

# Wpływ eksplantatu inicjalnego na efektywność transformacji *Gerbera hybrida* za pomocą *Agrobacterium tumefaciens*

Elżbieta Nowak

Żaneta Rojek

Danuta Kucharska

Teresa Orlikowska

Instytut Sadownictwa i Kwiaciarstwa  
Skierniewice

## 1. Wstęp

Włączanie pojedynczych genów dowolnego pochodzenia do genomu dowolnego biocyta roślinnego w drodze transformacji jest obiecującą metodą ulepszania odmian uprawnych. Krzyżowanie prowadzi do zmieszania cech obydwu partnerów i wymaga długotrwałej selekcji segregujących mieszańców. Połączenie dalece oddalonych komponentów roślinnych w drodze krzyżowania jest w ogóle niemożliwe, tym bardziej nie ma możliwości przepływu genów pomiędzy roślinami a zwierzętami. Wprowadzanie pojedynczych genów wyizolowanych nawet z odległych taksonów nie zakłóca metabolizmu biocyta lub zakłóca go w znacznie mniejszym stopniu. Pozwala to hodowcom na zrealizowanie dwóch celów — uniknięcia sprzężeń pomiędzy genami i przekroczenia barier krzyżowania. Wśród scharakteryzowanych chemicznie genów są także geny użyteczne dla ulepszania roślin ozdobnych, które modyfikują kolor i budowę kwiatów, pokrój roślin, przedłużają trwałość kwiatów, oraz geny podwyższające odporność na choroby wirusowe, bakteryjne i szkodniki, a także na herbicydy w uprawach polowych. Prace przeglądowe na ten temat przedstawiali Robinson i Firoozabady (20), Orlikowska i Nowak (18) oraz Derolles i wsp. (5), Elomaa i wsp. (6) donosili o uzyskaniu transgenicznej gerbery o zmienionej barwie kwiatostanów. Wydajność regeneracji pędów transgenicznych była jednak bardzo niska, co skłania do kontynuowania badań nad doskonaleniem metody (5). *Gerbera* zajmuje szóste miejsce w handlu światowym kwiatami ciętymi, a w Polsce jej pozycja jest jeszcze wyższa. Możliwość ulepszania odmian gerbery na drodze transformowania byłaby atrakcyjną metodą, także dla polskich hodowców. Celem pracy było doświadczalne określenie warunków transformowania gerbery przy użyciu wektora LBA 4404/pBI121

*Agrobacterium tumefaciens* z genami markerowymi *nptII* i *gus*. W pracy tej przedstawiono wpływ różnych eksplantatów inicjalnych na wydajność transformacji u kilku odmian.

## 2. Materiał i metody

### 2.1. Kultury bakteryjne

Doświadczenia prowadzono ze szczepem bakteryjnym LBA 4404/pBI121, który posiada chromosom Ach 5 z genem odporności na streptomycynę (1). Plazmid pBI121 posiada w obrębie T-DNA gen *nptII* kodujący odporność na kanamycynę z promotorem i terminatorem syntazy nopaliny oraz gen *gus* z promotorem CMV35S i terminatorem syntazy nopaliny. Bakterie namnażano w ciemności, w temperaturze 25°C, na pożywkach stałych i płynnych LB (24), przy 250 rpm.

### 2.2. Ustalenie poziomów selekcyjnych kanamycyny

Badano wpływ kanamycyny na eksplantaty nie zakażane, w warunkach typowych dla wszystkich stadiów regeneracji i rozmnażania. Kanamycynę sterylizowano przez filtrowanie i dodawano do przestudzonej pożywki w następujących stężeniach (mg/l): 0; 1,0; 2,5; 5,0; 7,5; 10,0; 20,0; 50,0 i 100,0.

### 2.3. Zakażanie bakteriami, regeneracja i selekcja

Badania prowadzono na pięciu odmianach gerbery: Amber, Boy, Ferrari, Mariola i Tamara. Zakażano najmłodsze listki z ogonkami od 3 do 7 mm długości (czasem dodatkowo uszkodzone) lub rozgniatane wierzchołki pędów, z dwutygodniowych kultur pędowych gerbery (pożywka wzrostowa z tabeli 1, ale z 2 mg/l kinetyny). Proces zakażenia i selekcji oparto głównie na metodzie transformacji opracowanej dla krokosza barwierskiego — *Carthamus tinctorius* (17). Do zakażenia używano 18-godzinnych kultur płynnych, namnażanych w obecności streptomycyny, kanamycyny i 10 mg/l octanu syringonu. Kultury bakterii wirowano, a osad zawieszano w pożywce Murashige i Skooga (13) — MS z glukozą i octanem syringonu w rozcieńczeniu 1:5 lub 1:10 ( w stosunku do objętości kultury). Czas moczenia w zawieszynie bakterii trwał około 3 minut, po czym eksplantaty były osączone na sterylnej bibule i wykładane na pożywkę indukującą regenerację. Po 3 dniach kokultywacji eksplantaty przekładano na taką samą pożywkę, ale z dodatkiem czynnika hamującego rozmnażanie bakterii — 250 mg/l Biotaksymu (polski preparat antybiotyku cefotaksim). Po 2 tygodniach kultury przenoszono na światło. Powstający zielony kalus przekładano co miesiąc na świeżą pożywkę regeneracyjną, odcinając wytworzone pędy. Pędy przenoszono na pożywkę wzrostową dla rozmnożenia i ukorzeniania. Dla pobudzenia regeneracji pę-



dów kalusy przeszczepiano na pożywkę z azotanem srebra. Skład pożywek podano w tabeli 1.

TABELA 1  
SKŁAD POŻYWEK DLA KULTUR GERBERY

Składniki w mg/l	Pożywka indukująca regenerację	Pożywka regeneracyjna	Pożywka wzrostowa (i do namnażania pędów)	Pożywka do ukorzenia
sole MS	x 1/2	x 1	x 1	x 1
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	85	85	85	-
witaminy	WPM	WPM	WPM	WPM
sacharoza g/l	10	30	30	30
TDZ	0,5	0,01 - 0,05	-	-
BAP	-	ew. 1	-	-
kinetyna	-	-	1 (2)	-
IAA	-	0,05	0,05	5
NAA	0,05	0,01	-	-
siarczan ad.	-	20	20	-
agar g/l	8 Bacto (Difco)	8 Bacto (Difco)	7 Plant (Duchefa)	7 Plant (Duchefa)
pH	5,8	5,8	5,8	5,8
Biotaksym	-	250	250	250
kanamycyna	-	1 - 10	5	10
azotan srebra	-	10 (co kilka pasaży)	-	-

Proces selekcji komórek i tkanek stransformowanych rozpoczynano równocześnie z eliminacją bakterii lub od kilku do kilkudziesięciu dni później. Poziom kanamycyny w czasie regeneracji wynosił od 1 do 10 mg/l. Pozostałe procedury zostały podane przy omawianiu wyników doświadczeń.

#### 2.4. Sprawdzanie obecności genu *gus* na podstawie ekspresji w środowisku zawierającym substrat X-gluc

Sprawdzanie obecności genu prowadzono wg metody podanej przez Samac i Shah (23). Fragmenty pędów wykazujące aktywność genu *gus* wykładano na pożywkę bakteryjną (LB lub Leifert i Waites-Sigma kat. L1906) dla sprawdzenia, czy źródłem niebieskiego koloru nie jest bakteria zasiedlająca tkanki pędu.

## 2.5. Sprawdzanie obecności genów *nptII* i *gus* metodą amplifikacji enzymatycznej

Plazmidowe DNA wyizolowano metodą opisaną przez Krzymowską (15). Izolację DNA roślinnego wykonywano wg metody E. Craiga z Uniwersytetu Stanowego Montany, Bozeman (1 listek homogenizowano z buforem ekstrakcyjnym 50 mM Tris pH 8,0; 5 mM EDTA i 100 mM NaCl na lodzie, podgrzewano przez 5 min w 95°C, wirowano 4 minuty, a supernatant rozcieńczano buforem TE 10 mM Tris pH 8,0; 1 mM EDTA jak 1:10), wg Gawel i Jarret (8) oraz wg Boom i wsp. (4) (zmodyfikowana przez T. Malinowskiego ISK).

Amplifikację enzymatyczną do fragmentów genu *nptIII* o wielkości 792 p.z. i genu *gus* o wielkości 1800 p.z. wykonywano na aparacie Perkin Elmer przy użyciu zestawów Perkin Elmera i Biometry, posługując się starterami podanymi przez Robertson i wsp. (22): 5' CAA GAT GGA TTG CAC GCA GGT TCT C 3' i 5'GAA TCG GGA GCG GCG ATA CCG TAA A 3' (*nptIII*) oraz 5'CTC GCA TTA, CCC TTA CGC TGA AGA G 3' i 5'ATT GTT TGC CTC CCT GCT GCG GTT T 3' (*gus*). Amplifikację prowadzono wg następującego programu: 1 cykl: 94°C – 5 min, 60°C – 1 min, 72°C – 2 min, 30 cykli: 94°C – 1 min, 60°C – 1 min, 72°C – 2 min, 1 cykl: 72°C, 4°C – 4 min. Reakcje amplifikacyjne rozdzielano elektroforetycznie na 1% agarozie i barwiono bromkiem etydyny.

## 3. Wyniki

### 3.1. Określenie stężeń selekcyjnych kanamycyny

Listki gerbery wyłożone na pożywkę indukującą regenerację i przełożone po 3 dniach na taką samą pożywkę z dodatkiem kanamycyny żółkły i nie tworzyły kalusa przez okres 5 tygodni, nawet przy stężeniu 2,5 mg/l. Listki przenoszone na pożywkę selekcyjną po 14 dniach pozostawały zielone przez 5 tygodni kultury, a na końcach ogonków tworzył się kalus z zielonymi punktami merystematycznymi. Dlatego, w przypadku opóźnienia selekcji (po wytworzeniu kalusa), stężenie kanamycyny podwyższano stopniowo do 5 lub 10 mg/l. Pędy gerbery wyszczerpione na pożywkę do namnażania pędów kątowych nie tworzyły nowych pędów już przy stężeniu kanamycyny 5 mg/l choć ich liście pozostawały zielone po 4 tygodniach. Stężenie 10 mg/l powodowało bielenie młodych liści i przejaśnienia na nerwach liści starszych, a po dłuższym okresie czerwienienie ogonków liściowych i tworzenie „soczynkowych” wierzchołków wzrostu. Pędy wyszczerpione na pożywkę do ukorzenia z dodatkiem kanamycyny nie zmieniały wyglądu w czasie 4 tygodni. Bez kanamycyny ukorzeniało się od 90 do 100% pędów (w zależności od odmiany), przy 5 mg/l od 0 do 50%, natomiast przy stężeniu 10 mg/l i wyższych korzenie nie tworzyły się wcale. Do selekcyjonowania transgenicznych pędów można polecić następujące stężenia kanamycyny: w okresie induk-



wania regeneracji z kokulturowanych liści 2,5 mg/l, dla etapu regeneracji z kalusa 5-10 mg/l, namnażania pędów kątowych oraz ukorzenia pędów 10 mg/l.

### 3.2. Kokultywacja, regeneracja i selekcja pędów transgenicznych

Pędy stransformowane pojawiały się po kilku miesiącach przeszczepiania kalusa na pożywki regeneracyjne z czynnikiem selekcyjnym i Biotaksymem. Kulturę prowadzono w taki sposób, aby kalus posiadał zdolność do regeneracji pędów w czasie kilku miesięcy. Było to możliwe przy zastosowaniu niskich stężeń TDZ (od 0,01 do 0,05 mg/l) i auksyny. Czynnikiem sprzyjającym wznowieniu regeneracji okazało się dodawanie do pożywki raz na kilka pasaży 10 mg/l azotanu srebra.

Pędy transgeniczne otrzymano zarówno z kalusa wyrastającego po kokultywacji na nasadach ogonków liściowych, jak i z kalusa powstającego z miążdżonych wierzchołków wzrostu. Udział pędów transgenicznych zależał, m. in. od właściwości odmiany. W tabeli 2 przedstawiono wyniki z doświadczenia, gdzie zakażano najmłodsze listki odmian Boy i Mariola. Selekcję rozpoczęto bezpośrednio po kokultywacji na pożywce z 1 mg/l kanamycyny, a po 2 tygodniach dawkę podwyższono do 5 mg/l. W siódmym miesiącu regeneracji kalusy przełożono na pożywkę z dodatkiem 10 mg/l azotanu srebra na jeden pasaż, po którym zaobserwowano znacznie intensywniejszą regenerację. Otrzymano pędy transgeniczne obydwu odmian, więcej w odmianie Mariola, która ma znacznie większy potencjał regeneracyjny niż odmiana Boy.

TABELA 2

REGENERACJA GERBERY ZAKAŻANEJ BAKTERIĄ LBA 4404 PO 10 MIESIĄCACH.  
ŚREDNIE OZNACZONE TĄ SAMĄ LICZBĄ NIE RÓŻNIĄ SIĘ ISTOTNIE PRZY P = 0,05

Odmiany	Regenerujące listki (inicjalna liczba listków) (%)	Średnio pędów na listek regenerujący	Liczba pędów transgenicznych ogółem	Średnio pędów transgenicznych na listek zakażany	Pędy transgeniczne (%)
Boy	34,3 a (99)	2,0 a	4	0,04	5,3
Mariola	69,4 b (108)	1,9 a	25	0,18	18,0

W celu zwiększenia liczby komórek kompetentnych dla przyjęcia T-DNA wykonano doświadczenie, w którym dodatkowo raniono listki gerberzy odmian Amber, Ferrari, Mariola i Tamara. Kulturą bakterii zakażano listki uprzednio spreparowane w ten sposób, że nasady ogonków miążdżono płaskim końcem bagietki szklanej lub zdrapywano skalpelem włoski. Po 3 dniach kokultywacji listki przełożono na pożywkę indukcyjną zawierającą 0,01 mg/l TDZ i 1 mg/l kanamycyny. Po miesiącu poziom kanamycyny zwiększono do 2 mg/l, a po następnym do 5 mg/l, dodając azotan srebra przez okres jednego pasażu

dla przywrócenia regeneracji pędów z kalusa. Pędy transgeniczne otrzymano w każdej kombinacji. Średnia liczba pędów transgenicznych na 1 listek zakażony nie była wyższa niż w doświadczeniu bez dodatkowego kaleczenia, ale wyraźnie wzrósł udział pędów transgenicznych (tabela 2 i 3).

TABELA 3

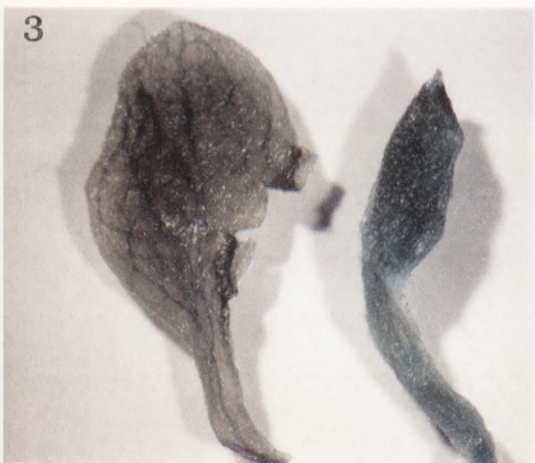
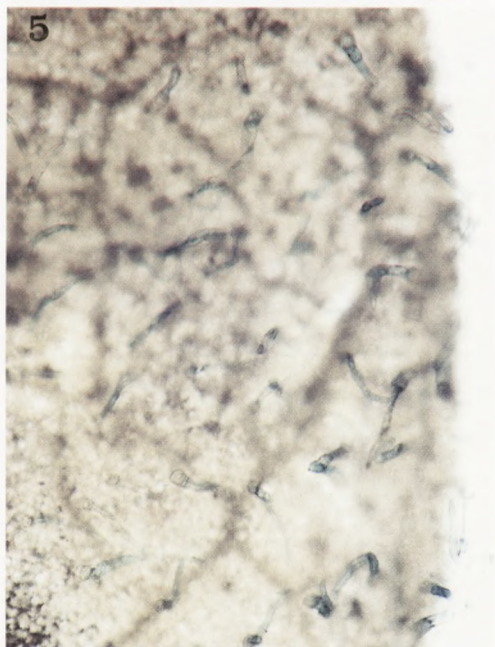
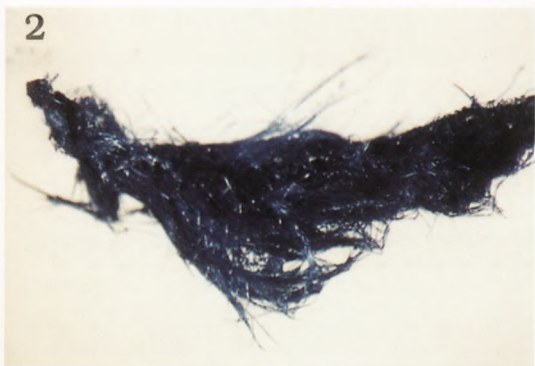
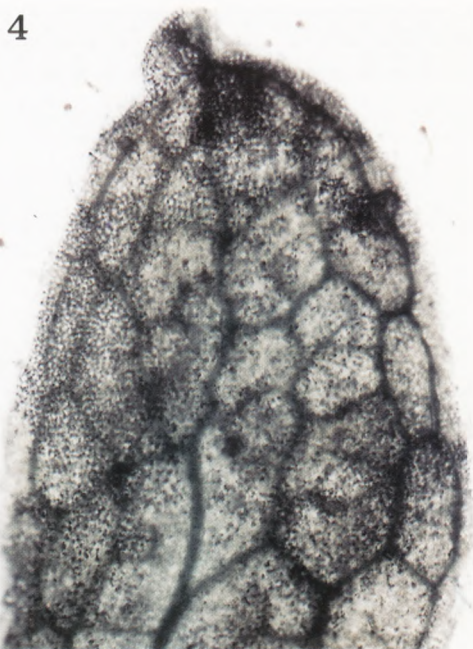
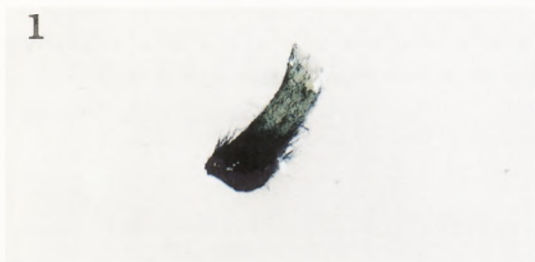
REGENERACJA GERBERY PO ZAKAŻENIU BAKTERIĄ LBA 4404 PO 9 MIESIĄCACH, W ZALEŻNOŚCI OD SPOSOBU PREPAROWANIA EKSPLANTATÓW. ŚREDNIE OZNACZONE TĄ SAMĄ LITERĄ NIE RÓŻNI SIĘ ISTOTNIE PRZY  $P = 0,05$

Odmiana	Sposób preparowania eksplantatu	Listki regenerujące (inicjalna liczba listków) (%)	Średnio pędów na listek regenerujący	Liczba pędów transgenicznych ogółem	Średnio pędów transgenicznych na listek zakażony	Pędy transgeniczne (%)
Amber	miażdżone	38,2 b (120)	1,1 a	6	0,05	18,8
	zdrapane	29,8 ab (50)	1,2 a	4	0,08	28,6
Ferrari	miażdżone	37,6 b (70)	1,4 ab	9	0,13	23,7
	zdrapane	33,3 b (80)	1,4 ab	4	0,05	12,1
Mariola	miażdżone	13,7 a (80)	1,5 ab	5	0,06	50,0
	zdrapane	24,7 ab (70)	1,8 ab	17	0,24	41,5
Tamara	miażdżone	24,8 ab (60)	1,2 a	4	0,07	23,5
	zdrapane	29,8 ab (40)	2,0 b	15	0,25	50,0

Badano także możliwość uzyskiwania stransformowanych pędów w wyniku zakażenia bakterią wierzchołków pobranych z namnażających się kultur. Po usunięciu liści wierzchołki pędów o długości 3-5 mm rozgniatano w zawieszynie bakterii. Po 5 minutach eksplantaty osuszano i umieszczano na pożywce indukcyjnej z 0,01 mg/l TDZ. Po 3 dniach kokultywacji listki płukano przez 3 godziny w roztworze TDZ 0,1 mg/l i Biotaksymu 500 mg/l. Selekcję rozpoczęto po 2 tygodniach przy poziomie kanamycyny 2 mg/l, a po 2 miesiącach podwyższono do 5 mg/l. Większość wierzchołków wytworzyła kalus, z którego powstawały pędy transgeniczne. W doświadczeniu tym wykazano, że w przypadku odmiany o mniejszym potencjale regeneracyjnym ogonków liściowych (Boy), korzystniejsze jest zakażenie wierzchołków pędów i stymulowanie regeneracji pędów z powstającego kalusa (tab. 4).

Łącznie z 3 doświadczeń, w których zakażono 777 listków i 234 wierzchołki otrzymano 162 niezależnie stransformowane pędy, w tym 14 w odmianie 'Amber', 45 'Boy', 13 'Ferrari', 71 'Mariola' i 19 'Tamara'. Po rozmnożeniu uzyskano 24 względnie stabilne linie.





- Fot. 1. Ekspresja przejściowa genu *gus* na końcu ogonka liściowego gerbery.  
Fot. 2. Ekspresja przejściowa genu *gus* na całej blaszce liściowej gerbery.  
Fot. 3. Ekspresja genu *gus* w wiązkach przewodzących i na całej blaszce liściowej transgenicznego pędu gerbery.  
Fot. 4. Ekspresja genu *gus* w wiązkach przewodzących liścia transgenicznego pędu gerbery.  
Fot. 5. Ekspresja genu *gus* we włoskach na powierzchni liści transgenicznego pędu gerbery.





TABELA 4

REGENERACJA GERBERY, KTÓREJ WIERZCHOŁKI BYŁY ZAKAŻANE BAKTERIĄ LBA 4404 PO 9 MIESIĄCACH.  
ŚREDNIE OZNACZONE TĄ SAMĄ LITERĄ NIE RÓŻNIA SIĘ ISTOTNIE PRZY P = 0,05

Odmiana	Wierzchołki regenerujące (inicjalna liczba wierzchołków) (%)	Średnio pędów na wierzchołek regenerujący	Liczba pędów transgenicznych ogółem	Średnio pędów transgenicznych na wierzchołek zakażony	Pędy transgeniczne (%)
Amber	47,0 a (72)	2,4 ab	4	0,06	5,0
Boy	86,5 b (63)	3,0 b	41	0,65	28,2
Mariola	69,7 b (99)	2,2 a	24	0,24	16,4

### 3.3. Obserwacja aktywności genu *gus*

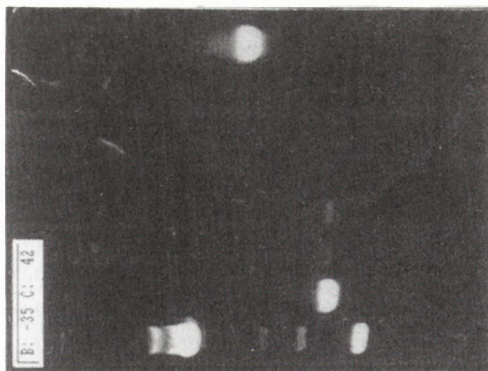
Obserwacja aktywności genu *gus* w tkankach była bardzo pomocna dla upewnienia się, czy wykonane zakażenia tkanek były skuteczne. Ekspresja przejściowa pojawiała się już czwartego dnia od rozpoczęcia zakażenia na prawie wszystkich eksplantatach. Niebieskie plamy i punkty zajmowały całą powierzchnię eksplantatu lub były zlokalizowane tylko w obrębie podstawy ogonków liściowych (fot. 1 i 2). Z czasem udział listków wykazujących niebieskie zabarwienie zmniejszał się i niebieski kolor był najczęściej widoczny tylko na niewielkich fragmentach tkanek ogonka lub blaszki liściowej, a później na sektorach kalusa i powstających pędach.

Obraz aktywności genu *gus* w kalusie i tkankach pędów zregenerowanych był zróżnicowany. W listkach gerbera pochodzących z pędów zregenerowanych, które przeżyły selekcję na kanamycynie niebieski kolor był widoczny głównie w tkance naczyniowej i we włoskach kutnerowych, rzadko na całej blaszce liściowej (fot. 3-5). Zabarwienie miało różną intensywność — od granatowego, do ledwie widocznego bladoniebieskiego. Nie stwierdzono związku lokalizacji ani intensywności zabarwienia z odmianą gerbera. W żadnym przypadku testowania liści z niebieskim zabarwieniem, pobranych z pędów selekcyonowanych przez wiele miesięcy na kanamycynie z dodatkiem Biotaksymu, nie stwierdzono wzrostu bakterii z fragmentów pędów wyłożonych na pożywkę bakteryjną.

### 3.4. Sprawdzanie obecności genów *nptII* za pomocą amplifikacji enzymatycznej

Fragmenty o wielkości 792 par zasad do primerów genu *nptII* kodującego odporność na kanamycynę otrzymano na wzorcach DNA wyizolowanych z plazmidu oraz z DNA roślinnego izolowanego wszystkimi podanymi metodami natomiast nie uzyskiwano fragmentów 1800 p.z. z DNA wyizolowanego z roślin (fot. 6).

<i>gus</i>	pBI121	1
<i>gus</i>	#9	2
<i>gus</i>	#10	3
<i>gus</i>	#11	4
<i>npII</i>	#9	5
<i>npII</i>	#10	6
<i>npII</i>	#11	7
<i>npII</i>	pBI121	8
drabinka DNA 500 p.z. 9		



Fot. 6. Produkt amplifikacji enzymatycznej fragmentu genu *npII* o wielkości 792 p.z. w liniach transgenicznym oraz plazmidzie i genu *gus* w plazmidzie.

## 4. Dyskusja

O wytwarzaniu roślin transgenicznych za pośrednictwem *Agrobacterium tumefaciens* decyduje wiele czynników. Można je podzielić na trzy grupy. Pierwsza, to wirulencja bakterii i właściwa konstrukcja T-DNA, druga jest związana ze zdolnością do masowej regeneracji zorganizowanych struktur przybyszowych rośliny biorcy (pąków lub zarodków somatycznych), a trzecia ze sposobem selekcji transformowanych komórek, kalusa i pąków.

Wadą zastosowanego w omawianych doświadczeniach wektora bakteryjnego jest wykazywanie aktywności genu *gus* także w bakteriach, co może prowadzić do fałszywych, pozytywnych ocen. Matzk i wsp. (9) wykazali na podstawie obserwacji w mikroskopie elektronowym, że bakterie można spotkać w tkankach roślinnych w kulturach *in vitro* nawet po 12 miesiącach od zakażenia, a także jeszcze po kilku miesiącach wzrostu w szklarni. Należy zatem zachować ostrożność decydując o statusie transgenicznym pędu tylko na podstawie niebieskiego zabarwienia po podaniu substratu X-gluc, gdy nie używa się konstrukcji *gus* z intronem. Z tego powodu fragmenty pędów zakażonych bakterią LBA 4404, wyselekcjonowane na pożywce z kanamycyną i wykazujące niebieskie zabarwienie były testowane także na pożywkach bakteryjnych. W żadnej z tak testowanych przez nas na pożywkach bakteryjnych linii transgenicznych bakterie nie wyrosły.

Ważnym czynnikiem jest czas rozpoczęcia selekcji. Zbyt późne przeniesienie kultur na pożywki selekcyjne może obniżać jej skuteczność. Selekcja rozpoczęta bezpośrednio po kokultywacji przy wysokim stężeniu kanamycyny całkowicie hamowała regenerację pędów (dane nie publikowane). Najwięcej pędów transgenicznych otrzymano w przypadku, gdy selekcję rozpoczęto bezpośrednio po zakończeniu kokultywacji przy niskim stężeniu kanamycyny (1-2 mg/l), a następnie podwyższono stężenie do 5-10 mg/l. Elomaa i wsp. (6) selekcję w kulturach gerberii rozpoczynali po 2 tygodniach przy stężeniu kanamycyny wynoszącym 25 mg/l.

Na liczbę uzyskanych niezależnych transformantów ma wpływ potencjał regeneracyjny genotypu i tkanki. Dlatego prace nad transformacją zostały



poprzedzone doświadczeniami nad regeneracją gerbery. Opracowano metodę o zadowalającej wydajności, dostatecznej do zastosowania w transformacji. Odbywa się ona w dwóch etapach — indukcji (przy wyższym stężeniu cytokininy oraz auksyny) i regeneracji pędów bezpośrednio z nasady ogonków liściowych, i pośrednio z tworzącego się kalusa. W zależności od odmiany regenerowało od 50 do 90% listków, a w czasie 3 miesięcy tworzyło się średnio od 2,5 do 6,0 pędów na eksplantat regenerujący. Bardzo poważną zaletą tej metody jest utrzymywanie się zdolności regeneracyjnej kalusa powstałego na ogonkach liściowych przez wiele miesięcy (publikacja w przygotowaniu). Stwierdziliśmy także, że stopniowo zmniejszającą się zdolność do regeneracji można pobudzić przez włączanie do pożywki co kilka pasaży azotanu srebra. Taki sposób ma znaczenie dla regenerowania pędów transgenicznych, które powstają po kilku miesiącach od kokultywacji. Umieszczanie ogonków liściowych na pożywce z kanamycyną ogranicza regenerację bezpośrednią i opóźnia regenerację z kalusa. Krens i wsp. (14) podają, że bezpośredni sposób regeneracji buraka mniej sprzyjał transformacji niż regeneracja z kalusa. Wiąza to z tym, że odróżnicowanie komórek powoduje zwiększenie ich kompetencji do stransformowania. Mukhopadhyah i wsp. (12) donoszą, że tylko pędy pochodzące z regeneracji kalusa wytworzonego na liścieniach *Brassica campestris* były stransformowane. Pędy wyrastające bezpośrednio pochodziły z merystemów wytworzonych 450-625  $\mu\text{m}$  pod powierzchnią, z komórek do których T-DNA nie dotarło. Podobnie Lowe i wsp. (16) uważają, że u chryzantemy komórki wrażliwe na transfer T-DNA znajdują się w tkance przewodzącej; z nich tworzy się wolno kalus, podczas gdy organogeneza z komórek epidermy rozpoczyna się po już 14 dniach.

O użytecznej metodzie transformowania można mówić wówczas, jeśli jest możliwe uzyskanie co najmniej kilkunastu roślin transgenicznych w jednym procesie transformacji. Jest to konieczne, ponieważ spośród nich trzeba wyselekcjonować takie, które nie zostały zmienione w inny sposób, jak tylko przez obecność dodatkowej informacji wniesionej na T-DNA. Proces włączania obcego DNA może spowodować mutacyjne zmiany genetyczne typu delecje lub powtórzenia, związane z okresową utratą ciągłości na chromosomie. Włączenie T-DNA do miejsc wysoce repetytywnych może wywołać trwały brak aktywności. Podobny efekt może mieć włączenie do genomu rośliny wielu kopii T-DNA, co powoduje trwałą inaktywację wprowadzonych genów (7, 10, 11). Trzeba liczyć się zatem z koniecznością prowadzenia selekcji wśród stransformowanych roślin.

W jedynej pracy dotyczącej transformacji gerbery za pośrednictwem *Agrobacterium* kokultywowano małe fragmenty ogonków liściowych odmiany Terra Regina (6). Autorzy przeprowadzili kilka eksperymentów. W każdym z nich liczebność eksplantatów wynosiła 1200. Uzyskali 7 pędów transgenicznych, z których 4 przeżyły wszystkie etapy selekcji. W porównaniu z tymi wynikami nasza metoda wydaje się skuteczniejsza.

Z przeprowadzonych przez nas doświadczeń wynika, że młode liście łatwo regenerujących odmian gerbery są bardzo dobrym obiektem do transformacji, ale dla odmian o mniejszym potencjale regeneracyjnym lepsze wyniki można



uzyskać zakażając bakteriami rozgniecione wierzchołki pędów, jednakże w tym przypadku potrzebne są znacznie większe mateczniki. Prawdopodobieństwo uzyskania transgenicznych pędów gerbera wzrasta, gdy dodatkowo uszkodza się listki przez miażdżenie lub zeskrobywanie włosków, które jak stwierdzono podczas obserwacji ekspresji przejściowej *gus*, stanowią ochronę przed bakterią.

Różnice w sile ekspresji genów markerowych dotyczyły zmieniającej się wrażliwości na czynnik selekcyjny i zabarwienia o różnej intensywności i niejednakowej lokalizacji w tkankach, w obecności substratu X-gluc. Najczęściej obserwowaliśmy niebieski kolor w nerwach liściowych, włoskach kutikularnych, komórkach aparatów szparkowych, w pąkach oraz w całej blaszce najmłodszych liści. Nigdy nie stwierdzono niebieskiego koloru w korzeniach. Chociaż promotor CaMV 35S, w który jest zaopatrzony gen *gus* ma charakter konstytutywny już Battraw i Hall (3) stwierdzili, że funkcjonuje on głównie w komórkach epidermy liści, mezofilu i wiązkach przewodzących, a jest mało aktywny w komórkach epidermy korzeni. Renou i wsp. (21) donosili, że aktywność genu *gus* w liściach chryzantemy była najsilniejsza w liściach najmłodszych, pąkach, kalusie, strefach merystematycznych i wiązkach przewodzących.

Obserwowano także niestabilność ekspresji wprowadzonych genów w obrębie potomstwa otrzymanego przez rozmnożenie pąków kątowych. Stwierdzano różnice pomiędzy pędami w obrębie jednej linii i pomiędzy kolejnymi rozmnożeniami. Aktywność genu *gus* pojawiała się i znikła w kolejnych pasażach. Przyczyna leży albo w budowie chimerycznej tkanek albo w przejściowej utracie aktywności genów. Niestabilność roślin transgenicznych pierwszego pokolenia jest częsta (11). Ustabilizowanie ekspresji można osiągnąć przez rozmnożenie generatywne lub regenerację pędów dodatkowych z pojedynczych komórek.

## Literatura

1. An G., Watson B. D., Stachel S., Gordon M. P., Nester E. W., (1985), *EMBO J.*, 4, 277-284.
2. Barfield D., Pua E.-C., (1991), *Plant Cell Reports*, 10, 308-314.
3. Battraw M. J., Hall T. C., (1990), *Plant Molecular Biology*, 15, 527-538.
4. Boom R., Sol C. J. A., Salimans M. M. M., Jansen C. L., Wertheim-van Dillen P. M. E., van der Noordaa J., (1990), *J. of Clinical Microbiology*, 28, 495-503.
5. Deroles S. C., Boase M. R., Konczak I., (1997), in: *Biotechnology of Ornamental Plants*, Eds. Geneve R. L., Preece J. E., Merkle S. A., CAB International, UK, 87-119.
6. Elomaa P., Honkanen J., Puska R., Seppanen P., Helariutta Y., Mehto M., Kotilainen M., Nevalainen L., Teeri T. H., (1993), *Bio/Technology*, 11, 508-511.
7. Finnegan J., McElroy D., (1995), *Bio/Technology*, 12, 883-888.
8. Gawel N. J., Jarret R. L., (1991), *Plant Molec. Biology*, 9, 262-266.
9. Matzk A., Mantell S., Schiemann J., (1996), *Molecular Plant-Microbe Interaction*, 9, 373-381.
10. Matzke M. A., Matzke A. J. M., (1995), *Plant Physiol.*, 107, 679-685.
11. Meyer P., (1995), *Euphytica*, 85, 359-366.
12. Mukhopadhyay A., Arumugam N., Nandakumar P. B. A., Pradhan A. K., Gupta V., Pental D., (1992), *Plant Cell Reports*, 11, 506-513.



13. Murashige T., Skoog F., (1962), *Physiol. Plantarum*, 15, 473-497.
14. Krens F. A., Trifonova A., Keizer L. C. P., Hall R. D., (1996), *Plant Science*, 116, 97-106.
15. Krzymowska M., (1995), w: *Inżynieria genetyczna i biologia molekularna. Metody. Podręcznik laboratoryjny*, Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, Warszawa, 1-15.
16. Lowe J. M., Davey M. R., Power J. B., Blundy K. S., (1993), *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 33, 171-180.
17. Orlikowska T. K., Dyer W. E., (1995), *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 40, 85-91.
18. Orlikowska T., Nowak E., (1996), *Hodowla Roślin i Nasiennictwo*, 3, 39-45.
19. Oud J. S. N., Schneiders H., Kool Ad J., van Grinsven M. Q. J. M., (1995), *Euphytica*, 85, 403-409.
20. Robinson K. E. P., Firoozabady E., (1993), *Scientia Horticulturae*, 55, 83-99.
21. Renou J. P., Brochard P., Jalouzot R., (1993), *Plant Sci.*, 89, 185-197.
22. Robertson D., Weissinger A. K., Ackley R., Glover S., Sederoff R. R., (1992), *Plant Molecular Biology*, 19, 925-935.
23. Samac D., Shah D. M., (1991), *The Plant Cell*, 3, 1063-1072.
24. *Molecular Cloning Laboratory Manual*, (1989), Eds. Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T., Cold Spring Harbour Laboratory Press., 2ed., Appendix.

### Effect of initial explant on effectivity of *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Gerbera hybrida*

#### Summary

An efficient method for genetic *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of five cultivars *Gerbera hybrida* was established. The youngest leaves and shoot tips from proliferating *in vitro* cultures were co-cultivated with disarmed strain LBA 4404/pBI121 carrying the chimaeric genes *nptII* and *gus*. The inoculated explants were repeatedly cultured on regeneration medium with kanamycin and Biotaksym. After 9-10 months from 0.04 to 0.25 independently transformed shoots from one inoculated leaf and from 0.06 to 0.65 from one inoculated shoot tip were obtained, depending on cultivar and additional treatment. Transformed shoots accounted for 5.0 to 50.0% of all regenerated shoots. Additional wounding of leaves before inoculation by squeezing and scratching off increased transformation efficiency. Better results for recalcitrant to regeneration cultivars were obtained if squeezed shoot tips were inoculated. Regenerating shoots were selected on kanamycin, screened for *gus* expression with X-gluc and tested by PCR for *nptII* and *gus* genes. All together 162 transgenic shoots were obtained in cvs Amber, Boy, Ferrari, Mariola and Tamara, but only 24 relatively stable lines were established.

#### Key words:

*Agrobacterium tumefaciens*, gerbera, initial explants, transformation.

#### Adres do korespondencji:

Teresa Orlikowska, Instytut Sadownictwa i Kwiaciarnictwa, ul. Pomologiczna 18, 96-100 Skierniewice.