Anna Olejnik
Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, Studium Doktoranckie Wydziału Biologii

Wpływ warunków fizycznych i chemicznych kokultywacji *Agrobacterium tumefaciens* z eksplantatami *Brassica napus* na integrację T-DNA z DNA biorcy*

Influence of physical and chemical factors of co-cultivation *Agrobacterium tumefaciens* with *Brassica napus* explants on T-DNA integration

Słowa kluczowe: *Brassica napus, Agrobacterium tumefaciens*, transformacja genetyczna, kokultywacja

Badania nad transformacją rzepaku metodą *Agrobacterium tumefaciens* prowadzą do ciągłego udoskonalania tej techniki, a co za tym idzie, zwiększenia jej wydajności. Kokultywacja to etap transformacji bezpośrednio odpowiedzialny za jej wynik, zachodzi w nim bowiem transfer i wbudowanie transgenu do genomu rośliny. Niniejsza praca prezentuje zestawienie współczesnych badań nad transformacją rzepaku, ze szczególnym uwzględnieniem warunków fizykochemicznych etapu kokultywacji, takich jak: temperatura, czas oraz dodatki substancji wspomagających. Ukazano również, że oprócz wymienionych parametrów w kokultywacji należy wziąć pod uwagę typ eksplantatu, genotyp rośliny oraz szczep *Agrobacterium*.

Key words: *Brassica napus*, *Agrobacterium tumefaciens*, genetic transformation, co-cultivation

Studies of canola transformations via *Agrobacterium tumefaciens* lead to the advancement of this technique. Co-cultivation is directly responsible for results of transformation. It is a stage of transfer and integration of transgene into a plant genome. This paper reviews some results of contemporary research about canola transformation with particular attention paid to physical and chemical conditions of co-cultivation: temperature, time and added chemicals. This comparison has shown that besides those parameters, an important role in co-cultivation is also played by the type of explant, genotype of plant and *Agrobacterium* strain..

Agrobacterium tumefaciens — narzędzie transformacji

Transformacja przy użyciu *Agrobacterium tumefaciens* jest metodą powszechnie stosowaną do uzyskiwania rzepaku transgenicznego. Do najczęściej wprowadzanych cech użytkowych należą: odporność na herbicydy, wirusy, grzyby, insekty, czynniki środowiskowe, takie jak: susza, zasolenie, a także zmiany w składzie

* The financial support within the project PBZ-MNiSW 2/3/2006

kwasów tłuszczowych i białek w nasionach (Kahrizi i in. 2007, Senior i Bavage 2003, Wang i in. 2005). Metoda ta jest również stosowana do transgenezy dla potrzeb badawczych. Poznaje się w ten sposób np. procesy biologiczne, takie jak funkcjonowanie systemu glukozynolany — mirozynaza (Troczyńska i in. 2003, 2006).

Dzięki naturalnemu plazmidowi bakteryjnemu pTi (ang. *Tumor inducing plasmid*), komórki *Agrobacterium tumefaciens* mają zdolność przenoszenia fragmentu DNA (T-DNA) i jego integracji z genomem roślinnym (Poulsen 1998).

Pierwszym etapem doświadczenia z wykorzystaniem transformacji za pośrednictwem *Agrobacterium tumefaciens* jest wprowadzenie wektora do komórek bakterii. Następnie w skoordynowany sposób jest prowadzony etap hodowli bakterii oraz przygotowania eksplantatów roślin – biorców. Podczas właściwego procesu transformacji następuje inokulacja oraz kokultywacja odpowiednich eksplantatów. W kolejnym etapie odbywa się regeneracja roślin oraz ich selekcja. Istotą całego procesu transformacji jest bowiem wprowadzenie obcego genu do komórki roślinnej, a następnie zregenerowanie kompletnych roślin transgenicznych, czyli zmienionych genetycznie.

Transfer genów z komórek *Agrobacterium* do komórek roślinnych przebiega od adhezji komórek bakterii do komórek roślinnych, poprzez indukcję genów *vir*, po przeniesienie T-DNA i jego integrację z genomem roślinnym (de la Riva i in. 1998, Ziemienowicz 2002). Odbywa się to podczas kokultywacji. Jest to etap współhodowli, w warunkach in vitro, tkanek roślinnych poddawanych transformacji z komórkami bakterii, zawierającymi wektor z wprowadzanym genem.

Trudność etapu kokultywacji polega na konieczności utrzymania zdolności tkanek roślinnych do regeneracji, przy jednoczesnym stworzeniu odpowiednich warunków do rozwoju *Agrobacterium* i integracji T-DNA z genomem roślinnym.

Przeniesienie fragmentu T-DNA do komórki roślinnej

Transfer T-DNA jest kontrolowany przez 30–40kb region vir plazmidu Ti, który obejmuje 6 podstawowych operonów: virA, virB, virC, virD, virE, virG oraz dodatkowe: virF i virH (de la Riva i in. 1998). Aktywacja genów wirulencji odbywa się przy obniżonym pH, w obecności związków fenolowych (np. acetosyringon) i monosacharydów pochodzących ze zranionej tkanki roślinnej (Gelvin 2003, de la Riva i in. 1998, Ziemienowicz 2002). Geny vir mogą być też stymulowane przez opiny oraz aminokwasy (Ziemienowicz 2001). Pod wpływem tych czynników transmembranowe białko receptorowe VirA ulega autofosforylacji (de la Riva i in. 1998, Ziemienowicz 2002). Aktywowane VirA fosforyluje, kolejne w kaskadzie przekazywania sygnału, cytoplazmatyczne białko VirG, wiążące DNA (de la Riva i in. 1998, Ziemienowicz 2001, 2002). VirG działa jako czynnik regulacji transkrypcji i dzięki aktywacji prowadzi do ekspresji pozostałych genów z grupy *vir*

oraz genów chromosomalnych *chv* odpowiadających za adhezję komórek bakterii do komórek rośliny (de la Riva i in. 1998, Ziemienowicz 2002).

Pozostałe białka kodowane przez geny wirulencji odpowiadają za wycięcie T-DNA z plazmidu i jego transfer do jądra komórki roślinnej. Białka VirD1 i VirD2 odpowiadają za wycięcie T-DNA. VirD2 do rozpoznania sekwencji granicznych regionu T-DNA potrzebuje obecności białka VirD1 (de la Riva i in. 1998, Ziemienowicz 2001, 2002). Po uwolnieniu koniec 5' nici T-DNA wiązany jest przez VirD2, a następnie jednoniciowy T-DNA w kompleksie z VirE2 stabilizowany jest przez białko VirE2 wiążące jednoniciowy DNA (de la Riva i in. 1998, Ziemienowicz 2001). Opłaszczony T-DNA jest transportowany do komórki roślinnej przez kanał zbudowany przez białka VirB1 do VirB11 oraz VirD4 (Ziemienowicz 2001). VirE2, oprócz stabilizacji, chroni T-DNA przed działaniem enzymów nukleolitycznych wewnątrz komórki roślinnej. Zarówno VirD2, jak i VirE2 posiadają sekwencje NLS (ang. *nuclear localization signal*), rozpoznawane przez importyny jądrowe komórki roślinnej (Ziemienowicz 2002). W ten sposób, przy pomocy białek transportowych komórki roślinnej T-DNA zostaje dostarczone do jądra. Transgen zostaje włączony do genomu rośliny na drodze rekombinacji nieuprawnionej (Ziemienowicz 2002). Geny przenoszone przez fragment T-DNA ulegają najczęściej ekspresji.

Warunki kokultywacji

W analizowanych pracach dotyczących rzepaku stosowano różne warunki kokultywacji komórek *Agrobacterium tumefaciens* z eksplantatami. Podstawowymi zmiennymi były: czas, temperatura oraz związki chemiczne dodawane do pożywki (tab. 1).

Temperatura kokultywacji

Białko VirA, stanowiące czujnik obecności substancji powstałych w trakcie zranienia tkanki roślinnej, poprzez swoją budowę jest podatne na zmiany konformacyjne pod wpływem temperatury. Z dostępnych informacji wynika, że w temperaturze powyżej 32ºC staje się ono niezdolne do aktywacji (Salas i in. 2001).

W doświadczeniach nad transformacją tytoniu, analizowano efektywność transformacji w zależności od temperatury. Spośród badanych temperatur: 15, 19, 25 i 32ºC, w dwóch skrajnych nie doszło do transformacji, gdyż nie stwierdzono integracji T-DNA z genomem roślinnym. Najwięcej transgenicznych roślin uzyskano po kokultywacji w temperaturze 19 i 25ºC. Temperatura 25ºC wydaje się być optymalna dla integracji T-DNA z DNA roślinnym (Salas i in. 2001).

W pracach nad transformacją rzepaku często stosuje się temperaturę pokojową kokultywacji. W 7 z 12 analizowanych doświadczeń znalazły się informacje na temat stosowanej temperatury. Podane wartości: 22, 24, 25 i 26ºC potwierdzają wyniki badań nad transformacją tytoniu.

Tabela 1

Warunki kokultywacji stosowane we współczesnych badaniach nad transformacją *Brassica napus*
Co-cultivation conditions in contemporary research of Brassica napus transformation

Materiał roślinny *Plant material*	Eksplantat *Explant*	Szczep *A. tumefaciens*/wektor *A. tumefaciens strain/plasmid*	Kokultywacja *Co-cultivation*		Dodatki chemiczne *Chemicals*	Wynik transformacji *Transformation result*	Literatura *Reference*
			temp. *temp.* [°C]	czas *time* [h]			
Odmiany: Sarow-4, Masrri L-11, Masrri L-16, Semu-304, Semu-249	fragmenty hypokotyli (0,5 cm)	LBA4404/pBI121		72	acetosyringon 100 µM	27–31%	Morghaieb i in. 2006
Linia wsobna: Jinyou	fragmenty hypokotyli (1–1,5 cm)	LBA4404/ /pBI101-Bmk-chi	25	48		39 z 675	Wang i in. 2005a
Odmiana: Westar	fragmenty hypokotyli (1 cm)	GV3850/mGFP-ER GV3850/eGFP		24, 48, 72	acetosyringon 0,05 mM	4–25%	Cardoza, Stewart 2003
Linia syntetyczna: RS 306	fragmenty hypokotyli (5–7 mm)	GV3101/pMP90RK ATHV/C58C1		72		0–20%	Sonntag 2007
Odmiany: PF, K16, Maplus	fragmenty hypokotyli (1 cm), liścienie	C58/pCV3101 LBA4404/pBI121		48		7–30%	Zebarjadi i in. 2007
Odmiany: PF 7045/91, SLM 046	fragmenty hypokotyli, liścienie 5-dniowych siewek	EHA101/PBI121 LBA4404/PBI121	25	48	glukoza 1%	6,5–13,3%	Jonoubi i in. 2003
Odmiana: Westar	liścienie 4-dniowych siewek	LBA4404/pKitGluk:1	t.p.	24-48		6 z b.d.	Melander i in. 2006
Odmiana: Westar	liścienie 7-dniowych siewek	LBA4404/pHZX1	24	48	acetosyringon 200 µM	64 z b.d.	Zhang i in. 2001
Linia: 9412	liścienie 8-dniowych siewek	LBA4404/pYP46	22	72	acetosyringon 100 mM	103 z 300	Peng i in. 2006
Odmiana: Maplus	protoplasty	b.d./pNK55-Resyn	26	24, 48, 72		3 z 12*	Wang i in. 2005b
Odmiana: Maplus linia DH O-120	zarodki mikrosporowe	LBA4404/pKGIB EHA105/pKGIB	24	48		0,5–4%	Cegielska-Taras i in. 2008
Linie DH: O-120, GR-64	zarodki mikrosporowe	GV3101/pTGG1 GV3101/pTGG2	24	48		0,7–1,3%	Troczyńska i in. 2006

t.p. — temperatura pokojowa, b.d. — brak danych, * — w stosunku do zregenerowanych pędów

Czas kokultywacji

W doświadczeniu nad transformacją rzepaku, w którym porównywano różne czasy kokultywacji, najlepsze efekty osiągnięto po 48 godzinach. Zwiększona efektywność dotyczyła obydwu wprowadzanych genów i wynosiła kolejno: 25% dla eGFP i 17% dla mGFP5-ER. Wydłużenie czasu kokultywacji prowadziło do zdecydowanego obniżenia liczby uzyskanych transformantów (Cardoza, Stewart 2003).

Istotność długości okresu kokultywacji potwierdzają wyniki doświadczeń nad transformacją protoplastów rzepaku. Czas 24 godzin jest prawdopodobnie niewystarczający dla transformacji protoplastów, natomiast kokultywacja trwająca 72 godziny może powodować ich obumieranie. Rośliny uzyskano jedynie z protoplastów po kokultywacji trwającej 48 godzin (Wang i in. 2005).

Okres 48 godzin kokultywacji jest najczęściej odpowiedni dla tego etapu w przypadku transformowania fragmentów hypokotyli, liścieni lub zarodków mikrosporowych. Niekiedy jednak stosowana jest też z powodzeniem 72-godzinna kokultywacja (tab. 1).

Dodatki chemiczne

Substancje, dla których receptorem jest białko VirA, mogą wspomagać proces transformacji poprzez wydajną aktywację tego białka.

W 4 z 12 analizowanych badań stosowano dodatek w postaci acetosyringonu, natomiast w jednym doświadczeniu użyto 1% glukozy.

Podsumowanie

Brassica napus L. jako roślina dwuliścienna dobrze poddaje się transformacji za pomocą *Agrobacterium tumefaciens*. Prowadzone badania nad transformacją dla celów hodowlanych idą w kierunku ciągłego ulepszania tej metody, a przez to zwiększania jej efektywności. Dobranie odpowiednich warunków fizycznych i chemicznych kokultywacji, jako etapu kluczowego dla przenoszenia T-DNA do genomu rośliny, pozwala na znaczne podniesienie skuteczności transformacji. Ponieważ jest to etap współhodowli, należy wziąć pod uwagę również rodzaj eksplantatu, genotyp rośliny, a także stosowany szczep *Agrobacterium,* czego dowodem są przedstawione powyżej badania.

Literatura

Cardoza V., Stewart C.N. 2003. Increased *Agrobacterium*-mediated transformation and rooting efficiencies in canola (*Brassica napus* L.) from hypocotyl segment explants. Plant Cell Rep., 21: 599-604.

Cegielska-Taras T., Pniewski T., Szała L. 2008. Transformation of microspore-derived embryos of winter oilseed rape (*Brassica napus* L.) by using *Agrobacterium tumefaciens*. J. Appl. Genet., 49 (4): 343-347.

Gelvin S.B. 2003. *Agrobacterium*-Mediated Plant Transformation: the Biology behind the "Gene-Jockeying" Tool. Microbiology and Molecular Biology Reviews, Mar.: 16-37.

Jonoubi P., Mousavi A., Majd A., Jalali-Javaran M., Daneshian J., Salmanian A.H. 2003. *Agrobacterium*-mediated Transformation and Regeneration of Fertile Transgenic Plants of Rapeseed (*Brassica napus* L.). Proc. of the 11th Rapeseed Congress, Copenhagen, 1: 144-146.

Kahrizi D., Salmanian A.H., Afshari A., Moieni A., Mousavi A. 2007. Simultaneous substitution of Gly96 to Ala and Ala183 to Thr in 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase gene of *E. coli* (k12) and transformation of rapeseed (*Brassica napus* L.) in order to make tolerance to glyphosate. Plant Cell Rep., 26: 95-104.

Melander M., Kamnert I., Happstadius I., Liljeroth E., Bryngelsson T. 2006. Stability of transgene integration and expression in subsequent generations of doubled haploid oilseed rape transformed with chitinase and ß-1,3-glucanase genes in a double-gene construct. Plant Cell Rep, 25: 942-952.

Moghaieb R.E.A., El-Awady M.A., El Mergawy R.G., Youssef S.S., El-Sharkawy A.M. 2006. A reproducible protocol for regeneration and transformation in canola (*Brassica napus* L.). African Journal of Biotechnology, Vol. 5 (2): 143-148.

Peng R.-H., Yao Q.-H., Xiong A.-S., Cheng Z.-M., Li Y. 2006. Codon-modifications and an endoplasmic reticulum-targeting sequence additively enhance expression of an *Aspergillus* phytase gene in transgenic canola. Plant Cell Rep., 25: 124-132.

Poulsen G.B. 1996. Genetic transformation of *Brassica*. Plant Breeding, 115: 209-225.

de la Riva G.A., González-Cabrera J., Vázquez-Padrón R., Ayra-Pardo C. 1998. *Agrobacterium tumefaciens*: a natural tool for plant transformation. Electronic Journal of Biotechnology, 1: 3.

Salas M.G., Park S.H., Srivatanakul M., Smith R.H. 2001. Temperature influence on stable T-DNA integration in plant cells. Plant Cell Rep., 20: 701-705.

Senior I.J., Bavage A.D. 2003. Comparison of genetically modified and conventionally derived herbicide tolerance in oilseed rape: A case study. Euphytica, 132: 217-226.

Sonntag K. 2007. Genotype and procedure dependence of *Agrobacterium*-mediated transformation of *Brassica napus*. Proc. of the 12th International Rapeseed Congres, Wuhan, China, Vol. II: 276-278.

Troczyńska J., Drozdowska L., Cegielska-Taras T. 2003. Transformation of microspore-derived embryos to study the myrosinase-glucosinolate system in *Brassica napus* L. Proc. of the 11th Rapeseed Congres, Copenhagen, Denmark, 1: 175-177.

Troczyńska J., Drozdowska L., Cegielska-Taras T. 2006. Wykorzystanie zarodków mikrosporowych rzepaku ozimego do modyfikacji aktywności myrozynazy *in planta*. Rozprawy i Monografie IGR PAN „Haploidy i linie podwojonych haploidów w genetyce i hodowli roślin", 6: 139-150.

Wang J., Chen Z., Du J., Sun Y., Liang A. 2005a. Novel insect resistance in *Brassica napus* developed by transformation of chitinase and scorpion toxin genes. Plant Cell Rep., 24: 549-555.

Wang Y.P., Sonntag K., Rudloff E., Han J. 2005b. Production of fertile transgenic *Brassica napus* by *Agrobacterium*-mediated transformation of protoplasts. Plant Breeding, 124: 1-4.

Zebarjadi A., Jalali-Javaran M., Salmanian A.H., Karimzadeh G. 2007. *Brassica napus* plant regeneration and transformation via *agrobacterium*-mediated-transformation. Proc. of the 12th International Rapeseed Congres, Wuhan, China, Vol. II: 9-11.

Zhang H.-X., Hodson J.N., Williams J.P., Blumwald E. 2001. Engineering salt-tolerant *Brassica* plants: Characterization of yield and seed oil quality in transgenic plants with increased vacuolar sodium accumulation. Proc. of the National Academy of Sciences of the United States of America, 98, 22: 12832-12836.

Ziemienowicz A. 2001. Odyssey of *Agrobacterium* T-DNA. Acta Biochimica Polonica, 48, 3: 623-635.

Ziemienowicz A. 2002. Transfer plazmidów między bakteriami a komórkami eukariotycznymi. Kosmos, 51, 3: 343-351.