



Charakterystyka genów ulegających ekspresji podczas somatycznej embriogenezy u roślin

Anna Gruszczyńska, Monika Rakoczy-Trojanowska

Katedra Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin,
Szkola Główna Gospodarstwa Wiejskiego, Warszawa

Characteristics of genes expressed during plant somatic embryogenesis

Summary

Recently, several papers regarding genes essential for somatic embryogenesis have been published. The most important genes playing a key role in both zygotic and somatic embryogenesis are: *SERK*, *LEC*, and *BBM*. The majority of them are regulatory genes coding transcriptional factors. It was proved that the highest transcript accumulation of *AGL15*, *BBM*, *SERK* genes is characteristic for early stages of embryogenesis. The other genes, e.g. *LEC1*, *L1L*, *LEC2*, *FUS3*, *PEI1* are preferentially expressed in later stages. Recently, *NiR* gene coding ferredoxin – nitrite reductase, isolated from QTL region has been proved to play a key role in regeneration ability of rice.

Although many investigations have been performed up to date, the molecular mechanisms of somatic embryogenesis is still far from understanding.

Key words:

somatic embryogenesis, gene expression, *SERK*, *LEC*.

Adres do korespondencji

Anna Gruszczyńska,
Katedra Genetyki,
Hodowli i Biotechnologii
Roślin,
Szkola Główna
Gospodarstwa Wiejskiego,
ul. Nowoursynowska 159,
02-776 Warszawa.

biotechnologia

1 (76) 96–106 2007

1. Wprowadzenie

Somatyczna embriogeneza polega na formowaniu się zarodków somatycznych z komórek wegetatywnych w warunkach *in vitro* (1). Proces ten stanowi doskonały przykład totipotencjalności roślin i jest wykorzystywany jako modelowy do badania embriogenezy zygotycznej. W czasie tego procesu zarodki przechodzą kolejne stadia rozwojowe odpowiadające planowi rozwoju zarodków zygotycznych. Zarodki somatyczne są strukturami

o wyraźnej biegunowości, która w dalszym rozwoju odpowiada polaryzacji pęd-korzeni. W czasie późnej embriogenezy zarodek nabywa odporności na suszę gromadząc materiały zapasowe będące źródłem pokarmowym podczas kiełkowania, a jego metabolizm zostaje uspiony (2). Uwieńczeniem procesu embriogenezy jest wykształcona roślina z jednym liścieniem (rośliny jednoliścienne) lub dwoma liścieniami (u dwuliściennych). Procesy, jakie mają miejsce w komórkach roślinnych podczas przejścia komórek wegetatywnych w komórki embriogeniczne są jeszcze słabo poznane pod względem genetycznym.

Prace zmierzające do wyjaśnienia genetycznego podłoża zdolności do regeneracji roślin w kulturze *in vitro*, w tym nad somatyczną embriogenezą, prowadzone są od ponad dwudziestu lat. W wyniku klasycznej analizy genetycznej powstało kilka teorii na temat dziedziczenia tej cechy. W większości z nich zakładała się, że proces somatycznej embriogenezy jest kontrolowany przez niewielką liczbę genów i jest cechą dominującą (3,4). W nielicznych pracach wykazano jednak, że regeneracja roślin na drodze embriogenezy somatycznej ma charakter recesywny lub podlega supresji przez 2 geny komplementarne (5,6).

Dopiero jednak rozwój nowoczesnych technik badawczych w pierwszej połowie lat dziewięćdziesiątych ubiegłego wieku umożliwił identyfikację loci cech ilościowych związanych z reakcją roślin w kulturze *in vitro* na mapach sprzężeń markerów molekularnych (7,8) oraz izolację i szczegółową charakterystykę genów zaangażowanych w proces somatycznej embriogenezy.

2. Charakterystyka genów związanych z somatyczną embriogenezą

Formownie zarodków roślinnych wymaga aktywacji specyficznego zestawu genów. Dotychczas wykryto i scharakteryzowano kilka genów zaangażowanych w proces tworzenia zarodków somatycznych z komórek wegetatywnych. Najważniejsze z nich to: *SERK* (9), *LEC1* (10), *LEC2* (11), *FUS3* (12,13), *L1L* (14), *BBM* (15). Udział innych genów takich jak: *AGL15* (16) i *PEI1* (17) w tym procesie nie został jeszcze w pełni przebadany.

2.1. Geny *SERK*

Najobszerniej scharakteryzowano geny należące do rodziny *SERK*. Pierwszy gen *DcSERK* (*Daucus carota somatic embriogenesis receptor – like kinase*) z tej rodziny zidentyfikowano u marchwi (*Daucus carota*), (9). Jednak najlepiej zbadano gen *AtSERK1* u rzodkiewnika (*Arabidopsis thaliana*), (18). Ponadto u tego gatunku zidentyfikowano cztery inne geny (*AtSERK 2÷5*) podobne do *AtSERK1* na poziomie sekwencji DNA (19). Białka *SERK* zaliczane są do nadrodziny roślinnych kinaz białkowych (RLK) (20). Zbudowane są z peptydu sygnałowego i domeny zewnątrzkomórkowej składającej się

z zamka leucynowego, pięciu powtórzeń bogatych w leucynę (LRRs), pojedynczej domeny transmembranowej, domeny kinazy wewnątrzkomórkowej, 11 konserwowanych subdomen należących do kinaz serynowo-treoninowych oraz domeny bogatej w prolinę (SPP) – rysunek 1. (18). Funkcja domeny SPP nie jest poznana, może ona pełnić rolę zawiasu zapewniającego elastyczność zewnątrzkomórkowej części receptora lub uczestniczyć w oddziaływaniu ze ścianą komórkową. Główną cechą odróżniającą białka SERK od innych białek z nadrodziny RLK jest obecność domeny bogatej w prolinę zlokalizowanej pomiędzy LRRs i domeną transmembranową. Obecność motywu SPP użyto jako kryterium identyfikacji kolejnych czterech genów *SERK* (*AtSERK2* ÷ *AtSERK5*) wśród licznych genów LRR-RLK u rzodkiewnika. Każdy z tych genów zawiera wszystkie charakterystyczne elementy opisanych białek SERK. Geny *AtSERK1* i *AtSERK2* wykazują największą homologię w sekwencji nukleotydowej i są najbliższe ze sobą spokrewnione w obrębie rodziny genów *SERK*, natomiast geny *AtSERK3*, 4 i 5 stanowią oddzielną podrodzinę. Rodzina genów *SERK* ma wysoce konserwatywną strukturę genomową. We wszystkich białkach SERK każda zewnątrzkomórkowa domena i każdy kolejny motyw LRR kodowane są przez oddzielne egzony (18). Geny należące do rodziny *SERK* wykryto także u innych roślin, tj. u kupkówki pospolitej (*Dactylis glomerata*) (21), kukurydzy (*Zea mays*) (19), lucerny (*Medicago truncatula*) (22) i słonecznika (*Helianthus* sp.), (23). Na poziomie aminokwasowym gen *AtSERK1* jest nieco bardziej podobny do genu *DcSERK* niż pozostałe geny *SERK* rzodkiewnika.

Dowodu na związek genu *SERK* z somatyczną embriogenezą dostarczyły badania przeprowadzone u rzodkiewnika (18). Kultury pochodzące z roślin transformowanych genem *AtSERK* pod kontrolą promotora 35S wirusa mozaiki kalafiora po 4 tygodniach wzrostu na pożywce indukcyjnej miały podwyższone zdolności embriogeniczne w porównaniu do kultur typu dzikiego. W kulturze otrzymanej z roślin typu dzikiego gen *AtSERK1* ulegał ekspresji na bardzo niskim poziomie, natomiast kultury z roślin transformowanych genem *AtSERK1* wykazywały wyższą ekspresję w kulturach embriogenicznych niż w kulturach nieembriogenicznych. U marchwi gen *DcSERK* ulegał ekspresji w kulturach embriogenicznych po 7 dniach wzrostu na pożywce zawierającej 2,4-D, w komórkach rozwijających się w zarodki somatyczne. Ekspresja tego genu trwała od wczesnych faz embriogenezy do stadium globularnego. Nie zaobserwowano ekspresji tego genu w kulturach nieembriogenicznych. Ekspresję genu *DcSERK* stwierdzono również w zarodkach zygotycznych (9). W embrio-



Rys. 1. Schemat rozmieszczenia domen w rodzinie białek SERK, P – peptyd sygnałowy, LZ – zamek leucynowy, LRR – region bogaty w leucynę, SPP – domena bogata w prolinę, T – domena transmembranowa, K – domena kinazy.

genezie zygotycznej gen *AtSERK* ulega ekspresji w komórkach jajowych przed zapłodnieniem, we wczesnym rozwoju zarodka, aż po stadium sercowate (21).

2.2. Geny *LEC*

Geny *LEC* (ang. *leafy cotyledon*) rzodkiewnika, do których należą: *LEC1*, *LEC2*, *FUS3* (*FUSCA3*) kodują białka stanowiące grupę regulatorów zaangażowanych w prawidłowy rozwój zarodka zarówno podczas morfogenezy jak i dojrzewania (11).

Białka *LEC* są znacząco podobne do podjednostki HAP3 czynnika transkrypcji CBF (*CCAAT binding factor*) na poziomie sekwencji (10,11). CBF są ewolucyjnie konserwowanymi oligomerycznymi regulatorami transkrypcji zbudowanymi z trzech podjednostek: HAP2, HAP3 i HAP5, które tworzą kompleks wiążąc się z motywem CCAAT (obecny w obszarach promotorowych wielu genów eukariotycznych) (24). U kilku gatunków roślin, m.in. u rzodkiewnika również znaleziono geny kodujące białka o znaczącym podobieństwie do funkcjonalnych domen podjednostek HAP2, HAP3, HAP5 drożdży (25). Ponadto podjednostka HAP3 u rzodkiewnika (*AtHAP3*) powoduje supresję mutacji w genie *HAP2* u drożdży, co sugeruje, że białko roślinne oddziałuje funkcjonalnie z kompleksem CBF (26). *LEC1*, *LEC2*, *FUS3* są homologami białek HAP drożdży. Białko *LEC1*, podobnie jak podjednostka HAP3, składa się z trzech regionów (domeny A, B i C), przy czym centralna domena B jest ewolucyjnie konserwowana. Domena B białka *LEC1* jest niezbędna dla aktywności tego białka w embriogenezie (27). Domena ta posiada resztę aminokwasową, która jest niezbędna podczas oddziaływania podjednostki HAP3 z innymi podjednostkami kompleksu CBF oraz odpowiada za zdolność kompleksu do wiązania DNA (28). W białku HAP3 kodowanym przez geny *LEC2* i *FUS3* podjednostce B odpowiada podobna do niej podjednostka B3 (11,28). W bazach danych znajduje się jeszcze kilka genów, zlokalizowanych w genomie rzodkiewnika, kodujących podjednostkę HAP3 i wykazujących istotne podobieństwo w obrębie domeny B (14). Wśród białek kodowanych przez te geny najbardziej podobne na poziomie sekwencji do białka *LEC1* jest białko L1L. Podobieństwo to dotyczy jedynie regionu B podjednostki HAP3, natomiast regiony A i C tych białek różnią się. Poza rzodkiewnikiem podobieństwo w obrębie domeny B podjednostki HAP3 wykryto u innych gatunków m. in. jęczmienia, pszenicy, fasoli, soi, groszku, ryżu, kukurydzy (14).

U rzodkiewnika geny *LEC1*, *LEC2* i *FUS3* są zaangażowane w regulację wczesnych i późnych faz embriogenezy zygotycznej (10,11) i wykazują efekt plejotropowy odpowiadając za utrzymanie prawidłowej struktury wieszadełka, tożsamość liścieni oraz uniemożliwiają przedwczesne kiełkowanie nasion (11,29). Gen *LEC1* ulega ekspresji podczas rozwoju zarodka w fazie globularnej oraz sercowatej aż po stadium torpedy i zaginania liścieni (14). Poziom transkryptu genu *LEC1* jest niewykrywalny w organach wegetatywnych. Ekspresja genu *L1L* zachodzi w późniejszych fazach embriogenezy zygotycznej (w stadium torpedy i zaginania liścieni oraz w dojrzałych

zarodkach) (14). RNA tego genu wykryto również w liściach, korzeniach, łodygach i pąkach kwiatowych, jednak poziom ekspresji genu *L1L* był niski. Ekspresja genu *LEC2* ogranicza się tylko do rozwoju zarodka, przy czym najwyższy poziom transkrypty stwierdzono we wczesnych i średnich fazach embriogenezy zygotycznej (11). Na podstawie analizy mutantów dowiedziono, że geny *LEC* uczestniczą w rozwoju zarodka (10,14). Kwong i wsp. (14) otrzymali mutanty z wyciszonym genem *L1L* charakteryzujące się zaburzoną embriogenezą. U niektórych zarodków pojawiły się dodatkowe komórki w wieszadełku, inne miały zredukowane liścienie. Nasiona posiadające takie zarodki nie kiełkowały nawet, wtedy gdy niedojrzałe nasiona zebrano i wyłożono je na pożywkę. Supresja genu *L1L* powoduje defekty w rozwijającym się zarodku, a zmiany te dotyczą wczesnych faz embriogenezy zygotycznej. Natomiast zarodki mutantów *lec1* wykształcają liścienie, które pod względem kształtu przypominają formę pośrednią między liścieniami a liśćmi typu dzikiego (10). Tak zmienione fenotypowo zarodki powstają, mimo że u mutantów *lec1* wykryto obecność transkrypty genu *L1L* (14), co świadczy o tym, że obecność tego genu nie zapobiega powstawaniu zdeformowanych zarodków i obecność obu funkcjonalnych genów jest konieczna do prawidłowego zachodzenia embriogenezy. U mutantów *lec1* i *fus3* zaobserwowano zmiany w morfologii wieszadełka. Defekty takie wykryto także u podwójnych mutantów *lec1fus3*. Ponadto komórki zniekształconego wieszadełka, które u typu dzikiego mają ograniczoną liczbę podziałów, ulegały proliferacji i formowały wtórne zarodki (10). Struktury złożone z pierwotnych i wtórnych zarodków nie traciły zdolności embriogenicznych. Zjawiska tego nie stwierdzono u pojedynczych (*lec1*) i podwójnych (*lec1lec2*) mutantów, jedynie w 2 nasionach na 298 tworzyły się wtórne zarodki u mutantu *fus3* (10).

Na podstawie otrzymanych wyników z przeprowadzonych badań wskazuje się, że geny *LEC* odpowiadają za nabycie potencjału embriogenicznego, co udowodniono u rzodkiewnika, wykorzystując rośliny transgeniczne (10,11). Mutanty *lec1*, których jednym z kilku efektów plejotropowych jest produkowanie nasion nieodpornych na wysychanie, transformowano cDNA genu *LEC*. U roślin z transgenem nastąpiła komplementacja mutacji i rośliny te wytwarzały nasiona tolerujące suszę. Ponadto na liściach transgenicznych siewek powstawały struktury przypominające zarodki somatyczne (10). Na podstawie analizy histologicznej i zastosowania hybrydyzacji *in situ* potwierdzono, że wyrastające z komórek wegetatywnych struktury są zarodkami somatycznymi. Mutanty *lec2* miały zniekształcone liścienie, natomiast po transformacji genem *LEC2* odtworzono fenotyp dziki i liścienie były prawidłowo wykształcone (11). Na liścieniach transgenicznych siewek powstawały dodatkowo struktury podobne do zarodków somatycznych. W strukturach tych zachodziła ekspresja genów, których produkty akumulują się w zarodkach somatycznych. Podobne wyniki uzyskano w przypadku transformacji typu dzikiego konstruktem 35S::*LEC2* (11). Z wyników przeprowadzonych badań wskazuje się, że geny *LEC* uczestniczą w indukcji rozwoju zarodków somatycznych. Ostatnio potwierdzono, że geny *LEC* odgrywają główną rolę w procesie embriogenezy somatycznej rzodkiewnika (30).

Wykazano, że mutanty: *lec1*, *lec2* i *fus3* miały dużo słabsze zdolności embriogeniczne w porównaniu z typem dzikim. W tych samych warunkach kultury 65-94% reagujących eksplantatów typu dzikiego wytwarzało zarodki somatyczne z pominięciem stadium kalusa, podczas gdy w przypadku mutantów tylko 0,0-3,9% eksplantatów formowało zarodki somatyczne na drodze pośredniej. Całkowita utrata zdolności embriogenicznych wystąpiła u podwójnych (*lec1 lec2*, *lec1 fus3*, *lec2 fus3*) i potrójnych (*fus3 lec1 lec2*) mutantów. Sprawdzono poziom ekspresji genów *LEC* u typu dzikiego rzodkiewnika w zarodkach przed i po wyłożeniu na pożywkę 2,4-D. Ekspresja genów: *LEC1*, *LEC2*, *FUS3* zachodziła zarówno przed, jak i w czasie trwania kultury (30). Transkrypt genu *ZmLEC1*, który jest homologiem genu *LEC1* rzodkiewnika był obecny w kalusie embriogenicznym, a jego poziom spadał w czasie rozwoju zarodków somatycznych (31). Na podstawie przedstawionych wyników można przypisać genom *LEC* główną rolę w embriogenezie zygotycznej u roślin oraz w indukcji somatycznej embriogenezy w kulturach *in vitro*.

2.3. Gen *BBM*

Kolejnym genem zaangażowanym w somatyczną embriogenezę jest *BBM* (ang. *baby boom*) zidentyfikowany u rzodkiewnika i u rzepaku (*Brassica napus*), wykazujący podobieństwo do przedstawicieli rodziny czynników transkrypcyjnych AP2/ERF (32). Charakterystyczne dla tych białek jest występowanie domeny AP2/ERF wiążącej DNA. W obrębie rodziny białek AP2/ERF wyróżniono dwie podrodziny: ERF, która zawiera jedną domenę wiążącą DNA oraz AP2 posiadającą dwie takie domeny. Białka *BBM* rzodkiewnika i rzepaku należą do podrodziny AP2 i na poziomie sekwencji białkowej wykazują 98-99% podobieństwo między sobą oraz 60-89% w obrębie obu domen. Boutilier i in. (15) badali ekspresję genu *BBM* w kulturach mikrospor rzepaku. Obecność transkryptu stwierdzono w 4-dniowych kulturach embriogenicznych, podczas gdy w kulturach nieembriogenicznych transkryptu nie wykryto. Ekspresja genu *BBM* zachodziła we wczesnych i późnych fazach rozwoju zarodka (16). Interesujących wyników dostarczono z przeprowadzonych badań u rzodkiewnika i rzepaku transformowanych konstrukcjami zawierającymi geny *BBM* pod kontrolą dwóch semikonstrytuwnych promotorów (*35S::BBM* i *UBI::BBM*). U transformantów z nadekspresją genu *BBM* wśród licznych efektów plejotropowych głównym było spontaniczne formowanie zarodków somatycznych oraz struktur podobnych do liścieni na siewkach. Zarodki somatyczne wykazywały organizację podobną do zarodków zygotycznych. Zaklasyfikowanie białek *BBM* do czynników transkrypcyjnych w połączeniu z ich akumulacją podczas rozwoju zarodka pozwoliły przypisać im ważną rolę w regulacji szlaków związanych z embriogenezą.

2.4. Inne geny związane z embriogenezą

2.4.1. Gen *AGL15*

Białko *AGL15* (ang. *agamous-like*) jest przedstawicielem rodziny regulatorów transkrypcji zawierających domenę MADS i akumulowane jest w największej ilości we wczesnych stadiach rozwoju zarodka zarówno u roślin jedno-, jak i dwuliściennych. Stosując specyficzne przeciwciała i techniki immunohistochemiczne wykazano, że białko *AGL15* gromadzi się w cytoplazmie komórek jajowych przed zapłodnieniem i przemieszcza się do jądra we wczesnych stadiach rozwoju wieszadełka, zarodka i bielma. Relatywnie wysoki poziom tego białka występuje w jądrach w czasie morfogenezy zarodka aż do rozpoczęcia wysychania nasion u rzepaku, kukurydzy i rzodkiewnika (16). Perry i wsp. (16) udowodnili, że gen *AGL15* ma związek z somatyczną embriogenezą wykorzystując mutanty *lec1*, *lec2* i *fus3* rzodkiewnika, u których doszło do zatracenia tożsamości zarodka oraz przedwczesnego zakończenia embriogenezy (13). U mutantów *lec2* i *fus3* nie zaobserwowano zmian w gromadzeniu się białka *AGL15*, natomiast u mutantu *lec1* poziom tego białka spadał w późnym stadium sercowatym, poprzedzając zaburzenia morfologiczne u rozwijających się zarodków. Mutacja w genie *LEC1* nie miała wpływu na poziom białka *AGL15* we wczesnych fazach rozwoju zarodka, co wskazuje, że gen *LEC1* nie jest konieczny do aktywacji ekspresji genu *AGL15*. Na podstawie otrzymanych wyników potwierdzono, że gen *LEC1* wpływa na utrzymanie wysokiego poziomu białka *AGL15* podczas późnej embriogenezy.

Wspomniano, że gen *AGL15* koduje białko regulatorowe. Białko to wiąże się z motywem CARGW (C-[A/T]rich-G) sekwencji promotorowych genów. Jednym z kandydatów mógł być gen *AtGA2ox6* rzodkiewnika, kodujący oksydazę GA2, której aktywność katalityczna polega na konwersji biologicznie aktywnych form gibereliny w nieaktywne. Hipotezę tę potwierdzono wykonując serię eksperymentów z wykorzystaniem techniki immunoprecypitacji białka *AGL15* z elementami regulatorowymi tego genu (33). Najwyższą ekspresję obu genów stwierdzono we wczesnych fazach rozwoju zarodków, zarówno zygotycznych, jak i somatycznych. Spadkowi poziomowi akumulacji oksydazy i białka regulatorowego podczas rozwoju zarodków towarzyszył wzrost poziomu endogennej gibereliny. Jest to zrozumiałe, ponieważ giberelina wpływa negatywnie na podziały komórkowe, a stymuluje wzrost wydłużeniowy komórek, co w zarodkach następuje począwszy od stadium sercowatego; w fazie torpedy poziom transkryptów obu genów spadał znacząco. Transgeniczne rośliny rzodkiewnika z dodatkową kopią genu *AGL15* ulegającego ekspresji konstytutywnej charakteryzowały się zwiększoną efektywnością formowania zarodków somatycznych z merystemów wierzchołkowych w pożywce płynnej zawierającej 2,4-D. Wyłączenie techniką *knock-out* genu *AtGA2ox6* oraz dodanie do pożywki GA i GA3 wywoływało efekt odwrotny. W przytoczonych badaniach wykazano, że geny *AtGA2ox6*

oraz *AGL15* pełni istotną funkcję w najwcześniejszych fazach rozwoju zarodka. Autorzy przypuszczają, że oprócz *AtGA2ox6* istnieje jeszcze kilka genów, których ekspresja jest regulowana przez białko *AGL15*.

2.4.2. Gen *PEI1*

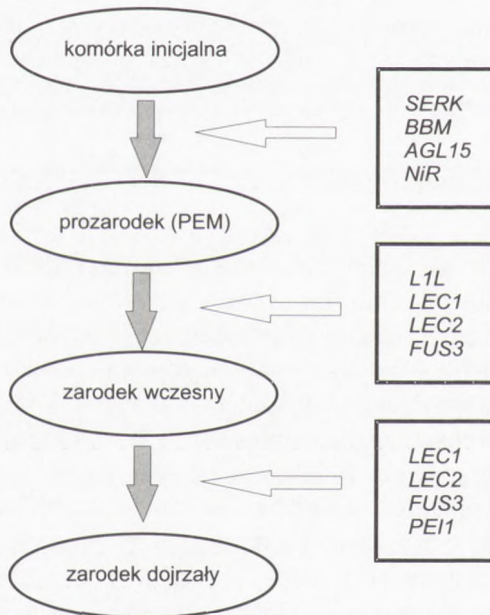
Gen *PEI1* koduje białko zawierające domenę z motywem palców cynkowych (Cys₃His) o budowie charakterystycznej dla zwierzęcych i grzybowych czynników transkrypcyjnych. Podczas zastosowania hybrydyzacji *in situ* wykazano, że u rzodkiewnika ekspresja genu *PEI1* zachodzi w zarodku od stadium globularnego aż po późną fazę liścieni. Gen ten jest niezbędny w rozwoju zarodka, co wykazali Li i Thomas (17) wprowadzając cDNA genu *PEI1* w orientacji antysensowej do rzodkiewnika. U transformantów powstawały zmienione fenotypowo zarodki, które utraciły zdolność przechodzenia prawidłowej embriogenezy. Zarodki te różniły się wielkością od prawidłowo rozwiniętych, a także pozostawały białe i nie przybierały zielonej barwy jak ma to miejsce u fenotypu dzikiego. Zaburzenia te dotyczyły przejścia z fazy globularnej do stadium sercowatego. W kulturach *in vitro* takie zaburzone w rozwoju zarodki nie były zdolne do wytwarzania liścieni, natomiast formowanie korzeni miało prawidłowy przebieg. Eksplantaty pobrane z tych korzeni wyłożone na pożywkę wytwarzały kalus embriogeniczny, a zregenerowane rośliny formowały zarodki o identycznym fenotypie jak rośliny transformowane genem *PEI1* w orientacji antysensowej. Na podstawie tych wyników sugeruje się, że gen *PEI1* jest zarodkospetyficznym czynnikiem transkrypcyjnym, który odgrywa ważną rolę podczas embriogenezy u rzodkiewnika i zaangażowany jest w rozwój wierzchołkowej części zarodka (17).

2.4.3. Gen *NiR*

W ostatnich miesiącach u ryżu zidentyfikowano gen *NiR* (ang. *ferredoxin-nitrate reductase*), (34). Nie udowodniono wprawdzie jego bezpośredniego związku z somatyczną embriogenezą, ale jest to gen o podstawowej roli dla zapoczątkowania procesu morfogenezy *in vitro*. Wydaje się zatem, że jego charakterystyka jest uzasadniona w kontekście omawianego zagadnienia. Gen *NiR* koduje reduktazę azotanową, która redukuje toksyczne dla komórek roślinnych jony azotanowe (dostarczane z pożywką jony azotanowe są redukowane do azotanowych przez reduktazę azotanową) do amonowych. Pierwszym etapem prac była identyfikacja QTLi związanych ze zdolnością do regeneracji roślin na mapie sprzężeń markerów molekularnych, bazującej na populacji mapującej, której komponentami rodzicielskimi były dwie odmiany ryżu: jedna o wysokiej wydajności regeneracji roślin (*Kasalath*), druga nie reagująca w kulturze *in vitro* (*Koshihikari*). Wśród nich, QTL o nazwie *PSR1* (ang. *Pro*

moter of Shoot Regeneration), znajdujący się na chromosomie pierwszym, charakteryzował się największym udziałem w kontroli całkowitej zmienności cechy. Wykorzystując technikę *map-based cloning* (klonowanie bazujące na mapowaniu genetycznym) oraz przeszukując bibliotekę BAC autorzy fizycznie zlokalizowali obszar PSR1, określili jego długość i sekwencję. Okazało się, że w obszarze tym znajduje się gen *NiR*. Następnie wykazano, że różnice między odmianami polegały na polimorfizmach typu SNP (ang. *single nucleotide polymorphism*) oraz delecjach i insercjach głównie w obszarze promotorowym genów i przekładały się na wysoki poziom ich ekspresji u odmiany Kasalath, niski u odmiany Koshihikari. Poziom ekspresji genów obu odmian był ściśle skorelowany z aktywnością enzymatyczną *NiR*. Wyniki te potwierdzono oznaczając poziom jonów azotynowych uwalnianych do pożywki – w pożywce, na której prowadzono kulturę kalusa odmiany Kasalath poziom NO_2^- był wysoki, podczas gdy w pożywce z kalusem drugiej odmiany – niewykrywalny. Dodatkowym dowodem była regeneracja roślin z kalusa uzyskanego z eksplantatów niereaktywnej odmiany Koshihikari transformowanych konstruktem zawierającym pełną sekwencję genomową lub cDNA genu *NiR*, wyizolowanego z odmiany Kasalath.

NiR jest pierwszym zidentyfikowanym genem, który ma tak istotne znaczenie dla zapoczątkowania procesu morfogenezy *in vitro*, w tym embriogenezy somatycznej i jednocześnie, jak się wydaje, nie odgrywa większej roli w różnicowaniu zgoty.



Rys. 2. Najwyższy poziom transkryptu genów ulegających ekspresji podczas rozwoju zarodka.

3. Podsumowanie

Do tej pory zidentyfikowano i scharakteryzowano kilka genów, które ulegają ekspresji podczas somatycznej embriogenezy. Większość z nich koduje białka będące regulatorami transkrypcji. Wiedza na temat sposobu działania tych genów jest jednak nadal niepełna, a szczegółowe poznanie ich wszystkich funkcji i wzajemnych powiązań wymaga dalszych badań. Niemniej jednak, informacje zgromadzone do tej pory oraz szybki rozwój i doskonalenie metod biologii molekularnej pozwalają sądzić, że mechanizmy sterujące somatyczną (i zygotyczną) embriogenezą będą coraz bardziej zrozumiałe. To z kolei stwarza szansę sterowania procesem somatycznej embriogenezy w roślinnych kulturach *in vitro*, integralnym elementem wielu procedur biotechnologicznych.

Literatura

1. Mordhorst A. P., Toonen M. A. J., de Vries S. C., (1997), *Crit. Rev. Plant Sci.*, 16, 535-576.
2. Bewley J. D., (1997), *Plant Cell*, 9, 1055-1066.
3. Henry Y., Vain P., de Buyser J., (1994), *Euphytica*, 79, 45-58.
4. Nadolska-Orczyk A., Malepszy S., (1989), *Theor. Appl. Genet.*, 78, 836-840.
5. Rakoczy-Trojanowska M., Malepszy S., (1993), *Theor. Appl. Genet.*, 86, 406-410.
6. Rakoczy-Trojanowska M., Malepszy S., (1995), *Euphytica*, 83, 233-239.
7. Komatsuda T., Annaka T., Oka S., (1993), *Theor. Appl. Genet.*, 86, 713-720.
8. Taguchi-Shiobara F., Lin S. Y., Tanno K., Komatsuda T., Yano M., Sasaki T., Oka S., (1997), *Theor. Appl. Genet.*, 95, 828-833.
9. Schmidt E. D. L., Guzzo F., Toonen M. A. J., de Vries S. C., (1997), *Development*, 124, 2049-2062.
10. Lotan T., Ohto M., Yee K. M., West M. A., Lo R., Kwong R. W., Yamagishi K., Fischer R. L., Goldberg R. B., Harada J. J., (1998), *Cell*, 93, 1195-1205.
11. Stone S. L., Kwong L. W., Yee K. M., Pelletier J., Lepiniec L., Fisher R. L., Goldberg L. B., Harada J. J., (2001), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 98, 11806-11811.
12. Meinke D. W., (1992), *Science*, 258, 1647-1650.
13. Meinke D. W., Franzmann L. H., Nickle T. C., Yeung E. C., (1994), *Plant Cell*, 6, 1049-106.
14. Kwong R. W., Bui A. Q., Lee H., Kwong L. W., Fischer R. L., Goldberg R. B., Harada J. J., (2003), *Plant Cell*, 15, 5-18.
15. Boutilier K., Offringa R., Sharma V. K., Kieft H., Ouellet T., Zhang L., Hattori J., Liu C., van Lammeren A. A. M., Miki B. L. A., Custers J. B. M., van Lookeren Campagne M. M., (2002), *Plant Cell*, 14, 1737-1749.
16. Perry S. E., Nichols K. W., Fernandez D. E., (1996), *Plant Cell*, 8, 1977-1989.
17. Li Z., Thomas T. L., (1998), *Plant Cell*, 10, 383-398.
18. Hecht V., Vielle-Calzada J. P., Hartog M. V., Schmidt E. D. L., Boutilier K., Grossniklaus U., de Vries S. C., (2001), *Plant Physiol.*, 127, 803-816.
19. Baudino S., Hansen S., Brettschneider R., Hecht V. R. G., Dresselhaus T., Lörz H., Dumas C., Rogowski P. M., (2001), *Planta*, 213, 1-10.
20. Walker J. C., (1994), *Plant Mol. Biol.*, 26, 1599-1609.
21. Somleva M. N., Schmidt E. D. L., de Vries S. C., (2000), *Plant Cell Rep.*, 19, 718-726.
22. Nolan K. E., Irwanto R. R., Rose R. J., (2003), *Plant Physiol.*, 133, 218-230.
23. Thomas C., Meyer D., Himber C., Steinmetz A., (2004), *Plant Physiol. Biochem.*, 42, 35-42.
24. Mantovani R., (1999), *Gene*, 239, 15-27.
25. Gusmaroli G., Tonelli C., Mantovani R., (2001), *Gene*, 264, 173-185.

26. Edwards D., Murray J. A. H., Smith A. G., (1998), *Plant Physiol.*, 117, 1015-1022.
27. Shinha S., Kim I. S., Sohn K.-Y., de Crombrughe B., Maity S. N., (1996), *Mol. Cell Biol.*, 16, 328-337.
28. Chugh A., Khurana P., (2002), *Current Science*, 83(6), 715-730.
29. Parcy F., Valon C., Kohara A., Misera S., Giraudat J., (1997), *Plant Cell*, 9, 1256-127.
30. Gaj M. D., Zhang S., Harada J. J., Lemaux P. G., (2005), *Planta*, 222, 997-988.
31. Zhang S., Wong L., Meng L., Lemaux P. G., (2002), *Planta*, 215, 191-194.
32. Riechmann J. L., Meyerowitz E. M., (1998), *Biol. Chem.*, 379, 633-646.
33. Wang H., Tang W., Zhu C., Perry S. E., (2002), *Plant J.*, 32, 831-843.
34. Nishimura A., Ashikari M., Lin S., Takashi T., Angeles E. R., Yamamoto T., Matsuoka M., (2005), *PNAS*, 102 (33), 11940-11944. Chugh A., Khurana P., (2002), *Current Science*, 83(6), 715-730.