

TRANSFORMACJA ROŚLIN ZA POŚREDNICTWEM *AGROBACTERIUM RHIZOGENES**

AGROBACTERIUM RHIZOGENES-MEDIATED TRANSFORMATION OF PLANTS

Katarzyna HNATUSZKO-KONKA¹, Piotr ŁUCHNIAK¹,
Aneta WIKTOREK-SMAGUR², Aneta GERSZBERG¹,
Tomasz KOWALCZYK¹, Andrzej K. KONONOWICZ¹

¹Katedra Genetyki Ogólnej, Biologii Molekularnej i Biotechnologii Roślin,
Uniwersytet Łódzki oraz ²Instytut Medycyny Pracy, Łódź

Streszczenie: Na przestrzeni ostatnich lat opracowano wiele prostych i skutecznych procedur transformacji roślin za pośrednictwem *Agrobacterium rhizogenes*. Ten glebowy patogen roślin wywołuje powstawanie korzeni włosnikowatych w miejscach zranienia tkanki. Podobnie jak *A. tumefaciens* jest zdolny do transferu fragmentu swojego megaplazmidu Ri do komórek roślinnych, gdzie ulega on stabilnej integracji i ekspresji. Podczas gdy indukcja transgeniczných korzeni w wyniku infekcji *A. rhizogenes* zachodzi w stosunkowo krótkim czasie, uzyskanie roślin transgeniczných za pośrednictwem *A. tumefaciens* zajmuje minimum 4 do 6 miesięcy. Co więcej, każda wiązka korzeni transformowanych pojawiająca się w wyniku transformacji za pośrednictwem *A. rhizogenes* stanowi niezależny transformant, co pozwala na uzyskanie i analizę dużej liczby niezależnych linii transgeniczných. Niniejsza praca prezentuje m.in. wybrane rezultaty badań nad zwiększeniem częstotliwości transformacji.

Słowa kluczowe: transformacja genetyczna roślin, *Agrobacterium rhizogenes*, korzenie włosnikowate.

Summary: In recent years, simple and efficient procedures for obtaining transformed roots have been developed. Much like *Agrobacterium tumefaciens*, *Agrobacterium rhizogenes*, a causative agent of hairy root disease in plants, transfers T-DNA fragment from its root-inducing (Ri) plasmid to plant cells, where it is steadily integrated and expressed. It has to be emphasized, that while it usually takes a relatively short period of time to produce transformed roots following *A. rhizogenes*-mediated transformation, at least 4–6 months are required to regenerate transgenic plants when *A. tumefaciens* carrying Ti plasmid is used. Moreover, since each transgenic root represents an independent transformation event, a large number of transformed root lines can be produced and analyzed in only a few weeks. Here, we present the results of selected research on the increase in transformation frequency.

Key words: genetic transformation of plants, *Agrobacterium rhizogenes*, hairy roots.

*Praca finansowana z grantów UŁ nr 505/0397 i 506/0996.

WSTĘP

W przypadku systemów roślinnych u podłoża wprowadzania obcych genów leży złożony proces transformacji genetycznej. Wykorzystuje on konstrukcje genowe zdolne do integracji z genomem gospodarza i nadające mu określone nowe cechy. Obecnie, nie ma wątpliwości, że problem transformacji, stabilnej integracji transgenów z genomem rośliny i ich ekspresji został rozwiązany i stanowi cenione i obiecujące narzędzie alternatywnej biosyntezy. Współczesne metody transformacji można podzielić na dwie główne grupy: wektorowe i bezwektorowe. Transformacja bezwektorowa obejmuje sposoby niewykorzystujące pośrednictwa organizmów bakteryjnych (transformacja protoplastów przy użyciu czynników fizycznych – *elektroporacja* lub chemicznych – za pomocą *glikolu polietylenowego* – PEG oraz mikrowstrzeliwanie) [31, 32]. Grupa druga natomiast to metody wykorzystujące pośrednictwo bakterii, a jej jedynym reprezentantem była do niedawna transformacja za pośrednictwem *Agrobacterium*. Obecnie wiadomo jednak, że obok przedstawicieli rodzaju *Agrobacterium*, naukowcom udało się „ujarzmzić” kilka innych gatunków bakterii, które po odpowiedniej modyfikacji są zdolne do transferu genów. Badania prowadzone na organizmach roślinnych ujawniły, że gatunki, takie jak: *Rhizobium* sp. NGR234, *Sinorhizobium meliloti* czy *Mesorhizobium loti* mogą być równie przydatne do tych celów w roślinnej biotechnologii. Warunkiem ich wykorzystania jest wprowadzenie do komórek bakteryjnych sekwencji niezbędnych dla procesu transformacji: genów wirulencji pochodzących z *Agrobacterium* oraz plazmidu binarnego niosącego region T-DNA [5, 8]. Biorąc pod uwagę, że wszystkie wymienione powyżej metody mają swoje ograniczenia, opracowano kilka alternatywnych procedur transformacji. Do tej grupy należą między innymi: elektroforeza niedojrzałych zarodków, elektroporacja komórek i tkanek, wprowadzanie DNA zamkniętego w liposomach, wytrząsanie zawiesiny komórek z mikrowłókienkami szklanymi, mikroiniekcja czy transformacja poprzez łagiewkę pyłkową. Ze względu na niską efektywność transformacji podejścia alternatywne nie znalazły szerokiego zastosowania w laboratoriach biotechnologicznych, gdzie jednym z głównych narzędzi transferu genów pozostaje nadal naturalny proces agroinfekcji [31, 32].

W latach osiemdziesiątych ubiegłego wieku, naukowcy opracowali sposób „rozbrajania” wirulentnych szczepów *Agrobacterium* pozbawiając je sekwencji onkogenów oraz bardzo często także genów syntazy opin. Dzięki temu zainfekowane tkanki mogły stać się źródłem normalnych – nieskolonizowanych roślin. Substytucja onkogenów pożądanymi transgenami oraz ich ekspresja w komórkach roślin doprowadziły do powstania nowych fenotypów. Początkowo wprowadzanie obcych genów poprzez T-DNA odbywało się w układzie *cis* w stosunku do genów *vir*, jednakże opracowanie systemu binarnego znacznie zwiększyło odsetek transformacji roślin za pośrednictwem *Agrobacterium*. Bakterie z tego rodzaju stały się natomiast powszechnie znane jako czynnik kontrolowanego horyzontalnego transferu genów, który pełni kluczową rolę zarówno w badaniach podstawowych, jak i w agrobiotechnologii [15].

Agrobacterium rhizogenes

Patogeny charakter przedstawicieli rodzaju *Agrobacterium* rozpoznany został w początkach ubiegłego wieku. Naukowcy szybko odkryli, że, obok gatunków awirulentnych (np. *A. radiobacter*), te glebowe, gramujemne pałeczki stanowią bezpośrednią przyczynę nowotworowych chorób roślin dwuliściennych, wywołując przyrost tkanki – guzowatość szyjki korzeniowej (*A. tumefaciens*, *A. vitis*) lub guzowatość trzciny (*A. rubi*), bądź zorganizowaną proliferację zainfekowanych komórek objawiającą się rozwojem i wzrostem korzeni włóśnikowatych [15]. Drobnoustroj odpowiedzialny za to ostatnie zjawisko został w 1930 roku nazwany przez Rikera *Agrobacterium rhizogenes* (od ang. *rhizogenic reaction*) [38]. Naukowcy słusznie dopatrywali się podobieństw pomiędzy mechanizmem działania *A. tumefaciens* a genozą tworzenia korzeni tumorowych. Udowodniono, że patogeniczność *A. rhizogenes* wiąże się z występowaniem plazmidu cechującego się funkcjonalnym podobieństwem do pTi *A. tumefaciens* [40, 41]. Obecnie wiadomo, że podobnie jak w przypadku tumorogenezy u podłoża ryzogenezy leży obecność w komórkach patogena plazmidu wirulencji Ri (ang. *Root inducing*) oraz aktywny transfer do komórek rośliny-gospodarza tzw. transferowego DNA – T-DNA (ang. *Transferred-DNA*) i ekspresja zlokalizowanych w nim genów [22]. Jest to jedyny znany przykład tego rodzaju transferu kwasu nukleinowego między przedstawicielami dwóch królestw [9]. Zasadniczymi, z punktu widzenia transformacji, elementami megaplazmidu Ri (około 200 kbp) jest niemobilny region wirulencji obejmujący operony *vir* oraz sekwencja T-DNA [32]. Ponadto pRi jest nośnikiem genów odpowiedzialnych za jego koniugacyjny transfer, replikację DNA plazmidu, cechę niezgodności oraz genów warunkujących katabolizm opin [17].

Opiny reprezentują zróżnicowane strukturalnie pochodne aminokwasów, które są produkowane przez zainfekowane komórki roślin w następstwie ekspresji genów bakteryjnych. Komórki tkanki tumorowej produkują jedynie ten rodzaj opin, który jest specyficzny dla infekującego szczepu. Wydzielając te substancje roślina tworzy unikalne środowisko dla *Agrobacterium*, w którym tylko te bakterie są zdolne do ich utylizacji jako źródła węgla i azotu [36, 42]. Zjawisko to nosi miano „kolonizacji genetycznej” [42].

Sekwencja T-DNA obejmuje dwie klasy genów. Pierwszą tworzy jeden z trzech (lub czterech – według niektórych autorów regulon Ri może być także nośnikiem genu syntazy mikimopiny) właściwych *A. rhizogenes* rodzajów syntaz opin – *ops* (geny kodujące syntazę kukumopin, mannopin, agropin) oraz geny związane z ich sekrecją – *ocs* [12, 32]. Druga grupa to onkogeny wywołujące niekontrolowany rozwój roślinnej tkanki tumorowej. Kodowane przez nie produkty mogą wpływać na biosyntezę fitohormonów, uwrażliwiać systemy roślinne na stężenie endogennych regulatorów wzrostu lub uczestniczyć w remodelowaniu chromatyny [16, 32]. Warto zaznaczyć, że szczepy agropinowe charakteryzują się występowaniem dwóch fragmentów T-DNA: T_L (lewy T-DNA) i T_R (prawy T-DNA), których transfer może zachodzić niezależnie [3, 17, 32, 38]. Kluczowa rola w procesie ryzogenezy przypisywana jest niosącemu onkogeny *rol* (*rolA*, *rolB*, *rolC*, *rolD*) odcinkowi T_L

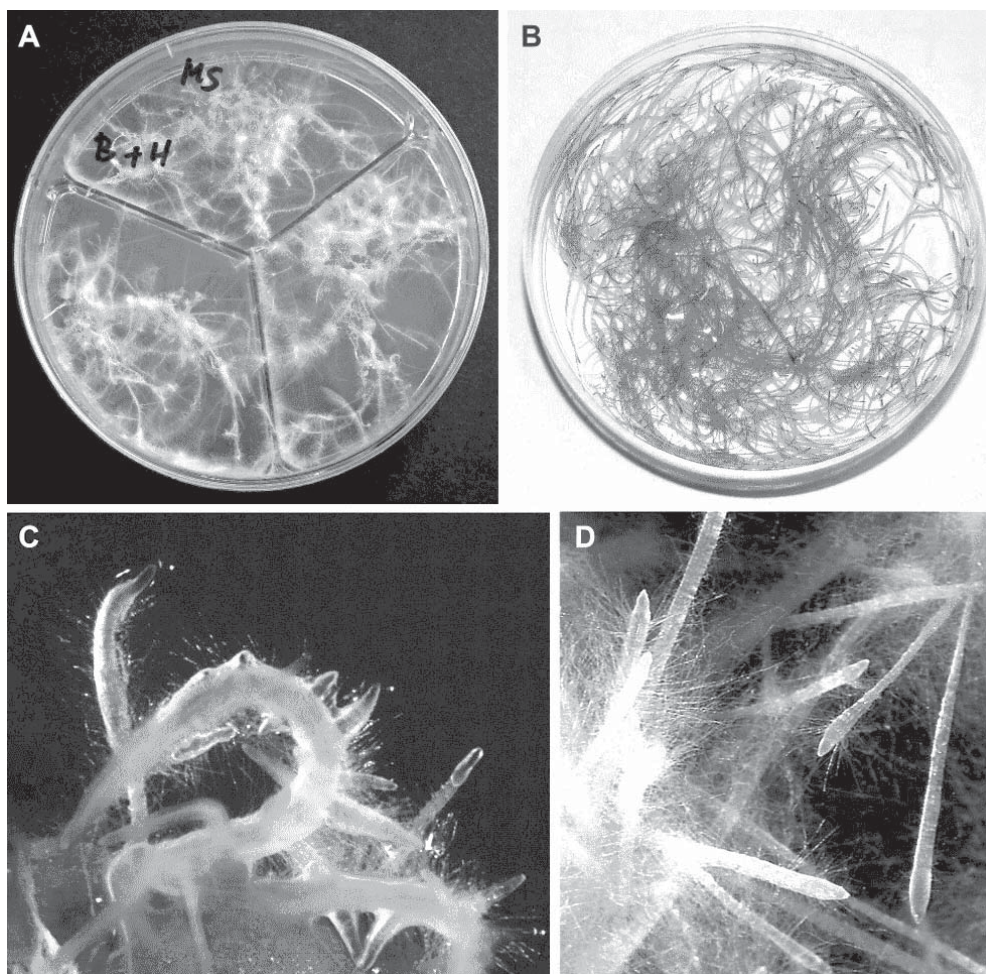
ze względu na wysoką homologię do pojedynczego T-DNA zidentyfikowanego w szczepach mannopinowych i kukumopinowych [3]. Niezależnie od budowy, region T po obu stronach jest oflankowany powtarzalnymi sekwencjami o długości 24–25 pz (RB i LB), których obecność zapewnia prawidłowe rozpoznanie T-DNA, jego wycięcie, transport oraz integrację z genomem roślinnym [32, 36, 42].

Należy zaznaczyć, że w przypadku znakomitej większości badań nad mechanizmem agroinfekcji jako patogena modelowego wykorzystywano *Agrobacterium tumefaciens*. Publikacji na temat przebiegu infekcji *A. rhizogenes* jest niewspółmiernie mniej, a informacje dotyczące tego rodzaju transformacji zdobywa się przez wyszukiwanie analogii i homologii z lepiej poznanym patogenem. Jednak, jak można zauważyć z powyższej charakterystyki wirulentne plazmidy Ti i Ri odznaczają się znacznym podobieństwem. Dotyczy ono przede wszystkim niemal identycznej organizacji regionu *vir*. Jedyne istotne odstępstwo stanowi brak w plazmidzie Ri (i w całym genomie bakteryjnym) u *A. rhizogenes* sekwencji kodujących białka VirE1 i VirE2. W przypadku niektórych szczepów funkcje wymienionych białek przejmują produkty ekspresji genów *GALLS* zlokalizowanych na wirulentnym plazmidzie. Warto zauważyć, że obok funkcjonalnej substytucji, białka GALLS (GALLS-FL i GALLS-CT) nie wykazują homologii sekwencyjnej z produktami operonu *virE*. Zaobserwowano ją natomiast pomiędzy GALLS a sekwencją aminokwasową helikaz i białek uczestniczących w koniugacyjnym transferze plazmidów [16, 19, 20, 21].

KONTROLOWANA TRANSFORMACJA

Zasięg infekcji dzikimi typami gatunków *Agrobacterium* obejmuje niewielką liczbę roślin o znaczeniu ekonomicznym. Tymczasem rekombinowane szczepy tych bakterii stały się unikalnym narzędziem w rękach biotechnologów, narzędziem pozwalającym na genetyczne modyfikacje szerokiego spektrum organizmów, w tym roślin uprawnych, ozdobnych i drzew [9, 36]. Co więcej, możliwość tych modyfikacji nie ogranicza się jedynie do przedstawicieli królestwa roślin. Wykazano bowiem, że *Agrobacteria* są zdolne do transformacji drożdży, grzybów, zarodków jeżowców czy nawet komórek ludzkich [26, 27].

Po ponad trzech dekadach wykorzystywania bakteryjnych wektorów, dostępne jest wiele procedur transferu genów. Mimo że przeważająca część tych protokołów zakładała użycie *A. tumefaciens*, transformacja roślin za pośrednictwem *A. rhizogenes* zyskuje coraz więcej zwolenników. Fakt, że uzyskanie przewidywalnej i stabilnej ekspresji transgenu nadal pozostaje problematyczne, skłania naukowców do modyfikacji stosowanych rozwiązań. Za zaadoptowaniem *A. rhizogenes* na potrzeby biotechnologii roślin przemawiają liczne czynniki. Fenotyp korzeni transformowanych charakteryzuje się szybkim, niezależnym od fitohormonów wzrostem, brakiem geotropizmu, genetyczną i biosyntetyczną stabilnością, krótkim czasem podwajania biomasy oraz łatwością utrzymywania [1, 17, 18]. Zdolność do syntezy szerokiego spektrum związków chemicznych i wysoka produktywność sprawiły, że korzenie



RYCINA 1. Korzenie włosnikowate indukowane na: A) rzodkwi, B) rzodkiewce – po reakcji na aktywność GUS, C) rzodkiewniku pospolitym, D) kapuście pekińskiej
 FIGURE 1. Hairy roots induced in: A) radish, B) radish – after GUS assay, C) *Arabidopsis thaliana*, D) headed Chinese cabbage

włosnikowate indukowano u wielu gatunków roślin dwuliściennych i nagozalążkowych [10, 35]. Należy podkreślić, że *Ri*-transformacja cieszy się dużym zainteresowaniem w przypadku modyfikacji roślin, których cykl życiowy jest szczególnie długi [17]. Przykładem mogą tu być rośliny drzewiaste, stanowiące cenne źródło papieru czy tarcicy [15, 32]. Obecnie panuje przekonanie, że *Agrobacterium rhizogenes* może być z powodzeniem wykorzystywana nie tylko w badaniach nad biologią korzeni (metabolizm, analiza funkcji genów w powiązaniu z rozwojem korzeni) czy interakcjami roślina - fitopatogen, ale także do genetycznych manipulacji roślin do celów produkcji metabolitów wtórnych, fitoremediacji czy funkcjonalnej charakterystyki genów i ich promotorów. Liczni badacze wskazują, że transformacja za pośrednictwem tego fitopatogena stanowi obiecującą alternatywę dla roślinnej

inżynierii angażującej *A. tumefaciens*. Wydaje się, że *A. rhizogenes* bez przeszkód może być wykorzystywana do produkcji przeciwciał czy rekombinowanych białek, stanowiąc nośnik plazmidów binarnych z sekwencją pożądanego transgenów [4, 6, 7, 17, 25]. Takie zastosowania *Ri*-transformacji uzasadniają regenerację z kultur korzeni włośnikowatych całych roślin, które zachowują genetyczną stabilność w trakcie kolejnych pasażów [4, 11, 17]. Co więcej, rośliny takie uzyskuje się również spontanicznie (bezpośrednio z korzeni, z pominięciem formowania kalusa), co wyklucza ryzyko wystąpienia zmienności somaklonalnej [2, 17]. Interesującą metodę uzyskiwania transgenicznych roślin z wykorzystaniem transformacji przy użyciu *A. rhizogenes* przedstawili Crane i współpracownicy [7] regenerując siewki z korzeni tumorowych tak zwanych roślin złożonych/mieszanych (*composite plants*) *Medicago truncatula*. Rośliny te złożone z przetransformowanych korzeni włośnikowatych i pędów dzikich roślin mogą być uprawiane *ex vitro*, co znacznie zmniejsza koszty ich hodowli, eliminując etap kultur tkankowych. Należy podkreślić, że system *composite plants* umożliwia badanie ekspresji transgenów w korzeniach (ang. *in root*) w kontekście całej rośliny i mogą być wykorzystywane w różnych analizach funkcji genu i w badaniach dotyczących interakcji roślina-patogen [7].

Jak widać z powyższego, stabilność genetyczna korzeni *Ri*, która znajduje odzwierciedlenie w ich przewidywalnej produktywności uzasadnia żywe zainteresowanie naukowców omawianym systemem transformacji. Stanowi on bowiem zarówno efektywne narzędzie badań podstawowych, jak i źródło biologicznie cennych związków. Do zalet podejścia wykorzystującego pośrednictwo *A. rhizogenes* zalicza się, obok właściwości samych korzeni włośnikowatych, łatwość/prostotę techniki transformacji oraz stosunkowo krótki okres otrzymywania transgenicznych korzeni (kilka tygodni w porównaniu z 4–6 miesiącami wyprowadzania transgenicznych roślin po infekcji *A. tumefaciens*) [7]. Korzenie włośnikowate mogą syntetyzować więcej niż jeden metabolit, co sprawia, że za *Ri*-transformacją przemawiają również względy ekonomiczne [17]. Co więcej, ponieważ każda wiązka korzeni pojawiająca się w miejscu infekcji stanowi niezależny transformant, z jednego eksplantatu z powodzeniem można wyprowadzić dużą liczbę niezależnych linii transgenicznych, dających w efekcie reprezentatywną pulę osobników do dalszych analiz [17, 24]. Ryzogeneza (produkcja transformowanych korzeni przy wykorzystaniu *A. rhizogenes*) jest techniką relatywnie skuteczną. Ryzogeneza została uzyskana u wielu gatunków roślin, w tym także tych o dużym znaczeniu użytkowym, jak np. *Phaseolus vulgaris*, *Phaseolus acutifolius*, *Glycine max* (L.) Merr., *Trifolium pratense*, *Nicotiana tabacum*, *Pisum sativum*, *Medicago sativa*, *Vicia faba* czy *Lotus japonicus* [24].

Powodzenie *Ri*-modyfikacji roślin zależy jednak od wielu czynników. Podobnie jak w przypadku *A. tumefaciens*, na skuteczny transfer T-DNA mają wpływ: genotyp roślin, dobór szczepu *A. rhizogenes*, gęstość (OD) inokulatu bakteryjnego, temperatura inokulacji, synteza przez roślinę induktorów fenolowych, wiek rośliny donorowej oraz jej zdolność do regeneracji [6, 26]. Nie bez znaczenia jest także sposób przeprowadzania inokulacji, parametry etapu kokultury czy metoda eliminacji bakterii po infekcji [38]. Warto zatem zauważyć, że pomimo szerokiego wachlarza

gatunków roślin, które mogą być poddane efektywnej *Ri*-transformacji, możliwości modyfikowania procedur w celu skutecznego i wydajnego transferu genów są ograniczone. Ponieważ wydajność transformacji w przypadku wielu gatunków roślin jest bardzo niska, prowadzone są liczne badania nad ulepszeniem procedur transformacji, manipulując zarówno „czynnikiem bakteryjnym”, jak i gospodarzem roślinnym bądź modyfikując parametry kokultury oraz uprawy [26].

ZWIĘKSZAJĄC WYDAJNOŚĆ TRANSFORMACJI

Obecnie podejmuje się wiele prób ulepszenia istniejących już lub opracowania nowych protokołów *Ri*-transformacji. Poniżej przedstawiono rezultaty badań nad efektywnością indukcji korzeni tumorowych u wybranych gatunków.

Nie ma wątpliwości, że jedną z kluczowych kwestii wpływających na wydajność transferu genów jest **dobór „optymalnego” szczepu *A. rhizogenes***. Pod względem wirulencji, szczepy agropinowe wydają się przeważać nad pozostałymi typami bakterii tego gatunku. Według niektórych badaczy agropinowe szczepy 15834, A4 i LBA 9402 uważane są za najbardziej wirulentne, jednakże ich zdolność do transformacji wydaje się zróżnicowana w zależności od gatunku infekowanej rośliny [1,38]. Zróżnicowanie pod tym względem stwierdzono podczas infekcji kilku gatunków *Hyoscyamus* pięcioma szczepami *Agrobacterium*: 1724, A4, 2659, 15834 i LBA 9402. Przykładowo, tylko w jednym przypadku (*Hyoscyamus arachnoideus*) szczep 15834 indukował wzrost korzeni tumorowych z najwyższą częstotliwością [1]. Podobne rezultaty otrzymano transformując należącą do tropikalnych roślin strączkowych *Sesbania rostrata*. Spośród czterech testowanych szczepów *A. rhizogenes* (15834, 2659, 1724, 8196) typ 2659 odznaczał się najwyższym potencjałem indukcyjnym, podczas gdy szczep 15834 indukował powstawanie kalusa, ale nie korzeni [37].

Powyższe wyniki sugerują zatem: albo konieczność korzystania z opracowanych już protokołów, rekomendujących dany szczep do transformacji danego gatunku rośliny albo eksperymentalną identyfikację szczepu o najwyższej wirulencji. Korzystając z wiedzy na temat transformacji roślin za pośrednictwem *A. tumefaciens* można także starać się zwiększyć wirulencję *A. rhizogenes* stosując induktory chemiczne, takie jak: acetosyringon, kwas synapinowy, wanilinę, kwas wanilinowy czy monocukry (np. arabinoza, glukoza, ksylloza, galaktoza). Zaletą takiego podejścia jest jednoczesne poszerzenie spektrum podatnych na transformację danym szczepem gatunków roślin. Z przebadanych związków fenolowych, do stymulacji procesu transferu genów najczęściej stosowany jest acetosyringon [17, 25, 38]. Wykazano, że wzbogacenie nim pożywki dla kultur *Alhagi pseudoalhagi* pięciokrotnie zwiększyło zdolność transformacji szczepu A4 [38].

Obok *Agrobacterium rhizogenes* o powodzeniu transformacji decyduje przede wszystkim roślinny gospodarz. Wybór odpowiedniego eksplantatu (tkanki lub organu) w optymalnym stadium rozwojowym jest równie istotny, co dobór infekującego szczepu. Do transformacji wybiera się zazwyczaj zdrowe, młode tkanki. Mogą to

być liście lub ich fragmenty, siewki, pędy, korzenie lub protoplasty, przy czym stosunkowo rzadko zdarza się, że tylko konkretna część rośliny jest podatna na transformację [38]. Badania prowadzone przez Fu i wsp. [13] wykazały, że transformacja należącej do rodziny astrowatych *Saussurea involucreta* z najwyższą częstotliwością zachodzi w tkankach korzeni w porównaniu z infekcją blaszek i ogonków liściowych. Podobny wysoki potencjał ryzogenezy (76,5%) zaobserwowano w eksplantatach korzeni *Taraxacum platycarpum* transformowanego szczepem 15834 *A. rhizogenes*, podczas gdy transformacja tkanek łodygi i liścieni zachodziła ze znacznie niższą częstotliwością, odpowiednio (32,7%) i (16,2%).

Czynnikiem mającym równie silny wpływ na indukcję wzrostu korzeni włośnikowatych jest **zastosowane podłoże**. W przypadku niektórych roślin, pożywki zawierające wysokie stężenia soli, jak np. MS (Murashige-Skoog) czy LS (Linsmaier-Skoog) wspomagają formowanie się korzeni tumorowych [28, 30]. Dla odmiany, niska zawartość soli (np. w pożywce B5) faworyzuje wzrost bakterii, co utrudnia ich późniejszą eliminację [14]. Co więcej, nadmierna proliferacja bakterii może hamować indukcję korzeni poprzez tzw. „konkurencję inhibicyjną” patogenów [17].

Wpływ składu pożywki na wzrost tumorowy może być zróżnicowany. Przykładowo, Akramian i wsp. [1] indukcję proliferacji prowadzili na dwóch podłożach (MS i B5). W żadnym z badanych przypadków nie odnotowali oni różnic w indukcji korzeni włośnikowatych *Hyoscyamus* zależnych od użytej pożywki [1]. Trzeba jednak podkreślić, że wpływ składu podłoża niekoniecznie musi dotyczyć indukcji korzeni włośnikowatych, ale ich późniejszego namnażania i wzrostu. Rutynowo używane pożywki zostały przetestowane pod kątem optymalizacji warunków wzrostu korzeni i skrócenia ich czasu podwajania biomasy (ang. *biomass doubling time*). Przykładowo, w badania nad *Solanum tuberosum* stwierdzono, że media B5 i SH (Schenk-Hildebrandt), obok badanych MS i WM (White) najsilniej wspomagają namnażanie korzeni tumorowych, a stosowanie pożywki B5 zapewnia podwojenie biomasy kultury tkankowej w ciągu 2,32 dnia [33, 34, 39]. Ponadto, opracowano liczne modyfikacje standardowych pożywek, wzbogacając je o różne związki. Wśród nich najczęściej stosowane są różne stężenia sacharozy i azotu [17, 29]. Dla przykładu, w 2002 roku Lourenco i wsp. [29] opublikowali wyniki swoich badań nad wpływem koncentracji wymienionych związków na wzrost korzeni włośnikowatych *Centaurea calcitrapa*. Testowane w podłożu SH stężenia sacharozy wynosiły: 10, 30, 50, 70 i 100 g/L. Dokonane po piętnastu dniach kultury pomiary uzyskanej biomasy wykazały stężenia sacharozy w przedziale 30–50 g/L jako optymalne dla namnażania korzeni tumorowych. Podobnie analizowano wpływ obecności szeregu stężeń jonów amonowych i azotanów jako źródła azotu (podstawowa pożywka SH powinna zawierać je w stężeniach: odpowiednio 2,6 i 24,7 mM). Zaobserwowany przyrost biomasy sugerował, że najwyższą przyswajalność azotu uzyskuje się wprowadzając do pożywki wyłącznie jony azotowe w koncentracji 24,7 mM [29]. Odmianą kombinację składników odżywczych zastosowali Alpizar i wsp. [2] w swoich badaniach nad proliferacją korzeni *Coffea arabica*. Do standardowej pożywki MS wzbogaconej o cysteinę, pirydoksynę, tiaminę, glicynę oraz kwas nikotynowy wprowadzali w

różnych stężeniach auksyny (IBA, IAA i NAA) oraz sacharozę. Koncentracje sacharozy, pozwalające na maksymalny przyrost biomasy korzeni ustalono na 1–2%. W przypadku egzogennych regulatorów wzrostu stwierdzono, że ich obecność jest jednym z podstawowych czynników warunkujących wzrost korzeni włośnikowatych (przy ich braku przyrost biomasy jest bardzo niski), a najbardziej pożądanym fitohormonem jest IBA w stężeniu 0,5 μM [2].

Powyższe przykłady jedynie sygnalizują zakres i rodzaj badań prowadzonych nad wpływem różnych czynników na efektywność transformacji roślin za pośrednictwem *A. rhizogenes*. Należy pamiętać, że warunki transferu genów zoptymalizowane dla danego gatunku nie muszą dać pozytywnych wyników w przypadku innych, nawet blisko spokrewnionych gatunków (a nawet odmian). Dostępnych jest jednak coraz więcej protokołów transformacji konkretnych gatunków, które mogą stanowić punkt wyjścia do opracowania procedur indukcji ryzosekrecji roślin pokrewnych. Przykładem może być opracowana przez Tao i wsp. [35] procedura transformacji *Torenia fournieri* z wykorzystaniem *A. rhizogenes*. Transformację przeprowadzono poprzez zanurzenie eksplantatów liściowych w zawiesinie bakteryjnej i kokultywację na podłożu MS. Analizie poddany został wpływ na indukcję i proliferację korzeni takich czynników, jak: szczep *Agrobacterium* (oznaczano wirulencję A4, R1000, R1601, R1205), czas infekcji (w przedziale od 5 do 20 minut), gęstość inokulum (testowany zakres od 0,5 do 1 przy OD_{600}), czas kokultywacji (od 2 do 4 dni), obecność lub brak acetosyringonu (w stężeniach 0, 10, 20, 30 i 40 $\mu\text{M/L}$), stężenie azotanu srebra (stężenia w zakresie 0,5 do 10 mg/L) oraz pH pożywki (testowane wartości: 4,5; 5,5; 6,5; 7,5). Na podstawie częstości indukcji korzeni włośnikowatych ustalono optymalną kombinację analizowanych parametrów, przy których częstotliwość transformacji wyniosła 90% (rekomendowany szczep R1000, 15 minutowy czas infekcji, gęstość optyczna około 1, 3-dniowy okres kokultywacji, acetosyringon w stężeniu 30 $\mu\text{M/L}$, pożywka MS o pH 6,5 z dodatkiem azotanu srebra w stężeniu 4 mg/L) [35]. Podobne badania przeprowadzone zostały dla *Glycine max* (L.) Merr. [6, 24]. Identyfikacja kluczowych dla transformacji soi parametrów jest szczególnie istotna, biorąc pod uwagę fakt, że reprezentuje ona trzecią co do wielkości rodzinę roślin wyższych – *Fabaceae*. Należy również podkreślić, że przedstawiciele tej rodziny zajmują drugie, za roślinami zbożowymi, miejsce na liście najważniejszych roślin uprawnych [24]. Oczywiście jest zatem, że opracowanie protokołu otrzymywania roślin złożonych (ang. *composite plants*) *Glycine max* (L.) Merr. wzbudziło szerokie zainteresowanie zarówno naukowców, jak i praktyków. Podobnie jak w przypadku *Torenia fournieri*, optymalna procedura transformacji soi jest wynikiem szeroko zakrojonych badań nad poszczególnymi jej parametrami. Szczegółowej analizie poddano między innymi znaczenie genotypu, wieku infekowanej rośliny, gęstości inokulum oraz temperatury uprawy. Częstotliwość indukcji korzeni włośnikowatych w badanych wariantach metodologicznych pozwoliła na identyfikację optymalnych parametrów. Wykazano, że spośród dziesięciu testowanych genotypów, najbardziej podatnym na transformację szczepem K599 *A. rhizogenes* jest *Glycine max* (L.) Merr. cv *Zigongdongdou*. Wykazano także, że jednodniowe siewki tej odmiany stanowią najlepszy materiał do indukcji

korzeni, która może być przeprowadzana przy 16 h fotoperiodzie zarówno przy temperaturach dnia i nocy 23/20°C, jak i 28/25°C. Jeśli chodzi o gęstość inokulum bakteryjnego nie stwierdzono znaczących różnic w indukcji w przedziale od 0,2 do 1,2 OD₆₀₀. Przy zastosowaniu zoptymalizowanych parametrów transformacja poprzez nakłuwanie igłą w obszarze węzła liścieni przyniosła u niemal 100% roślin złożonych wzrost korzeni włóśnikowatych [6].

W pracach nad optymalizacją warunków transformacji badacze oceniają wpływ nie tylko tych omówionych powyżej czynników, ale także innych, jak na przykład badany przez Jian i wsp. wpływ tzw. hodowli wstępnej (ang. *preculture*). Opublikowane przez tych badaczy wyniki dowodzą, że dwudniowa kultura wstępna (testowany przedział czasowy 0–6 dni) eksplantatów *Lotus corniculatus* (fragmenty łodygi z węzłem) na podłożu MS stymuluje proces transformacji zwiększając jej efektywność [23]. Kumar i wsp. [25] potwierdzając istnienie różnic pomiędzy gatunkami roślin w czasowej podatności (ang. *temporal competence*) na transformację za pośrednictwem *A. rhizogenes* wykazali stymulujący wpływ na efektywność transformacji wstępnego traktowania eksplantatów („krażki liściowe” *Nicotiana tabacum*) czynnikami fizycznymi (ręczne zranienie tkanki igłą, ultrasonikacja) lub chemicznymi (pektynaza, celulaza, acetosyringon lub chlorek wapnia). Największy wzrost częstotliwości transformacji (ponad 4-krotny) w porównaniu z wynikami uzyskanymi po wstępnym zranieniu eksplantatów za pomocą igły preparacyjnej (kontrola, częstotliwość transformacji = 21%) stwierdzono po transformacji w obecności acetosyringonu eksplantatów poddanych uprzednio sonikacji. Warto podkreślić, że po sonikacji eksplantatów w połączeniu z maceracją enzymatyczną stwierdzono obniżenie częstotliwości transformacji od 1,5- do 5,24-raza, w zależności od rodzaju traktowania enzymatycznego.

PODSUMOWANIE

Postęp w rozwoju technologii korzeni włóśnikowatych (transformowanych), jaki został dokonany w ostatnich latach, zasługuje na najwyższą uwagę genetyków i biologów molekularnych oraz biotechnologów. Technika transformacji genetycznej roślin za pośrednictwem *Agrobacterium rhizogenes* wykorzystywana jest obecnie zarówno w badaniach podstawowych, jak i aplikacyjnych. Korzenie transformowane wykorzystywane są w genomice funkcjonalnej oraz opracowywaniu nowych technologii na potrzeby fitoremediacji oraz produkcji metabolitów wtórnych i rekombinowanych białek o właściwościach biofarmaceutyków, enzymów diagnostycznych lub enzymów przemysłowych. U podłoża tych aplikacji leżą przede wszystkim unikalne w porównaniu z innymi roślinnymi kulturami *in vitro* właściwości tych korzeni. Nie ulega wątpliwości, że biotechnologia dysponuje obecnie szerokim wachlarzem narzędzi, który pozwoli w najbliższym czasie na pełne wykorzystanie potencjału *Agrobacterium rhizogenes*.

LITERATURA

- [1] AKRAMIAN M, TABATABAEI SMF, MIRMASOUMI M. Virulence of different strains of *Agrobacterium rhizogenes* on genetic transformation of four *Hyoscyamus* species. *Amer-Eurasian J Agri Environ Sci* 2008; **3**: 759–763.
- [2] ALPIZAR E, DECHAMPE, LAPEYRE-MONTES F, GUILHAUMON C, BERTRAND B, JOURDAN C, LASHERMES P, ETIENNE H. *Agrobacterium rhizogenes*-transformed roots of coffee (*Coffea arabica*): Conditions for long-term proliferation, and morphological and molecular characterization. *Annal Bot* 2008; **101**: 929–940.
- [3] AOKI S, SYONO K. The roles of *Rirol* and *Ngrol* genes in hairy root induction in *Nicotiana debneyi*. *Plant Sci* 2000; **159**: 183–189.
- [4] BASTIAN P, CHAVARRIA-KRAUSER A, ENGWER C, JAGER W, MARNACH S, PTASHNYK M. Modelling *in vitro* growth of dense root networks. *J Theoret Biol* 2008; **254**: 99–109.
- [5] BROOThAERTS W, MITCHELL HJ, WEIR B, KAINES S, SMITH LMA, YANG W, MAYER JE, ROA-RODRIGUEZ C, JEFFERSON RA. Gene transfer to plants by diverse species of bacteria. *Nature* 2005; **433**: 629–633.
- [6] CAO D, HOU W, SONG S, SUN H, WU C, GAO Y, HAN T. Assessment of conditions affecting *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of soybean. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 2009; **96**: 45–52.
- [7] CHABAUD M, BOISSON-DERNIER A, ZHANG J, TAYLOR CG, YU O, BARKER DG. *Agrobacterium rhizogenes*-mediated root transformation. W: The *Medicago truncatula* handbook. Mathesius U, Journet EP, Sumner LW (eds). ISBN 0-9754303-1-9. <http://www.noble.org/MedicagoHandbook/>.
- [8] CHUNG SM, VAIDYA M, TZFIRA T. *Agrobacterium* is not alone: gene transfer to plants by viruses and other bacteria. *Trends Plant Sci* 2006; **1**: 1–4.
- [9] CITOVSKY V, KOZLOVSKY SV, LACROIX B, ZALTSMANA, DAFNY-YELIN M, VYAS S, TOVKACH A, TZFIRA T. Biological systems of the host cell involved in *Agrobacterium* infection. *Cell Microbiol* 2007; **9**: 9–20.
- [10] COLLIER R, FUCHS B, WALTER N, LUTKE WK, TAYLOR CG. *Ex vitro* composite plants: an inexpensive, rapid method for root biology. *Plant J* 2005; **43**: 449–457.
- [11] DORAN PM. Foreign protein production in plant tissue cultures. *Curr Opin Biotechnol* 2000; **11**: 199–204.
- [12] ESTRADA-NAVARRETE G, ALVARADO-AFFANTRANGER X, OLIVERAS J-E, DIAZ-CAMINO C, SANTANA O, MURILLO E, GUILLEN G, SANCHEZ-GUEVERA N, ACOSTA J, QUINTO C, LI D, GRESSHOFF PM, SANCHEZ F. *Agrobacterium rhizogenes* Transformation of the *Phaseolus* spp.: A Tool for Functional Genomics. *MPMI* 2006; **19**: 1385–1393.
- [13] FU C-X, ZHAO D-X, XUE X-F, JIN Z-P, MA FS. Transformation of *Saussurea involucreta* by *Agrobacterium rhizogenes*: Hairy root induction and syringin production. *Process Biochem* 2005; **40**: 3789–3794.
- [14] GAMBORG OK, MILLER RA, OJIMA K. Nutrient requirement of suspension cultures of soybean cells. *Exp Cell Res* 1968; **50**: 151–158.
- [15] GELVIN SB. *Agrobacterium*-mediated plant transformation: the biology behind the „gene-jockeying” tool. *Microbiol Mol Biol Rev* 2003; **67**: 16–37.
- [16] GELVIN SB. *Agrobacterium* in the Genomics Age. *Plant Physiol* 2009; **150**: 1665–1676.
- [17] GIRI A, NARASU ML. Transgenic hairy roots: recent trends and applications. *Biotech Adv* 2000; **18**: 1–22.
- [18] GUILLON S, TREMOUILLAU-GUILLER J, PATI PK, RIDEAU M, GANTET P. Hairy root research: recent scenario and exciting prospects. *Curr Opin Plant Biol* 2006; **9**: 341–346.
- [19] HODGES LD, CUPERUS J, REAM W. *Agrobacterium rhizogenes* GALLS protein substitutes for *Agrobacterium tumefaciens*. *J Bacteriol* 2004; **186**: 3065–3077.
- [20] HODGES LD, LEE L-Y, McNETT H, GELVIN SB, REAM W. The *Agrobacterium rhizogenes* GALLS gene encodes two secreted proteins required for genetic transformation of plants. *J Bacteriol* 2009; **191**: 355–364.
- [21] HODGES LD, VERGUNST AC, NEAL-McKINNEY J, DULK-RASA, MOYER DM, HOOYKAAS PJJ, REAM W. *Agrobacterium rhizogenes* GALLS protein contains domains for ATP binding, nuclear localization, and type IV secretion. *J Bacteriol* 2006; **188**: 8222–8230.

- [22] HUFFMAN GA, WHITE FF, GORDON MP, NESTER EW. Hairy-root-inducing plasmid: Physical map and homology to tumor-inducing plasmids. *J Bacteriol* 1984; **157**: 269–276.
- [23] JIAN B, HOU W, WU C, LIU B, LIU W, SONG S, BI Y, HAN T. *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of Superroot-derived *Lotus corniculatus* plants: a valuable tool for functional genomics. *BMC Plant Biol* 2009; **9**: 78.
- [24] KERESZT A, LI D, INDRASUMUNARA, NGUYEN CDT, NONTACHAIYAPOOM S, KINKEMA N, GRESSHOFF PM. *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of soybean to study root biology. *Nat Protoc* 2007; **2**: 948–952.
- [25] KUMAR V, SHARMAA, PRASAD BCN, GURURAJ HB, RAVISHANKAR GA. *Agrobacterium rhizogenes* mediated genetic transformation resulting in hairy root formation is enhanced by ultrasonication and acetosyringone treatment. *Electr J Biotech* 2006; **9**: 349–357.
- [26] LACROIX B, KOZLOVSKY SV, CITOVSKEY V. Recent Patents on *Agrobacterium*-Mediated Gene and Protein Transfer, for Research and Biotechnology. *Recent Patents on DNA & Gene Sequences* 2008; **2**: 69–81.
- [27] LACROIX B, TZFIRA T, VAINSTEIN A, CITOVSKEY V. A case of promiscuity: *Agrobacterium*'s endless hunt for new partners. *Trends Genet* 2006; **22**: 29–37.
- [28] LINSMAIER EM, SKOOG F. Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 1965; **18**: 100–127.
- [29] LOURENCO PML, DE CASTRO S, MARTINS TM, CLEMENTE A, DOMINGOS A. Growth and proteolytic activity of hairy roots from *Centaurea calcitrapa*: effect of nitrogen and sucrose. *Enzyme Microb Tech* 2002; **31**: 242–249.
- [30] MURASHIGE T, SKOOG F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 1962; **15**: 473–497.
- [31] RAKOCZY-TROJANOWSKA M. Alternative methods of plant transformation – a short review. *Cell Mol Biol Lett* 2002; **7**: 849–858.
- [32] RAKOCZY-TROJANOWSKA M. Wprowadzanie genów do roślin. W: Malepszy S [red.] *Biotechnologia Roślin*. PWN Warszawa 2007: 233–246.
- [33] SCHENK RU, HILDERBRANDT. AC. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous plant cell cultures. *Can J Bot* 1972; **50**: 199–204.
- [34] SUNIL KUMAR GB, GANAPATHI TR, SRINIVAS L, REVATHI CJ, BAPAT, VA. Expression of hepatitis B surface antigen in potato hairy roots. *Plant Sci* 2006; **170**: 918–925.
- [35] TAO J, LI L. Genetic transformation of *Torenia fournieri* L. mediated by *Agrobacterium rhizogenes*. *S Afr J Bot* 2006; **72**: 211–216.
- [36] TZFIRA T, CITOVSKEY V. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of plants: biology and biotechnology. *Curr Opin Biotechnol* 2006; **17**: 147–154.
- [37] VAN DE VELDE W, MERGEAY J, HOLSTERS M, GOORMACHTIG S. *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of *Sesbania rostrata*. *Plant Sci* 2003; **165**: 1281–1288.
- [38] WASILEWSKA A, KRÓLICKA A. Otrzymywanie i charakterystyka kultur korzeni włosnikowatych. *Biotechnologia* 2005; **4**: 173–188.
- [39] WHITE PR. *The Cultivation of Animal and Plant Cells*. The Ronald Press, New York, 1963: 228 ss.
- [40] WHITE FF, NESTER EW. Hairy Root: Plasmid encodes virulence TrqKts in *Agrobacterium rhizogenes*. *J Bacteriol* 1980; **141**: 1134–1141.
- [41] WHITE FF, NESTER EW. Relationship of plasmids responsible for hairy root and crown gall tumorigenicity. *J Bacteriol* 1980; **144**: 710–720.
- [42] ZUPAN JR, MUTH TR, DRAPER O, ZAMBRYSKI P. The transfer of DNA from *Agrobacterium tumefaciens* into plants: A feast of fundamental insights. *Plant J* 2000; **23**: 11–28.

Prof. dr hab. Andrzej Kiejstut Kononowicz,
Katedra Genetyki Ogólnej, Biologii Molekularnej
i Biotechnologii Roślin, Uniwersytet Łódzki
ul. Banacha 12/16, 90-237 Łódź
e-mail: akononow@biol.uni.lodz.pl