

DOLOČANJE TRANSGENOV V HMELJU PO TRANSFORMACIJI Z *Agrobacterium tumefaciens*

Suzana ŠKOF, Zlata LUTHAR²

UDK/UDC 633.791:579.64:57.084/.085 (045)
izvirni znanstveni članek/original scientific article
prispelo/received: 17. 10. 2005
sprejeto/accepted: 25. 11. 2005

IZVLEČEK

V nodije hmelja sorte Aurora smo s posredno transformacijo z *Agrobacterium tumefaciens* vnesli testni *gus* (*uidA*) gen in rastlinski selekcijski *nptII* gen. Izražanje testnega *gus* gena smo preverjali z metodo histokemičnega GUS testa aktivnosti β -glukuronidaze v poganjkih nastalih na transformiranih izsečkih. Na podlagi GUS testa je bilo 10,7 % nastalih regenerantov uspešno transformiranih. Z molekulsko analizo modro obarvanih regenerantov (GUS pozitivnih regenerantov) smo s PCR metodo (polimerazno verižno reakcijo) preverili vključenost testnega in selekcijskega gena v rastlinski genom in v večini primerov potrdili vključenost obeh transgenov.

Ključne besede: hmelj, transformacija, *Agrobacterium tumefaciens*, *gus* gen, *nptII* gen

IDENTIFICATION OF TRANSGENES IN HOP AFTER *Agrobacterium*- MEDIATED TRANSFORMATION

ABSTRACT

Agrobacterium-mediated transformation of hop nodal explants was used for the introduction of a *gus* (*uidA*) marker gene and *nptII* plant selection gene into commercial hop cv. Aurora. Expression of the *gus* gene was evaluated by histochemical analysis of β -glucuronidase (GUS) activity in shoots that emerged on transformed hop explants. GUS staining revealed a relatively high transformation efficiency (10.7 % of all regenerants). Molecular analysis of blue coloured plants (GUS positive regenerants) by the PCR method (polymerase chain reaction) was used to detect integration of marker and selection genes into the hop genome and in the majority of cases confirmed the integration of both transgenes.

Key words: hop, transformation, *Agrobacterium tumefaciens*, *gus* gene, *nptII* gene

¹ asist., univ. dipl. ing. agr., Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Katedra za genetiko, biotehnologijo in žlahtnjenje rastlin, Jamnikarjeva 101, 1000 Ljubljana, Slovenija

² izr. prof., dr., ibid

1 UVOD

Novejše biotehnološke metode genskih transformacij predstavljajo dopolnitev in privlačno alternativo klasičnemu žlahnjenju hmelja, ki je dolgotrajen postopek tudi zaradi specifičnih lastnosti (dvodomna trajnica). Genske transformacije omogočajo relativno hitro vključitev željenih lastnosti v genom že obstoječih sort hmelja ne da bi spremenili njihove kvalitativne agronomsko pomembne lastnosti.

Predpogoj za učinkovit vnos željenih genov je visok odstotek regeneracije *in vitro*. Le nekaj avtorjev poroča o uspešni regeneraciji hmelja, največkrat preko oblikovanja kalusa na izsečkih, bodisi divjih varietet [1, 2] ali komercialnih sort hmelja [3]. O direktni regeneraciji dveh čeških kultivarjev hmelja poročata Rakouský in Matoušek [13]. Le nekaj objav poroča o začetkih transformacij pri hmelju. Dosedaj so dosegli le prehodno izražanje *gus* testnega gena v kalusnem tkivu [12] in stabilno izražanje *gus* testnega gena in to samo pri dveh tesno sorodnih genotipih hmelja Tettnanger in Saaz [5, 11]. Ker je regeneracija pri hmelju močno odvisna od genotipa [3], je potrebno razviti modificiran protokol regeneracije in posledično transformacije za vsako sorto/kultivar posebej. Do sedaj ni poročil o uspešni regeneraciji in transformaciji katerekoli slovenske sorte oz. divje oblike hmelja.

V raziskavi smo poskušali vzpostaviti učinkovit transformacijski sistem s pomočjo posrednega vnosa genov z bakterijo *Agrobacterium tumefaciens* pri najbolj razširjeni slovenski sorti hmelja Aurora. Izražanje vnešenega testnega *gus* (β -glukuronidaza) gena smo preverili s histokemičnim GUS testom, vključitev testnega in selekcijskega *nptII* (odpornost na antibiotik kanamicin) gena v rastlinski genom s PCR analizo.

2 MATERIAL IN METODE

2.1 Rastlinski material, kokultivacija z *Agrobacterium* in regeneracija transformiranih rastlin

Iz *in vitro* gojenih rastin sorte hmelja Aurora smo narezali nodije in jih gojili tri dni na regeneracijskem gojišču z MS [10] makro in mikroelementi ter vitamini z dodanim inozitolom 100 mg/l, glukozo 20 g/l, TDZ 1 mg/l, IAA 0,025 mg/l, acetosiringonom 100 μ M in agarjem 8 g/l; pH 5,8.

V tekočem YEB gojišču smo gojili do logaritemske faze rasti *Agrobacterium tumefaciens* sev LBA4404 z vnešenim pCAMBIA2201 plazmidom, ki je vključeval testni *gus* gen z intronom in selekcijski *nptII* gen, oba pod kontrolo CaMV 35S promotorja.

Izsečke hmelja - nodije smo potopili v suspenzijo z *Agrobacterium* (10 min), izpostavili ultrazvoku (60 s) in vakuumu (10 min) ter nato še pustili v bakterijski suspenziji (10 min), posušili na sterilnem filterskem papirju in prestavili na regeneracijsko gojišče s 100 μ M acetosiringonom. Po treh dneh kokultivacije smo izsečke sprali z raztopino antibiotika timentin [100:1 tikarcilin : klavulonska kislina] 200 mg/l, osušili na sterilnem filterskem papirju

in prestavili na regeneracijsko gojišče s timentinom 150 mg/l, da bi preprečili rast *Agrobacterium*. Gojili smo jih v rastni komori pri 16/8 h (svetloba/tema) fotoperiodi, temperaturi 24 ± 1 °C in osvetlitvi $40 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$.

2.2 Histokemični test aktivnosti *gus* gena

S histokemičnim GUS testom smo testirali aktivnost *gus* gena v listih novo nastalih poganjkov na kalusnem tkivu. Obarvanje z raztopino X-Gluc (5-bromo-4-kloro-3-indolil glukoronid) smo izvedli 110 dni po okuževanju izsečkov z *Agrobacterium* [6, 4]. Celice, v katerih se izraža *gus* gen, se obarvajo modro.

2.3 Molekulska analiza rastlinskega materiala s PCR metodo

Celokupno genomsko DNA smo izolirali iz transformiranih poganjkov z izraženim *gus* genom in kontrolnih netransformiranih rastlin po protokolu s CTAB detergentom [7]. Koncentracijo izolirane DNA smo določili z mini DNA fluorometrom (TKO 100) in jo razredčili na 20 ng/ μl .

S PCR analizo smo preverili vključitev testnega in selekcijskega gena. Uporabljeni specifični začetni oligonukleotidi (GUS3for/GUS3rev, NPTIIa/NPTIIb) so bili narejeni za pomnožitev fragmenta 408 bp pri *gus* oz. fragmenta 650 bp pri *nptII* genu. PCR reakcijska mešanica je vsebovala 1 \times PCR pufer, 0,1 mM vsakega deoksinukleotid trifosfata, 0,5 mM ustreznega začetnega oligonukleotida (GUS ali NPT), 1 enoto Taq DNA polimeraze in ustrezen volumen DNA vzorca. Namnoževanje DNA je potekalo v cikličnem termostatu (Thermal Cycler 480) po modificiranem temperaturnem profilu [8]: začetna denaturacija DNA pri 94 °C 5 min, nato 35 ciklov: 1 min pri 94 °C, 1 min pri 58 °C in 1,5 min pri 72 °C ter končno izdolževanje fragmentov 5 min pri 72 °C. Namnožene fragmente smo ločevali na 1,4 % agaroznem gelu in vizualizirali z etidijevim bromidom pod UV svetlobo.

3 REZULTATI

110 dni po okužbi izsečkov z *Agrobacterium tumefaciens* smo z GUS testom preverili izražanje testnega *gus* gena v regeneriranih poganjkih nastalih na kalusnem tkivu. Med 475 testiranimi poganjki jih je imelo 51 vsaj eno modro točko (preglednica 1) in od teh 14 intenzivnejše modro obarvanje.

Preglednica 1: GUS test na listih poganjkov, nastalih na izsečkih sorte hmelja Aurora 110 dni po okužbi z *Agrobacterium*

Table 1: GUS-assay of shoots's leaves formed on explants of hop cv. Aurora performed 110 days after *Agrobacterium*-mediated transformation

Testirani poganjki	GUS pozitivni* poganjki	Odstotek transformacije (%)
475	51	10,7

*Vsaj ena modra točka

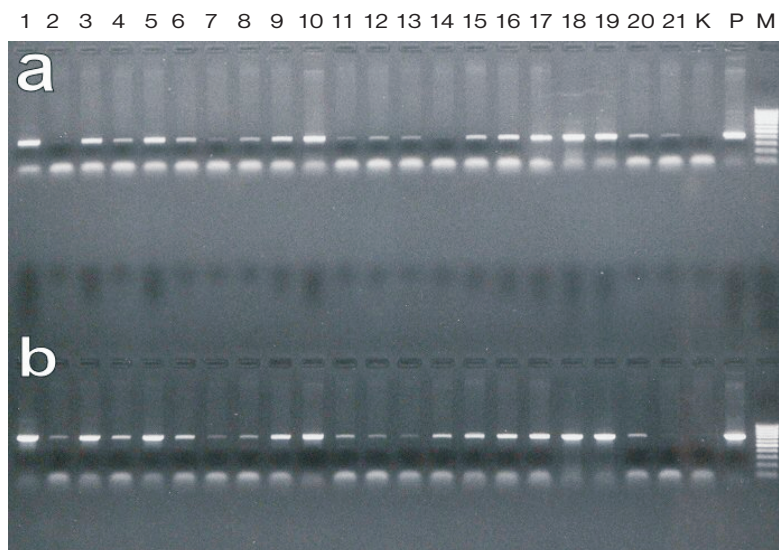
Pri 47 GUS pozitivnih poganjkih jih je bilo 14 intenzivneje modro obarvanih in 33 z vsaj eno modro točko. Pri teh smo preverili vključitev testnega *gus* in selekcijskega *nptII* gena v rastlinski genom s PCR metodo (slika 1). Rezultati so prikazani v preglednici 2.

Preglednica 2: PCR analiza 47 z GUS testom pozitivnih regenerantov hmelja

Table 2: PCR analysis of 47 with GUS-assay positive hop regenerants

Štev. regenerantov z vgrajenimi transgeni	Vgrajeni transgeni			
	<i>gus</i> in <i>nptII</i>	samo <i>gus</i>	samo <i>nptII</i>	brez obeh
14 intenzivno modro obarvanih regenerantov	10	1	1	2
33 regenerantov z le nekaj modrimi točkami	22	3	3	5

Od 14 analiziranih poganjkov, ki so bili intenzivneje modro obarvani z GUS testom, jih je imela večina, kar 71,4 % vgrajen tako testni (*gus*) kot selekcijski (*nptII*) gen, 7,1 % samo *gus* ali samo *nptII* gen in 14,3 % nobenega od transgenov. Podobno smo pri 33 poganjkih z le nekaj modrimi točkami zaznali večinoma prisotnost obeh transgenov (66,7 %), 9,1 % jih je vsebovalo le enega od obeh transgenov ter 15,1 % nobenega.



Slika 1: PCR analiza vključitve testnega *gus* (a) in selekcijskega *nptII* (b) gena v genom 21 transformiranih regenerantov hmelja. 1 do 21 - transformirane rastline, K - netransformirana rastlina, P - plazmid pCAMBIA2201, M - marker GeneRuler 100bp DNA Ladder (Fermentas)

Figure 1: PCR analysis of marker *gus* (a) and selection *nptII* (b) gene integration into genome of 21 transformant hop regenerants. 1 to 21 - trasformed hops; K - control plant, P - pCAMBIA2201; M - marker GeneRuler 100bp DNA Ladder (Fermentas)

Iz slike 1 je razvidno, da se pri transformantih št. 2 in 14 ni namnožil DNA fragment pribl. dolžine 408 bp (*gus* gen) (slika 1a), medtem ko se je namnožil DNA fragment pribl. dolžine 650 bp, ki potrjujejo vključenost *nptII* gena (slika 1b). Pri transformantu št. 21 pa se je ravno obratno namnožil DNA fragment, ki potrjuje vključenost *gus* gena (slika 1a), ni pa fragmenta *nptII* gena (slika 1b).

4 RAZPRAVA IN SKLEPI

GUS test smo izvedli več kot tri mesece po okužbi izsečkov hmelja z *A. tumefaciens*, zato je modro obarvanje testiranih regeneriranih poganjkov pokazalo ne le prehodno temveč stabilno izražanje testnega *gus* gena. Testirani listi nekaterih transgenih regenerantov so imeli večja intenzivno modra področja, drugi le nekaj modrih točk. Opazili smo tudi modro obarvanje pretežno v žilnem tkivu, kar so opazili tudi pri drugih rastlinskih vrstah [9]. Intenzivnost in vzorec modrega obarvanja sta odvisna od mesta vključitve in števila kopij *gus* gena, ki se naključno vgradi v rastlinski genom in od opremljenosti gena s promotorjem. Na podlagi GUS testa smo dobili relativno visok odstotek uspešnosti transformacije (10,7 % vseh na izsečkih nastalih regenerantov). Horlemann in sod. [5] poročajo o 2,9 % GUS pozitivnih organogenih skupkih.

PCR se lahko uporablja kot rutinsko analitično orodje za hitro analizo prisotnosti transgenov v transformiranih rastlinah. Ker je bil *gus* gen v našem primeru opremljen z intronom, kateri onemogoča izražanje gena v bakteriji, so bili preprečeni PCR lažno pozitivni rezultati zaradi možne kontaminacije rastlinskega materiala z *Agrobacterium*, ki lahko ostane v kulturi. Od testiranih 47 GUS pozitivnih regenerantov jih je imela večina, kar 70 % vgrajena tako testni kot selekcijski gen, manjši del 8 % le enega od obeh in 14 % nobenega od obeh (preglednica 2). Pri transformaciji se vgradi v rastlinski genom celotni genski konstrukt (v našem primeru *gus* in *nptII* gen). V primerih, ko smo detektirali le enega od obeh transgenov, je lahko prišlo do mutacij/delekcij ali modifikacij samo v enem delu genskega konstrukta, še posebej je to verjetneje za *nptII* gen, ker v gojišču za regeneracijo ni bilo selekcijskega antibiotika. Lahko je šlo tudi za himerno tkivo (samo del celic je bil uspešno transformiran) in je sčasoma netransformirano tkivo preraslo transgeno tkivo, kar se je najverjetneje zgodilo tudi v primerih, ko v predhodno GUS pozitivnih regenerantih nismo detektirali nobenega od transgenov. Horlemann in sod. [5] so s PCR preverili vključitev le selekcijskega *nptII* gena in ugotovili, da so imeli vsi GUS pozitivni organogeni skupki, ki so rasli na selekciji tudi vključen selekcijski (*nptII*) gen. V primeru, če se genski konstrukt vgradi na mesto v genom, ki ni kodirajoče se ga lahko dokaže z molekulskimi analizami, vendar se gen ne izraža, ni funkcionalen in ne zasledimo produkt oz. lastnost. Stabilnost transgena je potrebno testirati tako na DNA nivoju, kot njegov produkt oz. produkte tudi na potomcih.

Vzpostavljeni transformacijski protokol je prvi objavljeni pri slovenski sorti hmelja Aurora in nam bo služil kot osnova za vnos agronomsko pomembnih lastnosti (npr. odpornost na bolezni) v najbolj razširjeno slovensko sorto.

5 LITERATURA

1. Batista, D., Sousa, M.J., Pais, M.S., Plant regeneration from stem and petiole-derived callus of *Humulus lupulus* L. (hop) clone Bragança and var. Brewers's Gold.- In Vitro Cellular and Developmental Biology- Plant, 32(1996) s. 37-41.
2. Batista, D., Ascensão, L., Sousa, M.J., Pais, M.S., Adventitious shoot mass production of hop (*Humulus lupulus* L.) var. Eroica in liquid medium from organogenic nodule cultures.- Plant Science, 151(2000) s. 47-57.
3. Gurriarán, M.J., Revilla, M.A., Tamés, R.S., Adventitious shoot regeneration in cultures of *Humulus lupulus* L. (hop) cvs. Brevers Gold and Nugget.- Plant Cell Reports, 18(1999) s. 1007-1011.
4. Hiei, Y., Ohta, S., Komari, T., Kumashiro, T., Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA.- The Plant Journal, 6(1994) 2, s. 271-282.
5. Horlemann, C., Schwekendiek, A., Höhnle, M., Weber, G., Regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation of hop (*Humulus lupulus* L.).- Plant Cell Reports, 22(2003) s. 210-217.
6. Jefferson, R.A., Kavanagh, T.A., Bewan, M.W., GUS fusions: â-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants.- The EMBO Journal, 6(1987) s. 3901-3907.
7. Kump, B., Svetek, S., Javornik, B., Izolacija visokomolekularne DNA iz rastlinskih tkiv.- Zbornik Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani, Kmetijstvo, 59(1992) s. 63-66.
8. Lakshmi, S.G., Sreenivas, G.L., Bhattacharya, A., *Agrobacterium* mediated transformation of sandalwood (*Santalum album* L.) a tropical forest tree.- Plant Tissue Culture and Biotechnology, 4(1998) s. 189-195.
9. Mercuri, A., De Benedetti, L., Burchi, G., Schiva, T., *Agrobacterium*-mediated transformation of African violet.- Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 60(2000) s. 39-46.
10. Murashige, T., Skoog, F., A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures.- Physiologia Plantarum, 15(1962) s. 473-497.
11. Okada, Y., Saeki, K., Inaba, A., Suda, N., Kaneko, T., Ito, K., Construction of a gene expression system in hop (*Humulus lupulus*) lupulin gland using valerophenone synthase promoter.- Journal of Plant Physiology, 160(2003) s. 1101-1108.
12. Oriniaková, P., Pavingerova, D., Matoušek, J., Methodical aspects of hop *Humulus lupulus* L.) genetic transformation.- Rostlinna Výroba, 45(1999) s. 219-227.
13. Rakouský, S., Matoušek, J., Direct organogenesis in hop-a prerequisite for the application of *A. tumefaciens*-mediated transformation.- Biologia Plantarum, 36(1994) s.191-200.