

TRANSZFORMÁCIÓS MARKEREK ÉS NEGATÍV SZELEKCIÓS GÉNEK
 AGROBACTERIUM ÁLTALI NÖVÉNYI TRANSZFORMÁCIÓHOZ
 Czakó Mihály

1981-ben, miután szakbiológus oklevelet szereztem a József Attila Tudományegyetemen, az MTA Szegedi Biológiai Kozpontja Növényélettani Intezetének "Növényi Sejtgenetika" laboratóriumában kezdtem el ismerkedni a kísérletes szomatikus sejtgenetikával Dr. Maliga Pál és Dr. Márton László irányításával. Akkoriban kezdett gyarapodni a tudásanyag a növényi gének szerkezetéről és tulajdonságairól és kezdett kibontakozni a növényi géntranszfer technológia. Ezzel kapcsolatban különös hangsúlyt kapott az *Agrobacterium* biológiája és természetes géntranszfer képessége mivel ez fontos genetikai eszköznek ígérkezett - ahogyan azt a modern növényi molekuláris biológia tanúsíthatja. Akkoriban szükség mutatkozott és azóta is szükség van kedvező genetikai tulajdonságokkal rendelkező vagy jól térképezett modellnövények *in vitro* szövet- és sejttenyésztési technológiáinak, pozitív és negatív transzformációs marker gének, valamint az *Agrobacterium* biológiájáról szerzett ismereteink egyidejű fejlesztésére. Ezért dolgozom a növényi szövet- és sejttenyésztés, *Agrobacterium* biológia és növényi molekuláris biológia egymással szorosan összefonódó és kölcsönösen összefüggő területein, amelyeken elért eredményeimet az alábbi paragrafusokban foglaltam össze [az e téren született tudományos dolgozatok teljes címe és a folyóiratok szögletes zárójelben aláhúzva szerepelnek a szövegben].

I. Az 1986-ig, vagyis a "doctor universitatis" fokozat megszerzéséig, tartó időszakban gyűjtöttem az I. paragrafusban összefoglalt adatokat - amelyekből írt disszertáció címe: "Az oktopin-típusú *Agrobacterium tumefaciens* tumorindukáló-plazmid TR-regiójának integrálódása *Nicotiana plumbaginifolia* protoplaszt-transzformációs rendszerben", továbbá azoknak az adatoknak a többségét, amelyekből később további három közlemény (IV., VI. és VII. paragrafusok) született.

Egy *Agrobacterium*-általi egysejt-transzformációs rendszert dolgoztunk ki *Nicotiana plumbaginifolia* VIV. növényfajban, amely egy gyakran használt euploid modell a növényi sejtgenetikában. *Nicotiana plumbaginifolia* protoplasztok és *Agrobacterium tumefaciens* (az I-es biotípusú Ach5 törzs) sejtek együttenyésztése után izoláltunk egy transzgenikus növényt (101-es vonal) amelynek kromoszómájába csak az ugynevezett TR-regió, vagy "jobboldali transzfer DNS" épült be egyetlen kópiában az *Agrobacterium* tumorkeltő (Ti-) plazmidjából [Czakó M., Márton L. (1986) Independent integration and seed transmission of the T_R-DNA of the octopine Ti plasmid pTi Ach5 in *Nicotiana plumbaginifolia*. Plant Molecular Biology 6: 101-109]. A 101-es vonalból lehetséges volt teljes növényeket regeneráltatni, és ezekben a növényekben kimutatható volt a TR-DNS jelenlétére jellemző agropin és mannopin. Az agropin/mannopin szintézis képessége 3:1-es domináns öröklésmentet mutatott az önbeporzással nyert nemzedékben. Ugyanakkor 1:1 hasadás mutatkozott vad típussal való keresztezés után. Ezek az öröklődési arányok arra mutattak, hogy a TR-DNS egyetlen kromoszómába volt csak beépülve. Továbbá, mivel minden egyes regenerált növény (32) tetraploidnak (2n=40) bizonyult, a 101-es transzgenikus vonal úgy keletkezhetett, hogy a TR-DNS integrálódása egy eredetileg diploid recipiens sejt tetraploidizálásához vezető endomitotikus ciklusában, leghamarább a második S-fázisban következett be. A DNS-DNS hibridizáció eredményei megerősítették, hogy csak TR-DNS, és a TL-DNS egyáltalán nem, épült be a genomba. Ez az első olyan növény amelyben bizonyítottan a TR-DNS TL-DNS-től független integrálódása történt egy oktopin-típusú Ti-plazmidból, amely kettő, de azelőtt mindig látszólag együttjáró T-regióval rendelkezik.

A hormonmentes táptalajon történt szelekcióból származó többi transzformáns analízise további hasznos információkat szolgáltatott. A kizárólag TL-DNS markereket mutató, vagyis hormon-



autotróf és oktopin szintetizáló, transzformánsok száma egy nagyságrenddel nagyobb volt mint a mind TL- és TR-DNS markeret mutató transzformánsok száma. Nem mindegyik TL- vagy TR-DNS marker fejeződött ki minden egyes transzformánsban, ami további különböző fenotípus kategóriákat eredményezett. Homogén differenciálatlan, vagy hajtás-teratóma típusú növekedés kombinálódott egy, több vagy az összes lehetséges opin vegyület szintézisével; például az agropin mellől hiányzott a prekuzora, a mannopin, egyes transzformánsokból. 5-Azacidinnel, ami egy ismert DNS demetilációt okozó vegyület, lehetséges volt reaktiválni az agropin szintézist három ilyen transzformáns kivételével. Ezekben a sejtvonalakban az agropin bioszintézis gént hordozó TR-DNS átrendeződése volt kimutatható DNS-DNS (Southern) hibridizációval.

Az agropin és mannopin szintézis hasonló kategóriáit észleltük az A281 *Agrobacterium* törzs (szintén I-es biotípusú, de az un. succinamopin-típusú pTiBo542 Ti-plazmidot hordozza) által transzformált sejtvonalakban.

II. Túl azon, hogy a fenti kísérletek bizonyítékokat szolgáltatottak a TR-DNS önálló integrálódására, a részletesen jellemzett 101-es vonal egy kiváló recipiensnek ígérkezett egy homológ rekombináción alapuló irányított géncsere kísérlethez amelyben kettős crossing-over játszódhat le a kromoszómába integrálódott TR-DNS és a fölülfertőzés során újonnan bejutó transzformáló plazmid DNS homológ szakaszai között. Reciprok rekombinációt nem sikerült megfigyelni, de a kromoszómába integrálódott TR-DNS átrendeződését igen [Czakó M, Kanevsky IF, Márton: Introduction of homologous sequences cause rearrangements of the cognate gene in *Nicotiana plumbaginifolia*, manuscript in preparation].

III. Az előbbi kísérletsorozatból származó transzformánsokban gyakran szokatlanul hosszú T-DNS-t találtunk. Részletes analízis kimutatta, hogy ezekben az esetekben nemcsak a szokásos T-régió épült be a növényi genomba, hanem az egész plazmid [Czakó M, Márton L.: Frequent integration of long T-DNAs extending through the binary vector in *Nicotiana plumbaginifolia*, manuscript in preparation]. Ezek a megfigyelések megváltoztatják a T-régió átvitel mehanizmusáról alkotott elképzeléseinket és újabb kísérletek szükségességére világítanak rá.

IV. Az opin vegyületek szintézisének képessége - amint az az I. paragrafusból kitűnik - hasznos bélyeg(ek) a transzformált állapot kimutatásában. Az opin vegyületek alacsony molekulatömegű növényi anyagcsere termékek, amelyeknek szintézisét kódoló genek az *Agrobacterium* Ti-plazmidból a növényi kromoszómába beépülő T-DNS-en található. Az opin vegyületek fontos szerepet játszanak a növényi sejt *Agrobacterium* általi géntranszferen alapuló 'genetikai gyarmatosításában'. Egy sor III-as biotípusú *Agrobacterium* izolátum jellemzése során egy a tudomány számára új opin vegyületet fedeztünk föl, amelyet "vitopine"-nak neveztünk el [Szegedi E, Czakó M, Otten L, Koncz C (1988) Opines in crown gall tumours induced by biotype 3 isolates of *Agrobacterium tumefaciens*. *Physiological & Molecular Plant Pathology* 32: 237-248].

Fertőzött szőlő növényekből izolált *Agrobacterium* tenyészetek (III. biotípus = főleg szőlő eredetű) patogenitását és az indukált tumorok opin tartalmát hasonlítottuk össze I-es és II-es biotípusú izolátumokéval. Az I-es és II-es biotípusú izolátumokkal szemben, a szőlő izolátumok csak relative kicsi tumorokat okoztak az *Agrobacterium*-ra érzékeny *Kalanchoe daigremontiana* HAMET ET PERRIER tesztnövény hajtásain, de ugyanakkor nagy hajtás-teratómákat vagyis regeneráló tumorokat indukáltak ugyanezen faj dekapitált egyedeinek sebzett hajtáskeresztmetszeti felületén. A szőlő agrobaktériumokat a katabolizált opin vegyület(ek) és a tumorban (*Kalanchoe tubiflora* HAMET és szőlő, *Vitis vinifera* L. növényen) található opin vegyülete(ek) szerint osztályokba soroltuk. Az oktopin hasznosító izolátumok tumorjában magas koncentrációjú oktopin volt kimutatható. Ez a

koncentráció jóval magasabb volt mint ami az I-es biotípusú *Agrobacterium* törzsek tumorjaira jellemző. Nem volt hasonló mennyiségi különbség az I-es, II-es és III-as biotípusú nopalin hasznosító izolátumok tumorjainak nopalin tartalmában. Egyes izolátumok tumorjaiban sem oktopin sem nopalin nem volt kimutatható. Papírelektroforézis és ezüst nitrátos negatív festés kombinációjával egy specifikus vegyület volt kimutatható ezen izolátumok által okozott tumorokban. A vegyületnek, amely elektroforetikus és katabolikus tulajdonságaiban minden ismert opin vegyülettől eltért, a "vitopine" triviális nevet adtuk. A vitopint csak a vitopin tartalmú tumort indukáló, mostantól vitopine-típusú, izolátumok voltak képesek hasznosítani mint kizárólagos nitrogénforrást és nem fordult elő más ismert opin vegyületekkel együtt. Kémiai természetére nézve ikerion, amely pH 1.6 savas pufferban kationként viselkedik, pH 2.8-as savas pufferban anion. A fordított ammoniás ezüst nitrát reakcióban nem oxidálódik. Minden vizsgált opin vegyület, az oktopin, nopalin, agropin és vitopin, kimutatható volt a tumoron kívül a növény egészséges részeiben is, ami összhangban van e vegyületeknek a "genetikai gyarmatosítást" szelektíve elősegítő szerepével. További megfigyelés, hogy az oktopin kimutatható volt *Agrobacterium*-mal inokulált sebzési szövetből egy ún. "*Agrobacterium*-rezisztens" szőlőfajtában is, tehát a rezisztencia csak a tumorfejlődés hiányában nyilvánul meg, de a transzformáció bekövetkezik.

V. A III-as biotípusú *Agrobacterium* izolátumok további speciális tulajdonsága a tartarát hasznosító képesség. A fakultatív anyagcsere tulajdonságok gyakran plazmidhoz-kötöttek. Folyamatosan fennálló igény van újabb *Agrobacterium* plazmidokra amelyek könnyen kontrollálható anyagcsere tulajdonságokat hordoznak, mert azok nagyon jól használhatók vektorként növények genetikai manipulációjához. Ebből kiindulva határoztuk el hogy megvizsgáljuk a tartarát hasznosítás genetikai lokalizációját a III-as *Agrobacterium* biotípus különböző képviselőiben.

Tizenkettő III-as biotípusú, háromféle opin-típusba tartozó *Agrobacterium* izolátumot konjugáltattunk *in planta* egy plazmidmentes I-es biotípusú recipiens partnerral. A tizenkettőből hét kombináció eredményezett borkösav hasznosító transzkonjugánsokat. Nagy meretű plazmidok jelentek meg a recipiens törzsben hat kombinációból származó transzkonjugánsokban. Négy kombináció esetében a tartarát hasznosításért felelős plazmid, amelyet Tr-plazmidnak neveztünk el, mérete alapján megkülönböztethető volt a donor izolátum Ti-plazmidjától. A Tr-plazmidok egy heterogén csoportot képeznek amelyek különböznek molekulatömegükben, konjugatív transzfer gyakoriságban, és stabilitásban idegen (I-es biotípusú) gazdasejben. Három Tr-plazmid esetében kimutatható volt a konjugatív képesség [Szegedi E, Otten L, Czakó M (1992) Diverse types of tartrate plasmids in *Agrobacterium tumefaciens* biotype III strains. Molecular Plant Microbe Interactions 5: 435-438].

VI. *Agrobacterium* patogenitás és opin termelés kimutatására számos modell növény alkalmas. Más típusú kísérletekhez, mint pl. genetikai analízishez használható biokémiai mutánsok izolálásához és jellemzéséhez a *Nicotiana plumbaginifolia* növény volt a legalkalmasabb, különösen mivel valódi haploid ($n=10$, $x=10$) vonal is rendelkezésre állt. Különös jelentősége van biokémiai (és morfológiai) mutánsok inszerciós mutagenézissel való előállításának. Az *Agrobacterium* általi transzformáció során a T-DNS integrálódása a kromoszómába várhatóan inszerciós mutációkat okoz, és a T-DNS inszercióval 'jelölt' géneket könnyen izolálni lehet. Konkrét célunk a *Nicotiana* nitrát reduktáz gén inszerciós mutagenézise/jelölése volt. E célra egy olyan plazmidot használtunk amely lehetővé tette a jelölt gén megkülönböztetését. Haploid, valamint nitrát reduktáz deficienciára heterozigóta diploid növény eredetű levél protoplasztok *Agrobacterium* együttenyésztes (kokultivációs) transzformációja után nagyszámú inszerciós mutáns jelöltet izoláltunk. Egy részletes analízis kimutatta hogy a transzformációt egy emelkedett mutáció ráta kísérte. Az emelkedett mutáció ráta a transzformált populációra volt jellemző és nem volt azonos a szomaklonális variáció 'háttér' gyakoriságával [Márton L, Hrouda M, Pécsváradi A, Czakó M (1994) T-DNA insert independent

mutations induced in transformed plant cells during *Agrobacterium* cocultivation. Transgenic Research, 3: 317-325].

A transzformációs gyakoriság $1n$ (haploid), $2n$ (diploid) és $4n$ (tetraploid) *Nicotiana plumbaginifolia* protoplaszt tenyészetekben való meghatározása során egy váratlan nagy (50%) csökkenést tapasztaltunk a nem szelektált (kontroll) haploid tenyészetek protoplaszt regenerációs gyakoriságában ("plating efficiency") amikor virulens (transzformáló-képes) *Agrobacterium* törzset használtunk. Ezt a csökkenést nem tapasztaltuk diploid és tetraploid tenyészetekben, valamint avirulens törzssel kezelt haploid tenyészetekben. Ez a mortalitás aránytalanul magas volt a haploid tenyészetekben kapott (0.1-0.5%) transzformációs gyakorisághoz képest és arra utalt hogy egy a transzformáció közvetlen inszerciós mutációs hatásán fölül mutagenezis zajlott le. Egy ilyen mutagenezisre utalt a nitrát reduktáz gén(ek) inszerciós mutagenezis jelölésére irányuló kísérletekben kapott mutánsok analízise is. Nitrát reduktáz deficiens mutánsokat izoláltunk haploid, nitrát reduktáz apoenzim heterozigóta (*nia/wt*) és molibdén kofaktor heterozigóta (*cnxA/wt*) diploid *Nicotiana plumbaginifolia* protoplasztokból, és levél korong tenyészetekből *Agrobacterium* együttenyésztés transzformációt követően. A klorát rezisztens izolátumok közül csak azokat teszteltük a T-DNS-re jellemző kanamicin rezisztenciára amelyek nitrát reduktáz deficiensnek bizonyultak. 39 függetlenül izolált NR-deficiens mutánsot analizáltunk DNS-DNS hibridizációval. Egyetlen sejtvonalban sem találtunk T-DNS-t inszertálódva a nitrát reduktáz génbe, annak ellenére hogy a kanamicin rezisztens vonalak aránya magasabb volt a nitrát reduktáz deficiens mutánsok között mint a nem mutánsok között. Ezek az adatok azt sugallták hogy a transzformáció-kompetens sejtek mutagenezist szenvednek az *Agrobacterium* transzformáció során - nemcsak inszerciók révén, hanem egy mutációs kísérőjelenség révén is amely nem okoz nagy átrendeződéseket az érintett lokuszban. Ez a mutagenezis kíséri de nem szükségszerűen kapcsolt a stabil transzformációhoz.

VII. A fent említett számos nitrát reduktáz hiányos mutáns jellemzése során nyilvánvalóvá vált, hogy szükség van egy eljárásra amelynek segítségével föloldható az a fiziológias gátlás amely jellemző a nitrát reduktáz deficiens mutánsokra és kallusz tenyészetekben gátolja a hajtások képződését. Föltételeztük, hogy az auxinhatással függ össze a gátlás, és az auxin-indukált etilén hatásának a gátlásával az auxinhatás két komponensét, a kalluszképződéshez vezető sejtosztódás serkentését és a hajtás regenerálódás gátlását szét lehetne választani. Erre a célra ezüst ionokat (Ag^+) használtunk, amelyekről ismert volt hogy az etilén hatását hatékonyan gátolják (pl. vágott virágokban). 5-50 mg/l ezüst nitrát hatékonyan serkentette a hajtás regenerációt különböző alig vagy egyáltalán nem regenerálódó *Nicotiana* genotípusokban, valamint búza (*Triticum aestivum* L.) éretlen embrió-eredetű kallusz tenyészetekben [Purnhauser L, Medgyesi P, Czakó M, Dix PJ, Márton L (1987) Stimulation of shoot regeneration in *Triticum aestivum* and *Nicotiana plumbaginifolia* Viv. tissue cultures using an ethylene inhibitor $AgNO_3$. Plant Cell Reports 6: 1-4]. Az ezüst nitrát etilén hatást gátló szerepét támogatták további adatok is: az ezüst nitrát föloldotta a 2,4-diklórfenoxi-ecetsav (erős kalluszosító és etilénindukáló auxin) és maga az etilén gáz gátló hatását is búza szövettenyészetekben. Az ezüst ionokat azóta elterjedten használják szövettenyészetek regenerálódásának serkentésére.

VIII. Az utóbbi időben az *Arabidopsis thaliana* (Cruciferae) vált a legelfogadottabb modell növényé. Habár haploid növény még nem áll rendelkezésre (a haploid *Nicotiana plumbaginifolia*-t még mindig használják transzformációra és mutáns azonosításra), az *Arabidopsis* egy "kötelező" modell a molekuláris biológiai kísérletekben mivel a genetikai térképe rendkívül részletes és rohamléptekben fejlődik, továbbá a teljes életciklusa a növények között az egyik legrövidebb: 4-6 hét. Vannak hátrányai is. Gyakran szükséges lehet egy-egy konkrét növény egyed eltartása vagy vegetatív

főlszaporítása, pl. genetikailag homogén kiinduló anyag fönntartása céljából, vagy egy fontos transzgenikus növény fiziológiai, biokémiai vagy kémiai jellemzése céljaira. Vegetatív szaporítás jöhet csak szóba egy heterozigóta egyed fönntartása céljából is. Egyes mutánsok és transzgenikus növények normális szaporítását részleges vagy teljes sterilitás akadályozza, mint pl. egy olyan transzgenikus növény esetében amely egy mag-letális gént hordoz. Az *Arabidopsis*-ra vegetatív fázisban a levélrozetta jellemző, és az ebből kinövő virágzó hajtás növekedése viszont determinált. Ennélfogva a hajtáskultúra nem alkalmas vegetatív szaporításra. Ezek a problémák rávilágítottak egy klónális tömegszaporítás szükségességére és potenciális hasznosságára. Hogy az *Arabidopsis* rendszer előnyei maradéktalanul kiaknázhatók legyenek, kifejlesztettünk egy *in vitro* szaporítási eljárást és ezzel megoldottuk a transzgenikus *Arabidopsis* vonalak fönntartásának problémáját [Czakó M, Wilson J, Yu X, Márton L (1993) Sustained root culture for generation and vegetative propagation of transgenic *Arabidopsis thaliana*. Plant Cell Reports 12: 603-606].

Mind vad típusú, mind nitrát reduktáz hiányos *Arabidopsis thaliana* (L.) HEYNH. levágott gyökerei tenyészthetők folyékony táptalajban. Lehetséges gyökér-tenyészetet indítani egyetlen csíranövényből. Első lépésben a gyökereket kettő napig indolecetsavban (0.05 mg/l) inkubáltuk. Az indolecetsav a későbbiekben is elősegítette a gyökértenyészetek beindulását átoltás után, de nem volt esszenciális a tartós növekedéshez. Ezzel az eljárással lehetséges volt klónozni mind vad típusú, mind mutáns egyedeket. A gyökerek megtartották hajtásregeneráló képességüket; azonban egy kontrollált dezikkációs kezelés volt szükséges a hajtásregeneráció friss gyökerekre jellemző szintjének helyreállításához. A diploid kromoszómaszám stabilnak bizonyult és nem tapasztaltuk recesszív mutációk fölhalmozódását a tenyészetben. A tenyésztett gyökerek jól transzformálhatók *Agrobacterium*-mal. E módszerrel volt lehetséges fönntartani egy olyan transzgenikus egyed, amelyben egy domináns, magspecifikus letális gén megakadályozza a transzgenikus magok fejlődését (lásd X. paragrafus).

IX. Jól ismert géntérképének köszönhetően az *Arabidopsis* a homológ rekombináción alapuló génicserelődési kísérletekben is egyre nagyobb szerepet kap. Saját eredményeink a *Nicotiana plumbaginifolia* rendszerben (II. paragrafus) rávilágítottak arra, hogy a ritka homológ rekombinációs kategória kisselektálásához újabb marker génekre és szelekciós eljárásokra van szükség. Szignifikáns hatékonyság növekedést lehet elérni ún. "öngyilkos" gének alkalmazásával, azáltal hogy a random integrálódás ellen szelektálunk. A negatív szelekció elve azon alapszik, hogy egy bizonyos marker gén kifejeződése a sejt növekedésének föltétlen azonnali vagy föltételes gátlását eredményezi. Negatív szelekciós géneket lehet alkalmazni számos biológiai probléma genetikai eszközökkel való megközelítésében [Czakó M, Wenck A, Márton L: Negative selection markers for plants. In "Current Topics in Plant Molecular Biology" series Vol 4: "Technology Transfer of Plant Biotechnology", CRC Press, Boca Raton, folkeresre készült irodalmi attekintes].

Mivel ismeretes volt hogy különböző mikrobiális és növényi toxinok megfelelő, sejt felszíni receptor-kötő és transzmembrán internalizáló doménektől mentes polipeptid fragmentjei nem képesek kifejteni citotoxikus hatásukat mert nem tudnak bejutni a sejtbe, ezeket a fragmenteket elkezdték alkalmazni kimérés gének összeállításában. Kísérleti bizonyítékokat szolgáltatunk arra, hogy a diftéria toxin A fragmentje toxikus a növényi sejtekre amennyiben a sejtben belül szintetizálódik. Ezt a rendkívül hatásos kiméra gént Dr. Gynheung An (Pullman, USA) laboratóriumában fejlesztettem ki [Czakó M, An G (1991) Expression of DNA coding for diphtheria toxin chain A is toxic to plant cells. Plant Physiology 95: 687-692]. A *Corynebacteriophage* eredetű diftéria toxin katalitikus "A" polipeptid fragmentjének megfelelő génszakaszt izoláltam és elláttam transzláció START és STOP kódonokkal és klónoztam növényi típusú promoter (cauliflower mosaic virus 35S RNA promoter) és poliadenilációs (*Agrobacterium* TL-DNS gen 7) régiók közé egy ún. bináris *Agrobacterium*

plazmidban. A diftéria toxint tartalmazó plazmidot hordozó *Agrobacterium* törzs nagyon alacsony transzformációs hatékonyságot mutatott dohányban (*Nicotiana tabacum* L.), sőt nagyban csökkentette még egy második *Agrobacterium* törzsből származó transzformánsok kisselektálásának hatékonyságát is ha a két törzset kevérekben használtuk transzformációhoz. Tranziens expressziós kísérletekben, ahol a diftéria toxin plazmidot egy kloramfenikol acetiltranszferáz gént hordozó plazmiddal együttesen elektroporációval juttattuk be dohány protoplasztokba, a diftéria toxin plazmid erősen gátolta a másik gén kifejeződését. Kifejlesztettünk egy bináris plazmidot (pGA987) amely lehetővé teszi a diftéria toxin gén és különféle növényi promoterek kombinálását.

X. A rendkívül erős diftéria toxin negatív szelekciós marker gén lehetővé tette egy növényi promoter működésének újszerű analízisét [Czakó M, Jang J-C, Herr JM, Jr, Márton L (1992) Differential manifestation of seed mortality induced by seed specific expression of the diphtheria toxin chain 'A' gene in *Arabidopsis* and tobacco. Molecular & General Genetics 235: 33-40] genetikai ablációval. Bejuttattunk egy borsó vicilin (mag tartalékfehérje) promoter-diftéria toxin kiméra gént dohány és *Arabidopsis* növényekbe. Ez a kiméra gén egy domináns, mag-letális Mendeli faktorként viselkedett, és a hasadási arányok összhangban voltak a DNS-DNS hibridizációval megállapított T-DNS kópiaszámokkal. A csírázás gátlása jól definiált fejlődési rendellenességekre volt visszavezethető, ami lehetővé tette a megfejlődés folyamatának analízisét genetikai ablációval. Érdekes párhuzamba állíthatók a két fajban megfigyelt rendellenességek, de ugyanakkor különbségek is tapasztalhatók voltak. Az endospermium normális fejlődése mindkét fajban zavart volt. Fejlődő *Arabidopsis* magokban, a kezdetben szincícium jellegű endospermiumban a sejtmagok koordinálta sejtfalképződés nem fejeződött be maradéktalanul, óriássejtek maradtak. Ennek egyik következménye, hogy a száraz mag zsugorodásra hajlamos volt. Az *Arabidopsis* embrió normálisan 'U' alakban teljesen visszahajlik és fejlődési programja végére teljesen kitölti a magot mert maradéktalanul elfogyasztja az endospermiumot. Egy tipikus transzgenikus növényből származó embriók kb. 75 %-a morfológiailag normális megjelenésű, látható lézióktól mentes volt, de a növekedésük a fejlődés egy relative jól definiált szakaszában, amikor az embrió már kb. 90°-ban meggörcbült, megrekedt és nem fogyasztották el maradéktalanul az endospermiumot. Dohányban, a sejtes endospermium fejlődés időelőtti megrekedése és a periféria degenerálódása volt megfigyelhető mire az embrió a sziklevel iniciálódás stádiumába érkezett. A sziklevel stádiumban már léziók is megfigyelhetőek voltak a sziklevelben, de mindazonáltal az embrió végrehajtotta növekedési és fejlődési programját és végeredményben csaknem ugyanakkorra és formájúra nőtt mint egy normális embrió. Eddigre azonban a sejtek degenerációja és szétesése megfigyelhető volt az embrió minden részében. Tartalékfehérje lerakódások és egyéb citoplazma szemcsék képződése csak nagyon kevés sejtben volt megfigyelhető. A léziók keletkezésének ideje és térbeli eloszlása az embrióban ugyanazt a mintázatot követte mint a tartalékfehérjék (köztük a vicilin) normális lerakódása a magok 25 %-ában. Ezek az adatok arra engednek következtetni, hogy a vicilin promoter a sejt fejlődési ciklusában egy meghatározott stádiumban kapcsol be. Csak a differenciálódó sejtekben működik, azokban is a megnyúlási szakaszban vagy azután. Ez tette lehetővé, hogy a transzgenikus embriók vegrehajtsák a morfológiai fejlődési programjukat de ugyanakkor tartaléktápanyaggal nem töltődtek föl a sejteik, hanem a toxin szintézise miatt intracelluláris degeneráció következett be. Egy sajátos szöveti kölcsönhatás is megfigyelhető volt: az elégtelen mennyiségű endospermiumot az embrió idő előtt elhasználja és elkezdi asszimilálni az integumentum parenchima rétegeit. Ezek a parenchima rétegek a normális fejlődés során is hasonlónak válnak az endospermiumhoz de az endospermium egy részével együtt megmaradnak az érett magban ahol végül csak a csírázáskor használnak el. A normális mag egy merev megvastagodott falú sejtekből álló maghéjból, endospermiumból és egy egyenes embrióból áll. Ezzel szemben a vicilin promoter-diftéria toxin kiméra gént hordozó dohánymagok csak az

alakját megörzött maghéjból és annak üregében egy intracellulárisan degenerált embrióból állnak. Elsőként nyertünk genetikai ablációval adatokat a mag és embrió fejlődés részleteiről amik hozzájárultak a fejlődés lépéseinek sorrendjéről és bizonyos sejtrétegek és szövetek szerepéről rendelkezésre álló tudásanyaghoz.

XI. A diftéria toxin gén toxicitásának erőssége hátrányos lehet bizonyos promoterekkel kombinációban, amikor a géntranszfer során történő tranzien expresszióból eredő toxin megakadályozza érdekes transzformánsok keletkezését. Ezért kevésbé toxikus negatív szelekciós markereket fejlesztettünk ki. Például a *Rhodococcus* indol monoxigenáz gén is használható erre a célra [Wenck A, Czakó M, Márton L.: The *Rhodococcus* indole oxidase gene as a conditional negative selection marker gene in tobacco and *Arabidopsis*, kézirat benyújtva, Plant Journal]

XII. Föltetelesen letális marker gének lehetővé teszik a negatív szelekció idejének, helyének és mértékének szabályozását, például egy szubsztrát-függő negatív szelekciós gén esetében a szubsztrát adagolása idejének és koncentrációjának megválasztásával. Ilyen szubsztrát-függő negatív szelekciós marker gén a Humán Herpes Simplex vírus timidin kináz génje (*HSVtk*), amit sikerrel alkalmaztak emlős sejtekben mint letális marker gént. A timidin kináz képes foszforilálni a normális szubsztrátján kívül nukleozid analógokat, pl. ganciclovir-t, ami egy herpesz-ellenes hatóanyag, és a keletkező nukleotid analóg, ganciclovir-monofoszfát, bekerül a nukleinsav metabolizmusba és gátolja a DNS replikációját.

A *HSVtk* gént bejuttattuk *Arabidopsis* növénybe *Agrobacterium* segítségével [Czakó M, Márton L (1994) The Herpes Simplex Virus thymidine kinase gene as a conditional negative selection marker gene in *Arabidopsis thaliana*. Plant Physiology 104: 1067-1071]. A transzgenikus növények normális morfológiát mutattak és termékenyek voltak. A ganciclovir erősen gátolta mind a hajtás regenerálódást transzformált gyökertenyzetekben, mind a kalluszképződést transzformált levél szegmenteken a 10^{-5} - 10^{-4} koncentráció tartományban. Nyolc nappal a hajtás-indukáló táptalajra való helyezés után a hajtásregeneráció gátlása egy 35-szörös csökkenésben mutatkozott meg a vad-típusú levél szegmentekhez képest, amelyeket a ganciclovir egyáltalán nem gátolt.

A *HSVtk* génaktivitás elleni negatív szelekció szintén jól működött *Agrobacterium* transzformációs kísérletekben a transzformációra való pozitív (kanamicin rezisztencia) szelekcióval kombinálva is. A hajtásregeneráció gátlása egy 25-szörös csökkenésben mutatkozott meg a kettősen, negatív-pozitív (ganciclovir+kanamicin), szelektált tenyészetekben a csak pozitív (kanamicin) szelekciónak kitett kontrollhoz képest. A negatív szelekció a transzformációs gyakoriságát gyakorlatilag a pozitív szelekciót véletlenszerűen túlélő hajtások 'háttér' gyakorisága szintjére csökkentette le.

XIII. A *HSVtk* gén egy kiváló modellnek bizonyult annak tanulmányozására, hogy hogyan befolyásolja az egyedi transzformánsok közötti variabilitás egy negatív szelekciós rendszer hatékonyságát, ami egy olyan génen alapul amelynek hatása arányos, a gyakran variábilis, mRNS és/vagy géntermék fölhalmozódással. Nagy különbségeket tapasztaltunk az egyedi transzformánsok ganciclovir érzékenységében a dohány rendszerben [Czakó M, Marathe RP, Xiang C, Guerra DJ, Bishop GJ, Jones JDG, Márton L: Expression of the Herpes Simplex Virus thymidine kinase gene in *Nicotiana tabacum* L. submitted to Transgenic Research]. A növekedési tesztek eredményei összhangban voltak az *HSVtk* RNS szintekkel. *Agrobacterium* transzformációs kísérletekben a hajtásregeneráció gátlása egy mindössze 3-5.3-szoros csökkenésben mutatkozott meg a kettősen, negatív-pozitív (ganciclovir+kanamicin), szelektált tenyészetekben a csak pozitív (kanamicin) szelekciónak kitett kontrollhoz képest. A negatív szelekció hatékonyságát csökkentette a *HSVtk* gén

expressziójának az egyedek közötti változékonysága, vagyis alacsony expressziós szintű és ennél fogva ganciclovir-ra nem érzékeny, transzformánsok viszonylag nagy gyakoriságú megjelenése dohányban.

A ganciclovir hatásait vizsgáltuk a 10^{-6} - 10^{-3} M koncentráció tartományban. Jól definiált hatásokat figyelhettünk meg levél szegmenteken ganciclovir-ral kiegészített hajtás-regeneráló táptalajon. A vad-típusú szöveteken csak 10^{-3} M koncentrációnál jelentkezett gátlás: hajtások helyett csak kallusz képződött. A legérzékenyebb transzformált növények a pSLJ882 transzformánsok közül kerültek ki. Ugyancsak ezek között találtuk a legmagasabb *HSVtk* RNS szinteket is. Ezeket a transzformánsokat a 10^{-3} M sőt még a 10^{-4} M ganciclovir is tökéletesen gátolta. A pCX305.1 transzformánsokban a ganciclovir legfőbb késleltetett regenerációt és a hajtások sajátos morfológiai elváltozását okozta: vékony keresztmetszet, hosszú szártag és keskeny levelek szinte levéllemez nélkül. Ugyanezek a szimptómák a legérzékenyebb pSLJ882 transzformánsokban is megjelentek de alacsonyabb ganciclovir küszöbkoncentrációnál. A pSLJ882 plazmidban található *HSVtk* gén abban különbözik a pCX305.1-ben található *HSVtk* konstrukciótól, hogy nem tartalmazza a HSV vírus eredetű mRNS 5'- és 3'-régioikat. A ganciclovir érzékenység tipikus Mendeli öröklésmentet mutatott.

Összefoglalás és tervek: Első kísérleti rendszerünkben, a *Nicotiana plumbaginifolia* növényben fontos adatokat szereztem az *Agrobacterium* T-DNS integrálódásának mechanizmusáról és a transzformációt kísérő mutagenézisről. Résztvettem egy új biológiailag aktív opin vegyület és *Agrobacterium* plazmidok jellemzésében. Az *Arabidopsis thaliana* növény jelenleg a legfontosabb kísérleti modell rendszerünk a gén transzfer és rekombinációs kísérleteinkhez. Extrém és mérsékelt erősen feltétlen és feltételes negatív szelekciós géneket fejlesztettem ki, továbbá technológiát transzgenikus *Arabidopsis* gyökértenyészetből való előállítására és a transzgenikus növények vegetatív szaporítására. Jelenleg két fő - egy alapkutató és egy alkalmazott kutató - témán dolgozom. Célunk a nitrát reduktáz gén szabályozásának tanulmányozása. E célból precízen be kívánjuk helyettesíteni egy 'riporter' génre homológ rekombináció révén, azért hogy a 'riporter' gén aktivitása hűen, pozíció effektustól mentesen, tükrözze a promoter aktivitását. Az alkalmazott biotechnológiai téma - nehézfém-szennyezett folyami szedimentek bioremediációja genetikai manipulációval előállított növényekkel: a nehézfém fölhalmozódás áthelyezése a gyökérből a (lelatható) hajtásrendszerbe nehézfém-kötő fehérjék zöld szövet-specifikus termeltetése révén.

TRANSFORMATION MARKERS AND NEGATIVE SELECTION GENES FOR
AGROBACTERIUM-MEDIATED TRANSFORMATION OF PLANTS
by Czakó Mihály

In 1981, after graduating as a biologist at the Attila József University, I was introduced to the plant somatic cell genetics research by Dr. Pál Maliga and by Dr. László Márton in the Laboratory of Plant Cell Genetics, Biological Research Centre of the Hungarian Academy of Sciences, Szeged. It was an era of expansion of the knowledge on plant genes and gene transfer with special emphasis on the genetics of *Agrobacterium* as a tool for plant molecular biology. There was a need for simultaneous advancement in the understanding of *Agrobacterium* biology, development of *in vitro* technologies for new model plants with well understood genetics, as well as positive and negative selectable markers for plant transformation. I have been working on the three closely interconnected fields of plant tissue culture, *Agrobacterium* biology, and molecular genetics and my findings and contributions are summarized in these below.

I. In the period preceding 1986, which was the year when I received my "doctor universitatis" degree, I collected the data summarized in paragraph I. - the resulting dissertation title is "Az oktopin-típusú *Agrobacterium tumefaciens* tumorindukáló-plazmid TR-regiójának integrálódása *Nicotiana plumbaginifolia* protoplaszt-transzformációs rendszerben", as well as the majority of those data from which further three scientific publications resulted later on (paragraphs IV., VI. and VII.).

An *Agrobacterium*-mediated single cell transformation system was established in *Nicotiana plumbaginifolia* Viv. - an euploid model species for cell genetics. A transgenic plant (line no. 101) carrying a single copy of the TR-region of the octopine-type Ti plasmid pTiAch5 was isolated after co-cultivation of *Nicotiana plumbaginifolia* cells with *Agrobacterium tumefaciens* biotype I strain Ach5 [Czakó M, Márton L (1986) Independent integration and seed transmission of the T_R-DNA of the octopine Ti plasmid pTi Ach5 in *Nicotiana plumbaginifolia*. Plant Molecular Biology 6: 101-109]. From line 101 intact plants could be easily regenerated with the ability to synthesize agropine and mannopine (TR-DNA markers). The segregation in the self-progeny fitted to a 3:1 ratio, indicating that the TR-DNA was carried by a single chromosome. As the regenerated plants were tetraploid, this genetic constitution must have resulted from an integration event which took place in the diploid recipient cell during the successive S-phases of an endomitotic cycle at the earliest. The Southern blot analysis confirmed the absence of the TL-DNA, demonstrating for the first time the independent integration of the TR-region of pTiAch5, an octopine-type Ti plasmid with supposed two T-regions.

Characterization of the rest of the transformants yielded useful information. The number of transformants expressing only TL-DNA markers, i.e., phytohormone autotrophy and octopine synthase, was an order of magnitude higher than that of cell lines which were simultaneously positive for both TL- and TR-DNA markers. Not each of the TL-, or TR-DNA markers were expressed in each transformant resulting in a variety of phenotypes. It included the unorganized or the shoot-teratoma type of growth combined with the presence or absence of opines; e.g. agropine was absent from some of the transformants containing its precursor, mannopine. 5-Azacytidine, a known demethylating agent, did not reactivate agropine synthesis in these lines. Southern blot analysis showed that the TR-DNA region coding for agropine synthesis was rearranged or absent in one of these lines.

Similar variation in the expression of agropine and mannopine production was observed in transformants obtained with the A281 strain carrying pTiBo542, a succinamopine-type Ti plasmid from another biotype I strain.

II. Beside its scientific importance as a proof of independent integration of T_R-DNA, line 101 was a promising recipient for gene targeting experiments utilizing homologous recombination via its single copy TR-DNA complement and homologous sequences in the transforming plasmid. It was found that introduction of homologous sequences resulted in rearrangements of the cognate gene, but no reciprocal recombination occurred at detectable frequency [Czakó M, Kanevsky IF, Márton: Introduction of homologous sequences cause rearrangements of the cognate gene in *Nicotiana plumbaginifolia*, manuscript in preparation].

III. In these line 101 transformants it was also found, that very long T-DNAs were frequently transferred, apparently the entire plasmid, into the plant chromosome [Czakó M, Márton L.: Frequent integration of long T-DNAs extending through the binary vector in *Nicotiana plumbaginifolia*, manuscript in preparation].

IV. As demonstrated in thesis I, opines are useful screenable markers for transformation. During the characterization of biotype III *Agrobacterium* isolates a novel opine - vitopine - was discovered [Szegedi E, Czakó M, Otten L, Koncz C (1988) Opines in crown gall tumours induced by biotype 3 isolates of *Agrobacterium tumefaciens*. *Physiological & Molecular Plant Pathology* 32: 237-248]. Opines are low molecular weight *Agrobacterium* T-DNA determined plant metabolites that play important roles in the genetic colonization of plants by *Agrobacterium* through gene transfer.

Pathogenic properties and opine markers of biotype III (grapevine) isolates of *Agrobacterium tumefaciens* were compared with those of biotypes I and II. By contrast with biotypes I and II, grapevine isolates induced only small tumors on *Kalanchoe daigremontiana* HAMET ET PERRIER stems but produced large organogenic galls on decapitated shoot tips of this plant species. Grapevine agrobacteria were classified according to their opine catabolic properties and the type of opine they induced in *Kalanchoe tubiflora* HAMET and grapevine (*Vitis vinifera* L.) tumours. Crown gall tissues obtained after infection with octopine-utilizing grapevine isolates contained octopine in very large amounts compared to biotype I tumours. A similar difference was not observed when nopaline production of tumours incited by biotypes I and II and by grapevine isolates were examined. Tumours formed by a third class of grapevine isolates synthesized a novel opine: it was given the trivial name vitopine. Vitopine is utilized only by vitopine strains, occurs only in vitopine tumours, detected by reversed silver nitrate staining, zwitterion, cationic at pH 1.6 but migrates towards the anode at pH 2.8, non-reducing. Octopine, nopaline, agropine, and vitopine were also detected in healthy tissues of plants infected with appropriate *Agrobacterium* isolates, indicating that these opines can selectively promote the colonization of the whole plant by agrobacteria. Biotype III octopine isolates induced octopine synthesis at the infection sites of a crown gall-resistant grapevine hybrid, showing that pathogenic agrobacteria can transform plants without tumour formation.

V. Biotype III *Agrobacterium* strains exhibit other special characteristics as well: they utilize tartrate. Metabolic faculties are often plasmid-borne. *Agrobacterium* plasmids with conveniently controlled metabolic markers are in demand as vehicles for genes for plant genetic manipulation.

Therefore, the tartrate utilization determinants of representatives of three main groups of biotype III *Agrobacterium* were investigated.

Twelve biotype III isolates of *Agrobacterium tumefaciens* belonging to three opine types were mated *in planta* with a plasmid-free biotype I recipient strain. When selection was imposed for tartrate utilization seven of the twelve mating combinations resulted in transconjugants. In six combinations large plasmids were transferred from the donor strains capable of tartrate utilization. In four of the six combinations the transferred plasmids were distinguishable from the Ti plasmids and are named Tr plasmids. They form a diverse group, since they differ in size, transfer frequency and stability in a biotype I chromosomal background, and three of them proved to be self-conjugal [Szegedi E, Otten L, Czakó M (1992) Diverse types of tartrate plasmids in *Agrobacterium tumefaciens* biotype III strains. *Molecular Plant Microbe Interactions* 5: 435-438].

VI. For testing the pathogenicity and opines of *Agrobacterium* many model plants were available. However, for other studies, such as isolation and manipulation of biochemical mutants which could be used in genetic analysis *Nicotiana plumbaginifolia* was especially suitable because true haploid lines were available. It was of special interest to produce biochemical mutations by insertion mutagenesis using the *Agrobacterium*-mediated transformation so that the tagged-genes could be isolated. Our objective was to tag the *Nicotiana* nitrate reductase gene by such chimeric gene constructions which allowed the recognition of the tagged genes. After *Agrobacterium* co-culture transformation of haploid and diploid (but heterozygous for nitrate reductase deficiency) cultures, a large number of putative insertion mutants have been selected. Apart from the T-DNA insertions, a large number of other mutations occurred in the transformed cell population. The increased rate of mutation was associated with transformation events and clearly distinguished from the background somaclonal variation [Márton L, Hrouda M, Pécsváradi A, Czakó M (1994) T-DNA insert independent mutations induced in transformed plant cells during *Agrobacterium* cocultivation. *Transgenic Research*, 3: 317-325].

Transformation frequencies were determined for $1n$, $2n$, and $4n$ *Nicotiana plumbaginifolia* protoplast cultures in *Agrobacterium*-mediated gene transfer experiments. An unexpected, large drop (50%) in plating efficiencies was observed in the non-selected (control) $1n$ populations after transformation treatment with virulent strains. This effect was not observed in the $2n$ or $4n$ cultures or in the $1n$ cultures when treated with avirulent bacteria. The mortality was nonproportionally high and could not be explained by the low (0.1-0.5%) transformation efficiency in the $1n$ population, indicating mutagenesis of the cell populations independently from the T-DNA insertions. Mutagenesis was also indicated in gene tagging experiments where nitrate reductase-deficient (NR^-) mutants were selected from haploid *Nicotiana plumbaginifolia* protoplasts, as well as from leaf disc cultures or protoplasts of diploid plants that were heterozygous for a mutation either in the NR apoenzyme gene (*nia/wt*) or one of the molybdenum containing cofactor genes (*cnxA/wt*), after *Agrobacterium* cocultivation. The chlorate-resistant isolates were tested for the T-DNA specific kanamycin-resistance trait only after NR-deficiency had been established. Thirty-nine independent NR-deficient mutants were further analyzed by Southern-blot hybridization. There was no indication of integrated "T-DNA" sequences in the mutated NR genes, contrary to the fact that NR-deficient cells were found more frequently in cell populations which became transformed during the treatment than in the populations which did not. These observations suggest that transformation-competent cells undergo mutagenesis during the *Agrobacterium* gene transfer process not only as a result of stable integration

events, but also by such accompanying events that do not result in major changes in the mutated loci. These observations indicate that mutagenesis is associated with, but not necessarily linked to transformation in the affected cells.

VII. During the characterization of the above numerous nitrate reductase deficient mutants it became obvious that there is a need for a method to overcome the physiological block in shoot regeneration typical for these mutants. We supposed that by inhibition of ethylene action the main effects of auxin (promotion of callus growth and suppression of shoot development) should be separable. In order to reverse the suppression of shoot regeneration we tried to abolish ethylene action by Ag^+ which was known to be a potent inhibitor of ethylene action in intact plants. Silver nitrate over a concentration range of 5-50 mg/l effectively promoted shoot regeneration in different *Nicotiana* and genotypes with poor regeneration as well as in wheat (*Triticum aestivum* L.) callus cultures derived from immature embryos [Purnhauser L, Medgyesi P, Czakó M, Dix PJ, Márton L (1987) Stimulation of shoot regeneration in *Triticum aestivum* and *Nicotiana plumbaginifolia* Viv. tissue cultures using an ethylene inhibitor $AgNO_3$. *Plant Cell Reports* 6: 1-4]. The role of silver ions as inhibitor of ethylene action was supported by a reversal of the inhibitory effects on 2,4-D and ethylene on morphogenesis in wheat callus cultures. Application of silver ions for promoting regeneration in tissue cultures has since become widely used.

VIII. *Arabidopsis thaliana* has recently emerged as a universal model plant. Although no haploid lines are available as in *Nicotiana plumbaginifolia* (which is still used for transformation and mutagenesis), *Arabidopsis* has become an obligate object for most plant molecular biological studies because of its detailed genetic map and short life cycle. It is often desirable to maintain or even scale up the propagation of individual plants, e.g. a transgenic line for biochemical or physiological studies, as well as to provide genetically homogeneous material for further genetic manipulations. Vegetative propagation is essential when a heterozygotic genotype is to be preserved. The mere maintenance of certain mutants and transgenic plants may be prevented by poor fertility or when the expression of a transgene (e.g. toxin gene) would exclude generative propagation. Because of the rosette type vegetative growth pattern and rapid advancement to the determined inflorescence phase, shoot explants of *Arabidopsis* cannot be used for vegetative propagation. These problems emphasized the need for a mass clonal propagation system for genetically stable *Arabidopsis* material. In order to be able to take full advantage of the *Arabidopsis* system, it was necessary to invent an *in vitro* propagation technology and thus overcome existing technical difficulties of generation, and vegetative propagation of transgenic *Arabidopsis* [Czakó M, Wilson J, Yu X, Márton L (1993) Sustained root culture for generation and vegetative propagation of transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Reports* 12: 603-606].

Excised roots of wild-type and nitrate-reductase deficient mutant *Arabidopsis thaliana* (L.) HEYNH. can be propagated as sustained root cultures in liquid medium. Culture initiation from a single seedling required a two-day indoleacetic acid treatment at 0.05 mg/l concentration. Indoleacetic acid facilitated subculture but was not essential for sustained growth. This procedure has allowed the clonal propagation of roots derived from individual wild-type and mutant seedlings. The cultured roots retained their shoot regeneration ability; however, a controlled desiccation treatment was required to restore it to the level of freshly excised roots. The chromosome number remained diploid and no evidence for the accumulation of recessive mutations was observed. The cultured roots

are competent for *Agrobacterium*-mediated transformation. The sustained root culture technology allowed the maintenance of transgenic tissues in which expression of a dominant, seed-lethal gene (see below at thesis XI.) precluded generative propagation.

IX. Owing to its well known genetics, *Arabidopsis* has become a model also for homologous gene replacement studies. Our findings on *Nicotiana plumbaginifolia* (thesis II.) emphasized the need for marker genes and different selection regimes for recovering homologous recombinants. Significant improvement of the gene targeting efficiency could be achieved by the incorporation of 'suicide' genes, so that random gene transfer events would be counterselected. The concept of negative selection is based on the expression of a marker gene that causes immediate or conditional inhibition of growth. Negative selection marker genes can also be used in genetic approaches towards understanding other biological processes [Czakó M, Wenck A, Márton L: Negative selection markers for plants. Scheduled to appear in "Current Topics in Plant Molecular Biology" series Vol 4: "Technology Transfer of Plant Biotechnology", CRC Press, Boca Raton, invited review].

Because polypeptide fragments of microbial and plant toxins that are devoid of cell receptor binding and transfer domains are not cytotoxic, it has become attractive to use these polypeptides in the assembly of chimeric genes. We presented evidence that expression of a chimeric diphtheria toxin fragment 'A' construct in tobacco is toxic. I developed this potent 'suicide' gene for expression in plant cells while working in Dr. Gynheung An's laboratory [Czakó M, An G (1991) Expression of DNA coding for diphtheria toxin chain A is toxic to plant cells. Plant Physiology 95: 687-692]. DNA coding for the enzymatically active subunit A of diphtheria toxin was placed under the control of the cauliflower mosaic virus 35S RNA promoter and the *Agrobacterium* left transfer-DNA gene 7 polyadenylation signal. *Agrobacteria* carrying a binary plant vector with the chimeric diphtheria toxin A gene had very low transforming activity in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.), and greatly diminished the recovery of stable transformants when mixed together with *agrobacteria* which alone transformed plant cells well. The introduction of this chimeric molecule into tobacco cells by electroporation lowered the level of the transient expression of the coelectroporated chloramphenicol acetyltransferase reporter gene indicating that expression of diphtheria toxin chain 'A' in plant cells is toxic. We have developed a binary vector pGA987 which can be used for probing a variety of plant promoters.

X. The diphtheria toxin 'A' gene proved to be a potent new negative selection gene for probing the function of plant promoters [Czakó M, Jang J-C, Herr JM, Jr, Márton L (1992) Differential manifestation of seed mortality induced by seed specific expression of the diphtheria toxin chain 'A' gene in *Arabidopsis* and tobacco. Molecular & General Genetics 235: 33-40]. A pea vicilin promoter-diphtheria toxin chain 'A' gene has been introduced into *Arabidopsis* and tobacco. The chimeric DTx-A gene behaves as dominant, seed-lethal, Mendelian factor, and the segregation ratios are consistent with the numbers of integrated copies as revealed by Southern blotting. Germination deficiency results from distinct developmental abnormalities, thus allowing genetic dissection of seed development. The endosperm is affected first in both species. In *Arabidopsis*, full cellularization of the originally free nuclear endosperm does not take place, which results in shrinkage and shriveled appearance of the mature dry seed. The embryo, which appears structurally normal and lacks visible lesions, ceases to develop at the partially recurved cotyledon stage and does not use the remaining endosperm. In tobacco, peripheral degeneration and premature termination of the cellular endosperm development occurs at the cotyledon initiation stage. Lesions appear in the

cotyledons in the advanced cotyledon stage, but the embryo continues to grow and attain nearly the same size and level of differentiation of mature wild-type embryos before degeneration and intracellular disintegration take place throughout. Accumulation of protein bodies and other cytoplasmic inclusions is very limited and occurs only in few cells. The timing and distribution of lesions follow a pattern typical for accumulation of protein bodies in wild-type seeds. These observations are consistent with the vicilin promoter being expressed in the enlargement phase of cell differentiation. A novel tissue interaction situation arises, when the embryo uses up all the arrested endosperm: the embryo has proven able to absorb the parenchyma layers of the integument which are normally obliterated by and incorporated into the endosperm. The mature seed thus consists of a seed coat of one rigid cell layer, and a degenerated embryo. The genetic ablation technique contributed to the establishment of the sequence of events and the role of different cell-lineages and tissues in seed development. This is the first time that genetic dissection of embryo/seed development has been approached by genetic ablation.

XI. The extreme potency of the diphtheria toxin gene may be a disadvantage in systems where transient expression of the transgene can mask interesting genetic events. In our search for novel marker genes we found that the indole monooxygenase gene from *Rhodococcus* sp. acts as a negative selectable marker gene [Wenck A, Czakó M, Márton L.: The *Rhodococcus* indole monooxygenase gene as a conditional negative selection marker gene in *Arabidopsis thaliana* and tobacco, manuscript].

XII. Conditional lethal markers provide an added element of control over negative selection, for example through substrate-dependence. The human Herpes Simplex Virus thymidine kinase type 1 (*HSVtk*) gene acts as a conditional lethal marker in mammalian cells. The HSVtk enzyme is able to phosphorylate certain nucleoside analogues (*e.g.* ganciclovir, an antiherpetic drug), thus converting them to toxic DNA replication inhibitors.

HSVtk was introduced into *Arabidopsis* by *Agrobacterium*-mediated transformation [Czakó M, Márton L (1994) The Herpes Simplex Virus thymidine kinase gene as a conditional negative selection marker gene in *Arabidopsis thaliana*. Plant Physiology 104: 1067-1071]. Transgenic plants were morphologically indistinguishable from wild-type, and exhibited normal fertility. Ganciclovir at 10^{-5} - 10^{-4} M drastically reduced shoot regeneration on transgenic, HSVtk⁺ root explants, or callus formation on HSVtk⁺ leaf explants, but did not affect the wild type cultures. There was a 35-fold reduction in shoot regeneration 8 days after transfer to shoot induction medium.

Negative selection against *HSVtk* gene activity along with kanamycin selection was also efficient in *Agrobacterium*-mediated gene transfer experiments. Shoot regeneration was 25-times lower on double selective (ganciclovir+kanamycin) plates than in the kanamycin control. This regeneration rate in double selective plates is in the range of the frequency of shoots normally escaping kanamycin selection in *Arabidopsis* cultures.

XIII. *HSVtk* proved to be a good model to demonstrate the potentials and limitations of negative-selection systems based on accumulation of a gene product, which may be highly variable among individual transformants. There were great differences between individual HSVtk⁺ transgenic plants in ganciclovir sensitivity in tobacco [Czakó M, Marathe RP, Xiang C, Guerra DJ, Bishop GJ, Jones JDG, Márton L: Expression of the Herpes Simplex Virus thymidine kinase gene in *Nicotiana*

tabacum L. submitted to Transgenic Research]. Growth assay results correlated with the *HSVtk* transcript levels. Negative selection against *HSVtk*⁺ transformants at the level of *Agrobacterium*-mediated transformation using ganciclovir/kanamycin double selection medium (the positive selection marker neomycin phosphotransferase II gene was in the transformation vector) resulted in a three- to six-fold reduction in the frequency of kanamycin resistant shoots. The efficiency of negative selection in this case was limited due to the great variation in *HSVtk* expression, i.e., the frequently occurring transformants with low or no ganciclovir sensitivity escaping negative selection.

Distinct phenotypes ranging from no regeneration through abnormal or delayed regeneration was observed when leaf segments were placed on shoot inducing medium supplemented with 10⁻⁶-10⁻³ M ganciclovir. The highest *HSVtk* mRNA and ganciclovir sensitivity levels were observed in plants which were transformed with the pSLJ882 chimeric construct. The pSLJ882 plant expression vector carried the coding sequence of *HSVtk*, whereas plasmid pCX305.1 carried an *HSVtk* construct retaining the untranslated 5' leader and viral 3'-regions. The pCX305.1 transformants showed, at most, a delayed formation of shoots with thin stems and very narrow leaves. Ganciclovir sensitivity showed typical Mendelian segregation. A gene dosage effect was also seen at the seedling level in the progeny of two transgenic lines.

Summary and perspectives: In our first experimental system, *Nicotiana plumbaginifolia*, important data have been obtained about the mechanism of *Agrobacterium* T-DNA integration and associated mutagenesis. I also participated in the discovery and characterization of a novel biologically active opine and *Agrobacterium* plasmids. *Arabidopsis thaliana* is our experimental model for studies with gene transfer and gene replacement. Potent and moderate non-conditional and conditional negative selection genes and the technologies for generation and vegetative propagation of transgenic *Arabidopsis* have been developed. Presently, I am involved in a project aimed at precise replacement of the major nitrate reductase gene for a reporter gene by homologous recombination so that there would be no interference from ectopic copies. I am also working on an applied biotechnology project - a genetic engineering technology for bioremediation of heavy metal contaminated sediments: increasing metal accumulation in the aerial (harvestable) parts by introducing metal binding protein genes expressed only in the green tissues.