



Wykorzystanie interferencji RNA w biotechnologii zbóż

Anna Nadolska-Orczyk, Wojciech Zalewski, Sebastian Gasparis, Wacław Orczyk

Zakład Inżynierii Komórkowej i Transformacji, Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin, Państwowy Instytut Badawczy, Radzików

Application of RNA interference for cereal crops biotechnology

Summary

RNAi technology is based on a natural process of RNA-directed gene regulation. The technique is widely used for gene functional analysis and to obtain plants with modified traits. The main advantage of this system, particularly when applied for polyploid species, is the possibility of simultaneous silencing of homologous, homoeologous or orthologous genes.

The article discusses the results of relatively few papers where RNAi has been used for functional analysis of native genes of wheat and barley. The main part of the article presents the research on RNAi based gene silencing in cereals performed by our group. The experimental basis of our work was the elaboration of efficient *Agrobacterium*-based transformation and plant regeneration systems of different cereal species (wheat, barley, triticale and oat). Currently, the method is applied for modification of two types of traits in wheat, triticale and barley. The first one is a technological trait related to cereal grain hardness. It is genetically controlled by *Pina* and *Pinb* genes. We obtained over a hundred transgenic lines with various degrees of *Pina* and *Pinb* silencing. Currently, the lines are being analyzed for the amount of PINA and PINB proteins, composition of storage proteins, and the grain texture. The second set of traits depends on *CKX* genes encoding cytokinin oxidase/dehydrogenase – the part of the system specifically governing the cytokinin level in different organs and developmental stages. We obtained over forty barley transgenic lines with silenced *HvCKX1*. This modification was found to be tightly correlated with enhanced plant productivity measured as the higher grain number and higher mass of a thousand kernels. The T₁ and T₂ transgenic seedlings developed bigger root system.

Adres do korespondencji

Anna Nadolska-Orczyk,
Zakład Inżynierii
Komórkowej
i Transformacji,
Instytut Hodowli
i Aklimatyzacji Roślin,
Radzików,
05-870 Błonie.

biotechnologia

3 (90) 53–63 2010

Key words:

RNAi, cereals, wheat, barley, gene silencing.

1. RNAi u roślin

Odkrycie procesu interferencji RNA (RNAi) jest jednym z największych osiągnięć biologii molekularnej ostatnich kilkunastu lat. Pozwoliło ono poznać nowe mechanizmy regulacji genetycznej, zaferowało potężne narzędzie badawcze i jednocześnie stworzyło bardzo konkretne możliwości aplikacyjne.

Pierwsze wyniki wskazujące na istnienie nowego rodzaju regulacji genetycznej pochodzą z badań ekspresji syntazy chalkonowej, enzymu szlaku biosyntezy antocyjanów, w transgenicznej petunii (1). Van der Krol i wsp. (2) zaobserwowali, że dodatkowa kopia genu kodującego ten enzym w transgenicznych roślinach powodowała, zamiast spodziewanej ciemniejszej barwy kwiatów, wykształcenie kwiatów bezbarwnych. Efekt ten określono terminem 'kosupresja', lub 'wyciszanie potranskrypcyjne' w skrócie PTGS (*Post-Transcriptional Gene Silencing*). Termin 'interferencja RNA' (RNAi) został pierwszy raz zaproponowany przez Fire i wsp. (3) na określenie wyciszenia ekspresji sterowanej przez dsRNA u *Ceanorhabditis elegans*.

W badaniach mechanizmu interferencji RNA wykazano, że we wszystkich przypadkach główną rolę odgrywały krótkie, 18-26-nukleotydowe, dwuniciowe RNA (dsRNA). Jest to grupa bardzo heterogenna, w której, dla zastosowań biotechnologicznych najważniejsze są krótkie interferujące RNA (siRNA). Powstają one w wyniku specyficznego cięcia dowolnej cząsteczki dwuniciowego RNA (dsRNA) na przykład dsRNA będącego transkryptem odpowiedniego transgeny. Homologia siRNA do jakiegokolwiek transkryptu (RNA) inicjuje proces jego degradacji. Efektem jest potranskrypcyjne wyciszanie ekspresji (PTGS). Homologia siRNA do DNA promotora skutkuje jego metylacją. Konsekwencją jest inaktywacja promotora i wyciszenie transkrypcyjne (TGS) (4).

Duża skuteczność oraz wysoka specyficzność tych procesów są głównymi atutami RNAi w genomice funkcjonalnej i biotechnologii. Wykazano, że RNAi było indukowane po wprowadzeniu transgeny, którego przejściowa lub stała ekspresja prowadziła do akumulacji dsRNA lub RNA o strukturze spinki do włosów – hpRNA (ang. *hairpin RNA*) (5, 6). Homologia dsRNA / hpRNA do promotora indukowało sekwencyjnie-specyficzną metylację DNA promotora (RdDM), prowadząc do wyciszenia transkrypcyjnego (7).

Pierwsze prace dokumentujące skuteczne wyciszanie ekspresji różnych genów endogennych przy użyciu transgenów kodujących hpRNA ukazały się w 2000 r. (8-10). Opracowano różne systemy wektorów umożliwiające wprowadzenie do genomu rośliny transgeny z fragmentem określonego genu w orientacji sensowej i antysensowej (11,12, <http://www.chromdb.org/rnai/pMCG161.html>), którego ekspresja prowadziła do powstania hpRNA. Udokumentowano, że użycie małego fragmentu genu lub jego elementu regulacyjnego jest wystarczające do uzyskania wyciszenia. Bazy z sekwencjami kodującymi i regulatorowymi mogą być bezpośrednio wykorzystane do analizy funkcjonalnej lub do wyciszenia ekspresji i uzyskiwania roślin o korzystnych cechach użytkowych.

Ważnym narzędziem w genomice funkcjonalnej jest wyciszanie indukowane wirusem – VIGS (*Virus Induced Gene Silencing*). Polega ono na lokalnym wprowadzeniu do komórki roślinnej odpowiednio skonstruowanego wektora warunkującego przejściową ekspresję i akumulację określonych dsRNA. Systemiczne roznoszenie sygnału pozwala wyciszać określony gen i obserwować efekt fenotypowy w wielu częściach rośliny. Eksperymentalne systemy VIGS zaproponowano dla roślin jedno- (13,14) i dwuliściennych (15,16).

2. Zalety badawcze metody RNAi są szczególnie cenne u zbóż

Analiza funkcjonalna genów była dotychczas głównie prowadzona z użyciem mutantów typu utraty funkcji. Dla gatunków modelowych o małych genomach (takich jak *Arabidopsis thaliana*) istnieją liczne kolekcje takich mutantów. Uzyskanie takich kolekcji dla roślin uprawnych jest w większości przypadków praktycznie niemożliwe. Ponadto, na podstawie analizy genomu *A. thaliana* wskazuje się, że 65% genów kodujących białka występuje w postaci kilku kopii (17). W tej sytuacji identyfikacja mutanta, w którym obserwujemy zmianę lub utratę określonej funkcji jest bardzo trudna lub niemożliwa nawet w roślinie modelowej. Ukierunkowane wyciszanie ekspresji genów, wykorzystujące mechanizm RNAi skutecznie rozwiązuje ten problem. Możliwość wyboru odpowiedniego fragmentu wyciszającego oraz rodzaju wyciszenia (transkrypcyjne lub potranskrypcyjne) pozwala modulować siłę sygnału wyciszającego i/lub precyzyjnie wyciszyć gen pojedynczy lub grupę genów. Geny należące do rodziny genów są w dużej mierze homologiczne, zatem wybór odpowiedniej sekwencji wyciszającej pozwala na wyciszenie jednego lub wielu genów z tej rodziny. Przykładem jest wyciszanie rodziny genów *OsRac* w ryżu przy użyciu silnie konserwowanych fragmentów wybranych z dwóch genów z tej rodziny (18).

Genomy zbóż są bardzo duże, a w przypadku gatunków poliploidalnych dodatkowo złożone z homeologicznych genomów diploidalnych. Genomy alloheksaploidalnej pszenicy, pszenżyta czy owsa są prawie 100-krotnie większe niż genom *A. thaliana* i 34 razy większe niż genom ryżu (19). Zwielokrotnienie genów homologicznych, homeologicznych i ortologicznych u tych gatunków jest bardzo duże i uzyskanie mutanta danej cechy staje się niemożliwe. Wyciszanie ekspresji takich genów metodą RNAi, która teoretycznie pozwala wyciszyć każde mRNA mające homologie z krótkimi siRNA jest praktycznie jedyną skuteczną metodą. Po raz pierwszy zostało to potwierdzone w badaniach genu *DDM1* u sztucznego tetraploida rośliny modelowej *Arabidopsis suecica*. Transformacja pojedynczą kasetą wyciszającą tego genu powodowała hamowanie ekspresji jego wielokrotnych ortologów (20). Dodatkowo, obraz regulacji ekspresji genów u gatunków poliploidalnych jest szczególnie złożony w przypadku rodzin genów. Obserwowana u pszenicy korelacja ilości mRNA wyciszanych genów *PDS* i *EIN2*, kodujących desaturazę fitoenuową i białko sygnałne etylenu z poziomem wyciszenia sugeruje, że efekt RNAi zależy prawdopo-

dobnie od dawki kaset wyciszających (21). Uzyskanie roślin o wyciszaniu słabym, pośrednim i silnym daje większe możliwości analizy, zwłaszcza w przypadku kiedy brak białka jest skorelowany z letalnością. Bardzo dużą zaletą metody RNAi jest wspomniana możliwość jej wykorzystania, wówczas gdy znany jest jedynie fragment sekwencji kodującej (znacznik transkrypcji – EST) lub sekwencji regulatorowej danego genu. Wprowadzenie kasety wyciszającej poprzez stabilną transformację umożliwi analizę cech w czasie rozwoju rośliny oraz ich przekazywanie do następnych pokoleń.

3. Analiza cech w zbożach

Analiza funkcjonalna genów z wykorzystaniem metody RNAi u zbóż jest nadal w początkowej fazie aplikacji. Skonstruowanie kasety wyciszającej określony gen, dysponując wcześniej opracowanymi systemami wektorów i wiedzą o sekwencji wyciszanego genu jest zadaniem stosunkowo łatwym. Obecnie głównym czynnikiem limitującym szerokie zastosowanie tej metody jest brak prostych i wydajnych metod genetycznej transformacji zbóż. Ponadto długi cykl życiowy tych roślin i konieczność weryfikacji wyników w kilku pokoleniach generatywnych znacznie wydłuża te badania.

3.1. Diploidalne gatunki zbóż – jęczmień

Do najważniejszych diploidalnych gatunków zbóż należą: ryż (modelowy gatunek rośliny zbożowej) oraz kukurydza i jęczmień. Obiektem naszych badań jest głównie jęczmień – gatunek ekonomicznie ważny, hodowany i szeroko uprawiany w Polsce. Dotychczas ukazało się zaledwie kilka publikacji, w których opisano wykorzystanie metody RNAi u tego gatunku.

W pierwszej publikacji wykorzystano kasetę wyciszającą, której ekspresja prowadziła do powstania hpRNA wybranego fragmentu genomu wirusa żółtej karłowatości jęczmienia (BYDV-PAV). Uzyskane transgeniczne linie były wysoce i jednocześnie specyficznie odporne na tego wirusa (9).

Wyciszenie ekspresji jest ważnym narzędziem badania funkcji genu. Ta strategia została wykorzystana do analizy funkcji genu *Jekyll*. Badania zmian fenotypowych w roślinach z obniżoną od 20 do 100% ekspresją tego genu pozwoliło wnioskować o istotnej roli białka JEKYLL w programowanej śmierci komórek i rozwoju nasion jęczmienia (22).

Stosując podobną metodę badano funkcję genu *MSH7* jęczmienia, o którym sądzono, że podobnie jak *Ph2* u pszenicy, kontroluje parowanie chromosomów oraz procesy rekombinacji i naprawy DNA. Wyciszenie ekspresji *MSH7* pozytywnie zwerfikowało te przypuszczenia i potwierdziło istotną rolę tego genu w przebiegu me-

jozy (23). Podobnie Gubler i wsp. (24) zastosowali metodę RNAi do sprawdzenia roli genu *HvABA8'OH1* w procesach warunkujących spoczynek nasion.

3.2. Gatunki poliploidalne

Do poliploidalnych, rodzimych gatunków zbóż należą: pszenica (*Triticum aestivum* L.), pszenżyto (\times *Triticosecale* Wittmack) i owies (*Avena sativa* L.). Badania prowadzone w laboratoriach na świecie koncentrują się wokół pszenicy, gatunku o bardzo dużym znaczeniu gospodarczym.

Pierwsze doniesienie, w którym użyto stabilnej transformacji do wyciszania genów natywnych pszenicy dotyczyło genu odpowiedzialnego za wernalizację, *VRN2* z *T. monococcum* L (25). Wprowadzenie kasety RNAi zawierającej 347 pz tego genu spowodowało obniżenie (do 60%) ilości transkryptów wszystkich homologów *VRN2* w allotetraploidalnej pszenicy i przyspieszało czas kwitnienia roślin. Ta sama strategia i wyciszenie *VRN1*, genu warunkującego kwitnienie po wernalizacji, pozwoliła na redukcję ilości transkryptu o 80% i opóźnienie czasu kwitnienia o 2 tygodnie (26).

Inną grupą cech modyfikowanych przy użyciu metody RNAi była zawartość i skład frakcji skrobi (tj. amylozy i amylopektyny) w ziarnie pszenicy. Geny *SBEII* kodują dwie izoformy enzymu syntezy amylopektyny. Regina i wsp. (27) skonstruowali kasety specyficznie wyciszające jeden lub obydwa geny *SBEII*. W obydwu przypadkach wykazano redukcję białka do poziomu 10% roślin kontrolnych, przy czym zgodnie z oczekiwaniem, pierwsza konstrukcja wyciszała ekspresję tylko jednego, a druga obydwu genów. Ziarna linii transgenicznych miały zredukowaną zawartość amylopektyny i podwyższoną zawartość amylozy. W badaniach na szczurach wykazano, że zmiana ta jest potencjalnie korzystna żywieniowo.

W innych pracach wykorzystujących metodę RNAi skoncentrowano się na jednoczesnym wyciszeniu wielu homeologów wybranych genów. Travella i wsp. (21) badali wyciszenie *PDS* i *EIN2* obecnych w każdym z trzech genomów A, B i D alloheksaploidalnej pszenicy. Do wyciszania użyto fragmentów genów o długości około 500 pz, wykazujących 96% podobieństwa do trzech homeologicznych kopii. W liniach transgenicznych ilość transkryptów wahała się od 10 do 80% w stosunku do kontroli i było to skorelowane z nasileniem zmian fenotypowych. W transgenicznych liniach homozygotycznych wyciszenie było silniejsze niż w liniach hemizygotycznych co wskazuje, że w heksaploidalnej pszenicy efekt RNAi zależy od dawki transgeny (liczby kaset). Uauy i wsp. (28) analizowali funkcję wielu homologicznych kopii genów *NAM* pszenicy. W otrzymanych roślinach, charakteryzujących się zredukowaną (od 30 do 60%) ilością transkryptów tych genów obserwowano opóźnienie procesów starzenia oraz obniżenie zawartości białek i mikroelementów (cynku i żelaza) w ziarniakach. Wykorzystując metodę RNAi Yue i wsp. (29) potwierdzili, że podjednostka gluteniny 1Dx5 (produkt genu *1Dx5*) istotnie wpływa na jakość ciasta, a Gil-Humanes i wsp. (30) otrzymali rośliny o zredukowanej zawartości γ -gliadyn.

W prawie wszystkich opisanych badaniach stosowano metodę biolisticzną. Jedynie w pracy Regina i wsp. (27) posłużono się *Agrobacterium*. W większości prac uzyskano zaledwie kilka transgeniczných linii, w których wyciszenie ekspresji wahało się od 20 do 90%. Wszystkie cytowane prace potwierdzają ogromne możliwości badawcze i aplikacyjne metody RNAi.

4. Badania prowadzone w Zakładzie Inżynierii Komórkowej i Transformacji

4.1. Opracowanie metod transformacji i badania wstępne

Technologia wyciszania genów wymaga użycia metody transformacji genetycznej. W 2000 r., kiedy rozpoczynaliśmy badania na zbożach, do transformacji używano głównie metody biolisticznej (mikrowstrzeliwania). Zalety metody transformacji genetycznej przy użyciu *Agrobacterium*, mimo że wówczas nie była jeszcze dopracowana u zbóż, przekonały nas do jej wyboru (31) i do opracowania wydajnych metod regeneracji roślin (32). Ustaliliśmy warunki transformacji za pomocą *Agrobacterium* polskich odmian pszenicy: Kontesa, Torka (33), jęczmienia: Golden Promise, Scarlett (nie publikowane) oraz jako pierwsi opracowaliśmy je dla polskiej odmiany pszenicy-ta Wanad (34) i odmian owsa: Bajka, Sławko, Act (35).

Pierwsze eksperymenty wyciszania przeprowadzono na uzyskanych wcześniej transgeniczných zbożach wykazujących ekspresję genu reporterowego *gus* oraz genu selekcyjnego *nptII* – obydwu pod kontrolą promotora 35S. Celem wyciszania stał się wspólny promotor i dlatego zastosowano w tym przypadku strategię wyciszania transkrypcji (TGS). Użyta w tych badaniach kasetta wyciszająca zawierała promotor *p_{mas}* i dwa odwrócone fragmenty promotora 35S z sekwencjami wzmacniającymi rozdzielone intronem (36). Ekspresję transgenów wyciszano poprzez transformację tą konstrukcją transgeniczných roślin lub wprowadzenie jej do roślin dzikich, które następnie były krzyżowane z roślinami wykazującymi ekspresję. W obydwu przypadkach uzyskano wyciszenie ekspresji transgenów, a efekt wyciszenia był przekazywany do następnego pokolenia (Nadolska-Orczyk, nie publikowane).

4.2. Kierunkowe wyciszanie genów natywných zbóż

Obecnie badania nad kierunkowym wyciszaniem genów natywných prowadzimy dla dwóch cech. Pierwsza jest cechą jakościową, związaną z twardością ziarna u zbóż. Jest ona głównie warunkowana dwoma genami *Pina* i *Pinb*. Druga jest cechą ilościową, kodowaną przez rodzinę genów *CKX*, które regulują poziom cytokinin w różnych organach i tkankach, i tym samym biorą udział w różnych procesach roz-

wojowych roślin. W obydwu przypadkach wspólnym elementem jest sposób wyciszenia prowadzący do degradacji transkryptu (PTGS). W badaniach używany jest wektor binarny pMCG161, skonstruowany z myślą o zbożach (<http://www.chromdb.org/rnai/pMCG161.html>). Zawiera on kasetę selekcyjną genu *bar* pod promotorem zbożowym Ubi1 pochodzącym z kukurydzy oraz miejsca restrykcyjne do wprowadzenia fragmentów wyciszanych genów w orientacji sensowej i antysensowej.

4.3. Badania nad wyciszaniem genów *Pina* i *Pinb*

Twardość ziarna jest ważną cechą technologiczną. W pszenicy alloheksaploidalnej *T. aestivum* L., uprawianej w Polsce i dominującej w uprawie na świecie, jest ona głównie warunkowana dwoma genami *Pina* i *Pinb* zlokalizowanymi w genomie D. Geny te kodują puroindolinę a (PINA) i puroindolinę b (PINB). PINA i PINB są dwoma podjednostkami friabiliny – białka obecnego we frakcji skrobiowej endospermu i warstwie aleuronowej dojrzałych ziarniaków. Brak tego białka powoduje twardość ziarniaków, co z kolei warunkuje określone cechy technologiczne mąki. Zarówno geny puroindolinowe, ich ortologi oraz kodowane przez nie białka puroindolinopodobne występują w niektórych genomach Triticeae i Aveneae. Są one obecne w genomach: H jęczmienia, R żyta i pszenżyta i D owsa. Brak tych genów w niektórych genomach diploidalnych i tetraploidalnych zbóż determinuje twardość ziarna. Przykładem jest uprawiana w basenie Morza Śródziemnego pszenica tetraploidalna *Triticum turgidum* var. *durum* (AABB) przeznaczana głównie do produkcji makaronów, kaszy kuskus itp. Mutacje genów *Pin* powodują wykształcenie ziarna o różnym stopniu twardości (37).

Wybraliśmy ten prosty model genetyczny do analizy samego efektu wyciszenia metodą RNAi jak również ze względu na wartość użytkową warunkowanej przez te geny cechy. Chcemy sprawdzić czy jest możliwe całkowite wyciszenie obydwu genów i czy pozwoli to uzyskać ziarno tak twarde jak u pszenicy durum. Jak ta modyfikacja wpłynie na zawartość innych białek w ziarniakach i ich wartość technologiczną? Czy występuje sugerowany związek pomiędzy białkami puroindolinowymi a odpornością na patogeny?

Badania nad wyciszaniem genów *Pin* prowadzimy u dwóch odmian pszenicy, Kontesa i Torka oraz odmianie pszenżyta Wanad. Zostały skonstruowane dwie kasety wyciszające, do wyciszenia genu *Pina* i w osobnym wektorze dla genu *Pinb*. Rośliny były transformowane wektorami zawierającymi pojedyncze kasety i kotransformowane obydwoma wektorami. Po wielu eksperymentach wyselekcjonowaliśmy 150 roślin T₀ reprezentujących wszystkie kombinacje. Obecność T-DNA sprawdzano wieloma niezależnymi testami PCR z użyciem specyficznych starterów. Funkcjonalność wprowadzonych kaset weryfikowano badając obecność i ilość transkryptów genu selekcyjnego *bar* metodą półilościowego RT-PCR.

W celu wykonania prawidłowych analiz wyciszenia, charakteryzowano allele genów *Pina* i *Pinb* w badanych odmianach. Poznano ich sekwencję nukleotydową oraz

zbadano ekspresję w dojrzewających ziarniakach. Najsilniejszą ekspresję obserwowano od 20 do 26 dni po zapyleniu (DAP), niezależnie od odmiany. Te stadia rozwoju ziarniaków wybrano do analizy w wyciszonych liniach. W wyniku przeprowadzonej analizy sekwencji badanych genów w odmianach Kontesa i Torka wykazano, że allel *Pina* jest typu dzikiego, a allel *Pinb* zawiera mutację punktową, prowadzącą do zamiany aminokwasu leucyny na prolinę w pozycji 60 (mutacja *Pinb-D1c*). Jest to opisana mutacja, często występująca w pszenicach europejskich, nie prowadząca do utraty białka (38). Analizę ekspresji obydwu genów *Pina* i *Pinb* przeprowadzono w ziarniakach 20 i 26 DAP w transgenicznym liniach T₁ i T₂ obydwu odmian pszenicy i jednej odmiany pszenżyta. Część linii wykazywała całkowite lub częściowe wyciszenie ekspresji obydwu genów. Na podstawie pomiarów ilości białek izolowanych z frakcji skrobi zawierającej PINA i PINB wykazano występowanie u większości linii korelacji pomiędzy zawartością ekstrahowanej frakcji białka i poziomem transkryptów obydwu genów. Metoda (SDS-PAGE) rozdziału białek tej frakcji na dwuwarstwowym żelu pozwoliła na separację PINA i PINB. Białko całkowite w wyciszonych liniach nie uległo obniżeniu. Na podstawie tych analiz wytypowano pojedynki do dalszych badań.

4.4. Badania nad wyciszaniem genów z rodziny *HvCKX* jęczmienia i *TaCKX* pszenicy i pszenżyta

Geny *CKX* należące do rodziny genów, występują u różnych gatunków roślin. Kodują one enzymy oksydaz/dehydrogenaz cytokinin regulujące endogenne poziomy cytokinin w roślinach. Cytokiny, jako regulatory wzrostu, biorą udział w wielu etapach wzrostu i rozwoju rośliny, m. in. kontroli formowania i wzrostu pąków bocznych u ryżu (39). Zróżnicowane profile ekspresji poszczególnych genów i subkomórkowa lokalizacja ich produktów sugerują zróżnicowane funkcje w poszczególnych organach (40,41). Poszczególne enzymy *CKX* różnią się właściwościami biochemicznymi, w szczególności powinowactwem substratu do różnych cytokinin (42). Funkcje genów z rodziny *CKX* zostały dotąd scharakteryzowane w gatunku modelowym *A. thaliana* (43,44) i w niektórych zbożach: ryżu (39) i kukurydzy (45-48). W pozostałych gatunkach zbóż niektóre geny zostały sklonowane, ale ich funkcja jest poznana bardzo słabo lub jest nieznaną. U jęczmienia są to geny *HvCKX2* i *HvCKX3* (49) a u pszenicy *TaCKX1*, *TaCKX2* i *TaCKX5* (50-52). Te ostatnie sklonowano w ostatnich latach.

Nasze badania nad kierunkowym wyciszaniem genów z rodzin *CKX* u jęczmienia, pszenicy i pszenżyta rozpoczynaliśmy w 2006 r. przy współpracy z zespołem dr P. Galuszki (Uniwersytet Palacki, Olomouc, Czechy). Do doświadczeń wybraliśmy geny *HvCKX1* (fragment sekwencji z baz danych NCBI), *HvCKX2* jęczmienia sklonowany przez współpracujący zespół (49) oraz *TaCKX1* pszenicy (fragment sekwencji z baz danych NCBI). Do kaset wyciszających wektora pMCG161 klonowaliśmy różne

fragmenty sekwencji kodujących wybranych genów. Pierwsza zawierała fragment 413 pz *HvCKX1* (NCBI nr AF362472). W drugiej umieściliśmy fragment konserwatywny genu *HvCKX2* o długości 289 pz. Trzecia kasetka do wyciszania genu *TaCKX1* ma wbudowany fragment 740 pz (NCBI nr AF362471 i CJ682441). Transformowaliśmy pięć odmian trzech gatunków zbóż: jęczmienia, pszenicy i pszenżyta. Transgeniczne rośliny otrzymaliśmy u odmiany jęczmienia Golden Promise, odmiany pszenicy Kontesa i pszenżyta Wanad. Dotąd przeanalizowaliśmy wyciszenie w 52 liniach Golden Promise, transformowanych kasetą wyciszającą genu *HvCKX1*. W prawie 80% wyselekcjonowanych linii stwierdzono istotnie obniżoną względną aktywność enzymu dehydrogenazy/oksydazy cytokininy w korzeniach siewek T_1 . Analiza wyciszania badanego genu wymagała przeprowadzenia pomiarów akumulacji transkryptu genu *HvCKX1* w różnych tkankach/organach roślin dzikich. Badano organy 5-dniowych siewek oraz liście, kwiatostany i kłosa w różnych stadiach rozwoju w dwóch badanych odmianach Golden Promise i Scarlett. Najwyższy poziom akumulacji transkryptu *HvCKX1* stwierdzono w rozwijających się kłosach w dniu zapylenia (0 DAP) oraz 7 i 14 DAP, a także w korzeniach siewek. Te organy zostały wybrane do analizy wyciszania w roślinach transgenicznych. Pełną analizę ekspresji genu *HvCKX1*, aktywności enzymu CKX i zmian fenotypowych przeprowadzono w segregującym potomstwie T_1 otrzymanym z siedmiu transgenicznych linii. Względna ekspresja *HvCKX1* mierzona w kłosach 0 DAP i 14 DAP wahała się w granicach od 0,47 do 1,15. Obserwowany w niektórych roślinach 50% spadek ilości transkryptu warunkował znacznie niższą aktywność enzymu CKX w segregującym potomstwie. W roślinach tych względne wartości aktywności enzymu wahały się od 0,15 do nieco powyżej 1,00. Bardzo interesująca i potencjalnie ważna użytkowo okazała się korelacja pomiędzy obniżoną aktywnością enzymu i zwiększoną produktywnością roślin obserwowaną, jako większa liczba nasion i/lub większa masa tysiąca nasion w pokoleniu T_0 i T_1 . Ponadto cechy te były związane z wyższą masą korzenia w 5-dniowych siewkach potomstwa T_1 i T_2 . Potwierdziliśmy, że otrzymane fenotypy były stabilnie dziedziczne w dwóch – trzech pokoleniach i zawsze obserwowano korelację zmian na poziomie molekularnym ze zmianami fenotypowymi.

W przedstawionych wynikach badań własnych udokumentowaliśmy znaczne możliwości wykorzystania metody RNAi do analizy funkcji genów oraz do otrzymania roślin o nowych, korzystnych cechach agronomicznych. Nasze badania wykonujemy głównie z użyciem polskich odmian zbóż: pszenicy, pszenżyta, owsa, jęczmienia, ponieważ mogą one być użyte w programach hodowlanych. Jako pierwsi udokumentowaliśmy, że wyciszenie genu *HvCKX1* pozytywnie wpływa na produktywność roślin jęczmienia (53,54). Przedstawione wyniki badań nad wykorzystaniem procesu RNAi do stabilnego wyciszenia ekspresji genów w pszenicy, pszenżycie i jęczmieniu są jednymi z nielicznych, które dotychczas ukazały się w literaturze światowej (rozd. 3).

Badania finansowane z projektów: N302 013 31/1517, CZECHY/259/2006, 620/N-COST/09/2010, PBZ-MNiSW-2/3/2006/31, PBZ-MNiSW-2/3/2006/23.

Literatura

1. Napoli C., Lemieux C., Jorgensen R., (1990), *Plant Cell.*, 2, 279-289.
2. van der Krol A. R., Mur L. A., Beld M., Mol J. N., Stuitje A. R., (1990), *Plant Cell.*, 2, 291-309.
3. Fire A., Xu S., Montgomery M. K., Kostas S. A., Driver S. E., Mello C. C., (1998), *Nature*, 391, 806-811.
4. Baulcombe D., (2004), *Nature*, 431, 365-363.
5. Brummelkamp T. R., Bernards R., Agami R., (2002), *Science*, 296, 550-553.
6. Tuschl T., (2002), *Nat. Biotechnol.*, 20, 446-448.
7. Mette M. F., Aufsatz W., van der Winden J., Matzke M. A., Matzke A. J., (2000), *EMBO J.*, 19, 5194-5201.
8. Levin J. Z., de Framond A. J., Tuttle A., Bauer M. W., Heifetz P. B., (2000), *Plant Mol. Biol.*, 44, 759-775.
9. Wang M. B., Abbott D. C., Waterhouse P. M., (2000), *Mol. Plant Pathol.*, 1, 347-356.
10. Chuang C. F., Meyerowitz E. M., (2000), *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 97, 4985-4990.
11. Wesley S. V., Helliwell C. A., Smith N. A., Wang M. B., Rouse D. T., Liu Q., Gooding P. S., Singh S. P., Abbott D., Stoutjesdijk P. A., Robinson S. P., Gleave A. P., Green A. G., Waterhouse P. M., (2001), *Plant J.*, 27, 581-590.
12. Himmelbach A., Zierold U., Hensel G., Riechen J., Douchkov D., Schweizer P., Kumlehn J., (2007), *Plant Physiol.*, 145, 1192-1200.
13. Lacomme C., Hrubikova K., Hein I., (2003), *Plant J.*, 34, 543-553.
14. Scofield S. R., Huang L., Brandt A. S., Gill B. S., (2005), *Plant Physiol.*, 138, 2165-2173.
15. Faivre-Rampant O., Gilroy E. M., Hrubikova K., Hein I., Millam S., Loake G. J., Birch P., Taylor M., Lacomme C., (2004), *Plant Physiol.*, 134, 1308-1316.
16. Brigneti G., Martín-Hernández A. M., Jin H., Chen J., Baulcombe D. C., Baker B., Jones J. D., (2004), *Plant J.*, 39, 264-272.
17. Arabidopsis Genome Initiative, (2000), *Nature*, 408, 796-815.
18. Miki D., Itoh R., Shimamoto K., (2005), *Plant Physiol.*, 138, 1903-1913.
19. Moore G., (2000), *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 51, 195-222.
20. Lawrence R. J., Pikaard C. S., (2003), *Plant J.*, 36, 114-121.
21. Travella S., Klimm T. E., Keller B., (2006), *Plant Physiol.*, 142, 6-20.
22. Radchuk V., Borisjuk L., Radchuk R., Steinbiss H-H., Rolletschek H., Broeders S., Wobus U., (2006), *Plant Cell*, 18, 1652-1666.
23. Lloyd A. H., Milligan A. S., Langridge P., Able J. A., (2007), *BMC Plant Biology*, 7, 67-76. doi:10.1186/1471-2229-7-67.
24. Gubler F., Hughes T., Waterhouse P., Jacobsen J., (2008), *Plant Physiol.*, 147, 886-896.
25. Yan L., Loukoianov A., Blechl A., Tranquilli G., Ramakhrisna W., SanMiquel P., Bennetzen J. L., Eche-
nique V., Dubcovsky J., (2004), *Science*, 303, 1640-1644.
26. Loukoianov A., Yan L., Blechl A., Sanchez A., Dubcovsky J., (2005), *Plant Physiol.*, 138, 2364-2373.
27. Regina A., Bird A., Topping D., Bowden S., Freeman J., Barsby T., Kosar-Hashemi B., Li Z., Rahman S., Morell M., (2006), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103, 3546-3551.
28. Uauy C., Distelfeld A., Fahima T., Blechl A., Dubcovsky J., (2006), *Science*, 314, 1298-1301.
29. Yue H., Jiang D., Dai T., Qin X., Jing Q., Cao W., (2008), *J. Cereal Sci.*, 47, 153-161.
30. Gil-Humanes J., Pistón F., Hernando A., Alvarez J. B., Shewry P. R., Barro F., (2008), *J. Cereal Sci.*, 48, 565-568.
31. Nadolska-Orczyk A., Orczyk W., (2000), *Mol. Breed.*, 6, 185-194.
32. Przetakiewicz A., Orczyk W., Nadolska-Orczyk A., (2003), *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 73, 245-256.
33. Przetakiewicz A., Karas A., Orczyk W., Nadolska-Orczyk A., (2004), *Cell. Mol. Biol. Lett.*, 9, 903-917.
34. Nadolska-Orczyk A., Przetakiewicz A., Kopera K., Binka A., Orczyk W., (2005), *J. Plant Growth Reg-
ul.*, 24, 2-10.
35. Gasparis S., Bregier C., Orczyk W., Nadolska-Orczyk A., (2008), *Plant Cell Rep.*, 27, 1721-1729.
36. Sijen T., Vijn I., Rebochoa A., van Blokland R., Roelofs D., Mola J. N. M., Kooter J. M., (2001) *Curr.
Biol.*, 11, 436-440.

37. Nadolska-Orczyk A., Gasparis S., Orczyk W., (2009), *J. Appl. Genet.*, 50, 185-197.
38. Lillemo M., Morris C. F., (2000), *Theor. Appl. Genet.*, 100, 1100-1107.
39. Ashikari M., Sakakibara H., Lin S., Yamamoto T., Takashi T., Nishimura A., Angeles E.R., Quian Q., Kitano H., Matsuoka M., (2005), *Science*, 309, 741-745.
40. Schmölling T., Werner T., Riefler M., Krupková E., Bartrina y Manns I., (2003), *J. Plant Res.*, 116, 241-252.
41. Werner T., Schmölling T., (2009), *Curr Opin Plant Biol.*, 12, 527-538.
42. Galuszka P., Popelkova H., Werner T., Frebortova J., Pospisilova H., Mik V., Kollmer I., Schmölling T., Frebort I., (2007), *J. Plant Growth Regul.*, 26, 255-267.
43. Bilyeu K. D., Cole J. L., Laskey J. G., Riekhof W. R., Esparza T. J., Kramer M. D., Morris R. O., (2001), *Plant Physiol.*, 125, 378-386.
44. Werner T., Motyka V., Strnad M., Schmölling T., (2001), *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 98, 10487-10492.
45. Morris R. O., Bilyeu K. D., Laskey J. G., Cheikh N. N., (1999), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 255, 328-333.
46. Houba- Hérin N., Pethe C., d'Alayer J., Laloue M., (1999), *Plant J.*, 17, 615-626.
47. Massonneau A., Houba-Hérin N., Pethe C., Madzak C., Falque M., Mercy M., Kopecny D., Majira A., Rogowsky P., Laloue M., (2004), *J. Exp. Bot.*, 55, 2549-2557.
48. Vyroubalová S., Václavíková K., Turecková V., Novák O., Smehilová M., Hluska T., Ohnoutková L., Frébort I., Galuszka P., (2009), *Plant Physiol.*, 151, 433-447.
49. Galuszka P., Frébortová J., Werner T., Yamada M., Strnad M., Schmölling T., Frébort I., (2004), *Eur. J. Biochem.*, 271, 3990-4002.
50. Zhang L., Zhang B-S., Zhou R-H., Gao L-F., Zhao G-Y., Song Y-X., Jia J-Z., (2007), *Acta Agronom. Sin.*, 33, 1419-1425.
51. Zhang L., Zhang B-S., Zhou R-H., Kong X., Gao L-F., Jia J-Z., (2008), *Sci. Agric. Sin.*, 41, 636-642.
52. Feng D-S., Wang H-W., Zhang X-S., Kong L-R., Tian J-C., Li X-F., (2008), *Plant Mol. Biol. Rep.*, 26, 143-155.
53. Nadolska-Orczyk A., Galuszka P., Zalewski W., Orczyk W., (2009), *Wniosek patentowy: zgłoszenie numer P.388118.*, Data przyjęcia: 2009-05-27.
54. Zalewski W., Galuszka P., Gasparis S., Orczyk W., Nadolska-Orczyk A., (2010), *J. Exp. Bot.*, doi:10.1093/jxb/erq052.