

Transformacja pomidora za pomocą *Agrobacterium tumefaciens*

Grzegorz Bartoszewski

Katarzyna Niemirowicz-Szczytt

Katedra Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin, Wydział Ogrodniczy
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego
Warszawa

1. Wprowadzenie

Pomidory należą do gatunków często ulepszanych poprzez transformację. Odmiana Flavr Savr™, otrzymana przez firmę Calgene z Kalifornii i dopuszczona do uprawy w 1994 r., była pierwszą na świecie zalegalizowaną transgeniczną odmianą pomidora (1). Pomidor (*Lycopersicon esculentum* Mill.) jest transformowany za pomocą *Agrobacterium tumefaciens*, chociaż wykorzystuje się również inne metody, na przykład elektroporację i mikrowstrzeliwanie. W pracy zostaną omówione czynniki, które mają wpływ na efektywność transformacji pomidora, jak również przykłady zastosowania transformacji w badaniach podstawowych i hodowli.

2. Czynniki wpływające na efektywność transformacji

Pomidor jest gatunkiem rutynowo wykorzystywanym do transformacji od czasu opracowania metody transformacji krążków liściowych (2) oraz wykorzystania konstruktów binarnych (3). Ukazało się wiele prac dotyczących metodyki i wskazujących na czynniki istotne dla efektywności transformacji pomidora (5,6,13-18). Czynniki te można podzielić na dotyczące *Agrobacterium*, dotyczące rośliny oraz interakcji obu tych elementów.

Do czynników związanych z *Agrobacterium* mających wpływ na efekty transformacji zaliczane są: genotyp użytego szczepu bakteryjnego, sposób przygotowania *Agrobacterium* i gęstość inokulum. Bardzo duży wpływ na skuteczność transformacji ma konstrukt bakteryjny. Dotyczy to zarówno chromosomu bakteryjnego, plazmidu pomocniczego, jak i plazmidu binarnego. Konstrukty te stają się coraz bardziej wyrafinowane i są ciągle modyfikowane pod kątem przydatności w transformacji. Chociaż głównymi czynnikami są

plazmidy, jednakże pewne znaczenie ma też chromosom bakteryjny. Przykładem mogą być szczepy, które mają zmutowany gen *recA* i dzięki temu charakteryzuje się ograniczoną zdolnością do rekombinacji, a zatem większą stabilnością plazmidów wprowadzonych do tego szczepu (4). W transformacji pomidora wykazano znacznie lepszą efektywność przy użyciu szczepów niojących plazmid pomocniczy, sucynamopinowy EHA105, określane też jako superwirulentny w porównaniu z plazmidami oktopinowym i nopalinowym (5). Obecnie najczęściej wykorzystuje się w transformacji plazmidy binarne (funkcje *vir* i T-DNA są w układzie trans). Geny markerowe i reporterowe wykorzystywane w transformacji pomidora zestawiono w tabeli 1.

TABELA 1
GENY MARKEROWE I REPORTEROWE, KTÓRE WPROWADZONO DO POMIDORA

Wprowadzony gen markerowy	Nazwa skrókowa	Źródło
syntaza nopaliny	nos	Horsch i wsp., 1985, (2)
fosfotransferaza neomycyny	npt2	Horsch i wsp., 1985, (2)
fosfotransferaza higromycyny	hpt2	Rudenko i wsp., 1994, (7)
adenyltransferaza spektynomycyny	aadA	Scofield i wsp., 1994, (8)
acetyltransferaza fosfinitricyny	bar	de Block i wsp., 1987, (9)
β -D-glukuronidaza	gusA (uidA)	Comai i wsp., 1990, (10)
lucyferaza	lucA	Chang i wsp., 1994, (11)
acetyltransferaza chloramfenikolu	cat	Palm i wsp., 1990, (12)

Do czynników związanych z elementem roślinnym można zaliczyć: genotyp rośliny, typ i sposób przygotowania eksplantatów, zdolności do regeneracji w warunkach transformacji. W wielu eksperymentach wykazano, że pewne genotypy pomidora transformuje się znacznie skuteczniej od innych. Dzieje się tak, dlatego że poszczególne genotypy różnią się pomiędzy sobą wrażliwością na stres transformacji, a także zdolnościami do regeneracji *in vitro*. Już w pierwszych eksperymentach dotyczących transformacji pomidora, McCormick i wsp. (6) pokazali, że różne genotypy pomidora różniły się kompetencją do transformacji.

Do czynników związanych z interakcją *Agrobacterium* — roślina można zaliczyć: sposób inokulacji, warunki kokultury, zdolności do regeneracji pędów w warunkach selekcji transgenicznych komórek i eliminacji *Agrobacterium*. Inokulacja najczęściej polega na umieszczeniu eksplantatów w inokulum na 10-30 minut.

Najwyższe efektywności transformacji, wyrażone stosunkiem liczby eksplantatów wytwarzających transgeniczne pędy (ukorzeniające się w obecności czynnika selekcyjnego) do liczby inokulowanych eksplantatów wynosiły 70-100% (14). W innych eksperymentach otrzymywano niższe efektywności: 9% (5), 8 i 14% zależnie od genotypu (18). Van Roekel i wsp. (5) podkreślają,

że efektywności w przeprowadzonych przez nich transformacjach bardzo różniły się, chociaż wszystkie transformacje przeprowadzono w ściśle zdefiniowanych, takich samych warunkach.

Zregenerowane pędy, które ukorzeniają się na pożywce z czynnikiem selekcyjnym poddawane są różnorodnym analizom, które pozwalają bliżej charakteryzować i selekcionować rośliny przydatne do dalszych prac. Pierwszą analizą jest najczęściej metoda PCR, która pozwala na wyeliminowanie pędów nie posiadających spodziewanej wstawki. Następną jest ocena poziomu ploidalności transformantów i eliminacja pędów o zmienionej ploidalności. W przypadku pomidora często duży udział stanowią pędy tetraploidalne, a pojawiają się także pędy oktoploidalne (17).

Kolejną ważną analizą jest *Southern-blot*, pozwalający na stwierdzenie poprawności integracji i liczby kopii transgeny. Dość częstym bowiem zjawiskiem jest niepełna integracja obszaru T-DNA, jak też rearanżacje obszaru T-DNA. Z analizy sprzężeń przeprowadzonych przez Chyi i wsp. (19) wynika, że lokalizacja obszaru T-DNA w genomie pomidora jest losowa. W przypadku pomidora opisywane są wprowadzenia od 1 do 6 kopii transgeny (20), jednakże u innych gatunków stwierdzano nawet do 20 kopii transgeny w roślinie (21). Najbardziej przydatne są rośliny, które posiadają 1 kopię transgeny i wykazują dziedziczenie mendelowskie charakterystyczne dla pojedynczego genu.

Kolejną fazą w analizie roślin transgeniczných jest analiza ekspresji transgenów. Podstawową analizą jest *Northern-blot*, pozwalający wykazać ekspresję transgeny na poziomie mRNA. Stosowana jest także metoda RT-PCR. W przypadkach, kiedy wprowadzany gen determinuje powstawanie białka przeprowadzana jest analiza na tym poziomie. Może to być analiza *Western-blot* lub test ELISA z wykorzystaniem specyficznych przeciwciał, czy też oznaczenie aktywności tego białka lub też produktów reakcji enzymatycznej katalizowanej przez nie (o ile jest to możliwe).

3. Transformacja w badaniach genetycznych i w hodowli

Transformacja za pomocą *Agrobacterium* nabrała ogromnego znaczenia zarówno w sferze badań genetycznych, jak i w hodowli nowych odmian pomidora. Pozwala bowiem na wprowadzenie dowolnego fragmentu DNA do genomu pomidora o wielkości 25-30 tysięcy par zasad, co odpowiada możliwości wprowadzenia 3-4 genów jednocześnie. Ostatnio skonstruowane wektory BIBAC (ang. *Binary Bacterial Artificial Chromosome*), pozwalają na przeniesienie fragmentów znacznie większych, rzędu 150 tysięcy par zasad (4). Regulacja ekspresji transgenów możliwa jest dzięki scharakteryzowaniu wielu sekwencji regulatorowych i potwierdzeniu ich funkcjonowania w pomidorze (tab. 2).

TABELA 2
 WYBRANE SEKWENCJE REGULATOROWE, KTÓRE BYŁY WPROWADZANE DO RÓŻNYCH FORM POMIDORA
 ZA POMOCĄ *A. tumefaciens*

Promotor	Specyfika ekspresji/miejsce	Pochodzenie	Źródło
1	2	3	4
syntazy nopalinowej (nos)	konstytutywna	<i>A. tumefaciens</i>	Horsch i wsp., 1985, (2)
małej podjednostki karboksylazy RuBP	konstytutywna, silniejsza w porównaniu z promotorem nos	soja, groszek, petunia	McCormick i wsp., 1986, (6)
35S CaMV	konstytutywna, silniejsza w porównaniu z promotorem nos	wirus mozaiki kalafiora CaMV	de Block i wsp., 1987, (9)
syntazy mannopinowej	konstytutywna silniejsza w porównaniu z promotorem nos	<i>A. tumefaciens</i>	Comai i wsp., 1990, (10)
fragment 1400 par zasad flankujący koniec 5' cDNA LAT59	specyficzna dla pylników i pyłku	pomidor	McCormick i wsp., 1989, (6)
sekwencji Lat52 kodującej białko podobne do inhibitora trypsyny typu Kunitz	pyłek i faza kiełkowania pyłku	pomidor	Muschietti i wsp., 1994, (23)
genu homologicznego do dehydrogenazy alkoholowej adh3a	dojrzałe pylniki, niedojrzałe nasiona	pomidor	Ingersoll i wsp., 1994, (24)
fragment końca 5' cDNA genu 9612	znamię słupka, słupek	pomidor	Budelier i wsp., 1990, (25)
sekwencji TPRP-F1	załaznie	pomidor	Martineau i wsp., 1995, (26)
E8 genu oksydazy ACC	ekspresja specyficzna dla owoców	pomidor	Deikman i wsp., 1992, (27)
genu poligalakturonazy	zewnątrzny i wewnętrzny perykarp	pomidor	Montgomery i wsp., 1993, (28)
syntazy malatowej	późna embriogeneza, faza po kiełkowaniu	rzepak	Comai i wsp., 1992, (29)
genu RSI-1	miejsca inicjacji korzeni przybyszowych, czapeczka korzeniowa, tkanka przewodząca	pomidor	Taylor i Scheuring 1994, (30)
genu HSC80	wierzchołki pędów i korzeni podczas normalnego wzrostu oraz pod wpływem szoku cieplnego	pomidor	Koning i wsp., 1992, (31)

1	2	3	4
genu kodującego inhibitor proteiny IIK	podczas zranienia	ziemniak	Palm i wsp., 1990, (12)
kwaśnej chitynazy	wokół nekroz powodowanych przez <i>Alternaria solani</i> i <i>Phytophthora infestans</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Samac i wsp., 1991, (32)
genu β -1,3-glukanazy	podczas infekcji <i>Cladosporium fulvum</i>	<i>Nicotiana glumbaginifolia</i>	Ashfield i wsp., 1994, (33)

3.1. Transpozony

Opracowanie skutecznej metodyki transformacji pozwala na wprowadzenie do pomidora transpozonów i umożliwia mutagenезę transpozonową. W 1988 r. Yoder i wsp. (34) wykazali, że element transpozycyjny *Ac* z kukurydzy ulega transpozycji w komórkach liści pomidora. Jednocześnie nie stwierdzili oni uruchamiania elementu *Ds*. W kolejnych pracach dowiedziono jednak, że element *Ds* jest również aktywny, ale tylko w roślinach zawierających *Ac* (35).

Intensywne badania prowadzone nad transpozycją elementów *Ac* i *Ds* (36-40), pozwoliły na skuteczne zastosowanie mutagenезy transpozonowej do izolacji genów. Wykorzystując mutagenезę transpozonową sklonowano, zsekwencjonowano i poznano strukturę ważnych genów: *Cf-9* i *Cf-2* — odporności na brunatną zgniliznę pomidora, powodowaną przez wybrane izolaty *Cladosporium fulvum* (41,42), *Dwarf* — samokończący typ wzrostu (43), *DCL* związany z rozwojem chloroplastów (44), *Dem* związany z defektem zarodka i merystemu (Carroll i wsp., zgłoszone do publikacji), *Feebly* (*Divaricata*) związany ze sposobem wzrostu (45) i in. Stworzone zostało również podłoże do mutagenезy transpozonowej genów związanych z biosyntezą kwasu abscyzynowego (46).

Bardzo interesującą strategię mutagenезy transpozonowej genu *Cf-9* zastosowali Jones i wsp. (41). Wykorzystali oni transgeniczną linię pomidora z aktywnymi transpozonami i genem odporności *Cf-9* oraz transgeniczną linię wykazującą ekspresję genu awirulencji *avr9* z grzyba *C. fulvum*. Skrzyżowane linie dały letalne potomstwo. Tylko rośliny z transpozonem w obrębie genu *Cf-9* nie były letalne.

Peterson i Yoder (47) opisali nową mutację pomidora: *Mox* — gen modyfikujący locus *Xa* (*Xanthophylllic-1*), spowodowaną transpozonem, objawiająca się zmiennością barwy liścia.

Inne wykorzystanie transpozonów opisuje Goldsbrough i wsp. (48). Element *Ds* został wykorzystany do eliminacji genów markerowych w transgenicznym pomidorach. Strategia autorów polegała na tym, że gen markerowy *nptIII* lub gen reporterowy *gus* był umieszczony w obrębie funkcjonującego elementu *Ds*, sprzężonego z sekwencją transpozazy. Transpozycja obejmowała zatem obok elementu *Ds* również gen markerowy, znajdujący się w obrębie *Ds*. Chimeryczny transpozon ulegał integracji w różnych miejscach ge-

nomu. Sprzężenie genu markerowego z pozostałą częścią obszaru T-DNA ulegało rozbiciu. Przenoszony wraz z transpozonom gen markerowy wykazywał różną siłę ekspresji zależnie od miejsca integracji. Autorzy przypuszczają, że system ten może być wykorzystany również do generowania transgeniczných roślin o odpowiednim poziomie ekspresji transgeny.

3.2. Regulatory transkrypcji

U pomidora znane są geny kodujące czynniki transkrypcyjne typu MADS-box, które odgrywają ważną rolę m.in. w morfogenezie kwiatu. Możliwość transformacji pozwoliła bliżej je scharakteryzować. Jednym z genów tego typu jest gen *TAG-1*, homolog genu *AGAMOUS* z *Arabidopsis thaliana*. Wprowadzenie do pomidora tego genu w układzie antysensowym, pod kontrolą promotora 35S CaMV, jak również nadekspresja tego genu — wprowadzenie w układzie sensowym pod kontrolą promotora 35S CaMV, powodowało homeotyczne zmiany morfologii kwiatów. W układzie antysensowym pręciki były przekształcone w płatki, a słupki w pseudosłupki, podczas gdy w układzie nadekspresji genu *TAG-1* działki kielicha były przekształcone w liście, zaś płatki korony w sterylne pylniki (49). Innymi genami typu MADS-box u pomidora są: gen *TM-5* i gen *TM-6*. Wprowadzenie cDNA tych genów w układzie „antysens” pod kontrolą promotora 35S CaMV pozwoliło na określenie fenotypowych konsekwencji ich „wyłączenia”. Ekspresja antysensowego RNA genu *TM-5* nie spowodowała zmian w części wegetatywnej roślin pomidora. Część transgeniczných roślin miała zielone płatki korony, które nie opadały, jak również zielone pylniki, zaś słupki były pokryte włoskami. Wywołane zmiany nie miały charakteru homeotycznego. Ekspresja antysensowego RNA genu *TM-6* nie powodowała zasadniczych zmian fenotypowych (50).

Innym typem regulatorów transkrypcji są białka wykazujące homologie do onkogenów z rodziny białek Myc. Jednym z nich jest białko kodowane przez gen *delila* (*del*) pochodzący z *Antirrhinum*, wpływający na zabarwienie kwiatów poprzez regulację poziomu transkrypcji kilku genów strukturalnych szlaku syntezy antocjanów. Gen *delila* został wprowadzony pod kontrolą promotora 35S CaMV do pomidora. Konstytutywna ekspresja tego genu spowodowała antocjanowe zabarwienie większości tkanek wegetatywnych. W kwiecie tylko nerwy płatków korony wykazywały antocjanowe zabarwienie. Młode owoce nie wykazywały antocjanowego zabarwienia. W zabarwionych tkankach wykazano silnie podwyższony poziom ekspresji (na poziomie mRNA) genu reduktazy dihydroflawonolowej i niewiele podwyższony poziom ekspresji syntazy chalconowej. Otrzymano także transgeniczne rośliny, do których wprowadzono chimeryczny gen *del* z transpozonomem *Ac*. Konstrukcja genu powodowała, że po wycięciu transpozonu gen *del* odzyskiwał swą funkcję. Otrzymane rośliny miały mozaikowe, antocjanowe plamy na liściach. Sektory antocjanowe były wyraźne, o różnych kształtach (51).

W ekspresji genu *Knotted-1* pochodzącego z kukurydzy, zawierającego homeobox, wykazano, że jest to regulator transkrypcji determinujący architekturę liści również u pomidora (52).

3.3. Cechy odporności uzyskane w transgenicznym pomidorze

3.3.1. Tolerancja na herbicydy

Możliwość transformacji pozwoliła otrzymać rośliny charakteryzujące się tolerancją na herbicydy takie jak glufosinat (Basta) i glifosat (Roundup). Tolerancję na herbicyd Basta otrzymano wprowadzając do genomu pomidora gen *bar*, kodujący acetylotransferazę fosfinotricyny (9). Wprowadzenie zmutowanego genu *aroA* (kodującego syntazę 5-endopirogrono-szikimo-3-fosforanową) pozwoliło otrzymać rośliny tolerancyjne na glifosat (14,22).

3.3.2. Odporności na wirusy

Pomidor jest rośliną porażaną przez wiele wirusów. Żmudne i często mało skuteczne wprowadzanie odporności do odmian uprawnych pomidora przy użyciu klasycznych metod hodowlanych, spowodowało intensywne prace nad wytwarzaniem odpornych na wirusy roślin pomidora na drodze inżynierii genetycznej. Wykorzystane zostały bardzo różne mechanizmy odporności na wirusy (tab. 3). Wprowadzenie genu *N*, odporności na TMV (ang. *Tobacco Mosaic Virus*) z tytoniu pozwoliło na otrzymanie roślin pomidora wykazujących odporność na tobamowirusy (59). W przeprowadzonych testach pokazano, że otrzymane rośliny wykazywały odporność po zainokulowaniu wirusami: TMV izolat U1, TMV izolat Cg i ToMV (ang. *Tomato Mosaic Virus*) (59).

3.3.3. Odporności na choroby grzybowe i bakteryjne

Transformacja pozwoliła na identyfikację i weryfikację funkcji genów odporności na infekcje bakteryjne i grzybowe pomidora, sklonowanych w wyniku mutagenезы transpozonowej lub w oparciu na zagęszczonej molekularnej mapie genetycznej.

Martin i wsp. (60) wykorzystali transformację do zidentyfikowania klonu cDNA niosącego gen odporności na chorobę pomidora powodowaną przez bakterię *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. Autorzy wyselekcjonowali 2 klony cDNA: CD186 i CD127 wykorzystując marker molekularny, sprzężony z genem odporności. Wprowadzenie tych klonów poprzez transformację do wrażliwego na chorobę powodowaną przez bakterię *P. syringae* pv. *tomato* genotypu pomidora i analiza odporności transgenicznych roślin pozwoliły na wykazanie, że klon CD186 niesie gen odporności na tę chorobę. Po zsekwencjonowaniu klonu zidentyfikowano gen odporności *Pto*. Tymczasem, drugi klon cDNA — CD127, wysoce homologiczny do klonu CD186 i leżący w bliskim sąsiedztwie, niósł gen wrażliwości na insektycyd fosforoorganiczny — fenthion (gen *Fen*). Wprowadzanie tego klonu pod kontrolą promotora 35S CaMV do genotypu odpornego na fenthion, spowodowało, że otrzymane rośliny nabyły wrażliwość na insektycyd: wykazywały nekrotyczne plamy po spryskaniu insektycydem (61). Podobna strategia została wykorzystana podczas identyfikacji genów znajdujących się w locus *Cf-2* (odporność na bru-

TABELA 3
ODPORNOŚCI NA WIRUSY WYTWORZONE W POMIDORACH Z WYKORZYSTANIEM TRANSFORMACJI

Wprowadzony gen/pochodzenie	Nazwa skrókowa	Cecha	Źródło
gen białka płaszczka wirusa mozaiki lucerny AIMV	AMIV-CP	odporność na AMIV	Tumer i wsp., 1987, (53)
satelitarne sekwencje wirusa mozaiki ogórka CMV	cDNA T73-satRNA	odporność na CMV	Saito i wsp., 1992, (54)
gen białka płaszczka wirusa mozaiki tytoniu TMV i gen białka płaszczka wirusa mozaiki pomidora	CP TMV CP ToMV	odporność na TMV i ToMV	Sanders i wsp., 1992, (55)
gen kodujący białko nukleokapsydu wirusa TSWV (<i>tomato spotted wilt virus</i>)	N-TSWV	odporność na TSWV	Kim i wsp., 1994, (56) Ultzen i wsp., 1995, (57)
gen kodujący białko VI otoczki białkowej wirusa TYLCV (<i>tomato yellow leaf curl virus</i>)	CP-V1-TYLCV	odporność na TYLCV	Kunik i wsp., 1994, (58)
gen odporności na wirusa mozaiki tytoniu TMV z tytoniu	N	odporność na TMV-U1, TMV-Cg, ToMV	Whitham i wsp., 1996, (59)

natną zgniliznę powodowaną przez niektóre izolaty *Cladosporium fulvum*). Do podatnego na infekcję grzybem *C. fulvum* genotypu pomidora wprowadzono cztery różne klony kosmidowe. W przeprowadzonej analizie odporności transgeniczných roślin wykazano, że dwa klony nadawały roślinom pomidora odporność na brunatną zgniliznę, powodowaną przez grzyb *C. fulvum*. W wyniku dalszych prac stwierdzono, że obydwie klony zawierały różne geny odporności (42). Wykazano zatem, że w locus *Cf-2* znajdują się 2 geny odporności na brunatną zgniliznę pomidora.

Zaproponowano model systemu nadającego odporność na szerokie spektrum chorób (62). System ten oparty jest na otrzymaniu transgeniczných roślin niosących gen *Cf-9* pod kontrolą promotora indukowanego przez patogena i gen *avr9* pod kontrolą konstytutywnego promotora. Gen *avr9* pochodzi z grzyba *C. fulvum* i koduje białko awirulencji Avr9, będące białkiem sygnałnym (ligand, którego receptorem jest białko Cf-9). Wykazano, że ekspresja tych dwóch genów jednocześnie powoduje reakcję nadwrażliwości, prowadzącą do lizy komórki zaatakowanej przez patogena (63), a to ogranicza infekcję. Jednakże warunkiem funkcjonowania takiego układu, nadającego roślinie odporność, jest odpowiedni promotor „reagujący” na infekcję.

Udało się otrzymać transgeniczne rośliny pomidora o podwyższonej odporności na infekcję *Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici*. Do roślin pomidora wprowadzono geny pochodzące z tytoniu, kodujące chitynazy I i II klasy oraz β -1,3-glukanazy I i II klasy. Jedynie rośliny, które wykazywały ekspresję chitynazy I klasy i β -1,3-glukanazy I klasy charakteryzowały się podwyższoną

odpornością na chorobę powodowaną przez grzyb *F. oxysporum f.sp. lycopersici* (64).

3.3.4. Odporności na owady

Dzięki poznaniu genów pochodzących z *Bacillus thuringiensis*, kodujących toksyny szkodliwe dla różnych grup owadów, możliwe było otrzymanie pomidorów odpornych na niektóre owady. Wprowadzono do pomidora różne wersje genów z grupy *Bt: CryIA(b)*, *CryIA(c)* i *CryIC* (65-67).

3.4. Cechy dotyczące dojrzewania owoców

W 1988 r. Smith i wsp. (68) wykazali, że możliwe jest zahamowanie ekspresji genu poligalakturonazy (PG) w stabilnie stransformowanych roślinach pomidora, wykazujących ekspresję antysensowego RNA genu PG. Strategia zastosowana przez Smith i wsp. (68) okazała się bardzo przydatna w badaniach dotyczących dojrzewania owoców pomidora (79). Z powodzeniem stosowano ją do „wyłączania” enzymów związanych z metabolizmem ściany komórkowej, takich jak: wymieniona PG, (68-73), esterazy pektynowe (74,75) jak również enzymy szlaku syntezy etylenu: oksydaza ACC (77,78) i syntaza ACC (80) oraz enzymów zaangażowanych w syntezę karotenoidów — syntaza fitoenu (83). Zastosowanie takiej metodyki pozwoliło też na ustalenie i zweryfikowanie funkcji kilku klonów cDNA specyficznych dla owoców: TOM13 — oksydaza ACC (77) i TOM5 — syntaza fitoenu (83).

3.4.1. Ingerencja w metabolizm ściany komórkowej

Poligalakturonaza ma znaczenie w dojrzewaniu owoców pomidora. Powoduje mięknięcie owoców przez częściową depolimeryzację frakcji pektyn ściany komórkowej. PG syntetyzowana jest *de novo* w wyniku nagromadzenia się mRNA PG podczas dojrzewania owoców. Chimeryczny gen skonstruowany przez Smith i wsp. (68) składał się z promotora 35S CaMV, fragmentu cDNA PG o długości 730 par zasad, zawierającego 50 par zasad obszaru nie transkrybowanego oraz początek transkrybowanej sekwencji i był zakończony terminatorem syntazy nopolinowej (nos). Spośród transgenicznych roślin zostały wybrane 3 rośliny, wykazujące ekspresję antysensowego RNA w liściach i te rośliny poddano dalszym analizom. Dwie spośród nich wykazały ekspresję antysensowego RNA w owocach, równocześnie wykazały one zredukowaną o 90% ekspresję mRNA endogennej PG. Aktywność PG w homozygotycznych roślinach transgenicznych była zredukowana o 99%. Jednocześnie w owocach transgenicznych roślin nie stwierdzono zahamowań w syntezie likopenu. Pomimo ograniczenia akumulacji mRNA PG i redukcji aktywności enzymu, różnica w mięknięciu owoców transgenicznych w porównaniu z dzikimi była niewielka. Wprowadzenie genu PG w orientacji sensowej do naturalnego mutantu pomidora *rin*, charakteryzującego się brakiem aktywności PG w owocach i twardymi owocami, nie spowodowało ich mięknięcia podczas dojrze-

wania (71). Zahamowanie ekspresji genu *PG* wpływa jednak istotnie na jakość owoców: są one bardziej odporne na marszczenie i pęknięcie podczas przejrzenia, jak również mają lepsze właściwości przetwórcze: otrzymuje się z nich więcej koncentratu. Następstwem tych eksperymentów są 2 transgeniczne odmiany pomidora: *FlavrSavr*TM (72, 73) i odmiana firmy Zeneca/PetoSeeds (tab. 4).

W metabolizm ściany komórkowej dojrzewających owoców pomidora zaangażowane są również esterazy pektynowe (*PE*). W przeciwieństwie do *PG*, która jest kodowana przez 1 gen (w owocach występuje kilka form *PG*, najprawdopodobniej efekt obróbki posttranslacyjnej) *PE* są kodowane przez rodzinę genów. Wprowadzenie pojedynczego transgeny antysensowej *PE* nie pozwala całkowicie zahamować aktywności esteraz pektynowych, jednakże owoce transgenicznych roślin charakteryzowały się większą zawartością suchej masy (74).

Seymour i wsp. (76) wykazali, że za pomocą pojedynczego chimerycznego transgeny w orientacji sensowej można „wyłączyć” jednocześnie, wykorzystując zjawisko kosupresji, geny *PG* i *PE*. Osiągnęli ten efekt dzięki skonstruowaniu specjalnego chimerycznego genu. Gen ten składał się z fragmentu cDNA *PG* (244 par zasad końca 5' kodujące 71 aminokwasów) połączonego z fragmentem 1320 par zasad cDNA *PE* (kodujące pełną *PE*) — obydwa fragmenty były w orientacji sensowej, połączone z promotorem 35S *CaMV* i terminatorem syntazy nopolinowej (*nos*). Transgeniczne rośliny pomidora wykazywały konstytutywną ekspresję mRNA transgeny i wysoce ograniczoną ekspresję mRNA *PG* i mRNA *PE*, jak też ograniczoną aktywność tych enzymów w owocach. Jednocześnie autorzy nie stwierdzili ekspresji transgeny na poziomie białka (analiza aktywności *PE* w liściach).

3.4.2. Ingerencja w metabolizm etylenu

Przeprowadzenie analizy transgenicznych roślin pomidora z antysensową sekwencją klonu *TOM13*, specyficznego dla owoców pozwoliło na zidentyfikowanie funkcji kodowanej przez ten klon, a także na stwierdzenie, że produkt klonu *TOM13* jest zaangażowany w syntezę etylenu (77). W dalszych pracach, a mianowicie w przeprowadzonej analizie ekspresji tego klonu w drożdżach i oocytach *Xenopus laevis* pokazano, że produktem tego genu jest oksydaza 1-aminocyklopropano-1-karboksylationu (oksydaza *ACC*) (78).

Owoce roślin transformowanych genem oksydazy *ACC* w układzie antysensowym miały zmieniony fenotyp. Charakteryzowały się zmniejszoną akumulacją likopenu oraz były bardziej odporne na marszczenie i pęknięcie podczas przejrzenia. Na poziomie molekularnym charakteryzowały się zmniejszoną ekspresją wielu mRNA charakterystycznych dla dojrzewania m.in. syntazy fitonowej (zaangażowanej w syntezę karotenoidów). Owoce zerwane na początku dojrzewania posiadały lepsze właściwości przechowalnicze. Potraktowane etylem dojrzewały, wykazując jednak odporność na marszczenie i pęknięcie (79).

Innym, głównym enzymem zaangażowanym w syntezę etylenu jest syntaza 1-aminocyklopropano-1-karboksylationu (syntaza *ACC*). Enzym ten jest kodo-

wany przez rodzinę genów, spośród których dwa są aktywne podczas dojrzewania owoców pomidora — klon cDNA: LE-ACC2 i LE-ACC4. Ekspresja chimerycznego genu 35SCaMV/ACC2 w orientacji antysensowej ograniczyła produkcję etylenu w owocach o 99,5%. Owoce roślin transgenicznych nie dojrzewały nawet po 90-120 dni od zapylenia, podczas gdy normalne owoce dojrzewały w 48-50 dni od zapylenia. Po potraktowaniu etylenem lub propylenem owoce roślin transgenicznych dojrzewały normalnie (80).

Innymi genami, które znalazły zastosowanie do obniżania poziomu etylenu w dojrzewających owocach są: deaminaza 1-aminocyklopropano-1-karboksyłanu (deaminaza ACC) i hydrolaza S-adenozylometioniny (hydrolaza SAM). Deaminaza ACC degraduje ACC do kwasu α -keto-masłowego i została wyizolowana z bakterii *Pseudomonas* sp. szczep 6G5. Jej ekspresja w pomidorze pozwoliła na ograniczenie syntezy etylenu o 97%. Owoce transgenicznych roślin charakteryzowały się opóźnionym dojrzewaniem i lepszymi właściwościami przechowalniczymi. Można je było przechowywać o 6 tygodni dłużej (81). Hydrolaza SAM została wyizolowana z bakteriofaga T3. Wprowadzona pod kontrolą specyficznego promotora E8 (indukowany przez etylen, specyficzny dla owoców) hamowała syntezę etylenu w dojrzewających owocach o 80% (82).

Mutant pomidora *Never-ripe* (*Nr*) charakteryzuje się zahamowaniem dojrzewania owoców. Jest to wynikiem braku wrażliwości na etylen. Wilkinson i wsp. (83) wykazali, że klon cDNA — TXTR-14, wyizolowany z pomidora, który wykazywał podobieństwo do genu *ETR-1*, pochodzącego z *A. thaliana*, kodującego receptor etylenu, kosegregował z locus *Nr*. Porównując sekwencje domniemanych białek *ETR-1* i TXTR-14 wykazano ich duże podobieństwo, zaś wprowadzenie zmutowanej sekwencji TXTR-14 (leucyna zamiast prolina w pozycji 36 białka) pod kontrolą promotora 35S CaMV do linii pomidora wrażliwej na etylen pozwoliło uzyskać transgeniczne rośliny, które nie były wrażliwe na etylen, wykazujące fenotyp *Nr*. Potwierdziło to przypuszczenie, że mutacja *Nr* pomidora jest spowodowana zmianą pojedynczego aminokwasu w białku o wysokiej homologii do receptora etylenu *ETR-1* z *A. thaliana* (83).

3.4.3. Manipulacja syntezą karotenoidów

Wprowadzenie innego klonu TOM5 (również specyficzny dla owoców) w orientacji antysensowej do genomu pomidora pozwoliło na potwierdzenie, że produkt tego klonu jest zaangażowany w syntezę karotenoidów. Rośliny transgeniczne charakteryzowały się jasnożółtym zabarwieniem płatków korony kwiatów i żółtymi nie dojrzewającymi owocami (84). W przeprowadzonym teście komplementacji transgenicznej linii i naturalnego mutantu *yellow flesh* o bardzo podobnym fenotypie oraz w dalszych analizach wykazano, że produktem tego klonu jest syntaza fitoenu, jeden z enzymów biosyntezy karotenoidów.

3.5. Modulacja poziomu auksyn i cytokinin

Źródłem genów związanych z metabolizmem auksyn i cytokinin są genomy *Agrobacterium tumefaciens* i *Agrobacterium rhizogenes*. Bakterie te posiadają plazmidy Ti (*A. tumefaciens*) i Ri (*A. rhizogenes*), które w obszarach T i R mają geny, wśród których są geny związane z metabolizmem auksyn i cytokinin. Większość z nich zidentyfikowano i wykorzystano do transformacji pomidora.

3.5.1. Geny *Agrobacterium rhizogenes*

W obszarze R plazmidu Ri zidentyfikowano m.in. geny *rolA*, *rolB* i *rolC*. Ich ekspresja powoduje podwyższenie wrażliwości tkanki roślinnej na auksyny. Gen *rolB* koduje β -glikozydazę, zdolną do hydrolizy indolilo- β -glikozydów, zaś *rolC* β -glikozydazę cytokininową, zdolną do hydrolizy N-glikozydów. W eksperymentach przeprowadzonych przez Altvorst i wsp. (85) otrzymane zostały rośliny pomidorów wykazujące ekspresję genów: *rolA*, *rolB* i *rolABC*. Rośliny z wprowadzonym genem *rolA* były bardzo zmienione, miały małe ciemnozielone i pomarszczone liście, wydłużone międzywęzła oraz w przypadku diploidalnych transformantów brak włosków na łodydze. Wytwarzały one bardzo dużo kwiatów, ale o mniejszych rozmiarach i wykazujących męską sterylność. Rośliny z wprowadzonym genem *rolB* miały szersze, ale krótsze liście, nie były one pomarszczone i wykazywały ograniczenie dominacji wierzchołkowej. Rośliny posiadające geny *rolABC* niewiele różniły się fenotypowo od roślin kontrolnych, jednakże miały zdecydowanie słabiej rozwinięty system korzeniowy. Wszystkie transgeniczne rośliny wytwarzały bardzo mało nasion lub też nie wytwarzały ich wcale (*rolA*). Krążki liściowe i pyłek transgenicznych roślin wykazywały większą wrażliwość na auksynę kwas naftylooctowy (NAA).

3.5.2. Geny *A. tumefaciens*

Bardzo ważnym genem jest gen kodujący transferazę izopentenyłową (*ipt*). Produkt tego genu jest zasadniczym enzymem w metabolizmie cytokinin. Ekspresja genu *ipt* pod kontrolą promotora specyficznego dla zalaźni pozwoliła podwyższyć poziom endogennych cytokinin w początkowych fazach rozwoju owocu pomidora. Efektem tego było podwyższenie zawartości suchej masy w owocach, jednakże były one mniejsze. Rośliny transgeniczne zawiązywały więcej owoców (26). Część z nich, posiadających gen *ipt* pod kontrolą promotora 2A11, dojrzewała normalnie, a część miała zielone plamy (w obrębie tego samego grona). W wynikach uzyskanych z przeprowadzonej analizy molekularnej wykazano podwyższony poziom *ipt* mRNA w zielonych obszarach w porównaniu z czerwoną częścią owocu. Dalej analizowano ilościowo cytokininy w owocach i stwierdzono, że czerwone części owocu zawierają znacznie więcej cytokinin w porównaniu z częścią zieloną. Jednocześnie zauważono, że podwyższony poziom cytokinin w owocach indukował ekspresję

mRNA białek związanych z patogenezą: PR-1, chitynazy i inhibitora metalo-karboksypeptydazy w liściach transgenicznych roślin. Po zerwaniu owoców i kwiatów nie stwierdzono w liściach podwyższonego poziomu mRNA wymienionych białek (86).

Storti i wsp. (87), badając podatność transgenicznych linii komórek pomidora na infekcję *Fusarium oxysporum* wykazali, że transgeniczna linia kalusowa z wprowadzonymi genami *iaaH* i *ipt* charakteryzowała się wyższą zawartością kallozy, podwyższoną aktywnością peroksydazy i odpornością na kwas fumarowy. W testach wykazano ograniczony rozwój *Fusarium* w przypadku tej linii. Podobnymi właściwościami charakteryzowała się linia kalusowa z wprowadzonymi genami *iaaH* i *iaaM*, jednakże nie hamowała rozwoju *Fusarium*.

Znany jest mutant pomidora *lateral suppressor (ls)*. Charakteryzuje się on tym, że nie wytwarza w ogóle lub wytwarza sporadycznie pędy boczne, ale też ma obniżoną płodność, zdeformowane korony kwiatów i małe owoce. Wykazano także, że poziom cytokinin w pędach mutantu *ls* jest znacznie obniżony. Groot i wsp. (88) badali wpływ genu *ipt* (pod kontrolą oryginalnego promotora tego genu) na morfologię mutantu *ls*. Transgeniczne rośliny wykazywały duże zróżnicowanie morfologiczne i zostały podzielone na 4 klasy fenotypowe zależnie od: długości międzywęźli, ograniczenia dominacji wierzchołkowej, zmniejszenia powierzchni liści oraz zaburzeń w wytwarzaniu korzeni. Oprócz tego liście III i IV klasy transformantów miały jasnozielone zabarwienie. Podwyższony poziom endogennych cytokinin nie przywrócił mutantowi *ls* zdolności do wytwarzania pędów bocznych. Autorzy obserwowali „bulwkowate” struktury, zorganizowane histologicznie, w kątach liści.

Gen związany z syntezą auksyn *iaaH* został wykorzystany do selekcji spontanicznych haploidów pomidora (89) jako dominujący negatywny marker. Transgeniczne rośliny z wprowadzonym pod kontrolą oryginalnego promotora genem nie wykazywały zmian morfologicznych.

Ciekawym przykładem wykorzystania genów związanych z syntezą auksyn jest praca Carmi i wsp. (90). Autorzy wykorzystali promotor genu *TPRP-F1* (ang. *tomato fruit expressed proline-rich protein*) ulegający ekspresji w zalążniach i owocach oraz geny *iaaH* i *rolB* do wprowadzenia partenokarprii. Transgeniczne rośliny wykazujące ekspresję chimerycznego genu *pTPRP-F1-iaaH* zawiązywały partenokarpiczne owoce w wykastrowanych kwiatach po potraktowaniu prekursorem auksyny (kwasu naftylooctowego, NAA) — amidem naftylooctowym (NAM). Z kolei transgeniczne rośliny wykazujące ekspresję genu *pTPRP-F1-rolB* wykazywały fakultatywną partenokarpnię, polegającą na tym, że tylko część owoców zawierała nasiona. Owoce nie były zniekształcone i normalnie dojrzewały. Efekt ten został osiągnięty dzięki „nadwrażliwości” na auksyny stymulowanej przez gen *rolB*. W praktyce ogrodniczej często stosuje się zabieg hormonizacji — traktowania młodych kwiatów auksyną, by zaindukować rozwój owoców. System wykorzystujący chimeryczny gen *pTPRP-F1-rolB* nie wymaga traktowania kwiatów auksynami lub ich prekursorami.

3.6. Metabolizm i transport węglowodanów

Wprowadzanie do pomidora i ekspresja genu syntazy 6-fosfosacharozy (limitujący enzym w syntezie sacharozy, SPS) pochodzącej z kukurydzy pod kontrolą promotora małej podjednostki karboksylazy RuBP z tytoniu spowodowało istotne zmiany w gospodarce węglowodanami (91). Aktywność endogennej SPS w pomidorze jest regulowana przez światło. Natomiast rośliny transgeniczne wykazywały stałą aktywność SPS. W roślinach transgenicznych inna była dystrybucja węglowodanów: zwiększyła się akumulacja węglowodanów w pędach, zaś zmniejszyła w korzeniach. Transgeniczne rośliny wykazujące wysoką aktywność kukurydzianej SPS miały wyższy o 20% współczynnik fotosyntezy, jednocześnie nie stwierdzono kosupresji endogennej SPS (92).

Innym, limitującym syntezę skrobi enzymem regulowanym allosterycznie, jest pirofosforylaza ADP-glukozy (ADPGPP). Do pomidora wprowadzono chimeryczny gen składający się z sekwencji glgC16 (z *E. coli*) połączony z sekwencją CTP (fragment małej podjednostki karboksylazy RuBP z *Arabidopsis thaliana*), kodującą peptyd odpowiedzialny za przeniesienie sprzężonego z nim białka do chloroplastów. W liściach transgenicznych roślin stwierdzono podwyższoną zawartość skrobi. W ekspresji innej formy białka ADPGPP, kodowanej przez sekwencję glgC, która wymaga aktywatora pokazano, że pomimo ekspresji ADPGPP poziom skrobi w liściach transgenicznych roślin nie uległ zmianie (93).

Wprowadzenie do pomidora genu apoplastowej inwertazy z drożdży pod kontrolą promotora 35S CaMV miało poważne konsekwencje. Otrzymane rośliny, które wykazywały ekspresję inwertazy miały silnie zahamowany wzrost, charakteryzowały się żółtymi i nekrotycznymi plamami na liściach oraz skreśleniem liści. Liście znajdujące się w cieniu nie wykazywały takich objawów. Przetrzymanie liści przez 24 godziny w ciemności prowadziło do zaniku skrobi w chloroplastach roślin kontrolnych, podczas gdy nie obserwowano tego efektu u roślin transgenicznych. Przyczyną opisanych zmian fenotypowych transgenicznych roślin może być zahamowanie transportu sacharozy z komórek mezofilu do floemu poprzez apoplast na skutek hydrolizy sacharozy (94).

3.7. Regulacja innych procesów

3.7.1. Fitochrom

Wprowadzona do pomidora pod kontrolą promotora 35S CaMV sekwencja cDNA fitochromu owsa ulegała ekspresji i dawała funkcjonujący, zdolny do fotokonwersji fitochrom. Fenotyp transgenicznych roślin różnił się od kontroli. Rośliny te były karłowe, miały ciemnozielone liście i owoce, zaś siewki pokolenia R1 miały skrócone hipokotyle i podwyższoną zawartość antocjanów (95).

3.7.2. Białka o słodkim smaku — monelina

Monelina jest białkiem 100 000 razy słodszy od sacharozy (molarnie). Białko to naturalnie występuje w owocach rośliny afrykańskiej *Dioscorephylum cumminsii* Diels. i jest heterodimerem. Penarrubia i wsp. (96) otrzymali transgeniczne rośliny pomidora, do których wprowadzono chimeryczne geny moneliny. Część roślin miała wprowadzoną sekwencję moneliny (kodującą obydwie podjednostki) pod kontrolą konstytutywnego promotora 35S CaMV, zaś część miała gen moneliny pod kontrolą promotora E8, specyficznego dla dojrzewających owoców i indukowanego przez etylen. Wykazano, że w przypadku genu E8-monelina ekspresja na poziomie białka zachodzi w dojrzewających i dojrzałych owocach. W przypadku genu 35S CaMV-monelina nie stwierdzono występowania moneliny w owocach. Potraktowanie etylenem niedojrzałych owoców roślin z genem E8-monelina indukowało ekspresję moneliny, tak że zawartość moneliny w dojrzałych owocach wynosiła około 0,92% wszystkich białek zawartych w owocach. Jest to poziom 10 razy wyższy od minimalnego stężenia w roztworze wodnym, które jest wykrywane organoleptycznie. Autorzy (96) zauważają, że koncentracja białek słodkości powinna być wyższa od 1%, by mogła wpłynąć na smak owoców.

3.7.3. Produkcja szczepionki przeciwko wścieklicznie w pomidorze

Produkcja szczepionek przeciwko chorobom ludzkim i chorobom zwierząt w roślinach jest jednym z bardziej intrygujących zastosowań biotechnologii. Jako szczepionka przeciwko wścieklicznie stosowana jest m.in. glikoproteina wirusa wściekliczyny, która podawana doustnie, immunizuje organizm. McGarvey i wsp. (97) wytworzyli transgeniczne rośliny pomidora, które produkowały to białko. Wprowadzili oni do pomidora za pomocą *A. tumefaciens* chimeryczny gen kodujący glikoproteiny wirusa wściekliczyny ze szczepu ERA, wraz z sekwencją peptydu sygnałowego pod kontrolą promotora 35S CaMV. Ekspresję genu zbadano metodą *Western-blot* i wykryto 2 białka o wielkości 60 kDa i 62 kDa. Białko sztucznie namnożonego wirusa miało wielkość 66 kDa. Autorzy tłumaczą to tym, że glikozylacja w komórkach roślinnych przebiega trochę inaczej niż w komórkach zwierzęcych (białko to ma 3 miejsca glikozylacji, a masa białka, które w ogóle nie uległo glikozylacji została oszacowana na 58,6 kDa). Białka były zlokalizowane w aparatach Golgiego, plazmalemmie i ścianie komórkowej parenchymy. W ekstrakcie z liści białko to stanowiło 0,1-1,0% wszystkich białek. Prowadzone są dalsze prace, mające oszacować właściwości immunizacyjne transgenicznych pomidorów.

4. Transgeniczne odmiany pomidora jako przykład wykorzystania w hodowli

Pierwszą transgeniczną odmianą rośliny uprawnej, dopuszczoną do obrotu handlowego w krajach uprzemysłowionych były pomidory Flavr Savr™.

Zgodę na komercyjną sprzedaż i dopuszczenie do spożycia odmiany wydała w maju 1994 r. FDA (Food and Drug Administration of the Government of the USA). Sprzedaż owoców rozpoczęła się w tym samym miesiącu. Konsumenty pozytywnie zaakceptowali nowe pomidory. Odmiana Flavr Savr™ została wytworzona w wyniku transformacji za pomocą *A. tumefaciens* z wykorzystaniem wektora binarnego. Wprowadzono gen poligalakturonazy w układzie antysensowym pod kontrolą promotora 35S CaMV z terminatorem syntazy nopalinowej co spowodowało obniżenie poziomu poligalakturonazy, enzymu degradującego pektyny, a jednocześnie spowolnienie procesu rozpadu ścian komórkowych związanych z mięknięciem owocu (72,73).

Z danych opublikowanych przez ISAAA (International Service for the Acquisition of Agri-Biotech Application) (1) wynika, że aktualnie (1 lipiec 1996 r.) w Stanach Zjednoczonych zostało dopuszczonych do uprawy 5 odmian pomidora otrzymanych w wyniku transformacji (tab. 4).

TABELA 4

ODMIANY POMIDORÓW POWSTAŁE W WYNIKU TRANSFORMACJI I DOPUSZCZONE DO SPRZEDAŻY W STANACH ZJEDNOCZONYCH, 1 LIPIEC 1996 R. (NA PODSTAWIE (1), ZMODYFIKOWANE)

Firma	Zmodyfikowana cecha (mechanizm)	Rok dopuszczenia do sprzedaży	Nazwa odmiany	Powierzchnia uprawy*
Calgene	opóźnione dojrzewanie (PG antysens)	1994	Flavr Savr™	około 10 000 akrów
DNA Plant Technology	opóźnione dojrzewanie (syntaza ACC)	1995	Endless Summer™	?
Monsanto	opóźnione dojrzewanie (syntaza ACC)	1995	?	?
Zeneca/Peto Seeds	grubsza skórka, zmieniona zawartość pektyn (PG antysens)	1995	?	?
Agritope	poprawione dojrzewanie	1996	?	?

* W Stanach Zjednoczonych uprawia się rocznie ponad 500 000 akrów pomidorów: 40% do spożycia w stanie świeżym, pozostałe do przetwórstwa.

Jeżeli chodzi o Europę to odmiany firm Calgene i Zeneca są w trakcie procedury pozwalającej na wprowadzenie ich do handlu, zaś odmiana firmy Zeneca/Peto Seeds została dopuszczona do sprzedaży w Wielkiej Brytanii, jednak możliwa jest tylko sprzedaż importowanych produktów otrzymanych

z tej odmiany, podczas gdy nie jest dozwolona jej uprawa w Anglii. Odmiana Flavr Savr™ firmy Calgene została również dopuszczona w 1995 r. do sprzedaży w Meksyku. Wiadomo także, że od 1994 r. w Chinach są uprawiane transgeniczne pomidory z odpornością na wirusy, jednakże nie znane są bliższe szczegóły dotyczące skali produkcji jak i rodzaju odporności.

Nie jest jasne dlaczego na rynku amerykańskim nie pojawiły się transgeniczne odmiany pomidora z tolerancją na herbicydy (Basta i Roundup), odpornością na wirusy (TMV, ToMV, CMV, TSWV) i owady (odporność oparta na genach *Bt*). Wiadomo, że firmy biotechnologiczne wytworzyły transgeniczne linie pomidora charakteryzujące się takimi odpornościami, zaś dopuszczone do uprawy zostały inne gatunki niosące te lub bardzo podobne geny odporności.

5. Perspektywy

Dotychczasowe osiągnięcia związane z transformacją pomidora zaowocowały pierwszymi transgenicznymi odmianami, które z powodzeniem są uprawiane w Stanach Zjednoczonych, Meksyku i w Chinach. Dopuszczenie do sprzedaży w Anglii produktów otrzymanych z owoców transgenicznych odmian pomidora świadczy o tym, że wkrótce także w Europie, można spodziewać się upraw transgenicznych pomidorów.

Gwałtowny postęp biologii molekularnej dostarcza coraz większej wiedzy dotyczącej transformacji, jak też zasad funkcjonowania genomu pomidora. Aktualnie pojawiają się doniesienia na temat nowych wektorów binarnych oferujących zupełnie nowe możliwości. Skonstruowano wektory binarne, które mogą przenosić do genomu roślinnego fragmenty DNA o wielkości kilkuset tysięcy par zasad (4). Oznacza to możliwość wprowadzania do roślin klonów niosących całe szlaki metaboliczne, rodziny genów odporności, cechy ilościowe (QTL), jak też konstruowanie bibliotek w tym wektorze, dających możliwość analizy ekspresji klonów w roślinie. Równocześnie wyizolowany został i jest charakteryzowany molekularnie pierwszy locus QTL pomidora (98). Wyniki badań Mlynarowej i wsp. (99,100) dotyczące sekwencji MAR-owych (ang. *Matrix Associated Regions*) pozwalają przypuszczać, że również w pewnym stopniu opanowany został mechanizm stabilnej ekspresji transgenów, eliminujący efekt pozycji.

Coraz więcej genów, bardzo ważnych z punktu widzenia praktycznej hodowli jest poznawanych na poziomie molekularnym, pochodzących zarówno z pomidora jak też innych gatunków. Można spodziewać się zatem dalszego postępu w transformacji pomidora, dającego zupełnie nowe możliwości doskonalenia odmian.

Literatura:

1. James C., Krattiger A. F., (1996), ISAAA Briefs, 1, ISAAA, Ithaca, NY.
2. Horsch R. B., Fry J. E., Hoffmann N. L., Wallroth M., Eichholtz D., Rogers S. G., Fraley R. T., (1985), *Science*, 227, 1229-1231.
3. An G., Watson B. D., Chiang C. C., (1986), *Plant Physiol.*, 81, 301-305.
4. Hamilton C. M., Frary A., Lewis C., Tanksely S. D., (1996), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, 9975-9979.
5. van Roekel J. S. C., Damm B., Melchers L. S., Hoekema A., van Roekel J. S. C., (1993), *Plant Cell Rep.*, 12, 644-647.
6. McCormick S., Niedermeyer J., Fry J., Barnason A., Horsch R., Fraley R., (1986), *Plant Cell Rep.*, 5, 81-84.
7. Rudenko G. N., Nijkamp H. J. J., Hille J., (1994), *Mol. Gen. Genet.*, 243, 426-433.
8. Scofield S. R., Jones D. A., Harrison K., Jones J. D. G., (1994), *Mol. Gen. Genet.*, 244, 189-196.
9. de Block M., Botterman J., Vandewiele M., Dockx J., Thoen C., Gossele V., Movva N. R., Thompson C., van Montagu M., Leemans J., (1987), *EMBO Journal*, 6, 2513-2518.
10. Comai L., Moran P., Maslyar D., (1990), *Plant Mol. Biol.*, 15, 373-381.
11. Chang Y. C., Pfitzner A. J. P., (1994), *Plant Sci.*, 98, 175-183.
12. Palm C. J., Costa M. A., An G. H., Ryan C. A., (1990), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, 603-607.
13. Davis M. E., Miller A. R., Lineberger R. D., (1991), *Journal of Exp. Botany*, 42, 359-364.
14. Fillatti J. J., Kiser J., Rose R., Comai L., (1987), *Biotechnology*, 5, 726-730.
15. Koornneef M., Hanhart C., Jongsma M., Toma I., Weide R., Zabel P., Hille J., (1986), *Plant Sci.*, 45, 201-208.
16. Shahin E. A., Sukhapinda K., Simpson R. B., Spivey R., (1986), *Theor. Appl. Genet.*, 72, 770-777.
17. Chyi Y., Phillips C., (1987), *Plant Cell Rep.*, 6, 105-108.
18. Hamza S., Chupeau Y., (1993), *Journal of Exp. Botany*, 269, 1837-1845.
19. Chyi Y. S., Jorgensen R. A., Goldstein D., Tanksley S., (1986), *Mol. Gen. Genet.*, 204, 64-69.
20. Sukhapinda K., Spivey R., Simpson R. B., Shahin E. A., (1987), *Mol. Gen. Genet.*, 206, 491-497.
21. Simpson R. B., Spielmann A., Margossian L., McKnight T. D., (1986), *Plant Mol. Biol.*, 6, 403-415.
22. Horsch R. B., Fraley R. T., Rogers S. G., Klee H. J., Fry J., Hinchee M. A. W., Shah D. S., (1988), *Iowa State Journal of Research*, 62, 487-502.
23. Muschietti J., Dircks L., Vancanneyt G., McCormick S., (1994), *Plant Journal*, 6, 321-338.
24. Ingersoll J. C., Rothenberg M., Liedl B. E., Folkerts K., Garvin D., Hanson M. R., Doyle J. J., Mutschler M. A., (1994), *Plant Mol. Biol.*, 26, 1875-1891.
25. Budelier K. A., Smith A. G., Gasser C. S., (1990), *Mol. Gen. Genet.*, 224, 183-192.
26. Martineau B., Summerfeld K. R., Adams D. F., deVerna J. W., (1995), *Biotechnology*, 13, 250-254.
27. Deikman J., Kline R., Fischer R. L., (1992), *Plant Physiol.*, 100, 2013-2017.
28. Montgomery J., Pollard V., Deikman J., Fischer R. L., (1993), *Plant Cell*, 5, 1049-1062.
29. Comai L., Matsudaira K. L., Heupel R. C., Dietrich R. A., Harada J. J., (1992), *Plant Physiol.*, 98, 53-61.
30. Taylor B. H., Scheuring C. F., (1994), *Mol. Gen. Genet.*, 243, 148-157.
31. Koning A. J., Rose R., Comai L., (1992), *Plant Physiol.*, 100, 801-811.
32. Samac D. A., Shah D. M., (1991), *Plant Cell*, 3, 1063-1072.
33. Ashfield T., Hammond Kosack K. E., Harrison K., Jones J. D. G., (1994), *Molecular Plant Microbe Interactions*, 7, 645-657.
34. Yoder J. I., Palys J., Alpert K., Lassner M., (1988), *Mol. Gen. Genet.*, 213, 291-296.
35. Lassner M. W., Palys J. M., Yoder J. I., (1989), *Mol. Gen. Genet.*, 218, 25-32.

36. Yoder J. I., (1990), *Plant Cell*, 2, 723-730.
37. Yoder J. I., (1990), *Theor. Appl. Genet.*, 79, 657-662.
38. Osborne B. I., Corr C. A., Prince J. P., Hehl R., Tanksley S. D., McCormick S., Baker B., (1991), *Genetics*, 129, 833-844.
39. Rommens C. M. T., van der Biezen E. A., Ouwkerk P. B. F., Nijkamp H. J. J., Hille J., (1991), *Mol. Gen. Genet.*, 228, 453-458.
40. Thomas C. M., Jones D. A., English J. J., Carroll B. J., Bennetzen J. L., Harrison K., Burbidge A., Bishop G. J., Jones J. D. G., (1994), *Mol. Gen. Genet.*, 242, 573-585.
41. Jones D. A., Thomas C. M., Hammond-Kosack K. E., Balint-Kurti P. J., Jones J. D. G., (1994), *Science*, 266, 789-793.
42. Dixon M. S., Jones D. A., Keddie J. S., Thomas C. M., Harrison K., Jones J. D., (1996), *Cell*, 84, 451-459.
43. Bishop G. J., Harrison K., Jones J. D., (1996), *Plant Cell*, 8, 959-969.
44. Keddie J. S., Carroll B., Jones J. D., Grissem W., (1996), *EMBO Journal*, 15, 4208-4217.
45. van der Biezen E. A., Brandwagt B. F., van Leeuwen W., Nijkamp H. J., Hille J., (1996), *Mol. Gen. Genet.*, 251, 276-280.
46. Burbidge A., Grieve T. M., Woodman K. J., Taylor I. B., (1995), *Theor. Appl. Genet.*, 91, 1022-1031.
47. Peterson P. W., Yoder J. I., (1995), *Journal of Heredity*, 86, 172-177.
48. Goldsbrough A. P., Lastrella C. N., Yoder J. I., (1993), *Biotechnology*, 11, 1286-1292.
49. Pnueli L., Hareven D., Rounsley S. D., Yanofsky M. F., Lifschitz E., (1994), *Plant Cell*, 6, 163-173.
50. Pnueli L., Hareven D., Broday L., Hurwitz C., Lifschitz E., (1994), *Plant Cell*, 6, 175-186.
51. Mooney M., Desnos T., Harrison K., Jones J., Carpenter R., Coen E., (1995), *Plant Journal*, 7, 333-339.
52. Hareven D., Gutfinger T., Parnis A., Eshed Y., Lifschitz E., (1996), *Cell*, 84, 735-744.
53. Tumer N. E., O'Connell K. M., Nelson R. S., Sanders P. R., Beachy R. N., Fraley R. T., Shah D. M., (1987), *EMBO Journal*, 6, 1181-1188.
54. Saito Y., Komari T., Masuta C., Hayashi Y., Kumashiro T., Takanami Y., (1992), *Theor. Appl. Genet.*, 83, 679-683.
55. Sanders P. R., Sammons B., Kaniewski W., Haley L., Layton J., la Vallee B. J., Delannay X., Tumer N. E., (1992), *Phytopathology*, 82, 683-690.
56. Kim J. W., Sun S. S. M., German T. L., (1994), *Plant Disease*, 78, 615-621.
57. Ultzen T., Gielen J., Venema F., Westerbroek A., de Haan P., Tan M. L., Schram A., Grinsven M., Goldbach R., (1995), *Euphytica*, 85, 159-168.
58. Kunik T., Salomon R., Zamir D., Navot N., Zeidan M., Michelson I., Gafni Y., Czosnek H., (1994), *Biotechnology*, 12, 500-504.
59. Whitham S., McCormick S., Baker B., (1996), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, 8776-8781.
60. Martin G. B., Brommonschenkel S. H., Chunwongse J., Frary A., Ganai M. W., Spivey R., Wu T. Y., Earle E. D., Tanksley S. D., (1993), *Science*, 262, 1432-1436.
61. Martin G. B., Frary A., Wu T. Y., Brommonschenkel S., Chunwongse J., Earle E. D., Tanksley S. D., (1994), *Plant Cell*, 6, 1543-1552.
62. Staskawicz B. J., Ausubel T. M., Baker B. J., Ellis J. G., Jones J. D. G., (1995), *Science*, 268, 661-667.
63. Hammond-Kosack K. E., Harrison K., Jones J. D. G., (1994), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 10445-10449.
64. Jongedijk E., Tigelaar J., van Roekel J. S. C., Bres Vloemans S. A., Dekker I., van den Elzen P. J. M., Cornelissen B. J. C., Melchers L. S., (1995), *Euphytica*, 85, 173-180.
65. Fischhoff D. A., Bowditch K. S., Perlak F. J., Marrone P. G., McCormick S. M., Niedermeyer J. G., Dean D. A., Kusano-Kretzmer K., Mayer E. J., Rochester D. E., Rogers S. G., Fraley R. T., (1987), *Biotechnology*, 5, 807-813.
66. Perlak F. J., Fuchs R. L., Dean D. A., McPherson S. L., Fischhoff D. A., (1991), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 3324-3328.

67. van der Salm T., Bosch D., Honee G., Feng L., Munsterman E., Bakker P., Stiekema W. J., Visser B., (1994), *Plant Mol. Biol.*, 26, 51-59.
68. Smith C. J. S., Watson C. F., Ray J., Bird C. R., Morris P. C., Schuch W., Grierson D., (1988), *Nature*, 334, 724-726.
69. Sheehy R. E., Kramer M., Hiatt W. R., (1988), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85, 8805-8809.
70. Smith C. J. S., Watson C. F., Morris P. C., Bird C. R., Seymour G. B., Gray J. E., Arnold C., Tucker G. A., Schuch W., Harding S., Gierson D., (1990), *Plant Mol. Biol.*, 14, 369-379.
71. Giovannoni J. J., DellaPenna D., Bennet A. B., Fischer R. L., (1989), *Plant Cell*, 1, 53-63.
72. Redenbaugh K., (1993), *Acta Horticulturae*, 336, 133-146.
73. Kramer M. G., Redenbaugh K., (1994), *Euphytica*, 79, 293-297.
74. Tieman D. M., Harriman R. W., Ramamohan G., Handa A. K., (1992), *Plant Cell*, 4, 667-679.
75. Hall L. N., Tucker G. A., Smith C. J. S., Watson C. F., Seymour G. B., Bundick Y., Boniwell J. M., Fletcher J. D., Ray J. A., Schuch W., Bird C. R., Gierson D., (1993), *The Plant Journal*, 3, 121-129.
76. Seymour G. B., Fray R. G., Hill P., Tucker G. A., (1993), *Plant Mol. Biol.*, 23, 1-9.
77. Hamilton A. J., Lycett G. W., Gierson D., (1990), *Nature*, 346, 284-287.
78. Hamilton A. J., Bouzayen M., Gierson D., (1991), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 7434-7437.
79. Picton S., Gray J.E., Gierson D., (1995), *Euphytica*, 85, 193-202.
80. Oeller P. W., Lu M. W., Taylor L. P., Pike D. A., Theologis A., (1991), *Science*, 254, 437-439.
81. Klee H. J., Hayford M. B., Kretzmer K. A., Barry G. F., Kishore G. M., (1991), *Plant Cell*, 3, 1187-1193.
82. Good X., Kellogg J. A., Wagoner W., Langhoff D., Matsumura W., Bestwick R. K., (1994), *Plant Mol. Biol.*, 26, 781-790.
83. Wilkinson J. Q., Lanahan M. B., Yen H., Giovannoni J. J., Klee H. J., (1995), *Science*, 270, 1807-1809.
84. Bird C. R., Ray J. A., Fletcher J. D., Boniwell J. M., Bird A. S., Teulieres C., Blain I., Bramley P. M., Schuch W., (1991), *Biotechnology*, 9, 635-639.
85. van Altvorst A. C., Bino R. J., van Dijk A. J., Lamers A. M. J., Lindhout W. H., van der Mark F., Dons J. J. M., (1992), *Plant Sci.*, 83, 77-85.
86. Martineau B., Houck C. M., Sheehy R. E., Hiatt W. R., (1994), *Plant Journal*, 5, 11-19.
87. Storti E., Bogani P., Bettini P., Bittini P., Guardiola M. L., Pellegrini M. G., Inze D., Buiatti M., (1994), *Theor. Appl. Genet.*, 88, 89-96.
88. Groot S. P. C., Bouwer R., Busscher M., Lindhout P., Dons H. J., (1995), *Plant Growth Regulation*, 16, 27-36.
89. Hamza S., Camilleri C., Pollien J. M., Vaucheret H., Bourgin-J. P., Chupeau Y., (1993), *Theor. Appl. Genet.*, 86, 657-664.
90. Carmi N., Salts Y., Szechtman A.D., Dedicova B., Shabtai S., Berg R., (1997), XIII Meeting of the Eucarpia Tomato Working Group, Jerusalem, Israel, Conference Abstracts.
91. Worrell A. C., Bruneau J. M., Summerfelt K., Boersig M., Voelker T. A., (1991), *Plant Cell*, 3, 1121-1130.
92. Galtier N., Foyer C. H., Huber J., Voelker T. A., Huber S. C., (1993), *Plant Physiol.*, 101, 535-543.
93. Stark D. M., Timmerman K. P., Barry G. F., Preiss J., Kishore G. M., (1992), *Science*, 258, 287-292.
94. Dickinson C. D., Altabella T., Chrispeels M. J., (1991), *Plant Physiol.*, 95, 420-425.
95. Boylan M. T., Quail P. H., (1989), *Plant Cell*, 1, 765-773.
96. Penarrubia L., Kim R., Giovannoni J., Kim S. H., Fischer R. L., (1992), *Biotechnology*, 10, 561-564.

97. McGarvey P. B., Hammond J., Dienelt M. M., Hooper D. C., Fu Z. F., Dietzschold B., Koprowski H., Michaels F. H., (1995), *Biotechnology*, 13, 1484-1487.
98. Alpert K. B., Tanksley S. D., (1996), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, 15503-15507.
99. Mlynarowa L., Loonen A., Heldens J., Jansen R. C., Keizer P., Stiekema W. J., Nap J. P., (1994), *Plant Cell*, 6, 417-426.
100. Mlynarowa L., Keizer L. C. P., Stiekema W. J., Nap J. P., (1996), *Plant Cell*, 8, 1589-1599.

Tomato transformation with *Agrobacterium tumefaciens*

Summary

Tomato is one of the model species used for crop transformation. The first transgenic tomato variety, known as Flavr Savr™, was approved for sale in the USA in 1994. The introduced trait of this cultivar is delayed ripening. In 1996, its acreage was reported to be 10,000 acres. Another variety characterised by delayed ripening is Endless Summer™, approved in 1995. There are some other cultivars with new traits, such as thicker skin, altered pectin or resistance to viruses (TSWV, ToMV) either approved or pending approval. In addition, a wide range of basic research on tomato transformation has been carried out, including studies on resistance to herbicides, viruses, fungi, bacteria, insects as well as on altered transcription regulation, ripening, carotenoid synthesis, level of auxines and cytokinines, carbohydrates, proteins and specific vaccines. Further improvement of tomato varieties is expected with the use of *Agrobacterium tumefaciens*.

Key words:

tomato, transformation, *Agrobacterium*, transgenes, metabolism regulation, resistance, transgenic varieties.

Adres do korespondencji:

Grzegorz Bartoszewski, Katedra Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin, Wydział Ogrodniczy SGGW, ul. Nowoursynowska 166, 02-787 Warszawa, fax: 843-09-82; e-mail: Bartoszewski@alpha.sggw.waw.pl