



Ekspresja genów germin pod wpływem wybranych czynników zewnętrznych w tytoniu transgenicznym (*Nicotiana tabacum* var. *Xanthi*)

Justyna Nowakowska

Zakład Genetyki i Fizjologii Drzew Leśnych, Instytut Badawczy Leśnictwa, Warszawa

Germin genes expression induced by stress factors in transgenic tobacco plants (*Nicotiana tabacum* var. *Xanthi*)

Summary

Wheat germin, a glycoprotein mainly localized in the cell wall of monocots, dicots and pine (*Pinus caribaea* Morelet), is a specific marker of the onset of growth in germinating seeds. There are two genes *gf-2.8* and *gf-3.8* of germin, isolated from wheat (*Triticum aestivum*). Because of their structure and biochemistry, both of the germin's isoforms have been now assimilated to the oxalate-oxidase enzyme (E.C. 1.2.3.4). Several constructs of the *gf-2.8* and *gf-3.8* genes promoters deletion were fused with *uidA* gene and tested for the GUS activity in the transgenic tobacco plants. The aim of this work was to evaluate whether some environmental factors induce the activity of germin. Hormonal treatment (auxins 2,4-D, NAA, gibberellin GA₃), salt treatment, salicylic acid, heavy metals (Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Cd, Hg, As) and Al induced high GUS activity in root apex, cotyledons and hypocotyls in transgenic seedlings and in leaves of the tobacco plants transformed with the entire and one partially deleted construct of the *gf-2.8* gene. Neither cold nor heat shock, enhanced significant GUS activity. The *gf-3.8* – GUS constructs of germin did not give a positive response to any factors mentioned above. Thus, only the *gf-2.8* protein seems to be regulated by some factors. The *gf-2.8* oxalate-oxidase activity could be then involved in general stress-induced signalling in higher plants.

Key words:

auxin, cold, germin, gibberellic acid, heat shock, heavy metals ions, NaCl, oxalate oxidase, salicylic acid.

Adres do korespondencji

Justyna Nowakowska,
Zakład Genetyki
i Fizjologii Drzew Leśnych,
Instytut Badawczy
Leśnictwa,
ul. Bitwy Warszawskiej
1920 roku nr 3,
00-973 Warszawa;
e-mail:
j.nowakowska@ibles.waw.pl

biotechnologia

2 (53) 152–164 2001

1. Wstęp

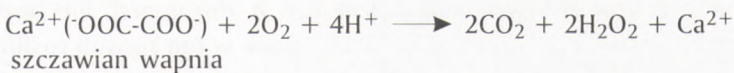
Germiny są białkami powszechnie występującymi w kiełkujących zarodkach pszenicy (*Triticum aestivum* L.), jęczmienia (*Hordeum vulgare* L.), rzodkiewnika (*Arabidopsis thaliana* L.) oraz sosny (*Pinus caribaea* Morelet). Odkrycie germin nastąpiło w 1973 r., kiedy po raz pierwszy wyizolowano nowo powstałe białka w kiełkujących ziarniakach pszenicy (1). Struktura i funkcja germin jest najlepiej poznana u pszenicy, stąd też pszeniczne germiny stanowią obiekt wielu badań (2-4).

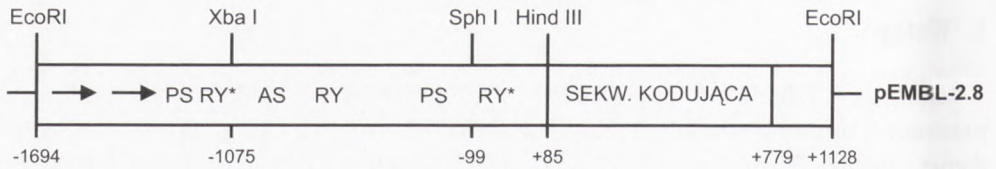
W szczegółowych badaniach sekwencji aminokwasowej wykazano, że germiny są homopentamerycznymi białkami o łącznej masie cząsteczkowej 125 kD, zlokalizowanymi w błonie komórkowej i cytoplazmie (5). Ponadto są to białka rozpuszczalne w wodzie, odporne na działanie proteaz oraz charakteryzują się dużą stabilnością ($t_{1/2} = 60$ s) w obecności detergentu – dodecylo siarczanu sodu (SDS) – w 100°C (5). Pszenica zawiera dwa odrębne klony genomowe germin, zlokalizowane w chromosomach 4A (5 kopii), 4B (3 kopie) i 4D (9 kopii) (4). Stosując technikę trawienia enzymem restrykcyjnym *EcoRI* wyizolowano klon o długości 2,8 tysiąca par zasad (**gen *gf-2.8***) oraz klon o długości 3,8 tysiąca par zasad (**gen *gf-3.8***). Sekwencje kodujące genów *gf-2.8* i *gf-3.8* nie zawierają intronów i są do siebie podobne w 94% (4). Pomimo wysokiego podobieństwa obu sekwencji kodujących dwie izoformy germiny, sekwencje obu promotorów 5' oraz terminatorów 3' różnią się od siebie. Poza występującymi w promotorach *gf-2.8* i *gf-3.8* sekwencjami TATA i CAAT, które inicjują początek transkrypcji, w *gf-2.8* znajdują się: sekwencje odwróconych powtórzeń AT oraz sześć sekwencji zbliżonych do elementów odpowiedzi na auksyny – tzw. *AuxRE* (*Auxin-responsive elements*) (rys. 1).

Promotor germiny *gf-3.8* zawiera mniej elementów o charakterze regulacyjnym: wykryto w nim jedynie sekwencję bogatą w puryny oraz jedną sekwencję odwrotnego powtórzenia (200 pz) (rys. 2).

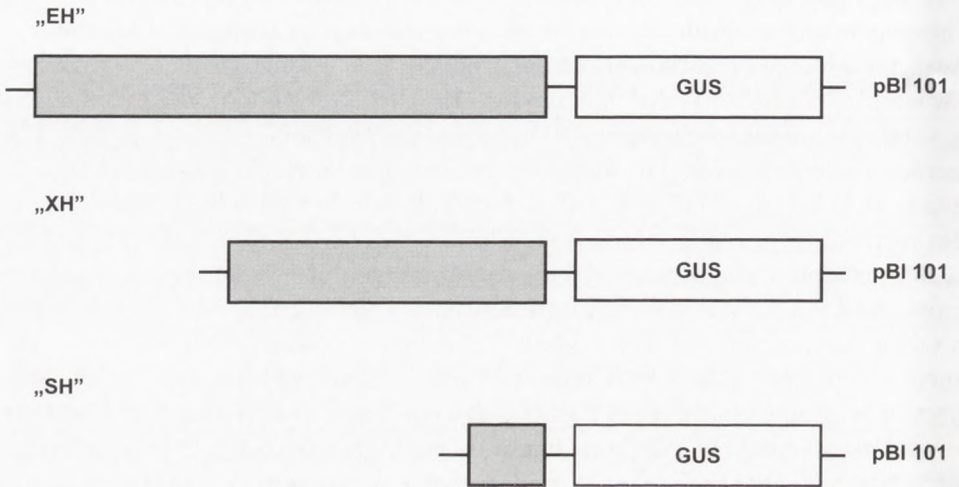
Porównując aktywność germin z aktywnością oksydazy szczawianowej jęczmienia (E.C. 1.2.3.4.) w 1993 r. Lane i in. odkryli, że oba białka pełnią tę samą funkcję: rozkładają cząsteczki szczawianu wapnia na dwutlenek węgla, nadtlenuk wodoru i jony wapnia w środowisku kwaśnym (pH 4), przy dostępie tlenu (6). Reakcja ta przebiega następująco:

Oksydaza szczawianowa
(*germina*)





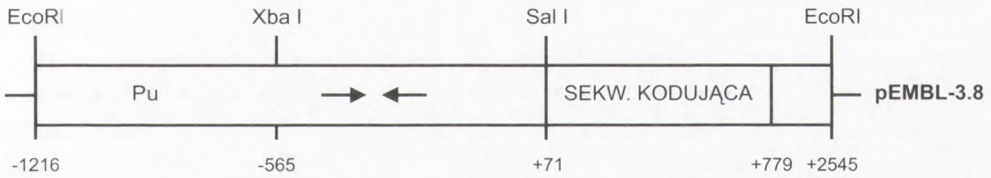
Konstrukty gf-2.8-GUS:



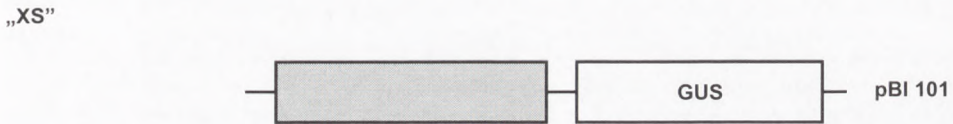
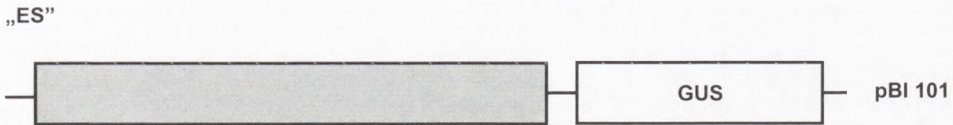
Rys. 1. Konstrukty „EH”, „XH” i „SH” promotora germiny gf-2.8 w pBI 101. Całkowity promotor „EH” (od -1694 do +85) zawiera → → powtórzenia jednokierunkowe, RY: specyficzna sekwencja puryn i pirymidyn, RY*: element RY indukowany przez auksyny w genie syntazy nopolinowej, PS: sekwencja homologiczna do genu PS-IAA 4/5, AS: sekwencja wiążąca regulacyjne białko ASF-1. GUS: sekwencja kodująca syntazę glukuronidazową. Sekwencja kodująca: sekwencja kodująca białko gf-2.8.

W ostatnim dziesięcioleciu, powszechnie stosuje się w biologii doświadczalnej rośliny transgeniczne, takie jak tytoń, lucerna, kukurydza, ziemniak. Rośliny te nie różnią się morfologią od osobników dzikich, jedynie posiadają w swym genomie dodatkowo wprowadzone geny strukturalne lub markerowe. Transformacja polega na wprowadzeniu kodujących fragmentów DNA do genomu rośliny za pomocą techniki wektorowej (infekcja *Agrobacterium tumefaciens*, *A. rhizogenes*), lub bezwektorowej (mikrowstrzeliwanie cząsteczek DNA) (7). Uzyskane w ten sposób rośliny pozwalają na badanie ekspresji danego genu pod kontrolą wybranego promotora, oraz umożliwiają kontrolę ekspresji pod wpływem czynników zewnętrznych.

Celem pracy, wykonanej w Laboratorium Rozwoju Roślin na Uniwersytecie Louis Pasteur w Strasburgu (Francja), było zastosowanie tytoniu transgenicznego do badań ekspresji dwóch genów germin *gf-2.8* i *gf-3.8* przy zastosowaniu genu markerowego.



Konstrukty gf-3.8-GUS:



Rys. 2. Konstrukty „ES” i „XS” promotora germiny gf-3.8 w pBI 101. Całkowity promotor „ES” (od -1216 do +71) zawiera: → ← powtórzenia odwrotne, Pu: sekwencja bogata w puryny, GUS: sekwencja kodująca syntazę glukuronidazową. Sekwencja kodująca: sekwencja kodująca białko gf-3.8.

wego *uidA* (GUS), pod wpływem takich czynników zewnętrznych jak: auksyny (2,4-D i NAA), giberelina (GA_3), kwas salicylowy, chłód ($4^\circ C$), wysoka temperatura ($42^\circ C$), NaCl, jony metali ciężkich (Mn^{2+} , Fe^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} , Hg^{2+} , As^{5+}) oraz Al^{3+} (tab. 1).

Tabela 1

Czynniki zewnętrzne testowane w badaniu ekspresji i aktywności germin w tytoniu transgenicznym (11)

Czynnik	Dawkowanie	Czas inkubacji
NAA	100 μM	2 dni
2,4-D	50 μM	2 dni
GA ₃	50 μM	2 dni
SA	100 μM	2 dni
Chłód	4°C	2 dni
Wysoka temp.	42°C	2 godz.
NaCl	200 mM	2 dni
ZnSO ₄	1 mM	2 dni
Cd(CH ₃ COO) ₂	1 mM	2 dni
HgCl ₂	100 μM	2 dni
CuSO ₄	1 mM	2 dni
CoCl ₂	1 mM	2 dni
FeCl ₂	1 mM	2 dni
MnCl ₂	1 mM	2 dni
NiCl ₂	1 mM	2 dni
Al(NO ₃) ₃	1 mM	2 dni
Na ₃ AsO ₄	100 μM	2 dni

2. Materiał i metody

2.1. Materiał roślinny

Nasiona tytoniu dzikiego oraz transgenicznego (*Nicotiana tabacum* var. Xanthi) sterylizowano 70% alkoholem etylowym i wysiewano na sterylną pożywkę MS (8), zawierającą selekcyjny antybiotyk dla roślin transgeniczných. Po dwumiesięcznym wzroście w warunkach *in vitro* (25°C, 16 godz. światła 39 $\mu\text{E} \times \text{m}^{-2} \times \text{s}^{-1}$, 8 godz. ciemności), rośliny przeniesiono do gleby i hodowano w szklarni aż do samozapylenia i zebrania nasion.

2.2. Plazmidy i szczepy bakteryjne

W badaniach użyto następujące plazmidy: pEMBL 18 (+) – gf-2.8 i pEMBL 18 (+) – gf-3.8 skonstruowane przez Lane i in. (4), oraz wektor pBI 101 (ClonTech, USA).

Plazmidy i wektory były przechowywane w dwóch szczepach bakteryjnych: *E. coli* JM 109 oraz *A. tumefaciens* LBA 4404 wg wskazówek Sambrooka i in. (9).

2.3. Klonowanie promotorów *gf-2.8* i *gf-3.8*

Izolacja sekwencji promotora genu *gf-2.8* polegała na trawieniu pEMBL-2.8 enzymem restrykcyjnym *EcoRI*, po czym na oczyszczeniu fragmentu metodą Prep-A-Gene (BioRad) i trawieniu enzymami odpowiednio *XbaI* i *SphI* w celu uzyskania częściowych delecji oraz wprowadzeniu uzyskanych fragmentów przed gen markerowy GUS w plazmidzie pBI 101 wg metod opisanych przez Sambrook i in. (9). Końcowym wynikiem klonowania były trzy konstrukty *gf-2.8* (10, rys. 1.):

- konstrukt „EH”, zawierający całkowity promotor *gf-2.8* przed genem GUS,
- konstrukt „XH” – promotor pozbawiony pierwszych 610 pz,
- konstrukt „SH” – delecja 1793 pz promotora.

Izolacja sekwencji promotora *gf-3.8* przebiegała w podobny sposób jak izolacja promotora *gf-2.8*, jedynie z powodu braku miejsca cięcia w końcowej części promotora wprowadzono sekwencję enzymu *Sall* za pomocą specyficznego startera w reakcji polimerazy łańcuchowej (PCR – *Polimerase Chain Reaction*). Dzięki tej metodzie uzyskano w drodze dalszych manipulacji:

- konstrukt „ES”, zawierający całkowity promotor *gf-3.8* przed genem GUS
- oraz konstrukt „XS”, pozbawiony pierwszych 651 pz promotora (11, rys. 2.)

Wyhodowane rośliny tytoniu transgenicznego zostały następnie nazwane inicjalami konstruktów, które posłużyły do ich transformacji, tak zatem otrzymano linie tytoniu „EH”, „XH”, „SH”, „ES” i „XS”.

2.4. Transformacja tytoniu

Transformacja roślin polegała na infekcji szczepem *A. tumefaciens*, do którego uprzednio wprowadzono konstrukty „EH”, „XH”, „SH”, „ES” i „XS” metodą potrójnej koniugacji (12). Liście 5-6-dniowych roślin tytoniu poddano sterylizacji w wodzie chlorowanej z dodatkiem detergentu 0,1% Tween 20. Następnie liście płukano 3 razy w wodzie dejonizowanej i suszono na bibule filtracyjnej. Skalpelem wycięto w blaszce liściowej kwadraty o wymiarach 2 cm² i umieszczono w 5 ml płynnej pożywki MS wraz z 1 ml zawiesiny *A. tumefaciens*. Zainfekowane blaszki przeniesiono do pożywki MS selekcyjnej (MS z dodatkiem 1 mg × l⁻¹ benzoamylpuryny, 0,1 mg × l⁻¹ NAA, 500 mg × l⁻¹ karbenicyliny, 300 mg × l⁻¹ kanamycyny), po czym do pożywki MS regeneracyjnej (MS z dodatkiem 30 g × l⁻¹ sacharozy i 8 g × l⁻¹ fitoagaru). Regeneracja młodych pędów transgenicznego tytoniu trwała ok. 3-4 tygodni w temperaturze 25°C, 16 godz. światła o natężeniu 39 μE × m⁻² × s⁻¹, 8 godz. ciemności. Po upływie 1-2 miesięcy, rośliny przesadzano do gleby i hodowano w szklarni w celu uzyskania homozygotycznych linii transgenicznych T2, traktowanych następnie wg opisu przedstawionego w tabeli 1.

2.5. Badanie ekspresji genu markerowego GUS

Gen *uidA* koduje aktywne białko GUS, które przekształca substrat 5-bromo-4-chloro-3-indolylo glukuronid (X-gluc) w zabarwiony na niebiesko produkt 3-hydroksy-5-bromo-4-chloro indol. Obecność niebieskiego barwnika w tkance transformowanych roślin świadczy zatem o syntezie aktywnego białka GUS.

Badania histologiczne aktywności GUS wykonano według metody opracowanej przez Jeffersona i in. (13), polegającej na 16-godzinnej inkubacji materiału roślinnego w temperaturze 37°C po dodaniu substratu (500 $\mu\text{g} \times \text{ml}^{-1}$ X-gluc, ClonTech) i obserwacji pod mikroskopem stereoskopowym typu NIKON. Analizie poddawano około 10 niezależnych linii transgeniczných T2.

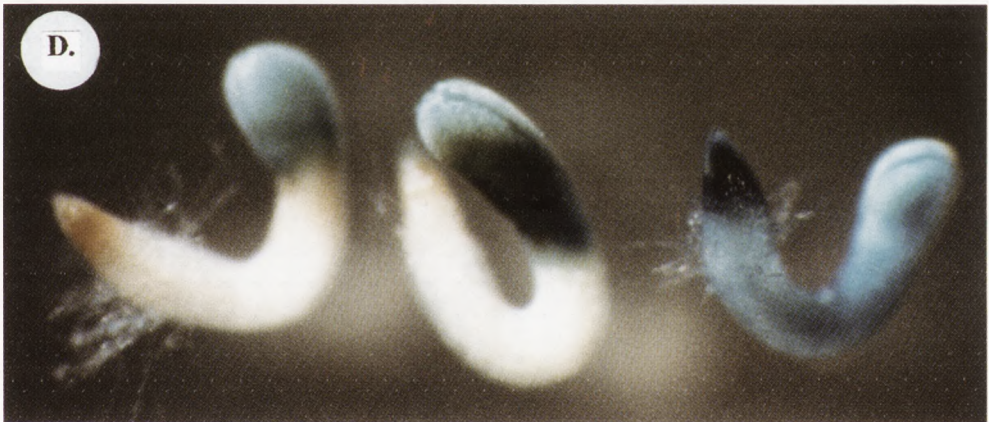
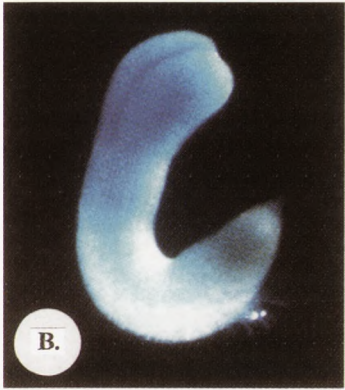
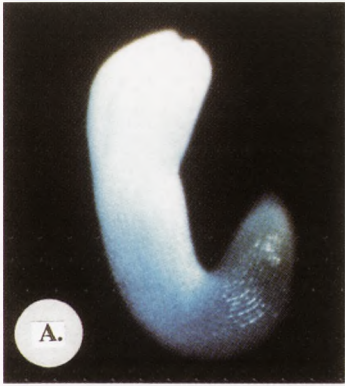
3. Wyniki

3.1. Ekspresja i aktywność enzymatyczna GUS w tytoniu transgenicznym „EH”, „XH” i „SH”

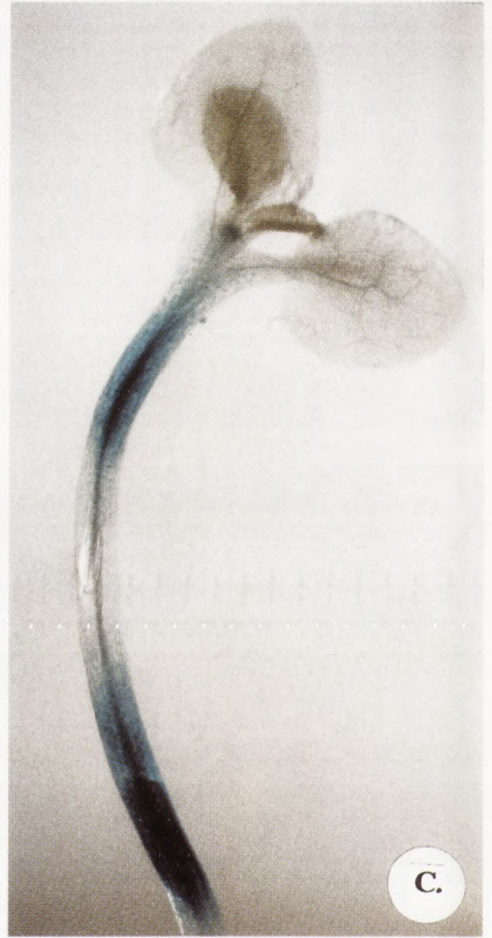
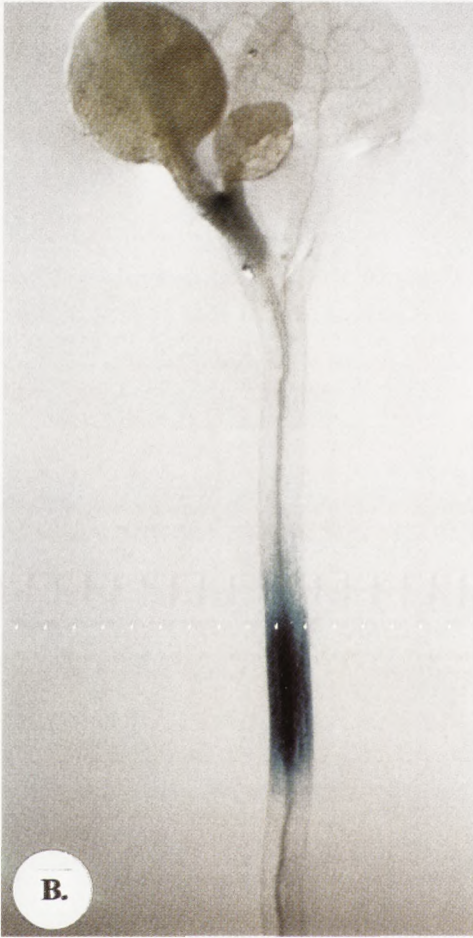
Wszystkie zastosowane czynniki, oprócz niskiej i wysokiej temperatury, wpłynęły na ekspresję GUS w tkankach tytoniu „EH” i „XH”. Tak zatem młode siewki wykazywały indukcję GUS w merystemie korzeniowym, hipokotylu i liścieniach, poddanych działaniu auksyn (NAA i 2,4-D), gibereliny, kwasu salicylowego, NaCl, jonów cynku, kadmu, żelaza i niklu (tab. 2, fot. 1, 2). Dojrzałe rośliny transgeniczne „EH” i „XH” wykazywały aktywność GUS w częściach merystematycznych pędu górnego i liściach u roślin traktowanych auksynami, kwasem giberelowym, kwasem salicylowym, NaCl, oraz jonami cynku, kadmu, rtęci, miedzi, kobaltu, żelaza, manganu, niklu, glinu i arsenu. W przypadku stosowania jonów glinu i arsenu aktywność GUS występowała również w merystemach korzeniowych u dojrzałych roślin (tab. 2, fot. 2,3,4).

Żaden z wymienionych czynników nie wpłynął na ekspresję GUS w roślinach dzikiego tytoniu (kontrola).

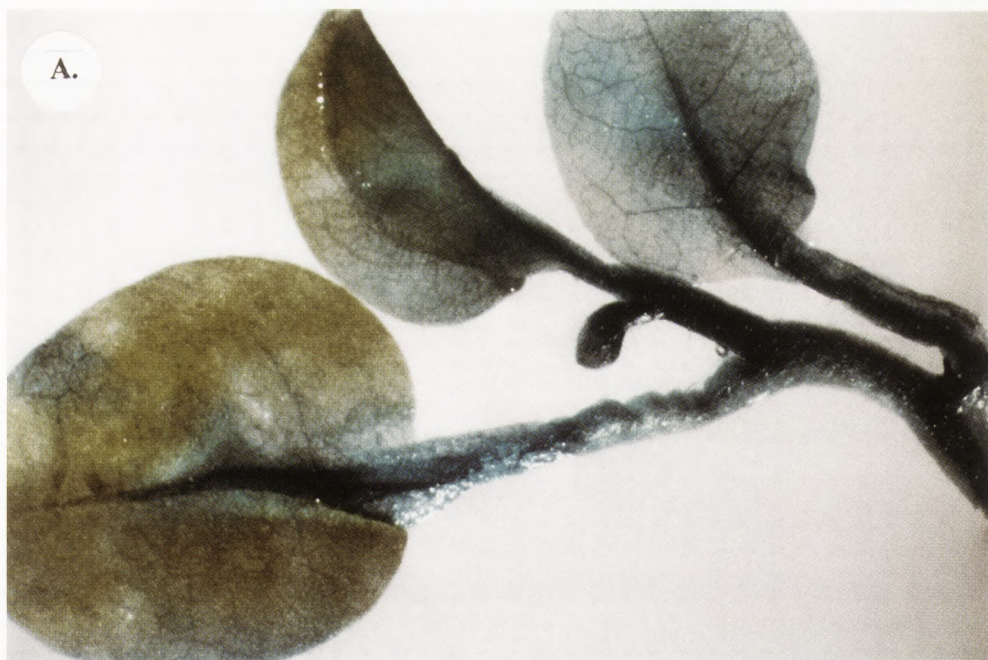
Obserwacje histologiczne zostały potwierdzone za pomocą pomiaru fluorymetrycznego aktywności GUS (13) w badanych liniach tytoniu transgenicznego (11).



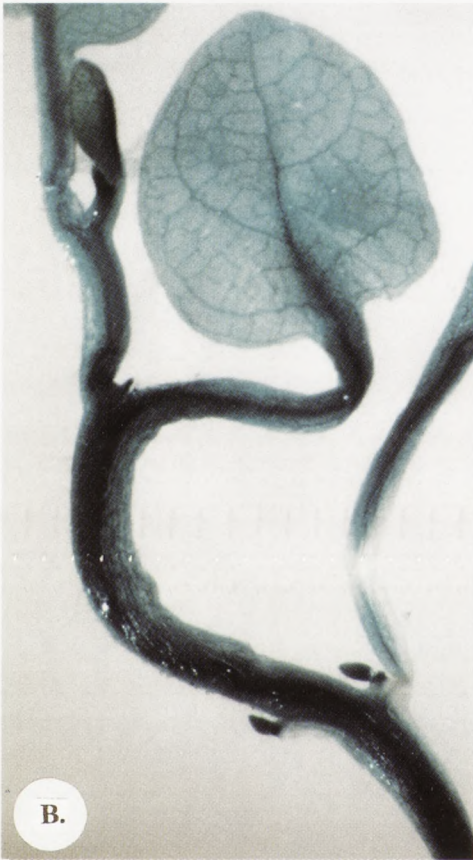
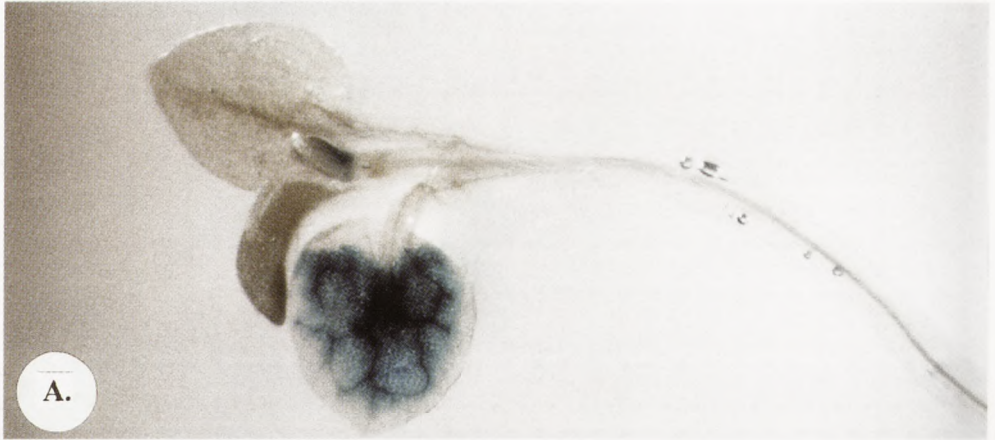
Fot. 1. Aktywność GUS w tytoniu transgenicznym. A. 3-dniowa siewka „EH” traktowana 100 μM NAA; B. 3-dniowa siewka „XH” traktowana 100 μM NAA; C. 3-miesięczna roślina „XH” indukowana 50 μM 2,4-D; D. 3-dniowe siewki „SH”, „XH” i „EH” traktowane 50 μM GA_3 .



Fot. 2. Badanie aktywności GUS metodą kolorymetryczną w roślinach traktowanych 200 mM NaCl. A. 3-dniowe siewki „SH”, „EH” i „XH”; B. 1-miesięczna roślina „EH”; C. 1-miesięczna roślina „XH”.



Fot. 3. Aktywność GUS w tytoniu transgenicznym, traktowanym 100 μM roztworem HgCl_2 . A. 3-miesięczna roślina „EH”; B. 3-miesięczna roślina „XH”.



Fot. 4. Badanie aktywności GUS w tytoniu transgenicznym „XH”, pod wpływem jonów metali ciężkich i Al³⁺. A. 1-miesięczna roślina (1 mM MnCl₂); B. 3-miesięczna roślina (100 μM Na₃AsO₄); C. 3-miesięczna roślina (1 mM Al(NO₃)₃).

Tabela 2

Aktywność GUS w tytoniu transgenicznym

Czynnik	Konstrukty		
	„EH”	„XH”	„SH”
NAA	a (ap, l)	a, h, c (ap, l)	–
2,4-D	a (ap, l)	a, h, c (ap, l)	–
GA ₃	c (ap, l)	a, h, c, (ap, l)	–
SA	h (ap)	h (ap)	–
4°C	–	–	–
42°C	–	–	–
NaCl	h, c (ap)	a, h, c (ap)	–
ZnSO ₄	c (a, ap)	c (l)	–
Cd(CH ₃ COO) ₂	a (l)	a, h (ap, l)	–
HgCl ₂	(ap, l)	(a, ap, l)	–
CuSO ₄	(ap)	(ap)	–
CoCl ₂	(ap)	(ap)	–
FeCl ₂	c (ap)	(ap)	–
MnCl ₂	(ap)	(l)	–
NiCl ₂	h (ap)	h (ap)	–
Al(NO ₃) ₃	(ap)	(a, ap)	–
Na ₃ AsO ₄	(ap)	(a, ap, l)	–

Objaśnienia: dla siewek 3-7-dniowych – a: merystem korzeniowy, c: liścienie, h: hipokotyl. Dla 1-miesięcznych roślin (w nawiasach) – ap: część merystematyczna wierzchołka pędu, l: blaszki liściowe.

3.2. Ekspresja i aktywność enzymatyczna GUS w tytoniu transgenicznym „ES” i „XS”

W obserwacjach histologicznych młodych siewek i dojrzałych roślin transgenicznych „ES” i „XS” nie wykazano ekspresji GUS w żadnej tkance testowanych roślin, mimo zwiększonej ilości substratu (550 µg × ml⁻¹ X-gluc) oraz przedłużonej inkubacji do 24 godzin.

4. Dyskusja

Zastosowanie transgenicznego tytoniu do badań ekspresji genów germin *gf-2.8* i *gf-3.8* miało na celu utworzenie systemu badań, w którym ekspresja każdej z izoform byłaby poddana odrębnej regulacji. Pszenica posiada w genomie 17 *loci* kodujących germiny, tak zatem nie jest możliwe rozróżnienie, który gen: *gf-2.8* lub *gf-3.8* podlega regulacji pod wpływem badanego czynnika.

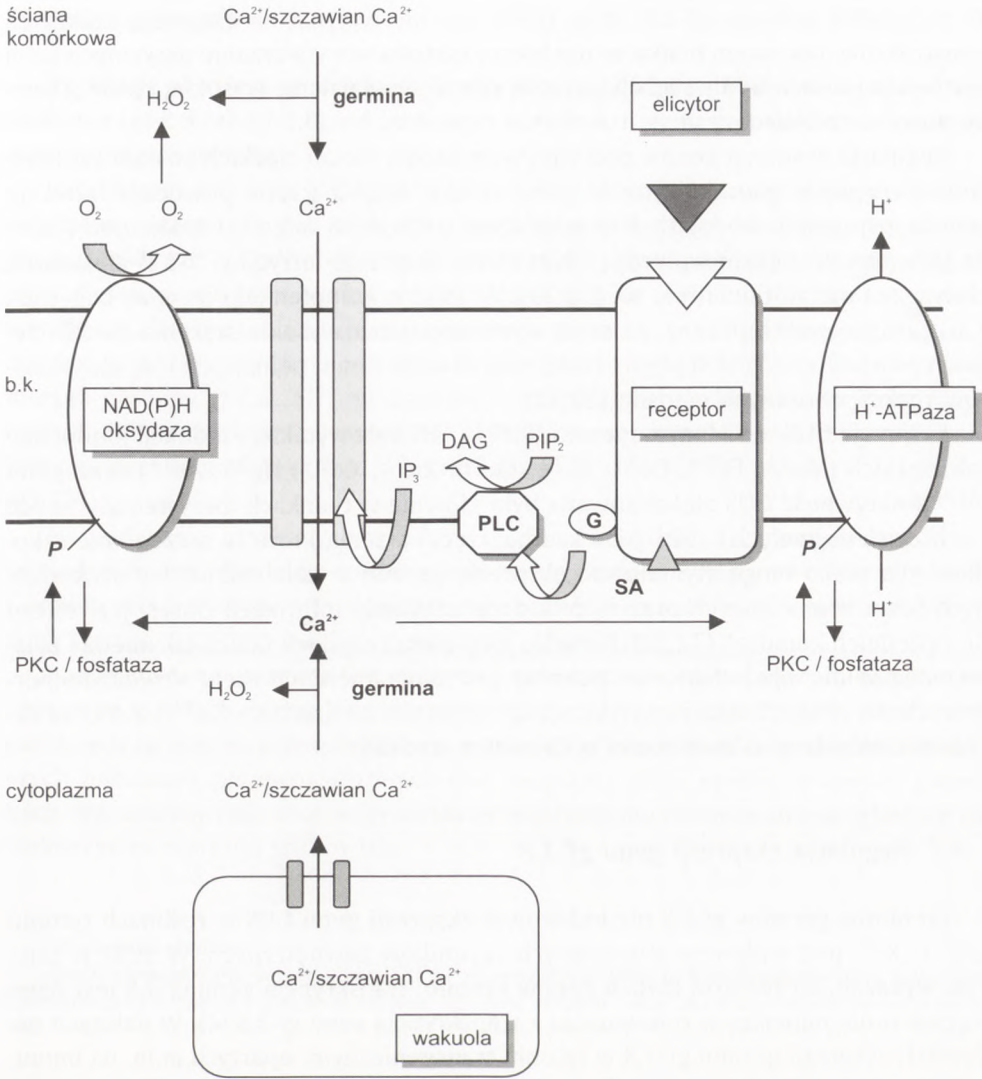
4.1. Regulacja ekspresji genu *gf-2.8*

Stosowane fitohormony – auksyny i giberelina wpłynęły na ekspresję genu markerowego GUS, będącego pod kontrolą promotorów „EH” i „XH” genu *gf-2.8*. Znajdujące się w promotorze *gf-2.8* sekwencje regulacyjne RY, RY*, PS i AS typu *AuxRE*, zawarte między miejscami restrykcyjnymi *EcoRI* i *SphI* warunkują indukcję ekspresji GUS pod wpływem auksyn i gibereliny (rys. 1, tab. 2, fot. 1). Konstrukt „SH”, zawierający tylko jeden element *AuxRE*, jak się okazało, nie był wystarczający do indukcji ekspresji genu GUS (rys. 1, tab. 2). Obecnie znanych jest wiele genów, których ekspresja jest kontrolowana przez auksyny, np. gen *PS-IAA4/5* u grochu (14) i gen *GH3* u soi (15) oraz gibereliny: gen *GH2/4* (16). Niektórzy autorzy cytują możliwość indukcji elementów *AuxRE* zarówno przez auksyny jak i gibereliny, np. w genie *GH3*, *as-1*, syntazy nopalinowej i transferazy glutationowej (16,17).

W badanych tkankach tytoniu, indukcja syntezy germiny *gf-2.8* przez auksyny i giberelinę może być związana z udziałem tego białka w mechanizmach sygnalizacji komórkowej dzięki uwalnianym jonom Ca^{2+} i cząsteczkom H_2O_2 . Jony wapnia i cząsteczki nadtlenu wodoru pełnią funkcję przekaźników drugiego i trzeciego rzędu w komórkach roślinnych i zwierzęcych (18). Wapń reguluje ciśnienie osmotyczne w cytoplazmie i jest ważnym składnikiem ściany komórkowej (19). Na podstawie badań Mehdy i in. (20) oraz Gelli i in. (21), przedstawiono hipotetyczny model udziału germiny w metabolizmie komórki roślinnej (rys. 3). Uwolnione przez germinę w cytoplazmie jony Ca^{2+} mogą pełnić rolę aktywatorów fosfokinazy C, która poprzez fosforylację H^+ -ATPaz membranowych przyczynia się do zakwaszenia matrix ściany komórkowej. Wzrost stężenia jonów wodorowych w ścianie komórkowej jest jednym z mechanizmów stymulowanych przez auksyny w czasie tzw. „kwaśnej teorii wzrostu” (22,23).

Kwas salicylowy, który bierze udział w reakcjach obronnych roślin przed patogenami, również wpływa na ekspresję genu GUS u roślin „EH” i „XH”. Kwas ten przyczynia się do przekazania informacji o infekcji grzybowej (poprzez aktywowany elicytorem receptor membranowy) *via* przekaźniki drugiego i trzeciego rzędu (Ca^{2+} , fosforany inozytolu), które z kolei aktywują zlokalizowaną w błonie komórkowej NAD(P)H oksydazę i H^+ – ATPazę (20). W wyniku tych reakcji wzrasta w ścianie komórkowej stężenie nadtlenu wodoru, co zapewnia odbudowę ściany zniszczonej enzymami proteolitycznymi grzyba (rys. 3). Białka, których synteza jest indukowana przez kwas salicylowy należą do tzw. białek z rodziny PR (*Pathogenesis Related Proteins*), a niektóre z nich, jak np. gen *GH2/4* u soi, podlegają zarówno regulacji przez kwas salicylowy oraz auksyny (16).

Wpływ NaCl na ekspresję GUS w roślinach „EH” i „XH” wykazuje podobieństwo do indukcji genów *Gs1* i *Gs2* w jęczmieniu. Białka te, z rodziny germin, biorą udział w utrzymaniu stałego poziomu potencjału wodnego w komórkach jęczmienia (24). Wysokie stężenie jonów Na^+ i Cl^- powoduje m.in. zakłócenia w transporcie jonów przez błonę komórkową oraz niszczy strukturę ściany komórkowej. Tak zatem ger-



Rys. 3. Rola germin w reakcjach sygnalizacji komórkowej z udziałem jonów wapnia (wg Mehdy i in. (20), Gelli i in. (21), zmodyfikowane). G: białko G, PLC: fosfolipaza C, PIP₂: 4,5-dwufosforan fosfatydylinylozitolu, IP₃: 1,4,5-trójfosforan inozytolu, DAG: diacylglicerol, PKC: fosfokinaza C, SA: kwas salicylowy, b.k.: błona komórkowa.

mina gf-2.8 może pełnić rolę ochronną poprzez zwiększoną produkcję cząsteczek H₂O₂ i odbudowę łańcuchów fenylpropanoidowych w ścianie komórkowej.

Zarówno niska (4°C) jak i wysoka (42°C) temperatura przyczyniają się do powstania w komórkach roślinnych reaktywnych form tlenu H₂O₂, O₂⁻ i OH⁻ (25,26).

W przypadku germiny *gf-2.8*, stres termiczny nie wpłynął na ekspresję badanych konstruktów, tak zatem białko to nie bierze udziału w wytwarzaniu aktywnych form tlenu oraz jonów wapnia sygnalizujących szkodliwe działanie wysokiej i niskiej temperatury w roślinie.

Regulacja ekspresji genów pod wpływem jonów metali ciężkich została zaobserwowana u wielu gatunków roślin. Jony żelaza, kadmu i rtęci powodują indukcję transkrypcji genów kodujących fitochelatyny u *Phaseolus vulgaris* i *Arabidopsis thaliana* (27). Metale ciężkie wpływają również na ekspresję ferrytyny, 1-3 β -glukanazy, chitynazy i metalotioneiny u soi (28,29). W 1995 r. Kampfenkel i in. oraz Lobreaux i in. zasugerowali hipotezę, że stres wywołany przez wysokie stężenia metali ciężkich powoduje wzrost stężenia reaktywnych form tlenu, pełniących rolę aktywatorów reakcji obronnych u roślin (30,31).

Ekspresja GUS w badanym tytoniu „EH” i „XH” była wynikiem indukcji jonów metali ciężkich (Mn^{2+} , Fe^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} , Hg^{2+} , As^{5+}) oraz glinu (Al^{3+}). Aktywność GUS zlokalizowana była głównie w tkankach merystematycznych i w liściach dojrzałych roślin. Jony kadmu, rtęci i arsenu, które są szczególnie szkodliwe dla roślin mogą stymulować ekspresję germin w celu odbudowy uszkodzonych ścian komórkowych oraz w celu przekazywania informacji dotyczącej stresu do sąsiednich komórek (32,33). Ponadto jony metali ciężkich takich jak miedź i żelazo mogą pełnić rolę kofaktorów germiny, jak to ma miejsce u wielu oksydaz komórkowych. W 1992 r. Esaka i in. wykazali np. synergiczne działanie Cu^{2+} i 2,4-D na aktywność oksydazy askorbinowej u *Cucurbita* ssp. (34).

4.2. Regulacja ekspresji genu *gf-3.8*

Promotor germiny *gf-3.8* nie indukował ekspresji genu GUS w roślinach tytoniu „ES” i „XS”, pod wpływem stosowanych czynników zewnętrznych. W 1991 r. Lane i in. wykazali, że spośród dwóch genów germin, transkrypcja genu *gf-3.8* jest dziesięciokrotnie mniejsza w porównaniu z transkrypcją genu *gf-2.8* (4). W dalszych badaniach ekspresji germin *gf-3.8* w tytoniu transgenicznym, opartych m.in. na immunologicznej i radioaktywnej analizie ekspresji różnych konstruktów *gf-3.8*, wykazano, że synteza białka *gf-3.8* następuje jedynie w roślinach transgenicznych zawierających sekwencję kodującą *gf-3.8* pod kontrolą silnego promotora wirusa mozaiki kalafiora – CaMV 35S (11). W tych roślinach, białko *gf-3.8* występowało w postaci nieaktywnych monomerów o masie cząsteczkowej 25 kD. Nie jest wykluczone, że synteza aktywnej germiny *gf-3.8* zachodzi w komórkach pszenicy, i jest prawdopodobnie zależna od specyficznych czynników, nie występujących w komórkach tytoniu.

5. Podsumowanie

Regulacja ekspresji genów kodujących germiny *gf-2.8* i *gf-3.8* zależy od rodzaju izoformy (*gf-2.8* lub *gf-3.8*), od badanego konstruktów genu germin oraz od rodzaju stosowanego czynnika.

Jedyny gen izoformy *gf-2.8* podlegał indukcji w tytoniu transgenicznym. Badane regulatory wzrostu (2,4-D, NAA, GA₃) oraz kwas salicylowy, NaCl, jony metali ciężkich (Mn²⁺, Fe²⁺, Co²⁺, Ni²⁺, Cu²⁺, Zn²⁺, Cd²⁺, Hg²⁺, As⁵⁺) i Al³⁺ wpływają na indukcję ekspresji genu markerowego GUS w tytoniu „EH” i „XH”. Tak zatem sekwencje regulacyjne typu *AuxRE* usytuowane w pierwszych 1793 pz promotora *gf-2.8* aktywują transkrypcję genu w roślinach transgenicznym. Najkrótszy fragment promotora germiny *gf-2.8* „SH” nie zawiera wystarczającej liczby sekwencji regulacyjnych, indukowanych przez testowane czynniki zewnętrzne. Gen germiny *gf-2.8* nie jest również indukowany przez stres termiczny, tj. chłód (4°C) i wysoką temperaturę (42°C).

Na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić, że transgeniczny tytoń jest odpowiednim modelem roślinnym do badań ekspresji wyłącznie izoformy *gf-2.8*. Germina *gf-3.8* wymaga prawdopodobnie obecności innych czynników transkrypcyjnych warunkujących prawidłową ekspresję genetyczną.

Podsumowując, germina jest jednym z powszechnie występujących białek stresowych w roślinach, bierze ona udział w reakcjach sygnalizacji stresu w komórkach roślinnych za pośrednictwem jonów wapnia i cząsteczek nadtlenu wodoru. W dalszych badaniach przeprowadzonych nad ekspresją genu germin w innych gatunkach, np. u sosny (35), można by wyjaśnić mechanizmy obronne drzew iglastych na niekorzystne warunki środowiska.

Objaśnienia skrótów:

AuxRE: element warunkujący odpowiedź na auksyny, 2,4-D: kwas dichlorofenoksyoctowy, GA₃: kwas gibberelowy, GUS: syntaza glukuronidazowa, kD: (kilo Dalton) jednostka masy cząsteczkowej białek, NAA: kwas α-naftylooctowy, pz: pary zasad, SA: kwas salicylowy, MS: pożywka Murashige i Skooga.

Literatura

1. Dobrzanska M., Tomaszewski M., Grzelczak Z., Rejman E., Buchowicz J., (1973), *Nature*, 244, 507-509.
2. Grzelczak Z. F., Lane B. G., (1983), *Can. J. Biochem. Cell Biol.*, 61, 1233-1243.
3. Grzelczak Z. F., Rahman S., Kennedy T. D., Lane B. G., (1985), *Can. J. Biochem. Cell Biol.*, 63, 1003-1013.
4. Lane B. G., Bernier F., Dratewka-Kos E., Shafai R., Kennedy T. D., Pyne C., Munro J. R., Vaughan T., Walters D., Altomare F., (1991), *The J. Biol. Chem.*, 266, 10461-10469.
5. Lane B. G., Cuming A. C., Frégeau J., Carpita N. C., Hurkman W. J., Bernier F., Dratewka-Kos E., Kennedy T. D., (1992), *Eur. J. Biochem.*, 209, 961-969.
6. Lane B. G., Dunwell J. M., Ray J. A., Schmitt M. R., Cuming A. C., (1993), *The J. Biol. Chem.*, 268, 12239-12242.
7. Tretyń A., (1998), *Podstawy fizjologii roślin*, PWN, Warszawa, 663-693.

8. Murashige T., Skoog F., (1962), *Physiol. Plant.*, 15, 473-497.
9. Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T., (1989), *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
10. Berna A., Bernier F., (1997), *Plant Mol. Biol.*, 33, 417-429.
11. Nowakowska J., (1998), *Acta Physiol. Plantarum*, 20 (1), 19-33.
12. Rogers S. G., Horsh R. B., Fraley R. T., (1988), *Gene transfer in plants using Ti plasmid vectors*, in: *Methods for plant molecular biology*, 26, 423-436, Eds. A. Weissbach, H. Weissbach, Harcourt Brace Jovanovich Publishers, Academic Press Inc. New York, 423-436.
13. Jefferson R. A., (1987), *Plant Mol. Biol. Reporter*, 5, 387-405.
14. Ballas N., Wong L-M., Theologis A., (1993), *J. Mol. Biol.*, 233, 580-596.
15. Liu Z. B., Ulmasov T., Shi X., Hagen G., Guilfoyle T. J., (1994), *The Plant Cell*, 6, 645-657.
16. Ulmasov T., Hagen G., Guilfoyle T., (1994), *Plant Mol. Biol.*, 26, 1055-1064.
17. Ulmasov T., Liu Z. B., Hagen G., Guilfoyle T. J., (1995), *Plant Cell*, 7, 1611-1623.
18. Kubowicz D., Jankiewicz L. S., (1997), *Regulatory wzrostu i rozwoju roślin. Właściwości i działanie*, PWN, Warszawa, 236-249.
19. Carpita N., McCaan M., Griffing L. R., (1996), Meeting Report, *The Plant Cell*, (Sept.), 1451-1463.
20. Mehdy M. C., Sharma Y. K., Sathasivan K., Bays N. W., (1996), *Physiol. Plant.*, 98, 365-374.
21. Gelli A., Higgins V. J., Blumwald E., (1997), *Plant Physiol.*, 113, 269-279.
22. Tretny A., Jankiewicz L. S., (1997), *Regulatory wzrostu i rozwoju roślin. Właściwości i działanie*, PWN, Warszawa, 226-235.
23. Lewak S., Kopcewicz J., Lewak S., (1998), *Podstawy fizjologii roślin*, PWN, Warszawa, 130.
24. Hurkman W. J., Tanaka C. K., (1996), *Plant Physiol.*, 110, 971-977.
25. deRocher A. E., Helm K. W., Lauzon L. M., Vierling E., (1991), *Plant Physiol.*, 96, 1038-1947.
26. Prasad T. K., Anderson M. D., Artin B. A., Stewart C. R., (1994), *The Plant Cell*, 6, 65-74.
27. Howden R., Andersen C. R., Goldsbrough P. B., Cobbett C. S., (1995), *Plant Physiol.*, 107, 1067-1073.
28. Czarnecka E., Nagao R. T., Key J. L., Gurley W. B., (1988), *Mol. and Cell. Biol.*, 3, 1113-1122.
29. Fobis-Loisy I., Loridon K., Lobréaux S., Lebrun M., Briat J-F., (1995), *Eur. J. Biochem.*, 231, 609-619.
30. Kampfinkel K., van Montagu M., Inzé D., (1995), *Plant Physiol.*, 107, 725-735.
31. Lobréaux S., Thoiron S., Briat J-F., (1995), *The Plant J.*, 8, 443-449.
32. Cumming J. R., Taylor G. J., (1990), *Stress responses in plants: adaptation and acclimation mechanisms*, Wiley-Liss Inc., New York, 329-356.
33. Pietras T., Małolepsza U., Witusik A., (1997), *Wiad. Bot.*, 41, 3/4, 43-50.
34. Esaka M., Fujisawa K., Goto M., Kisu Y., (1992), *Plant Physiol.*, 100, 231-237.
35. Domon J. M., Dumas B., Laine E., Meyer Y., David A., David H., (1995), *Plant Physiol.*, 108, 141-148.