

Transformacja roślin za pomocą *Agrobacterium* — podstawowy model działania i czynniki na niego wpływające

Anna Nadolska-Orczyk
Zakład Kultur Tkankowych
Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin
Radzików

1. Wstęp

Stwierdzenie, że fragment T-DNA plazmidu Ti bakterii glebowej *Agrobacterium tumefaciens* może zostać przeniesiony do komórki roślinnej (1), gdzie po wbudowaniu do jądrowego DNA (2) ulega ekspresji, pozwoliło wykorzystać ten proces do wprowadzania obcego DNA do komórek roślinnych. W kolejnych pracach wykazano, że rozpoznanie T-DNA zależy od stosunkowo krótkich, 25-zasadowych sekwencji flankujących ten obszar, a DNA pomiędzy tymi sekwencjami można zastąpić tym, które ma być wprowadzone (3). Wykazano, że cechy kodowane przez zintegrowane DNA były dziedziczone według praw Mendla (4).

Za przeniesienie T-DNA odpowiedzialne są geny wirulencji. Większość z nich znajduje się w obszarze *vir* plazmidu Ti (6,7). Bardzo ważne są również geny *chw* zlokalizowane na chromosomie bakteryjnym warunkujące adsorbcję *Agrobacterium* na powierzchni komórki roślinnej (8,9) oraz indukcję regulonu *vir* (10,11). Spostrzeżenia te pozwoliły na daleko idącą modyfikację plazmidu Ti *Agrobacterium*. Doprowadziły one do skonstruowania najczęściej używanego obecnie systemu, zwanego binarnym, w którym geny *vir* znajdują się na jednym plazmidzie (tzw. pomocniczym), natomiast T-DNA na drugim (12-14). Drugi opracowany system kointegracyjny (15), jak się wydaje, ma znacznie mniejsze zastosowanie.

System transformacji pośredniej za pomocą *Agrobacterium* był jeszcze parę lat temu prawie wyłącznie stosowany w obrębie roślin dwuliściennych (16,17). Część badaczy uważała wtedy, że jednoliścienne nie ulegają transformacji przy użyciu tego systemu (18). Obecnie cieszy się coraz większym powodzeniem również w obrębie roślin jednoliściennych (19-21). Obce DNA zostało wprowadzone do stu dwudziestu różnych gatunków roślin (22). W wielu przypadkach pozostaje zatem problemem nie tyle przeprowadzenie transfor-

macji co zwiększenie jej wydajności. Umożliwi to zmniejszenie kosztów uzyskiwania transformantów i w konsekwencji pełniejsze wykorzystanie w praktyce oraz jako narzędzie badawcze w biologii (fizjologii) roślin.

2. Czynniki wpływające na transformację przy użyciu *Agrobacterium*

Zainicjowanie wieloetapowego procesu transformacji roślin, doprowadzenie do stabilnej integracji T-DNA oraz stabilnej ekspresji w genomie roślinnym jest zależne od szeregu czynników, które zostaną omówione.

2.1. Rozmnażanie *in vitro*

Większość systemów transformacji opiera się na wykorzystaniu totipotentnej komórek somatycznych lub generatywnych w procesach regeneracji *in vitro*. Wydajność z jaką takie komórki mogą ulec transformacji jest czynnikiem ograniczającym, zwłaszcza u roślin uznawanych za trudne do prowadzenia w kulturach tkankowych. W jednym z najprostszych dotychczas zastosowanych systemów transformacji za pomocą *Agrobacterium* omija się techniki kultur tkankowych. Do transformacji wykorzystano nacinanie niedojrzałych kwiatostanów *Arabidopsis thaliana* u podstawy i inokulację zawieszoną tych bakterii w miejscu zranienia (23). Jednak system ten bardzo dobrze funkcjonujący u małej, o krótkim okresie wegetacji i wydającej bardzo dużo nasion rośliny jest nieprzydatny dla innych roślin.

Do największych zalet systemów regeneracji *in vitro* roślin, które następnie mają być wykorzystane do transformacji należą:

- wysoka efektywność i reproduktywność w celu regeneracji możliwie jak największej liczby niezależnych roślin do testowania,
- wydajna selekcja, umożliwiająca podziały i różnicowanie komórek transgenicznych i otrzymywanie z nich roślin,
- krótki czas uzyskiwania roślin transgenicznych, co jednocześnie warunkuje małą zmienność somaklonalną,
- ciągła dostępność materiału roślinnego,
- zastosowanie tej techniki do szerokiego zakresu odmian,
- techniczna łatwość.

2.2. Szczep *Agrobacterium* i roślina

Wzajemna interakcja bakterii i komórki roślinnej zachodząca w czasie transformacji doprowadziła do ewolucyjnego wykształcenia mechanizmów rozpoznania komórki gospodarza przez *Agrobacterium* oraz pewnej specjalizacji poszczególnych szczepów w stosunku do różnych grup roślin. W przeprowadzanych doświadczeniach wykazuje się szerokie zróżnicowanie wrażliwości roślin na różne szczepy *Agrobacterium* (24-26). Boulton i wsp. (27)

wykazali, że szczepy *Agrobacterium*, które używają jako źródła pokarmu i energii nopalinę, agropinę i mannopinę są w stanie wywołać infekcję kukurydzy, natomiast te wykorzystujące oktopinę i kukumopinę nie są patogenne. Z przeprowadzonych badań porównawczych nad zdolnościami transformacyjnymi trzech szczepów: oktopinowego LBA4404(pAL4404), nopalinowego C58C1(pMP90) oraz L,L-sukcinamopinowego EHA105(pEHA105) u grochu uzyskano odpowiednio 1, 2,2 i 8,2 transgenicznych roślin ze 100 wyłożonych eksplantatów (28).

Klasyfikacji tumorogennych szczepów *Agrobacterium* dokonano na podstawie rodzaju opin kodowanych przez geny, które znajdowały się w obszarze T-DNA plazmidu Ti danej bakterii. Związki te są wykorzystywane przez bakterie jako źródło węgla i azotu. Należą do nich m.in. typy: oktopinowe, nopalinowe, agropinowe, L,L-sukcinamopinowe i sukcinamopinowe. Niektóre z nich, wykazujące podwyższoną ekspresję genów *vir* oraz szeroki zakres zdolności infekcyjnych różnych gatunków roślin, określane są jako hiperwirulentne. Takim szczepem jest np. szczep A281 z grupy szczepów L,L-sukcinamopinowych (29) oraz szczepy EHA 101 (30) i EHA 105 (31) będące pochodnymi szczepu A281. Innym szczepem wykazującym silną wirulencję u soi jest szczep Chry5. Na podstawie tego szczepu skonstruowano system binarny KYRT1 oraz użyto do transformacji soi (32). W badaniach porównawczych z EHA105 oraz GV3850 stwierdzono, że nowy system jest podobnie lub nawet trochę bardziej efektywny.

Szczepy te różnią się również strukturą i rodzajem genów wirulencji (33-35), które są bezpośrednio odpowiedzialne za przeniesienie i obróbkę T-DNA. W ich zakres wchodzi osiem operonów (od *virA* do *virH*) ulokowanych na plazmidzie Ti. Ekspresja genów jest regulowana przez białka Vir A i Vir G (36). Vir A w odpowiednim pH oraz obecności drobnocząsteczkowych związków fenolowych i cukrów uwalnianych przez zranione komórki ulega autofosforylacji i fosforyluje białko Vir G, które w dalszej kolejności aktywuje promotory genów *vir* wywołując transkrypcję (37). Enzym VirD2 przyłącza się do końca 5' nici T, a VirE2 tworzy z nią kompleks ochronny. Za przeniesienie tego kompleksu przez membranę bakteryjną do cytoplazmy komórki roślinnej odpowiada aż jedenaście białek VirB i VirD4 (38). Te spostrzeżenia pozwoliły na modyfikacje genów *vir* w celu zwiększenia efektywności transformacji roślin. Mutacja genu *virG* do *virGN54D* wywołana zmianą kodu tylko jednego aminokwasu powoduje ekspresję konstytutywną innych genów *vir*. Transformacja tytoniu, bawełny i kukurydzy za pomocą *Agrobacterium* zawierającym plazmid ze zmutowanym genem *virGN54D* była znacznie bardziej wydajna niż z typem dzikim (39). Podobnie użycie wielu kopii genu *virG* spowodowało zwiększenie efektywności transformacji u tytoniu, mimo że nie dało pozytywnego efektu u kukurydzy. Zwiększenie efektywności transformacji przejściowej poprzez zwielokrotnienie liczby kopii tego genu u selera, marchwi i ryżu otrzymali również Liu i wsp. (40) przy czym efekt ten był jednocześnie związany z gatunkiem rośliny i typem plazmidu Ti. Zwiększenie liczby kopii tego genu powodowało większe uniezależnienie efektywności transformacji od acetosyringonu (41) lub od pH (42,43). Wektory wykazujące wysoką eks-

presję genów *vir G* wykorzystane były również do transformacji ryżu za pomocą *Agrobacterium* (44). Ogromną rolę w indukcji genów *vir*, głównego czynnika wpływającego na zdolność *Agrobacterium* do infekcji kukurydzy, odegrał locus *virA*, a za absolutnie niezbędny czynnik autorzy uznali białko ChvE wymagane do indukcji ekspresji genów *vir* (45).

Najdłuższe fragmenty T-DNA przekazywane przez dzikie szczepy *Agrobacterium* do komórek roślinnych wynosiły od 15 do 25 tysięcy par zasad (46). Zastosowanie w systemie binarnym plazmidu pomocniczego wykazującego zwiększoną produkcję białek Vir G i Vir E pozwoliło na wydajne wprowadzenie do genomu rośliny fragmentu wynoszącego aż 150 tysięcy par zasad obcego DNA i dziedziczenie go w całości (47).

2.3. Czynniki indukujące geny wirulencji

Wspomniano już, że transkrypcja obszaru *vir* jest indukowana przez związki fenolowe jak acetosyringon i alfahydroksy-acetosyringon (48,49). Są one uwalniane przez zranione komórki niektórych gatunków roślin łatwo ulegających transformacji jak na przykład tytoń (50). Indukcję genów *vir* w warunkach kultury *in vitro* u gatunków roślin nie wytwarzających tych związków można osiągnąć poprzez kokultywację *Agrobacterium* ze zranionymi komórkami lub tkankami roślin wytwarzających te induktory, lub też przez dodatek acetosyringonu do kultury bakteryjnej (51), albo w czasie kokultywacji z eksplantatami (52,53), a także poprzez wstępne traktowanie eksplantatów tymi związkami (54). W ostatnio przeprowadzonych doświadczeniach nad transformacją niekaleczonych liści tytoniu za pomocą *Agrobacterium* wykonanych przez Escudero i Hohn (55) zaprzecza się powszechnej opinii potrzeby ich kaleczenia. Infekcja tkanki liści była zależna od światła i w związku z tym autorzy przypuszczają, że wnikanie *Agrobacterium* następuje przez komórki szparkowe. Nadal jednak ogromną rolę w infekcji odgrywał acetosyringon dodawany do kultury bakteryjnej przed traktowaniem liści.

Do innych czynników wpływających na regulację transformacji należą pH, temperatura (49), pH, temperatura i sacharoza (56,57), temperatura (58), opiny (59), cukry (60,9) i osmoprotektanty jak glicynobetaina (61). Wpływ pH i acetosyringonu na transformację poprzez *Agrobacterium* może być zależny od genotypu rośliny oraz użytego szczepu (62). Stwierdzono m.in., że obecność acetosyringonu podnosi wirulencję szczepu A281 u *Glycine max*.

Pełniejsze badania wpływu temperatury na transformację za pomocą *Agrobacterium* zostały przedstawione przez Dillen i wsp. (63). Autorzy użyli różnych szczepów zawierających system binarny, w których plazmid pomocniczy był typu nopalinowego, oktopinowego, agropinowego lub sukcinamopinowego oraz dwóch gatunków roślin (*Phaseolus acutifolius* i *Nicotiana tabacum*). Testowano sześć różnych temperatur od 15 do 29°C. Niezależnie od użytego typu plazmidu pomocniczego oraz genotypu najwyższą ekspresję przejściową genu *uidA* uzyskano w temperaturze od 19 do 22°C. Podobnie jak w badaniach przeprowadzanych przez Alt-Moerbe i wsp. (56,57), gdzie synteza VirD2

i VirG oraz w badaniach prowadzonych przez Fullner i Nester (58) i Melchers i wsp. (64), gdzie indukcja *virB* była wysoka w temperaturze od 20 do 25°C, tak i tutaj sugeruje się, że zachodzi zależność pomiędzy regulonem *vir* i temperaturą. Mimo że synteza wymienionych białek oraz indukcja genów *virB* były wystarczająco wysokie również w wyższych temperaturach, w przypadku koniugacji zależnej od *vir* optimum temperatury wynosiło 19°C.

2.4. Selekcja transgenicznych komórek oraz warunki regeneracji roślin

Tradycyjna selekcja transgenicznych komórek oparta jest na systemie selekcji negatywnej. Polega ona na tym, że komórki transgeniczne nabierają zdolności do przeżycia na substancji selekcyjnej użytej do ich kultury, natomiast nietransgeniczne na niej zamierają. W pierwszym przypadku dzieje się tak dzięki wbudowaniu do genomu roślinnego oraz wystąpieniu ekspresji genu warunkującego odporność na określoną substancję. Są nimi zazwyczaj antybiotyki lub herbicydy. Najczęściej używanym genem selekcyjnym jest gen kodujący fosfotransferazę neomycyny (*nptII*) warunkujący odporność na kanamycynę (65), rzadziej fosfotransferazę higromycyny (*hpt*) kodującą odporność na higromycynę (66) oraz transferazę fosfinitrycyno-acetylową (*bar*) warunkującą odporność na fosfinitrycynę (67). Ten ostatni jest jednocześnie genem warunkującym odporność na herbicyd Basta, ponieważ fosfinitrycyna jest jego związkami aktywnym. Dodanie do pożywek odpowiednio kanamycyny, higromycyny lub fosfinitrycyny (czynnik aktywny herbicydu) umożliwia prowadzenie selekcji komórek transgenicznych.

Dodatkowo w systemach transformacyjnych używany jest gen reporterowy *gus* kodujący β -glukuronidazę (68). Wprowadzenie intronu do części kodującej tego genu pozwoliło na badanie jego ekspresji po wbudowaniu do DNA roślinnego (69). Dzięki temu stwierdzono, że już w 36 godzin po infekcji *Agrobacterium* zaszło wbudowanie, transkrypcja i translacja ponieważ aktywność enzymu była wykrywalna. Podobnie obecnie modyfikuje się inne geny selekcyjne wprowadzane do roślin. W wielu jednak przypadkach system selekcji komórek transgenicznych jest mało wydajny ze względu na zbyt niską ekspresję genów markerowych, co może być związane m.in. ze słabym promotorem tego genu (70).

Od niedawna proponuje się użycie genu kodującego białko zielonej fluorescencji (GFP) wyizolowanego z meduzy, jako systemu alternatywnego do genu reporterowego *gus* (71). Obserwacja ekspresji tego genu jest możliwa w roślinach po naświetlaniu ich ultrafioletem. System ten ma również swoich przeciwników ze względu na fototoksyczność tego białka, niestabilność jego ekspresji w warunkach polowych oraz stosowanie mało czulej metody wykrywania.

W niektórych doniesieniach sugeruje się wpływ czynnika selekcyjnego na wydajność selekcji (72-74). Biorąc pod uwagę zróżnicowany wpływ substancji selekcyjnych Becker i wsp. (75) wprowadzili do jednego z wektorów binarnych różne geny selekcyjne: fosfotransferazy neomycyny (*nptII*), fosfotransferazy higromycyny (*hptIII*), transferazy fosfinitrycyno-acetylowej (*bar*), redu-

ktazy dwuhydrofobowej (*dhfr*) oraz gen warunkujący oporność na bleomycynę (*ble*). Wprowadzenie tych wektorów do szczepu hiperwirulentnego EHA105 (pEHA105) pozwoliło na wykonanie badań dotyczących wpływu substancji selekcyjnej na selekcję transgenicznych pędów grochu (28). Pędy takie uzyskiwano z bardzo wysoką jak dla grochu efektywnością rzędu od kilku do kilkunastu procent na fosfotrycynie i kanamycynie, natomiast nie udało się ich uzyskać na higromycynie B i metatreksanie.

Ciekawy system selekcji pozytywnej zaproponowali Joersbo i Okkels (76). W swoich badaniach zastosowali metodę opartą na procedurze regeneracji, w której wymagane jest dodanie cytokiny w celu otrzymania regeneracji pędów. Zamiast cytokiny autorzy dodali do pożywki nieaktywnej pochodnej glikuronidu. Komórki, które uległy transformacji i wykazały aktywność genu *gus* były w stanie przekształcić glikuronid cytokiny do aktywnej cytokiny przez co uległy regeneracji. Jednak, jak można się domyślać, system ten może być wykorzystany tylko w określonych warunkach kultury.

2.5. Stabilność integracji i ekspresji wprowadzonego genu

Poziom ekspresji transgenów może wahać się w bardzo szerokich granicach (77,78). Powszechnie uważa się, że zależy on od efektu pozycji (79,80), liczby kopii przeniesionego genu (81,82). Istotnym czynnikiem może być integracja tylko fragmentu T-DNA (83,84). Zagadnienia te mogą być rozwiązane poprzez regenerację wielu niezależnych transformantów i wybranie tych z odpowiednią ekspresją. Poważniejszą kwestię stanowi niestabilność ekspresji transgenów (85), brak ekspresji wprowadzonych genów u transgenicznych roślin (86,87) i niemendlowskie dziedziczenie transgenicznych fenotypów (88,89). W większości przypadków utrata ekspresji transgenów była wynikiem ich metylacji (89,90). Dlatego zastosowanie czynnika demetylującego wpływało na jej podniesienie i ustabilizowanie (91,92). Ponieważ prawidłowa ekspresja transgenów jest równie ważna jak i wydajna metoda transformacji, ostatnio przedstawiono szereg prac na ten temat (93-95).

Pewne trudności w ekspresji transgenów związane są m.in. ze zbyt dużą liczbą kopii danego genu w roślinie oraz niemendlowskim ich dziedziczeniem. Przypisuje się to balistycznej metodzie transformacji. W metodzie tej częściej występują również rośliny chimeralne. Dlatego tak szeroko dotąd stosowana metoda transformacji za pomocą *Agrobacterium* cieszy się również coraz większą popularnością wśród gatunków trudnych w kulturach *in vitro*.

Literatura

1. Chilton M-D., Drummond M. H., Merlo D. J., Sciaky D., Montoya A. L., Gordon M. P., Nester E. W., (1977), *Cell*, 11, 263-271.
2. Thomashow M. F., Panagopoulos C. G., Gordon M. P., Nester E. W., (1980), *Nature*, 283, 794-796.
3. Zambryski P., Joos H., Genetello C., Leemans J., van Montagu M., Schell J., (1983), *EMBO J.*, 2, 2143-2150.

4. Otten L., de Greve H., Hernalsteens J. P., van Montagu M., Scheider O., Straub J., Schell J., (1981), *Mol. Gen. Genet.*, 183, 209-213.
5. Horsch R. B., Fraley R. T., Rogers S. G., Sanders P. R., Lloyd A., Hoffman N., (1984), *Science*, 723, 496-498.
6. Klee H. J., White F. F., Iyer V. N., Gordon M. P., Nester E. W., (1983), *J. Bacteriol.*, 153, 878-883.
7. Hille J., van Kan J., Schilperoort R., (1984), *J. Bacteriol.*, 158, 754-756.
8. Matthyse A. G., (1987), *J. Bacteriol.*, 169, 313-323.
9. Crews J. L. R., Colby S., Matthyse A. G., (1990), *J. Bacteriol.*, 172, 6182-6188.
10. Cangelosi G. A., Ankenbauer R. G., Nester R. W., (1990), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, 6708-6712.
11. Pazour G. J., Das A., (1990), *Nucleic Acids Res.*, 18, 6909-6913.
12. Hoekema A., Hirsch P. R., Hooykaas P. J. J., Schilperoort R. A., (1983), *Nature*, 303, 179-181.
13. Bevan M., (1984), *Nucleic Acid Res.*, 12, 8711-8721.
14. Koncz C., Schell J., (1986), *Mol. Gen. Genet.*, 204, 383-396.
15. Deblaere R., Bytebier B., de Greve H., Deboeck F., Schell J., van Montagu M., (1987), *Methods in Enzymology*, 153, 277-292.
16. Fisk H. J., Dandekar A. M., (1993), *Scientia Horticulturae*, 55, 5-36.
17. Wordragen M. F., Dons J. J. M., (1992), *Plant Mol. Biol. Rep.*, 10, 12-36.
18. Potrykus I., (1990), *Bio/Technology*, 8, 535-542.
19. Hiei Y., Komari T., Kubo T., (1997), *Plant Mol. Biol.*, 35, 205-218.
20. Cheng M., Fry J. E., Pang S., Zhou H., Hironaka C. M., Duncan D. R., Conner T. W., Wan Y., (1997), *Plant Physiol.*, 115, 971-980.
21. Tingay S., McElroy D., Kalla R., Fieg S., Wang M., Thornton S., Brettell R., (1997), *Plant J.*, 11, 1369-1376.
22. Birch R. G., (1997), *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 48, 297-326.
23. Katavic V., Haughn G. W., Reed D., Martin M., Kunst L., (1994), *Mol. Gen. Genet.*, 245, 363-370.
24. Owens L. D., Cress D. E., (1985), *Plant Physiol.*, 77, 87-94.
25. Hobbs S. L. A., Jackson J. A., Mahon J. D., (1989), *Plant Cell Rep.*, 8, 274-277.
26. Uratsu S. L., Ahmadi H., Bringhurst R. S., Dandekar A. M., (1991), *Hort. Sci.*, 26, 196-199.
27. Boulton M. L., Bucholz W. G., Marks M. S., Markham P. G., Davies J. W., (1989), *Plant Mol. Biol.*, 12, 31-40.
28. Nadolska-Orczyk A., Buga E., Wiweger M., Orczyk W., (1998), *Plant Biotechnol. and In Vitro Biology in the 21st Century. Int. Congress*, (14-19 07.1998), Israel, 164.
29. Hood E. E., Helmer G. L., Fraley R. T., Chilton M.-D., (1986), *J. Bacteriol.*, 168, 1291-1301.
30. Hood E. E., Fraley R. T., Chilton M.-D., (1987), *Plant Physiol.*, 83, 529-534.
31. Hood E. E., Gelvin S. B., Melchers L. S., Hoekema A., (1993), *Transgenic Res.*, 2, 208-218.
32. Torisky R. S., Kovacs L., Avdiushko S., Newman J. D., Hunt A. G., Collins G. B., (1997), *Plant Cell Rep.*, 17, 102-108.
33. Yanofski M., Lowe B., Montoya A., Rubin R., Krul W., Gordon M., Nester E. W., (1985), *Mol. Gen. Genet.*, 201, 237-246.
34. Stachel S. E., Nester E. W., (1986), *EMBO J.*, 5, 1445-1454.
35. Rogowsky P. M., Powell B. S., Shirasu K., Lin T.-S., Morel P., Zyprian E. M., Steck T. R., Kado C. I., (1990), *Plasmid*, 23, 85-106.
36. Winans S. C., (1992), *Microbiol. Rev.*, 56, 12-31.
37. Zupan J. R., Zambryski P., (1995), *Plant Physiol.*, 107, 1041-1047.
38. Baron Ch., Zambryski P., (1996), *Curr. Biology*, 6, 1567-1569.
39. Hansen G., Das A., Chilton M.-D., (1994), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 7603-7607.
40. Liu Ch-N., Li X-Q., Gelvin S. T., (1992), *Plant Mol. Biol.*, 20, 1071-1087.
41. Rogowsky P. M., Close T. J., Chimera J. A., Shaw J. J., Kado C. I., (1987), *J. Bacteriol.*, 169, 5101-5112.

42. Pazour G. P., Das A., (1991), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 6941-6945.
43. Jin S., Pan S. Q., Nester E. W., (1993), Mol. Microbiol., 7, 555-562.
44. Hiei Y., Ohta S., Komari T., Kumashiro T., (1994), Plant J., 6, 271-282.
45. Heath J. D., Boulton M. I., Raineri D. M., Doty S. L., Mushegian A. R., Charles T. C., Davies J. W., Nester E. W., (1997), Mol. Plant-Microbe Interact., 10, 221-227.
46. Willmitzer L., (1980), Nature, 287.
47. Hamilton C. M., Frary A., Lewis C., Tanksley S. D., (1996), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93, 9975-9979.
48. Stachel S. E., Messens E., van Montagu M., Zambryski P. C., (1985), Nature, 318, 624-629.
49. Bolton G. W., Nester E. W., Gordon M. P., (1986), Science, 232, 983-984.
50. Lindsey K., Gallois P., (1990), J. Exp. Bot., 41, 529-536.
51. Sheikholeslam S. N., Weeks D. P., (1987), Plant Mol. Biol., 8, 291-298.
52. Owens L. D., Smigocki A. N., (1988), Plant Physiol., 88, 570-573.
53. Lipp Joao K. H., Brown T. A., (1993), Plant Cell Rep., 12, 422-425.
54. Guivarch A., Caissard J.-C., Brown S., Marie D., Dewitte W., van Oncelen H., Chriqui D., (1993), Protoplasma, 174, 10-18.
55. Escudero J., Hohn B., (1997), The Plant Cell, 9, 2135-2142.
56. Alt-Moerbe J., Nedderman P., von Lintig J., Weiler E. W., Schroder J., (1988), Mol. Gen. Genet., 213, 1-8.
57. Alt-Moerbe J., Kuhlmann H., Schroder J., (1989), Mol. Plant Microbe Int., 2, 301-308.
58. Fullner K. J., Nester E. W., (1996), J. Bacteriol., 178, 1498-1504.
59. Veluthambi K., Krishnan M., Gould J. H., Smith R. H., Gelvin S. B., (1989), J. Bacteriol., 171, 3969-3703.
60. Ankenbauer R. G., Nester E. W., (1990), J. Bacteriol., 172, 6442-6446.
61. Vernade D., Herrera-Estrella A., Wang K., van Montagu M., (1988), J. Bacteriol., 170, 5822-5829.
62. Godwin I., Todd G., Ford-Lloyd B., Newbury H. J., (1991), Plant Cell Rep., 9, 671-675.
63. Dillen W., de Clercq J., Kapila J., Zambre M., van Montagu M., Angenon G., (1997), Plant J., 12, 1459-1463.
64. Melchers L. S., Regensburg-Tuink A. J. G., Schilperoort R. A., Hooykaas P. J. J., (1989), Mol. Microbiol., 3, 969-977.
65. Farley R. T., Rogers S. G., Horsch R. B., (1986), CRC Critical Rev. in Plant Sci., 4, 1-45.
66. Waldron C., Murphy E. B., Roberts J. L., Gustafson G. D., Armour S. L., Malcolm S. K., (1985), Plant Mol. Biol., 5, 103-108.
67. de Block M., Botterman J., Vandewiele M., Docky J., Toen C., Gossele V., Movva N. R., Thompson C., van Montagu M., Leemans J., (1987), EMBO J., 6, 2513-2518.
68. Jefferson R. A., Kavanagh T. A., Bevan M. W., (1987), EMBO J., 6, 3901-3907.
69. Vancanneyt G., Schmidt R., O'Connor-Sanchez A., Willmitzer L., Rocha-Sosa M., (1990), Mol. Gen. Genet., 220, 245-250.
70. Ozcan S., Firek S., Draper J., (1993), Bio/Technol., 11, 218-221.
71. Haseloff J., Amos B., (1995), TIG, 11, 328-329.
72. Lulsdorf M. M., Rempel H., Jackson J. A., Baliski D. S., Hobbs S. L. A., (1991), Plant Cell Rep., 9, 479-483.
73. Dong J.-Z., McHughen A., (1993), Plant Sci., 88, 61-71.
74. Akama K., Puchta H., Hohn B., (1995), Plant Cell Rep., 14, 450-454.
75. Becker D., Kemper E., Schell J., Masterson R., (1992), Plant Mol. Biol., 20, 1195-1197.
76. Joersbo M., Okkels F. T., (1996), Plant Cell Rep., 16, 219-221.
77. Jones J. D. G., Dunsmuir P., Bedbrook J., (1985), EMBO J., 4, 4211-2418.
78. Peach C., Velten J., (1991), Plant Mol. Biol., 17, 49-60.
79. Jaenisch R., Jahner D., Nobis P., Simon I., Lohler J., (1981), The Cell, 24, 519-529.
80. Amasino R. M., Powell A. L. T., Gordon M. P., (1984), Mol. Gen. Genet., 197, 437-446.
81. Scott R. J., Draper J., (1987), Plant Mol. Biol., 8, 265-274.
82. Hobbs S. L. A., Warkentin T. D., de Long C. M. O., (1993), Plant Mol. Biol., 21, 17-26.

83. Jones J. D. G., Gilbert D. E., Grady K. L., Jorgensen R. A., (1987), *Mol. Gen. Genet.*, 207, 478-485.
84. Bhattacharyya M., Stermer B. A., Dixon R. A., (1994), *Plant J.*, 6, 957-968.
85. Meyer P., Linn F., Meyer H., Niedenhof I., Saedler H., (1992), *Mol. Gen. Genet.*, 231, 345-352.
86. Ottaviani M-P., Smits T., Haenisch Ten Cate C. H., (1993), *Plant Sci.*, 88, 73-81.
87. Finnegan J., McElroy D., (1994), *Bio/Technology*, 12, 883-888.
88. Deroles S. C., Gardner R. C., (1988), *Plant Mol. Biol.*, 11, 355-377.
89. Scheid O. M., Paszkowski J., Potrykus I., (1991), *Mol. Gen. Genet.*, 228, 104-112.
90. Matzke M. A., Primig M., Trnovsky J., Matzke A. J. M., (1989), *EMBO J.*, 8, 643-649.
91. Mandal A., Lang V., Orczyk W., Palva E. T., (1993), *Theor. Appl. Genet.*, 86, 621-628.
92. Palmgren G., Mattson O., Okkels F. T., (1993), *Plant Mol. Biol.*, 21, 429-435.
93. Cogoni C., Macino G., (1997), *Trends in Plant Sci.*, 2, 438-443.
94. Scheid O. M., Afsar K., Paszkowski J., (1998), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 95, 632-637.
95. van Houdt H., Ingelbrecht I., van Montagu M., Depicker A., (1997), *The Plant J.*, 12, 379-392.

***Agrobacterium* - mediated transformation of plants - basic model of the process and key factors involved in it**

Summary

During infection of plant tissue by *Agrobacterium*, a fragment of Ti plasmid (T-DNA) is transferred to a cell. T-DNA is delimited by 25 bp direct repeats, which are necessary to direct it. Any piece of DNA flanked by these sequences can be transferred to the plant cell, where it becomes integrated into the plant genome. The processing and transfer of T-DNA are mediated by *vir* region localized on the Ti-plasmid. Based on the summarized model of plant transformation via *Agrobacterium*, the key factors involved in this mechanism are reviewed.

There are two basic components of the process: Agro strain with its vector system and recipient, usually totipotent plant cell. The most important factors, which should be taken into consideration, include: *Agrobacterium* host specificity and its vector system, tissue culture techniques and their limitations, chemical agents inducing virulence genes and selection strategies. Some of them can influence the expression pattern of the introduced genes.

Key words:

Agrobacterium, transformation, plants.

Adres do korespondencji:

Anna Nadolska-Orczyk, Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin, Radzików, 05-870 Błonie, e-mail: a.orczyk@ihar.edu.pl