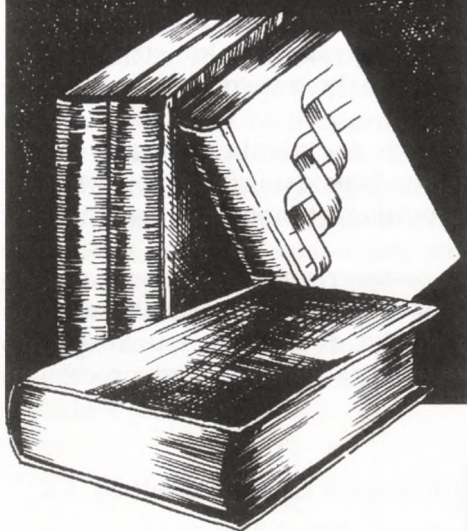


Prace
przeglądowe



Transformacja u ogórka *Cucumis sativus* L.

Maria Szwacka¹
Wojciech Burza¹
Andrzej Pałucha²
Stefan Malepszy¹

¹Katedra Genetyki Hodowli
i Biotechnologii Roślin,
Szkoła Główna Gospodarstwa
Wiejskiego
Warszawa

²Instytut Biochemii i Biofizyki
Polska Akademia Nauk
Warszawa

1. Wprowadzenie

Opracowane w Katedrze Genetyki Hodowli i Biotechnologii Roślin systemy regeneracji u ogórka, zarówno z eksplantatów bardzo młodych liści (1), z ustalonych kultur zawiesinowych (2) oraz protoplastów (3), pozwoliły na przeprowadzenie różnych doświadczeń nad optymalizacją metody transformacji. Przy elektroporacji i mikrowstrzeliwaniu zastosowano kasety ekspresyjne zawierające wyłącznie geny markerowe (4,5). Natomiast, przy metodzie wektorowej zastosowano kasety zawierającą gen o znaczeniu użytkowym — cDNA genu taumatyny II kodującego monomeryczne białko (22 kDa), które wzbudza szczególne zainteresowanie ze względu na właściwość wywoływania u człowieka wrażenia



Rys. 1. Obszar T-DNA w wektorze pRUR528s; nos p. — promotor genu syntazy nopalinowej; *npt II* — sekwencja kodująca genu neomycynowej fosfotransferazy II; nos t — terminator genu syntazy nopalinowej; CaMV 35S — promotor 35S RNA z wirusa CaMV; taumatyna II — cDNA genu taumatyny II.

▷ — sekwencje graniczne.

słodkiego smaku (6). Gen ten ulega ekspresji wyłącznie w owocu afrykańskiej rośliny *Thaumatococcus danielli*, z którego został otrzymany (7). W kilku pracach wskazano na występowanie znaczącej homologii w sekwencji aminokwasów taumatyny z białkami zaangażowanymi w mechanizmach obronnych u roślin (8-11).

Nasze zainteresowanie wprowadzeniem genu taumatyny do ogórka wynika z dwóch powodów. Po pierwsze, zamierzamy sprawdzić możliwość jego ekspresji i słodkiego smaku w roślinach dyniowatych. Po drugie, zamierzamy określić ewentualny wpływ na odporność na choroby u ogórka. Praca ta zawiera doniesienie o uzyskaniu transgenicznych roślin ogórka wykazujących ekspresję genu taumatyny II i jest to pierwsza informacja dla rośliny z rodziny *Cucurbitaceae*. Ekspresję genu taumatyny II do tej pory wykazano u *Solanum tuberosum* (12).

Doniesienia o genetycznej transformacji ogórka dotyczą zarówno bezpośredniego wprowadzania obcego DNA do protoplastów lub fragmentów tkanek (mikrowstrzeliwanie, elektroporacja), jak też za pośrednictwem *Agrobacterium*. Trzy z nich dotyczyły uzyskania transgenicznych roślin o nowych interesujących cechach użytkowych, wskutek wprowadzenia do ich genomu genu białka otoczki wirusa CMV oraz genów kodujących enzymy o działaniu przeciwgrzybowym (13-15).

2. Wyniki badań nad transformacją *Cucumis sativus* L.

Do wszystkich doświadczeń zastosowano jeden genotyp — linię wsobną z odmiany Borszczagowski. Eksplantaty pobierano z roślin uprawianych w kulturze *in vitro* (3). Do transformacji ogórka posłużyły następujące wektory binarne: [1] pBI121, [2] pPCV6NFHGusInt oraz [3] pRUR528s (rys. 1), pochodna plazmidu pROK2 (16).

2.1. Bezwektorowa transfekcja fragmentów liści i protoplastów

W badaniach podjęto próbę określenia optymalnych warunków elektroporacji protoplastów, uzyskanych z płynnej kultury merystemów pędowych (2). Przy wykorzystaniu tej metody i wektora pBI 121 wprowadzono do pro-

toplastów ogórka gen kodujący β -glukuronidazę (GUS) pod kontrolą promotora 35S CaMV (4). Określono parametry elektryczne pozwalające na uzyskanie najwyższych poziomów ekspresji przejściowej GUS. Wysokie poziomy ekspresji przejściowej białka reporterowego uzyskiwano w przypadku stosowania, w 10-sekundowych odstępach, trzech impulsów elektrycznych o napięciu wyjściowym: 250 V - 350 V, powstałych w wyniku rozładowania kondensatora o pojemności 140 μ F. Ważne było stężenie roztworu plazmidowego DNA (50-70 μ g/l) i równoczesne dodanie 50 μ g/l nośnikowego eukariotycznego DNA. Poziom ekspresji przejściowej genu β -glukuronidazy mierzono metodą spektrofluorymetryczną (17), po 24 godzinach od zabiegu elektroporacji. System transformacji bezwektorowej w połączeniu z wydajnym systemem bezpośredniej regeneracji roślin z protoplastów, jak się wydaje, może być zastosowany do uzyskiwania transgenicznych roślin tego gatunku. Omawiany system regeneracji jest jednak obciążony znaczną zmiennością protokolonalną (18).

Inne badania dotyczyły optymalizacji warunków promujących transfekcję fragmentów liści ogórka przy wykorzystaniu mikrowstrzeliwania i kasyety ekspresyjnej zawierającą gen markerowy *hpt* II oraz gen reporterowy *uid* A (5). Zastosowano linearyzowane DNA plazmidu pPCV6NFHGusInt (C. Koncz, Max-Planck Institut) i mikronośniki wolframowe, uzyskując genetycznie transformowane tkanki nie wykazujące zdolności do morfogenezy. Obecność w nich aktywnej β -glukuronidazy potwierdzono po 48 godzinach, za pomocą barwienia histochemicznego. Otrzymane zarodki somatyczne nie wykazywały ekspresji genu reporterowego i nie ulegały konwersji u rośliny.

2.2. Transformacja za pośrednictwem *Agrobacterium*

Z dobrym skutkiem zastosowaliśmy metodę wprowadzania obcych genów za pośrednictwem *A. tumefaciens*. Najpierw określono czynniki istotnie wpływające na wydajność transformacji krążków liściowych *C. sativus* nierozbrojonym wektorem plazmidowym pTiB6S3 (19), za pośrednictwem oktopinowego szczepu *A. tumefaciens* B6S3. Zawiesinę komórek szczepu B6S3 przygotowano w zmodyfikowanej pożywce 1/2 MS, zawierającej 1/2 makroelementów, mikroelementy i witaminy wg Murashige i Skooga (20). Takie postępowanie miało wpływ na kondycję eksplantatu po transformacji. Do kultury tkanek roślinnych zastosowano pożywki o analogicznym składzie, ewentualnie uzupełnione regulatorami wzrostu (0,8 mg/l 2,4-D i 0,4 mg/l 2iP). Innym ważnym czynnikiem było stężenie bakteriostatyków podczas selekcji transformantów (500 mg/l Carbenicyllin i 300 mg/l Cefatoxime) (21). W optymalnych warunkach wydajność transformacji, wyrażona stosunkiem liczby eksplantatów tworzących kalus w nieobecności hormonalnych regulatorów wzrostu do liczby zakazanych eksplantatów, osiągnęła 18%. Wyniki transformacji za pośrednictwem szczepu *A. tumefaciens* B6S3 potwierdzone zostały metodą hybrydyzacji całkowitego DNA kalusa przy zastosowaniu sondy (fragment DNA o długości 7500 pz) odpowiadającej wprowadzonemu fragmentowi DNA bakteryjnego. Za pomocą konstrukcji kasyety ekspresyjnej zawierającego cDNA genu taumatyny



A



B



C



D

Fot. 1. Porównanie reakcji eksplantatów liściowych roślin ogórka po 6 tygodniach kultury. A — roślina nietransformowana, pożywka bez kanamycyny; B — roślina nietransformowana, pożywka z kanamycyną; C — transgeniczna roślina 209, pożywka bez kanamycyny; D — transgeniczna roślina 209, pożywka z kanamycyną.



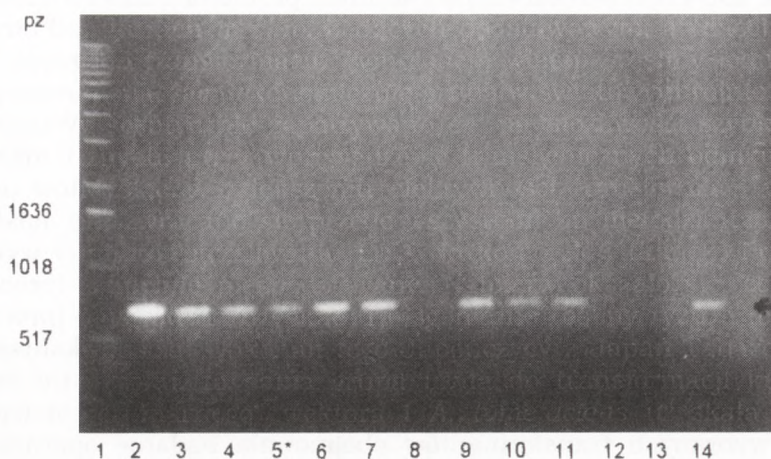
II (A. Pałucha, IBB PAN, Warszawa) pod kontrolą promotora 35S RNA z wirusa mozaiki kalafiora (35S CaMV) (rys. 1) zapoczątkowaliśmy prace nad otrzymaniem roślin ogórka zawierających transgeny o znaczeniu użytkowym. Ustalono czynniki decydujące o wydajnej regeneracji roślin po transformacji tym konstruktem genowym za pośrednictwem *A. tumefaciens* (22). Wśród nich wyróżniono: 1) poziom regulatorów wzrostu (1 mg/l 2,4-D oraz 1 mg/l 2iP) na etapie wstępnej kultury eksplantatów i selekcji transformantów oraz 2) zastosowanie selekcji dwustopniowej (100 mg/l kanamycyny, a następnie 150 mg/l). W wyniku przeprowadzonych dwóch doświadczeń, przy wykorzystaniu selekcji dwustopniowej i bezpośredniej regeneracji roślin (procedura I), selekcji jednostopniowej i regeneracji roślin poprzez fazę kalusa (procedura II A) oraz selekcji dwustopniowej i regeneracji roślin poprzez fazę kalusa (procedura II B) otrzymano szereg transgeniczných roślin (tab. 1). Do kultury tkanek i roślin zastosowano pożywki opracowane przez Burzę i Malepszego (1). Analiza wybranych transformantów obejmowała badanie oporności na kanamycynę oraz analizę hybrydyzacyjną całkowitego DNA, w celu potwierdzenia integracji obu transgenów oraz badanie obecności transkryptu genu taumatyny II przy wykorzystaniu hybrydyzacji typu Northern. U większości przebadanych transformantów (29/31) potwierdzono występowanie aktywnego genu *npt II*. Na pożywce z kanamycyną (100 mg/l) fragmenty liści tworzyły kalus tak intensywnie, jak przy braku antybiotyku (fot. 1 i 2).

TABELA 1

PORÓWNANIE TRZECH PROCEDUR TRANSFORMACJI FRAGMENTÓW LIŚCI OGÓRKA
KONSTRUKTEM GENOWYM ZAWIERAJĄCYM cDNA GENU TAUMATYNY II I REGENERACJI ROŚLIN

Procedura transformacji i regeneracji	Liczba zakażanych eksplantatów	Liczba (%) eksplantatów, z których zregenerowano rośliny	Liczba zregenerowanych roślin
I	138	1 (0,7)	1
II A	229	3 (1,3)	11
II B	206	8 (3,9)	30

Wyniki doświadczeń, w których integrację genu *npt II* do genomu ogórka potwierdzono przy wykorzystaniu techniki PCR przedstawiono na fotografii 2. Standardową ilość (100 ng) genomowego DNA liści roślin transformowanych, izolowanego metodą Dellaporta i in. (23), poddano amplifikacji przez 30 cykli (94/60/72°C), przy użyciu pary specyficznych starterów, których sekwencje nukleotydowe — NP1: 5' gaggtattcggetatgactg 3' i NP2: 5' atcgggagcggcgataccgta 3' w pełni pokrywały się z opublikowanymi przez E. Becka i in. (24). U większości przebadanych roślin (9/11) zidentyfikowano fragment o długości 700 pz, swoisty dla genu *npt II*. Natomiast, integrację cDNA genu taumatyny II do genomu ogórka potwierdzono metodą hybrydyzacji według Southerna. Kolejnym etapem analizy molekularnej transgeniczných roślin ogórka było wykazanie ekspresji genu taumatyny II na poziomie



Fot. 2. Produkty amplifikacji fragmentu genu *npt II* (700 pz) z genomu roślin transformowanych wektorem pRUR 528s (ścieżki: 2-12); z genomu rośliny nietransformowanej (ścieżka 13) i z DNA wektora pRUR 528s (ścieżka 14); ścieżka 5* — roślina 209; 1 kpz ladder firmy Gibco — BRL (ścieżka 1).

RNA. Zastosowano całkowite RNA izolowane z młodych liści roślin uprawianych w szklarni, a w przypadku jednej rośliny, RNA izolowano z owocu (25). Prawie wszystkie z analizowanych roślin (10/11) zawierały mRNA taumatyny II, ale poziom ekspresji wprowadzonego transgeny w poszczególnych roślinach był zróżnicowany. Sugeruje się, że na poziom ekspresji transgeny wpływa miejsce jego integracji (26).

Należy stwierdzić, że uzyskane wyniki potwierdzają przydatność *Agrobacterium* jako wektora do transformacji ogórka i kanamycyny jako markera selekcyjnego, przeciwnie do genetyczyny. We wcześniejszych doświadczeniach wykonanych na fragmentach liści ogórka i z wykorzystaniem genetyczyny dowiedziono negatywnego wpływu selekcji z użyciem tego antybiotyku na morfogenezę materiału roślinnego transformowanego za pośrednictwem *A. tumefaciens* (27). Wyjaśnienia wymaga także przydatność higromycyny jako markera selekcyjnego dla metody transformacji wykorzystującej technikę mikrowstrzeliwania.

3. Podsumowanie

Z przebadanych sposobów transformacji, tylko w przypadku wektorowej transformacji i kanamycyny jako markera selekcyjnego uzyskano wiele płodnych transgenicznych roślin ogórka, zawierających gen taumatyny II. Rośliny T_0 różniły się nieznacznie morfologią i przebiegiem rozwoju. Dla wybranych roślin przeprowadzono analizę hybrydacyjną typu Northern i wykazano,

u prawie wszystkich obecność mRNA taumatyny II, ale poziom ekspresji był zróżnicowany.

Wykaz stosowanych skrótów:

2,4-D - kwas 2,4-dichlorofenoksyoctowy, 2iP - 6-(γ , γ -dimetyloalliloamino)puryna

Literatura

1. Burza W., Malepszy S., (1995), *Plant Breed.*, 114, 341-345.
2. Wróblewski T., Malepszy S., (1992), *Proceedings-Fifth EUCARPIA Cucurbitaceae Symposium* (July 27-31), Skierniewice, Poland, 104-107.
3. Malepszy S., (1988), *Biotechnology in Agriculture and Forestry*. vol. 6. Crops II (Ed. Bajaj Y. P. S.), Springer-Verlag, Berlin-Hedelberg, 227-293.
4. Burza W., Wochniak P., Wróblewski T., Malepszy S., (1995), *J. Appl. Genet.*, 36, 1-10.
5. Czarnak M., Burza W., Filipecki M., Rakoczy-Trojanowska M., (1996), *J. Appl. Genet.*, 36A, 110-1113.
6. van der Wel H., Loeve K., (1972), *Eur. J. Biochem.*, 3, 221-225.
7. Edens L., Heslinga L., Klok R., Ledeboer A. M., Maat J., Toonen M.Y., Visser Ch., Verrips C. T., (1982), *Gene*, 18, 1-12.
8. Cornelissen B. J. C., Hooft van Huijsduijnen R. A. M., Bol J. F., (1986), *Nature*, 321, 531-532.
9. Woloshuk C. P., Meulenhoff J. S., Sela-Buulage M., van den Elzen P. J. M., Cornelissen B. J. C., (1991), *Plant Cell*, 3, 619-628.
10. Singh N. K., Handa A. K., Hasegawa P. M., Bressan R. A., (1985), *Plant Physiol.*, 79, 126-137.
11. Rodrigo I., Vera P., Frank R., Conejero V., (1991), *Plant Mol. Biol.*, 16, 931-934.
12. Witty M., (1992), *Methods Enzymol.*, 216, 441-447.
13. Chee P. P., Slightom J. L., (1991), *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 116, 1098-1102.
14. Nishibayashi S., Kaneko H., Hayakowa T., (1996), *Plant Cell Reps.*, 15, 809-814.
15. Raharjo S. H. T., Hernandez M. O., Zhang Y. Y., Punja Z. K., (1996), *Plant Cell Reps.*, 15, 591-596.
16. Hilder V. A., Gatehouse A. M. R., Sheerman S. E., Barker R. F., Boulter D., (1987), *Nature*, 300, 160-163.
17. Jefferson R. A., (1987), *Plant Mol. Biol. Reporter*, 5, 387-405.
18. Pląder W., Malepszy S., Burza W., Rusinowski Z., (1997), *Euphytica*, (w druku).
19. de Vos G., de Beuckeleer M., van Montagu M., Schell J., (1981), *Plasmid*, 6, 249-253.
20. Murashige T., Skoog F., (1962), *Physiologiae Plantarum*, 15, 473-497.
21. Szwacka M., Mosieniak G., (1994), *XXX Zjazd PTBioch.*, Szczecin, 182.
22. Szwacka M., Morawski M., Burza W., (1996), *J. Appl. Genet.*, 37A, 126-129.
23. Dellaporta S. L., Wood J., Hicks J. B., (1983), *Plant Mol. Biol. Rep.*, 1, 19-23.
24. Beck E., Ludwig G., Averswald E. A., Reiss B., Schaller H., (1982), *Gene*, 19, 327-336.
25. Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T., (1989), *Molecular Cloning. A Laboratory Manual.*, vol. 1.
26. Prols F., Meyer P., (1992), *Plant J.*, 465-475.
27. Szwacka M., Pałucha A., Malepszy S., (1995), *J. Appl. Genet.*, 36A, 58.

Fragment DNA zawierający cDNA genu taumatyny II został udostępniony przez dr A.M. Ledeboera (Unilever Research Laboratorium, Vlaardingien, The Netherlands).

Badania częściowo finansowane w ramach grantu KBN Nr 227/P06/96/11.

Transformation of cucumber *Cucumis sativus* L.

Summary

Different transformation methods were investigated. However a lot of fertile plants were obtained only in the case of *A. tumefaciens* and thaumatin with kanamycin as a selective marker. Small differences in the plant morphology and development were observed in T_0 generation. Most of the plants showed the presence of the transgene but the level of mRNA was different.

Key words:

cucumber, transformation, thaumatin, transgenic plants.

Adres do korespondencji:

Maria Szwacka, Katedra Genetyki Hodowli i Biotechnologii Roślin, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego, ul. Nowoursynowska 166, 02-787 Warszawa.