

rozwijająca się słuźnia, a później zarodnie maworka pokrewnego (Ryc. 14, 15). Z punktu widzenia naukowego, niezmiernie interesujący przypadek. Maworek pokrewny jest w Polsce notowany na rozproszonych stanowiskach, na ściółce, szczątkach roślin i na korze.

Można by mnożyć przykłady różnorodnych mikrosiedlisk antropogenicznych, zasiedlanych przez słuźowce. Warto więc nieco uważniej przyglądać się najbliższemu otoczeniu, bo słuźowce są wśród nas

i choć nie zawsze prezentują się atrakcyjnie, to jednak mogą zainteresować jako jeden z wielu elementów bogactwa i różnorodności przejawów życia otaczającego nas świata.

*Składam serdeczne podziękowania Pani mgr Dominice Michalczyk za materiał z hodowli rzeżuchy oraz wszystkim autorom zdjęć za udostępnienie tak pięknych fotografii słuźowców.*

■ Dr Anna Drozdowicz – Instytut Botaniki UJ w Krakowie. E-mail: anna.drozdowicz@uj.edu.pl.

## T transformacja genowa roślin metodą balistyczną (mikrowstrzeliwanie) na przykładzie słonecznika *Helianthus annuus* L.

Monika Tuleja (Kraków)

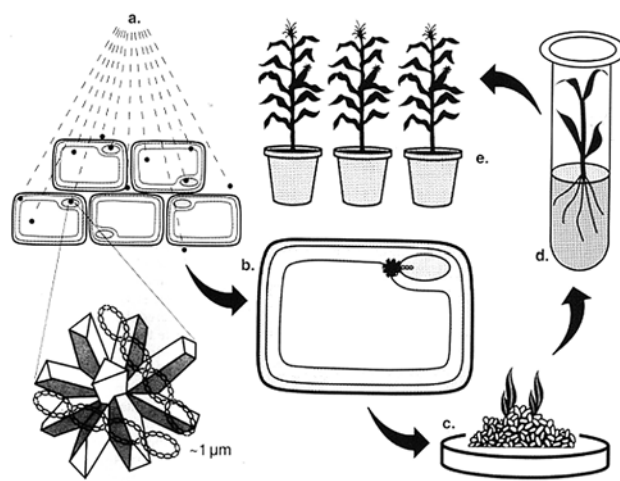
DROBIAZGI

Rozpoczęta rejestracją i dopuszczeniem w 1994 r. do uprawy w USA zmodyfikowanej genetycznie odmiany pomidora zwyczajnego „Flavr-Savr”, komercjalizacja roślin transgenicznych była zarówno ukoronowaniem dotychczasowych badań nad modyfikacją genetyczną roślin jak również pociągnęła za sobą intensyfikację działań w zakresie metod transformacji roślin.

Aby transformowanie roślin było możliwe i skuteczne, spełnione muszą być następujące warunki: tkanki docelowe muszą być zdolne do rozmnażania lub regeneracji; należy opracować wydajny system dostarczania egzogenego DNA, selekcji tkanek transgenicznych i efektywną metodę uzyskiwania płodnych roślin transgenicznych. Ponadto technika transformacji powinna być prosta, tania, powtarzalna i niezależna od genotypu, a czas kultury *in vitro* stosunkowo krótki, aby uniknąć niekorzystnej w tym przypadku zmienności somaklonalnej.

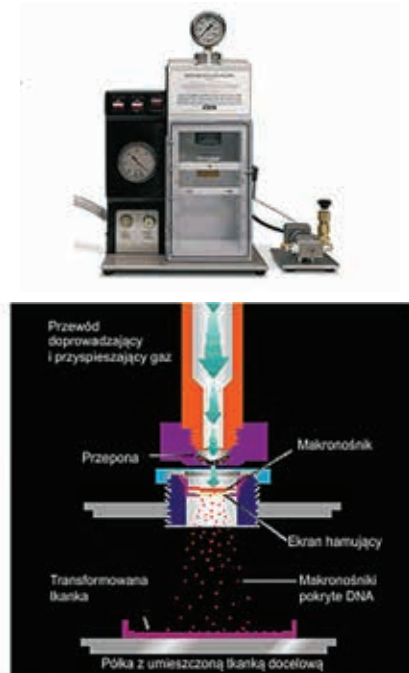
Jedną z szeroko stosowanych obecnie metod transformacyjnych, obok transformacji wektorowej z użyciem *Agrobacterium*, jest metoda bezpośredniego wprowadzania DNA do komórek docelowych tzw. mikrowstrzeliwanie (ang. *microprojectile bombardment*, *particle bombardment*). Metoda ta, zwana również balistyczną, opracowana przez Sanforda i in. (1987), a następnie zmodyfikowana przez Kleina i in. (1987) jest jedyną metodą, która umożliwia dostarczanie DNA do komórek praktycznie każdego typu tkanki i każdego organizmu a nawet do organelli komórkowych, chloroplastów i mitochondriów. Polega ona na wstrzeliwaniu do komórek mikrocząstek metali szlachetnych tzw.

mikroośników służących jako mikropociski. Są one naładowane czyli oplecione uprzednio naniesionym na nie DNA, rzadziej RNA. Przy użyciu aparatu do mikrowstrzeliwania zwanym też strzelbą genową (ang. *particle gun*) rozpędzone do prędkości około kilkuset m/s mikroośniki przebijają się przez ściany komórkowe, penetrują wnętrza komórki, a „ładunek” – czyli DNA wbudowuje się w genom rośliny docelowej. Siłą przyspieszającą mikroośniki może być np. rozprężający się gaz, często jest nim hel. W tym



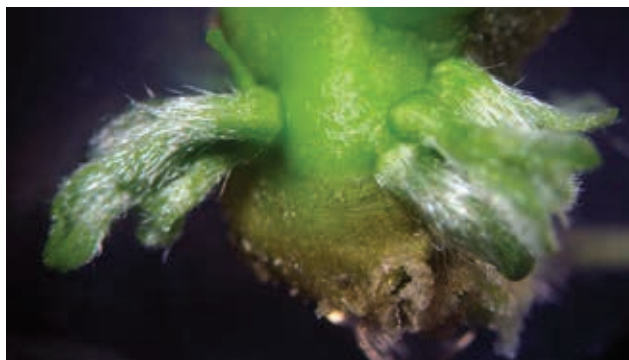
Ryc.1. Ogólna zasada wprowadzania obcego DNA do roślinnych komórek docelowych w procesie mikrowstrzeliwania – a) przyspieszone mikroośniki (w powiększeniu oplecione obcym DNA), b) oplecione DNA mikroośniki trafiają do komórek docelowych, gdzie wprowadzony DNA traci połączenie z mikroośnikami i łączy się z chromosomowym DNA rośliny, c) hodowla transformowanych, dzielących się komórek, z których regenerują rośliny w obecności pożywki selekcyjnej, d) zregenerowane transgeniczne rośliny ukorzeniane są na pożywce z czynnikiem selekcyjnym, na którym rośliny niestransformowane nie ukorzeniają się, e) po przeniesieniu do szklarni transgeniczne rośliny osiągają dojrzałość i wydają nasiona.

rodzaju aparatu mikronośniki opłaszczone DNA nano-szone są na plastikowe krążki zwane makronośnikami. Podczas strzału są one zatrzymywane na ekranie hamującym, a mikronośniki wypychane dalej (Ryc. 2). Głównym czynnikiem ograniczającym wydajność tej metody jest jedynie przeżywalność transformowanych komórek i ich zdolność do regeneracji, która zależy od uwarunkowań genetycznych, fizjologicznych i warunków kultury *in vitro* (Vain i in., 1993a).



Ryc. 2. Aparat do transformacji metodą mikrowstrzeliwania – PDS-1000/He i schemat jego działania wgł. Malepszy 2001 (zmodyfikowane).

Mikrowstrzeliwanie z powodzeniem wykorzystano do transformacji wielu gatunków, jedno- i dwuliściennych, m.in. *Arachis*, *Avena*, *Glycine*, *Hordeum*, *Nicotiana*, *Triticum*, *Zea* i wielu innych (zob. np. Klein i in., 1988; McCabe i in., 1988; Hamilton i in., 1992; van der Leede-Plegt i in., 1992; Vasil i in., 1992; Pawłowski i Somers, 1998; Deng i in., 2001; O'Connor-Sanches, 2002; Sairam i in., 2003; Deng i in., 2009; Singh i in., 2010; Cho i in., 2011; Jagga-Chungh i in., 2012). Eksperymenty nad



Ryc. 3. Pędy przybyszowe wyrastające z hipokotyla niedojrzałego zarodka słonecznika w trakcie kultury *in vitro*.

transformacją genetyczną słonecznika prowadzone są od początku lat 90. XX w. W doświadczeniach tych stosowano metodę transformacji przy użyciu *Agrobacterium* oraz mikrowstrzeliwanie.

Badania opisywane w tym artykule miały na celu opracowanie warunków transformacji genetycznej słonecznika *Helianthus annuus* L. (genotyp HA89B) przy użyciu strzelby genowej typu Biolistic PDS 1000/He produkcji firmy Bio-Rad z wykorzystaniem genu reporterowego GUS (plazmid pFS/35S-gus) jako ilościowego i półilościowego markera, a następnie genu odporności na *Plasmopara halstedii* oraz warunków hodowli *in vitro* transformowanych eksplantatów wybranej linii słonecznika *Helianthus annuus* L.

Materiałem roślinnym użytym w tym doświadczeniu były niedojrzałe zarodki zygotyczne oraz trzydniowe siewki genotypu HA89B, wysoko wydajnego pod względem regeneracyjnym. Jako eksplantaty wykorzystano liście i hypokotyle niedojrzałych zarodków zygotycznych ciętych i całe niedojrzałe zarodki zygotyczne oraz fragmenty merystemów apikalnych łodyg pięciodniowych siewek.

### Metodyka prowadzenia hodowli

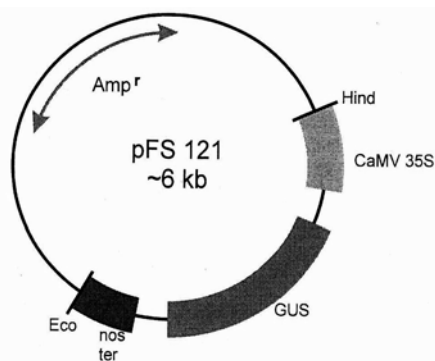
Wysterylizowany według standardowych procedur materiał roślinny pochodzący z niedojrzałych zarodków zygotycznych oraz z pięciodniowych siewek (merystemy apikalne) utrzymywano przez cztery dni w ciemności (tzw. kultury wstępne) na pożywkach wykorzystywanych także przy mikrowstrzeliwaniu. Okazało się bowiem, po licznych wstępnych doświadczeniach, że pożywki zawierające duże stężenie cukru, a co za tym idzie zwiększone ciśnienie osmotyczne, które miało wpływ na wzrost turgoru komórek, są dobrym podłożem „przygotowującym” niejako tkankę roślinną do wydajnego przyswajania obcego DNA wprowadzonego w procesie „particle bombardment”. Po zakończeniu mikrowstrzeliwania hodowlę przenoszono i nadal utrzymywano na pożywkach organogennych, na których obserwowano bezpośrednią indukcję pędów przybyszowych.

Dla każdego doświadczenia obliczono liczbę pędów przybyszowych, liczbę zregenerowanych roślin ukorzenionych w ziemi, liczbę wydanych nasion oraz średnią ilość pędów przybyszowych na eksplantat. Obliczono również procent indukcji kalusa i somatycznej embriogenezy dla niedojrzałych zarodków zygotycznych na pożywce z wysokim stężeniem sacharozy. Ponadto obliczono liczbę niebieskich plam (ang. *blue spots*) po mikrowstrzeliwaniu dla niedojrzałych zarodków zygotycznych i merystemów wierzchołkowych łodyg, oraz liczbę pędów

przybyszowych pojawiających się po mikrowstrzeliwaniu na eksplantat.

Kultury bakterii *Escherichia coli*, które posiadały wykorzystywany do transformacji plazmid, hodowano na pożywce (LB-Vollmedium; Lennox L Broth Base, Sigma) przygotowanej według wskazówek producenta, do której po autoklawowaniu dodano ampicylinę w stężeniu  $100 \text{ mg}^{-1}$ .

W opisanych w niniejszej pracy doświadczeniach transformacyjnych wykorzystano plazmid pFS 121. Plazmid ten jest pochodną wektora Puc 13 należącego do serii wektorów pUC – najczęściej obecnie używanych do transformacji *E. coli*. Omawiany plazmid ma wielkość 5,7 kb i zawiera zapożyczony od pUC 13 gen oporności na ampicylinę. Ponadto posiada kasetę genową GUS z genem reporterowym gusA (uidA) dołączoną do niego z wektora pBI 121. Gen gusA (uidA) kodujący  $\alpha$ -glukuronidazę (GUS) czyli hydrolazę rozszczepiającą dzikie odmiany  $\alpha$ -glukuronidów został pierwotnie wyizolowany z *E. coli* K12 (Jefferson, 1987; Jefferson i in., 1987). Obszar ten w plazmidzie znajduje się pod kontrolą promotora wirusa mozaiki kalafiora CaMV 35S, a zakończony jest terminatorem NOS.



Puc 13 – dawca  
z GUS – kasetą genową pochodzącą z pBI 121

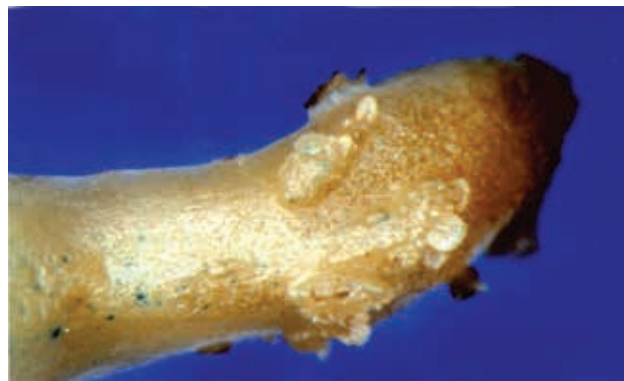
Ryc. 4. Plazmid pFS 121.

Plazmid-DNA izolowano z dobrze wypłukanej kultury bakterii *E. coli*, która namnażała się przez noc, według zmodyfikowanej procedury Sambork i in. 1989, a następnie oznaczano stężenie i czystość otrzymanego roztworu DNA metodą fotometryczną (Beckman DU-64 Spectralphotometer) (Sambork i in. 1989). Elektroforetyczny rozdzielacz kwasów nukleinowych następował na 0,8% (w/v) żelu agarozowym (Serva, Standard EEO) z dodatkiem  $0,2 \text{ } \mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}$  bromku etydyny. Poprzez wbudowanie się bromku etydyny pomiędzy zasady DNA możliwe było na zakończenie elektroforezy uwidocznienie i sfotografowanie przebiegu fragmentów DNA w świetle UV (Eagle Eye, Stratagene).

Mikronośnikami DNA w tym doświadczeniu były odpowiednio przygotowane drobiny złota, które oplecione zostały konkretną ilością kwasów nukleinowych w obecności spermidyny i  $\text{CaCl}_2$ . W konsekwencji na jeden strzał użyto  $5 \text{ } \mu\text{l}/12 \text{ } \mu\text{l}$  roztworu złoto-DNA, co odpowiadało ilości  $250 \text{ } \mu\text{g}/750 \text{ } \mu\text{g}$  złota i  $0,83/2 \text{ } \mu\text{g}$  DNA. W celu naładowania wysterylizowanych i osuszonych makronośników, roztwór złoto-DNA został na nie w odpowiedniej, wspomnianej powyżej ilości nakroplony.

Kultura tkankowa znajdowała się w środku wyznaczonej okręgiem powierzchni ( $2,4 \text{ cm}$ ) szalik ( $\text{Ø} 90 \text{ mm}$ ) z pożywką z wysokim stężeniem sacharozy. Na jeden strzał, co odpowiadało jednej szalce, przypadało z reguły 30 niedojrzałych zarodków zygocytynych dla doświadczenia z niedojrzałymi zarodkami zygocytynymi i 40 fragmentów merystemów wierzchołkowych pędu dla doświadczenia z merystemami wierzchołkowymi pędu.

Mikrowstrzeliwanie następowało po wcześniejszym wytworzeniu próżni  $27 \text{ mm Hg}$ . Po wstępnym przetestowaniu warunków (odległość pomiędzy: przeponą a makronośnikiem – siatką stopującą – szalką z hodowlą tkankową oraz wartość ciśnienia gazu) wybrano te najbardziej obiecujące.



Ryc. 5. Fragment transformowanej tkanki zarodka słonecznika *H. annuus* L. z widocznymi „blue spots”, czyli histochemicznie zaznaczonymi miejscami z obcym DNA, widoczne również młode pędy przybyszowe.

W celu histochemicznego oznaczenia aktywności GUS pobrane eksplantaty inkubowano w roztworze barwiącym (X-Gluc) przez 48 godz. w temperaturze  $37^\circ\text{C}$  w wyniku czego miejsca tkanki roślinnej, w które wbudowany został egzogenny DNA, wybarwione zostały na niebiesko (tzw. blue spots). Kontrolę stanowiły eksplantaty nie poddane mikrowstrzeliwaniu oraz eksplantaty ostrzelane nie naładowanym złotem (bez plazmidu).

Technikę mikrowstrzeliwania charakteryzuje niska efektywność transformacji. Przejściową ekspresję genów reporterowych wykazują te komórki, w których mikroośniki z DNA umiejscowiły się w jądrze komórkowym jest to najczęściej tylko kilka procent,

pozostałych 70–80% zazwyczaj łąduje w wakuoli. Penetracja mikronośników jest zwykle płytka np. w transformowanych eksplantach słonecznika obecność „blue spots” obserwowano w epidermie oraz w warstwach subepidermalnych kory pierwotnej hipokotyli.

Metoda ta ma też negatywny wpływ na przeżywalność komórek docelowych w wyniku mechanicznych uszkodzeń przy wprowadzaniu mikronośników, dlatego tak istotne jest dostosowanie optymalnych warunków hodowli tkanek docelowych przed i po mikrowstrzeliwaniu.

Pomimo tych niekorzystnych cech, do których należy zaliczyć i wysokie koszty sprzętu, mikrowstrzeliwanie jest szeroko stosowaną metodą transformacji, szczególnie przydatną dla roślin jednoliściennych, u których transformacja przy pomocy *Agrobacterium*

jest mało skuteczna lub nawet niemożliwa. Przy użyciu strzelby genowej transformowano już wszystkie gatunki zbóż, trzcinę cukrową i rośliny ozdobne np. tulipana. Metodę balistyczną stosuje się również jako metodę uzupełniającą transformację wektorową przy użyciu *Agrobacterium*. W przypadku słonecznika zwiększono wydajność transformacji i regeneracji merystemów wierzchołkowych pięciodniowych siatek ostrzeliwując tkankę merystemów apikalnych pustymi (pozbawionymi DNA) pociskami, uzyskując tym samym specyficzne zranienia tkanek, które następnie infekowano prowadząc kulturę w obecności zmodyfikowanych bakterii. Dzięki tej metodzie transformować można praktycznie wszystkie rodzaje tkanek roślinnych, a coraz częściej znajduje ona również zastosowanie w transformacji bakterii, grzybów, glonów i zwierząt, w tym ssaków.

■ Dr Monika Tuleja – Instytut Botaniki UJ. E-mail: monika.tuleja@uj.edu.pl.

## ROŚLINY UŻYTKOWE W OGRODZIE BOTANICZNYM UJ W KRAKOWIE

*Piotr Klepacki (Kraków)*

DROBIAZGI

Mieszkańcom wielkiego miasta roślina kojarzy się prawie wyłącznie z zielenią, której w miastach brakuje. Nieco rzadziej odsyła do powszedniości – porannej kawy, wygodnego krzesła czy trzymanej w ręku książki. Jeszcze bardziej dalekie od codziennych doświadczeń wydają się rośliny symboliczne i sakralne. Ogród botaniczny jest doskonałym miejscem, by na nowo odnaleźć z tymi roślinami kontakt, obejrzeć je jako eksponat, są przecież na swój sposób wyjęte ze swego kulturowego i użytkowego kontekstu.

Wiśnia piłkowana (*Prunus serrulata*) to drzewo budzące wielkie emocje, zwłaszcza w Japonii. Mieszkańcy „kraju kwitnącej wiśni” każdej wiosny tłumnie wylegają na ulice, by podziwiać urodę tych drzew. Również w Krakowie jest to możliwe, Ogród Botaniczny ma w swojej kolekcji trzy odmiany tego gatunku. Inne kwiaty o dużym znaczeniu symbolicznym to chryzantemy. W Polsce ich funkcja ozdobna sprowadza się do statusu „kwiatów pamięci”, stawianych na grobach. Niepisane reguły nie pozwalają wręczać ich jesienią np. z okazji imienin. W Chinach, gdzie uprawiane są od ponad trzech tysięcy lat, razem z wiśnią piłkowaną, bambusem i storczykiem wchodzi w skład kanonicznej grupy roślin przedstawianych w sztuce. Chryzantemy obecne są także w sztuce innych państw regionu. W Japonii chryzantema stanowi

herb cesarski, występuje w znakach instytucji państwowych i herbach rodowych oraz w najważniejszym odznaczeniu państwowym (Najwyższy Order Chryzantemy). Zresztą inne rośliny także znajdują swoje miejsce w symbolice tamtejszych instytucji państwowych. Kwitnąca paulownia (*Paulownia tomentosa*) znajduje się w znaku premiera Japonii. W Europie większą popularnością cieszą się symbole zwierzęce (np. orły, byki, niedźwiedzie), kwiaty występują znacznie rzadziej. Oczywiście są wyjątki, ciekawym przykładem jest herb miasta Mońki. Powstał w latach 90. XX w. przez przekształcenie herbu Rawicz (panna w koronie i czerwonej sukni na niedźwiedziu). W herbie Moniek panna nie siedzi na niedźwiedziu, ale pochyla się nad kwiatem ziemniaka (*Solanum tuberosum*), wskazując tym samym na podstawowe źródło utrzymania mieszkańców miasta i najbliższej okolicy.

Palmy to w naszych warunkach rośliny przede wszystkim ozdobne. Ale na tym nie kończy się ich rola, o czym wiedzą specjaliści z branży spożywczej. Palmy dostarczają oleju roślinnego, który używany jest do wyrobu margaryn, ciast, słodczy itp. Lokalnie, w krajach, gdzie są uprawiane, mają zastosowanie również jako surowiec do produkcji cukru, alkoholu oraz mączki skrobiowej – sago. Ich młode pędy