



Polskie zboża transgeniczne

Janusz Zimny, Sławomir Sowa, Izabela Menke-Milczarek,
Andrzej Czaplicki, Aleksander Sowa

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin, Radzików

Polish transgenic cereal crops

Summary

First transgenic cereal plants have been obtained in Poland seven years ago. Within the time other cereals like wheat, rye and barley have been also transformed. The prerequisite for that was a very efficient regeneration system by somatic embryogenesis. Generally the basic study on transgenic cereals are quite advanced but the question is how to include transgenic lines in to practical breeding process? Most of genes, promoters and transformation methods are patented and probably Polish breeders will never afford to buy the licences. Though there is a need to concentrate the future work in Polish institutes on identification and isolation of genes of interest. Than to transfer them to plants and register transgenic varieties. According to the Polish law it is allowed to carry out the field experiments, but it is not possible to register the plant variety.

Key words:

transgenic cereals, regeneration systems, transformation.

1. Wstęp

Odkąd w latach pięćdziesiątych odkryto „szyfr życia” badacze na całym świecie zastanawiali się jak w sposób celowy zmodyfikować genom. W latach osiemdziesiątych uzyskano pierwsze rośliny transgeniczne, a od początku lat dziewięćdziesiątych zaczęto skutecznie transformować zboża. Dziś rośliny transgeniczne są ciągle wyzwaniem dla badaczy, a dla krajów trzeciego świata nadzieją na rozwiązanie problemów z niedożywieniem.

Adres do korespondencji

Janusz Zimny,
Instytut Hodowli
i Aklimatyzacji Roślin,
Radzików,
05-870 Błonie.

Umożliwią one poprawę jakości roślin i wzrost plonów przez zwiększanie ich odporności na choroby, odporności na wyleganie i wymarzenie, wcześniejsze dojrzewanie, a także tolerancję na stresy abiotyczne. Transformacja roślin otwiera również nowe możliwości w produkcji pożądanych związków. Rośliny, do których wprowadzono odpowiednie geny zwierzęce, mogą wytwarzać białka lub inne produkty, które dotąd można było izolować tylko z tkanki zwierzęcej. Roślinna produkcja przeciwciał lub jakichkolwiek innych komponentów stosowanych w lecznictwie zmniejsza ryzyko wprowadzenia czynników chorobotwórczych do organizmu człowieka.

Należy pamiętać, że inżynieria genetyczna to nie tylko przeniesienie obcych genów do roślin uprawnych, to również możliwość modyfikacji ekspresji genów już obecnych w genomie rośliny. Rośliny transgeniczne są także doskonałym narzędziem badawczym. Wiele informacji na temat funkcji nieznanego genu można uzyskać zwiększając lub blokując jego ekspresję w roślinach transgenicznych. Funkcję badanego genu można wyjaśnić analizując zmiany procesów biochemicznych i fizjologicznych w zmodyfikowanych roślinach.

Według ostatnich danych ponad 4500 linii roślin zmodyfikowanych genetycznie zostało przetestowanych w polu, z których około 40 zostało wprowadzonych do uprawy, w tym 13 odmian kukurydzy, 11 pomidorów i cztery odmiany soi. Skutkiem tego prawie 50% kukurydzy, bawełny czy soi uprawianej w Stanach Zjednoczonych w roku 1999 było zmodyfikowane genetycznie. Odmiany te głównie posiadały geny warunkujące odporność na szkodniki i herbicydy. Do zalet uprawy takich roślin można zaliczyć wzrost produktywności, zapobieganie erozji gleby, a także zmniejszenie stosowania herbicydów i insektycydów, które w rolnictwie tradycyjnym powodują skażenie gleby i wody.

Uzyskanie roślin transgenicznych wymagało, jak dotąd, opanowania metod:

- 1) biologii molekularnej umożliwiających wyizolowanie genów odpowiedzialnych za konkretną cechę,
- 2) wprowadzania genów do komórek,
- 3) regeneracji roślin w kulturach *in vitro*.

2. Kultury *in vitro* zbóż i regeneracja roślin

Uzyskanie zbóż transgenicznych możliwe jest tylko przez transformację pojedynczych komórek i regenerację z nich roślin. Dlatego regeneracja w kulturach *in vitro* jest procesem o podstawowym znaczeniu dla inżynierii genetycznej tych roślin.

Metody kultur *in vitro* wniosły, w ostatnich dziesięciu latach, znaczący wkład w hodowlę roślin. Pozwalają one na badanie dużej liczby osobników na małej powierzchni i w krótkim czasie, a także na selekcję odpornych lub tolerancyjnych na stresy linii komórkowych, z których mogą być regenerowane rośliny.

Technika uzyskiwania haploidów w kulturach *in vitro* pylników (mikrospor) otworzyła praktycznej hodowli możliwość otrzymywania, w krótkim czasie, linii homozygotycznych, w których allele genów występują w formie recesywnej. W latach osiemdziesiątych w Chinach i we Francji wprowadzono do produkcji, uzyskane tą metodą, pierwsze odmiany. Kultury *in vitro* stały się zatem same w sobie metodą wykorzystywaną z powodzeniem w hodowli, a jednocześnie są ogniwem pośrednim w inżynierii genetycznej roślin uprawnych.

Do początku lat osiemdziesiątych istniały tylko pojedyncze doniesienia o regeneracji roślin zbóż z kultur tkankowych. W wielu przypadkach regeneracja była sporadyczna i ograniczała się do kilku genotypów. W latach osiemdziesiątych początek nowoczesnym badaniom w dziedzinie kultur tkankowych roślin zbożowych dały cztery znaczące odkrycia, a mianowicie: a) określenie rodzaju używanego eksplantatu i jego fazy rozwojowej; b) zastosowanie prostej, syntetycznej pożywki wzbogaconej auksyną; c) uzyskanie długotrwałych kultur embriogenego kalusa, w którym regeneracja odbywa się poprzez tworzenie somatycznych zarodków; d) uzyskanie embriogenych zawiesin komórkowych pochodzących z embriogenego kalusa stanowiących źródło totipotentnych protoplastów tzn. komórek pozbawionych ściany komórkowej.

3. Sposoby regeneracji

Istnieją dwie drogi regeneracji roślin w kulturach *in vitro*: somatyczna embriogeneza i organogeneza. Obydwa procesy były obserwowane w kulturach roślin z rodziny *Poaceae*, do których należą zboża. Somatyczna embriogeneza definiowana jako rozwój zarodka z komórek innych niż gamety lub produktu ich fuzji – zygoty, jest najbardziej bezpośrednią metodą regeneracji roślin.

Materiał roślinny użyty do regeneracji powinien być morfogeny i mieć zdolność do regeneracji. Embriogenne kultury mogą być zainicjowane z ontogenetycznie młodych eksplantatów zawierających aktywne merystematycznie komórki. Z tego powodu w badaniach wykorzystuje się najczęściej części roślin zawierające tkankę o silnym potencjale podziałowym komórek, takie jak młode pylniki, niedojrzałe zarodki, podstawę liścia, młode kwiatostany, merystemy wierzchołkowe pędu i korzenia.

Najczęściej stosowanymi eksplantatami zbóż są obecnie niedojrzałe zarodki i młode kwiatostany. Stosunkowo łatwo jest też otrzymać kalus z podstawy liścia. Stwierdzono, że stadium rozwojowe eksplantatu jest czynnikiem krytycznym dla otrzymania totipotentnej kultury. Tylko w bardzo krótkim przedziale czasowym w trakcie rozwoju zarodków, kwiatostanów i liści są one zdolne do tworzenia embriogennej kultury. W tym okresie pewne, wyselekcjonowane, komórki eksplantatu mają charakter merystematyczny, są tylko częściowo zróżnicowane i nie są zdolne do pełnienia żadnych wyspecjalizowanych funkcji.

Potencjalnie zawiesiny komórkowe mogą być z powodzeniem wykorzystywane do selekcji w kulturach *in vitro*, a także jako znakomite źródło protoplastów. Kultury zawiesin można uzyskać wykorzystując embriogenny kalus zainicjowany z tkanek aktywnych merystematycznie znajdujących się w tarczach niedojrzałych zarodków, młodych kwiatostanach lub kalusie z mikrospor. W ostatnich latach wykazano silny potencjał regeneracyjny zawiesin jęczmienia i pszenicy pochodzących z mikrospor. Wadą zawiesin komórkowych zbóż jest ich krótkotrwała zdolność do regeneracji. U pszenżyta wykorzystywano, jak dotąd, tylko embriogenny kalus indukowany z niedojrzałych zarodków. Z takiej zawiesiny regenerowano rośliny, po kilku miesiącach jej zdolność do regeneracji zanikała, ale wykorzystywano ją jako bardzo wydajne źródło protoplastów (7,8).

Istotną rolę w biotechnologii roślin odgrywają techniki związane z izolacją i kulturą komórek pozbawionych ściany komórkowej – protoplastów. Protoplasty stanowią jednorodną populację, do której każdy czynnik eksperymentalny dociera w tym samym czasie i z takim samym nasileniem. Zakłada się, że wskutek fuzji protoplastów roślin odległych systematycznie i somatycznej hybrydyzacji będzie można otrzymać odmiany, a nawet gatunki o pożądanych cechach użytkowych. Wszystkie wymienione techniki kultur *in vitro* znalazły lub znajdą zastosowanie w bioinżynierii roślin, także zbożowych.

Polskie prace dotyczące kultur *in vitro* i regeneracji zbóż prowadzone były w latach siedemdziesiątych i osiemdziesiątych najczęściej we współpracy z Instytutem Maxa Plancka w Kolonii (IMP). Przełomowym momentem był rok 1985 kiedy to Rybczyński i Zimny w Ogrodzie Botanicznym PAN w Warszawie i Stolarz w IMP w Kolonii udokumentowali otrzymanie somatycznych zarodków pszenżyta i żyta (1-5). Dzięki zastosowaniu metody somatycznej embriogenezy można było osiem lat później uzyskać pierwsze polskie zboża transgeniczne.

4. Transformacja

Przez wiele lat czynnikiem limitującym rozwój inżynierii genetycznej roślin zbożowych był brak efektywnej metody transformacji oraz trudności ze zregenerowaniem roślin z protoplastów. Najpierw próbowano transformować protoplasty zbóż za pomocą glikolu polietylenowego (PEG) (6-8), ale nie udało się uzyskać roślin z transformowanych protoplastów. W ciągu ostatnich dziesięciu lat zastosowano kilka innych metod transformowania zbóż. Jedną z nich jest metoda z użyciem bakterii glebowej. Metoda ta opiera się na zachodzącym w naturze zjawisku **agroinfekcji**. Główną rolę w tym procesie odgrywają bakterie glebowe z rodzaju *Agrobacterium* (*A. tumefaciens* i *A. rhizogenes*). Bakterie te zasiedlają zranioną tkankę roślin i indukują wytwarzanie w komórkach roślinnych związków zwanych opinami, które umożliwiają ich rozmnażanie. Zmodyfikowanym *Agrobacterium* zakażana jest tkanka rośliny (część liścia, korzenia, pędu). T-DNA zawierające transgen przenoszone jest przez *Agrobacterium* do komórki roślinnej.

Do niedawna przyjmowano, że rośliny jednoliścienne nie mogą być transformowane przez agroinfekcję, ponieważ nie są one naturalnymi gospodarzami dla *Agrobacterium*. Ostatnio pojawiło się jednak wiele doniesień o przeniesieniu DNA z *Agrobacterium* do komórek roślin jednoliściennych, takich jak kukurydza, ryż, jęczmień i pszenica. Metodą tą uzyskano, jak dotąd, w IHAR jęczmień do którego wprowadzono gen hemoglobiny. Metoda ta nie jest tak wydajna jak się spodziewano i większość prac nad transformowaniem zbóż prowadzona jest z wykorzystaniem metody „strzelby genowej”.

Polega ona na wstrzeliwaniu do komórek plazmidów zawierających pożądane sekwencje DNA, zaadsorbowanych na mikroskopijnych cząstkach złota. Metoda ta wymaga również doskonałego systemu regeneracji, ale już nie z protoplastów, lecz z embriogenicznej tkanki roślinnej. Stosowanie tej metody szybko się upowszechniło, pozwalając także na wydajne transformowanie roślin zbożowych. Dzięki zastosowaniu „strzelby genowej” możliwe stało się wykorzystanie do transformowania obok niedojrzałych zarodków, takich eksplantatów jak merystem wierzchołkowy lub młody kwiatostan.

W Polsce uzyskano w ten sposób rośliny pszenżyta w roku 1993 (9). W ciągu minionych siedmiu lat przeprowadzono wielostronną analizę potomstwa tych roślin. Najpierw trzeba było spełnić warunki niezbędne aby roślina została uznana za transgeniczną. Udowodnienie transformacji integratywnej wymaga spełnienia następujących warunków: a) zastosowania kontroli w trakcie transformacji i analizy, b) ścisłej korelacji między metodą i oczekiwanym wynikiem, c) ścisłej korelacji między danymi fizycznymi (*Southern blot*) i fenotypowymi (test enzymatyczny), d) wykonania kompletnej analizy typu *Southern* (sygnał w obszarze o wysokim ciężarze molekularnym), wykazania obecności kompletного genu, oraz braku kontaminacji DNA (kontrola negatywna), e) posiadania danych pozwalających na wyróżnienie fałszywych i prawdziwych transformantów, f) korelacji fizycznych i fenotypowych dowodów z przekazaniem genów potomstwu, g) przeprowadzenia molekularnej analizy potomstwa.

Warunki te zostały ogłoszone przez Potrykusa (10) i dla solidnych autorów i recenzentów stały się prawem obowiązującym. Rośliny transgenicznego pszenżyta odpowiadały tym wymaganiom (9). Następnie badano „efekt pozycji” czyli wpływ miejsca ulokowania transgeny na chromosomach na ich ekspresję. Okazało się, że geny lokowane są w genomie w sposób przypadkowy, a miejsce ich włączenia nie ma wpływu na poziom ekspresji (11). Kolejnym krokiem było ustabilizowanie linii transgenicznych w ten sposób, aby transgeny nie segregowały w kolejnych pokoleniach. Linie te ujawniały jednocześnie inne cechy ciekawe z hodowlanego punktu widzenia. W ostatnich siedmiu latach rozmnożono 11 pokoleń linii transgenicznego pszenżyta. U linii tych nie obserwowano zaniku lub osłabienia intensywności cech determinowanych wprowadzonymi genami. Dysponujemy obecnie materiałem nasiennym niezbędnym do rozpoczęcia eksperymentów polowych. W myśl artykułu 37^a Ustawy o ochronie środowiska w Polsce możliwe jest przeprowadzanie do-

świadczeń polowych po uzyskaniu zezwolenia, ale nie ma możliwości zarejestrowania odmian transgenicznych i sprzedaży materiału nasiennego. Dalsze prace nad transformowaniem pszenżyta doprowadziły do uzyskania w IHAR linii posiadających gen odporności na wirus BrSMV lub gen *dapA* wywołujący nadprodukcję lizyny. W minionych latach prowadzono też w kraju badania nad transformacją pszenicy. W roku 1996 uzyskano w Instytucie Biochemii i Biofizyki PAN transgeniczne pszenice posiadające geny *bar* i *uidA* (12). W roku 2000 ukazała się praca wykonana częściowo w Ogrodzie Botanicznym PAN na temat udanej transformacji pszenicy odpornej na białafos. Linie te jednocześnie zawierały gen płaszczka wirusa mozaiki pszenicy lub gen RNAzy III (13). W IHAR wyprowadzono kilkadziesiąt linii pszenicy odpornych na fosfotricynę oraz wykazujących ekspresję genu *uidA*. Linie te przygotowane są do doświadczeń polowych. Pszenicę odmiany Veery 5 z translokacją 1Rs transformowano genem secaliny w orientacji antysens ograniczając wytwarzanie tego białka (dane nie publikowane). Tym samym genem transformowano żyto uzyskując podobny efekt (14). Jednocześnie uzyskano linie żyta i jęczmienia odporne na fosfotricynę, przy czym jęczmień transformowano metodą agroinfekcji.

5. Uwagi końcowe

W wielu laboratoriach w kraju powstają rośliny transgeniczne, ale status prawny tak badań jak i uprawy tych roślin jest tylko tymczasowy. Odrębny akt prawny – prawo genowe jest przygotowywany i zostanie wprowadzony w życie około roku 2002. Wobec narastającej niechęci Europejczyków do żywności transgenicznej, jak się wydaje, najpierw zyskają na znaczeniu rośliny, które będą produkowały pożądane związki farmakologicznie czynne, jak szczepionki, hormony czy enzymy, a także związki nie związane bezpośrednio z żywnością.

W artykule wzmiankowane są badania własne autorów oraz opublikowane prace innych autorów polskich (tab. 1).

Tabela 1

Metody transformowania zbóż w publikacjach Polaków

Metoda transformowania	Roślina	Obiekt transformowany	Plazmid	Gen	Promotor	Wynik	Autor
PEG	żyto, jęczmień, kukurydza, ryż	protoplasty	PGLVneo1130	<i>nptII</i>	NOS	ekspresja „transient“	Junker i in., 1987 (6)
PEG	pszenżyto	protoplasty	PRT99 pLGV1103	<i>nptII</i>	CaMV 35S NOS	ekspresja „transient“	Stolarz, Lörz, 1988 (15)
PEG	pszenżyto	protoplasty	pBI 121	<i>nptII</i> <i>uidA</i>	NOS CaMV 35S	transgeniczny kalus	Rafalski, Zimny, 1994 (7)
strzelba genowa	pszenżyto	niedojrzały zarodek	pDB1	<i>bar</i> <i>uidA</i>	CaMV 35S	transgeniczne rośliny (11 pokoleń)	Zimny i in., 1995 (9)
strzelba genowa	pszenica	niedojrzały zarodek	pAHC25	<i>bar</i> <i>uidA</i>	Act 1 Ubi1	transgeniczne rośliny (12)	Dobrzańska i in., 1997 (12)
strzelba genowa	żyto	niedojrzały zarodek	pDB1	<i>bar</i> <i>uidA</i>	CaMV 35S Act 1	transgeniczne rośliny (14)	Sowa i in., 1997 (14)
kotransformacja			pAWAct – Sec	Sec1	Act 1	3 pokolenia	
strzelba genowa	pszenica	niedojrzały zarodek	PLZ11 pLZ12 pLZ14	<i>bar</i> WSMV- <i>cp</i>	Ubi1	transgeniczne rośliny (13)	Zhuang i in., 2000 (13)
kotransformacja			PAHC25M	<i>rnc70</i>			

Literatura

1. Zimny J., Rybczyński J. J., (1986), *Somatic embryogenesis of Triticale*, in: *Genetic Manipulations in Plant Breeding*, Symposium Proceedings, Berlin (West), (1985). 503-505.
2. Stolarz A., Lörz H., (1986a), *Somatic embryogenesis, cell and protoplast culture of Triticale (x Triticosecale Wittmack)*, in: *Genetic Manipulation in Plant Breeding*, Symposium Proceedings, Horn W., Jensen C. J., Odenbach W., Schieder O., Ed. W. de Gruyter, Berlin, 499-501.
3. Zimny J., Lörz H., (1986), *Somatic embryogenesis and plant regeneration from meristematic tissue of Secale cereale (rye)*, in: *Genetic Manipulations in Plant Breeding*, Symposium Proceedings, Berlin (West), (1985), 505-507.
4. Stolarz A., Lörz H., (1986b), *Z. Pflanzenzüchtung.*, 96, 353-362.
5. Zimny J., Lörz H., (1989), *Z. Pflanzenzüchtung*, 102, 89-100.
6. Junker B., Zimny J., Lührs R., Lörz H., (1987), *Plant Cell Rep.*, 6, 329-332.
7. Rafalski A., Zimny J., (1994), *In vitro culture and transformation study on Triticale*, Sesja posterowa, 8th International Congress of Plant Tissue and Cell Culture, Firenze, 114.
8. Zimny J., Rafalski A., (1993), *Biul. Instytut. Hod. i Aklim. Roślin*, 187, 127-132.
9. Zimny J., Becker D., Brettschneider R., Lörz H., (1995), *Mol. Breeding*, 1, 2, 155-164.
10. Potrykus I., (1991), *Ann. Rev. Plant Physiol., Plant Mol. Biol.*, 42, 205-225.
11. Pedersen C., Zimny J., Becker D., Gärtner A., Lörz H., (1997), *Theor. Appl. Genet.*, 94, 749-757.
12. Dobrzańska M., Krysiak C., Kraszewska E., (1997), *Acta Phusiol. Plant.*, 19, 277-284.
13. Zhang L., Rybczyński J. J., Langenberg W. G., Mitra A., French R., (2000), *Plant Cell Rep.*, 19, 241-250.
14. Sowa S., Zimny J., Lörz H., (1997), *Transgenic rye plants*, *Zeszyty Naukowe AR w Krakowie*, 318, 581-583.
15. Stolarz A., Lörz H., (1988), *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 12, 227-230.