

# Transformacja roślin za pomocą wektorów *Agrobacterium tumefaciens*

Teresa Orlikowska  
Instytut Sadownictwa  
i Kwiaciarstwa  
Skierniewice

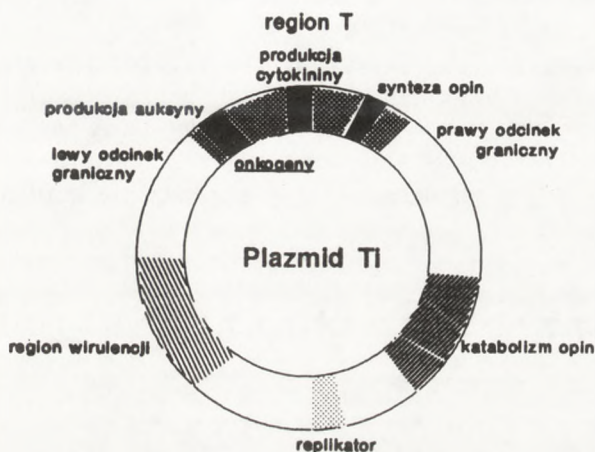
## 1. Wprowadzenie

Rozwój biologii molekularnej umożliwia użycie techniki wprowadzania pojedynczych obcych genów do genomu komórki roślinnej i zastosowanie tej procedury do ulepszania roślin uprawnych. Opisano różne sposoby wprowadzania DNA do tkanek, komórek lub protoplastów, z których szersze znaczenie praktyczne mają: wprowadzanie DNA do protoplastów przez mikropory wytworzone w cytoplazmie pod wpływem pola elektromagnetycznego i/lub PEG, mikroiniekcja do komórek lub organelli komórkowych i wstrzeliwanie DNA za pomocą biologicznego pocisku (1). Wprowadzane w ten sposób DNA nie jest zabezpieczone przed atakiem endo- i egz nukleaz, które powodują jego degradację i sprawiają, że wydajność transformacji jest niska. Za najbardziej skuteczny sposób dla roślin dwuliściennych jest obecnie uważane wprowadzanie DNA za pośrednictwem *Agrobacterium*, która ewolucyjnie wytworzyła system genetycznej kolonizacji roślin.

## 2. Mechanizm genetycznej kolonizacji roślin przez *Agrobacterium*

*Agrobacterium* jest patogeniczną bakterią glebową, która infekuje rośliny przez zranione tkanki, powodując tumorowy wzrost guzów na szyjce korzeniowej w przypadku *A. tumefaciens* lub nadmierny rozrost korzeni w przypadku *A. rhizogenes* (2,3). W kulturach *in vitro* zainfekowane tkanki tworzą kalus lub liczne korzenie bez dodatku regulatorów wzrostu do pożywki. Powstające w wyniku infekcji tumorowe komórki mają ponadto zdolność produkcji i wydzielania na zewnątrz opin i cukrów, które stanowią źródło azotu i węgla dla zasiedlających przestrzenie międzykomórkowe bakterii.

Komórki tumorowe powstają w wyniku przeniesienia fragmentów plazmidów bakteryjnych — Ti-plazmid u *A. tumefaciens* (rys. 1, za 2) i Ri-plazmid u *A. rhizogenes*, do wnętrza komórek roślinnych. Te fragmenty, zwane DNA transferowym (T-DNA), przemieszczają się przez uszkodzoną ścianę komórkową do jądra, gdzie mogą przyłączyć się do DNA rośliny i realizować swój program genetyczny. Na T-DNA stwierdzono obecność genów kodujących syntezę auksyn, cytokinin i opin. Fragmenty T-DNA są zawsze precyzyjnie wycinane w procesie przenoszenia w sąsiedztwie tzw. sekwencji granicznych. Znajdujące się w obrębie T-DNA sygnały ekspresyjne TATA przy końcu 5' (dla inicjacji) i AATAAA przy końcu 3' (dla terminacji), są rozpoznawane przez czynniki transkrypcyjne rośliny (2).



Rys. 1. Plazmid Ti.

Proces infekcji przebiega w zasadzie podobnie u różnych szczepów *Agrobacterium* i jest zainicjowany, gdy jeden z genów wirulencyjnych umieszczonych na plazmidzie rozpozna w otoczeniu bakterii obecność substancji fenolowych, wydzielanych przez uszkodzone komórki roślinne. Bakteria przemieszcza się w pobliże uszkodzonej komórki roślinnej, a geny wirulencji umieszczone na chromosomie bakteryjnym indukują produkcję substancji umożliwiających przyleganie komórki bakteryjnej do komórki roślinnej. W wyniku uaktywnienia się innego plazmidowego genu wirulencji produkowane jest białko inicjujące akcję endonukleazy. Enzym ten wycina T-DNA z plazmidu, a białko wiąże się kowalencyjnie z końcem 5', ochrania je przed atakiem innych nukleaz i pilotuje transfer do jądra komórki roślinnej. Inny gen wirulencyjny plazmidu powoduje produkcję następnego białka ochronnego, które otula jednoniciowe T-DNA, tworząc nitkę nukleoproteinową. Jeszcze inny plazmidowy gen wirulencyjny indukuje tworzenie białek budujących strukturę, przez które T-DNA jest transportowane do jądra komórkowego. Proces ten

jest podobny do koniugacyjnej wymiany DNA pomiędzy bakteriami, chociaż jest znacznie mniej poznany. Kolejny plazmidowy gen wirulencyjny odpowiada za produkcję białka, które może detoksyfikować niekorzystne substancje obecne w komórce roślinnej. Niektóre szczepy bakterii posiadają ponadto na chromosomie gen kodujący syntezę *trans*-zeatyny, która wydzielana w pobliżu komórki roślinnej powoduje wzrost tumorogenności. Miejsce włączenia T-DNA ma charakter przypadkowy i może wiązać się z reorganizacją DNA genomowego. Sugeruje się następujący sposób włączania T-DNA (4,5):

- T-DNA jest przenoszone do komórki roślinnej jako kompleks DNA-białko,
- po wnikięciu do jądra, białko związane z prawym końcem (5') wiąże się z przeciętą sekwencją DNA roślinnego,
- przyłączenie się jednoniciowego T-DNA do jednej z nici DNA roślinnego powoduje lokalne skręcenie, co ma konsekwencje w postaci następnego pęknięcia na końcu przyłączonego DNA,
- każdy z końców T-DNA jest wiązany do DNA roślinnego, a nitka homologiczna jest kopiowana przez enzymy komórkowe,
- reperacja i replikacja powstających przecięć DNA roślinnego może powodować tworzenie powtarzalnych sekwencji różnej długości i dodatkowe przeorganizowania w postaci delekcji i/lub duplikacji na końcach wprowadzonego T-DNA.

### 3. Ekspresja genów T-DNA w roślinach

Przypuszcza się, że T-DNA może ulegać przejściowej ekspresji w komórce roślinnej, nawet jeśli nie jest włączony do DNA genomowego, ponieważ posiada odczytywane przez roślinę sygnały transkrypcyjne (5). Zjawisko to jest jednak ograniczone do krótkiego czasu, po czym T-DNA, który nie jest związany z DNA genomowym, zostaje strawiony przez endonukleazy. T-DNA zintegrowany rozpoczyna produkcję enzymów szlaku syntezy auksyn i cytokinin, co przerywa równowagę hormonalną komórki i inicjuje tumorowy wzrost oraz syntezę i wydzielanie opin. Także trwałe włączenie się T-DNA nie gwarantuje jego ekspresji z powodu metylacji lub sąsiedztwa z „uśpionymi” regionami DNA (6).

Objawy ekspresji genów markerowych stwierdzano już po 2 dniach od początku kokultywacji (7). Najłatwiejsza do obserwowania jest ekspresja wyizolowanego z *Escherichia coli* genu kodującego enzym  $\beta$ -glukuronidazę powodującego rozszczerzenie substratów  $\beta$ -glukuronidowych, które w wyniku tego stają się widoczne w komórkach, ponieważ zmieniają zabarwienie na niebieskie. Geny tego typu, które pozwalają śledzić stransformowane sektory tkanek noszą nazwę genów reporterowych (8). Przeorganizowanie genu GUS spowodowało, że nie jest on „czytany” przez *Agrobacterium*, co wyklucza pomyłki, także przy obserwacji najwcześniejszych zdarzeń transformacyjnych, zanim jeszcze bakteria zostanie wyeliminowana z tkanek (7,9).

Ekspresja wprowadzonych obcych genów jest zależna od sekwencji kontrolujących inicjację transkrypcji, tzw. promotorów, które poprzedzają geny strukturalne (10). Jednym z najchętniej stosowanych i najsilniej działających jest promotor wirusa mozaiki kalafiora (CaMV 19S), używany najczęściej w postaci podwojonych sekwencji, jako CaMV 35S (11). Używane są też pochodzące od niego promotory hybrydowe (12).

Ekspresja wprowadzonych genów może być niejednakowa w poszczególnych roślinach transgenicznym, ponieważ zależy od miejsca przyłączenia T-DNA (efekt pozycji) do genomu roślinnego (13). Po wycięciu z plazmidu, T-DNA ulega wielokrotnej replikacji w komórce bakteryjnej lub/i roślinnej i do genomu roślinnego mogą włączyć się wielokrotne kopie T-DNA, co może być przyczyną metylacji i inaktywacji tego odcinka (6). Powodem dla którego nie obserwuje się ekspresji wprowadzonych genów, choć wykrywa się ich obecność w DNA genomowym, może być włączenie T-DNA do tych fragmentów DNA roślinnego, które nigdy nie ulegają ekspresji lub tylko w szczególnych okolicznościach albo w określonym stadium rozwoju. Następnym krokiem, który nauka musi zrobić aby transformacja nie była jak dziś loterią, jest znalezienie sposobu na przyłączanie T-DNA do określonych loci (celowane przyłączanie). Offringa i wsp. (1992) dokonali przeglądu możliwości dla rozwiązania tego problemu. Rozwiązaniem może być konstruowanie T-DNA częściowo homologicznego do DNA loci, które ulegają ekspresji.

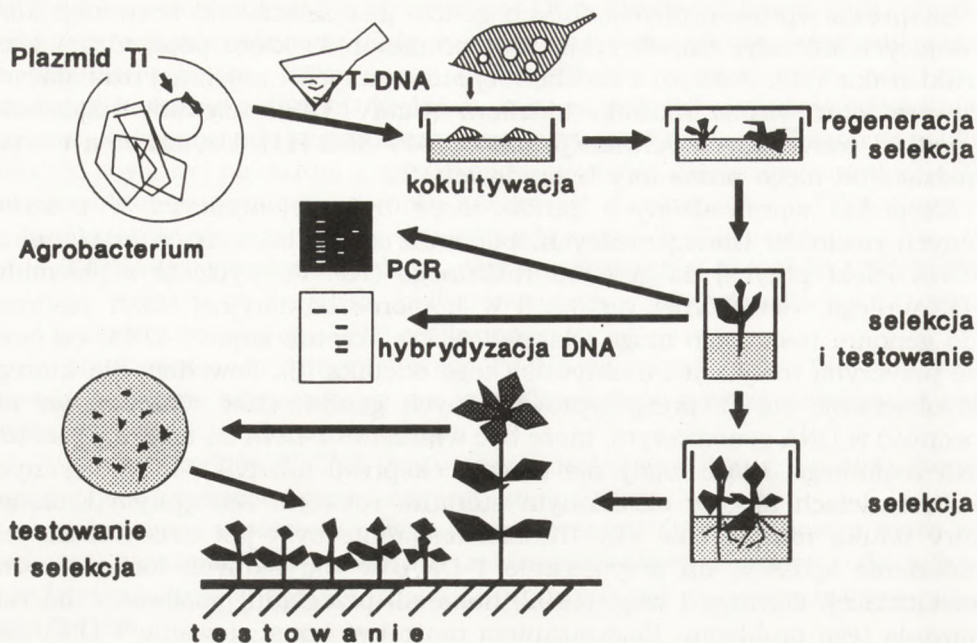
Podstawą używania T-DNA *Agrobacterium* dla celów inżynierii genetycznej jest fakt, że dla odcięcia i przeniesienia T-DNA są potrzebne jedynie lewa i prawa sekwencja graniczna. Pozostałe geny T-DNA, kodujące syntezę hormonów i opin nie mają znaczenia dla transferu (5). Można je zatem wyciąć (rozbroić bakterię z onkogenów), a w ich miejsce wstawić dowolne geny strukturalne oraz promotory inicjujące ich transkrypcję. Stwarza to możliwość konstrukcji wektorów z dowolnym zestawem genów.

#### 4. Czynniki kontrolujące wytwarzanie roślin transgenicznym

Wytwarzanie roślin transgenicznym odbywa się w 4 etapach (rys. 2):

- 1) wprowadzenie obcych genów do zmodyfikowanego szczepu bakteryjnego,
- 2) kokultywacja bakterii z komórkami lub tkankami roślinnymi,
- 3) eliminacja bakterii, selekcja negatywna tkanek niestransformowanych i regeneracja struktur stransformowanych (próba transformacji powinna być poprzedzona opracowaniem metody masowej regeneracji pędów lub zarodków somatycznych w danym genotypie rośliny),
- 4) analiza i weryfikacja ekspresji genów w stransformowanych roślinach (14).

O skuteczności i wydajności transformacji decydują zarówno właściwości biorcy jak i dawcy. Geny wirulencyjne *Agrobacterium* zwiększają aktywność w wyniku kontaktu z wydzielanymi przez zranione komórki komponentami fenolowymi, takimi jak octan lub hydroksyoctan syringonu (15). Jeśli roślina



Rys. 2. Etapy wytwarzania roślin transgenicznych.

nie wydziela w efekcie zranienia atrakcyjnych dla bakterii fenoli, efekt naturalnej chemoaktywacji bakterii można uzyskać w wyniku dodania tych fenoli do kultury bakteryjnej lub do pożywki, na której bakteria zakaża roślinę (16). Aktywacja genów wirulencyjnych octanem syringonu zależy jednak od genotypu rośliny, szczepu bakteryjnego i warunków w jakich proces przebiega i może także wpływać niekorzystnie na wynik transformowania (17). Wpływ właściwości dawcy wiąże się ze stopniem wirulencji bakterii. Wirulencja jest uwarunkowana przez geny *chv* umieszczone na chromosomie bakteryjnym i geny *vir* umieszczone na plazmidzie. Stąd, zarówno szczep bakterii, jak i plazmid mogą w znaczny sposób modyfikować wynik transformacji. Jako wektory transformacji najczęściej używane są trzy szczepy *Agrobacterium tumefaciens*: octopinowy — Ach5, nopalinowy — C58, i uważany za najbardziej wirulentny sucynamopinowo-agropinowy — A281 (17).

Obiektem transformacji powinny być tkanki lub komórki, które są zdolne do masowej regeneracji struktur zorganizowanych — pędów lub zarodków somatycznych. Korzystniejszym wariantem jest regeneracja bezpośrednio z komórek stransformowanych. W przypadku, gdy tworzą one najpierw kalus, zregenerowane z niego struktury mogą wykazywać zmiany somaklonalne, modyfikujące wartość odmiany. Regenerację bezpośrednią można łatwiej zaindukować w tkankach juwenilnych, pochodzących z siewek albo odmłodzonych w kulturach *in vitro*. Transformować jednak należy eksplantaty pochodzące z roślin o znanej wartości użytkowej, co w przypadku roślin drzewias-

tych oznacza roślinę w stadium dojrzałości do owocowania. Siewki można używać tylko wtedy gdy mamy do czynienia z ustabilizowaną odmianą. Wydajność regeneracji można zwiększyć przez zminimalizowanie stresu, np. przez włączenie do pożywki azotanu srebra, który zmniejsza wrażliwość tkanek na etylen (18) albo przez wstępną kulturę tkanek na pożywce regeneracyjnej bez dodatku bakterii (19). Dla wydajności regeneracji ma ponadto znaczenie rodzaj, dawka i moment zastosowania czynnika selekcyjnego — antybiotyku lub herbicydu (20,14).

## 5. Ocena transformacji

Wynik transformacji ocenia się przede wszystkim na podstawie obrazu wczesnej ekspresji genów umieszczonych w obrębie T-DNA. Skonstruowany sztucznie T-DNA powinien posiadać geny markerowe, które pozwalają na skuteczną selekcję pozytywną stransformowanych komórek. Najczęściej są to geny odporności na antybiotyk lub tolerancji na herbicyd albo geny, których produkt jest łatwy do chemicznej detekcji (tab. 1). Kokulturowane z bakteriami tkanki umieszcza się na pożywce z dodatkiem czynnika selekcyjnego (antybiotyku lub herbicydu), na której powinny przeżyć i zregenerować tylko komórki posiadające gen odporności, ponieważ tylko one są zdolne do wytwarzania enzymu rozkładającego czynnik toksyczny. Wcześniej jednak trzeba wyznaczyć próg toksyczności, przy którym tkanki niestransformowane nie regenerują, ale który nie jest drastycznie toksyczny dla eksplantatów (20). Regeneracja na pożywkach selekcyjnych nie gwarantuje jednak, że wszystkie wyrastające pędy będą stransformowane. Pędy niestransformowane, a zregenerowane w obecności czynnika selekcyjnego, tzw. uciekinierzy, mogą powstawać na partiach eksplantatu nie mających kontaktu z pożywką, gdy czynnik selekcyjny (np. kanamycyna) jest słabo przemieszczany w tkance. Z tego powodu przypuszczalne pędy transgeniczne powinny być sprawdzone pod kątem produkcji enzymów markerowych albo przez retestowanie na pożywkach selekcyjnych bardzo małych eksplantatów. Następnym krokiem jest poszukiwanie wprowadzonego genu w ekstrakcie DNA sporządzonym z pędów zregenerowanych na pożywkach selekcyjnych. Najczęściej do tego celu jest używana metoda enzymatycznej amplifikacji wybranych sekwencji wprowadzonego genu, znana jako metoda PCR (*polymerase chain reaction*), która umożliwia wykrycie obecności pikogramowych ilości DNA. Amplifikacja odcinków DNA następuje pod wpływem polimerazy DNA, która wydłuża oligonukleotydowe primery, komplementarne do fragmentów poszukiwanego genu. W skrócie jej przebieg jest następujący (22):

— sporządzenie mieszaniny składającej się z ekstraktu DNA, pojedynczych nukleotydów, specyficznych primerów (sekwencji około 25 nukleotydów rozpoczynających i kończących odcinek wprowadzanego genu), enzymu polimerazy DNA oraz specyficznego dla reakcji buforu,

— cyklicznego zastosowania sekwencji temperatur, które powodują kolej-

no rozdzielenie (denaturację) łańcuchów DNA, ustawienie się primerów wzdłuż odcinków komplementarnych do DNA z ekstraktu i dobudowanie brakującego odcinka,

— elektroforeza uzyskanego produktu PCR i porównanie jego wielkości (położenia w żelu) z wzorcem wprowadzonego genu.

TABELA 1  
NAJCZĘŚCIEJ UŻYWANE GENY MARKEROWE (ZA 21)

Gen	Pochodzenie	Kodowany enzym	Wartość		Oporność przeciwko
			selekcyjna	reporterowa	
fosfotransferaza neomycyny I ( <i>npt</i> II)	Tn5 <sup>1</sup>	fosfotransferaza neomycyny	+	+	neomycyna, G-418, kanamycyna
fosfotransferaza hygromycyny ( <i>hpt</i> )	<i>E. coli</i>	fosfotransferaza hygromycyny	+	-	hygromycyna B
transferaza acetylowa chloramfenikolu ( <i>cat</i> )	Tn9	transferaza acetylowa chloramfenikolu	+	+	chloramfenikol
syntaza oktopiny ( <i>ocs</i> )	T-DNA	syntaza oktopiny	+	+	toksyczne prekursorzy opin
syntaza nopaliny ( <i>nos</i> )	T-DNA	syntaza nopaliny	-	+	
<i>araA</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>	syntaza EPSP <sup>2</sup>	+	-	glifosat
<i>bar</i>	<i>Streptomyces hygroscopicus</i>	transferaza acetylowa fosfinotrycyny	+	-	fosfinotrycyny
$\beta$ -galaktozydaza	<i>E. coli</i>	$\beta$ -galaktozydaza	-	+	
glukuronidaza ( <i>GUS</i> )	<i>E. coli</i>	glukuronidaza	-	+	
lucyferaza robaczka świętojańskiego	<i>Photinus pyralis</i>	lucyferaza	-	+	

<sup>1</sup>transpozon, <sup>2</sup>syntaza 5-endopirogrono-szikimo-3-fosforanowa.

Ten sposób daje odpowiedź, czy DNA będący przedmiotem transformacji był obecny w ekstrakcie, ale nie informuje, czy pochodził on z DNA zintegrowanego z roślinnym, czy z pozostałych w tkankach bakterii, których całkowita eliminacja jest często trudna. Metodą, która może dać odpowiedź, czy wprowadzony DNA jest trwale włączony do genomu roślinnego, jest hybrydyzacja

DNA genomowego do znakowanej izotopem sondy sprawdzanego genu. Metoda hybrydyzacji przebiega w następujących etapach (23):

- ekstrakcja DNA genomowego z pędów zregenerowanych na pożywce selekcyjnej (DNA powinno być dobrze oczyszczone aby nie było blokowane działanie endonukleaz),
- frakcjonowanie DNA na krótkie odcinki w wyniku działania endonukleaz restrykcyjnych,
- rozdzielenie fragmentów DNA w wyniku elektroforezy w żelu,
- przeniesienie rozdzielonego DNA na filtr nitrocelulozowy (*Southern blotting*),
- denaturacja dwuniciowego DNA na filtrze,
- hybrydyzacja DNA do sondy genetycznej znakowanej izotopem fosforu [<sup>32</sup>P],
- autoradiograficzna analiza hybrydyzacji.

Ostatecznym potwierdzeniem stabilnej transformacji jest ekspresja genów markerowych lub analiza molekularna obecności wprowadzanego DNA, przeprowadzona na potomstwie generatywnym. W trakcie mejozy są bowiem eliminowane wszystkie nietrwałe połączenia w obrębie DNA.

## 6. Zastosowanie transformacji do ulepszania roślin uprawnych

Wprowadzanie pojedynczych genów kodujących cechy użytkowe do wartościowych odmian pozwala na realizację dwóch marzeń hodowców: nieograniczonego transferu genów i wprowadzanie genów pożądaných, niesprzężonych z niepożądanymi. Kod genetyczny jest uniwersalny i w komórce roślinnej mogą funkcjonować zarówno geny wyizolowane z mikroorganizmów jak i zwierząt (21). Można zatem w ten sposób obejść bariery krzyżowalności. Mieszańce somatyczne, choć umożliwiają eliminację barier związanych z zapyleniem i zapłodnieniem, nie są rozwiązaniem dla łączenia oddalonych taksonów z powodu niezgodności metabolizmów. Transformacja daje możliwość wprowadzania małych ilości informacji genetycznej, która nie zakłóca metabolizmu biorcy w sposób istotny dla przeżycia. Mieszańce seksualne powstają w wyniku równoległej rekombinacji i posiadają wszystkie geny rodziców — korzystne i niekorzystne dla celów hodowlanych. Dopiero następne, najczęściej wielokrotne przekrzyżowania mieszańca z jednym z rodziców, pozwalają na eliminację niekorzystnych sprzężeń. W przypadku genów leżących obok siebie na chromosomie często jest to niemożliwe.

Odcinek T-DNA nie może być dowolnie długi. Najczęściej do plazmidu wprowadza się konstrukcje składające się z genu strukturalnego i jednego lub dwóch genów markerowych, każdy z promotorem. Dlatego przedmiotem transformacji mogą być cechy uwarunkowane jednogenuowo. Wśród wyizolowanych genów są takie, które kodują cechy o bezpośrednich walorach użytkowych (tab. 2). Intensywne badania prowadzone nad genomami roślinnymi



TABELA 2

WAŻNIEJSZE GENY UŻYTKOWE WYKORZYSTYWANE W TRANSFORMACJI ZA POMOCĄ *AGROBACTERIUM*

Gen	Pochodzenie	Kodowane białko	Kodowana cecha	Źródło
<b>Odporność na herbicydy</b>				
<i>aroA</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>	syntaza EPSP	odporność na glifosat	21
<i>bar</i>	<i>Streptomyces hygroscopicus</i>	transferaza acetylowa fosfinotrycyny	odporność na fosfinotrycyny	21
<i>tda</i>	<i>Alcaligenes eutrophus</i>	monooksygenaza 2,4-D	odporność na 2,4-D	27
<i>crs-1-1</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>	syntaza mleczanu octowego	odporność na chlorsulfuron	28
<b>Odporność na owady</b>				
białkowy inhibitor trypsyny (CpTi)	<i>Glycine max</i>	inhibitor proteazy	zakłócenie trawienia larw <i>Lepidoptera</i> i <i>Coleoptera</i>	29
krystaliczne białko owadobójcze (ICPs)	<i>Bacillus thuringiensis</i>	$\Delta$ -endotoksyna	jw. <i>Lepidoptera</i> , <i>Coleoptera</i> , <i>Diptera</i>	30
<b>Tolerancja wirusów</b>				
okrywa białkowa	wirus mozaiki tytoniu		odporność krzyżowa	29
	wirus mozaiki lucerny		odporność krzyżowa	29
	wirus X ziemniaka		odporność krzyżowa	29
	wirus ospowatości śliw		odporność krzyżowa	31
<b>Inne</b>				
gen ukorzenia (rol)	<i>Agrobacterium rhizogenes</i>		zwiększenie zdolności do ukorzenia	32
pigmentacja (DQR)	<i>Zea mays</i>	reduktaza dihydrokwercytny	zabarwienie	31
pigmentacja (chs)	<i>Petroselinum</i> , <i>Antirrhinum</i>	syntaza chalkonowa	zabarwienie	33

z pewnością doprowadzą w najbliższym czasie do wyizolowania i chemicznej charakteryzacji następnych genów użytecznych w hodowli roślin. Najwięcej pracuje się nad najważniejszymi gospodarczo roślinami, a więc zbożami, roślinami motylkowatymi i oleistymi. Najważniejsze osiągnięcia nad poznaniem

genomu uzyskano dla roślin modelowych, łatwych, jak kukurydza czy pomidor (24). Analiza genetyczna roślin drzewiastych, które mają długi okres juvenilny i wydają potomstwo generatywne po kilku, kilkunastu lub kilkudziesięciu latach jest znacznie trudniejsza. Bez poznania sposobów dziedziczenia najważniejszych cech trudno jest osiągać znaczące postępy w ulepszaniu odmian. Jest to powód, dla którego osiem krajów europejskich bierze udział w opracowaniu genomu jabłoni. Trzy kraje europejskie współpracują w określeniu genomu czereśni. W Szkockim Instytucie Badania Roślin prowadzone są badania nad genomem czarnej porzeczki. Wiadomo jest, że tak ważne cechy jabłoni, jak odporność na mączniak, parch, trzy rodzaje mszyc, karłowatość i kolumnowy pokrój, są uwarunkowane jednogеноwo. Po wyizolowaniu i chemicznym scharakteryzowaniu geny te mogą być używane do transformacji, co przyczyni się do zmiany technologii uprawy, a co ważniejsze do zmniejszenia zużycia środków chemicznych w czasie produkcji owoców. Wielkie nadzieje wiąże się z wytwarzaniem roślin odpornych na wirusy przez wprowadzenie genu płaszcza białkowego. Powiodła się m.in. próba wprowadzenia odporności na szarkę do moreli, a w kilku ośrodkach, także w Polsce, zaawansowane jest wprowadzanie tej cechy do śliwek. Wyizolowany jest gen blokujący biosyntezę etylenu, co przedłuża okres przechowywania pomidorów, a może także owoców. Dostępne są 4 geny warunkujące tolerancję na 4 grupy herbicydów oraz geny produkujące toksyny przeciwko owadom *Lepidoptera*, *Coleoptera* i *Diptera*. Do truskawki wprowadzono gen odpowiedzialny za kodowanie chitynazy, który ma zapobiegać porażaniu roślin przez fytoftorozę.

## 7. Perspektywy

Transformacja może w istotny sposób wspomóc prace hodowlane. Już obecnie jest to atrakcyjna metoda badania regulacji ekspresji genów, w tym, bardzo trudnych do rozszyfrowania genów rozwojowych (25). Jej praktyczne zastosowanie jest ograniczone z różnych powodów. Jednym z nich jest zbyt niska frekwencja pędów stransformowanych lub brak regeneracji ze stransformowanego kalusa. Tymczasem, stransformowane rośliny mogą różnić się między sobą zarówno siłą ekspresji wprowadzonego genu jak i innymi cechami, co jest wynikiem przeorganizowania DNA spowodowanego wbudowaniem obcego genu. Im większa liczba pędów transgenicznych tym większa szansa na otrzymanie pędów stransformowanych prawidłowo. Regeneracja z tkanek kokulturowanych z bakteriami jest znacznie trudniejsza jak z tkanek nie kokulturowanych. Kontakt z bakteriami (szczególnie, jeśli nie są zoptymalizowane czas i koncentracja bakterii) niszczy najczęściej komórki leżące przy miejscu cięcia, które mają największy potencjał regeneracyjny. Wpływ bogatej pożywki bakteryjnej oraz wzmocniony w wyniku kokulturowania stres powodują, że rośliny tworzą przede wszystkim kalus. Trudności z regeneracją po traktowaniu bakteriami są niewielkie tylko w przypadku roślin z rodziny *Solanaceae*. Recepty na masowe produkowanie transgenicznego tytoniu (26) nie są

na ogół skuteczne dla innych roślin. Poziom ekspresji obcych genów zależy od aktywności promotorów. Skuteczność większości z nich była określona dla rośliny modelowej — tytoniu, i nie zawsze działa jednakowo silnie po włączeniu do innych genomów (An — informacja ustna). Przedmiotem dalszych badań musi być zatem efektywna regulacja genów. Genetyka molekularna powinna rozszerzyć ofertę „konstruktów” wektorowych i genów o znaczeniu użytkowym.

Następnym zagadnieniem jest przepływ informacji i dostępność „półproduktów” biotechnologicznych (sekwencji, gotowych konstruktów genetycznych, plazmidów, szczepów bakteryjnych itp.) do badań aplikacyjnych. Ich wytwarzanie jest kosztowne i nie wszędzie można i trzeba zaczynać od początku. Powszechne zainteresowanie inżynierią genetyczną i rozwój technik biologii molekularnej pozwalają przypuszczać, że ulepszanie roślin w wyniku ich transformowania będzie miało coraz większe znaczenie praktyczne.

## Literatura

1. Potrykus I., (1990), *Physiol. Plant.*, 79, 125 – 134.
2. Hooykaas P.J.J., Schilperoort R.A., (1992), *Plant Molec. Biol.*, 19, 15 – 38.
3. Sledgehammer A., Tackhammer A., (1990), *Plant Physiol.*, 92, 281 – 285.
4. Gheysen G., van Montagu M., Zambryski P., (1987), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84, 6169 – 6173.
5. Zambryski P., (1988), *Annu. Re. Genet.*, 22, 1 – 30.
6. Matzke M.A., Primig M., Trnovsky J., Matzke A.J.M., (1989), *EMBO Journal*, 8, 643 – 649.
7. Janssen B.-J., Gardner R.C., (1989), *Plant Molec. Biol.*, 14, 61 – 72.
8. Jefferson R.A., Kavanagh T.A., Bevan M.W., (1987), *EMBO Journal*, 6, 3901 – 3907.
9. Vancanneyt G., Schmidt R., O'Connor-Sanchez A., Willmitzer L., Rocha-Sosa M., (1990), *Molec. General Genetics*, 220, 245 – 250.
10. An G., (1986), *Plant Physiol.*, 81, 86 – 91.
11. Kay R., Chan A., Daly M., McPherson J., (1987), *Science*, 236, 1299 – 1302.
12. Comai L., Moran P., Maslyar D., (1990), *Plant Molec. Biol.*, 15, 373 – 381.
13. Offringa R., van den Elzen P.J.M., Hooykaas P.J.J., (1992), *Transgenic Res.*, 1, 114 – 123.
14. Rogers S.G., Horsch R.B., Fraley R.T., (1986), *Methods in Enzymol.*, 118, 627 – 640.
15. Stachel S.E., Messens E., van Montagu M., Zambryski P., (1985), *Nature*, 318, 624 – 629.
16. Sheikholeslam S.N., Weeks D.P., (1987), *Plant Molec. Biol.*, 8, 291 – 298.
17. Van Wordragen, Dons H.J.M., (1992), *Plant Molec. Biol. Rep.*, 10, 12 – 36.
18. DeBlock M., (1988), *Theor. Appl. Genet.*, 76, 767 – 774.
19. Schmidt R., Willmitzer L., (1988), *Plant Cell Reports* 7, 583 – 586.
20. Catlin D.W., (1990), *Plant Cell Rep.*, 9, 285 – 288.
21. Weising K., Schell J., Kahl G., (1988), *Annu. Rev. Genet.*, 22, 421 – 427.
22. Oste Ch., (1988), *BioTechniques*, 6, 162 – 167.
23. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T., (1989), *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, sec.ed., Cold Spring Harbor La. Press.
24. Malepszy S., (1992), *Biotechnologia*, 2, (17), 44 – 55.
25. Walden R., Schell J., (1991), *In Vitro Cell. Dev. Biol.*, 27P, 1 – 10.

26. Burow M.D., Chlan C.A., Sen P., Lisca A., Murai N., (1990), *Plant Molec. Biol. Rep.*, 124 – 139.
27. Bayley C., Trolinder N., Ray C., Morgan M., Quisenberry J.E., Ow D.W., (1992), *Theor. Appl. Genet.*, 83, 645 – 649.
28. Brasileiro A.C.M., Tourneur C., Leple J.-C., Combes V., Jouanin L., (1992), *Transgenic Res.* 1, 133 – 141.
29. Brar D.S., Uchimiya H., (1990), *Plant Tissue Culture: Applications and Limitations*, Ed. Bhojwani S.S., Elsevier, 346 – 365.
30. Cheng J., Bolyard M.G., Saxena R.C., Sticklen M.B., (1992), *Plant Science*, 81, 83 – 91.
31. Laimer M., Machado A.C., Hanzer V., Weiss H., Regner F., Steinkellner H., Matanovich D., Plail R., Knapp E., Kalthoff B., Katinger H., (1992), *Plant Cell Reports*, 11, 25 – 29.
32. Rugini E., Pellegrineschi A., Mencuccini M., Mariotti D., (1991), *Plant Cell Reports*, 10, 291 – 295.
33. Walden R., (1990), *Genetic Transformation in Plants*, 25 – 48, Milton Keynes: Open University Press.

### Transformation of plants using *Agrobacterium tumefaciens*

#### Summary

*Agrobacterium* — mediated introduction of genes into plant cells is reviewed in the following topics: a mechanism of genetic colonization of plants, expression of T-DNA genes in plants, factors controlling production of transgenic plants, evaluation of transformation, using transformation for plant improvement.

#### Key words:

transformation, *Agrobacterium tumefaciens*, plant improvement.

#### Adres dla korespondencji:

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