



Znaczenie transformacji genetycznej w nowoczesnych badaniach roślin

Katarzyna Niemirowicz-Szczytt

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

The significance of plant genetic transformation for modern research

Summary

It has been over ten years now since genetically modified plants, obtained due to genetic transformation, started to be cultivated in many countries all over the world. As a rule, a GM plant is characterized by a new trait developed as a result of introduction of gene/genes (T-DNA), derived from another organism.

It seems that no sufficient attention has been paid to the fact that genetic transformation has provided a useful tool for functional plant genomics. The identification of genome sequences of a few species (such as *Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa* i *Medicago truncatula*) and significant progress in genome sequencing of some others, including trees (*Populus trichocarpa*), lead to an inevitable question about the function of genes. It is the knowledge of the function of DNA sequences that allows for their practical applications.

Insertional mutagenesis, based on T-DNA incorporation, meant to cause gene modification resulting in the development of new plant phenotypes. Mutant phenotype ensures isolation and identification of the modified gene. In order to identify the function of a gene which does not bring about phenotype changes, it is necessary to supplement an inserted DNA segment with sequences enabling the monitoring of gene expression. Gene silencing technology is another way to get the information about gene function and to control genes. New techniques are being enriched with improved chemical and physical mutation methods.

Further studies and new applications are greatly facilitated by the detection of gene functions with the use of insertional mutagenesis, gene silencing strategy and evaluation of gene expression.

Key words:

plants, genetic transformation, mutagenesis, gene silencing, gene expression.

Adres do korespondencji

Katarzyna
Niemirowicz-Szczytt,
Katedra Genetyki,
Hodowli i Biotechnologii
Roślin,
Szkoła Główna
Gospodarstwa Wiejskiego,
ul. Nowoursynowska 159,
02-776 Warszawa;
e-mail:
katarzyna_niemirowicz@
sggw.pl

1. Wprowadzenie

Od ponad dziesięciu lat rośliny genetycznie modyfikowane (uzyskane w wyniku transformacji genetycznej) są uprawiane w różnych krajach na całym świecie. Z reguły mają one nową cechę po wprowadzeniu genu/ów (T-DNA) pochodzącego z innego organizmu. Wykorzystanie roślin genetycznie modyfikowanych jest przedmiotem gorących dyskusji zarówno w Polsce jak i na całym świecie.

Mniej uwagi natomiast zwraca się na fakt, że transformacja genetyczna stała się niezwykle przydatnym narzędziem w genomice funkcjonalnej roślin (1). Poznanie sekwencji genomów kilku gatunków roślin (*Arabidopsis thaliana*, *Oryza sativa* i *Medicago truncatula*), a także szybko powstające bazy sekwencji genomów innych gatunków roślin, w tym drzew (*Populus trichocarpa*), zmusza do postawienia pytania o funkcję genów. Znajomość funkcji poznanych sekwencji pozwala na ich wykorzystanie.

2. Metody badania funkcji genu

Ustalenie funkcji genów dokonuje się przez porównanie do poznanych wcześniej genów (*in silico*), a następnie przez analizę eksperymentalną.

2.1. Genomika porównawcza (*in silico*)

Poszukiwanie podobieństwa badanego genu do wszystkich dostępnych sekwencji genów w bazie danych dostarcza nam z reguły informacji przybliżonej. Informacja ta dotyczy z jednej strony rodziny genów o podobnych właściwościach produktu białkowego, a z drugiej procentowego udziału sekwencji identycznych z wybranymi genami. Sekwencje DNA najczęściej przekształca się w sekwencje aminokwasów, gdyż brak homologii jest łatwiej wykrywalny na tym poziomie. Porównanie sekwencji DNA lub sekwencji aminokwasów może doprowadzić do wykrycia domen zasadniczych, które pełnią takie same funkcje. Wyniki porównania sekwencji w bazach danych z reguły dają informację niekompletną, o różnym stopniu użyteczności. Pomaga ona jednak w planowaniu analiz eksperymentalnych.

2.2. Genomika eksperymentalna

Do DNA mikroorganizmów stosunkowo łatwo można wprowadzać wybrane geny (np. oporności na antybiotyki) wbudowane do odpowiednich kaset. Jeśli na końcach kasety zostaną dobudowane sekwencje homologiczne do sekwencji genu, który chcemy inaktywować (badać) to pomiędzy wprowadzonym DNA i znajdującym się w komórce mikroorganizmu dojdzie do rekombinacji homologicznej. Komórkę za-

wierającą wymieniony odcinek łatwo identyfikować, gdyż będzie oporna na antybiotyki. Następnie takie komórki można badać pod kątem utraconej funkcji.

U roślin podobnie, można wprowadzić T-DNA wywołujące zmiany w genie. Przyczynia się to do powstawania nowych fenotypów. Roślina o fenotypie mutantu (mutageneza insercyjna) ułatwia izolację i identyfikację zmienionego genu. Ostatnie doniesienia świadczą o intensywnych badaniach ryżu przy zastosowaniu mutagenezy insercyjnej (2-4). Można również przeprowadzić transformację genetyczną zmierzającą do zwiększenia ekspresji (nadekspresji) genu np. przez zastosowanie odpowiednio silnego promotora. Z kolei wprowadzenie genu o znanej funkcji może spowodować ekspresję nietypową dla tego genu (ekspresja ektopowa).

Dokładne badanie funkcji genu i jego produktu białkowego jest możliwe po zastosowaniu mutagenezy ukierunkowanej, która w przypadku roślin będzie polegała na odcinaniu poszczególnych części genu, wprowadzaniu zmniejszonego odcinka genu do wektora i przeprowadzaniu transformacji. Możliwe są nie tylko delecje, ale również inne manipulacje (np. insercje, substytucje) na wytypowanym do badań genie. Wymaga to jednak przygotowania wielu wektorów i przeprowadzenia wielu transformacji komórek roślinnych. Wprowadzone ukierunkowane zmiany w genie mogą powodować śmierć komórki, a co za tym idzie brak informacji o funkcji genu.

Wprowadzanie genów do roślin jest dużo trudniejsze niż do mikroorganizmów. Tego typu eksperymenty można przeprowadzić stosunkowo łatwo tylko z *Arabidopsis thaliana*, *Nicotiana tabacum* czy *Oryza sativa*, ale będą trudne lub niemożliwe do przeprowadzenia w przypadku wielu gatunków roślin wyższych (5). Dlatego też konstruuje się układy modelowe (np. *Arabidopsis thaliana*) dla programów systematycznego poznawania genomów z kolekcjami mutantów (5) i form o skrajnie wyrażonych cechach, opracowanymi metodami transgenezy (możliwie proste, tanie, z prostą strukturą zintegrowanego locus) i metodami badania ekspresji genów. Najczęściej do komórek roślinnych geny są wprowadzane przy użyciu plazmidu Ti *Agrobacterium tumefaciens*, rzadziej przy użyciu metod biolistycznych, chociaż ta metoda jest doskonała i wykorzystywana do stabilnych, miejscowo specyficznych transformacji (6). Znajomość mechanizmów powstawania locus transgeny jest zasadnicza dla interpretacji poszukiwanej funkcji genu (7,8).

Dla wykrycia funkcji genu, który nie powoduje zmian fenotypu, do insertowanego odcinka DNA dodaje się sekwencje umożliwiające monitorowanie ekspresji genu, np. geny reporterowe (9).

Technologia wyciszania genów dostarcza informacji o funkcji genu, a także pozwala na regulowanie działania genów. Próbuje się nowych metod wyciszania genów, używając technologii transformacji przy użyciu dsRNA (10), a nawet dsDNA (11). System badania wyciszania genów za pomocą RNAi ma pewne ograniczenia (12). Pojawiają się też informacje o wykorzystaniu wirusów jako wektorów do wyciszania genów w roślinach (13). Do nowych możliwości dodaje się ciągle udoskonalane metody mutacji chemicznych i fizycznych (5).

3. Podsumowanie

Odkrywanie funkcji za pomocą mutagenезы insercyjnej, strategia wyciszania i ocena ekspresji daje możliwości dalszego poznania i wykorzystania genów u roślin. Postęp w tej dziedzinie jest możliwy również dzięki doskonaleniu technik transformacji genetycznej komórek roślinnych.

Literatura

1. Pereira A., (2000), *Transgenic Research*, 9, 245-260.
2. Pan X. K., Liu H., Clarke J., Jones J., Bevan M., Stein L., (2003), *Nucleic Acids Research*, 31, 1245-1251.
3. Sha Y., Li S., Pei Z., Luo L., Tian Y., He C., (2004), *Theoretical and Applied Genetics*, 108, 306-314.
4. Sallaud C., Gay C., Larmande P., Bes M., Piffanelli P., Piegu B., Droc G., Regad F., Bourgeois E., Meynard D., Perin C., Sabau X., Ghesquiere A., Glaszmann J. C., Delseny M., Guiderdoni E., (2004), *Plant Journal*, 39, 450-464.
5. Henikoff S., Comai L., (2003), *Annual Review of Plant Biology*, 54, 375-401.
6. Chawla R., Ariza-Nieto M., Wilson A. J., Moore S. K., Srivastava V., (2006), *Plant Biotechnology Journal*, 4, 209-218.
7. Svitashv S. H., Pawlowski W. P., Makarevitch I., Plank D. W., Somers D. A., (2002), *The Plant Journal*, 32, 433-445.
8. Makarevitch I., Svitashv S. K., Somers D. A., (2003), *Plant Molecular Biology*, 52, 421-432.
9. Abdoul-Soud M. A. M., Yun Byung Wook., Harrier L. A., Loake G. J., (2004), *Mycopathologia*, 158, 475-482.
10. Campbell T. N., Choy F. Y. M., (2005), *Current Issues in Molecular Biology*, 7, 1-6.
11. Kawai-Toyooka H., Kuramoto C., Orui K., Motoyama K., Kikuchi K., Kanegae T., Wada M., (2004), *Plant and Cell Physiology*, 45, 1648-1657.
12. Wang T., Iyer L. M., Pancholy R., Shi X. Y., Hall T. C., (2005), *New Pathologist*, 167, 751-760.
13. Naylor M., Reeves J., Cooper J. I., Edwards M. L., Wang H., (2005), *Journal of Virological Methods*, 124, 27-36.