



Lucerna siewna (*Medicago sativa*) jako obiekt transformacji przy użyciu *Agrobacterium tumefaciens* oraz regeneracji *in vitro*

Olesia Lisova, Andrzej B. Legocki

Instytut Chemii Bioorganicznej Polska Akademia Nauk, Poznań

Alfalfa (Medicago sativa) as an Object for Transformation by Agrobacterium tumefaciens and Regeneration in vitro

Summary

From the economical point of view alfalfa is a very valuable plant. It has very high yield potential, it is rich in protein, vitamins and minerals, so it is prized as very important feed for horses, beef cattle, sheep, goats and other domestic animals. That is why the improving of alfalfa quality by the methods of molecular biotechnology is a very interesting issue. In this review information about the crucial elements of alfalfa transformation and regeneration are gathered together. Following elements as genetic background of plant, *A. tumefaciens* strains, explant types, *in vitro* culture medias, plant development stages are discussed. It seems that optimisation of the transformation and regeneration procedure are individual for every plant genotype and *A. tumefaciens* strain.

Key words:

alfalfa, transformation, *Agrobacterium tumefaciens*, somatic embryogenesis, regeneration.

Adres do korespondencji

Olesia Lisova,
Instytut Chemii
Bioorganicznej,
Polska Akademia Nauk,
ul. Noskowskiego 12/14,
61-704 Poznań;
e-mail:
olesia@ibch.poznan.pl

1. Wstęp

Lucerna siewna (*Medicago sativa* L.) jest rośliną paszową o największej na świecie powierzchni upraw (1), a co za tym idzie, o olbrzymim znaczeniu ekonomicznym. Spełnia ona ogromną rolę w żywieniu bydła, dostarczając paszy chętnie pobieranej,

o dużej koncentracji białka i wysokiej strawności (2). Dlatego ważnym zagadnieniem, jeśli wziąć pod uwagę najnowsze tendencje rozwoju technologii rolnictwa, jest transformacja genetyczna lucerny – czyli możliwość wprowadzania do genomu tej rośliny sekwencji DNA, warunkujących nowe pożyteczne cechy, takie na przykład, jak odporność na herbicydy, odporność na szkodniki i choroby, odporność na stresowe warunki środowiska, takie jak susza, chłód, zasolenie. Inne pożądane modyfikacje cech lucerny to na przykład jakościowe i ilościowe zmiany składników odżywczych. Kolejnym, potencjalnym zastosowaniem lucerny transgenicznej może być jej wykorzystanie jako bioreaktora do produkcji specyficznego białka na potrzeby terapii, diagnostyki lub przemysłu. Ważną cechą takiego bioreaktora roślinnego jest stosunkowo niski koszt produkcji białka.

2. Genetyczne uwarunkowania transformacji i regeneracji lucerny

Lucerna siewna nie należy do grupy szczególnie dogodnych obiektów, jeśli chodzi o manipulacje jej materiałem genetycznym. Jest to gatunek autotetraploidalny ($2n = 32$), o bardzo dużym genomie, allogamiczny, ze zmiennym stopniem autokompatybilności. Wynika stąd olbrzymia zmienność genetyczna roślin zarówno w obrębie gatunku, jak i nawet w obrębie jednej konkretnej odmiany. Dlatego w przypadku tego gatunku wielkiego znaczenia, jeśli chodzi o wydajność transformacji i regeneracji, nabiera pojedynczy konkretny genotyp rośliny (3-5).

Na podstawie badań wykazano (6), że u lucerny siewnej cecha wydajnej regeneracji *in vitro* jest dziedziczona z wysoką częstością, dlatego możliwe było wyselekcjonowanie takich odmian lucerny siewnej, jak Rangelander, Regen S, Regen Y, Europe, które wykazują dość wysoką średnią wydajność regeneracji w kulturach *in vitro* (dla Rangelander – ok. 80% (7)). Jednak dla większości innych odmian najpierw należy wyselekcjonować wysoce embriogeniczny genotyp, a następnie utrzymywać go jako źródło eksplantatów, namnażając wyłącznie wegetatywnie. Podobną zależność podatności na regenerację *in vitro* od genotypu stwierdzono nie tylko dla lucerny siewnej, ale również w przypadku wielu innych rodzajów roślin motylkowych: *Arachis*, *Glycine*, *Melilotus*, *Vicia* (9), *Trifolium* (10), *Cajanus* (11), *Coronilla* (12), *Phaseolus*, *Stylosanthes* (13) i *Lothus* (14).

Genotyp uważany jest za wydajnie regenerujący, gdy na 20 wyjściowych eksplantatów wytwarza się 4-5 embriogenicznych kalusów, a następnie na każdym kalusie powstaje ponad 10 embrionów w stadium torpedy (5). Istnieje pogląd, że w obrębie każdej istniejącej odmiany można wyselekcjonować wysoce embriogeniczny genotyp. Jest to jedynie kwestia liczby przebadanych pod kątem regeneracji roślinnych genotypów (7,8). W tym przypadku logicznym podejściem, jak się wydaje, byłby wybór, jako obiektu do przetestowania potencjału regeneracji *in vitro*, takiej odmiany lucerny, którą hodowcy uprzednio wyselekcjonowali względem maksymalnej liczby pokosów w ciągu jednego sezonu wegetacyjnego, taka odmiana cechuje się bowiem

zwiększoną zdolnością do regeneracji. Niestety brak jest danych literaturowych na temat przypuszczalnej korelacji między potencjałem regeneracji odmiany *in vitro* a jej wielokością.

Najczęściej stosowaną metodą transformacji lucerny jest transformacja za pomocą *Agrobacterium tumefaciens*. Jest to metoda, w której wykorzystuje się mechanizm naturalnej infekcji roślin przez bakteryjny patogen glebowy. Bakteria przekazuje do komórki roślinnej materiał genetyczny, na podstawie którego zachodzi ekspresja genów. Metoda ta ma wiele zalet, najważniejszą z nich jest, jak się wydaje, trwałość modyfikacji genetycznej rośliny i możliwość przekazania wprowadzonego genu następnemu pokoleniu.

W przypadku zaistnienia sytuacji, gdy z pewnych powodów bardzo zależy na transformacji konkretnego genotypu lucerny, który to genotyp cechuje się niską podatnością na transformację *Agrobacterium*, sugerowane jest zastosowanie metody transformacji przez bombardowanie mikrocząsteczkami, ponieważ transfer genu za pomocą tej metody, jak się wydaje, jest mniej zależny od genotypu rośliny (15).

Lucerna siewna ulega regeneracji w większości przypadków na drodze somatycznej embriogenezy. Somatyczną embriogenezą nazywane jest zjawisko inicjacji i rozwoju zarodków z tkanki somatycznej. Jest to bardzo dogodna cecha z punktu widzenia transformacji tego gatunku. Pozwala bowiem na otrzymanie wyjątkowo jednorodnych pod względem genetycznym roślin, ponieważ zasadniczo somatyczny embriion rozwija się z pojedynczej sformowanej komórki (16). Ponadto zarówno embriony jak i małe roślinki często wytwarzają na swojej powierzchni wtórne somatyczne embriony. Zjawisko to nazywane jest embriogenezą wtórną lub cykliczną (17). Wtórna embriogeneza pozwala uzyskać dowolną liczbę roślin z jednostkowej transformacji.

Bardzo ważną charakterystyką genotypu lucerny, wyselekcjonowanego do prac *in vitro* jest czas regeneracji – dla najlepszych genotypów ten czas wynosi 9-14 tygodni (18). Generalnie lucerna siewna ma długi czas regeneracji, co jest związane z jej fizjologią – jest to roślina dwuletnia i jej wzrost i rozwój zarówno w warunkach *in vivo* jak i w *in vitro* zachodzą bardzo wolno w porównaniu np. z sałatą (*Lactuca sativa*), której czas wegetacji wynosi ok. 1,5 miesiąca.

Na podstawie opisanych cech fizjologicznych i genetycznych lucerny siewnej, a także na podstawie własnych doświadczeń z zakresu transformacji lucerny siewnej, autorzy tego opracowania jeszcze raz chcą podkreślić, że lucerna siewna jest dość trudnym obiektem do transformacji. Niemniej jednak potrzeba transformowania właśnie lucerny siewnej jest bardzo duża, bowiem roślina ta ma ogromne znaczenie jako obiekt badań o charakterze aplikacyjnym.

Dla potrzeb zaś badań podstawowych jako obiekt do badań nad transformacją używa się w wielu laboratoriach *Medicago truncatula* – gatunek o małym genomie, diploidalny i, co najważniejsze, autogamiczny, co sprzyja wyprowadzeniu stabilnych i jednorodnych linii genetycznych (19,20). Transformacja i regeneracja *Medicago truncatula* nie nastrocza większych trudności.

Wspomnieć należy również, że procedury regeneracji *in vitro* opracowano dla wielu innych gatunków *Medicago*, np. dla *M. coerulea*, *M. Glutinosa* (21), *M. Arborea* (22), *M. difalcata*, *M. falcata*, *M. hemicycla*, *M. varia* (23) i *M. media* (24).

3. Obce geny wprowadzane do lucerny

Wśród najczęściej wprowadzanych do lucerny siewnej cech genetycznych należy wymienić takie, jak: odporność na szkodniki, odporność na herbicydy, markery genetyczne umożliwiające selekcję transformantów oraz sekwencje kodujące białka o znaczeniu ekonomicznym (wykorzystanie lucerny jako bioreaktora, w którym zachodzi wydajna ekspresja pożądanego białka). W tabeli 1 przedstawiono szereg przykładów transformacji lucerny.

Tabela 1

Lista konstruktów genetycznych, wprowadzonych do genomu *Medicago* za pomocą *Agrobacterium*

Fragment DNA	Obce białko, ulegające ekspresji w roślinie	Genotyp <i>Medicago</i>	Literatura
1	2	3	4
35S _{gus} -intron	β-glukuronidaza	<i>M. truncatula</i> ssp. <i>falcata</i>	(20)
<i>enod12A</i> , <i>enod12b</i> , <i>srg1b3</i>	noduliny	<i>M. truncatula</i> ekotyp108-1	(18)
<i>npIII</i>	fosfotransferaza aminoglikozydowa	<i>M. sativa</i> , cv. Regen S	(1)
<i>cad</i> -antysens	–	<i>M. sativa</i> , RA-3	(25)
<i>rk2</i>	fosfotransferaza aminoglikozydowa	<i>M. varia</i> , g/t A2	(16)
IFR _{gus}	β-glukuronidaza	<i>M. sativa</i> cv. Apollo, Regen SY	(26)
gen owalbuminy kury	owalbumina kury	<i>M. sativa</i> cv. Rangelander, Siriver, Trifecta	(14)
gen wicyliny, wicylinyKDEL	wicylina, wicylinaKDEL	<i>M. sativa</i> cv. Rangelander	(27)
<i>Alfin1</i> , <i>Alfin1</i> -antysens	–	<i>M. sativa</i> cv. Regen S	(28)
<i>mtenod12gus</i>	nodulina + β-glukuronidaza	<i>M. truncatula</i> cv. Jemalong, g/t A17,2HA1, 2HA3-9-10-3	(29)
gen faseoliny	faseolina	<i>M. sativa</i> cv. Rangelander	(30)
35S inhibitor I proteinyzy pomidora	inhibitor I proteinyzy pomidora	<i>M. sativa</i> , klony 93-21, 93-13	(31)
<i>npIII</i> , <i>gus</i>	β-glukuronidaza	<i>M. sativa</i> , cv. Zaječarska	(32)
<i>cryIC</i>	endotoksyna <i>Bacillus thuringiensis</i>	<i>M. sativa</i> cv. Regen S, klon RA3	(33)
<i>sfa8</i>	albumina słonecznika	<i>M. sativa</i> cv. Siriver, Aquarius	(34)
<i>bar</i>	N-acetylotransferaza fosfinotricyny	<i>M. sativa</i> cv. Regen S, klon RA3	(35)
gen syntetazy glutaminy (antysens)	–	<i>M. sativa</i> cv. Regen SY, Rangelander	(36)
<i>Fe-sod</i>	dysmutaza ponadtlenkowa	<i>M. sativa</i> , cv. Rangelander	(37)
<i>iomt</i> -nadekspresja	izoflawon-O-metylotransferaza	<i>M. sativa</i> cv. Regen S	(38)
gen kinazy asparaginianowej	kinaza asparaginianowa	<i>M. sativa</i>	(39)

1	2	3	4
NADH-gogat (antysens)	–	<i>M. sativa</i> cv. Regen SY	(40)
gen syntazy resweratrolu	syntaza resweratrolu	<i>M. sativa</i>	(41)
<i>tubA1</i>	α -tubulina	<i>M. sativa</i>	(42)
<i>enod40</i>	nodulina	<i>M. sativa</i> cv. Regen	(43)
<i>psugt1</i> (antysens)	–	<i>M. sativa</i> cv. Regen	(44)
<i>tdy1gus</i>	β -glukuronidaza	<i>M. sativa</i>	(45)
geny lektyn soi i grochu	lektyny soi i grochu	<i>M. sativa</i> cv. Regen	(46)

4. Zarys podstawowych elementów procedury transformacji

4.1. *Agrobacterium tumefaciens*

Agrobacterium tumefaciens jest to Gram-dodatnia bakteria glebowa, która wytworzyła unikatowy system kolonizacji roślin (47). Jest to patogeniczna bakteria, która infekuje rośliny przez zranione tkanki, powodując narośl (tumor) na szyjce korzeniowej. Wirulentne szczepy *Agrobacterium* zawierają pozachromosomalne DNA w formie plazmidu o wielkości 200 tys. pz, niosącego geny uczestniczące w rozwoju tumoru (tzw. Ti-plazmid). Są to geny odpowiedzialne za zdolność koniugacji z komórką roślinną, replikację oraz katabolizm opin – czynników, wykorzystywanych przez bakterie jako źródło węgla i azotu. Ponadto plazmid ten zawiera geny wirulencji i region T-DNA, który podczas infekcji jest przenoszony do komórki roślinnej i ulega integracji z genomem jądrowym. Odcinek T-DNA zawiera geny kodujące hormony roślinne i opiny, po wbudowaniu do jądrowego DNA rośliny geny te ulegają wydajnej ekspresji. Proces ten z powodzeniem wykorzystano do celów inżynierii genetycznej. Do przeniesienia i integracji T-DNA niezbędne są wyłącznie prawa i lewa sekwencje graniczne. Pozostałe geny można usunąć i na ich miejsce wstawić dowolne geny wraz z sekwencjami warunkującymi ich ekspresję.

Do celów transformacji genetycznej stosowane są wyselekcjonowane, zmodyfikowane pod kątem transformacji, o różnej sile wirulencji szczepy.

Tabela 2

Szczepy *Agrobacterium* najczęściej stosowane do transformacji lucerny siewnej

Szczep <i>Agrobacterium</i>	Odmiana lucerny siewnej	Literatura
EHA 105	Arcangeli	(18)
LBA 4404	Zaječarska	(32)
A281	Zaječarska	(32)
AGL1	Aquarius, Siriver	(34)
A208	Rangelander	(30)
C58C1	Rangelander	(48)

Powszechnie uważa się, że dla potrzeb konkretnej transformacji należy wprowadzić konstrukt genetyczny do transformacji roślin do kilku szczepów *Agrobacterium* i wybrać ostatecznie szczep, cechujący się największą efektywnością transformacji. Można jednak zauważyć, że autorzy różnią się zdaniem co do znaczenia wyboru szczepu. Jedni utrzymują, że rodzaj szczepu absolutnie nie wpływa na wydajność transformacji (48), inni sugerują, iż szczep *Agrobacterium* odgrywa wręcz zasadniczą rolę w procesie transformacji: z konkretnym genotypem lucerny wydajnie oddziałuje tylko odpowiednio dobrany szczep *Agrobacterium* (4,22). Z praktycznych doświadczeń autorów tego tekstu wynika, że jednak dobór szczepu jest ważny dla wydajności transformacji.

4.2. Przygotowanie eksplantatów oraz transformacja

4.2.1. Znaczenie stanu fizjologicznego eksplantatów

Obok genotypu, zasadniczym czynnikiem decydującym o powodzeniu hodowli lucerny *in vitro* jest stan fizjologiczny roślin (źródła eksplantatów). Zależy on od warunków, w których rośliny te są hodowane (większość autorów zaleca stosowanie następujących warunków: fotoperiod 16 h, temperatura 26°C, niewielka wilgotność, dobry drenaż podłoża, pH gleby zbliżone do neutralnego (30,2)). Innym istotnym czynnikiem jest wiek roślin. Młode rośliny cechuje większa wydajność regeneracji (17).

4.2.2. Rodzaje eksplantatów

Źródłem eksplantatów mogą być zarówno tkanki merystematyczne, jak i już zróżnicowane.

Tabela 3

Wybrane rodzaje eksplantatów stosowane w procesie regeneracji lucerny *in vitro*

Odmiana lucerny	Typ eksplantatu	Literatura
Europe	liście	(17)
Rangelander	hypokotyle	(7)
Regen S	liścienie	(49,50)
Adriana	korzenie	(51)
A-15	ogonki liściowe, łodygi	(52)
Saranac	niedojrzałe pylniki, załącznik	(53)

Rodzaj zastosowanych do transformacji i regeneracji eksplantatów, jak się wydaje, jest czynnikiem mało ważnym (7). Niektórzy autorzy jako szczególnie wydajny typ eksplantatów wymieniają ogonki liściowe, lecz uważamy, że fakt ten wpływa jedynie z większej odporności ogonków liściowych, w porównaniu np. do liści, na uszkodzenia mechaniczne podczas manipulacji.

4.2.3. Transformacja

Materiał wyjściowy po wysterylizowaniu uszkadza się, by zwiększyć wydajność infekcji *Agrobacterium*. Ponadto uszkodzone tkanki wydzielają czynniki indukujące proces przenoszenia T-DNA (54). Komórki *Agrobacterium* są hodowane przez noc w pożywce płynnej. W tak przygotowanej zawieszynie *Agrobacterium* eksplantaty są następnie inkubowane od 1 minuty do 36 godzin – tak duża rozbieżność czasu jest podawana przez różnych autorów. Opracowano również metodę z zastosowaniem infiltracji próżniowej, która zwiększa efektywność infekcji *Agrobacterium* (55). Po okresie wstępnej inkubacji eksplantaty wykładane są na pożywkę do kokultury. Kokultura trwa przez 2-3 dni w ciemności. Czynnikiem, który na danym etapie wpływa dodatkowo na wydajność transformacji jest acetosyringon, dodawany do pożywki (28,18).

4.2.3. Pożywki do hodowli *in vitro*

Najczęściej stosowanymi pożywkami do hodowli lucerny *in vitro* są pożywki oparte na trzech podstawowych zestawach składników: MS (56), SH (57) oraz Blydesa (58). Wszystkie pożywki do hodowli *in vitro* zawierają pięć głównych grup składników: nieorganiczne sole (makro- i mikroelementy), źródło energii i węgla, witaminy, organiczny azot i regulatory rozwoju. Oprócz wymienionych komponentów dodaje się różne naturalne złożone substancje, takie jak ekstrakt drożdżowy lub hydrolizat kazeiny. W tabeli 4 umieszczono wykaz składników trzech podstawowych pożywek. Nie uwzględniono jednak regulatorów rozwoju, które będą omówione w innym rozdziale.

Należy podkreślić, że praktycznie każdy badacz zajmujący się regeneracją lucerny siewnej wypracował indywidualne ilościowe i jakościowe modyfikacje tych podstawowych pożywek, optymalizując je dla potrzeb konkretnego genotypu lucerny. Niektórzy uczeni przytaczają dowody silnej interakcji takich czynników jak: genotyp-pożywka, genotyp-eksplantat, genotyp-eksplantat-pożywka (59). Potencjał embriogeniczny, gdy jest on dostatecznie wysoki, jak się wydaje, jest jednak niezależny od składu stosowanego podłoża (9,60,61). Skład pożywki może co najwyżej modulować w niewielkim zakresie wydajność embriogenezy.

Tabela 4

Porównanie składu podstawowych pożywek stosowanych w hodowli lucerny *in vitro*

	Rodzaj pożywki		
	UM (bazowana na MS)	SH	Blaydes
	zawartość składnika, mg/l		
Makroelementy:			
KH ₂ PO ₄	170	–	300
KNO ₃	1900	2500	1000
NH ₄ H ₂ PO ₄	–	300	–
NH ₄ NO ₃	1650	–	1000
Ca (NO ₃) ₂	–	–	347
CaCl ₂ × 2 H ₂ O	440	200	–
MgSO ₄ × 7 H ₂ O	370	400	35
KCl	–	–	65
Mikroelementy:			
KJ	0,415	1	0,8
ZnSO ₄ × 7 H ₂ O	4,3	1	1,5
H ₃ BO ₃	3,1	5	1,6
Na ₂ MoO ₄ × 2 H ₂ O	0,125	0,1	–
MnSO ₄	11,2	10	4,4
CuSO ₄ × 5 H ₂ O	0,013	0,2	–
CoCl ₂ × 6 H ₂ O	0,013	0,1	–
Na ₂ FeEDTA	–	–	32
Na ₂ EDTA	40	20	–
FeSO ₄ × 7 H ₂ O	13,9	15	–
EDFS	140	–	–
Witaminy i aminokwasy:			
tiamina	10	5	0,1
kwask nikotynowy	5	5	0,5
pirydoksyna	10	0,5	0,1
prolina	–	288	–
tioprolina	–	53	–
glicyna	2	–	2
Inne składniki:			
sacharoza	30 000	30 000	30 000
agar	7000	6000	10 000
mio-inozytol	100	200	–
hydrolizat kazeiny	2000	–	–
Odczyn:			
pH	5,7	5,8	5,8

4.2.4. Selekcja transformantów

Po 2-3 dniach kokultury eksplantaty przekłada się na pożywkę zawierającą czynnik selektywny, w celu pozytywnej selekcji materiału transgenicznego, oraz antybiotyków – w celu eliminacji *Agrobacterium*. Najczęściej używanymi czynnikami selekcyjnymi są antybiotyki kanamycyna i hygromycyna, a także herbicyd Basta oparty na fosfinitricynie. Bardzo ważny jest wybór antybiotyku eliminującego *Agrobacterium*. Istnieje opinia, że takie antybiotyki jak cefotaksym, karbenicylina i wankomycyna wykazują hamujący wpływ na inicjację kalusa i wzrost regenerantów (1,3).

4.2.5. Czynniki wzrostowe a embriogeneza

W celu wydajnego sterowania procesem embriogenezy pożywki powinny zawierać odpowiednie regulatory rozwoju roślin (zarówno naturalne hormony roślinne jak i ich syntetyczne analogi). Do pożywek dostosowanych do potrzeb lucerny siewnej, dodawane są dwie grupy regulatorów: auksyny (IAA, NAA, 2,4-D) i cytokiny (kinetyna, BAP).

Auksyny *in vitro* stymulują podziały komórkowe prowadząc do tworzenia tkanki kalusowej, zdolne są także w pewnych warunkach nadawać komórkom kalusa cechy embriogeniczne (62). Do auksyn należy IAA (kwas indoliloctowy), naturalna auksyna, oraz syntetyczne NAA (kwas naftyloctowy) i 2,4-D (kwas 2,4-dichlorofenoksyloctowy).

Cytokiny *in vitro* pobudzają podziały komórkowe, przeciwdziałają starzeniu się organów roślinnych, pobudzają działanie kambium i formowanie się tkanek przewodzących (62). Kinetyna (6-furfuryloaminopuryna) oraz BAP (6-benzyloaminopuryna) należą do cytokinin syntetycznych.

Tabela 5

Wybrane zestawy czynników wzrostowych używane do indukcji somatycznej embriogenezy lucerny *in vitro*

Czynnik	Stężenie, mg/l	Genotyp lucerny	Literatura
1	2	3	4
2,4-D	2	cv. Adriana	(51)
kinetyna	0,1		
2,4-D	22	klon A-15	(52)
kinetyna	1		
2,4-D	2	klon HG2	(63)
kinetyna	2		
2,4-D	2	cv. Arcangeli	(18)
kinetyna	0,25		
BAP	1	<i>M. arborea</i>	(22)
NAA	1		

1	2	3	4
2,4-D	10	cv. Rangelander	(30)
BAP	0,5		
NAA	0,09		
NAA	4,6	cv. Rangelander	(31)
kinetyna	2,15	klony 93-21, 93-13	(3)
NAA	2	cv. Georgia –TE	(64)
IAA	2		
kinetyna	2		
2,4-D	2	cv. Saranac	(65)
NAA	2		
kinetyna	2		

Z przedstawionych danych wynika, że embriogenezę mogą wydajnie inicjować różne czynniki w najrozmaitszych kombinacjach. Aby kierować rozwojem tkanki roślinnej bardzo ważne są odpowiednie proporcje właściwych regulatorów. Mechanizmy działania takich kombinacji czynników prawdopodobnie są niesłychanie złożone. Każdy regulator wzrostu i rozwoju ma szeroki zakres oddziaływania na rośliny, zależny od stężenia oraz współdziałania z innymi substancjami egzo- i endogennymi. Zamieszczamy uogólnione dane na temat oddziaływania regulatorów rozwoju na eksplantaty roślinne *in vitro* (66).

1. Te same regulatory roślinne mogą różnie działać:

- nie tylko na eksplantaty z grup oddalonych taksonomicznie, ale także na odmiany i klony tego samego gatunku;
- nawet na eksplantaty z tej samej rośliny, ale pochodzące z różnych tkanek i organów.

2. Kolejne podanie różnych regulatorów daje odmienny efekt niż podanie ich równocześnie.

3. Wzrastająca koncentracja regulatora może wywoływać nasilenie się jakiegoś efektu, a po przekroczeniu progu ilościowego może spowodować jego zmianę.

4. Różne regulatory, także z odmiennych grup, mogą powodować taką samą reakcję morfologiczną eksplantatów pobranych z różnych tkanek albo z roślin należących do odmiennych grup taksonomicznych.

5. Reakcja eksplantatu na regulatory roślinne jest w znacznym stopniu modyfikowana przez środowisko, np. zawartość składników mineralnych i organicznych w pożywce, cechy fizyczne pożywki, skład atmosfery w naczyniu, temperaturę czy oświetlenie.

6. Działanie regulatorów roślinnych zależy od wieku kultur, ponieważ wraz z liczbą pasaży zmienia się wrażliwość eksplantatu na regulatory, co jest wynikiem zmieniającej się ekspresji/represji niektórych genów lub akumulacji niektórych metabolitów.

7. Reakcja morfogenetyczna eksplantatu na regulatory rozwoju następuje po różnym okresie, a długość okresu oczekiwania na reakcję jest zależna od stężenia i rodzaju regulatora, rodzaju eksplantatu, jego początkowej wrażliwości i innych czynników.

8. Większość regulatorów rozwoju nie pozostaje w komórkach i tkankach w postaci, w jakiej została podana do pożywki, ale przynajmniej częściowo jest metabolizowana do form nieaktywnych fizjologicznie.

Wychodząc z tych rozważań stwierdzamy, że pozostaje wyłącznie eksperymentalna droga doboru odpowiednich regulatorów dla potrzeb regeneracji konkretnego genotypu lucerny.

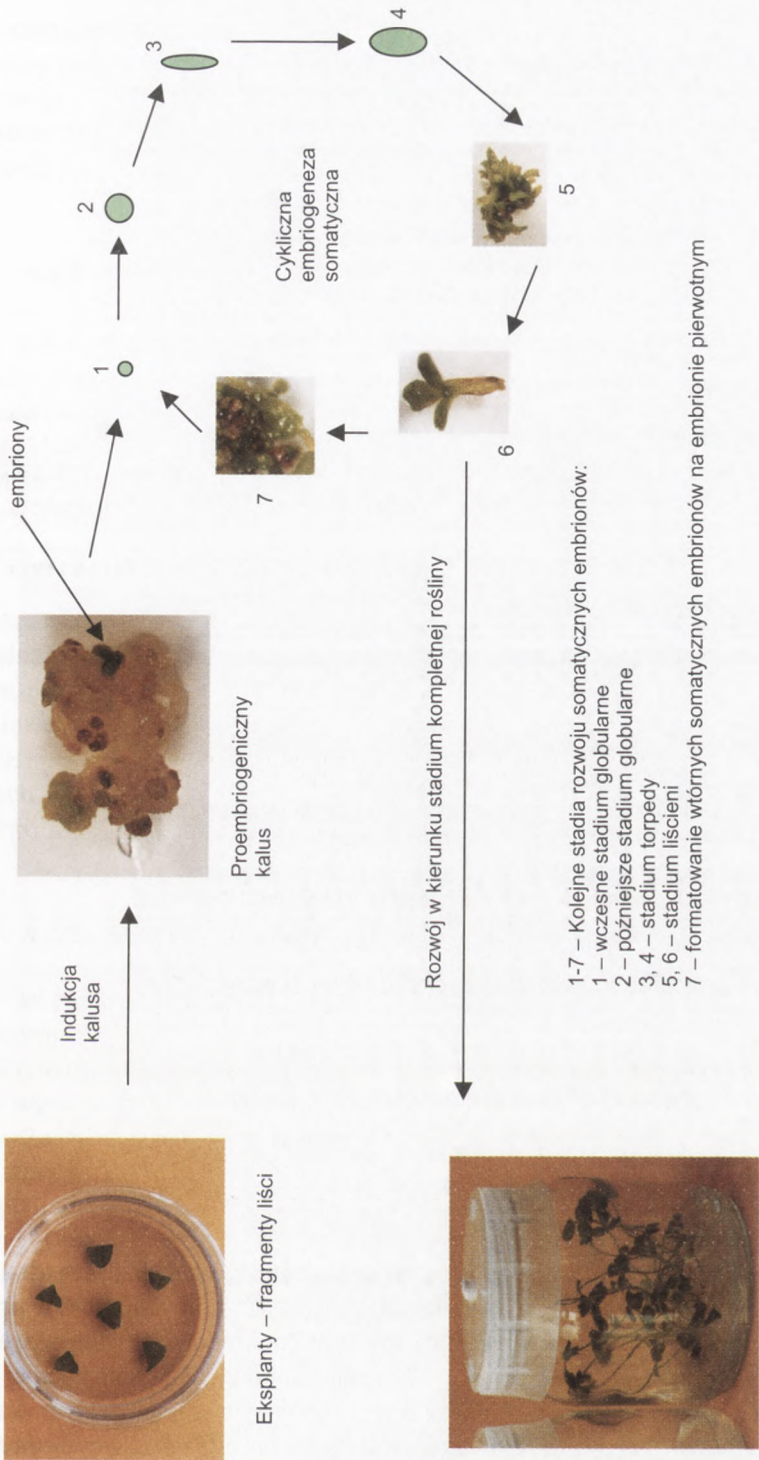
4.2.6. Stadia rozwoju embrionów

Embriony przechodzą kolejne stadia rozwoju – od kulistego poprzez stadium torpedy i do postaci z widocznymi liścieniami (rys. 1). W tym ostatnim stadium embriony kiełkują i rozwijają się w kompletne rośliny. Wykazano, że embriony lucerny siewnej nie zainicjują procesu dojrzewania, jeśli nie zostaną oddzielone od kalusa (53). Niekiedy, by pobudzić embrion do morfogenezy, badacze odcinają jego część „pędową”, a następnie ukorzeniają na pożywce bez hormonów (64).

W przypadku gdy somatyczne embriony utrzymuje się w warunkach regeneracji, na ich powierzchni wytwarzają się nowe somatyczne embriony, luźno związane z matczynym embrionem, co pozwala przypuszczać, że powstają one z pojedynczej komórki lub z nielicznej grupy komórek (64). Taka cykliczna somatyczna embriogeneza (cykl trwa przeciętnie ok. 30 dni) pozwala utrzymywać hodowlę somatycznych embrionów przez dłuższy okres. Wydajność tego procesu jest znaczna – jeden embrion w jednym cyklu może wytworzyć kilkadziesiąt wtórnych embrionów. Zjawisko cyklicznej somatycznej embriogenezy jest znane wśród innych roślin, lecz u lucerny siewnej ma charakter unikatowy, ponieważ wtórna embriogeneza może zajść nawet na embrionach znajdujących się w bardzo zaawansowanych stadiach rozwoju (64).

4.2.7. Schematy hodowli eksplantatów

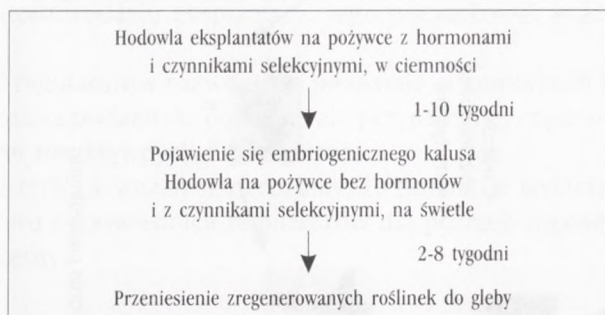
Dalsze postępowanie mające na celu uzyskanie embrionów i morfogenezę może być oparte na następujących schematach (zestawienia 1 i 2).



- 1-7 – Kolejne stadia rozwoju somatycznych embrionów:
 1 – wczesne stadium globularne
 2 – późniejsze stadium globularne
 3, 4 – stadium torpedy
 5, 6 – stadium liścieni
 7 – formatowanie wtórnych somatycznych embrionów na embrionie pierwotnym

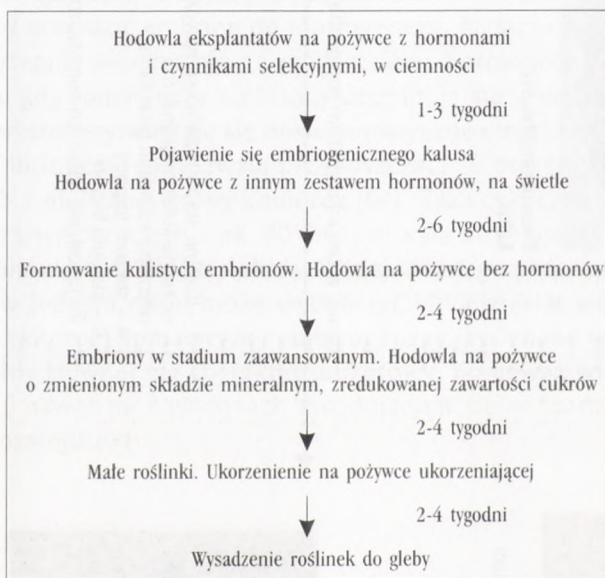
Rys. 1. Regeneracja lucerny *Medicago sativa* na drodze somatycznej embriogenezy.

Schemat podstawowej procedury regeneracji lucerny



Schemat może ulec rozbudowaniu, gdy konkretny genotyp rośliny wymaga zastosowania pewnych czynników, aby móc przejść kolejne stadia embriogenezy.

Schemat wielostopniowej procedury regeneracji lucerny



Schemat ten pokazuje maksymalnie złożone postępowanie. Z reguły badacze ustalają metodą doświadczalną własny, najprostszy schemat, zmieniając warunki hodowli w przypadku zaobserwowania pewnego zahamowania rozwoju embrionów na jednym z etapów. Terminy, w których zachodzą kolejne zdarzenia embriogenezy somatycznej są określone z dużym przybliżeniem, albowiem są one w ogromnym stopniu zróżnicowane w zależności od genotypu lucerny. Okres, w którym kalus zachowuje właściwości embrio-

geniczne także jest bardzo zróżnicowany, w zależności od genotypu rośliny (61). Interesujący jest fakt, że w przypadku lucerny siewnej, odwrotnie, niż u większości innych gatunków roślin, indukcja korzeni za pomocą regulatorów rozwoju może nastąpić przy wysokim stężeniu auksyny i niskim cytokiny (17). Jednakże w większości przypadków tworzenie korzeni u lucerny nie potrzebuje zastosowania regulatorów rozwoju.

4.2.8. Poziom ekspresji transgenu

Jako wynik procesu regeneracji transformantów otrzymywane są rośliny o bardzo różnym poziomie ekspresji transgenu, nawet jeśli pochodzą one z embrionów, rozwijających się na pojedynczym kalusie. Wynika stąd, że pojedynczy transgeniczny kalus może powstawać z więcej niż jednej transformowanej komórki. Podaje się także inną interpretację, a mianowicie, że kalus może powstawać z pojedynczej transformowanej komórki, lecz w toku proliferacji, przed embriogenezą w niektórych komórkach następuje rearanżacja DNA (14).

Ponadto, jak i w przypadku innych roślin, pochodzących z hodowli *in vitro*, częstym zjawiskiem wśród zregenerowanych roślin lucerny jest zmienność somatoklonalna. W obszernej pracy przeglądowej na ten temat (6) opisano następujące prawdopodobne przyczyny tego zjawiska: strukturalne modyfikacje chromosomów, przemieszczenie się transpozonów, utrata chromatyny, amplifikacja DNA, somatyczny *crossing-over*, somatyczna redukcja oraz zmiany DNA w organelach cytoplazmatycznych. Wykazano, że stabilność cytologiczna regenerantów zależy też od genetycznego podłoża rośliny wyjściowej (24).

4.2.9. Wydajność procesu transformacji

W piśmiennictwie można znaleźć następujące wartości wydajności transformacji lucerny siewnej (liczba transformantów na 100 pierwotnych eksplantatów): 12,5-51% (67), 4-15% (34), ponad 100% (18), 20% (3), 13-30% (3), 60% (5). Z danych tych wynika, że wydajność procesu transformacji jest zupełnie inna w każdym badanym przypadku. Zależy ona przede wszystkim, jak się wydaje, od trafności wyboru wyjściowego materiału oraz optymalizacji warunków transformacji i regeneracji. Na wydajność wpłynąć może w znacznej mierze charakter transgenu, promotor, miejsce integracji do genomu, liczne mechanizmy wyciszenia genów oraz wiele innych czynników.

5. Podsumowanie

Należy zaznaczyć, że zarówno somatyczna embriogeneza jak i organogeneza lucerny siewnej *in vitro* są wynikiem kombinacji i współdziałania takich cech, jak geno-

typ, warunki rozwojowe i środowiskowe, a także regulatory wzrostu, fizyczne i inne komponenty pożywki. Czynniki te można podzielić na te o znaczeniu zasadniczym, oraz na takie, które nie są obligatoryjnym warunkiem do uzyskania regenerantów lucerny, lecz stosowane, znakomicie podnoszą wydajność. Dla powodzenia procesu regeneracji zasadnicze znaczenie, jak się wydaje, mają genotyp oraz stan fizjologiczny materiału wyjściowego, a także czynniki wzrostowe w podłożu.

W odpowiedzi morfogenicznej w trakcie regeneracji można wyróżnić trzy wyraźne stadia: nabycie kompetencji, indukcja lub determinacja poszczególnej drogi morfogenezy, oraz różnicowanie (wytworzenie zróżnicowanych struktur tkankowych, prowadzące do uzyskania kompletnej rośliny). Każde z tych stadiów jest precyzyjnie regulowane za pomocą wielu różnych czynników, zatem tylko optymalnie dobrane, złożone warunki hodowli (komponenty chemiczne oraz fizyczne) pozwalają na wydajną regenerację roślin. Warto podkreślić, że fizjologia rośliny w ogromnej mierze warunkowana jest przez jej genotyp, zatem wybierając określony genotyp lucerny siewnej badacz powinien dobrze znać biologię tej odmiany, optymalne warunki wzrostowe, czas wzrostu itd., by trafnie wybrać warunki hodowli *in vitro* spośród olbrzymiej liczby rozmaitych wariantów hodowli, opisanych w literaturze.

Proces transformacji przy użyciu *Agrobacterium tumefaciens* był dokładniej opracowany dopiero w ostatnich latach, a zatem nadal istnieje wiele pytań i niewiadomych. Kluczem do sukcesu, jak się zdaje, są tutaj odpowiednio dobrane: szczep *Agrobacterium* i genotyp rośliny. Ważnym czynnikiem jest również rodzaj i schemat selekcji transformantów. Nie bez znaczenia jest charakter transgeny, albowiem bardzo ważna jest prawidłowa i nie zakłócająca metabolizmu integracja obcego genu do genomu roślinnego.

Poprawnie przeprowadzona transformacja jednak nie gwarantuje jeszcze sukcesu – czyli wydajnej ekspresji wprowadzonego genu w roślinie. Liczne czynniki wpływające na ekspresję muszą być też wzięte pod uwagę, jak np: typ promotora, czynność metaboliczna produktu ekspresji, częstość używania kodonów, metylacja DNA, efekt pozycyjny, mechanizmy wyciszenia genów i wiele innych.

Oprócz systemu transformacji z użyciem *Agrobacterium tumefaciens* istnieje też wydajny system z użyciem *Agrobacterium rhizogenes* (68). Stosowane są również inne techniki transformacji, takie jak mikroiniekcja (69) i mikrowstrzeliwanie (70).

Z przytoczonych rozważań wynika, że optymalizacja procedury transformacji i regeneracji lucerny siewnej jest wybitnie indywidualna w każdym przypadku, pozostaje zatem mieć nadzieję, iż wraz z postępami badań w tej dziedzinie w różnych ośrodkach rozszerzy się paleta dostępnych danych, na podstawie której będzie możliwa przede wszystkim ukierunkowana, a także wydajna i efektywna praca nad nowymi wektorami genetycznymi do transformacji oraz genotypami roślin.

Praca w ramach grantu KBN nr 004/P04/98.

Literatura

1. Thomas M. R., Johnson L. B., White F. F., (1990), *Plant Sci.*, 69, 189-198.
2. Alfalfa (*Medicago sativa* L.) http://web.css.orst.edu/Topics/Species.../Alfalfa/International_Fact_Sheet.html
3. Du S., Erickson L., Bowley S., (1994), *Plant Cell Rep.*, 13, 330-334.
4. Samac D. A., (1995), *Plant Cell Tissue Org. Cult.*, 43, 271-277.
5. Desgagnés R., Laberge S., Allard G., Khoudi H., Castonguay Y., Lapointe J., Michaud R., Vézina L. P., (1995), *Plant Cell Tissue Org. Cult.*, 42, 129-140.
6. Bingam E. T., Hurley L. V., Kaatz D. M., Saunders J. W., (1975), *Crop Sci.*, 15, 719-721.
7. Brown D. C. W., Atanassov A., (1985), *Plant Cell Tissue Org. Cult.*, 4, 111-122.
8. Philips G. C., (1983), *In Vitro*, 19, 265-270.
9. Campbell C. T., Tomes D. T., (1984), *Plant Cell Tissue Org. Cult.*, 3, 49-57.
10. Kumar A. S., Reddy T. P., Reddy G. M., (1983), *Plant Sci. Lett.*, 32, 271-278.
11. Mariotti D., Arcioni S., (1983), *Plant Cell Tissue Org. Cult.*, 2, 103-110.
12. Meijer E. G. M., (1982), *Z. Pflanzenzüchtg.*, 89, 169-172.
13. Keyes G. J., Collins G. B., Taylor N. L., (1980), *Theor. Appl. Genet.*, 58, 265-271.
14. Schroeder H. E., Khan M. R. I., Knibb W. R., Spencer D., Higgins T. J. V., (1991), *Aust. J. Plant Physiol.*, 18, 495-505.
15. Christou P., (1992), *Plant J.*, 2, 275-281.
16. Deak M., Kiss G. B., Koncz C., Dudits D., (1986), *Plant Cell Rep.*, 5, 97-100.
17. Dos Santos A. V. P., Outka D. E., Cocking E. C., Davey M. R., (1980), *Z. Pflanzenphysiol. Bd.*, 99, 261-270.
18. Trinh T. H., Ratet P., Kondorosi E., Durand P., Kamaté K., Bauer P., Kondorosi A., (1998), *Plant Cell Rep.*, 17, 345-355.
19. Nolan K. E., Rose R. J., Gorst J. R., (1989), *Plant Cell Rep.*, 8, 278-281.
20. Hoffmann B., Trinh T. H., Leung J., Kondorosi A., Kondorosi E., (1997), *MPMI*, 10, 307-315.
21. Arcioni S., Davey M. R., Dos Santos A. V. P., Cocking E. C., (1982), *Z. Pflanzenphysiol.*, 106, 105-110.
22. Mariotti D., Arcioni S., Pezzotti M., (1984), *Plant Sci. Lett.*, 37, 149-156.
23. Gilmour D. M., Davey M. R., Cocking E. C., (1987), *Plant Sci.*, 48, 107-112.
24. Nagaranjan P., Walton P. D., (1987), *Plant Cell Rep.*, 6, 109-113.
25. Baucher M., Bernard-Vailhe M. A., Chabbert B., Besle J. M., Opsomer C., van Montagu M., Botterman J., (1999), *Plant Mol. Biol.*, 39, 437-447.
26. Oommen A., Dixon R. A., Paiva N. L., (1994), *The Plant Cell*, 6, 1789-1803.
27. Wandelt C. I., Khan M. R. I., Craig S., Schroeder H. E., Spencer D., Higgins T. J. V., (1992), *The Plant J.*, 2, 181-192.
28. Winicov I., Bastola D. R., (1999), *Plant Physiol.*, 120, 473-480.
29. Shabaud M., Larssonneau C., Marmouget C., Huguet T., (1996), *Plant Cell Rep.*, 15, 305-310.
30. Bagga S., Sutton D., Kemp J. D., Sengupta-Gopalan C., (1992), *Plant Mol. Biol.*, 19, 951-958.
31. Narváez-Vásquez J., Orozco-Cárdenas M. L., Ryan C. A., (1992), *Plant Mol. Biol.*, 20, 1149-1157.
32. Ninković S., Miljuš- Djukić J., Nešković M., (1995), *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 42, 255-260.
33. Strizhov N., Keller M., Mathur J., Koncz- Kálmán Z., Bosch D., Prudovsky E., Schell J., Sneh B., Koncz C., Zilberstein A., (1996), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, 15012-15017.
34. Tabe L. M., Wardley-Richardson T., Ceriotti A., Aryan A., McNabb W., Moore A, Higgins T. J. V., (1995), *J. Animal Sci.*, 73, 2752-2759.
35. D'Halluin, K., Botterman J., de Greef W., (1990), *Crop Sci.*, 30, 866-871.
36. Ortega J. L., Temple S. J., Sengupta-Gopalan Ch., (2001), *Plant Physiol.*, 126, 109-121.
37. McKersie B. D., Murnaghan J., Jones K. S., Bowley S. R., (2000), *Plant Physiol.*, 122, 1427-1437.
38. He X. Z., Dixon R. A., (2000), *Plant Cell*, 12, 1689-1702.
39. Galili S., Guenoune D., Winger S., Hana B., Schupper A., Ben-Dor B., Kapulnik Y., (2000), *Transgenic Res.*, 9, 137-144.
40. Schoenbeck M. A., Temple S. J., Trepp G. B., Blumenthal J. M., Samac D. A., Gantt J. S., Hernandez G., Vance C. P., (2000), *J. Exp. Bot.*, 51, 29-39.

41. Hipskind J. D., Paiva N. L., (2000), *Mol. Plant Microbe Interact.*, 13, 551-562.
42. Stott H. U., Long S. R., (1999), *Plant Mol. Biol.*, 41, 601-614.
43. Fang Y., Hirsch A. M., (1998), *Plant Physiol.*, 116, 53-68.
44. Woo H. H., Orbach M. J., Hirsch A. M., Hawes M. C., (1999), *Mol. Plant Microbe Interact.*, 12, 882-893.
45. Schoenbeck M. A., Samac D. A., Fedorova M., Gregerson R. G., Gannt J. S., Vance C. P., (1999), *Mol. Plant Microbe Interact.*, 12, 882-893.
46. van Rhijn P., Fujishige N. A., Lim P. O., Hirsch A. M., (2001), *Plant Physiol.*, 126, 133-144.
47. Nadolska-Orczyk A., (1994), *Biotechnologia*, 1, 117-124.
48. McKersie B. Procedure for genetic transformation of alfalfa using *Agrobacterium tumefaciens*. <http://tdg.uoguelph.ca/www/CRSC/embryo/proced.htm>
49. Lupotto E., (1983), *Z. Pflanzenphysiol.*, 111, 95-104.
50. Lupotto E., (1986), *Ann. Bot.*, 57, 19-24.
51. Pezzotti M., Arcioni S., Mariotti D., (1984), *Genet. Agr.*, 38, 195-208.
52. Novák F. J., Konecna D., (1982), *Z. Pflanzenphysiol.*, 105, 279-284.
53. Saunders J. W., Bingham E. T., (1972), *Crop Sci.*, 12, 804-806.
54. Stachel S. E., Messens E., van Montagu M., Zambryski P., (1985), *Nature*, 318, 624-629.
55. Bechtold N., Ellis J., Pelletier G., (1983), *C. R. Acad. Sci. Paris. Life Sciences*, 316, 1194-1199.
56. Murashige T., Skoog F., (1962), *Physiol. Plant.*, 15, 473-497.
57. Schenk R. U., Hildebrandt A. C., (1972), *Can. J. Bot.*, 50, 199-204.
58. Blaydes D. F., (1966), *Physiol. Plant.*, 19, 748-753.
59. Nagarajan P., Mc Kenzie J. S., Walton P. D., (1986), *Plant Cell Rep.*, 5, 77-80.
60. Kao K. N., Mychayluk M. R., (1981), *In Vitro*, 17, 645-648.
61. Arcioni S., Damiani F., Pezzotti M., Lupotto E., (1990), in: *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, 10, *Legumes and oilseed crops I*, p. III.1 *Alfalfa, Lucerne (Medicago spp.)*, Ed. Y. P. S. Bajaj, Springer-Verlag, 197-241.
62. Orlikowska T., (1997), w: *Regulatory wzrostu i rozwoju roślin*, pod red. L. Jankiewiczza, Warszawa, PWN, 222-227.
63. Bingham E. T., McCoy T. J., (1986), in: *Plant Breeding Reviews*, Ed. Janick J., vol. 4., AVI, Westport, Connecticut, 123-152.
64. Parrott W. A., Bailey M. A., (1993), *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 32, 69-75.
65. Bingham E. T., Hurley L. V., Kaatz D. M., Saunders J. W., (1975), *Crop Sci.*, 15, 719-721.
66. Minocha S. C., (1987), in: *Cell and tissue culture in forestry*, Eds. Borge J. M., Durzon D. J., vol. 1, Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, 50-66.
67. Shahin E. A., Spielmann A., Sukhapinda K., Simpson R. B., Yashar M., (1986) *Crop Sci.*, 26, 1235-1239.
68. Constantino P., Spanò L., Pomponi M., Benvenuto E., Ancora G., (1984), *J. Mol. Appl. Genet.*, 2, 465-470.
69. Knoblauch M., Hibberd J. M., Gray J. C., van Bel A. J., (1999), *Nat. Biotechnol.*, 17, 906-909.
70. Bidney D., Scelonge C., Martich J., Burrus M., Sims L., Huffman G., (1992), *Plant Mol. Biol.*, 18, 301-313.