

Nr indeksu 362808
PL ISSN 0023-4249

Polskie Towarzystwo Przyrodników
im. KOPERNIKA

KOSMOS

BIOTECHNOLOGIA ROŚLIN



Prenumeratę, jak również sprzedaż pojedynczych zeszytów *KOSMOSU* prowadzi, oprócz Wydawcy — **MAWI**, także firma **AMOS**, 01-806 Warszawa, ul. Zuga 12. Koszt prenumeraty w 1996 r. wynosi 30,00 zł.

Zlecenie dostawy za granicę jest o 100 procent droższe. W przypadku życzenia dostaw drogą lotniczą zamawiający pokrywa dodatkową opłatę.

Wpłaty są przyjmowane na konto firmy **AMOS**:

PKO VIII O/W-wa nr 1586-77578-136, z dopiskiem na blankiecie tytułu i okresu prenumeraty, a w przypadku pojedynczych zeszytów — numeru tomu i zeszytu.

Polskie Towarzystwo Przyrodników
im. KOPERNIKA

KOSMOS

BIOTECHNOLOGIA ROŚLIN

Rok założenia 1876

WARSZAWA 1995

MEDYCZNA AGENCJA WYDAWNICZO INFORMACYJNA

RADA REDAKCYJNA

LESZEK KUŹNICKI (*wiceprzewodniczący*), WŁODZIMIERZ OSTROWSKI,
HENRYK SZARSKI, PRZEMYSŁAW TROJAN,
ADAM URBANEK (*przewodniczący*), KAZIMIERZ ZIELIŃSKI

KOMITET REDAKCYJNY

BRONISŁAW CYMBOROWSKI, WŁADYSŁAW
GOLINOWSKI (*zastępca redaktora naczelnego*), LUCYNA GRĘBECKA,
KAZIMIERZ L. WIERZCHOWSKI (*redaktor naczelny*),
BARBARA BIERZYŃSKA (*sekretarz*)

REDAKTOR ZESZYTU

WŁADYSŁAW GOLINOWSKI

ADRESY REDAKCJI

Polskie Towarzystwo Przyrodników im. Kopernika
ul. Rakowiecka 36, 02-532 Warszawa

Redaktor Naczelny
Instytut Biochemii i Biofizyki PAN, Pawińskiego 5A, 02-106 Warszawa
tel. 658-47-29

Sekretarz
Muzeum i Instytut Zoologii PAN, Wilcza 64, 00-679 Warszawa
tel. 629-32-21 wew. 24

Wydano z pomocą finansową Komitetu Badań Naukowych

Nr indeksu 362808

PL ISSN 0023-4249

MEDYCZNA AGENCJA WYDAWNICZO INFORMACYJNA

Warszawa, ul. Złota 60/28

Druk: Drukarnia Nr 1, Rakowiecka 37, Warszawa

Pokwitowanie dla wpłacającego	
Zł.....	
słownie.....	
wplacający.....	
.....	
.....	
imię nazwisko adres wraz z kodem pocztowym	
na r-k	
MAWI	
ul. Żłota 60/28, 00-821 Warszawa	
PKO BP IX O/Warszawa	
Nr: 1599-321004-136	
pren. <i>KOSMOS</i>	
stempel	Oplata zł.....
podpis przyjmującego	
PRENUMERATA PRASY	

Odcinek dla posiadacza rachunku	
Zł.....	
słownie.....	
wplacający.....	
.....	
.....	
imię nazwisko adres wraz z kodem pocztowym	
na r-k	
MAWI	
ul. Żłota 60/28, 00-821 Warszawa	
PKO BP IX O/Warszawa	
Nr: 1599-321004-136	
pren. <i>KOSMOS</i>	
stempel	Oplata zł.....
podpis przyjmującego	
PRENUMERATA PRASY	

Odcinek dla poczty lub banku	
Zł.....	
słownie.....	
wplacający.....	
.....	
.....	
imię nazwisko adres wraz z kodem pocztowym	
na r-k	
MAWI	
ul. Żłota 60/28, 00-821 Warszawa	
PKO IX O/Warszawa	
Nr: 1599-321004-136	
pren. <i>KOSMOS</i>	
stempel	Oplata zł.....
podpis przyjmującego	
PRENUMERATA PRASY	

Szanowni Czytelnicy i Prenumeratorzy Kosmosu!

Możecie Państwo jeszcze zamówić prenumeratę roczną *Kosmosu* wypełniając dwustronnie przekaz i wpłacając 30,00 zł (cztery zeszyty po 7,50 zł) na konto Medycznej Agencji Wydawniczo Informacyjnej. W ciągu roku ukazują się cztery zeszyty kolejnego tomu. Możecie również zamówić zeszyty archiwalne po 7,50 zł za egzemplarz w Polskim Towarzystwie Przyrodniczym im. Kopernika, ul. Rakowiecka 36, 02-532 Warszawa, konto: Bank Gdański IV O/Wa nr 300009-6943-132.

KOSMOS

KONTYNUACJA PRENUMERATY:

TAK

NIE

ROCZNA

PÓLROCZNA

LICZBA EGZ. 1 2 3 4

WARTOŚĆ.....zł

Zakreśl właściwie!

KOSMOS

KONTYNUACJA PRENUMERATY:

TAK

NIE

ROCZNA

PÓLROCZNA

LICZBA EGZ. 1 2 3 4

WARTOŚĆ.....zł

Zakreśl właściwie!

KOSMOS

KONTYNUACJA PRENUMERATY:

TAK

NIE

ROCZNA

PÓLROCZNA

LICZBA EGZ. 1 2 3 4

WARTOŚĆ.....zł

Zakreśl właściwie!

CZASOPISMO JEST DOSTĘPNE GŁÓWNIEM W PRENUMERACIE

WPROWADZENIE

W ciągu ostatnich kilkudziesięciu lat nastąpił ogromny wzrost wydajności produkcji w rolnictwie, osiągnięty głównie dzięki zastosowaniu mechanizacji, nawozów sztucznych, środków ochrony roślin, wysoko wydajnych odmian roślin uprawnych i ras zwierząt hodowlanych. Wydaje się jednak, że optymalizacja procesu produkcyjnego, może najbardziej spektakularna w nowoczesnych, sterowanych przez programy komputerowe szklarniach i fermach hodowlanych, dociera do granic efektywności — coraz większe nakłady środków nie przynoszą proporcjonalnego wzrostu dochodu. Co gorsza, metody produkcji, które spowodowały „zieloną rewolucję”, przyniosły także groźny efekt uboczny — degradację środowiska naturalnego, przejawiającą się między innymi zmniejszeniem powierzchni lasów i innych użytków ekologicznych, eutrofizacją wód, erozją i zanieczyszczeniem gleb, wyselekcjonowaniem z naturalnych populacji chwastów, owadów i patogenów odpornych na pestycydy. Wyjściem z rysującego się impasu ekonomicznego i ekologicznego może być zastosowanie w rolnictwie metod i środków produkcji rodem z laboratorium biotechnologicznego.

Biotechnologia to każda technika wykorzystująca żywe organizmy do wytworzenia określonego produktu lub jego zmodyfikowania do poprawienia cech roślin lub zwierząt lub do stworzenia mikroorganizmów o specyficznych cechach użytkowych. Podstawą nowoczesnej biotechnologii są techniki rekombinacji DNA określane ogólnie terminem „inżynieria genetyczna”, pozwalające przenieść do dowolnego organizmu dowolny gen wyklonowany z każdego innego organizmu z precyzją i szybkością nieporównanie większą niż umożliwiają konwencjonalne metody hodowli.

Biotechnologia, w połączeniu z tradycyjnymi technikami stosowanymi w rolnictwie, pozwoli na zwiększenie produktywności i utrzymywanie jej stale na wysokim poziomie, na bardziej ekonomiczne przetwarzanie plonu, zwiększenie różnorodności oferowanych produktów, przystosowanie ich do rosnących wymagań jakościowych i funkcjonalnych, jak również na zmniejszenie uzależnienia nowoczesnego rolnictwa od środków chemicznych i innych środków produkcji.

Biotechnologia spowoduje lepsze poznanie, ochronę i wykorzystanie zasobów genetycznych, powinna wpłynąć także na bardziej przyjazne środowisku wykorzystywanie innych zasobów naturalnych.

Biotechnologia w praktyce gospodarstwa rolniczego czy hodowlanego to sadzonki roślin ozdobnych produkowane *in vitro*, „sztuczne nasiona”, odmiany pomidorów o przedłużonym okresie dojrzewania — tak rozumiana biotechnologia to jednak tylko szczyt ogromnej góry lodowej badań podstawowych, obejmujących oprócz problematyki struktury genomu i regulacji jego funkcjonowania

przez czynniki ustrojowe i zewnętrzne, także badania różnorodnych procesów biochemicznych i biofizycznych związanych z metabolizmem żywej komórki.

W prezentowanym zeszycie *Kosmosu* proponujemy zestaw artykułów dobrych tak, aby choć w części odzwierciedlić złożoność owej góry lodowej. Pierwsza z prac przedstawia *Arabidopsis thaliana* L. czyli rzodkiewnik pospolity — organizm, który dla biologii molekularnej roślin jest tym, czym *Drosophila* w badaniach nad zwierzętami. Kolejne trzy prace dotyczą organizacji i ekspresji genomu roślinnego. Następny artykuł — M. Krzymowskiej i J. Henninga — rozpoczyna zestaw poświęcony jednemu z bardziej istotnych kierunków w biotechnologii, jakim jest poszukiwanie naturalnych mechanizmów odporności roślin na szkodniki i patogeny i przenoszenie tych mechanizmów do roślin uprawnych. W tym samym zestawie znalazły się artykuły poświęcone symbiozie motylkowatych z bakteriami wiążącymi azot cząsteczkowy, a to z racji problemu „dialogu” pomiędzy rośliną a mikroorganizmem, charakterystycznego zarówno dla patogenezy, jak i symbiozy. Kolejne cztery prace dotyczą zagadnień regulacji procesów życiowych roślin przez fitohormony oraz wpływu na nie czynników abiotycznych. Blisko wierzchołka góry lodowej — praktyki biotechnologicznej w rolnictwie — sytuują się zagadnienia poruszane w końcowych sześciu artykułach. Dyskutują one zagadnienia bezpośrednio związane z produkcją roślin transgeniczných w laboratorium i ich przeniesieniem do upraw polowych. Pierwsze dwa artykuły w tej serii poświęcono różnym metodom transformacji roślin, następny — kontrolowaniu morfogenezy roślin w kulturach *in vitro* ze szczególnym naciskiem na somatyczną embriogenezę. Kolejna praca omawia możliwości uzyskania i zastosowania w biotechnologii haploidów roślin. Artykuł E. M. Szewczyk referuje możliwości przeniesienia do roślin bakteryjnych genów syntezy biodegradowalnych poliestrów. Następna praca dotyczy ważnego zagadnienia uzyskania odmian roślin uprawnych, odpornych na zakażenie nicieniami. Artykuł S. Malepszego, ostatni w tym zeszycie, traktuje o przydatności roślin transgeniczných w hodowli, testowaniu wartości odmian transgeniczných w warunkach polowych i — wreszcie — ich uprawie polowej.

W. G. Grinowli

INTRODUCTION

The enormous increase in agricultural output achieved within the last decades was due mainly to progress in mechanization, to increased application of fertilizers and pesticides, as well as to introduction of highly productive plant varieties and lines of breeding animals. However, it seems that optimization of the production processes, which give most spectacular results in modern, computer-controlled green houses and breeding farms, is reaching the limits of its effectiveness: the increase in expenditure leads no more to an adequate increase of income. What is much worse, the production methods which led to the "green revolution" have brought also dangerous side effects. Deep degradation of the natural environment is manifested by decreased area of forests and other arable lands of ecological importance, by water eutrophization, by erosion and pollution of soil. Moreover, there appeared pesticide-resistant lines selected from natural populations of common weeds, insects and pathogens.

It seems that the approaching economic and ecological dilemma could be solved by applying in agriculture the methods and means of production created in biotechnological laboratories.

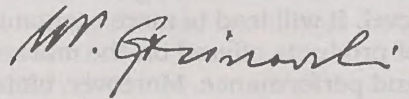
Every technique making use of a living organism to produce or modify a defined product, to improve some properties of plants and animals, or to construct microorganisms with the desired useful properties belongs to the field of biotechnology. The techniques of DNA recombination, commonly termed "genetic engineering", serve as the basis of modern biotechnology. They make possible the transfer to any chosen organism of any gene cloned out of any other organism, with a precision and speed incomparably higher than it is possible to achieve by conventional breeding methods.

Biotechnology, applied together with traditional methods of agriculture, will permit to raise the agricultural output and maintain it at a permanently high level. It will lead to more economical processing of crops and increased diversity of products offered on the market, assuring at the same time their high quality and performance. Moreover, biotechnology could lower the present-day dependence of modern agriculture on chemicals and other potentially noxious means of production. It will give rise to better knowledge, protection and utilization of genetic resources, and will also lead to more environment friendly use of other natural resources.

Biotechnology in the farm practice means the possibility of taking advantage of the ornamental plants seedlings produced *in vitro*, of "artificial seed" or tomato varieties with a delayed ripening. These practical aspects of biotechnology correspond, however, only to a peak of an enormous iceberg, the main body of which consists of basic scientific research, encompassing not only the problems

of genome structure and regulation of its function by endogenous or exogenous factors, but also studies on a variety of biochemical and biophysical processes related to the metabolism of a living cell.

The issue of *Kosmos* now presented to the reader contains a collection of papers chosen in such a way as to reflect, at least partly, the complexity of the biotechnological "iceberg". The first paper concerns *Arabidopsis thaliana*, an organism which serves in plant molecular biology the same purpose as does *Drosophila* in studies on animals. Three successive papers concern organization and expression of plant genome. The next one, by M. Krzymowska and J. Hennig, is the first of a series devoted to one of the most important trends in biotechnology, i.e. the research into natural mechanisms of plant resistance to pests and pathogens, and introducing those mechanisms into cultivated plants. In the same series are included the papers dealing with symbiosis of the *Papilionaceae* plants with the molecular-nitrogen fixing bacteria. This problem is of special interest because of the plant-microorganism "dialogue" which is characteristic of both pathogenesis and symbiosis. The following four papers discuss regulation of plant life processes by phytohormones, and the effect exerted by abiotic factors. Near the summit of the "iceberg", i.e. the implementation of biotechnological methods in agricultural practice, can be located the questions discussed in the six papers closing the issue. They are focused on the problems related to production of transgenic plants in the laboratory and their subsequent transfer to field cultures. The first two papers of this series are devoted to various plant transformation methods, the next one — to control of plant morphogenesis in *in vitro* cultures, with special emphasis on somatic embryogenesis. The fourth paper concerns the possibility of raising haploid plants and their utilization in biotechnology. The paper by E.M. Szewczyk examines the perspectives of transferring into plants of the bacterial genes encoding synthesis of biodegradable polyeasters. The next paper approaches the important question of obtaining varieties of cultivated plants that would be resistant to nematod infection. The last paper, by S. Malepszy, considers the usefulness of transgenic plants in agriculture, for assessment in field trials of the value of the varieties obtained, as well as in large-scale cultivation.



ANDRZEJ JERZMANOWSKI

Instytut Biologii Eksperymentalnej Roślin Uniwersytetu Warszawskiego
i Instytut Biochemii i Biofizyki Polskiej Akademii Nauk
Pawińskiego 5A, 02-106 Warszawa

ARABIDOPSIS THALIANA — ORGANIZM MODELOWY W BIOLOGII MOLEKULARNEJ ROŚLIN

DLACZEGO ARABIDOPSIS?

Każdy, kto zetknął się z biologią wie, jak wielkie znaczenie dla postępu tej nauki miały wyniki badań nad genetyką małej muszki owocowej *Drosophila melanogaster*. Analiza genetyczna mutantów, uzupełniona później o analizę na poziomie molekularnym, umożliwiła poznanie wielu prawidłowości dotyczących dziedziczenia cech, funkcjonowania aparatu genetycznego i regulacji różnych procesów fizjologicznych w złożonych organizmach zwierzęcych.

Potrzeba znalezienia organizmu, który pełniłby rolę roślinnej muszki *Drosophila*, istniała od dawna. Sprawa stała się pilna w połowie lat osiemdziesiątych, kiedy rozpoczęto przygotowania do uruchomienia megaprojektów biologicznych zmierzających do sekwencjonowania kompletnych genomów. Złożoność organizacji i ogromny koszt tych projektów wykluczają wciąż jeszcze (mimo znacznego postępu w dziedzinie technologii) jednoczesne sekwencjonowanie więcej niż kilku wybranych genomów. Tak więc przyjęte ostatecznie i rozpoczęte programy sekwencjonowania kompletnych genomów, które dotyczą bakterii *Escherichia coli*, drożdży, nicienia *Caenorhabditis elegans*, muszki *Drosophila*, myszy, człowieka i rzodkiewnika (*Arabidopsis thaliana*) — rośliny z rodziny krzyżowych podniosły wymienione organizmy (a właściwie gatunki, które reprezentują) do rangi prawdziwych superobiektów doświadczalnych w biologii.

Dlaczego jako reprezentanta świata roślin wybrano *Arabidopsis*, niepozorny chwast bez jakiegokolwiek wartości użytkowej? Nie ma co ukrywać, że dokonując wyboru brano pod uwagę przede wszystkim cechy korzystne w badaniach genetycznych.

GENETYKA KLASYCZNA

Arabidopsis jest rośliną małą (dojrzała osiąga zaledwie 20–25 cm), do jej uprawy potrzeba bardzo niewiele miejsca. Na powierzchni 100 cm² można bez trudu hodować kilkadziesiąt roślin. Krótki czas życia (od wysiania nasion

pokolenia F1 do zebrania nasion pokolenia F2 upływa zaledwie 5-6 tygodni) umożliwia szybkie otrzymywanie i testowanie nowych linii genetycznych. *Arabidopsis* rośnie dobrze w warunkach laboratoryjnych, w ziemi bądź w sterylnych pożywkach o zdefiniowanym składzie.

Proste wymagania dotyczące światła, temperatury i składu podłoża oraz niewielka powierzchnia wystarczająca do hodowli znacznej nawet liczby roślin pozwalają uznać *Arabidopsis* za wyjątkowo tani, a zatem nadający się do powszechnego użycia obiekt doświadczalny.

Z punktu widzenia analizy genetycznej szczególne znaczenie ma możliwość wywoływania mutacji w dużych liczbowo populacjach *Arabidopsis* oraz łatwość identyfikowania osobników o zmienionych fenotypach.

W przypadku *Arabidopsis* mutagenizowaniu poddaje się nasiona. Każde z nasion tej rośliny zawiera tylko kilka komórek, z których rozwijają się później organy reproduktywne. Mutacja w DNA jednej z takich komórek jest zatem powielona w komórkach potomnych tworzących określony fragment rośliny dorosłej. Wszystkie komórki tego fragmentu są identycznymi heterozygotami w odniesieniu do zmutowanego genu. Powstający w tym miejscu kwiat zawiera gamety, z których połowa niesie chromosom z mutacją. Ponieważ w *Arabidopsis* kwiaty ulegają w sposób naturalny samozapyleniu (cecha niezwykle ułatwiająca badania genetyczne), jedna czwarta powstałych nasion pokolenia F2 będzie homozygotyczna w stosunku do nowej mutacji. Heterozygoty stanowiąc będą dwie trzecie pozostałych nasion.

Mutagenizacja nasion *Arabidopsis* umożliwia łatwe otrzymanie homozygot oraz identyfikację recesywnych mutacji letalnych. Jeśli homozygotyczność w zmutowanym genie wywiera efekt letalny, który zaznacza się już na poziomie embriogenezy, jedna czwarta nasion w strąku nie będzie zdolna do kiełkowania. W tym samym strąku znajdują się jednak heterozygoty, które zachowują mutację i mogą być wykorzystane do analizy genetycznej.

Nasiona *Arabidopsis* są bardzo małe. W plastikowej probówce typu Eppendorfa, o pojemności 1,5 ml, mieści się ich 50 000. Ponieważ do wysiania 10 tysięcy nasion i hodowli otrzymanych z nich roślinek aż do stadium, w którym można zaobserwować zmiany fenotypowe, wystarcza jedna duża szalka Petriego, można poddawać mutagenizacji i testowaniu jednocześnie dziesiątki, a nawet setki tysięcy nasion.

To właśnie możliwość prowadzenia doświadczeń genetycznych na taką skalę czyni z *Arabidopsis* „botaniczną *Drosophilę*”.

Dzięki zastosowaniu opisanych wyżej metod scharakteryzowano do dziś setki różnych mutacji *Arabidopsis* (KONCZ i współred. 1992). Najliczniej reprezentowane wśród nich są mutacje morfologiczne. Dotyczą one wszystkich niemal części i organów rośliny. Wiele mutacji dotyczy enzymów różnych szlaków metabolicznych. Obszerną klasę stanowią mutacje określane jako fizjologiczne lub hormonalne. Wpływają one przede wszystkim na zdolność rośliny do syntetyzowania regulatorów wzrostu, a także na zdolność do reagowania na nie. Bardzo interesujące są mutacje rozwojowe, szczególnie te dotyczące rozwoju kwiatu (MEYEROWITZ 1989).

Komplementacja i mapowanie mutacji za pomocą krzyżówek genetycznych umożliwiły sporządzenie mapy genetycznej *Arabidopsis*. Na pięciu chromoso-

mach tworzących razem haploidalny genotyp *Arabidopsis* ustalono wzajemne pozycje kilkuset różnych genów. Zlokalizowano także położenie centromerów.

BIOLOGIA MOLEKULARNA

W świecie botanicznym *Arabidopsis* reprezentuje grupę organizmów najbardziej zaawansowanych ewolucyjnie — rośliny kwiatowe. Genom *Arabidopsis* okazał się jednak niezwykle mały. Zawiera tylko około 80 000 kb (kilobase — tysiąc par zasad), czyli około 80 milionów par zasad. *Arabidopsis* ma zatem najmniejszy genom wśród badanych dotąd pod tym względem roślin kwiatowych. Dla porównania, genom (w przeliczeniu na haploidalny garnitur chromosomów) tytoniu zawiera 1 600 000 kb, grochu — 4 500 000 kb, pszenicy 5 900 000 kb, a niektórych lilii — aż 30 000 000 kb. Genom skomplikowanego organizmu wielokomórkowego, jakim jest *Arabidopsis*, zawiera tylko nieco ponad pięciokrotnie więcej DNA niż genom jednokomórkowych drożdży i zaledwie 15 razy tyle DNA, co genom bakterii *Escherichia coli*. Genom muszki owocowej jest około dwukrotnie większy. Podobnej wielkości genom co *Arabidopsis* ma natomiast liczący zaledwie trzy tysiące komórek nicięń *Caenorhabditis elegans*. Niewielki genom *Arabidopsis* jest zapewne wynikiem długotrwałej presji selekcyjnej faworyzującej swoistą „ekonomizację” zawartości jądra komórkowego. Znajduje to odzwierciedlenie w organizacji sekwencji DNA. 80% całkowitego DNA stanowią sekwencje występujące w jednej lub kilku kopiach. Są to w większości sekwencje kodujące białka (geny strukturalne wraz z towarzyszącymi im sekwencjami regulatorowymi). Tylko 20% genomu stanowią sekwencje powtarzające się, z czego około połowa to sekwencje często powtarzające się. W genomie *Arabidopsis* niemal zupełnie nie występują rozproszone sekwencje powtarzające się, tak częste w genomach innych roślin.

Do tej pory sklonowano już ponad 200 genów *Arabidopsis*. Pod względem organizacji sekwencji nie różnią się one od typowych genów eukariotycznych. Około połowa z nich wykazuje obecność intronów. Godny uwagi jest fakt, że średnia liczba (2,3 na gen) i wielkość (około 1 kb) intronów w genomie *Arabidopsis* są mniejsze niż w genomach innych roślin.

Nie wiadomo jakie znaczenie dla funkcjonowania niewielkiej rośliny kwiatowej, jaką jest *Arabidopsis*, ma tak daleko posunięta oszczędność w gromadzeniu DNA. Z praktycznego punktu widzenia cecha ta jest niezwykle korzystna, dzięki niej bowiem znajdowanie i klonowanie genów *Arabidopsis* jest niepomierne łatwiejsze niż w przypadku innych roślin. Brak rozproszonych sekwencji powtarzających się umożliwia, na przykład, znajdowanie genów za pomocą tak zwanego „spacerowania po chromosomie”, techniki polegającej na izolowaniu kolejnych, nakładających się fragmentów genomowego DNA.

MUTAGENEZA ZA POMOCĄ INSERCJI T-DNA

Przeważającą większość opisanych dotąd mutantów *Arabidopsis* otrzymano za pomocą wspomnianej już mutagenezy chemicznej nasion. Ten sposób muta-

genizowania jest bardzo skuteczny i wydajny, identyfikacja zmutowanego genu wymaga jednak w każdym przypadku dość żmudnej analizy. W laboratoriach, w których prowadzi się badania nad *Arabidopsis*, zastosowano z powodzeniem inny sposób otrzymywania mutantów, pozwalający na szybką lokalizację genu, w którym zaszła zmiana (FELDMAN i współaut. 1989). Opiera się on na wykorzystaniu przypadkowych insercji do genomu rośliny fragmentów DNA plazmidu Ti z *Agrobacterium tumefaciens* (insercje następują w wyniku transformacji nasion za pomocą *Agrobacterium* zawierającej odpowiednio przekształcony plazmid Ti). Umieszczenie pomiędzy włączonymi do genomu fragmentami DNA plazmidu Ti (tzw. fragmentami T) sekwencji warunkującej oporność na antybiotyki umożliwia, po uzyskaniu nasion pokolenia F₂, selekcję roślin transformowanych, wśród których poszukuje się następnie interesujących mutantów. Jeżeli znalezione mutacje koregują z cechą oporności na antybiotyki, ich przyczyną jest najprawdopodobniej insercja do odpowiedniego genu fragmentu T-DNA (stąd nazwa: mutageniza insecyjna). Uszkodzony gen jest więc zaznaczony sekwencją T. Można go dzięki temu stosunkowo łatwo odnaleźć (np. za pomocą hybrydyzacji próbnika stanowiącego sekwencję T-DNA do DNA klonów składających się na bibliotekę genomową zmutowanej rośliny). W typowym doświadczeniu polegającym na insecyjnej mutagenizie nasion *Arabidopsis*, około 15% stanowią mutacje letalne. Mutacje wywołujące interesujące efekty fenotypowe stanowią około 1%. Wiele laboratoriów dysponuje dużymi zbiorami nasion pokolenia F₂ uzyskanymi po mutagenizie insecyjnej. Zbiory te są na ogół dostępne dla tych, którzy podejmują się szukać w nich interesujących mutantów.

FIZYCZNA MAPA CHROMOSOMÓW I SEKWENCJONOWANIE GENOMU

Dostępna obecnie fizyczna mapa chromosomów *Arabidopsis* składa się ze zbioru wektorów (są nimi w tym przypadku tzw. kosmidy lub sztuczne chromosomy drożdżowe zwane YAC) zawierających duże fragmenty genomowego DNA pochodzące z poszczególnych chromosomów. Ułożenie fragmentów w stosunku do siebie w chromosomie ustalono dzięki analizie ich nakładających się obszarów. Skonstruowanie fizycznej mapy genomu *Arabidopsis* (obok niej istnieje też szczegółowa mapa gentyczna) umożliwiło rozpoczęcie międzynarodowego programu sekwencjonowania. Jest realizowany na podobnej zasadzie, jak wcześniej rozpoczęty program sekwencjonowania genomu drożdży. Ośrodki pełniące funkcję koordynatorów lokalnych sprawują nadzór nad rozdziałem wektorów zawierających fragmenty genomowego DNA pomiędzy poszczególne laboratoria, w których wykonuje się sekwencjonowanie. Odczytane sekwencje poddawane są weryfikacji, a po jej pomyślnym przejściu — gromadzone w centralnej bazie danych. Gross sekwencjonowania wykonują laboratoria w krajach Europy Zachodniej, USA i Japonii. Należy tu wspomnieć, że w projekcie sekwencjonowania genomu *Arabidopsis* od 1995 roku biorą także udział laboratoria Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN w Warszawie.

SEKWENCJONOWANIE FRAGMENTÓW DNA, KTÓRY ULEGA EKSPRESJI —
BAZA DANYCH EST

Uzyskanie pełnego obrazu organizacji materiału genetycznego organizmu wymaga sekwencjonowania całego genomu. Tylko znajomość pełnej sekwencji genomowego DNA pozwoli w przyszłości na analizę skomplikowanych relacji między sekwencjami kodującymi białko, a sekwencjami regulatorowymi oraz między samymi sekwencjami regulatorowymi. Jednak dla wielu badaczy znacznie większe niż znajomość sekwencji przypadkowych obszarów w chromosomach ma znajomość sekwencji DNA kodującego białka. Z tego powodu, niemal równocześnie z podjęciem sekwencjonowania genomów rozpoczęto gromadzenie danych o sekwencjach fragmentów DNA przepisanych z mRNA (tzw. cDNA). Z biegiem czasu sekwencjonowanie cDNA przybrało postać niezależnych międzynarodowych projektów badawczych. Podejście do gromadzenia danych o sekwencjach cDNA uległo w ostatnich latach ciekawej ewolucji. Zamiast starannego sprawdzania każdej podanej sekwencji i dbałości o to, by przedstawiała ona DNA odpowiadający pełnemu mRNA (tj. zawierającemu kodon inicjacyjny i terminacyjny, najlepiej wraz z obecnymi na 5'- i 3'-końcu sekwencjami nie ulegającymi translacji) przyjęto strategię postępowania, którą w języku angielskim określa się jako „quick and dirty”. Polega ona na sekwencjonowaniu przypadkowych zbiorów mRNA przekształconych w cDNA za pomocą jednokrotnej reakcji odwrotnej transkryptazy. Produktami takiej reakcji są zwykle krótkie odcinki cDNA kodujące polipeptydy, których średnia długość nie przekracza 100 aminokwasów. Odcinki takie nazywa się znacznikami sekwencji ulegających ekspresji, po angielsku EST (expressed sequence tags).

O ile zbiory EST mogą służyć jako zwyczajne narzędzia badawcze biologii molekularnej, na przykład do charakterystyki profilu ekspresyjnego organizmu lub tkanki bądź do identyfikacji eksonów, ich prawdziwe znaczenie polega na czym innym. Ponieważ bazy danych EST rosną bardzo szybko i w przypadku najważniejszych organizmów modelowych biologii osiągnęły już stan bliski nasycenia (reprezentują większość produkowanych przez dany organizm mRNA) uczeni zajmujący się biologią molekularną stanęli nagle w obliczu sytuacji, która wymaga zasadniczej zmiany spojrzenia na strategię badawczą. W końcu września 1995 baza danych EST człowieka zawierała 270 tysięcy, a *Arabidopsis* blisko 25 tysięcy sekwencji. Przy tak licznych zbiorach szansa znalezienia sekwencji homologicznej do dowolnego znanego już genu jest bardzo wysoka. Można zatem podchodzić do rozwiązywania problemów biologicznych w sposób stanowiący swoiste odwrócenie strategii stosowanej do tej pory. Zamiast poszukiwać białek odpowiedzialnych za przebieg badanych procesów, a następnie szukać kodujących je genów, badać przebieg ich transkrypcji itp. można w bazach danych EST zidentyfikować od razu odpowiednie sekwencje na podstawie ich homologii do sekwencji już znanych, na przykład kodujących białka, biorące udział w analogicznych procesach u innych organizmów. Uczeni zajmujący się *Arabidopsis* znajdują się tu w wyjątkowo korzystnej sytuacji, mogą bowiem otrzymać bezpłatnie klony zawierające sekwencje dowolnych EST. Klony mogą być zamawiane

pocztą elektroniczną z centralnej depozytorni materiału genetycznego *Arabidopsis* znajdującej się w stanie Ohio w USA.

W naszym laboratorium, dzięki informacjom zawartych w bazie danych EST, udało się zidentyfikować, a następnie zsekwencjonować geny *Arabidopsis* kodujące ważne regulatory transkrypcji. Wykrycie homologów znanych genów w zbiorze EST *Arabidopsis* umożliwia nam także analizę mechanizmów molekularnych związanych z odpowiedzią roślin na stres chłodowy.

Dzięki wysiłkom biologów molekularnych pracujących nad genomem *Arabidopsis* udało się w ciągu ostatnich kilku lat ujawnić nowe fakty dotyczące sposobu działania substancji wzrostowych, odpowiedzi roślin na światło i inne czynniki środowiskowe, a także podstaw molekularnych procesów morfogenetycznych (MEYEROWITZ i SOMERVILLE 1995). Z pewnością żaden inny organizm, wykorzystywany w tym samym okresie jako materiał badawczy, nie przyczynił się w porównywalnym stopniu do postępu wiedzy o biologii roślin.

ARABIDOPSIS, A MODEL ORGANISM OF PLANT MOLECULAR BIOLOGY

Summary

The advantages of using *Arabidopsis* in genetic, molecular, biochemical and physiologic studies are discussed.

LITERATURA

- FELDMAN K. A., MARKS M. D., CHRISTIANSON M. L., QUATRANO R. S., 1989. A dwarf mutant of *Arabidopsis* generated by T-DNA insertion mutagenesis. *Science* 243, 1351–1354.
- KONCZ C., CHUA, N. Ch., SCHELL J. (red) 1992. *Methods in Arabidopsis Reserach*. World Scientific Publishing, London.
- MEYEROWITZ E. M., 1989. *Arabidopsis*, a useful weed *Cell* 56, 263–269.
- MEYEROWITZ E. M., SOMERVILLE Ch. R., (red) 1995. *Arabidopsis* Cold Spring Harbor Laboratory Press.

ANDRZEJ B. LEGOCKI

*Instytut Chemii Bioorganicznej PAN
Z. Noskowskiego 12/14, 61-704 Poznań*

ORGANIZACJA I BUDOWA GENOMU ROŚLINNEGO

Ewolucja wykształciła dwie odrębne strategie różnicowania i rozwoju organizmów wielokomórkowych: dla organizmów zwierzęcych, które posiadają zdolność do przemieszczania się oraz dla organizmów roślinnych, które są w zasadzie przypisane do jednego miejsca. Dla roślin stało się to podstawą do wykształcenia ich genetycznej i metabolicznej plastyczności w odpowiedzi na bodźce zewnętrzne i zmienność środowiska.

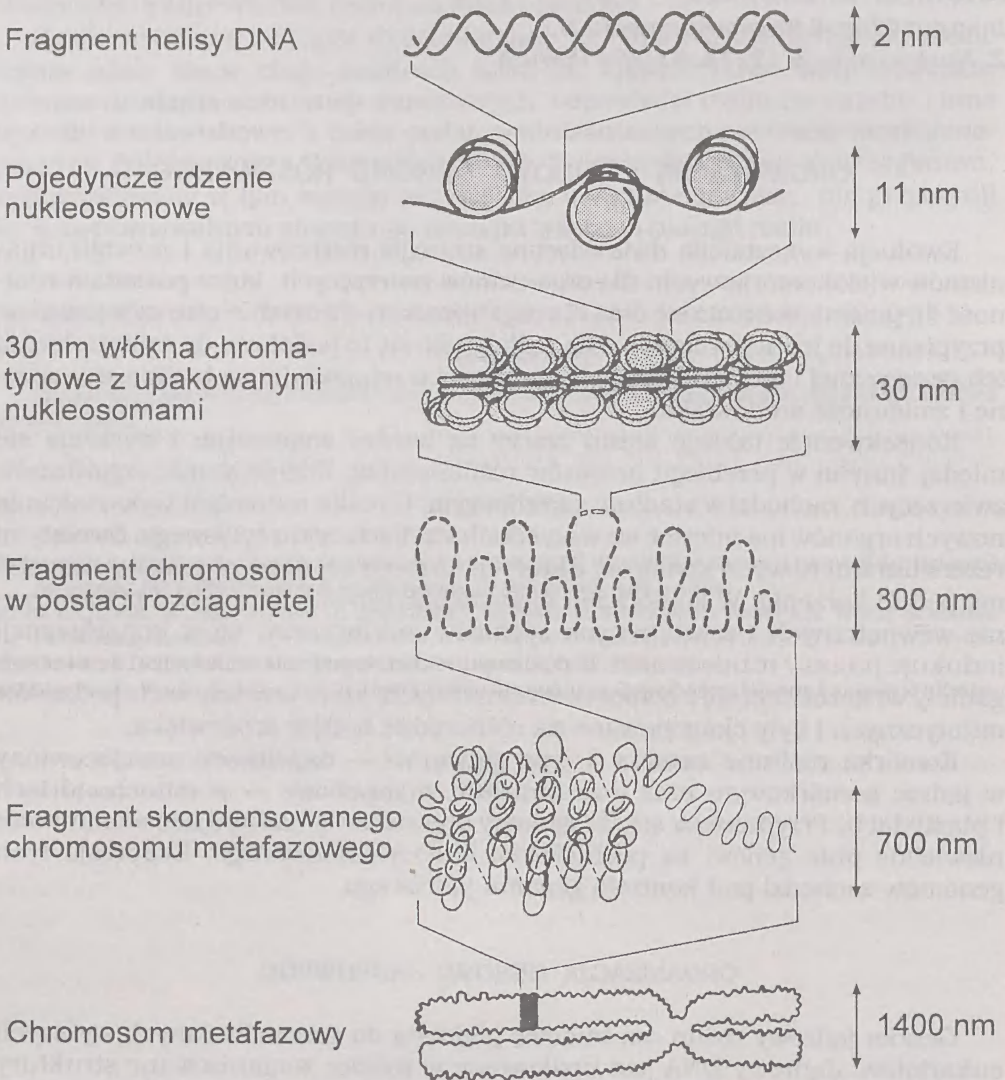
Konsekwencje takiego stanu rzeczy są bardzo znamienne i wyrażają się między innymi w przebiegu procesów różnicowania. Różnicowanie organizmów zwierzęcych zachodzi w stadium zarodkowym. U roślin natomiast wykształcanie nowych organów ma miejsce we wszystkich stadiach cyklu życiowego. Swoistymi rezerwuarami nowych komórek, z których formują się nowe organy są merystemy pędu i korzenia. W komórkach merystematycznych ma miejsce przetwarzanie wewnętrznych i zewnętrznych sygnałów morfogenezy, co w konsekwencji indukuje procesy różnicowania. U roślin ponadto, w przeciwieństwie do zwierząt, gamety wykształcają się z komórek somatycznych, które przeszły wiele podziałów mitotycznych i były ekspozowane na różnorodne bodźce środowiska.

Komórka roślinna zawiera 3 typy genomów — największy umiejscowiony w jądrze komórkowym oraz dwa mniejsze, organellowe — w mitochondriach i plastydach. Przypuszcza się, że genomy organellowe, zawierające stosunkowo niewielkie pule genów, są pochodzenia endosymbiotycznego. Ekspresja tych genomów zachodzi pod kontrolą genomu jądrowego.

ORGANIZACJA GENOMU JĄDROWEGO

Genom jądrowy roślin ma budowę podobną do genomów innych wyższych eukariotów. Jądrowy DNA jest upakowany w wysoce zorganizowane struktury chromosomów. Uporządkowanie materiału genetycznego ma charakter wielopozomowy — od ułożonych w podwójne helisy łańcuchów DNA, z którymi są związane białka jądrowe, poprzez struktury chromatyny skupiające obszerne

fragmenty genomu, aż do skondensowanych chromosomów metafazowych (rys. 1). Chromosomy takie stają się aktywne transkrypcyjnie w interfazie cyklu komórkowego, kiedy to rozluźnienie upakowania umożliwia cząsteczkom polimerazy RNA i czynnikom transkrypcyjnym dostęp do łańcuchów DNA i rozpoczęcie procesu transkrypcji. W ten sposób zostaje zainicjowany proces odczytania informacji genetycznej, zawartej w chromosomowym DNA.



Rys. 1. Schemat hierarchii i organizacji upakowania chromatyny odpowiadający skondensowanym chromosomom metafazowym roślin (wg WATSON i MURPHY 1993).

Poziom zawartości jądrowego DNA w komórce jest wielkością stałą i charakterystyczną dla danego gatunku. Oznaczoną chemicznie zawartość DNA można odnieść do pojedynczego jądra komórkowego i wyrazić jako wartość 1C lub 2C,

przy czym wartość 1C odnosi się do zawartości DNA w niereplikującym haploidiu. Zawartość jądrowego DNA waha się u różnych gatunków roślin od 0,5 do 200 pikogramów (BENNETT i współaut. 1982) (tab. 1).

Tabela 1

Zawartość jądrowego DNA w roślinach wyższych (wybrane przykłady)

	Zawartość DNA (g/genom)	Ploidalność
<i>Arabidopsis thaliana</i> (rzodkiewnik pospolity)	$0,20 \times 10^{-12}$	(2x = 10)
<i>Raphanus sativus</i> (rzodkiew zwyczajna)	$0,40 \times 10^{-12}$	(2x = 18)
<i>Lycopersicon vulgare</i> (pomidor)	$0,75 \times 10^{-12}$	(2x = 24)
<i>Glycine maõ</i> (soja)	$0,90 \times 10^{-12}$	(4x = 40)
<i>Oryza sativa</i> (ryż)	$1,00 \times 10^{-12}$	(2x = 24)
<i>Beta vulgaris</i> (burak zwyczajny)	$1,20 \times 10^{-12}$	(2x = 18)
<i>Solanum tuberosum</i> (ziemniak)	$2,10 \times 10^{-12}$	(4x = 48)
<i>Gossypium hirsutum</i> (bawełna)	$3,00 \times 10^{-12}$	(4x = 52)
<i>Nicotiana tabacum</i> (tytoń)	$3,90 \times 10^{-12}$	(4x = 48)
<i>Zea mays</i> (kukurydza)	$3,90 \times 10^{-12}$	(2x = 20)
<i>Pisum sativum</i> (groch)	$4,90 \times 10^{-12}$	(2x = 14)
<i>Lolium perenne</i> (trawa życica trwała)	$4,90 \times 10^{-12}$	(2x = 14)
<i>Hordeum vulgare</i> (jęczmień)	$5,60 \times 10^{-12}$	(2x = 14)
<i>Secale cereale</i> (żyto)	$9,50 \times 10^{-12}$	(2x = 14)
<i>Vicia faba</i> (bób)	$13,30 \times 10^{-12}$	(2x = 12)
<i>Avena sativa</i> (owies)	$13,70 \times 10^{-12}$	(2x = 42)
<i>Allium cepa</i> (cebula)	$16,80 \times 10^{-12}$	(2x = 16)
<i>Triticum aestivum</i> (pszenica heksaploidalna)	$17,30 \times 10^{-12}$	(6x = 42)
<i>Haemanthus katharinae</i> (krasnokwiat)	$59,00 \times 10^{-12}$	(2x = 16)

1 pikogram (10^{-12} g) = $0,965 \times 10^9$ par zasad lub $6,4 \times 10^{11}$ daltonów. Dla porównania: zawartość DNA (g/genom) wynosi: CaMV – $0,84 \times 10^{-17}$, chloroplast grochu – $1,3 \times 10^{-16}$, *Escherichia coli* – $4,0 \times 10^{-15}$, człowiek – 6×10^{-12} .

Pojemność kodująca genomu roślinnego, oszacowana na podstawie zawartości jądrowego DNA u różnych gatunków roślin znacznie przekracza liczbę genów ulegających ekspresji. Zjawisko to jest związane z występowaniem w genomie dużych ilości powtarzalnych sekwencji DNA, które nie posiadają zdolności kodujących, a ich ilość jest skorelowana dodatkowo z rozmiarami genomu. Przyjmuje się szacunkowo, że liczba genów strukturalnych kodujących białka wynosi w genomie roślinnym 30–70 tysięcy, to jest 10–20 razy więcej niż u *E. coli*. Przy założeniu, że białko roślinne składa się średnio z 350 aminokwasów, można przyjąć, że średnia długość genu roślinnego kodującego polipeptyd wynosi 2000 pz łącznie z intronami i regionami regulatorowymi. Oszacowana dla takiego wyliczenia wielkość tej części genomu jądrowego, która koduje białka, wynosiłaby 60–140 $\times 10^6$ pz, co stanowi zaledwie małą część całkowitego genomu roślinnego (np. dla genomu grochu nie więcej niż 4%).

GENOMY ORGANELLOWE

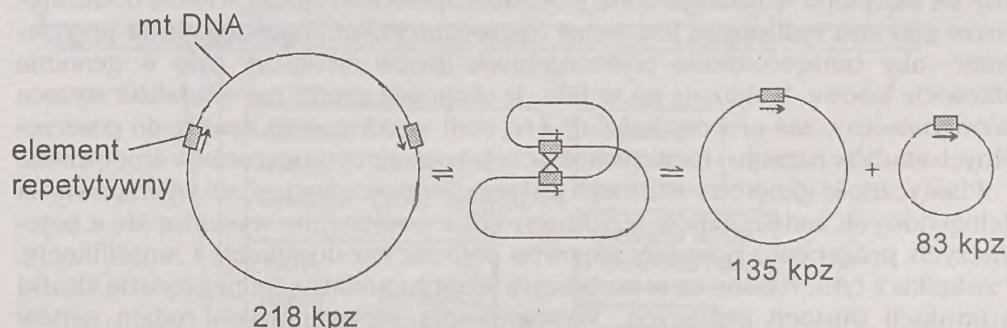
Genomy organellowe roślin wyższych mają charakter kolistych cząsteczek DNA (mitochondria — mtDNA, chloroplasty — ctDNA). Wyjątek stanowią liniowe mtDNA niektórych niższych eukariotów. W każdej pojedynczej organelli występuje na ogół kilka kopii chloroplastowego lub mitochondrialnego DNA. Mimo iż w genomach organellowych jest zakodowana stosunkowo ograniczona liczba białek, są one zdolne do prowadzenia replikacji swego DNA, transkrypcji, a także syntezy własnych białek. Procesy te zachodzą w stromie chloroplastów oraz w mitochondrialnej matriks. Jakkolwiek odczytywanie informacji genetycznej zdeponowanej w organellach zachodzi przy udziale białek chloroplastów lub mitochondriów, to jednak większość wymaganych komponentów i czynników białkowych potrzebnych dla tych procesów pochodzi z jądra.

Przebieg biosyntezy białka w organellach jest bardzo zbliżony do modelu bakteryjnego. Odnosi się to zwłaszcza do chloroplastów, których rybosomy nie tylko wykazują podobny do *E. coli* typ oporności antybiotykowej (chloramfenikol, streptomycyna, tetracyklina), znaczną homologię strukturalną do prokariotycznych rRNA, ale także funkcjonalne dopasowanie do bakteryjnych tRNA (synteza chloroplastowych polipeptydów rozpoczyna się od N-formylometioniny i może zachodzić z udziałem wszystkich tRNA z *E. coli*). Genom chloroplastowy, na który składa się kolisty DNA o długości 120–160 tys. pz (genom bakteriofaga T4 — 165 kpz) należy dziś do najlepiej opisanych typów genomu roślinnego. Ten sam, charakterystyczny dla danego gatunku, genom występuje u wszystkich plastydów: chloroplastów, chromatoplastów, amyloplastów i elajoplastów.

Obecnie jest poznana całkowita sekwencja kilkunastu chloroplastowych DNA. Dobrym przykładem jest genom chloroplastowy wątrobowca *Marchantia polymorpha* o długości 121,024 pz, który zawiera dwa odwrócone powtórzenia, 10,058 pz każde, zawierające geny rRNA (16S, 23S, 4,5S, 5S) i kilka innych zduplikowanych genów. Odcinki te są rozdzielone dwoma pojedynczymi sekwencjami — krótszą o długości 19,813 pz oraz dłuższą — w której są zlokalizowane geny dla 37 rodzajów tRNA oraz geny strukturalne kodujące białka: 4 podjednostki polimerazy RNA, białka rybosomalne (8 białek podjednostki 50S i 11 białek podjednostki 30S), 19 białek lub podjednostek białkowych aparatu fotosyntetycznego (w tym podjednostkę rybulozo 1,5-bisfosforanu karboksylazy i podjednostki F_0F_1 ATPazy), 10 białek zidentyfikowanych na podstawie homologii sekwencji DNA (homologicznych do podjednostek kompleksu NADH-CoQ reduktazy i ferodoksyny) oraz 28 niezidentyfikowanych otwartych ramek odczytu.

Niektóre regiony genomu chloroplastowego wykazują wysoką homologię do bakteryjnego DNA. Dotyczy to przede wszystkim 4 podjednostek polimerazy RNA i białek rybosomalnych. Istnienie tych homologii wspiera hipotezę o endosymbiotycznym pochodzeniu chloroplastów, która zakłada kolonizację bakterii fotosyntetycznych w pradawnej komórce eukariotycznej. Z kolei homologia niektórych genów kodujących podjednostki kompleksu NADH-CoQ do analogicznych genów pochodzenia mitochondrialnego może sugerować możliwy w trakcie ewolucji przeływ informacji genetycznej pomiędzy plastydami i mitochondriami.

Genomy mitochondrialne, na które składają się koliste cząsteczki mtDNA, a w niektórych przypadkach także dodatkowe linie formy DNA, podlegają znacznemu ewolucyjnemu zróżnicowaniu. Pośród nich genomy roślinne należą do najbardziej różnorodnych, zarówno pod względem organizacji, jak i wielkości — od 200 do 2400 kpz. Ich zróżnicowanie genetyczne wynika głównie z częstych rekombinacji zachodzących w obrębie dużych cząsteczek mtDNA zawierających różnej długości elementy repetytywne (rys. 2). Niektóre mitochondria zawierają oprócz chromosomowego DNA szereg małych kolistych cząsteczek plazmidowych DNA, występujących w różnych formach topologicznych. Ponieważ plazmidy mitochondrialne nie wykazują powinowactwa strukturalnego do chromosomowego DNA organelli, wątpliwości budzi ich funkcja biologiczna w mitochondrium i w komórce.



Rys. 2 Rekombinacja w obrębie mtDNA *Brassica campestris*. Kolisty 218 kpz DNA zawiera dwa elementy repetytywne 2 kpz. Rekombinacja pomiędzy tymi elementami prowadzi do utworzenia dwu mniejszych cząsteczek mtDNA: 135 kpz i 83 kpz (wg PALMER i SHIELDS 1984).

Genom mitochondrialny koduje wszystkie rodzaje rybosomalnego RNA obecne w organelli (26S, 18S, 5S), jak też około 30 rodzajów tRNA. Podobnie jak genomy chloroplastowe, genom mitochondrialny zawiera geny kodujące wiele różnych podjednostek i białek membranowych uczestniczących w transporcie elektronów i syntezie ATP. Ponadto genom ten zawiera szereg sekwencji z niezidentyfikowanymi otwartymi ramkami odczytu oraz sekwencje transkrypcyjnie nieczynne lub kodujące transkrypty, którym nie można przypisać jakiegokolwiek funkcji. Mimo, że organizacja genomu mitochondrialnego oraz przebieg transkrypcji i translacji wykazują cechy typowe dla prokariotów, odnotować należy niespodziewane odstępstwa, jak na przykład występowanie intronów w kilku genach mitochondrialnych. Obecność w mtDNA kilku genów chloroplastowych (np. u *Zea mais* 16S rRNA, tRNA i duża podjednostka Rubisco, u *Oryza sativa* około 6% genomu mitochondrialnego pochodzi z chloroplastów) zdaje się potwierdzać wspomnianą wcześniej wymianę materiału genetycznego pomiędzy organellami w obrębie komórki roślinnej (HIRAI i NAKAZONO 1993).

Z ekspresją mitochondrialnego genomu roślin wyższych jest związane zjawisko tak zwanej cytoplazmatycznej męskiej sterylności. Określenie determinantów genetycznych tego zjawiska, a także udział w nim genów jądrowych ma duże

znaczenie dla hodowli i wyprowadzania hybrydów F_1 takich roślin uprawnych, jak: kukurydza, burak cukrowy, sonecznik i sorgo.

Z budową genomu mitochondrialnego wiąże się niezmiernie ciekawe zjawisko odmienności kodu genetycznego wykorzystywanego w genach mitochondrialnych w porównaniu do wszystkich innych genów prokariotycznego i eukariotycznego (jądrowego i chloroplastowego) pochodzenia.

ORGANIZACJA, BUDOWA I EKSPRESJA GENÓW ROŚLINNYCH

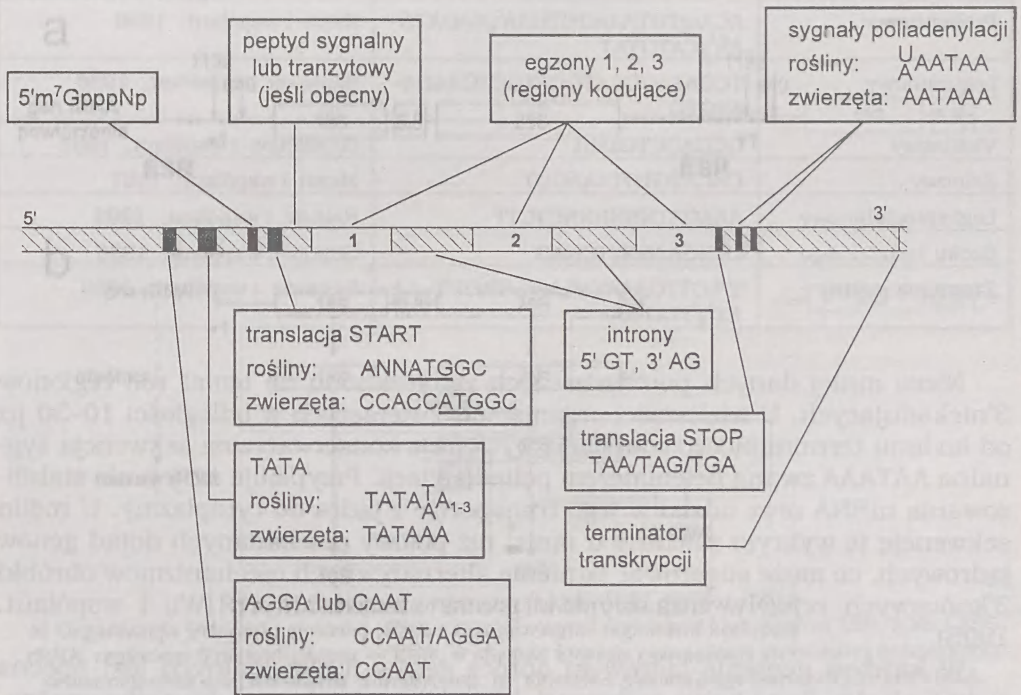
U roślin, podobnie jak u innych organizmów wyższych, organizacja genów ma charakter rozproszony w odróżnieniu do genomu bakteryjnego, w którym geny są skupione w funkcjonalne jednostki operonów. Nasza wiedza o architekturze genomu roślinnego jest wciąż fragmentaryczna. Trudno jednak przypuszczać, aby umiejscowienie poszczególnych genów struktury było w genie całkowicie losowe. Wskazuje na to fakt, iż ekspresja genów ma charakter wysoce skoordynowany, zaś procesy indukcji i represji są odniesione zawsze do poszczególnych stadiów rozwoju i różnicowania, czy też określonych warunków środowiska.

Plastyczność genomu roślinnego jest wynikiem między innymi występowania wielogenowych rodzin genów struktury, które ewolucyjnie wywodzą się z pojedynczych pragenów i powstały zapewne poprzez ich duplikację i amplifikację. W związku z tym, rośliny są w mniejszym stopniu podatne na negatywne skutki akumulacji mutacji genowych. Występowanie wielogenowych rodzin genów struktury umożliwia funkcjonowanie u roślin ważnych mechanizmów adaptacyjnych. Dzięki temu bowiem, że każdy czynny gen tej samej rodziny jest zaopatrzony w odrębny region regulatorowy (promotor) jest możliwe ich indywidualne wyrażanie w różnych sytuacjach rozwoju rośliny czy oddziaływania stresowego. W ten więc sposób roślina przypisana w ciągu swego cyklu życiowego do jednego miejsca może być mniej podatna na mutagenne działanie środowiska. Pojawienie się bowiem mutacji w obrębie jednego genu i jego wyłączenie może być skompensowane przez uruchomienie innego komponentu wielogenowej rodziny, kodującego ten sam produkt.

GENY KODUJĄCE BIAŁKA

Porównanie budowy genów roślinnych z innymi organizmami wyższymi ukazało nie tylko ich podobną organizację, ale także powszechność występowania krótkich sekwencji regulatorowych w obrębie odcinków niekodujących na obu końcach regionów kodujących (elementy strukturalne *cis*). Region 5'końcowy — promotor — uczestniczy w inicjacji i regulacji transkrypcji i jest rozpoznawany przez polimerazę RNA II i współdziałające czynniki transkrypcyjne, podczas gdy region 3'końcowy odgrywa rolę w terminacji transkrypcji i poliadenylacji mRNA (rys. 3). Zarówno w rejonach bliskich, jak i w dystalnych w stosunku do miejsca startu transkrypcji może występować szereg sekwencji sygnałnych wzmacniających, jak i też osłabiających ekspresję. Porównanie tych sekwencji w obrębie określonych klas genów rozwoju, czy genów odpowiedzialnych za

określone szlaki metaboliczne doprowadziło do wyróżnienia tak zwanych sekwencji regulatorowych najwyższej zgodności (*consensus*) np. CAAT czy TATA. Sekwencje te ukazują nie tylko ewolucyjne powiązania pomiędzy gatunkami, ale również świadczą o istnieniu w przyrodzie uniwersalnych mechanizmów kontroli genetycznej u gatunków nawet bardzo odległych.



Rys. 3. Sekwencje regulatorowe w jądrowych genach roślinnych oraz roślinnych mRNA. Dla porównania podano niektóre sekwencje wysokiej zgodności u zwierząt.

Oprócz regionów promotorowych, którym można przypisać cechę gatunkowej specyficzności w szeregu przypadków wyróżniono organo- i tkankowo-swoiste sekwencje dla danego genu, które decydują o jego wyrażeniu w określonym organie czy tkance. Swoiste regiony regulatorowe wykryto także w promotorach genów uczestniczących w procesach rozwoju i odpowiedzi na stres. Wykrycie ich ma nie tylko dużą wartość poznawczą ale także i aplikacyjną, ponieważ sekwencje takie mogą być wykorzystane w ukierunkowanych transformacjach roślin przy wprowadzeniu obcych genów do genomu rośliny-biorcy. Tabela 2 podaje kilka wybranych przykładów sekwencji wysokiej zgodności w obrębie promotorów roślinnych. Sekwencje te mają charakter rozpoznawczych regionów regulatorowych i wyróżniają się wysokim stopniem zachowawczości. Mogą one jednak różnić się pomiędzy sobą zarówno budową, jak i lokalizacją w obrębie regionów niekodujących. Dotyczy to zwłaszcza tych gatunków roślin, które różnią się stopniem ewolucyjnego rozwoju, lub które ewoluowały w różnych warunkach środowiska. Przykładem może być inne niż u większości gatunków umiejscowienie regulatorowych sekwencji sygnałnych w obrębie promotorów genów leghe-

moglobiny u łubinu — jednej z najstarszych roślin motylkowatych (STRÓŻYCKI i LEGOCKI 1995).

Tabela 2

Elementy promotorowe *cis* genów roślin wyższych

Element	Sekwencja	Literatura
Prolaminowy	ACA ^g tGTG ^g TAAAGGTGAA ^t gNAGATG-A ^g _t ^g CATGTAT	KREIS i współaut. 1986
Leguminowy	TCCATAGCCATGCATGCTGAAGA-ATGTC	BÄUMLEIN i współaut. 1986
Vicilinowy	GCCACCTCaattt	GATEHOUSE i współaut. 1986
Zelnowy	CACATGTGTAAAGGT	MAIER i współaut. 1987
Leghemoglobinowy	AAAGATNNNNNCTCTT	RAMLOV i współaut. 1993
Szoku termicznego	CTNGAANNITC ^a NAG	GURLEY i współaut. 1986
Zranienia rośliny	T ^g _t GTTGAAATA ^a _t A ^a —TAGT ^a _t -AA-AT ^a _t ^a _t TATGA	SIEBERTZ i współaut. 1989

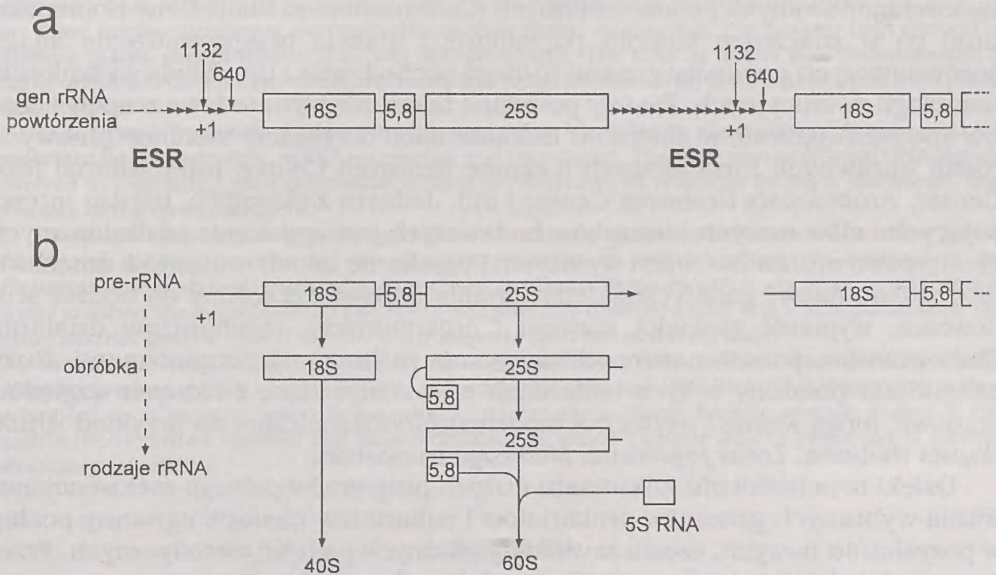
Nieco mniej danych porównawczych zgromadzono na temat roli regionów 3'niekodujących. U większości organizmów zwierzęcych w odległości 10–30 pz od kodonu terminującego translację występuje konserwatywna sekwencja sygnałna AATAAA zwana heksamerem poliadenylacji. Przypisuje się jej rolę stabilizowania mRNA oraz udział w jego transporcie z jądra do cytoplazmy. U roślin sekwencję tę wykryto zaledwie u mniej niż połowy przebadanych dotąd genów jądrowych, co może sugerować istnienie alternatywnych mechanizmów obróbki 3'końcowych rejonów transkryptów genów strukturalnych (WU i współaut. 1995).

W każdym genomie jądrowym oprócz genów funkcjonalnych jest obecna pewna nieokreślona liczba sekwencji, które mają wysokie strukturalne powinowactwo do genów, lecz które nie podlegają ekspresji do funkcjonalnych produktów. Takie pseudogeny uważa się za relikty ewolucji i jakkolwiek mogą one lub ich fragmenty podlegać duplikacji, to można sądzić, że presja ewolucyjnej selekcji prowadzić będzie w przyszłości do ich eliminacji.

GENY KODUJĄCE RNA

Geny kodujące rybosomalne RNA: 18S, 5.8S i 25S RNA są zlokalizowane w genomie jądrowym roślin w obrębie jednej jednostki genowej, która poddana jest transkrypcji do jednociowego, policistronowego produktu przez zlokalizowaną w jąderku polimerazę I RNA (rys. 4). Pierwotny produkt transkrypcji podlega kilkietapowej obróbce łącznie z nukleolitycznym rozcinaniem i modyfikowaniem (głównie metylacją) zasad nukleozydowych. Istotną rolę w regulacji procesu transkrypcji rDNA odgrywa region promotorowy całej jednostki genowej — ESR (external spacer region). Analiza strukturalna tego regionu u kukurydzy i pszenicy wykazała obecność szeregu prostych powtórzeń oraz regionów zachowawczych, które występują także w analogicznych jednostkach genowych u innych roślin.

Cechą charakterystyczną roślinnych genów rybosomalnych jest znaczna zmienność liczby ich kopii w genomie często w obrębie jednego gatunku, a niekiedy nawet w różnych tkankach tej samej rośliny. Inną obserwowaną formą zmienności jest różna długość odcinków międzygenowych, co prowadzi do pojawiania się subpowtórzeń sekwencji w pewnych regionach genomu (ROGERS i BENDICH 1987).



Rys. 4. Schemat organizacji i obróbki genów rRNA.

a) Organizacja jednostki genowej rRNA z zaznaczonymi regionami kodującymi 18S, 5.8S i 25S rRNA, regionem 5'niekodującym — ESR, w obrębie którego zaznaczono strzałkami powtórzenia sekwencji oraz miejsca startu transkrypcji. b) Obróbka pierwotnego transkryptu pre-rRNA.

Geny kodujące niskocząsteczkowe RNA podlegają transkrypcji przez zlokalizowane w nukleoplazmie polimerazę II oraz polimerazę III. Polimeraza II, która przepisuje sekwencje unikalne genomu jądrowego kodujące pulę mRNA dla białek, uczestniczy także w transkrypcji UsnRNA. Ta klasa niskocząsteczkowych rodzajów RNA jest kodowana przez wielogenowe rodziny genów, na przykład u *Arabidopsis thaliana* 10–15 cząsteczek U2snRNA i 8–9 U5snRNA, u kukurydzy i ziemniaka 25–40 U2snRNA (VANKAN i FILIPOWICZ 1989).

Zróznicowana i obszerna grupa genów jądrowych poddawana transkrypcji przez polimerazę III koduje inne niskocząsteczkowe rodzaje RNA: tRNA, U6snRNA, 4.5S RNA i 5S RNA. Porównanie zidentyfikowanych sekwencji tych genów ujawniło wspólne, w obrębie tych klas właściwości RNA, sprowadzające się do tworzenia jednolitych funkcjonalnie i przestrzennie struktur o zdefiniowanej roli biologicznej (BARCISZEWSKA i współaut. 1994)

UWAGI KOŃCOWE

Ogólne reguły organizacji i budowy genomów roślin wyższych (tzn. roślin mających zdolność do kwitnienia) są znane mniej więcej od 10 lat. Zostały one

odniesione do kilkudziesięciu gatunków, z których większość stanowią rośliny o znaczeniu gospodarczym. Zidentyfikowano dotąd kilka tysięcy genów, których budowę nukleotydową poznano częściowo lub w całości. Zostały one wpisane do międzynarodowego banku genów (GenBank), do którego możliwy jest dostęp poprzez liczne programy i sieci komputerowe.

W ostatnich także latach wytyczono zasady klasyfikacji i nomenklatury zsekwencjonowanych genów roślinnych (Commission on Plant Gene Nomenclature) co w znacznym stopniu porządkuje i ułatwia przeprowadzenie analiz porównawczych pomiędzy genami różnego pochodzenia i umożliwia wyszukanie homologii ewolucyjnych. Zostały powołane także międzynarodowe zespoły i centra specjalizujące się w zbieraniu dokumentacji dotyczącej zasobów genowych roślin uprawnych i modelowych (Legume Research Center, International Rice Center, *Arabidopsis* Resource Center i in.). Jednym z głównych, bardzo interesujących celów nowych kierunków badawczych jest uzyskanie zdefiniowanych genotypowo mutantów roślin wyższych. Pozyskanie takich mutantów umożliwiłoby zidentyfikować genetyczne determinanty odpowiedzi rośliny na bodźce środowiska, wyjaśnić zjawiska rozwoju i organogenezy, mechanizmy działania fitohormonów, poznać naturę oddziaływania roślin z mikroorganizmami. Duży nacisk jest położony w tych badaniach na rośliny, które z różnych względów stanowić mogą ważne i użyteczne modele ogólnobiologiczne, na przykład *Arabidopsis thaliana*, *Lotus japonicus*, *Medicago truncatula*.

Dzięki uruchomieniu kilkunastu dużych programów pełnego zsekwencjonowania wybranych genomów prokariotów i eukariotów nastąpił ogromny postęp w pozyskaniu nowych, często zautomatyzowanych podejść metodycznych. Przełomu w tej dziedzinie, bez wątpienia, dokonało uruchomienie programu zsekwencjonowania genomu ludzkiego. Dużego znaczenia nabrały podjęte równoległe projekty zmapowania i zsekwencjonowania genomów roślin wyższych (ryżu, kukurydzy, soi, *Arabidopsis*, *Lotus*, lucerny, tytoniu i in.). Od niedawna szczególnie nacisk w tych projektach jest położony na identyfikację sekwencji kodujących (EST — expressed sequence tags). W połowie 1995 roku zasoby zgromadzone w GenBank wynosiły 425 211 sekwencji, o sumarycznej długości 318 624 586 pz, z czego 255 244 reprezentuje fragmentaryczne sekwencje cDNA lub pełne sekwencje EST (BOGUSKI 1995).

Akumulacja danych sekwencyjnych, mapowanie genomów, przypisanie funkcji poszczególnym genom roślinnym, a także zlokalizowanie ich ekspresji na poziomie tkanki i komórki skupiają dziś uwagę wielu pracowni, stanowiąc solidną podstawę dla poznania i zrozumienia organizacji i funkcji zasobów genowych roślin.

Autor dziękuje dr Z. Michalskiemu i mgr E. Adameczyk za pomoc techniczną w przygotowaniu manuskryptu.

STRUCTURE AND FUNCTION OF THE PLANT GENOME

Summary

All plant cells contain three genomes localized, respectively in the nucleus, mitochondria and plastids. The largest and the most significant is the nuclear genome. The two smaller genome originated from endosymbiotic partners which were engulfed by a primitive eukaryotic cell.

Plant nuclear genome is similar to that of other higher eukaryotes. The nuclear DNA content in different plants ranges from 0.5 to over 200 picograms. The DNA in nuclei and chromosomes is highly organized on different structural levels and range from the DNA double helix up to metaphase chromosome.

A number of relatively short nucleotide sequences identified in plant genes (*cis* elements) are important for transcription, mRNA processing and translation. There are also additional DNA signals involved in regulating gene expression during development, in response to plant hormones, and changes in the environment.

The plastid genomes in higher plants show a number of prokaryotic features. The major part of the plastid genome encodes its own genetic apparatus or proteins which are involved in the photosynthetic system in plant cells. In contrast to plastid genomes which are more or less similar to one another, the mitochondrial genome is exceptionally diverse in both size and organization. The mitochondrial genetic code differs in many respects from the universal code.

Studies on nuclear genes coding for rRNA revealed that rRNA is first transcribed as a polycistronic precursor RNA which contains sequences for 18S and 25S RNA. This transcript is then submitted to processing which is essential to its functions. These include specific 5' and 3' end modifications, intron removal and base modifications which together lead to formation of distinct secondary structures.

LITERATURA

- BARCISZEWSKA M. Z., SZYMAŃSKI M., SPECHT T., ERDMANN V. A., BARCISZEWSKI J., 1994. *Compilation of plant 5S ribosomal RNA sequences on RNA and DNA levels*. Plant Science 100, 117-128.
- BÄUMLEIN H., WOBUS U., PUSTELL J., KAFATOS F. C., 1986. *The legumin gene family: structure of a B type gene of Vicia faba and a possible legumin gene specific element*. Nucl. Acids Res. 14, 2707-2716.
- BENNET M. D., SMITH J. B., HESLOP-HARRISON J. S., 1982. *Nuclear DNA amounts in angiosperms*. Proc. R. Soc. London 216, 179-192.
- BOGUSKI M. S., 1995. *The turning point in genome research*. Trends in Biol. Sci. 20, 295-296.
- GATEHOUSE J. A., EVANS J. M., CROY R. R. D., BOULTER D., 1986. *Upstream sequences required for efficient expression of soybean heat shock gene*. Mol. Cell Biol. 6, 559-567.
- GURLEY W. B., CZARNECKA E., NAGAO R. T., KEY J. T., 1986. *Upstream sequences required for efficient expression of a soybean heat shock gene*. Mol. Cell Biol. 6, 559-568.
- HIRAI A., NAKAZONO M., 1993. *Six percent of the mitochondrial genome in rice came from chloroplast DNA*. Plant Molecular Biology Reporter 11, 98-110.
- KREIS M., WILLIAMSON M. S., FORDE J., SCHMUTZ D., CLARK J., BUXTON B., PYWELL J., MARRIS C., HENDERSON J., HARRIS N., SHEWRY P. R., FORDE B. G., MIFFLIN B. J., 1986. *Differential gene expression in the developing barley endosperm*. Phil. Trans. Roy. Soc. Lond. B. 314, 13-28.
- MAIER U. G., BROWN J. W. S., TOLOCZYKI C., FEIX G., 1987. *Binding of nuclear factor to a consensus sequence in the 5' flanking region of zein gene from maize*. EMBO J. 6, 17-24.
- PALMER J. D., SHIELDS C. R., 1984. *Recombination in plant mtDNA of Chinese cabbage (Brassica campestris)*. Nature 307, 437-440.
- RAMLOV K. B., LAURSEN N. B., STOUGAARD J., MARCKER K. A., 1993. *Site-directed mutagenesis of the organ-specific element in the soybean leghemoglobin *lbc 3* gene promoter*. Plant J. 4, 577-580.
- ROGERS S. O., BENDICH A. J., 1987. *Ribosomal RNA genes in plants: variability in copy number and in the intergenic spacer*. Plant Mol. Biol. 9, 509-520.
- SIEBERTZ B., LOGEMANN J., WILLMITZER, SCHELL J., 1989. *Cis-analysis of the wound-inducible promoter *wun1* in transgenic tobacco plants and histochemical localization of its expression*. Plant Cell 1, 961-970.

- STRÓZYCKI P., LEGOCKI A. B., 1995. *Leghemoglobins from an evolutionarily old legume Lupinus luteus*. Plant Science 110, 83-93
- VANKAN P., FILIPOWICZ W., 1989. *A U-snRNA gene-specific upstream element and a-30 TATA box are required for transcription of the U2snRNA gene of Arabidopsis thaliana*. EMBO J. 8, 3875-3881.
- WATSON M. D., MURPHY D. J., 1993. *Genome organization, protein synthesis and processing in plants*. [W:] *Plant Biochemistry and Molecular Biology*, LEA P. J., LEEGOOD R. C. (red.) J.Wiley & Sons, Chichester, New York, 197-220.
- WU L., UEDA T., MESSING J., 1995. *The formation of mRNA 3'-ends in plants*. Plant J. 8, 323-329.

MICHAŁ M. SIKORSKI

*Instytut Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk
Noskowskiego 12/14, 61-704 Poznań*IDENTYFIKACJA GENÓW ROŚLINNYCH I ICH EKSPRESJA
W BAKTERYJNYM UKŁADZIE EKSPRESYJNYM

ROLA BIAŁEK W FUNKCJONOWANIU ORGANIZMÓW ŻYWYCH

Białka są podstawowymi składnikami każdej żywej komórki pełniąc szereg skomplikowanych funkcji biologicznych decydujących o prawidłowym rozwoju organizmu: (1) jako enzymy kierują wszystkimi procesami chemicznymi niezbędnymi dla utrzymania funkcji życiowych, (2) uczestniczą w aktywnym transporcie metabolitów przez błony komórkowe, (3) kontrolują wzrost i różnicowanie komórek, (4) są składnikami systemów obronnych, (5) kontrolują ekspresję genów, (6) są odpowiedzialne za koordynację ruchów, (7) uczestniczą w przekazywaniu impulsów nerwowych, (8) nadają sztywność strukturalną.

Poznanie struktury i funkcji biologicznej wielu białek stało się możliwe dzięki zastosowaniu metod inżynierii genetycznej i technologii rekombinacji DNA (wyodrębnienie pojedynczych genów lub ich fragmentów kodujących określone białka i ich ekspresji w heterologicznych układach komórkowych).

Zastosowanie białek różnych organizmów w przemyśle produktów spożywczych i farmakologii spowodowało rozwój technologii opierających się na metodach rekombinacji genów wykorzystywanych do szybkiego i stosunkowo łatwego uzyskiwania białek na dużą skalę. W ostatnim czasie obserwuje się duże zainteresowanie białkami, które mogą mieć zastosowanie w diagnostyce i zwalczaniu chorób. Znaczący postęp, jaki w ostatnich latach dokonał się w biologii molekularnej, doprowadził do opanowania produkcji specyficznych białek, takich jak: interferon, hormony, alergeny pyłkowe, składniki krwi, przeciwciała monoklonalne czy wreszcie enzymy hydrolityczne mające duże znaczenie handlowe.

ZALETY KOMÓRKOWYCH UKŁADÓW STOSOWANYCH DO PRODUKCJI
REKOMBINOWANYCH BIAŁEK

UZYSKIWANIE BIAŁEK NA SKALĘ PREPARATYWNĄ

Uzyskanie jednorodnych preparatów białek z natywnej tkanki w ilościach wystarczających do podjęcia badań strukturalnych (oznaczenie struktury kry-

stalograficznej, analiza spektralna) i funkcjonalnych (aktywność biologiczna) jest często utrudnione ze względu na występowanie małych ilości tych białek w tkance. Należałoby wtedy przeprowadzić ekstrakcję z dużej ilości materiału wyjściowego. Pomocna w tej działalności badawczej okazała się technika pozyskiwania szczepów bakteryjnych, drożdży czy komórek zwierzęcych wykazujących nadprodukcję określonych białek po transformacji odpowiednimi wektorami plazmidowymi zawierającymi zintegrowany obcy gen danego białka. Następnie, w odpowiednio skonstruowanych układach komórkowych wywołuje się nadprodukcję obcego białka, które stosunkowo prostymi metodami chromatograficznymi oddziela się od pozostałych białek.

UKIERUNKOWANA MUTAGENEZA BIAŁEK

Technologia rekombinacji DNA stworzyła duże możliwości badania struktury i funkcji białek poprzez łatwe przeprowadzanie ukierunkowanej mutagenezy punktowej z zastosowaniem oligonukleotydów ze zmutowanym pojedynczym nukleotydem. Polega to na wytwarzaniu mutantów na poziomie sekwencji kodujących cDNA w reakcji PCR z użyciem zmutowanych oligonukleotydów i matrycy DNA, w której mutację należy wprowadzić (SIKORSKI i ROŻEK 1994).

PRODUKCJA BIAŁEK W PROCESACH BIOTECHNOLOGICZNYCH

Szczególną rolę w procesach biotechnologicznych pełnią enzymy. Technologia rekombinacji białek została wykorzystana nie tylko do produkcji dużych ilości enzymów, ale także do uzyskiwania enzymów o zwiększonej aktywności i trwałości. Ma to duże znaczenie dla wydajności procesów przemysłowych.

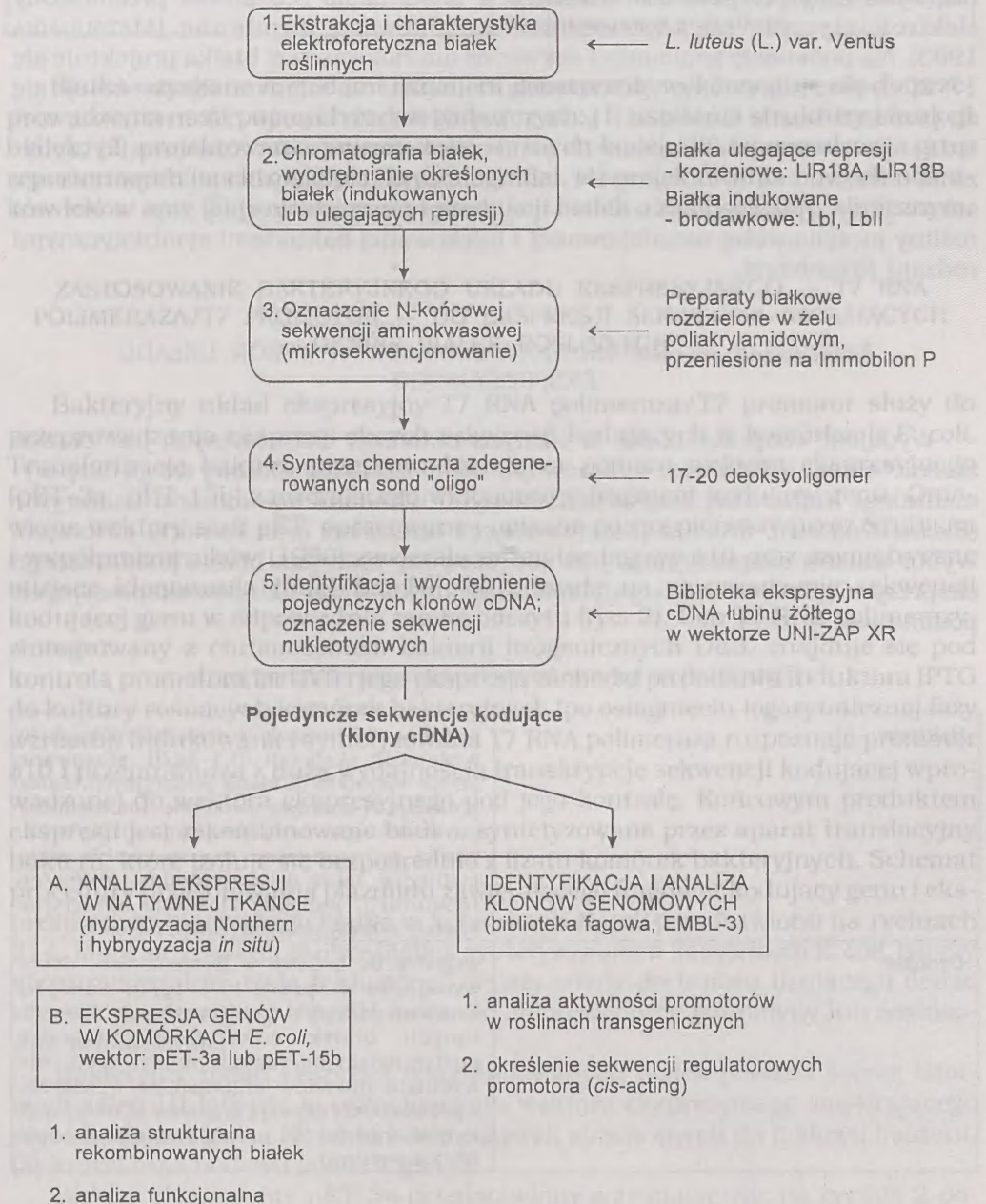
KIEROWANIE METABOLIZMEM KOMÓREK

Przykładem mogą być szczepy bakterii posiadające zdolność zwiększonej produkcji antybiotyku lub szczepy drożdżowe produkujące ze zwiększoną wydajnością etanol. W medycynie spotyka się wiele przypadków patologicznych, wymagających poprawienia metabolizmu pacjentów. Podobnie w przypadku roślin uprawnych czy zwierząt hodowlanych istnieje wielkie zainteresowanie w uzyskiwaniu odmian i gatunków o ulepszonych cechach (np. produkcja warzyw i owoców odpornych na mróz). Wymienione wyżej przykłady wymagają zastosowania technik rekombinacji DNA do produkcji białek o nowych, ulepszonych właściwościach. W tym przypadku rekombinowane białko jest produkowane *in situ* i wykorzystywane bezpośrednio przez odpowiedni organizm.

STRATEGIA POZYSKIWANIA SEKWENCJI KODUJĄCYCH BIAŁKA ROŚLINNE

Produkcja białek roślinnych w układach heterologicznych polega na transformacji komórek bakteryjnych, drożdżowych lub zwierzęcych odpowiednimi wektorami ekspresyjnymi z wprowadzoną do nich sekwencją kodującą obcy gen pod kontrolą określonego promotora. Indukcję transkrypcji obcego genu wywołuje się w odpowiedniej fazie wzrostu komórek. Produkcja białek w układach heterologicznych wymaga jednak posiadania klonów cDNA i znajomości ich

sekwencji nukleotydowej obejmującej pełną sekwencję kodującą dane białko. Przykładowa strategia izolacji pojedynczych sekwencji cDNA z roślin wyższych jest przedstawiona na rycinie 1. Procedura ta jest oparta na przeszukiwaniu bibliotek ekspresyjnych cDNA przygotowanych na bazie poli A⁺RNA wyodrębnio-



Ryc. 1. Ogólny schemat wyodrębniania i analizy sekwencji kodujących białka łubinu żółtego.

nego z tkanek na określonym etapie rozwoju rośliny za pomocą homologicznych sond molekularnych. Sondy projektuje się na podstawie oznaczonej N-końcowej sekwencji aminokwasowej oczyszczonych białek roślinnych. Mikrosekwencjonowanie około 30 N-końcowych reszt aminokwasowych wykonuje się automatycznie wykorzystując preparat białkowy w ilości około 0,5 pmola przeniesiony elektroforetycznie na odpowiednio modyfikowaną membranę (MATSUDAIRA 1993). Na podstawie znajomości sekwencji aminokwasowej białka projektuje się 17-20 deoksyoligonukleotydomową sondę molekularną, którą następnie stosuje się do przeszukiwania biblioteki i izolacji pojedynczych klonów. Alternatywną metodą uzyskiwania homologicznych sond molekularnych jest różnicowa hybrydacja sekwencji cDNA z frakcjami mRNA z tkanek roślinnych i selekcja tą drogą sekwencji specyficznych dla określonego etapu rozwoju rośliny (np. z korzeni rośliny motylkowatej nieinfekowanej i infekowanej bakteriami symbiotycznymi rodzaju *Rhizobium*).

EKSPRESJA REKOMBINOWANYCH BIAŁEK — WYBÓR UKŁADU EKSPRESYJNEGO

Wydajność ekspresji białek w różnych układach ekspresyjnych jest bardzo zróżnicowana. Należy więc wybrać odpowiedni układ komórkowy drogą eksperymentalną. Najbardziej rozpowszechnionymi układami są: komórki bakteryjne (*Escherichia coli*), drożdże (*Saccharomyces cerevisiae*) oraz komórki zwierzęce. Wybór układu ekspresyjnego jest podyktowany rodzajem białka poddawanego ekspresji. Ogólna charakterystyka wymienionych wyżej układów ekspresyjnych podana jest w tabeli 1.

Tabela 1

Charakterystyka komórkowych układów ekspresyjnych

Bakterie	wygodne do hodowli w fermentorach, duża wydajność ekspresji (0,1-5g/l), stosowane przede wszystkim do białek bakteryjnych, białka posiadają N-końcową metioninę, nie zachodzą posttranslacyjne modyfikacje (np. glikozylacja), białka eukariotyczne tworzą zwykle ciała inkluzyjne, łatwe do oczyszczania, trudne do renaturacji, najlepiej stosować bakteryjne sygnały sekrecyjne nie wycinają intronów.
Drożdże	wygodne do hodowli w fermentorach, dobra wydajność ekspresji (0,1-1g/l), najlepiej stosować do białek drożdżowych, ale także do innych białek eukariotów, zachodzą posttranslacyjne reakcje modyfikacji, nie wycinają intronów organizmów wyższych, z powodzeniem używają sygnałów sekrecyjnych innych organizmów, proteoliza może stanowić istotny problem.

Komórki	trudne i kosztowne w prowadzeniu hodowli zwierzęcej na dużą skalę, stosunkowo mała wydajność (0,001–0,1g/l), mogą być głównie stosowane dla białek zwierzęcych, prawidłowo zachodzą procesy modyfikacji, prawidłowo wycinane introny, zwierzęce sygnały sekrecyjne są rozpoznawane prawidłowo.
---------	--

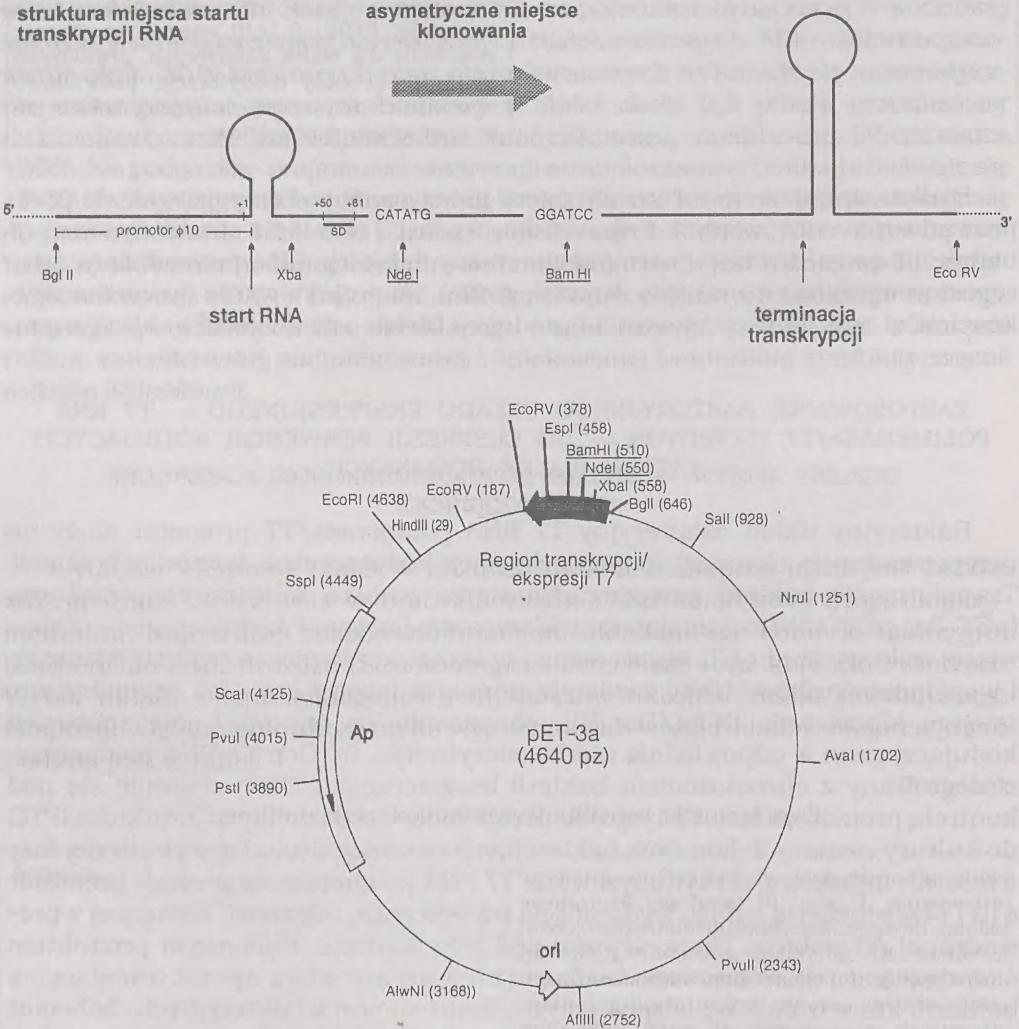
Białka uzyskane metodami inżynierii genetycznej wykorzystuje się do przeprowadzenia następujących zadań badawczych: (1) ustalania struktury i funkcji białek, (2) projektowania przemysłowo ważnych białek, (3) wprowadzania grup reporterowych (spektroskopia, krystalografia), (4) projektowania nowych nośników leków oraz (5) projektowania i produkcji białek o zastosowaniu klinicznym.

ZASTOSOWANIE BAKTERYJNEGO UKŁADU EKSPRESYJNEGO — T7 RNA POLIMERAZA/T7 PROMOTOR — DO EKSPRESJI SEKWENCJI KODUJĄCYCH GENÓW BIAŁEK ROŚLINNYCH

Bakteryjny układ ekspresyjny T7 RNA polimeraza/T7 promotor służy do przeprowadzania ekspresji obcych sekwencji kodujących w komórkach *E. coli*. Transformację bakterii przeprowadza się za pomocą wektora ekspresyjnego (pET-3a, pET-15b) zawierającego wklonowany fragment kodujący genu. Omawiane wektory serii pET, opracowane i opisane po raz pierwszy przez STUDIERA i współpracowników (1990) zawierają promotor fagowy $\phi 10$ oraz asymetryczne miejsce klonowania (*NdeI/BamHI*), co pozwala na wprowadzenie sekwencji kodującej genu w odpowiednią ramkę odczytu (ryc. 2). Gen T7 RNA polimerazy, zintegrowany z chromosomem bakterii lizogenicznych DE3, znajduje się pod kontrolą promotora lacUV5 i jego ekspresja zachodzi po dodaniu induktora IPTG do kultury rosnących komórek bakteryjnych (po osiągnięciu logarytmicznej fazy wzrostu). Indukowana i syntetyzowana T7 RNA polimeraza rozpoznaje promotor $\phi 10$ i przeprowadza z dużą wydajnością transkrypcję sekwencji kodującej wprowadzonej do wektora ekspresyjnego pod jego kontrolę. Końcowym produktem ekspresji jest rekombinowane białko, syntetyzowane przez aparat translacyjny bakterii, które izoluje się bezpośrednio z lizatu komórek bakteryjnych. Schemat procedury przygotowania plazmidu zawierającego fragment kodujący genu i ekspresji rekombinowanego białka w komórkach *E. coli* przedstawiono na rycinach 3 i 4. Może się zdarzyć, że obce białko, syntetyzowane w komórkach *E. coli*, tworzy nierozpuszczalne „ciała inkluzyjne”. Należy wtedy do buforu lizującego dodać czynnik denaturujący (np. 6M mocznik, chlorowodorek guanidyny lub zastosować sonikowanie).

Bakteryjny układ ekspresji rekombinowanych białek posiada szereg istotnych zalet: (1) łatwość w przygotowaniu wektora ekspresyjnego zawierającego część kodującą genu, (2) niski koszt pożywek stosowanych do hodowli bakterii, (3) krótki czas hodowli (około 7 godz.).

Wektor ekspresyjny pET-3a przedstawiony schematycznie na rycinie 2 posiada następujące właściwości: (1) zawiera marker selekcyjny (gen oporności na

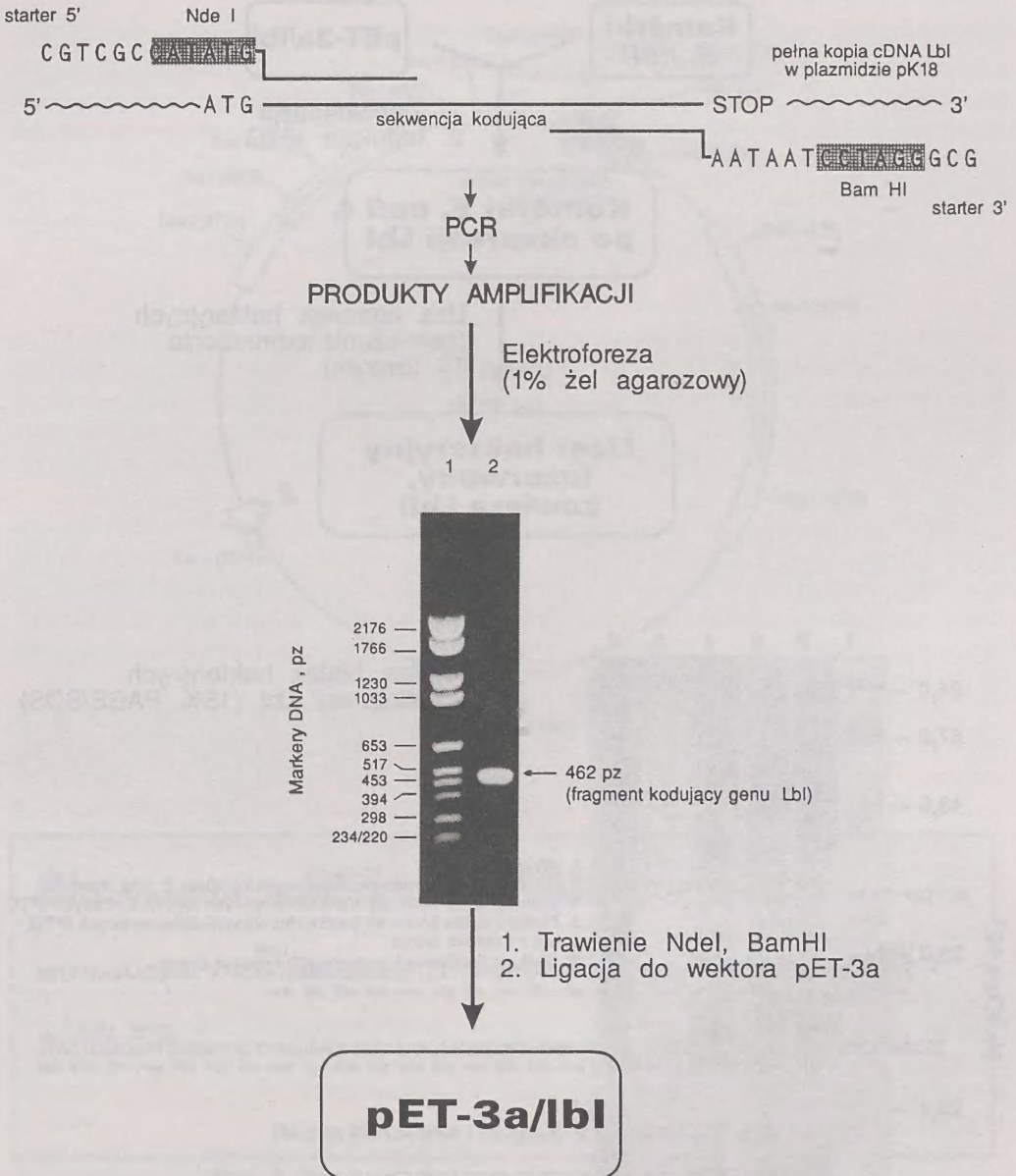


Ryc. 2. Struktura wektora ekspresyjnego pET-3a.

ampicyline), (2) sekwencje odpowiedzialne za kontrolę translacji, (3) asymetryczne miejsce klonowania, (4) promotor $\phi 10$ rozpoznawany przez T7 RNA polimerazę.

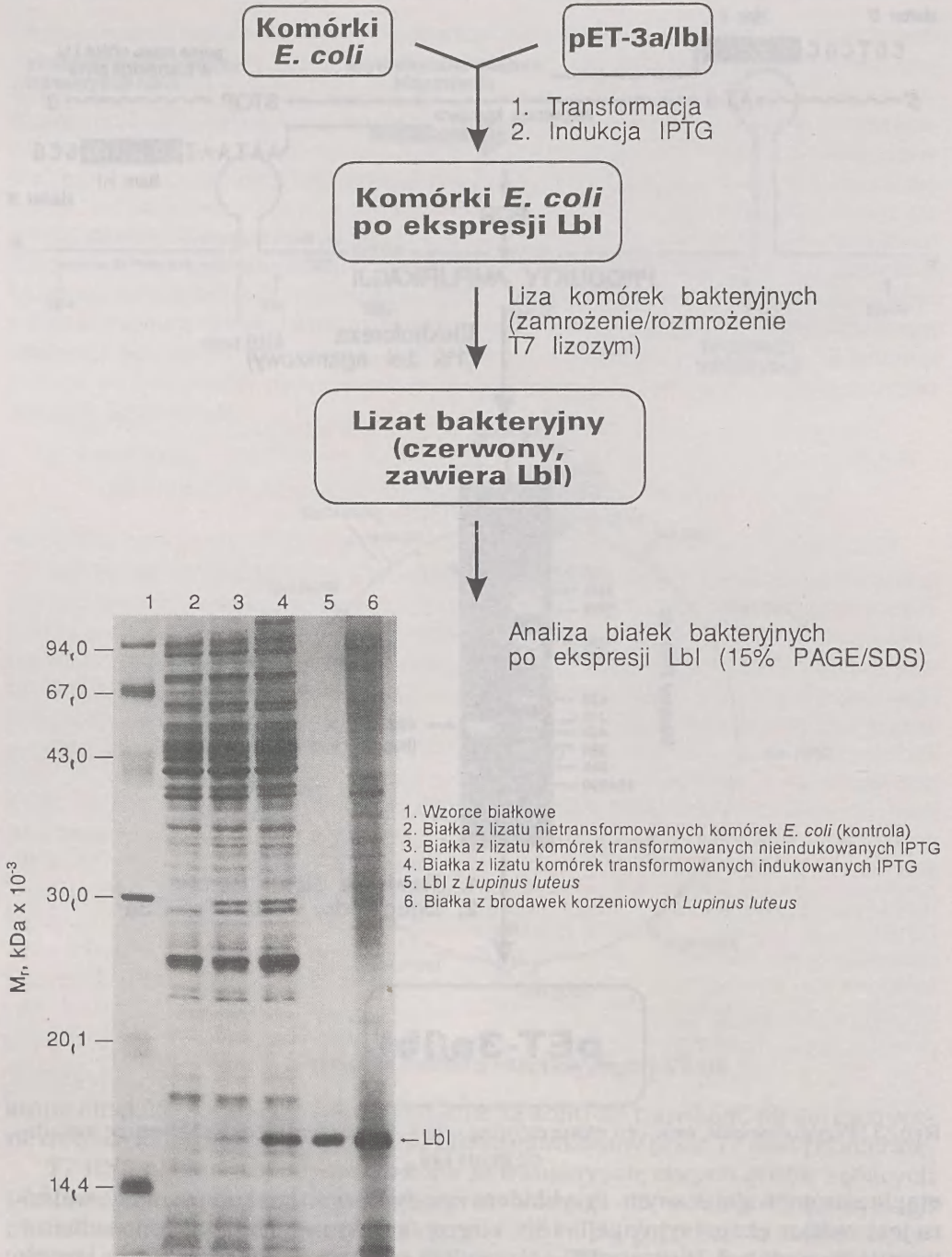
T7 RNA polimeraza odpowiedzialna za transkrypcję obcych genów będących pod kontrolą promotora fagowego wprowadzonego do wektora ekspresyjnego posiada szereg zalet: (1) enzym jest pojedynczym polipeptydem o masie cząsteczkowej około 90 kDa, (2) posiada 5-krotnie wyższą aktywność niż polimeraza bakteryjna, (3) charakteryzuje się dużą wiernością transkrypcji.

Firma biotechnologiczna Novagen opracowała nowe wersje wektora ekspresyjnego pET charakteryzujące się większą uniwersalnością, łatwiejsze w praktyce laboratoryjnej, pozwalające oczyszczać rekombinowane białka w jednym



Ryc. 3. Przygotowanie wektora ekspresyjnego pET-3a zawierającego sekwencję kodującą genu *lbI*.

etapie chromatograficznym. Przykładem zmodyfikowanego i ulepszanego wektora jest wektor ekspresyjny pET-15b, którego strukturę przedstawiono schematycznie na rycinie 5. Wektor pET-15b zawiera sekwencję operatora *lac* po stronie 3' promotora T7 (tzw. T7*lac* promotor) oraz dodatkowo naturalny promotor i sekwencję kodującą represora *lac* (*lacI*) zorientowaną tak, że promotory T7*lac* i *lacI* są skierowane w przeciwnych kierunkach. Jeżeli ten wektor jest użyty do ekspresji obcego genu w lizogenicznych komórkach BL21(DE3), wtedy represor



Ryc. 4. Transformacja komórek bakteryjnych i ekspresja białka Lbl.

lac blokuje promotor *lacUV5* (nie zachodzi transkrypcja genu T7 RNA polimerazy) oraz promotor *T7lac* (nie zachodzi transkrypcja obcego genu wprowadzonego do wektora pET-15b będącego pod jego kontrolą). W ten sposób stabilizuje się

Połączenie dwóch modyfikacji w bakteryjnym układzie ekspresyjnym: wprowadzenia promotora T7lac do plazmidu pET-15b i plazmidu zawierającego gen lizozymu T7 pLysS do komórek *E. coli*, pozwala na utrzymanie i ekspresję w komórkach bakteryjnych BL21(DE3)pLysS białek o większej toksyczności dla bakterii.

OCZYSZCZANIE REKOMBINOWANYCH BIAŁEK PRZY ZASTOSOWANIU WEKTORA pET-15b

Wektor pET-15b zawiera sekwencję 6 lub 10 reszt histydynowych, które mogą ulegać ekspresji na C- lub N-końcu rekombinowanego białka. Fragment histydynowy pozwala na oczyszczanie białka w jednoetapowej chromatografii na żywicy immobilizowanej jonami Ni⁺⁺ (NOVAGEN 1993). Metoda ta jest szybka i można ją stosować na skalę preparatywną również z użyciem buforów denaturujących.

Białka otrzymane metodami rekombinacji DNA i inżynierii białek mogą być wykorzystane do następujących celów: (1) jako antygeny do uzyskiwania monospecyficznego przeciwciała, (2) do badań funkcjonalnych (aktywność enzymatyczna, białka wiążące hormony, białka regulatorowe) i (3) do badań strukturalnych metodami fizykochemicznymi (krytalografia i analiza rentgenostrukturalna, spektroskopia).

Dodatkową zaletą opisywanego układu ekspresyjnego jest możliwość przeprowadzania mutacji poprzez zmianę określonych liter kodu genetycznego zapisanego w sekwencji nukleotydowej fragmentu kodującego genu. Stwarza to możliwość badania mechanizmu funkcjonowania białek poprzez wprowadzanie mutacji w obrębie fragmentów sekwencji odpowiedzialnych za aktywność biologiczną białek.

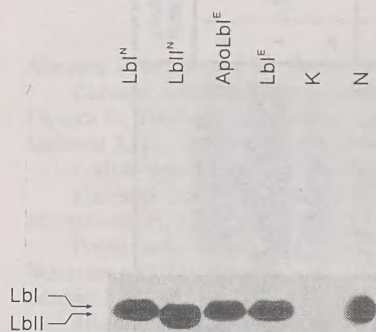
EKSPRESJA GENÓW LEGHEMOGLOBIN I I II (LbI i LbII) ŁUBINU ŻÓŁTEGO W BAKTERYJNYM UKŁADZIE EKSPRESYJNYM

Leghemoglobiny roślin motylkowatych są odpowiednikami zwierzęcej mioglobiny pełniącej funkcję przENOŚNIKA tlenu (STRÓŻYCKI w tym zeszycie; STRÓŻYCKI i LEGOCKI 1995). Występują one w brodawkach korzeniowych roślin motylkowatych jako produkty genów, których ekspresja jest indukowana w trakcie rozwoju symbiozy z bakteriami rodzaju *Rhizobium*.

Opisany układ ekspresyjny T7 RNA polimeraza/T7 promotor zastosowano do ekspresji sekwencji kodujących genów LbI i LbII z brodawek korzeniowych łubinu żółtego (SIKORSKI i współaut. 1994, 1995).

Fragmety sekwencji cDNA o długości 462 pz kodujące leghemoglobinę I i II uzyskane w reakcji amplifikacji metodą PCR z pełnej kopii cDNA, wklonowano do wektora ekspresyjnego pET-3a (pET-3a/LbI, pET-3a/LbII). Następnie transformowano komórki *E. coli*, szczep BL21(DE3)pLysS, wywołując ekspresję przez dodanie IPTG do hodowli bakterii. Produkty ekspresji oczyszczono i wykazano, że rekombinowane białka otrzymane tą drogą posiadają identyczne właściwości, jak LbI i LbII z brodawek korzeniowych łubinu żółtego. Wykazano również, że surowica anty-LbI dla leghemoglobiny I uzyskanej w wyniku ekspresji w *E. coli*

daje krzyżową reakcję immunochemiczną zarówno z rekombinowanymi białkami jak i z natywnymi leghemoglobinami z brodawek korzeniowych łubinu (ryc. 6). W wyniku analizy spektralnej uzyskano charakterystyczne widmo utlenowanej leghemoglobiny I (SIKORSKI i współaut. 1995). Syntetyzowana w komórkach bakteryjnych apoleghemoglobina wykorzystuje hem do utworzenia funkcjonalnej leghemoglobiny. Ponadto sekwencje aminokwasowe N-końca oczyszczonych białek potwierdzają identyczność z białkami natywnymi z brodawek korzeniowych.



Ryc. 6. Analiza immunochemiczna rekombinowanych białek. LbI^N , $LbII^N$ — oczyszczone preparaty leghemoglobiny I i II z brodawek korzeniowych łubinu żółtego; $ApoLbI^E$ — apoleghemoglobina pozbawiona hemu; LbI^E — leghemoglobina syntetyzowana w komórkach *E. coli*; K — ekstrakt białkowy komórek *E. coli* nietransformowanych; N — ekstrakt białkowy z brodawek korzeniowych łubinu. Reakcję immunochemiczną przeprowadzono z surowicą króliczą anti- LbI^E . Detekcję przeprowadzono autoradiograficznie z użyciem białka A ze *Staphylococcus aureus* znakowanego izotopem ^{125}J .

Na rycinach 3 i 4 przedstawiono schematycznie procedurę przygotowania wektora ekspresyjnego, transformacji komórek bakteryjnych i ekspresji sekwencji kodującej genu *LbI* w komórkach bakteryjnych. Identycznie postępowano w przypadku ekspresji *LbII*.

EKSPRESJA SEKWENCJI KODUJĄCEJ BIAŁKO LIR18A ŁUBINU ŻÓŁTEGO W KOMÓRKACH *E. COLI* Z ZASTOSOWANIEM WEKTORÓW EKSPRESYJNYCH pET-3a I pET-15b

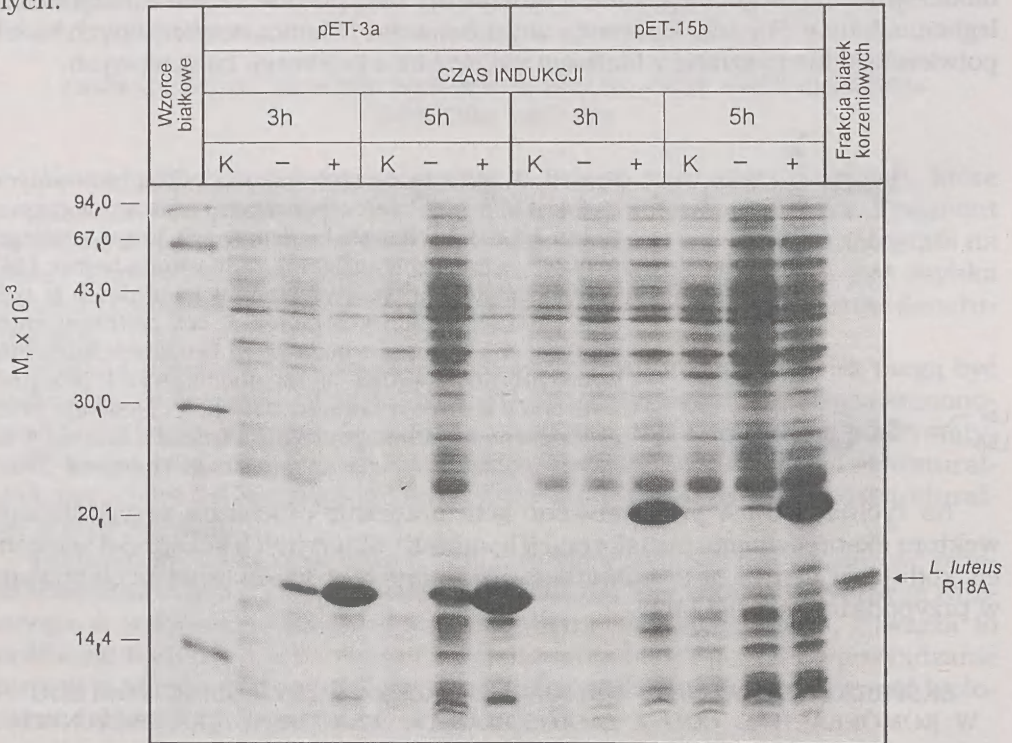
W celu porównania wydajności ekspresji rekombinowanego białka w wektorach pET-3a i pET-15b przeprowadzono ekspresję białka LIR18A łubinu żółtego o masie cząsteczkowej 16,9 kDa. Zastosowano szczep *E. coli* BL21(DE3)pLysS (ryc. 7). Wykazano, że oba wektory (pET-3a i pET-15b) mogą być stosowane z jednakowym powodzeniem do ekspresji genu kodującego białko LIR18A.

Jak wcześniej wspomniano, zaletą stosowania wektora pET-15b jest łatwość oczyszczania produktu ekspresji jako białka fuzyjnego zawierającego fragment 6-ciu histydyn na kolumnie z żywicą chelatującą jony Ni^{++} .

Powstające białko fuzyjne można hydrolizować specyficzną proteazą — trombiną, która odcina fragment znacznika histydynowego łatwy do oddzielenia od właściwego produktu przez rechromatografię na żywicy Ni^{++} .

Gen kodujący białko LIR18A łubinu żółtego należy do rodziny genów kodujących białka kwaśne o masie cząsteczkowej 17–19 kDa, stanowiących klasę białek IPR (intracellular pathogenesis-related proteins). Białko LIR18A, podobnie jak jego homolog LIR18B (90% podobieństwa do białka LIR18A) ulegają w łubinie żółtym represji w trakcie rozwoju efektywnej symbiozy *L. luteus* — *B.*

lupini (LEGOCKI i współaut. 1994). Rola i struktura tych białek, uczestniczących prawdopodobnie w procesach obronnych rośliny, jak dotąd nie została poznana. Stąd nasze zainteresowanie uzyskiwaniem białek LIR18A i LIR18B na skalę preparatywną w celu ich wykorzystania do badań strukturalnych i funkcjonalnych.



Ryc. 7. Porównanie ekspresji genu białka LIR18A łubinu żółtego w komórkach *E. coli* w wektorach ekspresyjnych serii pET: pET-3a i pET-15b — elektroforeza białek po lizie komórek *E. coli* w 15% żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących. Ekspresję prowadzono w temp. 37°C przez 3 i 5 godz. Produkt ekspresji w wektorze pET-15b jest białkiem fuzyjnym, zawierającym fragment sekwencji „histrynowej”, służącej do chromatografii na kolumnie z żywicą chelatującą.

Ze względu na dużą różnorodność zarówno komórkowych układów ekspresyjnych, jak i odpowiednich wektorów dostępnych komercyjnie, ograniczyliśmy się do opracowania najczęściej stosowanego układu bakteryjnego, który jak nam się wydaje, będzie użyteczny również dla produkcji innych białek roślinnych na skalę preparatywną.

IDENTIFICATION OF PLANT GENES AND THEIR EXPRESSION IN AN BACTERIAL EXPRESSION SYSTEM

Summary

Identification of higher plant genes encoding individual proteins is based on determination of protein amino acid sequence of N-termini. The sequence of 10-20 amino acid residues of protein is

sufficient to design the deoxyoligonucleotide probe which can be used for screening of cDNA library in order to distinguish full cDNA copies of individual clones.

The coding part of a cDNA clone can be introduced into the expression vector of pET series to overexpress protein in *E. coli* cells. The overexpression of yellow lupin leghemoglobins (LbI and LbII) and PR-like protein (LR18A) is described. These are examples of using the bacterial expression system for production of recombinant proteins for structural and functional studies.

The pET system is the most powerful system yet developed for the cloning and expression of recombinant proteins in *E. coli* cells.

LITERATURA

- AUSUBEL F. M., BRENT R., KINGSTON R. E., MOORE D. D., SEIDMAN J. G., SMITH J. A., STRUHL K., 1995. *Current protocols in molecular biology*. John Wiley & Sons, Inc. New York, U.S.A.
- FRANKS F., 1993. *Protein Biotechnology*. Humana Press, Totova, New Jersey, 467-488.
- LEGOCKI A. L., SIKORSKI M. M., STRÓŻYCKI P. M., SZLAGOWSKA A. E., 1994. *Structure and expression of nodule-specific genes of yellow lupin (Lupinus luteus)*. Proceedings of the 1st European Nitrogen Fixation Conference. Oficyna Press, Szeged, Hungary. 180-184.
- MATSUDAIRA P., 1993. *A Practical Guide to Protein and Peptide Purification for Microsequencing*. Academic Press, Inc. San Diego, U.S.A.
- NOVAGEN pET System Manual. 1993. NOVAGEN, Inc. Madison, U.S.A.
- SIKORSKI M. M., ROZEK M., 1994. *Expression of Lupinus luteus nodulin-45 gene in E. coli cells. Mutagenesis of coding sequence by PCR method*. Acta Biochim. Polon. 41, 106-109.
- SIKORSKI M. M., TOPUNOV A. F., SZLAGOWSKA A. E., ŚWIDERSKI M. R., STRÓŻYCKI P. M., VORGAS C. E., WILSON K. S., LEGOCKI A. B., 1994. *Expression of leghemoglobin cDNA's of Lupinus luteus in Escherichia coli and purification of recombinant proteins*. Proceedings of the 1st European Nitrogen Fixation Conference. Oficyna Press, Szeged, Hungary. 341.
- SIKORSKI M. M., TOPUNOV A. F., STRÓŻYCKI P. M., VORGAS C. E., WILSON K. S., LEGOCKI A. B., 1995. *Cloning and expression of plant leghemoglobin cDNA of Lupinus luteus in Escherichia coli and purification of the recombinant protein*. Plant Sci. 108, 109-117.
- STRÓŻYCKI P. M., LEGOCKI A. B., 1995. *Leghemoglobins from an evolutionarily old legume, Lupinus luteus*. Plant Sci. 110, 83-93.
- STUDIER F. W., ROSENBERG A. H., DUNN J. J., DUBENDORFF J. W., 1990. *Use of T7 RNA Polymerase to Direct Expression of Cloned Genes*. Meth.Enzymol. 185, 60-89.

PAWEŁ M. STRÓŻYCKI

*Instytut Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk
Noskowskiego 12/14, 61-704 Poznań*

FUNKCJE I EWOLUCJA HEMOGLOBIN. HEMOGLOBINY ROŚLINNE

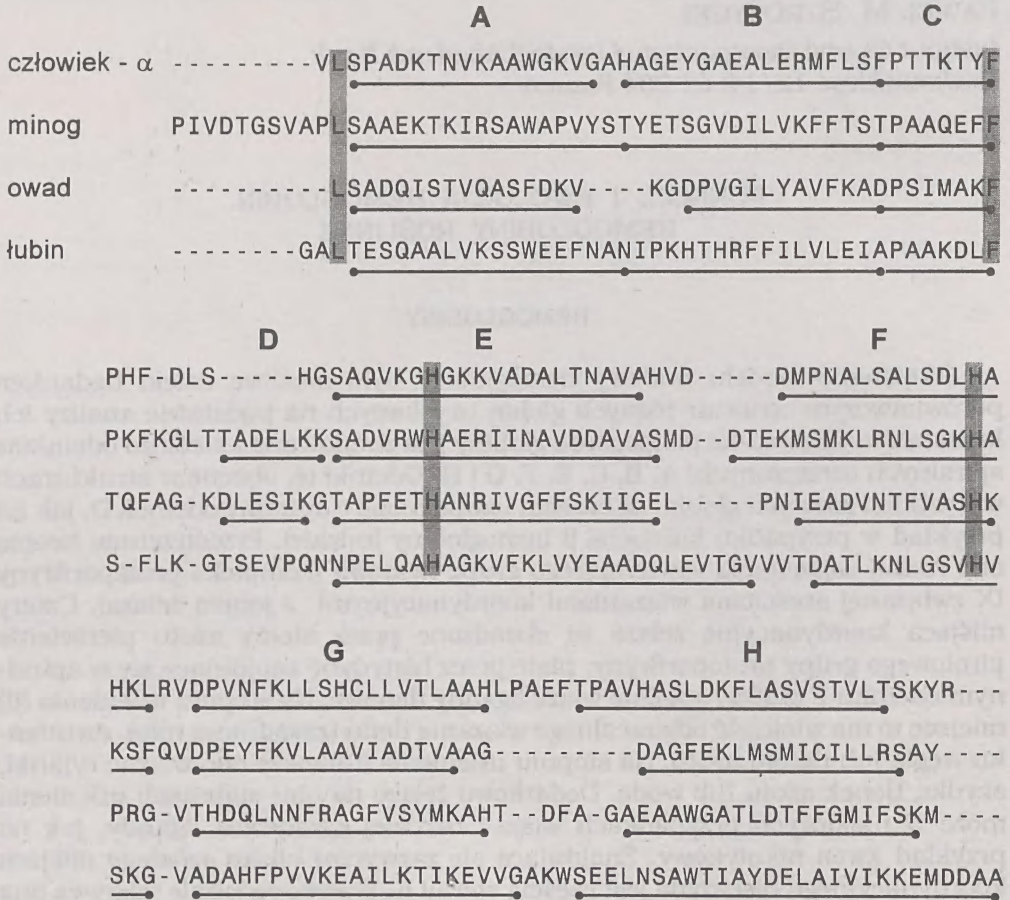
HEMOGLOBINY

Określenie modelu budowy hemoglobiny było możliwe dzięki badaniom porównawczym struktur różnych globin uzyskanych na podstawie analizy ich kryształów. Częsteczką polipeptydu globiny jest zbudowana z siedmiu odcinków spiralnych oznaczonych: A, B, C, E, F, G i H. Odcinki te, obecne w strukturach wszystkich znanych globin, są czasem uzupełnione o spiralny odcinek D, jak na przykład w przypadku łańcucha β hemoglobiny ludzkiej. Przestrzennie tworzą one rodzaj zagłębienia zawierającego grupę hemową (kompleks protoporfiryny IX związanej sześcioma wiązaniami koordynacyjnymi z jonem żelaza). Cztery miejsca koordynacyjne żelaza są obsadzone przez atomy azotu pierścienia pirolowego grupy protoporfiryny, piąte przez histydynę znajdującą się w spiralnym odcinku F białka, a szóste wiąże ligandy tlenowe. Na stopniu utlenienia (II) miejsce to ma zdolność odwracalnego wiązania tlenu (zasadnicza rola), dwutlenku węgla lub tlenku azotu. Na stopniu utlenienia (III) może ono wiązać cyjanki, azydki, tlenek azotu lub wodę. Dodatkowo żelazo na obu stopniach utlenienia może w niektórych przypadkach wiązać bardziej egzotyczne ligandy, jak na przykład kwas nikotynowy. Znajdująca się zazwyczaj blisko szóstego miejsca koordynacyjnego histydyna jest częścią spirali E. Prawdopodobnie odgrywa ona kluczową rolę w regulacji wiązania tlenu (OLSON i współaut. 1988).

Wiele globin funkcjonuje jako podjednostki większych kompleksów. I tak: α i β łańcuchy hemoglobiny ludzkiej są częścią tetrameru $\alpha_2\beta_2$; hemoglobina mięczaka jest homodimerem. Inne natomiast, jak hemoglobiny owadów, roślinne oraz minogów są monomerami.

Porównanie sekwencji aminokwasowych hemoglobin z organizmów o różnym stopniu pokrewieństwa wykazało, że w przeciwieństwie do wysokiego podobieństwa struktur trzeciorzędowych, struktury pierwszorzędowe globin wykazują niską zachowawczość. Identyczne okazały się tylko te aminokwasy (i ich pozycje w łańcuchu polipeptydowym), które odgrywają kluczową rolę w strukturze cząsteczki hemoglobiny. Aminokwasy te są zaangażowane w „wyginanie” łańcucha peptydowego i tworzenie tak zwanej „kieszeni molekularnej”, w której jest transportowany tlen.

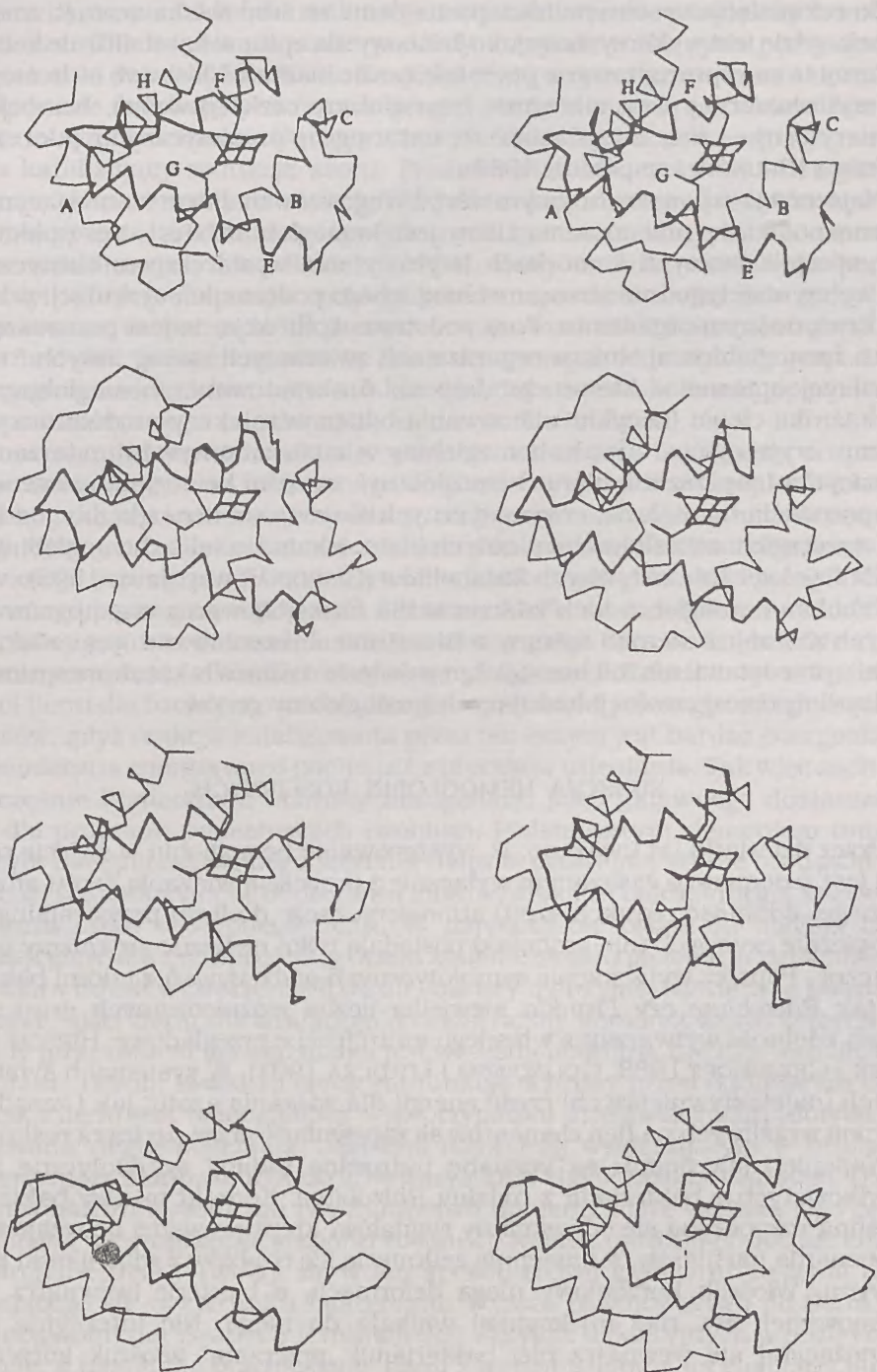
Rodzina białek globinowych była pierwszą, w której odkryto, iż struktura trzeciorzędowa, będąc wysoce konserwatywną, może być tworzona na bazie znacznie różniących się sekwencji aminokwasowych (struktur pierwszorzędowych) (rys. 1 i rys. 2). Ta zasada strukturalnej bezwładności w ewolucji molekularnej jest obecnie oczywista dla wielu innych rodzin białek.



Rys. 1. Porównanie sekwencji łańcuchów aminokwasowych globin wyizolowanych z różnych organizmów. Sekwencje zostały „nałożone” z uwzględnieniem informacji pochodzących z analizy struktur trójwymiarowych (analiza kryształów — „superpozycje”). Cztery niezmiennie reszty aminokwasowe zostały zacieniowane. Odcinki spiralne są podkreślone oraz oznaczone literami A-H (patrz tekst) (wg ARONSON i współaut. 1994).

HEMOGLOBINY ZWIERZĘCE

Większość organizmów zwierzęcych wykazuje tak wysokie zapotrzebowanie na tlen, że nie może być ono spełnione na drodze prostej dyfuzji tlenu ze środowiska do „oddychających” tkanek. W sensie ewolucyjnym zostały zmuszo-



Rys. 2. Modele stereoskopowe szkieletów węglowych (Ca) — czterech hemoglobin (wg ARONSON i współaut. 1994). Kolejność i oznaczenia jak na rys. 1.

ne do rozwinięcia systemów transportu tlenu ze środowiska zewnętrznego do tkanek, gdzie jest wykorzystany jako końcowy akceptor w katabolizmie komórki. Systemy te są reprezentowane przez tak zwane białka oddechowe — hemoglobiny, erytrokroryny (np. olbrzymie hemoglobiny bezkręgowców), hemocjaniny i hemerytryny — znacznie różniące się naturą grup prostetycznych, jak i częścią białkową (BRUNORI i współaut. 1980).

Najszerzej rozpowszechnionym wśród kręgowców białkiem stanowiącym chemiczną podstawę przenoszenia tlenu jest hemoglobina. Jest ona upakowana w wyspecjalizowanych komórkach (erytrocytach) wystarczająco elastycznych, aby wytrzymać tygodnie stresu mechanicznego podczas ich cyrkulacji w systemie krwionośnym organizmu. Poza podstawową funkcją, to jest przenoszeniem tlenu, hemoglobina spełnia w organizmach zwierzęcych szereg innych funkcji. Najszerzej opisane w literaturze dotyczą: funkcjonowania hemoglobiny jako przekaźnika ciepła (w cyklu utlenowania-odtlenowania) czy modulatora metabolizmu erytrocytów, udziału hemoglobiny w zapoczątkowywaniu starzenia się erytrocytów (poprzez utlenianie hemoglobiny), związku hemoglobiny z genetyczną opornością na malarię, enzymatycznych aktywności hemoglobiny, oddziaływań z szeregiem związków chemicznych (m.in. lekami), a także hemoglobiny jako źródła fizjologicznie aktywnych katabolitów (GIARDINA i współaut. 1995).

Problem hemoglobin i ich znaczenia dla funkcjonowania organizmów zwierzęcych został już szeroko opisany w literaturze. Prezentowane opracowanie ma na celu przedstawienie roli hemoglobin w świecie roślin, a także zaprezentowanie wiedzy dotyczącej ewolucji kodujących hemoglobiny genów.

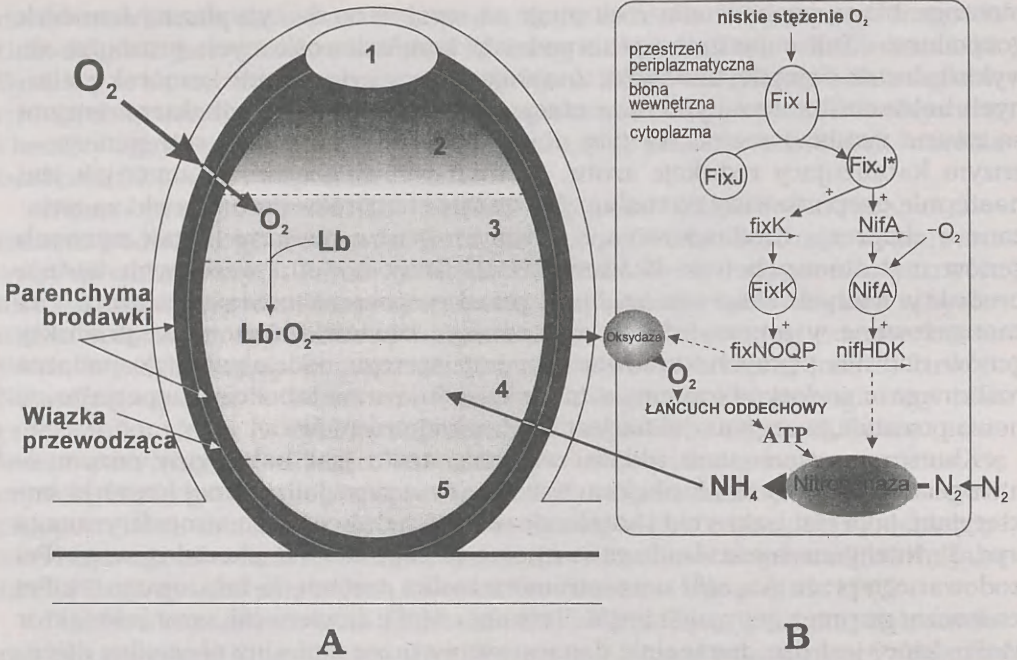
FUNKCJA HEMOGLOBIN ROŚLINNYCH

Przez dziesiątki lat uważano, iż występowanie hemoglobin w świecie roślinnym jest fenomenem związanym wyłącznie z procesem wiązania azotu atmosferycznego. Zdolność redukcji azotu atmosferycznego do form przyswajalnych — biologicznie czynnych (np. amoniak) posiadają tylko nieliczne organizmy prokariotyczne. Poprzez wytworzenie symbiotycznych oddziaływań z takimi bakteriami, jak *Rhizobium* czy *Frankia* niewielka liczba zróżnicowanych grup roślin nabyła zdolność wytwarzania własnego azotu (prace przeglądowe: HIRSCH 1992, ROLFE i GRESSHOFF 1988, GOLINOWSKI i ŁOŁOCKA 1991). W systemach symbiotycznych (najefektywniejszych) część energii dla wiązania azotu, jak i zasadnicza ochrona wrażliwych na tlen elementów są zapewniane przez partnera roślinnego.

Najlepiej, jak dotąd, są poznane naturalne układy symbiotyczne roślin motylkowatych z bakteriami z rodziny *Rhizobium*. Kontakt między bakteriami a rośliną rozpoczyna się od wymiany sygnałów, która prowadzi do wzajemnego rozpoznania partnerów, a następnie zetknięcia się rizobiów z włośnikami korzeniowymi. Włośnik korzeniowy ulega deformacji, a bakterie (wewnątrz nowo uformowanej tzw. nici infekcyjnej) wnikają do niego. Nić infekcyjna (wraz z mnożącymi się wewnątrz niej bakteriami) „przerasta” włośnik korzeniowy i wnika do sąsiadujących z nimi tkanek. Jednocześnie mitotycznej aktywacji ulegają komórki kory pierwotnej korzenia, dając początek tak zwanemu primordium brodawki. Po „wrośnięciu” nici infekcyjnych do primordium, bakterie

otoczone błoną pochodzenia roślinnego są uwalniane do cytoplazmy komórek gospodarza. Tak zapoczątkowane podziały komórek roślinnych prowadzą do wykształcenia dojrzałej brodawki. Znajdujące się w cytoplazmie komórek roślinnych bakterie (bakteroidy) wraz z otaczającymi je błonami peribakteroidowymi są zwane symbiosomami. Na tym etapie bakterie syntetyzują nitrogenazę — enzym katalizujący redukcję azotu. Produkt wiązania azotu — amoniak jest następnie eksportowany do rośliny. Wszystkie etapy rozwoju brodawki są związane z ekspresją brodawkowo-specyficznych genów roślinnych, tak zwanych genów nodulinowych (van KAMMEN 1984). Geny nodulin wczesnych kodują produkty, których ekspresja zachodzi przed rozpoczęciem wiązania azotu i są zaangażowane w proces infekcji oraz rozwoju brodawki. Natomiast produkty genów nodulin późnych stanowią elementy szeregu oddziaływań gospodarza roślinnego z endosymbiontem, a także decydują o metabolicznej specjalizacji nowo powstałego organu, jakim jest brodawka korzeniowa.

Kluczowym elementem układu wiązania azotu jest bakteryjny enzym — nitrogenaza. Enzym ten funkcjonuje wewnątrz wyspecjalizowanej komórki bakteryjnej, jaką jest bakteroid i katalizuje reakcję redukcji azotu atmosferycznego (rys. 3). Nitrogenaza jest zbudowana z homodimerycznego białka żelazowego (Fe) kodowanego przez gen *nifH* oraz tetrameru białka molibdeno-żelazowego (MoFe) kodowanego przez geny *nifD* i *nifK*. Tetramer MoFe zawiera tak zwany kofaktor MoFe, który jest nieodwracalnie denaturowany przez tlen. Już niewielkie stężenia tlenu powodują całkowitą inaktywację nitrogenazy. Fakt tak wysokiej toksyczności tlenu dla funkcjonowania nitrogenazy stanowi pewnego rodzaju konflikt interesów, gdyż reakcja katalizowana przez ten enzym jest bardzo energochłonna, a konieczna energia musi pochodzić z procesów utleniania. Tak więc zachodzi jednocześnie konieczność ochrony nitrogenazy, jak i aktywnego dostarczenia tlenu dla procesów oddechowych rizobium. Podstawowym elementem umożliwiającym osiągnięcie niskiego stężenia tlenu w centralnej strefie brodawki jest bardzo wysoka aktywność oddechowca mikrosymbionta bakteryjnego, zużywającego dużą część dostępnego tlenu. W parenchymie brodawki ulegają także ekspresji geny, których produkty dzięki zmianie składu głównie ścian komórkowych biorą udział w tworzeniu fizycznej bariery dyfuzyjnej. Bariera ta powoduje obniżenie ilości tlenu docierającego do cytoplazmy komórek zawierających bakteroidy (przykładem takiego białka jest wczesna nodulina ENOD2 (van de WIEL i współaut. 1990)). Białkiem łączącym funkcję ochrony przed nadmiarem tlenu i nośnika tlenu jest hemoglobina — w przypadku brodawek roślin motylkowatych zwana leghemoglobiną. Jest ona najobficiej występującym w brodawce białkiem, może stanowić 15% do 25% wszystkich białek rozpuszczalnych. Dzięki swojemu bardzo wysokiemu powinowactwu do tlenu wiąże większą jego część, pozostawiając w cytoplazmie komórki roślinnej, jeszcze bardziej obniżając ciśnienie parcjalne tlenu. Tworzy się w ten sposób rodzaj gradientu stężenia tlenu obniżającego się w kierunku bakteroidu. Wyższe powinowactwo do tlenu (niż leghemoglobina) tak zwanych terminalnych oksydaz bakteryjnych umożliwia im przejście, a następnie przeniesienie tlenu z leghemoglobiny na elementy łańcucha oddechowego.



Rys. 3. Udział leghemoglobiny w regulacji ekspresji genów bakteryjnych oraz funkcjonowania nitrogenazy.

(A) Schemat budowy brodawki korzeniowej (typu niezdeteminowanego) z wyróżnieniem powstających podczas rozwoju brodawki stref: 1 — merystem brodawki, 2 — strefa infekcji, 3 — strefa pośrednia, 4 — strefa wiązania azotu, 5 — strefa starzenia się. Fizyczna bariera ograniczająca dostęp tlenu do tkanek w centrum brodawki znajduje się w parenchymie brodawki otaczającej wiązkę przewodzącą (bariera ta jest przerwana tylko w rejonie merystemu brodawki). (B) Uproszczonego modelu regulacji niektórych genów bakteryjnych w wyniku obniżenia stężenia tlenu w strefie infekcji. Niskie stężenie tlenu aktywuje bakteryjne białko „sensorowe” FixL, które fosforyluje, a przez to aktywuje aktywator transkrypcji FixJ. Aktywowane białko FixJ (FixJ*) indukuje transkrypcję *fixK* i *nifA*, produkty białkowe tych genów indukują następnie transkrypcję genów kodujących białka bezpośrednio zaangażowane w wiązanie azotu, to jest terminalnej oksydazy oraz nitrogenazy. Geny leghemoglobiny ulegają ekspresji w strefach: infekcji, pośredniej i wiązania azotu. Leghemoglobina przenosi tlen na oksydazy bakteryjne, a te z kolei na łańcuch oddechowy umożliwiając produkcję ATP w warunkach niskiego stężenia tlenu. Duże ilości ATP są konieczne w procesie redukcji azotu atmosferycznego prowadzonym przez nitrogenazę. (wg MYLONA i współaut. 1995, BECANA i SPRENT 1987, PREISIG i współaut. 1993).

EWOLUCJA HEMOGLOBIN — WSPÓLNY PRZODEK

Początkowo istniały dwie teorie tłumaczące pochodzenie hemoglobin roślinnych. Pierwsza z nich — „ewolucji równoległej” (zbieżnej) opisywała różnicowanie się hemoglobin zwierzęcych i roślinnych jako dwa niezależne procesy. Procesy te, choć mające różne początki, doprowadzić miały do powstania podobnego funkcjonalnie białka, umożliwiającego efektywne korzystanie z podstawowego

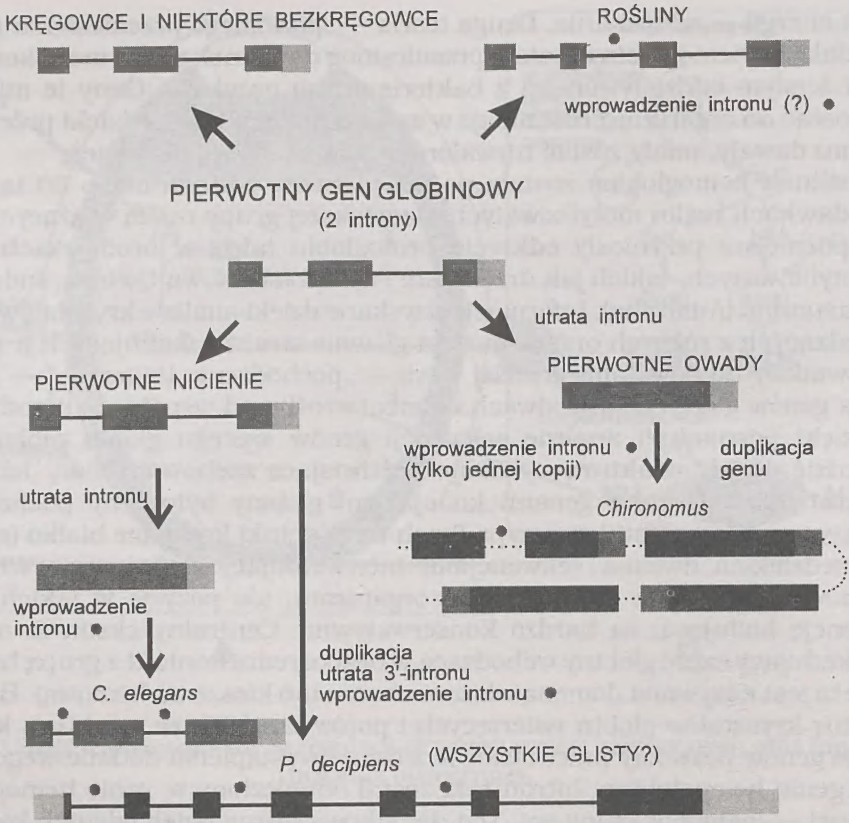
źródła energii — oddychania. Druga teoria — „poziomego przeniesienia genów” zakładała, że hemoglobiny zostały przeniesione do tkanek roślin motylkowatych dzięki ścisłym oddziaływaniom z bakteriami lub owadami. Geny te miały się przedostać do organizmu roślinnego w sposób przypadkowy i dzięki przewodze, jaką mu dawały, miały zostać utrwalone z pokolenia na pokolenie.

Roślinna hemoglobina została po raz pierwszy odkryta około 60 lat temu w brodawkach roślin motylkowatych, największej grupy roślin wiążących azot. Lata późniejsze przyniosły odkrycie hemoglobiny także w brodawkach roślin niemotylkowatych, takich jak drzewiaste *Parasponia* (Nowa Gwinea, Indonezja) czy *Casuarina* (Australia). Informacje uzyskane dzięki analizie kryształów globin pochodzących z różnych organizmów, a głównie struktur kodujących je genów, doprowadziły do powstania trzeciej teorii — „pochodzenia liniowego” — pochodzenia genów globin w królestwach zwierząt i roślin od wspólnego przodka.

Dzięki poznaniu i analizie sekwencji genów szeregu globin można było stwierdzić, iż ich struktura wykazuje zadziwiająco zachowawczość. Jedynymi znanymi do 1981 roku genami kodującymi globiny były geny pochodzenia zwierzęcego. We wszystkich przypadkach trzy odcinki kodujące białko (eksony) są przedzielone dwiema sekwencjami interweniującymi (introny). Wielkości intronów różnią się w zależności od organizmu, ale pozycje w jakich dzielą sekwencję kodującą, są bardzo konserwatywne. Centralny ekson to odcinek genu kodujący część globiny wchodzącą w bezpośredni kontakt z grupą hemową (część ta jest nazywana domeną wiązania hemu lub kieszenią hemową). Badania struktur kryształów globin zwierzęcych i porównanie ich ze strukturą kodujących je genów pozwoliły przewidzieć możliwość wystąpienia dodatkowego intronu w genie hemoglobiny. Intron taki został odnaleziony w genie hemoglobiny roślinnej — leghemoglobiny *soi*. Ten dodatkowy intron dzieli odcinek kodujący domenę wiązania hemu na dwa mniejsze moduły. Okazuje się, że model taki obowiązuje w przypadku wszystkich poznanych dotąd genów globin roślinnych.

Początkowo szeroko był rozpowszechniony pogląd, że struktura genu hemoglobiny roślinnej odzwierciedla strukturę genu pierwotnej globiny, a gen wspólnego przodka wszystkich zwierząt utracił centralny intron krótko po ewolucyjnym rozdziale królestw zwierząt i roślin, około miliarda lat temu (LEWIN 1984). Obecne odkrycia centralnego intronu także w niektórych genach globin zwierzęcych mogą sugerować, iż model ten może być błędny. Prawdopodobna wydaje się hipoteza, iż przodek obecnych roślin uzyskał centralny intron w genie hemoglobiny już po rozdziale królestw roślin i zwierząt. Analiza sekwencji genów hemoglobiny niektórych nicieni (*Caenorhabditis elegans*) wskazuje na możliwość najpierw utraty intronów, a następnie wprowadzenia nowych w inne pozycje. W innych przypadkach, poza utratą i uzyskaniem nowych intronów, nastąpiła prawdopodobnie swoista duplikacja sekwencji genów. Duplikacje te, na przykład w przypadku glisty *Pseudoterranova decipiens*, doprowadziły do powstania genu kodującego polipeptyd o podwójnej w stosunku do innych globin długości oraz dwóch „kieszeniach hemowych” (head-to-tail duplication). W przypadku owada *Chironomus thumini thumini* powstała rodzina genów zawierająca wielokrotną kopię genu hemoglobiny (rys. 4).

Należy także wspomnieć o nie omawianej powyżej grupie organizmów — bakteriach. Pierwszą poznana hemoglobina bakteryjna była hemoglobina *Vitreo-*



Rys. 4. Model ewolucji genów globin zwierzęcych i roślinnych (wg DIXON i POHAJDAK 1992).

scilli (WAKABAYASHI i współaut. 1986). Funkcjonując w warunkach niedoboru tlenu spełnia inną niż u roślin rolę — zwiększa stężenie tlenu w okolicy oksydaz terminalnych. Odkrycie hemoglobiny bakteryjnych jest potwierdzeniem założenia, że podobieństwa I i III rządowych struktur hemoglobiny pochodzących z różnych organizmów a także podobieństwa genów kodujących te białka wynikają ze wspólnego pochodzenia hemoglobiny roślinnych i zwierzęcych. Możliwe jest wtedy założenie, że hemoglobina była obecna w organizmach, które żyły około $1,3 \times 10^9$ – $1,5 \times 10^9$ lat temu i z których wywodzą się królestwa roślin i zwierząt. Obecność intronów w pierwotnym genie hemoglobiny — przodka roślin i zwierząt (jak na rys. 4) nie musi być w tym przypadku wynikiem „wprowadzenia” intronu; są znane przypadki występowania intronów w genach archebakterii (APPLEBY i współaut. 1990).

EWOLUCJA HEMOGLOBIN W ŚWIECIE ROŚLIN

Pogląd, iż występowanie hemoglobiny w świecie roślin jest ograniczone tylko do roślin motylkowatych czy układów symbiotycznych, został podważony dzięki odkryciu hemoglobiny u roślin niemotylkowatych, takich jak *Parasponia andre-*

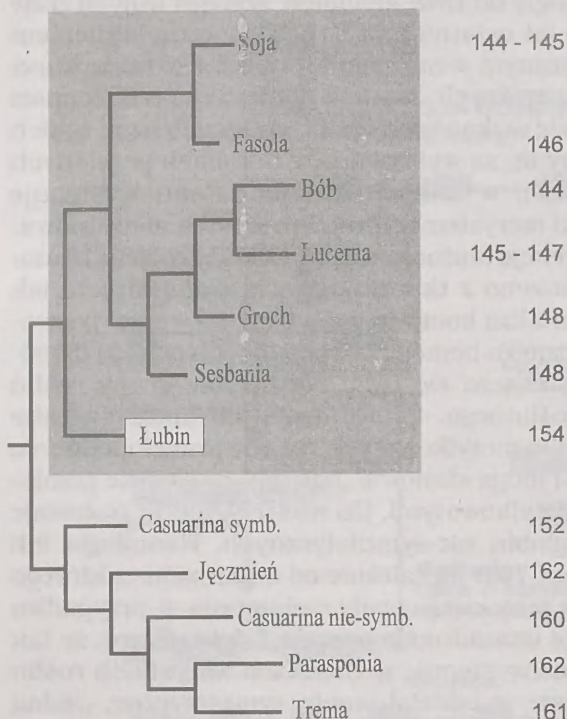
sonii czy wręcz roślin nie wiążących azotu, jak *Trema tomentosa* czy jęczmień. Co więcej, sondy molekularne uzyskane na bazie sekwencji DNA hemoglobiny jęczmienia wykazują wysoką homologię do DNA genomów szeregu innych traw (TAYLOR i współaut. 1994). Badania lat ostatnich wykazują, że poza istnieniem hemoglobin związanych ze symbiotycznym wiązaniem azotu istnieje także klasa tak zwanych hemoglobin nie-symbiotycznych. Istnieją doniesienia o obecności hemoglobin nie-symbiotycznych także w tkankach roślin wiążących azot, takich jak *Casuarina* czy soja. Hemoglobiny te są wykrywane w tkankach poddanych stresowi tlenowemu lub w tkankach, w których niedobór tlenu występuje fizjologicznie, jak na przykład tkanki merystematyczne lub tkanka aleuronowa.

Do chwili obecnej poznano sekwencje aminokwasowe kilkudziesięciu hemoglobin roślinnych pochodzących zarówno z tkanek roślin motylkowatych, jak i niemotylkowatych. Porównawcza analiza komputerowa tych sekwencji pozwoliła na stworzenie drzewa filogenetycznego hemoglobin roślinnych (rys. 5) (STRÓŻYCKI i LEGOCKI 1995). Wyraźnie zaznacza się tutaj oddzielenie grupy roślin motylkowatych od reszty świata roślinnego. Potwierdzają się także sugestie dotyczące miejsca łubinów wśród roślin motylkowatych. Są one prawdopodobnie jednymi z najstarszych w tej grupie i mogą stanowić „ogniwo” pośrednie pomiędzy roślinami motylkowatymi i niemotylkowatymi. Do rozstrzygnięcia pozostaje wciąż kwestia funkcji klasy hemoglobin nie-symbiotycznych. Homologia ich sekwencji aminokwasowych sięgająca 70% niezależnie od organizmu, z którego pochodzą, wskazuje, iż kodujące je geny ewoluowały wolniej niż w przypadku hemoglobin symbiotycznych. Istnieje uzasadnione prawdopodobieństwo, że tak zwane hemoglobiny nie-symbiotyczne występują w tkankach wszystkich roślin niezależnie od tego, czy wchodzi one w oddziaływania symbiotyczne. Jedną z funkcji, jaką spełniają, może być podtrzymywanie podstawowych procesów oddechowych, koniecznych do przeżycia komórki (organizmu) podczas stresu tlenowego. Mogą one także stanowić element swobodnego systemu reakcji na niedobór tlenu. Interesujący jest także fakt, iż ewolucja hemoglobin roślinnych jest powiązana prawdopodobnie ze skracaniem łańcucha polipeptydowego hemoglobiny. Jednakże, czy jest to wynik ewolucyjnego dążenia do zwiększania powinowactwa hemoglobin roślinnych do tlenu czy przystosowania do zmieniających się warunków środowiska, pozostaje jeszcze zagadką.

PODSUMOWANIE

Dane przedstawione w tym opracowaniu wydają się wskazywać, iż hemoglobina jest białkiem, które funkcjonuje we wszystkich organizmach żywych, spełniając różnorodne zadania związane z udziałem tlenu w procesach życiowych.

Ewolucja hemoglobin to jeden z przykładów udanej genetycznej i molekularnej strategii konserwacji systemu transportu tlenu w organizmach żywych. Geny kodujące to białko przetrwały miliardy lat i są odkrywane w najbardziej zróżnicowanych formach życia na ziemi.

Długość
w aminokwasach

Rys. 5. Proponowany schemat zależności filogenetycznych różnych gatunków roślin motylkowatych (na szarym polu) i niemotylkowatych, stworzony na podstawie komputerowej analizy sekwencji aminokwasowych znanych hemoglobiny roślinnych (wg STRÓŻYCKI i LEGOCKI 1995).

FUNCTIONS AND EVOLUTION OF HEMOGLOBINS.
PLANT HEMOGLOBINS

Summary

Hemoglobins have been found to occur in almost all animal systems and in some bacterial systems. Some data concerning plant hemoglobins are presented in this paper. Plant hemoglobin is associated with the nitrogen fixing system and is the key protein protecting nitrogenase from oxygen and, on the other hand, providing oxygen to the terminal oxidases.

It was the globin family for which it was first recognized that the tertiary structure could be highly conserved even when primary sequences diverged to an undetectably low level of similarity.

Data from the analysis of sequences and structures of different hemoglobin genes support the theory of "linear descent" regarding the evolution of the hemoglobin gene in the plant and animal kingdoms from a common ancestor.

LITERATURA

- APPLEBY C. A., DENNIS E. S., PEACOCK W. J., 1990. *A primaevial origin for plant and animal haemoglobins?* *Aust. Syst. Bot.* 3, 81-9.
- ARONSON H., -E. G., ROYER W. E., HENDRICKSON W. A., 1994. *Quantification of tertiary structural conservation despite primary sequence drift in the globin fold.* *Protein Sci.* 3, 1706-11.
- BECANA M., SPRENT J. I., 1987. *Nitrogen fixation and nitrate reduction in the root nodules of legumes.* *Physiol. Plant.* 70, 757-65.
- BRUNORI M., GIARDINA B., KUIPER H. A., 1980. *Oxygen transport proteins.* [W:] *Inorganic Biochemistry (Series) 3*, H. A. O. HILL (red.). Royal Society of Chemistry, Burlington House, London. 126-82.

- DIXON B., POHAJDAK B., 1992. *Did the Ancestral globin gene of plants and animals contain only 2 introns*. Trends Biochem. Sci. 17, 486-8.
- GIARDINA B., MESSANA I., SCATENA R., CASTAGNOLA M., 1995. *The multiple functions of hemoglobin*. Crit. Rev. Biochem. Molec. Biol. 30(3), 165-96.
- GOLINOWSKI W., ŁOŹOCKA B., 1991. *Charakterystyka układu symbiotycznego rośliny motylkowate-ri-zobia*. Kosmos 40(4), 331-346.
- HIRSCH A. M., 1992. *Developmental biology of legume nodulation*. Tansley Review No. 40. New Phytol. 122, 211-37.
- LEWIN R., 1984. *Surprise finding with insect globin genes*. Science 226, 328.
- MYLONA P., PAWLOWSKI K., BISSELING T., 1995. *Symbiotic nitrogen fixation*. Plant Cell 7(7), 869-85.
- OLSON J. S., MATHEWS A. J., ROHLFS R. J., SPRINGER B. A., EGEBERG K. D., SLIGAR S. G., TAME J., RENAUD J. -P., NAGAI K., 1988. *The role of the distal histidine in myoglobin and hemoglobin*. Nature 336, 265-6.
- PREISIG O., ANTHAMATTEN D., HENNECKE H., 1993. *Genes for a microaerobically induced oxidase complex in Bradyrhizobium japonicum are essential for a nitrogen-fixing endosymbiosis*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 3309-13.
- ROLFE B. G., GRESSHOFF P. M., 1988. *Genetic analysis of legume nodule initiation*. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 39, 297-319.
- STRÓŻYCKI P. M., LEGOCKI A. B., 1995. *Leghemoglobins from an evolutionarily old legume, Lupinus luteus*. Plant Sci. 110, 83-93.
- TAYLOR E. R., NIE X. Z., MACGREGOR A. W., HILL R. D., 1994. *A cereal haemoglobin gene is expressed in seed and root tissues under anaerobic conditions*. Plant Mol. Biol. 24, 853-62.
- van de WIEL C., SCHERES B., FRANSSSEN H., van LIEROP M. J., van LAMMEREN A., van KAMMEN A., BISSELING T., 1990. *The early nodulin transcript ENOD2 is located in the nodule parenchyma (inner cortex) of pea and soybean root nodules*. EMBO J. 9, 1-7.
- van KAMMEN A., 1984. *Suggested nomenclature for plant genes involved in nodulation and symbiosis*. Plant Molec. Biol. Reporter 2, 43-5.
- WAKABAYASHI H., MATSUBARA H., WEBSTER D. A., 1986. *Primary sequence of dimeric bacterial haemoglobin from Vitreoscilla*. Nature 322 (6078), 481-483.

MAGDALENA KRZYMOWSKA, JACEK HENNIG

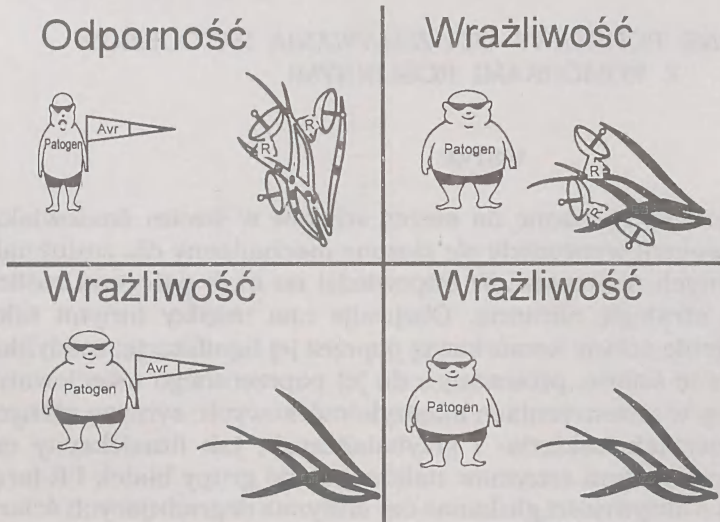
*Instytut Biochemii i Biofizyki PAN,
Pawińskiego 5a, 02-106 Warszawa*MOLEKULARNE PODSTAWY ODDZIAŁYWANIA PATOGENÓW
Z KOMÓRKAMI ROŚLINNYMI

WSTĘP

Rośliny nieustannie są narażone na szereg stresów w swoim środowisku. Stąd też na drodze ewolucji wytworzyły się złożone mechanizmy dla zminimalizowania ich negatywnych następstw. W odpowiedzi na atak patogena roślina może podjąć ogólną strategię obronną. Obejmuje ona między innymi takie procesy jak: wzmocnienie ściany komórkowej poprzez jej lignifikację; modyfikacje białek tworzących tę ścianę, prowadzące do jej poprzecznego usieciowania oraz odkładanie kalozy w przestrzeniach międzykomórkowych; synteza różnych związków o właściwościach bakterio- i grzybobójczych, jak fitoaleksyny czy wolne rodniki; wreszcie synteza enzymów należących do grupy białek PR (ang. pathogenesis related) o aktywności glukonaz czy chitynaz degradujących ściany komórkowe bakterii lub grzybów (KLESSIG i MALAMY 1994).

Jedną z bardziej skutecznych strategii obronnych stosowanych przez roślinę jest wytworzenie lokalnych nekroz (HR ang. hypersensitive response) w miejscu wniknięcia patogena. Jak się wydaje, ta samobójcza śmierć komórek ma na celu pozbawienie intruza składników odżywczych oraz, co ważniejsze, postawienie fizycznej bariery dla jego dalszego rozprzestrzeniania się w obrębie zaatakowanej tkanki. Kiedy infekcja jest zlokalizowana, a więc ograniczona do miejsca wniknięcia patogena, mówimy o odporności rośliny. Przeciwnie — nierozpoznanie obecności patogena, podjęcie walki zbyt późno bądź przełamanie defensywy przez patogena prowadzi do całkowitego porażenia rośliny. Mówimy wtedy o wrażliwości rośliny. Co warunkuje, że roślina jest odporna lub wrażliwa, stanowi fundamentalne pytanie fitopatologii. Po części wyjaśnia tę kwestię hipoteza „gen do genu” (ryc. 1) stworzona na podstawie badań klasycznej genetyki jeszcze w latach 70-ych (FLOR 1971). Zakłada ona, że do reakcji odporności dochodzi tylko wtedy, gdy patogen atakujący roślinę z genem odporności *R* zawiera gen awirulencji *Aur*. Brak każdego z tych dwóch elementów implikuje wrażliwość. Hipoteza ta nie wyjaśnia jednak, w jaki sposób roślina rozpoznaje obecność patogena, ani jak ta informacja rozprzestrzenia się w obrębie porażonej i przylegającej tkanki.

Pierwotna infekcja może rozpocząć powstanie nabytej odporności (SAR ang. systemic acquired resistance), to jest długotrwałej zwiększonej odporności na kolejne infekcje. W odróżnieniu jednak od wtórnej odpowiedzi immunologicznej występującej u zwierząt, SAR jest reakcją niespecyficzną wobec patogena, przeciwnie — zapewnia odporność na wiele często niespokrewnionych patogenów. SAR może rozwinąć się w wyniku infekcji zarówno u rośliny wrażliwej, jak też w następstwie odpowiedzi typu HR. Stąd też kłopotliwym jest przy obecnym stanie wiedzy przyporządkowanie obserwowanych, jednostkowych procesów do reakcji SAR lub HR tym bardziej, że nie można wykluczyć, iż te dwa zjawiska angażują wspólne elementy (KUĆ 1982).



Ryc. 1. Hipoteza „gen do genu” opisuje oddziaływania między czynnikiem chorobotwórczym a rośliną. Do zjawiska odporności dochodzi tylko wtedy, gdy roślina posiadająca gen *R* rozpoznaje patogena, który ma specyficzny gen awirulencji (*Avr*). Wszystkie pozostałe kombinacje, na skutek nierozpoznania obecności patogena, prowadzą do wrażliwości.

Ostatnie lata wzbogaciły znacznie naszą wiedzę o molekularnym podłożu patogenezy roślin. Artykuł ten ma na celu pokrótce przedstawić najnowsze odkrycia z tej dziedziny.

GENY ODPORNOŚCI

O istnieniu genów odporności podlegających rozkładowi mendlowskiemu wnoszono już na przełomie XX wieku, jednak dopiero w ostatnich dwóch latach udało się sklonować i poznać sekwencje kilku genów odporności *R*, pochodzących z różnych gatunków roślin i warunkujących odporność na patogenne grzyby, bakterie i wirusy (STASKAWICZ i współaut. 1995).

Kiedy patogen z genem awirulencji *Avr* atakuje roślinę z odpowiadającym mu genem odporności *R*, roślina rozpoznaje intruza i uruchamia mechanizm obronny. Wczesne reakcje obejmują zmiany w przepuszczalności błony komórkowej prowadzące do wycieku jonów potasowych i chlorkowych na zewnątrz komórki a wnikania jonów wodorowych i wapniowych do wnętrza komórki. Obserwowana jest także zwiększona synteza nadtlenu wodoru (H_2O_2) nazywana „wyrzutem wolnych rodników” (LEVINE i współaut. 1994). Sądzi się, że H_2O_2 uwalniany w tej reakcji jest produkowany, podobnie jak w fagocytach układu immunologicznego

ssaków, przez oksydazę NADPH. Zjawiskom tym towarzyszy produkcja fitoaleksyn — niskocząsteczkowych związków o charakterze antybiotyków.

Do późnych reakcji, zapoczątkowanych bezpośrednim oddziaływaniem produktów genów *Avr* i *R*, należy tworzenie przez roślinę nekroz lokalnych w miejscu inwazji. Ta przebiegła taktyka, gdy kilka komórek wysyłanych jest na pewną śmierć, ma na celu ocalenie całej rośliny. Strategia ta nasuwa analogie do kamikaze — japońskich lotników samobójców z okresu II-giej wojny światowej. Narzędzie to jest jednak bardzo destruktywne, stąd też jego używanie wymaga precyzyjnego aparatu kontroli. Opisano szereg mutantów kukurydzy, jęczmienia oraz rzodkiewnika (*Arabidopsis thaliana*) spontanicznie tworzących nekrozy (GREENBERG i współaut. 1994, DIETRICH i współaut. 1994). Mutanty te zyskały w literaturze miano „roślin paranoidalnych”, gdyż mimo nieobecności patogena wykazują reakcje obronne typowe dla odpowiedzi HR (JONES 1994). Stąd można wnosić, że śmierć komórki podczas HR jest genetycznie programowana i ulega represji w roślinach zdrowych. Zjawisko to wydaje się podlegać mechanizmom analogicznym do tych regulujących apoptozę — programowaną śmierć komórek zwierzęcych, tym bardziej, że w obu procesach kluczową rolę pełnią wolne rodniki. Jednak dopiero dokładna analiza mutantów, z izolacją i charakterystyką poszczególnych zmutowanych genów, pozwoli na opisanie komórkowych mechanizmów zawiadujących tym procesem.

Opisana powyżej sekwencja zdarzeń, zainicjowana rozpoznaniem obecności patogena, charakteryzuje reakcję obronną rośliny bez względu na typ czynnika chorobotwórczego, który ją wywołał. Poszczególne odpowiedzi mogą się wprawdzie różnić czasem reakcji, czy nasileniem zmian. Sugerują jednak wspólne bądź zbliżone mechanizmy rozpoznawania infekcji i transdukcji sygnału dla różnych układów patogen — roślina.

Nie było więc dużym zaskoczeniem, gdy okazało się, że szereg wyizolowanych genów odporności wykazuje znaczne podobieństwa sekwencji (STASKAWICZ i współaut. 1995). I tak *RPS-2* z *Arabidopsis* kodujący odporność na *Pseudomonas syringae* zawierający gen awirulencji *Avr Rpt2*, gen *N* z tytoniu — odporność na wirusa TMV, gen *Cf9* z pomidora — odporność na grzyba *Cladosporium fulvum* z genem *Avr9* oraz gen *L⁶* z lnu — wszystkie posiadają motyw powtórzeń bogatych w leucyny (LRR — ang. leucine rich repeat) typowy dla oddziaływań białko — białko. Poza tym *RPS-2*, *N* oraz *L⁶* zawierają konserwowaną sekwencję odpowiedzialną za wiązanie nukleotydów (ATP, GTP). *RPS-2* w swej N-końcowej części zawiera motyw suwaka leucynowego, który mógłby odpowiadać za dimeryzację białek. Natomiast *N* zawiera w swej N-końcowej części domenę homologiczną do receptora dla interleukiny-1 (IL-1R). Fakt ten prowokuje do interesujących spekulacji. Związanie interleukiny z IL-1R doprowadza do degradacji IκB, a tym samym uwolnienia aktywnego czynnika transkrypcyjnego NFκB, który zmienia swą lokalizację z cytoplazmy do jądra, gdzie aktywuje geny związane z odpowiedzią immunologiczną. Co więcej, w procesie tym uczestniczy jako przekaźnik H₂O₂ — związek, którego rola w odpowiedzi roślin na patogena jest niepodważalna.

Opierając się na analizie sekwencji, produkty genów *RPS-2* oraz *N* umiejscawia się w cytoplazmie, gdzie rozpoznawałyby wewnątrzkomórkowy ligand, podczas gdy *L⁶* i *Cf9* kotwiczyłyby się w błonie stanowiąc receptor dla zewnątrzkomórkowego ligandu.

Inny sklonowany gen odporności, *PTO*, pochodzi z pomidora i warunkuje odporność na bakterię *P. syringae*. Na podstawie sekwencji przewiduje się, że koduje on kinazę serynowo-treoninową, która mogłaby uczestniczyć w przekazywaniu sygnału (MARTIN i współaut. 1993).

Poznanie interakcji między genem odporności a genem awirulencji otwiera perspektywę konstruowania roślin o zwiększonej odporności. Załóżmy, że do rośliny z genem odporności *R* wprowadzimy gen awirulencji pod kontrolą promotora indukowanego specyficznie przez patogena, wówczas w przypadku infekcji dochodzi do uruchomienia mechanizmu obronnego opartego na oddziaływaniu *Avr-R*. Wstępne doświadczenia przeprowadzone z kombinacją genów *Avr9/Cf9* wydają się dość obiecujące (HAMMOND-KOSACK i współaut. 1994).

Fakt, że to właśnie gen awirulencji pozwala roślinie rozpoznać obecność intruza, generuje natychmiast pytanie — dlaczego patogeny posiadają owe geny? Być może geny *Avr* kodują cechę, która daje zdolność przystosowawczą patogenom, tak jak to stwierdzono dla wielu bakteryjnych genów awirulencji nadających bakteriom zwiększoną zjadliwość wobec wrażliwych roślin, to jest nie posiadających genów *R*.

Oddziaływania czynnik chorobotwórczy — roślina mogą przybierać inne niż opisywane przez teorię „gen do genu” właściwości. Rasy grzyba *Cochliobolus carbonum* produkujące toksynę „Hc” mogą infekować jedynie kukurydzę pozbawioną aktywnego genu odporności *Hm1* (JOHAL i BRIGGS 1992). Mutacje znoszące produkcję toksyny są recesywne i korelują z utratą wirulencji. Tak więc, z czterech możliwych kombinacji między zjadliwym i niezjadliwym grzybem a odporną bądź wrażliwą rośliną, tylko jedna prowadzi do wrażliwości rośliny. Po wyizolowaniu genu *Hm1*, okazało się, że koduje on NADPH zależną reduktazę toksyny Hc, która inaktywuje toksynę. Sekwencja genu *Hm1*, naturalnie nie wykazuje homologii do innych opisanych powyżej genów odporności *R*.

ROLA KWASU SALICYLOWEGO

Istnieje szereg różnorodnych dowodów wskazujących na udział kwasu salicylowego (SA) w procesie patogenezy. Pierwszą przesłankę stanowiła obserwacja, że podanie roślinom tytoniu aspiryny (kwasu acetylosalicylowego) bądź kwasu salicylowego indukuje odporność na wirusa mozaiki tytoniowej (TMV) oraz aktywuje geny biorące udział w patogenezie (ANTONIWI i WHITE 1980). Kiedy natomiast rośliny tytoniu infekowane TMV inkubowano w podwyższonej temperaturze (32°C) nie reagowały one odpowiedzią typu HR, to znaczy nie tworzyły nekroz, ani nie produkowały białek PR, a wirus mógł rozprzestrzeniać się bez ograniczeń w całej roślinie. Okazało się, że synteza SA w tej temperaturze była również zablokowana. Przeniesienie roślin do niższej temperatury (22°C) przywracało zarówno syntezę SA, jak również powstawanie nekroz (MALAMY i współaut. 1992).

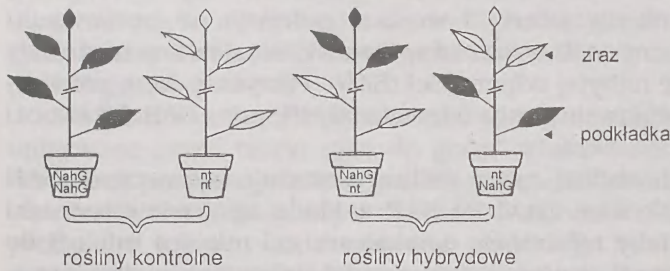
Ponadto w innych doświadczeniach pokazano, że hybrydy międzygatunkowe *Nicotiana glutinosa* i *N. debneyi* akumulujące duże ilości SA, konstytutywnie produkują białka PR (YALPANI i współaut. 1993). Po infekcji wirusem TMV rośliny te wytwarzały nekrozy kilkakrotnie mniejsze niż w odpornej na TMV odmianie

tytoniu *Xanthi* nc. wskazując, że lokalizacja infekcji była w nich wyjątkowo szybka i skuteczna. W wielu gatunkach roślin: tytoniu, ogórku, ziemniaku i *A. thaliana* podczas odpowiedzi na atak patogena endogennej poziomu SA wzrasta wielokrotnie zarówno w liściach infekowanych, jak i w nieinfekowanych (tzw. górnych). W obu przypadkach synteza SA poprzedza indukcję białek PR (KLESSIG i MALAMY 1994). Zewnętrzne podanie SA indukuje w tytoniu te same geny i z podobną kinetyką, jak podczas odpowiedzi SAR na skutek infekcji TMV (WARD i współaut. 1991). Na tej podstawie oparto przypuszczenie, że SA może stanowić element kaskady przekaźników wiodącej do syntezy białek PR. Bezpośrednie dowody na funkcję kwasu salicylowego pochodzą z badań przeprowadzonych na transgenicznym tytoniu zawierającym bakteryjny gen *NahG* z *Pseudomonas putida*. Produkt genu *NahG* katalizuje przekształcenie SA do katecholu. Tym samym po zakażeniu rośliny z aktywnym genem *NahG* były zdolne do akumulowania tylko niewielkich ilości SA i w konsekwencji wykazywały ostrzejsze symptomy chorobowe (więcej i większe nekrozy), w porównaniu z roślinami nietransformowanymi (GAFFNEY i współaut. 1993). Rośliny te nie były w stanie również wytworzyć nabytej odporności (SAR). Powyższe dane potwierdzają udział SA, zarówno w powstawaniu odpowiedzi HR, jak i SAR (VERNOOIJ i współaut. 1994).

Zainfekowanie nawet niewielkiej części rośliny powoduje wytworzenie SAR w obrębie całej rośliny. Tak więc zjawisko SAR zakłada istnienie cząsteczki sygnałowej, która przenosiłaby informację o zakażeniu od miejsca infekcji do wszystkich tkanek. Obserwowany wzrost poziomu SA w liściach nieinfekowanych (tzw. liściach górnych), poprzedzający indukcję białek PR sugerował, że być może SA miałby stanowić ten ruchomy element kaskady przekaźników. Jednak doświadczenie wykonane na ogórku zakażonym bakterią *P. syringae* pokazało, że sygnał odpowiedzialny za gromadzenie się SA w całej roślinie był uwolniony z zainfekowanego liścia zanim wzrost poziomu SA mógł być wykryty w tym liściu, co poddało w wątpliwość fakt, że to właśnie SA stanowić by miał ten przemieszczający się sygnał (RASMUSSEN 1991). Przekonywających dowodów kwestionujących mobilność SA dostarczyły również eksperymenty ze wspomnianym wcześniej tytoniem z genem *NahG*. Zaszczepiając zrazy z *NahG* bądź nietransformowanych (nt) roślin na podkładkach nt lub *NahG* sporządzono cztery typy roślin (ryc. 2). Otrzymane rośliny testowano po infekcji liści podkładki na powstawanie SAR i indukcję genów PR w liściach zrazu. Bez względu na pochodzenie podkładki, SAR obserwowano wyłącznie w roślinach ze zrazem nt. A więc, mimo że podkładki z genem *NahG* niezdolne były do kumulowania wysokiego stężenia SA, generowały sygnał, docierający do zrazu i indukujący powstawanie SAR (VERNOOIJ i współaut. 1994). Interesującym natomiast okazał się fakt, że rośliny ze zrazami *NahG* nie wykazywały ani reakcji SAR ani indukcji białek PR. Reasumując, SA prawdopodobnie nie przemieszcza się, by zainicjować SAR, jednak jego obecność jest niezbędna lokalnie w miejscu tworzenia SAR.

Analiza SA gromadzącego się w zakażonej tkance wykazała, że powstający wolny SA jest przekształcany następnie przez glukozylotransferazę UDPglukoza:SA do β -glukozydu (SAG) (YALPANI i współaut. 1992). Tworzenie koniugatów z cukrem jest powszechną u roślin formą magazynowania dużych ilości toksycznych bądź wysoce reaktywnych związków (KLECZKOWSKI i SCHELL 1995).

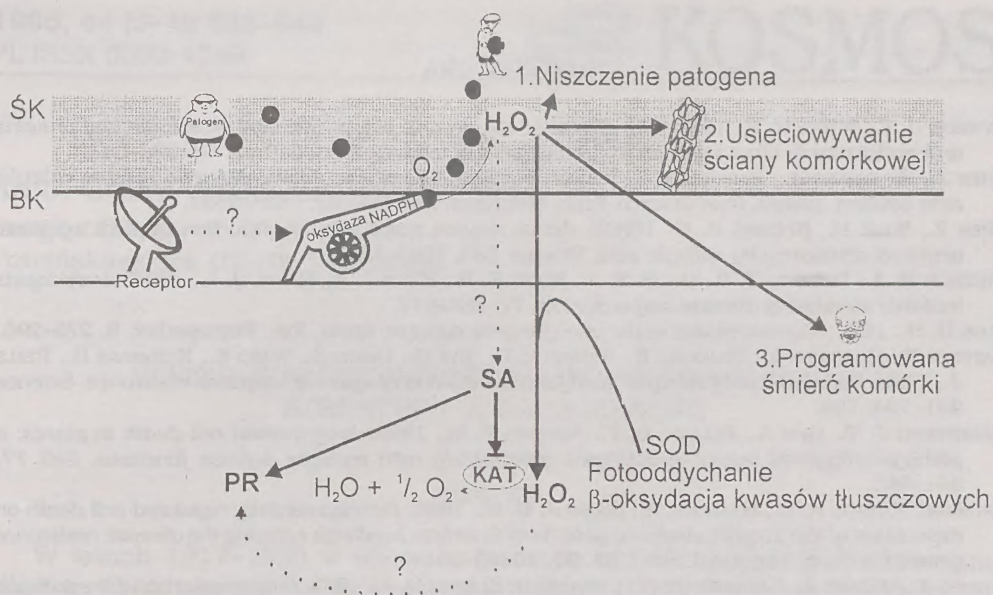
Dekoniugacja a więc reakcja odwrotna umożliwia, w razie potrzeby, szybką mobilizację „uwięzionego” dotychczas aktywnego związku. Taki mechanizm został opisany dla szeregu hormonów roślinnych. Sądzi się, że SAG stanowi taką nieaktywną biologicznie formę SA, a obserwowaną indukcję białek PR po podaniu glukozydu przypisuje się raczej działaniu SA uwolnionemu przez β -glukozydazy umiejscowione w ścianie komórkowej. Jako że w wyniku infekcji SAG jest gromadzony w całej roślinie, stworzono interesującą hipotezę dotyczącą natury SAR (HENNIG i współaut. 1993). Mianowicie, cytoplazmatyczny zapas SAG powstały przy pierwotnej infekcji, uwalniany byłby do przestrzeni zewnątrzkomórkowej na skutek destrukcji komórek podczas ponownej infekcji. Tam β -glukozydazy ściany komórkowej hydrolizowałyby natychmiast SAG do wolnego SA, który indukowałby reakcję obronną (MALAMY i współaut. 1993).



Ryc. 2. Schemat doświadczenia potwierdzającego udział SA w indukcji odpowiedzi typu SAR. Transgeniczne rośliny tytoniu *NahG* niezdolne do gromadzenia SA i rośliny nietransformowane (*nt*) posłużyły jako źródło zrazów bądź podkładek dla sporządzenia czterech typów roślin. Po infekcji liści podkładki wirusem TMV badano powstawanie SAR w liściach zrazu.

Identyfikacja cytoplazmatycznego kompleksu białkowego o ciężarze 240–280 kDa specyficznie wiążącego SA (SABP ang. salicylic acid binding protein), wyizolowanego z liści tytoniu (CHEN i współaut. 1993a), ułatwiła poznanie molekularnych podstaw procesu indukowanej odporności. W skład tego kompleksu wchodzi co najmniej jedna podjednostka (o ciężarze 57 kDa) specyficznie wiążąca SA a także te jego analogi (kwas acetylosalicylowy, kwas 2-6-dwuhydroksybenzoesowy), które indukują syntezę białek PR oraz efektywnie pobudzają procesy towarzyszące indukowanej odporności. Analiza sekwencji c-DNA kodującej peptyd 57 kDa wchodzący w skład SABP wykazała wysoki stopień zgodności ze znanymi roślinnymi katalazami (CHEN i współaut. 1993b). Bezpośrednim dowodem potwierdzającym analizę sekwencyjną są wyniki wykazujące, że oczyszczony preparat SABP jest zdolny do konwersji H_2O_2 do H_2O i O_2 w warunkach *in vitro*. Ponadto związanie SA poprzez SABP wpływa na hamowanie aktywności katalazy *in vitro*. Wiele przesłanek, takich jak wysoka specyficzność wiązania, czy jego odwracalna inhibicja wskazuje, że białko wiążące SA może pełnić rolę receptora i być przekazywaczem informacji o procesach infekcji komórek roślinnych (CHEN i współaut. 1993b).

Ten model jest zgodny z wcześniejszymi doniesieniami, które pokazały (ryc. 3), że H_2O_2 uczestniczy w szeregu procesach reakcji obronnej: 1) bezpośrednio przyczynia się do destrukcji patogena; 2) fortyfikuje ścianę komórkową; 3) reguluje ekspresję genów gospodarza. Te dwa ostatnie procesy są również zależne od SA.



Ryc. 3. Rozpoznanie przez roślinę obecności patogena zapoczątkowuje kaskadę reakcji. Kluczową rolę pełni w nich nadtlenek wodoru (H_2O_2). ŚK — ściana komórkowa, BK — błona komórkowa, KAT — katalaza, SA — kwas salicylowy, SOD — dysmutaza nadtlenkowa, PR — białka PR (pathogenesis-related proteins).

PODSUMOWANIE

Ostatnie lata przyniosły szereg ważkich odkryć dotyczących patogenezы roślin. Poznano sekwencje kilku genów odporności. Dowiedziono udziału SA i H_2O_2 w przekazywaniu sygnału, to jednak wciąż zbyt mało by stworzyć kompletny model oddziaływań patogen — roślina. A przecież gruntowne poznanie tych mechanizmów może nie tylko wzbogacić naszą wiedzę, ale również przyczynić się do wzmocnienia naturalnej odporności roślin, tym samym redukując ogromne straty uprawne bez konieczności używania chemicznych środków ochrony roślin.

MOLECULAR BASIS OF PATHOGEN ACTION ON PLANT CELLS

Summary

In response to pathogen attack a plant can trigger complex defense strategies. According to the "gene-for-gene" hypothesis perception of the pathogen's presence depends on matching of a specific plant resistance (*R*) gene and a corresponding pathogen avirulence (*Avr*) gene. Several *R* genes from various plant species have recently been cloned and characterized. Some of them share common structural features though they encode resistance to pathogens having different lifestyles. This suggests that plants have evolved a conserved mechanism of resistance. Considerable evidence suggested that salicylic acid (SA) serves as a signal molecule during pathogenesis. Transgenic plants which do not accumulate SA show more severe symptoms than nontransgenic plants and are unable to mount systemic acquired resistance.

LITERATURA

- ANTONIW J. F., WHITE R. F., 1980. *The effects of aspirin and polyacrylic acid on soluble leaf proteins and resistance to virus infection in five cultivars of tobacco*. *Phytopath. Z.* 98, 331-341.
- CHEN Z., RICIGLIANO J., KLESSIG D. F., 1993a. *Purification and characterization of a soluble salicylic acid-binding protein from tobacco*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 90, 9533-9537.
- CHEN Z., SILVA H., KLESSIG D. F., 1993b. *Active oxygen species in the induction of plant systemic acquired resistance by salicylic acid*. *Science* 262, 1883-1886.
- DIETRICH R. A., DELANEY T. P., UKNES S. J., WARD E. R., RYALS J. A., DANGL J. L., 1994. *Arabidopsis mutants simulating disease response*. *Cell* 77, 565-577.
- FLOR H. H., 1971. *Current status of the gene-for-gene concept*. *Annu. Rev. Phytopathol.* 9, 275-296.
- GAFFNEY T., FRIEDRICH L., VERNOOIJ B., NEGROTTO D., NYE G., UKNES S., WARD E., KESSMANN H., RYALS J., 1993. *Requirement of salicylic acid for the induction of systemic acquired resistance*. *Science* 261, 754-756.
- GREENBERG J. T., GUO A., KLESSIG D. F., AUSUBEL F. M., 1994. *Programmed cell death in plants: a pathogen-triggered response activated coordinately with multiple defense functions*. *Cell* 77, 551-563.
- HAMMOND-KOSACK K. E., HARRISON K., JONES J. D. G., 1994. *Developmentally regulated cell death on expression of the fungal avirulence gene Avr9 in tomato seedlings carrying the disease resistance gene Cf-9*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 91, 10445-10449.
- HENNIG J., MALAMY J., GRYNKIEWICZ G., INDULSKI J., KLESSIG D. F., 1993. *Interconversion of the salicylic acid signal and its glucoside in tobacco*. *Plant J.* 4, 593-600.
- JOHAL G., BRIGGS S., 1992. *Reductase activity encoded by the HM1 disease resistance gene in maize*. *Science* 258, 985-987.
- JONES J. D. G., 1994. *Paranoid plants have their genes examined.* *Curr. Biol.* 4, 749-751.
- KLECZKOWSKI K., SCHELL J., 1995. *Crit. Rev. Plant Sci.* 14, 283-298.
- KLESSIG D. F., MALAMY J., 1994. *The salicylic acid signal in plants*. *Plant Mol. Biol.* 26, 1439-1458.
- KUĆ J., 1982. *Induced immunity to plant disease*. *Bioscience* 32, 854-860.
- LEVINE A., TENHAKEN R., DIXON R., LAMB C., 1994. *H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response*. *Cell* 79, 583-593.
- MALAMY J., HENNIG J., KLESSIG D. F., 1992. *Temperature-dependent induction of salicylic acid and its conjugates during the resistance response to tobacco mosaic virus infection*. *Plant Cell* 4, 359-366.
- MALAMY J., HENNIG J., SÁNCHEZ-CASAS P., INDULSKI J., GRYNKIEWICZ G., KLESSIG D. F., 1993. *Role of Salicylic Acid in Systemic Acquired Resistance*. [W:] *Plant Signals in Interactions with Other Organism — Current Topics in Plant Physiology; An American Society of Plant Physiologist Series* 11, 230-232.
- MARTIN G. B., BROMMONSCHENKEI S. H., CHUNWONGSE J., FRARY S., GANAL M. W., SPIVEY R., WU T., EARLE E. D., TANKSLEY S. D., 1993. *Map-based cloning of a protein kinase gene conferring disease resistance in tomato*. *Science* 262, 1432-1436.
- RASMUSSEN J. B., HAMMERSCHMIDT R., ZOOK M. N., 1991. *Systemic induction of salicylic acid accumulation in cucumber after inoculation with Pseudomonas syringae pv. syringae*. *Plant Physiol.* 97, 1342-1347.
- STASKAWICZ B. J., AUSUBEL F. M., BAKER B. J., ELLIS J. G., JONES D. G., 1995. *Molecular genetics of plant disease resistance*. *Science* 268, 661-667.
- VERNOOIJ B., FRIEDRICH L., MORSE A., REIST R., KOLDITZ-JAWHAR R., WARD E., UKNES S., KESSMANN H., RYALS J., 1994. *A novel long distance signal is required for systemic acquired resistance*. *Plant Cell* 6, 959-965.
- WARD E. R., UKNES S. J., WILLIAMS S. C., DINCHER S. S., WIEDERHOLD D. L., ALEXANDER D. C., AHL-GOY P., MÉTRAUX J. -P., RYALS J. A., 1991. *Coordinate gene activity in response to agents that induce systemic acquired resistance*. *Plant Cell* 3, 1085-1094.
- YALPANI N., SCHULZ M., DAVIS M. P., BALKE N. E., 1992. *Partial purification and properties of an inducible uridine 5'-diphosphate-glucose:salicylic acid glucosyltransferase from oat roots*. *Plant Physiol.* 100, 457-463.
- YALPANI N., SHULAEV V., RASKIN I., 1993. *Endogenous salicylic acid levels correlate with accumulation of pathogenesis-related proteins and virus resistance in tobacco*. *Phytopathology* 83, 702-708.

ANNA GÓRA, WŁODZIMIERZ ZAGÓRSKI

Instytut Biochemii i Biofizyki PAN
Pawińskiego 5A, 02-106 WarszawaWIROID WRZECIONOWATOŚCI BULW ZIEMNIAKA —
STRUKTURA A PATOGENNOŚĆ

WSTĘP

W latach 1917–1923 w Maine w Stanach Zjednoczonych zaobserwowano pojawienie się nowej choroby ziemniaka (DIENER 1979). Porażone rośliny karłowaciały, ich liście były wydłużone i skrzycone, a bulwy mniejsze i wrzecionowate. Choroba rozprzestrzeniała się szybko, główną drogą zakażenia był bezpośredni kontakt rośliny chorej ze zdrową. Stwierdzono też, że czynnik infekcyjny przenosi się łatwo przez skażone sokiem chorej rośliny narzędzia rolnicze. Infekcja była przenoszona także w wyniku szczepienia infekcyjnymi zrazami, przez pyłek zakażonych roślin i wegetatywnie — przez bulwy. Dalsze badania wykazały, że czynnik wywołujący wrzecionowatość bulw ziemniaka występuje wśród dziko rosnących w Ameryce Południowej i Północnej gatunków z rodziny *Solanaceae*. Jego rozprzestrzenianie się w naturalnych, bogatych ekosystemach jest jednak ograniczone. Wprowadzenie monokultur ziemniaka i rozwój technik rolniczych umożliwiły rozprzestrzenianie się choroby.

Przez ponad pięćdziesiąt lat usiłowano wyodrębnić czynnik zakaźny, przypuszczając, że patogen ten jest wirusem roślinnym. Stwierdzono jednak, że nie ma on właściwości immunogennych, jest niewrażliwy na działanie proteaz, DNaz i fenolu, ulega natomiast inaktywacji pod wpływem działania RNaz. To sugerowało, że czynnikiem infekcyjnym jest wolny kwas rybonukleinowy, w przeciwieństwie do wirusów nieobiałczony. Własności badanego czynnika okazały się więc tak niekonwencjonalne, że dla tej grupy patogenów utworzono nowy termin — wiroidy (DIENER 1979), zaś patogen wywołujący tę chorobę ziemniaka nazwano wiroidem wrzecionowatości bulw ziemniaka (ang. potato spindle tuber viroid, PSTVd). Patogeny te różnią się od typowych wirusów, bowiem ich materiał genetyczny to cząsteczka jednoniciowego RNA złożonego z około 250–375 nukleotydów, nie kodująca żadnych białek a mimo to replikująca się w komórkach gospodarza i wywołująca swoistą chorobę rośliny (DIENER 1987, SEMANCIK 1987). Tak więc całość informacji genetycznej jest zawarta w strukturze pierwszej i drugorzędowej RNA. Patogeny te powodują infekcje o podobnych objawach i sposobie przenoszenia w uprawach pomidorów, ogórków, awokado, palm kokosowych, tytoniu, owoców cytrusowych i winorośli. Poniżej przedstawiono

wybrane wiroidy należące do różnych grup, wyodrębnionych na podstawie podobieństwa sekwencji RNA oraz występowaniu charakterystycznych regionów w cząsteczkach wiroidów (SYMONS 1991).

Grupa ASBV

podgrupa ASBV

— ASBVd — wiroid skazy słonecznej awokado (ang. avocado sunblotch viroid)

Grupa PSTV

podgrupa PSTV

— CSVd — wiroid karłowatości złocieni (ang. chrysanthemum stunt viroid)

— CEVd — wiroid łuszczyca kory cytrusów (ang. citrus exocortis viroid)

— CCCVd — wiroid kadang-kadang kokosów (ang. coconut cadang-cadang viroid)

— CTIVd — wiroid tinangaja kokosów (ang. coconut tinangaja viroid)

— CPFVd — wiroid bladeści owoców ogórka (ang. cucumber pale fruit viroid)

— HLVD — utajony wiroid chmielu (ang. hop latent viroid)

— HSVd — wiroid karłowatości chmielu (hop stunt viroid)

— PSTVd — wiroid wrzecionowatości bulw ziemniaka (ang. potato spindle tuber viroid)

— TASVd — wiroid wierzchołkowej karłowatości pomidorów (ang. tomato apical stunt viroid)

— TPMVd — wiroid planta-macho pomidorów (ang. tomato planta macho viroid)

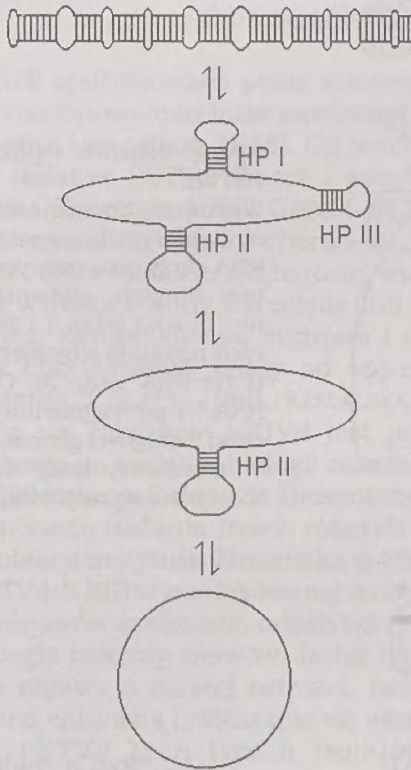
podgrupa ASSV

— ASSVd — wiroid bliznowacenia skórki jabłek (ang. apple scar skin viroid)

— GYSVd — wiroid żółtej plamistości winorośli (ang. grapevine yellow speckle viroid)

Genom PSTVd stanowi jednoniciowy, koliście zamknięty RNA o długości 356–360 nukleotydów. Na podstawie struktury pierwszorzędowej po uwzględnieniu danych dotyczących trawień enzymatycznych i modyfikacji chemicznej RNA wiroida zaproponowano model struktury drugorzędowej cząsteczki PSTVd (RIESNER i współaut. 1979). Cząsteczka wiroida ma pałeczkowatą formę o strukturze w przeważającej części dwuniciowej bowiem około 70% zasad tworzy pary nukleotydowe, w tym najwięcej typu G:C (ryc. 1). Badania procesu denaturacji termicznej PSTVd i innych wiroidów wykazały istnienie kilku struktur pośrednich pomiędzy formą pałeczkowatą a kołową całkowicie zdenaturowaną (HENCO i współaut. 1979), (ryc. 1). Jedną z nich, zawierającą trzy dwuniciowe fragmenty typu „szpilek” (z ang. zwane HPI, HPII, HPIII), ma duże znaczenie biologiczne. Uważa się bowiem, że struktura taka jest tworzona w czasie replikacji RNA PSTVd i ma kluczowe znaczenie dla tego procesu. Przypuszcza się, że w obrębie sekwencji szpilki HPI znajduje się miejsce cięcia oligomerycznych replikacyjnych form pośrednich i ligacji powstałych monomerycznych odcinków w ostateczne formy kołowe (DIENER 1986). Szpilka II może być miejscem wiązania niezidentyfikowanego jeszcze czynnika kodowanego przez roślinę gospodarza, ułatwiającego transkrypcję macierzystego genomu PSTVd (LOSS i współaut. 1991). Wiroidy niosące sekwencje tworzące typowe struktury szpilki II infekują ten sam zasięg

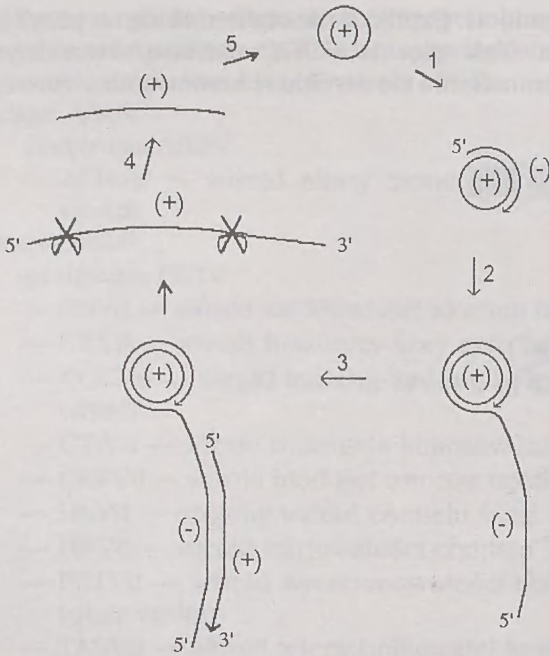
roślin — gospodarzy (ziemniak i pomidor). Szpilki II nie stwierdza się na przykład w wiroidzie karłowatości chmielu. Tak więc istnienie sekwencji tworzących szpilkę II może być adaptacją do namnażania się wiroida w komórkach swojego gospodarza.



Ryc. 1. Etapy denaturacji RNA PTVd. HP I, HP II, HP III — struktury typu „szpilek” (ang. hairpins) stabilizujące pośrednią formę przestrzenną pomiędzy cząsteczką pałeczkowatą a kolistą, całkowicie zdenaturowaną.

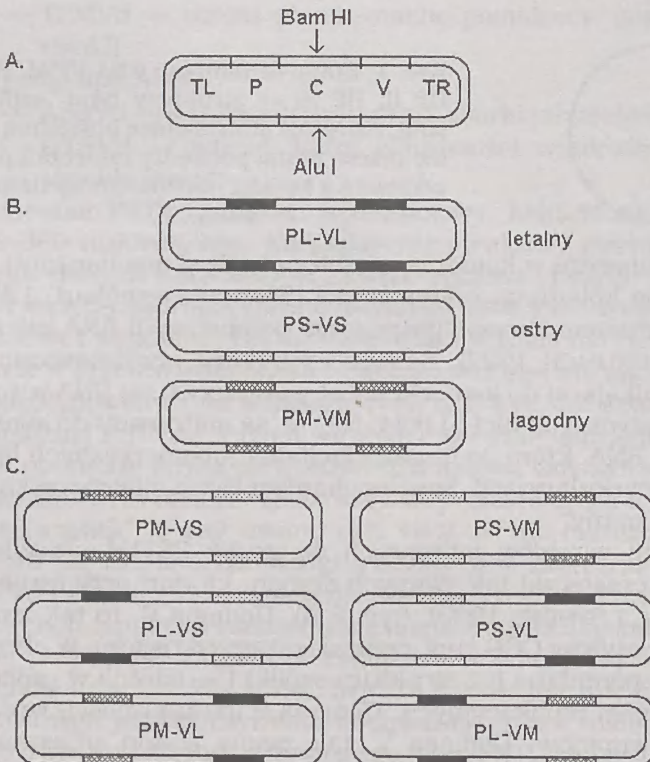
Replikacja RNA wiroidowego w komórce przebiega według mechanizmu tak zwanego obracającego się koła (ang. rolling circle) (BRANCH i współaut. 1988), najprawdopodobniej z udziałem enzymu gospodarza polimerazy II RNA zależnej od DNA (SCHINDLER i MÜHLBACH 1992). Schemat replikacji przedstawiono na rycinie 2. Na matrycy wnikaającej do komórki kolistej cząsteczki (+) RNA wiroida zachodzi synteza oligomerycznych nici (-) RNA. Nici te są matrycami do syntezy oligomerycznych nici (+) RNA, które po fragmentacji do monomerycznych liniowych cząsteczek ulegają cyrkularyzacji. Sam mechanizm cięcia oligomerycznych nici RNA PSTVd nie jest znany.

Porównanie sekwencji wiroidów należących do grupy PSTVd umożliwiło wyróżnienie 5 regionów cząsteczki tak zwanych domen, którym przypisuje się określone funkcje (KEESE i SYMONS 1985), (ryc. 3 A). Domena C, to tak zwany centralny region konserwatywny CCR (ang. central conserved region). W obrębie tej domeny występuje wspomniana już struktura szpilki I — istotna w procesie cięcia oligomerycznych form replikacyjnych. Domena P (patogenności) wpływa na stopień zjadliwości wiroidów. Domena V, tak zwany region zmienności, prawdopodobnie moduluje patogenność. Domeny terminalne TR (prawa) i TL



Ryc. 2. Schemat replikacji RNA PSTVd.

Wnikająca do komórki kolista, monomeryczna cząsteczka (+) RNA służy jako matryca do syntezy długich, oligomerycznych nici (-) RNA (etap 1 i 2), na których powstają oligomeryczne nici (+) RNA (etap 3). Oligomery RNA (+) po fragmentacji na odcinki o długości genomu wiroida — monomery (etap 4) ulegają cyrkularyzacji (etap 5).



Ryc. 3. Budowa analizowanych genomów PSTVd.

[A] Ogólny model budowy cząsteczki wiroida z zaznaczonymi strukturalnymi domenami: C, P, V, TR, TL oraz miejscami cięcia rozpoznawanymi przez enzymy restrykcyjne *Bam*HI, *Alu*I. Miejsca te zostały wykorzystane do konstrukcji hybrydowych cząsteczek PSTVd. [B] Genomy wyjściowe (letalny, ostry, łagodny). [C] Genomy hybrydowe (chimery).

(lewa) prawdopodobnie uczestniczą w zdarzającej się międzycząsteczkowej rekombinacji i rearanżacji RNA wiroidów. Strukturę tych domen wiąże się również z przemieszczaniem się wiroida w roślinie (SEMANCIK 1987).

RÓŻNORODNOŚĆ GENOMU PSTVd

W 1978 opublikowano pełną sekwencję genomu pierwszego wiroida. Był to wiroid wrzecionowatości bulw ziemniaka PSTVd-DI, należący do szczepu pośredniego (GROSS i współaut. 1978). Od tamtej pory poznano już sekwencję około 20 różnych izolatów PSTVd (GROSS i współaut. 1981, HEROLD i współaut. 1992, LAKSHMAN i TAVANTZIS 1993, GÓRA i współaut. 1994). W porażonych roślinach izolaty te wywołują objawy chorobowe, które możemy określić jako łagodne, pośrednie, ostre i letalne. Najbardziej widocznym objawem porażenia jest zahamowanie wzrostu rośliny, skrzywienie liści i ich zwieszanie się oraz nekrozy. Bulwy porażonych ziemniaków są mniejsze i mają wrzecionowaty kształt. Natężenie objawów chorobowych zależy od szczepu wiroida oraz od gatunku rośliny (PFANNENSTIEL i SLACK 1980, KOWALSKA-NOORDAM 1986/1987). Rośliną silnie reagującą na zakażenie PSTVd jest pomidor odm. Rutgers, będący rośliną wskaźnikową do badania biologii zakażenia tego wiroida.

W 1991 roku w Zakładzie Biosyntezy Białka Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN rozpoczęto badania trzech różnych fenotypowo izolatów PSTVd pochodzących z kolekcji Instytutu Ziemniaka w Młochowie (GÓRA i współaut. 1994). Izolat ostry PSTVd-S XIII w zainfekowanej roślinie wskaźnikowej powoduje wystąpienie ostrych objawów zakażenia, takich jak: karłowatość rośliny, silne skrzywienie liści oraz rozległe nekrozy nerwów. Izolat typu pośredniego PSTVd-I 818 wywołuje podobne objawy o niższej ostrości, natomiast izolat łagodny PSTVd-M, poza nieznaczną epinastią (zwieszanie się liści) nie daje żadnych objawów porażenia.

RNA PSTVd tych trzech izolatów otrzymany z zakażonych roślin wskaźnikowych posłużył do syntezy pełnej długości kopii DNA (cDNA) PSTVd. Pierwszą nić cDNA otrzymano poprzez odwrotną transkrypcję RNA wiroidowego, drugą nić — poprzez amplifikację cDNA metodą PCR (reakcja łańcuchowa polimerazy). W obu reakcjach zastosowaliśmy specyficzne startery (ang. primers) o sekwencji komplementarnej do regionu konserwatywnego CCR. Odpowiednie dobranie starterów umożliwiło otrzymanie pełnej długości monomerycznych cząsteczek cDNA wiroida. Otrzymane cDNA sklonowano w bakteryjnym wektorze plazmidowym pUC9 w sposób umożliwiający uzyskanie infekcyjnych plazmidowych kopii cDNA PSTVd (CANDRESSE i współaut. 1990, TABLET i SÄNGER 1984). Tabela 1 przedstawia wyniki sekwencjonowania sklonowanego cDNA PSTVd. Izolat łagodny PSTVd-M był molekularnie homogeny, bowiem tylko jeden wariant sekwencyjny typu M został wykryty w trakcie sekwencjonowania. Izolaty: pośredni PSTVd-I 818 oraz ostry PSTVd-S XIII — były molekularnie heterogenne. Trzy warianty sekwencyjne I2, I3 oraz I4 zostały wykryte w PSTVd-I 818. Natomiast PSTVd-S XIII był złożony z wariantów sekwencyjnych S23, S27, I2, I4. Różnice w sekwencji nukleotydowej tych wariantów sekwencyjnych dotyczą kilku podstawień nukleotydowych w obrębie domeny P i V. Przeprowadzono badania infekcyjności polegające na mechanicznym zakażeniu, poprzez

wcieranie preparatów plazmidowych (inokulum) w liście siewek pomidora odmiany Rutgers i obserwacji rozwijających się objawów porażenia. Badania te wykazały, iż wszystkie warianty molekularne są infekcyjne i indukują symptomy o określonej ostrości, są więc odrębnymi genomami zdolnymi do replikacji w komórkach rośliny gospodarza. Na uwagę zasługuje fakt, że wyjściowy izolat ostry w istocie jest złożony z czterech wariantów sekwencyjnych, wśród których dwa (I2, I4) analizowane osobno są fenotypowo pośrednimi. Mimo występowania różnych fenotypowo wariantów sekwencyjnych w izolacie ostrym PSTVd-SXIII całkowity fenotyp tego izolatu, złożonego z kilku wariantów, pozostaje ostry. Pośrednie objawy wywoływane zapewne przez warianty I2, I3, I4 są zagłuszane przez ostre objawy wywoływane przez obecne w izolacie wersje „ostre”. Jest oczywiste, że wyjściowy izolat jest nie tylko heterogenny molekularnie, ale po prostu zawiera różne wersje genotypu PSTVd. Cecha patogenności jest związana z określoną sekwencją niesioną przez określony wariant i przekazywaną potomnym niciom danego wariantu. Zjawisko heterogenności genetycznej wirusów RNA, a także wiroidów, jest powszechne (EIGEN 1993, VISVADER i SYMONS 1985). Wiąże się je z wysoką zmiennością mutacyjną owych genomów, wynikającą z braku mechanizmów reperujących swoistych dla genów zapisanych w podwójnych niciach DNA.

Tabela 1

Wyniki analizy molekularnej izolatów RNA PSTVd

Wyjściowy izolat PSTVd	Wykryty wariant sekwencyjny	Liczba znalezionych klonów	Objawy wywoływane na porażonych roślinach przez dany wariant sekwencyjny
Ostry PSTVd-SXIII	S23	1	ostre
	S27	1	ostre
	12	8	pośrednie
	14	1	pośrednie
Pośredni PSTVd-1818	12	8	pośrednie
	13	1	pośrednie
	14	1	pośrednie
Łagodny PSTVd-M	M	7	łagodne

PATOGENNOŚĆ PSTVd

Wobec tego, że RNA wiroidów nie niesie informacji dotyczącej syntezy swoistych białek przyjmuje się, że patogenny wpływ wiroidowego RNA na roślinę wynika z bezpośredniego oddziaływania tegoż RNA na jakieś składniki komórki gospodarza. Wysłunięto kilka hipotez dotyczących mechanizmu patogenności wiroidów, ale żadna z nich nie została, do tej pory, potwierdzona w pełni

doświadczalnie. Przypuszczalny udział komórkowej polimerazy II RNA w replikacji wiroidów stał się podstawą do stworzenia hipotezy, według której RNA PSTVd może współzawodniczyć z DNA gospodarza o polimerazę II, zakłócając funkcjonowanie komórek roślinnych (RACKWITZ i współaut. 1981).

Inna hipoteza jest oparta na podobieństwie sekwencji genomu wiroida do sekwencji niskocząsteczkowych jądrowych RNA komórki (snRNA). Proponuje się, że RNA wiroidowy zakłóca proces wycinania intronów z RNA komórkowego. Model zaproponowany przez DICKSON (1981) jest oparty na podobieństwie sekwencji pomiędzy RNA PSTVd w rejonie nukleotydów 306–314 i 112–123 a końcem 5' niskocząsteczkowego jądrowego U1 RNA. W innych modelach (DIENER 1981, GROSS i współaut. 1982) również zwrócono uwagę na podobieństwo sekwencji wiroidów do pierwszorzędowej struktury RNA U1 (snRNA). Tym autorem istotne wydaje się podobieństwo 5' końca U1 RNA i genomu PSTVd pomiędzy 258 i 282 nukleotydem (GROSS i współaut. 1982), lub pomiędzy 257 i 279 nukleotydem (DIENER 1981). Podobnie, sugerowano wpływ wiroidowego RNA na proces składania genów biorąc pod uwagę podobieństwo sekwencji RNA PSTVd do U3 RNA (SCHÜMACHER i współaut. 1983, KISS i współaut. 1983) oraz ASBVd do U5 RNA (KISS i SOLYMOSEY 1982). Słabą stroną powyższych modeli jest to, że różnice sekwencji nukleotydowej pomiędzy różnymi fenotypowo szczepami PSTVd nie występują w obrębie kluczowych dla modeli regionów cząsteczki PSTVd, nie tłumaczą więc różnic w ostrości objawów wywoływanych przez różne szczepy. Istotne wydaje się również to, iż modele te były oparte na porównaniu sekwencji RNA wiroidowego z U-RNA z komórek zwierzęcych a nie roślinnych.

Najbardziej interesująca wydaje się hipoteza wysunięta przez SCHNÖLZER i współpracowników (1985). Podstawą tego modelu jest zauważona korelacja pomiędzy ostrością objawów powodowanych przez różne izolaty PSTVd, a stabilnością termodynamiczną regionu cząsteczki, w którym lokują się różnice w sekwencji pomiędzy tymi izolatami. Region ten, zwany VM (ang. virulence modulating), należy do domeny P i obejmuje fragment RNA pomiędzy 42 i 60 (górny fragment nici struktury pałeczkowatej wiroida) oraz 300 i 319 nukleotydem dolnego fragmentu nici. Porównując cztery różne szczepy PSTVd stwierdzono, że ze wzrostem wirulentności (zjadliwości) maleje stabilność termodynamiczna drugorzędowej struktury RNA regionu VM domeny P. Region ten prawdopodobnie oddziałuje z nieznanym jeszcze czynnikiem komórkowym stanowiącym „tarczę” (ang. target) wiroida w zainfekowanej komórce. Czynnikiem tym może być jeden z rodzajów niskocząsteczkowego RNA 7S RNA, który wchodzi w skład cząsteczki SRP (ang. signal recognition particle), związanej z transportem pewnych białek sekrecyjnych i błonowych przez błony reticulum endoplazmatycznego (HASS i współaut. 1988).

Analiza stabilności termodynamicznej mutantów PSTVd ze zmianami nukleotydowymi wprowadzonymi w obszar domeny P (HAMMOND 1992) oraz różnych naturalnych izolatów PSTVd (GÓRA i współaut. 1994) wykazała, że choć większość z nich zachowuje się zgodnie z regułą SCHNÖLZER, to istnieją też takie, w przypadku których nie ma korelacji pomiędzy patogennością a stabilnością termodynamiczną. Zależności takiej nie stwierdzono również dla łagodnego i ostrego izolatu wiroida łuszczycy kory cytrusów CEVd (VISVADER i SYMONS 1985).

Region VM jest częścią domeny P i eksperymentalnie wykazano, że właśnie sekwencja tej domeny jest kluczowa dla ostrości objawów porażenia. Bezpośredni wpływ tej domeny na patogenność wykazały analizy infekcyjności hybrydowych cząsteczek wiroidów. VISVADER i SYMONS (1986) skonstruowali chimeryczne (rekombinacyjne) cząsteczki wiroida CEVd. Konstrukty z domeną P pochodzącą z izolatu łagodnego wywoływały łagodne objawy chorobowe w porażonych roślinach wskaźnikowych. Natomiast rekombinanty z domeną P pochodzącą z izolatu ostrego powodowały wystąpienie symptomów ostrych lub łagodnych w zależności od stężenia inokulum używanego do zakażenia roślin. Analiza międzygatunkowych rekombinantów (SANO i współaut. 1992) będących połączeniem różnych regionów cząsteczki wiroida pochodzących od CEVd i TASVd (wiroid wierzchołkowej karłowatości pomidorów) potwierdziła wpływ domeny P na wirulentność wiroidów. Wykazano też znaczący wpływ na ostrość symptomów porażenia domeny TL i domen V+TR.

Określenie funkcji domen PSTVd zostało też przeprowadzone w naszym laboratorium. Podstawą tych badań stała się analiza molekularna trzech różnych fenotypowo izolatów PSTVd (tab. 1). Opisane warianty sekwencyjne (tab. 1) wywołujące powstanie objawów porażenia określonego typu, różnią się punktowymi mutacjami zarówno w domenie P oraz V. Biorąc pod uwagę tę obserwację oraz wyniki analizy infekcyjności rekombinacyjnych międzygatunkowych (SANO i współaut. 1992) i wewnątrzgatunkowych (VISVADER i SYMONS 1986) cząsteczek wiroida można sądzić, że wirulentność PSTVd jest określona przez strukturę obu domen (P oraz V) lub przez analogię z innymi wiroidami tylko domenę P. Gdyby drugie przypuszczenie było słuszne, to stwierdzone przez nas mutacje w domenie V nie wpływałyby w znaczący sposób na patogenność. Skonstruowaliśmy więc infekcyjne plazmidy zawierające wstawki hybrydowe (chimery) będące połączeniem połówek cDNA z domenami P i V pochodzącymi z wariantów sekwencyjnych PSTVd różniących się zjadliwością. Domeny P pochodzące z wariantów letalnego (ang. lethal), ostrego (ang. severe) i łagodnego (ang. mild) oznaczyliśmy PL, PS, PM, analogicznie oznaczyliśmy domeny V — VL, VS, VM. Konstrukcje chimer prowadziliśmy posługując się trzema wyjściowymi sekwencjami: molekularnym wariantem PSTVd-M (PM-VM) wywołującym łagodne objawy porażenia oraz wariantami sekwencyjnymi: KF440-2 (PL-VL) i S23 (PS-VS) dającymi objawy ostre. Izolat KF440-2 udostępniony nam przez dr Mina Tsagris, określony przez autora jako letalny, w naszych warunkach laboratoryjnych powoduje wystąpienie objawów chorobowych o takiej samej ostrości, jak wariant S23, choć różni się zmianami nukleotydowymi w domenie P i V. Schemat konstrukcji hybrydowych cząsteczek PSTVd jest przedstawiony na rycinie 3. Różnice w strukturze pierwszorzędowej tych trzech wariantów są zlokalizowane w domenie P oraz V, natomiast pozostałe domeny: C, TL i TR wykazują 100% podobieństwa sekwencji. Łączenie więc ze sobą połówek wiroidowego cDNA różnych wariantów prowadzi w rezultacie do wymiany domeny P lub V pomiędzy tymi wariantami. W ten sposób rozporządzaliśmy pełnym kompletem genomów reprezentującym permutacje obu domen. Przeprowadzone badania infekcyjności otrzymanych wyjściowych i hybrydowych cząsteczek wiroida pozwoliły na określenie bezpośredniego wpływu domeny P i V na patogenność i replikację wiroida. Przykład wyników jednej analizy przedstawiono na rycinie 4. Nasze

wyniki dowodzą, że to struktura domeny P jest bezpośrednio odpowiedzialna za ostrość symptomów porażenia. Sześć typów badanych cząsteczek PSTVd z domeną P „typu ostrego” (PS-VS, PL-VL, PL-VM, PS-VM, PS-VL, PL-VS) indukowało powstanie ostrych objawów porażenia, podczas gdy cząsteczki zawierające domenę P „typu łagodnego” (PM-VM, PM-VL, PM-VS) prawie niezauważalną epinastię. Oznaczyliśmy stężenie wiroida w tkance roślinnej (liść) w różnych odstępach czasowych po inokulacji rekombinacyjnymi plazmidami. Otrzymane wyniki wskazują na brak zależności pomiędzy stężeniem wiroida w roślinie a ostrością objawów porażenia. Nie zaobserwowaliśmy istotnego wpływu domeny V na replikację i zjadliwość PSTVd.



kontrola

PM-VS

PS-VM

Ryc. 4. Symptomy porażenia wywoływane przez wybrane genomy PSTVd.

Przedstawione badania hybrydowych cząsteczek wiroida prowadzą do wniosku, że wyodrębnione krótkie obszary genomu RNA — domeny — niosą zapis dotyczący konkretnego fenotypu. Domeny te wykazują ciągłość genetyczną i przeniesione w inny kontekst nie tracą swojej funkcji. Prowadzi to do dość paradoksalnego spostrzeżenia. Wiemy, że PSTVd to genom, koduje on swoją replikację, przemieszczanie się w roślinie i patogenność. Nie wiemy jednak ile ten mini-genom zawiera genów. Nie potrafimy tu bowiem zastosować standardowej definicji genu. Nie możemy w przypadku PSTVd mówić o genie jako cistronie, bowiem PSTVd nie koduje białek. Nie możemy tu mówić o genie jako jednostce komplementującej, ekspresja genetyczna wiroida wydaje się zachodzić *in cis*, nie obserwuje się komplementacji *in trans*. Pozostaje nam spostrzeżenie, że poszczególne krótkie domeny (P, C, V czy T) wiroidowego RNA określają swoiste fenotypy. W sumie myśląc o tym mini-genomie RNA, pewnie trzeba używać

pojęcia „mini-genów”, odpowiadających krótkim sekwencjom RNA (kilku- kilkunastu nukleotydowych) określającym dane funkcje.

Mimo bardzo dokładnego poznania struktury RNA wiroidów, molekularny mechanizm ich namnażania się, czy też patogenności pozostaje wciąż nie rozwiązana zagadką.

STRUCTURE-FUNCTION RELATIONSHIPS IN THE POTATO SPINDLE TUBER VIROID

Summary

Potato spindle tuber viroid (PSTVd) was the first member of this peculiar group of plant pathogenic agents, the viroids, to be characterized. It was also the first pathogenic agent to be completely sequenced and for which infectious cDNA molecules became available. This single stranded, circular RNA molecule (356–360 nucleotide long) is an autonomous replicon which induces specific symptoms in its host plants while completely lacking, at the same time, the polypeptide coding capacity. Therefore, any information necessary for viroid replication and pathogenicity has to be carried by the RNA sequence itself and/or by the resulting viroid secondary structure.

Based on sequence comparison analysis the generalized rod-like viroid structure has been divided into five domains: the central conserved region (CCR, domain C), the pathogenicity domain (P), the variable domain (V), the right terminal (TR), and the left (TL) terminal loops.

The various sequenced PSTVd isolates which induced different symptoms (mild, intermediate, severe, and lethal) in infected plants differ mostly in the P domain sequences, but mutations are also detected in the V domain. The relative contributions of the V and P domains to PSTVd pathogenicity have been investigated by analysing the disease's phenotypes induced by PSTVd chimeric recombinants. In PSTVd the P domain structure is directly responsible for the severity of symptoms induced in tomato.

LITERATURA

- BRANCH A. D., BENEFELD B. J., ROBERTSON H. D. 1988. *Evidence for a single rolling circle in the replication of potato spindle tuber viroid*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85, 9128–9132
- CANDRESSE T., DIENER T. O., OWENS R. A. 1990. *The role of the viroid central conserved region in cDNA infectivity*. Virology 175, 232–237.
- DICKSON E., 1981. *A model for the involvement of viroids in RNA splicing*. Virology 115, 216–221.
- DIENER T. O., 1979. *Viroids and viroid diseases*. Wiley and Sons, New York.
- DIENER T. O., 1981. *Are viroids escaped introns?* Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78, 5014–5015
- DIENER T. O., 1986. *Viroid processing: a model involving the central conserved region and hairpin I*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 83, 58–62.
- DIENER T. O., 1987. *The viroids*. Plenum, New York.
- EIGEN M., 1993. *The origin of genetic information: viruses as models*. Gene 135, 37–47.
- GÓRA A., CANDRESSE T., ZAGÓRSKI W., 1994. *Analysis of the population structure of three phenotypically different PSTVd isolates*. Arch. Virol. 138, 233–245.
- GROSS H. J., DOMDEY H., LOSSOW C., JANK P., RABA M., ALBERTY H., SÄNGER H. L., 1978. *Nucleotide sequence and secondary structure of potato spindle tuber viroid*. Nature 273, 203–208.
- GROSS H. J., LIEBEL U., ALBERTY H., KRUPP G., DOMDEY H., RAMM K., SÄNGER H. L., 1981. *A severe and mild potato spindle tuber viroid isolate differ in three nucleotide exchanges only*. Biosci. Rep. 1, 235–241.
- GROSS H. J., KRUPP G., DOMDEY H., RABA M., JANK P., LOSSOW C., ALBERTY H., RAMM K., SÄNGER H. L. 1982. *Nucleotide sequence and secondary structure of citrus exocortis and chrysanthemum stunt viroid*. Eur. J. Bich. 121, 249–257.
- HAMMOND R. W., 1992. *Analysis of the virulence modulating region of potato spindle tuber viroid (PSTVd) by site-directed mutagenesis*. Virology 187, 654–662.

- HASS B., KLANNER A., RAMM K., SÄNGER H. L., 1988. *The 7S RNA from tomato leaf tissue resembles a signal recognition particle RNA and exhibits a remarkable sequence complementarity to viroids.* EMBO J. 7, 4063-4074.
- HENCO K., SÄNGER H. L., RIESNER D., 1979. *Fine structure melting of viroids as studied by kinetic methods.* Nucleic Acids Res. 6, 3041-3059.
- HEROLD T., HASS B., SINGH R. P., BOUCHER A., SÄNGER H. L., 1992. *Sequence analysis of five new field isolates demonstrates that the chain length of potato spindle tuber viroid (PSTVd) is not strictly conserved but as variable as in other viroids.* Plant. Mol. Biol. 19, 329-333.
- KEESE P., SYMONS R. H., 1985. *Domains in viroids: evidence of intermolecular RNA rearrangements and their contribution to viroid evolution.* Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82, 4582-4586.
- KISS T., POSFAI J., SOLYMOSY F., 1983. *Sequence homology between potato spindle tuber viroid and U3 snRNA.* FEBS Lett. 163, 217-220.
- KISS T., SOLYMOSY F., 1982. *Sequence homologies between a viroid and small nuclear RNA (sn RNA) species of mammalian origin.* FEBS Lett. 144, 318-320.
- KOWALSKA-NOORDAM A., CHRZANOWSKA M., SKRZECZKOWSKA S., 1986/1987. *Reaction of ten Polish potato cultivars to severe and mild strains of potato spindle tuber viroid.* The Potato, 71-91.
- LAKSHMAN D. K., TAVANTZIS S. M., 1993. *Primary and secondary structure of 360-nucleotide isolate of potato spindle tuber viroid.* Arch. Virol. 128, 319-331.
- LOSS P., SCHMITZ M., STEGER G., RIESNER D., 1991. *Formation of a thermodynamically metastable structure containing hairpin II is critical for infectivity of potato spindle tuber viroid RNA.* EMBO J. 10, 719-727.
- PFANNENSTIEL M. A., SLACK S. A., 1980. *Response of potato cultivars to infection by the potato spindle tuber viroid.* Phytopathology 70, 922-926.
- RACKWITZ H. R., ROHDE W., SÄNGER H. L., 1981. *DNA-dependent RNA polymerase II of plant origin transcribes viroid RNA into full-length copies.* Nature 291, 297-301.
- RIESNER D., HENCO K., ROKHL U., KLOTZ G., Kleinschmidt A. K., GROSS H. J., Domdey H., Sängner H. L., 1979. *Structure and structure formation of viroids.* J. Mol Biol. 133, 237-251
- RIESNER D., GROSS H. J., 1985. *Viroids.* Annu. Rev. Biochem. 54, 531-564.
- SANO T., CANDRESSE T., HAMMOND R. W., DIENER T. O., OWENSS R. A., 1992. *Identification of multiple structural domains regulating viroid pathogenicity.* Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89, 10104-10108.
- SCHINDLER I. M., MÜHLBACH H. P., 1992. *Involvement of nuclear DNA-dependent RNA polymerase in potato spindle tuber viroid replication: a reevaluation.* Plant Science 84, 221-229
- SCHNÖLZER M., HASS B., RAMM K., HOFMANN H., SÄNGER H. L., 1985. *Correlation between structure and pathogenicity of potato spindle tuber viroid (PSTVd).* EMBO J. 4, 2181-2190.
- SCHÜMACHER J., SÄNGER H. L., RIESNER D., 1983. *Subcellular localization of viroids in highly purified nuclei from tomato leaf tissue.* EMBO J. 2, 1549-1555.
- SEMANCIK J. S., 1987. *Viroids and viroid-like pathogens.* CRC Press, Boca.
- SYMONS R. H., 1991. *The intriguing viroids and virusoids: what is their information content and how did they evolve?* Mol. Plant-microbe Interactions 4, 111-121
- TABLER M., SÄNGER H. L., 1984. *Cloned single- and double-stranded DNA copies of potato spindle tuber viroid (PSTVd) RNA and co-inoculated subgenomic DNA fragments are infectious.* EMBO J. 3, 3055-3062.
- VISVADER J. E., SYMONS R. H., 1985. *Eleven new sequence variants of the citrus exocortis viroid and the correlation of sequence with pathogenicity.* Nucleic Acids Res. 13, 2907-2920.
- VISVADER J. E., SYMONS R. H., 1986. *Replication of in vitro constructed viroid mutants: location of the pathogenicity-modulating domain of citrus exocortis viroid.* EMBO J. 5, 2051-2055.

GRAŻYNA GARBACZEWSKA

*Katedra Botaniki, Wydział Rolniczy,
Szkola Główna Gospodarstwa Wiejskiego,
Rakowiecka 26/30, 02-528 Warszawa*

WIRUS MOZAIKI KALAFIORA — CaMV — MODEL ŻYCIOWY WIRUSA Z ODWROTNĄ TRANSKRYPCJĄ

WSTĘP

Procesy składające się na mechanizm powstawania chorób wywoływanych przez patogeny, jak i badania tych procesów określa się terminem patogeneza. Na patogenezę ma wpływ wiele czynników związanych z porażeniem organizmu gospodarza oraz czynników kontrolujących zdolność patogena do infekcji pojedynczej komórki i transportu międzykomórkowego (HULL 1991).

Jednym z patogenów są wirusy obligatoryjne pasożyty, które dysponują ograniczoną informacją zakodowaną w genomie do przeprowadzenia swego cyklu życiowego. Mają one zwykle 4 do 10 genów ściśle związanych z transkrypcją, replikacją lub transportem wirusa. Stąd podczas infekcji wirusy muszą jednocześnie modyfikować wiele właściwości w komórce rośliny — gospodarza, aby zrealizować swój cykl życiowy. Naturalna infekcja rośliny obejmuje oddziaływania między 3 genomami: wirusa, rośliny i wektora. Wirusy roślin wymagają mechanicznego uszkodzenia w czasie wnikania do komórki gospodarza i zazwyczaj to uszkodzenie powodują wektory, na przykład mszyce, skoczki, nicienie. Jeśli komórka rośliny jest podatna, wirus się w niej namnaża. Następnie przemieszcza się do sąsiednich komórek opanowując całą roślinę. Wynikiem namnażania i transportu są zmiany prowadzące do procesu chorobowego. Na ogół plon upraw roślin porażonych znacznie się zmniejsza.

Dążeniem rolników, ekonomistów, a zwłaszcza patologów roślin jest możliwość ograniczenia wielkości strat. Zadanie to wydaje się być coraz bardziej rzeczywiste, od kiedy zaczęto wprowadzać nowe rozwiązania oparte na znajomości molekularnego podłoża oddziaływań wirus-vektor (PIRONE 1991) zamiast chemicznego zwalczania wektorów.

Podobnie rozszerzono metody stosowane w praktyce rolniczej oparte na selekcji form odpornych lub podatnych na patogena. Aby metody te były skuteczne, muszą uwzględniać wyniki badań dotyczące interakcji genomów wirusa i rośliny (PFEIFFER i MESNARD 1995). Molekularne mechanizmy odporności zakładają, że wirus w roślinie jest transportowany bardzo szybko, a jego mały genom może ewoluować. Równocześnie wiadomo, że rośliny podatne nie mogą

bronić się ucieczką przed patogenem, ani że ich genom złożony z tysięcy genów nie może ewoluować równie szybko jak genom wirusa po to, by roślina stała się odporna lub przestała spełniać warunki właściwe dla gospodarza patogena.

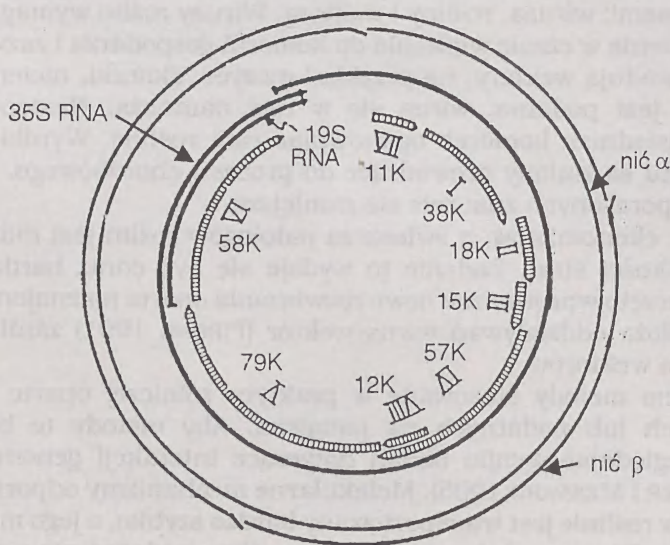
Specyficzność gospodarza danego wirusa polega na interakcji produktów jego genów z produktami genów patogena. Określenie białek gospodarza, z którymi współdziała wirus i możliwość wprowadzania nowych genów stanowi główny cel mechanizmów odporności roślin.

Ze względu na budowę genomu wirusa mozaiki kalafiora — CaMV i przebieg jego cyklu życiowego jest on atrakcyjnym modelem do zaprezentowania poglądów wyjaśniających interakcje między rośliną gospodarzem lub nie gospodarzem i wirusem, w oparciu o które powstają nowe strategie stosowane do ograniczania skutków chorób wirusowych i wykorzystania genomu CaMV do wprowadzania nowych genów.

BUDOWA GENOMU CaMV I JEGO CYKL ŻYCIOWY

Wirus mozaiki kalafiora — CaMV należy do wyjątkowej grupy wśród wirusów roślin, którą charakteryzuje genom w formie dwuniciowego DNA (ds DNA), podczas gdy większość wirusów porażających rośliny (20 grup spośród opisanych z 25) ma genom (+) ss RNA czyli jednociowe, pozytywne RNA (CORNUET 1987).

CaMV jest wirusem sferycznym (ikosahedrycznym) o średnicy około 50 nm, o masie cząsteczkowej $22,8 \times 10^6$ d (CHAUVIN i współaut. 1979), w którym kwas nukleinowy jest złożony z kolistej podwójnej nici DNA o długości 8031 par zasad — 8kb, nić (-) DNA α ma jedno pęknięcie, nić (+) DNA β ma dwa pęknięcia. Genom DNA jest zorganizowany z 8 genów (FRANCK i współaut. 1980, HOWARTH i współaut. 1981). Zidentyfikowano część produktów białkowych tych genów i ich funkcje (AL ANI 1980) (ryc. 1).



Ryc. 1. Genetyczna organizacja CaMV (wg PFEIFFERA i HOHN 1987).

Nić α — kodowana, ma 1 pęknięcie; nić β — niekodowana, ma 2 pęknięcia; DNA koduje 8 genów — ORFs, podane są masy cząsteczkowe białek; transkrypty RNA, 19S i 35S mają różne promotory, ale ten sam koniec 3'; 19S RNA zawiera informację genu VI; 35S RNA zawiera informację całego genomu CaMV.

Rycina 1 przedstawia genetyczną organizację CaMV.

Gen I — ORF I koduje białko (38kd) — P1 związane z przemieszczaniem się wirusa — (Linstead i współaut. 1988, Albrecht i współaut. 1988), białko to cechuje zdolność do łączenia się z RNA (Citovsky i współaut. 1991).

Gen II — ORF II koduje białko związane z nabywaniem wirusa przez mszyce (Woolston i współaut. 1983, Armour i współaut. 1983), białko P2 zidentyfikowano w inkluzjach zwanych wiropłazmą elektronoprzezierną — II typ, a zawarte w nich cząstki CaMV są źródłem infekcyjnego wirusa dla wektora, jakim są mszyce (Espinosa i współaut. 1991).

Gen III — ORF III koduje białko P3 wykazujące niespecyficzną aktywność łączenia się z DNA (Mesnard i współaut. 1990).

Gen IV — ORF IV koduje białko kapsydu P4 (coat protein) (Daubert i współaut. 1982).

Gen V — ORF V koduje enzym — odwrotną transkryptazę — P5 (Toh i współaut. 1983) oraz proteinazę aspartanową (Torruella i współaut. 1989).

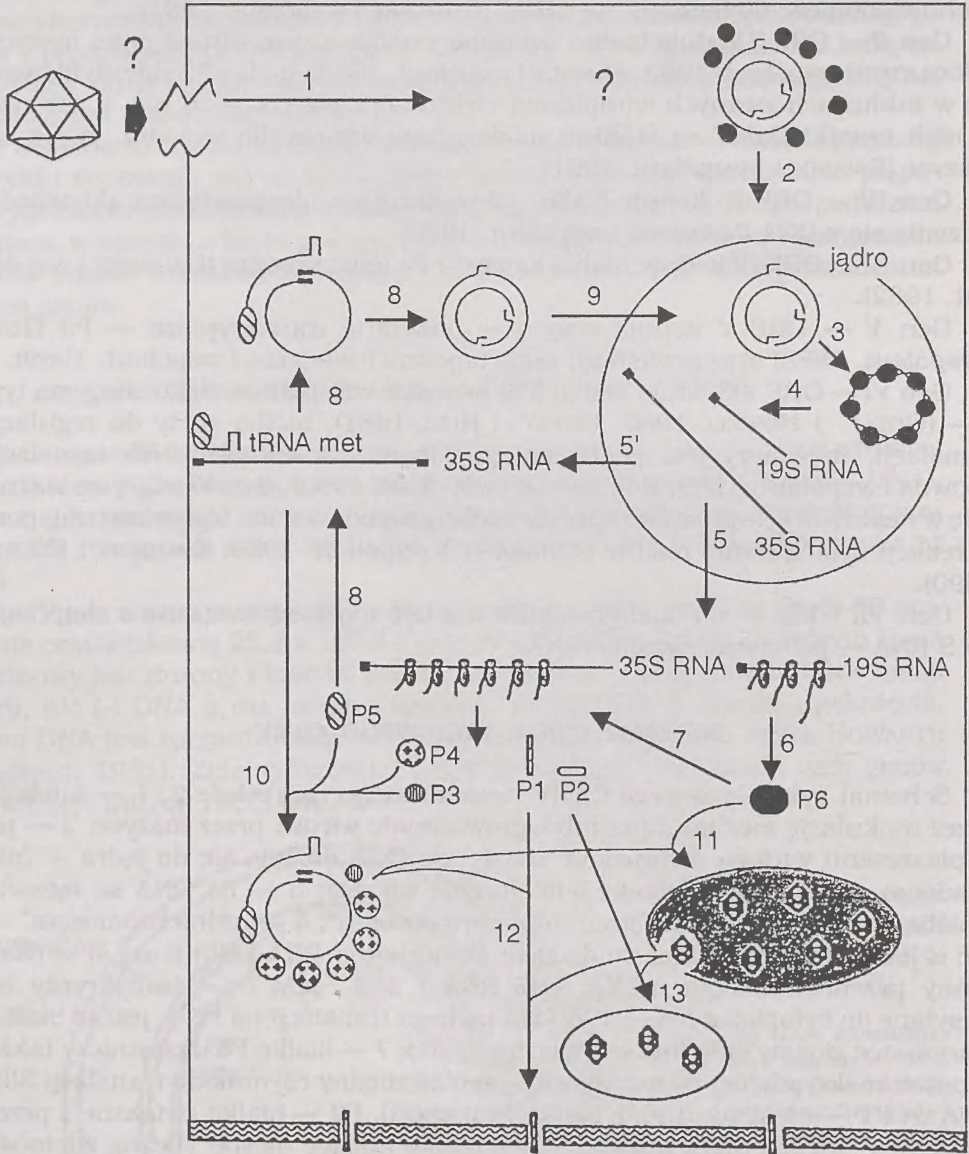
Gen VI — ORF VI koduje białko (P6) tworzące wiropłazmę elektronogestą typ I — (O Dell i Howell 1980, Covey i Hull 1981), białko służy do regulacji translacji, to znaczy jest posttranskrypcyjnym transaktywatorem translacji (Gowda i współaut. 1989, Bonneville i współaut. 1989). Gen VI odgrywa ważną rolę w nasileniu symptomów i specyficzności gospodarza, ma wpływ na transport w reakcji systemicznej rośliny (Takahashi i współaut. 1989, Daubert i Routh 1990).

Gen VII i VIII — nie kodują białek, ale być może są związane z ekspresją 35 S RNA — policistronowego mRNA.

SCHEMAT CYKLU ŻYCIOWEGO CaMV

Schemat cyklu życiowego CaMV przedstawiono na rycinie 2. 1 — infekcja przez inokulację mechaniczną lub wprowadzenie wirusa przez mszyce; 2 — po odpłaszczenu wiriona dwuniciowe cząsteczki DNA dostają się do jądra — (nie wiadomo, jak i gdzie zachodzi odbiałczenie wirusa); 3 — ds DNA są łączone z histonami gospodarza w formę „minichromosomu”; 4 — „minichromosom” — nić α jest transkrybowana z udziałem komórkowej RNA polimerazy II w dwie formy przenośnikowego mRNA, 19S RNA i 35S RNA; 5 — transkrypty są wysyłane do cytoplazmy; 6 — 19S RNA podlega translacji na P6 — jest to białko stanowiące główny składnik wiropłazmy typu I; 7 — białko P6 uczestniczy także w posttranskrypcyjnej transaktywacji jako niezbędny czynnik do translacji 35S RNA w: P1 — niestrukturalne białko (transport), P2 — białko związane z przenoszeniem wirusa przez mszyce, P3 — białko mające niespecyficzną zdolność łączenia się z DNA, P4 — białko kapsydu, P5 — odwrotna transkryptaza; 8 — 35S RNA + P5 — odwrotna transkrypcja, najpierw powstaje nić (-) DNA potem (+) DNA; 9 — w „skróconym” cyklu DNA może migrować z powrotem do jądra i wytwarzać dodatkowe transkrypty 35S RNA; 10 — produkty genów P3, P4 i P5 są syntetyzowane na 35S RNA; 11 — montaż i dojrzewanie wirionów wymagają produktu P6, składnika wiropłazmy (typ I), w której cząstki CaMV mogą być gromadzone; 12 — transport wirusa do sąsiednich komórek przez plazmodesmy

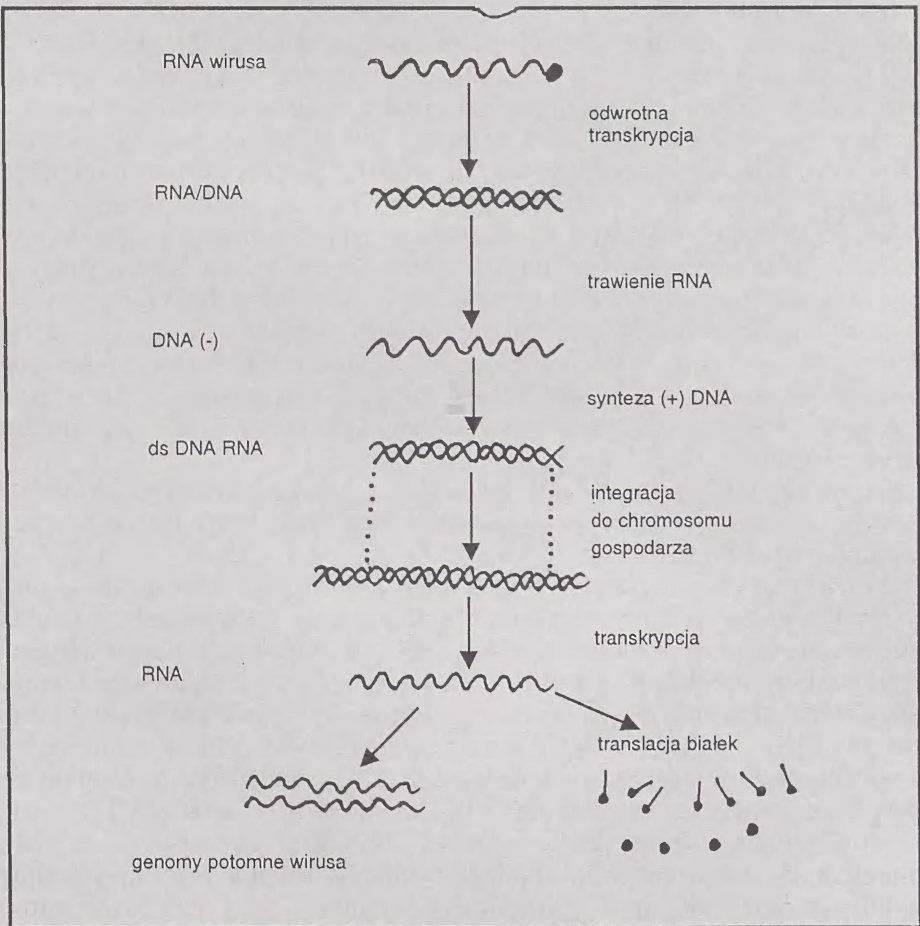
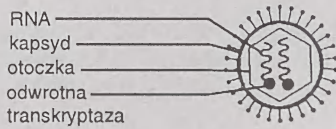
wymaga białka kodowanego przez gen I; 13 — wiriony zawarte w elektronoprzejrzystej wiropłazmie (typu II) są formą CaMV transportowaną przez mszyce.



Ryc. 2. Schemat cyklu życiowego CaMV.

Wyjątkowość pararetrowirusów, do których należy CaMV, polega również na tym, że w cyklu życiowym uczestniczy enzym odwrotna transkryptaza, analogicznie jak w grupie zwierzęcych wirusów — retrowirusów: onkogennych, lentiwirusów typu HIV czy SIDA lub hepadnawirusów (wirus zapalenia wątroby typu B — HBV) (ryc. 3).

W przypadku retrowirusów, które mają genom ds RNA odwrotna transkryptaza katalizuje syntezę kopii wirusowego DNA na nici genomowego RNA. Natomiast pararetrowirusy mają genom ds DNA i tutaj udział odwrotnej transkryptazy następuje po utworzeniu transkryptów RNA, kiedy 35S RNA — staje się matrycą do syntezy kopii genomowego DNA: najpierw (-) DNA, a następnie (+) DNA.



Ryc. 3. Cykl życiowy retrowirusów.

Istotną różnicą między porównywanymi grupami wirusów jest również to, że DNA retrowirusów powstałe w procesie odwrotnej transkrypcji ulega integracji z chromosomowym DNA gospodarza, podczas gdy genom ds DNA CaMV nie

podlega takiemu włączaniu, a tworzy tylko formę tak zwanego „minichromosomu” (OLSZEWSKI i współaut. 1982).

W cyklu życiowym CaMV, którego model przedstawił PFEIFFER i współaut. (1983, 1987) (ryc. 2) wyróżnia się etapy, z których część jest zlokalizowana:

— w jądrze komórkowym: łączenie wirusowego ds DNA z histonami gospodarza w „minichromosom”; transkrypcja na „minichromosomie” przenośników RNA: 19S RNA — gen VI; 35S RNA — pełna kopia genomu — 8031 par nukleotydów i małe RNA „short-stop” — złożone ze 180 nukleotydów;

— w cytoplazmie: odwrotna transkrypcja: na 35S RNA synteza kopii nici (-) DNA, a następnie (+) DNA; translacja białek: na 19S RNA — białko wiropłazmy; na 35S RNA — wszystkie produkty białkowe genów; składanie i dojrzewanie cząstek w wiropłazmach.

Następstwem przedstawionych procesów jest obraz cytologiczny, w którym cząstki wirusa i wiropłazma dwóch typów są zlokalizowane w cytoplazmie porażonych komórek (ryc. 4). Interesujące są bardzo nieliczne obserwacje, które pokazują obecność cząstek CaMV w jądrze komórkowym: *Nicotiana clevelandii* szczep W-260 (GRACIA i SHEPHERD 1987); *Brassica pekinensis* (kapusta pekińska) — cząstki szczepu PDL 1 (GARBACZEWSKA i KERLAN 1992). Interpretacja tej lokalizacji jądrowej jest trudna do wyjaśnienia za pomocą proponowanego modelu, a obecność wirusa w jądrze może zakłócać metabolizm rośliny.

Innym zagadnieniem pozostającym dotychczas bez wyjaśnienia jest miejsce i sposób odbiałczania cząstek wirusa mozaiki kalafiora. Wiadomo, że cząstki CaMV mają ogromną stabilność i wymagają środowiska silnie zasadowego do dysocjacji wirusowego DNA od białek kapsydu. Sugeruje to, że w procesie potrzeba wiele energii, która prawdopodobnie pochodzi ze specyficznych struktur błonowych.

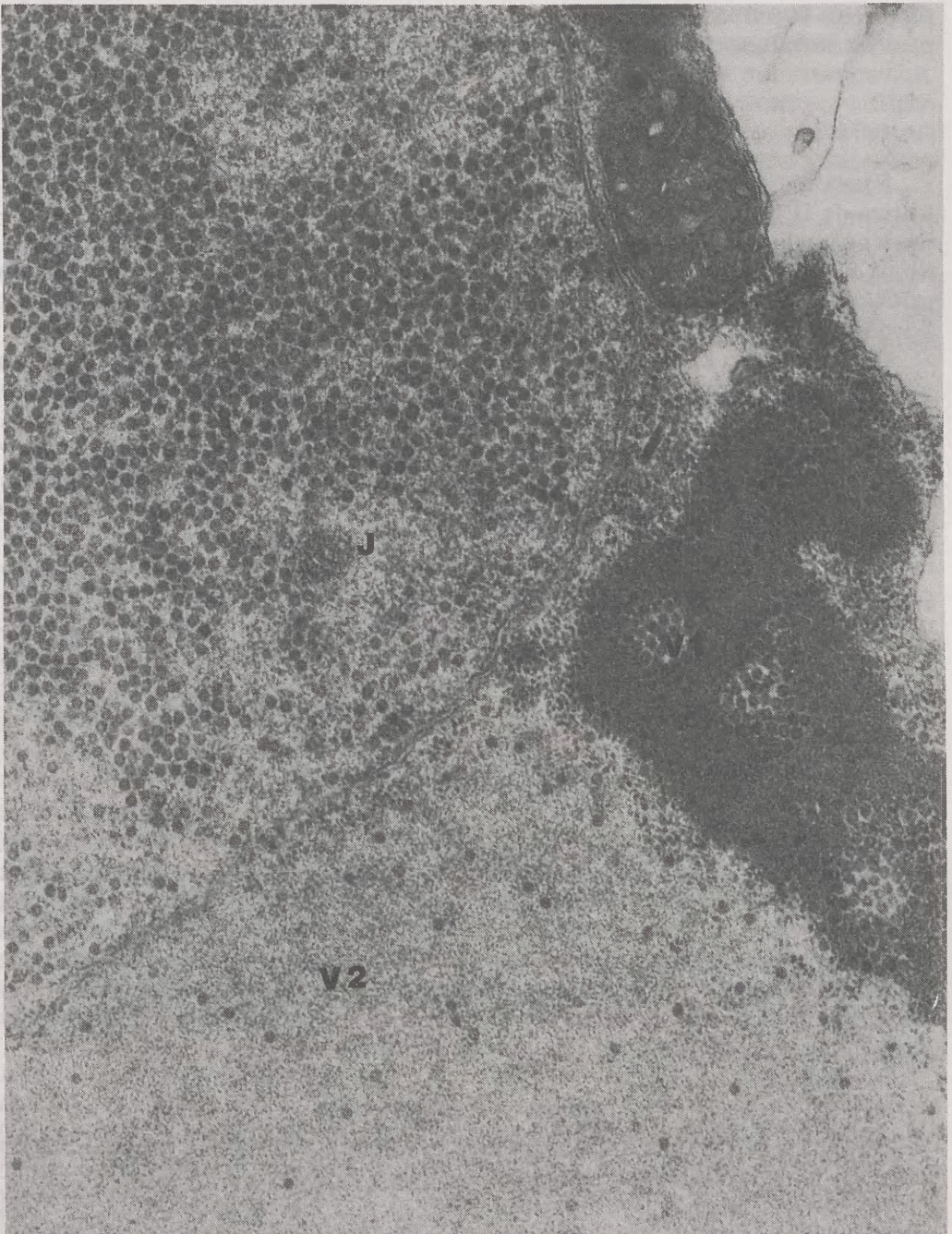
W cyklu życiowym CaMV na powstałym w jądrze komórkowym „minichromosomie” zachodzi transkrypcja przenośników RNA, które przemieszczają się do cytoplazmy.

Główna rola w cyklu życiowym CaMV przypada 35S RNA, które w procesie odwrotnej transkrypcji jest matrycą dla genomu ds DNA wirusa oraz służy do translacji produktów białkowych całego polycystronowego genomu wirusa.

Był badany mechanizm kontroli transkrypcji 35S RNA (COVEY i współaut. 1990, COVEY i TURNER 1991). Sądzi się, że transkrypcja 35S RNA jest kontrolowana przez jeden z genów. Wyklucza się raczej gen VI (białko wiropłazmy), który jest syntetyzowany konstytutywnie (COVEY i TURNER 1991). Natomiast rolę tę może pełnić gen IV odpowiedzialny za białko kapsydu (FUETTERER i HOHN 1991).

Porównywano również poziom m RNA: 35S, 19S i „short stop” w roślinach różniących się podatnością na infekcję CaMV. W roślinach o dużej podatności (kalafior) stwierdzono niski poziom przenośników 19 i 35S RNA, natomiast frakcja „short stop” RNA była wysoka. Wyniki były przeciwstawne dla roślin odpornych, co wskazuje na rolę regulacyjną tego małego RNA złożonego ze 180 nukleotydów i zakończonego sygnałem polyadenylacji — poly (A). Wydaje się, że odgrywa on podobną rolę w powstawaniu reakcji obronnych przez aktywowanie kinaz, jak u retrowirusów (SANFAÇON 1991).

Natomiast translacja polycystronowego 35S RNA wymaga białka ORF (VI) (BONNEVILLE i współaut. 1989, GOWDA i współaut. 1989). Wskazuje na to niska



Ryc. 4. Fragment komórki mięsiskowej liścia kapusty pekińskiej porażonej CaMV — PDL 1. W jądrze komórkowym (J) są widoczne liczne cząstki wirusa.

W cytoplazmie są dwa typy wiropłazmy, V1 elektronogęsta z licznymi cząstkami wirusa; V2 elektronoprzeziarna z niewielką liczbą cząstek wirusa.

proporcja 19S:35S RNA w roślinach odpornych, gdzie ilość produktu ORF VI jest niewystarczająca do regulacji translacji z 35S RNA (HOHN 1990).

KIERUNKI BADAŃ Z WYKORZYSTANIEM CaMV

Powodem licznych prac nad CaMV są: a) zastosowanie ich genomu o strukturze ds DNA do badania funkcji poszczególnych genów i oddziaływań z genomem gospodarza; b) analogia budowy genomu i cyklu życiowego z retrowirusami, które są przyczyną groźnych chorób ludzi; c) wykorzystanie genomu w formie mRNA jako silnego wektora do wprowadzania genów do tkanek roślin, zwierząt i drożdży.

Genomy kilku szczepów CaMV zostały sekwencjonowane, określono zakres ich gospodarzy i wywołane przez nie symptomy. W odróżnieniu od wirusów roślin genom (+) ss RNA, genom ds DNA CaMV może być stosowany do inokulacji, a równocześnie może być dzielony na funkcjonalne fragmenty i testowany w roślinach transgenicznych (ANDERSON i współaut. 1992, SANFAÇON i współaut. 1991, SANFAÇON i WIECZOREK 1992, SAUNDERS i współaut. 1990). Przeprowadzano również zamianę fragmentów genomu CaMV tworząc tak zwane wirusy chimeryczne, a właściwie genomy hybrydowe z zastosowaniem enzymów restrykcyjnych. Następnie inokulowano rośliny o różnym stopniu odporności tymi genomami hybrydowymi, co umożliwiło określenie specyficznej roli genów CaMV.

Dla uzyskania roślin odpornych wprowadza się sekwencje kodujące białka, zaburzające cykl rozwoju wirusa, na przykład dla CaMV gen VI (białko wiropłazmy) lub gen IV (białko kapsydu) w orientacji sensownej lub antysensownej.

BIĄŁKA KODOWANE PRZEZ GENOM CaMV A INDUKCJA OBJAWÓW CHOROBYCH

Genom CaMV koduje 6 różnych białek, które są możliwymi sprawcami objawów chorobowych roślin. Wiadomo też, że nasilenie symptomów nie jest uwarunkowane koncentracją wirusa w tkankach rośliny. Każde z 6 białek wypełnia jedną z podstawowych funkcji cyklu życiowego CaMV, takich jak replikacja, transport czy przenoszenie wirusa przez mszyce, a jednocześnie ma wpływ na powstające symptomy w roślinie, jak na przykład karłowatość lub też decyduje o spełnianiu przez roślinę funkcji gospodarza. Te zależności są rezultatem kompleksowej interakcji białek wirusa ze specyficznymi białkami gospodarza.

PRODUKT BIAŁKOWY GENU VI

Szczególną cechą ultrastruktury komórek porażonych CaMV lub należących do grupy pararetrowirusów jest występowanie w cytoplazmie dwóch form inkluzji białkowych zwanych wiropłazmą (ryc. 4). Matriks wiropłazmy typu I jest miejscem gromadzenia się cząstek CaMV, a także miejscem składania cząstek i ich dojrzewania, ponieważ wykryto w niej aktywność odwrotnej transkryptazy (MAZZOLINI i współaut. 1989, MESNARD i współaut. 1990).

Głównym składnikiem wiropłazmy jest białko P6 (62 kDa) kodowane przez gen VI. Białko to daje efekty plejotropowe, ponieważ poza rolą strukturalną jest

zdolne aktywować ekspresję innych genów CaMV (SCHOLTHOF i współaut. 1992, BONNEVILLE i współaut. 1989) przez zwiększenie translacji genów z 35S RNA.

Ostatnio wykazano, że gen VI CaMV także uczestniczy w determinowaniu zakresu roślin gospodarzy wirusa (SCHOELZ i współaut. 1986, SCHOELZ i SHEPARD 1988) i ma znaczącą rolę w powstawaniu symptomów, na przykład ma wpływ na wystąpienie chloroz rzepy (DAUBERT i współaut. 1984, ANDERSON i współaut. 1992).

Większość szczepów CaMV poraża systemicznie tylko rośliny z rodziny *Brassicaceae*. Jednak pewna grupa szczepów jest zdolna do porażania roślin z rodziny *Solanaceae*, a przebieg replikacji i rozprzestrzenianie wirusa w tych roślinach są różne, na przykład:

1. Szczep CabBS wywołuje reakcję lokalną na *Datura stramonium* (bieluń dziedzierzawa), *Nicotiana bigelovii*, *Nicotiana edvardsonii*.

2. Szczep D4 indukuje systemiczną mozaikę na *Datura stramonium*, *Nicotiana bigelovii*.

3. Szczep W 260 infekuje systemicznie *N. bigelovii* i *D. stramonium*, ale daje nekrozy na *D. stramonium*, a mozaikę na *N. bigelovii*.

Poprzez zmianę segmentów genomu między klonowanymi szczepami CaMV wykazano, że gen VI szczepu D4 jest odpowiedzialny za wystąpienie systemicznej mozaiki na *Datura* i *N. bigelovii* (DAUBERT i ROUTH 1990).

W przypadku innych szczepów także inne geny CaMV oddziałują na wystąpienie systemicznego rozprzestrzeniania szczepu W 260 w roślinach *Datura stramonium*. Reakcja ta zależy nie tylko od produktu genu VI, ale również od interakcji z genami I i IV (QIU i SCHOELZ 1992). Jednocześnie wyniki te wskazują, że w pewnych roślinach wytworzenie białka P6 może powodować reakcję obronną, a w następstwie ograniczenie transportu wirusa w roślinie. Białko P6 szczepów D 4 i W 260 nie wywołuje reakcji obronnej.

W transgenicznych roślinach *N. bigelovii* (SCHOELZ i współaut. 1991) wykazali, że ekspresja produktu genu VI ze szczepu o systemicznej reakcji gospodarza powoduje zmianę w transporcie cząstek szczepu CaMV, który charakteryzował się reakcją lokalną, a wprowadzony gen spowodował uzyskanie przez wirusa zdolności do transportu na dalekie odległości.

Wykazano też, że gen VI jest włączony w indukcję chloroz i ma wpływ na powstawanie fenotypu karłowatości poprzez regulację translacji innych genów (ANDERSON i współaut. 1992).

Interesujące są wyniki badań odnoszące się do roślin nie gospodarzy CaMV. Ekspresja genu VI w transgenicznych roślinach — nie gospodarzach, na przykład *N. tabacum* może wywoływać objawy charakterystyczne dla szczepów CaMV (BAUGHMAN i współaut. 1988, GOLDBERG i współaut. 1991, BALLAZS 1990), jednak może powodować powstanie bardzo silnych objawów. Białko P6 wywołuje wówczas tak zwany „toksyczny efekt”, podczas gdy rośliny gospodarza są bardziej tolerancyjne na białko P6 i lepiej znoszą procesy namnażania wirusa.

PRODUKT BIAŁKOWY GENU IV

Gen IV koduje białko kapsydu CaMV, któremu przypisuje się indukcję fenotypu karłowatości rzepy (ANDERSON i współaut. 1991). Białko kapsydu

wirusa mozaiki ogórka wpływa na wystąpienie chloroz na tytoniu (NELSON i współaut. 1990), a białko kapsydu wirusa mozaiki lucerny ALMV wpływa na zmianę fenotypu rośliny. Natura oddziaływań białek kapsydu z roślinami nie jest wyjaśniona. Natomiast w przypadku porażenia tytoniu wirusem mozaiki tytoniu sądzi się, że nagromadzenie białek kapsydu TMV w tylakoidach gran chloroplastów zakłóca procesy fotosystemu II i jest przyczyną wystąpienia chloroz (DAWSON 1991).

PRODUKT BIAŁKOWY GENU I

Gen *I* koduje białko transportowe 38 kDa podobne do białka TMV — 30 kDa (TOMENIUS i współaut. 1987) i mające zdolność do łączenia się z kwasem nukleinowym (CITOVSKY i współaut. 1991), stąd białko to może uczestniczyć w transporcie całych wirionów, jak i kwasów nukleinowych (CITOVSKY i ZAMBRYSKI 1992). Ekspresja objawów porażonych roślin jest uwarunkowana sposobem transportu wirusa w roślinie — transport lokalny odbywa się przez plazmodesmy z komórki do komórki lub transport w tkankach przewodzących na dalekie odległości — reakcja systemiczna. Produkt genu *I* był lokalizowany w plazmodesmach (LINSTED i współaut. 1988).

INNE PRODUKTY BIAŁKOWE GENÓW CaMV

Gen *II* koduje białko związane z nabywaniem wirusa przez mszyce i stanowiące główny składnik wiropłazmy typu II. Białko to ma wpływ kontrolujący na żerowanie i infekcyjność mszyc, a także pośrednio wpływa na fenotyp karłowatości, podobnie jak produkt genu *V* (STRATFORD i COVEY 1989).

UWAGI KOŃCOWE

Badania z użyciem transgeniczných roślin do ekspresji wirusowych genów wykazały, że właściwości kilku z nich umożliwiają antywirusową strategię. W przypadku CaMV dotyczy to głównie genów *VI* i *IV*. Dla innych wirusów zwiększenie odporności roślin na porażenie było uzyskane przez wprowadzenie do ich genomu następujących transgenów (NELSON i współaut. 1990):

1. Kodujących białko płaszczą — otrzymano rośliny transgeniczne, każdą z innym genomem wirusa: mozaiki tytoniu (TMV), potywirusa ziemniaka (PVY), wirusa liściozwoju ziemniaka (PLRV), wirusa mozaiki ogórka (CMV), wirusa mozaiki lucerny (ALMV) i CaMV — następuje wówczas zmiana dynamicznej równowagi między procesami montażu cząstek wirusa a dysocjacją białek kapsydu, bądź też inhibicja receptorów komórkowych, odpowiedzialnych za uwalnianie kwasu nukleinowego genomu wirusa od białek kapsydu.

2. Replikaz — następuje obniżenie procesów namnażania się wirusa, nadprodukcja RNA lub antysense RNA chroni przed wirusową infekcją.

Jednocześnie wyniki z transfekcją roślin nie-gospodarzy wskazują na trudności w regeneracji roślin i powstawanie zmienionego fenotypu. Roślina gospodarz poddana transfekcji w ten sam sposób z genem *VI* nie daje tak silnych objawów. Może to świadczyć o koewolucji rośliny i wirusa (ZIJLSTRA i HOHN 1992).

Można też sądzić, że czynniki genetyczne gospodarza kontrolują zdarzenia cyklu życiowego CaMV przebiegające w jądrze, podczas gdy zdarzenia cytoplazmatyczne cyklu są kontrolowane przez geny CaMV.

Jednym z najbardziej interesujących odkryć dotyczących CaMV było stwierdzenie, że jego 35S RNA może być silnym promotorem o konstytutywnej ekspresji przy wprowadzaniu genów do komórek roślin z klasy jedno- i dwuliściennych (SANDERS i współaut. 1987, BATTRAW i Hall 1990) komórek zwierzęcych (BALLAZS i współaut. 1989) i drożdży (HIRT i współaut. 1990), a być może znajdzie też zastosowanie jako wektor transgenów do komórek grzybów.

Transkrypty RNA CaMV, w tym 35S mają sygnały polyadenylacji podobne do tych, które występują w m RNA roślin, zwierząt, drożdży i retrowirusów (SANFACON 1991).

Poznanie regulacji transkrypcji genomu CaMV, roli sygnałów transkrypcyjnych i oddziaływań produktów białkowych genów wirusa z genomem roślin mogą wpłynąć na powstanie nowych metod inżynierii odporności, mających zastosowanie dla różnych organizmów, nie tylko roślinnych.

THE CAULIFLOWER MOSAIC VIRUS, CaMV, AS A REVERSE TRANSCRIPTASE DEPENDENT MODEL OF VIRAL LIFE CYCLE

Summary

CaMV, causes disease only in a narrow group of plants but is of special scientific interest because it resembles animal retroviruses both in its genome structure and the life cycle. CaMV genome consists of double-stranded circular DNA composed of 8 genes. One of them encodes reverse transcriptase, the enzyme catalysing DNA synthesis on RNA. CaMV genome is readily divided into fragments which can be used in studies on the effect of the host plant properties on the expression of viral genes.

LITERATURA

- AL ANI R., PFEIFFER P., WHITECHURCH O., LESOT A., LEBEURIER G., HIRTH L., 1980. *A virus specified protein produced upon infection by cauliflower mosaic (CaMV)*. Ann. Inst. Pasteur Virol. 131 E. 33-53.
- ALBRECHT H., GELDREICH A., MENISSIER-DE MURCIA J., KIRCHHERR D., MESNARD J. M., LEBEURIER G., 1988. *Cauliflower mosaic virus gene I product detected in a cell-wall-enriched fraction*. Virology 163, 503-508.
- ANDERSON E. J., SHIRLEY G., QIU S. G., SCHOELZ J. E., 1991. *Genetic analysis of determinants of disease severity and virus concentrations in cauliflower mosaic virus*. Virology 181, 647-655.
- ANDERSON E. J., TRESE A. T., SEHGAL O. P., SCHOELZ J. E., 1992. *Characterization of a chimeric cauliflower mosaic virus isolate that is more severe and accumulates to higher concentrations than either of the strains from which it was derived*. Mol. Plant Microbe Interact. 5, 48-56.
- ARMOURS L., MELCHER U., PIRONE T. P., LYTILE D. J., ESSENBERG R. G., 1983. *Helper component for aphid transmission encoded by region II of cauliflower mosaic virus DNA*. Virology 129, 25-30.
- BALAZS E., 1990. *Disease symptoms in transgenic tobacco induced by integrated gene VI of cauliflower mosaic virus*. Virus Genes 3, 205-211.
- BALAZS N., BROIDO S., SOREQ H., LOYTER A., 1989. *Efficient functioning of plant promoters and poly (A) sites in Xenopus oocytes*. Nucleic Acids Res. 19, 7891-7903.
- BATTRAW M. J., HALL T. C., 1990. *Histochemical analysis of CaMV 35S promoter- α -glucuronidase gene expression in transgenic rice plants*. Plant Mol. Biol., 15, 527-538.
- BAUGHMAN G. A., JACOBS J. D., HOWELL S. H., 1988. *Cauliflower mosaic virus gene VI produces a symptomatic phenotype in transgenic tobacco plants*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85, 733-737.

- BONNEVILLE J. M., SANFACON H., FUTTERER J., HOHN T., 1989. Posttranscriptional trans-activation in cauliflower mosaic virus. *Cell* 59, 1135–1143.
- CHAUVIN C., JACROT B., LEBEURIER G., HIRTH L., 1979. The structure of cauliflower mosaic virus, a neutron diffraction study. *Virology* 96, 640–641.
- CITOVSKY V., KNORR D., ZAMBRYSKI P., 1991. Gene I, a potential cell-to-cell movement locus of cauliflower mosaic virus encodes an RNA-binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88, 2476–2480.
- CITOVSKY V., ZAMBRYSKI P., 1992. How do plant virus nucleic acids move through intercellular connections. *Bio Essays* 13. 8., 373–379.
- CORNUET P., 1987. *Elements de virologie vegetale* INRA. Paris.
- COVEY S. N., HULL R., 1981. Transcription of cauliflower mosaic virus DNA. Detection of transcripts, properties and location of the gene encoding the virus inclusion body protein. *Virology* 3, 463–474.
- COVEY S. N., TURNER D. S., LUCY A. P., SAUNDERS K., 1990. Host regulation of the cauliflower mosaic virus multiplication cycle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87, 1633–1637.
- COVEY S. N., TURNER D. S., 1991. Comparison of viral nucleic acid intermediates at early and late stages of cauliflower mosaic virus infection suggests a feedback regulatory mechanisms. *J. Gen. Virol.* 72, 2603–2606.
- DAWSON W. O., 1991. The pathogenicity of tobacco mosaic virus. *Sem. in Virology* 2, 131–137.
- DAUBERT S., RICHINS R., SHEPHERD R. J., GARDNER R. C., 1982. Mapping of the coat protein gene of cauliflower mosaic virus by its expression in a procariotic system. *Virology* 122, 444–447.
- DAUBERT S., ROUHF G., 1990. Point mutations in cauliflower mosaic virus gene VI confer host-specific symptom changes. *Mol. Plant Microbe Interact.* 3, 341–345.
- DAUBERT S., SCHOELZ J., DEBAO L., SHEPHERD R. J., 1984. Expression of disease symptoms in cauliflower mosaic virus genomic hybrids. *J. Mol. Appl. Genet.* 2, 537–546.
- ESPIÑOZA A. M., MEDINA V., HULL R., MARKHAM P. G., 1991. Cauliflower mosaic virus gene II produkt forms distinct inclusion bodies in infected plant cells. *Virology* 185, 337–344.
- FUETTERER J., HOHN T., 1991. Translation of a polycistronic mRNA in the presence on the cauliflower mosaic virus transactivator protein. *EMBO J.*, 10, 3887–3896.
- FRANCK A., JONARD G., RICHARDS K., 1980. Nucleotide sequence of cauliflower mosaic virus DNA. *Cell*, 21, 285–294.
- GARBACZEWSKA G., KERLAN C., 1992. Localization of cauliflower mosaic virus in the cell nucleus of *Brassica pekinensis* L. *Res. Virol.*, 143, 285–295.
- GOLDBERG K. B., KIERNAN J., SHEPHERD R. J., 1991. A disease syndrome associated with expression of gene VI of caulimoviruses may be a nonhost reaction. *Mol. Plant Microbe Interact.* 4, 182–189.
- GOWDA S., WU F. C., SCHOLTHOF H. B., SHEPHERD R. J., 1989. Gene VI of figwort mosaic virus (caulimovirus group) function in posttranscriptional expression of genes on the full-length RNA transcript. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86, 9203–9207.
- GRACIA O., SHEPHERD R. J. Cauliflower mosaic virus in the nucleus of *Nicotiana*. *Virology* 146, 141–146.
- HIRT H., KOGL M., MURBACHER T., HEBERLE-BORS E., 1990. Evolutionary conservation of transcriptional machinery between yeasts and plants as shown by the efficient expression from the CaMV 35S promoter and 35S terminator. *Curr. Genet.*, 17, 473–479.
- HOHN T., BONNEVILLE J.-M., FUETTERER J. i współautorzy, 1990. The use of 35S RNA as either messenger or replicative intermediate might control the cauliflower mosaic virus replication cycle. [W:] *Viral genes and plant pathogenesis*. PIRONE T. P., SHAW J. G. (red.) Springer-Verlag, New York, 67–78.
- HOWARTH A. J., GARDNER R. C., SHEPHERD R. J., 1981. Nucleotide sequence of naturally occurring deletion mutants of cauliflower mosaic virus. *Virology* 112, 678–685.
- HULL R., 1991. Plant viral pathogenesis. *Sem. in Virology*, vol. 2, 79–80.
- LINSTEAD P. J., HILLS G. J., PLASKITT K. A., WILSON I. G., HARKET C. L., MAULE A. J., 1988. The subcellular location of the gene I Product of cauliflower mosaic virus is consistent with a function associated with virus spread. *J. Gen. Virol.* 69, 1809–1818.
- MAZZOLINI L., DABOS P., CONSTANTIN S., YOT P., 1989. Further evidence that viroplasm are the site of cauliflower mosaic virus genome replication by reverse transcription during viral infection. *J. Gen. Virol.* 70, 3439–3449.
- MESNARD J. M., KIRCHHERR D., WURCH T., LEBEURIER G., 1990. The cauliflower mosaic virus gene III product is a non-sequence specific DNA binding protein. *Virology* 174, 622–624.
- NELSON R. S., POWELL P. A., BEACHY R. N., 1990. Coat protein — mediated protection against virus infection. [W:] *Recognition and response in plant virus interactions*. Springer — Verlag, 427–442.
- ODELL J. T., HOWELL S. H., 1980. The identification, mapping, and characterization of mRNA for P66, a cauliflower mosaic virus coded protein. *Virology* 102, 349–359.

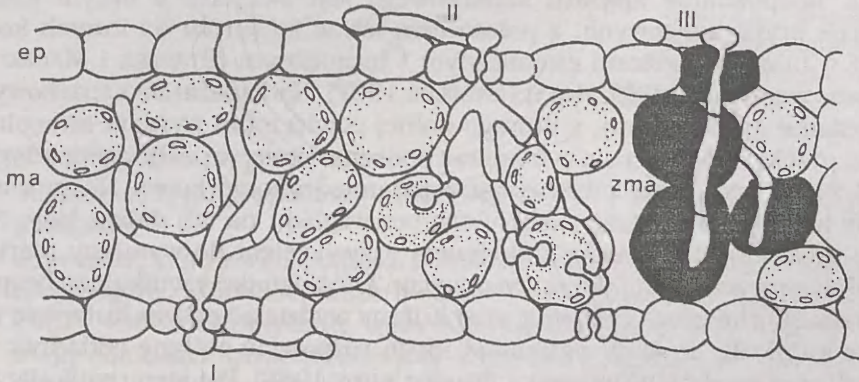
- OLSZEWSKI N., HAGEN G., GUILFOYLE T. J., 1982. A transcriptionally active covalently closed minichromosome of cauliflower mosaic virus DNA isolated from infected turnip leaves. *Cell* 29, 395-402.
- PFEIFFER P., HOHN T., 1983. Involvement of reverse transcription in the replication of cauliflower mosaic virus, a detailed model and test of some aspects. *Cell* 33, 781-789.
- PFEIFFER P., HOHN T., 1987. The life cycle of Cauliflower Mosaic Virus. *Plant Molec. Biol.*, 140, 443-453.
- PFEIFFER P., MESNARD J. M., 1995. The interplay of host and virus genes in the specificity and pathogenicity of cauliflower mosaic virus. [W:] *Pathogenesis and host specificity in plants diseases*, vol. 3, 269-285 Pergamon.
- PIRONE T. P., 1991. Viral genes and gene products that determine insect transmissibility. Sem. in *Virology* vol. 2, 81-87.
- QIU S. G., SCHOELZ J., 1992. Three regions of cauliflower mosaic virus strain W260 are involved in systemic infection of solanaceous host. *Virology* 190, 773-782.
- SANFACON H., 1991. Regulation of mRNA formation in plants, lessons from the cauliflower mosaic virus transcription signals. *Can. J. Bot.* 70, 885-899.
- SANFACON H., BRODMANN P., HOHN T., 1991. A dissection of the cauliflower mosaic virus polyadenylation signal. *Genes Dev.* 5, 141-149.
- SANFACON H., WIECZOREK A., 1992. Analysis of cauliflower mosaic virus RNAs in Brassica species showing a range of susceptibility to infection. *Virology* 189, 1-10.
- SANDERS P. R., WINTER J. A., BARNASON A. R., 1987. Comparison of cauliflower mosaic virus 35S and nopaline synthase promoters in transgenic plants. *Nucleic Acids Res.* 15, 1543-1559.
- SAUNDERS K., LUCY A. P., COVEY S. N., 1990. Susceptibility Brassica species to cauliflower mosaic virus infection is related a specific stage in the virus multiplication cycle. *J. Gen. Virol.* 7, 1641-1647.
- SCHOELZ J. M., SHEPARD R. J., DAUBERT S., 1986. Region VI of cauliflower mosaic virus encodes a host range determinant. *Mol. Cell. Biol.* 6, 2632-2637.
- SCHOELZ J. M., SHEPARD R. J., 1988. Host range control of cauliflower mosaic virus. *Virology* 162, 30-37.
- SCHOELZ J. M., GOLDBERG K. B., KIERNAN J., 1991. Expression of cauliflower mosaic virus (CaMV) gene VI in transgenic *Nicotiana bigelovii* complements a strain of CaMV defective in long-distance movement in nontransformed *N. bigelovii*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 4, 350-355.
- SCHOLTHOF H. B., WU F. C., GOWDA S., SHEPHERD R. J., 1992. Regulation of caulimovirus gene expression and the involvement of cis-acting elements on both viral transcripts. *Virology* 190, 403-412.
- STRATFORD R., COVEY S. N., 1989. Segregation of cauliflower mosaic virus symptom genetic determinants. *Virology* 172, 451-459.
- TAKAHASHI H., SHIMAMOTO K., EHARA Y., 1989. Cauliflower mosaic virus gene VI causes growth suppression, development of necrotic spots and expression of defence-related genes in transgenic tobacco plants. *Mol. Gen. Genet.* 216, 188-194.
- TOH H., HAYASHIDA H., MIYATA T., 1983. Sequence homology between retroviral reverse transcriptase and putative polymerases of hepatitis B virus cauliflower mosaic virus. *Nature* 305, 827-829.
- TOMENIUS K., CLAPHAM D., MESH I., 1987. Localization by immunogold cytochemistry of the virus-coded 30K protein in plasmodesmata of leaves infected with tobacco mosaic virus. *Virology* 160, 363-371.
- TORRUELLA M., GORDON K., HOHN T., 1989. Cauliflower mosaic virus produces an aspartic proteinase to cleave its polyproteins. *EMBO J.* 8, 2819-2825.
- WOOLSTON C. J., COVEY S. N., PENSWICK J. R., DAVIES J. W., 1983. Aphid transmission and a polypeptide are specified by a defined region of the cauliflower mosaic virus genome. *Gene* 23, 15-23.
- ZIJLSTRA C., HOHN T., 1992. Cauliflower mosaic virus gene VI controls translation from dicistronic units in transgenic Arabidopsis plants. *Plant Cell.* 4, 1471-1484.

KRYSTYNA BRZEZICKA-SZYMCZYK

Katedra Botaniki, Wydział Rolniczy
Szkoty Głównej Gospodarstwa Wiejskiego
Rakowiecka 26/30, 02-528 Warszawa

INFEKCJA, ROZPOZNANIE, ODPOWIEŹ W INTERAKCJACH GRZYBÓW PATOGENICZNYCH Z ROŚLINAMI

Strategia grzybowej infekcji zależy między innymi od sposobu odżywiania się patogena. Z tego względu grzyby dzielimy na: nekrotroficzne, biotroficzne oraz czasowo biotroficzne. Pierwsze stanowią grupę mało wyspecjalizowanych patogenów, które porażają rośliny wydzielając różnego rodzaju substancje (toksyny, enzymy) i rozwijają się wewnątrz znekrotyzowanej tkanki. Drugie penetrują żywe tkanki gospodarza wytwarzając strzępki międzykomórkowe lub wewnątrzkomórkowe haustoria (rys. 1). Patogeny czasowo biotroficzne w pierwszej fazie wytwa-



Rys. 1. W zależności od sposobu odżywiania się grzyby biotroficzne wytwarzają grzybnie międzykomórkową (I) lub grzybnie z haustoriami (II), natomiast grzyby nekrotroficzne rozrastają się w obumarłej tkance gospodarza (III) (ep — epiderma; ma — miękisz asymilacyjny; zma — znekrotyzowany miękisz asymilacyjny (oznaczony czarnym kolorem).

rzają strzępki międzykomórkowe i haustoria, by w drugiej fazie wytworzyć silnie rozwiniętą grzybnie wtórną już w znekrotyzowanych tkankach (CRUTE i współaut. 1985, MANSFIELD 1984, KEEN 1986). W czasie infekcji pomiędzy patogenem a żywicielem jest wymienianych wiele sygnałów (MENDGEN i współaut. 1988). Taka „dyskusja” może zapewnić sukces patogenowi lub roślinie. Sygnały wysyłane od patogena nazwano induktorami (elicitors). Są to molekuly wywołujące reakcje obronne (WOLOSHUK i KOLATTUKUDY 1986). Mogą nimi być:

- enzymy wytwarzane przez patogena;
- specyficzne węglowodany pochodzące ze ścian komórek patogena (KOGEL i współaut. 1985, MANSFIELD 1986);
- fragmenty ścian komórkowych żywiciela, które mogą indukować reakcje obronne innych komórek żywiciela (DAVIS i HAHLBROCK 1987).

Induktory mogą być odbierane przez receptory (sensory) — są to cząsteczki zdolne do rozpoznania induktora. Stanowią je białka i glikoproteiny zlokalizowane na zewnętrznej powierzchni ściany komórkowej i w plazmolemie komórek żywiciela.

Patogen może znieść efekt działania induktora wytwarzając supresor (OKU i współaut. 1987).

W procesie infekcyjnym można wyróżnić trzy etapy: kiełkowania, wnikania i pasożytowania.

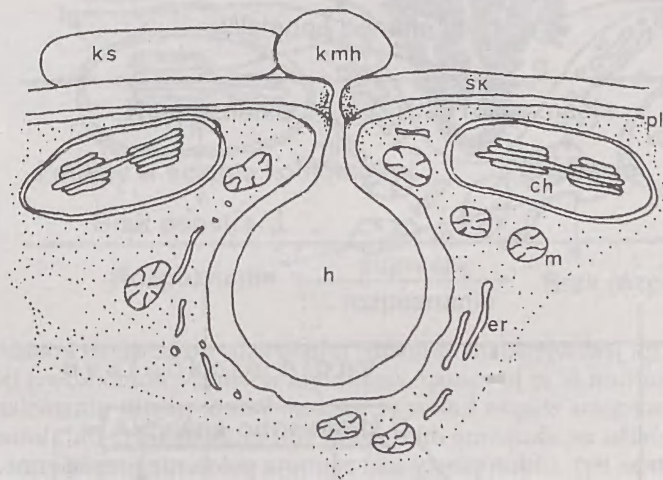
KIEŁKOWANIE

Zarodniki, które znalazły się na powierzchni rośliny są przytwierdzone do niej za pomocą substancji klejących (MATTHYSSE 1987). Kiełkowanie spor zachodzi w odpowiednich warunkach wilgotnościowych, temperaturowych i świetlnych (STAPLES i MAĆKO 1984). Patogeny mogą wnikać do rośliny bezpośrednio przez skórę, aparaty szparkowe lub zranienie. Zarodniki na powierzchni rośliny wytwarzają strzępki kiełkowe i przycistki (appresoria). Wzrost strzępki kiełkowej może być ukierunkowany tigio- i chemotropizmem a także kształtem komórek skórki. Rozpoznanie aparatu szparkowego jest związane z innym kształtem komórek przyszparkowych, z położeniem ich w stosunku do innych komórek skórki a także z bodźcem chemicznym i termicznym (STAPLES i MAĆKO 1984, STAPLES i współaut. 1985, HOCH i STAPLES 1987). Nad aparatem szparkowym jest wytwarzane appresorium, z którego dolnej powierzchni wyrasta strzępka infekcyjna przekształcająca się w komorze podszparkowej w pęcherzyk podszparkowy. Z niego wyrastają pierwsze strzępki międzykomórkowe. Na powierzchni rośliny kiełkuje większość zarodników bez względu na ich dalsze losy. Na tym etapie może dojść pomiędzy patogenem a żywicielem do wymiany pierwszych sygnałów opisywanych jako rozpoznawcze. Otóż patogeny wnikające bezpośrednio przez skórę mogą pod wpływem kutyny wydzielać enzym kutynazę rozkładający kutykulę. Rośliny natomiast mogą rozpoznać chitynę (składnik ściany komórkowej grzyba) (WOLOSHUK i KOLATTUKUDY 1986). Patogeny wnikające przez aparaty szparkowe w obawie przed rozpoznaniem przez gospodarza potrafią obudować appresorium szczelnie glukanami ukrywając w ten sposób chitynę (MENDGEN 1988).

WNIKANIE

Właściwa batalia między patogenem a żywicielem zachodzi wewnątrz rośliny na powierzchni komórek mezofilu. Grzyby biotroficzne muszą pokonać ścianę komórkową, wniknąć do komórki i wytworzyć ssawkę (rys. 2). Komórką odpowiedzialną za ten manewr jest komórka macierzysta ssawki. Mała, wierzchołkowa

komórka strzępki, która mechanicznie i enzymatycznie (celulazami i pektynazami) rozluźnia zwartą strukturę ściany komórkowej. Kolejną barierą, na jaką napotyka intruz, jest błona komórkowa (plazmolema) — żywy element protoplastu z licznymi receptorami zdolnymi do zidentyfikowania patogena. W tym miejscu patogen zachowuje się szczególnie ostrożnie. Wnika w głąb protoplastu nie naruszając ciągłości plazmolemy. Umieszczając ssawkę w komórce zapewnia sobie dostęp do substancji odżywczych żywiciela. Kosztem pobieranych składników pokarmowych gospodarza rozbudowuje grzybnię i tworzy właściwe sobie struktury zarodnikowe (BRZEZICKA-SZYMCZYK i współaut. 1988). Tak zachowuje się „idealny” żywiciel. Powszechnie rośliny wytwarzają szereg mechanizmów nie tylko identyfikujących patogena, ale także zatrzymujących jego wzrost i rozwój.



Rys. 2. Powstawanie haustorium (h) otoczonego ciągłą plazmolemą (pl) jest wynikiem swobodnej penetracji komórki macierzystej haustorium (k m h) przez ścianę komórkową (ś k). Wokół haustorium są widoczne organella komórkowe, ch — chloroplast, m — mitochondrium, er — retikulum endoplazmatyczne.

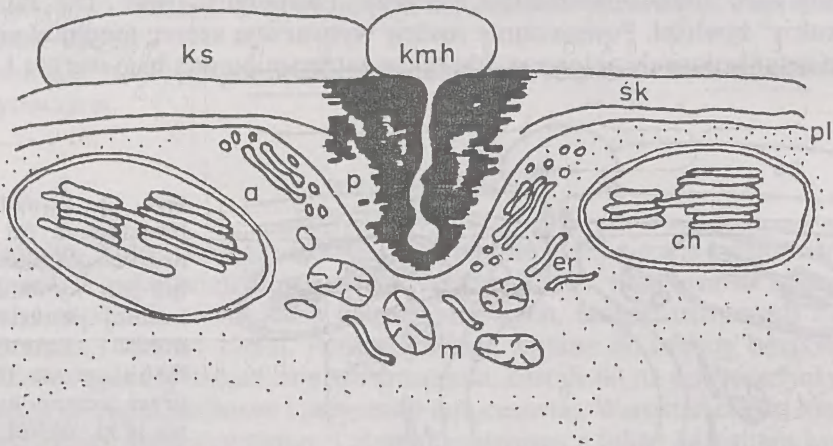
Wyróżniamy dwa typy odporności:

- odporność typu gospodarza (host resistance) — odporność rośliny na jej patogeny;
- odporność typu niegospodarza (nonhost resistance) — odporność rośliny na patogeny, które normalnie nie są w stanie jej porazić (RIDE 1985, NICKS 1987, 1988). Genetycznie uwarunkowane mechanizmy odpornościowe mają charakter uniwersalny i są skierowane przeciwko całym grupom potencjalnych patogenów. RIDE (1985) podzielił te mechanizmy na: negatywne — wynikające z braku czynników koniecznych do wzrostu i rozwoju grzyba i pozytywne — związane z obecnością lub wytworzeniem czynników hamujących wzrost i rozwój patogena.

Należą do nich:

Fitoaleksyny — związki o niskim ciężarze cząsteczkowym. Występujące bardzo często w roślinach flawonoidy, antocyjany, alkaloidy mają charakter fungistatyczny. Mogą być produkowane *de novo* przy zranieniach i w czasie infekcji na przykład: pisatyna, faseolina, avenoluminy (Avl I, II, III) (MAYAMA i współaut. 1981, BOILEY i INGHAM 1971, KEEN i LITTLEFIELD 1979, KEEN i współaut. 1983).

Lignina, kalloza, fenole i depozyty krzemowe — substancje związane z modyfikacją ściany komórkowej. Obserwowane są u roślin bardzo wczesnie rozpoznających patogena (już na powierzchni ściany komórkowej). Komórka reaguje wówczas lokalnym pogrubieniem ściany komórkowej w miejscu kontaktu ze strzępką grzyba, lub tworzy „papillę” (rys. 3), strukturę zamykającą ssawkę wewnątrz ściany komórkowej (CRUTE i współaut. 1985, AIST i GOLD 1987, HEATH 1981, TIBURZY i REISENER 1990).



Rys. 3. Powstawanie papilli (p) jest wynikiem aktywnej odpowiedzi atakowanej komórki. Komórka macierzysta haustorium (k m h) zostaje zamknięta w ścianie komórkowej (ś k) poprzez odkładanie w tym miejscu złogów kallozy i ligniny. Wokół papilli plazmolema ulega inwaginacji a w jej pobliżu są skupione diktiosomy (d), mitochondria (m), kanały retikulum endoplazmatycznego (er). Chloroplasty (ch) zajmują położenie przyścienne.

MRGP (hydroxyproline-rich glycoproteins) — specyficzne glikoproteiny gromadzone na powierzchni zainfekowanych komórek mogących pełnić funkcję barier strukturalnych i powodować niespecyficzną aglutynację mikroorganizmów (CASSAB i VARNER 1988, CLARKE i współaut. 1981).

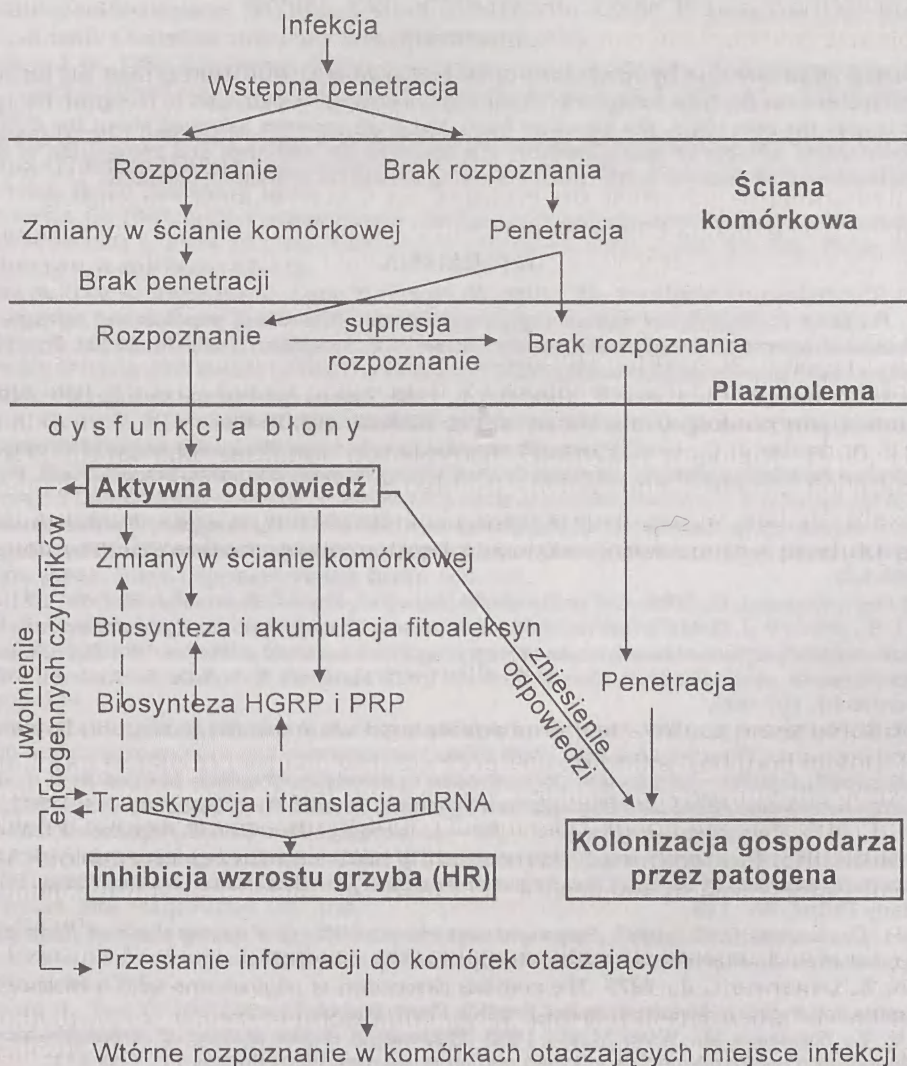
PRP — (pathogenesis related proteins) — białka związane z patogenezą. Są to najczęściej:

- enzymy kontrolujące szlak metaboliczny fenoli i lignin (YAMAMOTO i współaut. 1977, 1986),
- oksydazy NADPH uwalniające H_2O_2 (DOKE 1985, TANAKA i współaut. 1993)
- β -1,3 glukanazy i chitynazy (LEGRAND i KAUFFMAN 1987, KOMBRINK i współaut. 1988). Wzrost aktywności tych enzymów jest związany z dysfunkcją plazmolemy, uwolnieniem z niej endogennych czynników uruchamiających transkrypcję i translację m-RNA (KOGEL i współaut. 1985, MANSFIELD 1990).

Jedną z najdrastyczniejszych reakcji rośliny na obecność patogena jest tworzenie nekroz. W miejscu infekcji gwałtownie obumierają zainfekowane komórki a razem z nimi ginie patogen (MANSFIELD 1984, 1986).

Zgodnie z koncepcją „gen do genu” procesy odpornościowe zachodzą w roślinie tylko wówczas, gdy rośliny posiadają gen odporności *R* a patogen dysponuje

genem awirulencji *Avr* (FLOR 1971). Każdy inny układ genetyczny wywołuje podatność (wrażliwość). Znane są geny odpowiedzialne za reakcje nadwrażliwości HR — (hypersensitiv resistance). Gen *Sr5* pszenicy wywołuje HR na *Puccinia graminis* f. sp. *tritici* (TIBURZY i REISENER 1990), gen *L7, K* u lnu wywołuje HR na *Melampsora lini* (KEEN i LITTLEFIELD 1979, KEEN i współaut. 1983), geny *Dm* sałaty — odporność na *Bremia lactucae* (MANSFIELD i współaut. 1988). Efekt działania tych genów przejawia się produkcją fitoaleksyn i modyfikacją ścian komórkowych. Infekcja, rozpoznanie, odpowiedź to główne etapy skomplikowanego mechanizmu wzajemnych oddziaływań w układzie grzyb — roślina (rys. 4). Im



Rys. 4. Schemat oddziaływań grzyb — roślina (wg MANSFIELDA 1990 — zmienione). Przerwane linie oznaczają możliwość istnienia takiego szlaku.

wcześniejsze rozpoznanie patogena tym większa szansa na jego inaktywację. Ważna jest nie tylko reakcja komórki atakowanej ale także szybkość z jaką informacja o infekcji dociera do komórek otaczających. Niezwykle trudny jest do ustalenia mechanizm współdziałania (oddziaływania) patogen-roślina prowadzący krok po kroku od rozpoznania do odporności lub kolonizacji rośliny. Wyjaśnienie tych zależności należy już do biochemików i biologów molekularnych.

INFECTION, RECOGNITION AND RESPONSE IN THE INTERACTION BETWEEN FUNGAL PATHOGENS AND PLANTS

Summary

During plant infection by fungi there is an exchange of stimuli coming from the pathogen (inducers) and from the host (receptors). These signals enable the pathogen to recognize the target and to invade the host plant. On the other hand, the plant becomes informed about the infection and counteracts it, more or less efficiently. The speed of the exchange and recognition of those informations may be decisive for the plant becoming invaded or remaining resistant.

LITERATURA

- AIST J. R., GOLD R. E., 1987. *Prevention of fungal ingress, The role of papillae and calcium*. [W:] *Molecular determinants of plant diseases*. NISHIMURA S. i współaut. (red). Japan Sci. Soc. Press. Tokyo i Springer-Verlag Berlin, 197-309.
- BRZEZICKA-SZYMCZYK K., GOLINOWSKI W., GAŚOWSKI A., 1988. *Zmiany cytologiczne mezofilu kilku odmian pszenicy jarej porażonych rdzą brunatną*. Biul. IHAR 32, 3/4, 79-93.
- BOILEY J. A., INGHAM J. L., 1971. *Phaseolin accumulation in bean (*Phaseolus vulgaris*) in response infection by tobacco necrosis virus and the rust *Uromyces appendiculatus**. *Physiol. Plant. Pathol.* 1, 451
- CLARKE J. A., LISKER N., LAMPORT D. T. A., ELLINGBOE A. H., 1981. *Hydroxyproline enhancement as primary event in the successful development of *Erysiphe graminis* in wheat*. *Plant Physiology* 67, 188-189.
- CASSAB G. J., VARNER J. E., 1988. *Cell wall proteins*. *Anu. Rev. Physiol. Plant. Mal. Biol.* 39, 321-353.
- CRUTE I. R., de WIT P. J. G. M., WADE M., 1985. *Mechanisms by which genetically controlled resistance and virulence influence host colonization by fungal and bacterial parasites*. [W:] *Mechanisms of resistance to plant diseases*. FRASER R. S. S. (red). Martinus Nyhoff-Dr W Junk Publishers Dordrecht, 197-309.
- DAVIS K. R., HAHNBROCK K., 1987. *Induction of defense responses in cultured parsley cells by plant cell wall fragments*. *Plant Physiol.* 85, 1286-1290.
- DOKE N., 1985. *NADPH — dependent O₂ generation in membrane fractions isolated from wounded potato tubers inoculated with *Phytophthora infestans**. *Physiol. Plant Pathol.* 27, 311-322.
- FLOR H. H., 1971. *Current status of the gene — for — gene concept*. *Ann. Rev. Phytopathol.* 9, 257-296.
- HEATH M. C., 1981. *The suppression of the development of silicon — containing deposits in French bean leaves by exudates of the bean rust fungus and extracts from bean rust — infected tissue*. *Physiol Plant Pathol.* 18, 149.
- HOCH H. C., STAPLES R. C., 1987. *Structural and chemical changes among the rust fungi during appressorium development*. *Ann. Rev. Phytopathol.* 25, 231-247.
- KEEN N. T., LITTLEFIELD L. J., 1979. *The possible association of phytoalexins with resistance gene expression in flax to *Melampsora lini**. *Physiol. Plant. Pathol.* 14, 265.
- KEEN N. T., YOSHIKAWA M., WANG M. C., 1983. *Phytoalexin elicitor activity of carbohydrates from *Phytophthora megasperma* f.sp. *glicinea* and other sources*. *Plant Physiol.* 71, 466-471.
- KEEN N. T., 1986. *Pathogenic strategies for fungi*. [W:] *Recognition in microbe-plant symbiotic and pathogenic interactions*. Lugtenberg B. (red) Springer-Verlag, Berlin, 171.

- KOGEL K. H., SCHRENK F., SHARON N., REISENER H. J., 1985. *Suppression of the hypersensitive response in wheat stem rust interaction by reagents with affinity for wheat plasma membrane galactoglycates*. J. Plant Physiol. 118, 343.
- KOGEL G., BEISSMANN B., REISENER H. J., KOGEL K., 1991. *Specific binding of hypersensitive lignification elicitor from Puccinia graminis f. sp. tritici to the plasma membrane from wheat (Triticum aestivum L.)*. Planta 183, 164.
- KOMBRING E., SCHRODER M., HAHNBROCK K., 1988. *Several „pathogenesis — related” proteins in potato are 1,3- β -glucanases and chitinases*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85, 782–786
- LEGRAND M., KAUFFMAN S., 1987. *Biological function of pathogenesis — related proteins from tobacco pathogenesis — related proteins are chitinases*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 84, 6750–6754
- MANSFIELD J. W., 1984. *Plant cell death during infection by fungi*. [W:] Cell ageing and death. DAVIES SIGEE D. C. (red). Cambridge University Press, Cambridge p. 323.
- MANSFIELD J. W., WOODS A. M., STREET P. F. S., ROWELL P. M., 1988. *Recognition processes in lettuce downy mildew disease*. [W:] Eucaryote cell recognition. CHAPMAN G. P., AINSWORTH C. C., CHATHAM C. J. (red). Cambridge University Press, Cambridge p. 241.
- MANSFIELD J. W., 1986. *Recognition elicitors and the hypersensitive reaction*. [W:] Recognition in microbe — plant symbiotic and pathogenic interactions. LUGTENBERG B. (red). Springer — Verlag, Berlin p. 434.
- MANSFIELD J. W., 1990. *Recognition and Response in plant — fungus interactions*. NATO ASI Series, tom 41, Recognition and Response in Plant — Virus Interactions. FRASER R. S. S. (red). Springer-Verlag, Berlin Heidelberg 1990.
- MATTHYSSE A. G., 1987. *Surface interactions between gram negative bacteria and plants*. [W:] Molecular determinants of plant diseases. NISHIMURA S. i współaut. (red). Japan Sci. Soc. Press Tokyo i Springer-Verlag Berlin 97–115.
- MAYAMA S., TANI T., MATSUURA Y., UENO T., FUKAMI H., 1981. *The production of phytoalexin by oat in response to crown rust Puccinia coronata f. sp. avenae*. Physiol. Plant Pathol. 19, 217.
- MENDGEN K., SCHNEIDER A., STERK M., FINK W., 1988. *The differentiation of infection structures as a result of recognition events between some biotrophic parasites and their hosts*. J. Phytopathology 123, 259–272.
- NICKS R. E., 1987. *Nonhost plant species as donors for resistance to pathogens with narrow host range I Determination of nonhost status*. Euphytica 36, 841–853.
- NICKS R. E., 1988. *Nonhost plant species as donors for resistance to pathogens with narrow host range II Concepts and evidence on the genetics basis of nonhost resistance*. Euphytica 37, 88–99.
- OKU H., SHIRAIISHI T., OUCHI S., 1987. *Role of specific suppressors in pathogenicity of Mycosphaerella species*. [W:] Molecular determinants of plant disease. NISHIMURA S. i współaut. (red). Japan Sci. Soc. Press, Tokyo i Springer-Verlag, Berlin 145–156.
- RIDE J. P., 1985. *Non-host resistance to fungi*. [W:] Mechanisms of resistance to plant disease. FRASER R. S. S. (red). Martinus Nijhoff Dr W. Junk Publishers Dordrecht 29–61.
- STAPLES R. C., MAČKO V., 1984. *Germination of uredospores and differentiation of infection structures*. [W:] The cereal rusts, tom 1. BUSHNELL W. R., ROELFS A.P. (red). Acad. Press. Inc. Orlando, Florida 255–289.
- STAPLES R. C., HOCH H. C., EPSTEIN L., LACETTI L., HASSOUNA S., 1985. *Recognition of host morphology by rust fungi responses and mechanisms*. Can. J. Plant Pathol. 7, 314–322.
- TANAKA A., YAMAMOTO H., MAEYA M., MARUYAMA Y., TANI T., 1993. *Purification and characterization of a lipoxygenase isozyme from oat leaves inoculated with incompatible race Puccinia coronata avenae*. Ann. Phytopathol. Soc. Jpn. 59, 225.
- TIBURZY R., REISENER H. J., 1990. *Resistance of wheat to Puccinia graminis f. sp. tritici, association of the hypersensitive reaction with the cellular accumulation of lignin — like material and callose*. Physiol. Mol. Plant Pathol. 36, 109.
- WOLOSHUK C. P., KOLATTUKUDY P. E., 1986. *Mechanisms by which contact with plant cuticle triggers chitinase gene expression in the spores of Fusarium solani f. sp. pisi*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 83, 1704–1708.
- YAMAMOTO H., TANI T., 1986. *Possible involvement of lipoxygenase in the mechanism of resistance of oats to Puccinia coronata avenae*. J. Phytopathol. 116, 329.

BARBARA ŁOTOCKA, WŁADYSŁAW GOLINOWSKI

*Katedra Botaniki, Wydział Rolniczy,
Szkola Główna Gospodarstwa Wiejskiego,
Rakowiecka 26/30, 02-528 Warszawa,*

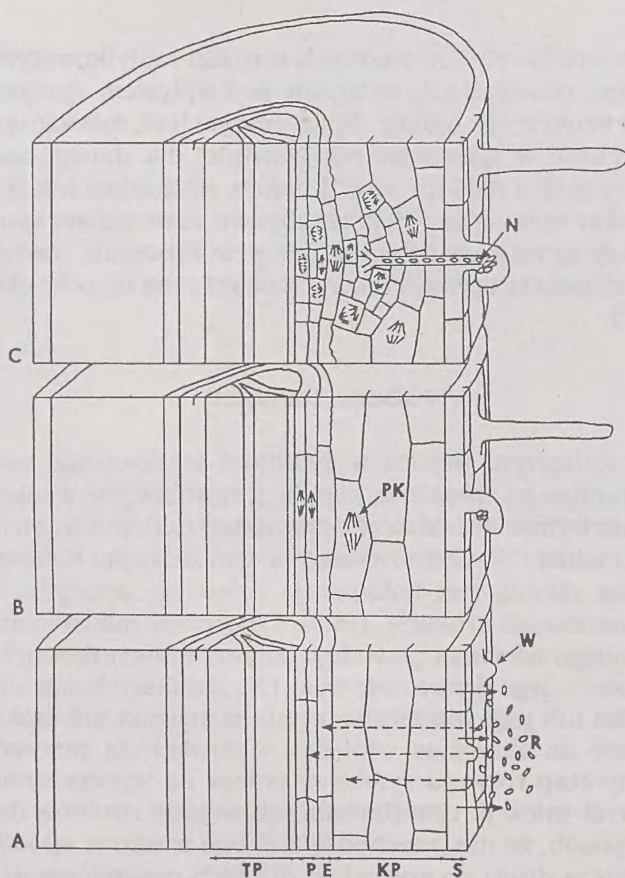
POWSTAWANIE I ROZWÓJ BRODAWEK KORZENIOWYCH ROŚLIN MOTYLKOWATYCH

Powstawanie brodawek korzeniowych u roślin motylkowatych jest przykładem organogenezy następującej wyłącznie pod wpływem specyficznego bodźca ze środowiska zewnętrznego rośliny. Bodźcem tym jest, mówiąc w dużym skrócie myślowym, obecność w ryzosferze odpowiedniej dla danego gatunku rośliny bakterii symbiotycznej z rodzaju *Azorhizobium*, *Rhizobium* lub *Bradyrhizobium*. O naturze sygnałów wymienianych przez obydwu uczestników symbiozy traktują dwa inne artykuły zamieszczone w tym zeszycie *Kosmosu*, niniejsza zaś praca, omawiająca morfogenezę brodawek korzeniowych, ma na celu ułatwienie zrozumienia ich treści.

PROCES INFEKCJI

Warunkiem wstępnym wejścia w symbiozę konkretnego osobnika rośliny gospodarza i żyjącej w jej ryzosferze populacji rizobiów jest wzajemne rozpoznanie. Polega ono na wymianie bodźców o charakterze chemicznym i jest omówione w pracy J. Kopcińskiej i W. Golinowskiego w tym zeszycie. Efektem rozpoznania gospodarza przez rizobia jest kolonizacja przez nie młodych, wyrastających włośników korzeniowych (HIRSCH 1992). Obecność mikrokolonii bakterii na powierzchni młodego włośnika powoduje zmianę ukierunkowania jego wzrostu i — co za tym idzie — jego deformację (rys. 1A). Zniekształcenie może polegać na rozděciu włośnika lub jego rozgałęzieniu, ale skuteczna infekcja może nastąpić tylko, gdy dojdzie do skręcenia włośnika i obrośnięcia przezeń mikrokolonii rizobiów. Kolejny etap rozwoju symbiozy polega na wytworzeniu przez roślinę specyficznych wrót infekcji, umożliwiających wejście rizobiów do wnętrza ciała rośliny w taki sposób, że nie „rozchodzą się” one w nim w sposób dowolny, ale docierają najkrótszą drogą do specjalnie dla nich przygotowanej niszy ekologicznej — zawiązka brodawki korzeniowej, którego wytwarzanie następuje równolegle z postępowaniem infekcji. Owe specyficzne wrota infekcji to tak zwana nić infekcyjna, którą można porównać do trans-komórkowego tunelu, mającego

swój początek w bezpośrednim sąsiedztwie obrośniętej przez włosnik kolonii rizobiów i rosnącego poprzez komórki kory pierwotnej korzenia ku zawiązkowi brodawki. Ściana nici infekcyjnej jest podobna do ściany komórkowej, a matryks ją wypełniająca — do blaszki środkowej (BREWIN i współaut. 1993), jest ona podłożem dla rizobiów, wnikających do wnętrza nici. W jaki sposób bakterie wnikają do nici nie jest rozstrzygnięte — może to nastąpić albo poprzez inwaginację ściany — swoisty wzrost ściany do wnętrza włosnika, albo wskutek rozpuszczenia fragmentu ściany blokującego wejście do dobudowanej do ściany nici, albo w wyniku kombinacji obu procesów. Kierunek wydłużania nici infekcyjnej jest, jak się wydaje, wyznaczany przez tak zwane struktury pre-infekcyjne — grube cytoplazmatyczne mosty w komórkach kory, często zawierające jądro komórkowe (van BRUSSEL i współaut. 1992). Ostatecznie nić infekcyjna wrasta do niektórych komórek zawiązka brodawki i tam wreszcie są uwalniane z niej bakterie.



Rys. 1. Powstawanie zawiązka brodawki korzeniowej: A — wymiana sygnałów między rośliną i bakterią; B — obrastanie kolonii bakterii przez wydłużający się włosnik, podziały komórek w głębi korzenia; C — penetracja zawiązka brodawki przez nić infekcyjną. Skróty: S — skórka korzenia, KP — kora pierwotna korzenia, E — endoderma, P — perycykl, TP — tkanka przewodząca walca osiowego korzenia, W — włosnik, R — komórki rizobiów, PK — podział komórki, N — nić infekcyjna.

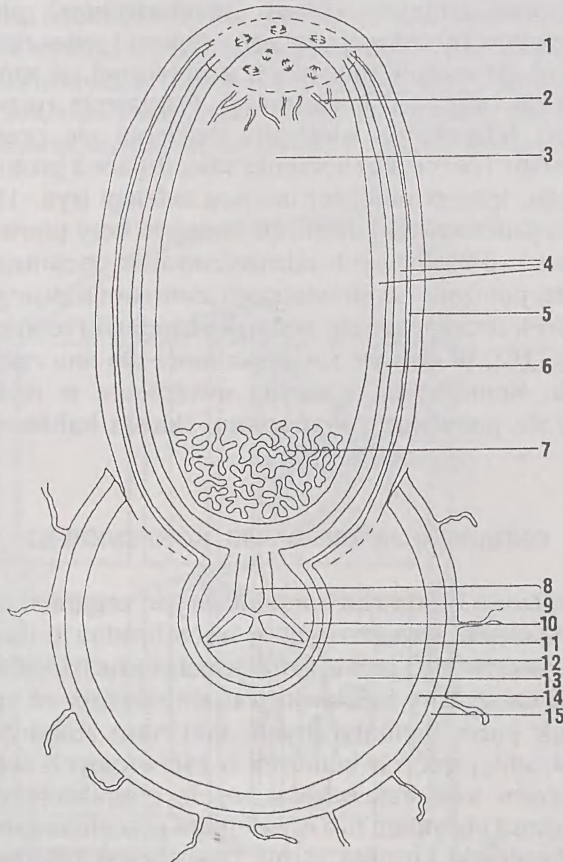
POWSTAWANIE ZAWIĄZKA BRODAWKI KORZENIOWEJ

Ciągle jeszcze brak jest danych o tym, w jaki sposób sygnał o obecności rizobiów jest przez roślinę odbierany i w jaki sposób przekazywany w jej ciele. Czasteczki chemicznego bodźca wysyłane przez bakterie nie są wykrywane wewnątrz tkanek gospodarza, muszą więc być rozpoznawane przez receptor na jego powierzchni, uruchamiający system „przełączników”, przez które sygnał dociera do komórek kompetentnych do jego odbioru i jednocześnie odpowiedzi. Odpowiedź — to uruchomienie informacji genetycznej, w której jest zapisany program wytworzenia brodawki korzeniowej. Przejawem rozpoczęcia realizacji tego programu jest odzyskanie zdolności dzielenia się przez komórki kory pierwotnej, endodermy i perycyklu korzenia sąsiadujące z protoksylemem wiązki drewna pierwotnego, leżącej najbliżej miejsca infekcji (rys. 1B) (HIRSCH 1992, NEWCOMB 1981). Najintensywniej dzielą się komórki kory pierwotnej i tylko w tej strefie spośród trzech pobudzonych odróżnicowanie obejmuje stopniowo inne komórki, coraz dalej położone od pierwotnego „centrum indukcji”. Równocześnie z podziałami komórek tworzącego się zawiązka brodawki rośnie w jego kierunku nić infekcyjna (rys. 1C). W obrębie zawiązka może się ona rozgałęzić i wnikać do kilku komórek. Komórki te, z chwilą uwolnienia w nich bakterii z nici infekcyjnej, staną się pierwszymi komórkami tkanki bakteroidalnej brodawki korzeniowej.

ORGANIZACJA BRODAWKI KORZENIOWEJ

W pełni wykształcona brodawka korzeniowa jest organem o skomplikowanej budowie (rys. 2). Komórki zewnętrznych warstw brodawki (kora brodawki) nie są zainfekowane przez rizobia i pełnią funkcje ochronne (HIRSCH 1992, NEWCOMB 1981). Zewnętrzna część kory brodawki jest zbudowana ze stosunkowo luźno ułożonych komórek parenchymatycznych. Pod nimi znajduje się pojedyncza warstwa szybko obumierających komórek o zdrewniałych ścianach, a jeszcze głębiej — kilka warstw komórek miękkiszowych, charakteryzujących się nieco mniejszymi rozmiarami i brakiem lub niewielkimi przestrzeniami komórkowymi. Warstwy korowe brodawki chronią ją nie tylko przed inwazją patogenów lub wysychaniem, ale także stanowią barierę ograniczającą dyfuzję tlenu do wnętrza brodawki, którego nadmiar powoduje nieodwracalną inaktywację nitrogenazy. W wewnętrznych warstwach kory brodawki przebiegają wiązki przewodzące. Zawierają one elementy floemu i ksylemu oraz komórki perycyklu (w tym komórki transferowe) i są otoczone jednowarstwową endoderma z pasemkami Caspary'ego. Wiązki brodawki łączą się z systemem przewodzącym korzenia, a endoderma wiązek jest ciągła z endoderma korzenia (i identyczna z nią pod względem budowy). W wierzchołkowej części brodawki, chroniony bardzo cienką w tym miejscu i nie zawierającą zdrewniałych komórek korą, znajduje się merystem brodawki. Ontogenetycznie jest on pochodną merystematycznego zawiązka brodawki, powstałą z nie zainfekowanych komórek zawiązka. Mery-

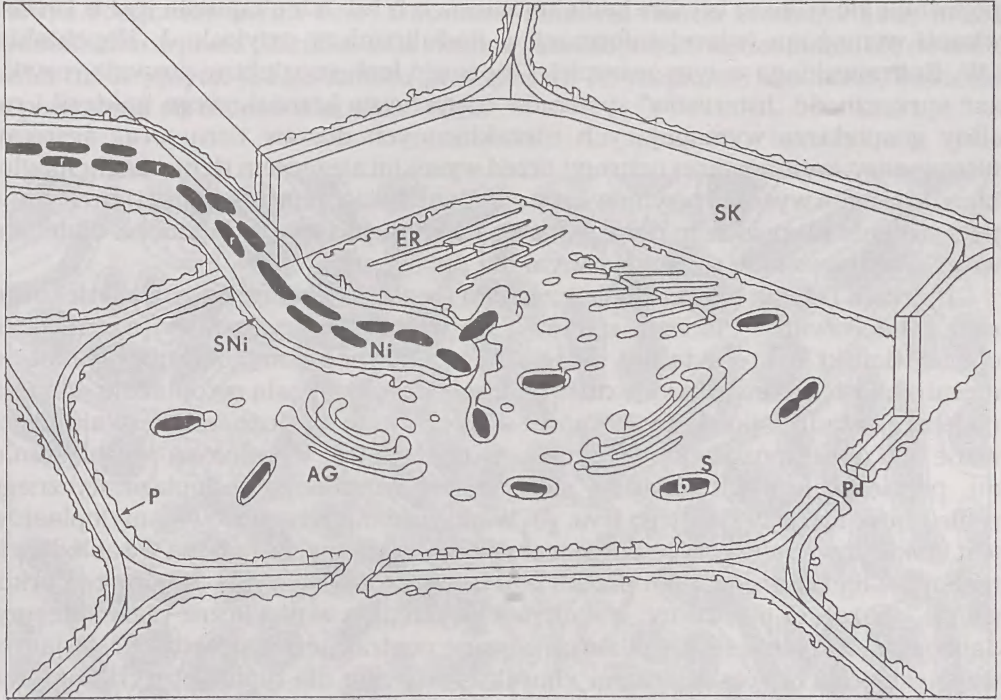
stem brodawki odpowiada za przyrost wszystkich tkanek brodawki, jego pochodne odkładane na zewnątrz różnicują się w komórki wiązek przewodzących i poszczególnych warstw kory, pochodne odkładane ku wnętrzu brodawki podlegają infekcji i różnicują się w komórki tkanki bakteroidalnej. Infekcja następuje w warstwie komórek leżących bezpośrednio pod merystemem (tzw. strefa penetracji nici infekcyjnych), polega na wrastaniu nici infekcyjnych do pochodnych merystemu i uwalnianiu do nich bakterii.



Rys. 2. Budowa brodawki korzeniowej typu niezdeterminowanego: 1 — rejon merystematyczny brodawki, 2 — rejon penetracji nici infekcyjnych, 3 — dojrzała tkanka bakteroidalna, 4 — miększ kory brodawki, 5 — zdrewniałe komórki w korze brodawki, 6 — wiązka przewodząca, 7 — strefa degradacji tkanki bakteroidalnej, 8 — drewno, 9 — kambium, 10 — tyko, 11 — perycykl, 12 — endoderma, 13 — kora pierwotna korzenia, 14 — egzoderma, 15 — skórka.

Zakończenie nici infekcyjnej, penetrującej komórkę, nie jest otoczone ścianą, zatem matriks nici, w której namnażają się rizobia jest w kontakcie z plazmolemą komórki gospodarza (rys. 3). Komórki bakterii wychodzące z nici podlegają endocytozie — plazmolema wpukla się wokół komórki rizobium i zamyka ją w pęcherzyku, który oddziela się od plazmolemy i przemieszcza się do wnętrza cytoplazmy komórki. W procesie endocytozy bakterii istotną rolę odgrywa endo-

plazmatyczne retikulum i aparaty Golgiego komórki gospodarza, wnioskując z licznych ich profili, obserwowanych zawsze w pobliżu końca nici. Można domyślać się, że dostarczają one błon i ich składników do odbudowy kurczącej się plazmoemy i powiększającej się powierzchni pęcherzyków zamykających bakterie.



Rys. 3. Uwalnianie bakterii z nici infekcyjnych. Skróty: Ni — nić infekcyjna, SNi — ściana nici infekcyjnej, r — pałeczkowate rizoiby, S — symbiosom, b — bakteroid, ER — endoplazmatyczne retikulum, AG — aparat Golgiego, P — plazmoema, Pd — plazmodesma, SK — ściana komórkowa.

Błona otaczająca bakterię (zwana błoną peribakteroidalną) podlega modyfikacji — między innymi zostają do niej włączone pewne białka konieczne do prawidłowego funkcjonowania nowo powstałego tworzywa — niby-organellum, zwanego symbiosomem. Modyfikacji podlega także sama komórka bakteryjna — przekształca się w bakteroid. Zmienia się jej wielkość (rośnie) i kształt (z pałeczkowatego w formy liter T, X, Y) oraz ulegają w niej ekspresji geny charakterystyczne dla tego etapu symbiozy. Takie przekształcenie jest ślepą uliczką ontogenezy — choć bakteroidy mogą jeszcze dzielić się, to nie stwierdzono, by były zdolne do powrotu do stanu saprofitycznie żyjącej pałeczki. Wśród genów bakteryjnych podlegających ekspresji po przekształceniu się bakterii w bakteroid są geny kodujące podjednostki nitrogeazy — kompleksu enzymatycznego redukującego azot cząsteczkowy do amoniaku. Jest on eksportowany do cytoplazmy komórki gospodarza w postaci jonu amonowego i tam włączany do związków organicznych, po czym opuszcza brodawkę wraz z prądem ksylemowym.

Nitrogenaza, jak już wspomniano, jest wrażliwa na tlen. Ważnym elementem jej ochrony przed nieodwracalną inaktywacją jest leghemoglobina — hemoproteid, którego ekspresja jest skorelowana z ekspresją genów nitrogenazy w rizobiach przekształcających się w bakteroidy. Leghemoglobina jest jedną z wielu nodulin — roślinnych białek brodawkowo-specyficznych, to jest takich, które pojawiają się tylko w brodawkach korzeniowych lub ich ekspresja jest w brodawkach wzmożona (więcej informacji o nodulinach w artykule J. Kopcińskiej i W. Golinowskiego w tym zeszycie). Obecność leghemoglobiny pozwala rozwiązać sprzeczność „interesów” systemów oddychania komórkowego bakterii i rośliny gospodarza wymagających niezakłóconych dostaw tlenu oraz systemu nitrogenazy, wymagającej ochrony przed wysokim stężeniem tlenu. Leghemoglobina, która ma wysokie powinowactwo do tlenu, wiąże jego cząsteczki i utrzymuje jego stężenie na poziomie pozwalającym na funkcjonowanie łańcucha oddechowego, a jednocześnie nie toksycznym dla nitrogenazy.

Dojrzała tkanka bakteroidalna zawiera dwa typy komórek — niezainfekowane i zainfekowane. Pierwsze układają się w rozgałęzione sznury przenikające obszar tkanki bakteroidalnej, drugie są upakowane pomiędzy nimi. Komórki niezainfekowane mają zwykle dużą wakuolę i niezbyt gęstą cytoplazmę, ich rola nie jest dokładnie poznana. Komórki zainfekowane są duże, słabo zwakuolizowane lub nawet pozbawione wakuol, cytoplazma jest wypełniona symbiosomami, pomiędzy którymi układają się cysterny szorstkiego endoplazmatycznego retikulum i aparaty Golgiego (rys. 4). Większość mitochondriów i amyloplastów jest zlokalizowana w przyściennej warstwie cytoplazmy, zwłaszcza w sąsiedztwie niezbyt w tej tkance dużych przestrzeni międzykomórkowych. Ściana komórkowa ma charakter pierwotny, jest cienka i występują w niej liczne plazmodesmy. Jądro komórkowe jest duże i zlokalizowane centralnie, a zawartość DNA jądrowego często przewyższa poziom charakterystyczny dla diploidalnych komórek danego gatunku (MITCHELL 1965). Tkanka bakteroidalna jest miksoploidalna, większość jej komórek przechodzi jeden lub więcej cykli endoreplikacyjnych (takie zjawisko często dotyczy tkanek lub komórek roślinnych o szczególnej intensywności określonych procesów metabolicznych (NAGL 1978).

W dojrzałych komórkach tkanki bakteroidalnej nadal są widoczne nici infekcyjne, które wrosły do nich, gdy komórki te znajdowały się jeszcze w strefie merystematycznej brodawki (NEWCOMB 1981). W niciach nadal są widoczne komórki rizobiów, z których większość nie wykazuje żadnych objawów sugerujących ich degradację. Utrzymywanie się wewnątrz brodawki takiej wewnątrzniciowej populacji rizobiów w saprofitycznym stadium ich rozwoju jest zjawiskiem o zasadniczym znaczeniu z punktu widzenia interesów bakteryjnego partnera symbiozy. Mikrokolonia bakterii, wchodząc w symbiotyczny układ z rośliną, rozmnaża się w ciele rośliny (w brodawce korzeniowej), unikając konkurencji pokarmowej z innymi mikroorganizmami glebowymi. Pamiętać jednak należy, że ogromna większość osobników bakterii żyjących w brodawce to bakteroidy, niezdolne do samodzielnego bytowania w glebie.

Najstarsze, najbardziej oddalone od szczytowo położonego merystemu komórki tkanki bakteroidalnej po kilku-kilkunastu dniach od zainfekowania zaczynają wykazywać objawy starzenia się (rys. 5). Objawy te mogą pojawiać się najpierw w „strefie bakterii”, obserwuje się wtedy łączenie membran peribakte-

roidalnych poszczególnych symbiosomów i lizę bakteroidów przy stosunkowo nie zmienionej cytoplazmie gospodarza; może też być odwrotnie — elementy „strefy rośliny” — protoplastu gospodarza — mogą podlegać lizie wcześniej niż symbiosomy (GOLINOWSKI i współaut. 1987). Ostateczny obraz jest w obu przypadkach podobny — komórki zapełniają „membrany-duchy” — fragmenty jeszcze nie zdegradowanych błon. Obumarłe komórki tkanki bakteroidalnej mogą być zasiedlane przez pałeczkowate rizobia, prawdopodobnie dostające się do nich z nici infekcyjnych już po zaniku protoplastu. Po rozpadzie brodawki, bakterie te powracają do środowiska glebowego.



Rys. 4. Fragment dojrzałej tkanki bakteroidalnej. Skróty: S — symbiosom, b — bakteroid, SK — ściana komórkowa, M — mitochondrium, A — amyloplast, ER — endoplazmatyczne retikulum, AG — aparat Golgiego.

Pomimo stopniowego zamierania najstarszych komórek tkanki bakteroidalnej, brodawka jako całość może funkcjonować długi, liczony w miesiącach (przypuszczalnie i w latach w przypadku wieloletnich roślin drzewiastych), czas dzięki działalności merystemu brodawki. Brodawki korzeniowe, w których długo utrzymuje się aktywność merystematyczna, określa się terminem „brodawki niezdeteminowane” (NEWCOMB 1981). Termin ten jest niezbyt szczęśliwym tłumaczeniem angielskiego „indeterminate nodules” i w istocie odnosi się do merystemu wzrostu nieograniczonego, istniejącego i funkcjonującego w tych brodawkach. Brodawki niezdeteminowane są jednym z dwu istniejących typów brodawek korzeniowych, wytwarzane przez bardzo liczne gatunki roślin motylkowatych (najpospolitsze z nich: koniczyna, lucerna, seradela, groch). Drugim, również częstym typem brodawek korzeniowych, są brodawki zdeteminowane, których aktywność merystematyczna zanika całkowicie po określonym czasie —

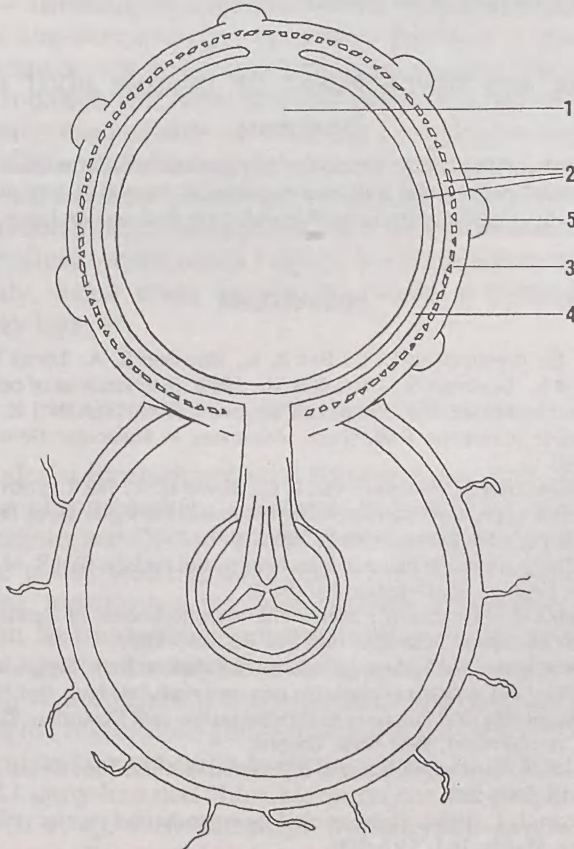
są więc one wytwarzane przez merystem wzrostu ograniczonego. Takie brodawki rozwijają się na korzeniach roślin pochodzących głównie z gorącej strefy klimatycznej, między innymi przez fasolę, soję, komonicę. Co ciekawe, brodawki powstające pod wpływem tego samego szczepu bakterii na różnych gatunkach roślin mogą należeć do odmiennych typów — na przykład *Rhizobium loti*, którego gospodarzem jest komonica, ale które może infekować także seradelę, powoduje powstawanie na komonicy brodawek zdeterminowanych, na seradeli zaś — niezdeteminowanych (HIRSCH 1992). Zjawisko to jest zrozumiałe, zważywszy, że program morfogenezy brodawki jest kodowany przez roślinę, a bakteria ma tylko ten program uruchomić. Raz uruchomiony, jest przez roślinę realizowany, jednak pod warunkiem jego opłacalności energetycznej, to jest utrzymującego się niedoboru azotu mineralnego w podłożu, odpowiedniej intensywności fotosyntezy rośliny — ale także pod warunkiem, że szczep bakterii, który zasiedlił brodawkę, jest zdolny do unikania rozpoznania przez system obronny rośliny i do wydajnego wiązania azotu. Istnieją uzasadnione przypuszczenia, że także w dalszych etapach symbiozy, już po zasiedleniu nici infekcyjnej we włókniku, zachodzi wymiana sygnałów pomiędzy symbiontami — swoiste wzajemne „sprawdzanie się” co do dalszej przydatności w rozwijającym się układzie (patrz artykuł A. Skorupskiej i J. Króla w tym zeszycie).



Rys. 5. Degradacja tkanki bakteroidalnej. Skróty: FS — fuzja symbiosomów, M — mitochondrium, A — amyloplast, ER — endoplazmatyczne retikulum, MD — „membrany-~duchy”.

W literaturze dotyczącej brodawek korzeniowych funkcjonują także inne od przytoczonego systemu ich klasyfikacji. Opierają się one na cechach morfologicznych lub kombinacji cech morfologicznych i dotyczących rozwoju brodawek, stąd też są mniej jednoznaczne i nie będą tu omawiane (CORBY 1981).

Etapy powstawania i rozwoju brodawek zdeterminowanych (rys. 6) są podobne, jak w przypadku brodawek niezdedeterminowanych. Tutaj także morfogeneza brodawki rozpoczyna się od rozpoznania symbiontów, kolonizacji młodych włośników i ich skręcania się w odpowiedzi na osiedlenie się rizobiów na ich powierzchni (HIRSCH 1992, NEWCOMB 1981). Inna jest jednak lokalizacja komórek kompetentnych do odpowiedzi na sygnał indukujący rozwój brodawki — są to komórki kory pierwotnej korzenia leżące bezpośrednio pod zainfekowanym włośnikiem. Zatem odróżnicowanie komórek kory przebiega tu w kierunku odwrotnym — dośrodkowo, w kierunku najbliższego pasma drewna pierwotnego. Związek brodawki jest penetrowany przez nić infekcyjną, wrasta ona do kilku komórek i są z niej uwalniane bakterie. Zainfekowane komórki nie tracą jednak jeszcze zdolności dzielenia się, a symbiosomy podczas mitozy są segregowane pomiędzy komórki potomne w ten sam sposób, co organelle gospodarza. Po podziale komórki liczba symbiosomów rośnie wskutek ich podziałów. W pełni wykształcona brodawka zdeterminowana nie zawiera komórek dzielących się — wszystkie komórki merystematycznego zawiązka brodawki różnicują się w ko-



Rys. 6. Budowa brodawki korzeniowej typu zdeterminowanego: 1 — tkanka bakteroidalna, 2 — miękisz kory brodawki, 3 — komórki zawierające kryształy szczawianu wapnia, 4 — wiązka przewodząca, 5 — przetchlinka; budowa korzenia — patrz rysunek 2.

mórki tkanek stałych. W centralnej części jest zlokalizowana jednorodna wiekowo tkanka bakteroidalna, zawierająca nieliczne komórki niezainfekowane (rys. 6). Komórki te uczestniczą w dalszych etapach przekształcania produktów wiązania azotu cząsteczkowego w związki eksportowane tkanką przewodzącą z brodawki. Tkanka bakteroidalna jest otoczona parenchymatyczną korą, której wewnętrzne komórki są małe i ściśle ułożone, w warstwach zewnętrznych — większe i z przestrzeniami międzykomórkowymi. Kora nie zawiera warstwy zdrewniałych komórek, występuje w niej natomiast nieregularna warstwa komórek z kryształami szczawianu wapnia (SUTHERLAND i SPRENT 1984). Na powierzchni kory są wytworzone obszary luźnej parenchymy — przetchlinki. Wiązki przewodzące są zbudowane podobnie jak w brodawkach niezdeterminowanych, jednak ich perycykl nie wykształca komórek transferowych. Oprócz różnic o charakterze morfologicznym, pomiędzy brodawkami niezdeterminowanymi i zdeterminowanymi występują istotne różnice w szlaku wiązania azotu, czego konsekwencją jest eksportowanie przez te brodawki odmiennych związków azotu do pozostałej części rośliny — w przypadku brodawek niezdeterminowanych są to amidy, zdeterminowanych — ureidy.

FORMATION AND DEVELOPMENT OF LEGUME ROOT NODULES

Summary

The paper summarizes briefly the processes of root hair infection, root nodule primordium formation, infection thread penetration and bacteria release, as well as formation of symbiosomes. The anatomical structure of indeterminate and determinate root nodule types is described.

LITERATURA

- BREWEN N. J., PEROTTO S., KANNENBERG E. L., RAE A. L., RATHBUN E. A., LUCAS M. M., KARDAILSKY I., GUNDER A., BOLANOS L., DONOVAN N., DROBAK B. K., 1993. *Mechanisms of cell and tissue invasion by Rhizobium leguminosarum: the role of cell surface interactions*. [W:] E. W. NESTER i D. P. S. VERMA, (red.), Kluwer Academic Publishers, *Advances in Molecular Genetics of Plant-Microbe Interaction* 369-380.
- BRUSSEL van A. A. N., BAKHUIZEN R., SPRONSEN van P. C., SPAINK H. P., TAK T., LUGTENBERG B. J. J., KIJNE J. W., 1992. *Induction of pre-infection thread structures in the leguminous host plant by mitogenic lipo-oligosaccharides of Rhizobium*. *Science* 257, 70-72.
- CORBY H. D. L., 1981. *The systematic value of leguminous root nodule*. [W:] R. M. POLHILL i P. H. RAVEN (red.), *Advances in Legume Systematics* 657-669.
- GOLINOWSKI W., KOPCIŃSKA J., BORUCKI W., 1987. *The morphogenesis of lupine root nodules during infection by Rhizobium lupini*. *Acta Soc. Bot. Pol.* 56, 687-703.
- HIRSCH A. M., 1992. *Developmental biology of legume nodulation*. *New Phytol.* 122, 211-237.
- MITCHELL J. P., 1965. *The DNA content of nuclei in pea root nodules*. *Ann. Bot.* 29, 371-377.
- NAGL W., 1978. *Endopolyploidy and Polyteny in Differentiation and Evolution*. Elsevier North-Holland Biomedical Press, Amsterdam, New York, Oxford.
- NEWCOMB W., 1981. *Nodule morphogenesis and differentiation*. *Int. Rev. Cytol. Suppl.* 13. *Biology of the Rhizobiaceae* 13, 247-297.
- SUTHERLAND J. M., SPRENT J. I., 1984. *Calcium-oxalate crystals and crystal cells in determinate root nodules of legumes*. *Planta* 161, 193-200.

JOANNA KOPCIŃSKA, WŁADYSŁAW GOLINOWSKI

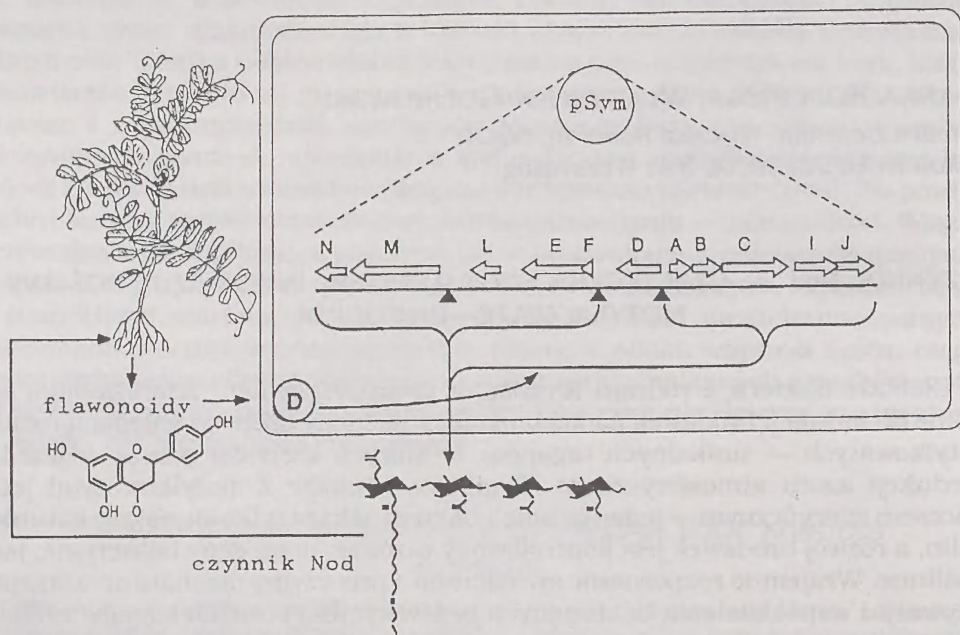
Katedra Botaniki, Wydział Rolniczy, SGGW
Rakowiecka 26/30, 02-528 Warszawa

CZYNNIK Nod — CZĄSTECZKA SYGNAŁOWA W INTERAKCJI ROŚLINY
MOTYLKOWATE—RHIZOBIUM

Glebowe bakterie z rodzaju *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* i *Azorhizobium* są zdolne do indukcji brodawek na korzeniach, a niekiedy także na łodygach roślin motylkowatych — unikalnych organów, w których zachodzi proces wiązania i redukcji azotu atmosferycznego. Symbioza rizobiów z motylkowatymi jest procesem specyficznym — jeden gatunek bakterii zakaża tylko określone gatunki roślin, a rozwój brodawek jest kontrolowany zarówno przez geny bakteryjne, jak i roślinne. Wzajemne rozpoznanie symbiontów i precyzyjny mechanizm kontroli aktywacji i współdziałania bakteryjnych genów symbiotycznych i genów roślinnych to podstawowe warunki powstania funkcjonalnego układu symbiotycznego. Badania dotyczące molekularnych podstaw procesów infekcji i brodawkowania wykazały, że rośliny motylkowate i żyjące w ich ryzosferze rizobia wymieniają chemiczne sygnały, które mają istotne znaczenie w rozpoznaniu partnerów i inicjacji symbiozy (rys. 1).

BAKTERYJNE GENY SYMBIOTYCZNE

U bakterii z rodzaju *Bradyrhizobium* i *Azorhizobium* geny związane z symbiozą są położone na chromosomie, u *Rhizobium* znajdują się na pozachromosomalnej, kolistej cząsteczce DNA — plazmidzie symbiotycznym (pSym). Geny te dzieli się na dwie podstawowe grupy: geny *nod* i *nol* — geny brodawkowania (nodulation genes), indukujące inicjację i rozwój brodawki oraz geny *fix* i *nif* (fixation i nitrogen fixation genes) odpowiedzialne za wiązanie azotu atmosferycznego. W grupie genów brodawkowania wyróżnia się geny *com nod* (common nodulation genes), występujące u wszystkich zbadanych dotąd rizobiów i geny *hsn nod* (host-specific nodulation genes) różne dla gatunku lub szczepu bakterii. Geny brodawkowania są oznaczone kolejnymi literami alfabetu, i tak geny *com nod* to geny *ABC IJ*, geny *hsn nod* charakterystyczne na, przykład, dla *Rhizobium meliloti* to geny *G, P, Q, i H*. Indukcja transkrypcji genów brodawkowania zachodzi pod wpływem flawonoidów i przy udziale bakteryjnego białka NodD.

Rhizobium leguminosarum

Rys. 1. Interakcja bakteryjnych i roślinnych cząsteczek sygnałowych (wg SPAINK i współaut. 1993, zmienione).

FLAWONOIDY

Są wtórnymi metabolitami wydzielanymi do podłoża przez korzenie roślin motylkowatych. Ilość i rodzaj flawonoidów w wydzielinie korzeniowej zależy od gatunku rośliny i jej stadium rozwoju. Flawonoidy wykazują różnorodną aktywność biologiczną, między innymi związki z grupy flawonów, flawononów i izoflawonów są naturalnymi induktorami transkrypcji genów brodawkowania (ROLFE 1988). Różne gatunki motylkowatych wydzielają zwykle nie jeden, a mieszaninę flawonoidów zawierającą zarówno silne, jak i słabe aktywatory genów *nod*, inhibitory procesu a także flawonoidy obojętne dla brodawkowania. Wzajemny wpływ tych klas flawonoidów determinuje siłę i jakość ostatecznego efektu ich działania jako aktywatorów transkrypcji genów brodawkowania (HARTWIG i współaut. 1989, MAXWELL i współaut. 1989).

BIAŁKO NodD

Jest bakteryjnym białkiem regulatorowym, produktem genu *nodD*. Gen ten, w przeciwieństwie do pozostałych genów *nod*, podlega ekspresji konstytutywnej,

regulowanej przez jego własny produkt (SPAINK i współaut. 1989). Białka NodD różnych gatunków i szczepów rizobiów, mimo dość dużego podobieństwa (75% homologii), różnią się między sobą „wrażliwością” na flawonoidy (SPAINK i współaut. 1987). Oznacza to, że każdy gatunek rizobium syntetyzuje właściwe sobie białko D, które współdziała w aktywacji transkrypcji genów brodawkowania tylko z określonymi flawonoidami. Interakcja między chemicznym sygnałem (flawonoidami) wysyłanym przez roślinę a bakteryjnym białkiem NodD jest więc pierwszym istotnym etapem determinującym swoistość symbiozy.

Mechanizm aktywacji genów brodawkowania jest podobny u wszystkich rizobiów. Interakcja flawonoid — białko NodD, zachodzi w wewnętrznej membranie komórki bakteryjnej. Cytoplazmatyczna część białka NodD wiąże się z krótkimi (47 par zasad), konserwatywnymi sekwencjami (nod box) w regionach promotorowych operonów genów *nod*, natomiast część wbudowana w membranę współdziała z flawonoidem, który prawdopodobnie powoduje zmianę konformacji cząsteczki białka NodD, a to z kolei indukuje transkrypcję genów brodawkowania (HIRSCH 1992).

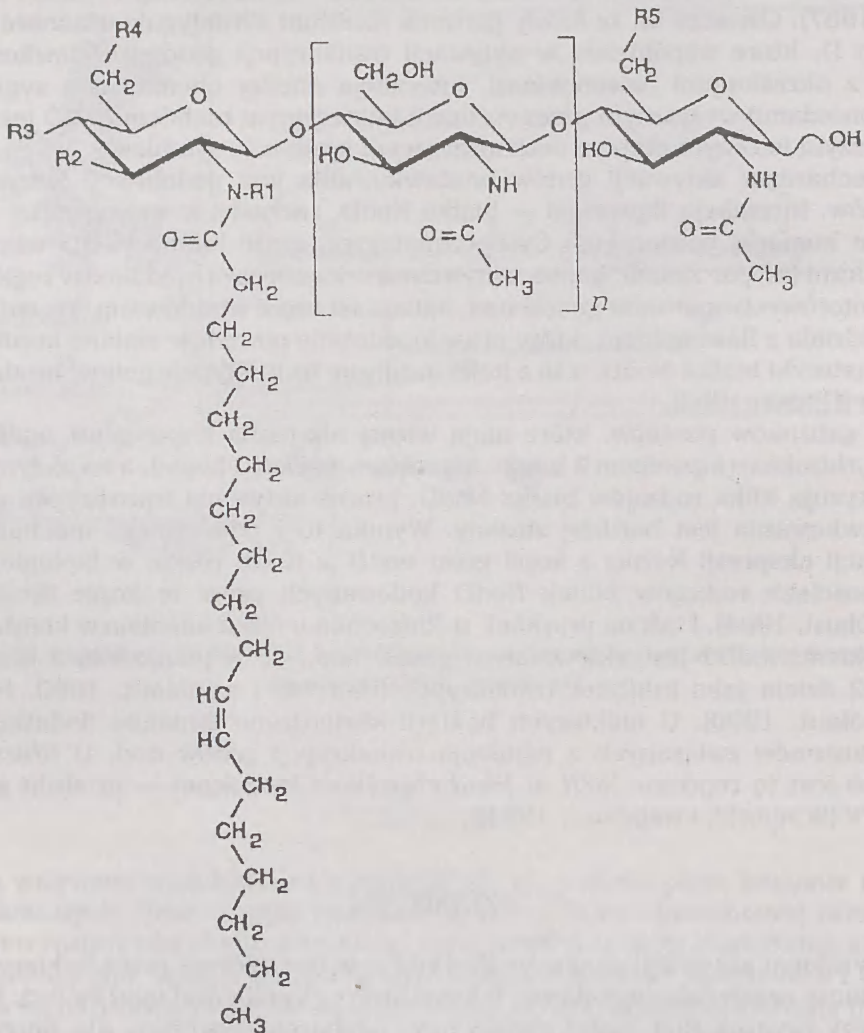
U gatunków rizobiów, które mają więcej niż jedną kopię genu *nodD* (np. *Bradyrhizobium japonicum* 2 kopie, *Rhizobium meliloti* 3 kopie), a co za tym idzie syntetyzują kilka rodzajów białka NodD, proces aktywacji transkrypcji genów brodawkowania jest bardziej złożony. Wynika to z odmiennego mechanizmu regulacji ekspresji każdej z kopii genu *nodD*, a także różnic w biologicznych własnościach rodzajów białek NodD kodowanych przez te kopie (SCHULTZE i współaut. 1994). I tak na przykład, u *Rhizobium meliloti luteolina* w kombinacji z białkiem NodD1 jest aktywatorem genów *nod*, ale w połączeniu z białkiem NodD2 działa jako inhibitor transkrypcji (HARTWIG i współaut. 1990, HONMA i współaut. 1990). U niektórych bakterii stwierdzono istnienie dodatkowych mechanizmów związanych z regulacją transkrypcji genów *nod*. U *Rhizobium meliloti* jest to represor *NolR*, u *Bradyrhizobium japonicum* — produkt genów *nodWV* (SCHULTZE i współaut. 1994).

CZYNNIK Nod

Wynikiem aktywacji genów brodawkowania jest synteza przez bakteryjnego symbionta cząsteczki sygnałowej, tak zwanego czynnika Nod (nod factor). Po raz pierwszy czynnik Nod został oczyszczony i scharakteryzowany dla *Rhizobium meliloti* (LEROUGE i współaut. 1990). Obecnie jest znana już struktura i aktywność biologiczna czynników Nod kilku innych gatunków bakterii (*Rhizobium leguminosarum*, *Rhizobium* sp. NGR234, *Rhizobium tropicii*, *Bradyrhizobium japonicum*, *Azorhizobium caulinodans*).

Czynnik Nod jest lipo-oligosacharydem o szkielecie cząsteczki wspólnym dla wszystkich przebadanych dotąd rizobiów (rys. 2). Szkielet ten jest zbudowany z podjednostek *N*-acetyl-glukozaminowych, których liczba waha się od 3 do 5 w zależności od gatunku bakterii. Do nieredukcyjnego końca cząsteczki jest przyłączony łańcuch szesnasto- lub osiemnastowęglowego kwasu tłuszczowego ze zmienną liczbą podwójnych wiązań (2, 3, 4). W pozycjach R₁–R₅ występują

różne podstawniki charakterystyczne dla gatunku i szczepu bakterii (PRICE i współaut. 1992, SPAINK 1992, SPAINK i współaut. 1993).



Rys. 2. Podstawowa struktura bakteryjnej cząsteczki sygnałowej.

Czynnik Nod jest syntetyzowany przy udziale białek kodowanych zarówno przez geny *com nod*, jak i *hsn nod*. Geny *com nodABC* są związane z syntezą podstawowego szkieletu cząsteczki czynnika Nod; mutanty *nodABC* nie syntetyzują cząsteczki sygnałowej i tracą zdolność do zakażenia gospodarza roślinnego. Białka kodowane przez geny *hsn nod* odpowiadają za przyłączenie do podstawowego szkieletu cząsteczki sygnałowej podstawników typowych dla określonego gatunku bakterii (HIRSCH 1992, SCHULTZE i współaut. 1994).

Mutacje w genach gatunkowo specyficznych (*hsn nod*) powodują zmianę struktury i aktywności biologicznej czynnika Nod, a to prowadzi do obniżenia

zdolności bakterii do infekcji lub zmiany gospodarza roślinnego, na przykład mutacje w genie *nodH* *Rhizobium meliloti* powodują, że nie infekuje on lucerny — rośliny gospodarza, natomiast indukuje powstawanie brodawek na wyce — roślinie spoza grupy infekcyjnej (FAUCHER i współaut. 1988).

Tak więc bakteryjne molekuly sygnałowe są kolejnym czynnikiem (obok interakcji flawonoid—białko NodD) decydującym o gatunkowej specyficzności układu symbiotycznego motylkowate—*Rhizobium*.

BIOLOGICZNA AKTYWNOŚĆ CZYNNIKA Nod

Pierwszą reakcją rośliny na inokulację homologicznym szczepem *Rhizobium* jest skręcanie włośników, a lokalne zmiany struktury ściany włośnika umożliwiają infekcję bakteryjną. We włośnikach inokulowanych roślin wspanięgi i grochu stwierdzono ekspresję roślinnych genów kodujących specyficzne symbiotyczne białka włośnikowe, tak zwane haduliny (GLOUDEMANS i współaut. 1989, KRAUSE i BROUGHTON 1992).

Równocześnie z infekcją włośników, komórki kory pierwotnej korzenia dzielą się tworząc primordium brodawki. W większości przypadków (85%) powstaje ono naprzeciwko bieguna ksylemowego. W rozwijającej się brodawce podlegają aktywacji geny kodujące specyficzne dla stanu symbiozy białka, tak zwane noduliny (LEGOCKI i VERMA 1980). Ze względu na czas ekspresji wyróżnia się dwa typy genów nodulinowych: wczesne i późne. Noduliny wczesne (*Enod*) pojawiają się przed rozpoczęciem wiązania azotu atmosferycznego i biorą udział w najwcześniejszych etapach interakcji roślina — bakteria (skręcanie włośników, tworzenie nici infekcyjnych) a także są zaangażowane w procesy morfogenetyczne (podział komórek kory korzenia, tworzenie primordium brodawki). Geny nodulin późnych podlegają ekspresji tuż przed lub jednocześnie z procesem wiązania N₂.

Zastosowanie metod immunocytochemicznych daje możliwość dość precyzyjnego określenia czasowej i tkankowej lokalizacji ekspresji genów nodulinowych i pozwala wnioskować o roli nodulin w morfogenezie brodawki, na przykład nodulina *Enod2* występuje w wewnętrznej warstwie komórek kory brodawki soi, grochu, łubinu, lucerny, a przypisywana jej rola polega na tworzeniu bariery tlenowej, zapewniającej odpowiednie warunki dla funkcjonowania wrażliwej na tlen nitrogenazy (DICKSTEIN i współaut. 1988, van de WIEL i współaut. 1990). Zlokalizowana w strefie infekcji w brodawkach grochu i lucerny *Enod12* bierze udział w „przygotowaniu” komórek do infekcji (HIRSCH i współaut. 1993, SCHERES i współaut. 1990). Z procesem wzrostu nici infekcyjnych i proliferacją bakterii wiąże się działanie noduliny *Enod5*, wykrywane tylko w komórkach zainfekowanych *Enod3* i *Enod14* są odpowiedzialne prawdopodobnie za transport jonów metali przez błonę bakteroidalną (SCHERES i współaut. 1990).

Podany egzogennie czynnik Nod powoduje ze strony rośliny reakcje, które w wielu przypadkach są identyczne z reakcjami po inokulacji homologicznym szczepem bakterii. Deformacje włośników, w tym tworzenie typowych dla infekcji *rizobium* lasek pasterskich, obserwowano na korzeniach lucerny, wspanięgi i *Macroptilium atropurpureum* (RELIC i współaut. 1993, 1994, SPAINK i współaut. 1991). W komórkach miękiszowych kory korzenia wyki stwierdzono zmiany ultrastru-

kturalne — powstawanie tak zwanych nici preinfekcyjnych, struktur identycznych do tych, jakie obserwowano po inokulacji *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* (van BRUSSEL i współaut. 1992). Stymulacja podziałów komórkowych i tworzenie centrów merystematycznych w sektorach ksylemowych pod wpływem czynników Nod wskazuje na ich udział w aktywacji cyklu komórkowego. Potwierdzają to doniesienia o indukowanej przez czynniki Nod ekspresji genów markerowych cyklu komórkowego w zawieszynie komórkowej lucerny (SAVOURE i współaut. 1994).

Na korzeniach lucerny, wspięgi i *Macroptilium atropurpureum* primordia brodawek powstałe pod wpływem czynników Nod rozwijały się w puste brodawki (pozbawione tkanki bakteroidalnej) o strukturze anatomicznej takiej, jak w brodawkach tworzących się po zakażeniu *Rhizobium* (SPAINK i współaut. 1991, 1993, TRUCHET i współaut. 1991). Stwierdzono również indukujący wpływ czynników Nod na ekspresję niektórych genów nodulinowych (BAUER i współaut. 1994, HORVATH i współaut. 1993). Bakteryjna cząsteczka Nod działa zatem jak sygnał spustowy, który w roślinnym gospodarzu wyzwala kaskadę zdarzeń prowadzących ostatecznie do rozwoju brodawki.

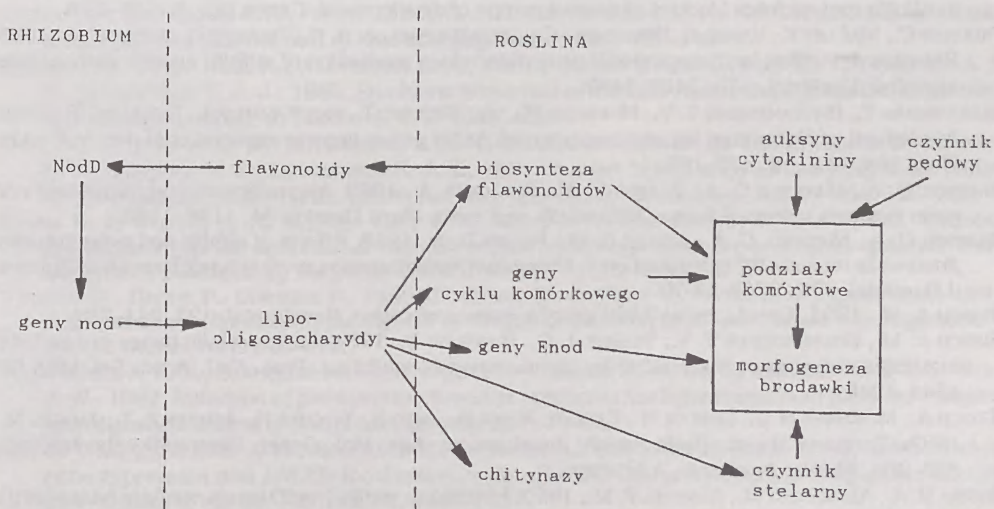
JAK ODBYWA SIĘ PERCEPCJA I PRZEKAZYWANIE SYGNAŁU BAKTERYJNEGO?

Wielkość i kompleksowość budowy cząsteczki czynnika Nod wskazuje, że nie jest możliwa jego dyfuzja do wnętrza komórki. Prawdopodobnie w błonach włośników są zlokalizowane receptory, które łącząc się z cząsteczką czynnika Nod uruchamiają drugi sygnał dla morfogenezy brodawki (HIRSCH 1992). Tworzenie „pustych” brodawek bez udziału bakterii, a jedynie pod wpływem egzogennych cytokinin i inhibitorów polarnego transportu auksyn (HIRSCH 1992, RELIC i współaut. 1993) i indukcja w tych brodawkach ekspresji niektórych genów wczesnych nodulin sugerują, że sygnał ten może być natury hormonalnej (HIRSCH i współaut. 1989, van de WIEL i współaut. 1990). Jedynie określone komórki korzenia są kompetentne do jego odbioru i odpowiedzi. Dlaczego tak się dzieje? Według hipotezy zaproponowanej przez Libbengę (LIBBENGA i współaut. 1973) z naczyń protoksylemu do kory korzenia dyfunduje regulator roślinny, tak zwany czynnik stelarny (stela factor). Zmiany jego stężenia w komórkach kory decydują o tym, czy komórki odpowiedzą na sygnał bakteryjny wznowieniem podziałów i utworzą centrum merystematyczne brodawki, czy też nie. Czynnik stelarny został oczyszczony i zidentyfikowany i dzisiaj wiemy już, że jest to urydyna. Jedynie w obecności urydyny komórki kory są zdolne do zareagowania podziałami na zakłócenie roślinnej wewnętrznej równowagi hormonalnej spowodowane przez bakteryjny sygnał — czynnik Nod.

Graficzny model przedstawiony na rysunku 3 powstał w oparciu o zgromadzone do tej pory informacje dotyczące współdziałania rośliny i *Rhizobium* w tworzeniu aktywnego układu symbiotycznego.

Interakcja flawonoidy — białka regulatorowe powoduje, poprzez transkrypcję genów *nod*, syntezę bakteryjnych czynników Nod decydujących o rozpoznaniu właściwego gospodarza roślinnego.

Włączenie programu morfogenezy brodawki odbywa się za pomocą sygnału bakteryjnego (czynnika Nod) i przy udziale hormonów roślinnych i urydyny (czynnika stelarnego). W procesy morfogenetyczne są zaangażowane geny cyklu komórkowego, geny nodulinowe i geny szlaku biosyntezy flawonoidów, których rola w symbiozie nie ogranicza się prawdopodobnie jedynie do indukcji bakteryjnych genów *nod* (HIRSCH 1992).



Rys. 3. Schemat współdziałania czynników kontrolujących wczesne etapy symbiozy *Rhizobium* — rośliny motylkowate (wg SCHULTZE i współaut. 1994, zmienione).

Brodawkowanie roślin jest kontrolowane przez złożony mechanizm autoregulacji obejmujący: inaktywację czynnika stelarnego przez cząsteczki sygnałowe Nod, degradację tych cząsteczek przez roślinne chitynazy, działanie kolejnego regulatora roślinnego, tak zwanego czynnika pedowego (SCHULTZE i współaut. 1994).

Nod FACTOR — A MOLECULAR SIGNAL IN THE LEGUMINOUS PLANT — *RHIZOBIUM* INTERACTION

Summary

The soil bacteria — rhizobia — are able to induce formation of a plant organ, the root nodule, in which the bacteria after being transformed into bacteroids are able to reduce molecular nitrogen to ammonia. This symbiosis is highly specific — host plants can only be nodulated by their homologous rhizobia.

Chemical signals produced by both the plant and bacteria play a major role in the specificity of this interaction. Plants secrete phenolic compounds which, by means of NodD protein, induce the expression of bacterial nodulation genes. As a consequence, the rhizobia produce signal molecules — Nod-factors, which trigger the processes involved in the root nodule morphogenesis.

LITERATURA

- BAUER P., CRESPI M., SZECZI J., ALLISON L. A., SCHULTZE M., RATET P., KONDOROSI E., KONDOROSI A., 1994. *Alfalfa Enod12 genes are differentially regulated during nodule development by Nod factors and Rhizobium invasion*. Plant Physiol. 105, 585-592.
- DICKSTEIN R., BISSELING T., REINHOLD V. N., AUSUBEL F. M., 1988. *Expression of nodule-specific genes in alfalfa root nodules blocked at an early stage of development*. Genes Dev. 2, 677-687.
- FAUCHER C., MAILLET F., VASSE J., ROSENBERG CH., VAN BRUSSEL A. A. N., TRUCHET G., DENARIE J., 1988. *Rhizobium meliloti host range nodH gene determines production of alfalfa specific extracellular signal*. J. Bacteriol. 170, 5489-5499.
- GLOUDEMANS T., BHUVANESWARI T. V., MOERMAN M., VAN BRUSSEL T., VAN KAMMEN A., BISSELING T., 1989. *Involvement of Rhizobium leguminosarum nodulation genes in gene expression in pea root hairs*. Plant Mol. Biol. 12, 157-162.
- HARTWIG U. A., MAXWELL C. A., JOSEPH C. M., PHILIPS D. A., 1989. *Interactions among flavonoid nod gene inducers released from alfalfa seeds and roots*. Plant Physiol. 91, 1138-1142.
- HARTWIG U. A., MAXWELL C. A., JOSEPH C. M., PHILIPS D. A., 1990. *Effects of alfalfa nod gene-inducing flavonoids on nodABC transcription in Rhizobium meliloti strains containing different nodD genes*. J. Bacteriol. 172, 2769-2773.
- HIRSCH A. M., 1992. *Developmental biology of legume nodulation*. New Phytol. 122, 211-237.
- HIRSCH A. M., BHUVANESWARI T. V., TORREY J. G., BISSELING T., 1989. *Early nodulin genes are induced in alfalfa root outgrowths elicited by auxin transport inhibitors*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 1244-1248.
- HIRSCH A., MCKHANN H. J., LOBLER M., FANG Y., NINER B., ASAD S., WYCOFF K., ASMANN P. T., JACOBS M., 1993. *Early events in alfalfa nodule development*. Adv. Mol. Genet. Plant-Microbe Interact. 353-364, Kluwer Academic Publishers.
- HONMA N. A., ASOMANING M., AUSUBEL F. M., 1990. *Rhizobium meliloti nodD genes mediate host-specific activation of nodABC*. J. Bacteriol. 172, 901-911.
- HORVATH B., HEIDSTRA R., LADOS M., MOERMAN M., SPAINK H. P., PROMÉ J. C., VAN KAMMEN A., BISSELING T., 1993. *Lipo-oligosaccharides of Rhizobium induce infection-related early nodulin gene expression in pea root hairs*. Plant J. 4, 727-733.
- KRAUSE A., BROUGHTON W. J., 1992. *Proteins associated with root hair deformation and nodule initiation in Vigna unguiculata*. Mol. Plant-Microbe Interact. 5, 96-103.
- LEGOCKI A. B., VERMA D. P. S., 1980. *Identification of „nodule specific” host proteins (nodulins) involved in the development of Rhizobium-legume symbiosis*. Cell 20, 153-163.
- LEROUGE P., ROCHE P., FAUCHER C., MAILLET F., TRUCHET G., PROMÉ J. C., DENARIE J., 1990. *Symbiotic host-specificity of Rhizobium meliloti is determined by sulphated and acylated glucosamine oligosaccharide signal*. Nature 344, 781-784.
- LIBBENGA K. R., VAN IREN F., BOGERS R. J., SCHRAAG-LAMES M. F., 1973. *The role of hormones and gradients in the initiation of cortex proliferation and nodule formation in Pisum sativum L.* Planta 114, 29-39.
- MAXWELL C. A., HARTWIG U. A., JOSEPH C. M., PHILIPS D. A., 1989. *A chalcone and two related flavonoids released from alfalfa roots induce nod genes of Rhizobium meliloti*. Plant. Physiol. 91, 842-847.
- PRICE N. P. J., RELIC B., TALMONT F., LEWIN A., PROMÉ D., PUEPPKE S. G., MAILLET F., DENARIE J., PROMÉ J. C., BROUGHTON W. J., 1992. *Broad-host range Rhizobium species strain NGR234 secreted a family of carbamoylated, and fucosylated, nodulation signals that are O-acetylated or sulphated*. Molec. Microbiol. 6, 3575-3586.
- RELIC B., TALMONT F., KOPCIŃSKA J., GOLINOWSKI W., PROMÉ J. C., BROUGHTON W. J., 1993. *Biological activity of Rhizobium sp. NGR234 nod-factors on Macroptilium atropurpureum*. Mol. Plant-Microbe Interact. 6, 764-773.
- RELIC B., PERRET X., ESTRADA-GARCIA M. T., KOPCIŃSKA J., GOLINOWSKI W., KRISHNAN H. B., PUEPPKE S. G., BROUGHTON W. J., 1994. *Nod-factors of Rhizobium are a key to the legume door*. Mol. Microbiol. 13, 171-178.
- ROLFE B. G., 1988. *Flavones and isoflavones as inducing substances of legume nodulation*. BioFactors 1, 3-10.
- SAVOURE A., MAGYAR R., PIERRE M., BROWN S., SCHULTZE M., DUDITS D., KONDOROSI A., KONDOROSI E., 1994. *Activation of cell cycle machinery and the isoflavonoid biosynthesis pathway by active*

- Rhizobium meliloti* Nod signal molecules in *Medicago microcallus* suspensions. EMBO J. 13, 1093–1102.
- SCHERES B., van ENGELEN F., van deer KNAAP E., van de WIEL C., van KAMMEN A., BISSELING T., 1990. Sequential induction of nodulin gene expression in the developing pea nodule. Plant Cell 2, 687–700.
- SCHULTZE M., KONDOROSI E., RATET P., BUIRE M., KONDOROSI A., 1994. Cell and molecular biology of *Rhizobium* — Plant interactions. Internat. Rev. Cytology. 156, 1–75.
- SPAINK H. P. 1992. Rhizobial lipo-oligosaccharides, answer and questions. Plant Molec. Biol. 20, 977–986.
- SPAINK H. P., WIJFFELMAN C. A., PEES E., OKKER R. J. H., LUGTENBERG B. J. J., 1987. *Rhizobium* nodulation gene *nodD* is a determinant of host specificity. Nature 328, 337–340.
- SPAINK H. P., OKKER R. J. H., WIJFFELMAN C. A., TAK T., GOOSEN-deROO L., PEES E., van BRUSSEL A. A. N., LUGTENBERG B. J. J., 1989. Symbiotic properties of rhizobia containing a flavonoid-dependent hybrid *nodD* product. J. Bacteriol. 171, 4045–4053.
- SPAINK H. P., SHEELEY D. M., van BRUSSEL A. A. N., GLUSHKA J., YORK W. S., TAK T., GEIGER O., KENNEDY E. P., REINHOLD V. N., LUGTENBERG B. J. J., 1991. A novel highly unsaturated fatty acids moiety of lipo-oligosaccharide signal determines host specificity of *Rhizobium*. Nature 354, 125–130.
- SPAINK H. P., WIJFJES A. H. M., van VLIET T. B., KIJNE J. W., LUGTENBERG B. J. J., 1993. Rhizobial lipo-oligosaccharide signals and their role in plant morphogenesis; are analogous lipophilic chitin derivatives produced by the plant? Aust. J. Plant Physiol. 2, 381–392.
- TRUCHET G., ROCHE P., LEROUGE P., VASSE J., CAMUT S., de BILLY F., PROMÉ J. C., DENARIE J., 1991. Sulphated lipo-oligosaccharide signals of *Rhizobium meliloti* elicit root nodule organogenesis in alfalfa. Nature 351, 670–673.
- van BRUSSEL A. A. N., BAKHUIZEN R., van SPRANSEN P. C., SPAINK H. P., TAK T., LUGTENBERG B. J. J., KIJNE J. W., 1992. Induction of pre-infection thread structures in the leguminous host plant by mitogenic lipo-oligosaccharides of *Rhizobium*. Science 257, 70–72.
- van de WIEL C., NORRIS J. H., BOCHENEK B., DICKSTEIN R., BISSELING T., HIRSCH A. M., 1990. Nodulin gene expression and *ENOD2* localization in the effective, nitrogen-fixing and ineffective, bacteria free nodules of alfalfa. Plant Cell 2, 1009–1017.
- van de WIEL C., SCHERES B., FRANSSSEN H., van LIEROP M. J., van LAMMEREN A., van KAMMEN A., BISSELING T., 1990. The early nodulin transcript *ENOD2* is located in the nodule parenchyma (inner cortex) of pea and soybean root nodules. EMBO Journal 9, 1–7.

ANNA SKORUPSKA, JAROSŁAW KRÓL

Zakład Mikrobiologii Ogólnej, Instytut Mikrobiologii,
Uniwersytet M. Curie-Skłodowskiej,
Akademicka 19, 20-033 Lublin

ZEWNAȚRZKOMÓRKOWE POLISACHARYDY *RHIZOBIUM*: ICH ROLA W SYMBIOZIE Z ROŚLINAMI MOTYLKOWATYMI

WPROWADZENIE

Bakterie glebowe z rodzajów *Rhizobium*, *Bradyrhizobium* i *Azorhizobium* są zdolne do indukowania brodawek wiążących azot atmosferyczny na korzeniach lub łodygach roślin z rodziny motylkowatych (*Fabaceae*). Symbioza jest procesem swoistym, jeden gatunek bakterii zakaża tylko określone gatunki roślin i tak: *Rhizobium meliloti* zakaża rośliny z rodzajów *Medicago*, *Melilotus* i *Trigonella*, *R. leguminosarum* biovar *viciae* — *Pisum*, *Lens*, *Vicia* i *Lathyrus*, a *R. leguminosarum* bv. *trifolii* zakaża *Trifolium*. Rozwój brodawki jest procesem wieloetapowym, kontrolowanym zarówno przez geny bakteryjne, jak i roślinne. Od najwcześniejszych etapów symbiozy następuje wymiana sygnałów między partnerami, prowadząca do aktywacji kolejnych genów. Pierwszym sygnałem są flawonoidy wydzielane przez korzenie roślin motylkowatych, które indukują ekspresję bakteryjnych genów brodawkowania (geny *nod* i *nol* — nodulation genes) poprzez aktywację regulatorowego białka NodD. Efektem działania genów brodawkowania jest synteza czynników Nod, czyli oligosacharydów lipo-chitynowych z modyfikacjami strukturalnymi warunkującymi swoistość zakażenia. Czynniki Nod wywołują różnorodne reakcje roślinne, takie jak: skręcenie włókników korzeniowych, inicjację merystemów brodawek i uaktywnienie szeregu genów roślinnych, co w efekcie prowadzi do wytworzenia brodawki. Kolejnym etapem niezbędnym dla zaistnienia efektywnej symbiozy jest aktywacja bakteryjnych genów odpowiedzialnych za wiązanie azotu atmosferycznego (geny *nif* i *fix* — nitrogen fixation and fixation genes) (FISHER i LONG 1992).

Kluczową rolę w ustaleniu symbiozy odgrywają między innymi powierzchniowe polisacharydy *Rhizobium*. Tworzą one swoistą, wyskokcząsteczkową interfazę między komórką bakteryjną i środowiskiem oraz wchodzą w złożone oddziaływania prowadzące do nawiązania efektywnej symbiozy *Rhizobium*—roślina motylkowata. Do polisacharydów powierzchniowych odgrywających istotną rolę w symbiozie należą kwaśne egzopolisacharydy (EPS), lipopolisacharydy (LPS) oraz β -1,2-glukany (GRAY i ROLFE 1990, REUBER i współaut. 1991, CARLSON i współaut. 1992, GRAY i współaut. 1992, LEIGH i COPLIN 1992, NOEL 1992, LEIGH

i WALKER 1994). Zależność między strukturą polisacharydów *Rhizobium* i efektywnością symbiozy jest złożona, zarówno ze względu na plejotropowy charakter mutacji w genach kontrolujących syntezę polisacharydów, jak i różnorodność oddziaływań między bakteriami i roślinami.

OBOJĘTNE β -1,2 GLUKANY

Szczepki *Rhizobium* tworzą cykliczne homopolimery złożone z około 20 reszt D-glukozy połączonej wiązaniami β -(1 \rightarrow 2). Te polisacharydy występują w przestrzeni peryplazmatycznej lub są wydzielane na zewnątrz komórki bakteryjnej. Mutacje w genach *R. meliloti* oznaczonych jako *ndvA* i *ndvB* (nodule development genes) powodują rozwój nieefektywnych brodawek na lucernie. Homologiczne geny wykryte w *Agrobacterium tumefaciens* również wpływają na wirulencję szczepów. Cykliczne β -1,2-glukany prawdopodobnie umożliwiają adaptację bakterii do ciśnienia osmotycznego w komórkach roślinnych, co może mieć znaczenie w brodawkowaniu (GRAY i współaut. 1992).

LIPOPOLISACHARYDY (LPS)

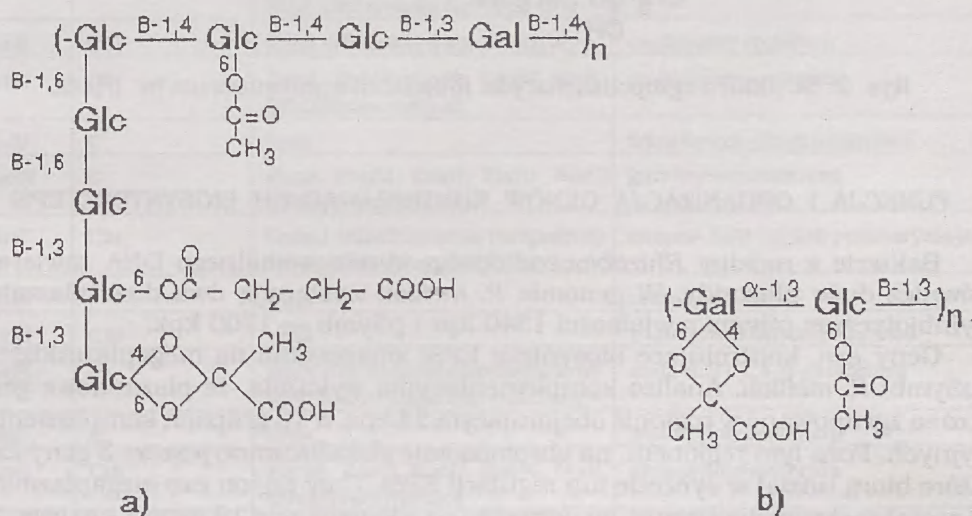
Lipopolisacharydy (LPS), w przeciwieństwie do egzopolisacharydów (EPS) i obojętnych glukanów, są integralną częścią zewnętrznej membrany bakterii. Czasteczkę LPS można podzielić na trzy funkcjonalne regiony: lipid A, oligosacharydowy rdzeń i antygen O-swoisty. Fragment rdzeniowy LPS jest połączony wiązaniem ketozydowym z hydrofobowym lipidem A, który zakotwicza czasteczkę LPS w membranie zewnętrznej. Do rdzenia LPS jest przyłączony polimorficzny region nazwany antygenem O (NOEL 1992). Ogólnie, mutanty różnych gatunków *Rhizobium* syntetyzujące zmieniony LPS są defektywne w procesie infekcji, to znaczy nie tworzą brodawek albo tworzą brodawki niekompletnie rozwinięte.

STRUKTURA EGZOPOLISACHARYDU (EPS)

EPS jest produkowany w dużych ilościach przez wiele bakterii glebowych i jest akumulowany na powierzchni komórek lub wydzielany do podłoża. Tradycyjnie uważano, że pełni nieswoistą rolę w pobieraniu składników odżywczych, przyczepianiu do podłoża, ochronie przed stresowymi czynnikami środowiska lub w patogenezie. Ostatnio wykazano, głównie dzięki izolacji szeregu mutantów *Rhizobium* defektywnych w produkcji EPS, że może również odgrywać swoistą rolę w symbiozie. *Rhizobium meliloti* jest jedynym gatunkiem *Rhizobiaceae*, w którym dokładnie poznano syntezę, a częściowo regulację syntezy EPS (TOLMASKY i współaut. 1982, REUBER i WALKER 1993, ARNOLD i współaut. 1993/1994).

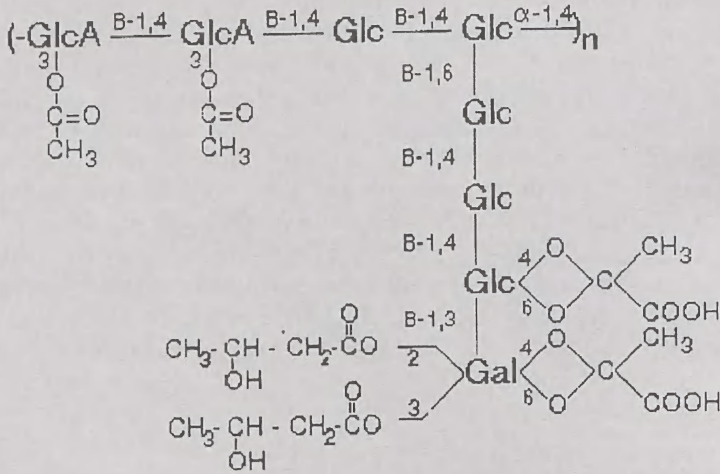
R. meliloti produkuje bursztynyloglukan (EPSI), który jest polimerem złożonym z ośmiocukrowych podjednostek (rys. 1). Każda z tych podjednostek zawiera po jednej reszcie bursztynianowej, pirogronianowej i octanowej, które stanowią niecukrowe modyfikacje EPSI. W obecności białego barwnika Calcofluoru, EPSI *R. meliloti* fluoryzuje w świetle UV, w odróżnieniu od EPS innych gatunków

Rhizobium. Mutanty defektywne w syntezie EPSI, lub nie zawierające acylowych modyfikacji, nie mają zdolności fluorescencji w UV (ARNOLD i współaut. 1993/1994). Biosynteza bursztynyloglukanu jest podobna do syntez innych bakteryjnych polimerów węglowodanowych, które zawierają powtarzającą się podjednostkę (TOLMASKY i współaut. 1982). Podjednostka EPSI jest syntetyzowana na nośniku lipidowym poprzez przyłączenie najpierw galaktozy, a następnie kolejnych glukozy. Po spolimeryzowaniu podjednostek EPS jest wydzielany na zewnątrz komórki. Obok EPSI *R. meliloti* może syntetyzować w warunkach głodu fosforanowego egzopolisacharyd oznaczony EPSII złożony z dwucukrowej powtarzającej się podjednostki, w której acetylowana glukoza jest połączona wiązaniem β -(1-3) z acylowaną pirogronianem galaktozą (rys. 1b) (HER i współaut. 1990). Funkcja EPSII w symbiozie nie jest wyjaśniona, lecz wiadomo, że nie może on zastępować funkcjonalnie EPSI.



Rys. 1. Struktura egzopolisacharydów *Rhizobium meliloti*: a) EPSI; b) EPSII.

R. leguminosarum obejmuje trzy biowary, które brodawkują trzy różne rośliny. *R. leguminosarum* bv. *trifolii* zakaża koniczynę, *R. leguminosarum* bv. *viciae* — wykę i groch a *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* — fasolę. EPS *R. leguminosarum* ma taką samą podstawową strukturę niezależnie od biowaru. Powtarzająca się, ośmiocukrowa podjednostka zawiera pięć reszt glukozy, dwie reszty kwasu glukuronowego i jedną resztę galaktozy. W rdzeniu i łańcuchu bocznym podjednostek znajdują się podstawniki niecukrowe: grupy acetylowe, pirogronianowe oraz 3-hydroksymaślanowe, rozmieszczone w sposób charakterystyczny dla biowaru. W *R. leguminosarum* bv. *trifolii* grupy acetylowe są przyłączone do pierwszej i drugiej reszty kwasu glukuronowego rdzenia podjednostki, reszty pirogronianowe są połączone z końcową glukozą i galaktozą łańcucha bocznego, natomiast grupy 3-hydroksymaślanowe acylują galaktozę bocznego łańcucha (rys. 2) (BREEDVELD i współaut. 1993).

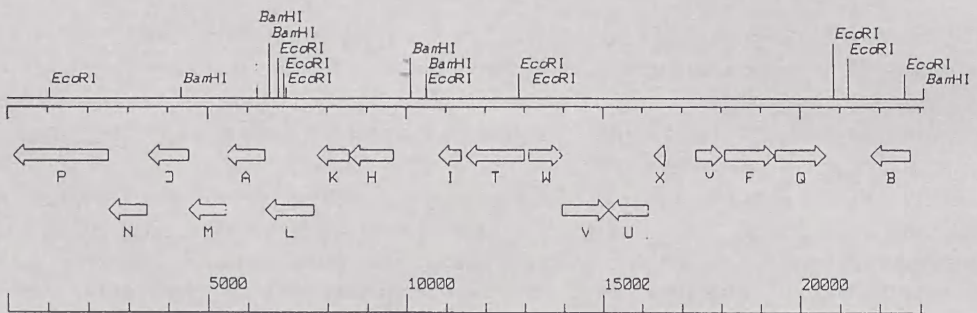


Rys. 2. Struktura egzopolisacharydu *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*.

FUNKCJA I ORGANIZACJA GENÓW KONTROLUJĄCYCH BIOSYNTEZĘ EPSI

Bakterie z rodziny *Rhizobiaceae* oprócz chromosomalnego DNA zawierają również duże plazmidy. W genomie *R. meliloti* występują dwa duże plazmidy symbiotyczne: pSymba o wielkości 1340 kbp i pSymb — 1700 kbp.

Geny *exo*, kontrolujące biosyntezę EPSI zmapowano na megaplazmidzie 2 (pSymb) *R. meliloti*. Analiza komplementacyjna wykazała, że plazmidowe geny *exo* są zgrupowane w regionie obejmującym 24 kbp, w 13 grupach komplementacyjnych. Poza tym regionem, na chromosomie zlokalizowano jeszcze 3 geny *exo*, które biorą udział w syntezie lub regulacji EPSI. Cały region *exo* megaplazmidu 2 został zsekwencjonowany, co pozwoliło na identyfikację 19 genów *exo* (rys. 3).



Rys. 3. Mapa genetyczna regionu 23,1 kbp plazmidu pSymb kontrolującego syntezę EPS *Rhizobium meliloti*. Strzałki pokazują kierunki transkrypcji genów. Zaznaczono miejsca rozpoznawane przez enzymy restrykcyjne EcoRI i BamHI.

Przypuszczalna sekwencja aminokwasowa niektórych genów wykazała homologie do białek o znanych funkcjach, co z kolei pozwoliło na wskazanie funkcji produktów genów *exo* w biosyntezie EPSI (REUBER i WALKER 1993, LEIGH i WALKER 1994) (tab. 1).

Tabela 1
Produkty genów *exo* zgrupowanych na drugim megaplazmidzie pSymb *R. meliloti*

Gen	Lokalizacja produktu genu	Homologia	Funkcja produktu genu
<i>exoZ</i>	CM	NodX (<i>Rhizobium leguminosarum</i>)	acetylotransferaza
<i>exoB</i>	CM	GalE (<i>Escherichia coli</i>)	UDP-glukozylo-4-epimeraza
<i>exoQ</i>	CM	brak	eksport EPS I i / lub polimeryzacja
<i>exoF</i>	P	ExoF (<i>Rhizobium</i> sp. NGR234)	nieznana
<i>exoY</i>	CM	CpsD (<i>Streptococcus agalactiae</i>) RfbP (<i>Salmonella typhimurium</i>)	galaktozylotransferaza
<i>exoX</i>	CM	ExoX (<i>Rhizobium</i> sp. NGR234)	negatywny regulator
<i>exoU</i>	CM	ExoA, ExoM, ExoO, ExoW, NodC (<i>Rhizobium meliloti</i>)	glukozylotransferaza
<i>exoV</i>	C	brak	transferaza pirogronianowa
<i>exoW</i>	C	ExoA, ExoM, ExoO, ExoU, NodC (<i>Rhizobium meliloti</i>)	glukozylotransferaza
<i>exoT</i>	CM	GumJ (<i>Xanthomonas campestris</i>) NdvA (<i>Rhizobium meliloti</i>)	eksport EPS I i / lub polimeryzacja
<i>exoS</i>	P	brak	nieznana
<i>exoH</i>	CM	brak	transferaza bursztynianowa
<i>exoK</i>	P	BglA (<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>) LicB (<i>Clostridium thermocellum</i>)	endo-1,3 i 1,4- β -glukanaza
<i>exoL</i>	C	brak	glukozylotransferaza
<i>exoA</i>	Cm	ExoM, ExoO, ExoU, ExoW, NodC (<i>Rhizobium meliloti</i>)	glukozylotransferaza
<i>exoM</i>	C	ExoA, ExoO, ExoU, ExoW, NodC (<i>Rhizobium meliloti</i>)	glukozylotransferaza
<i>exoO</i>	C	ExoA, ExoM, ExoU, ExoW, NodC (<i>Rhizobium meliloti</i>)	glukozylotransferaza
<i>exoN</i>	C	CelA (<i>Acetobacter xylinum</i>) GtaB (<i>Bacillus subtilis</i>)	UDP-glukozylopirofosforylaza
<i>exoP</i>	CM	brak	eksport EPSI lub/i polimeryzacja

Lokalizacja: C — cytoplazma, CM — włączone lub przyłączone do membrany cytoplazmatycznej, P — przestrzeń peryplazmatyczna.

Synteza EPSI, analogicznie do biosyntezy LPS, odbywa się na zakotwiczonym w membranie wewnętrznej nośniku lipidowym (fosforan poliprenyłu). Ośmio-sacharydowe podjednostki EPS są syntetyzowane z ich urydynodwufosforanowych prekursorów (UDP-glukozy i UDP-galaktozy). W syntezie prekursora cukrowego uczestniczy gen *exoC*, który koduje fosfoglukomutazę przekształcającą glukozylo-6-fosforan w glukozylo-1-fosforan. Produktem genu *exoN* jest pirofosfo-

rylaza UDP-glukozy, katalizująca tworzenie UDP-glukozy z glukozo-1-fosforanu. Gen *exoB* koduje epimerazę UDP-glukozy, która przekształca UDP-glukozę do UDP-galaktozy. Mutanty w genach *exoB* i *exoC* są plejotropowe, ponieważ obydwa enzymy uczestniczą w syntezie prekursorów wielocukrów komórkowych: EPS, LPS i obojętnych glukanów. Galaktoza jest pierwszym cukrem przyłączanym do nośnika lipidowego przez galaktozylotransferazę kodowaną przez gen *exoY*. Swoiste glukozylotransferazy kodowane przez geny *exoA*, *exoL*, *exoM*, *exoO*, *exoU* i *exoW* dołączają kolejne glukozy do rosnącej ośmiocukrowej podjednostki. Podczas kompletowania podjednostki cukrowej, geny *exoZ*, *exoH* i *exoV* modyfikują podjednostkę EPSI przez dołączanie kolejno reszty acetylowej, bursztynianowej i pirogronianowej. Geny *exoP*, *exoQ* i *exoT* uczestniczą w polimeryzacji i wydzielaniu EPSI, ponieważ mutanty w tych genach akumulują wewnątrz bakterii całe podjednostki związane z nośnikiem lipidowym. Białko ExoT wykazuje wysoką homologię do białka GumJ *Xanthomonas campestris* wymaganego do transportu „gumy ksantanowej”, oraz częściową homologię do NdvA, białka transportującego peryplazmatyczny β -1,2-glukan w *Rhizobium meliloti* (LEIGH i WALKER 1994). Białko ExoP zawiera domenę odpowiedzialną za wiązanie ATP, wykrywaną w prokariotycznych i eukariotycznych białkach przenośnikowych, co wskazuje na udział tego białka w zależnym od energii procesie translokacji przez wewnętrzną membranę. Produkt genu *exoK* jako jedyny w szlaku biosyntezy EPSI wykazuje homologię do 1,3- i 1,4- β -glukanaz i przypuszczalnie odpowiada za tworzenie niskocząsteczkowego bursztynyloglukanu z pierwotnego polimeru. Mutanty w tym genie nie wykazują defektów symbiotycznych, a jedynie tworzą nieco mniej EPS.

Z przypuszczalnej sekwencji aminokwasów większości produktów białkowych genów *exo* wynika, że są to białka zasocjowane z błoną cytoplazmatyczną. Tak więc, lokalizacja nośnika prenylowego, jak i całego aparatu biosyntezy podjednostki cukrowej EPS wskazuje na rolę membrany cytoplazmatycznej w produkcji EPS. Ponieważ bursztynyloglukan jest dużą cząsteczką przypuszcza się, że polimeryzuje podczas lub po przemieszczeniu podjednostek przez błonę cytoplazmatyczną (LEIGH i WALKER 1994).

REGULACJA SYNTEZY EPSI

W regulacji syntezy EPSI bierze udział kilka genów *exo*. *ExoR* i *ExoS* negatywnie regulują syntezę wielu genów *exo* leżących na megaplazmidzie 2. Mutanty w tych genach produkują zwiększone ilości EPSI, wpływając na transkrypcję z promotora *exoYF*, lecz indukują na lucernie normalne brodawki wiążące azot — Fix⁺ (GLAZEBROOK i współaut. 1989). Mutanty *exoX* tworzą trzy razy więcej EPSI niż szczep dziki. Regulacja poprzez gen *exoX* zachodzi potranslacyjnie, ponieważ sama ekspresja genu *exoX* nie ulega zmianie w mutantach. Białko ExoX hamuje syntezę bursztynyloglukanu poprzez interakcję z ExoY, pierwszą galaktozylotransferazą w szlaku biosyntezy EPSI. ExoX opisano także w *R. leguminosarum* oraz w *Rhizobium* NGR234 jako PsiA (BORTHAKUR i współaut. 1988, GRAY i współaut. 1990).

Ilość EPS syntetyzowanego przez *Rhizobium* wzrasta w warunkach głodu fosforowego lub azotowego, lecz nie wiadomo jaką w tych warunkach pełnią funkcję produkty genów regulatorowych.

FUNKCJA EPS W SYMBIOZIE

EPS, ze względu na swoją lokalizację na zewnątrz komórki bakteryjnej, jak również heterogenność struktury chemicznej, jest rozważany jako specyficzna cząsteczka sygnałowa w symbiozie. Pierwsze dobrze scharakteryzowane mutanty *R. meliloti* defektywne w syntezie EPS indukowały nieefektywne brodawki na lucernie (LEIGH i COPLIN 1992). Brodawki były poronne, bez nici infekcyjnych i bakteroidów, co wskazywało wyraźnie na defekt w zakażeniu komórek roślinnych przez rizobia. W roślinach zakażonych mutantami Exo^- występowały tylko 2 z 18 nodulin (białka roślinne powstające w odpowiedzi na zakażenie rizobiami). Fenotyp mutantów Exo^- *R. meliloti* (Nod^+Fix^- wskazywał, że EPS nie może być pierwotnym sygnałem interakcji bakterii z rośliną ani też sygnałem determinującym swoistość symbiozy, lecz cząsteczką istotną w fazie inwazji, kiedy bakterie uwalniają się z nici infekcyjnych penetrujących komórki epidermy (LEIGH i WALKER 1994). EPS jest również niezbędny dla rozwoju efektywnej symbiozy *R. leguminosarum* bv. *trifolii* z koniczyną (CHAKRAVORTY i współaut. 1982, DERYŁO i współaut. 1986, SKORUPSKA i współaut. 1991), *R. leguminosarum* bv. *viciae* z grochem (BORTHAKUR i JOHNSTON 1986) oraz *Rhizobium* NGR234 z *Leucaena leucocephala* (CHEN i współaut. 1985). EPS nie jest niezbędny w symbiozie *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* z fasolą, *Bradyrhizobium japonicum* lub *R. fredii* z soją (PARNISKE i współaut. 1993).

EPS wydaje się oddziaływać na różnych etapach rozwoju brodawki w zależności od układu symbiotycznego. Mutanty *exo* *R. leguminosarum* bv. *trifolii* indukują dwojakiego typu nieefektywne brodawki na koniczynie (SKORUPSKA i współaut. 1995, BIAŁEK i współaut. 1995). Niektóre mutanty tworzyły „puste”, niezakażone brodawki, bez nici infekcyjnych i bakteroidów, podobne do brodawek tworzonych na lucernie przez nieinfekcyjne Exo^- mutanty *R. meliloti*. Druga liczniejsza grupa Exo^- mutantów *R. leguminosarum* bv. *trifolii* tworzyła brodawki zakażone, w których można było obserwować powiększone nici infekcyjne upakowane bakteroidami, oraz komórki roślinne również wypełnione szybko degenerującymi bakteroidami. Ultramikroskopowe badania bakteroidów wykazują znaczne zmiany morfologiczne; bakteroidy są mniejsze, nieregularnego kształtu i silnie wybarwione. W zakażonych i niezakażonych komórkach roślinnych są widoczne duże ziarna skrobi, co świadczy o zwolnionym metabolizmie komórek roślinnych zakażonych mutantami defektywnymi w syntezie EPS. Podczas gdy nieinfekcyjne Exo^- mutanty *R. leguminosarum* bv. *trifolii* są przypuszczalnie zmutowane w genach *exo* wpływających na wczesne etapy infekcji koniczyny, mutanty indukujące zakażone brodawki mają defekty w genach uczestniczących w dalszych stadiach rozwoju symbiozy, co pozwala na częściowy rozwój brodawki. Bez względu na stopień rozwoju brodawki, koniczyna zakażona mutantami Exo^- wykazuje efekt głodu azotowego (SKORUPSKA i współaut. 1995). W brodawkach indukowanych przez mutanty Exo^- , hybrydyzacja *in situ* nie

wykazała obecności transkryptów genu *nifH*, co oznacza brak syntezy nitrogenu, kluczowego enzymu odpowiedzialnego za redukcję N_2 (BIALEK i współaut. 1995). Bakteroidy wykazują zmienioną morfologię od chwili uwolnienia z nici infekcyjnej i nigdy nie osiągają stanu dojrzałości pozwalającego na ekspresję genów odpowiedzialnych za redukcję azotu atmosferycznego. Mutacje transpozonowe prowadzące do fenotypu Exo^- zlokalizowano na niesymbiotycznych megaplazmidach *R. leguminosarum* bv. *trifolii* oraz na chromosomie (SKORUPSKA i współaut. 1991, 1995).

W *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* opisano regulatorowe geny *exo*, oznaczone *psi* (polysaccharide inhibition), które wyklonowane na wielokopiowym plazmidzie i wprowadzone do odpowiedniego gospodarza hamowały produkcję EPS. Geny *psiA* (homologia do *exoX* *R. meliloti*) i *psiB* zlokalizowano wyjątkowo na plazmidzie symbiotycznym jako geny sprzężone z genami *nod* i *nif* (BORTHAKUR i JOHNSTON 1987). Mutanty w tych genach syntetyzują normalną ilość EPS, lecz indukują na fasoli brodawki nie wiążące azotu, co wskazuje, że ciągła synteza EPS w brodawkach wpływa negatywnie na ich rozwój. Normalnie funkcjonujące geny *psi* prawdopodobnie hamują syntezę EPS w trakcie rozwoju brodawki, ponieważ bakteroidy wewnątrz brodawek mają niewiele lub wogóle nie mają EPS. Fuzja promotora genu *psi* *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* z genem dla β -glukuronidazy wykazała intensywną transkrypcję tego genu tylko w bakteroidach. Takie same mutanty *R. meliloti* nie wpływają na symbiozę z lucerną. Około 13 kbp od genów *psi*, na plazmidzie symbiotycznym zidentyfikowano gen oznaczony *psr* (polysaccharide restoration), który hamował transkrypcję genu *psi* (BORTHAKUR i JOHNSTON 1987, LATCHFORD i współaut. 1991). Mutanty w genie *psr* indukowały jednak normalne, Fix^+ , brodawki na fasoli. Sekwencja aminokwasowa PsrA wskazuje, że jest to transkrypcyjny regulator wiążący się z DNA.

Obok genów regulatorowych w *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* opisano geny *pss1* (polysaccharide synthesis) i *pss2* (homologiczny do *exoY* *R. meliloti* i *exoY* *Rhizobium* sp. NGR234), leżące poza plazmidem symbiotycznym. Mutacje w genach *pss/exoY* powodują zahamowanie syntezy EPS w *R. meliloti*, *Rhizobium* sp. NGR234 oraz w obu biowarach *R. leguminosarum* bv. *viciae* i *phaseoli*. Podczas gdy mutanty *pss* *R. leguminosarum* bv. *viciae* nie zakażają wyki i grochu, takie same mutanty *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* tworzą wiążące azot brodawki na fasoli (BORTHAKUR i JOHNSTON 1986). Tak więc fenotyp symbiotyczny mutacji zależał od rośliny, jaką zakażał szczep *Rhizobium*, a właściwie od typu brodawki jaką tworzyła roślina. Brodawki okrągłe, o krótko funkcjonującym merystemie (tzw. zdeterminowane), powstające z zawiązka w zewnętrznej strefie kory korzenia są tworzone przez takie rośliny, jak fasola, soja i komonica. Brodawki tego typu nie wydłużają się lecz zwiększają objętość, a bakterie w zakażonych komórkach różnicują się do bakteroidów wiążących azot. Brodawki wydłużone, o stale aktywnym merystemie powstające z zawiązka w wewnętrznej strefie kory korzenia (tzw. niezeterminowane) tworzą takie rośliny, jak lucerna, groch, koniczyna, wyka czy tropikalna *Leucaena*. Obecność EPS w zakażającym *Rhizobium* jest zasadniczo istotna tylko w roślinach tworzących brodawki niezeterminowane. Mutanty Exo^- tworzą defektywne brodawki na lucernie, koniczynie, grochu, wyce, ale efektywnie brodawkują fasolę, soję i komonicę. Szczególnie wyraźną zależność między mutacją *exo* i rośliną można obserwować na *R. loti*,

który zakaża szereg roślin tworzących zarówno brodawki zdeterminowane (*Lotus*), jak i niezdedeterminowane (*Leucaena*). Te same mutanty Exo^- *R. loti* indukują poronne Fix^- brodawki na *Leucaena* i Fix^+ na *Lotus* (HOTTER i SCOTT 1991). Być może różnice w wymaganiach co do EPS wynikają z różnic w funkcji EPS w morfogenezie brodawek zdeterminowanych i niezdedeterminowanych. Niezdeterminowane brodawki mają więcej nici infekcyjnych i bakterie rozprzestrzeniają się do nowych komórek roślinnych poprzez rozgałęzienie i wzrost nici infekcyjnej. EPS może tworzyć ważny komponent matriks wypełniającej nić infekcyjną.

Funkcja EPS w symbiozie wydaje się jednak daleka od wyjaśnienia, na co wskazują wyjątki z opisanego powyżej uogólnienia. *Hedysarum coronarium* zakażona mutantem *exoB* *Rhizobium* sp., tworzy niezdedeterminowane brodawki normalnie wiążące azot (OLLERO i współaut. 1994). Mutacja *exoB* wprowadzona do szczepu *Bradyrhizobium japonicum* wprawdzie nie hamuje procesu infekcji soi (*Glycine max*), jak w roślinach o niezdedeterminowanym typie brodawek, ale powoduje opóźnienie brodawkowania, co wpływa na konkurencyjność szczepu (PARNISKE i współaut. 1994).

Na funkcję EPS w symbiozie niewątpliwie ma również wpływ swoista niewęglowodanowa modyfikacja powtarzającej się podjednostki. Mutanty *exo* *R. meliloti*, które syntetyzują EPSI pozbawiony reszt bursztynianowych (*exoH*) czy pirogronianowych (*exoV*), tworzą nieefektywne brodawki na lucernie (LEIGH i COPLIN 1992). Natomiast brak grup acetylowych w EPSI nie wpływa na efektywność symbiozy (REUBER i WALKER 1993a). W innych gatunkach *Rhizobium* nie są znane geny kontrolujące modyfikację EPS. W *R. leguminosarum* bv. *trifolii* i bv. *viciae* EPS pozbawiony grup acyloowych, podany na roślinę przed zakażeniem dzikim szczepem, nie hamował brodawkowania w odróżnieniu od normalnego EPS. Wskazuje to, że modyfikacja EPS może mieć znaczenie również w symbiozie rizobiów z koniczyną i wyką (SKORUPSKA i współaut. 1985).

Czynniki Nod oraz EPS są syntetyzowane niezależnie, ale mogą współdziałać w tworzeniu brodawki. Świadczą o tym doświadczenia, w których wspólne zakażenie *Leucaena*, lucerny, grochu lub koniczyny mutantami Nod^-Exo^+ i Nod^+Exo^- prowadziło do powstania normalnych, zakażonych bakteriami brodawek (KAPP i współaut. 1990, GRAY i współaut. 1992, SKORUPSKA i KRÓL 1995). O swoistości oddziaływania EPS na symbiozę świadczy też możliwość supresji defektywnego fenotypu symbiotycznego mutantów *exo* *R. meliloti*, *R. leguminosarum* bv. *trifolii*, *Rhizobium* sp. NGR 234 przez dodanie mikromolowych stężeń homologicznego EPS na korzenie roślin przed zakażeniem (GRAY i współaut. 1992, SKORUPSKA i KRÓL 1995). W przypadku nieinwazyjnych mutantów *exo* *R. meliloti* do utworzenia zakażonych brodawek lucerny niezbędna jest czterocukrowa, w pełni zmodyfikowana podjednostka bursztynyloglukanu (BATTISTI i współaut. 1992). Brak grup bursztynianowych jest skorelowany z występowaniem EPS tylko w formie wysokocząsteczkowej co sugeruje, że ich występowanie jest istotne dla cięcia polimeru EPS na czterocukrowe, sygnałne podjednostki. Te doświadczenia uprawniają do wniosku, że EPS lub jego pochodne, działa jako swoisty sygnał w tworzeniu i rozwoju nici infekcyjnych (lucerna) lub w uwalnianiu bakteroidów z nici infekcyjnych (koniczyna). Podsumowując, można stwierdzić, że synteza swoście zmodyfikowanego EPS, o odpowiednim stopniu polimeryzacji jest niezbędna do rozwoju wiążącej azot brodawki, aczkolwiek rodzaj

strukturalnej modyfikacji egzopolisacharydu oraz jego ciężar cząsteczkowy wymagany dla efektywnej symbiozy nie jest znany dla większości gatunków *Rhizobium*.

Obserwacje ultrastrukturalne brodawek lucerny wykazują obecność w obrębie nici infekcyjnych elektrono-gęstego materiału, który przypuszczalnie jest egzopolisacharydem. Matriks zanika w miarę dojrzewania bakteroidów. Fuzja genów biosyntezy EPS (*exoY* i *exoF*) z genem dla fosfatazy alkalicznej wykazała aktywność promotorów *exo* tylko w strefie inwazji, tuż za merystemem brodawki i zupełny brak aktywności transkrypcyjnej w strefie wiązania azotu przez bakteroidy (GRAY i współaut. 1992). Obok genów regulatorowych *exo* (*exoR* i *exoS*), również geny plazmidowe odpowiedzialne za brodawkowanie — *syrA*, *syrM* i *nodD3* *R. meliloti* negatywnie kontrolują syntezę EPS (FISHER i LONG 1992).

Jedna z hipotez dotycząca roli EPS w symbiozie rizobiów z roślinami tworzącymi brodawki niezdeterminowane, częściowo tylko udokumentowana, mówi o działaniu EPS jako supresora systemu obronnego rośliny. Analiza elektronomikroskopowa pseudobrodawek indukowanych przez mutantą *Exo⁻ R. meliloti* 0540 wykazała nienormalne zgrubienie ścian komórkowych, wysyconych substancjami fenolowymi i ulegającymi lignifikacji, podobnie jak obserwowano w infekcji roślin patogenami grzybowymi (NIEHAUS i współaut. 1993). Zgrubienia ścian komórek merystemu, jak również występowanie osmofilnych struktur w tkance peryferyjnej brodawek indukowanych przez *Exo⁻* mutanty *R. leguminosarum* bv. *trifolii* na koniczynie przypisuje się również reakcji obronnej rośliny na zakażenie (SKORUPSKA i współaut. 1995). W systemie symbiotycznym *Bradyrhizobium japonicum* — soja (*Glycine max*), mutanty *exoB*, aczkolwiek indukowały wiążące azot brodawki (zdeterminowane), powodowały znaczny spadek zdolności konkurencyjnych szczepu. Wkrótce po infekcji można było obserwować akumulację fitoaleksyn oraz znaczne zgrubienie ścian komórkowych prowadzące do zlokalizowanego obumierania komórek charakterystycznego dla reakcji nadwrażliwości roślin broniących się przed infekcją patogenów (PARNISKE i współaut. 1993, 1994).

W terminologii fitopatologicznej mutanty *Exo⁻ R. meliloti* są awirulentne, mutanty *R. leguminosarum* bv. *trifolii* są albo awirulentne albo wykazują zredukowaną wirulencję podobnie jak mutanty *Exo⁻* fitopatogennych bakterii, takich jak *Erwinia stewartii*, *E. amylovora*, *Xanthomonas campestris* i *Pseudomonas solanacearum* (COPLIN i COOK 1990). Opierając się na analogii do fitopatogennych interakcji można postawić hipotezę, że EPS w interakcji rizobiów z roślinami tworzącymi niezdeterminowany typ brodawki (a także prawdopodobnie typ zdeterminowany) działa jak supresor reakcji obronnych rośliny, co ułatwia zajście zgodnych interakcji — wyróżnicowania bakteroidów i redukcji azotu atmosferycznego. Nadal nie jest znana molekularna natura receptora dla cząsteczki supresora reakcji obronnych rośliny. Hipotetycznym receptorem mogłyby być lektyny roślinne, których funkcja w symbiozie jest dotychczas mało poznana (NIEHAUS i współaut. 1993). Istnienie takiego receptora wymagałoby rozważenia mechanizmu przekazywania sygnału w roślinie umożliwiającego inwazję brodawki i rozwój bakteroidów.

RHIZOBIUM EXOPOLYSACCHARIDES: THEIR ROLE IN SYMBIOSIS
WITH LEGUME PLANTS

Summary

The symbiosis between bacteria of the genera *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium* and specific plants of the family *Fabaceae* plays an important role in the ecological nitrogen balance in nature. The symbiosis between microsymiont and legume is very specific and complex both on the chemical and on the genetic level. The plant — microbe interactions result in formation of a highly organized structure called nodule, in which nitrogen fixation takes place. It is evident that in the genus *Rhizobium* surface polysaccharides are involved in the infection proces and nodule development on legume plants. Here we summarize recent data on identification and analysis of the surface polysaccharide genes of *Rhizobium* and their role in symbiosis with legumes.

LITERATURA

- ARNOLD W., BECKER A., KELLER M., ROXLAU A., PÜHLER A., 1993/1994. *The role of Rhizobium meliloti surface polysaccharides in the infection of Medicago sativa*. Endocytobiosis & Cell Res. 10, 17–28.
- BATTISTI L., LARA J. C., LEIGH J. A., 1992. *Specific oligosaccharide form of the Rhizobium meliloti exopolysaccharide promotes nodule invasion in alfalfa*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 5625–5629.
- BIALEK U., SKORUPSKA A., YANG W. -C., BISSELING T., VAN LAMMEREN A. A. M., 1995. *Disturbed gene expression and bacteroid development in Trifolium pratense root nodules induced by Tn5 mutants of Rhizobium leguminosarum bv. trifolii defective in polysaccharide synthesis*. Planta 197, 184–192.
- BORTHAKUR D., JOHNSTON A. W. B., 1986. *A mutation that blocks exopolysaccharide synthesis prevents nodulation of peas by Rhizobium leguminosarum but not of beans by R. phaseoli and is not corrected by cloned DNA Rhizobium or the cytopathogen Xanthomonas*. Mol. Gen. Genet. 203, 320–323.
- BORTHAKUR D., JOHNSTON A. W. B., 1987. *Sequence of psi, a gene on the symbiotic plasmid of Rhizobium phaseoli which inhibits exopolysaccharide synthesis and nodulation and demonstration that its transcription is inhibited by psr, another gene on the symbiotic plasmid*. Mol. Gen. Genet. 207, 149–154.
- BORTHAKUR D., BARKER R. F., LATCHFORD J. W., ROSSEN L., JOHNSTON A. W. B., 1988. *Analysis of pss genes of Rhizobium leguminosarum required for exopolysaccharide synthesis and nodulation of peas: their primary structure and their interaction with and other nodulation genes*. Mol. Gen. Genet. 213, 155–162.
- BREEDVELD M. W., HAYO C. J., CRAMERS C., BATLEY M., POSTHUMUS M. A., ZEVENHUIZEN L. P. T. M., WIJFFELMAN C. A., ZEHNDER A. J. B., 1993. *Polysaccharide synthesis in relation to nodulation behavior of Rhizobium leguminosarum*. J. Bacteriol. 175, 750–757.
- CARLSON R. W., BHAT U. R., REUHS B., 1992. *Rhizobium lipopolysaccharides; their structures and evidence for their importance in the nitrogen-fixing symbiotic infection of their host legumes*. [W:] P. M. GRESSHOFF (red.) Current Topics in Plant Molecular Biology 33–44.
- CHAKRAVORTY A. K., ŻURKOWSKI W., SHINE J., ROLFE B. G., 1982. *Symbiotic nitrogen fixation: molecular cloning of Rhizobium genes involved in exopolysaccharide synthesis and effective nodulation*. J. Mol. Appl. Genet. 1, 585–596.
- CHEN H., BATLEY M., REDMOND J., ROLFE B. G., 1985. *Alteration of the effective nodulation properties of a fast-growing broad host range Rhizobium due to changes in exopolysaccharide synthesis*. J. Plant Physiol. 120, 331–349.
- COPLIN D. L., COOK D., 1990. *Molecular genetics of extracellular polysaccharide biosynthesis in vascular phytopathogenic bacteria*. Mol. Plant-Microbe Interact. 3, 271–279.
- DERVLO M., SKORUPSKA A., BEDNARA J., LORKIEWICZ Z., 1986. *Rhizobium trifolii mutants deficient in exopolysaccharide production*. Physiol. Plant. 66, 699–704.
- FISHER R. F., LONG S. R., 1992. *Rhizobium — plant signal exchange*. Nature 357, 655–659.
- GLAZEBROOK J., REED J., REUBER T. L., WALKER G., 1989. *Genetic analysis of Rhizobium meliloti exopolysaccharides*. Int. J. Biol. Macromol. 12(2), 67–70.

- GRAY J. X., DJORDJEVIC M. A., ROLFE B. G., 1990. *Two genes that regulate exopolysaccharide production in Rhizobium sp. strain NGR234: DNA sequences and resultant phenotypes*. J. Bacteriol. 172, 193-203.
- GRAY J. X., ROLFE B. G., 1990. *Exopolysaccharide production in Rhizobium and its role in invasion*. Mol. Microbiol., 4, 1425-1431.
- GRAY J. X., de MAAGD R. A., ROLFE B. G., JOHNSTON A. W. B., LUGTENBERG B. J. J., 1992. *The role of the Rhizobium cell surface during symbiosis*. [W:] D. P. S. VERMA (red.) *Molecular Signals in Plant-Microbe Communications* CRC Press, Boca Raton, 360-376.
- HER G. R., GLAZEBROOK J., WALKER G. C., REINHOLD V. N., 1990. *Structural studies of a novel exopolysaccharide produced by a mutant of Rhizobium meliloti strain 1021*. Carbohydr. Res. 198, 305-312.
- HOTTER G. S., SCOTT D. B., 1991. *Exopolysaccharide mutants of Rhizobium loti are fully effective on a determinate nodulating host but are ineffective on an indeterminate nodulating host*. J. Bacteriol. 173, 851-859.
- KAPP D., NIEHAUS K., QUANDT J., MÜLLER P., PÜHLER A., 1990. *Cooperative action of Rhizobium meliloti nodulation and infection mutants during the process of forming mixed infected nodules*. Plant Cell 2, 139-151.
- LATCHFORD J. W., BORTHAKUR D., JOHNSTON A. W. B., 1991. *The products of Rhizobium genes, psi and pss, which affect exopolysaccharide production, are associated with the bacterial cell surface*. Mol. Microbiol. 5, 2107-2114.
- LEIGH J. A., COPLIN D. L., 1992. *Exopolysaccharides in plant-bacterial interactions*. Annu. Rev. Microbiol. 46, 307-346.
- LEIGH J. A., WALKER G., 1994. *Exopolysaccharides of Rhizobium: synthesis, regulation and symbiotic function*. TIG 10, 63-67.
- NIEHAUS K., KAPP D., PÜHLER A., 1993. *Plant defence and delayed infection of alfalfa pseudonodules induced by an exopolysaccharide (EPSI)-deficient Rhizobium meliloti mutant*. Planta 190, 415-425.
- NOEL K. D., 1992. *Rhizobial polysaccharides required in symbioses with legumes*. [W:] D. P. S. VERMA (red.) *Molecular Signals in Plant-Microbe Communications*, CRC Press, Boca Raton, 341-357.
- OLLERO F. J., VALVERDE M. A., SANCHEZ-PALAZON L., VILLALOBO E., ESPUNY M. R., BELLOGIN R. A., 1994. *An exoB mutant of Rhizobium sp. is effective in indeterminate nodules of Hedysarum coronarium*. Microbiology 140, 1389-1394.
- PARNISKE M., KOSCH K., WERNER D., MÜLLER P., 1993. *ExoB mutants of Bradyrhizobium japonicum with reduced competitiveness for nodulation of Glycine max*. MPMI 6, 99-106.
- PARNISKE M., SCHMIDT P. E., KOSCH K., MÜLLER P., 1994. *Plant defense responses of host plants with determinate nodules induced by EPS-defective exoB mutants of Bradyrhizobium japonicum*. MPMI 7, 631-638.
- REUBER T. L., REED J., GLAZEBROOK J., GLUCKSMAN M. A., AHMANN D., WALKER G. C., 1991. *Rhizobium meliloti exopolysaccharides: genetic analyses and symbiotic importance*. Biochem. Soc. Trans. 19, 636-641.
- REUBER T. L., WALKER G. C., 1993. *Biosynthesis of succinoglycan, a symbiotically important exopolysaccharide of Rhizobium meliloti*. Cell 74, 269-280.
- REUBER T. L., WALKER G. C., 1993a. *The acetyl substituent of succinoglycan is not necessary for alfalfa nodule invasion by Rhizobium meliloti Rm1021*. J. Bacteriol. 175, 3653-3655.
- SKORUPSKA A., BIALEK U., URBANIK-SYPNIEWSKA T., VAN LAMMEREN A., 1995. *Two types of nodules induced on Trifolium pratense by mutants of Rhizobium leguminosarum bv. trifolii deficient in exopolysaccharide production*. J. Plant Physiol. (w druku).
- SKORUPSKA A., DERYŁO M., LORKIEWICZ Z., 1985. *Role of noncarbohydrate substitutions of Rhizobium exopolysaccharide in nodulation process*. Arch. Microbiol. 143, 307-310.
- SKORUPSKA A., DERYŁO M., GOLINOWSKI W., 1991. *The region for exopolysaccharide synthesis in Rhizobium leguminosarum biovar trifolii is located on the non-symbiotic plasmid*. Acta Biochim. Polon. 38, 423-435.
- SKORUPSKA A., KRÓL J., 1995. *Nodulation response of exopolysaccharide deficient mutants of Rhizobium leguminosarum bv. trifolii to addition of acidic exopolysaccharide*. Microbiol. Res. 150, 297-303.
- TOLMASKY M. E., STANELONI R. J., LELOIR L. F., 1982. *Lipid-bound saccharides in Rhizobium meliloti*. J. Biol. Chem. 257, 6751-6757.

STANISŁAW LEWAK

*Instytut Biologii Eksperymentalnej Roślin, Uniwersytet Warszawski,
Pawińskiego 5a, 02-106 Warszawa*

HORMONY ROŚLINNE — KIERUNKI BADAŃ OSTATNIEGO DZIESIĘCIOLECIA

WSTĘP

Kilkanaście lat temu upłynęła setna rocznica odkrycia w roślinach substancji, których obecność warunkuje wzrost, polarność i reakcje roślin na bodziec środowiskowy. W roku 1880 KAROL DARWIN, znany dziś głównie z powodu pionierskich prac nad teorią ewolucji, opublikował dzieło *The power of movement in plants*, w którym opisał doświadczenia wykazujące, że usunięcie wierzchołka wzrostu koleoptyla owsa powoduje zahamowanie wzrostu pozostałej części koleoptyla i utratę zdolności do wyginania się pod wpływem niesymetrycznego (bocznego) oświetlenia. Kontynuowanie tego rodzaju doświadczeń przez kilka pokoleń następców Darwina, połączone z ich wzbogaceniem o nowe techniki i podejścia eksperymentalne, doprowadziło w latach 30-tych naszego stulecia do wyodrębnienia i otrzymania w czystej postaci pierwszego hormonu roślinnego, auksyny, a następnie — do ustalenia jego struktury chemicznej jako kwasu indolilo-3-octowego.

Szybki rozwój nauk fizjologicznych i doskonalenie technik analitycznych doprowadziły w ciągu następnego półwiecza do poznania szeregu grup substancji pełniących podobną rolę w roślinach. Na szczególne podkreślenie zasługuje tutaj wprowadzenie metod chromatograficznych i instrumentalnej analizy strukturalnej. Wyniki tych badań pozwoliły również na wyróżnienie spośród substancji uczestniczących w regulacji procesów wzrostowych i rozwojowych roślin (zwanych ogólnie regulatorami wzrostu i rozwoju lub po prostu substancjami wzrostowymi roślin) klasy hormonów roślinnych. Substancje należące do tej klasy, zwane również fitohormonami, wyróżniają się (1) powszechnością występowania w organizmach roślin, (2) występowaniem i aktywnością biologiczną w niesłychanie niskich stężeniach oraz (3) często występującym rozdziałem między miejscem produkcji substancji czynnej w roślinie i miejscem jej działania.

W latach 80-tych stan wiedzy o hormonach roślinnych przedstawiał się następująco: poznano i uznano za hormony substancje należące do pięciu grup związków biologicznie czynnych, które wyliczamy w kolejności ich odkrywania i uznawania za hormony. Są to: auksyny (które głównie uczestniczą w regulacji wzrostu wydłużeniowego komórek, ruchów roślin, powstawaniu korzeni i doj-

rzewania owoców), gibereliny (regulacja wzrostu, spoczynku, kiełkowania nasion, kwitnienia i zawiązywania owoców), cytokiny (regulacja podziałów komórkowych, różnicowania komórek, spoczynku, transportu substancji organicznych w roślinie, starzenia), kwas absycynowy (regulacja wzrostu, kiełkowania, morfogenezy, spoczynku, opadania liści i owoców, starzenia). Najpóźniej uznano za hormon etylen — prosty, gazowy związek organiczny, którego aktywność biologiczna (regulacja wzrostu objętościowego komórek, dojrzewania owoców, starzenia) i powszechne występowanie znane były od dawna. W każdej z tych grup (za wyjątkiem etylenu) występuje przynajmniej kilka, spokrewnionych strukturalnie, substancji czynnych. Rekordy bije pod tym względem grupa giberelin; znanych jest ponad 80 substancji należących do tej grupy. Wydaje się, że hormony biorą udział w regulacji wszystkich etapów rozwojowych rośliny od kiełkowania nasion, przez wzrost wegetatywny, różnicowanie i organogenezę, indukcję i powstawanie kwiatu, embriogenezę, owocowanie, dojrzewanie do starzenia i śmierci. Regulacyjną rolę hormonów wykazano nie tylko obserwując ich efekt na powstawanie i przebieg poszczególnych faz rozwojowych rośliny, ale stwierdzono również ich udział w powstawaniu i rozwoju (dojrzewaniu) organelli komórkowych, aktywacji enzymów, regulacji poziomu niektórych metabolitów, a także regulacji ekspresji szeregu genów. Toteż jest uzasadnioną opinią, że regulacja hormonalna zajmuje jedno z centralnych miejsc w całokształcie procesów determinujących rozwój rośliny i jej reakcje (często przystosowawcze) na bodźce pochodzące ze środowiska. Opinia ta jest źródłem wzmoczonego zainteresowania w ostatnich latach problematyką związaną z hormonami roślinnymi.

Do końca lat 70-tych poznano w wielu szczegółach drogi biosyntezy wszystkich hormonów, łącznie z większością enzymów uczestniczących w tych drogach, a także powiązania dróg syntezy hormonów z innymi szlakami metabolicznymi. Podobnie, poznano drogi degradacji i inaktywacji większości hormonów w komórce roślinnej.

W tym samym czasie wykazano zależność między stężeniem hormonu, a jego efektem biologicznym. W pewnym zakresie stężeń zależność ta jest linearna lub wykładnicza. Poza tym zakresem, ale ciągle przy stężeniach fizjologicznych, zależność staje się bardziej złożona. Efekt przestaje być proporcjonalny do stężenia, a często występuje jego odwrócenie (np. hamowanie wzrostu przez wysokie stężenia auksyny zamiast stymulacji obserwowanej przy niższych stężeniach). Ponadto, wielokrotnie wykazano, że ten sam proces lub zjawisko znajduje się pod kontrolą więcej niż jednego hormonu, przy czym poszczególne hormony mogą wywoływać efekty przeciwstawne, addytywne lub synergistyczne. Mówimy więc o równowadze hormonalnej uczestniczącej w regulacji poszczególnych procesów, lub o kompleksie hormonalnym. Z drugiej strony, ten sam hormon zazwyczaj uczestniczy w regulacji więcej niż jednego zjawiska lub procesu zachodzącego w roślinie (efekt plejotropowy). Te obserwacje, jak również często występująca zbieżność miejsc produkcji i działania hormonów roślinnych stanowią o zasadniczej różnicy między nimi a hormonami zwierzęcymi.

Na tym tle oczywistymi powinny stać się pytania, które stawia sobie współczesna nauka o hormonach roślinnych. Zasadnicze pytania, do odpowiedzi na które zmierzają badania prowadzone od kilkunastu lat, można sformułować następująco:

- Czy lista dotąd poznanych hormonów jest kompletna?
- Czy aktualne stężenie hormonu w tkance jest jedynym parametrem decydującym o jego efekcie regulacyjnym?
- Jak odbywa się regulacja stężenia hormonu w miejscu jego działania?
- Na czym polega działanie hormonu? Jaki jest mechanizm tego działania?

Wyniki badań ostatnich lat nie przyniosły ostatecznej odpowiedzi na żadne z tych pytań. Jednak w każdym przypadku znacznie ją przybliżyły. Toteż i my spróbujemy przybliżyć tę problematykę cierpliwemu Czytelnikowi w dalszej części tego opracowania.

Oczywiście, równolegle do prac zmierzających do odpowiedzi na powyższe pytania, są kontynuowane badania nad hormonalną regulacją wzrostu, rozwoju i różnicowania u roślin. Omawianie tych badań nie mieści się w ramach niniejszego opracowania. Wydaje się jednak, że na zasygnalizowanie zasługuje postęp w jednym z kierunków tych badań. Prace nad udziałem hormonów w morfogenezie roślin prowadzone w latach 70-tych (np. ZAJĄCZKOWSKI i współaut. 1984) uzyskały nowy wymiar z chwilą stwierdzenia hormonalnej regulacji orientacji mikrotubul kortykalnych, która określa sposób odkładania się mikrofibryl celulozowych w ścianie komórkowej. Z kolei orientacja mikrofibryl determinuje kierunek wzrostu komórek, a tym samym kształt rośliny. Stwierdzono w ostatnich latach udział nie tylko auksyn, ale także giberelin, cytokinin i etyleny, a ostatnio również kwasu jasmonowego, w określaniu pozycji mikrotubul, ich stabilności i asocjacji z plazmolemą (SHIBAOKA 1994), co inspiruje dalsze badania (np. na poziomie molekularnym) w tym kierunku.

POSZUKIWANIA NOWYCH HORMONÓW

Jak już wspomniano, rozwój technik analitycznych umożliwiających identyfikację, ustalenie struktury i oznaczanie ilościowe składników roślin występujących w stężeniach rzędu mikrograma na kilogram świeżej masy, decyduje o postępie badań nad hormonami roślinnymi. Nie w tym opracowaniu jest miejsce na omawianie współczesnych metod badawczych stosowanych w tych badaniach. Niemniej wymienić należy jako te, którym dzisiejsza nauka o hormonach najwięcej zawdzięcza, obok szeregu metod chromatograficznych (łącznie z HPLC — wysokorozdzielczą chromatografią cieczową), takie metody jak spektrografia masowa sprzężona z chromatografią gazową (GC-MS) i jej udoskonalenia (np. GC-MS/SIM — ilościowe monitorowanie wybranego jonu), a także metody immunologiczne (HEDDEN 1993). Techniki te w znacznym stopniu wyparły powszechnie stosowane poprzednio biologiczne metody identyfikacji i ilościowego oznaczania hormonów, które obecnie stanowią narzędzie pomocnicze i uzupełniające.

Równolegle do kryteriów definiujących pojęcie hormonu roślinnego, wymienionych na początku tego opracowania, przyjęto trzy „kryteria metodyczne” precyzujące rodzaje prób doświadczalnych, którym musi zostać poddana substancja wykazująca aktywność biologiczną, występująca powszechnie i w „katalitycznych” stężeniach, aby mogła być uznana za hormon. Dopiero wykazanie, że: (1) występuje zależność (korelacja) między zmianami stężenia tej substancji

w roślinie i intensywnością badanego procesu fizjologicznego, (2) potraktowanie (egzogennie) rośliny (lub jej fragmentu) tą substancją inicjuje ten proces lub modyfikuje jego przebieg, (3) wywołanie zmiany endogennego stężenia (w roślinie) badanej substancji modyfikuje przebieg analizowanego procesu. Badanym procesem może być, na przykład, wzrost, liczba kiełkujących nasion lub pojawiających się pąków, ale także zmiana aktywności enzymu lub poziomu metabolitu. Modyfikacji endogennego stężenia kandydata do pozycji hormonu (kryterium metodyczne 3) można dokonać na przykład stosując inhibitory syntezy, transportu lub degradacji tej substancji. W ostatnich latach coraz szersze zastosowanie w tym celu znajdują rośliny, pozbawione zdolności syntezy badanego związku lub o zmodyfikowanej wrażliwości na tę substancję. Rośliny takie otrzymuje się bądź w wyniku mutacji i selekcji odpowiednich mutantów, bądź na drodze inżynierii genetycznej wprowadzając lub eliminując w roślinach transgenicznych geny odpowiedzialne za syntezę lub degradację kandydatów na hormony, syntezę białek wiążących potencjalne hormony lub białek uczestniczących w ich transporcie.

KWAS JASMONOWY

Wydaje się, że spośród licznych substancji czynnych biologicznie, opisywanych w ostatnich latach, w największym stopniu omawiane kryteria (zarówno te stanowiące definicję hormonu roślinnego, jak i kryteria metodyczne) spełnia kwas jasmonowy. Związek ten wyodrębniono po raz pierwszy jako składnik olejku aromatycznego kwiatów jaśminu w początkach lat 60-tych (DEMOLE i współaut. 1962), zidentyfikowano następnie jako aktywną substancję wydzielaną do podłoża w kulturach grzyba *Lasiodiplodia theobromae*, odpowiedzialną za hamowanie wzrostu roślin (ALDRIDGE i współaut. 1971). W latach 80-tych stwierdzono występowanie kwasu jasmonowego praktycznie we wszystkich badanych roślinach, opracowano specyficzne metody analityczne oraz poznano większość funkcji fizjologicznych tej substancji (SEMBDNER i PARTHIER 1993, KODA 1992).

Kwas jasmonowy jest prostym, dwunastowęglowym związkiem, pochodną cyklopentanonu. Jego biosynteza jest związana z przemianami nienasyconych kwasów tłuszczowych i jej przebieg poznany został w wielu szczegółach (VICK i ZIMMERMAN 1984). Równoległe do kwasu jasmonowego w roślinach występuje jego ester metylowy — substancja lotna o podobnej do wolnego kwasu aktywności biologicznej. Do tej samej grupy hormonów, zwanej jasmonidami, należy kwas kukurbitowy, związek zbliżony strukturalnie i wykazujący podobną do kwasu jasmonowego aktywność, a także jego ester metylowy i szereg stereoizomerów obu kwasów o żadnej lub nieznacznej aktywności biologicznej.

Kwas jasmonowy i/lub jego ester metylowy wykazują efekt biologiczny podobny do kwasu abscysynowego. Tytułem przykładu wymienić można hamowanie wzrostu wydłużeniowego nadziemnych części roślin, hamowanie wzrostu kalusa, stymulację starzenia (hamowanie oddychania i stymulacja proteolizy), hamowanie fotosyntezy i aktywności niektórych enzymów chloroplastowych, a także stymulację opadania liści. Z drugiej strony, obserwowano specyficzne dla jasmonidów efekty, takie jak indukcję syntezy specyficznych białek (np.

WILEN i współaut. 1991), czy udział w regulacji tuberyzacji (KODA i KIKUTA 1991). Ponadto stwierdzono antagonistyczne w stosunku do kwasu absycynowego działanie kwasu jasmonowego na kiełkowanie spoczynkowych nasion i na aktywność i biosyntezę niektórych enzymów (np. RANJAN i LEWAK 1995).

HORMON PRZYRANNY

Badania nad hormonem powstającym w wyniku mechanicznych uszkodzeń tkanki roślinnej nie są właściwie poszukiwaniem nowego hormonu, ale weryfikacją dawnych danych z użyciem nowoczesnych narzędzi badawczych. Już w 1921 roku HABERLANDT opisał hormon przyranny (traumatyna, kwas traumatynowy), a następnie struktura traumatyny została ustalona jako kwas trans-2-dodecenedionowy (ENGLISH i współaut. 1939). Kwas traumatynowy nie spełniał wszystkich kryteriów stawianych hormonom roślinnym; nie wykrywano go we wszystkich zranionych tkankach i nie we wszystkich badanych roślinach podanie traumatyny wywoływało charakterystyczną reakcję (wzmożenie podziałów komórkowych, stymulacja opadania liści). Reakcja ta była znacznie wyraźniejsza po podaniu nieoczyszczonego ekstraktu ze zranionych owoców.

Wyniki badań prowadzonych przez ZIMMERMANA (np. ZIMMERMAN i COUDRON 1979) wykazały, że traumatyna Haberlandta jest produktem nieenzymatycznego utlenienia właściwego hormonu przyrannego — kwasu 12-okso-trans-10-dodecenedionowego. Stwierdzono, że związek ten powstaje z kwasu linolenowego (produktu hydrolizy lipidów roślinnych), że w starszych tkankach występuje w nieaktywnej postaci zestryfikowanej oraz, że występuje i jest aktywny we wszystkich badanych roślinach. Pomimo niewielu, jak dotąd, prac nad „nowym” hormonem przyrannym wydaje się, że jest on poważnym kandydatem do rodziny hormonów roślinnych. Pozostaje pytanie, czy przejmie on nazwę „kwas traumatynowy”, czy też nazwa ta pozostanie przy „starym” związku Haberlandta.

TRIAKONTANOL

Ten jednowodorotlenowy alkohol alifatyczny, o długim (trzydziestowęglowym), nierozkrzewionym łańcuchu występuje powszechnie w niewielkich ilościach jako składnik wosków roślinnych. Triakontanol wykryto i zidentyfikowano po raz pierwszy w liściach lucerny w roku 1933 (CHIBNAL i współaut. 1933), a badania nad jego aktywnością jako regulatora wzrostu rozpoczęto w końcu lat 70-tych (RIES i współaut. 1977). Najlepiej poznanym efektem działania triakontanolu, który wykazuje aktywność w stężeniach rzędu 10^{-8} M, jest stymulacja wzrostu i zwiększanie suchej masy roślin (np. RIES i WERT 1977). Stąd też znalazł on szerokie zastosowanie w przypadku niektórych upraw w USA a także w Chinach (RIES 1984). Tym niemniej, jest znane jego działanie regulacyjne w takich procesach, jak synteza chlorofilu, fotosynteza i fotooddychanie (HAUGSTAD i współaut. 1983) i kiełkowanie nasion (np. LEWAK i SKOWROŃSKA 1982).

Z pewnością jest zbyt wcześnie, aby uznać triakontanol za hormon roślinny. Autor niniejszego opracowania nie spotkał się z doniesieniami dotyczącymi poziomu endogennego triakontanolu (wewnątrzkomórkowego a nie zawartego w woskach kutykuli), a tym bardziej dotyczącymi korelacji zmian tego poziomu ze zmianami badanych procesów fizjologicznych. Brak takich danych nie pozwa-

la na wykluczenie możliwości, że obserwowane efekty są skutkiem niefizjologicznego działania triakontanolu. Z drugiej strony, dane dotyczące mechanizmów działania tej substancji, jak na przykład doniesienia o aktywacji przez triakontanol błonowej ATP-azy (LESNIAK i współaut. 1989), lub o powstawaniu po podaniu triakontanolu specyficznego elicitora (RIES i współaut. 1990, RIES 1991), przemawiają za udziałem endogennego triakontanolu w regulacji wzrostu roślin.

CYJANOWODÓR

Występowanie w roślinach wolnego cyjanowodoru, gazowego, niskocząsteczkowego związku nieorganicznego, a także substancji rozkładających się w roślinie z wydzielaniem wolnego cyjanowodoru (związki cyjanogenne), jest znane od niemal 200 lat (pierwsze doniesienie na ten temat — SCHRADER 1803). Zainteresowanie tymi substancjami było związane głównie z silnie toksycznym działaniem cyjanowodoru na organizmy zwierzęce; HCN jest inhibitorem wielu metaloenzymów, w tym kluczowego enzymu oddechowego — oksydazy cytochromowej. Odkrycie tak zwanej niewrażliwej na cyjanki drogi oddechowej (oddychanie alternatywne), funkcjonującej u roślin w wielu sytuacjach fizjologicznych, oraz stwierdzenie stymulacji przez cyjanowodór takich procesów, jak kiełkowanie nasion czy redukcja azotanów (DZIEWANOWSKA 1983 a, b) zwróciło uwagę na cyjanowodór jako substancję regulującą procesy fizjologiczne u roślin. Powszecchność występowania tej substancji w roślinach (aczkolwiek często w stężeniach na granicy wykrywalności) oraz fakt, że HCN jest aktywny w stężeniach rzędu 10^{-6} M stwarzają podstawy, aby uważać go za kandydata na nowy hormon roślinny.

Cyjanowodór powstaje w roślinach nie tylko w wyniku hydrolizy cyjanogenów. Powstaje on na przykład z gliksalanu i hydroksyloaminy, metabolitów odpowiednio fotooddychania i szlaku redukcji azotanów. Ponadto, powstanie cząsteczki HCN towarzyszy ostatnim etapom syntezy etylenu, uznanego hormonu roślinnego. Poznano enzymy katalizujące te reakcje, jak również poznano w szczegółach drogi asymilacji cyjanowodoru, to znaczy drogi inaktywacji substancji czynnej jako trucizna albo jako endogenne regulator. Ciekawym jest, że enzymy szlaku asymilacji cyjanowodoru wykryto we wszystkich badanych organizmach z organizmem człowieka włącznie. Niestety, ich efektywność w większości organizmów jest niewystarczająca aby uchronić nas przed toksycznym działaniem HCN. Natomiast u roślin, zwłaszcza cyjanogennych (zawierających natywne cyjanogeny) zdolność do asymilacji cyjanowodoru jest wystarczająca, aby utrzymać jego stężenie na nietoksycznym, regulacyjnym poziomie.

Dlaczego więc cyjanowodór nie został dotąd uznany za hormon roślinny? Podstawową przyczyną jest ograniczona liczba danych dotyczących jego funkcji fizjologicznej. Poza regulacją oddychania i asymilacji (redukcji) azotanów wszystkie doniesienia dotyczą regulacji kiełkowania nasion i procesów z tym związanych. Wykazano obecność cyjanowodoru we wszystkich badanych nasionach, jak również stymulujący wpływ HCN na kiełkowanie (np. ESASHI i współaut. 1991). Stwierdzono również korelacje między poziomem endogennego HCN a zdolnością nasion do kiełkowania (DZIEWANOWSKA i współaut. 1983, BOGATEK i współaut. 1991) oraz udział cyjanowodoru w regulacji aktywności enzymów

katabolizmu cukrowców w kiełkujących nasionach (np. BOGATEK i LEWAK 1991). Natomiast brak jest podobnych danych dotyczących, na przykład, regulacji wzrostu, kwitnienia, dojrzewania.

Inną prawdopodobną przyczyną nieuznawania cyjanowodoru za hormon roślinny jest bariera psychologiczna, podobna do tej, jaka przez wiele lat nie pozwalała uznać za hormon etylenu. W odróżnieniu od wszystkich innych hormonów (za wyjątkiem etylenu) cyjanowodor nie jest substancją stałą i nie jest związkiem o wystarczająco złożonej budowie, aby wykazywać specyficzność strukturalną. Ponadto jest on znaną, groźną trucizną. Nie jest łatwo zaakceptować obcego w dobranym gronie.

FENOLOAMIDY

Jak już wspomiano wcześniej, hormony roślinne stanowią grupę substancji wzrostowych, spełniających pewne umowne kryteria. Do roślinnych regulatorów, które są aktywne (i występują) w znacznie wyższych stężeniach niż to przyjęto dla hormonów, należą poliaminy (aminy biogenne). Najpowszechniej występującymi przedstawicielami tej grupy są putrescyna (diamina), spermidyna (triamina) i spermina (tetraamina). Ich stężenie w roślinie dochodzi do 1 mM. Spektrum aktywności fizjologicznej poliamin w roślinach w znacznym stopniu pokrywa się z zakresem działania hormonów. Obserwacje wskazujące, że ich poziom znacznie się zmienia pod wpływem takich czynników środowiskowych, jak światło, temperatura i czynniki stresowe wywołały znaczne zainteresowanie tymi substancjami w latach 80-tych. Niemniej, pomimo tendencji aby traktować je podobnie jak „klasyczne” hormony roślinne (GALSTON i SAWHNEY 1990) wydaje się, że nie ma do tego wystarczających podstaw.

Do podobnej grupy regulatorów należą fenole roślinne. Substancje te charakteryzują się olbrzymim zróżnicowaniem strukturalnym i pełnią bardzo różne role w roślinach (od roli regulacyjnej do strukturalnej). Ich stężenia znacznie przekraczają zakres przyjęty dla hormonów co, łącznie z ograniczonym (niekiedy do jednego gatunku) rozpowszechnieniem w roślinach fenoli wykazujących działanie regulacyjne, zdecydowanie nie pozwala ich traktować jako hormonów roślinnych (np. KEFELI i DASHEK 1984).

Na tym tle na specjalną uwagę zasługują fenoloamidy, substancje zawierające elementy strukturalne zarówno amin biogennych, jak i fenoli i powstające z tych związków. Fenoloamidy występują powszechnie w roślinach w stężeniach nanomolarnych (podobnie jak hormony) i zmiany ich zawartości są skorelowane z takimi zjawiskami, jak odpowiedź na infekcje wirusowe, powstawanie i rozwój kwiatów, określanie płci i tuberyzacja (np. MARTIN-TANGUY 1985). Zróżnicowanie strukturalne poznanych dotąd fenoloamidów jest bardzo duże. Jest ono wynikiem zróżnicowania struktury fenoli oraz faktu, że obok „typowych” poliamin mogą wchodzić w ich skład aminy — produkty dekarboksylacji aminokwasów, jak na przykład tyramina (NEGREL i MARTIN 1984). To zróżnicowanie strukturalne odróżnia fenoloamidy od hormonów roślinnych; nawet w najliczniejszej grupie giberelin wszyscy przedstawiciele charakteryzują się tym samym szkieletem węglowym. Przeciwno uznaniu już teraz fenoloamidów za hormony przemawia jednak przede wszystkim brak danych dotyczących efektów biologicznych feno-

loamidów egzogennych oraz brak doświadczeń polegających na modyfikacji ich endogennego poziomu.

SUBSTANCJE UCZESTNICZĄCE W REAKCJACH ODPORNOŚCIOWYCH ROŚLIN

Infekcja roślin przez patogeny aktywuje mechanizmy obronne prowadzące do powstania różnego typu odporności. W powstawaniu odporności biorą udział mniej, lub bardziej specyficzne substancje chemiczne (elicytory). Wydaje się, że przynajmniej niektóre fenoloamidy mogą pełnić tę rolę. W ostatnich latach stwierdzano wielokrotnie wzrost poziomu kwasu salicylowego (związek fenolowy) i polipeptydu systeminy skorelowany z powstawaniem tak zwanej odporności systemicznej roślin. Traktowanie kwasem salicylowym roślin nie porażonych patogenem powodowało indukcję syntezy specyficznych białek powstających w wyniku infekcji i zwiększało odporność tych roślin. Pomimo niskich stężeń aktywnych tych substancji i powszechnego ich występowania w zainfekowanych roślinach, nie wydaje się, aby można je było traktować jako kandydatów na hormony roślinne. Co prawda wykazano wpływ egzogenego kwasu salicylowego na indukcję kwitnienia i opóźnianie starzenia niektórych kwiatów (róże), hamowanie kiełkowania nasion niektórych gatunków, indukcję alternatywnej (cyjanoodpornej) drogi oddechowej i ograniczanie transpiracji. Niemniej, oznaczenia zmian poziomu endogenego kwasu salicylowego nie wydają się potwierdzać udziału tego związku w regulacji tych procesów. Przekonywająco udowodnione spektrum działania kwasu salicylowego jest ograniczone do jednego rodzaju reakcji rośliny — indukcji systemicznej odporności na patogeny (RASKIN 1992). Wyniki doświadczeń z roślinami transgenicznymi pozbawionymi zdolności gromadzenia tego związku (VERNOOIJ i współaut. 1994) przemawiają przeciw uznaniu kwasu salicylowego za hormon roślinny i zdają się wskazywać na jego rolę w łańcuchu transdukcji sygnału na terenie komórki.

HORMONY ZWIERZĘCE I ICH ANALOGI

Pomimo stwierdzania wielu istotnych różnic między naturą, budową chemiczną i sposobem działania hormonów roślinnych i zwierzęcych, nauka o hormonach roślinnych od lat idzie tropem szybciej rozwijającej się (znacznie lepiej finansowanej) nauki o hormonach zwierzęcych (endokrynologii). Jednym z przejawów tej tendencji są poszukiwania w roślinach substancji o budowie podobnej lub identycznej do znanych hormonów zwierzęcych i badanie funkcji tych związków w organizmie roślinnym. Wykryto w roślinach hormony steroidowe, prostaglandyny (SANIEWSKI 1989) i acetylocholinę (TRETYN i współaut. 1988) oraz stwierdzono zdolność tych substancji do udziału w regulacji niektórych procesów fizjologicznych, takich jak na przykład wzrost i rozwój generatywny, a także w odpowiedzi roślin na bodźce środowiskowe. Stosunkowo wiele uwagi poświęca się steroidom występującym u krzyżowych — brassinosterolom, wśród których występują związki aktywne w nanomolarnych stężeniach uczestniczące w regulacji wzrostu i reakcjach tropicznych roślin (np. SASSE 1985). W świetle dotychczasowych danych nie wydaje się, aby substancje te spełniały podstawowe kryterium przyjęte dla hormonów roślinnych, to znaczy powszechność występowania. Obszerny artykuł przeglądowy na ten temat ukazał się niedawno na

łamach *Kosmosu* (CZERPAK 1993) i tam zainteresowany Czytelnik może znaleźć wiele informacji szczegółowych.

CO DECYDUJE O STĘŻENIU HORMONU W KOMÓRCE ROŚLINNEJ?

Jak już wspomniano, wielokrotnie stwierdzano zależność między stężeniem hormonu, którym traktowano roślinę, a wielkością odpowiedzi fizjologicznej. Podobnie, wielokrotnie wykazywano korelacje między stężeniem hormonu w tkance i intensywnością procesu regulowanego przez ten hormon. Niemniej, zarówno możliwości techniczne traktowania hormonami pojedynczych komórek w tkance, jak i określania stężenia hormonu w konkretnych komórkach, czy grupach komórek, są ograniczone. Stąd niewielka znajomość tego, jak wygląda regulacja hormonalna na poziomie komórki. Badania prowadzone na kulturach komórkowych (np. BOUZAYEN i współaut. 1990) lub na protoplastach izolowanych z tkanek wykazujących charakterystyczną odpowiedź na konkretny hormon (np. komórki warstwy aleuronowej zbóż odpowiadające na giberelinę indukującą syntezę α -amylazy, JACOBSEN i KNOX 1973) dostarczają danych wycinkowych. Podobnie, stosowanie przeciwciał do oznaczania dystrybucji hormonu w tkance (a nawet na terenie komórki) dostarcza danych obarczonych błędem metodycznym; przeciwciała najczęściej nie rozróżniają wolnych hormonów od związanych, nieaktywnych ich form. Utrudnia to, jeśli nie uniemożliwia, interpretację takich danych. Stąd też nieliczne dane dotyczące poziomu hormonów w komórkach roślinnych należy traktować jako dane wstępne lub przybliżone.

Jest rzeczą oczywistą, że o aktualnym poziomie hormonu w tkance (a także w komórce) decyduje w znacznym stopniu równowaga między intensywnością jego syntezy i degradacji. Innym, równoległym działającym mechanizmem jest odwracalna inaktywacja hormonów; powstawanie nieczynnych połączeń hormonów z cukrami, aminokwasami i peptydami oraz z innymi związkami niskocząsteczkowymi. Powstające połączenia, tak zwane koniugaty hormonów, stanowią rezerwową pulę nieaktywnego związku, z którego czynny hormon może być uwolniony niewielkim kosztem metabolicznym. Równowaga między powstawaniem koniugatów i ich rozpadem (najczęściej hydrolitycznym) jest drugim ze sposobów ustalania poziomu hormonu w komórce. Wreszcie trzecim sposobem — jest równowaga między intensywnością dopływu hormonu do komórki (tkanki) z innych tkanek i szybkością jego odpływu do innych obszarów rośliny (równowaga transportu).

Aczkolwiek procesy syntezy i degradacji hormonów poznano w znacznym stopniu w ubiegłych latach, ich regulacja pozostaje ciągle przedmiotem licznych dociekań. W znacznie mniejszym stopniu poznano dotąd enzymy uczestniczące w powstawaniu koniugatów, a na przykład próby wykrycia specyficznych glukozydaz hydrolizujących glikozydy i/lub estry glikozydowe giberelin nie zostały uwieńczone powodzeniem (np. SCHLIEMANN 1986). Wydaje się, że dominującymi trendami badań nad regulacją poziomu hormonów w roślinie, prowadzonych w ostatnich latach, są: (1) śledzenie mechanizmów powodujących zmiany poziomu hormonów w wyniku działania czynników środowiska takich jak światło, stosunki wodne, zmiany temperatury, infekcje patogenów i inne warunki stre-

sowe, oraz (2) badanie regulacji biosyntezy i degradacji hormonów przez inne hormony. Udział hormonów w reakcji roślin na stresowe czynniki środowiska jest przedmiotem innego, interesującego opracowania w tym zeszycie *Kosmosu* (KACPERSKA 1995). Regulacja biosyntezy etylenu przez auksynę należy do najlepiej poznanych przykładów oddziaływania jednego hormonu na powstawanie innego (np. KENDE 1993), niemniej mechanizm wielu z obserwowanych (i wcześniej wspomnianych) nieaddytywnych (synergistycznych) efektów kilku hormonów podanych łącznie jest interpretowany jako wynik regulacji poziomu jednego hormonu przez inny (np. DERMASTIA i współaut. 1994).

Hormony przemieszczają się w roślinie zarówno w ksylemie, jak i we floemie. Z dróg tych korzystają zapewne w znacznie mniejszym stopniu etylen i ester metylowy kwasu jasmonowego (oraz cyjanowodór), które jako substancje gazowe i niepolarne przemieszczają się na drodze dyfuzji przez błony komórkowe. Jedną z osobliwości przemieszczania się hormonów w roślinie jest tak zwany transport polarny, który wykazano w sposób nie budzący wątpliwości jedynie w przypadku auksyn. Transport ten zachodzi w sposób ukierunkowany bazypetalnie (w kierunku fizjologicznej podstawy rośliny), jest niezależny od przemieszczania się hormonu w naczyniach i wymaga nakładu energii metabolicznej. Transport polarny odgrywa zasadniczą rolę w determinacji polarności organizmu i jego skoordynowanego, harmonijnego rozwoju. Jego mechanizm polega na niesymetrycznym występowaniu na błonie komórkowej białek nośnikowych, umożliwiających przenoszenie zjonizowanej auksyny z cytoplazmy do apoplastu (HERTEL 1983). Wyizolowano białka wiążące auksynę, wykazano, że ich zdolność do wiązania hormonu jest blokowana przez specyficzne inhibitory polarnego transportu auksyny, poznano strukturę tych białek, a także zlokalizowano je (stosując przeciwciała monoklonalne) w bazalnej części komórek (JACOBS i SHORT 1986). Ta ostatnia obserwacja stanowi potwierdzenie udziału tych białek w polarnym transporcie auksyny.

O kierunku translokacji decyduje miejsce produkcji hormonu, a w jeszcze większym stopniu lokalizacja i właściwości komórek (tkanek) docelowych, w których hormony wykonują swoje zadanie. Gdy intensywność degradacji, koniugacji i eksportu hormonu z komórki jest niewielka następuje wzrost jego stężenia (gromadzenie się hormonu). Mówimy wtedy o „sekwestracji” hormonu w komórce. Gdy komórka taka jest zdolna do fizjologicznej odpowiedzi na zwiększone stężenie hormonu — mówimy o komórce „kompetentnej”. Wspomniano już wcześniej, że ten sam hormon może wywoływać różne odpowiedzi zależnie od tkanki, w której działa i zależnie od sytuacji fizjologicznej. Stan fizjologiczny komórki wyrażający się zdolnością do konkretnej odpowiedzi na dany hormon nazywamy „kompetencją” tej komórki. Zdolność do sekwestracji hormonu w komórkach o wysokiej kompetencji w stosunku do tego hormonu jest warunkiem pełnienia przez tę komórkę roli „komórki docelowej” (ang. target cell), to znaczy komórki odpowiadającej w sposób specyficzny na sygnał hormonalny. Jak dotąd poznano i scharakteryzowano niewiele takich komórek docelowych w roślinach. Do zbadanych najbardziej szczegółowo należą: komórki warstwy aleuronowej ziarniaków zbóż syntetyzujące α -amylazę w odpowiedzi na giberelinę (np. JACOBSEN i KNOX 1973), komórki strefy odcinającej liści, produkujące celulazę pod wpływem etylenu (DEL CAMPILLO i współaut. 1990) i komórki szparkowe reagu-

jące na kwas absycynowy (MACROBIE 1991). Wykazanie obecności kompetentnych komórek docelowych stanowi odpowiedź na jedno z pytań postawionych we wstępie do niniejszego opracowania; aktualne stężenie hormonu nie jest jedynym parametrem decydującym o jego efekcie. Innym, równie ważnym parametrem, jest kompetencja komórek. Problemy zarówno teoretyczne, jak i metodyczne, związane z mechanizmami powstawania kompetencji komórek ze zmianami kompetencji w trakcie rozwoju rośliny i ich znaczeniem biologicznym zajmują ciągle ważne miejsce we współczesnych badaniach nad hormonami (np. TREWAVAS 1991, BRADFORD i TREWAVAS 1994).

RECEPTORY HORMONÓW

Kompetentne, docelowe komórki roślinne muszą być zdolne do odróżniania cząsteczki hormonu od setek tysięcy docierających do nich innych związków chemicznych. Rozpoznawanie naturalnych hormonów musi być na tyle precyzyjne, aby odróżnić je od syntetycznych analogów o nieznacznie zmodyfikowanej strukturze, a także od nieaktywnych, związanych form hormonów (koniugatów). Do tak precyzyjnego molekularnego rozpoznawania substancji niskocząsteczkowych są zdolne białka i stąd koncepcja białkowych receptorów hormonów roślinnych. Zgodnie z tą koncepcją, hormon docierający do kompetentnej komórki natrafia na jej powierzchni na specyficzne białko, z którym wiąże się w kompleks za pomocą odwracalnego wiązania niekowalencyjnego. Białko receptorowe nabywa aktywność biologiczną w wyniku wiązania się z hormonem, to znaczy inicjuje ciąg zdarzeń prowadzący do odpowiedzi fizjologicznej.

Koncepcja receptorów hormonów w sposób oczywisty wyjaśnia różnice we wrażliwości różnych tkanek na hormon i zmiany wrażliwości tej tkanki w czasie ontogenezy; komórki tych tkanek zawierają różne ilości białka receptorowego. Koncepcja ta tłumaczy także kompetencję komórek; zależy ona od zdolności do sekwestracji hormonu i od ilości specyficznego receptora. Zakładając, że ten sam hormon może tworzyć aktywne kompleksy z różnymi receptorami i w ten sposób inicjować ciąg zdarzeń prowadzących do różnych odpowiedzi, wyjaśnia plejotropizm działania hormonów roślinnych. Wreszcie można przyjąć, że jedna cząsteczka białka receptorowego posiada dwa (lub więcej) miejsca aktywne, zdolne do wiązania różnych hormonów, podobnie jak ma to miejsce w przypadku enzymów allosterycznych. Tłumaczyłoby to często obserwowane współdziałanie różnych hormonów w regulacji tego samego procesu.

Omawianą koncepcję potwierdzono w ostatnich latach w wyniku szeregu doświadczeń opartych głównie na badaniu zdolności wiązania hormonów (znakowanych radioizotopami) przez tkanki roślinne, izolowane komórki, frakcje komórkowe i indywidualne białka. Wiązanie takie powinno spełniać następujące warunki, aby mogło być przypisane receptorowi w sensie omawianej koncepcji: musi ono być: (1) odwracalne, (2) o wysokim powinowactwie do hormonu występującego w bardzo niskim stężeniu, (3) wysycane przy podobnym stężeniu hormonu jak odpowiedź fizjologiczna, (4) specyficzne w stosunku do hormonów tej samej grupy i ich aktywnych analogów, (5) ograniczone do tkanek kompetentnych w stosunku do badanego hormonu i (6) związane ze specyficzną odpowie-

dział rośliny na hormon. W wyniku tych badań wyizolowano i scharakteryzowano szereg białek spełniających większość powyższych kryteriów. Najtrudniej jest spełnić kluczowe, ostatnie z wymienionych kryteriów, które jest właściwie wykazaniem aktywności biologicznej kompleksu hormon — receptor.

RECEPTORY AUKSYN

Najlepiej poznany receptorami hormonów roślinnych są białka wiążące auksynę (JONES 1994). Z pędów kukurydzy wyodrębniono szereg takich białek (zwanych ABP — auxin binding proteins), które spełniały pierwszych pięć wymienionych wyżej kryteriów. Jednym z tych białek okazał się nośnik auksyny uczestniczący w jej polarnym transporcie, omówiony poprzednio. Natomiast dwa następne, dobrze scharakteryzowane ABP wydają się pełnić rolę receptorów odpowiedzialnych za odpowiedzi wzrostowe rośliny. Oba te białka wykazują znaczne podobieństwo chemiczne i immunologiczne, różniąc się nieco specyficznością wiązania auksyn. Na terenie komórki są one związane z retikulum endoplazmatycznym oraz plazmolemą i, być może, z tonoplastem. Pewne wątpliwości budzi rola biologiczna ABP związanego z błonami retikulum endoplazmatycznego; od receptora hormonu oczekuje się bowiem lokalizacji na zewnętrznej stronie błony komórkowej. Wydaje się, że właściwą rolę receptora auksyny pełni ABP plazmolemy, podczas gdy ABP związany z retikulum jest jego prekursorem nieaktywnym *in situ*. Występowanie podobnych ABP wykazano u innych roślin (np. u tytoniu — LIBBENGA i MENNES 1987), aczkolwiek ich badania są zaawansowane w mniejszym stopniu.

Receptor auksyny wyizolowany z kukurydzy jest dimerem o masie 40–45 KD, zbudowanym z dwóch identycznych 20–22 KD podjednostek. Otrzymano monoklonalne przeciwciała w stosunku do tych podjednostek i posługując się nimi wyselekcjonowano z biblioteki cDNA siewek kukurydzy cDNA dla ABP, który następnie sklonowano i zsekwencjonowano. Homologiczne sekwencje DNA znaleziono w genomie tytoniu, *Arabidopsis thaliana* i truskawki, co pozwoliło następnie na zlokalizowanie genów kodujących ABP na poszczególnych chromosomach tych roślin. Ustalono również w szczegółach strukturę polipeptydu ABP, która wykazuje znaczne podobieństwo u wszystkich badanych roślin jedno- i dwuliściennych (JONES 1994).

Wykazano znaczną zgodność rozmieszczenia receptora auksyny w tkankach z ich wrażliwością na ten hormon. Stwierdzono na przykład, że wzrost apikalnych segmentów koleoptyli owsa jest silniej stymulowany przez auksynę niż wzrost części bazalnych wykazując jednocześnie, że części wierzchołkowe zawierają znacznie więcej ABP (oznaczonego immunologicznie) niż części bazalne. Wydaje się, że najbardziej przekonującą wskazówką, że ABP jest rzeczywiście funkcjonalnym receptorem auksyny, jest obserwacja, że zablokowanie ABP w koleoptylach kukurydzy przez podanie specyficznych przeciwciał hamuje wzrost indukowany przez auksynę (ROBERTS i HOOLEY 1988). Również pośrednich dowodów dostarczają wyniki szeroko zakrojonych badań nad udziałem ABP w powstawaniu indukowanej przez auksynę polaryzacji błon (np. BARBIER-BORYGOO i współaut. 1991). Pomimo intensywnych badań ostatnich lat, prowadzonych również z użyciem mutantów (REID 1993), brakuje bezpośrednich dowodów

na pełnienie przez kompleks ABP-auksyna roli biologicznej (kryterium 6 z wymienionych na początku tej części artykułu).

RECEPTORY GIBERELIN

Receptory innych hormonów roślinnych poznano w niewielkim stopniu. Wykazano obecność miejsc receptorowych giberelin w kilku tkankach wyróżniających się jednoznacznie odpowiedzią na ten hormon (np. hypokotyle ogórka, międzywęźla grochu, komórki aleuronowe jęczmienia, STODDART 1986). Wobec antagonistycznego działania giberelin i kwasu abscysynowego na indukcję syntezy szeregu enzymów hydrolitycznych w tkance aleuronowej ziarniaków zbóż na uwagę zasługuje obserwacja, że wiązanie gibereliny przez potencjalne receptory zlokalizowane w plazmolemie ulega hamowaniu przez kwas abscysynowy (NOLAN i HO 1988, a także SKRIVER i współaut. 1991). Otrzymanie mutantów niewrażliwych na giberelinę dostarczyło w ostatnich latach dodatkowych, aczkolwiek pośrednich, dowodów na występowanie specyficznych receptorów tego hormonu. Mutanty takie otrzymano dla szeregu roślin, w tym pszenicy, kukurydzy, grochu i *Arabidopsis* (SRIVASTAWA i SECHLEY 1991). Są one zdolne do syntezy gibereliny, ale nie zachdzą w nich typowe procesy regulowane przez ten hormon, takie jak wzrost (rośliny karłowate) i synteza α -amylazy, nawet po podaniu egzogennej gibereliny. W przypadkach, gdy mutacja dotyczy jednego genu (np. mutant D8 kukurydzy lub mutant Rht3 pszenicy) sugeruje się, że dotyczy ona genu kodującego białko receptorowe, nie wykluczając jednak na razie innych możliwości (np. gen kodujący syntezę antagonisty giberelin, blokującego właściwy receptor).

RECEPTORY CYTOKININ

Również badania nad receptorami cytokinin znajdują się w fazie początkowej. Na początku lat 80-tych wyizolowano z zarodków pszenicy białko o wysokim powinowactwie do cytokinin, dla którego określono strukturę i zidentyfikowano kodujący je gen (ERION i FOX 1981). Okazało się jednak, że występowanie tego białka jest ograniczone do tkanek zapasowych, a ponadto, że jest ono niesłychanie podobne do białek zapasowych nasion, co oczywiście uniemożliwiło traktowanie go jako potencjalnego, funkcjonalnego receptora cytokinin. Spośród późniejszych badań zmierzających do identyfikacji receptorów cytokinin wymienić można izolację z liści tytoniu białka specyficznie wiążącego substancje o aktywności cytokinin (MAMOTANI i TSUJI 1992). Kinetyka wiązania cytokinin przez to białko, dla którego określono masę cząsteczkową na 31 kDa, jest podobna do kinetyki wiązania hormonów przez receptory, niemniej brak jest innych dowodów świadczących o jego roli fizjologicznej jako receptora cytokinin. Nie uzyskano dotąd mutantów niewrażliwych na cytokininy, u których można się spodziewać zablokowania syntezy receptora.

RECEPTORY KWASU ABCYSYNOWEGO

Podobnie jak w przypadku giberelin, badania nad mutantami dostarczyły argumentów za występowaniem receptorów kwasu abscysynowego. Niewrażliwe na ten hormon mutanty *Arabidopsis thaliana* są zdolne do wzrostu w obecności

kwasy abscysynowego w stężeniach hamujących wzrost szczepu dzikiego, wykazują zaburzenia gospodarki wodnej, spoczynku nasion i innych typowych odpowiedzi na ten hormon. Jest wysoce prawdopodobne, że mutacja dotyczy genu specyficznego receptora kwasu abscysynowego (REID 1993). Innych dowodów, wskazujących pośrednio na obecność specyficznych receptorów kwasu abscysynowego dostarczyły wcześniejsze doświadczenia nad wiązaniem hormonu przez protoplasty komórek szparkowych, które są dla niego komórkami docelowymi (HORNBERG i WEILER 1984).

RECEPTORY ETYLENU

Również w przypadku etylenu dotychczasowe dane wskazują jedynie w sposób pośredni na obecność specyficznych receptorów tego hormonu. Pomimo, że w wielu tkankach roślinnych wykazano zdolność do wiązania etylenu, to tylko z liścieni *Phaseolus vulgaris* i *P. aureus* wyodrębniono i zidentyfikowano białko o wysokim powinowactwie do tego hormonu (HALL 1986). Białko to, o masie 50–60 KD, wiązało etylen ze stosunkowo niewielką szybkością i kinetyka wiązania odbiegała od typowej kinetyki oddziaływania hormonu z receptorem, co może być wynikiem lotności etylenu. Ponadto wykazano, że na terenie komórki białko to jest związane z retikulum endoplazmatycznym i ciałkami białkowymi. Nie powinno to jednak utrudniać pełnienia przez nie roli receptora, gdyż etylen dyfunduje swobodnie przez błony. Badania nad niewrażliwymi na etylen mutantami *Arabidopsis* doprowadziły do identyfikacji mutantu ETR1, który najprawdopodobniej utracił zdolność do syntezy receptora tego hormonu (BOWLER i CHUA 1994). Zmutowane rośliny mają znacznie niższą zdolność do wiązania etylenu niż szczep dziki i wykazują zaburzenia we wzroście i morfologii hypokotyli. Zidentyfikowano, zsekwencjonowano i scharakteryzowano gen *etr1*, a w wydedukowanej strukturze białka receptora wyróżniono domeny funkcjonalne, odpowiedzialne za wiązanie etylenu (domena N-terminalna) i za przekazywanie sygnału na system wtórnych przekaźników (domena C-terminalna). Podobne badania nad niewrażliwymi na etylen mutantami są prowadzone także na innych roślinach (np. na pomidorze, LANAHAN i współaut. 1994).

Intensywność i zakres prac zmierzających do poznania funkcjonalnych receptorów hormonów roślinnych, prowadzonych w ostatnich latach, pozwalają sądzić, że niedługo przyjdzie czekać na ich jednoznaczne wyniki. Wydaje się, że zastosowanie technik inżynierii genetycznej (uzyskanie roślin transgenicznych zawierających poznane receptory lub ich pozbawione), pozwoli na precyzyjne określenie ich funkcji fizjologicznych.

MECHANIZM DZIAŁANIA HORMONÓW ROŚLINNYCH

Powstanie kompleksu hormonu z jego specyficznym receptorem jest pierwszym zdarzeniem warunkującym odpowiedź na ten hormon. Badanie kinetyki tej odpowiedzi pozwoliło na wyróżnienie tak zwanych odpowiedzi szybkich, rozpoczynających się po kilku lub kilkunastu minutach od podania hormonu i odpowiedzi powolnych, których realizacja następuje po wyraźnie dłuższym czasie, mierzonym w dziesiątkach minut lub w godzinach. W odpowiedziach

szybkich kompleks hormon-receptor uczestniczy bezpośrednio, lub niemal bezpośrednio, w realizacji regulowanego procesu. Natomiast w odpowiedziach powolnych (długoterminowych) powstanie tego kompleksu inicjuje funkcjonowanie łańcucha transdukcji sygnału, który prowadzi do modyfikacji selektywnej ekspresji genów kodujących białka uczestniczące w realizacji procesu fizjologicznego.

HORMONALNA REGULACJA TRANSPORTU JONÓW

Szybkie odpowiedzi rozpoczynają się natychmiast, gdy hormon dotrze do komórki docelowej i zwiąże się z receptorem. Ten tak krótki okres między podaniem hormonu, a początkiem odpowiedzi wyklucza udział szeregu przemian metabolicznych i skomplikowanego łańcucha transdukcji. Szybkie odpowiedzi są wynikiem zmian konformacyjnych receptora, wywołanych przez hormon, lub zmian w bezpośrednim otoczeniu cząsteczki receptora (najczęściej w plazmolemie). Do najlepiej poznanych odpowiedzi tego typu należy hormonalna regulacja przemieszczania się jonów przez błony, niemniej na przykład aktywacja (lub dezaktywacja) białek enzymatycznych przez hormony również mieści się w tej kategorii.

W ostatnim dwudziestoleciu ukazało się kilkadziesiąt prac, często kontrowersyjnych (np. KUTSCHERA 1994), na temat tak zwanego wzrostu kwasowego. Nowe dane doświadczalne potwierdziły jednoznacznie, że indukowany przez auksynę wzrost objętościowy komórki polega na aktywowaniu przez ten hormon pompy zlokalizowanej w plazmolemie, która wykorzystuje energię metaboliczną (ATP) do przemieszczania jonów wodorowych (protonów) z komórki do apoplastu, powodując zakwaszenie ściany komórkowej (np. RAYLE i CLELAND 1992). Mechanizm ten jest wspomagany przez indukowaną (również przy udziale auksyny) egzocytozę pęcherzyków o kwaśnej zawartości (HAGER i współaut. 1991). Zakwaszenie ściany komórkowej powoduje rozluźnienie jej struktury (m.in. rozerwanie wiązań wodorowych), zmniejszenie ciśnienia turgorowego i wzrost komórki.

Innym, intensywnie badanym w ostatnich latach, rodzajem szybkich odpowiedzi na hormony jest indukowany przez kwas abscysynowy wpływ jonów potasowych z komórek szparkowych w warunkach suszy. Proces ten stanowi element mechanizmu ruchu szparek i został bardziej szczegółowo omówiony w równoległym opracowaniu w tym samym zeszycie *Kosmosu* (KACPERSKA 1995).

HORMONALNA REGULACJA SELEKTYWNEJ EKSPRESJI GENÓW

Podstawową drogą, na której przebiegają powolne odpowiedzi na hormon, jest modyfikacja poziomu specyficznych białek komórkowych. Może ona być wynikiem indukcji lub zablokowania syntezy tych białek (na etapie transkrypcji, translacji lub posttranslacyjnego przekształcania cząsteczki), lub też zmian intensywności ich degradacji (całkowita lub ograniczona proteoliza). W ostatnich latach najwięcej uwagi poświęcono mechanizmom regulacji hormonalnej procesu transkrypcji. Jest to, bez wątpienia, wynikiem zarówno roli, jaką pełnią specyficzne białka komórkowe we wzroście i różnicowaniu, jak i burzliwego rozwoju w tym czasie metod biologii molekularnej. Skoncentrowanie badań

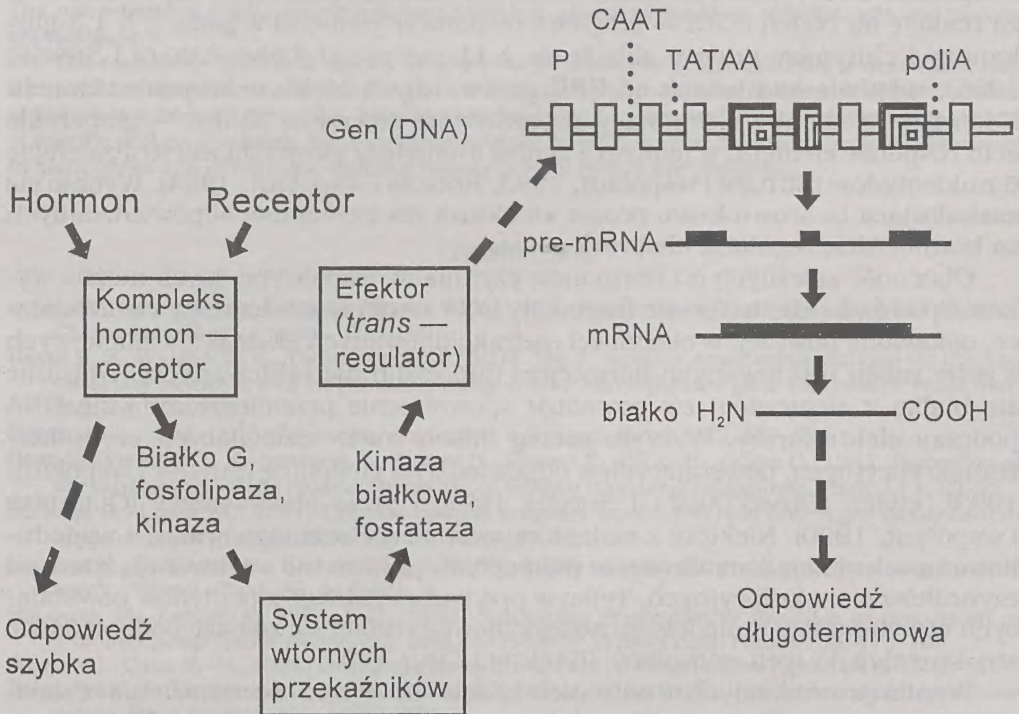
w tym kierunku odsunąło w cień dawniejsze koncepcje tłumaczące mechanizm działania hormonów jako aktywność enzymatyczną kompleksu hormon-receptor, lub jako modyfikację przez hormony struktury i właściwości błon i białek enzymatycznych (np. aktywności zależnej od DNA polimerazy RNA). Niemniej, wyniki tych badań nie zdeaktualizowały całkowicie tych dawniejszych koncepcji.

Porównanie składu białek roślin traktowanych hormonem i roślin kontrolnych, a zwłaszcza porównanie włączania ^{14}C aminokwasów do białek takich roślin wskazuje, że regulacja hormonalna dotyczy ułamka procentu wszystkich białek. Na przykład wśród około 40 000 rozróżnionych elektroforetycznie białek, występujących w hypokotylach soi, tylko kilkanaście pojawia się, lub zanika w roślinach traktowanych auksyną (ZURFLUH i GUILFOYLE 1980). Podobne wyniki uzyskano rozdzielając elektroforetycznie zdolny do translacji mRNA z roślin traktowanych (lub nie) auksyną lub etylenem (ZURFLUH i GUILFOYLE 1982). Świadczy to o bardzo precyzyjnym sposobie tej regulacji. Przypisanie poszczególnym indukowanym lub reprimowanym przez hormon białkom konkretnych funkcji fizjologicznych natrafia na poważne trudności. Stosunkowo łatwo jest wnioskować o tej funkcji, jeśli uda się wykazać aktywność enzymatyczną białka, jak ma to miejsce, na przykład, w przypadku indukowanej przez auksynę syntezy celulazy w epikotylach grochu lub indukowanej przez giberelinę syntezy α -amylazy w ziarniakach zbóż (np. HUANG i współaut. 1993). Natomiast w innych sytuacjach wnioskowanie jest oparte na korelacjach między lokalizacją białka w tkance i jej wrażliwością na hormon: na przykład indukowane przez auksynę białka występują głównie w intensywnie rosnących częściach hypokotyła soi, co pozwala postulować ich udział w mechanizmach wzrostu. Innym rodzajem korelacji jest stwierdzenie, że zmiany w ekspresji konkretnych genów, zachodzące pod wpływem bodźca środowiskowego, są identyczne ze zmianami powodowanymi przez hormon. Na przykład indukowane przez suszę niektóre białka siewek są identyczne z białkami indukowanymi w nasionach przez kwas abscy-synowy podczas późnej embriogenezy, co sugeruje ich udział w powstawaniu tolerancji na dehydratację (np. FINCHSAVAGE i współaut. 1994). W przypadku zidentyfikowania i zsekwencjonowania genu, którego ekspresja jest regulowana przez hormon, informacji o roli biologicznej produktu tego genu może dostarczyć porównanie jego sekwencji ze znanymi sekwencjami funkcjonalnych genów innych organizmów i stwierdzenie homologii (szereg przykładów znajdzie Czytelnik w pracy przeglądowej CHANDLER i ROBERTSON 1994). Potwierdzeniem tak zdobytych informacji będzie jednak dopiero sklonowanie genu, otrzymanie jego produktu w systemie *in vitro* i wykazanie funkcji fizjologicznej syntetycznego białka.

Skutkiem powstania kompleksu hormonu z receptorem jest uruchomienie łańcucha transdukcji sygnału, to znaczy przekazanie informacji z plazmolemy (lokalizacja receptora) do jądra komórkowego (lokalizacja genu). Funkcjonowanie łańcucha transdukcji umożliwia równocześnie amplifikację (wzmocnienie) tej informacji. Roślinne łańcuchy transdukcji sygnału (kaskady informacyjne) są podobne do tych, jakie funkcjonują w organizmach zwierzęcych. Uczestniczą w nich tak zwane białka G, jony wapniowe, fosforany inozytolu, diacyloglicerole i szereg innych tak zwanych wtórnych przekaźników sygnału. Są one uruchamiane nie tylko przez hormony ale także w wyniku działania innych nośników

informacji (światło, infekcja patogenu, inne czynniki stresowe). Łańcuchy transdukcji sygnału przedstawiano wielokrotnie w ostatnich latach w artykułach przeglądowych, również na łamach *Kosmosu* (np. BARAŃSKA 1993, BUSH 1993, COTE i CRAIN 1993, DROBAK 1993, NOWAK 1988, VERHEY i LOMAX 1993), toteż pominiemy ich szczegółowe omawianie w tym opracowaniu.

Pierwszym ogniwem łańcucha transdukcji sygnału jest powstanie kompleksu hormon-receptor białkowy. Ostatnim elementem łańcucha, bezpośrednio uczestniczącym w aktywacji (lub dezaktywacji) genu, jest białkowy czynnik regulujący proces transkrypcji konkretnego odcinka DNA (działający w sposób *trans*). Aktywacja tego czynnika jest wynikiem fosforylacji, lub defosforylacji już istniejących białek, na skutek aktywacji odpowiednich kinaz białkowych lub/i fosfataz przez końcowe ogniwa łańcucha transdukcji sygnału, co przedstawiono schematycznie na rysunku 1. Pojawienie się aktywnego czynnika transkrypcyjnego może także być wynikiem bardziej złożonych procesów, jak na przykład



Rys. 1. Podstawowe drogi działania hormonów. Utworzenie kompleksu hormon-receptor jest warunkiem uruchomienia różnych mechanizmów. Regulacja transkrypcji jest najczęściej badanym mechanizmem kontroli selektywnej ekspresji genu. P — promotor, w regionie którego znajduje się sekwencja nukleotydów, warunkująca odpowiedź na efektor (czynnik transkrypcyjny), powstający w wyniku uruchomienia przez hormon łańcucha transdukcji sygnału.

agregacja już istniejących, nieczynnych białek, lub indukcja syntezy białka — czynnika transkrypcyjnego.

Badanie czynników *trans*-działających na transkrypcję genów, uczestniczących w fizjologicznej odpowiedzi na hormon roślinny, stało się możliwe dzięki poznaniu w strukturze tych genów sekwencji nukleotydów odbierających informację docierającą w postaci zależnych od hormonów czynników transkrypcyjnych. Sekwencje te, (elementy działające *cis*) najeczęściej sąsiadują z regionem promotorowym genu (rys. 1), lecz mogą także znajdować się w pobliżu krańca 3' kodującego odcinka DNA. Ich aktywacja prowadzi do indukcji, wzmocnienia (*enhancer*), lub wygaszenia (*silencer*) transkrypcji genu.

Sekwencje nukleotydów uczestniczące w hormonalnej regulacji ekspresji szeregu genów (elementy działające *cis*) poznano między innymi u zbóż, tytoniu, *Brassica* i *Arabidopsis thaliana*. Element warunkujący odpowiedź na kwas abscysynowy (ABRE — abscisic acid response element) zawiera minimum 11 nukleotydów i towarzyszy promotorom kilku poznanych genów kodujących białka indukowane przez ten hormon (GUILTINAN i współaut. 1990, SKRIVER i współaut. 1991, BAKER i współaut. 1994). Podobnie, sekwencja odpowiedzialna za reakcję na etylen (ERE — ethylene-responsive element) w genach β -1,3-glukanazy i chitynazy tytoniu składa się z 11 par zasad (OHME-TAKAGI i SHINSHI 1995), różni się ona jednak od ERE genów innych białek w innych roślinach. Natomiast element warunkujący odpowiedź na giberelinę (GARE — gibberellic acid response element) w jednym z genów α -amylazy (Amy32b) zawiera zaledwie 6 nukleotydów (SUTLIFF i współaut. 1993, ROGERS i współaut. 1994). Wydaje się zaskakująca ta stosunkowo prosta struktura *cis*-elementów odpowiedzialnych za hormonalną regulację ekspresji genów.

Obecność zależnych od hormonów czynników transkrypcyjnych można wykazać poddając elektroforezie fragmenty DNA zawierające elementy *cis*-działające, omówione powyżej, w obecności rozfrakcjonowanych ekstraktów białkowych z jąder roślin traktowanych hormonem (lub roślin nietraktowanych). Wiązanie się białka z elementem *cis* powoduje spowolnienie przemieszczania się DNA podczas elektroforezy. Wykryto szereg takich *trans*-działających czynników transkrypcyjnych, powstających w odpowiedzi na giberelinę (SUTLIFF i współaut. 1993), etylen (OHME-TAKAGI i SHINSHI 1995) i kwas abscysynowy (GUILTINAN i współaut. 1990). Niektóre z nich sklonowano i zsekwencjonowano, a wydedukowaną sekwencję aminokwasów polipeptydu porównano z sekwencją znanych czynników transkrypcyjnych. Tylko w przypadku jednego z peptydów powstających w wyniku działania kwasu abscysynowego udało się znaleźć podobieństwo strukturalne do tych czynników (KATAGIN i CHUA 1992).

Wyniki prowadzonych w ostatnich latach badań nad mechanizmami działania hormonów roślinnych pozwalają na wniosek, że równolegle funkcjonuje więcej niż jeden mechanizm. Wyniki te upoważniają do przedstawienia dróg działania hormonów w sposób jak na rysunku 1. Wydaje się, że dalsze badania doprowadzą do pełniejszego potwierdzenia zależności przedstawionych w tym schemacie i do jego uszczegółowienia, ale nie zmieniają jego zasadniczych założeń. Poza pytaniami, postawionymi już w tym opracowaniu, jest jeszcze jedno, na które odpowiedź powinny przynieść badania najbliższych lat. Pytanie to dotyczy utrzymania specyficzności działania hormonów w trakcie przekazywania infor-

macji do jądra komórkowego. Specyficzność ta jest zdefiniowana „na wejściu” przez obecność specyficznego receptora. Odnajduje się ona „na wyjściu” w postaci specyficznego białka. Natomiast poznane dotąd łańcuchy transdukcji sygnału są w zasadzie takie same dla wszystkich hormonów i dla wszystkich poznanych odpowiedzi. Być może o specyficzności odpowiedzi decyduje równowaga między operującymi równolegle, nie do końca jeszcze poznanymi, szlakami transdukcji sygnału.

PLANT HORMONES — TRENDS OF THE LAST DECADE RESEARCH

Summary

Plant hormones are a distinct group of substances that control growth, cell divisions and cell differentiation. According to the criteria used for definition of a plant hormone, jasmonides should be added to the phytohormone list. Wound hormone (traumatol), triacontanol, hydrogen cyanide and phenolamides are regarded as possible candidates for the plant hormone group. Arguments are given that polyamines, phenolics, salicylic acid and animal hormones, despite their physiological activity and frequent occurrence in plants, certainly can not be considered plant hormones.

Mechanisms responsible for the establishment of a plant hormone level in a cell are reviewed. The competence of a cell towards a defined hormone, as well as the ideas of target cells and tissues are discussed.

The concept of specific receptors for plant hormones in the competent cells is developed, and the results of search for such receptors for the main plant hormones are reviewed. The basic modes of hormone action are described. Special attention is paid to the mechanisms of hormonal control of specific protein synthesis. Several examples of the recently studied hormone-responsive elements in plant genes and of hormone-induced transcriptional factors are presented.

LITERATURA

- ALDRIDGE D. C., GALT S., GILES D., TURNER W. B., 1971. *Metabolites of Lasiodiplodia theobromae*. J. Chem. Soc. Chem. Comm. 1623-1627.
- BAKER S. S., WILHELM K. S., THOMAS M. F., 1994. *The 5' region of Arabidopsis thaliana cor15a has cis-acting elements that confer cold-, drought- and ABA-regulated gene expression*. Plant Mol. Biol. 24, 701-713.
- BARAŃSKA J., 1993. *Ca²⁺ jako wtórny przekaźnik informacji*. Kosmos 42, 557-564.
- BARBIE-BORYGOO H., EPHRITIKHINE G., KLAMBT D., MAUREL C., PALME K., GUERN C., 1991. *Perception of the auxin signal at the plasma membrane of tobacco mesophyll protoplasts*. Plant J., 1, 83-93.
- BOGATEK R., LEWAK St., 1991. *Cyanide controls enzymes involved in lipid and sugar catabolism in apple embryos during culture*. Physiol. Plant. 83, 422-426.
- BOGATEK R., DZIEWANOWSKA K., LEWAK St., 1991. *Hydrogen cyanide and embryonal dormancy in apple seeds*. Physiol. Plant. 83, 417-421.
- BOUZAYEN M., LATCHE A., PECH J.-C., 1990. *Subcellular localization of the sites of conversion of 1-amino-cyclopropane-1-carboxylic acid into ethylene in plant cells*. Planta 180, 175-180.
- BOWLER C., CHUA N.-H., 1994. *Emerging themes of plant signal transduction*. Plant Cell 6, 1529-1541.
- BRADFORD K. J., TREWAVAS A. J., 1994. *Sensitivity thresholds and variable time scales on plant hormone action*. Plant Physiol. 105, 1029-1036.
- BUSH D. S., 1993. *Regulation of cytosolic calcium in Plants*. Plant Physiol., 103, 7-13.
- CHANDLER P. M., ROBERTSON M., 1994. *Gene expression regulated by abscisic acid and its relation to stress tolerance*. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant. Mol. Biol. 45, 113-141.
- CHIBNALL A. C., WILLIAMS E. F., LATNER A. L., PIPER S. H., 1933. *The isolation of n-triacontanol from lucerne wax*. Biochem. J. 27, 1885-1888.
- COTE G. G., CRAIN R. C., 1993. *Biochemistry of phosphoinositides*. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 44, 333-356.
- CZERPAK R., 1993. *Występowanie i aktywność biologiczna hormonów zwierzęcych i związków pokrewnych u roślin*. Kosmos 42, 613-636.

- DARWIN C., 1880. *The Power of Movements in Plants*. Murray, London.
- DEL CAMPILLO E., REID P. D., SEXTON R., LEWIS L. N., 1990. *Occurrence and localization of 9.5 cellulase in abscising and nonabscising tissues*. *Plant Cell* 2, 245-254.
- DEMOLE E., LEDERER E., MERCIER D., 1962. *Isollement et détermination de la structure du jasmonate du méthyle, constituant odorant caractéristique de l'essence de jasmin*. *Helv. Chim. Acta* 46, 675-685.
- DERMASTIA M., RAVNIKAR M., VILHAR B., KOVAC M., 1994. *Increased level of cytokinin ribosides in jasmonic acid-treated potato (*Solanum tuberosum*) stem node cultures*. *Physiol. Plant.* 92, 241-246.
- DROBAK B. K., 1993. *Plant phosphoinositides and intracellular signaling*. *Plant Physiol.*, 102, 705-709.
- DZIEWANOWSKA K., 1983 a. *Naturalne związki cyjanogenne*. *Post. Biochem.* 29, 191-225.
- DZIEWANOWSKA K., 1983 b. *Rola biologiczna związków cyjanogennych i cyjanowodoru*. *Post. Biochem.* 29, 227-238.
- DZIEWANOWSKA K., NIEDZWIEDŹ I., LEWAK St., 1983. *Hydrogen cyanide and cyanogenic compounds in seeds. II. Changes in free HCN level in apple seeds during stratification*. *Physiol. Veg.* 17, 681-686.
- ENGLISH J. JR., BONNER J., HAAGEN-SMIT A. J., 1939. *Structure and synthesis of a plant wound hormone*. *Science* 90, 329.
- ERION J. L., FOX J. E., 1981. *Purification and properties of a protein which binds cytokinin-active 6-substituted purines*. *Plant Physiol.* 67, 156-162.
- ESASHI Y., ISUZUGAWA K., MATSUYAMA S., ASHINO H., HASEGAWA R., 1991. *Endogenous evolution of HCN during pre-germination periods in many seed species*. *Physiol. Plant.* 83, 27-33.
- FINCHSAVAGE W. F., PRAMANIK S. K., BEWLEY J. D., 1994. *The expression of dehydrin proteins in desiccation-sensitive (recalcitrant) seeds of temperate trees*. *Planta* 193, 478-485.
- GALSTON A. W., SAWHNEY R. K., 1990. *Polyamines in plant physiology*. *Plant Physiol.* 94, 406-410.
- GUILTINAN M. J., MARCONE W. R., QUATRANO R. S., 1990. *A plant leucine zipper protein that recognizes abscisic acid response element*. *Science* 250, 267-271.
- HABERLANDT G., 1921. *Wundhormone als Erreger von Zelleilungen*. *Beitr. Allgem. Botan.* 2, 1-53.
- HALL M. A., 1986. *Ethylene receptors*. [W:] *Hormones, Receptors and Cellular Interactions in Plants*. CHADWICK C. M., GARROD D. R. (red.). Cambridge University Press, Cambridge. Str. 69-89.
- HAGER A., DEBUS G., EDEL H. -G., STRANSKY H., SERRANO R., 1991. *Auxin induces exocytosis and the rapid synthesis of a high turnover pool of plasma-membrane H⁺ATPase*. *Planta* 185, 527-537.
- HAUGSTAD M., ULSAKER L. K., RUPPEL A., NILSEN S., 1983. *The effect of triacanol on growth, photosynthesis and photorespiration in *Chlamydomonas reinhardtii* and *Anacystis nidulans**. *Physiol. Plant* 58, 451-456.
- HEDDEN P., 1993. *Modern methods for the quantitative analysis of plant hormones*. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 44, 107-129.
- HERTEL R., 1983. *The mechanism of auxin transport as a model for auxin action*. *Z. Pflanzenphysiol.* 122, 53-67.
- HORNBERG C., WEILER E. W., 1984. *High-affinity binding sites for abscisic acid on the plasmalemma of *Vicia faba* guard cells*. *Nature* 310, 321-324.
- HUANG N., CHANDLER J., THOMAS B. R., KOIZUMI N., RODRIGUEZ R. L., 1993. *Metabolic regulation of α -amylase gene expression in transgenic cell cultures of rice (*Oryza sativa*)*. *Plant Mol. Biol.* 23, 7237-747.
- JACOBS M., SHORT T. W., 1986. *Further characterization of the presumptive auxin transport carrier using monoclonal antibodies*. [W:] *Plant Growth Substances 1985*. Bopp M. (red.) Springer. Berlin 219-226.
- JACOBSEN J. V., KNOX R. B., 1973. *Cytochemical localization and antigenicity of α -amylase in barley aleurone tissue*. *Planta* 112, 213-224.
- JONES A. M., 1994. *Auxin-binding proteins*. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 45, 393-420.
- KACPERSKA A., 1995. *Udział hormonów w odpowiedzi roślin na stresowe czynniki środowiska*. *Kosmos* 44, 623-637.
- KATAGIN F., CHUA N., 1992. *Plant transcription factors, present knowledge and future challenges*. *Trends Genet.* 8, 22-27.
- KEFELI V. I., DASHEK W. V., 1984. *Non-hormonal stimulators and inhibitors of plant growth and development*. *Biol. Rev.* 11, 273-288.
- KENDE H., 1993. *Ethylene biosynthesis*. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 44, 283-307.
- KODA Y., 1992. *The role of jasmonic acid and related compounds in the regulation of plant development*. *Intern. Rev. Cytology* 135, 155-199.
- KODA Y., KIKUTA Y., 1991. *Possible involvement of jasmonic acid in tuberization of yam plants*. *Plant Cell Physiol.* 32, 629-633.

- KUTSCHERA U., 1994. *The current status of the acid-growth hypothesis*. New Phytol., 126, 549-569.
- LANAHAN M. B., YEN H-C., GIOVANNONI J. J., KLEE H. J., 1994. *The Never Ripe mutation blocks ethylene perception in tomato*. Plant Cell 6, 521-530.
- LESNIAK A. P., HAUG A., RIES S. K., 1989. *Stimulation of ATP-ase activity in barley (Hordeum vulgare) root plasma membranes after treatment with triacontanol and calmodulin*. Physiol. Plant. 75, 75-80.
- LEWAK St., SKOWROŃSKA E., 1982. *Interaction of triacontanol with gibberellin in control of lettuce seed germination*. Physiol. Plant. 55, 183-186.
- LIBBENGA K. R., MENNES A. M., 1987. *Hormone binding and its role in hormone action*. [W:] *Plant Hormones and their Role in Plant Growth and Development*. DAVIES P. J. (red.), M. Nijhoff Publishers, Dordrecht, Boston, Lancaster, str., 194-221.
- MACROBIE E. A. C., 1991. *Effect of ABA on ion transport and stomatal regulation*. [W:] *Abscisic Acid, Physiology and Biochemistry*. DAVIES W. J., JONES H. G. (red.), Bios Scientific Publishers, Oxford, Str., 153-168.
- MARTIN-TANGUY J., 1985. *The occurrence and possible function of hydroxycinnamoyl amides in plants*. Plant Growth Regul. 3, 381-399.
- MAMOTANI E., TSUJI H., 1992. *Isolation and characterization of a cytokinin-binding protein from the water soluble-fraction of tobacco leaves*. Plant Cell Physiol. 33, 407-412.
- NEGREL J., MARTIN C., 1984. *The biosynthesis of feruloyltyramine in Nicotiana tabacum*. Phytochemistry 23, 2797-2801.
- NOLAN R. C., HO T. D., 1988. *Hormonal regulation of α -amylase expression in barley aleurone layers*. Plant Physiol. 88, 588-593.
- NOWAK J. Z., 1988. *Receptory białkowe a przemiany fosfoinozytydów, trifosforan inozytolu i diacyloglicerol jako drugie przekaźniki informacji*. Kosmos 37, 339-378.
- OHME-TAKAGI M., SHINSHI H., 1995. *Ethylene inducible DNA binding proteins that interact with an ethylene-responsive element*. Plant Cell 7, 173-182.
- RANJAN R., LEWAK St., 1995. *Interaction of jasmonic and abscisic acid in the control of lipases and proteases in germinating apple embryos*. Physiol. Plant 93, 421-426.
- RASKIN I., 1992. *Role of salicylic acid in plants*. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 43, 439-463.
- RAYLE D. L., CLELAND R. E., 1992. *The acid growth theory of auxin induced cell elongation is alive and well*. Plant Physiol. 99, 1271-1274.
- REID J. B., 1993. *Plant hormone mutants*. J. Plant Growth Regul. 12, 207-226.
- RIES S. K., 1984. *Regulation of plant growth with triacontanol*. CRC Critical Rev. Plant Sci. 2, 239-285.
- RIES S., 1991. *Triacontanol and its second messenger 9- β -L(+) adenosine as plant growth substances*. Plant Physiol. 95, 986-989.
- RIES S. K., WERT V., 1977. *Growth responses of rice seedlings to triacontanol in light and dark*. Planta 135, 77-82.
- RIES S. K., WERT V. F., SWEETLEY C. C., LEAVITT R. A., 1977. *Triacontanol, a new naturally occurring plant growth regulator*. Science 195, 1339-1341.
- RIES S. K., WERT V., O'LEARY N. F. D., NAIR M., 1990. *9- β -L(+) adenosine, a new naturally occurring plant growth substance elicited by triacontanol in rice*. Plant Growth Regul. 9, 263-273.
- ROGERS J. C., LANAHAN M. B., ROGERS S. W., 1994. *The cis-acting gibberellin response complex in hugh-pl α -amylase gene promoters — Requirement of a coupling element for high-level transcription*. Plant Physiol. 105, 151-158.
- ROBERTS J. A., HOOLEY R., 1988. *Plant Growth Regulators*. Blackie. Glasgow, London, str., 139-144.
- SANIEWSKI M., 1989. *Występowanie i aktywność fizjologiczna prostaglandyn w roślinach*. Kosmos 38, 211-223.
- SASSE J., 1985. *The place of brassinolide in the sequential response to plant growth regulators in elongating tissue*. Physiol. Plant. 63, 303-308.
- SCHLIEPMANN W., 1986. *Enzymic hydrolysis of gibberellin conjugates*. [W:] *Conjugated Plant Hormones — Structure, Metabolism and Function*. SCHREIBER K., SCHÜTTE H. R., SEMBDNER G. (red.), Deutscher Verlag der Wissenschaften, Berlin, 191-204.
- SEMBDNER G., PARTIER B., 1993. *The biochemistry and the physiological and molecular actions of jasmonates*. Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant Mol. Biol. 44, 569-589.
- SHIBAOKA H., 1994. *Plant hormone-induced changes in the orientation of cortical microtubules, alterations in the cross-linking between microtubules and the plasma membrane*. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 45, 527-544.
- SKRIVER K., OLSEN F. L., ROGERS J. C., MUNDY J., 1991. *Cis-acting DNA elements responsive to gibberellin and its antagonist abscisic acid*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 7266-7270.

- SRIVASTAWA L. M., SECHLEY K. A., 1991. *In search of a gibberellin response*. Jour. Iowa Acad. Sci, 98, 51-62.
- STODDART J. L., 1986. *Gibberellin receptors* [W:] *Hormones, Receptors and Cellular Interactions in Plants*. CHADWICK C. M., GARROD D. R. (red.), Cambridge University Press, Cambridge, 91-114.
- SUTLIFF T. D., LANAHAN M. B., HO T. H. D., 1993. *Gibberellin treatment stimulates nuclear factor binding to the gibberellin response complex in a barley alpha-amylase promoter*. Plant Cell 5, 1681-1692.
- TRETYN A., KOPCEWICZ J., ŚLESACEK., 1988. *Interaction of light and the cholinergic system in the regulation of seed germination*. Biol. Plant. 30, 338-342.
- TREWAVAS A., 1991. *How do plant growth substances work? II*. Plant Cell Environ. 14, 1-12.
- VERHEY S. D., LOMAX T. L., 1993. *Signal transduction in vascular plants*. J. Plant Growth. Regul. 12, 179-195.
- VERNOOLJ B., FRIEDRICH L., MORSE A., REIST R., KOLDITZJAWHAR R., WARD E., KESSMANN H., RYALS J., (1994) *Salicylic acid is not the translocated signal responsible for inducing systemic acquired resistance but is required in signal transduction*. Plant Cell 6, 959-965.
- VICK B. A., ZIMMERMAN D. C., 1984. *Biosynthesis of jasmonic acid by several plant species*. Plant Physiol. 75, 458-461.
- WILEN R. W., VAN ROOIJEN G. J. H., PEARCE D. W., PHARIS R. P., HOLBROOK L. A., MOLONEY M. M., 1991. *Effects of jasmonic acid on embryo-specific processes in Brassica and Linum oilseeds*. Plant Physiol. 95, 399-405.
- ZAJĄCZKOWSKI S., WODZICKI T. J., ROMBERGER J. A., 1984. *Auxin waves and plant morphogenesis*. [W:] *Encyclopedia of Plant Physiology*, New Series, tom 10. Pirson A., ZIMMERMANN M. H. (red.). Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York. 234-262.
- ZIMMERMAN D. C., COUDRON C. A., 1979. *Identification of traumatin, a wound hormone, as 12-oxo-trans-10-dodecenoic acid*. Plant Physiol. 63, 536-541.
- ZURFLUH L. L., GUILFOYLE T. J., 1980. *Auxin induced changes in the patterns of protein synthesis in soybean hypocotyl*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 77, 357-361.
- ZURFLUH L. L., GUILFOYLE T. J., 1982. *Auxin- and ethylene- induced changes in the population of translatable messenger RNA in elongating sections of soybean hypocotyl*. Plant Physiol. 69, 332-337.

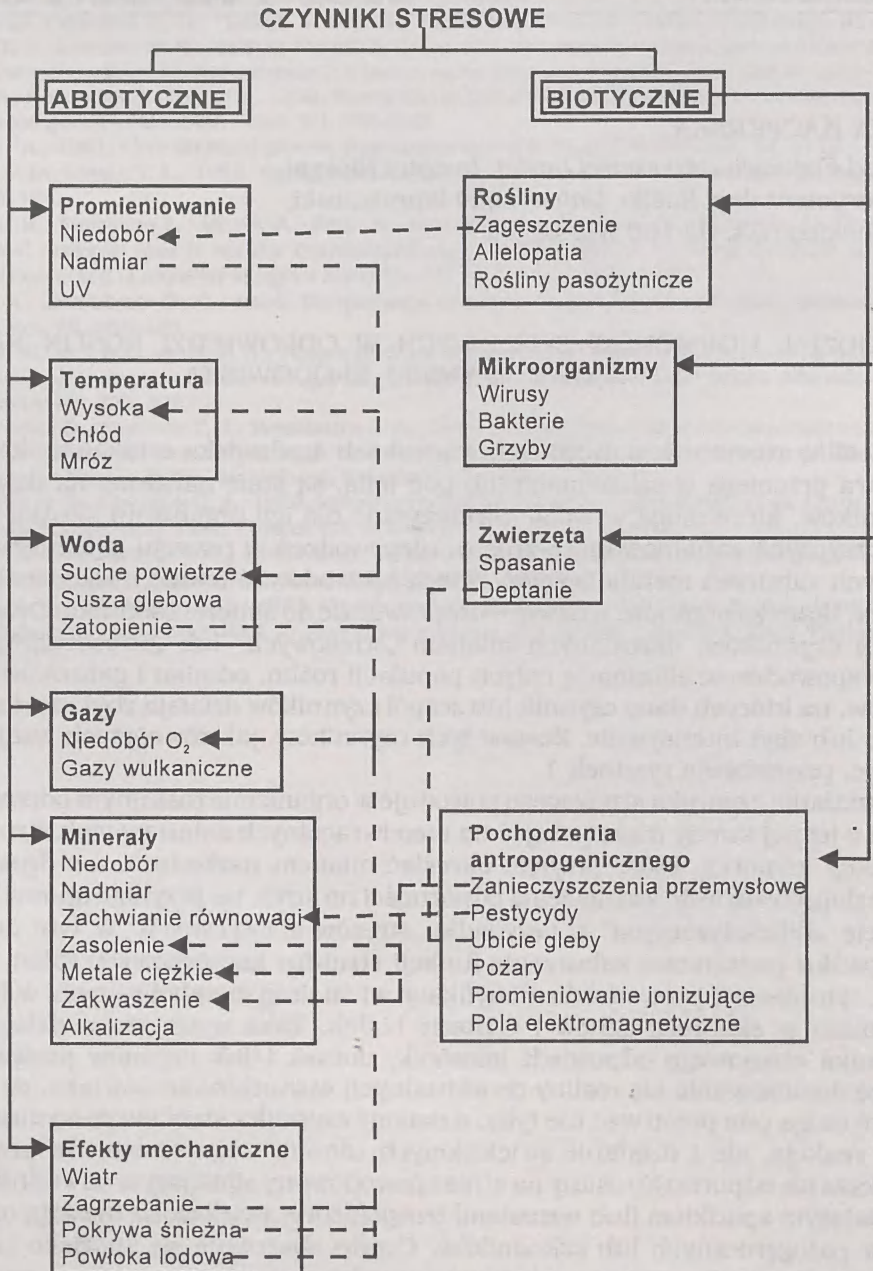
ALINA KACPERSKA

*Zakład Fizjologii Odporności Roślin, Instytut Biologii
Eksperymentalnej Roślin, Uniwersytet Warszawski,
Pawińskiego 5A, 02-106 Warszawa*

UDZIAŁ HORMONÓW ROŚLINNYCH W ODPOWIEDZI ROŚLIN NA STRESOWE CZYNNIKI ŚRODOWISKA

Rośliny rosnące w naturalnych warunkach środowiska a także te, których uprawa przebiega w szklarniach lub pod folią, są stale narażone na działanie czynników, które mogą wywołać niekorzystne dla ich organizmu skutki: mogą być przyczyną zahamowania wzrostu, niepowodzeń w rozwoju generatywnym, licznych zaburzeń metabolicznych, mogą spowodować trwałe uszkodzenia komórek, tkanek i organów, a nawet — doprowadzić do śmierci osobnika. Działanie takich czynników, określanых mianem „stresowych” lub „stresotwórczych”, może spowodować eliminację całych populacji roślin, odmian i gatunków z obszarów, na których dany czynnik lub zespół czynników działają zbyt często, zbyt długo lub zbyt intensywnie. Zestaw tych czynników, jak również ich wzajemne relacje, przedstawia rysunek 1.

Działanie czynnika stresowego powoduje w organizmie roślinnym odpowiedź, która z jednej strony może polegać na nieodwracalnych zaburzeniach struktury i funkcji komórek, które przyjęto określać mianem uszkodzeń, a z drugiej — może doprowadzić do zwiększenia odporności na stres, na przykład spowodować reakcję „aklimatyzacyjną” w przypadku stresów abiotycznych. W tym drugim przypadku początkowe zaburzenie funkcji struktur komórkowych (błon, organelli, cytoplazmy) prowadzi do modyfikacji wielu dróg metabolicznych, w tym — do zmian w ekspresji genów i syntezie białek. Taka wymuszona działaniem czynnika stresowego odpowiedź komórek, tkanek i/lub organów pozwala na lepsze dostosowanie się rośliny do aktualnych warunków środowiska, co sprawia że mogą one przetrwać nie tylko działanie czynnika stresowego wymuszającego reakcję, ale i działanie zwiększonych „dawek” tego stresu: na przykład zwiększa się odporność rośliny na stres spowodowany silniejszym odwodnieniem lub dalszym spadkiem (lub wzrostem) temperatury, zwiększoną inwazją organizmów patogenicznych lub szkodników. Często obserwuje się zjawisko zwane „cross protection” — wywołane jednym czynnikiem stresowym zmiany struktury błon i białek, podwyższające stabilność protoplazmy, przyczyniają się do zwiększenia odporności rośliny na inne stresy. Na przykład poddanie rośliny umiarkowanemu stresowi wodnemu zwiększa jej odporność na zamarzanie i *vice versa*, stres spowodowany zasoleniem może przyczynić się do zwiększenia odporności



Rys. 1. Stresowe czynniki środowiska i ich niektóre powiązania (za LARCHEREM 1995, zmodyfikowne).

roślin na zbyt niską lub zbyt wysoką temperaturę i na desykcję (silne odwodnienie). Znane są też przypadki, gdy stres mechaniczny lub inwazja patogena zwiększały odporność tkanki na dehydratację. Powstaje przypuszczenie, że odpowiedź rośliny na działanie różnych czynników stresowych znajduje się pod kontrolą jakiegoś jednego, podstawowego mechanizmu.

Reakcja rośliny na czynnik stresotwórczy może zachodzić w miejscu zadziałania czynnika lub też gdzieś indziej — w jakiejś innej tkance lub organie — ma wówczas charakter systemiczny. W tym drugim przypadku, informacja o powstaniu stanu stresowego w miejscu zadziałania czynnika zostaje przekazana do innych organów: z liści do korzeni i odwrotnie lub z liści do innych części pędu. W badaniach dotyczących odpowiedzi roślin na patogeny ten pierwszy typ reakcji określa się mianem nadwrażliwości (ang. hypersensitive responses, HS) natomiast reakcje systemiczne odpowiadają za tak zwaną odporność nabytą (ang. systemic acquired resistance, SAR). Informacja o powstaniu stanu zagrożenia (stanu stresowego) może mieć różne podłoże fizyczne: może być nią szybko przemieszczające się pobudzenie elektryczne (zmiany potencjału elektrycznego błon), zaburzenia stosunków wodnych w komórkach, zaburzenia transportu jonów i metabolitów, a także lub przede wszystkim — przemieszczania się w obrębie tkanek i organów specyficznych substancji — przekaźników informacji.

Nie ulega wątpliwości, że w reakcjach dostosowawczych rośliny do środowiska uczestniczą hormony roślinne. Wiadomo obecnie, że regulatory te pośredniczą nie tylko w odpowiedziach roślin na działanie czynników zaangażowanych w regulację ich „normalnego” wzrostu i rozwoju, takich jak długość dnia lub określona długość fal świetlnych (na przykład promieniowanie w zakresie czerwieni i dalekiej czerwieni, światło niebieskie), siła ciężenia czy odpowiednia dla danego stadium rozwojowego temperatura, ale i w odpowiedziach, które wiążą się z powstaniem „stanu stresowego” w organizmie roślinnym.

Jedną z pierwszych odpowiedzi rośliny na zadziałanie czynnika stresotwórczego jest zmiana równowagi hormonalnej, typowej dla okresu poprzedzającego to działanie. Dochodzi do zwiększenia podaży jakiegoś hormonu i/lub do obniżenia poziomu innych hormonów.

Najczęściej obserwowaną odpowiedzią roślin na działanie czynnika stresowego jest obniżenie poziomu tych hormonów, które uważa się za stymulatory wzrostu roślin (giberelin, cytokinin, czasem kwasu indoliloctowego), przy równoczesnym zwiększeniu poziomu hormonów zwykle hamujących wzrost elongacyjny komórek lub przyspieszających dojrzewanie i/lub starzenie się tkanek, a więc kwasu absycynowego (ABA), etylenu, kwasu jasmonowego lub jego estru metylowego (odpowiednio JA i JA-Me). Czy jednak można mówić, że te trzy ostatnie hormony to „hormony stresu”, inaczej hormony zaangażowane w regulację odpowiedzi roślin na stresowe czynniki środowiska? O tym, czy odpowiedź na to pytanie będzie pozytywna, mogą przesądzić następujące kryteria, dotyczące powiązań między czynnikiem a hormonem: 1) działanie czynnika stresotwórczego indukuje lub przyspiesza syntezę hormonu, 2) zahamowanie syntezy hormonu zapobiega wystąpieniu odpowiedzi na czynnik stresowy lub ją osłabia, 3) u mutantów genetycznych, charakteryzujących się niezdolnością do syntezy danego hormonu lub niewrażliwością na hormon podany z zewnątrz, nie występuje poszukiwana odpowiedź na czynnik stresowy, 4) zwiększenie podaży hor-

monu powoduje zmiany metaboliczne i modyfikacje strukturalne w komórkach podobne do tych, które wywołuje czynnik stresotwórczy, 5) reakcja na hormon pozwala osobnikowi na takie modyfikacje wzrostu i rozwoju, które przyczynią się do jego przetrwania, mimo że może to spowodować negatywne skutki dla jakiegoś organu, tkanek lub grupy komórek, na przykład prowadzi do przyspieszonego starzenia się i zrzucania liści, lignifikacji ścian, powstawania plam nekrotycznych (po ataku patogena) i innych.

Zastosowanie tych kryteriów pozwoliło na sklasyfikowanie ABA, etylenu i JA i jego pochodnych (JA-Me) jako hormonów stresu, aczkolwiek nie zawsze wiadomo, czy dany hormon spełnia te wszystkie kryteria; w niektórych przypadkach brak jeszcze konkretnych danych. W artykule niniejszym wykorzystano niektóre tylko spośród dostępnych danych, w celu zilustrowania raczej, niż udokumentowania zjawiska.

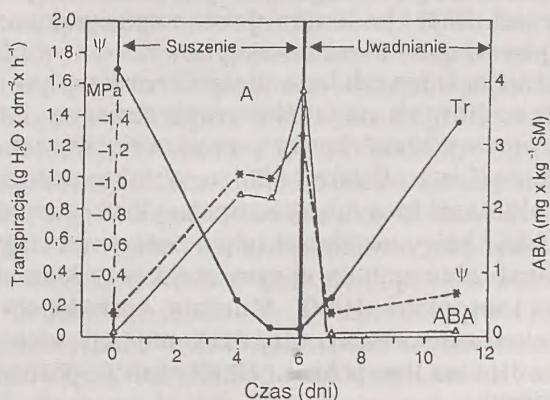
KWAS ABCYSYNOWY (ABA)

Kwas abscysynowy należy do seskwiterpenów, a jego prekursorem jest kwas mewalonowy. Biosynteza ABA w tkankach roślin wyższych może się odbywać na drodze bezpośredniej — w wyniku specyficznej cyklizacji pirofosforanu farnezylu lub pośredniej — w wyniku degradacji karotenoidu — wiolaksantyny, co ostatnio wydaje się bardziej prawdopodobne (PARRY i HORGAN 1991). Poziom ABA w komórkach zależy od szybkości syntezy tego hormonu, jego translokacji z innych tkanek i organów, a także od szybkości jego katabolizmu lub wiązania w biologicznie nieczynne koniugaty.

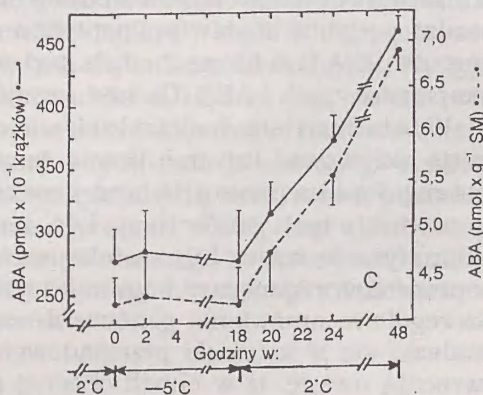
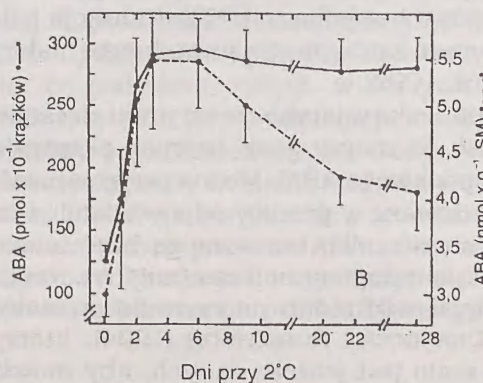
Porównanie zmian metabolicznych, wywołanych u roślin przez różne abiotyczne czynniki stresowe, wskazuje na podobieństwo reakcji wymuszonych suszą, zasoleniem lub niską temperaturą. Zaproponowano, iż pierwotnym podłożem tych zmian może być stres wodny (BOHNERT i współaut. 1995). Nie ulega obecnie wątpliwości, że poziom kwasu abscysynowego zwiększa się szybko wszędzie tam, gdy dochodzi do zmiany stosunków wodnych w komórkach pod wpływem czynników stresowych, na przykład pod wpływem suszy, chłodu, mrozu (rys. 2), a także wysokiej temperatury i zasolenia. Wywołane tymi czynnikami niewielkie nawet obniżenie potencjału wody w komórkach korzeni i/lub liści stymuluje syntezę tego hormonu lub/i powoduje jego uwolnienie z formy związanej (nieaktywnej biologicznie). Może on przemieszczać się w ksylemie z korzeni do liści lub z chloroplastów w komórkach mięksiszowych liścia do cytozolu i dalej — poprzez ściany komórkowe do komórek szparkowych, gdzie powoduje zamykanie się szparek (CORNISH i ZEEVAART 1985) lub do innych komórek i tkanek, gdzie wywołuje różnorodne efekty. Odpowiedź na ABA może wystąpić w bardzo krótkim czasie (na przykład zamykanie szparek w wyniku indukowanych przez ABA zmian w transporcie niektórych jonów do komórek szparkowych) lub wymaga dłuższego czasu do swojej realizacji (np. różnorodne odpowiedzi metaboliczne, w tym zmiany w fotosyntetycznym metabolizmie węgla, SEEMANN i SHARKEY 1987). Wskazuje to, że mechanizm działania ABA w odpowiedzi roślin na czynniki stresowe, jak i receptory tego hormonu mogą być bardzo różne.

Istnieją liczne dowody wskazujące na udział ABA w reakcjach aklimatyzacyjnych roślin. Jest to hormon polepszający gospodarkę wodną rośliny: z jednej strony powoduje zamykanie szparek, co pozwala ograniczyć transpirację, a z drugiej — może przyczyniać się do sprawniejszego pobierania i przewodzenia wody. Na przykład wykazano, że zarówno stres osmotyczny (zwiększający poziom endogennego ABA w pędach), jak i podanie ABA z zewnątrz powodowały zwiększenie eksudacji ze zdekapitowanych siewek słonecznika, co było wynikiem zarówno zwiększonego wydzielania jonów do soku ksylemu, jak i sprawniejszego pobierania wody w wyniku zwiększonego przewodnictwa hydraulicznego korzeni (LUDEWIG i współaut. 1988).

Winorośl



Rzepak ozimy



Rys. 2. Zmiany zawartości kwasu absycynowego w tkankach roślin poddanych: A — odwodnieniu (za LARCHEREM 1995, zmodyfikowane) lub B — działaniu chłodu i C — mrozu (SMOLEŃSKA i współaut. 1995).

Wiadomo, że zwiększenie ciśnienia osmotycznego w komórkach może być ważnym elementem mechanizmu umożliwiającego wzrost komórek w warunkach stresu wodnego (warunkiem tzw. dostosowania osmotycznego). W tym

kontekście specjalnego znaczenia nabierają obserwacje, że ABA bierze udział w regulacji syntezy takich substancji osmotycznie czynnych, jak prolina (QUARIE 1980) lub osmotyna (LAROSA i współaut. 1992).

Przetrwanie całego osobnika w warunkach stresowych może zależeć również od innych, idukowanych przez ABA odpowiedzi, w tym odpowiedzi wzrostowo-rozwojowych. Należy do nich ograniczanie intensywności transpiracji nie tylko poprzez zamykanie szparek, ale i zmniejszenie powierzchni transpiracyjnej na skutek zrzucania liści w okresach poprzedzających występowanie ostrych niedoborów wody w środowisku: w naszym klimacie również na jesieni. W warunkach klimatu umiarkowanego lub klimatu, w którym występują sezonowo niedobory wody, duże znaczenie dla przetrwania roślin ma zapadanie pąków, bulw, cebul i nasion w stan głębokiego spoczynku. Nie ulega dziś wątpliwości, że hormonem, który indukuje i podtrzymuje stan spoczynku organów lub form przetrwalnikowych jest właśnie kwas abscysynowy.

W innych badaniach udowodniono bezpośredni wpływ ABA na poziom odporności komórek roślinnych na jakiś czynnik stresowy. I tak wykazano, że podanie ABA do zawiesiny komórkowej powodowało wzrost odporności tych komórek na zamarzanie (CHEN i GUSTA 1983), a zablokowanie syntezy ABA przez podanie fluridonu (inhibitora biosyntezy karotenoidów) spowodowało jej obniżenie. Wykazano, że ABA, który zwiększał odporność zawiesiny komórkowej na zamarzanie powodował takie zmiany w syntezie ściany komórkowej, jak niska temperatura (TANINO i współaut. 1990). Mutanty *Arabidopsis thaliana*, charakteryzujące się zablokowaniem biosyntezy ABA, nie były zdolne do zwiększenia odporności na mróz (HEINO i współaut. 1990), lub odporności na desykcję (MEURS i współaut. 1992).

Udowodniono też rolę ABA w regulacji biosyntezy białek. Na przykład badanie produktów translacji *in vitro* poli(A)RNA z siewek jęczmienia, poddanych działaniu umiarkowanego stresu wodnego lub ABA wykazało, że był syntetyzowany bardzo podobny zestaw polipeptydów (GROSSI i współaut. 1992). Indukcja jednego z mRNA (1,5 kb) zachodziła pod wpływem zarówno stresu wodnego, niskiej temperatury, jak i ABA (GROSSI i współaut. 1992).

W ostatnich latach ukazało się wiele prac wskazujących, że czynniki stresowe mogą aktywować lub indukować geny *rab*, to znaczy geny, których ekspresja jest regulowana przez ABA (ang. genes responsive to ABA). Można przypuszczać, że produkty tych genów mogą być zaangażowane w procesy odpowiedzialne za aklimatyzację roślin lub za tolerowanie stresu, albo też — mogą brać udział w procesach regeneracji komórek i roślin po ustąpieniu stresu (ang. recovery). Szczegółowe omówienie genów *rab* w odpowiedzi roślin na czynniki stresowe znalazło się w artykule przeglądowym CHANDLER i ROBERTSON (1994), którzy zwracają uwagę, iż w chwili obecnej za mało jest jeszcze danych, aby mówić o fizjologicznej roli produktów genów *rab* w odporności na stesy, gdyż dla większości tych genów nie jest znana funkcja biochemiczna ich produktów. Udział genów *rab* w reakcjach roślin na czynniki stresowe możnaby zbadać wykorzystując rośliny transgeniczne, u których dochodziłoby albo do wzmożonej ekspresji danego genu (ang. over expression) albo — ekspresja ta ulegałaby zaburzeniom w wyniku wytworzenia antysensownego RNA. Tego typu podejścia sprawdziły się w badaniach dotyczących roli na przykład acylotransferazy

glicerolo-3 fosforanu w odpowiedzi roślin na chłód (MURATA i współaut. 1992) lub dehydrogenazy mannitolo-1-fosforanu w odporności roślin tytoniu na zasolenie (TARCZYŃSKI i współaut. 1993). Niestety, jak narazie brak tego typu danych na temat udziału genów *rab* w odporności roślin na stresy. Tym nie mniej, w badaniach, w których wykorzystano mutanty *Arabidopsis thaliana*, charakteryzujące się obniżoną zawartością ABA (mutacja *aba*) lub niewrażliwe na ABA (mutacja *abi*) stwierdzono, że ekspresja tylko niektórych genów *cor/lti* (ang. cold-regulated albo low temperature-induced) zależała od ABA (NORDIN i współaut. 1991). Okazało się też, że mutanty *aba* i *abi3* nie były zdolne do syntezy stabilnych w wysokiej temperaturze białek grupy LEA (ang. late embryogenesis abundant), które odgrywają prawdopodobnie ważną rolę w odporności komórek na odwodnienie. Białka należące do grupy 2 LEA, znane również pod nazwą dehydryn, często są synonimem białek RAB lub COR. Zaproponowano potencjalną rolę produktów niektórych genów *cor*, między innymi tych, które zależą od ABA: według THOMASHOW'a (1993) białka te mogą chronić błony chloroplastów przed skutkami zamarzania (na przykład białko COR15), stabilizować struktury komórkowe w warunkach desykcji (COR47, podobne do białek LEA), modyfikować proces zamarzania (białko COR6.6, homologiczne z KIN1).

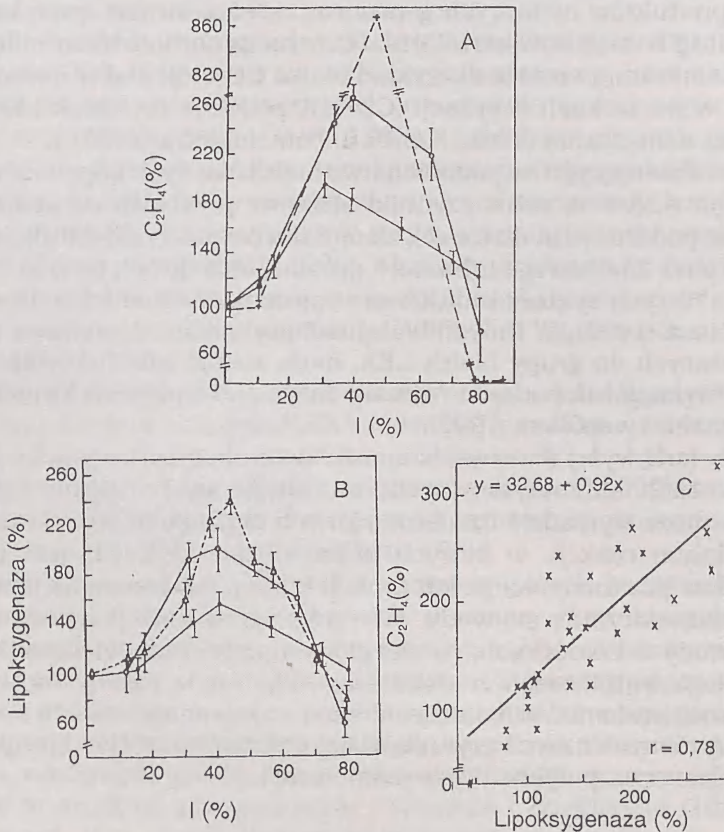
Danych wskazujących na podobieństwo molekularnych odpowiedzi komórek roślinnych na ABA i na różne czynniki stresowe przybywa coraz więcej. I tak wykazano, że podanie ABA do siewek ziemniaka powodowało indukcję i akumulację mRNA *pin2* (białkowego inhibitora proteaz) oraz dwóch innych białkowych inhibitorów, których syntezę indukowało zranienie mechaniczne tkanek (HILDMANN i współaut. 1992). W innych badaniach wykazano, że synteza niektórych białek, należących do grupy białek LEA, może zostać zaindukowana nie tylko w wyniku desykcji lub podania ABA, ale także pod wpływem kwasu jasmonowego (REINBOTHE i współaut. 1992).

Przedstawione wyżej dane wskazują, że kwas absycynowy pełni regulującą rolę w procesach aklimatyzacyjnych, umożliwiających roślinie ograniczenie szkód, jakie może wyrządzić działanie różnych czynników stresowych. Wydaje się, że podłożem reakcji, w których bierze udział ABA, nie jest naruszenie struktury błon lecz modyfikacja ich funkcji takich, jak transport jonów i metabolitów, przemieszczanie się wody. W wyniku tych reakcji następuje spadek potencjału wody w komórkach, co jest główną przyczyną zwiększenia poziomu ABA. Nie ulega wątpliwości, że ostateczna odpowiedź rośliny na wymuszony stresem wzrost poziomu ABA zależy od skomplikowanego układu współdziałających z ABA różnych innych czynników fizjologicznych, w tym i innych hormonów stresu (patrz na przykład kwas jasmonowy).

ETYLEN

Etylen, który stanowi najprostszą olefinę (C_2H_4) i występuje w stanie gazowym, reguluje w organizmie roślinnym wiele procesów zaangażowanych we wzrost, rozwój i starzenie się tkanek, dojrzewanie owoców, a także w odpowiedzi roślin na różne stresowe czynniki środowiska. Stymulacja syntezy etylenu w tkankach poddanych działaniu stresu jest tak „uniwersalną” reakcją, że

etylen, powstający w wyniku działania czynnika stresowego określa się nazwą „etylen stresowy” lub „wound ethylene” w języku angielskim. Indukcja etylenu stresowego zachodzi w wyniku mechanicznego uszkodzenia komórek (cięcia, nakłuwania, drapania, infekcji przez owady), pod wpływem promieniowania, stresu termicznego (temperatury zbyt niskiej lub zbyt wysokiej), odwodnienia, zatopienia, oddziaływań chemicznych (herbicydów, metali, ozonu, SO_2 i innych polutantów), a także w wyniku infekcji wirusowej i ataku patogena (YANG i HOFFMAN 1984). Zachodzi tylko w żywych komórkach, które reagują na czynnik stresowy przejściową, funkcjonalną destabilizację błony komórkowej, manifestującą się niewielkim wyciekaniem jonów z komórek (rys. 3). W komórkach wykazujących duże, nieodwracalne uszkodzenia błon synteza etylenu spada, a komórka zamiera.



Rys. 3. Synteza etylenu (A) i aktywność lipoksygenazy (B) w tkankach roślinnych, wykazujących różny poziom uszkodzeń (I) spowodowanych mrozem. C — zależność między powstawaniem stresowego etylenu i aktywnością lipoksygenazy w uszkodzonych mrozem tkankach (KACPERSKA i KUBACKA-ZĘBALSKA 1985, zmodyfikowane).

Etylen powstaje z metioniny w wyniku jej kolejnych przemian w tak zwanym cyklu metioninowym (ADAMS i YANG 1979, YANG i HOFFMAN 1984), w którym

pośrednimi produktami przemian są S-adenosylometionina (SAM) i kwas 1-aminocyklopropano-1-karboksyowy (ACC). Wiadomo, że zwiększenie produkcji etylenu pod wpływem czynników stresowych lub elicitorów (na przykład niskocząsteczkowych produktów rozpadu ściany komórkowej) zachodzi w wyniku zwiększonej podaży bezpośredniego prekursora etylenu, ACC (YANG i HOFFMAN 1984), czego przyczyną jest aktywacja syntazy ACC. Aktywacja syntazy ACC może też zachodzić pod wpływem kwasu absycynowego (RIOV i współaut. 1990), natomiast kwas salicylowy blokuje tę reakcję (LESLIE i ROMANI 1986). Wykazano też, że akumulacja indukowanego stresem mechanicznym transkryptu genu syntazy ACC w owocach pomidora była blokowana przez poliaminy i kwas salicylowy (LI i współaut. 1992). O poliaminach wiadomo, że zwiększają stabilność struktur komórkowych w warunkach różnych stresów, natomiast kwas salicylowy jest cząsteczką sygnałową w systemicznych odpowiedziach rośliny na atak patogena (CHEN i KLESSIG 1991).

Reakcję utlenienia ACC do etylenu katalizuje oksydaza ACC (dawniej EFE, ang. ethylene forming enzyme), która jest białkiem konstytucyjnym o poznanej już sekwencji aminokwasów (YANG i DONG 1993). Tym niemniej, w warunkach stresowych, powodujących powstawanie aktywnych form tlenu (O_2^- , OH^-) może dochodzić do nieenzymatycznego utlenienia ACC do tlenu (YANG i HOFFMAN 1984), między innymi w reakcji utleniania wielonienasyconych kwasów tłuszczowych, katalizowanej przez lipoksygenazę (KACPERSKA i KUBACKA-ZĘBALSKA 1989, rys. 3).

Niewiele jest danych na temat skutków zablokowania syntezy etylenu stresowego, na przykład po podaniu inhibitorów jego syntezy (analogów winyloglicyny, hydroksylaminy, jonów Co^{2+} lub Ni^{2+} , YANG i HOFFMAN 1984) lub w wyniku zastosowania technik biologii molekularnej, takich jak na przykład wprowadzenie do rośliny nonsensownego genu oksydazy ACC (HAMILTON i współaut. 1990) lub wywołanie mutacji, blokującej na przykład percepcję etylenu (LANAHAN i współaut. 1994). Zabiegi te wykonywano z powodzeniem na roślinach na przykład pomidora, skutecznie zapobiegając dojrzewaniu owoców lub starzeniu się i odpadaniu kwiatów, które to procesy przebiegały pod kontrolą etylenu. Podobnie, wysoce specyficzne efekty morfogenetyczne etylenu (zahamowanie elongacji hypokotyła, zgrubienie hypokotyła i „zaciskanie” wygięcia podwierzchołkowego hypokotyła) wykorzystano do pozyskania zarówno konstytucyjnych (zdolnych do „nadprodukcji” etylenu), jak i niewrażliwych na etylen mutantów *Arabidopsis*, które służą między innymi do badania miejsca działania etylenu w systemie transdukcji sygnału (BOWLER i CHUA 1994). Jak dotąd, brak takich prac w odniesieniu do roli etylenu w reakcjach roślin na czynniki stresowe.

Można jednak przypuszczać (HARBER i FUCHIGAMI 1989), że takie odpowiedzi roślin na etylen, jak zahamowanie elongacyjnego wzrostu tkanek i stymulacja przyrostu na grubość, przyspieszanie starzenia i odpadania liści, indukcja powstawania korzeni przybyszowych, indukcja powstawania tkanki „przewietrzającej” (aerenchymy) w korzeniach (DREW i współaut. 1981), zwiększenie osmolalności soku komórkowego, stymulacja produkcji fitoaleksyn, stymulacja syntezy bogatych w hydroksyprolinę glikoprotein, odgrywają rolę w aklimatyzacji roślin do takich stresowych czynników środowiska, jak nadmiar lub niedobór wody, zamarzanie wody, perturbacje mechaniczne (wywołane na przykład uci-

skiem lub działaniem wiatru). Ważnym elementem odporności roślin na te stresy jest modyfikacja własności ściany komórkowej pod wpływem etylenu. Wykazano między innymi, że zahamowanie biosyntezy etylenu u roślin poddanych oddziaływaniu mechanicznego stresu zapobiegało nabywaniu przez te rośliny odporności na suszę i mróz (JAFFE 1984). Poddanie roślin działaniu egzogenego etylenu zwiększało odporność roślin pomidora na suszę, a także odporność niektórych drzew owocowych na zamarzanie (HARBER i FUCHIGAMI 1989). Należy też dodać, że przyspieszone pod wpływem etylenu odpadanie liści przyczynia się do obniżenia transpiracji w warunkach stresu wodnego (poprzez ograniczenia transpirującej powierzchni).

Badania, dotyczące odpowiedzi roślin na patogeny, takie jak grzyby, bakterie i wirusy wykazały, że etylen odgrywa ważną rolę w patogenezie: w zależności od badanego systemu może albo idukować reakcje obronne w roślinie gospodarzu, albo może działać synergistycznie, przyspieszając rozwój symptomów chorobowych (BELL 1981, BOLLER 1982). Między innymi etylen uczestniczy w regulacji szlaku syntezy fenylopropanoidów, aktywując kluczowy dla tego szlaku enzym amoniakoliazę fenyloalaniny (PAL), stymuluje często produkcję fitoaleksyn, przyczynia się do zablizniania ran (YANG i PRATT 1978). Udział etylenu w indukcji specyficznych genów (ang. plant defense genes) i białek (PR, ang. pathogen related) jest już dobrze udokumentowany (np. ECKER i DAVIS 1987). Przyspieszone pod wpływem etylenu powstawanie plam nekrotycznych (w wyniku degradacji komórek w miejscu infekcji), wzmóżona lignifikacja ścian komórkowych, przyspieszone odpadanie liści powodują ograniczanie i hamowanie rozprzestrzeniania się patogena w obrębie rośliny (DUTTA i BIGGS 1991).

Tak więc udział etylenu w odpowiedziach roślin na różnorodne czynniki stresowe nie ulega obecnie wątpliwości. Przedstawione wyżej dane wskazują, że nie jest to dodatkowy produkt (ang. by-product) pewnych dróg metabolicznych, indukowanych stresem, jak to do dziś sugerują niektórzy badacze. Można obecnie proponować, że jest to substancja o działaniu sygnałowo-regulacyjnym. Wydaje się, że hormon ten współdziała z innymi hormonami w regulacji morfogenetycznych i fizjologicznych odpowiedzi roślin na czynniki stresowe, co prowadzi do zwiększonej odporności organizmu na stres. Mechanizm działania tego hormonu wymaga dalszych badań, wiążących się przede wszystkim z mechanizmem jego percepcji (problem receptorów) i udziału w transdukcji sygnału środowiskowego.

JASMONIANY

Kwas jasmonowy (JA) i jego ester metylowy (JA-Me) należą do powszechnie występujących w świecie roślinnym biologicznie czynnych związków cyklopentanonu (MEYER i współaut. 1984, SEMBDNER i PARTHIER 1993). Związki te mogą hamować, stymulować lub indukować wiele reakcji wzrostowych i rozwojowych w roślinach (SEMBDNER i PARTHIER 1993). Do niedawna uważane za „domniemane fitohormony”, obecnie coraz powszechniej są zaliczane do tej właśnie klasy regulatorów wzrostu i rozwoju roślin.

Substratem do syntezy kwasu jasmonowego jest nienasycony kwas tłuszczowy: kwas linolenowy, który ulega peroksydacji w reakcji katalizowanej przez lipoksygenazę. Dalsze przemiany produktów tej reakcji, 13-hydroksynadtlenku kwasu linolenowego prowadzą do powstania kwasu (+)-7-izo-jasmonowego, który ulega izomeryzacji do (-)-JA (SEMBDNER i PARTHIER 1993).

Istnieje kilka hipotez, dotyczących roli kwasu jasmonowego w życiu rośliny. Między innymi bierze się pod uwagę rolę tego związku jako czynnika zaangażowanego w regulację starzenia się tkanek lub — jako czynnika zaangażowanego w reakcję roślin na stres. Fakt, że można zablokować lub rozdzielić w czasie rozwój symptomów starzenia i specyficzne efekty działania JA (na poziomie syntezy białka) sprawia, że powiązanie syntezy JA z odpowiedziami na czynniki stresowe stało się bardziej prawdopodobne (SEMBDNER i PARTHIER 1993).

Od dawna wiadano, że w tkankach poddanych działaniu czynników stresowych, takich jak zranienie, dehydratacja, zbyt intensywne promieniowanie, niska temperatura, zachodzi peroksydacja nienasyconych kwasów tłuszczowych. Wykazano, że produktem dalszych przemian powstających w tej reakcji hydroksynadtlenków lipidów może być kwas „traumatynowy”, hipotetyczny hormon zranienia Haberlandta (ang. wound hormone), zidentyfikowany jako kwas 12-oxo-*trans*-10-dodecenowy (ZIMMERMAN i COUDRON 1979). Ostatnio udowodniono, że takie czynniki, jak zranienie (CREELMAN i współaut. 1992), elicytacja (potraktowanie tkanki niskocząsteczkowymi produktami degradacji ściany komórkowej, np. oligosacharydami) (GUNDLACH i współaut. 1992), stres osmotyczny i desykacja (BELL i MULLET 1991, WASTERNAK i współaut. 1995), a nawet dotyk wrażliwej tkanki, na przykład wąsów czepnych (WEILER i współaut. 1993) prowadzą do wzrostu zawartości endogennego kwasu jasmonowego, co powoduje zmiany w ekspresji wielu genów.

Stwierdzono, że egzogeny JA indukuje zmiany w syntezie wielu białek. Obecnie znanych jest już stosunkowo wiele białek indukowanych przez JA, określonych jako JIPs (ang. jasmonate-induced proteins). Ze względu na funkcję, jaką pełnią te białka u roślin dwuliściennych można je podzielić na 5 różnych klas (WASTERNAK i współaut. 1995). Do białek mających znaczenie w reakcjach na stres należą na pewno inhibitory proteinaz, enzymy zaangażowane w syntezę alkaloidów, lipoksygenazy, białka bogate w glicynę i hydroksyprolinę, zlokalizowane w ścianach komórkowych. Stwierdzono też indukcję białek, których funkcja nie jest znana lub tylko domniemana (SEMBDNER i PARTHIER 1993). Z zestawienia, przedstawionego w tabeli 1 wynika, że synteza wielu białek JIP może być indukowana nie tylko czynnikiem stresowym (powodującym zawsze zwiększenie poziomu endogennego JA), ale i przez inny fitohormon, kwas abscysynowy. Synteza tego hormonu, jak wiadomo, ulega indukcji pod wpływem czynników stresowych, które również indukują syntezę JA (patrz wyżej).

Z drugiej strony wiadomo, że pewne białka, których synteza zaczyna się w wyniku podania JA lub zranienia tkanki, nie ulegają indukcji pod wpływem egzogenego ABA (SEMBDNER i PARTHIER 1993). Powstaje więc pytanie, czy JA i AB współdziałają, czy działają niezależnie na drodze transdukcji sygnału? Poszukiwanie odpowiedzi na to pytanie jest przedmiotem dalszych badań, ale już obecnie dostępne dane przemawiają za komplementarnym oddziaływaniem ABA i JA na drodze przewodzenia sygnału (SEMBDNER i PARTHIER 1993), co się

zgadza z poprzednio sformułowanym przypuszczeniem, że w odpowiedziach, w których uczestniczy ABA, nie dochodzi do naruszenia struktury błony lecz do zmian potencjału wody w komórce. Natomiast synteza JA jest uwarunkowana uwolnieniem nienasyconych kwasów tłuszczowych z lipidów błon, co zachodzi w wyniku aktywacji odpowiednich acylohydrolaz przez czynnik stresowy.

Tabela 1

Białka indukowane kwasem jasmonowym lub estrem kwasu jasmonowego (wg SEMBDNERA i PARTHIERA 1993).

Białko	Pochodzenie	Ciężar cząsteczkowy (kDa)	Inne induktory
Inhibitory proteinyazy I i II	liście pomidora	8, 12	ABA, zranienie
Inhibitor proteinyazy I	liście ziemniaka		ABA, sacharoza
Inhibitor trypsyny	liście lucerny	6	zranienie
Lipoksygenaza	siewki soi, grochu		zranienie
Amoniakoliza fenyloalaniny	liście jęczmienia		zranienie, desykcja
Syntaza chalkonowa	zawiesina komórkowa z soi		oligosacharyny
Białka zapasowe z tkanek wegetatywnych (alfa i beta)	soja: liście, siewki, kultury komórkowe	27 (28), 29 (31) 94	zranienie, desykcja, cukry rozpuszczalne
Napina, krucyferyna	zarodki rzepaku		zranienie
Białka o nieznannej funkcji (wśród nich domniemane białka osmoprotekcyjne)	wycinki z liści jęczmienia	10/12, 23, 30, 37, 52, 66/68, 88	ABA, sorbitol, cukry, desykcja
Białka o nieznannej funkcji (wśród nich podobne do LEA?)	liścienie bawełny	18, 20, 23, 25, 30, 35, 40, 67	ABA
Nieznana funkcja	liście pomidora	63, 5, 87	zranienie

PODSUMOWANIE

Na podstawie przedstawionych wyżej danych można proponować, iż trzy omówione fitohormony: kwas absycynowy, etylen i kwas jasmonowy pełnią regulacyjną rolę w odpowiedzi roślin na czynniki stresowe, a więc można je określać jako hormony stresu. Należałoby się jednak zastanowić, czy termin ten jest adekwatny w stosunku do roli, którą pełnią w komórkach roślinnych. Czy nie należałoby ich wydzielić w odrębną grupę substancji, których rola wiązałaby się przede wszystkim z przewodzeniem sygnału w organizmie roślinnym (ang. plant-specific signal transmitter substances), do której należałoby zaliczyć też oligosacharyny i pewne oligopeptydy tak, jak to zaproponowali SEMBDNER i PARTHIER (1993)? A jeśli tak, to do tej grupy substancji należałoby dodać jeszcze (a może przede wszystkim ?) kwas salicylowy, który jest produktem peroksydacji flawonoli i który w roślinach pełni funkcję „endogenego” sygnału w reakcjach roślin na patogena (JONES 1994). Związek ten może powstawać w miejscu

zranienia, gdzie bierze udział w reakcjach nadwrażliwości (ang. hypersensitive reaction) lub — może zostać przeniesiony we floemie lub w strumieniu transpiracyjnym w ksylemie do innych części rośliny, gdzie powoduje reakcję obronną typu systemicznego (ang. systemic acquired response, SAR) w wyniku szybkiej indukcji ekspresji genów *pr* (ang. pathogen-related). Należy tu dodać, że prace CHENA i współpracownikw z grupy KLESSIGA (CHEN i KLESSIG 1991, CHEN i współaut. 1993) wykazały, iż działanie kwasu salicylowego może się wiązać z zahamowaniem katalazy, enzymu usuwającego aktywne formy tlenu w komórkach eukariotycznych. Rysuje się fascynująca możliwość, iż pierwotnym podłożem różnych odpowiedzi roślin na czynniki stresowe, naruszające strukturę błon, jest zwiększenie ilości aktywnych form tlenu, które powstają między innymi w reakcji peroksydacji lipidów, katalizowanej przez lipoksygenazę. W tym kontekście etylen, kwas jasmonowy i salicylowy mogłyby uczestniczyć w regulacji odpowiedzi „alarmowych” na czynnik stresowy, w przeciwieństwie do odpowiedzi „fizjologicznych”, w których regulacji zaangażowany byłby przede wszystkim kwas abscysynowy. Zastanowienie się nad tym problemem mogłoby być tematem odrębnego opracowania.

THE PHYTOHORMONE INVOLVEMENT IN PLANT RESPONSES TO ENVIRONMENTAL STRESS FACTORS

Summary

On the basis of the current literature data the following criteria of the hormone involvement in plant responses to stress factors are discussed: 1) the relationship between the stress action and synthesis of a hormone, 2) the effects of inhibition of a hormone synthesis on plant responses to different stressors, 3) the effects of an exogenous hormone on plant metabolism, with special emphasis on the stress- or hormone-induced alterations in gene expression and protein synthesis, 4) the hormone-induced modifications in plant growth and development, which may be of significance in avoidance or tolerance of different environmental constraints. It is shown that three phytohormones: abscisic acid, ethylene and jasmonates comply with most of the proposed requirements for the putative role of a hormone in plant stress responses. Therefore, they can be considered as "stress hormones". Abscisic acid-dependent responses seem to be related primarily to alterations in plant/tissue water status. On the other hand, ethylene and jasmonates seem to be involved in the control of alarm reactions in plants, which are triggered by structural destabilization of a membrane and lipid peroxidative breakdown.

LITERATURA

- ADAMS D. O., YANG S. F., 1979. *Ethylene biosynthesis: identification of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid as an intermediate in the conversion of methionine to ethylene*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 170-174.
- BELL A. A., 1981. *Biochemical mechanisms of disease resistance*. Annu. Rev. Plant Physiol. 32, 21-81.
- BELL E., MULLEN J. E., 1991. *Lipoxygenase gene expression is modulated in plants by water-deficit, wounding and methyl-jasmonate*. Mol. Gen. Genet. 230, 456-462.
- BOHNERT H. J., NELSON D. E., JENDSEN R. G., 1995. *Adaptations to environmental stresses*. The Plant Cell 7, 1099-1111.
- BOLLER T., 1982. *Ethylene-induced biochemical defenses against pathogens*. [W:] *Plant Growth Substances*. WAREING P. F. (red.), Academic Press New York, NY, 303-312.
- BOWLER C., CHUA N. -H., 1994. *Emerging themes of plant signal transduction*. The Plant Cell 6, 1529-1541.

- CHANDLER P. M., ROBERTSON M., 1994. *Gene expression regulated by abscisic acid and its relation to stress tolerance*. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 45, 113-141.
- CHEN T. H., -H., GUSTA L. V., 1983. *Abscicis acid-induced freezing tolerance in cultured plant cells*. Plant Physiol. 73, 71-76.
- CHEN Z., KLESSIG D. F., 1991. *Identification of a soluble salicylic binding protein that may function in signal transduction in the plant disease resistance response*. Proc.Natl. Acad. Sci. USA 88, 8179-8183.
- CHEN Z., SILVA H., KLESSIG D. F., 1993. *Active oxygen species in the induction of plant systemic acquired resistance by salicylic acid*. Science 262, 1883-1886.
- CORNISH K., ZEEVAART A. D., 1985. *Movement of abscisic acid into the apoplast in response to water stress in Xanthium strumarium L.* Plant Physiol. 78, 623-626.
- CREELMAN R. A., TIERNEY M. L., MULLET J. E., 1992. *Jasmonic acid/methyl jasmonate accumulate in wounded soybean hypocotyl and modulate wound gene expression*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89, 4938-4941.
- DUTTA S., BIGGS R. H., 1991. *Regulation of ethylene biosynthesis in citrus leaves infected with Xanthomonas campestris pv. citri*. Physiol. Plant. 82, 225-230.
- DREW M. C., JACKSON M. B., GIFFARD S. C., CAMPBELL R., 1981. *Inhibition by silver ions of gas space (aerenchyma) formation in adventitious roots of Zea mays L. subjected to exogenous ethylene or to oxygen deficiency*. Planta 153, 217-224.
- ECKER J., DAVIS R. W., 1987. *Plant defense genes are regulated by ethylene*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 5202-5206.
- GROSSI M., CATTIVELLI L., TERZI V., STANCA M., 1992. *Modification of gene expression induced by ABA, in relation to drought and cold stress in barley shoots*. Plant Physiol. Biochem. 30, 97-103.
- GUNDLACH H., MÜLLER M. J., KUTCHAN T. M., ZENK M. H., 1992. *Jasmonic acid is a signal transducer in elicitor-induced plant cell culture*. Proc.Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89, 2389-2393.
- HAMILTON A. J., LYCETT G. W., GRIERSON D., 1990. *Antisense gene that inhibits synthesis of the hormone ethylene in transgenic plants*. Nature 346, 284-287.
- HARBER R. M., FUCHIGAMI L. H., 1989. *Ethylene-induced stress resistance*. [W:] *Low Temperature Stress Physiology in Crop Plants*. Li P. H. (red). CRC Press, Boca Raton, Florida, 81-89.
- HILDMAN T., EBNETH M., PENA-CORTÉS SÁNCHEZ-SERRANO J. J., WILLMITZER L., PRAT S., 1992. *General roles of abscisic and jasmonic acids in gene activation as a result of mechanical wounding*. The Plant Cell 4, 1157-1170.
- HEINO P., SANDMAN G., LANG V., NORDIN K., PALVA E. T., 1990. *Abscicic acid deficiency prevents the development of freezing tolerance in Arabidopsis thaliana (L.) Heynh.* Theor. Appl. Genet. 79, 801-806.
- JAFFE M. J. 1984., *The involvement of callose and elicitors in ethylene production caused by mechanical perturbation*. [W:] *Ethylene: Biochemical, Physiological and Applied Aspects*. FUCHS Y., CHALUTZ E. (red).Marinus Nijhoff/Dr. W. Jung Pub., The Netherlands, 199-204.
- JONES A. M., 1994. *Surprising signals in plant cells*. Science 263, 183-184.
- KACPERSKA A., KUBACKA-ZĘBALSKA M., 1985. *Is lipoxigenase involved in the formation of ethylene from ACC ?* Physiol. Plant. 18, 339-347.
- KACPERSKA A., KUBACKA-ZĘBALSKA M., 1989. *Formation of stress ethylene depends both on ACC synthesis and the activity of free radical-generating system*. Physiol.Plant. 77, 231-237.
- LANAHAN M. B., YEN H. -C., GIOVANNONI J. J., KLEE H. J., 1994. *The Never Ripe mutation blocks ethylene perception in tomato*. The Plant Cell. 6, 521-530.
- LARCHER W., 1995. *Physiological Plant Ecology*. Berlin-Heidelberg, 332-334.
- LAROSA P. C., CHEN Z., NELSON D. E., SINGH N. K., HASEGAWA P. M., BRESSAN R. A., 1992. *Osmotin gene expression is postranscriptionally regulated*. Plant Physiol. 100, 409-415.
- LESLIE C. A., ROMANI R. J., 1986. *Salicylic acid: a new inhibitor of ethylene biosynthesis*. Plant Cell Rep. 5, 144-146.
- LI N., PARSONS B., LIU D., MATTOO A. K., 1992. *Accumulation of wound-inducible ACC synthase transcript in tomato fruit is inhibited by salicylic acid and polyamines*. Plant Molecular Biology 18, 477-487.
- LUDEWIG M., DÖRFLING K., SEIFERT H., 1988. *Abscicic acid and water transport in sunflowers*. Planta 175, 325-333.
- MEYER A., MIERSCH O., BUTTNER C., DATHE W., SEMBDNER G., 1984. *Occurrence of plant growth regulator jasmonic acid in plants*. J. Plant Growth Regul. 3, 1-8.
- MEURS C., BASRA A. S., KARSSSEN C. M, van LOON L. C., 1992. *Role of abscisic acid in the induction of desiccation tolerance in developing seeds of Arabidopsis thaliana*. Plant Physiol. 98, 1489-1493.

- MURATA N., ISHIZAKI-NISHIZAWA O., HIGASHI S., HAYASHI H., TASAKA Y., NISHIDA I., 1992. *Genetically engineered alteration in chilling sensitivity of plants*. Nature 356, 710-713.
- NORDIN K., HEINO P., PALVA E. T., 1991. *Separate signal pathways regulate the expression of a low temperature-induced gene in Arabidopsis thaliana (L.) Heynh.* Plant Mol. Biol. 16, 1061-1071.
- PARRY A. D., HORGAN R., 1991. *Carotenoids and abscisic acid (ABA) biosynthesis in higher plants*. Physiol. Plant. 82, 320-326.
- QUARRIE S. A., 1980. *Genotypic differences in leaf water potential, abscisic acid and proline concentrations in spring wheat during drought stress*. Ann. Bot. 46, 393-394.
- REINBOTHE S., REINBOTHE C., LEHMANN J., PARTHIER B., 1992. *Differential accumulation of methyl jasmonate-induced mRNAs in response to abscisic acid and desiccation in barley (Hordeum vulgare)*. Physiol. Plant. 86, 49-56.
- RIOV J., DAGAN E., GOREN R., YANG S. F., 1990. *Characterization of abscisic acid-induced ethylene production in Citrus leaf and tomato fruit tissues*. Plant Physiol. 92, 48-53.
- SEMBDNER G., PARTHIER B., 1993. *The biochemistry and the physiological and molecular actions of jasmonates*. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 44, 569-589.
- SEEMANN J. R., SHARKEY T. D., 1987. *The effect of abscisic acid and other inhibitors on photosynthetic capacity and the biochemistry of CO₂ assimilation*. Plant Physiol. 84, 696-700.
- SMOLEŃSKA G., GAWROŃSKA H., KACPERSKA A., 1995. *Modifications of abscisic acid level in winter oilseed rape leaves during acclimation of plants to freezing temperatures*. Plant Growth Regulation 17, 61-65.
- TANINO K. K., CHEN T. H. H., FUCHIGAMI L. H., WEISER C., 1990. *Metabolic alterations associated with abscisic acid-induced frost hardiness in bromegrass suspension culture*. Plant Cell Physiol. 31, 505-511.
- TARCZYŃSKI M. C., JENSEN R. G., BOHNERT H. J., 1993. *Stress protection of transgenic tobacco by production of osmolyte mannitol*. Science 259, 508-510.
- THOMASHOW M. F., 1993. *Genes induced during cold acclimation in higher plants*. [W:] *Advances in Low-Temperature Biology*. STEPONKUS P. L. (red.). JAI Press Ltd London, England, Greenwich, Connecticut, 183-210.
- WASTERNAK C., ATZORN R., LEOPOLD J., FEUSSNER I., RADEMACHER W., PARTHIER B., 1995. *Synthesis of jasmonate-induced proteins in barley (Hordeum vulgare) is inhibited by the growth retardant tetcyclasis*. Physiol. Plant. 94, 335-341.
- WEILER E. W., ALBRECHT T., GROTH B., XIA Z. -Q., LUXEM M., ANDERT L., SPENGLER P., 1993. *Evidence for the involvement of jasmonates and their octadecanoid precursors in the tendril coiling response of Bryonia dioica Jacq.* Phytochemistry 32, 591-600.
- YANG S. F., DONG J. G., 1993. *Recent progress in research of ethylene biosynthesis*. Bot. Bull. SAcad. Sin. 34, 89-101.
- YANG S. F., HOFFMAN N. E., 1984. *Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants*. Annu. Rev. Plant Physiol. 35, 155-189.
- YANG S. F., PRATT H. K., 1978. *The physiology of ethylene in wounded tissue*. [W:] *Biochemistry of Wounded Plant Tissue*. KAHL G. (red.). deGruyter, Berlin, 596-622.
- ZIMMERMAN D. C., COUDRON C. A., 1979. *Identification of traumatin, a wound hormone, a 12-oxo-trans-10-dodecenoic acid*. Plant Physiol. 63, 536-541.

MAŁGORZATA WIERZBICKA

*Pracownia Środowiskowego Skażenia Roślin, Zakład Morfogenezy,
Instytut Biologii Eksperymentalnej Roślin, Uniwersytet Warszawski,
Krakowskie Przedmieście 26/28, 00-927 Warszawa*

ODDZIAŁYWANIE METALI CIĘŻKICH NA ROŚLINY

WSTĘP

W pierwszych latach XVIII wieku Urban Werne wykrył w roślinach szereg metali ciężkich. Od tego czasu datuje się rozwój naszej wiedzy nad mikroelementami, takimi jak: Fe, Mn, Cu, Zn, Mo i inne. Dokładnie określano próg i zapotrzebowanie oraz skutki jakie powodują ich niedobory. Rozwój tego kierunku badań był związany z rozwojem rolnictwa i ewidentnym znaczeniem odpowiednich ilości mikroelementów dla wielkości uzyskiwanych plonów (MENDEL i KIRKBY 1983). Natomiast sytuacja przeciwna — czyli badanie działania nadmiaru metali na rośliny — zwróciła uwagę badaczy w ostatnim okresie, w związku z postępującym skażeniem środowiska. Szczególnie niekorzystny jest fakt, iż poprzez rośliny nadmierne ilości wielu metali są włączone do łańcucha pokarmowego i przez to do obiegu biologicznego. Natomiast zmniejszenie ilości metali ciężkich w skażonych glebach jest niezwykle trudne, wskutek czego poważnie trzeba się liczyć z faktem, iż metale ciężkie jeszcze przez wiele dziesiątków lat będą powodować nadmierne skażenie roślin.

DZIAŁANIE METALI CIĘŻKICH NA ROŚLINY

CYNK

Spośród wszystkich mikroelementów, w glebach najczęściej występują niedobory cynku, co coraz częściej staje się przyczyną ograniczonej produkcji roślin. Natomiast nadmiernie wysokie ilości cynku występują lokalnie w glebach zanieczyszczonych przez przemysł. Są to głównie tereny bogate w rudy cynkowe i tereny wokół hut metali nieżelaznych. Nadmierne ilości cynku w glebach powodują zmniejszenie tempa wzrostu korzeni i liści oraz hamują pobieranie przez rośliny fosforu i żelaza (MENGEL i KIRKBY 1983).

Niektóre gatunki roślin tolerują duże stężenie cynku w swoich tkankach i są zdolne do wzrostu na glebach o nienormalnie dużej jego zawartości, na przykład roślinność na glebach galmanowych zawiera od 600-7800 mg/kg suchej masy

roślin, podczas gdy w rosnących na przeciętnych glebach roślinach poziom zwykle nie przekracza 100 mg/kg suchej masy roślin (GODZIK 1984).

MIEDŹ

Miedź jest mikroelementem pobieranym przez rośliny w bardzo małych ilościach (2–20 mg Cu/kg s.m.). Dlatego wysoki poziom miedzi w odpadach przemysłowych może być toksyczny, ponieważ miedź wypiera (zastępuje) inne jony potrzebne dla roślin — zwłaszcza żelazo. Powoduje to, że częstym objawem zatrucia miedzią są niedobory żelaza w roślinach.

Skażenie miedzią występuje na terenach rudonośnych lub na glebach, na których przez wiele lat stosowano opryskiwanie związkami miedzi (np. cieczą bordowską, którą powszechnie używano do oprysku winnic).

KOBALT

Jest ważnym składnikiem żywienia zwierząt, gdyż jest składnikiem witaminy B₁₂. Bardzo jest również prawdopodobne, że jest to pierwiastek niezbędny dla roślin wyższych.

Toksyczne działanie kobaltu jest związane z wypieraniem przez ten pierwiastek innych metali ciężkich z fizjologicznie ważnych centrów. Jego toksyczność objawia się chlorozą, nekrozą i całkowitym wędnięciem liści.

Ciekawym zjawiskiem wśród roślin jest istnienie gatunków wyjątkowo mało wrażliwych na wysokie stężenia kobaltu. Liście ich mogą zawierać 100 razy więcej kobaltu niż liście normalnych roślin. Na przykład roślina *Crotalaria cobalticola*, która rośnie wyłącznie na terenach zasobnych w kobalt (Zair), jest traktowana przez geologów jako roślina wskaźnikowa złóż rud kobaltowych. Zawiera 500–800 mg Co/kg s.m. (MENGEL i KIRKBY 1983).

KADM

Kadm jest pierwiastkiem bardzo podobnym do cynku. Podobnie jest pobierany przez rośliny i może go zastępować w funkcjach metabolicznych. Jednak jest to pierwiastek toksyczny i to zarówno dla roślin, jak i dla zwierząt. Wynika to z dużego powinowactwa kadmu do grup tiolowych enzymów i białek. Powoduje on przez to zakłócenie czynności enzymów.

Głównymi źródłami skażenia kadmem są nawozy fosforowe, które często zawierają dodatki związków kadmu, osady ściekowe (jeśli są stosowane jako nawozy), huty metali nieżelaznych oraz ścieranie w czasie jazdy opon samochodowych na arteriach komunikacyjnych.

Zawartość kadmu w roślinach zwykle mieści się w granicach 0,1–1,0 mg Cd/kg s.m., a toksyczne działanie kadmu u ludzi obserwowano już przy spożyciu roślin o zawartości kadmu powyżej 3 mg Cd/kg s.m..

Chroniczne zatrucia ludności zanotowano w Japonii, w mieście Toyoma. Były one skutkiem spożywania ryżu uprawianego na glebach zanieczyszczonych kadmem pochodzącym z wód kopalnianych. Następowyły wówczas zakłócenia metabolizmu wapnia i fosforu, co powodowało bardzo bolesną demineralizację kości (MENGEL i KIRKBY 1983).

OLÓW

Ołów jest jednym z głównych zanieczyszczeń środowiska, o dużej toksyczności dla człowieka. Żadne inne zanieczyszczenia chemiczne nie są kumulowane przez ludzi w ilościach tak bliskich poziomowi toksycznemu klinicznie.

Głównym źródłem zanieczyszczeń ołowiem jest spalanie paliw płynnych w silnikach samochodowych. Pochodzi stąd 80% ołowiu znajdującego się w atmosferze. Po spaleniu benzyny samochodowej, z rury wydechowej wydostają się głównie nieorganiczne związki ołowiu (chalogenki). Około połowa tych zanieczyszczeń pada w odległości 100 m od drogi, a pozostała część bardzo rozprasza się w biosferze. Właśnie stąd pochodzi zwiększenie ilości ołowiu w lodowcach północnej Grenlandii — terenów tak bardzo oddalonych od wszelkiego przemysłu.

Można przyjąć, że w pyłe ulicznym zawartość ołowiu dochodzi do 1000 mg/kg. Przemysłowe źródła skażenia ołowiem pochodzą z hutnictwa miedzi, żelaza i stali, z wytopu rud cynku i produkcji cementu.

Toksyczne działanie ołowiu na organizmy żywe przede wszystkim jest związane z reakcją jonów ołowiatych z grupami sulfhydrylowymi enzymów i białek lub też jony ołowiatwe wypierają inne metale z cząsteczek enzymów i białek.

Zanieczyszczenie roślin ołowiem zależy od odległości od drogi, zwarcia roślin, czasu ekspozycji, natężenia ruchu samochodowego, kierunku wiatru. I tak rośliny wzdłuż ruchliwych autostrad zawierają od 50–100 mg/kg s.m., podczas gdy w odległości 150 m już tylko 2–3 mg/kg s.m. (dopuszczalna norma w żywności wynosi 1,5 mg/kg s.m.).

Głównym miejscem, przez które ołów wnika do roślin, są podziemne części roślin — korzenie. Przy wysokich dawkach ołowiu występują silne toksyczne objawy zatrucia u roślin, przejawiające się hamowaniem procesów metabolicznych, takich jak fotosynteza, oddychanie, transpiracja, pobieranie wody. Hamowane są liczne reakcje enzymatyczne (WIERZBICKA 1991, WOŹNY 1995).

TOKSYCZNE DZIAŁANIE METALI CIĘŻKICH

Zaburzenia w procesach fizjologicznych komórek pod wpływem metali ciężkich mogą być wynikiem działania dwóch różnych mechanizmów.

1. Bezpośredniej interakcji kationów z grupami SH metabolitów lub enzymów. Metale ciężkie wiążące się z grupami SH blokują enzymy bogate w te grupy, na przykład polimerazę DNA, RNA, ATP-azy.

2. Nasilenie procesów peroksydacji lipidów; oddziaływanie na poziomie błon biologicznych; powstające rodniki lipidowe i wysoce toksyczne produkty ich częściowej degradacji zaburzają układ redoksowy. Często wiąże się to bezpośrednio z zaburzeniami homeostazy wewnątrzkomórkowego wapnia, przez hamowanie aktywności Ca (TUKENDORF 1989).

SKAŻENIE ŻYWNOŚCI METALAMI CIĘŻKIMI

Dochodzimy obecnie do ważnego pytania. Czy jest możliwe, aby warzywa i rośliny użytkowe zawierały aż tak duże ilości metali ciężkich i stały się niebezpieczne dla ludzi?

Przecież związki metali ciężkich są toksyczne zarówno dla organizmów roślinnych, jak i zwierzęcych, a więc w silnie skażonym środowisku, warzywa i inne rośliny użytkowe nie powinny rosnąć i w związku z tym nie powinny również wydawać plonów. Czy więc rośliny użytkowe mogą stanowić jakieś istotne zagrożenie? Otóż okazuje się, że mogą stanowić poważne zagrożenie. Rośliny mogą prawidłowo rosnąć i wydawać plon zawierając toksyczne dla ludzi ilości metali. Opisano drastyczne przypadki zawartości dużych ilości ołowiu w rzodkiewkach, toksycznych wskutek tego dla organizmów ludzkich.

Okazuje się, że występujące w obszarach silnie skażonego środowiska dobrze widoczne uszkodzenia roślin, takie jak obniżenie plonów, hamowanie wzrostu roślin, spowodowane są przez gazowe zanieczyszczenia atmosfery, na przykład: dwutlenek siarki, tlenek azotu, fluor i ozon.

Bardzo silne zwiększanie ilości takich metali, jak ołów, kadm, cynk prowadzi również do zahamowania wzrostu, obniżenie biomasy, zmniejszenie plonów, większej podatności na choroby, a w skrajnych przypadkach do wyniszczenia roślin. Toksyczne objawy u roślin występują przy odpowiednio dużej zawartości w nich metali: Cu — ponad 30 mg/kg s.m.; Zn — ponad 1500 mg/kg s.m.; Mn — ponad 1000-1500 mg/kg s.m.; Cd — ponad 15 mg/kg s.m.; Pb — ponad 500 mg/kg s.m. Natomiast poziomy dopuszczalnej ilości metali w żywności są dużo niższe i na przykład dla ołowiu jest to 1,5 mg Pb/kg suchej masy, kadmu 0,15mg/kg s.m. — czyli ponad 100x mniej niż próg pierwszych uszkodzeń.

Oznacza to zatem, że rośliny bez żadnego wpływu na swój rozwój i plonowanie mogą przekroczyć dopuszczalną dla nas normę zawartości metali w swoich tkankach. Jest to zjawisko niebezpieczne, ponieważ prowadzi do włączenia w obieg biologiczny nadmiernych ilości metali ciężkich.

I tak dochodzimy do pewnego paradoksu. Z faktu że rośliny dobrze rosną w środowisku skażonym metalami ciężkimi wcale nie należy się cieszyć. Wręcz przeciwnie. Dla nas jest niebezpieczna dorodna i dobrze wyglądająca żywność skażona nadmiernymi ilościami metali ciężkich.

Należy się teraz zastanowić, czy nie jest to problem przesadzony. Czy rzeczywiście dotyka on ludzi obecnie żyjących w Polsce. A może zakres tego problemu jest tylko lokalny i dotyczy obszarów wokół hut metali nieżelaznych?

Ciekawej oceny narażenia ludności na kupno warzyw skażonych metalami ciężkimi w okolicach Poznania, czyli terenu o przeciętnym skażeniu metalami ciężkimi, dokonali badacze z Akademii Rolniczej w Poznaniu (TYKSIŃSKI i współaut. 1989). Oznaczyli oni zawartość metali w warzywach kupowanych z przypadkowych stoisk na czterech targowiskach Poznania poczynając od marca aż do lipca. Po kupieniu warzywa myto —czyli traktowano je tak, jak się to zwykle robi w codziennym życiu i oznaczono ilość metali ciężkich (ołowiu, kadmu, cynku, żelaza) w jadalnych częściach roślin.

Stwierdzono, że przekroczenie dopuszczalnej zawartości ołowiu wystąpiło w 66,7% prób warzyw o jadalnych owocach (pomidor, ogórek) i w 68,2% prób warzyw korzeniowych (marchew, seler, rzodkiewka, pietruszka). Natomiast w warzywach liściastych takich jak sałata, seler, kapusta, szpinak, pietruszka, koper, szczypiorek w 15,4% prób wykazywało zawartość ołowiu powyżej normy.

Zawartość ołowiu nie zależała ani od miejsca ani daty zakupu warzyw. Wyliczając średnią arytmetyczną z bardzo dużej rozpiętości zawartości ołowiu w pojedynczych próbach stwierdzono, że przeciętnie warzywa zawierały 5 mg/kg s.m. co jest 3-krotnym przekroczeniem normy.

Gorsze wyniki uzyskano dla kadmu. Przekroczenie dopuszczalnej normy dla kadmu stwierdzono dla warzyw liściowych w 94,9% prób, dla korzeniowych w 72,7% prób, dla warzyw których częścią jadalną są owoce — 100% prób. Średnia zawartość kadmu dla wszystkich analizowanych warzyw wynosiła 0,82 mg/kg s.m., była prawie 6-krotnie wyższa od dopuszczalnej normy.

Natomiast część z badanych warzyw zawierała nazbyt małą ilość cynku (57% prób) i nazbyt małą ilość żelaza (82,4% prób). Stwierdzone niedobory są niekorzystne z punktu widzenia żywienia człowieka.

Wydaje się, że wyniki te dobrze ilustrują sytuację, jakiej może spodziewać się przeciętny człowiek w Polsce. Oczywiście są to dane lokalne, które fragmentarycznie ilustrują sytuację. Jednak okolice Poznania nie są terenem szczególnie skażonym metalami ciężkimi, a zastosowana w badaniach tak prosta metodyka pobierania prób do badań przy dużej liczbie powtórzeń, dobrze ilustruje sytuację z jaką powinna się liczyć przeciętna osoba w Polsce.

STRATEGIE OBRONNE ROŚLIN PRZED METALAMI CIĘŻKIMI

Dalsza część tego artykułu będzie poświęcona rozważaniu problemu — w wyniku jakich procesów rośliny potrafią znosić w swoich tkankach wysokie ilości metali ciężkich ze szczególnym uwzględnieniem ołowiu. Problem ten można analizować na poziomie komórkowym, oraz na poziomie całego organizmu roślinnego.

MECHANIZMY ODPORNOŚCI NA METALE CIĘŻKIE NA POZIOMIE KOMÓRKOWYM

Odporność roślin na metale ciężkie jest związana ze strategią wykluczającą (LEWITT 1980). Polega ona na szybkim uruchamianiu procesów pozwalających wyłączyć nadmiar wolnych jonów z ogólnego metabolizmu komórki.

Wiązanie ze związkami chemicznymi

Stosunkowo powszechnie, wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia metali powoduje indukcję syntezy niskocząsteczkowych białek bogatych w grupy SH, zwanych fitochelatynami. Białka te charakteryzują się wysoką zawartością cysteiny i glutanonu. Wykryto je u kilkuset roślin, począwszy od purpurowych glonów, paproci, a skończywszy na najbardziej ewolucyjnie zaawansowanych roślinach z rodziny *Orchidales* (TUKENDORF 1989, WOŹNY 1995).

Główną funkcją fitochelatyn jest utrzymanie homeostazy metali w komórce. Mogą one czasowo przyjmować takie metale, jak Zn, Cu, Cd, Pb, aby obniżyć

stężenie wolnego metalu w komórce. Równocześnie związki te mogą być źródłem potrzebnego komórce metalu, jako, na przykład, kofaktora dla enzymów, co pozwala utrzymać niezakłócony metabolizm komórki. Jest bardzo prawdopodobne, że fitochelatyny pełnią również rolę systemu przenoszącego jony metali z cytoplazmy do wakuoli, w której jony oddysocjują i mogą być wiązane na przykład przez szczawiany.

Poza fitochelatynami są znane jeszcze inne związki odpowiedzialne za wyłączenie nadmiaru wolnych jonów z ogólnego metabolizmu komórki. Wzrostowi jonów cynku, niklu i chromu w środowisku zewnętrznym towarzyszy znaczna akumulacja kwasu jabłkowego w cytoplazmie i kwasu szczawiowego w wakuoli. Kwasy te są czynnikami chelatującymi jony metali ciężkich.

Ponadto stwierdzono wiązanie miedzi przez aminokwasy, takie jak cysteina i histydyna, a glin był wiązany z kwasami nukleinowymi i odkładany w jądrach komórkowych w postaci agregatów (TUKENDORF 1989, SHAW 1990).

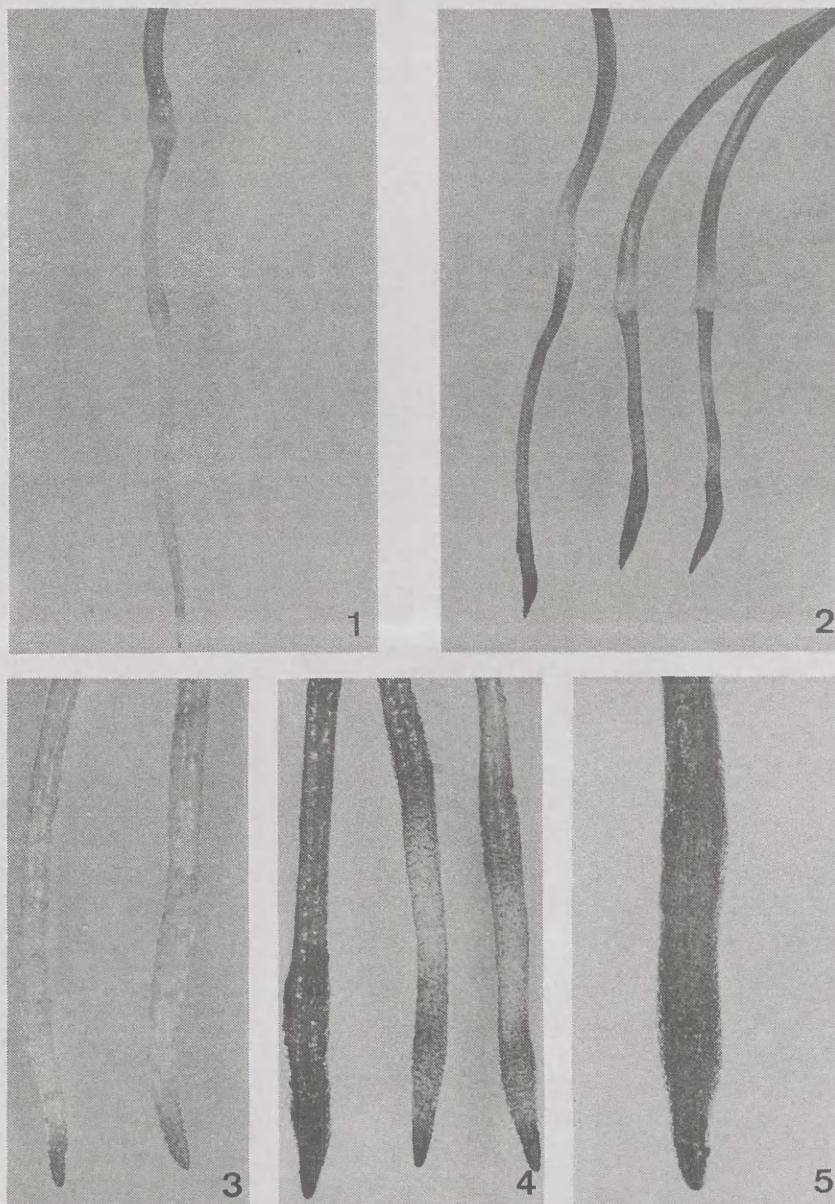
Gromadzenie metali w obszarach bezpiecznych dla metabolizmu komórkowego na przykładzie ołowiu

Korzenie roślin mają zdolność pobierania i gromadzenia dużych ilości metali w swoich tkankach (tab. 1, fot. 1–5), ograniczając przy tym jego transport do nadziemnych części roślin (JONES i współaut. 1973). A zatem właśnie w korzeniach znajdują się podstawowe mechanizmy rządzące gospodarką ołowiem w roślinach.

Ołów po wejściu do korzenia szybko przenika przez poszczególne warstwy komórek korzeni — w tempie 1 warstwa/5 minut (WIERZBICKA 1987b). W komórkach korzeni ołów jest unieszkodliwiany przez gromadzenie w wakuolach (tab. 2, fot. 1–5, tab. 3 fot. 1, 6), ścianach komórkowych (tab. 3, fot. 2–6) przestworach międzykomórkowych (tab. 2, fot. 2, tab. 3, fot. 4), pęcherzykach diktiosomalnych i siateczce śródplazmatycznej. Z cystern siateczki śródplazmatycznej powstaje rozbudowany system wakuolarny oraz następuje trawienie zatrutych obszarów protoplastu połączone z powstawaniem wakuol autofagowych zawierających złoży ołowiu (WIERZBICKA 1995, WOŹNY 1995). Ciekawy proces unieczynniania ołowiu połączony z wydalaniem opisali MALONE i współautorzy (1974) w korzeniach kukurydzy (*Zea mays*). Stwierdzili oni, że ołów jest transportowany w pęcherzykach diktiosomalnych z wnętrza komórek do ściany komórkowej wraz z materiałem ściany komórkowej i w ten sposób wyrzucany poza obręb komórki. W komórkach korzeni cebuli jadalnej (*Allium cepa*) obserwowano inny proces wyrzucania ołowiu z wnętrza komórki. Następowoło wydalanie ołowiu z protoplastu do ściany komórkowej poprzez palczaste wypuklenie plazmolemy (plazmotubule) (WIERZBICKA 1984).

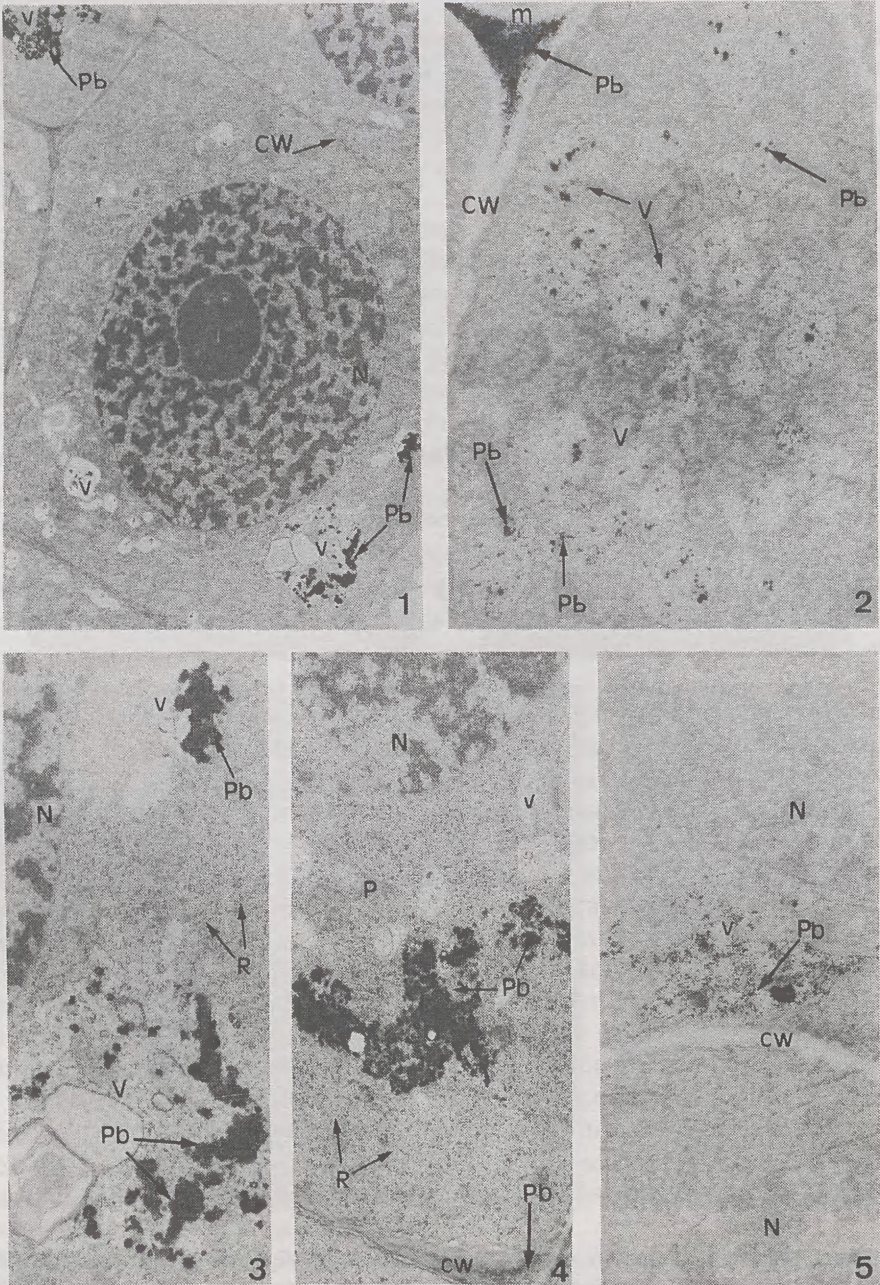
Powyższe dane wskazują na duże możliwości organizmów roślinnych w przystosowaniu się do zatrutego środowiska i detoksykacji groźnej dla komórki trucizny. Wart podkreślenia jest fakt, że możliwości obronne roślin wydają się być znacznie większe niż organizmów zwierzęcych chociażby dlatego, że komórki zwierzęce nie posiadają ani ściany komórkowej, ani tak rozwiniętego systemu wakuolarnego, jak komórki roślinne. A zatem odmienny system wydalniczy

*Tablice fotograficzne pochodzą z pracy magisterskiej Baranowskiej A. (1995).



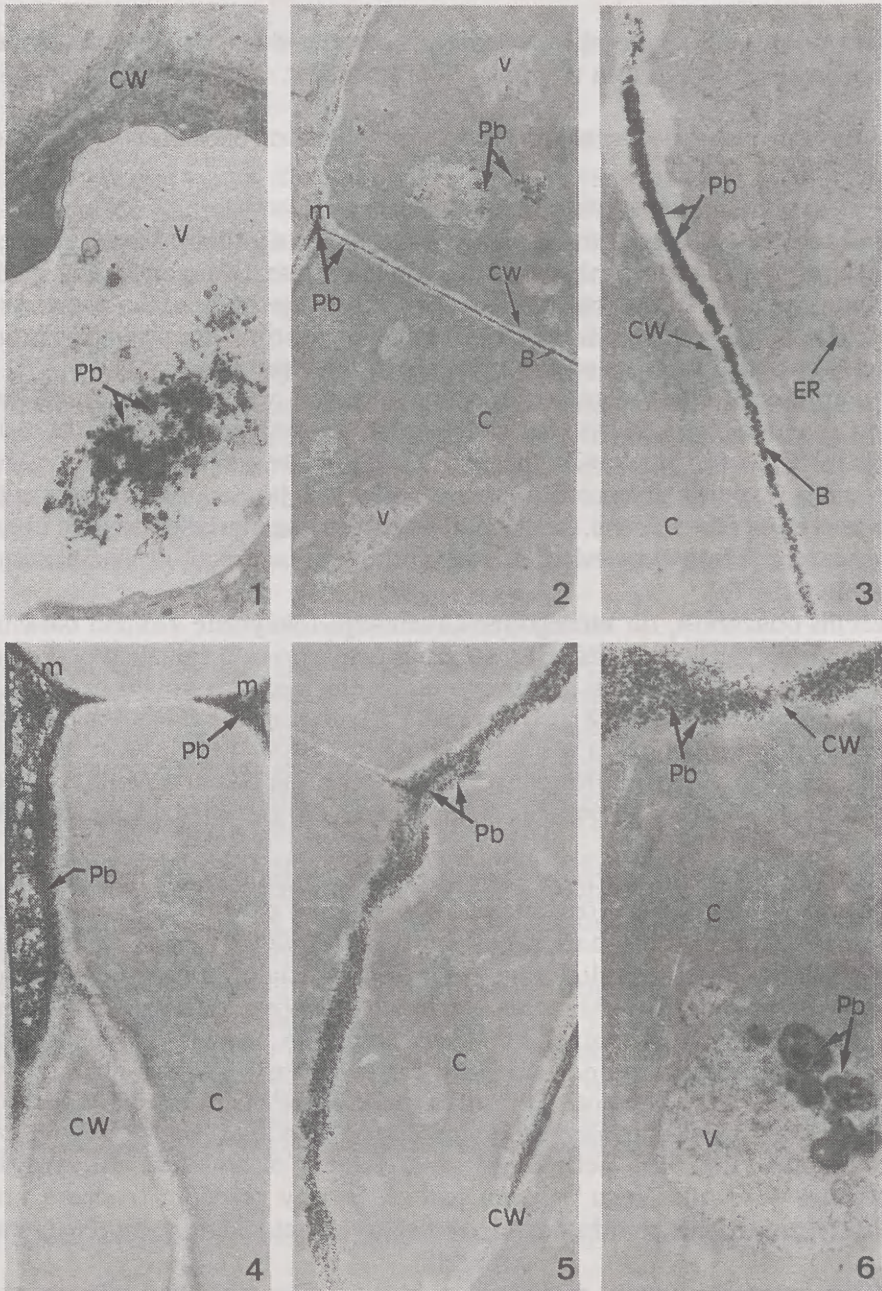
*Tablica 1. Lokalizacja ołowiu w korzeniach cebuli jadalnej *Allium cepa* L. za pomocą metody rodizonianowej. Rośliny hodowano przez 72 godziny w pożywce mineralnej z dodatkiem soli ołowiu ($4 \text{ mg/dm}^3 \text{ Pb}^{2+}$ z PbCl_2), lub bez dodatku ołowiu (kontrola). Ciemne wybarwienie korzeni wskazuje na obecność ołowiu. Fot. 1–4 pow. 5x, fot. 5 pow. 9x.

Fot. 1. Korzenie siewek — rośliny kontrolne, które nie były traktowane roztworem soli ołowiu.
 Fot. 2. Korzenie siewek — rośliny doświadczalne traktowane PbCl_2 . Fot. 3. Korzenie przybyszowe — rośliny kontrolne, które nie były traktowane roztworem soli ołowiu. Fot. 4, 5. Korzenie przybyszowe — rośliny doświadczalne, traktowane PbCl_2 .



Tablica 2. Ultrastrukturalna lokalizacja ołowiu w komórkach merystematycznych wierzchołków korzeni siewek *Allium cepa* L. przeprowadzona w mikroskopie elektronowym. Rośliny traktowano ołowiem ($4\text{mg Pb}/\text{dm}^3 \text{Pb}$ z PbCl_2) przez 54 godziny. Widoczne czarne złoże ołowiu (Pb) głównie w wakuolach komórek (V).

CW — ściana komórkowa, N — jądro, P — proplastyd, R — rybosomy, V — wakuola, Pb — złoże ołowiu, m — przestwór międzykomórkowy. Fot. 1 — pow. 14000x; fot. 2, 3 — pow. 35000x; fot. 4, 5 — pow. 60000x.



Tablica 3. Ultrastrukturalna lokalizacja ołowiu w komórkach merystematycznych wierzchołków korzeni siewek *Allium cepa* L. przeprowadzona w mikroskopie elektronowym. Rośliny traktowano ołowiem ($4\text{mg Pb}/\text{dm}^3 \text{Pb}$ z PbCl_2) przez 54 godziny. Widoczne czarne złoże ołowiu (Pb) głównie w ścianach komórkowych (CW).

CW — ściana komórkowa, V — wakuola, Pb — złoże ołowiu, C — cytoplazma, B — błazka środkowa ściany komórkowej, m — przestwór międzykomórkowy, ER — siateczka śródplazmatyczna.

Fot. 1 — pow. 15000x; fot. 2, 5 — pow. 20000x; fot. 3, 6 pow. — 45000x; fot. 4 — pow. 25000x.

komórek roślinnych i zwierzęcych wydaje się być podstawową różnicą w zdolności obrony przed tak silną trucizną, jaką jest ołów.

MECHANIZMY ODPORNOŚCI NA METALE CIĘŻKIE NA POZIOMIE CAŁEGO ORGANIZMU NA PRZYKŁADZIE
OŁOWIU

Miejsca szczególnie chronione w roślinach

W korzeniach ołów jest gromadzony początkowo z podobną intensywnością na całej długości. Jednak już po kilku godzinach jest on przenoszony z wierzchołków korzeni do wyższych części roślin. Powoduje to znaczne zmniejszenie ilości ołowiu w wierzchołkach korzeni, a przez to ochronę komórek merystematycznych korzenia, które są odpowiedzialne za jego wzrost.

Drugim obszarem szczególnie chronionym przed ołowiem jest wyspa komórek znajdujących się w samym szczycie korzenia — tak zwane komórki cichego centrum. Obszar ten zawiera komórki inicjalne, które uaktywniają się głównie w procesach regeneracji korzenia, co ma najistotniejsze znaczenie przy uszkodzeniu korzenia. Okazało się, że ołów od początku nie przenika do tego obszaru korzenia, a zatem istnieje mechanizm ochraniający te szczególnie ważne komórki (WIERZBIČKA 1987a).

Trzecim obszarem, do którego nie przenikają toksyczne związki ołowiu, są generatywne części kwiatu. Zalążki, a szczególnie woreczki zalążkowe, pozostają wolne od ołowiu nawet przy znacznym skażeniu wegetatywnych części roślin (pędu i korzenia). Dlatego też rozwijające się z tych części kwiatu nasiona roślin z reguły nie zawierają ołowiu w swoich tkankach (SHAW 1990). Również okrywy nasienne większości gatunków roślin szelnie chronią nasiona przed związkami ołowiu aż do momentu uszkodzenia ciągłości tych okryw (WIERZBIČKA i współaut. 1986).

Jako czwarty obszar można wymienić całe nadziemne części roślin. W korzeniach znajdują się bariery ograniczające transport ołowiu do części nadziemnych roślin. Rzeczywistą barierą jest najbardziej wewnętrzna warstwa komórek kory pierwotnej — endoderma. Komórki te znajdują się na pograniczu pomiędzy centralną częścią korzenia — walcem osiowym, zawierającym komórki przewodzące, a korą pierwotną, która ma położenie bardziej peryferyczne. To właśnie w komórkach endodermy jest zatrzymywany ołów wędrujący wraz z ruchem wody w głąb korzenia. Chroni to walec osiowy przed wnikaniem ołowiu a przez to mocno jest ograniczone przenoszenie ołowiu do nadziemnych części roślin. Zwykle 70%–95% pobranego przez roślinę ołowiu jest zatrzymywane w korzeniu. W wyniku tego procesu jest chroniony przed tą trucizną aparat fotosyntetyczny roślin znajdujący się w zielonych częściach roślin (WIERZBIČKA 1995).

Jak się ostatnio okazało, miejscem, w którym ołów może być zatrzymywany, jest również organ spichrzowy — cebula.

W korzeniu *Allium cepa* — cebuli jadalnej, jest zatrzymywane około 30% ołowiu pobranego przez roślinę, a aż 70% przechodzi do nadziemnych części roślin, z czego około 40% znajdowało się w spichrzowym organie — cebuli, a 30% w zielonych liściach. Przemieszczanie tak znacznych ilości ołowiu do organu spichrzowego wydaje się być korzystne dla rośliny, natomiast bardzo niekorzy-

stne dla nas, ponieważ oznacza gromadzenie ołowiu w jadalnych częściach *Allium cepa* (BARANOWSKA 1995).

ŻYWIENIE MINERALNE ROŚLIN

Metale ciężkie w tym również ołów, znajdując się w podłożu, w którym rosną rośliny, zwykle hamują pobieranie i transport wielu makro- i mikroelementów, co często powoduje obniżenie właściwych stosunków składników mineralnych w roślinach. Powoduje to, że u roślin obok odporności na dany metal rozwija się również odporność na obniżony poziom składników mineralnych. Może również pojawiać się możliwość zwiększonego ich pobierania (ANTOSIEWICZ 1992). Oznacza to, że u roślin odpornych na działanie ołowiu mogą również wystąpić obniżone wymagania pokarmowe. Szczególnie ważny pod tym względem okazał się wapń. Stwierdzono, że rośliny odporne na deficyt wapnia osiągają wysoki poziom odporności na ołów. Można więc powiedzieć, że jeśli roślina dobrze znosi nazbyt małe ilości wapnia, to równocześnie dobrze znosi toksyczne działanie ołowiu. Zależność ta została niedawno wykryta i mechanizm tego procesu nie jest jeszcze znany, a wyjaśnienie warte jest dalszych badań (ANTOSIEWICZ 1995).

GOSPODARKA WODNA ROŚLIN

Wiele metali ciężkich, w tym również ołów, powoduje zakłócenia w gospodarce wodnej roślin. Powoduje to, że u roślin odpornych na działanie metali ciężkich może wytworzyć się również zwiększona odporność na deficyt wody. Wyraźne anatomiczne przystosowanie do znoszenia deficytu wody stwierdzono u rośliny *Silene inflata* var. *angustifolia* rosnącej na hałdzie galmanowej w okolicy Olkusza (PANUFNIK i WIERZBICKA 1993). Rośliny pochodzące z tych terenów mają mniejszą powierzchnię asymilacyjną liści, a komórki liści są powiększone, przez co uzyskują zdolność do gromadzenia wody w porównaniu z roślinami rosnącymi w terenach nieskażonych. Okazało się, że oszczędna gospodarka wodna sprzyja dobremu tolerowaniu nadmiernych ilości ołowiu.

Ołów jest mniej szkodliwy dla roślin, jeśli rosną one w warunkach wysokiej wilgotności powietrza. Natomiast w warunkach niskiej wilgotności powietrza (niewielkiej suszy) należy spodziewać się, że większa ilość ołowiu będzie pobierana i transportowana do nadziemnych części roślin. Może być to przyczyną zwiększenia skażenia jadalnych części roślin, jak również zwiększenia puli ołowiu włączanej do obiegu biologicznego (BARANOWSKA 1995).

POCHODZENIE MECHANIZMÓW ODPORNOŚCIOWYCH ROŚLIN NA METALE CIĘŻKIE

Jak jest możliwe pojawienie się mechanizmów tak wysokiej odporności roślin na metale ciężkie, takich jak ołów (co opisano powyżej), skoro pierwiastek ten dopiero od 60 lat znajduje się w nadmiernych ilościach w glebie. Jest to nazbyt krótki czas na wytworzenie w drodze ewolucji tak złożonych procesów dających w efekcie dobre tolerowanie przez rośliny nadmiernych ilości metali ciężkich. Jak więc doszło do ich wytworzenia.

Z porównania działania nadmiernych ilości składników odżywczych, takich jak cynk i miedź oraz metali balastowych (czyli całkowicie zbędnych dla metabolizmu roślin), takich jak ołów i kadm wynika, że rośliny mogą w obu wypadkach wykorzystać te same mechanizmy odporności (MICHALAK i WIERZBICKA 1995). Wydaje się więc, iż rośliny nie mając zdolności ruchu i nie mogąc ani zmienić ani wybierać miejsca swojego bytowania, wykształciły w drodze ewolucji duże możliwości bronięcia się przed różnego typu związkami, które mogą przypadkowo być dostarczone w różnych ilościach i w różnych momentach życia roślin (np. zalewanie wodą o różnym składzie).

Sugerujemy więc, że rośliny broniąc się przed nadmiernymi ilościami metali mogą wykorzystywać drogi wytworzone w toku ewolucji dla działania nadmiernych ilości składników odżywczych. W ten sposób w chwili obecnej rośliny mogą skutecznie bronić się przed presją skażonego metalami ciężkimi środowiska.

INFLUENCE OF HEAVY METALS ON PLANTS

Summary

Due to increased pollution of the environment, plant pollution by heavy metals becomes a serious problem. The most noxious are excessive amounts of such elements as zinc, copper and cobalt, which simultaneously (in minute amounts) are necessary for plant metabolism, or of balast elements, such as cadmium and lead, which being superfluous in the plant and animal metabolism, at the same time are toxic. Their effect consists most often in blocking of enzymes by binding to their -SH groups. The uptake by plants of heavy metals leads to their incorporation into the biological circulation.

Plants possess efficient strategies which protect them against the toxic action of metals and simultaneously accumulate them in large amounts in some tissues. On the cellular level, these protection mechanisms consist in binding metals with various types of chemical compounds (e.g. phytochelatins), and in accumulating the metals in those plant cell areas (mainly the walls and vacuoles) where they remain inert. On the level of the whole organism, the protection concerns first of all the areas that are especially sensitive, e.g. the meristematic cells. The resistance of plants against heavy metals is enhanced by resistance towards calcium shortage and water deficit.

It seems that plants, to counteract the toxic effects of heavy metals, take advantage of the defensive strategies formed in the course of evolution for protection against excessive amounts of some components present in natural nutrients.

LITERATURA

- ANTOSIEWICZ D., 1992. *Adaptation of plants to an environment polluted with heavy metals*. Acta Soc. Bot. Pol. 61, 281-299.
- ANTOSIEWICZ D., 1995. *Do calcium — deficiency tolerant plants better tolerate the presence of toxic lead?* Environ. Exp. Bot. (w druku).
- BARANOWSKA A., 1995. *Wpływ warunków wilgotności względnej powietrza na reakcję Allium cepa L. var. Balstora na ołów*. Praca magisterska, Pracownia Środowiskowego Skażenia Roślin, Zakład Morfogenezy, IBER, Uniwersytet Warszawski.
- GODZIK B., 1984. *Tolerancja wybranych gatunków roślin na metale ciężkie*. Praca doktorska, Instytut Botaniki PAN, Kraków.
- JONES L. H. P., CLEMENT C. R., HOPPER M. J., 1973. *Lead uptake from solution by perennial ryegrass and its transport from roots to shoots*. Plant Soil. 38, 403-414.
- LEVITT J., 1980. *Responses of plants to environmental stress*. Academic Press, New York.
- MALONE C., KOEPPE D. E., MILLER R. J., 1974. *Localization of lead accumulated by corn plants*. Plant Physiol. 53, 388-394.
- MENDEL K., KIRKBY E. A., 1983. *Podstawy żywienia roślin*. PWRIL, Warszawa.

- MICHALAK E., WIERZBICKA M., 1995. Różnica w tolerancji na metale ciężkie pomiędzy roślinami *Allium cepa* L. rozwijającymi się z cebul i nasion. 50 Zjazd Polskiego Towarzystwa Botanicznego, Kraków, 26 sierpień–1 lipiec.
- PANUFNIK D., WIERZBICKA M., 1993. *Adaptation of Silene inflata plants to growth on the calamine waste heaps*. Central and Eastern European Regional Meeting, Porąbka-Kozubnik, Poland, 23–26 August.
- SHAW A. J., 1990. *Heavy metal tolerance in plants: evolutionary aspects*. CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida.
- TUKENDORF A., 1989. *Proteins and peptides binding heavy metals*. Post. Bloch. 35. 141–153.
- TYKSIŃSKI W., BRES W., GOLCZ A., KOMOSA A., KOZIK E., ROSZYK J., 1989. Zawartość ołowiu, kadmu, cynku i żelaza w warzywach sprzedawanych na terenie Poznania. Biul. Warz. Suppl. 121–128.
- WIERZBICKA M., 1984. *Ultrastructural location of lead in the cell walls in Allium cepa L. roots*. Post. Biol. Kom. 11, 509–512.
- WIERZBICKA M., ŁOBODZIŃSKA B., GODZIK B., 1986. *Seed coats as barriers for lead in plants resistant and nonresistant to heavy metals*. Post. Biol. Kom. 13, 377.
- WIERZBICKA M., 1987a. *Lead accumulation and its translocation barriers in roots of Allium cepa L. — autoradiographic and ultrastructural studies*. Plant Cell Environ. 10, 17–26.
- WIERZBICKA M., 1987b. *Lead translocation and localization in Allium cepa roots*. Can. J. Bot. 65, 1851–1860.
- WIERZBICKA M., 1991. *Skażenie roślin ołowiem*. Konferencja Zanieczyszczone Środowisko a Fizjologia Roślin, Warszawa 10–11 maj, PTB, Warszawa, 101–108.
- WIERZBICKA M., 1995. *How lead loses its toxicity to plants*. Acta Soc. Bot. Pol. 64, 81–90.
- WOŹNY A., 1995. *Ołów w komórkach roślinnych, pobieranie, reakcje, odporność*. Sorus, Poznań.

STANISŁAW MALESZEWSKI, BOŻENA KOZŁOWSKA

*Uniwersytet Warszawski, Filia w Białymstoku, Instytut Biologii
Świerkowa 20B, PL-15-950 Białystok*

W czterdziestolecie odkrycia fotooddychania

CZY FOTOODDYCHANIE JEST „MARNOTRAWNYM” PROCESEM BIOLOGICZNYM?

WSTĘP

W bieżącym roku upływa 40 lat od opublikowania pracy (DECKER 1955), której wyniki były podstawą do sformułowania hipotezy, że w fotosyntetyzujących komórkach przebiega proces związany z pobieraniem O_2 i wydzielaniem CO_2 , lecz różny od mitochondrialnego oddychania ciemniowego, i tak jak fotosynteza bezpośrednio zależny od napromienienia¹. Proces ten obecnie jest określany angielskim terminem „photorespiration” (DECKER i TIO 1959), natomiast w piśmiennictwie polskim jest stosowana nazwa fotooddychanie (POSKUTA 1970). Przebieg, powiązanie z innymi procesami komórkowymi, regulacja i fizjologiczne funkcje fotooddychania należą nadal do aktualnych problemów badawczych.

Już na początku lat sześćdziesiątych, dzięki kontaktom z kanadyjskimi biologami, profesorami G. Krotkovem i C. D. Nelsonem, kilku polskich pracowników naukowych miało szansę włączenia się do badań nad fotooddychaniem i przeniesienia tego problemu do własnych pracowni. W polskim języku opublikowano szereg artykułów omawiających przebieg fotooddychania, zależność tego procesu od czynników wewnętrznych i środowiskowych, jego fizjologiczne znaczenie oraz metody pomiaru (POSKUTA 1970, 1992, MALESZEWSKI 1974, 1988, KANIUGA 1977, MALESZEWSKI i BYSTRZEJEWSKA 1981, MALESZEWSKI i KAMIŃSKA 1984, KLECZKOWSKI i współaut. 1988). Ukazał się też przekład obszernej monografii I. ZELITCHA (1971) dotyczącej współzależności pomiędzy fotosyntezą, fotooddychaniem i produktywnością roślin.

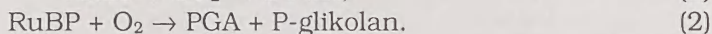
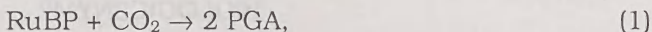
PRZEBIEG I POWIĄZANIE FOTOODDYCHANIA Z FOTOSYNTEZĄ

Integracja fotosyntezy i fotooddychania wynika z udziału w reakcjach rozpoczynających te procesy dwufunkcyjnego enzymu — karboksylazy/oxygenazy

¹Poprawny termin radiometryczny stosowany w miejsce tradycyjnego terminu „światło”.

rybulozo-1,5-bifosforanu (rubisco, E.C. 4.1.1.39), wspólnego dla obu aktywności tego enzymu endogennego substratu — rybulozo-1,5-bisfosforanu (RuBP), oraz występowania w atmosferze Ziemi CO₂ i O₂. Ponadto, w fotosyntezie są zużywane produkty fotooddechania: dwutlenek węgla i glicerynian. Przemiany węgla związane bezpośrednio z fotosyntetyczną asymilacją CO₂ są nazywane fotosyntetycznym redukcijnym cyklem węgla (PCRC), cyklem Calvina lub cyklem C₃. Reakcje towarzyszące fotooddechowemu wytwarzaniu CO₂ noszą nazwę fotosyntetycznego oksydacyjnego cyklu węgla (PCOC), szlaku kwasu glikolowego lub cyklu C₂. Znaczenie terminu fotooddechanie jest często zawężane do wytwarzania CO₂ w PCOC. Przebieg obu cykli przemian węgla, ich powiązania, lokalizację komórkową oraz enzymy w nich uczestniczące przedstawia rysunek 1.

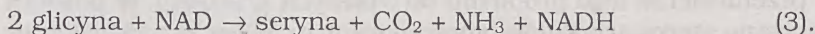
Reakcjami inicjującymi fotosyntetyczne (PCRC) i fotooddechowe (PCOC) przemiany związków węgla są karboksylacja i oksigenacja RuBP, obie katalizowane przez rubisco:



Powstający w stromie chloroplastów P-glikolan jest hydrolizowany do ortofosforanu (P_i) i glikolanu, który jest uznawany za bezpośredni substrat fotooddechania.

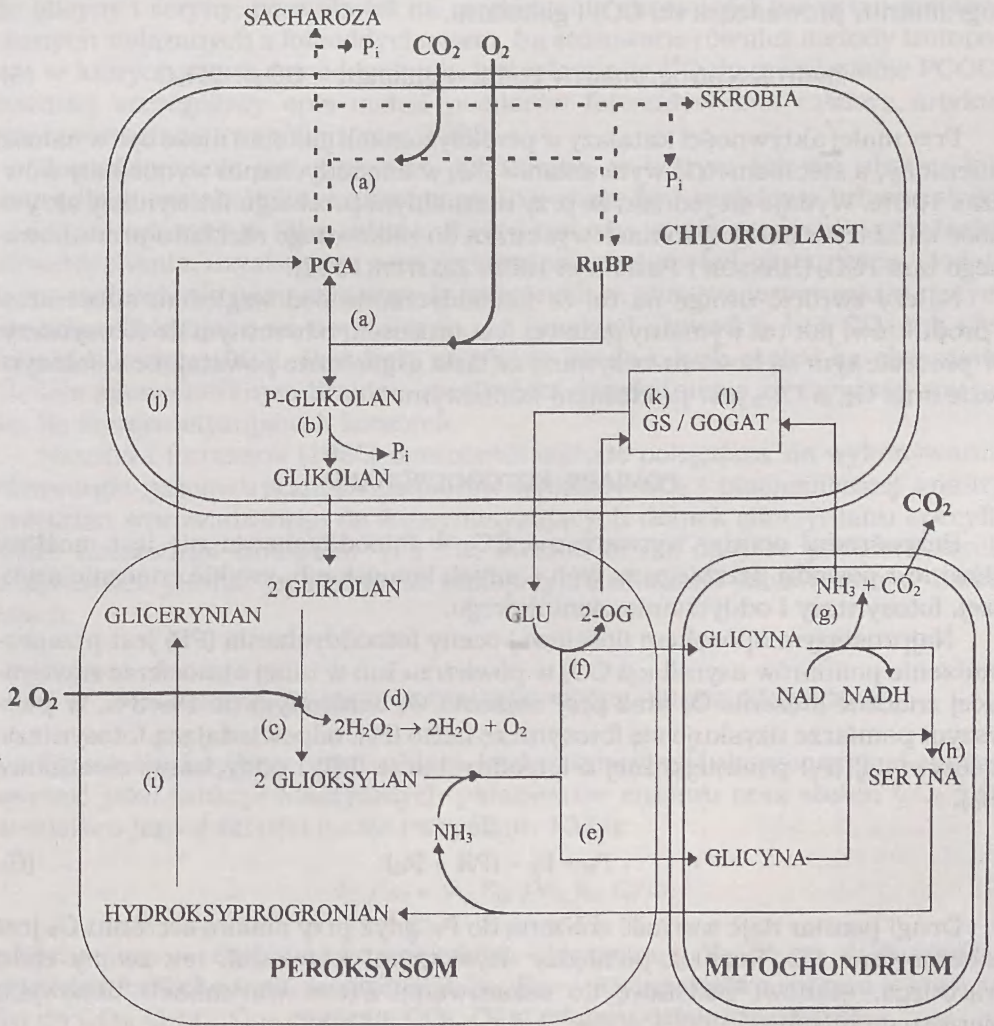
Chloroplasty roślin wyższych wydzielają glikolan do cytoplazmy, skąd jest pobierany przez peroksysomy i utleniany do glioksydanu przy udziale oksydazy glikolanowej (E.C. 1.1.3.1). Jednokomórkowe glony znaczną ilość glikolanu (1%–10%) wydzielają do podłoża (TOLBERT 1979), a specyficzną cechą ich PCOC jest udział w reakcji utleniania glikolanu reduktazy glioksydanowej (E.C. 1.1.1.26), zlokalizowanej w mitochondriach i współdziałającej z NAD.

Glioksydan jest bardzo aktywnym metabolitem i mógłby hamować szereg procesów, na przykład aktywację rubisco oraz reakcje katalizowane przez ten enzym (CAMPBELL i OGREN 1990, COOK i współaut. 1985). W PCOC ulega przekształceniu w nietoksyczną glicynę, a z dwu cząsteczek glicyny powstaje cząsteczka seryny i fotooddechowy CO₂:



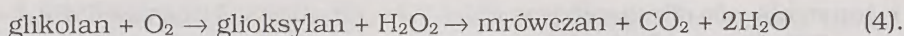
Zgodnie z podstawowym schematem fotooddechania (rys. 1) stosunek liczby atomów węgla uwalnianych jako CO₂ do uczestniczących w przemianach PCOC wynosi 1:4, to jest 25%. Pozostała ilość węgla poprzez serynę, hydroksypirogrognian i glicerynian powraca do PCRC.

W badaniach *in vitro* z użyciem izolowanych enzymów, chloroplastów oraz peroksysomów uzyskano dane sugerujące, że w CO₂ może być przekształcona większa, od podanej wyżej, względna liczba atomów węgla glikolanu, wytwarzanego w PCOC. Nadtlenek wodoru, produkowany w reakcji utleniania glikolanu lub podczas fotosyntetycznego transportu elektronów (reakcja Mehlera), powoduje bowiem nieenzymatyczną dekarboksylację α-aldehydo- i α-ketokwasów. Produktami peroksydacji glioksydanu jest CO₂ i mrówczan, który może być również utleniany do CO₂:

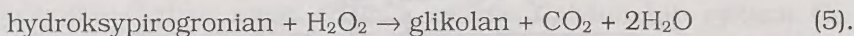


Rys. 1. Fotosyntetyczne (linie przerywane) i fotooddechowe (linie ciągłe) przemiany asymilowanego węgla (TOLBERT 1979, CANVIN 1990, ZELITCH 1992, zmienione).

Uwzględniono wymianę CO_2 i O_2 oraz uwalnianie P_i i krążenie NH_3 . Enzymy: (a) karboksylaza/oksygenaza RuBP, (b) fosfataza fosfoglikolanowa, (c) oksydaza glikolanowa, (d) katalaza, (e) seryna: glioksylian aminotransferaza, (f) glutaminian: glioksylian aminotransferaza, (g) dekarboksylaza glicynowa, (h) hydroksymetylotransferaza serynowa, (i) reduktaza hydroksypirogronianowa, (j) kinaza glicerynianowa, (k) syntetaza glutaminowa, (l) glutamina: 2-oksoglutaran aminotransferaza. Metabolity: GLU — glutaminian, 2-OG — oksoglutaran.



Ponadto, może przebiegać peroksydacja wytwarzanego z seryny hydroksypirogronianu, prowadząca do CO_2 i glikolanu:



Przy małej aktywności katalazy w peroksysomach glikolan może być w całości utleniony, a stechiometria wytwarzania CO_2 w fotooddychaniu wynosiłaby wówczas 100%. Wydaje się jednak, że przy normalnym przebiegu fotosyntezy aktywność katalazy w peroksysomach wystarcza do całkowitego rozkładu produkowanego tam H_2O_2 (HANSON i PETERSON 1985, ZELITCH 1992).

Należy zwrócić uwagę na to, że fotooddychanie pod względem substratów i produktów, jak też wymiany gazowej jest procesem odwrotnym do fotosyntezy. W procesie tym są bowiem zużywane związki organiczne powstające w fotosyntezie oraz O_2 , a CO_2 jest produktem końcowym.

POMIARY FOTOODDYCHANIA

Bezpośredni pomiar wytwarzania CO_2 w fotooddychaniu nie jest możliwy głównie z powodu przebiegu w tych samych komórkach, zwykle znacznie szybszej, fotosyntezy i oddychania ciemniowego.

Najprostszym sposobem ilościowej oceny fotooddychania (PR) jest przeprowadzenie pomiarów asymilacji CO_2 w powietrzu lub w innej atmosferze zawierającej znaczne stężenie O_2 oraz przy stężeniu O_2 obniżonym do 1%–3%. W pierwszym pomiarze uzyskuje się fotosyntezę netto (P_N), odpowiadającą fotosyntezie rzeczywistej (P_T) pomniejszonej o fotooddychanie (PR) i oddychanie ciemniowe (R_D):

$$P_N = P_T - (PR + R_D) \quad (6).$$

Drugi pomiar daje wartość zbliżoną do P_T , gdyż przy niskim stężeniu O_2 jest zahamowane PR. Różnica pomiędzy uzyskanymi wynikami, tak zwany efekt Warburga, stanowi podstawę do oszacowania PR w warunkach tlenowych pierwszego pomiaru.

Była stosowana również często metoda oznaczania PR polegająca na przeprowadzaniu pomiarów P_N przy różnych stężeniach CO_2 i ekstrapolacji wyników do stężenia zerowego. Uzyskana przez ekstrapolację ujemna wartość wymiany CO_2 charakteryzuje PR. Wskaźnikiem aktywności fotooddychania może być także wysokość stężenia kompensacyjnego CO_2 (Γ), które ustala się w zamkniętym układzie pomiarowym zawierającym fotosyntetyzujące tkanki. Są stosowane również metody, w których jest oznaczane wydzielanie CO_2 w warunkach eliminujących fotosyntezę: w krótkim czasie po zaciemnieniu liści (tak zwany poświeceniowy wyrzut CO_2 , PIB) lub w atmosferze bez CO_2 .

Podstawą do oceny fotooddychania może być też różnica pomiędzy szybkością asymilacji $^{14}\text{CO}_2$ zmierzona w krótkim odstępie czasu, po jego wprowadzeniu

do zamkniętego układu pomiarowego (pomiar P_T), i po dłuższym czasie, potrzebnym do wysycenia węglem ^{14}C substratów fotooddychania (pomiar P_N). Analiza włączania ^{14}C podczas asymilacji $^{14}\text{CO}_2$ do produktów pośrednich PCOC, głównie do glicyny i seryny, pozwala też na oszacowanie aktywności przemian metabolicznych związanych z fotooddychaniem. Są stosowane również metody izotopowe, w których miarą fotooddychania jest włączanie ^{18}O do metabolitów PCOC. Bardziej szczegółowy opis metod pomiarów fotooddychania zawiera artykuł KLECZKOWSKIEGO i współautorów (1988).

Fotooddychanie jest procesem cyklicznym, w którym nie ma ubytku lub akumulacji metabolitów, a uwalniany CO_2 może być częściowo lub w całości ponownie wiązany w fotosyntezie. Z tego powodu uważa się wyniki pomiarów fotooddychania, uzyskane za pomocą wymienionych metod, za zaniżone. Dodatkowo zastrzeżenia nasuwają metody, w których są stosowane warunki w dużym stopniu odbiegające od normalnych, na przykład atmosfera bez CO_2 lub ciemność (ZELITCH 1992). Rezultaty uzyskane każdą z tych metod są obarczone błędem spowodowanym brakiem możliwości uwzględnienia rzeczywistej wartości R_D fotosyntetyzujących komórek.

HANSON i PETERSON (1985) opracowali metodę polegającą na wykonywaniu równolegle gazometrycznych pomiarów wymiany CO_2 i biochemicznej analizy przemian wprowadzonego do fotosyntetyzujących tkanek glicerynianu specyficznie znaczonego izotopami ^3H i ^{14}C . Metoda ta nie nasuwa poważniejszych wątpliwości, jednak jej złożoność nie sprzyja szerszemu stosowaniu w badaniach.

KINETYKA REAKCJI KATALIZOWANYCH PRZEZ RUBISCO

Stosunek obu aktywności rubisco, karboksylacyjnej i oksygenacyjnej, można wyrazić jako funkcję kinetycznych parametrów enzymu oraz stężeń CO_2 i O_2 w miejscu jego działania (LAING i współaut. 1974):

$$v_c / v_o = V_c K_o / V_o K_c C / O \quad (7)$$

gdzie: v_c , v_o — szybkość karboksylacji, oksygenacji; V_c , V_o — maksymalna szybkość karboksylacji, oksygenacji; K_c , K_o — powinowactwo rubisco w stosunku do CO_2 , O_2 ; C , O — stężenie CO_2 , O_2 w miejscu działania rubisco.

Liczbowa wartość wyrażenia $V_c K_o / V_o K_c$, współczynnika powinowactwa substratowego CO_2/O_2 rubisco, jest podobna u różnych fotosyntetycznych typów roślin wyższych (C_3 , C_4 , pośredniego typu $\text{C}_3\text{-C}_4$) i wynosi około 80. Niższa jest u glonów (około 60), sinic (około 50), a zwłaszcza u fotosyntetyzujących bakterii (około 10), co jest prawdopodobnie spowodowane odmienną czwartorzędową strukturą ich rubisco. Przy podanej wartości współczynnika powinowactwa substratowego i stężeniach CO_2 i O_2 występujących podczas zrównoważonej fotosyntezy w miejscu działania rubisco (ocenianych odpowiednio na około 10,5 μM i 258 μM) stosunek v_c/v_o u roślin wyższych ma wartość około 3, zaś u innych fotoautotrofów jest odpowiednio mniejszy (JORDAN i OGREN 1983, OGREN 1984, CHEN i SPREITZER 1992). Względna szybkość karboksylacji i oksygenacji RuBP

zależy więc od właściwej, dla danej grupy fotoautotrofów, wartości współczynnika powinowactwa substratowego rubisco oraz od stężeń CO_2 i O_2 w miejscu działania tego enzymu.

MODELE MATEMATYCZNE FOTOSYNTETY I FOTOODDYCHANIA

Przy uwzględnieniu stechiometrii przemian zamieszczonych na rysunku 1 oraz zależności wyrażonych równaniem 7 opracowano matematyczne modele, przedstawiające relacje pomiędzy wymianą CO_2 , O_2 oraz innymi elementami fotosyntetycznego i fotooddechowego metabolizmu węgla (LAING i współaut. 1974, FARQUHAR i współaut. 1980, FARQUHAR i von CAEMMERER 1982, HARLEY i współaut. 1985, HAHN 1987, 1991). Niektóre zostały przytoczone niżej, gdyż bardzo ułatwiają zrozumienie interakcji pomiędzy fotosyntezą i fotooddychaniem.

Stosunek ilości CO_2 wiązanego w fotosyntezie (P_T) do uwalnianego w fotooddychaniu (P_R) określa równanie:

$$P_T/P_R = v_c / 0,5 v_o \quad (8)$$

gdzie: 0,5 — stechiometryczny stosunek węgla uczestniczącego w fotooddychaniu do uwalnianego jako CO_2 . Przyjmując wartości v_c i v_o podane w poprzednim rozdziale uzyskuje się modelowy stosunek P/P_R około 6.

Rozwiązując równanie (8) dla $P_T = P_R$ można określić wysokość kompensacyjnego stężenia (punktu) CO_2 fotosyntezy, Γ , nie uwzględniającą wytwarzania CO_2 w oddychaniu ciemniowym:

$$\Gamma = O (0,5 V_o K_c / V_c K_o) \quad (9).$$

Zgodnie z równaniem (9), pomiędzy wysokością Γ a stężeniem O_2 w miejscu działania rubisco, występuje prosta zależność stwierdzana doświadczalnie (OGREN 1984). Przyjmując podaną uprzednio wielkość tego stężenia O_2 otrzymuje się modelową wartość Γ 1,6 μM , to jest około 36 ppm, która mieści się w zakresie wielkości uzyskiwanych w pomiarach.

Szybkość asymilacji CO_2 , odpowiadająca fotosyntezie netto (P_N), zależy bezpośrednio od natężenia przebiegających równocześnie reakcji wiązania i uwalniania CO_2 . Wyraża to wzór:

$$P_N = v_c - 0,5v_o - R_D \quad (10)$$

gdzie: R_D — wytwarzanie CO_2 w oddychaniu ciemniowym.

Wprowadzanie bardziej złożonych modeli matematycznych (FARQUHAR i współaut. 1980, FARQUHAR i von CAEMMERER 1982) przekracza ramy tego artykułu. Przytoczone zostaną niżej tylko ich końcowe postacie.

Fotosyntezę netto przy napromienieniu niższym od wysycającego, gdy bezpośrednim czynnikiem ograniczającym zarówno karboksylację, jak i oksygenację jest odtwarzanie RuBP, wyraża wzór:

$$P_N = J (C - \Gamma \cdot / 4,5C + 10,5\Gamma \cdot) - R_D \quad (11)$$

gdzie: J określa potencjalną szybkość transportu elektronów zależną od natężenia napromienienia; współczynniki liczbowe uwzględniają stechiometrię reakcji PCRC i PCOC.

Fotosyntezę wysyconą fotonami przedstawia natomiast równanie:

$$P_N = V_C [C - \Gamma \cdot / C + K_C(1 + O/K_O)] - R_D \quad (12)$$

Przytoczone wyżej wzory zakładają, że natężenie funkcjonowania PCRC i PCOC przy napromienieniu niższym od wysycającego fotosyntezę zależy od gęstości strumienia fotosyntetycznych fotonów, a przy wyższych — od aktywności karboksylacyjnej rubisco. Natomiast stosunek ilości węgla metabolizowanego na obu drogach, tak jak relacja fotosyntezy do fotooddychania, zależy od kinetycznych parametrów rubisco oraz stężeń CO_2 i O_2 w miejscu funkcjonowania tego enzymu.

Na podstawie tych samych danych wyjściowych można określić inne parametry charakteryzujące funkcjonowanie obu sprzężonych cykli przemian węgla (BERRY i FARQUHAR 1978, FARQUHAR i współaut. 1980). Przykłady zamieszczono w tabeli 1.

Tabela 1

Wytwarzanie PGA oraz zużywanie NADPH i ATP w fotosyntetycznych i fotooddechowych przemianach węgla

Szybkość produkcji PGA	$2v_C + 1,5v_O = (2 + 1,5\phi) v_C = (2 + 4\Gamma \cdot / C)v_C$
Szybkość zużycia NADPH	$2v_C + 2v_O = (2 + 2\phi) v_C = (2 + 4\Gamma \cdot / C)v_C$
Szybkość zużycia ATP	$3v_C + 3,5v_O = (3 + 3,5\phi) v_C = (3 + 7\Gamma \cdot / C) v_C$

gdzie $\phi = v_O/v_C$

FOTOODDYCHANIE A PRODUKTYWNOŚĆ ROŚLIN

Około 90% suchej masy roślin powstaje z fotosyntetycznie asymilowanego CO_2 (ZELITCH 1992). Z tego powodu fotooddychanie, jako proces przeciwny do fotosyntetycznego wiązania CO_2 , należy do podstawowych czynników produktywności roślin. Nadrzędnym czynnikiem wydajności fotosyntetycznej i produktywności roślin jest fotosynteza netto (P_N), którą definiuje wzór 6.

W szeregu prac donoszono o paradoksie wyrażającym się brakiem prostej ilościowej zależności pomiędzy P_N , wyrażoną na jednostkę powierzchni liścia, a wytwarzaniem masy roślinnej (plonowaniem). Wydaje się jednak, że stwierdzenia te zostały sformułowane na podstawie wyników wyrzykowych pomiarów P_N , nie reprezentujących rzeczywistej asymilacji netto CO_2 całej rośliny (ZELITCH 1982). Badania, w których zapewniono odpowiednią dokładność oznaczeń wymiany CO_2 , wykazywały bowiem prostą zależność pomiędzy P_N całej rośliny a jej wzrostem (BUGBEE i MONJE 1992, GRODZINSKI 1992). Również autorzy tego artykułu w badaniach prowadzonych z pszenicą, żytem i pszenżytem, rosnącymi w warunkach kontrolowanych przy małym napromienieniu, stwierdzali ściśle

korelację pomiędzy suchą masą roślin i ich całkowitą fotosyntezą netto (MALESZEWSKI i współaut. 1993).

Rośliny C_3 w normalnych warunkach atmosferycznych tracą w wyniku fotooddychania około 40% fotosyntetycznie już związanego CO_2 . Powoduje to zmniejszenie produktywności i dodatkowe zużywanie wytwarzanych w świetlnej fazie fotosyntezy ATP i NADPH. Z tego względu jest uzasadnione uznawanie fotooddychania za niekorzystny, marnotrawny (ang. wasteful) proces (ZELITCH 1992).

REGULACJA FOTOODDYCHANIA

Niekorzystne znaczenie fotooddychania dla szybkości fotosyntezy i wytwarzania masy roślinnej stanowiło dodatkowy bodziec do podejmowania badań, których celem było poznanie mechanizmów regulacji fotooddychania oraz znalezienie sposobów wpływania na jego ilościowy stosunek do fotosyntezy. Równanie 7 wskazuje, że korzystna dla fotosyntezy zmiana relacji szybkości obu procesów może być następstwem zwiększenia współczynnika powinowactwa substratowego rubisco (V_{cK_o} / V_{oK_c}) oraz stosunku stężeń CO_2/O_2 w miejscu działania tego enzymu. Uwzględniano także możliwość zmniejszenia fotooddychania przez ograniczenie aktywności aparatu enzymatycznego PCOC.

Współczynnik powinowactwa substratowego CO_2/O_2 rubisco nie zależy od napromienienia ani od stężenia RuBP jako trzeciego substratu wspólnego dla obu aktywności enzymu (JORDAN i OGREN 1983, 1984, OGREN 1984). W badaniach mających na celu poznanie możliwości oddziaływania na względne szybkości fotooddychania i fotosyntezy poprzez zmianę właściwości rubisco znaleziono zaledwie kilka czynników wpływających na kinetyczne parametry tego enzymu.

Dla osiągnięcia maksymalnej szybkości katalitycznej rubisco musi ulec aktywacji, polegającej na przyłączeniu kolejno CO_2 i Mg^{2+} . W procesie aktywacji jon magnezowy wiąże się z karbaminianem ϵ -aminowej reszty lizyny 201 polipeptydu dużej podjednostki rubisco (MALESZEWSKI 1988, PORTIS 1990). Stwierdzono, że po zastąpieniu magnezu jonem innego metalu następuje znaczne zmniejszenie współczynnika powinowactwa substratowego enzymu i odpowiednie zwiększenie jego względnej aktywności oksygenacyjnej. Na przykład, współczynnik powinowactwa substratowego rubisco zaktywowanej jonami Mn^{2+} obniża się z około 70 do zaledwie około 4, co prawdopodobnie wynika z tego, że w reakcji oksygenacji RuBP, Mn^{2+} jest lepszym katalizatorem niż Mg^{2+} (JORDAN i OGREN 1981, CHEN i SPREITZER 1992).

Już w początkowym okresie badań nad fotooddychaniem (BJORKMAN i współaut. 1968, JOLLIFFE i TREGUNNA 1968, 1973, LAING i współaut. 1974) uzyskano pośrednie dane prowadzące do wniosku, że wzrost temperatury powoduje zwiększenie stosunku szybkości fotooddychania do szybkości fotosyntezy. Obecnie są podstawy do przyjęcia, że zjawisko to rzeczywiście występuje i ma co najmniej dwie przyczyny. Jedną z nich jest większy spadek rozpuszczalności CO_2 niż O_2 i spowodowane tym obniżenie stosunku stężeń CO_2/O_2 w miejscu działania rubisco, które zwiększa dodatkowo temperaturową stymulację aktyw-

ności oksygenacyjnej enzymu (KU i EDWARDS 1977, JORDAN i OGREN 1984). Druga przyczyna jest bezpośrednio związana ze zmianą wartości współczynnika powinowactwa substratowego CO_2/O_2 rubisco, spowodowaną odmienną energią aktywacji w reakcjach karboksylacji i oksygenacji RuBP (CHOLLET i OGREN 1975, CHEN i SPREITZER 1992).

Stosunek stężeń CO_2/O_2 w miejscu działania rubisco podczas fotosyntezy przebiegającej w atmosferze powietrza zależy od szybkości karboksylacji RuBP oraz dopływu CO_2 do chloroplastów spoza komórki oraz ze źródeł wewnętrznych. Przedstawiony na rysunku 1 schemat fotosyntetycznego i fotooddychowego metabolizmu węgla dotyczy w zasadzie wszystkich fotoautotrofów. W typowej postaci występuje jednak tylko u lądowych roślin C_3 . U sinic, mikroglonów, wodnych makrofitów oraz lądowych roślin C_4 i CAM funkcjonują dodatkowe mechanizmy, zwiększające stosunek stężeń CO_2/O_2 w miejscu działania rubisco, które istotnie modyfikują względne ilości metabolizowanego węgla w PCRC i PCOC (BADGER i PRICE 1994).

U sinic i glonów, których rubisco charakteryzuje się szczególnie niskim powinowactwem do CO_2 działa złożony, słabo jeszcze poznany, mechanizm aktywnego transportu przez błony komórkowe nieorganicznych form węgla i zwiększania stężenia ich w fotosyntetyzujących komórkach. Poznanymi składnikami tego mechanizmu są transbłonowe przenośniki nieorganicznych form węgla oraz anhydraza węglanowa (E.C. 4.2.1.1). W wyniku działania mechanizmu zatażającego, wewnątrzkomórkowe stężenie CO_2 może być nawet 10^3 razy wyższe niż w otoczeniu, przez co aktywność oksygenacyjna rubisco może być istotnie ograniczona. Analogiczny mechanizm funkcjonuje u wyższych roślin wodnych.

U roślin fotosyntetycznego typu C_4 , do których należy między innymi trzcina cukrowa, kukurydza, szarłat, portulaka, wnikający do liści CO_2 jest pierwotnie wiązany w komórkach mezofilu przy udziale karboksylazy fosfoenolopirogronianowej (E.C. 4.1.1.31). Czworowęglowy produkt karboksylacji, kwas szczawiooctowy, ulega redukcji do kwasu jabłkowego lub aminacji do kwasu asparaginowego. Metabolity te są transportowane do komórek pochwy wokółwiązkowej, otaczających wieńcowo wiązki przewodzące liścia, gdzie są przekształcane w CO_2 i pirogronian. Ten ostatni powraca do komórek mezofilu i jest substratem dla odtwarzania pierwotnego akceptora CO_2 w fotosyntezie roślin C_4 , kwasu fosfoenolopirogronianowego. Uwalniany w komórkach pochwy wokółwiązkowej CO_2 jest wtórnie wiązany przez rubisco i przekształcany w cyklu Calvina, działającym tylko w tych komórkach. Jedną z funkcji tego dodatkowego mechanizmu fotosyntetycznego u roślin C_4 jest wydajne dostarczanie CO_2 dla rubisco i ograniczanie aktywności oksygenacyjnej enzymu i fotooddychania. Dzięki niemu fotosynteza u roślin C_4 przy optymalnym napromienieniu i temperaturze charakteryzuje się większą szybkością od fotosyntezy u roślin C_3 , punktem kompensacyjnym zbliżonym do zerowego i niewrażliwością na O_2 w stężeniu atmosferycznym.

Podobny rozdział przestrzenny reakcji fotosyntezy, umożliwiający ograniczenie fotooddychania, występuje u roślin fotosyntetycznego typu pośredniego $\text{C}_3\text{-C}_4$. Należą do niego niektóre gatunki z rodzajów *Panicum*, *Mollugo*, *Moricandia*, *Neurachne* i *Flaveria*. W liściach tych roślin występują szczątkowe pochwy wokółwiązkowe, a fotosynteza ma szereg pośrednich właściwości fotosyntezy C_3

i C₄: mniejszą niż u roślin C₃ wrażliwość na O₂ w stężeniu atmosferycznym, obniżony punkt kompensacyjny, donoszono też o podwyższonej P_N (ZELITCH 1992).

U roślin fotosyntetycznego typu CAM, obejmującego sukulentę należące do rodziny gruboszowatych (*Crassulaceae*), występują elementy fotosyntezy C₃ i C₄ w tych samych komórkach, lecz działanie ich jest rozdzielone czasowo (BADGER i PRICE 1994). Pierwotna karboksylacja kwasu fosfoenolopirogronowego i synteza kwasów czterowęglowych odbywa się w nocy, przy otwartych aparatach szparkowych, a dekarboksylacja tych kwasów i wtórne wiązanie uwolnionego CO₂ przez rubisco następuje podczas dnia, gdy aparaty szparkowe są zamknięte. Główną fizjologiczną korzyścią z CAM jest ograniczenie transpiracji. Nagromadzenie w fotosyntetyzujących komórkach dużej puli prekursorów CO₂ podczas nocy i zamknięcie aparatów szparkowych podczas dnia niewątpliwie minimalizuje także straty węgla powodowane fotooddychaniem.

INHIBITORY FOTOODDYCHANIA

W badaniach mających na celu zwiększenie szybkości fotosyntezy netto i produktywności roślin brano pod uwagę możliwość stosowania inhibitorów fotooddychania, działających na reakcje poprzedzające uwalnianie w tym procesie CO₂. Znalaziono szereg związków hamujących przemianę PCOC (KLECZKOWSKI 1994). Najczęściej były stosowane: kwas glicydowy, inhibitor wytwarzania glikolanu (ZELITCH 1974); kwas α -hydroksy-2-pirydynometanosulfonowy (α -HPMS) hamujący oksydazę glikolanową (ZELITCH 1966); kwas oksyaminoocetowy (AOA) hamujący działanie aminotransferazy glioksalanowej (YOKOTA i KITAKA 1987) oraz hydrazyd kwasu izonikotynowego (INH), który hamuje zlokalizowaną w mitochondriach reakcję przekształcania glicyny w serynę (PRITCHARD i współaut. 1963). W zasadzie, żaden z tych związków nie spełnił oczekiwań, to jest nie powodował zwiększenia fotosyntezy netto przez specyficzne hamowanie fotooddychania. Co prawda, w kilku pracach doniesiono o uzyskaniu przejściowego wzrostu fotosyntezy netto w liściach pobierających małe dozy α -HPMS (ZELITCH 1966, ŁOBODA i współaut. 1988), lecz inne badania nie potwierdzały takiego efektu, co sugeruje, że może on wystąpić tylko w szczególnych warunkach doświadczalnych. Inhibitory fotooddychania, zwłaszcza INH, α -HPMS i AOA, powodujące gromadzenie się pośrednich metabolitów cyklu PCOC w fotosyntetyzujących komórkach, są natomiast przydatne w badaniach mających na celu określenie udziału tego cyklu w przemianach asymilowanego węgla (MALESZEWSKI i KAMIŃSKA 1984).

GENETYCZNE MODYFIKACJE FOTOODDYCHANIA

Podwyższenie fotosyntezy netto i produktywności roślin, zwłaszcza gatunków roślin o fotosyntezie typu C₃, teoretycznie może być osiągnięte przez uzyskanie mutantów o obniżonej aktywności fotooddechowej (równanie 6).

Jedną z dróg prowadzących do takiego celu może być genetyczna modyfikacja powinowactwa substratowego rubisco: względne zwiększenie aktywności karboksylacyjnej i obniżenie aktywności oksigenacyjnej tego kluczowego dla fotosyntezy i fotooddychania enzymu. Analizując poddaną mutacjom rubisco z różnych szczepów glonu *Chlamydomonas reinhardtii* stwierdzono, że zmiana jednego lub dwu aminokwasów w dużej podjednostce enzymu powoduje zmianę współczynnika powinowactwa substratowego CO_2/O_2 w zakresie od 62 u typu dzikiego do 36 u mutantu. Chociaż uzyskana zmiana bezpośrednio powodowała efekt przeciwny do pożądanego, to jednak potwierdza możliwość genetycznej modyfikacji funkcji rubisco (CHEN i współaut. 1990, CHEN i SPREITZER 1992, ZELITCH 1992).

Dażąc do zwiększenia fotosyntetycznej wydajności poszukiwano też mutantów roślin z defektami genetycznymi, wyrażającymi się fenotypowo brakiem lub obniżoną aktywnością niektórych enzymów PCOC. Okazało się jednak, że mutanty takie nie są zdolne do wegetacji w normalnej atmosferze. Przeżywają jedynie w warunkach nie sprzyjających fotooddychaniu, to jest przy wysokim stężeniu CO_2 lub niskim stężeniu O_2 . Na przykład u mutantu rośliny typu C_3 — *Arabidopsis thaliana* z niską aktywnością fosfatazy fosfoglikolanowej (E.C. 3.1.3.18), podczas fotosyntezy przebiegającej w warunkach umożliwiających fotooddychanie, gromadził się w tkankach fosfoglikolan, bezpośredni produkt oksigenacji RuBP, który hamował fotosyntetyczny metabolizm węgla i wzrost roślin (McCOURT i SOMERVILLE 1987, PIERCE 1988).

Drogą prowadzącą do zmniejszenia fotooddychania może być także uzyskiwanie mutantów fotoautotrofów z wysoką aktywnością katalazową. Są bowiem podstawy, aby sądzić, że w ich tkankach fotooddechowe wytwarzanie CO_2 w innych przemianach (równanie 4 i 5) niż należąca do PCOC reakcja przekształcania glicyny w serynę będzie znacznie ograniczone lub wyeliminowane. Wynik badań prowadzonych w tym kierunku wykazał, że mutanty (na przykład tytoniu) z dużą aktywnością katalazową mają wyższą niż typy dzikie fotosyntezę netto w warunkach sprzyjających intensywnemu fotooddychaniu, to jest przy podwyższonej temperaturze, wysokim stężeniu O_2 , niskim stężeniu CO_2 . Rezultaty uzyskane w laboratorium zostały potwierdzone w doświadczeniach polowych. Są więc poważne podstawy do stwierdzenia, że wysoka aktywność katalazowa w fotosyntetycznych tkankach może zmniejszać fotooddechowe straty węgla (ZELITCH 1992).

WPLYW WYSOKIEGO STĘŻENIA CO_2 W ATMOSFERZE NA FOTOODDYCHANIE

Rośliny C_3 rozwijające się w atmosferze powietrza, zawierającego objętościowo około 21% O_2 i 0,035% CO_2 , tracą w wyniku fotooddychania około 40% asymilowanego netto węgla (ZELITCH 1992). Metodą zwiększania produktywności roślin, stosowaną często w uprawach szklarniowych, jest utrzymywanie w otaczającej je atmosferze stężenia CO_2 w zakresie 0,06%–0,2%. Skutki nawożenia roślin zwiększonymi dawkami CO_2 były też przedmiotem wielokierunkowych badań (GRODZINSKI 1992). Warto nadmienić, że zagadnienie to jest także uwzględnione w realizowanym w USA od 1988 roku przez NASA programie badań kosmicznych CELSS (Controlled Ecological Life Support System), którego celem

jest skonstruowanie samoodtwarzalnego, sztucznego środowiska, umożliwiającego długotrwałe przebywanie człowieka w prawie pełnej izolacji, jedynie przy dopływie energii słonecznej lub ze sztucznych źródeł jądrowych (GALSTON 1992).

Dotychczasowe badania wykazały, że utrzymywanie w atmosferze stężenia CO_2 znacznie wyższego od występującego obecnie w powietrzu powoduje ograniczenie fotooddychania, zwiększenie fotosyntezy i szybkości wzrostu u większości roślin typu C_3 . Problem stałego oddziaływania podwyższonego stężenia CO_2 jest jednak bardzo złożony, gdyż modyfikuje ono równocześnie liczne inne procesy i właściwości roślin: zagęszczenie i stan aparatów szparkowych, działanie naturalnych mechanizmów pobierania i transportu CO_2 , wytwarzanie i rodzaj końcowych produktów fotosyntezy, ich przemieszczanie i dalsze przemiany, działanie hormonów i rozwój. Powoduje to liczne wtórne, nieprzewidziane i nie zawsze korzystne konsekwencje (GRODZINSKI 1992).

FIZJOLOGICZNE FUNKCJE FOTOODDYCHANIA

Podjmując próby minimalizacji fotooddychania, jako procesu niekorzystnego dla produktywności roślin, należałoby znać jego fizjologiczne funkcje i wiedzieć w jakich warunkach mogą być one ograniczone lub zbędne. Niestety, mimo 40 lat wielokierunkowych badań poglądy dotyczące tego problemu opierają się jeszcze w dużym stopniu na hipotezach.

Fotooddychanie jest niewątpliwie wewnętrznym źródłem CO_2 , które przy utrudnionym dopływie CO_2 z atmosfery zewnętrznej, na przykład przy zamkniętych szparkach podczas stresu wodnego, zapewnia funkcjonowanie fotosyntezy kosztem nagromadzonych już w komórkach asymilatów. Umożliwia to odprowadzenie energii pochłoniętej przez barwniki fotosyntetyczne i chroni aparat fotosyntetyczny przed uszkodzeniami (MALESZEWSKI i KAMIŃSKA 1984, HEBER i współaut. 1989, PETERSON 1991). Podstawową funkcją cyklu C_2 jest natomiast odzyskiwanie dla fotosyntezy, przez ponowne włączenie do cyklu C_3 , do 75% węgla uczestniczącego w przemianach fotooddechowych, nie przekształconego w CO_2 (CANVIN 1990).

Zintegrowane procesy fotosyntezy i fotooddychania przebiegają w trzech organellach: chloroplastach, peroksysomach i mitochondriach (rys. 1). Uaktywnia to wewnątrzkomórkową wymianę metabolitów i ich transport. Nie jest wyjaśniony w zadawalającym stopniu problem wpływu tych procesów na oddychanie ciemniowe fotosyntetyzujących komórek (POSKUTA 1970, 1992). W napromienionych liściach stwierdzano wielokrotnie ograniczenie funkcjonowania oddechowych przemian związków węgla. Ostatnio wysunięto hipotezę, że może to następować w wyniku, zależnego od reakcji PCOC, hamowania dehydrogenazy pirogronianowej, regulującej dopływ węgla do cyklu Krebsa. Przy czym NADH wytwarzany w fotooddechowej reakcji przekształcania glicyny w serynę (równanie 3) może podtrzymywać mitochondrialny transport elektronów i wytwarzanie ATP (GEMEL i RANDALL 1992).

Przedmiotem licznych badań jest fotooddechowy cykl azotu. Wiadomo, że przebiegająca w mitochondriach reakcja przekształcania glicyny w serynę (równanie 3) jest głównym źródłem NH_3 w fotooddychających tkankach, który

powstaje w takich samych ilościach jak CO₂. Przy udziale układu enzymatycznego GS/GOGAT (rys. 1) azot amonowy jest reasymilowany przez włączenie do 2-oksylglutaranu z wytworzeniem glutaminianu. Ten ostatni stanowi donora grupy aminowej w reakcji PCOC glioksydan → glicyna, przebiegającej w peroksy-somach. Ostatnio, gromadzą się dowody wskazujące, że fotooddechowy cykl azotu nie jest zamknięty lecz powiązany z ogólnym metabolizmem azotowym rośliny i może pełnić funkcje syntetyczne, na przykład wytwarzanie netto glicyny i seryny w rosnących liściach (GIVAN i współaut. 1988, CANVIN 1990).

Podobną rolę spełnia PCOC i fotooddychanie w gospodarce fosforowej komórki. Odpowiedni poziom ortofosforanu nieorganicznego (P_i) jest niezbędny dla prawidłowego przebiegu fotosyntezy i innych procesów metabolicznych. P_i jest bowiem substratem w licznych reakcjach oraz pełni funkcje regulacyjne, na przykład w aktywacji enzymów. W fotosyntezie jest przekształcany w organiczne fosforany i odtwarzany podczas wytwarzania produktów końcowych: skrobi i sacharozy. Dodatkowym źródłem P_i jest przebiegająca w chloroplastach, należąca do PCOC, reakcja: fosfoglikolan → glikolan + P_i. Funkcja fotooddychania w gospodarce fosforowej sprowadza się więc do utrzymywania właściwej równowagi pomiędzy fosforanami organicznymi i ortofosforanem nieorganicznym w stromie chloroplastów (JACOB i LAWLOR 1993, KOZŁOWSKA i MALESZEWSKI 1994).

HAHN (1991) po dokonaniu metodami matematycznymi analizy funkcjonowania aparatu fotosyntetycznego i fotooddechowego w następujący sposób sformułował końcową konkluzję swoich badań. Najważniejszym wynikiem tej pracy jest stwierdzenie, że fotooddychanie, proces przeciwny do fotosyntezy i dlatego uważany za marnotrawny (ang. wasteful), ma stabilizujące znaczenie dla fotosyntetycznego cyklu Calvina. Przy braku fotooddychania równowaga cyklu Calvina nie jest możliwa. Zostało to ustalone z całą pewnością.

ZAKOŃCZENIE

Fotooddychanie zmniejsza fotosyntezę, która jest podstawowym czynnikiem w produktywności roślin. Z tego względu przyjęte powszechnie w piśmiennictwie określanie tego procesu przymiotnikiem marnotrawny (ang. wasteful) można uznać za uzasadnione, chociaż lepiej wyrażającym ten jego aspekt byłby termin energetycznie kosztowny. Zrozumiałe też są próby znalezienia metod specyficznego oddziaływania na fotooddychanie.

W ostatnich latach nagromadziły się jednak fakty wskazujące, że przemiany fotooddechowe są biologicznie ważnym elementem, rozszerzającym zakres zdolności przystosowawczych roślin do zróżnicowanych i zmiennych warunków środowiska. Tezę tę mocno potwierdza już sam fakt ewolucyjnego ukształtowania się i utrwalenia fotooddychania. Potwierdzeniem jej jest także zawężony zakres przystosowawczy, na przykład do warunków świetlnych i temperaturowych roślin typu C₄, u których fotooddychanie jest w sposób naturalny ograniczone.

Wyeliminowanie lub ograniczenie fotooddychania u niektórych roślin użytkowych mogłoby przynieść pozytywne efekty. Trzeba się jednak liczyć z tym, że byłoby to związane ze zmianami wielu ich właściwości biochemicznych, anatomicznych i fizjologicznych oraz wymagań odnośnie warunków środowiskowych.

Uzyskanie praktycznych korzyści z takiej modyfikacji wydaje się też bardziej realne przy uprawie roślin w warunkach częściowo lub całkowicie kontrolowanych.

IS PHOTORESPIRATION A WASTEFUL BIOLOGICAL PROCESS?

Summary

Photorespiration decreases the photosynthetic rate and plant productivity. Therefore, the definition of photorespiration as a wasteful process and search for the methods of its reduction in usable plants is reasonable. There are, however, some data indicating that photorespiration has also a number of positive effects which are necessary for normal function of photosynthesis under different and variable environmental conditions.

LITERATURA

- BADGER M. R., PRICE G. D., 1994. *The role of carbonic anhydrase in photosynthesis*. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 45, 369–392.
- BERRY J. A., FARQUHAR G. D., 1978. *The CO₂ concentrating function of C₃ photosynthesis. A biochemical model*. [W:] HALL D., COOMBS J., GOODWIN T., (red.). Proc. 4th Int. Congr. Photosynthes. Biochem. Soc. London, 119–131.
- BJORKMAN O., HIESEY W. M., NOBS M. A., NICHOLSON F., HART R. W., 1968. *Effect of oxygen concentration in higher plants*. Carnegie Inst. Wash. Year Book 66, 228–232.
- BUGBEE B., MONJE O., 1992. *Limits of crop productivity*. BioScience, 42, 494–502.
- CAMPBELL W. J., OGREN W. L., 1990. *Glyoxylate inhibition of ribulosebiphosphate carboxylase/oxygenase activation in intact, lysed, and reconstituted chloroplasts*. Photosynth. Res. 23, 257–68.
- CANVIN D. T., 1990. *Photorespiration and CO₂ — concentrating mechanisms*. [W:] DENNIS D. T., TURPIN D. H., (red.) Plant Physiology, Biochemistry and Molecular Biology, Longman Scientific & Technical 253–273.
- CHEN Z., SPREITZER R. J., 1992. *How various factors influence the CO₂/O₂ specificity of ribulose-1,5-biphosphate carboxylase / oxygenase*. Photosynth. Res. 31, 157–164.
- CHEN Z., GREEN D., WESTHOFF C., SPREITZER R. J., 1990. *Nuclear mutation restores the reduced CO₂/O₂ specificity of ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase in a temperature — conditional chloroplast mutant of Chlamydomonas reinhardtii*. Arch. Biochem. Biophys. 283, 60–67.
- CHOLLET R., OGREN W. L., 1975. *Regulation of photorespiration in C₃ and C₄ species*. Bot. Rev. 41, 137–179.
- COOK C. M., MULLIGAN R. M., TOLBERT N. E., 1985. *Inhibition and stimulation of ribulose-1,5-biphosphate carboxylase/oxygenase by glyoxylate*. Arch. Biochem. Biophys. 240, 392–401.
- DECKER J. P., 1955. *A rapid postillumination deceleration of respiration in green leaves*. Plant Physiol. 30, 82–84.
- DECKER J. P., TIO M. A., 1959. *Photosynthetic surges in C₃ Arabidopsis*. J. Agr. Univ. P. R. 43, 50–55.
- FARQUHAR G. D., von CAEMMERER S., 1982. *Modeling of photosynthetic response to environmental conditions*. [W:] Encyclopedia of Plant Physiology, 12B, LANGE O. L., NOBEL P. S., OSMOND C.B., ZIEGLER H. (red.). Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 549–587.
- FARQUHAR G. D., von CAEMMERER S., BERRY J. A., 1980. *A biochemical model of photosynthetic CO₂ assimilation in leaves of C₃ species*. Planta 149, 78–90.
- GALSTON A. W., 1992. *Photosynthesis as a basis for life support on earth and in space*. BioScience 42, 490–493.
- GIVAN C. V., JOY K. W., KLECZKOWSKI L. A., 1988. *A decade of photorespiratory nitrogen cycling*. TIBS 13 (11), 433–437.
- GEMEL J., RANDALL D. D., 1992. *Light regulation of leaf mitochondrial pyruvate dehydrogenase complex*. Plant Physiol. 100, 908–914.
- GRODZINSKI B., 1992. *Plant nutrition and growth regulation by CO₂ enrichment*. BioScience 42, 517–525.
- HAHN B. D., 1987. *A mathematical model of photorespiration and photosynthesis*. Ann. Bot. 60, 157–169.

- HAHN B. D., 1991. *Photosynthesis and photorespiration: modelling the essentials*. J. Theor. Biol. 151, 123-139.
- HANSON K. R., PETERSON R. B., 1985. *The stoichiometry of photorespiration during C₃-photosynthesis is not fixed: evidence from combined physical and stereochemical methods*. Arch. Biochem. Biophys. 237, 300-313.
- HARLEY P. C., WEBER J. A., GATES D. M., 1985. *Interactive effects of light, leaf temperature, CO₂ and O₂ on photosynthesis in soybean*. Planta 165, 249-263.
- HEBER U., VIIL J., NEIMANIS S., MIMURA T., DIETZ K. J., 1989. *Photoinhibitory damage to chloroplasts under phosphate deficiency and alleviation of deficiency and damage by photorespiratory reactions*. Z. Naturforsch. 44, 524-536.
- JACOB J., LAWLOR D. W., 1993. *Extreme phosphate deficiency decreases the in vivo CO₂/O₂ specificity factor of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase-oxygenase in intact leaves of sunflower*. J. Exp. Bot. 44, 1635-1641.
- JOLLIFFE P. A., TREGUNNA E. B., 1968. *Effect of temperature, CO₂ concentration, and light intensity on oxygen inhibition of photosynthesis in wheat leaves*. Plant Physiol. 43, 902-906.
- JOLLIFFE P. A., TREGUNNA E. B., 1973. *Environmental regulation of the oxygen effect on apparent photosynthesis in wheat*. Canad. J. Bot. 51, 841-853.
- JORDAN D. B., OGREN W. L., 1981. *A sensitive assay procedure for simultaneous determination of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase and oxygenase activity*. Plant Physiol. 67, 237-245.
- JORDAN D. B., OGREN W. L., 1983. *Species variation in kinetic properties of RuBP carboxylase/oxygenase*. Arch. Biochem. Biophys. 227, 425-33.
- JORDAN D. B., OGREN W. L., 1984. *The CO₂/O₂ specificity of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase: Dependence on ribulosebisphosphate concentration, pH and temperature*. Planta 161, 308-313.
- KANIUGA Z., 1977. *Regulacja fotooddychania*. Zesz. Nauk. Uniw. Jagiell. 464, 75-86.
- KLECZKOWSKI L. A., 1994. *Inhibitors of photosynthetic enzymes/carriers and metabolism*. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 45, 239-267.
- KLECZKOWSKI L. A., ŁOBODA T., NALBORCZYK E., 1988. *Pomiary fotooddychania u roślin wyższych*. Wiad. Bot. 32, 227-240.
- KOZŁOWSKA B., MALESZEWSKI S., 1994. *Low level of inorganic orthophosphate in growth medium increases metabolism and excretion of glycolate by Chlorella vulgaris cells cultivated under air conditions*. Plant Physiol. Biochem. 32 (5), 717-721.
- KU S. B., EDWARDS G. E., 1977. *Oxygen inhibition of photosynthesis. I. Temperature dependence and relation to O₂/CO₂ solubility ratio*. Plant Physiol. 59, 986-990.
- LAING W. A., OGREN W. L., HAGEMAN R. H., 1974. *Regulation of soybean net photosynthetic O₂ fixation by the interaction of CO₂, O₂ and ribulose-1,5-diphosphate carboxylase*. Plant Physiol. 54, 678-685.
- LOBODA T., KLECZKOWSKI L. A., TARŁOWSKI J., NALBORCZYK E., 1988. *A transient stimulation of net photosynthesis of rye leaves by α-hydroxy-2-pyridinemethanesulphonic acid (α-HPMS) due to inhibition of photorespiratory CO₂ release*. J. Exp. Bot. 39, 1765-770.
- MALESZEWSKI S., 1974. *Tlen jako element regulacji fotosyntezy*. Post. Biochem. 20, 379-402.
- MALESZEWSKI S., 1988. *Karboksylaza/oksygenaza rybulozo-1,5-bisfosforanu - kluczowy enzym fotosyntezy i fotooddychania*. Post. Biol. Kom. 15, 233-254.
- MALESZEWSKI S., BYSTRZEJEWSKA G., 1981. *Czynniki biofizyczne i biochemiczne warunkujące produktywność fotosyntetyczną roślin*. Post. Biol. Kom. 8, 211-225.
- MALESZEWSKI S., KAMIŃSKA Z., 1984. *Działanie tlenu w fotosyntetycznym metabolizmie węgla*. Post. Biochem. 30, 317-334.
- MALESZEWSKI S., TOMCZYK J., KOŁACIŃSKA B., KOZŁOWSKA B., 1993. *Photosynthesis and growth of wheat, rye and Triticale at various daylengths and night temperatures*. Plant Physiol. Biochem. 31, 773-776.
- MCCOURT P., SOMERVILLE C. R., 1987. *The use of mutants for the study of plant metabolism*. [W:] *The Biochemistry of Plants*, STUMPF P. K., CONN E. E. (red.), Academic Press, San Diego, New York, Berkeley, Boston, London, Sydney, Tokyo, Toronto, 33-64.
- OGREN W. L., 1984. *Photorespiration: Pathways, regulation, and modification*. Ann. Rev. Plant Physiol. 35, 415-442.
- PETERSON R. B., 1991. *Effects of O₂ and CO₂ concentrations on quantum yields of photosystems I and II in tobacco leaf tissue*. Plant Physiol. 97, 1388-1394.
- PIERCE J., 1988. *Prospects for manipulating the substrate specificity of ribulose bisphosphate carboxylase/oxygenase*. Physiol. Plant. 72, 690-698.

- PORTIS A. R., 1990. Rubisco activase. *Biochim. Biophys. Acta* 1015, 15-28.
- POSKUTA J., 1970. Fotooddychanie u roślin. *Wiadom. Bot.*, 14, 43-54.
- POSKUTA J., 1992. Zależności pomiędzy fotosyntezą i oddychaniem u roślin. *Wiadom. Bot.* 36, 7-52.
- PRITCHARD G. G., WHITTINGHAM C. P., GIFFIN W. J., 1963. The effect of isonicotinyl hydrazide on the photosynthetic incorporation of radioactive carbon dioxide into ethanol — soluble compounds of *Chlorella*. *J. Exp. Bot.* 14, 281-289.
- TOLBERT N. E., 1979. Glycolate metabolism by higher plants and algae. [W:] *Encyclopedia of Plant Physiology*, New series, 6, GIBBS M., LATZKO E., (red.). Springer-Verlag, Berlin, 338-352.
- YOKOTA A., KITAOKA S., 1987. Rates of glycolate synthesis and metabolism during photosynthesis of *Euglena* and microalgae grown on low CO₂. *Planta* 170, 181-189.
- ZELITCH I., 1966. Increased rate of net photosynthetic carbon dioxide uptake caused by the inhibition of glycolate oxidase. *Plant Physiol.* 41, 1623-1631.
- ZELITCH I., 1971. *Photosynthesis, photorespiration and plant productivity*. Academic Press, New York;
- ZELITCH I., 1974. The effect of glycidate, an inhibitor of glycolate synthesis, on photorespiration and net photosynthesis. *Arch. Biochem. Biophys.* 163, 367-377.
- ZELITCH I., 1982. The close relationship between net photosynthesis and crop yield. *BioScience* 32, 796-802.
- ZELITCH I., 1992. Control of plant productivity by regulation of photorespiration. *BioScience* 42, 510-516.

JÓZEF KAPUSTA

Instytut Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk
Noskowskiego 12/14, 61-704 Poznań

TRANSFORMOWANIE ROŚLIN DWULIŚCIENNYCH PRZY UŻYCIU AGROBACTERIUM

AGROBACTERIUM JEST PATOGENEM WYWOŁUJĄCYM CHOROBE W WYNIKU
KOLONIZACJI GENETYCZNEJ ROŚLINY GOSPODARZA

W roku 1907 ukazał się w *Science* artykuł SMITHA i TOWNESENDA, w którym autorzy wykazali, że przyczyną powstawania tumorowatych narośli na szyjce korzeniowej niektórych gatunków roślin są bakterie. Stąd wywodzi się angielska nazwa choroby crown gall disease co po polsku tłumaczy się jako choroba szyjki korzeniowej lub rak szyjki korzeniowej. Wiadomo obecnie, że czynnikiem sprawczym choroby jest wolno żyjąca bakteria glebowa *Agrobacterium tumefaciens*. Ponieważ rozwój choroby następuje w wyniku infekcji tkanki uprzednio zranionej, stąd u roślin uprawnych, które są poddawane mechanicznym zabiegom pielęgnacyjnym, guzowate narośla tworzą się najczęściej właśnie na szyjce korzeniowej. Inne bakterie o nazwie gatunkowej *Agrobacterium rhizogenes* wywołują schorzenie objawiające się powstawaniem w miejscu infekcji obfitej masy korzeni włosowatych. Zarówno *A. tumefaciens* jak i *A. rhizogenes* należą do rodziny *Rhizobiaceae*. Do tej samej rodziny należy także *A. radiobacter*, gatunek niewirulentny, niezdolny do infekcji oraz bardzo liczne gatunki rizobiów, które cechuje zdolność wchodzenia w związki symbiotyczne z roślinami motylkowatymi. Wiadomo obecnie, że agrobakteria poza nielicznymi wyjątkami infekują efektywnie jedynie rośliny dwuliścienne.

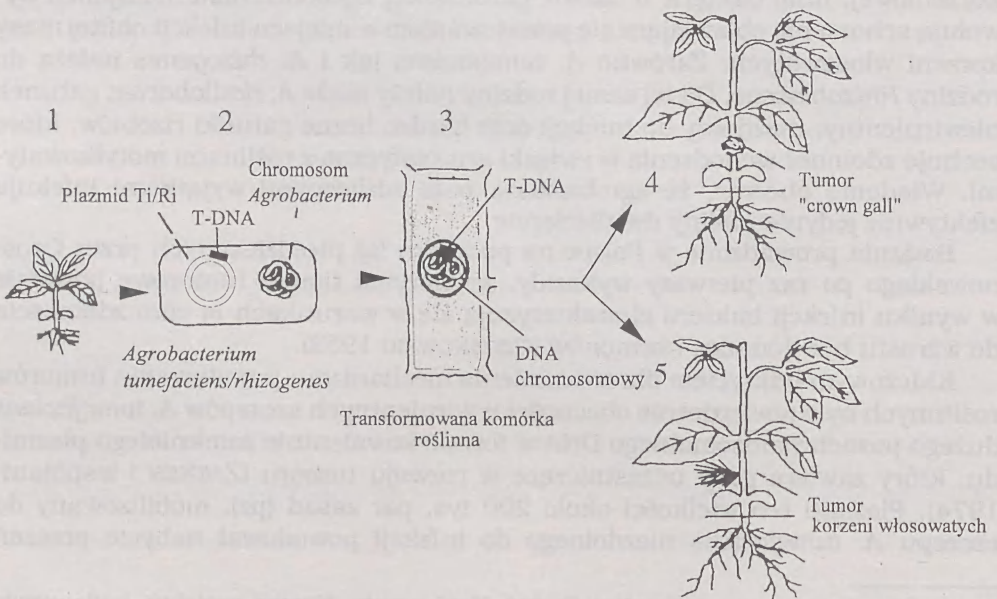
Badania prowadzone w Polsce na początku lat pięćdziesiątych przez Czosnowskiego po raz pierwszy wykazały, że sterylne tkanki tumorowe powstałe w wyniku infekcji bakterii charakteryzują się w warunkach *in vitro* zdolnością do wzrostu bez dodatku hormonów (CZOSNOWSKI 1952).

Kluczowym odkryciem dla zrozumienia mechanizmu powstawania tumorów roślinnych było stwierdzenie obecności u wirulentnych szczepów *A. tumefaciens* dużego pozachromosomalnego DNA w formie kowalentnie zamkniętego plazmidu, który zawiera geny uczestniczące w rozwoju tumoru (ZAENEN i współaut. 1974). Plazmid ten wielkości około 200 tys. par zasad (pz), mobilizowany do szczepu *A. tumefaciens* niezdolnego do infekcji powodował nabycie przezeń

właściwości tumorogennych, stąd nadano mu nazwę plazmidu indukującego tumory Ti (ang. tumor inducing plasmid) (Van LAREBEKE i współaut. 1975). Analogicznie plazmid, który w szczepach *A. rhizogenes* determinuje rozwój korzeni włosowatych, oznaczono Ri (ang. roots inducing plasmid). W wyniku badań nad biologią indukowania tumorów roślinnych prowadzonych w latach siedemdziesiątych w wielu laboratoriach na świecie wykazano, że skutkiem infekcji powodowanej przez *Agrobacterium* jest przeniesienie fragmentu plazmidu Ti do komórki roślinnej, a powstała w wyniku podziałów tej komórki narośl posiada właściwości tumorowe. Przenoszony do komórki roślinnej w następstwie infekcji przez *Agrobacterium* fragment DNA został oznaczony jako T-DNA (ang. transfer DNA). Fragment ten o wielkości około 20 tys. pz zostaje następnie włączony do genomu jądrowego komórki. Konsekwencją fizjologiczną wprowadzenia bakteryjnego DNA do komórki roślinnej jest przestawienie metabolizmu komórkowego na potrzeby patogena. Transformowane w ten sposób komórki roślinne rozpoczynają nieograniczoną biosyntezę znacznych ilości hormonów (auksyn i cytokinin), która stymuluje ich niekontrolowaną proliferację co prowadzi do powstania narośli o właściwościach tumoru. Ponadto są wytwarzane metabolity, pochodne aminokwasów, głównie argininy, jak na przykład oktopina lub nopalina oraz inne tak zwane opiny, które przez *Agrobacterium* są wykorzystywane jako źródło węgla i azotu.

Przedstawiony na rysunku 1 schemat interakcji *Agrobacterium* z komórką roślinną stanowi unikalny w przyrodzie przykład naturalnego przenoszenia genów pomiędzy światem bakterii i roślin. Dla określenia tego zjawiska przyjęła się termin „kolonizacja genetyczna”.

Odkrycie zasady przenoszenia informacji genetycznej z bakterii do komórek roślinnych spowodowało daleko idące praktyczne i teoretyczne konsekwencje

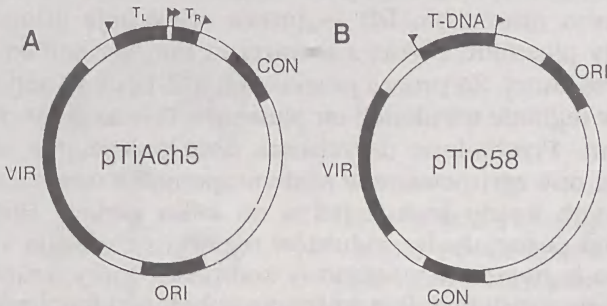


dla dalszego rozwoju biologii molekularnej i szeroko rozumianej biotechnologii roślin.

MOLEKULARNY MECHANIZM PRZENOSZENIA MATERIAŁU GENETYCZNEGO Z *AGROBACTERIUM* DO KOMÓRKI ROŚLINNEJ

Plazmidy stanowią bardzo ważny dla życia bakterii, dodatkowy, pozachromosomalny nośnik informacji genetycznej, który decyduje o dużej ich zmienności i potencjale adaptacyjnym. Charakterystyczną właściwością plazmidów jest zdolność do autonomicznej replikacji, w wyniku której często powstają dodatkowe kopie plazmidu. Plazmid Ti występuje w komórkach *Agrobacterium* w niewielkiej liczbie kopii (1–2), głównie z racji swej wielkości. Plazmid Ti o wielkości około 180–220 tys. pz znacznie przewyższa rozmiarami inne plazmidy bakteryjne. Podobnie jak większość plazmidów, plazmid Ti może być przenoszony z jednej komórki *Agrobacterium* do drugiej na drodze koniugacji.

Plazmidy *Agrobacterium* zawierają geny biosyntezy i katabolizmu opin, których występowanie u poszczególnych szczepów bakterii stało się podstawą dla ich klasyfikacji. Znaczny fragment plazmidu Ti stanowią geny odpowiedzialne za następujące funkcje: replikację, katabolizm opin i zdolność koniugacji. Na pozostałą część plazmidu składają się geny regionu wirulencji *vir* oraz region T-DNA, którego geny są przenoszone do komórki roślinnej (rys. 2). Na ogół



Rys. 2. Ogólny schemat organizacyjny plazmidu Ti szczepu oktopinowego (A) i nopalinowego (B) *Agrobacterium tumefaciens* (wg DRAPER i współaut. 1988).

Oznaczenia: T_L — lewy T-DNA, T_R — prawy T-DNA, CON — region kodujący funkcje koniugacji, ORI — region kodujący funkcje replikacji, VIR — region kodujący funkcje wirulencji.

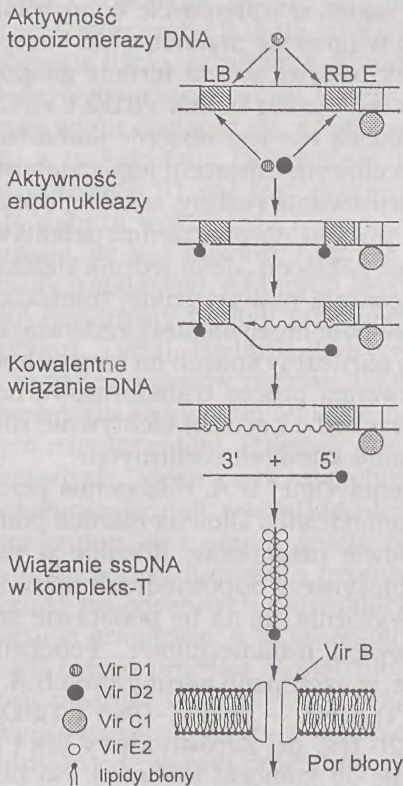
Rys. 1. Przeniesienie materiału genetycznego z *Agrobacterium tumefaciens* lub *A. rhizogenes* do komórki roślinnej. Wirulentny szczep *Agrobacterium* infekuje roślinę w miejscu zranienia (1). *Agrobacterium* oprócz DNA chromosomalnego zawiera plazmid Ti lub Ri (2). Region plazmidu Ti/Ri zwany T-DNA zostaje przeniesiony do komórki roślinnej, gdzie integruje z DNA na chromosomie roślinnym (3). Przeniesiony T-DNA koduje geny odpowiedzialne za produkcję hormonów wzrostu i opin. Podwyższony poziom hormonów (auksyn i cytokinin) stymuluje podzięły i tworzenie tumoru z komórki stransformowanej przez *A. tumefaciens* (4). W przypadku *A. rhizogenes* przeniesione do komórki roślinnej geny dla auksyn oraz zmieniające wrażliwość na hormony geny *rol* powodują wyrastanie korzeni włosowatych (5). (wg BOND i GRESSHOFF 1993 — zmodyfikowane).

plazmidy Ti zawierają jeden region T-DNA, jedynie szczepy oktopinowe *A. tumefaciens* posiadają na plazmidzie Ti dwa odrębne odcinki T-DNA, lewy czyli T_L-DNA i prawy T_R-DNA. Każdy z tych regionów może być niezależnie przenoszony do komórki roślinnej. Znamioną właściwością genów znajdujących się w regionie T-DNA jest fakt, że ulegają one ekspresji w roślinie, ponieważ odcinki kodujące tych genów są otoczone sekwencjami regulacyjnymi — zarówno TATA od strony 5' odpowiadającą za start transkrypcji, jak i AATAAA na 3' końcu, która reguluje terminację transkrypcji, i stanowi sygnał poliadenylacji. Geny z regionu T-DNA posiadają również sekwencje, które są rozpoznawane przez eukariotyczne czynniki transkrypcji i podlegają częściowo roślinnym mechanizmom regulacyjnym. Jakkolwiek geny regionu T-DNA posiadają własne sygnały transkrypcyjne, to jednak poziom ich ekspresji jest kontrolowany przez sekwencje chromosomowe, w sąsiedztwie których nastąpiła integracja T-DNA. Uzależniony jest również od tkanki, do której przynależy transformowana komórka.

Szczegółowe badania struktury T-DNA wykazały, że u różnych szczepów *A. tumefaciens* występują identyczne onkogeny: *ipt* — gen izopentynylotransferazy katalizującej biosyntezę cytokininy oraz geny biosyntezy auksyn: *iaaM* — gen monooksygenazy tryptofanu, *iaaH* — gen hydrolazy indoliloacetoamidu. W obrębie T-DNA są zlokalizowane ponadto geny katabolizmu odpowiednich, specyficznych dla danego szczepu, opin. Region T-DNA plazmidu Ti jest ograniczony z prawej i lewej strony tak zwanymi sekwencjami granicznymi, które tworzą odwrócone powtórzenia 25 par zasad. Sekwencje te, oznaczone jako LB — lewa sekwencja graniczna, RB — prawa sekwencja graniczna, oddzielają T-DNA od reszty plazmidu i wraz z zawartymi tam genami są przenoszone do jądra komórki roślinnej. Za proces przenoszenia T-DNA są odpowiedzialne geny zlokalizowane w regionie wirulencji *vir* plazmidu Ti oraz geny *chv* na chromosomie bakteryjnym. Przebadano dotychczas dość precyzyjnie większość genów z regionu *vir*. Są one zgrupowane w siedem operonów oznaczonych literami od A do G, z których każdy koduje jeden do kilku genów. Białka VirA i VirG w odróżnieniu od pozostałych produktów regionu *vir* ulegają ekspresji konstytutywnej. Białka te tworzą dwuczłonowy kompleks, który uruchamia ekspresję pozostałych genów wirulencji. Pod wpływem substancji fenolowych pochodzenia roślinnego, takich jak acetosyringon, alkohol koniferolowy, kwas ferulowy bądź innych prekursorów lignin, kompleks ulega indukcji. Białko VirA zlokalizowane w błonie *Agrobacterium* działa jako receptor substancji fenolowych. Jego domena zwrócona na zewnątrz ściany komórkowej bakterii działa jako sensor wrażliwy na pH i temperaturę. Receptcja sygnału fenolowego jest możliwa jedynie w przedziale pH 5,0–5,8. Domena białka VirA zwrócona do wnętrza komórki aktywuje białko VirG, które działa jak aktywator transkrypcji. Składający się z 12 pzd odcinek DNA nazywany *vir*-box znajduje się na 5' nie kodującym końcu każdego operonu *vir*. Postuluje się, że prawdopodobny mechanizm działania białka VirG polega na jego zdolności do wiązania się do tego regionu i stymulacji tą drogą transkrypcji mRNA dla odpowiednich białek. Nie jest bliżej poznany mechanizm regulacji, w którym uczestniczy białko VirG. Przypuszczalnie powinowactwo białka VirG do *vir*-box jest regulowane na drodze cyklicznej fosforylacji i defosforylacji.

Kluczowym etapem infekcji jest przeniesienie T-DNA do jądra zainfekowanej komórki roślinnej. Jest rzeczą charakterystyczną, że we wstępnej fazie tego procesu geny *vir* plazmidu Ti kooperują ściśle z genami, które są kodowane przez chromosom *Agrobacterium*. Geny te, *chvA*, *chvB*, *pscA* i *att* uczestniczą w nawiązywaniu przez *Agrobacterium* i komórkę roślinną fizycznego kontaktu oraz są odpowiedzialne za biosyntezę odpowiednich składników błony komórkowej. Opiszano szereg mutantów dla genów zlokalizowanych na chromosomie *Agrobacterium*, które utraciły zdolność do biosyntezy niektórych z tych składników. Mutanty te wykazując różnego rodzaju zaburzenia w procesie agregacji z komórkami roślinnymi nie są zdolne do infekcji. Etap asocjacji komórki roślinnej i bakteryjnej obejmuje na wstępie wymianę sygnałów molekularnych, która inicjuje wytworzenie struktur niezbędnych do przeniesienia materiału genetycznego do komórki roślinnej. Postuluje się, że pewną rolę w agregacji bakterii i komórek roślinnych odgrywa białko vitronectyna. Białko to, po raz pierwszy opisane w ludzkich hodowlach komórkowych, dodane do kultury *Agrobacterium* tuż przed inokulacją tkanki roślinnej uniemożliwiało asocjację bakterii z komórkami marchwi. Białka o własnościach vitronectyny opisano w oddziaływaniach jakie zachodzą po zapyleniu pomiędzy łagiewką pyłkową i znamieniem słupka oraz w przypadku niektórych interakcji patogennych bakterii z komórkami roślinnymi.

Właściwy proces przeniesienia T-DNA rozpoczyna się od wycięcia z plazmidu Ti jednoniciowego odcinka DNA, czyli ssDNA (rys. 3). W procesie tym uczestniczą



Rys. 3. Model syntezy nici T w *Agrobacterium*. Białko VirD1 i VirD2 rozpoznają prawą sekwencję graniczną T-DNA (RB). Czynniki VirD1 posiada aktywność topoiizomerazy DNA. Białko VirD2 o aktywności endonukleazy wiąże się kowalennie z wyseparowaną nicią DNA, co zabezpiecza ją przed degradacją eksonukleolityczną. Białko VirC1 wiąże się do regionu enhanserowego E przylegającego do prawej sekwencji granicznej T-DNA, co jest niezbędne do optymalnego formowania nici T. Produkt genu *virE2* tworzy kompleks z wyseparowanym jednoniciowym DNA (ssDNA) w sposób niezależny od jego sekwencji. Białka VirB zlokalizowane w porach błon komórkowych pośredniczą w transporcie kompleksu nici T i białek VirE2 przez błony (wg HOOYKAAS i BEIJERSBERGEN 1994 — zmienione).

dwa białka: VirD1 i VirD2. Białko VirD1 o aktywności topoiizomerazy zapewnia rozplecenie helisy DNA, VirD2 zaś jest endonukleazą, która po przecięciu dolnej nici T-DNA wiąże się kowalentnie do jej 5' końca. Wytworzenie jednoniciowego T-DNA zapoczątkowane przecięciem dolnej nici DNA przy prawej sekwencji granicznej, zachodzi prawdopodobnie równoległe z syntezą nowej nici. Inne białko VirC1 charakteryzuje się powinowactwem do specyficznej sekwencji wzmacniającej E o nazwie *overdrive*. Odcinek *overdrive* znajduje się w kierunku 3' od prawej sekwencji granicznej, w jej bezpośrednim sąsiedztwie. Uważa się, że sekwencja *overdrive* warunkuje optymalne wytworzenie ssDNA, jak również zwiększa częstotliwość transformacji. Przymuszcza się, że kompleks białka VirC1 z sekwencją *overdrive* umożliwia rozpoznanie przez endonukleazę VirD2 prawej sekwencji granicznej. Bliższa analiza struktury białka VirD2 wykazała ponadto, że N terminalny koniec tej cząsteczki posiada tak zwany sygnał lokalizacji jądrowej NLS, który odgrywa istotną rolę w transporcie nici T do jądra komórki roślinnej. Wytworzony jednoniciowy DNA jest opłaszczony przez cząsteczki białka VirE2, które wiążą się kooperatywnie z ssDNA. Uważa się, że tworzenie kompleksu ssDNA z nicią T nie zależy od jego sekwencji. Stwierdzono, że również białko VirE2 posiada domenę NLS odpowiedzialną za transport w kierunku jądra. Kompleks nici ssDNA oraz białek VirD2 i VirE2 jest odporny na działanie enzymów nukleolitycznych: DNA-azy, nukleazy S1 i egzonukleazy VII. W transporcie nici T uczestniczą ponadto inne białka — produkty operonu B. Szereg białek tego operonu: VirB4, VirB8, VirB9, VirB10 i VirB11 jest zlokalizowanych w błonie bakteryjnej i pośredniczy, jak się sądzi, w transporcie kompleksu nici T przez błony. Najmniej poznanym etapem w procesie przenoszenia kompleksu nici T do komórki roślinnej jest etap, który odbywa się na terenie gospodarza roślinnego. Wiadomo jedynie, że w proces ten oprócz białek VirD2 i VirE2 jest zaangażowane również białko VirF. Jakkolwiek nie jest obecnie jasna funkcja białka VirF, to nie ulega wątpliwości, że docelowym miejscem jego działania jest komórka roślinna. Jeśli bowiem do transformowania rośliny, u której uprzednio uzyskano ekspresję białka VirF, używano szczepu *Agrobacterium* defektywnego w operonie F, to cały proces przebiegał bez zakłóceń. Jeśli jednak defektywny szczep *Agrobacterium* użyto do transformowania rośliny dzikiej (niezdolnej do biosyntezy białka VirF) to transformacja nie była możliwa. Jest zadziwiające, że wymienione wyżej białka Vir funkcjonują w naturalny sposób na terenie komórki roślinnej. Fakt ten sprawia, że w konsekwencji proces transformowania przy użyciu wektora jakim jest *Agrobacterium* zachodzi bardziej efektywnie niż przy zastosowaniu innych metod transformowania komórek roślinnych.

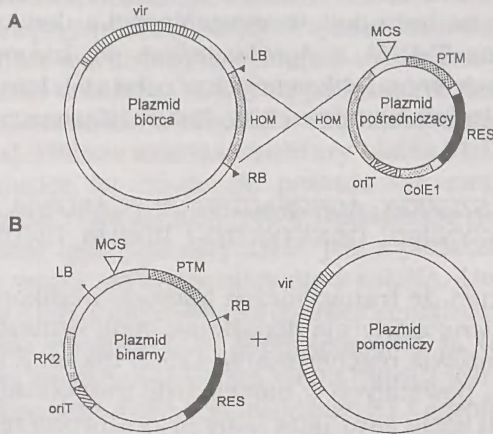
Mechanizm przenoszenia informacji genetycznej u *A. rhizogenes* przebiega zasadniczo podobnie jak w przypadku *A. tumefaciens*. Główna różnica pomiędzy tymi obydwoma patogenami tkwi w budowie plazmidów. Różnice w rodzaju kodowanych na plazmidach Ri genów do biosyntezy odpowiednich opin, stanowią podstawę klasyfikacji *A. rhizogenes*. Wyróżnia się na tej podstawie szczepy agropinowe, mannopinowe, kukumopinowe i mikimopinowe. Podobnie jak w przypadku oktopinowych *A. tumefaciens*, w szczepach agropinowych *A. rhizogenes* wyróżnia się dwa regiony T-DNA, T_L-DNA — lewy T-DNA i T_R-DNA — prawy T-DNA. Każdy wielkości około 15–20 tys. pz. Zarówno lewy jak i prawy segment T-DNA są przenoszone niezależnie do komórki roślinnej. Na prawym

T-DNA znajdują się oprócz sekwencji odpowiedzialnej za kodowanie syntezy agropiny, inaczej niż w oktopinowych *A. tumefaciens* jedynie geny do syntezy auksyn *iaaM* i *iaaH*. Na T_L-DNA zaś są zlokalizowane cztery loci: *rolA*, *rolB*, *rolC* i *rolD* odpowiedzialne za formowanie korzeni włosowatych. Geny *rol* decydują o specyficznych właściwościach tumoru korzeniowego, który różni się pod wieloma względami od typowych korzeni danej rośliny. Nie są obecnie znane funkcje tych genów. Przypuszcza się jedynie, że zmieniają one między innymi wrażliwość korzeni włosowatych na hormony, w szczególności auksyny. Molekularny mechanizm przenoszenia T-DNA z *Agrobacterium* do komórki roślinnej został omówiony wyczerpująco w opublikowanych w ostatnich latach pracach przeglądowych (HOOYKAAS i BEIJERSBERGEN 1994, ZUPAN i ZAMBRYSKI 1995).

ROZBROJONE SZCZEPY AGROBACTERIUM STANOWIĄ PODSTAWOWE NARZĘDZIE INŻYNIERII GENETYCZNEJ ROŚLIN DWULIŚCIENNYCH

Wykazano wcześniej, że transgeniczne komórki uzyskane z pomocą dzikich szczepów *A. tumefaciens* zawierają dodatkowe geny syntezy regulatorów wzrostu. Cecha ta uniemożliwia regenerowanie z nich roślin. Z tkanek tumorowych korzeni włosowatych, powstałych w następstwie transformowania za pośrednictwem *A. rhizogenes* u wielu gatunków istnieją możliwości regenerowania roślin, jednak regeneranty wyraźnie różnią się pod wieloma względami od roślin macierzystych i wykazują szereg cech tkanki tumorowej. Regeneranty otrzymane z korzeni włosowatych mają zmienione cechy morfologiczne i fizjologiczne, pomarszczone liście, zaburzoną dominację wierzchołkową pędu, nietypową skłonność do wytwarzania masy korzeni włosowatych nawet na liściach. Fakty te skłoniły wielu badaczy do zainteresowania się możliwościami rozbrojenia plazmidu *A. tumefaciens*. Obecnie nie ulega wątpliwości, że poza T-DNA żadna inna część plazmidu Ti nie jest przenoszona do komórki roślinnej. Długo jednak trwała debata wokół tego zagadnienia (BEVAN i CHILTON 1982). W roku 1983 wykazano, że jest możliwe fizyczne rozdzielanie plazmidu Ti na dwa oddzielne plazmidy (replikony), z których jeden zawierał region wirulencji a drugi odcinek T-DNA bez utraty funkcji przenoszenia genów do komórki roślinnej (HOEKEMA i współaut. 1983). Badania genetyczne nad mechanizmem wirulencji udowodniły, że żaden z genów regionu T-DNA nie uczestniczy w tym procesie i nie jest niezbędny do efektywnej transformacji. Konstatacje powyższe uutorowały drogę nowym rozwiązaniom. Polegały one na skonstruowaniu tak zwanych szczepów rozbrojonych, które zawierają plazmidy z całkowicie wydeletowanym T-DNA, a zachowują jednak wszystkie niezbędne funkcje do przeniesienia T-DNA, to znaczy region *vir* i zespół genów *chw* na chromosomie. Zmodyfikowane w ten sposób *Agrobacterium* może przenosić do komórki roślinnej dowolne geny dostarczone na odrębnych plazmidach, pod warunkiem że plazmidy te zawierają sekwencje graniczne, a w szczególności prawą sekwencję, która jest miejscem inicjacji całego procesu. Konstrukcję taką nazwano układem binarnym a rozbrojony plazmid Ti (bez T-DNA) przyjęto nazywać plazmidem pomocniczym (rys. 4). Wyprowadzanie roślin z komórek transformowanych tą drogą nie różni się zasadniczo od typowej procedury regeneracji. Wyłączając przypadki tak zwanej

zmienności somaklonalnej, rośliny transgeniczne zregenerowane tą drogą, poza nową cechą związaną z wprowadzonym genem, niczym nie różnią się od materiału matecznego. Od czasu kiedy po raz pierwszy zaproponowano metodę opartą na wykorzystaniu plazmidów binarnych, transformowanie roślin z wykorzystaniem tej metody zyskało dużą popularność, przede wszystkim dlatego, że manipulacje genetyczne na małych plazmidach binarnych są bardzo ułatwione.



Rys. 4. Schemat organizacyjny plazmidów *Agrobacterium* do transformowania w systemie kointegracyjnym (A) i binarnym (B).

A. Region homologiczny (HOM) plazmidu biorecy i plazmidu pośredniczącego umożliwia w wyniku integracji obu plazmidów wprowadzenie roślinnego markera selekcji (PTM) w obręb sekwencji granicznych (LB i RB). Geny regionu wirulencji *vir* po integracji plazmidu biorecy i plazmidu pośredniczącego funkcjonują w układzie *cis* w obrębie tego samego replikonu. B. Plazmid binarny mobilizowany do szczepu *Agrobacterium* zawierającego rozbrojony plazmid pomocniczy nie ulega integracji z plazmidem gospodarza. Geny *vir* z plazmidu pomocniczego działają w systemie *trans*. Oznaczenia: HOM — miejsce homologii, w obrębie której zachodzić może kointegracja plazmidów, LB, RB — odpowiednio lewa i prawa sekwencja graniczna, PTM — roślinny marker selekcyjny (np. *nptII*), RES — gen dla antybiotyku markera selekcji plazmidu w komórce biorecy, *ColE1* — sekwencja początku replikacji z plazmidu *ColE1*, *oriT* — sekwencja inicjacji transferu plazmidu w trakcie koniugacji *Agrobacterium*, RK2 — sekwencja zapewniająca szeroki zakres gospodarza, MCS — uniwersalne miejsce klonowania dodatkowych genów.

Inna strategia rozbrojenia plazmidu Ti, która jednakże jak dotychczas zyskała wyraźnie mniejsze zastosowanie, polega na wprowadzeniu w miejsce wydeletowanego T-DNA sekwencji, które zapewniają miejsca homologiczne z innym plazmidem, do którego wklonowuje się geny do transformowania (ZAMBRYSKI i współaut. 1983). Zabieg ten umożliwia integrację plazmidu zawierającego wklonowany gen z rozbrojonym plazmidem Ti. Układ do transformowania w tym systemie nazwano kointegracyjnym (rys. 4).

GENY MARKEROWE I REPORTEROWE UMOŻLIWIĄ SELEKCJĘ I MONITOROWANIE EFEKTYWNOŚCI TRANSFORMOWANIA

Ogólnie, metoda transformowania roślin przy użyciu *Agrobacterium* polega na zainfekowaniu odpowiednich eksplantatów roślinnych określonym szczepem

Agrobacterium. Po upływie 1–3 dni kokultury, w warunkach *in vitro* bakterie obrastają eksplantaty. Procedura przewiduje na tym etapie odmycie bakterii, a następnie zastosowanie odpowiednich pożywek regeneracyjnych oraz zestawu właściwych czynników selekcyjnych, dzięki którym wzrost transgenicznych komórek będzie stymulowany, nie transformowanych zaś hamowany (DRAPER i współaut. 1988, KAPUSTA i współaut. 1990). Selekcja ma na celu wyeliminowanie także *Agrobacterium*, co uzyskuje się dzięki użyciu antybiotyków carbenicyliny lub cefotaximu. Antybiotyki te nie są toksyczne dla większości gatunków roślin. Geny markerowe zawarte w obrębie sekwencji granicznych na plazmidach binarnych lub kointegracyjnych kodują białka enzymatyczne, warunkujące oporność na określone czynniki selekcyjne, na które komórki dzikie, nie transformowane są wrażliwe. Dzięki temu komórki stransformowane zyskują w warunkach selekcji *in vitro* przewagę i mogą się namnażać. Zależnie od rodzaju stosowanego czynnika selekcji, nie transformowane komórki nie namnażają się bądź zamierają.

Oprócz genów markerowych, konstruowane do transformowania plazmidy *Agrobacterium* zawierają także tak zwane geny reporterowe. Geny te są odpowiedzialne za kodowanie produktów, które łatwo wykrywa się prostymi testami enzymatycznymi lub histochemicznymi. Zarówno produkty genów markerów selekcji, jak i tak zwanych genów reporterowych nie występują w roślinach w sposób naturalny. Fakt ten pozwala z jednej strony na selekcjonowanie komórek transgenicznych, z drugiej zaś równoległe umożliwia potwierdzenie efektywności selekcji dzięki wykrywaniu ekspresji genów reporterowych. Ekspresja niektórych genów następuje już po 24 h od zainfekowania *Agrobacterium* a dotyczy to zwłaszcza genów zawierających sekwencje regulatorowe warunkujące ekspresję konstytutywną. Podział na markery selekcji i geny reporterowe ma znaczenie głównie systematyczne. O ile bowiem ze swej natury tylko niektóre geny pozwalają na selekcjonowanie komórek transformowanych, to opracowane metody umożliwiają wykrywanie produktów większości genów zarówno na etapie pierwotnego transkryptu (hybrydyzacja typu northern), jak i białka enzymatycznego (western blotting).

GENY MARKEROWE UŻYWANE DO SELEKJONOWANIA TRANSGENICZNYCH TKANEK ROŚLINNYCH

Do selekcji stransformowanych komórek wykorzystuje się geny, które kodują oporność na wybrane antybiotyki lub herbicydy. W zależności od potrzeb stosuje się dodatkowe systemy pozwalające selekcjonować transformowane komórki.

Najbardziej rozpowszechnionym markerem selekcji jest gen dla enzymu fosfotransferazy neomycynowej *nptII*, pochodzący z transpozonu Tn 5 (FRALEY i współaut. 1983). Enzym ten warunkuje oporność na szereg antybiotyków aminoglikozydowych, takich jak: neomycyna, kanamycyna i genetycyna (G418). *NptII* inaktywuje wymienione antybiotyki na drodze fosforylacji. Podobny gen bakteryjny, kodujący enzym *N*-acetylotransferazę-3-gentamycyny AAC(3), charakteryzuje się zdolnością detoksyfikacji wzmiankowanych wyżej antybiotyków aminoglikozydowych a także gentamycyny i paromomycyny.

Inny dość szeroko stosowany gen *hpt* koduje fosfotransferazę hygromycyny. Działanie *hpt* podobnie jak *nptII* polega na inaktywacji antybiotyku na drodze jego fosforylacji.

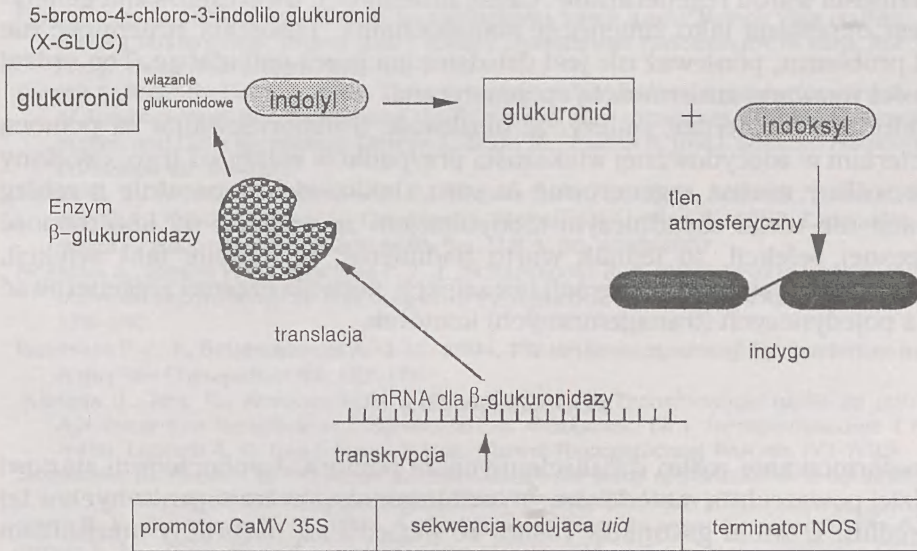
Do efektywnych markerów pozwalających selekcjonować transformowane komórki roślinne należą geny, które warunkują cechę oporności na herbicydy. Spośród tych genów wymienić należy gen *aro*, który koduje zmutowaną izoformę syntazy EPSP (syntaza enolopirogronowo-fosfoszikimowa) (COMAI i współaut. 1985). Syntaza EPSP jest miejscem działania herbicydu Roundup, którego substancja aktywna *N*-fosfonometylo-glicyna w sposób nieodwracalny inaktywuje enzym przerywając tym samym biosyntezę aminokwasów aromatycznych. Niedobór aminokwasów aromatycznych, a w szczególności nagromadzenie się w toksycznym stężeniu kwasu szikimowego w tkankach poddanych działaniu herbicydu, w krótkim czasie prowadzi do ich zamierania. Obecność w transgenicznym komórkach genu *aro*, który koduje niewrażliwą na herbicyd syntazę EPSP, umożliwia przeżywanie transformowanych komórek i regenerowanych z nich roślin. Podobny co do zasady system selekcji oparty na tolerancji na herbicyd opracowano dla herbicydu Glean. Miejscem działania tego herbicydu jest syntaza acetylomleczanowa (ALS) (SATHASIVAN i współaut. 1991). Niewrażliwy na działanie herbicydu enzym ALS chroni przed zaburzeniami szlak biosyntezy aminokwasów z rozgałęzionym łańcuchem bocznym w sposób analogiczny, jak w przypadku Roundupu odporny EPSPS zabezpiecza normalny metabolizm w szlaku przemian kwasu szikimowego. Gen *bar* warunkuje oporność na herbicyd Basta lub Bialofos. Fosfinotrycyna — czynnik aktywny tych herbicydów w sposób nieodwracalny hamuje syntazę glutaminową (GS). W wyniku przerwania łańcucha przyswajania azotu nagromadza się w komórkach toksyczny dla nich amoniak. Gen *bar* koduje enzym acetylotransferazę fosfinotrycyny, który detoksyfikuje herbicyd.

Doświadczając warunki selekcji uwzględnia się na ogół fakt, że rośliny cechuje różnicowana wrażliwość na każdy z czynników selekcyjnych z osobna. Zdolność tolerowania antybiotyku czy herbicydu zależy także od typu eksplantatu, wieku rośliny, statusu fizjologicznego, a również genotypu i właściwości odmianowych. Ustalenie zatem optymalnej dawki czynnika selekcyjnego w pożywce, obok wyboru odpowiedniego eksplantatu i sposobu regeneracji, stanowi klucz do powodzenia transformowania niezależnie od stosowanego wektora.

GENY REPORTEROWE POZWALAJĄ NA SZYBKĄ IDENTYFIKACJĘ STRANSFORMOWANYCH TKANEK

Spośród genów reporterowych powszechne zastosowanie znalazła β -glukuronidaza (*GUS*), którą koduje gen pochodzenia bakteryjnego *uid*. Enzym β -glukuronidaza odznacza się zdolnością rozkładu wiązania glukuronidowego. Wiązanie takie występuje w syntetycznym substracie α -glukuronidzie (5-bromo-4-chloro-3-indolyl glukuronid). W wyniku rozpadu substratu powstaje glukuronid i indoksył, który pod wpływem tlenu natychmiast dimeryzuje do niebieskiego barwnika indygo (rys. 5) (STOMP 1992). Dzięki tym właściwościom można śledzić tkankowo specyficzną ekspresję *GUS* w komórkach roślin transgenicznych nawet przyżyciowo, względnie w materiale utrwalonym po uprzednim wyekstrahowaniu chlorofilu. Do oznaczania ekspresji tego enzymu opracowano również

bardzo czuły pomiar fluorymetryczny. Szerokie zastosowanie znalazła metoda analizy odcinków promotorowych genów, które sfuzjonowane z sekwencją kodującą genu *uid* umożliwiają prześledzenie *in situ* ekspresji *GUS* pod wpływem określonego promotora. Skonstruowano dla tych celów szereg plazmidów binarnych zawierających miejsca restrykcyjne umożliwiające wklonowanie odcinka promotorowego dowolnego genu.



Rys. 5. Gen dla β-glukuronidazy *uid* ulega ekspresji w transformowanych komórkach. Enzym rozkłada syntetyczny substrat x-glukuronid (5-bromo-4-chloro-3-indolilo glukuronid) do glukuronidu i indoksyłu. Pod wpływem tlenu indoksył tworzy na drodze dimeryzacji niebieski barwnik indygo.

Do genów reporterowych, których również używa się jako markerów transformowania zalicza się także lucyferazę (*LUC*), acetylotransferazę chloramfenikolu (*CAT*), enzymy uczestniczące w syntezie antocyjanów (R i C1) i inne.

ROŚLINY TRANSGENICZNE POWINNY BYĆ REGENEROWANE Z POJEDYNCZYCH, TRANSFORMOWANYCH KOMÓREK

Konieczność regenerowania roślin z pojedynczych transformowanych komórek wynika z samej natury transformowania przez *Agrobacterium*, która polega na przeniesieniu z bakterii do jądra komórki roślinnej jednoniciowego T-DNA. Do otrzymywania roślin transgeniczných na drodze regenerowania z pojedynczych komórek skłaniają również względy genetyczno-hodowlane. Hodowcy oczekują bowiem jednorodnego pod względem genetycznym materiału roślinnego. Postulat, żeby rośliny transgeniczne cechowała genetyczna jednorodność narzuca konieczność skrócenia fazy *in vitro*, ponieważ dotychczasowe doświadczenia nad regeneracją roślin wskazują, że im krótszy jest okres hodowli *in vitro*

tym większe prawdopodobieństwo, że regenerowany materiał zachowa cechy rośliny macierzystej. Wiadomo obecnie, że jedynie niektóre spośród stosowanych obecnie technik regeneracji pozwalają na otrzymanie materiału roślinnego genetycznie jednorodnego. Zalicza się do nich przede wszystkim procedury polegające na stymulacji wzrostu merystemów istniejących w pierwotnym eksplanacie. Inne metody regeneracji, polegające na odróżnicowaniu, proliferacji a następnie ponownym różnicowaniu tkanek, są obciążone możliwością występowania zmienności wśród regenerantów. Część zmienności, uwarunkowana genetycznie, jest określana jako zmienność somaklonalna. Pozostała zmienność nie stanowi problemu, ponieważ nie jest dziedziczona przez potomstwo. Ten rodzaj zmienności nazwano zmiennością epigenetyczną.

Konkludując stwierdzić należy, że możliwość transformowania za pomocą *Agrobacterium* w zdecydowanej większości przypadków zależy od tego, czy dany gatunek rośliny można regenerować *in vitro*. Jakkolwiek generalnie przebieg regeneracji nie ulega zasadniczym modyfikacjom ze względu na konieczność równoczesnej selekcji, to jednak warto nadmienić, iż właśnie fakt selekcji, odmiennie niż w systemie regeneracji bez selekcji, pozwala częściej zregenerować rośliny z pojedynczych (transgenicznych) komórek.

PODSUMOWANIE

Transformowanie roślin dwuliściennych za pomocą *Agrobacterium* stanowi najbardziej powszechną metodę otrzymywania genotypów transgenicznych w tej grupie roślin. U wielu gatunków roślin, ze względu na naturalny mechanizm biologicznego transferu materiału genetycznego, dużą wydajność oraz precyzję z jaką obcy DNA zostaje wprowadzony do genomu biorecy, transformowanie z użyciem *Agrobacterium* jako wektora nie posiada alternatywy. Istnieje jednak liczna grupa roślin, głównie z rodziny motylkowatych oraz roślin drzewiastych, u których poza nielicznymi wyjątkami, transformowanie niezależnie od stosowanej metody następuje w dalszym ciągu znaczne problemy. Wydaje się, że również w przypadku tych gatunków roślin, wykorzystanie *Agrobacterium* odegrać powinno istotną rolę, jakkolwiek nie należy rezygnować z poszukiwania innych podejść na przykład techniki mikrowstrzeliwania lub równoległego zastosowania *Agrobacterium* i mikrowstrzeliwania.

TRANSFORMATION OF DICOTYLEDONOUS PLANTS USING AGROBACTERIUM

Summary

Agrobacterium tumefaciens transfers a part of its Ti plasmid, named the transferred DNA (T-DNA), to plant cells during tumor induction. Expression of *Agrobacterium* genes in plant cells results in their transformation into tumor cells. Expression of *A. rhizogenes* T-DNA segment of Ri plasmid in a plant cell causes hairy roots tumor formation. A comprehensive history of using *Agrobacterium* as a plant vector transformation system is presented. Recent advances in the molecular mechanism of T-DNA transfer, as well as plasmid vector transformation vehicles and plant transformation gene markers are reviewed.

LITERATURA

- BEVAN M., CHILTON M. D. 1982. *T-DNA of the Agrobacterium Ti and Ri plasmids*. Annu. Rev. Genet. 16, 357-384.
- COMAI L., FACCIOTTI D., HIATT W. R., THOMPSON G., ROSE R. E., STALKER D. M., 1985. *Expression in plants of a mutant aroA gene from Salmonella typhimurium confers tolerance to glyphosate*. Nature 317, 741-744.
- CZOSNOWSKI J., 1952. *Charakterystyka fizjologiczna trzech typów tkanek Vitis vinifera: normalnej, tumora bakteryjnego (crown gall) i tumora chemicznego hodowanych in vitro*. Spr. Poz. Tow. Przyj. Nauk. Prace Kom. Biol. 13, 1-20.
- DRAPER J., SCOTT R., HAMIL J., 1988. *Transformation of dicotyledonous plant cells using the Ti plasmid of Agrobacterium tumefaciens and the Ri plasmid of A. rhizogenes*. [W:] *Plant Genetic Transformation and Gene Expression*. DRAPER J., SCOTT R., WALDEN R. (red.). London: Blackwell Scientific Publisher. str. 69-158.
- FRALEY R. T., ROGERS S. G., HORSCH R. B., SANDERS P. R., FLICK J. S., ADAMS S., BITTNER M., BRAND L., FINK C. L., FRY J., GALLUPPI G., GOLDBERG S., HOFFMAN N. L., WOO S., 1983. *Expression of bacterial genes in plant cells*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80, 4803-4807.
- HOEKEMA A., HIRSCH P. R., HOOYKAAS P. J. J., SCHILPEROORT R. A., 1983. *A binary plant vector strategy based on separation of vir and T-region of the Agrobacterium tumefaciens Ti plasmid*. Nature 303, 179-180.
- HOOYKAAS P. J. J., BEIJERSBERGEN A. G. M., 1994. *The virulence system of Agrobacterium tumefaciens*. Annu. Rev. Phytopathol 32, 157-179.
- KAPUSTA J., MOL R., KONCZAK-ISLAM I., BURZA W., 1990. *Transformacja roślin za pośrednictwem Agrobacterium tumefaciens i Agrobacterium rhizogenes*. [W:] *Transformowanie i regeneracja roślin*. LEGOCKI A. B. (red.). Poznań: Inst. Chemii Bioorganicznej PAN str. IV1-IV23.
- SATHASIVAN K., HAUGHN G. W., MURAI N., 1991. *Molecular basis of imidazolinone herbicide resistance in Arabidopsis thaliana var. Columbia*. Plant Physiol. 97, 1044-1050.
- SMITH E. F., TOWNSEND C. O., 1907. *A plant tumor of bacterial origin*. Science 25, 671-673.
- STOMP A. M., 1992. *Histochemical detection of GUS*. [W:] *GUS protocols. Using the GUS gene as a reporter of gene expression*. GALLAGER S. R. (red.). San Diego: Academic Press, Inc. str., 103-114.
- VAN LAREBEKE N., GENETELLO C., SCHELL J., SCHILPEROORT R. A., HERMANS A. K., HERNALSTEENS J. P., VAN MONTAGU M., 1975. *Acquisition of tumor-inducing ability by non-oncogenic agrobacteria as a result of plasmid transfer*. Nature 255, 742-743.
- ZAENEN I., VAN LAREBEKE N., TEUCHY H., VAN MONTAGU M., SCHELL J., 1974. *Supercoiled circular DNA in crown-gall inducing Agrobacterium strains*. J. Mol. Biol. 86, 109-127.
- ZAMBRYSKI P., JOOS H., GONETELLO C., LEEMANS J., VAN MONTAGU M., SCHELL J., 1983. *Ti plasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal regeneration capacity*. Eur. Molecular Biol. Org. Journal 2, 2143-2150.
- ZUPAN J. R., ZAMBRYSKI P., 1995. *Transfer of T-DNA from Agrobacterium to the plant cell*. Plant Physiol. 107, 1041-1047.

MONIKA RAKOCZY-TROJANOWSKA

Katedra Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin,
SGGW, Nowoursynowska 166, 02-787 Warszawa

GENETYCZNA TRANSFORMACJA ROŚLIN

WSTĘP

Genetyczna transformacja roślin polega na wprowadzeniu do komórek rośliny egzogennego DNA a następnie jego integrację z genomem roślinnym.

W przyrodzie istnieje unikalny, naturalny system transformacji roślin bakteryjnym DNA. Proces ten zachodzi podczas tumorigenezy, czyli tworzenia tumorowatych narośli na korzeniach roślin — choroby wywołanej przez bakterie glebowe *Agrobacterium tumefaciens*.

Wykorzystanie tego naturalnego systemu przenoszenia genów do prac nad sztuczną transformacją roślin było możliwe dzięki rozwojowi dwóch bardzo ważnych dziedzin biotechnologii. Pierwsza z nich to inżynieria genetyczna zapoczątkowana odkryciem i poznaniem mechanizmu działania enzymów restrykcyjnych. Jest to zespół technik biochemicznych pozwalających na izolowane i dowolne łączenie fragmentów DNA różnych organizmów. Druga to kultury *in vitro* tkanek, organów i komórek, która umożliwia selekcję i namnożenie pojedynczych komórek zawierających wprowadzone geny a następnie regenerację z nich roślin.

OGÓLNA CHARAKTERYSTYKA KONSTRUKTÓW WPROWADZANYCH DO ROŚLIN

Geny, które w procesie transformacji wprowadza się do komórek roślinnych, muszą być w odpowiedni sposób przygotowane, to znaczy zawierać promotor, terminator oraz inne specjalne sekwencje nukleotydów umożliwiające sprawną transkrypcję w nowym środowisku. Nie muszą to być fragmenty DNA naturalnie występujące w genomie roślinnym, dlatego też nazywa się je genami chimeralnymi. Dość często używanym promotorem przy konstruowaniu genów chimerycznych jest promotor 35S z wirusa mozaiki kalafiora (CaMV), który zapewnia wydajną transkrypcję wprowadzanych genów u wielu gatunków, głównie roślin dwuliściennych. Powszechnie stosowanym terminatorem jest *nos* z genu kodującego syntazę nopalinową u *A. tumefaciens*. Najczęściej wprowadza się jednocześnie dwa lub trzy geny, odpowiednio zorganizowane jako tak zwane konstrukty, które przygotowuje się i namnaża w komórkach bakterii. Konstrukty takie

na ogół zawierają oprócz (lub zamiast) genu „głównego” także geny selekcyjne i geny reporterowe (w doświadczeniach optymalizacyjnych używa się raczej konstruktów zawierających tylko geny selekcyjne i reporterowe). Produkty pierwszej grupy genów pozwalają na rozdzielenie tkanek, które uległy transformacji od nietransformowanych. Mogą to być, na przykład, geny warunkujące odporność na antybiotyki. Jeżeli do pożywki selekcyjnej doda się odpowiedni antybiotyk i umieści na niej tkankę po transformacji, to w takich warunkach przeżyją tylko te, które posiadają „geny odporności” na dany antybiotyk. Coraz częściej jako markerów selekcyjnych używa się genów warunkujących odporność na herbicydy. W ten sposób jednocześnie można wprowadzać cechę użytkową. Natomiast geny reporterowe umożliwiają szybkie stwierdzenie, czy w ogóle doszło do wprowadzenia całego konstruktów do komórki oraz wstępną ocenę wydajności procedury, ponieważ produkty tych genów są łatwe do wykrycia w bardzo krótkim czasie (we wprowadzanym odcinku DNA mogą znajdować się geny, których efekt działania nie zawsze jest od razu widoczny). Bardzo popularnym genem reporterowym jest *uid A*. Gen ten koduje enzym β -glukuronidazę, dla którego substratem jest 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-moczan (X-gluc). Wynikiem reakcji enzymatycznej jest produkt o barwie niebieskiej. Jeżeli transformowaną tkankę umieści się w roztworze X-gluc to pojawienie się w niej sektorów zabarwionych na niebiesko świadczy o obecności aktywnego genu *uid A*. Oczywiście stwierdzenie ekspresji genów reporterowych nie świadczy o ich integracji z genomem biorcy. W licznych badaniach wykazano jednak, że istnieje pozytywna korelacja między ekspresją przejściową a stabilną (co oznacza ich integracje z genomem biorcy) genów reporterowych i innych, znajdujących się w tym samym konstrukcie.

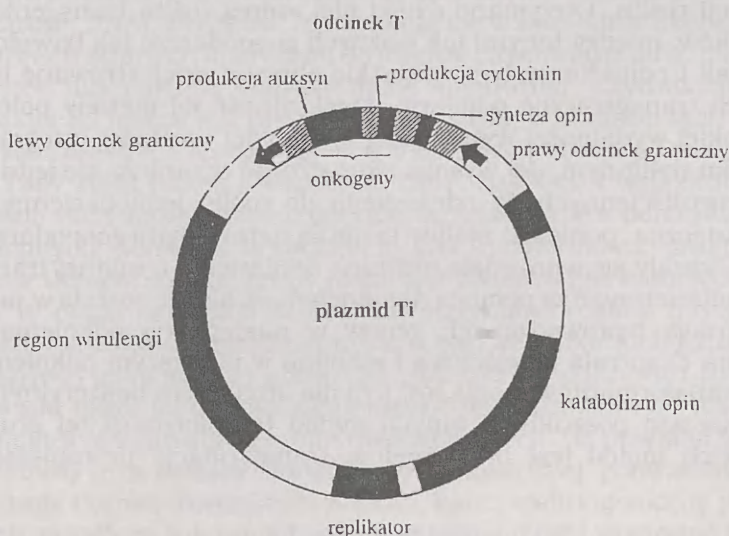
W trakcie wieloletnich badań nad transformacją roślin opracowano kilka metod wprowadzania genów, z których najczęściej są stosowane trzy: (1) transformacja z użyciem *Agrobacterium tumefaciens* lub (rzadziej) *A. rhizogenes* jako wektorów, (2) bezpośrednia transformacja protoplastów i (rzadziej) komórek z pomocą elektroporacji lub glikolu polietylenowego — PEG, (3) mikrowstrzelanie cząsteczek metali pokrytych DNA lub (rzadziej) RNA. Metody te zostaną poniżej omówione szczegółowo.

METODY WPROWADZANIA GENÓW

TRANSFORMACJA ZA POŚREDNICTWEM AGROBACTERIUM

Ta metoda transformacji wykorzystuje naturalną zdolność *Agrobacterium* do przekazywania swojego materiału genetycznego komórkom roślinnym w trakcie tumorogenezy. Po raz pierwszy zjawisko to zaobserwowali Zaenen i współautorzy w 1974 roku (HOOYKAAS i SCHILPEROORT 1992 za ZAENEN i współaut. 1974). Początkowo sądzono, że jest przekazywany DNA faga bakteryjnego, ale wyniki dalszych prac wykazały, że jest to fragment dużego (ponad 200 kb) kołistego plazmidu egzystującego niezależnie od chromosomu bakteryjnego. Plazmid ten nazwano Ti (ang. tumor inducing) a przekazywany odcinek — T (ang. transfered). W odcinku T plazmidu Ti znajdują się onkogeny, geny odpowiedzialne za syntezę auksyn i cytokinin — regulatorów wzrostu wpływających na morfogene-

zę tumorów oraz geny warunkujące syntezę opin — charakterystycznych związków będących produktem kondensacji pewnych aminokwasów z cukrami, indukowanych podczas tumorogenezy. Jest on z obu stron otoczony sekwencjami granicznymi, które biorą udział w procesie wycinania i integracji odcinka T. Poza odcinkiem T w plazmidzie Ti są obecne geny odpowiedzialne za katabolizm opin, wycinanie odcinka T (zlokalizowane w regionie wirulencji) oraz miejsce startu replikacji (ryc. 1). Dla bakterii sygnałem do infekcji są związki fenolowe uwalniane ze zranionej tkanki. W trakcie infekcji następuje wycięcie odcinka T, włączenie go do genomu roślinnego i rozpoczęcie transkrypcji genów bakteryjnych. Efektem ich ekspresji jest wytworzenie tumorów. Podobne właściwości stwierdzono w przypadku *A. rhizogenes*, bakterii powodującej powstawanie u zainfekowanych roślin nadmiernej liczby korzeni.



Ryc. 1. Schemat plazmidu Ti (wg HOYKAAS i SCHILPERORT 1992)

Poznanie natury tych procesów otworzyło drogę transformacji roślin. Już w trzy lata po odkryciu plazmidu Ti doniesiono o udanym, sztucznym wprowadzeniu odcinka T oraz integracji z genomem roślinnym (CHILTON i współaut. 1977). W pierwszej połowie lat osiemdziesiątych opracowano sposoby wprowadzania w obszar odcinka T pomiędzy sekwencje graniczne sztucznych konstruktorów, co było możliwe dzięki odkryciu, że poza tymi sekwencjami żaden z genów odcinka T nie jest potrzebny w procesie zakażenia. Drugą bardzo ważną przesłanką adaptacji systemu *Agrobacterium* do genetycznej transformacji roślin był fakt, że odcinek T jest w naturalny sposób zabezpieczony otoczką białkową uniemożliwiająca jego uszkodzenia i degradację przez system obronny komórki roślinnej.

Opracowano dwa systemy transformacji za pośrednictwem *Agrobacterium*: (1) kointegracyjny, w którym geny wprowadza się do odcinka T plazmidu Ti drogą homologicznej rekombinacji i (2) binarny, w którym geny zostają najpierw wklonowane do odcinka T dowolnego plazmidu zdolnego do replikacji w komórce

Agrobacterium, która zawiera plazmid Ti bez odcinka T, ale posiadający inne geny potrzebne w procesie transformacji (SZCZYGLÓWSKI i BOROŃ 1990)

Metodyka transformacji za pośrednictwem *Agrobacterium* składa się z następujących etapów: (1) kokultywacja — umieszczenie eksplantatów, na przykład fragmentów liści, liścieni, korzeni w roztworze bakterii, (2) odplukanie bakterii, (3) umieszczenie eksplantatów na pożywce z antybiotykiem w celu zabicia bakterii, (4) umieszczenie eksplantatów na podłożu z odpowiednim czynnikiem selekcyjnym, na przykład antybiotykiem o ile *Agrobacterium* użyte do transformacji zawierało w odcinku T gen kodujący odporność na ten antybiotyk, (5) regeneracja roślin (najczęściej w warunkach selekcyjnych). Często eksplantaty po okresie kokultywacji z bakteriami są przenoszone na pożywkę, do której jednocześnie dodano antybiotyk zabijający je oraz czynnik selekcyjny.

Transformacja za pośrednictwem *Agrobacterium* jest historycznie najstarszą metodą transformacji roślin. Otrzymano dzięki niej szereg roślin transgenicznych u wielu gatunków, między innymi tak ważnych gospodarczo jak bawełna, len, rzepak, ziemniak i pomidor, w tym wszystkie obecnie zarejestrowane lub będące w badaniach transgeniczne odmiany. Atrakcyjność tej metody polega głównie na jej wysokiej wydajności wynikającej z wysokiej częstości integracji odcinka T z genomem roślinnym. Jej wysoka skuteczność ogranicza się jednak głównie do roślin dwuliściennych. W odniesieniu do roślin jednoliściennych okazała się mało skuteczna, ponieważ rośliny te nie są naturalnymi gospodarzami *Agrobacterium*. Ukazały się wprawdzie nieliczne doniesienia o udanej transformacji roślin jednoliściennych za pomocą *Agrobacterium*, ale nie została w nich potwierdzona integracja wprowadzanych genów w następnych pokoleniach płciowych. Wykazana ekspresja przejściowa i stabilna w pierwszym pokoleniu przypuszczalnych transformantów mogła być jedynie artefaktem bakteryjnym.

W tej sytuacji zaczęto poszukiwać innych metod transformacji tej grupy roślin. Jedną z takich metod jest bezpośrednia transformacja protoplastów plazmidowym DNA.

TRANSFORMACJA BEZPOŚREDNIA

Metoda ta polega na umieszczeniu płynnej kultury protoplastów w roztworze plazmidowego DNA a następnie spowodowanie jego przeniknięcia do wnętrza komórki. Błona komórkowa stanowi jednak barierę dla egzogenego DNA i dlatego też konieczne jest zastosowanie specjalnych warunków pozwalających na jego penetrację do wnętrza komórki. Znane są dwa sposoby umożliwiające bezpośrednią transformację protoplastów: (1) użycie polietylenu glikolu (PEG), (2) elektroporacja. Dodanie PEG-u do zawiesiny protoplastów powoduje zmianę właściwości fizyko-chemicznych błony komórkowej — zostaje zwiększona jej półprzepuszczalność. Umieszczenie natomiast protoplastów w zmiennym polu elektrycznym o określonej długości trwania i częstości mikroimpulsów powoduje powstanie w błonie komórkowej mikroporów. Oba te czynniki ułatwiają penetrację DNA znajdującego się w roztworze do wnętrza komórek.

Stosując metodę bezpośredniej transformacji protoplastów uzyskano dotychczas szereg stabilnych transformantów u wielu gatunków, między innymi u kukurydzy, pszenicy, jęczmienia i ryżu. Poważnym ograniczeniem tej metody

okazała się trudność w uzyskiwaniu totipotentnych protoplastów, których źródłem u roślin jednoliściennych jest głównie zawiesina komórkowa złożona z kalusa typu II — rzadkiej i trudnej do uzyskania postaci kalusa występującego tylko u niektórych gatunków i ponadto zależnego od genotypu. Nadal też efektywność regeneracji z protoplastów jest u roślin jednoliściennych niska z wyjątkiem ryżu z grupy *japonica*, u którego otrzymywanie totipotentnych protoplastów i regeneracja z nich roślin nie stanowi obecnie większego problemu (VASIL 1994).

MIKROWSTRZELIWANIE

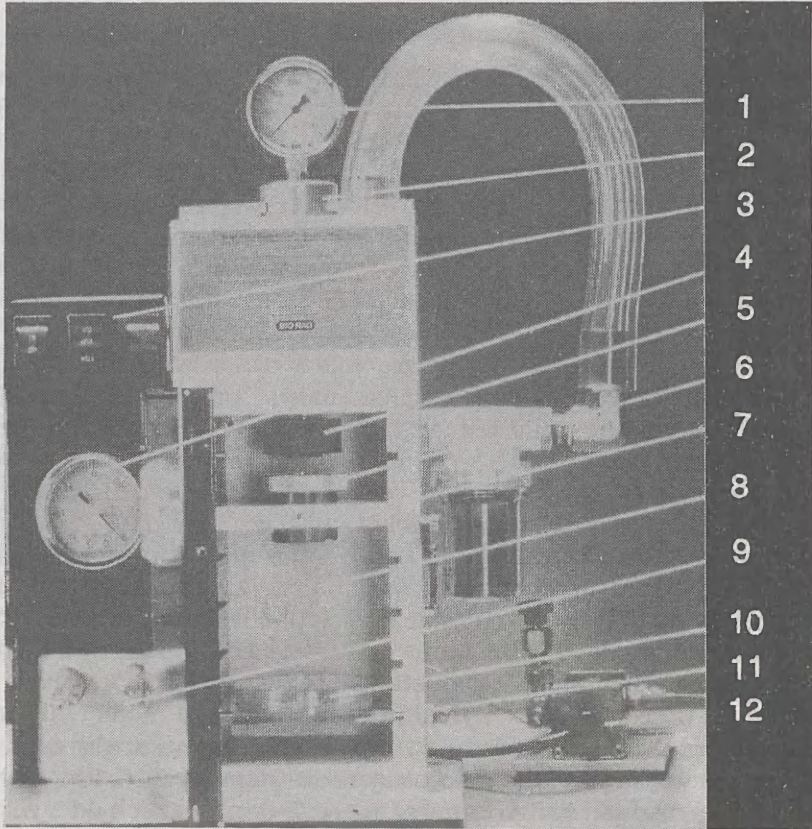
Mikrowstrzelianie (ang. particle bombardment) jest metodą transformacji materiału biologicznego polegającą na wprowadzeniu z bardzo dużą prędkością rzędu kilkuset metrów na sekundę do komórek cząsteczek metali pokrytych DNA (rzadziej RNA). Prędkość tę uzyskuje się w specjalnie skonstruowanych akceleratorach zwanych aparatami do mikrowstrzeliania (ang. particle bombardment device lub particle bombardment apparatus). Czynnikiem przyspieszającym cząsteczki metali jest proch strzelniczy lub, w urządzeniach nowszego typu, hel. O zastosowaniu tej metody w transformacji cebuli po raz pierwszy doniesiono w 1987 roku (KLEIN i współaut. 1987, SANFORD i współaut. 1987). W krótkim czasie stała się ona bardzo popularna, szczególnie w odniesieniu do roślin jednoliściennych, ponieważ tą metodą można transformować praktycznie wszystkie rodzaje tkanek, co u tej grupy roślin jest faktem o pierwszorzędym znaczeniu.

W ciągu ostatnich sześciu lat otrzymano rośliny transgeniczne w obrębie wielu gatunków jednoliściennych, w tym we wszystkich gatunkach zbóż oraz tak ważnych gospodarczo gatunków, jak trzcina cukrowa i tulipan. Potwierdzona została także jej wysoka skuteczność w odniesieniu do roślin nagonasiennych i niektórych gatunków roślin dwuliściennych, na przykład soi i fasoli, u których zawiodły inne metody transformacji. Najczęściej poddawano transformacji trzy rodzaje tkanek: niedojrzałe zarodki, kalus embriogeniczny powstały z niedojrzałych zarodków lub niedojrzałych kwiatostanów i zawieszoną komórkową.

Obecnie coraz więcej autorów wybiera do transformacji niedojrzałe zarodki ze względu na krótki (w porównaniu z innymi rodzajami tkanek) czas, który upływa od wyizolowania zarodków do otrzymania dojrzałych roślin. Kwitnące rośliny transgeniczne pszenicy otrzymano już po 7–9 miesiącach od wyizolowania niedojrzałych zarodków, podczas gdy w przypadku zawiesiny komórkowej trwało to ponad dwa lata (VASIL i współaut. 1994).

Mimo, że transformacja za pomocą mikrowstrzeliania jest coraz częściej stosowaną metodą transformacji roślin, wciąż jeszcze jest to metoda niedoskonała wymagająca wielu udoskonaleń. Niska wydajność transformacji wynika głównie z niskiej przeżywalności komórek spowodowanej uszkodzeniami mechanicznymi oraz szokiem akustycznym. Dlatego większość prac jest poświęcona optymalizacji różnych czynników zwiększających skuteczność mikrowstrzeliania. Dobrym sposobem dla pszenicy okazało się podniesienie ciśnienia osmotycznego pożywki indukcyjnej (poprzez zwiększenie zawartości sacharozy) powodującego podwyższenie turgoru komórek. Wprowadzenie przez firmę Du Pont nowego typu aparatu do transformacji — PDS 1000/He (ryc. 2), w którym

cząsteczki metali są przyspieszane za pomocą helu, znacznie ograniczyło szok akustyczny i tym samym poprawiło wydajność transformacji. Wpływ rodzaju użytych cząsteczek metali oraz sposób ich opłaszczania przez DNA (przez sonifikację lub precypitację) na efektywność transformacji roślin jednoliściennych nie został dotychczas potwierdzony. Kolejnymi poważnymi problemami związanymi z mikrowstrzeliwaniem są możliwość degradacji podczas opłaszczania cząsteczek metalu lub jego oderwanie w czasie rozpędzania w aparacie oraz wprowadzanie do genomu roślinnego zbyt dużej liczby kopii genów jednocześnie.



Ryc. 2. Aparat do transformacji roślin — PDS 1000/He.

1 — Wskaźnik ciśnienia helu, 2 — rura przyspieszająca gaz, 3 — przełączniki kontrolne, 4 — wskaźnik poziomu próżni, 5 — uchwyt przepony, 6 — pokrywa makropocisku, 7 — układ wyrzutni makropocisków, 8 — komora strzelania, 9 — regulacje prędkości odpowietrzania i napowietrzania, 10 — tkanka poddawana transformacji, 11 — półka na naczynie z tkanką, 12 — zawór dozujący.

W połowie 1994 roku ukazała się bardzo obiecująca praca, w której po raz pierwszy doniesiono o użyciu komórek bakterii — *Escherichia coli* i *A. tumefaciens* jako biologicznych „pocisków” do transformacji kukurydzy i tytoniu (RASMUSEN i współaut. 1994). Autorzy uważają, że opracowana przez nich metoda może rozwiązać oba te problemy. Wykorzystanie bakterii umożliwi także wprowadzanie DNA o dużej masie molekularnej, na przykład w postaci sztucznych chromosomów drożdżowych — YAC-ów (ang. yeast artificial chromosomes). Me-

toda ta wydaje się być szczególnie przydatna w transformacji roślin jednoliściennych, które mają duże komórki a wielkość komórek jest głównym ograniczeniem jej stosowania.

Każda z przedstawionych metod transformacji ma zarówno wady jak i zalety oraz ograniczony zakres zastosowania.

PERSPEKTYWY

Trwające od prawie piętnastu lat prace nad transformacją roślin przyniosły niekwestionowany wkład zarówno w poznanie molekularnych podstaw dziedziczenia, jak i w rozszerzenie zmienności genetycznej w świecie roślin. Następuje ciągle udoskonalanie metod transformacji a dotychczasowe wyniki potwierdziły jej użyteczność i celowość szczególnie w odniesieniu do gatunków ważnych dla gospodarki. Z praktycznego punktu widzenia transformacja roślin stwarza bowiem możliwość wprowadzania do materiałów hodowlanych nowych cech i w perspektywie szybkiego tworzenia nowych, atrakcyjnych odmian, które sprostać wymogom nowoczesnego rynku. Pierwsze odmiany transgenicznych pomidorów, ziemniaków i papryki już zostały zarejestrowane a wiele znajduje się w badaniach rejestrowych. Kilka transgenicznych odmian już zostało zarejestrowanych. Tworzone są specjalne programy rządowe wspierające uzyskiwanie transgenicznych roślin. Przykładem może być powstały w 1992 roku w USA program hodowli pszenicy, który zakłada wyhodowanie, przy wykorzystaniu metod biotechnologicznych nowych odmian między innymi odpornych na herbicydy, o poprawionym składzie skrobi ze zredukowaną zawartością amylopektyny i o wysokiej masie cząsteczkowej gluteiny (KURECZKA 1992).

GENETIC TRANSFORMATION OF PLANTS

Summary

Plant transformation can be achieved by introduction of exogenous DNA in the form of specially constructed fragments into the plant genome. Several transformation methods were elaborated during the last fifteen years. The methods which are in the most frequent use are: (1) transformation using bacterial vectors — *Agrobacterium tumefaciens* or *A. rhizogenes*, (2) direct transformation of protoplasts by means of electroporation or polyethylene glycol, (3) particle bombardment. The usefulness of the first method was proved in the case of dicot species whereas the second can be applied only for those genotypes which are capable of efficient plant regeneration from protoplasts. The third one seems to be the only effective transformation method for most of the monocots.

LITERATURA

- CHILTON M. -D., DRUMMOND M. H., MERLO D. J., SCLIAKY D., MONTOYA A. L., GORDON M. P., NESTER E. W., 1977. *Stable incorporation of plasmid DNA into higher plant cell, the molecular basis of crown gall tumorigenesis*. Cell 11, 263-271.
- HOOPYKAAS P. J. J., SCHILPEROORT R. A., 1992. *Agrobacterium and plant genetic engineering*. Plant.Biol. 19, 15-38.
- KLEIN T. M., WOLF E. D., WU R., SANFORD J. C., 1987. *High-velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells*. Nature 327, 70-73.

- KURECZKA J. E., 1992. *Genetic engineering and hybridization of wheat*. Cereal Foods World 37(8), 640-642.
- MCELROY D., BRETTTELL R. I. S., 1994. *Foreign gene expression in transgenic cereals*. Tibtech 12, 62-68.
- RAKOCZY-TROJANOWSKA M., 1995. *Transformacja roślin jednoliściennych przy pomocy mikroustrzeliwania — stan obecny badań i perspektywy*. V Ogólnopolski Zjazd Hodowców Roślin Ogrodniczych, Skierniewice, 23-24 luty, 235-242.
- RASMUSSEN J. L., KIKKERT J. R., ROY M. K., SANFORD J. C., 1994. *Biolistic transformation of tobacco and maize cells using bacterial cells as microprojectiles*. Plant Cell Rep. 13, 212-217.
- SANFORD J. C., KLEIN T. M., WOLF E. D., ALLEN N., 1987. *Delivery of substances into cells and tissues using a particle bombardment process*. Part. Sci. Tech. 5, 27-37.
- SZCZYGLÓWSKI K., BOROŃ L., 1990. *Wektory transformacyjne*. [W:] *Transformowanie i regeneracja roślin*. Poradnik laboratoryjny pod red. A. Legockiego. Wyd. Inst. Chemii Bioorg. PAN w Poznaniu, rozdz.III.
- VASIL I. K., 1994. *Molecular improvement of cereals*. Plant Mol. Biol. 25, 925-937.

WOJCIECH BURZA

Katedra Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin,
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego,
Nowoursynowska 166, 02-787 Warszawa

STEROWANIE MORFOGENEZĄ ROŚLIN W KULTURACH *IN VITRO*

WSTĘP

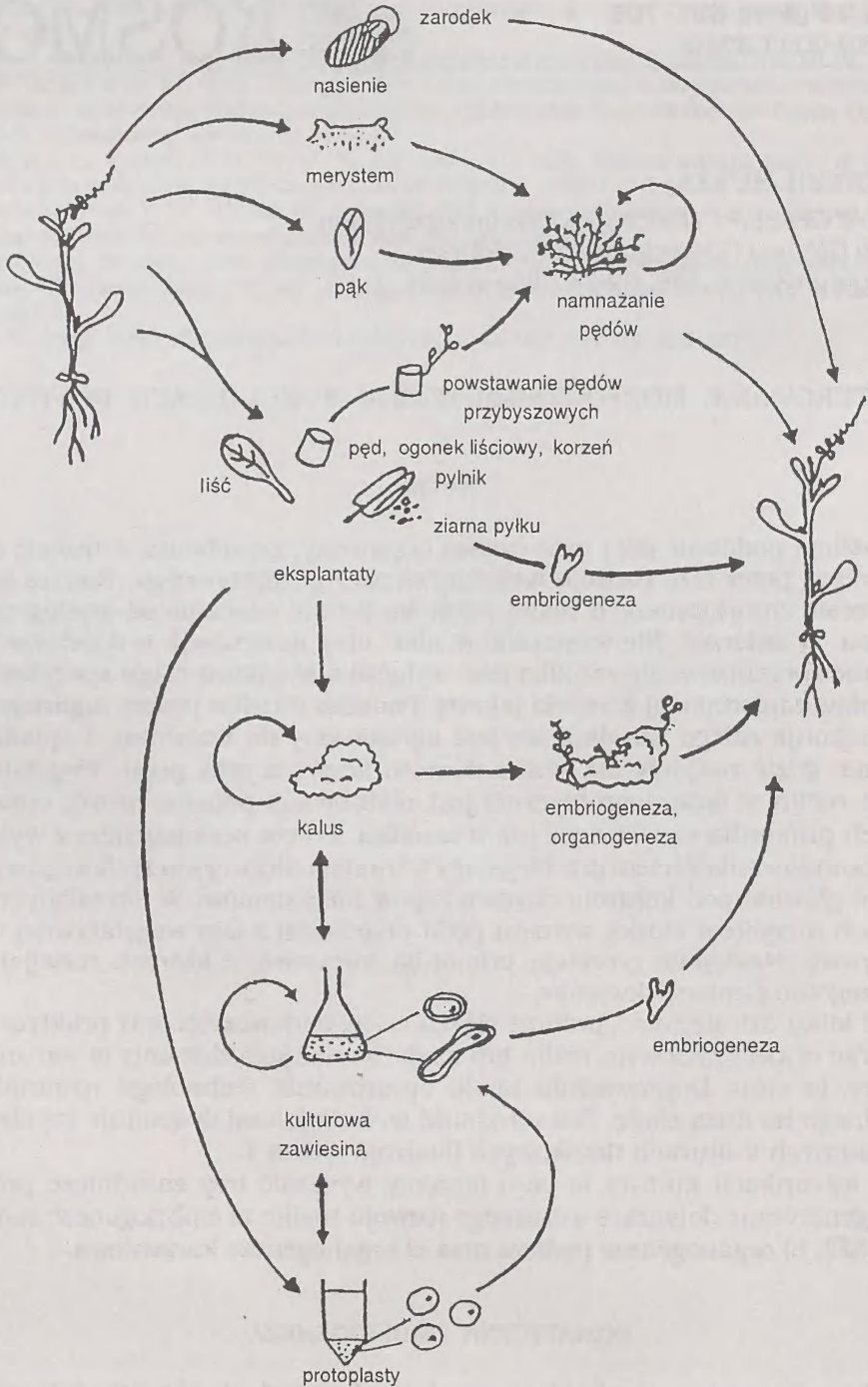
Rośliny, podobnie jak i inne wyższe organizmy, przechodzą w trakcie cyklu życiowego przez fazę rozwoju wegetatywnego i generatywnego. Rozwój zygoty w procesie embriogenezy u roślin różni się jednak znacznie od analogicznego procesu u zwierząt. Nie występuje w nim etap gastrulacji, a docelowe przestrzenne zorganizowanie zarodka jest wyłącznie wynikiem ciągu specyficznych podziałów zapłodnionej komórki jajowej. Ponadto u roślin proces organogenezy nie obejmuje całego zarodka, ale jest ograniczony do bazalnego i apikalnego bieguna, gdzie znajduje się stożek wzrostu korzenia oraz pędu. Wegetatywny wzrost roślin w fazie sporofitycznej jest realizowany poprzez rozwój organów, których primordia są widoczne już w zarodku. Proces organogenezy z wyłączeniem powstawania liścieni przebiegający w trakcie całego cyklu życiowego wydaje się być głównie pod kontrolą obydwu typów merystemów. W określonych warunkach merystem stożka wzrostu pędu przechodzi z fazy wegetatywnej w generatywną. Następnie powstają primordia kwiatowe, z których rozwijają się poszczególne elementy kwiatów.

Od kilku dziesięcioleci próbuje się dla celów badawczych oraz praktycznych sterować cyklem życiowym roślin lub modyfikować jego elementy w warunkach kultury *in vitro*. Doprowadziło to do opracowania technologii rozmnażania klonalnego na dużą skalę. Różnorodność technik jakimi dysponuje się obecnie w roślinnych kulturach tkankowych ilustruje rycina 1.

W warunkach kultury *in vitro* możemy wyróżnić trzy zasadnicze procesy morfogenetyczne dotyczące wczesnego rozwoju roślin: a) embriogenezę somatyczną (SE), b) organogenezę pędową oraz c) organogenezę korzeniową.

SOMATYCZNA EMBRIOGENEZA

SE *in vitro* może zachodzić bezpośrednio z komórek eksplantatu lub pośrednio przez fazę kalusa. Zwykle jest opisywana jako proces prowadzący do wytworzenia, na drodze zbliżonej do zygotycznej embriogenezy, bipolarnych struktur



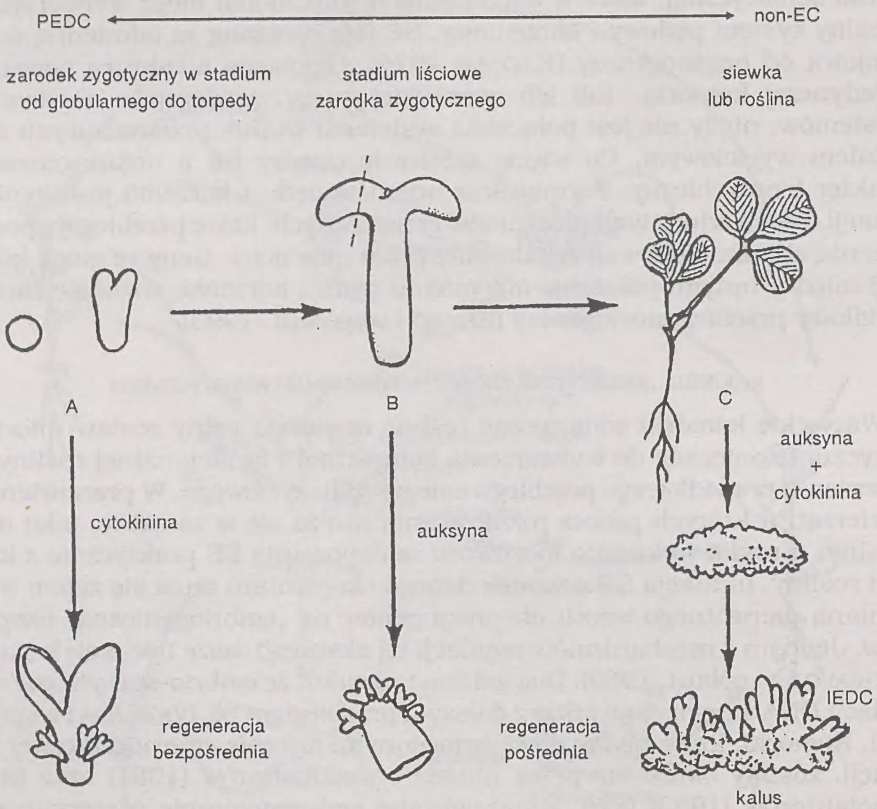
Ryc. 1. Różnorodne techniki namnażania powszechnie stosowane w kulturach tkankowych wykorzystujące totipotencjalne właściwości komórek roślinnych (za SMITH i DREW 1990 zmodyf.).

z tkanki somatycznej, które w odpowiednich warunkach mogą wytworzyć funkcjonalny system pędowy i korzeniowy. SE jest uważana za odmienną ścieżkę rozwojową od organogenezy (HACCIUS 1978). Bipolarna struktura powstająca z pojedynczej komórki lub ich niewielkiej grupy, zawierająca obydwie typy merystemów, nigdy nie jest połączona systemem wiązek przewodzących z eksplantatem wyjściowym. Co więcej zależność między SE a organogenezą ma charakter hierarchiczny. Formowanie organów pędu i korzenia jest wynikiem realizacji dwóch odrębnych programów genetycznych, które przebiegają podczas tworzenia się zarodków i są regulowane przez inne geny. Geny te mogą kontrolować między innymi położenie merystemu pędu i korzenia, wielkość zarodka, prawidłowy przebieg morfogenezy (KITANO i współaut. 1993).

INDUKCJA „EMBRIOGENICZNOŚCI” W KOMÓRKACH SOMATYCZNYCH

Wszystkie komórki somatyczne rośliny zawierają pełny zestaw informacji genetycznej konieczny do wytworzenia kompletnej i funkcjonalnej rośliny oraz zapewnienia prawidłowego przebiegu całego cyklu życiowego. W przeciwieństwie do zwierząt, u których proces różnicowania uważa się w zasadzie jako nieodwracalny, u roślin wykazano możliwość zainicjowania SE praktycznie z każdej części rośliny. Indukcja SE z tkanek danego eksplantatu musi się zatem wiązać ze zmianą pierwotnego wzoru ekspresji genów na „embriogeniczną” ekspresję genów. Jednym z mechanizmów regulacji tej ekspresji może być metylacja DNA (LOSCHIAVO i współaut. 1989). Dowiedziono również, że embrio-specyficzne wzory metylacji DNA są związane także z dalszym przebiegiem SE (VERGARA i współaut. 1990). Komórki, które będąc nieembriogenicznymi nabrały embriogenicznej kompetencji, zostały określone przez EVANSA i współautorów (1981) oraz SHARPA i współautorów (1983) jako „zaindukowane embriogenicznie zdeterminowane komórki” IEDC (ang. induced embryogenic determined cell) dla odróżnienia od tych, które już pierwotnie taką kompetencję posiadały „preembriogenicznie zdeterminowane komórki” PEDCs (ang. preembryogenic determined cells). Wpływ rodzaju explantatu z punktu widzenia pierwotnej embriogenicznej kompetencji komórek go tworzących na indukcję SE ilustruje rycina 2. Oczywiście schemat przedstawiony na rycinie 2 jest może nazbyt uproszczony i nie opisuje wszystkich istotnych rodzajów reakcji morfogenetycznych, które zaobserwowano *in vitro*. Założenie, że tkanki siewek i roślin są pozbawione pierwotnej embriogenicznej kompetencji nie w pełni odpowiada rzeczywistości. Przykładem może być opisana regeneracja bezpośrednia z mikroeksplantatów liściowych ogórka (BURZA i MALEPSZY 1995) pokazana na rycinie 5d, bezpośrednia embriogeneza z korzeni *Camelia japonica* (VIEITEZ i współaut. 1991), czy też bezpośrednia embriogeneza z protoplastów izolowanych z mezofilu liściowego *Brassica juncea* (EAPEN i współaut. 1989).

Oprócz regulatorów wzrostu, w tym szczególnie auksyn, udało się w wielu przypadkach zaindukować SE działając na eksplantaty warunkami stresowymi, takimi jak: szok cieplny, warunki beztlenowe, niska temperatura, jony metali ciężkich (przeł. MERKLE i współaut. 1995). Przypuszcza się, że mechanizm wyzwalany w tkance pod wpływem stresu lub auksyny jest zbliżony do tego, który pojawia się w czasie sporogenezy (HERBERLE-BORS 1985).

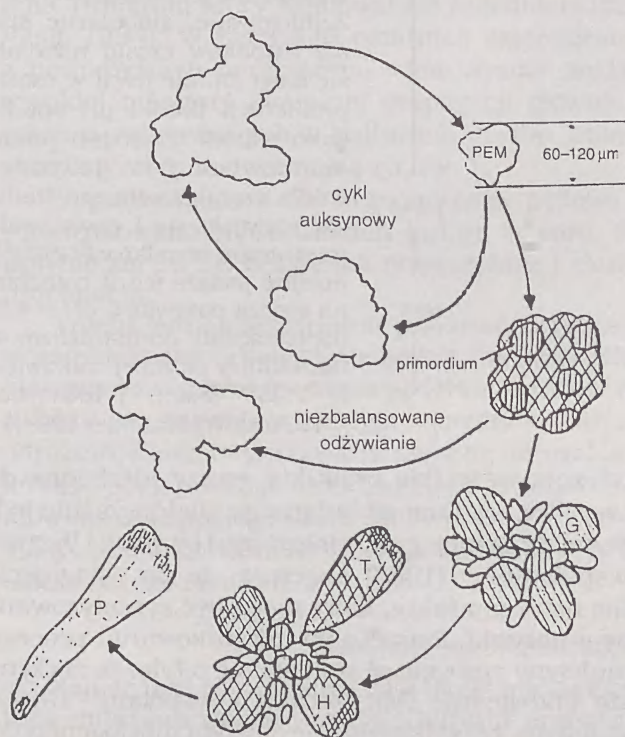


Ryc. 2. Wpływ pierwotnej kompetencji komórek eksplantatu na indukcję SE. Komórki eksplantatu pierwotnego mogą być w stanie kompetencji pomiędzy PEDC (preembriogenicznie zdeterminowane komórki) a non-EC (ang. non-embryogenic cells — komórki nieembriogeniczne). (A) Bardzo młode zarodki zygocyczne mają status najbardziej zbliżony do PEDC i ich odpowiedzią na działanie cytokininy będzie formowanie zarodków somatycznych. (B) Bardziej dojrzałe zarodki zygocyczne osiągają stan, w którym nie wystarczy już sama cytokinina. Wymagają auksyny do indukcji zarodków somatycznych. (C) W tkankach roślin zbudowanych z komórek nieembriogenicznych ale embriogenicznie indukowalnych działanie auksyny i cytokininy prowadzi do uformowania się kalusa zdolnego do wytworzenia zarodków somatycznych (MERKLE i współaut. 1995).

MODELOWE SYSTEMY Wczesnych STADIÓW SE NA PRZYKŁADZIE MARCHWI

Rośliną modelową we wcześniejszych i obecnych badaniach dotyczących SE jest *Daucus carota*. Już w 1959 r. REINERT opublikował pracę, w której dowodził, że rośliny marchwi pojawiające się w kulturze kalusa powstały z bipolarnych zarodków rozwijających się z pojedynczych komórek. Dokładny przebieg SE przedstawił HALPERIN (1966, 1970). Wkrótce po zaindukowaniu powstawania z eksplantatu pierwotnego kalusa powstają także wielokomórkowe agregaty o charakterze embriogenicznym nazwane masą proembriogeniczną PEM (ang. proembryogenic mass). Określenie to HALPERIN utworzył w oparciu o nazewnictwo

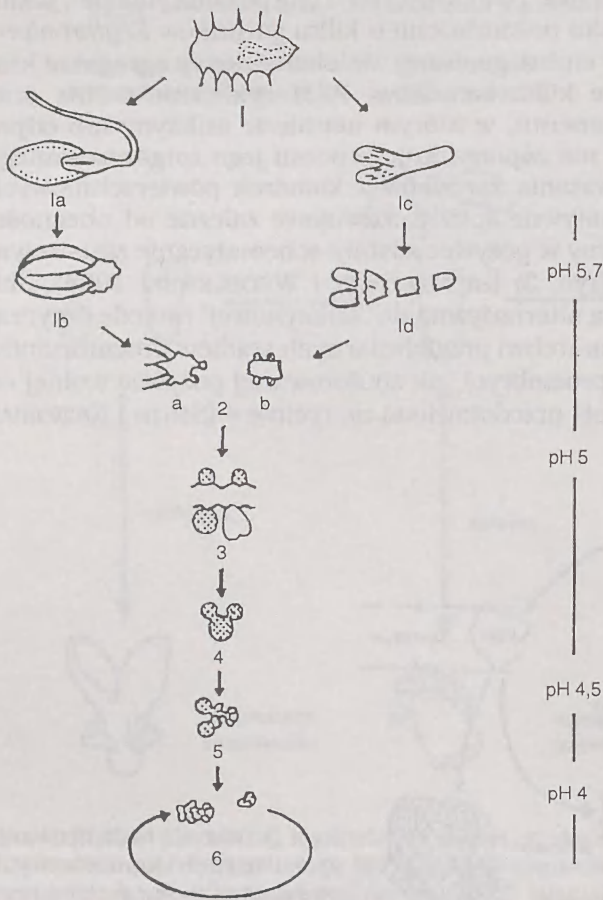
JEFFREYA (1895) „embryogenic mass” i GUERINA (1937) „corps embryogene”, jakim posłużyli się, aby opisać zjawisko poliembrionii u kilku gatunków *Erythronium*, gdzie zygota przekształca się w embriogeniczny wielokomórkowy agregat, z którego formułuje się ostatecznie kilka zarodków. PEM cyklicznie rośnie oraz podlega fragmentacji aż do momentu, w którym usunięcie auksyny lub odpowiednie obniżenie jej poziomu nie zapoczątkuje procesu jego zorganizowanego wzrostu prowadzącego do powstania zarodków z komórek powierzchniowych bogatych w skrobię. Te alternatywne ścieżki rozwojowe zależne od obecności bądź braku syntetycznej auksyny w pożywce zostały schematycznie zilustrowane przez WETHERELLA (1979) (ryc. 3) (za MALEPSZY i WRÓBLEWSKI 1994). Jak dotychczas opublikowano jedną alternatywną do „auksynowej” metodę dotyczącą inicjacji i ustabilizowania u marchwi preglobularnych stadiów proembryonów PGSP (ang. preglobular stage proembryo), na zbuforowanej pożywce wolnej od regulatorów wzrostu o niskim pH przedstawioną na rycinie 4 (SMITH i KRIKORIAN 1990 za WRÓBLEWSKI 1994).



Ryc. 3. Wzrost i różnicowanie w kulturach komórkowych marchwi; tkanka jest namnażana przy ciągłej presji auksynowej, powstają w niej primordia — pierwsze stadia rozwojowe zarodków, usunięcie auksyny powoduje ich dalszy rozwój: PEM — masa proembryogeniczna, G — stadium globularne zarodka, H — stadium sercowate zarodka, T — stadium torpedy, P — zarodek dojrzały (WETHERELL 1979 za MALEPSZY i WRÓBLEWSKI 1994).

ROLA AUKSYN W POWSTAWANIU I ROZWOJU ZARODKÓW SOMATYCZNYCH

Duża liczba prac dotyczących biosyntezy auksyn, ich metabolizmu oraz transportu w zarodkach somatycznych pokazuje, jak ważna jest ich rola w indukcji SE oraz kontroli prawidłowego przebiegu procesów morfogenetycznych. Mechanizm indukcji powstawania zarodków z komórek somatycznych nie jest wyjaśniony. Nie mniej powszechnie przyjmuje się, że przy ciągłej obecności



Ryc. 4. Inicjacja i ustabilizowanie u marchwi kultur preglobularnych stadiów proembryonów (PGSP) na zbuforowanej, wolnej od hormonów, półpłynnej pożywce uzupełnionej 1 mM NH_4^+ jako jedynym źródle azotu. Dwie tkanki (pochodzące z dojrzałych nasion) [1] były używane jako eksplantaty. Uszkodzone [1c] lub pokrojone [1d] dojrzałe zarodki zygocytyczne, a także cała owocnia [1b] po wykiełkowaniu zarodka [1a] mogła być używana do inicjacji globularnych stadiów zarodków somatycznych [2a, 2b] po 4 do 8 tygodni na tej samej pożywce. Zainicjowane, globularne stadia zarodków często rozwijały się dalej [3], ale jeżeli w czasie proliferacji tkanki pH spadło (jako skutek obecności jonów amonowych jako jedynego źródła azotu), to starsze stadia nie rozwijały się i powstawała mieszanina zarodków PGSP [5]. Kolejne pasażę (co 2 tygodnie) na świeżą pożywkę o pH = 4,5, doprowadzały do ustabilizowania kultury złożonej całkowicie z PGSP (SMITH i KRİKORIAN 1990 za WRÓBLEWSKI 1994).

auksyny agregaty PEM syntetyzują wszystkie produkty genów niezbędne do osiągnięcia przez powstający zarodek stadium globularnego. Jednocześnie jednak obecność auksyny blokuje dalszy przebieg embriogenezy. HALPERIN i WETHELLELL (1964) oraz BORKID i współautorzy (1986) sugerują, że do osiągnięcia kolejnych stadiów są niezbędne nowe produkty, które mogą być syntetyzowane dopiero po usunięciu auksyny z pożywki. Ponadto po zaindukowaniu procesu embriogenezy oddziaływanie auksyny egzogennej zmienia się o tyle, że zaczyna ona być syntetyzowana także endogennie (MICHALCZUK i współaut. 1992a, 1992b). Wydaje się prawdopodobnym, że oddziaływanie obydwu morfogenetycznie aktywnych substancji może prowadzić do rozregulowania prawidłowo przebiegającego procesu. Kilka prac wykazuje, że niezakłócony transport polarny auksyn w zarodku jest niezbędny do prawidłowego przebiegu morfogenezy (SCHIAVONE i COOKE 1987, LIU i współaut. 1993). Znamienny jest fakt, że zarodki zygocytyczne po potraktowaniu inhibitorami transportu auksyn wykazują znacznie mniejszą dezorganizację morfogenezy niż zarodki somatyczne. U pierwszych efektem ich działania na stadium globularne było powstawanie połączonych

liścieni, u drugich natomiast brak wykształcenia osi podłożnej i zupełny brak liścieni. Jedną z interesujących hipotez tłumaczących to zaskakujące zróżnicowanie przedstawił T. COOKE (za ZIMMERMAN 1993). Twierdzi on, że w zarodku zygotycznym w odróżnieniu od somatycznego regulacja morfogenezy odbywa się poprzez dwa mechanizmy: wewnętrzny oraz zewnętrzny związany z oddziaływaniem organizmu matcznego.

MIKROPROPAGACJA

Mikropropagacja jest definiowana jako proces namnażania *in vitro* pąków bocznych na skutek zniesienia dominacji wierzchołkowej oraz regeneracji z nich genetycznie jednorodnych roślin. Pionierskie prace w tej dziedzinie wykonali między innymi Georges Morel, który pracował nad wyprowadzaniem wolnych od wirusów roślin z kultur merystemów pędu; Folke Skoog i Carlos Miller, którzy wyjaśnili rolę odgrywaną przez cytokiny w morfogenezie pędu; zespół Kennetha Timonna, który zajmował się zagadnieniami dominacji wierzchołkowej (za VASIL 1994). W przeciągu ostatnich czterdziestu lat dzięki tym obserwacjom z powodzeniem opracowano wiele wysoce wydajnych i niezawodnych metod szybkiej masowej klonalnej propagacji głównie roślin dwuliściennych. Jako jeden z podstawowych w kulturach *in vitro* proces mikropropagacji jest przedstawiony schematycznie na rycinie 1.

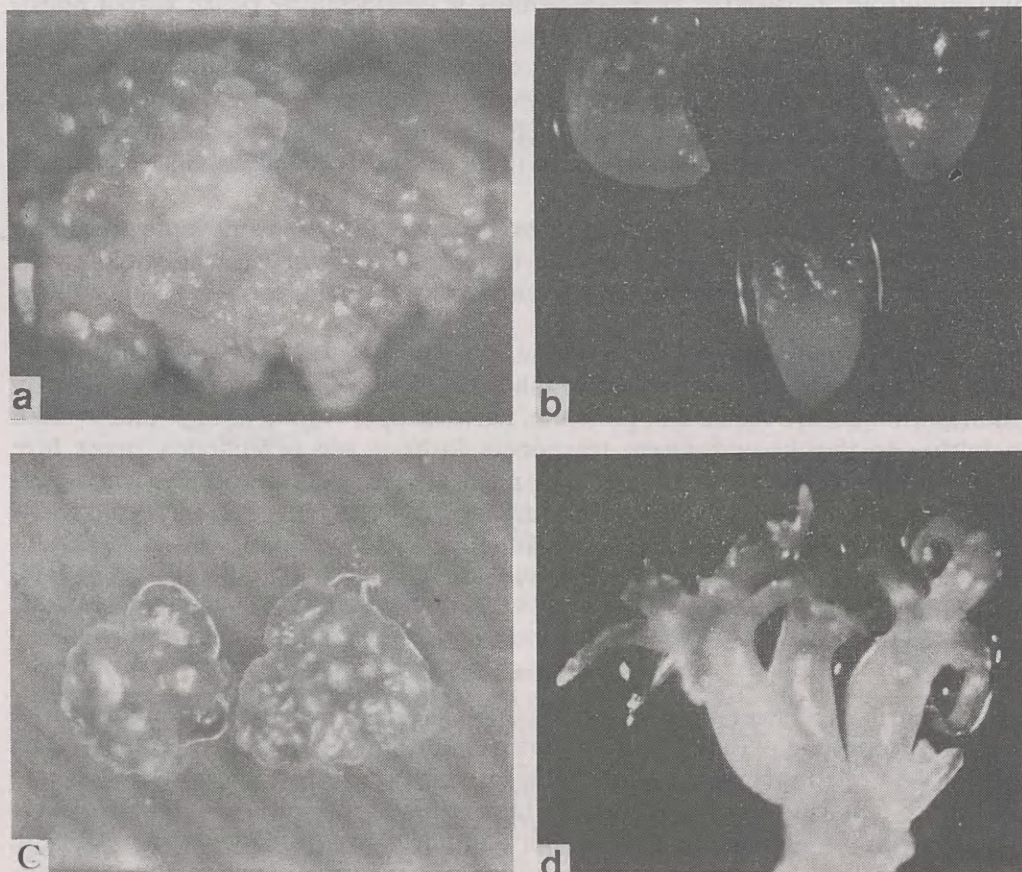
W porównaniu z SE organogeneza pędowa jest znacznie lepiej poznana i kontrolowana w warunkach kultur *in vitro*. Na pewno jeszcze wiele czasu upłynie zanim SE będzie tak powszechnie i skutecznie stosowana, jak mikropropagacja.

Trzeba jednak bezstronnie przyznać, że proces ten jest bez porównania mniej skomplikowany i dlatego nie będzie tak szczegółowo omówiony jak SE. Zasady klonowania *in vitro* i *in vivo* są podobne. Łatwość operowania tą techniką wynika z faktu, że tkanki w żadnym momencie kultury nie przechodzą przez fazę odróżnicowania i wykorzystuje się tutaj naturalną funkcję merystemu wierzchołkowego pędu, którego morfogenetyczna aktywność jest ściśle genetycznie zdefiniowana oraz podlega samoregulacji. Zmienność somaklonalna, która często jest opisywana w kulturach embriogenicznych, w kulturach merystemów jest zjawiskiem bardzo rzadkim.

KULTURA PRIMORDIÓW PĘDOWYCH

Najbardziej zaawansowaną z biotechnologicznego punktu widzenia jest metoda mikropropagacji nazwana kulturą primordiów pędowych (TANAKA i IKEDA 1983). Ze względu na małą popularność tej cennej metody w naszym kraju warto ją krótko scharakteryzować. Kulturę taką zakłada się izolując z pąków wierzchołkowych merystemy z 2–3 primordiami liściowymi. Precyzyjnie pobrane eksplantaty umieszcza się w różnych pożywkach płynnych zawierających auksynę i cytokininę (najczęściej NAA i BAP). Najtrudniejszą fazą kultury jest jej stabilizacja. Prawidłowe dopracowanie wszystkich parametrów, do których należy zaliczyć skład pożywki, objętość płynu i tkanki w próbówce, prędkość z jaką obraca się tarcza rotora, czas i intensywność oświetlenia, temperatura, często-

tliwość pasażowania decyduje o powodzeniu. Nieprawidłowo dobrane warunki prowadzą do wytworzenia kalusa bądź zdeformowanych struktur pędowych, prawidłowe zaś stabilizują kulturę w zamkniętym cyklu namnażania się primordiów pędowych. Często, jak na przykład w przypadku ogórka (ryc. 5a, c) (BURZA, dane nieopublikowane), tworzą duże agregaty przypominające strukturą skupiska zarodków globularnych, z tym że posiadają zielone zabarwienie chlorofilu powstającego w tkankach pod wpływem oświetlenia. W trakcie trwania kultury agregaty te podlegają fragmentacji. W takim stanie tkanka może być namnażana latami. Po wyłożeniu na zestalone pożywki szybko dochodzi do powstawania pędów, które są następnie ukorzeniane. Powyżej przedstawiony sposób masowej propagacji został zastosowany z powodzeniem u wielu gatunków roślin dwuliściennych, jednoliściennych i drzewiastych. Podstawowymi jego walorami jest możliwość mechanizacji na poziomie zbliżonym, jak dla SE, oraz wysoki potencjał regeneracyjny niezbędny, na przykład, w procedurze uzyskiwania roślin transgenicznych.



Ryc. 5. a — kalus embriogeniczny *C. sativus* odm. Borszczagowski; b — zarodki somatyczne powstające z kalusa embriogenicznego; c — tkanka merystematyczna powstająca w kulturze primordiów pędowych; d — zarodki somatyczne bezpośrednio powstające z mikroeksplantatów liściowych.

WSPÓŁCZESNE TECHNOLOGIE NAMNAŻANIA ROŚLIN W KULTURACH
TKANKOWYCH

Metody kultur tkankowych są obecnie stosowane przez ponad sześćset firm biotechnologicznych na całym świecie, które produkują rocznie ponad pięćset milionów roślin prawie pięćdziesięciu tysięcy odmian (VASIL 1994). Prawie całość produkcji powstaje przy wykorzystaniu technologii mikropropagacji. Nadal poważną barierę rozwojową stanowią wysokie koszty jednostkowe. Ś szczególnie intensywne prace nad automatyzacją mikropropagacji przy wykorzystaniu precyzyjnych robotów wyposażonych w możliwość komputerowej analizy obrazu są prowadzone w Japonii (KURATA i KOZAI 1992). Całkowicie zintegrowany, automatyczny proces mikropropagacji kończący się nawet automatycznym wysadzeniem roślin do ziemi (vitromatic process) został opracowany w Izraelu (LEVIN i współaut. 1988, LEVIN i VASIL 1989).

Przy dużej skali produkcji konieczne jest zastosowanie biofermentorów o znacznych objętościach, co wiąże się z dodatkowymi problemami natury technicznej i biologicznej. AKITA i TAKAYAMA (1994) opracowali technologię produkcji mikrobulw ziemniaka w dziesięciolitrowych fermentorach. Powodzeniem zakończyła się także próba wykorzystania pięćsetlitrowych bioreaktorów do namnażania pędów *Stevia rebaudiana* (AKITA i współaut. 1994). Uzyskano wysoki stopień namnażania wynoszący sto czterdzieści.

PODSUMOWANIE

Proces sterowania morfogenezą roślin *in vitro* nadal pozostaje w sferze badań i eksperymentów w skali laboratoryjnej. W szczególności stwierdzenie to odnosi się do SE. Z drugiej jednak strony dotychczas uzyskane wyniki badań jednoznacznie wskazują, że przed tego typu technologiami jest duża przyszłość i należy rozwijać je także w naszym kraju jako integralny element nowoczesnego rolnictwa.

CONTROL OF PLANT MORPHOGENESIS IN CULTURE *IN VITRO*

Summary

Many attempts were made during the last decades to control and modify the life cycle of the plants cultured *in vitro*, both for research and practical purposes. The two essential morphogenetic processes in early plant development which are most important from the biotechnological point of view, are somatic embryogenesis (SE) and shoot organogenesis.

In contrast to animals in which the process of cell differentiation is considered irreversible, it has been demonstrated that SE can be initiated from practically any part of a plant. Auxin plays a fundamental role in formation and development of somatic germs. Disturbances in the course of SE are caused to a large extent by lack of cooperation in this process of the parental organism, which is known to be essential in zygotic embryogenesis.

In comparison with SE, shoot organogenesis is much better understood and controlled under the culture *in vitro* conditions. From the biotechnological point of view, the most advanced propagation method is that called shoot primordia culture. Its main advantages are: the possibility of mechanisation on a level similar to that with SE, and high regeneration potential of plant cells indispensable, e.g., in the procedure of obtaining transgenic plants.

LITERATURA

- AKITA M., SHIGEOKA T., KOIZUMI Y., KAWAMURA M., 1994. *Mass propagation of shoots of Stevia rebaudiana in a large scale bioreactor*. Plant Cell Rep. 13, 180-183.
- AKITA M., TAKAYAMA S., 1994. *Stimulation of potato (Solanum tuberosum L.) tuberization by semicontinuous liquid medium surface level control*. Plant Cell Rep. 13, 184-187.
- AMMIRATO P. V., 1987. *Organizational events during somatic embryogenesis*. [W:] *Plant Tissue and Cell Culture*. GREEN C. E., SOMERS D. A., HACKETT W. P., BIESBOER D. D., (red). (New York: Alan R. Liss, Inc.), 57-81.
- BORKID C., CHOL J. H., SUNG Z. R., 1986. *Effect of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on the expression of embryogenic program in carrot*. Plant Physiol. 81, 1143-1146.
- BURZA W., MALEPSZY S., 1995. *Direct plant regeneration from leaf explants in cucumber (Cucumis sativus L.) is free of stable genetic variation*. Plant Breeding 114, 341-345.
- EAPEN S., ABRAHAM V., GERDEMANN M., SCHIEDER O., 1989. *Direct somatic embryogenesis, plant regeneration and evaluation of plants obtained from mesophyll protoplasts of Brassica juncea*. Annals of Botany 63, 369-372.
- EVANS D. A., SHARP W. R., FLICK C. E., 1981. *Growth and behaviour of cell cultures. Embryogenesis and organogenesis* [W:] *Plant Tissue Culture: Methods and Applications in Agriculture*. THORPE T. A. (red). Academic Press, New York, 45.
- GUERIN P., 1937. *L'ovule et la graine des Erythronium et des Calochortus*. Ann. Sci. Nat. Bot. Ser. 19 (10), 225.
- HACCIUS B., 1978. *Question of unicellular origin of non-zygotic embryos in callus cultures*. Phytomorphology 28, 74.
- HALPERIN W., 1966. *Alternative morphogenetic events in cell suspensions*. Am. J. Bot. 53, 443.
- HALPERIN W., 1970. *Embros from somatic plant cells*. [W:] *Control mechanism in the expression of cellular phenotypes*. Int'l Soc. for Cell Biology Symposium no. 9, Padykula H. (red). Academic Press, New York, 169.
- HALPERIN W., WETHERELL D. F., 1964. *Adventive embryony in tissue cultures of the wild carrot, Daucus carota*. Am. J. Bot. 512, 274-283.
- HATZOPOULOS P., FONG F., SUNG Z. R., 1990a. *Abscisic acid regulation of DC8, a carrot embryonic gene*. Plant Physiol 94, 690-695.
- HERBERLE-BORS E., 1985. *In vitro haploid formation from pollen: a critical review*. Theor Appl. Genet. 71, 361.
- JEFFREY E. C., 1895. *Polyembryony in Erythronium americanum*. Ann. Bot. 9, 537.
- KIFANO H., TAMURA Y., SATOH H., NAGATO Y., 1993. *Hierarchical regulation of organ differentiation during embryogenesis in rice*. Plant J. 3, 607.
- KURATA K., KOZAI T., 1992. *Transplant Production Systems*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- LEVIN R., GABA V., TAL B., HIRSCH S., DENOLA D., VASIL I. K., 1988. *Automated plant tissue culture for mass propagation*. Bio/Technology 6, 1035-1040.
- LEVIN R., VASIL I. K., 1989. *Progress in reduction the cost of micropropagation*. IAPTC Newsletter 59, 2-12.
- LIU C. -M., XU Z. -H., CHUA N. -H., 1993. *Auxin polar transport is essential for the establishment of bilateral symmetry during early plant embryogenesis*. Plant Cell 5, 621-630.
- LOSCHIAVO F., PITTO L., GIULIANO G., TORTI G., NUTI-RONCHI V., MARAZZITI D., VERGARA R., ORSELLI S., TERZI M., 1989. *DNA methylation of embryogenic carrot cell cultures and its variations as caused by mutation, differentiation, hormones and hypomethylating drugs*. Theor. Appl. Genet. 77, 325.
- MALEPSZY S., WRÓBLEWSKI T., 1994. *Charakterystyka ogólna somatycznej embriogenezy*. [W:] MALEPSZY S. (red.). Post. Biol. Kom. supl. 4, 1-10.
- MERKLE S. A., PARROTT W. A., FLINN B. S., 1995. *Morphogenic aspects of somatic embryogenesis*. [W:] THORPE T. A. (red). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London, 155-203.
- MICHALCZUK L., COOKE T. J., COHEN J. D., 1992a. *Auxin levels at different stages of carrot somatic embryogenesis*. Phytochem. 31, 1097-1103.
- MICHALCZUK L., RIBNICKY D. M., COOKE T. J., COHEN J. D., 1992b. *Regulation of indole-3-acetic acid biosynthetic pathways in carrot cell cultures*. Plant Physiol. 100, 1346-1353.
- REINERT J., 1959. *Über die Kontrolle der Morphogenese und die Induktion von Adventivembryonen an Gewebekulturen aus Karotten*. Planta 53, 318.

- SCHIAVONE F. M., COOKE T. J., 1987. *Unusual patterns of somatic embryogenesis in the domesticated carrot: Developmental effects of exogenous auxins and auxin transport inhibitors*. Cell Differ. 21, 53-62.
- SHARP W. R., EVANS D. A., SONDAHL M. R., 1983. *Application of somatic embryogenesis to crop improvement*, [W:] *Plant Tissue Culture*. Proceedinds of the Fifth International Congress of Plant Tissue Culture, Fujiwara A. (red.) Japanese Association for Plant Tissue Culture, 1982, 759.
- SMITH D. L., KRİKORIAN A. D., 1990. *Somatic embryo production from excised, wounded zygotic carrot embryos on hormone-free medium: evaluation of the effects of pH, ethylene and activated charcoal*. Plant Cell Rep. 9, 34-37.
- SMITH M. K., DREW R. A., 1990. *Current applications of tissue culture in plant propagation and improvement*. Aust. J. Plant Physiol. 17, 267-289.
- TANAKA R., IKEDA H., 1983. *Perennial maintenance of annual Haplopappus gracilis (2n=4) by shoot tip cloning*. Jpn. J. Genet., 58, 65-70.
- THOMAS T. L., 1993. *Gene expression during plant embryogenesis and germination: An overview*. Plant Cell 5, 1401-1410.
- THORPE T. A. (ed.) 1995. *In vitro embryogenesis in plants*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London.
- VASIL I. K., 1994. *Automation of plant propagation*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 39, 105-108.
- VERGARA R., VERDE F., PITTO L., LOSCHIAVO F., TERZI M., 1990. *Reversible variations in the methylation pattern of carrot DNA during somatic embryogenesis*. Plant Cell Rep. 8, 697.
- VEITEZ A. M., SAN-JOSE C., VEITEZ F. J., BALLESTER A., 1991. *Somatic embryogenesis from roots of Camellia japonica plantlets cultured in vitro*. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 116 (4), 753-757.
- WETHERELL D. F., 1979. *In vitro embryoid formation in cells derived from somatic plant tissues*. [W:] *Propagation of Higher Plants Through Tissue Culture*. HUGHES K. W., HENKE R., CONSTANTIN M. (red). Conf. 780411, U. S. Tech. Inf. Serv., Springfield, VA, 102.
- WRÓBLEWSKI T. A., 1994. *Proces somatycznej embriogenezy- charakterystyka szczegółowa*. [W:] MALEPSZY S. (red.). Post. Biol. Kom. supl. 4, 11-32.
- ZIMMERMAN J. L., 1993. *Somatic embryogenesis: a model for early development in higher plants*. The Plant Cell 5, 1411-1423.

KATARZYNA NIEMIROWICZ-SZCZYTT

Katedra Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin, SGGW
Nowoursynowska 166, 02-787 Warszawa,

HAPLOIDY ROŚLIN W BIOTECHNOLOGII

W naszym otoczeniu, w ogrodzie, w polu, w lesie, nawet w kolekcjach ogrodów botanicznych nie napotykamy roślin haploidalnych. Rośliny haploidalne są dostępne jedynie w specjalistycznych laboratoriach. Zwykle są rozmnażane wegetatywnie *in vivo* lub *in vitro*. Rośliny haploidalne są trudne do otrzymania, najczęściej nieplodne i słabsze pod względem siły wzrostu i odporności od roślin, z których powstały.

Rośliny haploidalne zawierają gametyczną liczbę chromosomów w sporoficie. Innymi słowy są to takie rośliny, które mają połowę liczby chromosomów rośliny rodzicielskiej. Wyróżniamy monoploidy (monohaploidy), które powstały z diploidów i polihaploidy, które powstały z poliploidów. Dla przykładu roślinę haploidalną, która powstała z diploidalnego jęczmienia (*Hordeum vulgare* $2n=2x=14$) nazwiemy monohaploidem ($n=x=7$) a roślinę, która powstała z tetraploidalnego ziemniaka (*Solanum tuberosum* $2n=4x=48$) nazwiemy dihaploidem ($n=2x=24$). Monohaploid jęczmienia ma tylko jeden, podstawowy genom a dihaploid ziemniaka ma ich jeszcze dwa. Z dihaploidów ziemniaka można otrzymać monohaploidy. Po raz pierwszy rośliny haploidalne zostały opisane w latach dwudziestych obecnego stulecia u bielunia dziedzierzawy (*Datura stramonium*) i u tytoniu szlachetnego (*Nicotiana tabacum*). Tytoń stał się rośliną modelową w badaniach nad haploidami.

OTRZYMYWANIE HAPLOIDÓW

Rośliny haploidalne można otrzymywać różnymi metodami. Prawie zawsze elementem tych metod jest kultura *in vitro* organów generatywnych (pylniki, załączki, zarodków a także mikrospor na pożywkach stałych lub płynnych. Technika kultur tkanek roślinnych *in vitro* przyczyniła się do otrzymania haploidów u setek gatunków roślin. Jedną z najstarszych metod uzyskiwania haploidów polega na wykorzystaniu procesu apomiksji stymulowanej zapyleniem. Proces apomiksji, czyli mówiąc najprościej, powstawanie nasion z pominięciem procesu zapłodnienia i/lub procesu mejozy, dosyć często występuje w świecie roślin. Dla reprodukcji gatunku jest to zwykle proces marginalny.

Stymulację rozwoju zarodka haploidalnego można wywołać przez zapylenie pyłkiem obcego gatunku, pyłkiem specyficznego klonu lub zapylenie pyłkiem

napromieniowanym. Pod wpływem nietypowego zapylenia następuje rozwój haploidalnego zarodka z niezapłodnionej komórki jajowej lub innej komórki woreczka zalążkowego. Zwykle zarodek haploidalny jest odżywiany przez mniej lub bardziej rozwinięte bielmo. Bielmo rozwija się z zapłodnionej lub tylko pobudzonej do podziałów komórki centralnej.

Zarodki haploidalne zwykle zamierają, jeśli się je pozostawi w nasieniu. Trzeba je izolować i przenosić na sztuczne pożywki, tak by mogły rozwinąć się w rośliny. Dla przykładu około 50% żeńskich kwiatów ogórka zapylnych pyłkiem napromieniowanym (promieniowanie gamma, 0,3 kGy) rozwija się w owoce. W owocach, wśród licznych nasion tylko pojedyncze zawierają słabo rozwinięte zarodki. Zarodki trzeba wyjąć z nasion i przenieść na odpowiednią pożywkę. Tylko część zarodków rozwinię się w rośliny (PRZYBOROWSKI i NIEMIROWICZ-SZCZYTT 1994).

Roślina monoploidalna, jaką jest haploid ogórka, jest nieplodna i nie wydaje nasion. W kulturze *in vitro* można ją rozmnożyć wegetatywnie i utrzymywać przy życiu przez dłuższy czas. Polihaploidy, otrzymywane opisywaną wyżej metodą, są zwykle bardziej żywotne i częściowo płodne. Dla przykładu dihaploidy ziemniaka ($2n=2x=24$), powstałe po zapyleniu tetraploidalnego ziemniaka (*Solanum tuberosum* $2n=4x=48$) pyłkiem *Solanum phureja*, nie wymagają do wzrostu sztucznej pożywki (HOUGHAS i współaut. 1958) i są częściowo płodne, chociaż zwykle samoniezdadne.

Następna metoda otrzymywania haploidów polega na wykorzystaniu procesu eliminacji chromosomów formy ojcowskiej z zarodków mieszańcowych. Proces ten zaobserwowano i wykorzystano u jęczmienia (*Hordeum vulgare*) zapylnego pyłkiem *Hordeum bulbosum*. Po kilku dniach z komórek zarodka mieszańcowego są eliminowane chromosomy *Hordeum bulbosum*. Powstaje w ten sposób zarodek haploidalny, który dla pełnego rozwoju wymaga kultury na sztucznej pożywce.

W latach sześćdziesiątych została opisana i nabrała rozgłosu trzecia metoda polegająca na indukowaniu sztucznej androgenezy *in vitro*. W wyniku kultury *in vitro* pylników *Datura stramonium* GUHA i MAHESHWARI (1964) otrzymali rośliny haploidalne. Zastosowanie tej metody pozwoliło na otrzymanie w ciągu 35 lat haploidalnych roślin, zarodków bądź kalusa u ponad 200 gatunków. W procesie androgenezy rozwój struktur haploidalnych następuje wyłącznie *in vitro* na pożywkach stałych lub płynnych. Kulturze poddaje się całe pylniki lub uwolnione (izolowane) mikrospory. Rośliną modelową w kulturach pylnikowych jest tytoń a w kulturach wolnych mikrospor rzepak i inne gatunki roślin kapustnych. Gatunkiem uniwersalnym pod względem możliwości zastosowania różnych metod indukowania haploidów jest jęczmień.

Proces gynogenezy, wykorzystywany w czwartej metodzie otrzymywania haploidów, wymaga również kultury *in vitro* na sztucznej pożywce. Haploidalne komórki gametofitu żeńskiego są indukowane do rozwoju w zarodki lub kalus pod wpływem substancji znajdujących się w pożywce. Na pożywkę wyklada się zalążnie lub zalążki, w których ukryty jest żeński gametofit.

Metoda jest trudniejsza od tej, w której wykorzystuje się androgenezę, gdyż kilka komórek woreczka zalążkowego jest otoczonych przez wiele warstw komórek zalążka i jeszcze więcej w przypadku zalążni. Najlepsze wyniki uzyskano tą metodą dla buraka cukrowego (*Beta vulgaris*), u którego nie można było uzyskać

haploidów inną metodą (POTYONDI i HESZKY 1992). Dość dobre wyniki uzyskuje się też dla jęczmienia (CASTILLO i CISTUE 1993).

Wszystkie omówione wyżej metody wymagają zastosowania kultury na sztucznej pożywce *in vitro*. Może to być kultura niedojrzałych zarodków, pylników, mikrospor, załączni lub załączków. Ważne jest by rośliny, z których zostanie pobrany materiał do kultur, rosły w odpowiednich warunkach uprawy. Otrzymanie haploidalnych roślin wymaga wysoko kwalifikowanego personelu i dobrze wyposażonego laboratorium (WENZEL i współaut. 1992).

Dobrze opracowana metoda dla danego gatunku pozwala na otrzymanie setek a nawet tysięcy roślin haploidalnych. Przykładem może być metoda „bulbosowa” dla jęczmienia, kultura pylników lub izolowanych mikrospor tytoniu i rzepaku a także zapylenie pyłkiem napromieniowanym roślin dyniowatych i kultura *in vitro* zarodków haploidalnych.

CHARAKTERYSTYKA I SELEKCJA HAPLOIDÓW

Rośliny haploidalne różnią się od roślin diploidalnych, ale różnice morfologiczne nie są wystarczające do udowodnienia poziomu ploidalności. Uważa się, że oszacowanie liczby chromosomów w metafazie podziału mitotycznego lub mejotycznego jest najdokładniejszą metodą sprawdzenia, czy roślina jest haploidem czy też nie. Dla wielu gatunków roślin, szczególnie tych o małych i licznych chromosomach, nie jest to zadanie łatwe.

Z pomocą przychodzi tu cytometria przepływowa, która pozwala na ocenę setek roślin w ciągu jednego dnia. Do badania w cytometrze jest wymagany jedynie niewielki wycinek tkanki, co jest bardzo ważne w przypadku badania regenerujących roślin lub kalusa. Z pomocą coraz lepszych cytometrów można selekcjonować nie tylko rośliny, ale także komórki a nawet pojedyncze chromosomy. Wyodrębnienie haploidów z uzyskanej populacji może być również ułatwione przez zastosowanie genów markerowych (HAMZA i współaut. 1993, MORIGNEUX i współaut. 1993).

PODWAJANIE LICZBY CHROMOSOMÓW (DOUBLING)

Rośliny haploidalne rozmnażane wegetatywnie *in vivo* lub *in vitro* mogą stanowić obiekt badań same w sobie. Jednak dla otrzymania potomstwa generytywnego, szczególnie u monohaploidów, jest niezbędne podwojenie liczby chromosomów. Otrzymane w ten sposób podwojone haploidy powinny być osobnikami homogametycznymi. Dalej rozmnażane dają wyrównane, homogametyczne linie, bardzo poszukiwane przez hodowców.

W ostatnich latach pojawiły się doniesienia, że DNA haploidów ulega metylacji i mutacjom, szczególnie w kulturze pylników (DEVAUX i współaut. 1993, REED i współaut. 1994).

W pewnych przypadkach, na przykład w kulturze pylników rzepaku, podwojone haploidy powstają częściowo spontanicznie. Jeśli haploidy są stabilne, wtedy najczęściej wykorzystuje się kolchicynę do podwojenia liczby chromoso-

mów. W wyniku traktowania tkanki merystematycznej kolchicyną otrzymuje się diploidy, poliploidy i chimery (NIKOLOVA i NIEMIROWICZ-SZCZYTT 1995). Przeżywalność roślin traktowanych kolchicyną można zwiększyć stosując kultury pędów lub merystemów (mikropropagacja) *in vitro*. Można też, licząc na spontaniczne podwojenie liczby chromosomów, indukować powstanie kalusa z organów rośliny haploidalnej, na przykład z eksplantatów liści, a następnie doprowadzić do różnicowania roślin (NIEMIROWICZ-SZCZYTT i współaut. 1995).

W przypadku polihaploidów dość często dochodzi do wytwarzania tak zwanych gamet niezredukowanych (NIEMIROWICZ-SZCZYTT 1990). Jeśli nastąpi połączenie gamet o niezredukowanej liczbie chromosomów, to otrzymamy potomstwo płodne, najczęściej o parzystej liczbie genomów. Oznacza to, że roślin, które nawet w niewielkim procencie wytwarzają gamety niezredukowane, nie trzeba kolchicynować i można je rozmnożyć przez nasiona.

HAPLOIDY I CO DALEJ

Rośliny z pojedynczym genomem stanowią bardzo wartościowy materiał badawczy. Można je wykorzystać do badań porównawczych i określić, jak działają poszczególne geny, pozbawione homologicznych partnerów. Można też komórki lub protoplasty roślin haploidalnych wykorzystać do indukowania mutacji lub transformacji. Fuzja dwóch osobników haploidalnych daje najczęściej organizm diploidalny. W ten sposób można połączyć cechy wybranych osobników a także doprowadzić do utworzenia osobników o różnym udziale składników cytoplazmy i jąder łączonych form, tak zwane mieszańce niesymetryczne. Indukowanie mutacji u osobników haploidalnych ma swoje uzasadnienie, gdyż można u nich obserwować ekspresję pojedynczego genu. Przykładem mogą być prace z mutantem haploidalnego tytoniu, w wyniku których charakteryzowano transpozony (GRANDBASTIEN i współaut. 1991). Podobnie po wprowadzeniu genu do komórek organizmu haploidalnego (transformacja) można łatwiej ocenić jego ekspresję niż w roślinie diploidalnej. Przykładem może być transformacja protoplastów pochodzących z mikrospor kukurydzy i regeneracja transgenicznych, haploidalnych roślin (SUKHAPINDA i współaut. 1993). Transformacji poddaje się także zarodki haploidalne, na przykład zarodki *Datura* i *Nicotiana* (SANGWAN i współaut. 1993).

Haploidy okazały się bardzo przydatne w pracach nad mapowaniem genomów. Podwojone haploidy ryżu (TANKSLEY i współaut. 1991), jak i jęczmienia (CHALMERS i współaut. 1993, GRANER i BAUER 1993, HEUN 1992) są wykorzystywane do mapowania przy użyciu techniki RFLP. Także dihaploidy ziemniaka są wykorzystywane do analizy cechy odporności, na przykład na *Phytophthora infestans* (KHARBOTLY i współaut. 1994). Z kolei podwojone haploidy pszenicy stanowiły materiał do identyfikacji alleli lokus Pm3, warunkującego odporność na mączniaka (HARTL i współaut. 1993).

Podwojone haploidy i ich generatywne potomstwo są również wykorzystywane w hodowli nowych odmian (NIEMIROWICZ-SZCZYTT 1989). Otrzymano szereg odmian rzepaku, pszenicy, ryżu, jęczmienia, ziemniaków, bawełny a nawet szparagów z linii wprowadzonych z podwojonych haploidów. Dla celów hodow-

lanych zaleca się wykorzystywanie najlepszych mieszańców F1 jako materiału wyjściowego do indukcji haploidów. Prawdopodobieństwo zaindukowania do rozwoju mikrospory lub komórki woreczka załążkowego o szczególnie korzystnym układzie cech jest wtedy znacznie większe.

Nowe czy poprawione technologie produkcji haploidów byłyby przydatne z punktu widzenia otrzymywania dużych populacji haploidów. Bardzo obiecująca wydaje się produkcja zarodków somatycznych w bioreaktorze a dalej sztucznych nasion (MALEPSZY 1988).

PODSUMOWANIE

Otrzymywanie i wykorzystanie haploidów wymaga zastosowania całego szeregu metod o charakterze biotechnologicznym. Kultury tkanek i komórek na stałych lub płynnych podłożach są niezbędnym elementem otrzymywania haploidów. Kultury zawieszinowe w bioreaktorach mogą mieć znaczenie dla rozmnożenia haploidów na większą skalę. Nowe techniki molekularne umożliwiają w coraz większym stopniu precyzyjną charakterystykę haploidów a także selekcję osobników o określonych cechach użytkowych. Manipulowanie protoplastami, wywoływanie mutacji a także transformowanie komórek zmieniają zakres wykorzystania haploidów i sprawiają, że stają się poszukiwanym materiałem do badań. Obok tradycyjnego już wykorzystywania podwojonych haploidów jako materiału wyjściowego do hodowli podkreśla się obecnie ich znaczenie dla konstruowania map genomowych szeregu gatunków roślin.

HAPLOIDS IN BIOTECHNOLOGY

Summary

Biotechnology is widely applied in haploid production *via* anther or ovule culture or embryo rescue, clonal propagation, doubling, protoplast fusion, mutant induction and transformation.

In several species, new varieties and lines were used in field trials. Genomic maps are based on the RFLP technique, and doubled haploids are under construction. New molecular (RFLP, RAPD) and immunological markers are used for diagnostic assays.

LITERATURA

- CASTILLO A. M., CISTUE L., 1993. *Production of gynogenetic haploids of Hordeum vulgare L.* Plant Cell Reports, 12, 3, 139-143.
- CHALMERS K. J., BARUA V. M., HACKETT G. A., THOMAS W. T. B., WAUGH R., POWELL W., 1993. *Identification of RAPD markers linked to genetic factors controlling the milling energy requirement of barley.* TAG, 87, 3, 314-320.
- DEVAUX P., KILIAN A., KLEINHOFES A., 1993. *Anther culture and Hordeum bulbosum -derived doubled haploids: mutations and methylation.* Molecular-and-General-Genetics, 241, 5/6, 674-679.
- GRANDBASTIEN M. H., SPIELMANN A., POUTEAU S., HUTTNER E., LONGUET M., KUNERT K., MEYER C., ROUZE P., CABOCHE M., 1991. *Characterization of mobile endogenous copia-like transposable elements in the genome of Solanaceae.* [W:] *Plant molecular biology 2.* Proceedings of a NATO Advanced Study Institute, 14-23 May, 1990, Elmau, Germany, HERRMANN R. G., LARKINS B. A. (red.) 333-343, NATO ASI Series A.: Life Sciences 212, New York, USA, Plenum Press.
- GRANER A., BAUER E., 1993. *RFLP mapping of the ym4 virus resistance gene in barley.* TAG 86, 6, 689-693.

- GUHA S., MAHESHWARI S. C., 1964. *In vitro* production of embryos from anthers of *Datura*. *Nature* 204, 497.
- HAMZA S., CAMILLERI C., POLLIEN J. M., VAUCHERET H., BOURGIN J. P., CHUPEAU Y., 1993. Selection for spontaneous tomato haploids using a conditional lethal marker. *TAG* 86, 6, 657-664.
- HARTL L., WEISS H., ZELLER F. J., JAHOR A., 1993. Use of RFLP markers for the identification of alleles of the Pm3 locus conferring powdery mildew resistance in wheat (*Triticum aestivum* L.). *TAG* 86, 8, 959-963.
- HEUN M., 1992. Mapping quantitative powdery mildew resistance of barley using a restriction fragment length polymorphism map. *Genome* 35, 6, 1019-1025.
- HOUGHAS R. W., PELOQUIN S. J., ROSS R. W., 1958. Haploids of the common potato. *J. Hered.* 49, 103-106.
- KHARBOTLY EL. A., LEONARDS-SCHIPPERS C., HUIGEN D. J., JACOBSEN E., PEREIRA A., STIEKEMA W. J., SALAMINI F., GEBHARDT C., 1994. Segregation analysis and RFLP mapping of R1 and R3 alleles conferring race-specific resistance to *Phytophthora infestans* in progeny of dihaploid potato parents. *Molecular and General Genetics* 242, 6, 749-754.
- LEHMANN C., KROLOW K.D., 1991. Experiments on haploid production from tetraploid triticales by the *Hordeum bulbosum* system and anther culture. *Cereal-Research-Communication* 19, 283-290.
- MALEPSZY S., 1988. Sztuczne nasiona — przełom w nasiennictwie. *Post. Nauk Rol.* 4, 3-15.
- MURIGNEUX A., BARLOY D., LEROY P., BECKERT M., 1993. Molecular and morphological evaluation of doubled haploid lines in maize. 1. Homogeneity within DH lines. *TAG* 86, 7, 837-842.
- NIEMIROWICZ-SZCZYTT K., 1989. Otrzymywanie i zastosowanie haploidów. [W:] *Biotechnologia w genetyce i hodowli roślin*. MALEPSZY S., NIEMIROWICZ-SZCZYTT K., PRZYBECKI Z. (red.) PWN, Warszawa, 151-118.
- NIEMIROWICZ-SZCZYTT K., 1990. Strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.): *In vitro* production of haploids. [W:] *Biotechnology in Agriculture and Forestry 12. Haploids in crop improvement I*. BAJAJ Y.P.S. (red.), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo, Hong-Kong, 403-416.
- NIEMIROWICZ-SZCZYTT K., FARIS MUSTAFA N., NIKOLOVA V., RAKOCZY-TROJANOWSKA M., MALEPSZY S. 1995. Optimization of cucumber (*Cucumis sativus* L.) haploid production and doubling. International Conference „Agrobiotechnology”, 17-20 September 1995, Poznań, Poland, Book of Abstracts.
- NIKOLOVA V., NIEMIROWICZ-SZCZYTT K., 1995. Diploidyzacja haploidów ogórka (*Cucumis sativus* L.) przy użyciu kolchicyny w warunkach *in vitro*. XII Zjazd Pol. Tow. Genet., Szczecin 27-29 wrzesień 1995, Book of Abstracts.
- POTYONDI L., HESZKY L., 1992. Gynogenetic haploids produced in ovule cultures of male sterile, fertile, mono- and multigerm sugar beet (*Beta vulgaris* L.) lines. *Acta Agronomica Hungarica* 41, 1-2, 125-130.
- PRZYBOROWSKI J., NIEMIROWICZ-SZCZYTT K., 1994. Main factors affecting cucumber (*Cucumis sativus* L.) haploid embryo development and haploid plants characteristics. *Plant BREEDING* 112, 70-75.
- REED S. M., BURNS J. A., WERNSMAN E. A., 1994. Cytological evaluation of tobacco doubled haploids for presence of amplified homologous chromosomal regions. *Crop Science* 34, 1, 236-239.
- SANGWAN R. S., DUCROCQ C., SANGWAN-NORREEL B., 1993. Agrobacterium mediated transformation of pollen embryos in *Datura innoxia* and *Nicotiana tabacum*: production of transgenic haploid and fertile homozygous dihaploid plants. *Plant-Science-Limerick* 95, 1, 99-115.
- SUKHAPINDA K., KOZUCH M. E., RUBIN-WILSON B., AINLEY W. M., MERLO D. J., 1993. Transformation of maize (*Zea mays* L.) protoplast and regeneration of haploid transgenic plants. *Plant-Cell-Reports* 13, 2, 63-68.
- TANKSLEY S. D., AHN N., CAUSSE M., COFFMAN R., FULTON T., MCCOUCH S. R., Second G., TAI T., WANG Z., WU K., YU Z., 1991. RFLP mapping of the rice genome. *Rice Genetics II*, Proc. of the Second Intern. Rice Genetics Symp. 14-18 May 1990, 435-442, IRRI, Manila, Philippines.
- WENZEL G., GRANER A., FADEL F., ZITZLSPERGER J., FOROUGH-WEHR J., 1992. Production and use of haploids in crop improvement. [W:] *Biotechnology and crop improvement in Asia*. MOSS J. P. (red.) 169-179, Patancheru, India, ICRISAT.

ELIGIA M. SZEWCZYK

Zakład Mikrobiologii Farmaceutycznej Akademii Medycznej w Łodzi
Pomorska 135, 90-235 Łódź

PERSPEKTYWY SYNTEZY BAKTERYJNYCH BIODEGRADOWALNYCH POLIESTRÓW PRZEZ ROŚLINY

Polihydroksykwas alkanowe (polyhydroxyalkanoates — PHA) są poliestrami wytwarzanymi i rozkładanymi przez drobnoustroje. Stanowią one rozpowszechniony wśród bakterii materiał zapasowy, umiejscowiony w cytoplazmie w formie otoczonych białkowo-lipidową błoną ciał wtrętowych, nazywanych granulami. Pod względem budowy chemicznej polimery te są karboksykwasami, zawierającymi jako grupę funkcyjną przynajmniej jedno ugrupowanie hydroksylowe, połączonymi między sobą wiązaniami estrowymi. Różnorodność reszt kwasowych, dodatkowych podstawników, umiejscowienie grup hydroksylowych, stopień spolimeryzowania, a wreszcie udział różnych monomerów tworzących kopoliestry sprawia, że PHA są grupą związków o różnorodnej budowie i właściwościach (STEINBÜCHEL 1991). Najważniejsze cechy tych polimerów, dzięki którym mogą one znaleźć powszechne zastosowanie jako ulegające biodegradacji w środowisku tworzywa sztuczne, to ich termoplastyczność, hydrofobowość i nietoksyczność. PHA są biokompatybilne, optycznie aktywne i wykazują własności piezoelektryczne.

Zdolność gromadzenia przez bakterie polihydroksykwasów alkanowych, a w szczególności poli-3-hydroksymaślanu (PHB) jest cechą szeroko rozpowszechnioną. STEINBÜCHEL w 1991 przedstawił obejmującą kilkaset gatunków listę drobnoustrojów, w których wykryto PHA lub badano jego metabolizm. Od tego czasu lista ta znacznie się wydłużyła. Obejmuje ona prawie wszystkie grupy bakterii właściwych, a także *Archaeobacteria* (ALTEKAR i RAJAGOPALAN 1990). Zdolność gromadzenia PHA jest niezależna od głównych cech metabolizmu, dotyczy zarówno bakterii tlenowych, jak i beztlenowych, chemotrofów i fototrofów, litotrofów i heterotrofów.

Historycznie najwcześniej zidentyfikowano polimer 3-hydroksymaślanu (PHB) w ziarnach zapasowych zawartych w *Bacillus subtilis* (LEMOIGNE 1923), chociaż jak się okazało, pierwszy opisał je, nie znając jednak ich składu, BELJERINCK u *Rhizobium* (1888). Nazwiska obu tych badaczy zostały uwiecznione w nazwach gatunkowych gromadzących PHB bakterii: *Azotobacter beijerinckii* i *Pseudomonas lemoignei*.

Najlepiej poznanymi bakteriami kumulującymi znaczne ilości PHA są fakultatywnie chemolitoautotroficzne, tlenowe pałeczki z rodzaju *Alcaligenes*. Zostały

opisane po raz pierwszy jako „Knallgasbakterien” przez SCHLEGELA w 1962, a później przez pewien czas klasyfikowane jako *Hydrogenomonas*. Szczep *Alcaligenes eutrophus* H16 jest zdolny, na przykład, do gromadzenia polimeru aż do 90% suchej masy komórkowej. Fakt ten spowodował, że stał się on obiektem wielostronnych badań, drobnoustrojem modelowym w dziedzinie syntezy PHA.

PHA są syntetyzowane także przez tlenowe, fotosyntetyzujące cyjanobakterie. Obecność tego związku w komórkach wykazano u wielu gatunków, między innymi u *Chloroglea fritschii*, *Gloeothece* sp. czy *Microcystis aeruginosa*. Występuje on obok szeregu innych substancji zapasowych przez nie gromadzonych. Dla przykładu, w komórkach *Oscillatoria limosa* można znaleźć ziarna glikogenu, cyjanoficynę — materiał zapasowy, charakterystyczny tylko dla tej grupy drobnoustrojów, polifosforany i polimer kwasu hydroksywalerianowego (PHV). Ten ostatni jest zawarty w granulach sięgających 2,5 μm , a zatem pięciokrotnie większych niż u innych bakterii. Ilość polimeru gromadzonego w hodowlach nie jest jednak zbyt wielka — sięga kilku procent suchej masy komórek. Przeprowadzane próby zwiększenia kumulacji wskazują, na wpływ składu pożywki hodowlanej, co szczególnie jest widoczne w przypadku niektórych gatunków z rodzaju *Spirulina* (VINCENZICINI i współaut. 1990), czy też *Gloeothece* (STAL 1992).

Przyczyna, dla której cyjanobakterie gromadzą PHA, właściwie nie jest znana. Trudno bowiem znaleźć miejsce dla tego związku i produktów jego rozkładu w ich szlakach metabolicznych. Źródłem energii dla cyjanobakterii jest światło, węgiel pochodzący z CO_2 , a dla wielu gatunków źródłem azotu jest azot atmosferyczny. Pożywkę hodowlaną stanowią więc odpowiednio dobrane składniki mineralne. Wiązanie CO_2 odbywa się poprzez cykl Calvina-Bensona, zaś w ciemności zgromadzony wcześniej glikogen jest utleniany w cyklu pentozowym. Udział PHA w metabolizmie cyjanobakterii wydaje się być bardzo ograniczony. U aktywnie kumulujących je bakterii głównym elementem ich przemian jest acetylo-CoA włączany z dużym zyskiem energetycznym w cykl Krebsa. Cyjanobakterie nie posiadają cyklu kwasów trójkarboksyłowych. Sugestia, iż PHA są wykorzystywane w przebiegu syntezy aminokwasów, chlorofilu czy karotenoidów (STAL 1992) nie jest jednak w żaden sposób udokumentowana.

Na marginesie rozważań o kumulacji PHA przez organizmy fotosyntetyzujące należy wspomnieć o ciekawym znaczeniu, jakie polimer ten ma dla rozwoju niektórych roślin wyższych poprzez swoją funkcję w komórkach żyjących z nimi w symbiozie bakterii wiążących azot z powietrza. Otóż synteza PHB jest inicjowana w warunkach mikroaerofilowych w tym samym czasie, gdy nitrogenaza, ogromnie wrażliwy na tlen enzym odpowiedzialny za wiązanie azotu, wykazuje wzrost swej aktywności. Zachodzące równoległe utlenianie PHB chroni nitrogenazę przed szkodliwym wpływem tlenu w brodawkach korzeniowych. Polimer ten jest zatem niezwykle ważnym czynnikiem regulującym aktywność nitrogenazy. Dla komórek *Rhizobium* i innych bakterii korzeniowych poli-3-hydroksymaślan stanowi materiał zapasowy w okresach, gdy wolno bytują w glebie (SENIOR i DAWES 1971, KARR i współaut. 1984, STAM i współaut. 1986).

Wytwarzanie PHA jest powszechne także wśród bakterii fotosyntetyzujących i chemolitotroficznych. W swojej pracy LIEBERGESELL i współpracownicy (1991) zbadali 11 szczepów bakterii chemolitotroficznych (należały one do rodzajów:

Alcaligenes, *Paracoccus*, *Azotobacter* i *Thiobacillus*), 15 szczepów bakterii purpurowych nie będących bakteriami siarkowymi (*Rhodobacter*, *Rhodocyclus*, *Rhodomicrobium*, *Rhodopseudomonas* i *Rhodospirillum*) oraz 15 szczepów bakterii siarkowych (*Chromatium*, *Lamprocystis*, *Thiocapsa*, *Amoebobacter*, *Thiocystis* i *Ectothiorhodospira*).

Bakterie chemolitotroficzne hodowano w warunkach tlenowych na podłożu zawierającym ograniczoną ilość azotu w postaci nieorganicznej oraz, jako źródło węgla, różne alifatyczne kwasy organiczne. Bakterie fototroficzne najpierw namnażano w świetle, w warunkach tlenowych, w bogatym w azot podłożu, a następnie przenoszono do pożywki bez azotu, ale ze związkami węgla w postaci soli kwasów organicznych — octanu, propionianu, walerianianu czy też kwasów o cząsteczce siedmio lub ośmiowęglowej. Wszystkie z badanych szczepów kumulowały w tych warunkach PHA. Z wyjątkiem bakterii siarkowych, które gromadziły homopolimer złożony z 3-hydroksymaślanu, pozostałe były zdolne syntetyzować polimer złożony z dwojakiego rodzaju podjednostek — 3-hydroksymaślanu i 3-hydroksywalerianianu.

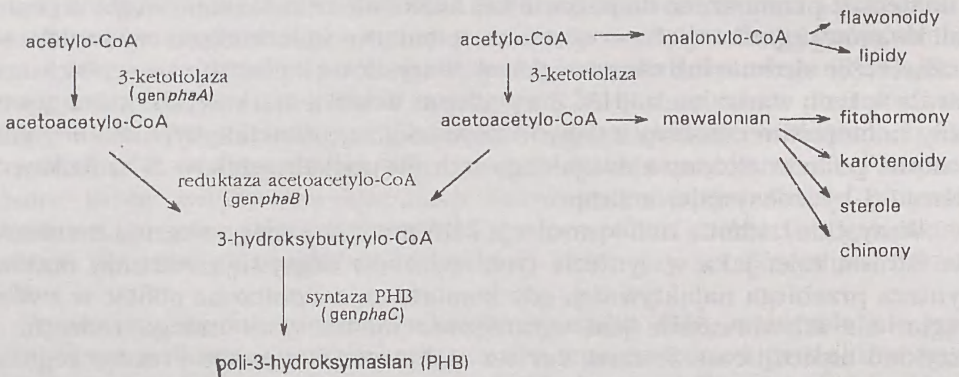
Wszystkie badania nad kumulacją PHA przez bakterie wskazują na niezwykle istotną rolę, jaką w syntezie tych związków odgrywają warunki hodowli. Synteza przebiega najaktywniej, gdy komórki są zaopatrzone obficie w związki węgla, ale ich mnożenie jest ograniczone niedoborami innego rodzaju, na przykład azotu, tlenu, fosforu, czy też niektórych kationów. Procesy regulacji syntezy polimeru są złożone i skupione na wczesnych etapach szlaku: wydajnej syntezie acetylo-CoA i wysokiej aktywności enzymu katalizującego reakcję jego kondensacji — biosyntetycznej 3-ketotiolazy. Produkty syntezy są w zasadniczym stopniu determinowane rodzajem źródła węgla, a o rodzaju tworzonego polimeru w równym stopniu decyduje budowa wytworzonego w komórkach tioestru hydroksykwasu, jak i specyficzność syntazy, dla której jest on substratem. Wiadomo na przykład, że dodanie do podłoża prekursorów o dłuższych łańcuchach węglowych, na przykład walerianianu, sprzyja syntezie polimerów o dłuższych łańcuchach ich podjednostek (HAYWOOD i współaut. 1990).

Synteza PHA może przebiegać według kilku dróg, z których najczęściej u bakterii spotyka się złożony z trzech etapów szlak syntezy PHB, dokładnie opisany u *Alcaligenes eutrophus*. Poszczególne etapy są katalizowane kolejno przez trzy enzymy (ryc.1). Pierwszy z nich — biosyntetyczna 3-ketotiolaza (EC 2.3.1.9.) — zwany tak dla odróżnienia od biorącej udział w reakcjach rozkładu degradacyjnej 3-ketotiolazy (EC 2.3.1.16), katalizuje odwracalną reakcję kondensacji Claisena dwóch reszt acetylo-CoA, w wyniku której powstaje acetoacetylo-CoA. Kolejny enzym szlaku, NADPH-zależna reduktaza acetoacetylo-CoA (E.C 1.1.1.36) doprowadza do stereospecyficznego przekształcenia tego związku w tioester D(-)-3-hydroksybutyrylo-CoA. Oba enzymy są białkami rozpuszczalnymi, syntetyzowanymi i aktywnymi w cytoplazmie komórek. Kolejny enzym szlaku — syntaza PHB jest znajdowana w cytoplazmie tylko wtedy, gdy nie obserwuje się syntezy PHB, natomiast w czasie jej trwania jest związany ściśle z białkowo-lipidową osłonką na powierzchni granul. Enzym katalizuje łączenie różnych tioestrów-CoA, przy czym preferuje substrat czterowęglowy, którego polimeryzacja prowadzi do powstania poli-3-hydroksymaślanu. Własności tej syntazy nie są jeszcze dokładnie poznane i dlatego nie nadano jej numeru EC.

Oprócz opisanej drogi syntezy PHB znaleziono jeszcze droge syntezy charakterystyczną tylko dla jednego gatunku: *Rhodospirillum rubrum*. Jest to pięcio-etapowy szlak, w którym acetoacetylo-CoA z udziałem reduktazy NADH-zależnej ulega przemianom w L(+)-3-hydroksybutyrylo-CoA, a ten dopiero pod działaniem dwóch hydratyz enolo-CoA jest przekształcany w substrat dla syntazy PHB (MOSKOWITZ i MERRICK 1969).

Alcaligenes eutrophus

transgeniczna *Arabidopsis thaliana*



Ryc. 1. Włączenie w szlak syntezy PHB *Alcaligenes eutrophus* elementów metabolizmu roślinnego wykorzystane w pierwszych próbach uzyskania syntezy PHB przez transgeniczną *Arabidopsis thaliana*.

Duże zainteresowanie budzą drogi syntezy innych niż PHB polihydroksy-kwasów alkanowych. Drogi takie znaleziono u bakterii z rodzaju *Pseudomonas*. Są jeszcze słabo poznane, wiadomo jednakże, że prowadzą do syntezy polimerów złożonych z podjednostek MCL (medium chain length) — o średniej długości łańcucha, to jest 6 do 14 węglowych. Dotąd opisano jako odrębne dwa takie szlaki, które, choć nadano im nazwy pojedynczych gatunków, znaleziono w komórkach znacznej grupy bakterii z rodzaju *Pseudomonas* należących do I grupy homologii rRNA. Są to: szlak *Pseudomonas oleovorans* i szlak *Pseudomonas aeruginosa*. PHA są tworzone w wyniku przekształceń zawartych w podłożu alkanów, alkoholi i kwasów karboksylowych, a same przemiany przypominają cykl β -oksydacji kwasów tłuszczowych (TIMM i STEINBÜCHEL 1990, STEINBÜCHEL 1991). Otrzymane w ten sposób polimery charakteryzują się, z powodu swej odmiennej budowy, nowymi, interesującymi z punktu widzenia ewentualnych zastosowań, właściwościami.

Wzrost zainteresowania biotechnologów polimerami hydroksykwasy spowodował stosunkowo szybkie poznanie molekularnych podstaw syntezy PHA przez bakterie. Z początku badania były skoncentrowane na szczepie *Alcaligenes eutrophus* H16. Geny kodujące wszystkie trzy białka enzymatyczne, odpowiedzialne za syntezę polimeru 3-hydroksyasmałanu, są u niego zlokalizowane we fragmencie DNA chromosomalnego, długości 5.2 kbp, który można uzyskać przez trawienie *Sma*I/*Eco*RI. W sekwencji nukleotydu fragmentu znaleziono

trzy ramki odczytu tworzące sekwencje poszczególnych genów syntezy PHB. Są ustawione w następującej kolejności: *phaC* (gen syntazy PHB) długości 1767 bp, *phaA* (gen biosyntetycznej 3-ketotiolazy) długości 1179 bp i *phaB* długości 738 bp kodujący NADPH-zależną reduktazę acetoacetylo-CoA. Geny te są zorganizowane we wspólny operon *phaCAB*. W swoich badaniach SCHUBERT i KRÜGER (1991) zidentyfikowali metodą Northern blot transkrypt tego fragmentu i znaleźli w odległości około 320 bp powyżej *phaC*, poprzedzający start dla transkrypcji, promotor o sekwencji uderzająco podobnej do konsensusu sekwencji promotora *Escherichia coli* σ^{70} . Takich sekwencji nie znaleziono powyżej *phaA* ani *phaB*, a dane doświadczalne wskazują, że nie mają one odrębnych promotorów. Zatem promotor znaleziony powyżej *phaC* jest promotorem dla całego operonu.

Bliskie usytuowanie genów syntezy PHB w genomie *Alcaligenes eutrophus* H16 umożliwiło szybkie ich wykrycie, klonowanie i przeniesienie do innego organizmu — *E. coli*. Dokonano tego w jednym czasie, zupełnie niezależnie, z zastosowaniem czterech różnych strategii, w trzech laboratoriach: James Madison University i Massachusetts Institute of Technology w Stanach Zjednoczonych oraz w Niemczech w Institut für Mikrobiologie der Georg-August-Universität Göttingen. Pierwszeństwo przypisuje się Dennisowi z uniwersytetu w Wirginii (SLATER i współaut. 1988), który znalazł i zidentyfikował operon *phaCAB* w *Alcaligenes eutrophus* poprzez przeszukiwanie jego biblioteki genowej, uzyskanej przez częściowe trawienie DNA za pomocą enzymu Sall, w kierunku aktywności biosyntetycznej 3-ketotiolazy. Te klony, które zawierały dodatkowo aktywność NADPH-zależnej reduktazy acetoacetylo-CoA i syntazy PHB zawierały cały operon. Klony te zyskały, nieobecną z natury u *E. coli*, zdolność gromadzenia PHB. Operon *phaCAB* może być z łatwością przenoszony do innych bakterii.

Klonowano już geny syntazy PHA z osiemnastu różnych drobnoustrojów, a sekwencje nukleotydowe poznano dla 10 genów pochodzących z ośmiu różnych drobnoustrojów. Analiza porównawcza pozwala podzielić je na trzy typy grupujące *phaC* o dużym podobieństwie struktury pierwszorzędowej kodowanych przez nie białek (STEINBÜCHEL i współaut. 1992). Heterologiczna ekspresja pojedynczych genów syntazy nastęrcza duże trudności. Za przyczynę niemożności uzyskania ekspresji polimerów, których podjednostki są średniej długości (MCL), uważa się fakt, że geny syntazy są usytuowane z dala od genów kodujących inne enzymy potrzebne do ich tworzenia z acetylo-CoA. Często położenie w genomie pozostałych genów syntezy PHA nie jest wręcz znane. Tymczasem możliwość klonowania i dowolnego przenoszenia do komórek dogodnych gospodarzy genów odpowiedzialnych za syntezę polimerów o innych lub lepszych niż PHB właściwościach, wydaje się bardzo pożądana. Szczególnie kusząca jest perspektywa ulokowania tych genów w organizmach samożywnych.

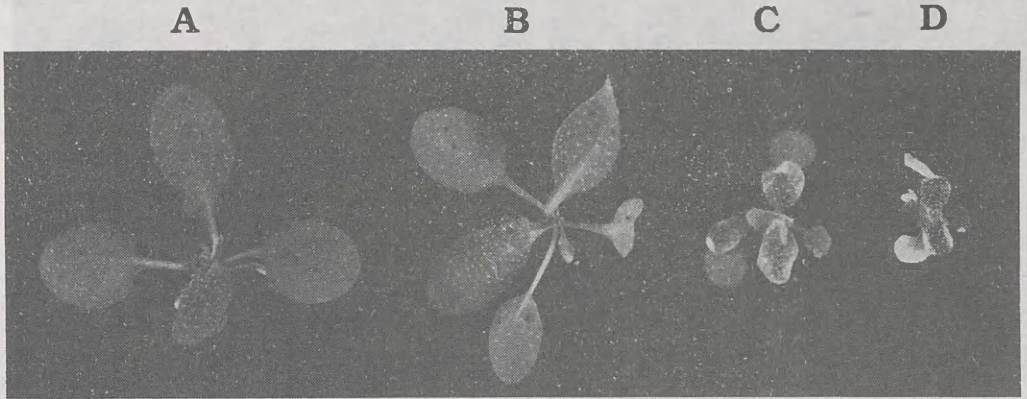
Wykorzystywanie bakterii jako organizmów wytwarzających PHA na skalę przemysłową ma szereg zalet. Wiele laboratoriów poświęciło ostatnie lata na dobranie odpowiednich szczepów, substratów i warunków hodowli potrzebnych do tej produkcji. Korzystne byłoby, być może, użycie bakterii autotroficznych lub zdolnych wykorzystywać substancje odpadowe, zyskując niski koszt hodowli a zachowując poprzez jej monitorowanie w biofermentorze możliwość ingerencji

w przebieg procesu i rodzaj otrzymywanego produktu. Jednak dotychczas, gdy obliczano koszty zawsze okazywało się, że w stosunku do kosztów produkcji tworzyw powstających z ropy naftowej są one bardzo duże. Przekraczają bowiem 5 \$ za kilogram. Nawet wysoka świadomość ekologiczna społeczeństw nie jest w stanie pokonać tej bariery. Innym sposobem na obniżenie kosztów produkcji PHA jest wykorzystanie do tego celu roślin wyższych. Jeszcze w 1989 roku takie plany wydawały się odległe. W swoim artykule opublikowanym w *Science*, Robert POOL (1989) przedstawiał trochę humorystycznie perspektywę „złocistych łańców plastiku”, ale jednocześnie sugerował, że koszty takiej produkcji mogłyby być tak niskie, jak koszty otrzymywania mąki — około 10 centów za funt. W tym czasie zespół Chrisa Sommervilla z Michigan State University Plant Research Laboratory intensywnie pracował nad klonowaniem do roślin genów bakterii produkujących PHB. Po pięciu latach literatura naukowa przyniosła informacje o pełnym sukcesie tej grupy (NAWRATH i współaut. 1994).

Zespół Sommervilla już wcześniej dokonał udanego klonowania genów kodujących reduktazę acetoacetylo-CoA (*phaB*) i syntazę PHB (*phaC*), pochodzących z *Alcaligenes eutrophus*, do komórek *Arabidopsis thaliana* (POIRIER i współaut. 1992b). Te dwa geny były potrzebne dla uzyskania przez roślinę kompletu genów szlaku syntezy PHB. Okazało się bowiem, że 3-ketotiolaza występuje w cytoplazmie roślin wyższych i jest zaangażowana między innymi w syntezę mewalonianu — prekursora pochodnych izoprenu (ryc. 1). Wprowadzenie brakujących genów do komórek odbyło się za pośrednictwem *Agrobacterium tumefaciens*, które zawierały plazmid Ti. Kodujące *phaB* i *phaC* sekwencje klonowano, każdy oddzielnie do pTi pBI121, gdzie znajdowały się pod kontrolą transkrypcyjną promotora 35S wirusa mozaiki kalafiora (CaMV35S). Promotor ten, jak wiadomo, zapewnia wysoką aktywność transkrypcyjną w rozmaitych tkankach roślinnych znajdujących się na różnym stopniu rozwoju (BENFEY i CHUA 1990). Otrzymane w wyniku transformacji z *phaB* i *phbC* homozygotyczne, transgeniczne linie wykazywały prawidłową integrację i transkrypcję tych genów. W wyciągach z liści wykrywano aktywność reduktazy acetoacetylo-CoA rzędu 1.6–16.2 IU/mg białka. Nie uzyskiwano jednak aktywności syntazy PHB, która zdaniem autorów, pozostawała nieaktywna w sytuacji braku w komórkach produktów genów *phbA* i *phbB*. Trudności z otrzymaniem ekspresji tego genu opisywano jednak także wtedy, gdy był przenoszony do *E. coli* (STEINBÜCHEL i SCHLEGEL 1990).

Transgeniczne rośliny, w których otrzymano ekspresję *phbC* wyglądem były zbliżone do formy dzikiej, ale te, w których doszło do ekspresji *phbB* i aktywność enzymu była wysoka, wykazywały znaczny stopień upośledzenia wzrostu (ryc. 2 A, C). W kolejnym etapie doświadczeń otrzymano rośliny zawierające jednocześnie oba klonowane geny. W tym celu dokonano krzyżowego zapylenia pomiędzy homozygotycznymi transgenicznymi liniami zawierającymi *phbB* i *phbC*. Powstała hybryda zyskała zdolność syntezy PHB. Oczekiwano, że tak jak enzymy, tak i produkty ich aktywności zostaną zlokalizowane w cytoplazmie, gdyż nie dołączono sekwencji kierujących je do docelowych organelli. Tymczasem granule PHB znaleziono także w wakuolach i jądrze. Ich obecność w znacznym stopniu zaburzała wzrost roślin (ryc. 2 D).

Niewątpliwym sukcesem przeniesienia genów bakterii *Alcaligenes eutrophus* do rośliny — *Arabidopsis thaliana* i ich wysokiej ekspresji został osiągnięty, mimo znacznej różnicy stosunku G:C obu organizmów. Trudno jednakże było mówić o pełnym powodzeniu eksperymentów z powodu znacznego zmniejszenia wzrostu i produkcji nasion (około 19% formy dzikiej). Mogło to być spowodowane niedostatkami acetylo-CoA dla zwykłych przemian metabolicznych bądź szkodliwością nowych metabolitów oraz destrukcją spowodowaną powstaniem granul.

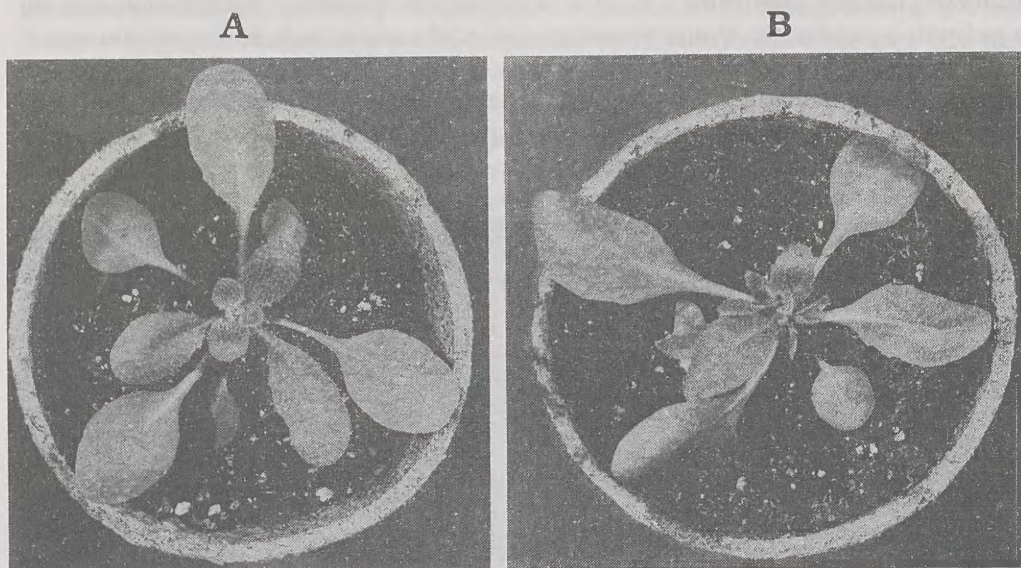


Ryc. 2. Wpływ ekspresji bakteryjnych genów w komórkach *Arabidopsis thaliana* na jej wzrost.

A — Postać dzika; B — roślina z włączonym genem syntazy PHB (*phaC*); C — roślina, w której doszło do ekspresji genu reduktazy acetoacetylo-CoA (*phaB*); D — syntetyzująca PHB hybryda powstała w wyniku skrzyżowania postaci B i C. Według POIRIER i współaut. 1992.

Drogi pokonania tych trudności — to określenie tkanek, w których należy ulokować geny, oraz skorelowanie czasu ich ekspresji z rozwojem rośliny, a także precyzyjna lokalizacja miejsca syntezy polimeru w komórce. Somerville uznał, że optymalne dla produkcji byłyby plastydy komórek z tkanek o wysokim przepływie acetylo-CoA. Warunki takie spełniałyby kumulujące duże ilości tłuszczu nasiona słonecznika, rzepaku lub też, lepiej, bo bez ograniczenia produkcji zdolnych do kiełkowania nasion, mezokarp owoców awokado lub palmy olejowej (POIRIER i współaut. 1992a). Zanim dojdzie do takich eksperymentów Somerville z powodzeniem ulokował geny syntezy PHB w plastydach *Arabidopsis thaliana* (NAWRATH i współaut. 1994). W tym celu zostały skonstruowane trzy plazmidy pBI, z których każdy zawierał jeden z genów szlaku syntezy PHB: 3-ketotiolazy, reduktazy acetoacetylo-CoA lub syntazy, połączone z fragmentem DNA kodującym peptyd przenoszący z małej podjednostki karboksylazy rybulozodwufosforanu grochu oraz promotor CaMV35S. Poprzez transformację ustalono linie transgenicznych heterozygotycznych roślin, a w wyniku ich skrzyżowania skonstruowano linie potrójnych hybrydów zdolnych do kumulowania znacznych ilości PHB. Rośliny te nie wykazywały żadnych objawów upośledzenia wzrostu czy rozwoju (ryc. 3). Co więcej, starsze rośliny zawierały w liściach około 10-cio krotnie więcej PHB niż rozwijające się, przeciętnie 7 mg na gram świeżej masy. W konkluzji swojej pracy autorzy oświadczyli, że nie istnieje już

żadna biologiczna bariera zdolna przeszkodzić efektywnemu gromadzeniu PHB przez rośliny wyższe.



Ryc. 3. Wpływ ekspresji bakteryjnych genów syntezy PHB w plastydach *Arabidopsis thaliana*.

A — Postać dzika; B — hybryda powstała w wyniku skrzyżowania trzech linii roślin transgenicznych: zawierających *phaA*, *phaB* i *phaC*. Wydajność tworzonego PHB — 1.2 mg/g świeżej masy. Według NAWRATH i współaut. 1994.

Należy wspomnieć, że zespół Somerville nie był jedynym, który próbował urzeczywistnić wizję „plastikowych ziemniaków”. Intensywnie, także z sukcesami, pracuje nad tym problemem zespół Brighta z „Zeneca Seeds” z Wielkiej Brytanii. Jego badacze prowadzili podobne eksperymenty jak Somerville w tym samym czasie (SMITH i współaut. 1992, SMITH i współaut. 1995). Modelowymi roślinami w ich badaniach były rzepak i tytoń.

Właściwości PHB otrzymanego w komórkach *Arabidopsis thaliana*, wyjąwszy większy rozrzut masy cząsteczkowej polimeru, są identyczne jak polimeru otrzymywanego z bakterii (POIRIER i współaut. 1995). Mimo wszystko, to dopiero początek. Otrzymywanie PHA na skalę przemysłową z bakterii daje większą różnorodność otrzymywanych produktów. Największy obecnie producent PHA Zeneca Bio Products z Wielkiej Brytanii (dawny ICI — Imperial Chemical Industries) prowadzi proces biotechnologiczny z udziałem mutantu *Alcaligenes eutrophus* H16 przynoszący około 10000 ton rocznie polimeru nazwanego „Biopol” — kopolimeru zbudowanego z dwóch rodzajów podjednostek: 3-hydroksymaślanu i 3-hydroksywalerianianu (3HB-co-3HV). Aby bakterie syntetyzowały ten polimer, muszą być hodowane w podłożu z glukozą i propionianem. Właściwości otrzymywanego polimeru, jego elastyczność, trwałość i termoplastyczność są znacznie korzystniejsze, niż w przypadku PHB i upodobniają to

tworzywo do polipropylenu. Znalazło ono praktyczne zastosowanie przy produkcji różnego rodzaju opakowań.

Otrzymywanie tego i innych polimerów o możliwie najbardziej korzystnych właściwościach jako produktu przeniesienia odpowiednich genów bakteryjnych do roślin stanowi ciągle aktualne wyzwanie dla biotechnologów roślin. Niewątpliwe korzyści płynące z powszechnego zastosowania tanich, biodegradowalnych tworzyw sztucznych w krótkim czasie byłyby wyraźnie odczuwalne w środowisku naturalnym. Należy także pamiętać, że produkcja roślinna nie będąca żywnością — to w regionach świata o wysokiej kulturze rolnej, na przykład w USA, kusząca alternatywa dla farmerów.

PERSPECTIVES OF SYNTHESIS OF BACTERIAL BIODEGRADABLE POLYESTERS BY PLANTS

Summary

The properties of alkane polyhydroxyacids (PHA), a storage material commonly found in bacteria, are closely similar to those of widely used plastics. However, the bacterial polymers are characterized by complete non-toxicity and the capacity to become biodegraded in the natural environment. Although industrial production of PHA taking advantage of their biosynthesis in bacteria was introduced only a few years ago and on a small scale, the material obtained in this way has found, and or is likely to find, multiple applications. The studies performed in several laboratories on the mechanisms of regulation and the way of PHA synthesis take into account specific metabolic features of various microorganisms. The productive strains are purposefully modelled by means of genetic engineering. The modelling is aimed both at improvement of the strains used and of the biotechnological processes. A turning point came when also higher plants became included in those studies. The attempts at transfer of the PHA synthesis genes from bacteria into plants undertaken at the beginning of the 90-ties resulted, after four years of experimentation, in transfer of the complete set of enzymes encoding poly-3-hydroxybutyrate synthesis from *Alcaligenes eutrophus* and *Arabidopsis thaliana*. The genes were introduced into plastids and there their full expression was achieved. This opened the way to production by plants of natural biodegradable plastics of common application.

LITERATURA

- ALTEKAR W., RAJAGOPALAN R., 1990. *Ribulose biphosphate carboxylase activity in halofilic archaeobacteria*. Arch. Microbiol. 153, 169-174.
- BEIJERINCK M., 1888. Bot. Ztg. 46, 725.
- BENFEY P. N., CHUA N. H., 1990. *The cauliflower mosaic virus 35S promoter: combinatorial regulation of transcription in plants*. Science 250, 959-966.
- HAYWOOD G. W., ANDERSON A. J., EWIG D. F., DAWES E. A., 1990. *Accumulation of a polyhydroxyalkanoate containing primarily 3-hydroxyalkanoate from simple carbohydrate substrates by Pseudomonas sp. strain NCIMB 40135*. Appl. Environ. Microbiol. 56, 3354-3359.
- KARR D. B., WATERS I. K., SUZUKI F., EMERICH D. W., 1984. *Enzymes of poly-β-hydroxybutyrate and cytric acid cycles of Rhizobium japonicum bacteroids*. Plant Physiol. 75, 1158-1162.
- LEMOIGNE M., 1923. *Production de l'acide β-hydroxybutyrique par certaines bacteries du groupe du Bacillus subtilis*. Comp. Rend. Acad. Sci. Paris, 176, 1761.
- LIEBERGESELL M., HUSTEDE E., TIMM A., STEINBÜCHEL A., FULLER R. C., LENZ R. W., SCHLEGEL H. G., 1991. *Formation of poly(3-hydroxyalkanoates) by phototrophic and chemolithotrophic bacteria*. Arch. Microbiol. 155, 415-421.
- MOSKOWITZ G. J., MERRICK J. M., 1969. *Metabolism of poly-β-hydroxybutyrate. II. Enzymatic synthesis of D(-)-β-hydroxybutyryl Coenzyme A by an enoyl hydratase from Rhodospirillum rubrum*. Biochemistry 8, 2748-2755.

- NAWRATH Ch., POIRIER Y., SOMMERVILLE Ch., 1994. Targeting of the polyhydroxybutyrate biosynthetic pathway to the plastids of *Arabidopsis thaliana* results in high levels of polymer accumulation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 12760-12764.
- POIRIER Y., DENNIS D., KLOMPARENS K., NAWRATH Ch., SOMMERVILLE C., 1992a. Perspectives on the production of polyhydroxyalkanoates in plants. FEMS Microbiol. Rev. 103, 237-246.
- POIRIER Y., DENNIS D. E., KLOMPARENS K., SOMMERVILLE C., 1992b. Polyhydroxybutyrate, a biodegradable thermoplastic, produced in transgenic plants. Science 256, 520-523.
- POIRIER Y., SOMMERVILLE C., SCHECHTMAN L. A., SATKOWSKI M. M., NODA J., 1995. Synthesis of high-molecular-weight poly([R]-(-)-hydroxybutyrate) in transgenic *Arabidopsis thaliana* plant cells. Int. J. Biol. Macromolecules 17, 7-12.
- POOL R., 1989. In search of the plastic potato. Science 245, 1187-1189.
- SCHLEGEL H. G., 1962. Bildung von Speicherstoffen durch Knallgas- und Purpurbakterien. Veröffentlichung Deutsche Botanische Gesellschaft 1, 167-172.
- SCHUBERT P., KRÜGER N., 1991. Molecular analysis of the *Alcaligenes eutrophus* poly(3-hydroxybutyrate) biosynthetic operon: identification of the N-terminus of PHB synthase and identification of the promoter. J. Bacteriol. 173, 168-175.
- SENIOR P. J., DAWES E. A., 1971. Poly- β -hydroxybutyrate biosynthesis and the regulation of glucose metabolism in *Azotobacter beijerinckii*. Biochem. J., 125, 55-66.
- SLATER S. C., VOIGE W. H., DENNIS D. E., 1988. Cloning and expression in *Escherichia coli* of the *Alcaligenes eutrophus* H16 poly- β -hydroxybutyrate biosynthetic pathway. J. Bacteriol. 170, 4431-4436.
- SMITH E., WHITE K. A., FENTEM T., BRIGHT S. W. J., 1992. The expression of PHA biosynthetic pathway genes in plants. FEMS Microbiol. Rev. 103, 417.
- SMITH E., WHITE K. A., HOLT D., FENTEM P.A., BRIGHT S. W. J., 1995. Expression of polybutyrate in oilseed rape. Proceedings of the Fourth International Symposium on Bacterial Polyhydroxyalkanoates, Montreal.
- STAL L. J., 1992. Poly(hydroxyalkanoate) in cyanobacteria: an overview. FEMS Microbiol. Rev., 103, 169-180.
- STAM H., van VERSEVED H. W., de VRIES W., Stouthamer A. H., 1986. Utilization of poly- β -hydroxybutyrate in free-living cultures of *Rhizobium* ORS571. FEMS Microbiol. Lett. 35, 215-220.
- STEINBÜCHEL A., 1991. Polyhydroxyalkanoic acids [W:] Byrom D., (red.) Biomaterials. Macmillan Publishers Ltd, Basingstoke, 123-213.
- STEINBÜCHEL A., HUSTEDE E., LIEBERGESELL M., PIEPER U., TIMM A., VALENTIN H., 1992. Molecular basis for biosynthesis and accumulation of polyhydroxyalkanoic acids in bacteria. FEMS Microbiol. Rev. 103, 217-230.
- STEINBÜCHEL A., SCHLEGEL H. G., 1991. Physiology and molecular genetics of poly- β -hydroxyalkanoic acid) synthesis in *Alcaligenes eutrophus*. Mol. Microbiol. 5, 536-542.
- TIMM A., STEINBÜCHEL A., 1990. Formation of polyesters consisting of medium-chain-length 3-hydroxyalkanoic acids from glukonate by *Pseudomonas aeruginosa* and other fluorescent pseudomonas. Appl. Environ. Microbiol. 56, 3360-3367.
- VINCENZINI M., SILI C., DE PHILIPPIS R., ENA A., MATERASSI R., 1990. Occurrence of poly- β -hydroxybutyrate in *Spirulina* species. J. Bacteriol. 172, 2791-2792.

MIROSLAW SOBCZAK, GRAŻYNA GRYMASZEWSKA,
WOJCIECH KUREK, WŁADYSŁAW GOLINOWSKI

Katedra Botaniki, Wydział Rolniczy,
Szkola Główna Gospodarstwa Wiejskiego
Rakowiecka 26/30, 02-528 Warszawa

BIOTECHNOLOGICZNE METODY WPROWADZANIA ODPORNOŚCI U ROŚLIN NA NICIENIE

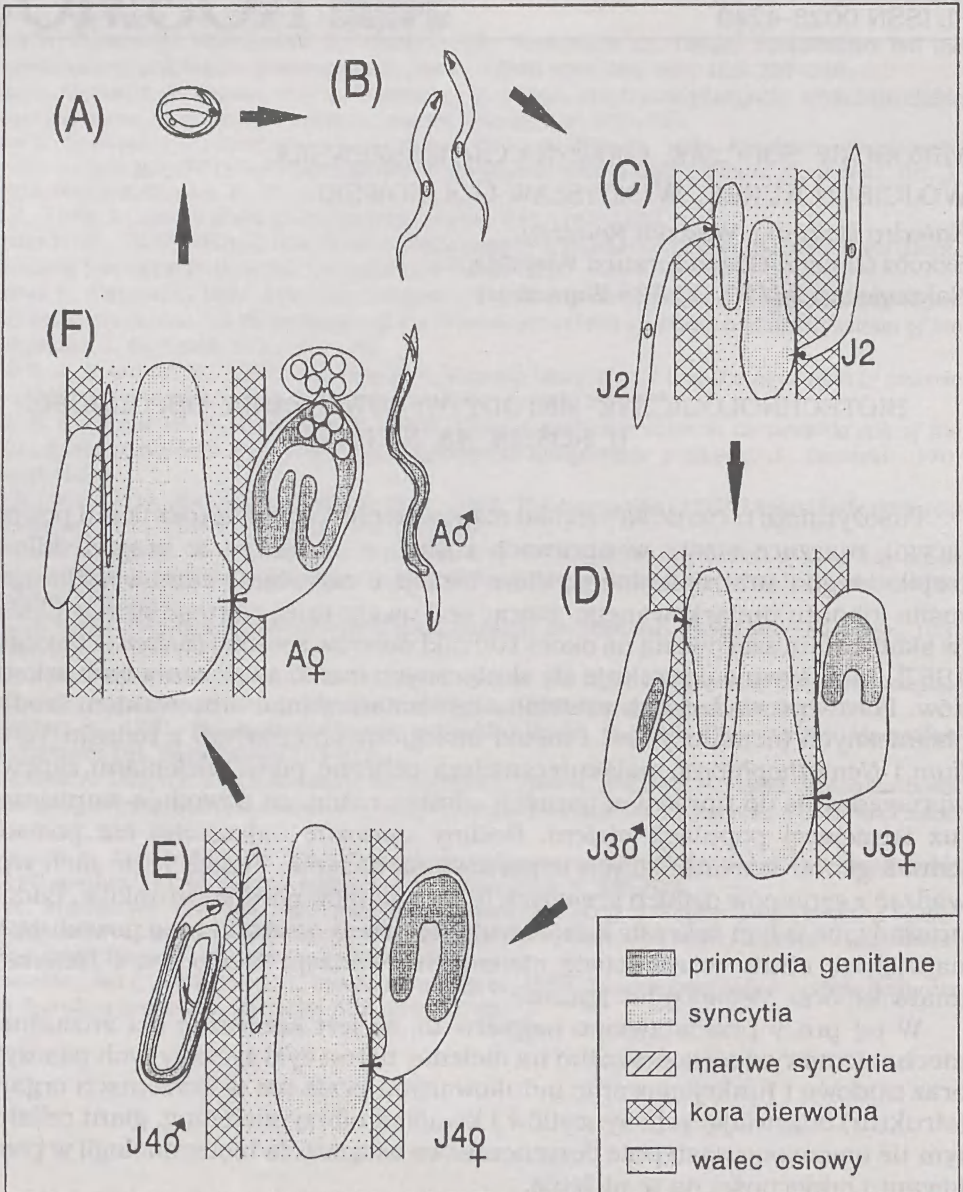
Pasożytnicze nicienie są szeroko rozpowszechnionymi szkodnikami powodującymi znaczące straty w uprawach roślin — zwłaszcza w krajach klimatu tropikalnego i subtropikalnego. Nieco mniejsze zagrożenie stanowią dla upraw roślin klimatu umiarkowanego. Biorąc pod uwagę dużą wartość strat w plonach (w skali świata szacowaną na około 100 mld dolarów rocznie) (SASSER i FRECKMAN 1987), intensywnie poszukuje się skutecznych metod zwalczania tych szkodników. Poza wprowadzeniem prawidłowego zmianowania, stosowaniem środków chemicznych (nematocydów) i metod biologicznych (grzybów z rodzaju *Verticillium* i *Nemathophtora*), najskuteczniejszą ochronę przed nicieniami zapewnia wprowadzanie do uprawy odpornych odmian roślin, co powoduje zmniejszenie już istniejącej populacji nicieni. Rośliny uprawne najczęściej nie posiadają jednak genów warunkujących odporność na nicienie. Trzeba je do nich wprowadzać z genomów dzikich krewnych lub z genomów obcych gatunków. Badania prowadzone w tym zakresie koncentrują się przede wszystkim na powodujących największe straty w rolnictwie nicieniach z rodzaju *Globodera* i *Heterodera* (mątwiki) oraz *Meloidogyne* (guzaki).

W tej pracy przedstawiono najpierw to, co jest konieczne dla zrozumienia mechanizmów odporności roślin na nicienie, to jest cykl życiowy tych pasożytów oraz budowę i funkcjonowanie indukowanych przez nie w korzeniach organów (struktur) odżywiających: syncytiów i komórek olbrzymich (ang. giant cells). Na tym tle omówiono następnie dotychczasowe osiągnięcia biotechnologii w poszukiwaniu odporności na te nicienie.

CYKL ŻYCIOWY NICIENI

MĄTWIKI

W cyklu życiowym mątwików występują cztery pokolenia larw i pokolenie osobników dojrzałych (ryc. 1). Larwy pierwszego stadium (J1) rozwijają się



Ryc. 1. Cykl rozwojowy mątwików (*Heterodera* spp.).

A) larwa drugiego stadium w oslonce jajowej. B) wędrujące larwy drugiego stadium. C) osiadłe, niezróżnicowane płciowo larwy drugiego stadium po zaindukowaniu syncytium. D) zróżnicowane płciowo larwy trzeciego stadium. E) zróżnicowane płciowo larwy czwartego stadium (syncytium samca degeneruje). F) dojrzałe płciowo osobniki: samiec opuszcza kutykulę trzeciego stadium larwalnego i wędruje do samicy, która po zapłodnieniu zaczyna składać jaja.

w jajach zawartych we wnętrzu cyst i w nich przechodzą pierwszą wylinkę. Larwy drugiego stadium (J2) są larwami infekcyjnymi. Przebijają osłonkę jaja, wychodzą z cyst i rozpoczynają poszukiwanie rośliny gospodarza. W korzeniach roślin żywicielskich indukują rozwój syncytium i przechodzą na osiadły tryb życia. Larwy infekcyjne mątwików nie są zróżnicowane płciowo. Różnice w budowie primordiów genitalnych samic i samców stają się widoczne przed rozpoczęciem wylinki do stadium J3 (GRUNDLER 1989). Po zakończeniu fazy J3 larwy samców, bez przerw na pobieranie pokarmu, przechodzą dwie bezpośrednio po sobie następujące wylinki i po osiągnięciu dojrzałości płciowej opuszczają korzenie. W rozwoju samic kolejne wylinki są zawsze przedzielone krótszymi lub dłuższymi okresami pobierania pokarmu. Dojrzałe samice odżywiają się cały czas kosztem rośliny gospodarza. Po zapłodnieniu, w jajach będących jeszcze w ciele samic, rozwijają się larwy pierwszego stadium (J1), a z oskórka osłaniającego jaja powstaje ochronna cysta. Pomimo że większość gatunków mątwików jest obliwatoryjnie amfimiktyczna (TRANTAPHYLLOU i HIRSCHMANN 1980), wyniki doświadczeń z różnymi wariantami warunków rozwoju nicieni i porażonych przez nie roślin wskazują, że płęć mątwików jest determinowana epigenetycznie (RASKI 1950, MUGNIERY i FAYET 1981, WYSS i GRUNDLER 1992).

GUZAKI

W rozwoju guzaków, podobnie jak w rozwoju mątwików, występują cztery stadia larwalne i pokolenie składające się z osobników dojrzałych. Infekcyjne larwy tych nicieni (J2) inicjują w korzeniach rozwój komórek olbrzymich, które są funkcjonalnymi odpowiednikami syncytiów. Po zainicjowaniu komórek olbrzymich, larwy przez około 14 dni pobierają z nich pokarm, po czym szybko przechodzą trzy wylinki. W obrębie oskórka larwy drugiego stadium przekształcają się w osobniki dojrzałe, które wznawiają pobieranie pokarmu i rozpoczynają składanie jaj. Większość guzaków to gatunki partenogenetyczne. Teoretycznie ich populacje powinny składać się wyłącznie z samic. Jednak w niekorzystnych warunkach nawet 60% populacji mogą stanowić samce lub formy interseksualne (TRANTAPHYLLOU i HIRSCHMANN 1980). Potwierdza to teorię epigenetycznej regulacji płci nicieni.

STRATEGIA NICIENI W POCZĄTKOWYM STADIUM INFEKcji

MĄTWIKI

Infekcyjne larwy mątwików wchodzą do korzeni w strefie wierzchołkowej (strefa elongacyjna i włośnikowa). Początkowo poprzez tkanki kory pierwotnej przemieszczają się w kierunku walca osiowego, a następnie migrują wzdłuż osi korzenia. Ich aparat gębowy jest zaopatrzony w stosunkowo masywny sztylet. Posługując się nim niszczą one mechanicznie leżące na trasie ich wędrówki komórki głębszych warstw miękiszu korowego i endodermy. Czasem penetrują również wnętrze walca osiowego. Blisko brzegu walca osiowego nakłuwają delikatnie kilka komórek, próbując zainicjować w nich zmiany prowadzące do powstania syncytium. Po znalezieniu właściwie reagującej komórki przez około

7 godzin trwają nieruchomo ze sztyletem wbitym do wyselekcjonowanej komórki. W tym czasie tracą zdolność lokomocji i przechodzą na osiadły tryb życia, rozpoczynając pobieranie pokarmu (WYSS 1992), o czym świadczą pulsacyjne ruchy mięśni przelyku. Pobieranie pokarmu odbywa się w trzech kolejno po sobie następujących fazach. Faza pierwsza jest fazą właściwego pobierania pokarmu i trwa około 1,5 h. Po niej następuje faza druga, podczas której larwy wyciągają, a następnie ponownie wprowadzają sztylet do syncytium. W trzeciej fazie przez kanał sztyletu larwy wprowadzają do syncytium swoją wydzielinę. Z wydzieliny tej powstaje tak zwana rurka pokarmowa (ang. feeding tube), która umożliwia nicieniom pobieranie pokarmu z cytoplazmy syncytium. Po utworzeniu rurki pokarmowej cały proces rozpoczyna się od początku i trwa z przerwami (kolejne wylinki) przez cały okres życia nicieni (WYSS 1992).

GUZAKI

Larwy guzaków wchodzą do korzeni w strefie elongacji. Stąd, przeciskając się między komórkami miększu korowego, migrują ku wierzchołkowi korzenia, a następnie wykonują zwrot o 180° , wchodzą w obszar różnicującego się walca osiowego i zacierają ku nasadzie korzenia. W strefie różnicowania tkanek przechodzą na osiadły tryb życia i indukują rozwój komórek olbrzymich. Określną trasę wędrówki larw zacierających do walca osiowego poprzez wierzchołek korzenia można wytłumaczyć istnieniem mechanicznej bariery, jaką stanowi dla nich położona na granicy kory pierwotnej i walca osiowego endoderma. Z kolei wybór międzykomórkowej drogi migracji przez larwy guzaków tłumaczy budowa sztyletu tych nicieni. Ma on mniejsze rozmiary niż sztylet mątwików i z tego powodu nie nadaje się do wykonania dużych otworów w ścianach komórek. W związku z tym przemieszczające się w korzeniach larwy, wydzielanymi przez siebie enzymami rozpuszczają blaszki środkowe, a sztyletu używają do rozsuwania tarasujących im drogę komórek (WYSS i współaut. 1992).

MORFOGENEZA SYNCYTIÓW I KOMÓREK OLBRZYMICH

SYNCYTIA

Skład komórkowy i ultrastrukturę syncytiów formujących się pod wpływem mątwików badano u wielu gatunków roślin (JONES i NORTHCOTE 1972, WYSS i współaut. 1984, BLEVE-ZACHEO i ZACHEO 1987, GOLINOWSKI i MAGNUSON 1991, MAGNUSON i GOLINOWSKI 1991, GRYMASZEWSKA i GOLINOWSKI 1991). W tej pracy przedstawiono wyniki obserwacji przeprowadzonych na porażonej mątwikiem burakowym modelowej roślinie, jaką w badaniach nematologicznych jest rzodkiewnik pospolity (*Arabidopsis thaliana*), ryc. 2a, (SIJMONS i współaut. 1991). W korzeniach tej rośliny inicjalną komórką syncytiów powstających pod wpływem larw samic jest zazwyczaj komórka prokambialna przyległa do już różnicowanych naczyń proto- lub metaksylemu. Komórka ta pod wpływem nicienia intensywnie powiększa się. Wzrasta w niej ilość organelli, takich jak mitochondria, plastydy i diktiosomy. Następuje też proliferacja endoplazmatycznego retikulum (ER) i zwiększa się gęstość optyczna cytoplazmy. Centralna wakuola

rozpada się na liczne, mniejsze. Po kilku godzinach w ścianach komórki inicjalnej pojawiają się otwarcia łączące ją z sąsiednimi komórkami prokambialnymi, mającymi już podobnie zmieniony protoplast. Syncytium powiększa się stopniowo poprzez rozpuszczanie odcinków ścian i fuzję protoplastów kolejnych komórek walca osiowego. Rozprzestrzenia się w walcu osiowym wzdłuż wiązek przewodzących akro- i bazypetalnie (ryc. 2b). W tym czasie sąsiednie komórki prokambium i komórki perycyklu dzielą się na całej długości syncytium i tworzą układ tkanek podobny do budowy wtórnej korzenia. Komórki endodermy zamierają, a tkanki kory pierwotnej i epiblema są rozrywane przez rozrastający się walec osiowy. Poza rejonem głowy nicienia syncytium zostaje otoczone warstwami komórek perydermalnych. Przy syncytiach następuje zahamowanie różnicowania drewna pierwotnego. Wiązki floemowe są przesunięte ku brzegowi walca osiowego. Wzrasta w nich ilość elementów przewodzących. W zaawansowanym stadium rozwoju obecne w syncytiach ameboidalne jądra znacznie się powiększają, co w połączeniu z silną kondensacją nukleoplazmy świadczy o ich wysokiej aktywności metabolicznej. Retikulum endoplazmatyczne tworzy w syncytiach charakterystyczne kolisty układy a w pewnych miejscach — zwarte obszary tubularnych cystern. W cytoplazmie pojawiają się liczne ciała lipidowe. Ściany syncytiów są zwykle grube i nie ma w nich czynnych plazmodesm. Przy naczyniach formują się na nich wyrostki transferowe, które powiększają powierzchnię pobierania wody i substancji pokarmowych.

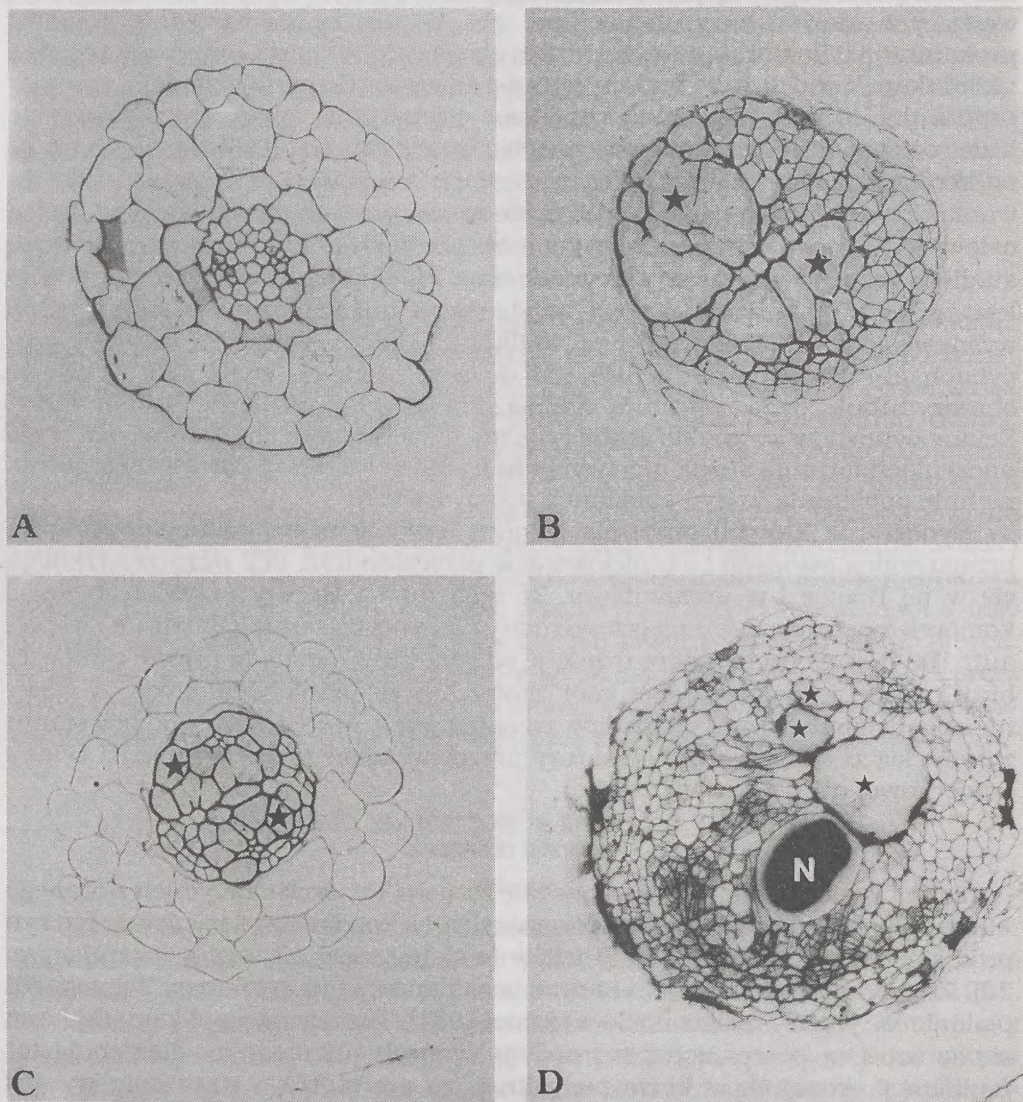
Syncytia, z których pobierają pokarm larwy samców, są usytuowane na brzegu walca osiowego i są inicjowane w perycyklu (ryc. 2c). Rozprzestrzeniają się w tej tkance i w prokambium. Ze względu na słabszy przyrost objętości komórek mają znacznie mniejsze rozmiary niż syncytia samic (GRUNDLER i współaut. 1994). Inne cechy, które różnią je od syncytiów samic, to prawie całkowity brak przerw w ciągłości ścian komórkowych w rejonach oddalonych od głowy nicienia i słabszy rozwój wyrostków transferowych, które wkrótce po powstaniu zlewają się ze sobą tworząc struktury przypominające raczej zgrubienia ściany komórkowej niż typowe wyrostki.

KOMÓRKI OLBRZYMIE

Larwy guzaków inicjują powstawanie zespołu komórek olbrzymich złożonego z 2 do 12 komórek w strefie różnicowania tkanek korzenia, w sąsiedztwie naczyń protoksylemu. Komórki poddane działaniu nicieni znacznie się powiększają (ryc. 2d). Zachodzą w nich synchronicznie liczne mitozy bez cytokinez. Wzrasta też ploidalność jąder — nawet do 64 n (JONES 1981). Tworzące zespół komórki łączą się ze sobą za pośrednictwem zmodyfikowanych plazmodesm. Następuje też proliferacja komórek w korze pierwotnej, co prowadzi do powstania wyrosła otaczającej zarówno nicienia, jak i komórki, z których pobiera pokarm (ENDO 1975).

Ciągłość tkanek przewodzących jest zachowana dzięki różnicowaniu się dodatkowych elementów drewna i łyka. W czasie rozwoju komórek olbrzymich wzrasta w nich proporcjonalny udział cytoplazmy w stosunku do wakuoli, a na ścianach sąsiadujących z naczyniami tworzą się rozbudowane systemy wyrostków ściany komórkowej. Cytoplazma ma strukturę podobną do cytoplazmy

komórek merystematycznych. Jądro komórkowe jest powiększone i ameboidalne, a ilość diktiosomów i mitochondriów wzrasta. Membrany ER są stosunkowo nieliczne, a rybosomy (wolne lub w polisomach) są rozproszone w całej cytoplazmie. Otwarcia w ścianie komórkowej nigdy się nie tworzą (JONES 1981).



Ryc. 2. Zmiany w tkankach korzenia rzodkiewnika (*Arabidopsis thaliana*) porażonych mątwikiem burakowym (*Heterodera schachtii*) i guzakiem północnym (*Meloidogyne incognita*).

A) przekrój poprzeczny przez korzeń rośliny nie zainfekowanej; B) syncytium (*) samicy mątwika w stadium J3; C) syncytium (*) samca mątwika w stadium J3; D) przekrój przez wyrost i komórki olbrzymie (*) zaindukowane przez guzaka; widoczne ciało nicienia (N). Powiększenie A, B, C — 500×, D — 250×.

ZMIANY AKTYWNOŚCI GENÓW W ORGANACH INDUKOWANYCH
PRZEZ NICIENIE

Nie są znane do tej pory nawet podstawowe mechanizmy regulujące tworzenie i funkcjonowanie organów odżywiających nicienie. Zdolność jednego gatunku nicienia do ich indukowania w setkach gatunków roślin (*Meloidogyne incognita* ma ponad dwa tysiące gatunków roślin gospodarzy) nie może być wytłumaczona tylko poprzez bezpośrednie oddziaływanie wydzielin nicienia na kluczowe enzymy w metabolizmie roślin. Podobnie też wszystkich obserwowanych zmian nie da się wytłumaczyć jako prostego działania lokalnego układu dawca-biorca stworzonego przez nicienia. Aktywny udział genów gospodarza w tworzeniu i funkcjonowaniu organów odżywiających wydaje się być oczywisty. Niestety brak jest niepodważalnych, bezpośrednich dowodów na poparcie tej teorii (SIMONS 1993). Powszechnie wiadomo jest jednak, że rozwijające się organy odżywiające mają silnie zagęszczoną cytoplazmę z dużą ilością organelli, szczególnie mitochondriów, rybosomów i endoplazmatycznego retikulum, dlatego za pewnik należy uznać, że przynajmniej te geny gospodarza, które biorą udział w regulowaniu aktywności i funkcji tych organelli, są w pewien sposób kontrolowane przez nicienie. Dodatkowo silnie powiększone, ameboidalne jądro komórkowe wskazuje na dużą aktywność genów roślinnych (BURROWS 1992). Pewne światło na mechanizm oddziaływania nicieni na roślinę może rzucić fakt, że specyficzne dla wydzielin włośnia spiralnego (*Trichinella spiralis*) przeciwciała wykazują obecność jego wydzielin w jądrze komórek gospodarza (DESPOMMIER 1990, LEE i współaut. 1991). Co więcej, okazuje się, że w wydzielinie tego nicienia jest substancja bardzo podobna do czynnika transkrypcji (POZIO i BRUSCHI 1994). Sugerowałoby to, że pasożyt oddziałuje bezpośrednio na specyficzną ekspresję genów komórek mięśnia. Włoseń spiralny jest, co prawda, pasożytem zwierząt i człowieka, ale indukuje w ich komórkach mięśniowych także powstawanie syncytiów. Poprzez możliwe analogie można przyjąć założenie, że nicienie roślinne mogą bezpośrednio oddziaływać na genetyczne mechanizmy regulacji aktywności metabolicznej komórki.

Do tej pory podjęto tylko kilka prób zanalizowania składu białek w syncytiach i komórkach olbrzymich oraz porównania ich ze składem białek w roślinach nie porażonych przez nicienie. Nie wykazano jednak istnienia żadnych istotnych różnic. Co więcej, niespodziewanie, większe i istotniejsze różnice w ich składzie zaobserwowano w liściach porażonych roślin, gdzie pojawiło się nowe białko, niż w ich korzeniach (HAMMOND-KOSACK i współaut. 1990).

Poszukiwanie genów aktywowanych (prawie) specyficznym w komórkach roślinnych — organach odżywiających nicienie przebiega zasadniczo dwoma drogami. Pierwsza z nich to zastosowanie metody odczytu różnicującego (ang. differential display) bibliotek cDNA. Jednym ze zidentyfikowanych genów, aktywnym w organach pokarmowych nicieni, jest gen *Nem2* kodujący katalazę. Pojawia się on w organach zaindukowanych przez *G. pallida* i *M. incognita* w korzeniach ziemniaka (NIEBEL i współaut. 1995). Katalaza steruje rozpadem nadtlenu wodoru do wody i tlenu. Nadtlenek wodoru jest uznawany za sub-

stancję sygnałową, stymulującą reakcje obronne w komórkach roślinnych. Zwiększona produkcja katalazy w zainfekowanych korzeniach może sugerować, że nicienie wytworzyły mechanizm wiodący do obejścia lub osłabienia systemu obronnego roślin poprzez zlikwidowanie lub ograniczenie ilości czynnika je indukującego, czyli nadtlenu wodoru (GHEYSEN i Van MONTAGU 1995).

Z kolei w korzeniach *Arabidopsis* porażonych przez *H. schachtii* zaobserwowano akumulację glikoproteidu (thioglikozydazy). Jest on jednak produkowany tylko w komórkach perydermalnych otaczających syncytium, a samo syncytium jest go całkowicie pozbawione (GRUNDLER i współaut. 1994, SCHMIDT 1995). Nieco bardziej specyficzną ekspresję dwóch ekstensyn (białek strukturalnych ściany komórkowej, pojawiających się pod koniec rozwoju ściany i stabilizujących połączenia pomiędzy jej składnikami) zaobserwowano w komórkach otaczających komórki olbrzymie zainicjowane przez *M. incognita* (Van der EYCKEN i współaut. 1992, 1994). Z drugiej strony, nie znaleziono istotnych ilości ekstensyny w ścianach komórek olbrzymich. Wysunięto więc hipotezę, że dla zachowania optymalnych możliwości pobierania pokarmu z systemu waskularnego do komórek olbrzymich niezbędne jest zachowanie ścian komórek olbrzymich w stanie jak najbardziej pierwotnym. Natomiast ściany komórek tworzących wyrostki stanowią w tym układzie mechaniczny system zabezpieczający komórki olbrzymie przed nadmierną ekspansją. W przypadku infekcji mątwikami synteza ekstensyn miała miejsce tylko w komórkach zniszczonych przez nicienia w czasie jego migracji.

Role ochronną można też przypisywać produktowi genu *Lemmi9*, który wykazuje wysoką aktywność w komórkach olbrzymich zaindukowanych przez *M. incognita* w korzeniach pomidora. Gen ten wykazuje bardzo duże podobieństwo do genu *lea14A* (ang. late — embryogenesis abundant) z genomu bawełny. Jest on szczególnie aktywny w późnych stadiach embriogenezy, a jego produkt jest prawdopodobnie odpowiedzialny za ochronę zarodka przed wysychaniem w czasie dojrzwania nasion. Przypuszczalną rolę genu *Lemmi9* może więc być ochrona cytoplazmy komórek olbrzymich przed wysychaniem (Van der EYCKEN i współaut. 1994).

Drugą drogą badania zmian w ekspresji genów w syncytium lub komórkach olbrzymich jest analiza aktywności regionów regulatorowych genów, to jest promotorów. Są one często aktywne (tzn. umożliwiają syntezę danego białka) tylko na określonym etapie rozwoju rośliny lub w określonym organie. Bardzo efektywnym narzędziem monitorowania aktywności promotorów na poziomie komórkowym jest gen markerowy *GUS* (*uid A*) kodujący enzym β -glukuronidazę. Gen ten jest przyłączany do promotora, którego funkcja i sekwencja jest znana. Zestaw taki, na drodze transformacji, jest wprowadzany do genomu rośliny i po jej regeneracji obecność produktu genu *GUS* może być wykryta poprzez reakcję z odpowiednim substratem na poziomie komórkowym, wskazując na aktywność testowanego promotora (JEFFERSON i współaut. 1987).

Metodą tą znaleziono, jak dotąd, tylko parę promotorów wykazujących podwyższoną aktywność w strukturach odżywiających nicienie. Jednym z nich jest promotor genu *TobrB7*, kodującego membranowe białko kanałowe. Normalnie gen ten ulega krótkotrwałej ekspresji we wczesnych etapach rozwoju walca osiowego. W korzeniach porażonych przez nicienia promotor tego genu jest

aktywny w całym zespole komórek olbrzymich (OPPERMAN i współaut. 1994, TAYLOR i współaut. 1992). Poprzez stopniowe skracanie długości oryginalnego promotora (długości około 1,8 kb) uzyskano ostatecznie odcinek DNA o długości około 0,3 kb, który jest specyficznie i wyłącznie aktywny w komórkach olbrzymich organu odżywiającego zaindukowanego przez nicienia.

Drugim przykładem jest promotor genu kodującego kinazę *cdc2a*. Białko to jest znane jako jeden z kluczowych regulatorów cyklu komórkowego. W niezainfekowanych roślinach jest ono aktywne tylko w dzielących się komórkach tkanek merystematycznych. W organach odżywiających nicienie największa aktywność promotora *cdc2a* została zaobserwowana trzy dni po wnikięciu patogena do korzenia, a następnie stopniowo malała (NIEBEL i współaut. 1994). Rolę tego genu można stosunkowo prosto wyjaśnić w komórkach olbrzymich, gdyż powszechnie jest znany zachodzący w nich proces wielokrotnych mitoz nie zakończonych cytokinezą (JONES 1981). Znacznie trudniejsze jest wytłumaczenie aktywności tego genu w syncytiach, których jądra nie przechodzą mitozy. Jedną z ewentualnych możliwości jest indukowanie w nich początkowych faz mitozy, po których zostaje ona przerwana i zablokowana, co prowadzi jednak do ewentualnej endoreduplikacji materiału genetycznego (GHEYSEN i Van MONTAGU 1995).

Kolejnym przykładem promotora aktywnego w organach pokarmowych nicienia jest promotor genu kodującego reduktazę hydroksymetyloglutarylokoenzymu A (HMGR). Enzym ten pełni kluczową rolę w mechanizmach syntezy terpenoidów i steroli (CRAMER 1992). Promotor tego genu jest aktywowany wkrótce po wyselekcjonowaniu komórki inicjalnej i jest aktywny przez cały okres rozwoju zespołu komórek olbrzymich (WEISSENBORN i współaut. 1994). Jest to szczególnie interesujący promotor, gdyż nicienie są całkowicie zależne od swojego gospodarza pod względem dopływu i składu steroli, których nie są w stanie samodzielnie syntetyzować (CHITWOOD i LUSBY 1991).

Wydaje się, że dalsze badania wykażą, że geny gospodarza, aktywne w organach odżywiających nicienie, są także aktywne w innych tkankach lub specyficznych stadiach rozwojowych rośliny. Jednakże, pomimo że geny i mechanizmy gospodarza nie są uruchamiane specyficznie przez infekcję nicienia, to posiada on zdolność wywołania całościowych zmian korzystnych dla siebie (BURROWS 1992).

Z kolei inne badania prowadzone przy użyciu zestawu: promotor-gen *GUS* wykazały, że wiele powszechnie stosowanych w biologii molekularnej promotorów o wysokiej aktywności w korzeniach, jak *CaMV 35S*, *rol A-D*, *nos*, *[gamma]-TIP* czy *T-cyt* było całkowicie wyłączanych w wyniku infekcji nicieniowej (GODDIJN i współaut. 1993). Wydaje się, że w ten sposób pasożyt może zmuszać komórki gospodarza do wyłączenia pewnych szlaków metabolicznych i do przestawienia całej maszyneryi biosyntezy białka na potrzeby budowania organu odżywiającego i dostarczanie pożywienia nicieniowi.

Dysponowanie promotorem o (prawie) specyficznej ekspresji w organie odżywiającym nicienie jest bardzo ważne dla konstruowania metodami inżynierii genetycznej linii roślin odpornych na te patogeny. Dlatego niewielka liczba znanych promotorów, aktywnych w syncytiach i komórkach olbrzymich, spowodowała podjęcie poszukiwań nowych, aktywnych promotorów. Wykorzystano

w tym celu także gen *GUS*, tym razem jednak pozbawiony promotora. W wyniku transformacji i regeneracji gen ten włącza się losowo do genomu rośliny i w wielu przypadkach podłącza się do jakiegoś promotora, tworząc funkcjonalną całość. Taki hybrydowy gen (promotor z rośliny stransformowanej + gen *GUS*) przejawia swoją organowo- i/lub rozwojowo specyficzną ekspresję, która może być śledzona w laboratorium po podaniu substratu odpowiedniego dla *GUS* (KERTBUNDIT i współaut. 1991). Ta metoda znakowania i „wyławiania” promotorów jest stosowana od paru lat w kilku europejskich laboratoriach. Analiza ponad 1000 transgenicznych linii modelowej rośliny *Arabidopsis thaliana* wykazuje, że tylko około 5% „wyłowionych” w ten sposób promotorów wykazuje wzmożoną aktywność w miejscu infekcji nicieniowej, przy czym nie jest to indukcja ściśle specyficzna. Zwykle ekspresję *GUS* obserwuje się też w innych miejscach w roślinie.

ZASTOSOWANIE BIOTECHNOLOGII WE WPROWADZANIU ODPORNOŚCI NA NICIENIE

Nematocydy są obecnie najbardziej toksycznymi pestycydami stosowanymi w rolnictwie, a co gorsza — jednocześnie najmniej skutecznymi i najtrudniejszymi w stosowaniu. Z tego powodu w wielu krajach rozwiniętych odchodzi się powoli od ich stosowania i szuka nowych, praktyczniejszych i bezpieczniejszych dla środowiska rozwiązań (ATKINSON i współaut. 1994).

Nadmiernego wzrostu populacji pasożytniczych nicieni można uniknąć poprzez stosowanie prawidłowego zmianowania i zachowanie odpowiednio długich przerw pomiędzy kolejnymi uprawami podatnymi na tego samego nicienia. Jest to jednak najczęściej warunek niemożliwy do spełnienia, gdyż większość nicieni ma bardzo szerokie spektrum gospodarzy, a niektóre ich gatunki potrafią przetrwać w stanie anabiozy nawet do ośmiu lat.

Inną możliwością jest zastosowanie w sposób masowy naturalnych wrogów nicieni, takich jak grzyby z gatunków *Nemathophtora gynophila* czy *Verticillium chlamydosporium*. W badaniach laboratoryjnych były one w stanie zniszczyć nawet 95% populacji nicieni, ale w praktyce okazało się, że działają bardzo wolno i są niezwykle trudne do zastosowania, chociaż zapewniają skuteczną i trwałą ochronę (BURROWS i współaut. 1994).

Ostatnią możliwością uniknięcia strat powodowanych przez nicienie jest wprowadzenie odporności do odmian uprawnych. Należy tu wyjaśnić, że w przypadku nicieni za roślinę odporną uznaje się taką, która uniemożliwia powiększanie się obecnej już populacji nicieni. Oznacza to, że za rośliny odporne uważa się takie, na których rozwijają się masowo tylko samce i sporadycznie pojedyncze samice (MÜLLER 1989). Problem polega jednak na tym, iż najczęściej gatunki uprawne nie posiadają odpowiednich genów odporności na nicienie i trzeba je przenosić z genomów ich dzikich krewnych, lub całkowicie obcych gatunków. Stosowane do tego tradycyjne metody hodowlane są bardzo czasochłonne i nie zawsze skuteczne.

Kilka znanych genów warunkujących odporność na nicienie jest obecnie już w części lub w całości sklonowana. Ich biochemiczna funkcja nie jest jednak

znana, podobnie zresztą jak większości innych genów odporności. Efekty ich działania są zazwyczaj podobne do nadwrażliwości i prowadzą do szybkiego obumierania protoplastu zaindukowanego organu odżywiającego nicienie.

Tak zwany gen *Mi* pochodzący z *Lycopersicon peruvianum* wprowadzono do genomu pomidora (*L. esculentum*). Jest to pojedynczy, dominujący gen o długości około 1,5 Mb i w najbliższej przyszłości powinien zostać całkowicie zsekwenconowany i sklonowany. Zapewnia on odporność na nicienie z rodzaju *Meloidogyne* (stąd nazwa) i jest, jak na razie, jedynym komercyjnie dostępnym genem odporności na te nicienie w uprawie pomidorów (ROBERTS 1992). Okazuje się jednak, że klasyczne lub nawet bardziej udoskonalone techniki hodowlane nie umożliwiają przeniesienia tego genu do innych roślin uprawnych niż pomidor.

Różne geny zapewniające odporność na *H. schachtii* występują w trzech dzikich gatunkach rodzaju burak (*Beta*), lecz do tej pory nie udało się wyhodować odmiany uprawnej odpornej na mątwika burakowego i posiadającej jednocześnie zdolność do produkcji cukru w stopniu umożliwiającym jego opłacalną produkcję. Obecnie podjęto kolejne próby osiągnięcia tego celu poprzez hodowle linii translokacyjnych buraka cukrowego (trisomicznych krzyżówek buraka cukrowego z jego dzikim odpornym krewnym, które po *crossing-over* w mejozie mogą dać płodne diploidalne potomstwo posiadające już gen odporności w wymienionym odcinku genomowego DNA) noszących gen odporności przeniesiony z *B. procumbens*. Dla tych linii trwają już zaawansowane prace nad identyfikacją, mapowaniem i klonowaniem tego genu (JUNG i współaut. 1992).

Kilka dzikich podgatunków ziemniaka (*Solanum tuberosum*) posiada geny odporności na niektóre patotypy *Globodera rostochiensis* i *G. pallida*, podczas gdy inne patotypy nie wywołują reakcji obronnych rośliny. Skomplikowany skład genomu ziemniaka bardzo utrudnia mapowanie i klonowanie interesujących genów (PINEDA i współaut. 1993).

Trwają oczywiście poszukiwania innych genów warunkujących odporność na nicienie. Przykładem jest wyselekcjonowanie 12 różnych mutantów rzodkiewnika (*Arabidopsis*) oznaczonych jako *AMi* i posiadających częściową, lub całkowitą odporność na nicienie guzakowe lecz tylko częściową na mątwiki (NIEBEL i współaut. 1994). Z wyselekcjonowanych 12 mutantów większość wykazuje zaburzenia wzrostu i rozwoju, a co więcej, tylko jeden z nich okazał się być rzeczywiście odpornym w testach przeprowadzonych *in vitro*.

Żmudność metod klasycznych ilustruje fakt, że nad wprowadzeniem odporności na mątwika burakowego do buraka cukrowego pracuje się już od przeszło 80 lat i dopiero ostatnio osiągnięto to dzięki metodom biotechnologicznym. Wydaje się, że trudności związane z wprowadzeniem genów odporności do odmian uprawnych zostaną ostatecznie pokonane dopiero metodami inżynierii genetycznej w połączeniu z transformacją roślin. Aktualnie, przekazywanie obcego DNA za pośrednictwem *Agrobacterium tumefaciens* (por. przegląd GHEYSEN i współaut. 1992) jest techniką tak zaawansowaną, że tylko nieliczne rośliny nie dają się stransformować w ten sposób. Wtedy pozostają jeszcze do wykorzystania inne możliwości, jak na przykład mikrowstrzeliwanie DNA (porównaj artykuł *Genetyczna transformacja roślin* w tym zeszycie). Ponadto metody biotechnologiczne mogą być w przyszłości wykorzystane do modyfikowania i ulepszenia naturalnych genów odporności używając technik rekombinacji DNA.

Niezależnie od zastosowania genów odporności, rozwój pasożytniczego nicienia można przerwać w wielu miejscach jego cyklu rozwojowego, poczynając od uniemożliwienia mu opuszczenia osłonki jajowej, a na późnych, zaawansowanych stadiach rozwojowych kończąc. W dalszej części artykułu przedstawimy możliwe biotechnologiczne metody uzyskania odporności roślin, prowadzącej do przerwania rozwoju nicienia, w kolejności chronologicznej, w jakiej interferują one z ich cyklem życiowym.

OPUSZCZANIE OSŁONKI JAJOWEJ

Larwy niektórych gatunków matwików wymagają przed opuszczeniem osłonki jajowej pobudzenia pewnymi substancjami, pochodzącymi z wydzielin korzeniowych. Poprzez wprowadzenie zmian w metabolizmie korzenia, prowadzących do zmniejszenia ilości tych związków można, teoretycznie, uzyskać rośliny nie stymulujące larw nicienia do opuszczania jaj. Strategia ta ma jednak parę słabych punktów. W ogólnej populacji jaj pewna ich część rozwija się zawsze do stadium wędrownych larw infekcyjnych, opuszczających osłonkę jajową bez uprzedniej stymulacji wydzielinami korzeniowymi. Prowadzi to do szybkiego wyselekcjonowania nowej wirulentnej populacji nicienia i obejścia uzyskanej tą drogą odporności. Dodatkowo okazało się, że niezwykle trudno jest wyizolować czynnik aktywny, a nawet po dokonaniu tego może okazać się, że metabolizmu korzenia nie da się zmienić w takim stopniu, aby związek stymulujący był produkowany w ilościach nie powodujących pobudzenia jaj (SIJMONS i współaut. 1994b).

ROZPOZNANIE GOSPODARZA

Po opuszczeniu jaja wędrowna larwa drugiego stadium poszukuje potencjalnego gospodarza, kierując się do źródła substancji stymulujących (innych niż substancje indukujące opuszczenie jaja) czyli korzenia (CLEMENS 1994). Po dotarciu do niego larwa początkowo wędruje bardzo destrukcyjnie przez miękisz korowy aby, po dotarciu do walca osiowego, zmienić swoje zachowanie na znacznie bardziej subtelne. Świadczy to niewątpliwie o zdolności nicienia do rozpoznawania potrzebnych mu tkanek i komórek. Molekularny mechanizm tego procesu musi być podobny u wielu gatunków nicienia, gdyż potrafią one indukować organy odżywiające w korzeniach wielu gatunków roślin. Wprowadzenie zmian w metabolizmie korzenia może prowadzić do ograniczenia infekcji. Metoda ta posiada jednak takie same ograniczenia jak opisana poprzednio (SIJMONS i współaut. 1994b).

BIAŁKA TOKSYCZNE DLA NICIENI

Idea tej metody polega na wprowadzeniu do genomu rośliny genów kodujących białko toksyczne dla nicienia. Pobranie przez nicienia toksycznego białka produkowanego specyficznie tylko w organie odżywiającym, lub też konstytutywnie w całej roślinie, powinno prowadzić do jego śmierci lub przynajmniej zahamować i osłabić jego rozwój. Oczywiście białko to nie powinno być toksyczne dla rośliny. Kluczowym problemem było znalezienie substancji działającej wystarczająco silnie na nicienia. Pod uwagę brano egzotoksynę (substancję produ-

kowaną przez różne szczepy *Bacillus thuringiensis*), kolagenazę i inhibitor proteiny (SIJMONS i współaut. 1994a).

Do tej pory udało się już praktycznie stworzyć system funkcjonujący w oparciu o inhibitor trypsyny sklonowany z genomu wspięgi chińskiej (*Vigna sinensis*) (CPTI) i soi (ATKINSON i współaut. 1994). Obecność CPTI nie ma znaczącego wpływu na natężenie infekcji i wczesne stadia rozwoju syncytium, jak też nie powoduje przerwania lub opóźnienia rozwoju samców. Powoduje jednak zmniejszenie wielkości osobników obu płci i ponad dwukrotne zmniejszenie względnej liczby samic w stosunku do samców.

PRZECIWCIAŁA MONOKLONALNE PRZECIW WYDZIELINOM NICIENI

Fragmenty DNA kodujące sekwencje łańcuchów immunoglobulin specyficznie aktywnych wobec wydzielin nicienia można wprowadzić do genomu rośliny i wywołać ich ekspresję. Wydzieliny larw nicienia wstrzyknięte do wyselekcjonowanych przez nie komórek zostaną zneutralizowane przez obecne w ich cytoplazmie przeciwciała. Przeciwciała wiążą się z reguły z centrami aktywnymi enzymów, przeciw którym zostały wyprodukowane. Enzymy czy też inne związki stymulujące, zawarte w wydzielinach nicienia, po połączeniu z przeciwciałami nie będą już w stanie aktywnie oddziaływać na metabolizm komórek gospodarza i nie będzie możliwe tym samym zaindukowanie przez nicienia organu odżywiającego (SCHOTS i współaut. 1992). To podejście znalazło już praktyczną realizację w fitopatologii: w ten sposób wprowadzono gen odporności do roślin tytoniu warunkujący ich odporność na porażenie wirusami (TAVLADORAKI i współaut. 1993).

BIĄŁKA TOKSYCZNE WOBEC STRUKTURY ODŻYWIĄCEJ NICIENIA

Po zaindukowaniu organu odżywiającego dalszy rozwój larw nicienia osiadłych odbywa się kosztem asymilatów gospodarza pobieranych za pośrednictwem tego wysoce wyspecjalizowanego organu. Larwy nie mogą już nigdy więcej zmienić swego położenia, a nawet nie są w stanie zaindukować ponownie powstania nowego organu odżywiającego, jeżeli stary zostanie uszkodzony. Co więcej, od efektywności tego organu zależy przyszła płeć nicienia. Wszelkie zaburzenia lub ograniczenia w dopływie związków pokarmowych powodują tworzenie się mniejszej liczby samic. Tę zależność można wykorzystać do konstruowania roślin transgenicznych odpornych na nicienie. Jeśli taka roślina będzie syntetyzować jakąkolwiek toksynę niszczącą syncytium, spowoduje to zatrzymanie dopływu pokarmu i tym samym śmierć nicienia. Ważną zaletą takiego podejścia jest fakt, że ma ono charakter ogólny, redukuje niebezpieczeństwo specyficzności gatunkowej i pojawienia się mutantów odpornych. Głównym problemem jest jednak stworzenie mechanizmu specyficznego uruchamiającego produkcję toksyny w organie odżywiającym. Cała gama toksycznych genów jest znana i może być łatwo wykorzystana. Pod uwagę mogą być brane substancje, takie jak nukleazy, proteinazy, glukanazy, lipazy, czynniki transkrypcji, przeciwciała i toksyny. Najważniejszym problemem jest jednak takie zmodyfikowanie genomu rośliny, aby gen kodujący toksynę był aktywny tylko i wyłącznie w zaindukowanej komórce lub też aby był aktywny we wszystkich komórkach, ale jego produkt

był neutralizowany w komórkach nie porażonych przez patogena. W oparciu o tę koncepcję zaproponowano model dwukomponentowego systemu składającego się z dwóch różnych promotorów i dwóch genów (SIJMONS 1993).

Praktyczną realizację tego systemu można oprzeć, na przykład, na parze związków: barnaza-barstar. Barnaza jest rybonukleazą toksyczną dla komórek. Enzym ten pochodzi z bakterii *Bacillus amyloliquefaciens* i posiada swój wewnątrzkomórkowy inhibitor zwany barstar. Oba związki są małymi jednołańcuchowymi białkami, które reagują ze sobą w proporcji 1:1, przez co barnaza ulega rozcięciu i dezaktywacji (HARTLEY 1988, 1989). Gen kodujący barnazę jest przyłączony do promotora o słabej ekspresji w normalnych tkankach rośliny, ale silnie aktywnego w organie odżywiającym nicienia. Natomiast gen kodujący sekwencję barstar jest pod kontrolą promotora konstytutywnie aktywnego w całej roślinie, ale blokowanego w organie odżywiającym nicienia (np. *CaMV 35S*). Po wprowadzeniu całego systemu do genomu rośliny w normalnych warunkach mamy więc następującą sytuację: barnaza jest produkowana w małych ilościach, gdyż jej promotor jest mało aktywny, i jest natychmiast blokowana przez barstar produkowany obficie, gdyż jego gen jest połączony z wysoce aktywnym promotorem. Sytuacja zmienia się, gdy dojdzie do zaindukowania przez nicienia organu odżywiającego. Jak wcześniej wspomniano, promotor białka barstar jest blokowany w organach odżywiających nicienie, dlatego też inhibitor ten nie jest dłużej produkowany w tych komórkach. Jako białko wewnątrzkomórkowe nie jest też wydzielany przez komórki sąsiednie i eksportowany do komórek wyselekcjonowanych przez nicienie. Natomiast barnaza, której gen jest połączony z promotorem nie ulegającym zablokowaniu przez nicienie, lub nawet przez nie aktywowanym, jest produkowana dalej. Po wyczerpaniu się zapasów inhibitora, w ciągu krótkiego czasu nagromadzają się duże ilości barnazy, co doprowadza do śmierci komórki inicjalnej organu odżywiającego. Dodatkową zaletą tego systemu jest brak konieczności użycia specyficznego promotora. Każdy przypadkowy wzrost ekspresji genu toksycznego poza strukturą odżywiającą będzie natychmiast neutralizowany przez barstar. Tylko tam, gdzie nastąpi zahamowanie aktywności genu neutralizującego, czyli w zaindukowanym organie odżywiającym nicienia, dojdzie do ujawnienia się efektu genu toksycznego (SIJMONS 1993).

FEROMONY

Samce poszukując i wędrując do samic są przywabiane feromonami płciowymi wytwarzanymi przez samice. Ich skład nie jest niestety do tej pory znany.

Istnieje kilka możliwości zakłócenia tego procesu. Można wprowadzić do genomu rośliny geny produkujące feromony nicieni w dużych ilościach i poprzez to swego rodzaju zagłuszenie uniemożliwić samcom określenie kierunku, z którego dochodzi sygnał chemiczny, lub też wprowadzić geny substancji szybko dezaktywizujących feromony nicieni. Inną metodą może być wprowadzenie zmian w metabolizmie roślin, uniemożliwiających im produkcję endogennych prekursorów ewentualnie potrzebnych nicieniowi do produkcji feromonów. Te metody są jednak całkowicie hipotetyczne i prawdopodobnie nigdy nie wyjdą poza stadium możliwości teoretycznych.

BIOTECHNOLOGICAL METHODS OF INTRODUCING RESISTANCE TO NEMATODA IN PLANTS

Summary

The parasites nematoda cause large losses in plant crops, therefore search is continued for new, more efficient and less toxic for the environment methods of crop protection against those parasites. To understand the mechanism of resistance to nematoda it is indispensable to know their life cycle, as well as structure and function of the induced by nematoda in plant tissues, i.e. syncytia and giant cells. Their description is followed by discussion of changes in gene expression of the host plant, occurring in response to the pathogen attack. This forms the background for presentation of recent achievements of biotechnology in search for nematoda resistance.

LITERATURA

- ATKINSON H. J., BLUNDY K. S., CLARKE M. C., HANSEN E., HARPER G., KORITSAS V., MCPHERSON M., O'REILLY D., TURNBULL S. R., URWIN P. E., 1994. *Novel plant defences against nematodes*. [W:] *Advances in Molecular Plant Nematology* LAMBERTI F., De GIORGI C., McK. BIRD D. (red.). Plenum Press New York, 197-210.
- BLEVE-ZACHEO T., ZACHEO G., 1987. *Cytological studies of the susceptible reaction of sugarbeet roots to Heterodera schachtii*. *Physiol. Mol. Pl. Pathol.* 30, 13-25.
- BURROWS P. R., 1992. *Molecular analysis of the infection between cyst nematodes and their hosts*. *J. Nematol.* 24, 338-342.
- BURROWS P. R., KERRY B. R., PERRY R. N., 1994. *New approaches to plant-parasitic nematode control*. *J. Zool. Lond.* 232, 341-346.
- CHITWOOD D. J., LUSBY W. R., 1991. *Metabolism of plant sterols by nematodes*. *Lipids* 26, 619-627.
- CLEMENS C. -D., 1994. *Partielle Charakterisierung und Bedeutung von Wirtswurzelexudaten für das präinfektionelle Verhalten der L2-Larven des Rübenzystennematoden Heterodera schachtii* SCHMIDT. *Praca Doktorska, University of Kiel*, 131.
- CRAMER C. L., 1992. *Regulation of defence-related gene expression during plant-pathogen interaction*. *J. Nematol.* 24, 586-587.
- DESPOMMIER D. D., 1990. *Trichinella spiralis: a worm that would be virus*. *Parasitol. Today* 6, 193-196.
- ENDO B. Y., 1975. *Pathogenesis of nematode-infected plants*. *Ann. Rev. Phytopathol.* 13, 213-238.
- GHEYSEN G., ANGENON G., Van MONTAGU M., 1992. *Transgenic plants: Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation and its use for crop improvement*. [W:] J. A. H. Murray (red.) John Wiley and Sons, Chichester, 187-232.
- GHEYSEN G., Van MONTAGU M., 1995. *Plant/nematode interactions, a molecular biologist's approach*. *Nematologica* 41, 366-384.
- GODDIJN O. J. M., LINDSEY K., van der LEE F. M., Klap J. C., Sijmons P. C., 1993. *Differential gene expression in nematode-induced feeding structures of transgenic plants harbouring promoter-gusA fusion constructs*. *Plant J.* 4, 863-873.
- GOLINOWSKI W., MAGNUSON C., 1991. *Tissue response induced by Heterodera schachtii (Nematoda) in susceptible and resistant white mustard cultivars*. *Can. J. Bot.* 69, 52-62.
- GRUNDLER F. M. W., 1989. *Untersuchungen zur Geschlechtsdetermination des Rübenzystennematoden Heterodera schachtii* SCHMIDT, *Praca Doktorska, University of Kiel*, 125.
- GRUNDLER F. M. W., BÖCKENHOFF A., SCHMIDT K.-P., SOBczak M., GOLINOWSKI W., Wyss U., 1994. *Arabidopsis thaliana and Heterodera schachtii, a versatile model to characterize the interaction between host plants and cyst nematodes*. [W:] *Advances in Molecular Plant Nematology* LAMBERTI F., De GIORGI C., McK. BIRD D., (red.). Plenum Press New York, 171-180.
- GRYMASZEWSKA G., GOLINOWSKI W., 1991. *Structure of syncytia induced by Heterodera avenae Woll. in roots of susceptible and resistant wheat (Triticum aestivum L.)*. *J. Phytopathol.* 133, 307-319.
- HAMMOND-KOSACK K. E., ATKINSON H. J., BOWLES D. J., 1990. *Changes in abundance of translatable mRNA species in potato roots and leaves following root invasion by cyst-nematode Globodera rostochiensis pathotypes*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 37, 339-354.

- HARTLEY R. W., 1988. *Barnase and barstar. Expression of its cloned inhibitor permits expression of a cloned ribonuclease.* J. Mol. Biol. 202, 913-915.
- HARTLEY R. W., 1989. *Barnase and barstar: two small proteins to fold and fit together.* TIBS 14, 450-454.
- JEFFERSON R.A., KAVANAGH T. A., BEVAN M.W., 1987. *GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants.* EMBO J. 6, 3901-3907.
- JONES M. G. K., 1981. *Host cell responses to endoparasitic nematode attack: Structure and function of giant cells and syncytia.* Ann. appl. Biol. 97, 353-372.
- JONES M. G. K., NORTHCOTE D. H., 1972. *Nematode-induced syncytium-a multinucleate transfer cell.* J. Cell Sci. 10, 789-809.
- JUNG C., KOCH R., FISCHER F., BRANDES A., WRICKE G., HERRMANN R.G 1992. *DNA markers closely linked to nematode resistance genes in sugar beet (*Beta vulgaris* L.) mapped using chromosome addition and translocations originating from wild beets of the Procumbentes section.* Mol. Gen. Genet. 232, 271-278.
- KERTBUNDIT S., DE GREVE H., DEBOECK F., VAN MONTAGU M., HERNALSTEENS J.-P., 1991. *In vivo random β -glucuronidase gene fusion in *Arabidopsis thaliana*.* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88; 5212-5216.
- LEE D. L., KO R. C., YI X. Y., YEUNG M. H. F., 1991. *Trichinella spiralis: antigenic epitopes for the stichocytes detected in the hypertrophic nuclei and cytoplasm of the parasitized muscle fibre (nurse cell) of the host.* Parasitology 102, 117-123.
- MAGNUSSON C., GOLINOWSKI W., 1991. *Ultrastructural relationship of the developing syncytium induced by *Heterodera schachtii* (Nematoda) in root tissue of rape.* Can. J. Bot. 69, 44-52.
- MUGNIERY D., FAYET G., 1981. *Determination du sexe chez *Globodera pallida* Stone.* Rev. Nematol. 4, 41-45.
- MÜLLER J., 1989. *Zur Definition von Resistenz und andere Fachbegriffe in der Nematologie.* Nachrichtenbl. Deut. Pflanzenschutzd. 41, 137-139.
- NIEBEL A., BARTHELNS N., DE ALMEIDA-ENGLER J., KARIMI M., VERCAUTEREN I., VAN MONTAGU M., GHEYSEN G., 1994. *Arabidopsis thaliana as a model host plant to study molecular interactions with root-knot and cyst nematodes.* [W:] *Advances in Molecular Plant Nematology.* LAMBERTI F., DE GIORGI C., McK. BIRD D. (red.). Plenum Press New York, 161-170.
- NIEBEL A., HEUNGENS K., BARTHELNS N., INZ D., VAN MONTAGU M., GHEYSEN G., 1995. *Characterization of the pathogen-induced potato catalase and its systemic expression upon nematode and bacterial infection.* Mol. Plant-Microbe Interact. (w druku).
- OPPERMAN C. H., TAYLOR C. G., CONKLING M. A., 1994. *Root knot nematode direct expression of plant root specific gene.* Science 263, 221-223.
- PINEDA O., BONIERBALE M., PLAISTED R., BRODIE R. L., BRODIE B., TANKSLEY S. T., 1993. *Identification of RFLP markers linked to the H1 gene conferring resistance to the potato cyst nematode *Globodera rostochiensis*.* Genome 36, 152-156.
- POZIO E., BRUSCHI F., 1994. *Updating on Trinellois.* Parasitology Today 18, 288-293.
- RASKI D. J., 1950. *The life history and morphology of the sugarbeet nematode *Heterodera schachtii** SCHMIDT. Phytopathology 40, 135-150.
- ROBERTS P.A., 1992. *Current status of the availability, development, and use of host plant resistance to nematodes.* J. Nematol. 24, 213-227.
- SASSER J. N., FRECKMAN D. W., 1987. *A world perspective on Nematology: the role of the Society.* [W:] *Vistas on Nematology* J. A. Veech, D. W. Dickson (red.). Society of Nematologists Hyattsville, 7-14.
- SCHMIDT K.-P., 1995. *Proteinanalytische Charakterisierung pathogenesespezifischer Vorgänge im Wurzelgewebe von *Arabidopsis thaliana* nach Infektion mit dem Rübenzystennematoden *Heterodera schachtii*.* Praca doktorska, University of Kiel, 166.
- SCHOTS A., DE BOER J., SCHOUTEN A., ROOSIEN J., ZILVERENTANT J. F., POMP H., BOUWMAN-SMITS L., OVERMARS H., GOMMERS F. J., VISSER B., STIEKEMA W. J., BAKKER J., 1992. *"Antibodies": a flexible approach to design resistance against pathogens.* Neth. J. Plant Pathol. 98, 183-191.
- SIJMONS P. C., 1993. *Plant nematode interactions.* Plant Mol. Biol. 23, 917-931.
- SIJMONS P. C., ATKINSON H. J., WYSS U., 1994a. *Parasitic strategies of root nematodes and associated host cell responses.* Ann. Rev. Phytopathol. 32, 235-259.
- SIJMONS P. C., GRUNDLER F. M. W., VON MENDE N., BURROWS P. R., WYSS U., 1991. *Arabidopsis thaliana as a new model host for plant-parasitic nematodes.* Plant J. 1, 245-254.
- SIJMONS P. C., VON MENDE N., GRUNDLER F. M. W., 1994b. *Plant-parasitic nematodes.* [W:] *Arabidopsis MEYEROWITZ E. M., SOMERVILLE C. R. (red.). Cold Spring Harbour Laboratory Press New York, 749-768.*

- TAVLADORAKI P., BENVENUTO E., TRINCA S., DE MARTINIS D., CATTANEO A., GALEFFI P., 1993. *Transgenic plants expressing a functional single-chain F_ν antibody are specifically protected from virus attack*. Nature 366, 469-472.
- TAYLOR C. G., SONG W., OPPERMAN C. H., CONKLING M. A., 1992. *Characterization of the nematode-responsive plant gene promoter*. J. Nematol. 24, 621.
- TRIANANTAPHYLLOU A. C., HIRSCHMANN H., 1980. *Cytogenetics and morphology in relation to evolution and speciation of plant-parasitic nematodes*. Ann. Rev. Phytopathol. 18, 333-359.
- Van der EYCKEN W., NIEBEL A., INZÈ D., Van MONTAGU M., GHEYSEN G., 1992. *Molecular analysis of the interaction between Meloidogyne incognita and tomato*. Nematologica 38, 441.
- Van der EYCKEN W., de ALMEIDA-ENGLER J., GHEYSEN G., Van MONTAGU M., 1994. *Molecular study of the compatible interaction: Meloidogyne incognita-tomato*. Nematologica 41, 350.
- WEISSENBORN D. L., ZHANG X., EISENBACK J. D., RADIN D. N., CRAMER C. L., 1994. *Induction of the tomato hmg2 gene in response to endoparasitic nematodes*. The 4th International Congress of Plant Molecular Biology, 19-24. 06., 1994, Amsterdam, Holandia, 1744, 1994.
- WYSS U., 1992. *Observations on the feeding behaviour of Heterodera schachtii throughout development, including events during moulting*. Fundam. appl. Nematol. 15, 75-89.
- WYSS U., GRUNDLER F. M. W., 1992. *Seminar: Heterodera schachtii and Arabidopsis thaliana, a model host-parasite interaction*. Nematologica 38, 488-493.
- WYSS U., GRUNDLER F. M. W., MÜNCH A., 1992. *The parasitic behaviour of second stage juveniles of Meloidogyne incognita in roots of Arabidopsis thaliana*. Nematologica 38, 98-111.
- WYSS U., STENDER C., LEHMANN H., 1984. *Ultrastructure of feeding sites of the cyst nematode Heterodera schachtii SCHMIDT in roots of susceptible and resistant Raphanus sativus L. var. oleiformis Pers. cultivars*. Physiol. Plant Pathol. 5, 21-37.

STEFAN MALEPSZY

Katedra Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin
Szkola Główna Gospodarstwa Wiejskiego
Nowoursynowska 166, 02-787 Warszawa

ROŚLINY TRANSGENICZNE W UPRAWIE POLOWEJ I HODOWLI ROŚLIN

WSTĘP

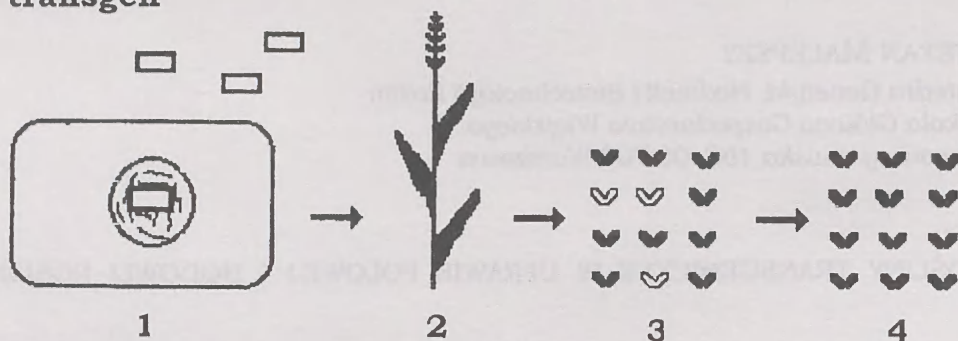
Roślina transgeniczna jest organizmem powstałym z takiej komórki, która włączyła do swego genomu fragment DNA skonstruowany za pomocą inżynierii genetycznej. Fragment ten może zawierać dowolną informację i może zostać włączony w prawie każdym miejscu genomu. W przenoszonych fragmentach mogą się znajdować różne geny i zazwyczaj są to jeden lub dwa geny markerowe oraz „właściwy gen”, od którego oczekuje się, że spowoduje zmianę określonej właściwości organizmu transgenicznego. „Właściwy gen” jest nazywany transgenem i zwykle nie ma w genomie swojego odpowiednika w postaci allelu. W takiej sytuacji roślina transgeniczna zawiera w genomie unikalny (nie występujący w innym miejscu) fragment i jest heterozygotą. Oznacza to, że w jej potomstwie, powstałym po samozapyleniu, będą segregowały rośliny z nową cechą uwarunkowaną transgenem oraz rośliny o fenotypie dzikim (nie zmienione). Wśród roślin z nową cechą będą homo- i heterozygoty. Sposób przekazywania i stosunki rozszczepień powinny być zgodne z prawami Mendla. Tak więc każda roślina transgeniczna powstała z transformowanej komórki daje niejednolite potomstwo i dopiero w wyniku samozapylenia można uzyskać nierozszczepiające się pokolenie zwane ustaloną linią transgeniczną (rys. 1).

Do powstania rośliny z transgenicznej komórki są potrzebne specyficzne warunki nazywane kulturą *in vitro* i umożliwiające regenerację. Rośliny powstałe w wyniku regeneracji mogą wykazywać różne zmienione właściwości (w pokoleniu R_0 i R_1) co nazwano zmiennością somaklonalną (LARKIN i SCOWCROFT 1981). Właściwości te są zazwyczaj trwale dziedziczone w kolejnych pokoleniach. Oznacza to, że w stosowanej metodyce uzyskiwania roślin transgenicznych obok nowych cech spowodowanych działaniem transgeny mogą występować inne zmienione cechy będące efektem somaklonalnej zmienności.

Rośliny transgeniczne są wytwarzane głównie z myślą o ulepszeniu roślin uprawnych lub powstaniu nowego sposobu ich użytkowania. Właściwości tych roślin należy więc ostatecznie sprawdzić w typowych warunkach uprawy, czyli w polu. Sprawdzenie odbywa się stopniowo, najpierw w szklarniach z odpowied-

nimi zabezpieczeniami, ostatecznie w otwartym polu. Na te ostatnie są wymagane specjalne zezwolenia, wydawane przez odpowiedni urząd.

transgen



Rys. 1. Schemat uzyskiwania linii transgenicznych.

1. Komórka włączyła do swojego genomu transgen. 2. Z transgenicznej komórki powstała transgeniczna roślina pokolenia T₀. 3. Powstałe pokolenie T₁ segreguje mendelowsko na typ dziki i wywołany transgenem nowy fenotyp. 4. Samozapylone rośliny T₁ o nowym fenotypie dają potomstwa rozszczepiające się lub jednolite — te ostatnie pochodzą z homozygoty i są ustaloną linią transgeniczną.

Wraz z pojawieniem się organizmów transgenicznych powstały również wątpliwości co do ich wprowadzenia do środowiska naturalnego i pojawił się termin bezpieczeństwo biologiczne (biosafety). W prawodawstwie większości państw wysokorozwiniętych wprowadzono szczegółowe przepisy ustalające warunki, jakie należy spełnić w pracy z organizmami transgenicznymi, w tym również podczas sprawdzania ich właściwości w warunkach uprawy polowej (CHMIEL 1993, UNIDO 1995). W niektórych państwach, na przykład RFN, przepisy te były początkowo bardzo restrykcyjne. Wszystko to spowodowało, że doświadczenia nad zachowaniem się roślin transgenicznych w uprawie polowej zostały podjęte z pewnym opóźnieniem, a i ich intensywność była i jest ograniczona.

DOŚWIADCZENIA POLOWE Z ROŚLINAMI TRANSGENICZNYMI PRZEPROWADZONE W EUROPIE

W Europie pierwsze zezwolenia na doświadczenia wydano w 1988 roku. Od tego czasu wydano ich prawie 550 (tab. 1 i 2), największą liczbę we Francji, Wielkiej Brytanii, Belgii, Włoszech i Holandii. Zezwolenia dotyczyły 21 gatunków roślin, ale największą ich liczbę wydano dla czterech gatunków o dużym znaczeniu gospodarczym: dla rzepaku, kukurydzy, buraka cukrowego i ziemniaka (tab. 2). Nowe właściwości, którymi charakteryzowały się transgeniczne rośliny, dotyczyły przede wszystkim tolerancji na herbicydy (około 90% przypadków), odporności na choroby wirusowe, zwiększonej zawartości skrobi oraz zmienionej barwy kwiatów. W nomenklaturze dotyczącej transgenicznych roślin występują

oznaczenia pokoleń literą T z dodatkiem określonej cyfry. Ta ostatnia mówi o tym, że mamy do czynienia z pokoleniem zregenerowanym z transformowanych komórek (T₀) lub pokoleniem powstałym z samozapylenia tych roślin (T₁). Kolejne cyfry oznaczają kolejne samozapylenia.

Tabela 1

Liczba zezwoleń wydanych w Unii Europejskiej na prowadzenie doświadczeń polowych z transgenicznymi roślinami różnych gatunków (wg NEUROTH i współaut. 1995)

Gatunek	Liczba zezwoleń
<i>Brassica napus</i>	134
<i>Zea mays</i>	109
<i>Beta vulgaris</i>	66
<i>Solanum tuberosum</i>	60
<i>Cichorium intybus</i>	35
<i>Lycopersicon esculentum</i>	35
<i>Nicotiana tabacum</i>	26
<i>Triticum aestivum</i>	4
<i>Populus</i>	4
<i>Helianthus annuus</i>	4
<i>Glycine max</i>	4
<i>Brassica oleracea</i>	4
<i>Eucalyptus grandis</i>	3
<i>Cucumis melo</i>	3
<i>Medicago sativa</i>	2
<i>Vitis</i> ssp.	1
<i>Fragaria</i> ssp.	1
<i>Dianthus caryophyllus</i> var. <i>napobrassica</i>	1
<i>Dendranthema grandiflora</i>	1
<i>Daucus carota</i>	1
<i>Brassica napus</i> var. <i>napobrassica</i>	1

W Polsce doświadczenia polowe z roślinami transgenicznymi rozpoczną się najprawdopodobniej w bieżącym roku i będą dotyczyły ziemniaków i pszenżyta. Dotychczas w szklarniach badano rośliny transgeniczne tych dwóch gatunków oraz tytoniu, rzepaku, ziemniaka, kukurydzy i ogórka. Zaawansowane są prace nad śliwą. Oto instytucje, w których prace te są realizowane: Instytut Biochemii i Biofizyki PAN w Warszawie, Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin w Radzikowie, Instytut Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu, Instytut Genetyki Roślin PAN w Poznaniu, Uniwersytet im. A. Mickiewicza w Poznaniu, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie.

Tabela 2

Liczba zezwoleń wydanych w państwach Unii Europejskiej na doświadczenia polowe z roślinami transgenicznymi (wg NEUROTH i współaut. 1995)

Państwo	Liczba zezwoleń
Portugalia	5
Szwecja	10
Dania	14
Hiszpania	24
Niemcy	24
Holandia	62
Włochy	65
Belgia	76
Wielka Brytania	91
Francja	162

TRANSGENICZNE PETUNIE W UPRAWIE POLOWEJ (HANISCH 1992)

Polowe doświadczenia z petuniami zostały przeprowadzone w 1990 i 1991 roku w Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung w Kolonii. Jest to jeden z najbardziej zaawansowanych ośrodków w pracach nad genetyką molekularną roślin. Dzięki doświadczeniom nad transgenicznymi petuniami niezamierzenie uzyskano dane o regulacji ekspresji genów, czyli mechanizmach kierujących aktywacją genu. Poniżej zostanie przedstawione, jak do tego doszło.

Zamierzeniem autorów była identyfikacja i izolacja elementów transpozycyjnych u petunii. Chcieli to osiągnąć przez wprowadzenie genu *A1* o znanej sekwencji i funkcji z kukurydzy i obserwację barwy kwiatów u petunii. Gen *A1* odpowiada za syntezę reduktazy dihydroflawonowej (DFR). Ze specyficznego substratu wytwarza ona leukopelargonidynę przekształcaną, przez kolejne enzymy znajdujące się w komórkach petunii, w łososiowy barwnik zwany pelargonidyną. Gen *A1* wprowadzony do petunii o kwiatach białych spowodował zmianę barwy na łososiowo-czerwoną. Z roślin T_0 uzyskano w szklarni linię ustaloną a następnie skrzyżowano z linią o białych kwiatach — uzyskując jednolite łososiowoczerwone, heterozygotyczne pokolenie. Postępowanie takie było niezbędne ze względu na chęć zajęcia się transpozonomi. Doświadczenie przeprowadzono w 1990 roku na 30 800 roślinach. Uczni zakładali, że istniejący u petunii transpozony przeniesie się w niektórych przypadkach do genu *A1* powodując jego inaktywację. Powinno się to ujawnić zmianą barwy kwiatów z łososiowoczerwonej na białą lub plamkowaną.

W pierwszym okresie wzrostu roślin w polu stwierdzono, że 8% roślin wykazywało zmniejszoną ekspresję genu barwy (słaba intensywność barwy), 0,2% miało oczekiwane kwiaty plamkowane lub białe a 91,8% było barwy intensywnie łososiowoczerwonej. Później zadziałały bardzo wysokie temperatury (do 36°C) i silne światło (o intensywności ponad 500 W/m²), co spowodowało

wyblaknięcie wszystkich kwiatów. W drugim okresie, kiedy powstały świeże kwiaty, tylko 37% roślin (zamiast poprzednich 91,8%) wykazywało łososiowoczerwoną barwę kwiatów. Nie było już kwiatów białych i plamkowanych, a najczęściej było o słabej barwie łososiowoczerwonej. Z grupy roślin o kwiatach silnie łososiowoczerwonych w pierwszym i słabo łososiowoczerwonych w drugim okresie wysiano nasiona. Okazało się, że rośliny z nasion pochodzących z I okresu miały kwiaty o intensywnej barwie łososiowoczerwonej, a z drugiego o słabej. Sugerowało to, że istnieje coś w rodzaju pamięci o warunkach wzrostu, w jakich gen działał i odpowiedniej modyfikacji jego ekspresji. Dokładniejsze badania molekularne wykazały, że przyczyną redukcji w ekspresji genu *A1* była metylacja promotora. Ekstremalne warunki wzrostu zwiększyły ją, co utrudniało odczytanie genu *A1* i w ten sposób zmniejszało ilość barwnika.

Dalej analizowano grupę roślin powstałych z nasion wytworzonych na roślinach o kwiatach białych i plamkowanych w I okresie. Okazało się, że przyczyną takich kwiatów nie była transpozycja, tylko pełna metylacja promotora genu *A1*. Wydaje się, że system metylacji jest instrumentem, którym roślina posługuje się w tym celu, aby stosownie do warunków wzrostu nadać transgenowi odpowiednią aktywność. Wyniki tych badań postawiły wiele nowych pytań dotyczących organizmów transgenicznych, które nauka podjęła.

DOŚWIADCZENIA POŁOWE Z ZIEMNIAKAMI ODPORNymi NA WIRUSY

KANIEWSKI i współpracownicy (1990) przeprowadzili analizę wzrostu roślin, plonu bulw i odporności na wirus PVX i PVY u kilku klonów ziemniaka (pokolenie T_0) powstałych w wyniku wprowadzenia genów białka płaszczka obu wirusów. Ekspresja wprowadzonych genów, mierzona średnią zawartością białka ogólnego, była bardzo zróżnicowana (tab. 3). Podobne zróżnicowanie dotyczyło procentowego udziału roślin zawierających wirusa po inokulacji (tab. 4). Tylko jeden

Tabela 3

Analiza testem ELISA poziomu PVX CP w transgenicznych roślinach ziemniaka zawierających chimeralny gen kodujący CP z PVX i PVY (KANIEWSKI i współaut. 1990)

Klon	Średnia (ng/mg białka ogólnego)
362	10,0 ± 6,6 a
108	10,1 ± 8,5 a
204	1,3 ± 0,9 b
303	0,5 ± 0,6 c

z klonów (303), który wykazywał najniższą ekspresję genów białek płaszczka (na poziomie białka) był praktycznie całkowicie wolny od wirusów. U pozostałych klonów wartości te kształtowały się bardzo różnie. Powyższe obserwacje znalazły pełne potwierdzenie w wysokości plonu bulw. Tylko klon 303 nie reagował obniżeniem plonu (tab. 5). Doświadczenie to zwróciło uwagę na dwie ważne sprawy. Po pierwsze, że poszczególne klony różnią się ekspresją na poszczegól-

nych etapach wyrażania się transgeny i po drugie, że nie ma prostej relacji pomiędzy intensywnością ekspresji transgeny a odpornością i będącej jej wynikiem wysokości plonu.

Tabela 4

Obecność infekcji PVX i/lub PVY określana testem ELISA po 16 tygodniach od inokulacji (wg KANIEWSKI i współaut. 1990).

Klon	Procent zainfekowanych roślin			
	PVX	PVY	PVH i PVY	PVX i/LUB PVY
RB i D	54,3 a	61,6 a	36,7 a	79,3 a
303	6,0 c	2,0 b	0,0 b	8,0 b
204	31,0 ab	80,8 a	27,8 a	84,0 a
362	10,0 bc	87,0 a	10,0 ab	87,0 a
108	29,2 ab	88,5 a	26,9 a	91,0 a

Wartości oznaczone tymi samymi literami nie różnią się istotnie w obrębie tej samej kolumny. Analizowano około 100 roślin.

Tabela 5

Porównanie plonu bulw z inokulowanych i nieinokulowanych roślin ziemniaka (wg KANIEWSKI i współaut. 1990).

Klon	Nieinokulowane (kg)	Inokulowane (kg)	Spadek plonu (%)
RB i D	14,6 ± 3,9	10,5 ± 1,8	28
362	17,1 ± 3,6	9,0 ± 1,4	47,4
108	14,6 ± 0,9	4,3 ± 5,3	63,7
204	14,2 ± 2,1	7,8 ± 3,3	45,1
303	14,8 ± 4,0	14,5 ± 1,3	-

*Plon z tych samych poletek różnił się istotnie od nieinokulowanych poletek tego samego klonu ($P < 0,05$). Wszystkie klony (poza RB i D) — ekspresja CP z PVX i PVY.

Kolejnym zagadnieniem jest pytanie, czy rośliny transgeniczne z wprowadzonym jednym lub kilkoma nowymi genami mają nową(e) cechę(y) będącą efektem działania tychże genów, czy też pojawiają się zmiany również innych właściwości oraz jak wygląda plonowanie na tle najlepszych odmian. Odpowiednie wyniki uzyskali między innymi uczeni holenderscy (JONGENDIJK i współaut. 1992). W tabeli 6 przedstawiono odporności roślin transgenicznych dwóch odmian ziemniaka na tle odmian wyjściowych i innych odpornych na ten sam czynnik (wirus PVX). Z analizy danych wynika, że: (1) klony transgeniczne odmiany Eskort są odporniejsze niż odmiany Bintje, (2) odmiany, których odporność nie jest wynikiem obecności transgeny tylko naturalnych genów odporności, mogą być nawet bardziej odporne od transgenicznych. W tabeli 7 przedstawiono dane dotyczące trwałości cech odmianowych u 61 transgenicznych klonów dwóch odmian — Bintje i Eskort. Okazuje się, że: (1) istnieje wpływ odmiany na trwałość określonej grupy cech (np. Eskort — brak zmian kielków i dwukrotnie mniej klonów o niższym plonie), (2) liczba klonów z dodatkowymi zmianami może być znaczna i dochodzić do 41%, zwykle wynosi jednak około kilkanaście procent. JONGENDIJK i współpracownicy (1992) podają również, że u odmiany Eskort 80%

klonów nie miało zmienionych cech odmianowych, a u Bintje niecałe 20%. Jednocześnie u tej ostatniej prawie 50% klonów miało zmienione 1–5 cech a u Eskort takich roślin w ogóle nie było. Maksymalna liczba cech zmienionych w jednym klonie wynosiła ponad 15 i było to około 10% klonów u każdej z odmian.

Tabela 6

Udział roślin zainfekowanych PVX w potomstwach klonalnych transgenicznych klonów odmiany Bintje (MGB) i Eskort (MGE) oraz nietransformowanych odmian standardowych (wg JONGENDIJK i współaut. 1992)

Odmiana	Procent zainfekowanego potomstwa średnia ^a	Wg listy odmian ^b	Ekspresja CP PVX		
			0,0–0,1	0,1–0,2	0,2–0,3
MGB 26	41,7 a	5	+		
Bintje	38,5 ab	5			
Eskort	36,5 abc	5			
Estina	27,1 abcd	6			
MGE-04	22,9 abcde	6–7	+		+
MGB-66	16,7 cdef	7–8			
MGE-08	12,5 def	8–9			+
B-44	10,4 def	8–9			+
B-18	8,3 def	8–9			+
B-28	6,3 def	8–9			+
B-13	6,3 def	8–9		+	
E-21	4,2 ef	8–9			+
E-13	2,1 ef	9			+
Elles	2,1 ef	9			
MGE-44	0,0 f	R		+	
E-32	0,0 f	R			+
Bildstar	0,0 f	R			
Sante	0,0 f	R			

^a — różne litery oznaczają różnice ($\alpha = 0.05$ Duncan's multiple range test)

^b — PVX (szczep X³), wynik odporności stosownie do listy odmian holenderskich: 5–9 bardzo wrażliwe — bardzo odporne,

R — odporne w polu (immunia).

^c — % ogólnego białka rozpuszczalnego, dane z doświadczeń w komorach, stosownie do HOEKEMA i współaut. 1989.

Przedstawione powyżej przykłady nie wyczerpują wszystkich zagadnień wynikłych z przeprowadzonych doświadczeń polowych oraz wprowadzania na rynek produktów będących wynikiem stosowania inżynierii genetycznej. Kolejną jest akceptacja społeczna. Nawet w społeczeństwie amerykańskim powstała silna presja na specjalne oznakowanie produktów spożywczych będących efektem inżynierii genetycznej. Na przykład, firma Colgene z USA wprowadziła do sprzedaży genetycznie zmienioną odmianę pomidora Flavr-Savr, zawierającą w transgenie oprócz genu użytecznego, także gen odporności na antybiotyki i promotor wirusa CaMV. Genem użytecznym była antysensowa kopia genu

poligalakturyazy, którego aktywność katalityczna polega na trawieniu pektyny odpowiedzialnej za twardość owoców. Zablokowanie aktywności tego genu przez antysensowy oligomer powoduje zmniejszenie produkcji enzymu, a w konsekwencji istotne spowolnienie mięknięcia owocu, co przedłuża dojrzewanie i ułatwia transport oraz przechowywanie. Dojrzały pomidor pozostaje twardy przez

Tabela 7

Przetrawanie niektórych cech odmianowych w wyniku zmian pod wpływem inżynierii genetycznej (wg JONGENDIJK i współaut. 1992, nieco zmodyfikowane), 61 niezależnych klonów MGB i MGE.

Cecha odmiany	Transgeniczne klony z Bintje Różniące się (%)	Transgeniczne klony z Eskort Różniące się (%)	Różniące się (ogółem %)
Kiełki			
Ogólny kształt	10,3	0,0	6,6
Intensywność podstawowego zabarwienia	20,5	0,0	13,1
Długość bocznych pędów	25,6	0,0	16,4
Roślina			
Wysokość	30,8	9,1	23,0
Typ rośliny	17,9	0,0	11,5
Typ wzrostu	12,8	18,2	14,8
Grubość pędu	12,8	13,6	13,1
Kolor pędu	12,8	18,2	14,8
Ogólna wielkość liści	25,6	18,2	32,0
Złączenie listków	15,4	0,0	9,8
Intensywność barwy zielonej	10,3	18,2	13,1
Falowanie brzegu liścia	15,4	4,5	11,5
Kwiat			
Wielkość kwiatostanu	5,1	9,1	6,6
Wielkość korony	2,6	9,1	4,9
Zabarwienie pąka	5,1	0,0	5,1
Kłębry			
Kształt	17,9	4,5	13,1
Głębokość oczka	0,0	9,1	3,3
Gładkość skórki	0,0	4,5	1,6
Ogólny plon	41,0	18,2	32,8

około 10 dni dłużej niż normalny. Ekonomiści amerykańscy oszacowali, że na rynku Ameryki Północnej powinno to dawać kilkanaście miliardów dolarów zysku rocznie. Amerykańska Agencja ds Żywności i Leków (FDA) w sierpniu 1994 roku zezwoliła na komercję pomidorów Flave-Savr mimo znacznych oporów konsumenckich. Jednym z głównych zastrzeżeń tych ostatnich było: czy gen oporności na neomycynę (NPT II) występujący w takim pomidorze nie zrekombinuje z bakteriami przewodu pokarmowego oraz czy promotor CaMV 35S nie

uaktywni się w innej odmianie (w wyniku przypadkowego przekrzyżowania) powodując obniżenie odporności na wirusy. W tym przypadku wątpliwości nie dotyczyły więc genu użytecznego, ale towarzyszących mu genów markerowych. Abstrahując od dogłębnosci i stopnia realizmu niektórych wątpliwości, zadaniem nauki jest udzielenie wyczerpujących odpowiedzi. Mamy tutaj jednak do czynienia z jednej strony z typową sytuacją polegającą na tym, że każda nowa technologia rodzi nowe problemy i rzecz w tym, aby ich wagę jak najlepiej rozpoznać. Z drugiej natomiast wiele problemów jest wynikiem walki o rynek i jego profity, w sytuacji kiedy niektóre firmy uzyskały wielką przewagę technologiczną nad innymi.

ROŚLINY TRANSGENICZNE W HODOWLI ROŚLIN I PRODUKCJI

Hodowla roślin jest dziedziną zajmującą się wytwarzaniem i wprowadzaniem do rolnictwa odmian o nowych potrzebnych właściwościach. Nowe odmiany wprowadzone do praktyki rolniczej dają lepszy, wyższy i/lub bardziej atrakcyjny plon, który przynosi większe dochody producentom. Podstawą do osiągnięcia sukcesu w hodowli jest dysponowanie odpowiednią zmiennością genetyczną, w najgorszym przypadku przynajmniej jedną rośliną o potrzebnej cesze. Dlatego też uzyskanie pierwszych roślin transgenicznych wzbudziło entuzjazm, szczególnie jeżeli chodzi o szybkość postępu w hodowli. Powstała bowiem możliwość szybkiego uzyskiwania wielu w jednakowy sposób zmienionych osobników. Niewątpliwie rośliny transgeniczne dają szansę szybkiego uzupełnienia dobrej odmiany o nową (nieczęsto unikalną) właściwość. Nie każda jednak z roślin, które posiadają nowy gen, ma we właściwy sposób wykształconą daną cechę, a jeżeli już, to często ma zmienione inne właściwości, co jest niekorzystne. Trzeba więc dysponować odpowiednio liczną grupą roślin transgenicznych (20-100), aby można być pewnym wystąpienia przypadków będących rzeczywistym ulepszeniem danej odmiany o nową cechę. Aby ustalić, które to są rośliny, należy dokonać dokładnej ich oceny w polowych doświadczeniach, odpowiednio rozmnożyć i ewentualnie skorygować właściwości w wyniku krzyżowania.

Najbardziej doniosły wpływ inżynierii genetycznej (rozumianej jako uzyskiwanie transgenicznych roślin) na hodowlę polega na tym, że możliwe jest wprowadzenie genów z każdego organizmu niezależnie od systematycznego oddalenia w tym — genów syntetycznych — o zaprogramowanej sekwencji, nie występujących w naturze. Daje to szansę sprostania wielkim wyzwaniom cywilizacyjnym, związanym z wyżywieniem ludności i ochroną naturalnego środowiska.

BREEDING AND PROPERTIES OF TRANSGENIC PLANTS IN FIELD CONDITIONS

Summary

Testing of the properties of transgenic plants in field conditions is an indispensable step in evaluation of the effect of the gene introduced on the value of the variety tested. Field trials require special licences from an appropriate organ. In the European Union, so far about 500 such licences were issued. They concerned 21 plant species, mainly potato, maize, sugar beet, rape, chicory and tobacco plant, and such traits as tolerance to herbicides, virus resistance, altered colour of flowers and starch content.

Transgenic plants differ in expression of the introduced gene, that is why, among others, the value of a new property introduced is also differentiated. Moreover, in a part of the transgenic plants, also some other properties, not related directly to the action of the gene introduced, were altered. Also in this case large differences between various varieties were observed. It should be added that some unexpected properties of the transgenic lines were found to be due to variable atmospheric conditions.

LITERATURA

- CHMIEL A., 1993. *Biozagrożenia i bezpieczeństwo*. Biotechnologia 4, 71-81.
- HANISCH C., 1992. *Der Petunien Freilandversuch*. [W:] *Pflanzenproduktion und Biotechnologie*, MPI f. Züchtungsforschung, Koeln, 227-237.
- HOEKEMA A., HUISMAN M. J., MOLENDIJK L., VAN DEN ELZEN P. J. M., CORNELISSEN B. J. C., 1989. *The genetic engineering of two commercial potato cultivars for resistance to potato virus X*. BioTechnology 7, 273-278.
- JONGENDIJK E., DE SCHUTTER A. A. J. M., STOLTE T., VAN DEN ELZEN P. J. M., CORNELISSEN B. J. C., 1992. *Increased resistance to potato virus X and preservation of cultivar properties in transgenic potato under field conditions*. Biotechnology 10, 422-429.
- KANIEWSKI W., LAWSON C., SAMMONS B., HALEY L., HART J., DELLANNAY X., TUMER N. E., 1990. *Field resistance of transgenic russet burbank potato to effects of infection by potato virus X and potato virus Y*. Biotechnology 8, 750-754.
- LARKIN P. J., SCOWCROFT W. R., 1981. *Somaclonal variation — a novel source of genetic variability from cell cultures for plant improvement*. Theor. Appl. Genet. 60, 197-214.
- NEUROTH B., TEGEDER M., SCHIEDER O., 1995. *Field release of transgenic plants — biological data for relevant species*. Biotechnologia, International Conference Agrobiotechnology 95. Poznań 15-20 September, II.1 (abstracts).
- UNIDO, 1995. *Voluntary code of conduct for the release of organisms into the environment*. Biotechnologia 1, 28-34.

SPIS TREŚCI

Wstęp	479
Andrzej Jerzmanowski. <i>Arabidopsis thaliana</i> — organizm modelowy w biologii molekularnej roślin	483
Andrzej B. Legocki. Organizacja i budowa genomu roślinnego	489
Michał M. Sikorski. Identyfikacja genów roślinnych i ich ekspresja w bakteryjnym układzie ekspresyjnym	501
Paweł M. Stróżycki. Funkcje i ewolucja hemoglobin. Hemoglobiny roślinne	515
Magdalena Krzymowska, Jacek Hennig. Molekularne podstawy oddziaływania patogenów z komórkami roślinnymi	527
Anna Góra, Włodzimierz Zagórski. Wiroid wrzecionowatości bulw ziemniaka — struktura a patogenność	535
Grażyna Garbaczewska. Wirus mozaiki kalafiora — CaMV — model życiowy wirusa z odwrotną transkrypcją	547
Krzyszyna Brzeźnicka-Szymczyk. Infekcja, rozpoznanie, odpowiedź w interakcjach grzybów patogenicznych z roślinami	561
Barbara Łotocka, Władysław Golinowski. Powstawanie i rozwój brodawek korzeniowych roślin motylkowatych	569
Joanna Kopcińska, Władysław Golinowski. Czynniki Nod — cząsteczka sygnałowa w interakcji rośliny motylkowate— <i>Rhizobium</i>	579
Anna Skorupska, Jarosław Król. Zewnątrzkomórkowe polisacharydy <i>Rhizobium</i> : ich rola w symbiozie z roślinami motylkowatymi	589
Stanisław Lewak. Hormony roślinne — kierunki badań ostatniego dziesięciolecia	601
Alina Kacperska. Udział hormonów roślinnych w odpowiedzi roślin na stresowe czynniki środowiska	623
Małgorzata Wierzbicka. Oddziaływanie metali ciężkich na rośliny	639
Stanisław Maleszewski, Bożena Kozłowska. Czy fotooddychanie jest „marnotrawnym” procesem biologicznym?	653
Józef Kapusta. Transformowanie roślin dwuliściennych przy użyciu <i>Agrobacterium</i>	669
Monika Rakoczy-Trojanowska. Genetyczna transformacja roślin	683
Wojciech Burza. Sterowanie morfogenezą roślin w kulturach <i>in vitro</i>	691
Katarzyna Niemirowicz-Szczytt. Haploidy roślin w biotechnologii	703
Eligia M. Szewczyk. Perspektywy syntezy bakteryjnych biodegradowalnych poliesterów przez rośliny	709

<i>Mirostaw Sobczak, Grażyna Grymaszewska, Wojciech Kurek, Władysław Golinowski. Biotechnologiczne metody wprowadzania odporności u roślin na nicienie</i>	719
<i>Stefan Malepszy. Rośliny transgeniczne w uprawie polowej i hodowli roślin</i>	737

CONTENTS

Introduction	481
<i>Andrzej Jerzmanowski. Arabidopsis, a model organism of plant molecular biology</i>	483
<i>Andrzej B. Legocki. Structure and function of the plant genome</i>	489
<i>Michał M. Sikorski. Identification of plant genes and their expression in an bacterial expression system</i>	501
<i>Paweł M. Stróżycki. Functions and evolution of hemoglobins. Plant hemoglobins</i>	515
<i>Magdalena Krzymowska, Jacek Hennig. Molecular basis of pathogen action on plant cells</i>	527
<i>Anna Góra, Włodzimierz Zagórski. Structure-function relationships in the potato spindle tuber viroid</i>	535
<i>Grażyna Garbaczewska. The cauliflower mosaic virus, CaMV, as a reverse transcriptase dependent model of viral life cycle</i>	547
<i>Krystyna Brzezicka-Szymczyk. Infection, recognition and response in the interaction between fungal pathogens and plants</i>	561
<i>Barbara Łotocka, Władysław Golinowski. Formation and development of legume root nodules</i>	569
<i>Joanna Kopcińska, Władysław Golinowski. Nod factor — a molecular signal in the leguminous plant — <i>Rhizobium</i> interaction</i>	579
<i>Anna Skorupska, Jarostaw Król. <i>Rhizobium</i> exopolysaccharides: their role in symbiosis with legume plants</i>	589
<i>Stanisław Lewak. Plant hormones — trends of the last decade research</i>	601
<i>Alina Kaeperska. The phytohormone involvement in plant responses to environmental stress factors</i>	623
<i>Małgorzata Wierzbicka. Influence of heavy metals on plants</i>	639
<i>Stanisław Maleszewski, Bożena Kozłowska. Is photorespiration a wasteful biological process?</i>	653
<i>Józef Kapusta. Transformation of dicotyledonous plants using <i>Agrobacterium</i></i>	669
<i>Monika Rakoczy-Trojanowska. Genetic transformation of plants</i>	683
<i>Wojciech Burza. Control of plant morphogenesis in culture <i>in vitro</i></i>	691
<i>Katarzyna Niemirowicz-Szczytt. Haploids in biotechnology</i>	703
<i>Eligia M. Szewczyk. Perspectives of synthesis of bacterial biodegradable polyesters by plants</i>	709
<i>Mirostaw Sobczak, Grażyna Grymaszewska, Wojciech Kurek, Władysław Golinowski. Biotechnological methods of introducing resistance to nematoda in plants</i>	719
<i>Stefan Malepszy. Breeding and properties of transgenic plants in field conditions</i>	737