

Hodowla i genetyka

ZIEMNIAKI MODYFIKOWANE GENETYCZNIE ODPORNE NA *PHYTOPHTHORA INFESTANS*

mgr inż. Iga Tomczyńska

IHAR – PIB, Zakład Genetyki i Materiałów Wyjściowych Ziemniaka, ul. Platanowa 19
05-831 Młochów, e-mail: i.tomczynska@ihar.edu.pl

Mimo że główne zainteresowanie hodowców skupia się na uzyskaniu ziemniaków o ulepszonych cechach agronomicznych i jakościowych, takich jak wysokość plonu czy dobry smak, to największym wyzwaniem wciąż pozostaje otrzymanie odmian o trwałej i wysokiej odporności na *Phytophthora infestans*. Uprawa takich odmian ograniczyłaby koszty ochrony chemicznej oraz straty plonu, jakie powoduje zaraza ziemniaka, a które szacuje się na ponad miliard euro w skali Unii Europejskiej (Haverkort i in. 2008). Jest to jednak założenie teoretyczne. O złożoności tego zagadnienia może świadczyć fakt, że pierwszych obserwacji symptomów chorobowych dokona-

no 167 lat temu, a wysiłki nad stworzeniem odmiany o trwałej i wysokiej odporności na ten patogen trwają do dziś. Celem niniejszego opracowania jest przedstawienie dzisiejszego stanu badań nad uzyskaniem modyfikowanych genetycznie ziemniaków odpornych na *P. infestans*.

Tradycyjna hodowla odpornościowa jest czasochłonna, a uzyskanie odmiany o trwałej i wysokiej odporności nie jest prostym procesem. Źródłem odporności na *P. infestans* są dzikie, południowoamerykańskie gatunki ziemniaka, które wprawdzie nie ulegają porażeniu, ale nie posiadają również korzystnych cech agronomicznych. Wykorzystanie dzikich form ziemniaka w hodowli

może być równoznaczne z wprowadzeniem niekorzystnych cech, takich jak drobne bulwy lub wysoka zawartość glikoalkaloidów. Ograniczeniem w postępie hodowlanym wynikającym z wykorzystania dzikich form *Solanum* jest sprzężenie korzystnych cech z niepożądanymi (Zimnoch-Guzowska, Gołębiewska 2011), a także bariera krzyżowalności spowodowana brakiem kompatybilności bielma lub różną ploidalnością (liczbą garniturów chromosomowych w komórce).

Przykładem może być cykl hodowlany, który doprowadził do uzyskania odmiany Bionica. Odporność odmiany Bionica pochodzi z dzikiego gatunku *S. bulbocastanum*. Gatunek ten nie krzyżuje się bezpośrednio z ziemniakiem uprawnym, dlatego też konieczne było przeprowadzenie serii krzyżowań pomostowych między gatunkami *S. acaule*, *S. bulbocastanum*, *S. phureja* i *S. tuberosum*. Krzyżowanie pomostowe umożliwia ominięcie bariery krzyżowalności i polega na wprowadzeniu do cyklu hodowlanego takich gatunków, które będą w stanie krzyżować się zarówno z donorem pożądanых cech, jak i ich biorcą. Krzyżowania przeprowadzono w latach 60. XX w., a rejestracja odmiany nastąpiła w roku 2008. Aby uzyskać odmianę Bionica, konieczne było krzyżowanie materiałów przez pięć pokoleń (Lammerts van Bueren i in. 2008, potato pedigree database). Jej odporność na *P. infestans* jest determinowana pojedynczym genem *Rpi-blb2* (Haverkort i in. 2009), jednak Bionica posiada również inne geny pochodzące z *S. bulbocastanum*, niezaangażowane w warunkowanie odporności na zarazę ziemniaka.

W porównaniu z tradycyjną hodowlą, gdzie problem stanowi sprzężenie cech pożądanых z niepożądanymi, transformacja genetyczna jest szybką i efektywną techniką i może posłużyć do wprowadzania wyłącznie wybranych genów odporności do już istniejących odmian komercyjnych. Aby było to możliwe, gen musi być sklonowany, tzn. wyizolowany z genomu tak, by można było go namnażać. Roślina zyskuje wyłącznie cechy warunkowane przez ten gen, a problem sprzężenia pożądanей cechy z cechami niekorzystnymi zostaje wyeliminowany (Halterman i in. 2008). Gen odporności na zarazę ziemniaka *Rpi-blb2* został sklonowany (van

der Vossen i in. 2005). Obecnie jest możliwe wprowadzenie go do rośliny bez jednoczesnego wprowadzania genów warunkujących cechy, które z punktu widzenia hodowcy są niepożądane.

Transfer genów odbywa się za pomocą mikrowstrzeliwania lub wektorowej metody z udziałem bakterii *Agrobacterium* sp. Mikrowstrzeliwanie przeprowadza się za pomocą specjalnego działka, którym „bombarduje się” tkankę rośliny biorcy pociskami z wolframu lub złota opłaszczonymi DNA transgenem. Pociski umożliwiają wprowadzenie DNA w obszar jądra komórkowego, gdzie następuje włączenie go do genomu biorcy.

Druga metoda opiera się na użyciu bakterii glebowych *Agrobacterium tumefaciens* i *Agrobacterium rhizogenes*. W toku ewolucji gatunki te rozwinęły zdolność do kolonizacji rośliny poprzez wprowadzenie odcinka swojego DNA (T-DNA) do genomu gospodarza. Bakterie modyfikują w ten sposób metabolizm rośliny, przystosowując go do własnych celów. Wykorzystanie *Agrobacterium* jako wektora jest możliwe dzięki modyfikacji odcinka T-DNA. Geny bakteryjne są usuwane, a na ich miejsce wprowadzane nowe geny (transgeny), które planuje się przenieść do rośliny (Klein 1996).

Proces obejmuje zintegrowanie dodatkowego genu z genomem rośliny biorcy, regenerację transformantów oraz sprawdzenie, czy oczekiwana cecha podlega ekspresji. Trudnością w tym wypadku jest głównie efektywność procesu transformacji. Transformowanie rośliny nie oznacza, że nowy gen działa zgodnie z oczekiwaniami. Przykładem może być odporność na zarazę komercyjnych odmian ziemniaka uzyskana dzięki wprowadzeniu genu *RB* pochodzącego z *S. bulbocastanum*. W dzikim gatunku gen ten warunkuje wysoką odporność naci i bulw, jednak po wprowadzeniu go do odmian Katahdin, Superior, Russet Burbank i Dark Red Norland jedynie nać była odporna. Patogen był w stanie porazić bulwy prawdopodobnie z powodu niestabilności białka produkowanego przez gen *RB*. Uważa się jednak, że jest to cenne źródło odporności, ponieważ znacząco redukuje rozwój choroby. Rośliny transformowane oraz nie zawierające genu odmiany kontrolne po 10 dniach od inokulacji *P. infestans* oceniano w skali 1-9,

gdzie 1 oznacza całkowite porażenie, a 9 – rośliny odporne. Oceny linii transformowanych zawierały się w przedziale 6,6-7,6, podczas gdy rośliny kontrolne oceniono za ledwie na 1,0-1,3. Co ważne, wprowadzenie genu *RB* do przytoczonych odmian nie powodowało istotnych zmian wielkości plonu (Haltermann i in. 2008).

Istnieją przypuszczenia, że rośliny wykazują trwalszą odporność w warunkach polowych, jeśli posiadają kilka genów odporności na szerokie spektrum izolatów *P. infestans*. Za tą hipotezą przemawia fakt, że w naturze często obserwuje się sytuacje, kiedy gen odporności nie występuje pojedynczo w wysoko odpornej roślinie. Umieszczenie kilku genów odporności, warunkujących brak porażenia, na wiele różnych izolatów *P. infestans* w pojedynczym genotypie ziemniaka wydaje się najlepszą strategią. Działanie takie jest uzasadnione szczególnie wtedy, gdy geny odporności mają różne pochodzenie i determinują różne mechanizmy interakcji pomiędzy gospodarzem a patogenem.

Dla ziemniaka opisano trzy różne metody transformacji, które mogą być użyte w celu wprowadzenia kilku genów jednocześnie, m.in. poprzez kilka następujących po sobie rund transformacji, kiedy w wyniku każdej pojedynczej rundy wprowadza się jeden transgen. Innym sposobem jest transformacja z użyciem jednego plazmidu, który zawiera kilka genów. Wtedy wprowadzenie tych genów dokonuje się jednocześnie. Niekiedy umieszcza się każdy pojedynczy gen w oddzielnym plazmidzie, ale plazmidy te są przenoszone razem do rośliny (Zhu i in. 2012).

Aby wprowadzić geny *Rpi-sto1*, *Rpi-vnt1.1* i *Rpi-blb3* do podatnej odmiany Désirée, wykorzystano drugą z przytoczonych powyżej metod. Geny sklonowano do wektora pBINPLUS, który posłużył do przeniesienia jednocześnie wszystkich trzech genów. Dzięki transformacji przeprowadzonej z udziałem *A. tumefaciens* uzyskano 23 rośliny o pożądanym cechach. Nie stwierdzono żadnych zakłóceń działania wprowadzonych genów, transformanty były całkowicie odporne we wszystkich przeprowadzonych testach (Zhu i in. 2012).

Problematyka tworzenia i uprawy genetycznie modyfikowanych roślin jest ważnym

tematem dyskusji społecznych. Spory wywołuje również kwestia badań nad odmianami ziemniaka, do których odporność na zarazę wprowadzono metodami inżynierii genetycznej.

Jeśli donorem odporności są gatunki ziemniaków, które krzyżują się z ziemniakiem uprawnym i należą do puli materiałów używanych w tradycyjnej hodowli, to przenoszony gen jest określany jako cisgen, a genetyczna modyfikacja z użyciem cisgeny jako cisgeneza (www.cisgenesis.com).

Twórcy tego terminu podkreślają, że jest to technika potencjalnie bardziej akceptowalna niż transgeneza. Produkt końcowy, czyli roślina otrzymana tym sposobem, nie zawiera obcych genów, ponieważ transfer genów odbywa się między roślinami z tego samego rodzaju. Postuluje się, aby rośliny cisgeniczne nie podlegały prawnym obostrzeniom jak inne rośliny modyfikowane genetycznie, zawierające geny np. wirusów lub bakterii. Proponowano nawet zakwalifikowanie cisgenezy jako metody hodowli konwencjonalnej (Goverse, Struik 2009).

Wprowadzenie do ziemniaka uprawnego genów pochodzących z organizmów taksonomicznie od niego odległych budzi więcej emocji. Jako potencjalne niebezpieczeństwo wymienia się toksyczny i alergizujący efekt „obcych” białek, który mógłby wystąpić po spożyciu bulw (Pisarski i in. 2011). Przykładem wprowadzenia obcego genu może być poprawa odporności ziemniaka na *P. infestans* po wprowadzeniu syntetycznego genu wzorowanego na genie motyla z rodziny omacnicowatych. Gąsienice barciaka większego (*Galleria mellonella*) mają zdolność wytwarzania przędzy. Aby zabezpieczyć przędzę przed zniszczeniem, ich gruczoły wydzielają białko SPI-2, które hamuje bakteryjne enzymy degradujące nić. Enzymy te to zewnątrzkomórkowe proteazy serynowe. Są produkowane przez wiele grzybowych patogenów roślin uprawnych, m.in. *P. infestans*, i ułatwiają zasiedlenie tkanki gospodarza. Zmodyfikowanie genu warunkującego powstawanie białka SPI-2 w taki sposób, aby podlegał ekspresji w roślinach ziemniaka, umożliwiło otrzymanie roślin wytwarzających białko, które blokowało enzymy *P. infestans*, nie dopuszczając do rozwoju choroby (Navrátil i in. 2012).

Sprzeciw społeczny dotyczy nie tylko transgenicznego ziemniaka jako produktu przeznaczonego do spożycia, ale także badań nad transgenicznymi ziemniakami. Odczuli to naukowcy z Norfolk, którzy prowadzili doświadczenia polowe na ok. 400 roślinach. Protestujący krytykowali zasadność projektu, nazywając go „marnotrawieniem publicznych pieniędzy”. Argumentowali, że otrzymanie odmian odpornych na zarazę ziemniaka jest możliwe przy użyciu konwencjonalnych metod, więc nie ma potrzeby angażowania technologii, którą uznaje się za ryzykowną.

Najwięcej emocji budzi obawa niekontrolowanego transferu DNA. Jako niewłaściwą oceniono odległość pomiędzy polem doświadczalnym a innymi polami, na których uprawiano ziemniaki. Wynosiła ona 20 m, podczas gdy odległość, na jaką owady przenoszą pyłek roślin, może wynosić 1 km. Informacja ta jest poparta badaniami nad przenoszeniem pyłku genetycznie modyfikowanej odmiany ziemniaka Desirée (Skogsmyr 1994).

Teoretycznie w przypadku ziemniaka nie istnieje ryzyko, że modyfikowany gen zostanie wbudowany w przypadkową roślinę i zjedzony przez człowieka. Jeśli pyłek z modyfikowanej rośliny spowoduje zapylenie i wytworzenie jagody u rośliny niemodyfikowanej genetycznie znajdującej się na sąsiednim polu, należy pamiętać, że jadalną częścią ziemniaka są bulwy, a nie owoce, w których mógłby znajdować się ów gen (www.bbc.co.uk).

Jeśli jednak dojdzie do zawiązania nasion po zapyleniu pyłkiem cis- lub transgenicznej rośliny, siewka, która wyrosnie z takiego nasiona, będzie rośliną zawierającą zmodyfikowany gen. Sytuacja taka jest prawdopodobna, dlatego badania nad modyfikowanymi ziemniakami są objęte specjalnym nadzorem. Na polach doświadczalnych samosiewy oraz odpady bulw podlegają bezwzględnemu niszczeniu, zabrania się również sadzenia na tym miejscu ziemniaków w ciągu 2 lat od zakończenia eksperymentów (www.gmoinfo.jrc.ec.europa.eu).

Obecnie testy polowe ziemniaków modyfikowanych genetycznie odpornych na *P. infestans* prowadzi się w sześciu krajach UE: Belgii, Irlandii, Szwecji, Holandii, Wielkiej

Brytanii i Czechach. Informacje udostępnione przez podmioty prowadzące badania przedstawia tabela 1.

Największe obszarowo badania prowadzi firma BASF Plant Science GmbH. Powierzchnia pól doświadczalnych w samej tylko Szwecji dochodzi do 50 ha. Poza BASF jedynym przedsiębiorstwem prowadzącym badania nad modyfikowanymi genetycznie ziemniakami jest czeska firma hodowlana Vesa Velhartice A. S. Większość doświadczeń prowadzą jednostki naukowe: Laboratorium Sainsbury, Uniwersytet Gent, ośrodek Teagasc lub Uniwersytet Wageningen i podległe mu jednostki.

Zdecydowaną większość genów wprowadzanych do ziemniaka uprawnego w celu uzyskania jego odporności na *P. infestans* stanowią geny pochodzące z jego dzikich krewnych. Ośrodek Teagasc w Irlandii jest jednak wśród wymienionych w tabeli 1 podmiotów jedynym, który prowadzi badania nad ziemniakami cisgenicznymi, tzn. że wprowadzany gen zawiera promotor i terminator, które naturalnie występują w genomie ziemniaka. Pozostałe ośrodki badawcze, mimo że wprowadzały geny odporności z dzikich gatunków *Solanum*, stosowały dodatkowo obcy dla ziemniaka gen reporterowy.

Mimo że dotychczas nie ma wiarygodnych doniesień o szkodliwości roślin modyfikowanych, w ocenie społecznej przydatności i bezpieczeństwa spożywania takich roślin jest kwestią kontrowersyjną. Sceptycyzm zawsze stanowił naturalną reakcję towarzyszącą przełomowym odkryciom. Nie wolno odmawiać prawa do ostrożności osobom, które nie czują się przekonane do metody modyfikacji genetycznych jako metody ulepszenia cech roślin. Z drugiej jednak strony należy racjonalnie oceniać korzyści i zagrożenia wiążące się z problemem (Pisarski i in. 2011). W opinii prof. J. Jonesa akceptacja społeczna jest decydującym czynnikiem rozwoju badań i wykorzystania transgenicznych odmian (www.bbc.co.uk). Ta, jak wiemy, jest raczej niska.

Postawa konsumencka w stosunku do żywności modyfikowanej genetycznie sprawia, że polscy hodowcy wątpią w możliwości wykorzystania transgenezy (Zimnoch-Guzowska, Gołębiewska 2011). Gust kupujących jest skierowany na stare, sprawdzone od-

miany, które są uznawane za wzór cech kulinarnych. W Holandii odmianą taką jest Bintje, w USA Russet Burbank, w Polsce – Irga, Irys czy Bryza.

Paradoksalnie, przywiązanie do konkretnych odmian może ułatwić wdrożenie metody modyfikacji genetycznych ziemniaków w celu uzyskania odporności na zarazę ziemniaka. Wszystkie wymienione odmiany są podatne na *P. infestans*, a wzbogacenie ich jedynie o odporność bez zmiany parametrów innych cech może być zachęcającą perspektywą. Jeśli kupujący preferują już istniejące

odmiany, łatwiejszym zabiegiem będzie wprowadzenie do nich odporności metodą modyfikacji genowej niż hodowla całkiem nowej odmiany odpornej z oczekiwaniem, że jej cechy kulinarne zostaną zaaprobowane przez rynek. Oczekiwania konsumentów względem jakości bulw zostaną spełnione, celem hodowców będzie uzyskanie trwałej i wysokiej odporności już istniejących odmian cieszących się dużym popytem, a uprawa tych odmian nie będzie potrzebowała wysokich nakładów na ochronę chemiczną.

Tabela 1

Charakterystyka prowadzonych w Europie badań polowych nad ziemniakami modyfikowanymi genetycznie (www.gmo.info.jrc.ec.europa.eu)

Wprowadzane geny	Podmiot prowadzący badania	Lokalizacja pól doświadczalnych	Czas trwania badań	Obszar uprawy (m ²)
<i>Rpi-vnt1</i> , <i>Rpi-sto1</i> , <i>Rpi-vnt1+Rpi-sto1+Rpi-blb3</i>	Uniwersytet Gent	Wetteren, Belgia	2010-2012	1500
<i>Rpi-vnt1.1</i>	Teagasc	Carlow, Irlandia	2012-2016	20 000
<i>Rpi-blb1</i> , <i>Rpi-blb2</i>	BASF Plant Science GmbH	różne miejscowości, Szwecja, Holandia, Belgia	2011-2018	10 000-500 000
Różne geny pochodzące z tuberyzujących gatunków z rodzaju <i>Solanum</i>	Praktijkonderzoek Plant & Omgeving, Stichting Dienst Landbouwkundig Onderzoek (DLO)	Borger Odoorn, Lelystad, Wageningen, Venray, Binnenmaas, Holandia	2011-2021	10 000
Różne geny pochodzące z gatunków dzikich ziemniaków	Uniwersytet Wageningen	Aa en Hunze, Borger-Odoorn, Eemsmond, Coevorden, Rhenen, Wageningen, Holandia	2010-2020	10 000
<i>Rpi-vnt1.1</i> , <i>Rpi-mcq1.1</i>	Laboratorium Sainsbury	Norwich Research Park, Wielka Brytania	2010-2012	1000
Syntetyczny gen SPI-2	Vesa Velhartice A.S.	Kolinec, Czechy	2009-2013	10 000
<i>Rpi-blb1</i> , <i>Rpi-blb2</i> , <i>Rpi-blb3</i> , <i>Rpi-R3a</i> , <i>Rpi-sto1</i>	Uniwersytet Wageningen	Borger-Odoorn, Eemsmond, Coevorden, Rhenen, Wageningen, Holandia	2007-2012	10 000

Literatura

1. Govere A., Struik P. C. 2009. Debate on the Exploitation of Natural Plant Diversity to Create Late Blight Resistance in Potato. – *Potato Res.* 52: 265-271; 2. Halterman D. A., Kramer L. C., Wielgus S., Jiang J. 2008. Performance of Transgenic Potato Containing the Late Blight Resistance Gene *RB*. – *Plant Dis.* 92: 339-343; 3. Haverkort A. J., Boone-

kamp P. M., Hutten R., Jacobsen E., Lotz L. A. P., Kessel G. J. T., Visser R. G. F., Vossen van der E. A. G. 2008. Societal Costs of Late Blight in Potato and Prospects of Durable Resistance Through Cisgenic Modification. – *Potato Res.* 51: 47-57; 4. Haverkort A. J., Struik P. C., Visser R. G. F., Jacobsen E. 2009. Applied Biotechnology to combat late blight in potato caused by *Phytophthora infestans*. – *Potato Res.* 52:

- 249-264; **5. Klein M. 1996.** Transformowanie roślin. [W:] Zastosowanie metod biotechnologicznych w hodowli roślin. Red. B. Michalik. Drukrol Kraków: 139-155; **6. Lammerts van Bueren E. T., Tiemens-Hulscher M., Struik P. C. 2008.** Cisgenesis Does Not Solve the Late Blight Problem of Organic Potato Production: Alternative Breeding Strategies. – *Potato Res.* 51: 89-99; **7. Navrátil O., Kodrlik D., Kludkiewicz B., Vinokurov K. S., Sehnal F., Horáčková V. 2012.** Protease inhibitors as a possible new factor in agricultural plant protection against microbial and fungal attack. *GMOs in Integrated.* – *Plant Prod. IOBC/WPRS Bull.* 73: 61-67; **8. Pisarski R. K., Grela E. R., Lipiec A. 2011.** Przydatność i bezpieczeństwo roślin transgenicznych (GMO) w żywieniu zwierząt. – *Post. Nauk Rol.* 345: 133-146; **9. Skogsmyr I. 1994.** Gene dispersal from transgenic potatoes to conspecifics: a field trial. – *Theor. Appl. Genet.* 88: 770-774; **10. Vossen E. A. van der, Gros J., Sikkema A., Muskens M., Wouters D., Wolters P., Pereira A., Allefs S. 2005.** The *Rpi-blb2* gene from *Solanum bulbocastanum* is an Mi-1 gene homolog conferring broad-spectrum late blight resistance in potato. – *Plant J.* 44: 208-22; **11. Zhu S., Li Y., Vossen J. H., Visser R. G., Jacobsen E. 2012.** Functional stacking of three resistance genes against *Phytophthora infestans* in potato. – *Transgenic Res.* 21: 89-99; **12. Zimnoch-Guzowska E., Gołębiewska M. 2011.** Wykorzystanie biotechnologii przez polską hodowlę roślin. – *Biul. IHAR* 259: 121-129; **13. www.bbc.co.uk; 14. www.gmoinfo.jrc.ec.europa.eu; 15. potato pedigree database: www.plantbreeding-wur.nl**
- * * *
- Autorka dziękuje prof. Ewie Zimnoch-Guzowskiej za cenne uwagi do manuskryptu. Finansowane przez NCBiR grant LIDER/06/82/L-1/09/NCBiR/2010