

Joanna Troczyńska, Stanisław Flasiński*, Lucyna Drozdowska

Akademia Techniczno-Rolnicza w Bydgoszczy, Wydział Rolniczy, Katedra Fizjologii Roślin

* Monsanto, St. Louis, Missouri, USA

Transformacja rzepaku genem reporterowym kodującym białko zielonej fluorescencji za pomocą *Agrobacterium tumefaciens*

Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of rapeseed with green fluorescent protein gene

Słowa kluczowe: rzepak, transformacja, regeneracja pędów, białko zielonej fluorescencji

Key words: rapeseed, transformation, shoots regeneration, green fluorescent protein

Segmenty hypocotyli rzepaku *Brassica napus* L. odmiany Bor izolowane z 5–7 dniowych siewek poddawano transformacji za pomocą *Agrobacterium tumefaciens* ABI zawierającego plazmid pMON30069 z genem selekcyjnym fosfotransferazą neomycyny NPTII warunkującym odporność na kanamycynę oraz genem kodującym białko zielonej fluorescencji (GFP) pod kontrolą konstytutywnego promotora z wirusa mozaiki kalafiora P-e35S. Po 24-godzinnej kokulturze eksplantaty wykładano na pożywkę stymulującą tworzenie pędów (sole MS, witaminy B5, 5 mg/L AgNO₃, 2 mg/L BAP, 0,5 mg/L ZEA, 0,01 mg/L GA₃). Różnicujące się pędy przenoszono na pożywkę elongacyjną (sole MS, witaminy B5). Pożywka indukująca tworzenie pędów oraz elongacyjna zawierały 20 mg/L kanamycyny jako czynnika selekcyjnego i 500 mg/L karbenicyliny hamującej rozwój *Agrobacterium*. Proces transformacji kontrolowano przy pomocy mikroskopu fluorescencyjnego. Na podstawie fluorescencji w świetle niebieskim stwierdzono ekspresję GFP w 2,3% pędów rzepaku uzyskanych po transformacji.

Hypocotyl explants excised from 5-7 day old seedlings of *Brassica napus* cv. Bor were transformed with *Agrobacterium tumefaciens* strain ABI containing a binary plasmid pMON30069 with the neomycin phosphotransferase gene (NPTII) and the green fluorescent protein gene (GFP) driven by P-e35S promoter from cauliflower mosaic virus. After 24 h co-incubation with *Agrobacterium* the explants were transferred to the shoot inducing medium (MS salts, vitamins B5, AgNO₃ 5 mg/l, BAP 2 mg/l, ZEA 0.5 mg/l, GA₃ 0.01 mg/l). Shoots regenerated from hypocotyl calli were transferred to the elongation medium (MS salts, B5 vitamins). Shoot inducing medium and elongation medium contained 20 mg/l kanamycin for selection of transformed cells and 500 mg/l carbenicillin to control *Agrobacterium* growth. Microscopic evaluation of GFP fluorescence was used to monitor the transformation. The GFP expression under blue light was detected in 2.3% of rapeseed shoots obtained from transformation.

Rzepak jest jedną z najważniejszych roślin oleistych uprawianych w Polsce i ważnych na świecie. Podobnie jak inne rośliny uprawne podlega on ciągłemu procesowi udoskonalania poprzez prace hodowlane. Metody hodowli tradycyjnej są jednak czasochłonne, a proces przenoszenia genów ograniczony tylko do tych form, które mogą się między sobą krzyżować. Szereg nowych możliwości stwarzają kultury *in vitro* w połączeniu z technikami transformacji roślin. Metody te pozwalają w stosunkowo krótkim czasie otrzymać rośliny o zmodyfikowanym genotypie, przy czym wprowadzanie genów może odbywać się niezależnie od stopnia pokrewieństwa między dawcą i biorcą.

Najczęściej stosowaną metodą transformacji roślin z rodzaju *Brassica* jest transformacja przy pomocy *Agrobacterium tumefaciens* zawierającego wektory binarne (Radke i in. 1988, De Block i in. 1989, Stefanov i in. 1994, Babic i in. 1998, Zhang i in. 2000). Proces transformacji jest wieloetapowy i kontrolowany dzięki ekspresji specyficznych genów w *Agrobacterium* i w roślinie. W tym procesie fragment DNA (T-DNA) z wektora binarnego zostaje wbudowany do genomu roślinnego na drodze niehomologicznej rekombinacji. Wydajność tego procesu jest różna w zależności od genotypu rośliny, odmiany, wieku, a także od rodzaju użytego eksplantatu (Zhang i in. 1999, Poulsen 1996, Stefanov i in. 1994). Ważnymi parametrami decydującymi o integracji T-DNA w genomie roślinnym są również warunki i czas prowadzenia kokultury oraz wrażliwość roślin na czynnik selekcyjny stosowany podczas regeneracji. Użycie genu selekcyjnego warunkującego odporność na antybiotyki lub herbicydy pozwala wyeliminować większość komórek niestransformowanych. Dodatkowo wprowadzenie do wektora genu, reporterowego, którego produkt świadczy nie tylko o wbudowaniu genu ale także o jego ekspresji, pozwala na monitorowanie procesu transformacji. Jednym z genów reporterowych powszechnie używanych w transformacji roślin jest gen kodujący białko zielonej fluorescencji (GFP) wyizolowany z *Aequorea victoria*. Obserwacja ekspresji tego genu jest możliwa w czasie naświetlania materiału roślinnego światłem UV lub niebieskim, które wzbudza autooksydację białka i jego fluorescencję. Detekcja nie wymaga więc niszczenia tkanki, używania substratów i ko-faktorów reakcji (Chalfie i in. 1994).

Celem niniejszej pracy było przetestowanie metody transformacji i oceny jej efektywności dla rzepaku ozimego odmiany Bor za pomocą *Agrobacterium tumefaciens* zawierającego plazmid binarny z genem selekcyjnym NPTII oraz genem GFP pod kontrolą konstytutywnego promotora P-e35S.

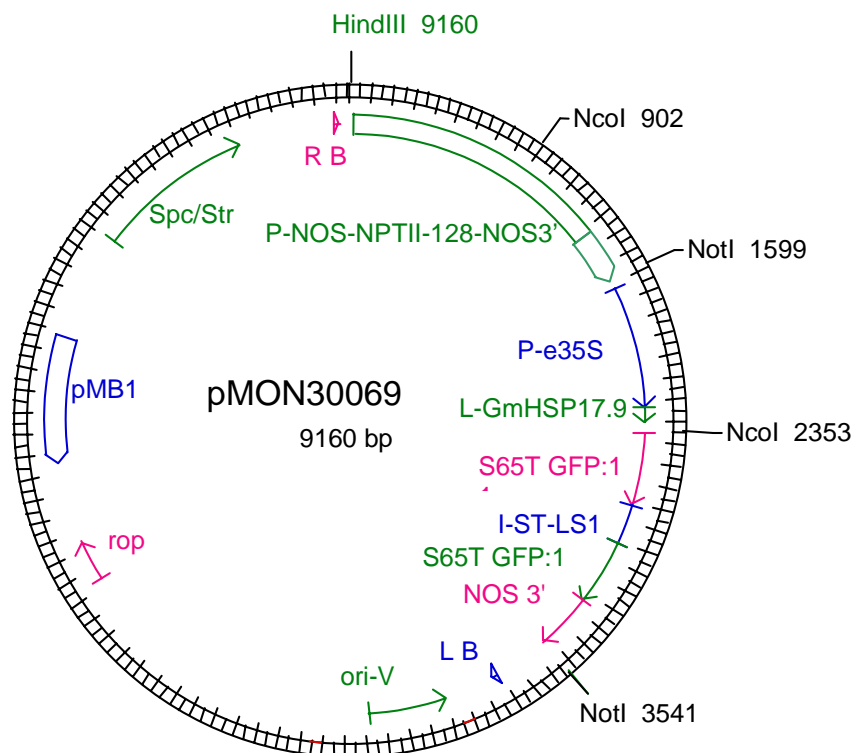
Materiały i metody

Nasiona rzepaku ozimego (*Brassica napus* L., odmiana Bor) sterylizowano 3 minuty w 70% etanolu i 10 minut w 30% handlowym preparacie podchlorynu sodu. Po sterylizacji nasiona płukano dwukrotnie sterylną wodą i wykładano na pożywkę PK. Pożywki stosowane w niniejszym doświadczeniu (tab. 1) zawierały sole mineralne MS (Murashige i Skoog 1962) oraz witaminy MS lub B5 (Gamborg i in. 1968). Po 5–7 dniach kultury hypokotyle siewek cięto na odcinki o długości 0,5–1 cm. Otrzymane fragmenty hypokotyli przemywano 30 minut pożywką podstawową PP, a następnie przenoszono na pożywkę indukującą kalus PIK i wytrząsano przez 24 godziny. Tak przygotowane eksplantaty poddawano transformacji według procedury opisanej przez Bade i Damma (1995).

Kulturę *Agrobacterium tumefaciens* szczep ABI zakładano około 4 dni przed transformacją hodując bakterie na pożywce agarowej LB z antybiotykami (100 mg/L spectynomycyny, 50 mg/L kanamycyny i 25 mg/L chloramfenikolu). *Agrobacterium* zawierało wektor binarny pMON30069, którego T-DNA posiada gen selekcyjny kodujący fosfotransferazę neomycyny oraz gen reporterowy kodujący białko zielonej fluorescencji (rys. 1). Gen GFP posiada mutacje seryny do treoniny w pozycji 65 i optymalizowane kodony pozwalające na znacznie wyższą fluorescencję i ekspresję u roślin w porównaniu do genu GFP formy dzikiej (Sheng-Zhi i in. 1996). Po dwóch dniach pojedyncze kolonie *Agrobacterium* przenoszono na płynną pożywkę LB z antybiotykami w celu namnożenia bakterii. Po kolejnych dwóch dniach wzrostu kulturę bakterii wirowano, a osad komórek zawieszano w pożywce PP.

Eksplantaty umieszczano w zawieszynie *Agrobacterium* na okres 20 minut, po czym usuwano pożywkę PP, z bakteriami a segmenty hypokotyli przemywano pożywką PIK. Kokulturę hypokotyli z *Agrobacterium* prowadzono na pożywce PIK delikatnie wytrząsając. Po 24 godzinach pożywkę PIK usuwano, a eksplantaty przemywano pożywką PM zawierającą karbenicylinę. Przemyte fragmenty hypokotyli wykładano na pożywkę PIP indukującą tworzenie pędów, zawierającą 20 mg/L kanamycyny oraz 500 mg/L karbenicyliny. Co 2 tygodnie segmenty przenoszono na świeżą pożywkę PIP. Pojawiające się pędy z liśćmi o długości 1–2 cm przenoszono na pożywkę elongacyjną PE. Po upływie około 2 tygodni wydłużone pędy pasażowano na pożywkę ukorzeniającą PU. Kontrolę w doświadczeniu stanowiły eksplantaty nie infekowane *Agrobacterium*, które wykładano na pożywkę z czynnikiem selekcyjnym, kanamycyną (kontrola Km⁺). Równolegle prowadzono ocenę zdolności regeneracji hypokotyli rzepaku odmiany Bor na stosowanych pożywkach bez kanamycyny (kontrola Km⁻).

Otrzymane rośliny analizowano na obecność białka zielonej fluorescencji przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego firmy Zeiss. W tym celu izolowano epidermę z liści i obserwowano fluorescencję przy świetle wzbudzenia o długości fali λ 490 nm i następnie fotografowano.



T-DNA zawarte jest między sekwencjami granicznymi oznaczonymi jako RB (sekwencja graniczna prawa) i LB (sekwencja graniczna lewa); P-NOS-NPTII-NOS3' — gen fosfotransferazy neomycyny wraz z promotorem (P-NOS) i sekwencją terminacyjną (NOS3'); P-e35S — promotor z wirusa mosaiki kalafiora, L-GmHSP17.9 — sekwencja liderowa genu HSP17.9 z soi; S65TGFP — gen GFP z mutacją seryny do treoniny w pozycji 65 zawierający intron ST-LS1 z ziemniaka; NOS3' — sekwencja terminacyjna; Spc/Str — gen odporności na spektomycynę i streptomycynę który pozwala na utrzymanie i selekcję plazmidu w *E. coli* i *Agrobacterium*; pMB1 — sekwencja warunkująca replikację wektora w *Escherichia coli*; oriV — sekwencja warunkująca replikację wektora w *Agrobacterium*; rop — gen kontrolujący ilość kopii wektora w komórce bakterii. Miejsca cięcia enzymami restrykcyjnymi *NotI*, *HindIII*, i *NcoI* są oznaczone.

The T-DNA region is enclosed between border repeats marked as RB (right border) and LB (left border); P-NOS-NPTII-NOS3' — the neomycin phosphotransferase gene flanked by promoter (P-NOS) and terminator (NOS3'); P-e35S — promoter from cauliflower mosaic virus, L-GmHSP17.9 — a leader from soybean HSP17.9 gene; S65TGFP — the GFP gene with serine 65 to threonine mutation contains intron ST-LS1 from potato; Spc/Str — a spectinomycin and streptomycin resistance gene allows the vector to be maintained and selected in *E.coli* and *Agrobacterium*; pMB1 — *Escherichia coli* origin of DNA replication; ori-V — *A. tumefaciens* origin of DNA replication; rop — a gene that regulates plasmid copy number in bacterial cells. Restriction enzymes *NotI*, *HindIII* and *NcoI* recognition sites are marked.

Rys. 1. Wektor binarny pMON30069 — A binary vector pMON30069

Tabela 1

Skład pożywek stosowanych podczas transformacji rzepaku
Composition of the media used in rapeseed transformation

Składniki pożywek <i>Media components</i>	Pożywki — <i>Media</i>						
	PK	PP	PIK	PM	PIP	PE	PU
Sole — <i>Salts</i>	MS	MS	MS	MS	MS	½MS	½MS
Witaminy — <i>Vitamins</i>	MSV	B5	B5	B5	B5	½B5	½B5
Sacharoza — <i>Sucrose</i> %	2	3	3	3	3	1	1
MES	500	500	500	500	500	500	500
Agar g/l	8				8	8	8
pH	5,8	5,8	5,8	5,8	5,8	5,8	5,8
AgNO ₃ mg/L					5		
ZEA mg/L					0,5		
BAP mg/L					2		
GA ₃ mg/L					0,01		
2,4-D mg/L			1				
Kinetyna — <i>Kinetin</i> mg/L			1				
IBA mg/L							0,1
Karbenicylina <i>Carbenicillin</i> mg/L				500	500		
Kanamycyna <i>Kanamycin</i> mg/L					20	20	10

MS — sole Murashige i Skooga — *Murashige and Skoog salt mixture*

½ MS — połowa soli MS — *half-strength MS salts*

MSV — witaminy wg Murashige i Skooga (1968) — *Murashige and Skoog vitamin mixture*

B5 — witaminy B5 wg Gamborga i in. (1968) — *Gamborg B5 vitamin mixture*

MES — 2-(N-morpholonino)-ethanosulfonic acid

BA — benzylaminopurine

ZEA — zeatin ribioside;

GA₃ — gibberellic acid;

2,4-D — 2,4-dichlorophenoxyacetic acid

IBA — indole-3-butyric acid

Wyniki i dyskusja

Po upływie około dwóch tygodni od rozpoczęcia kultury na fragmentach hypokotyli nie poddawanych transformacji w miejscach cięcia tworzyła się tkanka kalusowa. Pierwsze pędy regenerujące z kalusa rozwijały się po 3 tygodniach prowadzenia kultury na pożywce PIP (fot. 1A). Pędy z liśćmi o długości około 1 cm odcinano i pasażowano na pożywkę elongacyjną PE. Wydajność procesu regeneracji określono na podstawie liczby uzyskanych pędów w przeliczeniu na

wyjściową liczbę eksplantatów użytych w doświadczeniu. Wyniosła ona 52% dla hypokotyli inkubowanych na pożywce kontrolnej bez czynnika selekcyjnego (kontrola Km^-) (tab. 2). Tworzenie tkanki kalusowej i regenerację pędów obserwowano również na eksplantatach nie infekowanych *Agrobacterium* hodowanych na pożywce z czynnikiem selekcyjnym (kontrola Km^+), jednak wszystkie pędy po dłuższym okresie kultury bieleły i zamierały.

Tabela 2

Regeneracja i transformacja eksplantatów hypokotyli rzepaku odmiany Bor
Regeneration and transformation efficiency of rapeseed cv. Bor from hypocotyl explants

	Liczba eksplantatów <i>No. of explants</i>	Eksplantaty tworzące pędy <i>Explants forming shoots</i> [%]	Pędy wykazujące obecność GFP <i>GFP positive shoots</i> [%]
Kontrola — <i>Control Km⁻</i>	150	52,0	–
Kontrola — <i>Control Km⁺</i>	150	15,3	–
pMON 30069	630	27,8	2,3

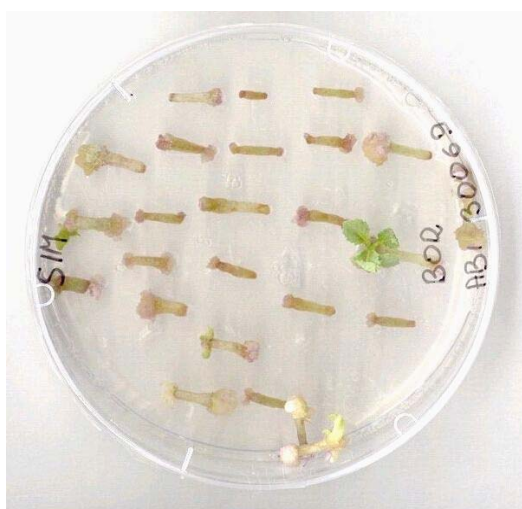
Hypokotyle po infekcji bakterii regenerowały ze znacznym opóźnieniem w stosunku do kontroli Km^- (fot. 1B) oraz mniej efektywnie (tab. 2). Obniżenie wydajności regeneracji po transformacji jest często obserwowanym efektem. Przyczyną tego mogą być warunki i czas kokultury eksplantatów z *Agrobacterium*, zastosowanie czynnika selekcyjnego w pożywce regeneracyjnej oraz stężenie użytej kultury bakteryjnej (Radke i in. 1988, Zhang i in. 1999).

W procesie transformacji duże znaczenie ma szybka i łatwa detekcja komórek wykazujących ekspresję wprowadzonego genu. Zastosowanie genów reporterowych, których produkty można wykryć różnymi metodami ułatwia opracowanie warunków transformacji. W wyniku zastosowanej metody otrzymano pędy wykazujące ekspresję wprowadzanego genu GFP. Uzyskana efektywność transformacji, wyrażona liczbą pędów, w których stwierdzono obecność białka zielonej fluorescencji w stosunku do wszystkich zregenerowanych pędów wyniosła 2,3%. Wydajność transformacji była porównywalna do wyników otrzymanych przez innych autorów dla roślin z rodzaju *Brassica* (Radke i in. 1988, Stefanov i in. 1994, Dabert i Augustyniak 1997, Zhang i in. 2000). W celu jej zwiększenia wydłuża się czas inkubacji i kokultury eksplantatów z *Agrobacterium* (Radke i in. 1988, Zhang i in. 2000). Podobny efekt można uzyskać poprzez obniżenie pH oraz dodanie do pożywki kokulturywacyjnej acetosyringonu. Wzmaga to infekcyjność bakterii, a zatem zwiększa szansę otrzymania większej liczby zmienionych genetycznie roślin (Vernade i in. 1988, Stachel i in. 1986). Transgeniczne pędy nie różniły się morfologicznie od pędów nie transformowanych jednak ich rozwój przebiegał znacznie wolniej w stosunku do kontroli Km^- (fot. 2A, B).

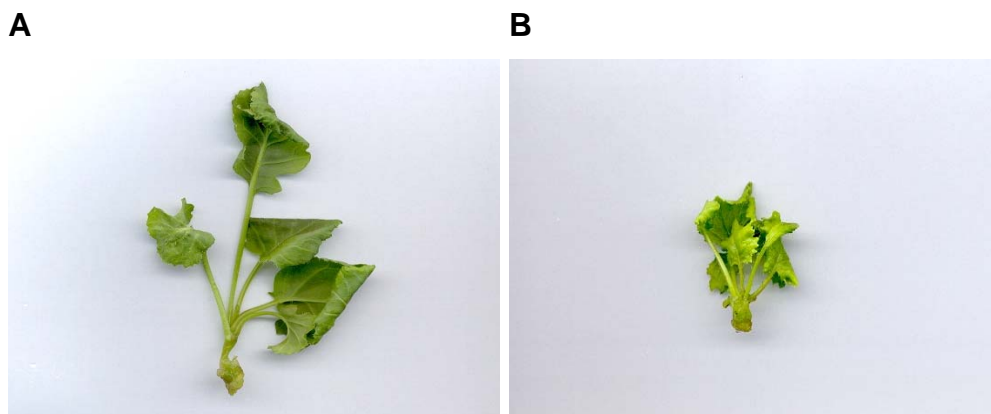
A



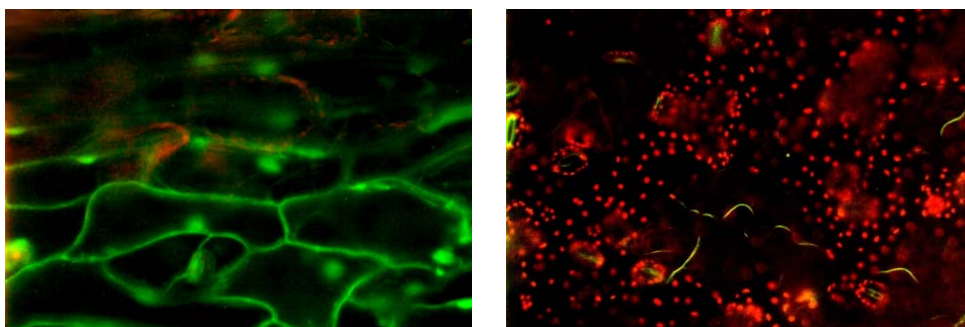
B



Fot. 1. Tworzenie kalusa oraz pędów na pożywce PIP na eksplantatach hypocotyli: A — kontrolnych (Km^-), B — transformowanych — *Callus and shoots formation on hypocotyl explants cultured on PIP medium: A — control (Km^-), B — transformed*



Fot. 2. Zregenerowane pędy po 4 tygodniach kultury na pożywce PE: A — kontrolne (Km^-), B — transgeniczne — *Regenerated shoots after 4 weeks of culturing on PE medium: A — control (Km^-), B — transgenic*



A — zielona fluorescencja białka GFP w roślinie transgenicznej — *Green fluorescence in transgenic plant transformed with GFP cassette*

B — czerwona fluorescencja chlorofilu w roślinie kontrolnej — *chlorophyll induced red fluorescence in nontransgenic plant*

Fot. 3. Fluorescencja obserwowana po wzbudzeniu światłem o długości 490 nm — *Fluorescence of epidermal cells from rapeseed leaves*

Na większości pędów uzyskanych po transformacji, początkowo zielonych, po odcięciu i przeniesieniu na pożywkę elongacyjną zawierającą 20 mg/L kanamycyny obserwowano antocjanowe przebarwienia, całkowite bielenie lub częściową utratę chlorofilu. W sektorach zielonych stwierdzano obecność białka GFP, co mogło świadczyć o chimerycznej naturze niektórych transformantów. Po przeniesieniu takich pędów na pożywkę ukorzeniającą zawierającą 10 mg/L kanamycyny nie obserwowano tworzenia korzeni. Pojawienie się pędów albinotycznych oraz chimer sektorialnych odnotowują również inni autorzy (Starzycki i in. 1997, Orlikowska i Dyer 1993).

Ekspresję GFP sprawdzano w epidermie liści i tkankach subepidermalnych zregenerowanych zielonych pędów, które ukorzeniano na pożywce PU z dodatkiem kanamycyny (fot. 3B). Zielona fluorescencja najlepiej była widoczna w komórkach szparkowych oraz w epidermie, ze względu na niską zawartość lub brak chlorofilu, którego intensywna fluorescencja maskuje fluorescencję GFP. Niemniej obecność białka stwierdzono również w tkankach parenchymatycznych. Podobne efekty obserwowano w tkankach transgenicznego tytoniu, kukurydzy, rzodkiewnika (Sheng-Zhi i in. 1996), pszenicy (Kaeppler i in. 2001) i rzepaku (Halfhill i in. 2001).

Wysoka wydajność regeneracji rzepaku odmiany Bor otrzymana na pożywce kontrolnej bez kanamycyny oraz po transformacji z *Agrobacterium* świadczy, że metoda opisana przez Bade i Damm (1995) jest użyteczna dla tej odmiany. Jednak niewielka liczba pędów wykazujących ekspresję genu GFP wskazuje, że zastosowane warunki kokultury i selekcji wymagają dalszych badań.

Podziękowanie

Autorzy pragną podziękować Firmie Monsanto (St. Louis, Missouri, USA) za udostępnienie wektora binarnego pMON30069 użytego w tych badaniach.

Literatura

- Babic V., Datla R.S., Scoles G.J., Keller W.A. 1998. Development of an efficient *Agrobacterium*-mediated transformation system for *Brassica carinata*. Plant Cell Reports, 17: 183-188.
- Bade J.B., Damm B. 1995. *Agrobacterium*-mediated transformation of rapeseed (*Brassica napus*) Gen transfer to plants. Springer Lab. Manual, Eds: Potrykus, Spangenberg. Swiss, 30-38.
- Chalfie M., Yuan Tu, Euskirchen G., Ward W.W., Prasher D.C. 1994. Green Fluorescent Protein as a Marker for Gene Expression. Science 263: 802-805.
- Dabert M., Augustyniak J. 1997. Transformacja roślin rodzaju *Brassica* za pomocą systemu *Agrobacterium*. Zeszyty Naukowe AR Kraków, 318: 491-495.
- De Block M., De Brouwer D., Tenning P. 1989. Transformation of *Brassica napus* and *Brassica oleracea* using *Agrobacterium tumefaciens* and the expression of the bar and neo genes in the transgenic plants. Plant Physiol., 91: 694-701.

- Gamborg O.L., Miller R.A., Ojima K. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell. Res.*, 50: 151-158.
- Halfhill M.D., Richards H.A., Mabon S.A. 2001. Expression of GFP and Bt transgenes in *Brassica napus* and hybridization with *Brassica rapa*. *Theor. Appl. Genet.*, 103: 659-667.
- Kaeppeler H.F., Carlson A.R., Menon G.K. 2001. Routine utilization of green fluorescent protein as a visual selectable marker for cereal transformation. *In vitro Cell. Dev. Biol.-Plant*, 37: 120-126.
- Murashige T., Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant*, 15: 473-497.
- Orlikowska T.K., Dyer W.E. 1993. In vitro regeneration and multiplication of safflower (*Carthamus tinctorius* L.) *Plant Sci.*, 93: 151-157.
- Poulsen G.B. 1996. Genetic transformation of Brassica. *Plant Breeding*, 209-225.
- Radke S.E., Andrews B.M., Crouch M.L., Kridl J.C., Knauf V.C. 1988. Transformation of *Brassica napus* L. using *Agrobacterium tumefaciens*: developmentally regulated expression of a reintroduced napin gene. *Theor. Appl. Genet.*, 75: 685-694.
- Sheng-Zhi Pang, DeBoer D.L., Wan J., Ye G., Layton G., Neher M.K., Armstrong Ch.L., Fry J.J., Honchee M.A.W., Fromm M.E. 1996. An improved green fluorescent protein gene as a vital marker in plants. *Plant. Physiol.*, 112: 893-900.
- Stachel S.E., Nester E.W., Zambryski P.C. 1986 A plant cell factor induces *Agrobacterium tumefaciens* vir gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 83: 379-383.
- Starzycki M., Starzycka E., Matuszczak M., Mikołajczyk K., Wiweger M. 1997. Transformacja rzepaku ozimego przy pomocy *Agrobacterium tumefaciens*. *Rośliny Oleiste*, XVIII: 47-54.
- Stefanov I., Fekete S., Bogre L., Pauk J., Feher A., Dudits D. 1994. Differential activity of mannopine synthase and the CaMV35S promoters during development of transgenic rapeseed plants. *Plant Science*, 95: 175-186.
- Vernade D., Herrera-Estrilla A., Wang K., Van Montagu M. 1988. Glicine betaine allows enhanced induction of the *Agrobacterium tumefaciens* vir genes by acetosyringone at low pH. *J. Bacteriol.*, 170: 5822-5829.
- Zhang F.L., Takahata Y., Watanabe M., Xu J.B. 2000. *Agrobacterium*-mediated transformation of cotyledonary explants of Chinese cabbage (*Brassica campestris* L. ssp. *pekinensis*). *Plant Cell Reports*, 19: 569-575.
- Zhang Y., Mohan B Singh, Prem L. Bhalla 1999. Genetic transformation of Australian cultivars of oilseed rape (*Brassica napus* L.) *Proc. 10th International Rapeseed Congress „New Horizons for Old Crop”* Canberra, Australia, CD.