

ARABIDOPSIS THALIANA **METODY GENETYCZNEJ TRANSFORMACJI***

ARABIDOPSIS THALIANA METHODS OF GENETIC TRANSFORMATION

Aneta WIKTOREK-SMAGUR¹, Katarzyna HNATUSZKO-KONKA²,
Aneta GERSZBERG², Piotr ŁUCHNIAK², Andrzej K. KONONOWICZ²

¹Instytut Medycyny Pracy oraz ²Katedra Genetyki Ogólnej,
Biologii Molekularnej i Biotechnologii Roślin, Uniwersytet Łódzki, Łódź

Streszczenie: Od wielu lat rzodkiewnik pospolity (*Arabidopsis thaliana*) wykorzystywany jest jako roślina modelowa. Znalazł on szerokie zastosowanie w biologii molekularnej, genetyce i fizjologii roślin. Ważnym przełomem w metodologii genetycznej transformacji roślin było wykazanie w przypadku *Arabidopsis thaliana* możliwości uzyskania transgeniczných roślin bez konieczności stosowania kultur *in vitro*. Metoda transformacji *in planta* została opisana ponad 20 lat temu. W niniejszej pracy przedstawiono zmiany, jakich dokonano w procedurze genetycznej transformacji *Arabidopsis* na przestrzeni ostatnich lat.

Słowa kluczowe: *Arabidopsis thaliana*, kultury *in vitro*, floral dip, infiltracja próżniowa.

Summary: For many years, a small flowering plant *Arabidopsis thaliana* is the most thoroughly studied model organism in plant biology. It has become a major model system for investigating plant molecular, genetic and biochemical processes. A plant transformation method that does not require the use of tissue culture and plant regeneration would greatly reduce the time necessary to produce transgenic plants, and this kind of method was described as *in planta* transformation almost 20 years ago. Here, we present the development of *in planta* transformation methodology in recent years.

Key words: *Arabidopsis thaliana*, *in vitro* culture, floral dip, vacuum infiltration.

WSTĘP

W genetyce i biotechnologii roślin wykorzystywane są zarówno ważne gospodarczo gatunki uprawne, jak również rośliny modelowe, nieprzedstawiające walorów użytkowych, jednakże mające cenne w naukach eksperymentalnych cechy. Jedną

*Praca finansowana z grantów UŁ nr 505/0397 i 506/0996.

z gatunków roślin modelowych jest pospolity chwast, rzodkiewnik pospolity (*Arabidopsis thaliana* L. Heynh.). Znany jest on botanikom od ponad czterech wieków, a w badaniach laboratoryjnych wykorzystywany jest od blisko 100 lat. Po raz pierwszy został opisany w 1577 roku przez niemieckiego lekarza Johannensa Thala, jako *Pilosella siliquosa minor* [30]. W ciągu następnych stuleci był znany pod ponad 30 różnymi nazwami. W 1753 roku Karol Linneusz dokonał dokładniejszej charakterystyki gatunku pod nazwą *Arabis thaliana*. Obecną nazwę, po raz pierwszy podali w 1842 roku w czasopiśmie *Flora Sachsoniae* Holi i Hynhold [35].

Arabidopsis thaliana jest pospolitą i dobrze poznaną rośliną należącą do rodziny *Brassicaceae* (*Cruciferae*). Rodzina to obejmuje około 340 rodzajów i przeszło trzy tysiące gatunków, w tym liczne ważne rośliny uprawne. Cechami właściwymi dla niej są przede wszystkim: budowa kwiatu złożonego z czterech okółków, z czterema dłuższymi i dwoma krótszymi pręcikami; owoc charakterystycznie pękający dwoma kłapami i mający tzw. przegrodę fałszywą, zwany łuszczyną lub łuszczynką oraz występowanie oleju gorczycznego.

Rodzaj *Arabidopsis* obejmuje 27 gatunków pochodzących głównie z centralnej Azji. Naturalne populacje *A. thaliana* występują również w Europie i w Ameryce Północnej. W związku z dużym zasięgiem geograficznym i ekologicznym, wśród roślin różnych populacji występuje duża zmienność genetyczna. Zmienność ta dotyczy głównie takich cech, jak: wrażliwość na niskie temperatury i długość dnia czy czas kwitnienia [1]. Zgromadzone w kolekcjach rośliny z różnych dzikich populacji wykorzystywano najpierw do badań nad wernalizacją, fotoperiodyzmem i kwitnieniem oraz innymi fizjologicznymi i molekularnymi podstawami rozwoju, a następnie w badaniach genetycznych i molekularnych. Linie *Arabidopsis* używane w laboratoriach pochodzą z nasion „dzikich” roślin rozmnażanych przez wiele pokoleń i obecnie stanowią dobrze scharakteryzowane linie homozygotyczne. Najpowszechniej wykorzystywanymi liniami są *Columbia wild-type* i *Landsberg erecta*. Obie te linie były wyselekcjonowane z ekotypu Landsberg w kolekcji Laibacha [35].

Większość ekotypów *A. thaliana* to rośliny jednoroczne, ozime. Nasiona ich kiełkują jesienią, zimą pozostają w stadium rozety, a wiosną, przy odpowiedniej ilości światła przechodzą w fazę rozwoju generatywnego. Rozwój rośliny i czas kwitnienia zależy od genotypu, a także od warunków hodowli. Niedobór substancji odżywczych powoduje szybkie zakwitanie, krótką fazę generatywną oraz produkcję niewielkiej liczby nasion. *Arabidopsis* szybko zakwita w warunkach dnia długiego lub ciągłego oświetlenia. Krótki dzień i niska temperatura wydłużają fazę wegetatywną i znacznie opóźniają kwitnienie [34].

Dojrzała roślina *A. thaliana* ma rozetę małych liści i pęd główny zakończony kwiatostanem. U starszych roślin z rozety wyrastają pędy drugorzędowe i wytwarzane są odgałęzienia pędu głównego. Kwiatostany poszczególnych pędów zawierają kwiaty w różnych stadiach rozwojowych, młodsze na szczycie, a starsze u podstawy. Pojedynczy kwiat ma około 3 mm długości i 1 mm średnicy. Kwiat typowy dla *Brassicaceae* składa się z czterech okółków; czterech działek kielicha, czterech białych płatków korony, sześciu pręcików, czterech długich i dwóch krótkich, słupka

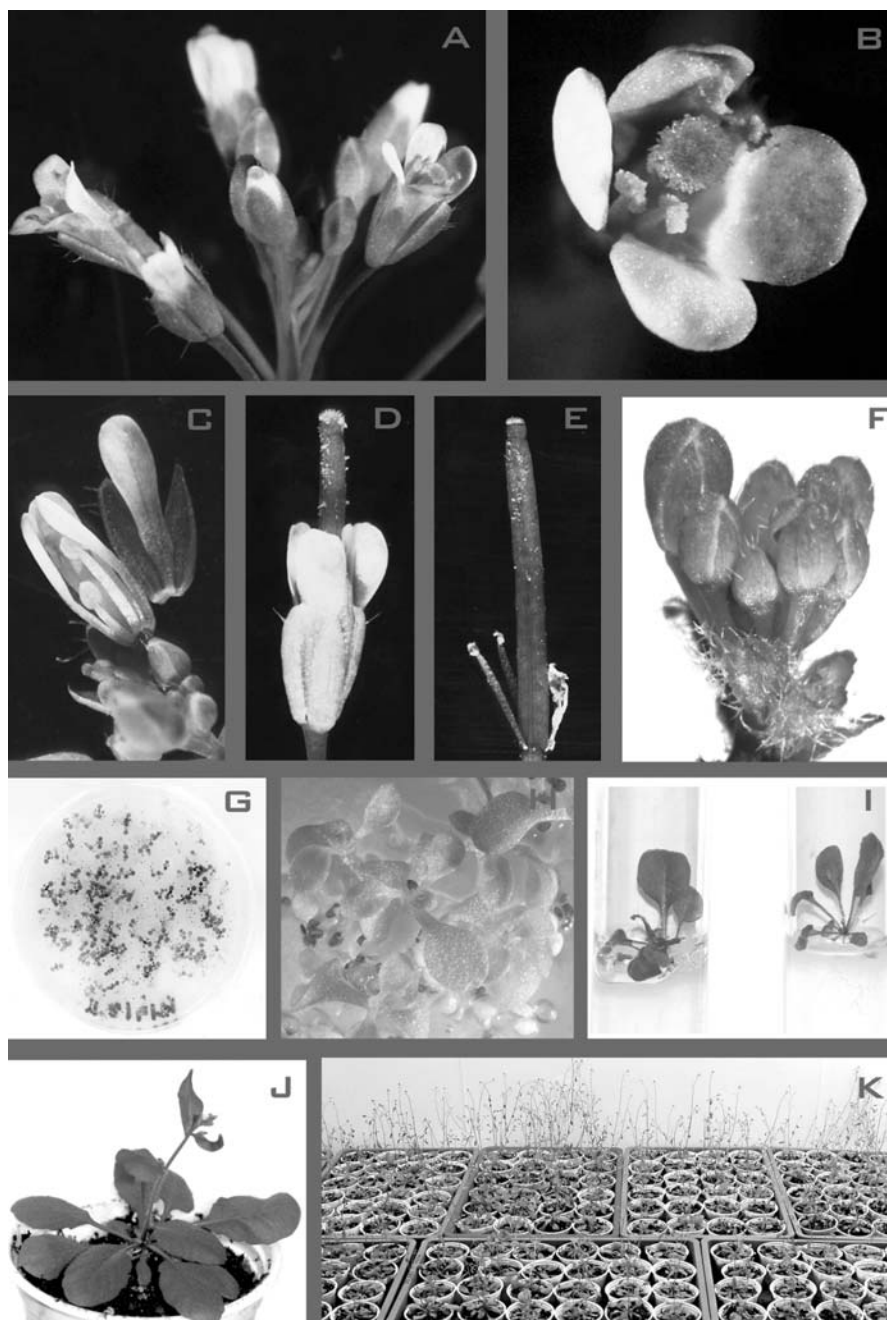
zbudowanego z dwóch owocolistków (ryc. 1A-E). Kwiaty są na ogół samopylne – stwierdzono bardzo niski procent obcopolności (około 10^{-4}), dzięki czemu łatwo jest utrzymać czyste linie. *Arabidopsis* może być jednak łatwo krzyżowana po uprzednim usunięciu pylników lub z wykorzystaniem linii męskosterylnych. Po zapyleeniu załącznia wydłuża się i rozwija w owoc typu łuszczyzny. Powstałe nasiona są bardzo małe – mają około 0,5 mm długości i ważą 20–30 µg. Dojrzałe nasiona, przechowywane w suchym i chłodnym miejscu, przez wiele lat nie tracą zdolności kiełkowania [34].

Od wielu lat *A. thaliana* wykorzystywana jest jako roślina modelowa w genetyce roślin wyższych [1, 11, 17, 26, 34, 36, 37, 44]. Podstawą wykorzystania *Arabidopsis* jako organizmu modelowego w genetyce są niewielkie rozmiary zsekwencjonowanego już genomu tej rośliny, rzodkiewnik pospolity ma ponadto także inne zalety: jest rośliną tanią i mało wymagającą w hodowli, a jej cykl rozwojowy zamyka się w 6–8 tygodniach. Cechy te czynią ją wyjątkowo dogodnym organizmem modelem w biologii molekularnej, genetyce i fizjologii roślin [5, 33].

METODY GENETYCZNEJ TRANSFORMACJI *ARABIDOPSIS THALIANA*

Dzięki inżynierii genetycznej opracowano molekularne techniki uzyskiwania genetycznie zmodyfikowanych odmian roślin całkowicie odmienne od metod klasycznych, takich jak np. tradycyjne krzyżowanie. Większość komórek roślinnych ma właściwość totipotencji, to znaczy ma zdolność do zróżnicowania się w dowolny typ komórki, aż do utworzenia (zregenerowania) dorosłego osobnika. Ta właściwość czyni z roślin niezwykle podatny system dla modyfikacji genetycznych. Znaczny postęp w dziedzinie genetyki i biologii molekularnej umożliwił konstruowanie organizmów o zmodyfikowanym zasobie informacji genetycznej [31, 38]. Wśród nich istotną rolę odgrywają rośliny transgeniczne. Obecne techniki inżynierii genetycznej pozwalają na kontrolowaną modyfikację genomów wielu gatunków roślin. Należy podkreślić, że techniki transformacji mają istotny wpływ zarówno na ekspresję transgenów, jak również na potencjalne zagrożenie, jakie może stanowić dla człowieka i przyrody wprowadzony do środowiska materiał genetyczny. Przy wykorzystaniu technik inżynierii genetycznej otrzymano nowe odmiany roślin charakteryzujące się zwiększoną odpornością na roślinożerne owady, odporne na infekcje patogenów czy na herbicydy, a także odmiany wykorzystywane jako bioreaktory do produkcji rekombinowanych białek [27].

W przypadku roślin u podłoża wprowadzania obcych genów leży złożony proces transformacji genetycznej. Wykorzystuje on konstrukcje genowe zdolne do integracji z genomem gospodarza i nadające mu określone nowe, unikalne cechy [22, 23, 24]. Obecnie istnieje kilkanaście metod transformacji genetycznej roślin, a o wyborze metody bardzo często decyduje wzór oraz wydajność ekspresji genu przeniesionego do rośliny biorcy. Każda z metod ma swoje wady i zalety. Część spośród nich jest rzadko stosowanych ze względu na ich pracochłonność i niską wydajność.



RYCINA 1. Główne etapy transformacji *A. thaliana* metodami *floral dip* i *vacuum infiltration*: A–E – budowa kwiatu *A. thaliana*, F – stadia rozwojowe pąków użytych do transformacji roślin, G–K – uprawa transgeniczných roślin *Arabidopsis*

FIGURE 1. Major stages of transformation of *A. thaliana* using floral dip and vacuum infiltration methods: A–E – structure of *A. thaliana* flower, F – developmental stages of floral buds used for plant transformation, G–K – cultivation of transgenic *Arabidopsis* plants

Do transformacji, integracji i ekspresji obcych genów w roślinach używanych jest wiele wektorów plazmidowych. Najczęściej obecnie wykorzystywaną techniką transformacji roślin jest transformacja za pośrednictwem *Agrobacterium tumefaciens* z wykorzystaniem zmodyfikowanych wektorów plazmidowych [20, 23, 24, 28]. W większości obecnie stosowanych metod genetycznej transformacji roślin istnieje konieczność stosowania technologii kultur *in vitro*. Proces regeneracji rośliny przeprowadza się w drodze bezpośredniej lub pośredniej organogenezy lub somatycznej embriogenezy. Procedury te są czasochłonne, pracochłonne, a niejednokrotnie także kosztowne [29]. Ponadto, pomimo już blisko 90-letniej historii roślinnych kultur *in vitro*, nie dla wszystkich gatunków o znaczeniu użytkowym udało się opracować efektywne procedury regeneracji *in vitro*, o wysokim stopniu powtarzalności. Jedną z „bolączek” metod regeneracji roślin na skalę ponadlaboratoryjną, często utrudniającą proces komercjalizacji, jest spontaniczna zmienność (niestabilność) materiału hodowlanego: w populacjach regenerowanych roślin pojawiają się osobniki o cechach innych niż w wyjściowym materiale roślinnym. Zjawisko to spowodowane tzw. zmiennością somaklonalną, dotyczy zwłaszcza embriogenezy pośredniej, prowadzonej przez stadium kalusa. Pod względem genetycznym kalus jest tkanką niestabilną: występują w nim zmiany zarówno liczby chromosomów, jak i ich zmiany strukturalne. Liczba chromosomów zwiększa się najczęściej w drodze endomitotycznej replikacji DNA, aneuploidyzacji lub poliploidyzacji. Analizy cytologiczne kalusa oraz roślin zregenerowanych z kalusa wskazują znacznie większą niż w naturze częstość występowania komórek poliploidalnych i aneuploidalnych, pęknięć chromosomów, związanych głównie z regionami heterochromatynowymi, a w konsekwencji powstawania różnych rodzajów aberracji chromosomowych. W długoterminowej kulturze kalusa niektórych gatunków roślin obserwuje się również eliminację chromatyny z jądra komórkowego i tworzenie się mikrojąder, somatyczny *crossing-over*, fuzje chromatyd i chromosomów [32].

Idealny system transformacji powinien być zatem oparty na technologii dostarczania DNA, która jest prosta, wydajna i tania. Ten proces powinien pozwalać na efektywne wprowadzenie transgenu do genomu rośliny gospodarza. Stale dokonywana optymalizacja technik transformacji sprowadza się, między innymi, do opracowania precyzyjnej, wydajnej i gwarantującej uzyskanie właściwego efektu (przy zachowaniu maksymalnego bezpieczeństwa) procedury. Wybór metody uzależniony jest od celu, możliwości technicznych, docelowego gatunku, a wreszcie – wprowadzanego transgenu/cechy.

Metodykę transformacji poszczególnych gatunków roślin dostosowuje się do ich indywidualnych cech. Ważnym przełomem w metodologii genetycznej transformacji *A. thaliana* było wykazanie możliwości uzyskania transgenicznych roślin bez konieczności stosowania kultur *in vitro*. Transformacja *Arabidopsis* za pośrednictwem *Agrobacterium* była jeszcze do niedawna trudna, pomimo że roślina ta jest bardzo podatna na wszelkiego rodzaju manipulacje. Alternatywą dla procedur transformacji wymagających regeneracji roślin *in vitro* była zaproponowana w 1987 roku przez Feldmana i Marksa [18] metoda transformacji *in planta*. Technika ta

opierała się na „zasysaniu” ze środowiska komórek *Agrobacterium tumefaciens* do wnętrza nasion *Arabidopsis thaliana* w fazie ich uwadniania (pęcznienia) lub w bardzo wczesnych stadiach kiełkowania. Pomimo niskiej powtarzalności (nawet przy zachowaniu ostrego reżimu postępowania) na przestrzeni kilku lat, w licznych pracowniach naukowych uzyskano dużą liczbę transformantów, a procedura ta znalazła szerokie zastosowanie w badaniach nad mutagenezą T-DNA [3, 16, 29].

W 1994 roku Chang i wsp. [12] zaproponowali nową procedurę poddawania transformacji całych roślin. Polegała ona na odcinaniu młodych kwiatostanów a następnie inokulowaniu roślin w miejscu zranienia zawiesiną komórek *Agrobacterium*. Zaletą tej metody jest pominięcie etapu kultur *in vitro*, przez co uniknięcie zmienności somaklonalnej oraz zredukowanie do zaledwie kilku tygodni czasu potrzebnego do uzyskania transgeniczných osobników. Metoda transformacji *in planta* używana była w wielu laboratoriach, jednak różnice w jej wydajności występowały nie tylko pomiędzy laboratoriami, ale także w zależności od eksperymentu, w obrębie tej samej pracowni [29].

Przełomowym etapem w transformacji *Arabidopsis* był rok 1993. Wtedy to Bechtold i wsp. [5] zaproponowali nową metodę transformacji wykorzystującą próżniową infiltrację roślin. Metoda ta była prosta i szybka, nie wymagała wyrafinowanej technicznie aparatury oraz co najważniejsze – wydajność takiej transformacji była znacznie wyższa w porównaniu z wcześniejszymi metodami transformacji. Metoda ta polegała na zanurzaniu całych roślin *Arabidopsis* uprawianych w kulturach doniczkowych w zawieszynie *Agrobacterium* w warunkach podciśnienia. Po przeprowadzeniu wspomaganej infiltracją próżniową inokulacji uprawa transformowanych w ten sposób roślin była kontynuowana aż do uzyskania nasion. Te po osuszeniu i wernalizacji poddawano selekcji przeprowadzając ich kiełkowanie na podłożu selekcyjnym z dodatkiem odpowiedniego antybiotyku. W przypadku tej metody wydajność transformacji wahała się w przedziale od 0,25 do 0,35% [5].

Kolejne lata przyniosły następne modyfikacje metody. Inokulacji zaczęto poddawać nie całe rośliny, a jedynie znajdujące się na szczycie rozety zawiazki pędów kwiatowych. Czynność tę przeprowadzano w eksykatorze próżniowym, w warunkach podciśnienia. Ostateczną modyfikację zaproponowali Clough i Bent [13]. Polega ona na zanurzaniu pąków kwiatowych w zawieszynie *Agrobacterium* z dodatkiem niewielkiej ilości surfaktanta Silwet L 77, który ułatwia bakteriom penetrację przestrzeni międzykomórkowych. Po przeprowadzeniu agroinfekcji i 24-godzinnej kokultury z *Agrobacterium*, doniczkową hodowlę roślin kontynuuje się aż do końcowego stadium cyklu rozwojowego – wydania nasion. Identyfikację i selekcję transformantów przeprowadza się wysiewając nasiona na pożywcę selekcyjnej (ryc. 1F-K) [9]. W 2000 roku Chung i wsp. [12] zaproponowali nową metodę transformacji, polegającą na spryskiwaniu kwiatostanów *Arabidopsis* zawiesiną komórek *Agrobacterium tumefaciens*. Obecnie do transformacji genetycznej *Arabidopsis thaliana* najczęściej używane są metody infiltracji próżniowej (ang. *vacuum infiltration*) i zanurzania pąków kwiatowych (ang. *floral dip*) [19, 25, 46, 49].

CZYNNIKI WPLYWAJĄCE NA WYDAJNOŚĆ TRANSFORMACJI

Najważniejszymi czynnikami, które mają wpływ na powodzenie transformacji metodą infiltracji próżniowej, to skład pożywki inokulacyjnej i czas aplikacji podciśnienia. Jednak "efekt próżniowy" jest ograniczony czasowo, inaczej mówiąc penetracja tkanek przez bakterie zachodzi tylko w warunkach podciśnienia. Przedłużanie tego etapu procedury ma negatywny wpływ na wigor i przeżywalność komórek.

Wyniki uzyskane przez Clougha i Benta [13] pokazały, że najważniejszymi czynnikami mającymi wpływ na powodzenie transformacji są stężenie sacharozy i surfaktantu w mieszaninie inokulacyjnej. Działanie surfaktantu jest stosunkowo długotrwałe, co zdecydowanie wydłuża czas penetracji *Agrobacterium*, a efekt obniżenia napięcia powierzchniowego utrzymuje się nawet do kilkudziesięciu godzin [10].

W obydwu opisanych powyżej metodach krytycznym punktem transformacji jest inokulacja roślin zawieszoną bakterii we właściwym stadium rozwoju kwiatostanów [49]. Bechtold i wsp. [5] uzyskiwali najwyższą wydajność transformacji, kiedy kwiatostany *Arabidopsis* miały wiele nie otwartych jeszcze pąków kwiatowych. Podobnie wyniki uzyskali Clough i Bent [13]. W celu otrzymania dużej liczby kwiatostanów i w ten sposób zwiększenia wydajności transformacji Ye i wsp. [47] zaproponowali usunięcie pierwszego pędu kwiatostanowego.

KOMÓRKI DOCELOWE

Punktem zwrotnym w rozwoju metodologii transformacji *A. thaliana in planta* było zidentyfikowanie tkanek docelowych dla T-DNA. Bechtold i wsp. [6] uważa, że okres, w którym transfer T-DNA ma miejsce, występuje w późnym stadium rozwoju rośliny i dotyczy komórek jednej linii zarodkowej (męskiej lub żeńskiej), komórki jajowej przed jej pierwszym podziałem lub bardzo wczesnego etapu rozwoju zarodkowego [6, 8 16].

Transformacja komórek szlaku generatywnego jest wspólną cechą omawianych metod transformacji. Obie metody pozwalają na pominięcie etapu kultur *in vitro* i regeneracji roślin po infiltracji próżniowej lub przez zanurzanie pąków kwiatowych. W przypadku tych metod wzrost i rozwój roślin poddanych infekcji kontynuowany jest bez selekcji, a identyfikację transgeniczných osobników przeprowadza się dopiero podczas kiełkowania nasion w warunkach presji selekcyjnej. Transformanty pokolenia T₀ są hemizygotami przenoszącymi T-DNA [6, 16].

Sugerowano, że obecność T-DNA na tylko jednym z dwóch chromosomów homologicznych świadczy o tym, że transfer i integracja transgeny zachodzi w późnym stadium rozwoju kwiatu po rozdzieleniu męskich i żeńskich linii zarodkowych. Założenie to uzasadniano tym, że *Arabidopsis* jest rośliną samopylną i gdyby transformacja zachodziła wcześniej, przed rozdzieleniem linii zarodkowych męskiej i żeńskiej, to w konsekwencji samozapylenia powstawałyby homozygotyczne transformanty. Wykazano, że pierwotne transformanty niosą transgen we wszystkich

komórkach, tkankach rośliny, co sugeruje, że transformacja zachodzi przed podziałami zapłodnionej komórki jajowej (zygotie), która daje początek zarodkowi. Inni badacze sugerowali, że podczas transformacji przez zwykłe zanurzenie kwiatów w roztworze z *Agro-bacterium* eksponowane są pylniki oraz pyłek, podczas gdy komórki jajowe nie, co wskazywałoby, że to komórki męskiej linii byłyby raczej celem transformacji.

Późniejsze badania dowiodły jednak, że pierwotnym obiektem transformacji *Arabidopsis* metodą zanurzania pąków kwiatowych lub infiltracji próżniowej są komórki żeńskiej linii zarodkowej [6, 16, 46]. Powstaje jednak pytanie: jeśli transformacja zachodzi w komórkach żeńskiej linii zarodkowej, to w jaki sposób *Agrobacterium* uzyskuje dostęp do komórki jajowej, która rozwija się w zamkniętych, wydawałoby się zalążniach. Okazuje się, że u *Arabidopsis* zalążnie nie zawsze są zamknięte. Zalążnia rozwija się jak pierścień, który różnicuje się z komórek merystemu kwiatowego, a następnie rozszerza, by ukształtować otwartą strukturę wazy – odbywa się to w późnych stadiach rozwojowych kwiatu. Trzy dni przed powstaniem kwiatu w części szczytowej słupka na szczycie „wazy” formowane jest znamię słupka. Wykazano, że transformanty były otrzymywane wówczas, gdy całe kwiaty inokulowano *Agrobacterium* pomiędzy piątym a dziesiątym dniem przed uformowaniem kwiatu w czasie, kiedy słupek jest „otwarty”.

Wydaje się, że bakterie mogą też wykorzystywać „kanał” łagiewki pyłkowej, by tą drogą dostać się do zalążni i dokonać transferu T-DNA do komórki jajowej – w podobny sposób do komórki jajowej dostaje się plemnik. Po delikatnym zanurzeniu niedojrzałych pąków kwiatowych w roztworze bakterii, podczas inkubacji w warunkach dostatecznej wilgotności, kielkująca łagiewka pyłkowa przenosi *Agrobacterium* ze znamienia słupka w dół do zalążków. Wzrost łagiewki pyłkowej jest związany z aktywnością enzymatyczną prowadzącą do degradacji m.in. ścian komórkowych. Ponadto substancje powstające podczas wzrostu łagiewki mogą pełnić rolę stymulatorów genów *vir* i w ten sposób sprzyjać transferowi T-DNA. Pewnym potwierdzeniem dla tej hipotezy jest fakt, że nie otrzymano transformantów z kwiatów, które w czasie inokulacji znajdowały się w stadium już rozwiniętym. Z drugiej strony, Bechtold i wsp. [6, 8] donosili, że transgeniczne rośliny można uzyskać także po inokulacji kwiatów znajdujących się w stosunkowo zaawansowanych stadiach rozwojowych, aczkolwiek częstotliwość transformacji jest niska. Jedno nie ulega wątpliwości, warunkiem wysokiej wydajności transformacji *Arabidopsis* jest dotarcie *Agrobacterium* w bezpośrednie sąsiedztwo zalążni i wnikięcie do jej wnętrza we wczesnych stadiach rozwoju kwiatu [6, 7, 16].

ZASTOSOWANIE METODY TRANSFORMACJI GENETYCZNEJ IN PLANTA W ODNIESIENIU DO INNYCH GATUNKÓW ROŚLIN

Wykorzystując metodę *in planta* uzyskano transgeniczne rośliny: *Medicago truncatula* [43], *Petunia hybryda* [42], *Brassica rapa* L. ssp. *chinensis* [40], *Brassica napus* [45], *Arabidopsis laciocarpa* [41]. Ponadto w 2001 roku Curtis

i Nam [14, 15] uzyskali transgeniczne rośliny rzodkiewki (*Raphanus sativus* L. *longipinnatus* Bailey). W przypadku infiltracji próżniowej zastosowanej do uzyskania transgenicznych roślin *Petunia* hybryda uzyskano od 7 do 9% wydajności transformacji. Polegała ona na inokulacji *Agrobacterium* pręcików bądź znamienia słupka [42]. Dla *Brassica rapa* oraz *Brassica napus* zastosowano wydłużony czas infiltracji próżniowej i uzyskano wydajność transformacji podobną do wyników otrzymanych przez Bechtolda i wsp. w 1993 (0,3%) [40, 45]. Tague w 2001 [41] uzyskał transgeniczne rośliny *Arabidopsis lasiocarpa* przy wykorzystaniu metody zarówno infiltracji próżniowej, jak i zanurzania pąków kwiatowych. Uzyskano 0,7% wydajność transformacji, przy niewielkiej modyfikacji wymienionych metod. Curtis i Nam [14] wykorzystali metodę zanurzania pąków kwiatowych do uzyskania transgenicznych roślin *Raphanus sativus* L. *longipinnatus* Bailey. Autorzy analizowali wpływ obecności różnych surfaktantów w pożywce inokulacyjnej, uzyskując wydajność transformacji pomiędzy 0,1–1,4%. Bartholmes i wsp. [4] wykorzystując metodę zanurzania pąków kwiatowych uzyskali transgeniczne rośliny *Capsella bursa-pastoris*. Najwyższą wydajność transformacji (0,4%) uzyskali stosując szczep *Agrobacterium tumefaciens* GV3101, 10% sacharozę oraz 0,05% Silwet L-77.

Kolejnym przełomem w transformacji genetycznej okazał się rok 2008, kiedy to uzyskano transgeniczne rośliny *Triticum aestivum* L. przy 5% wydajności transformacji. W tym przypadku metoda *in planta* okazała się o wiele skuteczniejsza od rutynowo stosowanej metody z użyciem karabinka genetycznego [2, 39].

Podsumowując, metoda *in planta* znajduje obecnie szerokie zastosowanie w transformacji genetycznej *Arabidopsis*. Szczegółowe badania nad tą metodą przyczyniły się do lepszego zrozumienia procesu transformacji, a tym samym otworzyły możliwości genetycznej transformacji innych gatunków roślin, nawet tych niespokrewnionych z *Arabidopsis* i należących do rodziny *Brassicaceae*.

LITERATURA

- [1] ALONSO-BLANCO C, KOORNNEEF M. Naturally occurring variation in *Arabidopsis*: an under-exploited resource for plant genetics. *Trends in Plant Science* 2000; **5**: 22–29.
- [2] AGARVAL S, LOAR S, STEBER C, ZALE J. Floral transformation of wheat. *Methods in Molecular Biology* 2009; **478**: 105–113.
- [3] APIROZ-LEECHAN R, FELDMAN KA. T-DNA insertion mutagenesis in *Arabidopsis*: going back and forth. *Trends in Genetics* 1997; **13**: 152–156.
- [4] BARTHOLMES C, NUTT P, THEIBEN G. Germline transformation of Shepherd's purse (*Capsella bursa-pastoris*) by the 'floral dip' method as a tool for evolutionary and developmental biology. *Gene* 2008; **409**: 11–19.
- [5] BECHTOLD D, ELLIS J, PELLETIER G. In planta *Agrobacterium*-mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants. *Comptes Rendus de l'Academie des Sciences, Serie III: Sciences de la Vie* 1993; **316**: 1194–1199.
- [6] BECHTOLD N, JAUDEAU B, JOLIVET S, MABA B, VEZON D, VOISIN R, PELLETIER G. The maternal chromosome set is the target of the T-DNA in the in planta transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* 2000; **155**: 1875–1887.

- [7] BECHTOLD N, JOLIVET S, VOISIN R, PELLETIER G. The endosperm and the embryo of *Arabidopsis thaliana* are the independently transformed through infiltration by *Agrobacterium tumefaciens*. *Transgenic Research* 2003; **12**: 509–517.
- [8] BENT AF. *Arabidopsis* in Planta Transformation. Uses, Mechanisms and Prospect for Transformation of Other Species. *Plant Physiology* 2000; **124**: 1540–1547.
- [9] BENT AF. *Arabidopsis thaliana* floral dip transformation method. *Methods in Molecular Biology* 2006; **343**: 87–103.
- [10] BEVAN M, WALSH S. Positioning *Arabidopsis* in plant biology. A key step toward unification of plant research. *Plant Physiology* 2004; **135**: 602–606.
- [11] CHANG SS, PARK SK, KIM BC, KANG BJ, KIM DU. Stable genetic transformation of *Arabidopsis thaliana* by *Agrobacterium* inoculation in planta. *Plant J* 1994; **5**: 551–558.
- [12] CHUNG MH, CHEN MK, PAN SM. Floral spray transformation can efficiently generate *Arabidopsis* transgenic plants. *Transgenic Research* 2000; **9**: 471–476.
- [13] CLOUGH SJ, BENT AF. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 1998; **16**: 735–743.
- [14] CURTIS IS, NAM HG. Transgenic radish (*Raphanus sativus* L. *Longipinnatus* Bailey) by floral-dip method – plant development and surfactant are important in optimizing transformation efficiency. *Transgenic Research* 2001; **10**: 363–371.
- [15] CURTIS IS. Production of transgenic crops by the floral-dip method. *Methods in Molecular Biology* 2005; **286**: 103–110.
- [16] DESFEUX C, CLOUGH SJ, BENT AF. Female reproductive tissues are the primary target of *Agrobacterium* – mediated transformation by the *Arabidopsis* floral-dip method. *Plant Physiology* 2000; **123**: 895–904.
- [17] FEDERSPIEL N. Deciphering a weed. Genomic sequencing of *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 2000; **124**: 1456–1459.
- [18] FELDMAN KA, MARKS MD. *Agrobacterium* mediated transformation of germinating seeds of *Arabidopsis thaliana*: a non-tissue culture approach. *Molecular and General Genetics* 1987; **208**: 1–9.
- [19] FUKUSAKI EI, IKEDA T, SUZUMURA D, KOBAYASHI A. A facile transformation of *Arabidopsis thaliana* using ceramic supported propagation system. *J Biomedicine and Biotechnology* 2003; **5**: 503–505.
- [20] FRANKEN E, TEUSCHEL U, HAIN R. Recombinant proteins from transgenic plants. *Current Opinion in Biotechnology* 1997; **8**: 411–416.
- [21] GANDI R, MAHESHWARI SC, KHURANA JP, KHURANA P. Genetic and molecular analysis of *Arabidopsis thaliana* (ecotype 'estland') transformed with *Agrobacterium*. *In Vitro Cellular and Developmental Biology* 2001; **37**: 629–637.
- [22] GE X, WANG H, CAO K. Transformation by T-DNA integration causes highly sterile phenotype independent of transgenes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Reports* 2008; **27**: 1341–1348.
- [23] GELWIN SB. *Agrobacterium*-mediated plant transformation: The biology behind the „gene-jockeying” tool. *Microbiology and Molecular Biology Review* 2003; **67**: 16–37.
- [24] GELWIN SB. Improving plant genetic engineering manipulating the host. *Trends in Biotechnology* 2003; **21**: 95–98.
- [25] GRABOWSKA A, FILIPECKI M. Infiltration with *Agrobacterium* – the method for stable transformation avoiding tissue culture. *Acta Physiologiae Plantarum* 2004; **26**: 451–458.
- [26] HAYS JB. *Arabidopsis thaliana*, a versatile model system for study of eukaryotic genome-maintenance functions. *DNA Repair* 2002; **64**: 1–22.
- [27] HERREERA-ESTRELLA W, SIMPSON J, MARTINEZ-TRUJILLO M. Transgenic plants: an historical perspective. *Methods in Molecular Biology* 2005; **286**: 3–32.
- [28] HWANG HH, MYSORE KS, GELVIN ST. Transgenic *Arabidopsis* plants expressing *Agrobacterium tumefaciens* Vir D2 protein are less susceptible to *Agrobacterium* transformation. *Molecular Plant Pathology* 2006; **7**: 473–484.
- [29] KATAVIC V, HAUGHN GW, REED D, MARTIN M, KUNST L. In planta transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Molecular and Gen Genetics* 1994; **245**: 363–370.
- [30] KONCZ C, REDEI GP. Genetic studies with *Arabidopsis*; a historical view. *Arabidopsis*. Cold Spring Harbor Laboratory Press 1994: 223–252.
- [31] KONONOWICZ AK, WIKTOREK-SMAGUR A, HNATUSZKO K. Cytochemia w biotechnologii roślin – systemy reporterowe z wykorzystaniem genów kodujących β -glukuronidazę (GUS) i zielono fluoresyujące białko (GFP). *Post Biol Kom* 2004; **31**: 137–143.

- [32] LABRAM, VANNINI C, GRASSI F, BRACALE M, BALSEMIN M, BASSO B, SALA F. Genomic stability in *Arabidopsis thaliana* transgenic plants obtained by floral dip. *Theoretical and Applied Genetics* 2004; **109**: 1512–1518.
- [33] MARTINEZ-TRUJILLO M, LIMONES-BRIONES V, CABRERA-PONCE JL, HERRERA-ESTRELLA L. Improving transformation of *Arabidopsis thaliana* by modifying the floral dip method. *Plant Molecular Biology Reporter* 2004; **22**: 63–70.
- [34] MAYEROWITZ EM. *Arabidopsis*, a useful weed. *Cell* 1989; **56**: 263–269.
- [35] MAYEROWITZ EM. Prehistory and history of *Arabidopsis* research. *Plant Physiology* 2001; **125**: 15–19.
- [36] MEINKE DW, CHERRY JM, DEAN C, ROUNSLEY SD, KOORNNEEF M. *Arabidopsis thaliana*: A model plant for genome analysis. *Science* 1998; **282**: 662–682.
- [37] MEINKE DW, MEINKE LK, MEINKE TC, SHOWALTER AM, SCHISSEL LA, MUELLER IT, TZAFRIR I. A sequence-based map of *Arabidopsis* genes with mutant phenotypes. *Plant Physiology* 2003; **131**: 409–418.
- [38] OGAWA Y, DANSAKO T, YANO K, SAKURAI N, SUZUKI H, AOKI K, NOJI M, SAITO K, SHIBATA D. Efficient and high-throughput vector construction and *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* suspension cultured cells for functional genomics. *Plant Cell Physiology* 2008; **49**: 242–250.
- [39] RISACHER T, CRAZE M, BOWDEN S, PAUL W, BARSBY T. Highly efficient *Agrobacterium*-mediated transformation of wheat via in planta inoculation. *Methods in Molecular Biology* 2009; **478**: 115–124.
- [40] QING CM, FAN L, LEI Y, BOUCHEZ D, TOURNEUR C, YAN L, ROBAGLIA C. Transformation of pakchoi (*Brassica rapa* L. ssp. *chinesis*) by *Agrobacterium* infiltration. *Molecular Breeding* 2000; **6**: 67–72.
- [41] TAGUE BW. Germ-line transformation of *Arabidopsis lasiocarpa*. *Transgenic Research* 2001; **10**: 259–267.
- [42] TJOKROKUSOMO D, HEINRICH T, WYLIE S, POTTER R, MCCOMB J. Vacuum infiltration of *Petunia hybrida* pollen with *Agrobacterium tumefaciens* to achieve plant transformation. *Plant Cell Reports* 2000; **19**: 792–797.
- [43] TRIEU AT, BURLEIGH SH, KARDAILSKY I, MALDONADO-MENDOZA IE, VERSAW WK, BLAYLOCK LA, SHIN H, HIOU TJ, KATAGI H, DEWBRE GR, WEIGEL D, HARRISON MJ. Transformation of *Medicago truncatula* via infiltration of seedlings or flowering plants with *Agrobacterium*. *Plant J* 2000; **22**: 531–541.
- [44] TZAFRIR I, DICKERMAN A, BRAZHNİK O, NGUYEN Q, MCELVER J, FRYE C, PATTON D, MEINKE D. The *Arabidopsis* seed genes project. *Nucleic Acids Research* 2003; **31**: 90–93.
- [45] WANG WC, MENON G, HANSEN G. Development of a novel *Agrobacterium*-mediated transformation method to recover transgenic *Brassica napus* plants. *Plant Cell Reports* 2003; **22**: 274–281.
- [46] WIKTOREK-SMAGURA A, HNATUSZKO K, KONONOWICZ AK. Floral bud dipping or vacuum infiltration – Two Methods of *Arabidopsis thaliana* transformation. *Russian J Plant Physiology* 2009; **56**: 560–568.
- [47] YE GN, STONE D, PANG SZ, CREELYW, GONZALEZ K, HINCHEE M. *Arabidopsis* ovule is the target for *Agrobacterium* in planta vacuum infiltration transformation. *Plant J* 1999; **19**: 249–257.
- [48] ZHANG X, HENRIGUES R, LIN SS, NIU QW, CHUA NH. *Agrobacterium* mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* using the floral dip method. *Nature Protocols* 2006; **1**: 641–646.
- [49] ZIDENGA T. Transformation by the floral dip method. *Information Systems for Biotechnology News Report* 2003; **1**: 7–8.

Dr Aneta Wiktorek-Smagur
Instytut Medycyny Pracy,
ul. Św. Teresy 8, 91-348 Łódź
e-mail: a_wiktorek@poczta.onet.pl