na kanamycynę, co ogranicza jej użycie w systemach selekcyjnych niektórych gatunków. Pomimo tych problemów transgeniczną kukurydzę otrzymano na drodze selekcji transgenicznych komórek na pożywkach z kanamycyną o stężeniu 200 mg/l (6).

TABELA 1

GENY OPORNOŚCI NA ANTYBIOTYKI STOSOWANE JAKO MARKERY SELEKCYJNE W INŻYNIERII GENETYCZNEJ ROŚLIN

Antybiotyk	Gen oporności	Produkt genu	Pochodzenie genu	Literatura
kanamycyna, neomycyna, paramomycyna, genetycyna	<i>npt-II</i>	fosfotransferaza neomycynowa II	transpozon Tn5	3
hygromycyna B	<i>hpt</i>	fosfotransferaza hygromycynowa	<i>Escherichia coli</i>	16
blastycydyna	<i>bsr</i>	deaminaza blastycydyny	<i>Aspergillus terreus</i> i <i>Bacillus cereus</i>	19
metotreksat	<i>dhfr</i>	reduktaza dwuhydrofolianowa	pR 67	18,20
bleomycyna, fleomycyna	<i>Ble*</i>	białko wiążące bleomycynę i fleomycynę	<i>Streptoalloteichus</i> <i>hindustanus</i> i transpozon Tn5	59
streptomycyna	<i>spt*</i>	fosfotransferaza streptomycyny	transpozon Tn5	60

* geny nie zostały omówione w pracy.

2.2. Fosfotransferaza hygromycynowa (HPT)

Gen *hpt* (lub *hph*) wyizolowany z bakterii *Escherichia coli* koduje fosfotransferazę hygromycynową. Enzym ten jest zdolny do unieczynnienia antybiotyku hygromycyny B wywołującego letalne efekty u roślin. Mechanizm oddziaływania hygromycyny na metabolizm roślinny nie został do końca wyjaśniony. Hygromycyna była z powodzeniem stosowana w selekcji transformantów w przypadku wielu gatunków roślin i dawała równie dobre efekty selekcyjne jak kanamycyna. Większość gatunków roślin wykazuje wyższą wrażliwość na hygromycynę niż na kanamycynę czy genetycynę (16). Za pomocą hygromycyny przeprowadzono selekcję roślin zbożowych, które wykazują wysoką oporność na kanamycynę i genetycynę (17). Stężenie hygromycyny stosowane podczas selekcji transformantów w warunkach *in vitro* mieści się w granicach od 25 do 200 mg/l (18); dla tytoniu 15 mg/l (14), a dla koniczyny 75 mg/l (12). Hygromycyna wykazuje jednak wysoką niestabilność w pożywkach, co powoduje, że rośliny muszą być często pasażowane, a to podnosi koszty selekcji.

2.3. Deaminaza blastycydynowa (BSR)

Gen *bsr* kodujący deaminazę blastycydynową wywołuje oporność na blastycydynę *S.* Antybiotyk ten jest produkowany w naturze przez *Streptomyces griseochromogenes* i był pierwotnie używany w Japonii jako fungicyd. Po wykazaniu jego toksyczności dla tytoniu i dzikiej róży oraz odkryciu bakterii opornych na blastycydynę (*Aspergillus terreus* oraz szczepy *Bacillus cereus*) użyto genu *bsr* jako selekcjonującego markera. Kodowany przez gen *bsr* enzym, deaminaza blastycydynowa, inaktywujący blastycydynę, należy do grupy aminohydrolaz. Stężenie wymagane przy selekcji tytoniu wynosi od 2 do 3 mg/l (19).

2.4. Reduktaza dwuhydrofolianowa (DHFR)

Pochodzący z bakterii *Escherichia coli* gen *dhfr* odpowiada za syntezę enzymu reduktazy dwuhydrofolianowej. Obecność tego enzymu w komórkach roślinnych umożliwia przeżycie na pożywkach zawierających metotreksat (MTX). Przy zastosowaniu genu *dhfr* jako selekcyjnego genu markerowego wyselekcjonowano między innymi transgeniczny tytoń i ryż oraz kilka innych roślin. Stężenia selekcyjne metotreksatu były relatywnie niskie i wynosiły od 0,1 mg/l dla tytoniu (20) do 2 mg/l dla ryżu (18). We wczesnych badaniach nad metotreksatem wykazano niską wydajność transformacji tym genem, ponadto antybiotyk blokował działanie hormonów dodanych do pożywki. Obecnie wykorzystywane są metody, w których są zmienione zasady selekcji oraz różnorodne składy pożywek, co pozwala uzyskiwać lepsze wyniki transformacji. Metotreksat jest związkiem niezwykle toksycznym, należy zachować dużą ostrożność w pracy, nigdy nie stosować w formie oprysku.

3. Geny odporności na herbicydy

3.1. Acetylotransferaza fosfotrycyny (PAT)

Zidentyfikowane w genomie bakterii *Streptomyces hygroscopicus* gen *bar* i gen *pat* w *S. viridochromogenes* (tab. 2) są odpowiedzialne za odporność na fosfotrycynę, składnik wielu herbicydów (21). Fosfotrycyna hamuje aktywność syntetazy glutaminianowej, co w rezultacie powoduje gromadzenie się toksycznego dla komórek roślinnych amoniaku. Acetylofosfotransferaza fosfotrycyny, będąca produktem genu *bar*, jest wysoce specyficzna i skuteczna w inaktywacji fosfotrycyny, a w konsekwencji herbicydu. Powstająca acetylowa pochodna nie posiada toksycznej aktywności czystego związku. Oprócz fosfotrycyny istnieją również pochodne związki posiadające zdolność inhibowania syntetazy glutaminianowej, np. trójpeptyd z resztą fosfotrycyny wytwarzany przez bakterię *S. hygroscopicus* nazywany bialafosem (Herbiace, Meiji Seika), czy syntetyczna fosfotrycyna (glufosinat amonowy) o nazwie handlowej Basta (Hoechst). Oba te preparaty są używane jako uniwersalne herbicydy, służą do selekcji transgenicznych komórek.

Gen *bar* był używany jako selekcyjny gen markerowy dla roślin jedno- i dwuliściennych. Obecnie należy do najczęściej stosowanych selekcyjnych genów markerowych w inżynierii genetycznej roślin. W pożywkach selekcyjnych stosowano zróżnicowane stężenie czystej fosfotrycyny zależnie od gatunku roślin. Czasami stosowany był również oprysk roślin. W przypadku kukurydzy używano w pożywce stężenia od 1 do 3 mg /l bialafosu (22). Natomiast pszenica była w stanie normalnie się rozwijać przy stężeniu 5 mg Basta na litr pożywki (23), koniczyna 10 mg/l (12), a ryż 10 mg/l fosfotrycyny (18). Produkt genu *bar* może być identyfikowany różnymi technikami: immunochemiczną, chromatografią cienkowarstwową i spektrofotometryczną. Ciekawym rozwiązaniem jest połączenie czynnika selekcyjnego z czerwonym chlorofenolem, który pod wpływem zmiany pH (rośliny metabolizując zakwaszają środowisko) zmienia barwę pożywki z czerwonej w kierunku żółtej (23).

TABELA 2

GENY ODPORNOŚCI NA HERBICYDY STOSOWANE JAKO MARKERY SELEKCYJNE W INŻYNIERII GENETYCZNEJ ROŚLIN

Herbicyd	Gen odporności	Enzym — produkt genu	Pochodzenie genu	Literatura
fosfotrycyna (bialafos, Basta)	<i>bar</i>	acetylotransferaza fosfotrycyny	<i>Streptomyces hygroscopicus</i>	21
bromoksynil	<i>bxn</i>	nitrylaza bromoksynilu	<i>Klebsiella ozaenae</i>	25
glifosat	<i>EPSPS</i>	syntaza EPSP	<i>Petunia hybrida</i>	24
2-4 D	<i>tfdA*</i>	monooksygenaza 2-4D	<i>Alcaligenes eutrophus</i>	61
herbicydy imidazolino- we oraz sulfonylowe	<i>als</i>	syntaza acetomleczanowa	mutanty <i>Arabidopsis</i>	26,27
atrazyna	<i>psbA*</i>	białko Qb	<i>Amaranthus hybridus</i>	62

* geny nie zostały omówione w pracy.

3.2. Syntaza 5'-enolopirogronylo-szikimo-3'-fosforanowa (EPSPS)

Gen syntazy EPSP został wyizolowany z wyselekcjonowanych linii *Petunia hybrida* odpornych na herbicyd glifosat. Glifosat, składnik m.in. popularnego herbicydu Roundup, zakłóca przebieg szlaku szikimowego w roślinach, pozwalającego na powstawanie aminokwasów aromatycznych. Rośliny z wyselekcjonowanych linii wykazywały dwudziestokrotny wzrost aktywności enzymu. Transformowana petunia toleruje stężenie 0,5 mM glifosatu, identyczne stężenie toleruje kalus (24). Wykazano również tolerancję roślin transgenicznych na oprysk herbicydem Roundup w dawce dwukrotnie wyższej niż letalna.

3.3. Nityrlaza bromoksynilu (BXN)

Gen *bxn* zidentyfikowany w genomie bakterii *Klebsiella ozanae* koduje specyficzną nityrlazę rozkładającą herbicyd bromoksynil (3,5-dwubromo-4-hydroksybenzonieryl). Herbicyd bromoksynil blokuje fotosystem II hamując w ten sposób transfer elektronów. Uzyskano transgeniczny tytoń z genem *bxn* pod kontrolą promotora genu kodującego mniejszą podjednostkę „rubisco” (25), który był odporny na bromoksynil. Tkankami docelowymi bromoksynilu są fotosyntetyzujące części roślin i tam powinna zachodzić specyficzna ekspresja genu *bxn*, jak również powinien być aktywny jedynie u organizmów prowadzących fotosyntezę. Kontrolne próby tolerowały stężenie herbicydu stukrotnie niższe niż rośliny transgeniczne.

3.4. Syntaza acetomleczanowa (ALS)

Gen *als* jest odpowiedzialny za degradację wielu herbicydów, m.in. grupy herbicydów imidazolinowych, powodujących zaburzenie szlaku biosyntezy leucyny, izoleucyny i waliny. Herbicydy te są inhibitorami syntazy acetomleczanowej. Transgeniczny kalus rzodkiewnika z genem *als* był w stanie normalnie się rozwijać nawet przy stężeniu 100 μM herbicydu w pożywce (26). Herbicydy sulfonyłowe takie jak: chlorosulfuron czy metylowany sulfomeluron powodują blokowanie szlaku biosyntezy aminokwasów, związanych z inhibicją syntazy mleczanowej. Transgeniczne rośliny zawierające zmutowaną wersję genu *als* (mutacja punktowa — 870 nukleotyd) były odporne na te herbicydy. Kalus transgenicznego tytoniu był w stanie rozwijać się na pożywkach zawierających 100 nM chlorosulfuronu, podczas gdy rośliny kontrolne zamierały pod wpływem stężenia dziesięciokrotnie niższego (27).

4. Geny indukcji negatywnej

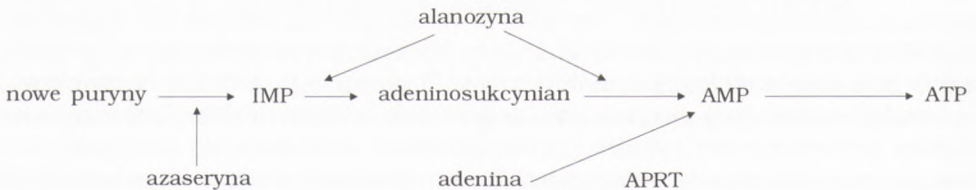
Do transformacji roślin używano genów indukcji negatywnej takich jak geny reduktazy azotanowej i deaminazy cytozyny. Geny typu *counter-selectable* powodują konwersję nieszkodliwego czynnika selekcyjnego do toksycznego. Geny indukcji negatywnej służą do analiz dziedziczenia transgenów, inaktywacji lub eliminacji niekorzystnych mutantów, a także w badaniach aberracji chromosomowych. Pierwszym takim genem użytym do transformacji roślin był gen *iaaH* (*tms 2*) kodujący hydrolazę przetwarzającą indoloacetamid w toksyczny kwas indoloctowy. Z genu tego jednak zrezygnowano z powodu endogennej aktywności niespecyficznych hydrolaz. Reduktaza azotanowa jest enzymem katalizującym przejście azotanów do azotynów i powodującym toksyczność chloranów. Przeprowadzone doświadczenia nad ekspresją genu *Nia* i jego zmutowanej formy *nia* (28), wykazały różnice ekspresji w zależności od źródła azotu w pożywce. Ekspresja transgenu kodującego reduktazę azotanową w roślinach typu *Nia* była zależna od obecności azotanów, a w mutantach *nia* od obecności azotanów lub amoniaku. Selekcja

zachodziła pod wpływem amoniaku. Deaminaza cytozyny kodowana przez prokariotyczny gen *codA* pochodzący z *Escherichia coli* powoduje konwersję nieaktywnej 5-fluorocytozyny do toksycznego 5-fluorouracylu (29). W badaniach nad genami białek szoku termicznego gen dehydrogenazy alkoholowej był pod kontrolą promotora genu białka szoku termicznego (30). Produkt genu powodował przejście alkoholu allilowego do toksycznego aldehydu akroleinowego. W temperaturze 37°C i w stężeniu 10 mM alkoholu dochodziło do stuprocentowej śmiertelności roślin.

5. Inne geny selekcyjne

5.1. Fosforybozylotransferaza adeninowa (APRT)

Gen *aprt*, używany z dobrym skutkiem w badaniach zwierzęcych, może być genem selekcyjnym również u roślin (31). Koduje on enzym, fosforybozylotransferazę adeninową, katalizującą powstawanie AMP z adeniny. Z kolei AMP jest prekursorem ATP. AMP jest produkowany w komórkach *in vivo* z powstałych na nowo puryn poprzez inozylomonofosforan i adeninosukcynian. Po zablokowaniu tego szlaku na skutek obecności azaseryny i alanozyny jest uruchamiany szlak katalizowany przez APRT (rys. 1). Dodanie do pożywki obu czynników blokujących oraz adeniny pozwala zidentyfikować rośliny transgeniczne. Selekcja ukierunkowana na rośliny z zaburzonym „cyklem APRT” może być prowadzona w obecności analogów adeniny (2-6-dwuaminopuryny). Są one przekształcane przez APRT w toksyczne pochodne, przez co przeżywają tylko rośliny z zablokowanym działaniem enzymu. Zachodzi zatem selekcja negatywna roślin transgenicznych. Niedogodnością metody u wielu gatunków roślin jest wysoki, endogenny poziom APRT.



Rys. 1. Alternatywny szlak syntezy AMP z adeniny po zablokowaniu (obecność alanozyny i azaseryny) tradycyjnego szlaku biosyntezy AMP.

5.2. Dekarboksylaza tryptofanu (TDC)

Pozwala na selekcję roślin transgenicznych wykazujących brak endogennej aktywności dekarboksylazy tryptofanu, kodowanej przez gen *tdc*. Gen *tdc* został zidentyfikowany w genomie *Catharanthus roseus*. Enzym powoduje przemiany toksycznych analogów tryptofanu takich jak 4-metylotryptofan do pochodnych tryptaminy, koniecznych do syntezy alkaloidów indolowych. Gen *tdc* wykorzystano do transformacji tytoniu, który nie wykazuje endogennej aktywności dekarboksylazy tryptofanu (32). Kontrolne rośliny zamierały już przy stężeniach 0,05 – 0,1 mM czynnika selekcyjnego. Przy wysokiej aktywności dekarboksylazy tryptofanu transformanty rozwijały się normalnie, nawet gdy stężenie czynnika selekcyjnego osiągało 0,5 mM. Białko enzymu bardzo łatwo oznacza się za pomocą metod immunologicznych, HPLC, czy FLPC (33).

6. Geny reporterowe

6.1. β -glukuronidaza (GUS)

Gen *gus* (*uidA*) to jeden z najpowszechniej stosowanych genów reporterowych w inżynierii genetycznej roślin, szczególnie szeroko używany w badaniach podstaw molekularnych metabolizmu roślin (tab. 3). Poziom produktu genu *gus*, β -glukuronidazy, można łatwo określać ze względu na reakcje barwne jakie katalizuje. Jest szczególnie użyteczna przy badaniu specyficzności tkankowej (34). β -glukuronidaza jest hydrolazą, która katalizuje hydrolizę wielu glukuronidów. Pochodzący z *Escherichia coli* gen koduje duże, termostabilne białko, nie wymagające kofaktorów w reakcjach enzymatycznych. Dla pełnej aktywności glukuronidaza wymaga obecności niektórych kationów metali (np. miedzi i cynku). Optymalną aktywność wykazuje w pH 5,2-8,0 (34).

System wykorzystujący gen *gus* zawiera kilka bardzo korzystnych cech. Wykazuje bardzo wysoką czułość i łatwość przy ilościowej ocenie poziomu ekspresji. Jest wysoce specyficzny i umożliwia histochemiczną lokalizację reakcji w tkankach roślinnych. Poziom substratów dla glukuronidazy jest łatwy w ocenie przy zastosowaniu standardowych technik spektrofotometrycznych, fluorometrycznych i histochemicznych. W roślinach nie jest wykrywalna endogenna aktywność glukuronidazy w warunkach reakcji wykonywanych w testach. Poziom enzymu bada się najczęściej czułą metodą fluorymetryczną. Substratem jest z reguły 4-metylo-umbelliferylo- β -D glukuronid (4-MUG). Enzym powoduje konwersję 4-MUG do 4-metylo-umbelliferonu, który jest pochodną kumaryny i daje efekty świetlne przy jonizacji grup hydroksylowych. Technika ta jest tysiąc razy czulsza od metody kolorymetrycznej. Metoda spektrofotometryczna jest często używaną, tanią techniką, w której wykorzystuje się różnice absorbancji pomiędzy ekstraktami inkubowanymi z substratem a próbą zerową. Metodą dającą równie dobre rezultaty jest

technika histochemiczna, szczególnie przy użyciu X-Gluc (5-bromo-4-chloro-3-indolilglukoronid) jako substratu. Jest to bardzo przydatna metoda do mikro- i makroskopowego obserwowania specyficzności tkankowej transgenów.

TABELA 3
GENY REPORTEROWE STOSOWANE W INŻYNIERII GENETYCZNEJ ROŚLIN

Gen	Białko – produkt genu	Pochodzenie genu	Literatura
<i>gus (uidA)</i>	β -glukuronidaza	<i>Escherichia coli</i>	34
<i>gfp</i>	zielono fluoryzujące białko	<i>Aequorea victoria</i>	35,36
<i>luc</i>	lucyferaza	<i>Photinus pyralis</i>	39,40
<i>cat</i>	acetylotransferaza chloramfenikolu	<i>Escherichia coli</i>	42,43

6.2. Zielono fluoryzujące białko (GFP)

Gen *gfp* kodujący zielono fluoryzujące białko (Green Fluorescent Protein) pochodzi z genomu meduzy (*Aequorea victoria*). Białko występuje w fotocytach i bierze udział w procesie fluorescencji (35). Powszechnie używa się go podczas transformacji roślin, zwierząt, bakterii i owadów. Jest niezwykle użyteczne, gdyż nie wymaga substratów, kofaktorów ani enzymów. Fluorescencja białka następuje po wzbudzeniu światłem o długościach 395 nm oraz 475 nm, przy emisji światła 509 nm (36). Prowadzone są szerokie badania nad uzyskaniem zmutowanego genu *gfp* dającego białko o innych maksymach wzbudzenia i termoodporności. Gen *gfp* wykazuje wysoki poziom ekspresji w komórkach, niska ekspresja jest zazwyczaj związana z delecją odcinka kodującego 28 aminokwasów. Delecja powoduje upodobnienie się genu do intronu roślinnego, czym tłumaczy się nieudane próby uzyskania ekspresji transgenu u niektórych gatunków roślin. Udana próba uzyskania wysokiej ekspresji genu wykazano u transgenicznego tytoniu (37) oraz trzciny cukrowej (38). Przeprowadzono także udane próby zligowania genu z sekwencjami docelowymi. Dokonano tego w celu doprowadzenia do ekspresji w wybranych rejonach komórki, a następnie obserwacji tam fluorescencji.

6.3. Lucyferaza (LUC)

Gen *luc* wyizolowany z genomu świetlików amerykańskich (*Photinus pyralis*) kontroluje syntezę lucyferazy, katalizującą zależne od ATP utlenianie lucyferyny owadziej (39). Gen *luc* ulega ekspresji w komórkach roślinnych po transformacji (40). Produkt genu, lucyferazę, można oczyścić z materiału roślinnego i badać jej poziom w warunkach *in vitro*. Możliwe jest również badanie zmian poziomu ekspresji genu *luc* w warunkach *in vivo* w roślinach transgenicznych (41). Ocena jest szybka i łatwa, wymaga jednak stosowania

luminometru dla pomiaru luminiscencji. Czułość testu związanego z pomiarem poziomu lucyferazy jest najwyższa, gdy porówna się ją z innymi genami reporterowymi (wystarczy tylko około 2000 cząsteczek enzymu do wykrycia aktywności). Pewną niedogodnością tego systemu jest niska stabilność lucyferazy w warunkach *in vivo*.

6.4. Acetylotransferaza chloramfenikolowa (CAT)

Gen *cat* został zidentyfikowany i wyizolowany z bakterii *Escherichia coli*. W obecności acetylo-CoA acetylotransferaza chloramfenikolowa przekształca chloramfenikol w acetylowaną pochodną z równoczesnym powstaniem zredukowanego CoA.

acetylotransferaza



chloramfenikolowa

Powstający CoA-SH może być oznaczony spektrofotometrycznie, densytometrycznie lub metodami izotopowymi (42,43). Pewną niedogodnością w przypadku zastosowania genu *cat* jako genu reporterowego jest obserwowana endogenna aktywność acetylotransferazy chloramfenikolowej. Poziom tej aktywności jest zróżnicowany w poszczególnych gatunkach roślin. Obserwuje się wysoką aktywność endogennej acetylotransferazy w rodzaju *Brassica*, podczas gdy w rodzinie *Solanaceae*, nie stwierdzono takiej aktywności (44).

7. Metody eliminacji genów selekcyjnych z genomów roślin transgenicznych

Używanie genów selekcyjnych w transformacjach roślin wiąże się z trzema głównymi zagadnieniami: 1) składniki selekcyjne pożywki, odpowiednie dla danego genu selekcyjnego użytego w transformacji, wpływają negatywnie na metabolizm i rozwój transgenicznych roślin. Wysokie stężenia antybiotyków, czy herbicydów mogą opóźnić wzrost i rozwój roślin transgenicznych; 2) użycie genów selekcyjnych jest, jak wspomniano, krytykowane przez ekologów, obawiających się zaburzeń w funkcjonowaniu naturalnych ekosystemów, 3) przy kolejnych transformacjach trzeba używać innych genów selekcyjnych. W związku z tym opracowano metody usunięcia tych genów z transformowanych roślin w trakcie kolejnych etapów prac nad przygotowaniem linii transgenicznych (45).

7.1. Kotransformacja

Jedną z metod umożliwiających eliminację selekcyjnych genów markerowych jest metoda kotransformacji. Polega ona na użyciu genów markerowych w pierwszym etapie transformacji do selekcji transformantów, a następnie usunięciu ich poprzez segregację w kolejnych pokoleniach. Kotransformacja może być przeprowadzana za pomocą jednego binarnego plazmidu z dwoma oddzielnymi fragmentami T-DNA (46,47), względnie przy użyciu dwóch oddzielnych binarnych plazmidów poprzez kokultywację z jednym wybranym szczepem *Agrobacterium tumefaciens* (48,49) lub z kilkoma szczepami tej bakterii (46,47,50,51). Eliminacja genu selekcyjnego zależy od skuteczności transformacji oraz integracji obu odcinków DNA na różnych chromosomach, a co za tym idzie wysokiej częstotliwości niezależnej segregacji obu genów (wprowadzanego i selekcyjnego) w kolejnych pokoleniach. Doświadczenia prowadzone w wielu laboratoriach nad różnymi gatunkami roślin wykazały wysoką skuteczność kotransformacji w eliminacji genów selekcyjnych. Problemy z uzyskaniem dużej ilości transformantów, niezależnie segregujących obie cechy, wynikają z zastosowanej metody transformacji, użycia różnych typów wektorów oraz z odmiennymi wymaganiami każdego transformowanego gatunku. Ważnym elementem kotransformacji jest wybór odpowiedniego szczepu *Agrobacterium*. Plazmidy oktopinowe pozwalają, np. uzyskać więcej transformantów segregujących w kolejnych pokoleniach, niż plazmidy nopalinowe.

7.2. Wykorzystanie właściwości elementów zdolnych do transpozycji do eliminacji genów selekcyjnych

Właściwości elementów zdolnych do transpozycji kukurydzy wykorzystano do eliminacji genów selekcyjnych z genomów roślin transgenicznych. Element Ac, jeden z dwóch składników systemu Ac/Ds, jest zdolny do reinsertji w nowym miejscu w genomie, nie tylko u kukurydzy, ale również u kilku innych gatunków. Drugi składnik tego systemu — Ds — nie posiada tej zdolności i może ją nabyć; albo w obecności elementu Ac, albo gdy dołączy się do niego gen kodujący transpozazę z elementu Ac. Analogiczną właściwość nabywają również sekwencje (w tym i całe geny) umieszczone pomiędzy odwróconymi powtórzeniami terminującymi elementu Ds. Obserwacja ta jest podstawą przy tworzeniu wektorów transformacyjnych umożliwiających oddzielenie wprowadzanego genu, od genu selekcyjnego i w efekcie eliminację tego ostatniego z linii transgenicznych.

W praktyce laboratoryjnej wykorzystuje się w tym celu dwa typy wektorów transformacyjnych. Odwrócone powtórzenia flankujące element Ds otaczają albo wprowadzany gen albo gen selekcyjny. W przypadku gdy do transformacji używa się *Agrobacterium tumefaciens* zarówno gen otoczony sekwencjami Ds, jak i drugi gen znajdują się we fragmencie T-DNA. Zachodząca rekombinacja umożliwia segregację potomstwa pod kątem obecności albo genu selekcyjnego albo genu wprowadzanego (zależnie od użytego typu wektora do transformacji).

Dobrym przykładem wykorzystania elementów zdolnych do transpozycji w systemach eliminacji genów selekcyjnych jest wektor MAT. Wektor transformacyjny MAT zawiera gen *ipt*, kodujący transferazę izopentenylową biorącą udział w syntezie cytokinin. Gen *ipt* został wprowadzony w rejon elementu Ac. Cytokiny stymulując organogenezę, pozwalają na szybką regenerację transformantów bez dodawania tych hormonów do pożywki. Rośliny transgeniczne z genem *ipt* wykazują zwiększone zdolności regeneracyjne, co powoduje, że rośliny z wprowadzonym genem są łatwo identyfikowane. Element Ac posiada zdolności do transpozycji w inne miejsce tego samego chromosomu lub na inny chromosom, co pozwala na segregację obu genów i usunięcie genu selekcyjnego *ipt*. System umożliwia wielokrotną transformację tym samym konstruktem i zwiększanie liczby kopii pożądanego genu w roślinie (52).

7.3. Miejscowospecyficzny system rekombinacji

Dużą nadzieję w inżynierii genetycznej roślin wiąże się z metodami usuwania genu selekcyjnego za pomocą systemów opartych na specyficznych miejscach rekombinacji (45). Najbardziej rozpowszechnionymi są systemy: pochodzący z drożdży FRT/FLP (53), Cre/*lox* pochodzący z bakteriofaga P1 (54,55), pSR1 (56), a także Gin rekombinaza (57). System FRT/FLP został użyty w wielu badaniach w inżynierii genetycznej roślin (np. ryż, kukurydza) (53,63). Wykorzystuje on specyficzne wycinanie sekwencji umieszczonych między zgodnie ustawionymi sekwencjami FRT. Reakcję tę katalizuje rekombinaza FLP, której gen wprowadza się podczas kolejnej transformacji. Ustawienie sekwencji FRT w orientacji przeciwnej do siebie powoduje odwrócenie genu będącego pomiędzy nimi, a tym samym, unieczynnienie go. Analogiczny mechanizm wykorzystano w modelu Cre/*lox* rozpowszechnionym w badaniach roślinnych (54,55). Enzym CRE katalizuje wycięcie genu znajdującego się pomiędzy sekwencjami *loxP* ustawionymi w odpowiedniej orientacji. Enzym wycina sekwencję w 95% przypadków. Systemy te są również badane pod względem użyteczności w kontrolowanym włączaniu transgenów do genomu roślin.

7.4. Tkankowospecyficzna ekspresja selekcyjnych genów markerowych

Kompromisową metodą eliminacji ekspresji genów selekcyjnych jest transformowanie roślin konstrukcjami, w których geny selekcyjne byłyby pod kontrolą promotorów tkankowospecyficznych. Takie podejście pozwala na selekcję transformantów, a równocześnie wyklucza ekspresję genów selekcyjnych w dojrzałych roślinach. Za pomocą tej techniki uzyskano m.in. transgeniczny tytoń transformowany genem *npt-II* pod kontrolą indukowanego zranieniem promotora AoPR1 wyizolowanego z *Asparagus officinalis*. W pociętych krążkach liściowych transformowanego tytoniu wykazano obecność genu oporności na antybiotyki, natomiast dorosłe rośliny wykazywały nikłą ekspresję lub jej brak (58).

7.5. Podsumowanie

Selekcja komórek transgenicznych jest ważnym etapem procesu transformacji roślin. Obok genu wprowadzanego do genomu biorcy wprowadzany jest równocześnie gen markerowy, który umożliwia identyfikację komórek transgenicznych poprzez nadawanie im zdolności do neutralizowania czynników selekcyjnych (antybiotyków lub herbicydów). Drugą możliwością wykorzystywaną w tym celu jest użycie podczas selekcji komórek transgenicznych genów reporterowych kodujących produkty, które mogą być łatwo wykrywane w komórkach roślinnych. Ponieważ stosowanie w systemach selekcyjnych genów oporności na antybiotyki i odporności na herbicydy budzi zastrzeżenia ekologów, opracowano szereg skutecznych metod umożliwiających eliminację tych genów z materiałów transgenicznych.

Literatura

1. Widmer F., Seidler R. J., Donegan K. K., Reed G. L., (1997), *Mol. Ecol.*, 6, 1-7.
2. MacKenzie D., (1999), *New Scientist*, 161, 4.
3. Bevan M. W., Flavell R. B., Chilton M. D., (1983), *Nature*, 304, 184-187.
4. Horsch R. B., Fraley R. T., Rogers S. G., Sanders P. R., Lloyd A., Hoffman N., (1984), *Science*, 223, 496-498.
5. Valvekens D., van Montagu M., van Lijsebettens M., (1988), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85, 5536-5540.
6. D'Halluin K., Bonne E., Bossut M., de Beuckeleer M., Leemans J., (1992), *Plant Cell*, 4, 1495-1505.
7. Battraw M., Hall T. C., (1992), *Plant Sci.*, 86, 191-202.
8. Christou P., McCabe D. E., Swain W. F., (1988), *Plant Physiol.*, 87, 671-674.
9. Firoozabady E., Deboer D. L., Merlo D. J., Halk E. L., Amerson L. N., Rashka K. E., Murray E. E., (1987), *Plant Mol. Biol.*, 10, 105-116.
10. Nowak E., Rojek Ż., Kucharska D., Orlikowska T., (1997), *Biotechnologia*, 4(39), 27-37.
11. Moloney M. M., Walker J. M., Sharma K. K., (1989), *Plant Cell Rep.*, 8, 238-242.
12. D'Halluin K., Botterman J., de Greef W., (1990), *Crop Sci.*, 30, 866-871.
13. Chachulska A. M., Chrzanowska M., Flis B., Krzymowska M., Lipska-Dwuźnik A., Ro-baglia C., Zagórski W., (1997), *Biotechnologia*, 4(39), 48-54.
14. Schmulling T., Rohrig H., (1995), *Mol. Gen. Genet.*, 249, 375-390.
15. Szwacka M., Burza W., Pałucha A., Malepszy S., (1997), *Biotechnologia*, 4(39), 20-25.
16. Meijer E. G. M., Schilperoort R. A., Rueb S., van Os-Ruygrok P. E., Hensgens L. A. M., (1991), *Plant Mol. Biol.*, 16, 807-820.
17. Hauptmann R. M., Vasil V., Ozias-Akins P., Tabaeizadeh Z., Rogers S. G., Fraley R. T., Horsch R. B., Vasil I. K., (1988), *Plant Physiol.*, 86, 602-606.
18. Dekeyser R., Claes B., Marichal M., van Montagu M., Caplan A., (1989), *Plant Physiol.*, 90, 217-223.
19. Kamakura T., Yoneyama K., Yamaguchi I., (1990), *Mol. Gen. Genet.*, 223, 332-334.
20. Herrera-Estrella L., de Block M., Messens E., Hernalsteens J. P., van Montagu M., Schell J., (1983), *EMBO J.*, 2, 987-995.
21. de Block M., Botterman J., Vandewiele M., Dockx J., Thoen C., Gosselé V., Rao Mov-va N., Thompson C., van Montagu M., Leemans J., (1987), *EMBO J.*, 6, 2513-2518.
22. Gordon-Kamm W. J., Spencer T.M., Mangano M.L., Adams T.R., Daines R.J., Start W.G., O'Brien J.V., Chambers S.A., Adams W.R., Willets N.G., Thomas B.R., Mackey C.J., Krueger R.W., Kausch A.P., Lemaux P.G., (1990), *Plant Cell*, 2, 603-618.

23. Wright M. S., Launis K., Bowman C., Hill M., Dimaio J., Kramer C., Shillito R.D., (1996), *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant*, 32, 11-13.
24. Shah D. M., Horsch R.B., Klee H.J., Kishore G.M., Winter J.A., Tumer N.E., Hironaka C.M., Sanders P.R., Gasser C.S., Aykent S., Siegel N.R., Rogers S.G., Fraley R.T., (1986), *Science*, 233, 478-481.
25. Stalker D. M., McBride K. E., Malyj L. D., (1988), *Science*, 242, 419-423.
26. Sathasivan K., Haughn G. W., Murai N., (1991), *Plant Physiol.*, 97, 1044-1050.
27. Haughn G. W., Smith J., Mazur B., Somerville C., (1988), *Mol. Gen. Genet.*, 211, 266-271.
28. Nussaume L., Vincentz M., Caboche M., (1991), *Plant J.*, 1, 267-274.
29. Perera R. J., Linard C. G., Signer E. R., (1993), *Plant Mol. Biol.*, 23, 793-799.
30. Severin K., Wagner A., Schoffl F., (1995), *Transgenic Res.*, 4, 163-172.
31. Schaff D. A., (1994), *Plant Sci.*, 101, 3-9.
32. Goddijn O. J. M., van der Duyn Schouten P. M., Schilperoort R. A., Hoge J. H. C., (1993), *Plant Mol. Biol.*, 22, 907-912.
33. Pennings E. J. M., Hegger I., Heyden R., Duine J. A., Verporte R., (1987), *Anal. Biochem.*, 165, 133-136.
34. Jefferson R.A., (1988), *Genetic Engineering*, Ed. J. K. Setlow, vol.10, 247-263, Plenum Press, New York, London.
35. Haseloff J., Amos B., (1995), *TIG*, 11, 328-329.
36. Prasher D. C., (1995), *TIG*, 11, 320-323.
37. Santa Cruz S., Baulcombe D., (1995), *J. Gen. Virol.*, 76, 2057-2061.
38. Elliott A. R., Campbell J. A., Brettell R. I. S., Grof C. P. L., (1998), *Aust. J. Plant Physiol.*, 25, 739-743.
39. de Wet J. R., Wood L. V., Helinski D. R., de Luca M., (1985), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82, 7870-7873.
40. Ow D. W., Wood K. V., de Luca M., de Wet J.R., Helinski D. R., Howell S. H., (1986), *Science*, 234, 856-859.
41. Millar A. J., Short S. R., Hiratsuka K., Chua N. H., Kay S. A., (1992), *Plant Mol. Biol. Rep.*, 10, 324-337.
42. Sleight M. J., (1986), *Anal. Biochem.*, 156, 251.
43. Miner J. N., Weinrich S. L., Hruby D. E., (1988), *J. Virol.*, 62, 297.
44. Gendloff E. H., Bowen B., Buchholz W. G., (1990), *Plant Mol. Biol.*, 14, 575-583.
45. Yoder J. I., Goldsbrough A. P., (1994), *Bio/Technology*, 12, 263-267.
46. Depicker A., Herman L., Jacobs A., Schell J., van Montagu M., (1985), *Mol. Gen. Genet.*, 201, 477-484.
47. Komari T., Hiei Y., Saito Y., Murai N., Kumashiro T., (1996), *Plant J.*, 10, 165-174.
48. de Framond A. J., Back E. W., Chilton W. S., Kayes L., Chilton M-D., (1986), *Mol. Gen. Genet.*, 202, 125-131.
49. Daley M., Knauf V. C., Summerfelt K. R., Turner J. C., (1998), *Plant Cell Rep.*, 17, 489-496.
50. McKnight T. D., Lillis M. T., Simpson R. B., (1987), *Plant Mol. Biol.*, 8, 439-445.
51. de Block M., Debrouwer D., (1991), *Theor. Appl. Genet.*, 82, 257-263.
52. Ebinuma H., Sugita K., Matsunaga E., Yamakado M., (1997), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 2117-2121.
53. Greenblatt I. M., (1984), *Genetics*, 108, 471-485.
54. Dale E. C., Ow D., (1990), *Gene*, 91, 79-85.
55. Odell J., Caimi P., Sauer B., Russell S., (1990), *Mol. Gen. Genet.*, 233, 369-378.
56. Onouchi H., Yokoi K., Machida C., Matsuzaki H., Oshima Y., Matsuoka K., Nakamura K., Machida Y., (1991), *Nucl. Acids Res.*, 19, 6373-6378.
57. Maeser S., Kahmann R., (1991), *Mol. Gen. Genet.*, 230, 170-176.
58. Ozcan S., Firek S., Draper J., (1993), *Bio/Technology*, 11, 218-221.
59. Perez P., Tiraby G., Kallerhoff J., Perret J., (1989), *Plant Mol. Biol.*, 13, 365-373.
60. Jones J.D.G., Svab Z., Harper E.C., Hurvitz C. D., Maliga P., (1987), *Mol. Gen. Genet.*, 210, 86-91.

61. Lyon B. R., Llewellyn D. J., Huppatz J. L., Dennis E. S., Peacock W. J., (1989), *Plant Mol. Biol.*, 13, 533-540.
62. Cheung A. L., Bogorad L., van Montagu M., Schell J., (1988), *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 85, 391-395.
63. Hodges T. K., Łyżnik L. A., (1996), *J. Appl. Genet.*, 37A, 36-49.

Selection systems in genetic engineering of plants

Summary

Systems are required which allow selection of transformed cells. Genes that confer a selectable advantage to transformed cells are included in the transformation system. They include the use of antibiotics, herbicides or other compounds. In this review, we describe the systems developed for selective elimination of selectable marker genes from the transgenic plants.

Key words:

plant transformation, selectable marker, reporter genes, selective agent, marker-free transgenic plants.

Adres do korespondencji:

Przemysław Lehmann, Pracownia Inżynierii Genetycznej Roślin, Instytut Genetyki Roślin, Polska Akademia Nauk, ul. Strzeszyńska 34, 60-479 Poznań, e-mail: pleh@igr.poznan.pl