

## GENETYCZNA REGULACJA EMBRIOGENEZY U ROŚLIN

### GENETIC REGULATION OF PLANT EMBRYOGENESIS

Agnieszka GRABOWSKA, Marcin FILIPECKI, Anna LINKIEWICZ

Katedra Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin,  
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

*Streszczenie:* W ciągu ostatnich kilku lat osiągnięto zasadniczy postęp w identyfikowaniu genów związanych z procesem rozwoju zarodka. Badania te oparte były głównie na analizie mutantów zarodkowych modelowej rośliny - *Arabidopsis thaliana*. Duże znaczenie w badaniach nad genetyką rozwoju zarodka mają mutacje ujawniające się we wczesnych etapach embriogenezy, zwłaszcza takie, u których rozwój zarodka zatrzymany jest w ściśle określonym stadium. Analizy fenotypów takich mutantów pozwoliły na poznanie i zrozumienie mechanizmów genetycznej regulacji embriogenezy. Wiele genów współuczestniczących w procesie tworzenia roślinnego zarodka zostało już sklonowanych i dokładnie scharakteryzowanych.

(*Postępy Biologii Komórki* 2001; 28: 509-527)

*Słowa kluczowe:* embriogeneza, mutant y zarodkowe, *Arabidopsis thaliana*

*Summary:* Over the past several years, substantial progress has been made toward the identification of genes involved in the embryo development. The majority of available information is coming from the analyses of embryo mutants of model plant - *Arabidopsis thaliana*. The special interest is given to the mutations in early stages of embryogenesis including those where the development is arrested in a specific stage. Analysis of such mutants enables recognition and understanding mechanisms of genetic regulation of embryogenesis. Many genes which are involved in the plant embryo formation had been cloned and precisely characterized.

(*Advances in Celi Biology* 2001; 28: 509-527)

*Key words:* embryogenesis, embryo mutants, *Arabidopsis thaliana*

## WSTĘP

W procesie embriogenezy z zapłodnionej komórki jajowej w wyniku kolejnych podziałów powstaje zarodek, z którego rozwija się osobnik dorosły. Podczas tego procesu ekspresji ulega wiele genów, jednak tak naprawdę wciąż nie wiadomo, ile z nich działa specyficznie w rozwoju zarodka. W ostatnich latach zidentyfikowano i opisano wiele genów uczestniczących w kontroli wczesnych etapów embriogenezy zygotycznej. Badania te oparte były głównie na molekularnej i genetycznej analizie mutantów zarodkowych modelowej rośliny - rzodkiewnika (*Arabidopsis thaliana*). Rozwój zarodka u tej rośliny zachodzi według typu *Onagrad*, w którym praktycznie tylko z komórki apikalnej rozwija się zarodek właściwy.

Kolekcje mutantów, które są wykorzystywane w większości badań nad rozwojem zarodka, uzyskano między innymi przez mutagenезę indukowaną T-DNA i EMS. Szczególnie zainteresowanie poświęca się mutantom wczesnych stadiów embriogenezy oraz takim, u których rozwój zarodka jest zatrzymany w ściśle określonym stadium. Zmiany morfologiczne spowodowane przez te mutacje można podzielić na następujące klasy:

- (1) delecja części zarodka wasi apikalno-bazalnej,
- (2) zaburzenia struktury wzoru radialnego,
- (3) zmiana morfologii zarodka, siewki.

Większość z tych mutacji ujawnia się z kolei na jednym z trzech krytycznych etapów:

- (1) pierwszy podział zygoty,
- (2) tworzenie protodermy,
- (3) przejście ze stadium globularnego do sercowatego.

Analiza tych mutantów oraz ekspresji odpowiadających im genów dostarczyła wielu cennych informacji o molekularnych mechanizmach regulacji embriogenezy. Wciąż jednak liczne geny, wpływające na morfogenezę zarodka, nie są poznane. Jednym z powodów jest bez wątpienia letalny charakter mutacji tych genów.

Celem niniejszej pracy jest omówienie podstawowych mechanizmów regulujących rozwój zarodka u *Arabidopsis* oraz przedstawienie aktualnej sytuacji w zakresie molekularnej charakterystyki genów uczestniczących w procesie embriogenezy.

## PIERWOTNA POLARYZACJA ZARODKA

Zapłodniona komórka jajowa, od której rozpoczyna się proces embriogenezy, dzieli się szereg razy według określonego planu. Powstaje kulisty prazarodek, który w wyniku kolejnych podziałów komórkowych przekształca się w zarodek spolaryzowany z wykształcającą się osią pędowo-korzeniową, zwaną też osią apikalno-bazalną. Wzdłuż tej osi, wyznaczonej przez merystemy wierzchołkowe pędu i korzenia, znajdują się podstawowe struktury budujące zarodek, później siewkę oraz roślinę dorosłą. Struktury te tworzą w zarodku dość prosty wzór liniowy, kolejno: merystem wierzchołkowy pędu, liścienie, hypokotyl, korzeń oraz merystem korzeniowy. Wzór ten i jego struktury są wyznaczone na bardzo wczesnych etapach rozwoju zarodkowego [30].

Polarność można już zaobserwować w budowie komórki jajowej, na co może wpływać polarna struktura załączka. Taki wpływ na kształtowanie osi apikalnobazalnej w zarodku ma miejsce jedynie w przypadku embriogenezy zygotycznej. W przypadku embriogenezy somatycznej, w której zarodki powstają z komórek innych niż zygota i nie ma bezpośredniego wpływu tkanki macierzystej, polarność może być indukowana warunkami kultury [42].

Brak lub ograniczony wpływ tkanki macierzystej na proces formowania osi zarodka stwierdzono także w warunkach naturalnych. Przykładem może tu być *Fucus*, u którego czynnikiem indukującym polarność jest światło. Jednak w tym przypadku zarówno zapłodnienie komórki jajowej, jak i dalszy rozwój zygoty odbywają się w wodzie, poza rośliną mateczną. Obserwowana u *Fucus* indukcja polarności światłem odbywa się w ciągu pierwszych dziesięciu godzin po zapłodnieniu [3, 25, 34, 58].

Niezależnie od opisanych czynników mogących wpływać na polarność zarodka, faktem jest to, że pierwszy podział zygoty u *Arabidopsis* odbywa się w komórce silnie spolaryzowanej, w której większość cytoplazmy i jądro są zlokalizowane na biegunie chalazalnym. W wyniku poprzecznego, asymetrycznego podziału mitotycznego powstają dwie komórki potomne, które różnią się wielkością oraz dalszymi losami w rozwoju zarodkowym. Komórka apikalna powstająca na biegunie chalazalnym zygoty jest mniejsza, bogata w organelle cytoplazmatyczne i to z niej, w wyniku dalszych podziałów, formuje się zarodek właściwy. Na silnie zwakuo- lizowanym biegunie mikropylarnym powstaje większa komórka bazalna, która ma mniej organeli, lecz bogatsza jest w białka i RNA. Z komórki tej w wyniku kolejnych podziałów

powstaje wieszadełko oraz część merystemu korzeniowego. Do tej pory nie ustalono, co dokładnie decyduje o dalszym rozwoju komórek apikalnej i bazalnej u roślin wyższych. Badania prowadzone na innych roślinach sugerują, że zdeterminowanie dalszych losów rozwojowych tych komórek może mieć miejsce zarówno przed, jak i po połączniu zygoty. Na przykład u *Fucus* zygota jest spolaryzowana przed podziałem i to determinuje dalszy rozwój komórek potomnych [34].

Pierwszym genem wykazującym zróżnicowaną komórkową ekspresję w zarodku rzodkiewnika jest *ATML1* (*Arabidopsis thaliana meristem layer 1*) [41, 68]. Gen ten ulega transkrypcji tylko w komórce apikalnej i jej potomnych. Różnice w ekspresji tego genu w określonych komórkach sugerują, że może on pełnić funkcje regulatorowe w kształtowaniu wzoru apikalno-bazalnego. Jest to hipoteza bardzo prawdopodobna zważywszy, że koduje on białko będące czynnikiem transkrypcyjnym zawierającym homeodomenę [41, 68].

512

Przypuszcza się, że bezpośredni udział w polaryzacji zarodka *A. thaliana* bierze gen *GNOM* (*GN*), znany też jako *EMB30* [50]. Zygota mutantu *gn* dzieli się bowiem symetrycznie i powstają komórki potomne równej wielkości. Z komórki bazalnej powstaje jednak skrócone wieszadełko, a z apikalnej rozwija się zarodek właściwy. Tak więc asymetryczność podziału nie jest jedynym czynnikiem decydującym o realizacji szlaku rozwojowego komórek [50].

Sekwencja białka kodowanego przez gen *EMB30* jest bardzo podobna do sekwencji białka drożdżowego Sec7p [11, 69]. Sec7p jest z kolei glikoproteiną transportowaną z siateczki endoplazmatycznej do aparatu Golgiego [55]. Białko to odgrywa kluczową rolę we wzroście komórek drożdżowych, odpowiadając za prawidłowe podziały oraz separację komórek drożdży [69]. Podobnie jak Sec7p, tak i EMB30 może wpływać na syntezę i sekrecję glikoprotein, które są niezbędne do prawidłowego wzrostu komórek. Wiele nieprawidłowości występujących u mutantu *gn* można wytłumaczyć zaburzeniami w syntezie oraz sekrecji składników budujących ściany komórkowe, co z kolei ma wpływ na prawidłowe podziały komórkowe, ekspansję komórek, kontakty między komórkami oraz stabilizację osi apikalno-bazalnej [69]. Potwierdzają to badania, które wykazały, że w kalusie, siewkach oraz liściach mutantu *gn* lokalizacja pektyn oraz innych polisacharydów budujących ściany komórkowej jest zmieniona w porównaniu z formą dziką, co być może wpływa na podziały, ekspansję oraz adhezję komórek [70].

Gen *GNOM* może być również pośrednio związany z polarnym transportem auksyny w zarodku [72]. Mutacja tego genu powoduje bowiem zaburzenia w transporcie oraz prawidłowym rozmieszczeniu produktu genu *PIN FORMED 1 (PIN1)*, który koduje transmembranowe białko niezbędne w transporcie auksyn oraz w powstawaniu prawidłowego gradientu tego hormonu [21, 72].

## FORMOWANIE APIKALNO-BAZALNEJ OSI ZARODKA

W anatomii i morfologii zarodka przyjęto terminologię analogiczną do stosowanej w odniesieniu do siewki. Na tej podstawie w rozwijającym się zarodku wyróżnia się trzy domeny: apikalną, centralną oraz bazalną. Domena apikalna składa się z merystemu wierzchołkowego pędu, liścieni oraz górnej części hypokotyła, domena centralna - z hypokotyła, natomiast domena bazalna - z korzenia oraz merystemu korzeniowego.

Domeny zarodka określa się również na podstawie płaszczyzn kolejnych podziałów komórkowych zygoty zachodzących podczas embriogenezy, wychodząc z założenia, że każda komórka ma przypisaną określoną rolę ontogenetyczną [35]. W tym schemacie już pierwszy podział zygoty wyznacza pierwszą płaszczyznę graniczną domen w rozwijającym się zarodku. Prawie wszystkie elementy budujące zarodek właściwy są pochodzenia apikalnego. Wyjątek stanowi centralna część merystemu korzeniowego oraz komórki inicjalne czapeczki, które są pochodzenia

bazalnego. Po podziale poprzecznym komórki apikalnej powstają dwie komórki, które w wyniku kolejnych podziałów dają dwie warstwy komórek, między którymi przebiega kolejna płaszczyzna graniczna. Górna warstwa komórek daje początek domenie apikalnej, na którą składają się merystem wierzchołkowy oraz liścienie w dojrzałym zarodku, natomiast dolna warstwa komórek daje początek domenie centralnej, na którą składają się nasady liścieni, hypokotyl, korzeń oraz proksymalne komórki inicjalne merystemu korzeniowego. Po podziale komórki bazalnej powstaje hypofiza (w polskojęzycznej literaturze stosowane są również terminy: hypophysis, hypofyza i wstawka) dająca początek centralnej części merystemu korzeniowego oraz komórkom inicjalnym czapeczki.

Domeny zarodka wyznaczone kolejnymi podziałami nie charakteryzują się pełną specyficznością organową siewki. Co więcej, analiza fenotypów mutantów związanych z tworzeniem osi apikalno-bazalnej zarodka dowodzi, że geny ją determinujące podlegają ekspresji w domenach ustalonych właśnie podczas podziałów komórkowych, a nie, jak wcześniej sądzono, w domenach związanych z obecnością organów zarodka. Te ostatnie jednak z powodzeniem mogą służyć do opisywania fenotypów mutacji różnych genów zaangażowanych w embriogenezę.

## PRZYKŁADY MUTANTÓW WZORU ORGANIZACJI ZARODKA NA OSI APIKALNO-BAZALNEJ

Wśród mutantów morfologicznych i anatomicznych *A. thaliana* wyróżnia się grupy mutantów charakteryzujące się delecjami lub anomaliami rozwojowymi różnych organów zarodka wzdłuż osi apikalno-bazalnej [49].

Prawidłowy rozwój domen apikalnej i centralnej jest uwarunkowany ekspresją genu *GURKE* (*GK*) [75]. Przy silnym fenotypie mutantu *gurke* (*gk*) zarodek pozbawiony jest liścieni, górna część hypokotyła jest zredukowana, a w miejsce merystemu wierzchołkowego pojawia się struktura tworząca nieuporządkowaną masę komórek. Pierwsze defekty rozwojowe u tego mutantu ujawniają się w stadium sercowatym zarodka.

Gen *FA CKEL* (*FK*) jest z kolei genem wpływającym na rozwój domeny centralnej.

U mutantek wybiórczej redukcji ulega hypokotyl, w efekcie czego liścienie, które mają zmieniony kształt i których jest często więcej niż dwa, wyrastają bezpośrednio z korzenia. Pierwsze anomalie rozwojowe u tego mutantu są widoczne już w stadium globularnym. Komórki budujące zarodek są powiększone, zakłóceniu ulega porządek podziałów komórkowych (podziały komórkowe zachodzą w przypadkowych płaszczyznach), a powstające ściany komórkowe są niekompletne [49, 67]. Analiza molekularna genu *FK* wykazała, że koduje on reduktazę sterolu C-14, enzym niezbędny w biosyntezie steroli i brasionosteroli - roślinnych substancji, będących cząsteczkami sygnałnymi między innymi w rozwoju embrionalnym [28, 67].

Do prawidłowego rozwoju domeny centralnej, hypofizy oraz kształtowania osi apikalno-bazalnej niezbędny jest gen *MONOPTEROS* (*MP*) [28,56]. Pierwsze zmiany u mutantu *mp* są już widoczne w zarodku ośmiokomórkowym. Zakłócenia wzoru podziałów komórek zarodka właściwego prowadzą do powstania czterech warstw komórek - zamiast dwóch. Ponadto górna komórka wieszadełka, z której normalnie powstaje centralna część merystemu korzeniowego oraz inicjalne komórki czapeczki, dzieli się horyzontalnie. Te nieprawidłowości wzoru podziałów zachodzące zarówno w domenie centralnej, jak i w hypofizie powodują, że mutant *mp* pozbawiony jest hypokotyła, korzenia, merystemu korzeniowego, oraz są przyczyną anomali w organizacji oraz funkcjonowaniu tkanki przewodzącej liścieni [5]. Gen *MP* koduje białko będące regulatorem transkrypcji, które prawdopodobnie jest zdolne do modyfikacji aktywności genów związanych z przekazywaniem sygnałów w szlaku biosyntezy auksyny [26].

## RÓŻNICOWANIE MERYSTEMÓW I KSZTAŁTOWANIE TKANEK

Podczas wczesnych etapów embriogenezy, rozwijający się zarodek składa się wyłącznie z komórek embrionalnych, to znaczy zdolnych do podziału, cienkościennych, bogatych w cytoplazmę i zewnętrznie do siebie podobnych. Podczas dalszych etapów rozwoju zarodka podziały komórkowe zostają ograniczone do szczytowych partii apikalnego bieguna - merystemu wierzchołkowego pędu oraz bazalnego bieguna korzenia - merystemu korzeniowego.

## MERYSTEM WIERZCHOŁKOWY PĘDU

Merystem wierzchołkowy pędu daje początek wszystkim nadziemnym częściom rośliny. U *A. thaliana* powstaje on z tej samej warstwy komórek co liścienie. Najpierw jednak pojawiają się primordia liścieniowe, które widoczne są w stadium późno globularnym zarodka, a potem następuje inicjacja merystemu wierzchołkowego pędu, która trwa do stadium torpedy [2, 47]. Zidentyfikowano i poznano czasowo-przestrzenny wzór ekspresji licznych genów współuczestniczących w inicjacji i formowaniu tego merystemu [8].

Do inicjacji oraz prawidłowego wykształcenia merystemu wierzchołkowego pędu niezbędny jest gen *SHOOT MERISTEMLESS (STM)* [19, 38]. Mutant *stm* charakteryzuje się brakiem merystemu, co jest spowodowane zaburzeniami podziałów komórek w warstwach, z których normalnie powstaje tunika i korpus. Liścienie oraz pozostałe organy zarodka *stm* rozwijają się normalnie [19]. Sekwencja genu *STM* wykazuje wysokie podobieństwo do sekwencji genów klasy *KNOTTED (KNO)*, których produkty białkowe zawierają homeodomenę, i pełnią rolę regulatorów transkrypcji [59]. Aida i współpracownicy [1] badali interakcje między genem *STM* a innym genem współodpowiedzialnym za formowanie merystemu wierzchołkowego pędu - *CUP-SHAPED COTYLEDON (CUC)*. Okazało się, że ekspresja *CUC* jest niezbędna dla prawidłowej ekspresji *STM*, a tym samym do formowania merystemu wierzchołkowego pędu. Nie jest jednak wyjaśnione, w jaki sposób produkt *CUC* aktywuje *STM*. Możliwe, że białko *CUC*, które zawiera domenę NAC, bezpośrednio aktywuje transkrypcję *STM* [1]. Ostatnie badania dowodzą, że funkcjonalnie gen *CUC* spełnia nadrzędną rolę w stosunku do *STM* [73].

Kolejnymi genami uczestniczącymi w formowaniu merystemu wierzchołkowego pędu, a zarazem działającymi niezależnie od *STM* są geny: *WUSCHEL (WUS)* oraz *CLAVATA (CLV) 1, 2, 3* [16,51]. Gen *WUS* odgrywa ważną rolę w inicjowaniu podziałów komórek w merystemie wierzchołkowym pędu, natomiast geny *CL V 1, 2, 3* biorą udział w inicjacji organów [66]. Produkt genu *WUS* jest czynnikiem transkrypcyjnym zawierającym homeodomenę [20]. Geny *CLV1* i *CLV2* kodują kinazy receptorowe będące składnikami systemu przekazywania sygnałów [29], natomiast *CL V3* koduje białko o charakterze ligandu, które działa w kompleksie białek kodowanych przez *CLV1* i *CLV2* [76]. Po szczegółowej analizie genu *WUS* i genów *CL V* okazało się, że *WUS* jest negatywnie regulowany przez kompleks białek *CL V* [9, 66]. Zaobserwowano, że podwójny mutant *wus/clv* ma taki sam fenotyp jak mutant *wus*, co sugeruje, że gen *WUS* jest wymagany dla prawidłowego fenotypu *clv*. Co więcej obszar ekspresji genu *WUS* został nieznacznie powiększony u mutantu *clv* w stosunku do fenotypu dzikiego, co wskazuje, że kompleks białek *CL V* może działać przez represję genu *WUS* [9, 66]. Kolejnymi genami odpowiedzialnymi za komórkową oraz funkcjonalną organizację merystemu wierzchołkowego pędu są: *FASCIATA1 (FAS1)* i *FASCIATA2 (FAS2)*. U mutantów *fas* w przeciwieństwie do mutantów *clv* zaobserwowano ograniczoną ekspresję genu *WUS*. Produkty genów *FAS1* i *2* będące czynnikami transkrypcyjnymi mogą zatem odgrywać krytyczną rolę w organizacji wierzchołkowego merystemu pędu poprzez regulacje genów niezbędnych w formowaniu merystemu [31].

Long i Barton [39] przedstawili kolejny model współdziałania oraz zależności pomiędzy trzema innymi genami związanymi między innymi z powstawaniem merystemu wierzchołkowego pędu: *AINTEGUMENTA (ANT)*, *UNUSUAL FLORAL ORGANS(UFO)* oraz *CLA VATA1 (CLV1)* a genem *SHOOTMERISTEMLESS (STM)*. Autorzy dokonali analizy wzorów ekspresji wymienionych genów u fenotypu dzikiego zarodków *Arabidopsis* oraz w zarodkach mutantu *stm*. W przypadku genu *STM* ekspresja inicjowana była w stadium późnoglobularnym zarodka i początkowo dotyczyła jednej lub dwóch komórek, później obserwowana była w rejonie, w którym wykształca się merystem wierzchołkowy pędu, między liścieniami. W rejonie tym wyróżnia się dwie części: centralną (ECR ang. *embryogenic central region*) i peryferyczną (EPR ang. *embryogenic peripheral region*) i to właśnie w części centralnej gen *STM* ulegał ekspresji. Kolejnym badanym genem był gen *UFO*,

który uczestniczy w kształtowaniu merystemu kwiatowego i wierzchołkowego pędu, a białko kodowane przez ten gen zawiera motyw F-box i pełni funkcje regulatorowe [36, 60]. W fenotypie dzikim ekspresja *UFO* następowała poczynając od stadium wczesnosercowatego zarodka i częściowo pokrywała się z ekspresją genu *STM*, z tą tylko różnicą, że nie obejmowała EPR oraz warstwy LI. Badając ekspresję genu *UFO* w zarodkach mutantu *stm* wykazano, że istnieje bezpośrednie współdziałanie obu badanych genów. Jeżeli chodzi o wspomniany już wcześniej gen *CLV1*, to wyniki badań wskazują na regulację jego ekspresji przez *STM*. Transkrypt genu *CL V 1* wykrywano od stadium wczesnosercowatego i podobnie jak w przypadku genu *UFO* jego obecność pokrywała się ze wzorem ekspresji genu *STM*, czyli również z wyjątkiem obszaru EPR oraz warstwy LI. Taki wzór ekspresji zaobserwowano zarówno w zarodkach o fenotypie dzikim, jak i w zarodkach mutantu *stm*, z tą różnicą, że w zarodkach mutantu ekspresja była nieznacznie obniżona. Kolejnym badanym genem był gen *ANT*, który jest regulatorem transkrypcji o wysokim podobieństwie do *AP*

*ET ALA2* [18]. Ekspresja *ANT* inicjowana jest w stadium 32-komórkowym zarodka i początkowo jest ograniczona zaledwie do kilku komórek. Potem od stadium globularnego wzór ekspresji występował w postaci pierścienia pokrywającego się z miejscem tworzenia liścieni oraz częściowo pokrywał się z ekspresją genu *STM*, obejmując region *EPR*. Pomimo że wzór ekspresji *STM* i *ANT* częściowo pokrywają się, to nie zaobserwowano jednak żadnych bezpośrednich powiązań między nimi, jak w przypadku *UFO* i *STM*.

## MERYSTEM KORZENIOWY I POPRZECZNY WZÓR ORGANIZACJI TKANKOWEJ

U rzodkiewnika pierwotny merystem korzeniowy składa się z dwóch warstw komórkowych, otaczających "strefę spoczynkową" (ang. *quiescent centre*). Zarówno "strefa spoczynkowa", jak i komórki inicjalne czapeczki wywodzą się z hypofizy. Górna warstwa proksymalnych komórek inicjalnych merystemu korzeniowego, która daje początek wszystkim tkankom korzenia, jest pochodzenia apikalnego. Wzór poprzecznej organizacji korzenia, czyli koncentryczne, warstwowe rozmieszczenie tkanek, jest stosunkowo prosty. Można wyróżnić następujące tkanki: epidermę, korę pierwotną, endodermę, perycykl oraz tkankę przewodzącą [17].

Jak wcześniej wspomniano, pierwsza płaszczyzna podziałowa, wyróżniająca domeny w zarodku przecina merystem korzeniowy na część apikalną i hypofizalną. Na podstawie tego podziału można wyróżnić mutanty hypofizalne, u których zaburzony jest rozwój merystemu korzeniowego. Jednym z nich jest mutant *hobbit* (*hbt*), u którego pierwsze zmiany są widoczne już podczas wczesnych etapów embriogenezy i dotyczą nieprawidłowych podziałów hypofizy, co prowadzi do pozbawienia siewki funkcjonalnego merystemu korzeniowego oraz czapeczki.

Wszystkie pozostałe elementy siewki rozwijają się normalnie, w tym proksymalne komórki inicjalne merystemu korzeniowego pochodzenia apikalnego [63, 82].

U innych mutantów z zaburzonym rozwojem korzenia: *raot meristemless* (*rml*) [12] i *stump* (*stp*) [6] merystem korzeniowy rozwija się w zarodku normalnie i dopiero w siewce zostaje zahamowany jego wzrost. Istnieją zatem różne poziomy regulacji aktywności merystemu korzeniowego w rozwoju embrionalnym i postembrionalnym [35].

Koncentryczne ułożenie tkanek w korzeniu jest związane z aktywnością komórek inicjalnych, które dzieląc się dają komórki pochodne, te z kolei różnicują się w określone elementy tkanek. Próbowano określić, czy sam merystem determinuje powstawanie koncentrycznego wzoru tkanek. Wyniki badań dowodzą jednak, że sam merystem korzeniowy nie zawiera wewnętrznej informacji determinującej tworzenie odpowiednich tkanek, natomiast wykształcone już tkanki korzenia determinują powstawanie odpowiedniego wzoru tkankowego z merystemu korzeniowego [62]. Dowodzą tego doświadczenia polegające na usuwaniu komórek inicjalnych kory pierwotnej i endodermy w korzeniu siewki *A. thaliana*, po których to zabiegach komórki perycyklu przejmowały ich funkcje. Stwierdzono ponadto, że po usunięciu zróżnicowanych już komórek kory pierwotnej i endodermy wzór tkankowej organizacji korzenia nie był odtwarzany. Komórki inicjalne kory pierwotnej i endodermy nie dzieliły się, kiedy nie miały kontaktu z komórkami już wykształconymi. Sugeruje to, że w korzeniu komórki inicjalne otrzymują informację o wzorze tkanek z wykształconych już komórek [78, 79]. Również podczas tworzenia korzeni bocznych u *A. thaliana* najpierw następuje organizowanie się tkanek, a dopiero potem powstaje aktywny merystem korzeniowy [46].

## USTALENIE WZORU POPRZECZNEGO W DOMENIE CENTRALNEJ

Koncentryczne rozmieszczenie tkanek w domenie centralnej rozpoczyna się stosunkowo wcześnie. Już w stadium szesnastokomórkowym zarodka rozpoczynają się podziały peryklinalne dające początek protodermie, która stanowi prekursor epidermy. Na przykładzie *A. thaliana* można stwierdzić, że przestrzenna organizacja pozostałych tkanek rozpoczyna się od stadium globularnego zarodka [22].

Chociaż protoderma formuje się zarówno w domenie apikalnej, jak i centralnej zarodka, to dalszy rozwój wzoru poprzecznego ogranicza się tylko do domeny centralnej. Podziały peryklinalne zachodzące w komórkach położonych pod warstwą protodermy prowadzą do powstawania wszystkich tkanek wewnętrznych. Podczas pierwszych podziałów powstaje warstwa komórek mięksiszowych, które otaczają centralne primordium waskulame, które w wyniku kolejnych podziałów daje początek perycyklowi oraz tkankom przewodzącym. W stadium torpedy z warstwy mięksiszu

zarodka różnicuje się endoderma oraz kora pierwotna. Formowanie kory pierwotnej i endodermy w korzeniu rzodkiewnika wymaga dwóch asymetrycznych podziałów komórkowych. Pierwszy podział komórek inicjalnych kory pierwotnej i endodermy to podział antyklinalny dający początek dwóm komórkom siostrzanym z różnym potencjałem rozwojowym. Jedna kontynuuje funkcje komórki inicjalnej, druga natomiast dzieli się peryklinalnie generując w ten sposób komórki budujące endodermę i korę pierwotną [64].

U wielu mutantów zarodkowych *A. thaliana* zaburzony jest rozwój określonych tkanek, co z kolei prowadzi do zmian wzoru poprzecznego tkankowej organizacji organów rośliny. Zmiany te dotyczą najczęściej hypokotyla i korzenia. Sugeruje to, że w obu tych organach w kształtowaniu poszczególnych tkanek współdziałają te same grupy genów [64]. U większości mutantów tego typu powstałe zmiany są spowodowane nieprawidłowymi podziałami komórkowymi zachodzącymi w poszczególnych warstwach. Prowadzi to do redukcji liczby oraz typów powstających komórek. Przykładem takich mutantów są: *short root (shr)* i *seareerow (ser)*, u których nastąpiła utrata warstw komórkowych między epidermą a perycyklem [61]. U obu tych mutantów występują antyklinalne podziały komórek inicjalnych kory pierwotnej i endodermy, ale późniejsze podziały peryklinalne, prowadzące u roślin typu dzikiego do zwiększenia liczby warstw komórkowych, nie zachodzą. W efekcie u mutantu *shr* brak jest warstwy endodermy, a u *ser* - endodermy i kory pierwotnej [4, 15,46,61, 64]. Mutacja innego genu *WOODEN LEG (WOL)* powoduje zaburzenia w rozwoju tkanki przewodzącej. W korzeniu rzodkiewnika ksylem formuje się jako pierwszy, potem w wyniku asymetrycznych podziałów formuje się floem i prokambium. U mutantu *wol*, u którego jest zredukowana liczba komórek przewodzących, wykształca się tylko ksylem [61]

Okazało się, że brak niektórych tkanek we wzorze poprzecznym często nie jest spowodowany brakiem informacji niezbędnej do specyfikacji komórek, ale niedostateczną liczbą komórek, z których mogłyby powstawać poszczególne tkanki [61]. Pewne światło na to zagadnienie rzuciły doświadczenia przeprowadzone na podwójnych mutantach zarodkowych, do otrzymania których wykorzystano mutantu *fass (js)* charakteryzującego się zwiększoną liczbą warstw komórkowych [74] oraz mutant *y ser, shr* i wolpozbawione poszczególnych tkanek. Analiza fenotypów podwójnych mutantów wykazała, że w przypadku *scr/fass* i *wol/fass* defekty były znoszone, to znaczy powstawały odpowiednio endoderma i kora pierwotna w przypadku mutantu *ser* oraz floem w przypadku mutantu *wolo*. Uzyskane wyniki sugerują, że zarówno gen *Scr*, jak i *WOL* nie odpowiadają za specyfikację komórek, a jedynie za prawidłowe podziały komórkowe. Fenotyp mutantu *shr* nie był znoszony przez *mutacjęfass*, co z kolei sugeruje, że gen *SHR* może specyficznym determinować rozwój endodermy [61].

Formowanie wzoru poprzecznej organizacji tkanek w zarodku może być indukowane więc przez co najmniej dwie klasy genów. Pierwsza obejmuje geny,

które są bezpośrednio związane z determinacją komórek, na przykład gen *SHR*. Do drugiej należą geny determinujące rozwój poszczególnych tkanek pośrednio, na przykład przez podziały komórkowe (*SCR*, *WOL*) [62]. Analizy molekularne tych trzech genów wykazały, że pełnią one funkcje regulatorowe. Gen *SCR* jest czynnikiem transkrypcyjnym należącym do rodziny genów GRAS i zawiera pięć charakterystycznych motywów: LHR I, VHIID, LHR II, PFYRE i SA W. Pierwsze trzy motywy odpowiadają za wiązanie DNA: LHR I i LHR II pośredniczą w interakcjach białko - białko, a VHIID w interakcjach białko - DNA. Funkcja dwóch pozostałych motywów nie jest poznana do tej pory [37, 57]. Produkt genu *SHR* jest również czynnikiem transkrypcyjnym i wykazuje dużą homologię do *SCR*. Po szczegółowej analizie ekspresji tych dwóch genów okazało się, że *SHR* spełnia funkcję nadrzędną w stosunku do *SCR* [27]. Gen *WOL* natomiast koduje białko, które odgrywa zasadniczą rolę w przekazywaniu sygnałów związanych z asymetrycznymi podziałami zachodzącymi w komórkach inicjalnych tkanki przewodzącej [44].

## MECHANIZMY RÓZNICOWANIA SIĘ KOMÓREK

Poznanie mechanizmów prowadzących do różnicowania się komórek jest niezbędne dla całościowego zrozumienia zjawisk zachodzących podczas rozwoju zarodka. Różnicowanie komórek obejmuje wiele powiązanych ze sobą procesów natury chemicznej, fizjologicznej i morfologicznej, prowadzących do specjalizacji komórek. Podczas różnicowania się tkanek dochodzi do zmian właściwości poszczególnych komórek oraz ich interakcji. Interesującą kwestią jest sposób determinacji poszczególnych komórek: skąd komórki budujące tkanki znają swoje przeznaczenie?

Początkowo sądzono, że czynniki determinujące los komórek mogą występować już w zygocie, a dokładniej mówiąc w ścianie komórkowej 'zygoty' i są przekazywane do wszystkich komórek potomnych. Hipotezę tę początkowo zaproponowano dla wyjaśnienia determinacji komórek protodermy u *Citrus jambhiri* [10]. Zygota u tego gatunku pokryta jest cienką warstwą kutikuli, która stanowi marker morfolo-

giczny dla powstającej warstwy komórek protodermy. Protoderma powstawała tylko z tych komórek potomnych zygoty, które posiadały warstwę kutikuli stanowiącej w tym przypadku rodzaj informacji pozycyjnej od zygoty.

Obserwując różnicowanie się protodermy w zarodku rzodkiewnika można przypuszczać, że istotne znaczenie ma tutaj pierwszy podział w płaszczyźnie peryklinamej oddzielający zewnętrzną warstwę komórek. Badania nad *mutantemfass A. thaliana* nie potwierdzają tego przypuszczenia. W zarodkach *fs*, pomimo nieregularnych płaszczyzn podziałów komórek, występują prawidłowo wykształcone wszystkie tkanki, w tym również protoderma [74].

Drugą hipotezą wyjaśniającą przebieg i regulację determinacji komórek jest działanie morfo genów specyficznych substancji, które docierałyby do zarodka z wie-

szadelka i bielma. Przypuszcza się, że stężenie morfo genów może odgrywać zasadniczą rolę w procesach różnicowania się komórek, tak jak ma to miejsce u zwierząt [23]. U *A. thaliana* wykazano obecność mRNA genu *ATML1*, który jest pierwszym markerem polarności w zarodku, nie tylko w protodermie zarodka, ale również w wykształconym bielmie. Sugerować by to mogło, że ekspresja tego genu w protodermie jest związana z działaniem specyficznych substancji docierających do zarodka z bielma [41]. Jest to kwestia szeroko dyskutowana, chociaż brak jest bezpośrednich dowodów, że substancje takie mogą decydować o rozwoju komórek w zarodku [35].

Kolejny proponowany mechanizm determinacji komórek jest związany z komunikacją międzykomórkową. We wszystkich procesach morfogenetycznych istotną rolę odgrywają czynniki wzrostowe - hormony. U roślin podobnie jak u zwierząt hormony nie powstają we wszystkich komórkach, ale są syntetyzowane w określonych ośrodkach, z których są rozprowadzane do sąsiednich komórek, tkanek i organów. Nie ulega wątpliwości, że podczas powstawania ośrodków syntezy substancji wzrostowych oraz ich transportu do różnych części roślin powstają zależności wywierające wpływ na całość zjawisk rozwojowych. Różna wrażliwość komórek oraz zawiązków organów na substancje wzrostowe jest traktowana jako wynik różnicowania się komórek. Obecność substancji wzrostowych nie musi jednak mieć bezpośredniego morfogenetycznego działania, lecz wystarczy, że pobudza lub hamuje wzrost komórek i ich podziały [7].

Bezpośredni wpływ auksyny na różnicowanie się komórek zaobserwowano u sosny [77]. Badania te dotyczyły wpływu stężenia endogennej auksyny IAA na podziały komórkowe oraz różnicowanie się komórek kambium. Uzyskane wyniki sugerują, że IAA może działać jak pozycyjny morfogen, który reguluje różnicowanie się oraz wzrost kambium. Jednak brak jest innych bezpośrednich dowodów na udział hormonów w specyfikacji komórek w roślinie [77].

Uważa się jednak, że istotniejszą rolę w różnicowaniu się komórek odgrywają miejscowe interakcje sąsiadujących ze sobą komórek oraz tzw. substancje krótkodystansowe [35]. Zidentyfikowano wiele substancji, które mogą być potencjalnymi czynnikami wpływającymi na rozwój oraz różnicowanie się komórek roślinnych. Przykładem takiej substancji, która wpływa na rozwój zarodków somatycznych marchwi, jest endochitynaza EP3. To zewnątrzkomórkowe białko zidentyfikowano w kulturze zawieszinowej marchwi u linii termowrażliwej *ts11*. Rozwój zarodków tej linii był hamowany w podwyższonej temperaturze w stadium globularnym, jednak po dodaniu białka EP3 do hodowli mutanta zarodki były zdolne do dalszego rozwoju [14, 15, 32]. Mechanizm działania EP3 w kulturze zawieszinowej marchwi nie jest jednak do końca wyjaśniony. Jedną z proponowanych hipotez zakłada, że obecność EP3 w kulturze może stymulować syntezę specyficznych substancji, które bezpośrednio wpływają na rozwój zarodków somatycznych [13, 14]. Okazało się jednak, że endochitynaza EP3 nie jest substancją specyficzną dla embriogenezy somatycznej.



Białko to zlokalizowano również w kulturze nieembriogenicznej marchwi, endospermie oraz integumentach zalążka. Wyniki te sugerują, że EP3 może odgrywać szerszą rolę w procesach rozwojowych [80] ..

Inne substancje, które mogą być związane z kontrolą wzrostu oraz różnicowaniem się komórek w trakcie embriogenezy u roślin wyższych, to zewnątrzkomórkowe białka arabinogalaktany (AGPs). Ustalono, że w kulturze zawieszinowej marchwi odgrywają one zasadniczą rolę w procesie somatycznej embriogenezy, potrafią przywracać oraz zwiększać potencjał embriogeniczny kultur zawieszinowych [48, 54, 83]. Obecność AGPs na membranach, w ścianach i w przestrzeniach międzykomórkowych wskazuje, że białka te odgrywają ważną rolę w komunikacji między komórkami [45]. Jeden z proponowanych mechanizmów działania AGPs dotyczy zmian zachodzących w ścianach komórkowych. Zmiany te polegają na modyfikacji składu chemicznego oraz struktury przestrzennej ścian komórkowych i są spowodowane transportem białek arabinogalaktanowych między sąsiednimi komórkami. Różny skład chemiczny oraz zróżnicowanie struktury ścian komórkowych mogą mieć zasadnicze znaczenie w różnicowaniu się komórek [33]. Inny proponowany mechanizm działania AGPs zakłada wykorzystanie białek arabinogalaktanowych jako źródeł uwalniania oligosacharydów, które mogą pełnić funkcję molekularnych sygnałów. Typ przekazywanego sygnału uzależniony nie tylko od rodzaju białek arabinogalaktanowych, ale również od enzymów znajdujących się w ścianach komórkowych uczestniczących w syntezie oligosacharydów oraz receptorów znajdujących się w błonach komórkowych odbierających sygnały [33].

## KOMPETENCJA DO PODJĘCIA EMBRIOGENEZY

Embriogeneza jest to proces, w którym zarodek rozwija się zazwyczaj z jednej komórki, która dzieli się i różnicuje według ściśle określonego planu. W roślinie rozwijającej się *in vivo* generalnie tylko zygota jest kompetentna do tego, żeby w wyniku podziałów utworzyć zarodek. W warunkach kultur *in vitro* embriogeniczność wyzwalana jest w komórkach innych niż zygota i to dzięki temu są one "prekursorami" zarodka. Wiadomo, że istnieją różnice w kompetencji do embriogenezy zygoty i komórek somatycznych oraz mikrospor. Ostatnie badania przynoszą wiele informacji na temat genetycznych czynników decydujących o zdolności zygot i komórek somatycznych do podjęcia realizacji programu rozwoju zarodkowego.

Techniki kultur tkankowych umożliwiły aseksualne rozmnażanie roślin drogą somatycznej embriogenezy oraz embriogenezy z mikrospor. Wymienione procesy wymagają jednak istotnej zmiany programu rozwojowego komórek w celu nabycia kompetencji czy też potencjału embriogenicznego. Identyfikacja czynników genetycznych warunkujących ten etap rozwoju jest bardzo trudna. W zawieszinach komórkowych marchwi udało się jednak wykryć marker molekularny kompetencji komórek do przekształcenia się z masy proembriogenicznej w zarodki somatyczne.

Markerem tym jest produkt genu *SERK* (*somatic embryogenesis receptor kinase*), który ulega ekspresji już w komórkach proembriogennych zawiesziny, natomiast brak go w wyselekcjonowanych liniach niezdolnych do embriogenezy. Ekspresja *SERK* zanika w stadium globularnym zarodka. Wagi temu odkryciu dodaje fakt, że białko *SERK* jest kinazą receptorową mogącą brać udział w przekazywaniu sygnałów i uruchamianiu całej kaskady procesów prowadzących do embriogenezy [65].

Kluczowego dla poznania inicjalnej fazy embriogenezy odkrycia dokonano dość niespodziewanie, badając u rzodkiewnika mutację *leafy eotyledon 1* (*lecl*). Gen *LECI* ma działanie plejotropowe i wpływa na morfologię liścieni u siewki, rozwój wieszadelka i fazę dojrzewania zarodka. Nadekspresja genu *LECI* powodowała sporadyczne pojawianie się zarodków somatycznych na liściach roślin. Produkt genu *LECI* jest regulatorem transkrypcji wiążącym się z CCAAT-box i prawdopodobnie bierze udział w indukowaniu zarodkowego szlaku rozwojowego. Wskazuje na to częściowa utrata zarodkowego charakteru przez liścienie i wieszadelko u mutantu *lecl* [40]. Zmiany w potencjale embriogennym, niezależne od hormonów, zaobserwowano również u mutantu rzodkiewnika *piekle* (*pkl*). Gen *PKL* koduje białko CHD3, które wpływa na strukturalną organizację chromatyny, a tym samym reguluje transkrypcję. Funkcja genu *PKL* polega przypuszczalnie na supresji potencjału embriogennego poprzez represję transkrypcji genu *LECI* [52, 53].

Zarodki niezgotyczne mogą powstać również w wyniku apomiksji. Apomiksja jest procesem, w którym uruchomienie programu embriogenezy następuje przedwcześnie, co prowadzi do rozwoju diploidalnego zarodka z niezredukowanej komórki macierzystej lub z diploidalnej komórki ośrodka. Zjawisko to z powodzeniem wykorzystano jako system modelowy identyfikując mutant *y rzodkiewnikajertilization independent endosperm* (*fie*) oraz *jertilization independent seed 1 i 2* (*fis1 2 i 3*). Geny *FIS* i *FIE* należą do grupy genów *Polycomb*, które związane są z rozwojem zarodka między innymi u *Drosophila* [71]. Białka *FIS1* i *FIE* zawierają domenę SET (*Suppressor of variegation 3-9, Enhancer of zeste, Trithorax*) i mogą odgrywać rolę w kontroli dostępu regulatorów transkrypcji do genów poprzez przebudowę chromatyny. *FIS2* zawiera również motyw palców cynkowych, domenę charakterystyczną dla wielu regulatorów transkrypcji [43]. Wymienione geny biorą prawdopodobnie udział w mechanizmie represji genów związanych z

rozwojem zarodka w podobny sposób, jak ma to miejsce u *Drosophila*. Badania mutantów *fie* i *fis1*, 2, 3 oraz izolacja genów *FIE* i *FIS* wykazały funkcjonowanie mechanizmu represji genów decydujących o rozwoju zarodka, zanim dojdzie do zapłodnienia [24]. Czynniki warunkujące uruchomienie bądź zahamowanie programu embriogenicznego wydają się być raczej związane z organizmem matczynym. Regulatorową rolę komponentu ojcowskiego we wczesnej embriogenezie umniejszają dowody na wyciszenie wielu aUeli ojcowskich w okresie pierwszych kilkudziesięciu godzin po

zapłodnieniu [81]. Autorzy przypuszczają, że zjawisko to może dotyczyć nawet całego genomu ojcowskiego, przynajmniej w początkowej fazie embriogenezy.

## PODSUMOWANIE

Źródłem wielu informacji na temat podstawowych mechanizmów regulujących rozwój zarodka oraz genów związanych z procesem embriogenezy są badania prowadzone na mutantach zarodkowych. Porównywanie zmutowanych form z ich formami "dzikimi" stało się dogodnym narzędziem do identyfikacji genów zaangażowanych w proces embriogenezy. Wspomniane w niniejszej pracy geny decydujące o kluczowych etapach rozwoju zarodka można podzielić na różne klasy w zależności od ich działania. Wiele z nich to geny związane z regulacją transkrypcji (*ATML1*, *STM*, *ANT*), przekazywaniem sygnałów (*SERK*, *UFO*), transportem auksyn (*PIN*), syntezą oraz sekrecją glikoprotein (*GN*). Należy pamiętać, że często dopiero współdziałanie produktów wielu genów daje właściwy efekt, a nie tylko specyficzne działanie jednego białka.

W ostatnich latach nastąpił ogromny postęp, jeżeli chodzi o identyfikację oraz charakterystykę genów związanych z kontrolą wczesnych etapów rozwoju zarodka. Jednak do chwili obecnej brak jest całościowego obrazu genetycznej regulacji przebiegu embriogenezy na poziomie molekularnym. Zsekwencjonowanie genomu *Arabidopsis thaliana* umożliwi uzupełnienie brakującej wiedzy na temat organizacji oraz funkcji poszczególnych genów. Z kolei analiza porównawcza genów wykazujących podobne funkcje u różnych organizmów umożliwi szczegółowe poznanie mechanizmów regulujących przebieg embriogenezy nie tylko u organizmów modelowych.

## LITERATURA

- [1] AIDA M, ISHIDA T, TASAKA M. Shoot apical meristem and cotyledon formation during *Arabidopsis* embryogenesis: interaction among the *CUP-SHAPED COTYLEDON* and *SHOOT MERISTEMLESS* genes. *Development* 1999; 126: 1563-1570.
- [2] BARTON MK, POETHING RS. Formation of the shoot apical meristem in *Arabidopsis thaliana*: an analysis of development in the wild type and in the *shoot meristemless* mutant. *Development* 1993; 119: 823-831.
- [3] BELANGER KD, QUATRANO RS. Polarity: the role of localized secretion. *Curr Opin Plant Biol* 2000; 3: 67-72.
- [4] BENFEY PN, LINSTAD PJ, ROBERTS K, SCHIEFELBEIN JW, HAUSER MT, AESCHBACHER RA. Root development in *Arabidopsis*: four mutants with dramatically altered root morphogenesis. *Development* 1993; 119: 57-70.
- [5] BERLETH T, JORGENS G. The role of the *monopteros* gene in organising the basal body region of the *Arabidopsis* embryo. *Development* 1993; 118: 575-587.
- [6] BERLETH T, HARDTKE CS, PRZEMECK GKH, MOLLER J. Mutational analysis of root initiation in the *Arabidopsis* embryo. *Plant Soil* 1996; 187: 1-9.
- [7] BERLETH T, SACHS T. Plant morphogenesis: long-distance coordination and local patterning. *Curr Opin Plant Biol* 2001; 4: 57-62.
- [8] BOWMAN JL, ESHED II. Formation and maintenance of the shoot apical meristem. *Trends Plant Sci* 2000; 5: 110-115.
- [9] BRAND U, FLETCHER J, HOBE M, MEYEROWITZ EM. Dependence of stem cell fate in *Arabidopsis* on a feedback loop regulated by CLV3 activity. *Science* 2000; 289: 617-619. [10] BRUCK DK, WALKER DB. Cell determination during embryogenesis in *Citrus jambhiri*. I. Ontogeny of the epidermis. *Bot Gaz* 1985; 146: 188-195.
- [11] BUSCH M., MAYER U, JURGENS G. Molecular analysis of the *Arabidopsis* pattern formation gene *GNOM*: gene structure and intragenic complementation. *Mol Gen Genet* 1996; 250: 681-691.
- [12] CHENG JC, SEELEY KA, SUNG ZR. *RML1* and *RML2*, *Arabidopsis* genes required for cell proliferation at the root tip. *Plant Physiol* 1995; 107: 365-376.
- [13] DE JONG AJ, CORDEWENER J, LO SCHIAVO F, TERZI M, VANDEKERCKHOVE J, VANKAMMEN A, DE VRIES S.c. A carrot somatic embryo mutant is rescued by chitinase. *Plant Cell* 1992; 4: 425-433.
- [14] DE JONG AJ, HEIDSTARA R, SPAINK HP, HARTOG MV, MEIJER EA, HENDRIKS T, SCHAIVOF L, TERZI M, BISSELING T, VANKAMMEN A, DE VRIES S.c. *Rhizobium* lipopolysaccharides rescue a carrot somatic embryo mutant. *Plant Cell* 1993; 5: 615-620.
- [15] DI LAURENZIO L, WYSOCKA-DILLER J, MALAMY JE, PYSH L, HELARIUTTA Y, FRESHOUR G, HAHN MG, FELDMANN KA, BENFEY PN. The *SCARECROW* gene regulates an asymmetric cell division that is essential for generating the radial organization of the *Arabidopsis* root. *Cell* 1996; 86: 423-433.
- [16] DOERNER P. Plant stem cells: The only constant thing is change. *Curr Biol* 2000; 10: R826-R829.
- [17] DOLAN L, JANMAAT K, WILLEMSSEN V, LINSTAD P, POETHING S, ROBERTS K, SCHERES B. Cellular organization of the *Arabidopsis thaliana* root. *Development* 1993; 119: 71-84.
- [18] ELLIOTT RC, BETZNER AS, HUTTNER E, OAKES MP, TUCKER WQ, GERENTES D, PEREZ P, SMYTH DR. *AINTEGUMENTA*, an *APETALA2*-like gene of *Arabidopsis* with pleiotropic roles in ovule development and floral organ

- growth. *Plant Cell*1996; 8: 155-168.
- [19] ENDRIZZI K, MOUSSIAN B, HAECKER A, LEVIN J, LAUX T. The *SHOOT MER/STEMLESS* gene is required for maintenance of undifferentiated celi in *Arabidopsis* shoot and floral meristems and acts at a different regulatory level than the meristem genes *WUSCHEL* and *ZW/LE*. *Plant J* 1996; 10: 967-979.
- [20] FLETCHER JC, MEYEROWITZ EM. Celi signalling within the shoot meristem. *Curr Opin Plant Biol*2000; 3: 23-30.
- [21] GALWEILER L, GUAN C, MULER A, WISMAN E, MEND GEN K, YEPHREMOV A, PALME K. Regulation of polar auxin transport by *AtP/NI* in *Arabidopsis* vascular tissue. *Science* 1998; 282: 2226-2230.
- [22] GOLDBERG RB, DE P AIV A G, Y ADEGRI R. Plant embryogenesis: Zygote to seed. *Science* 1994;266:605-614.
- [23] GREEN JE, SMITH JC. Graded ehanges in dos e *ofaXenopus* activin A homologue elieit stepwise transition in embryonic celi fate. *Nature* 1990; 347: 391-394.
- [24] GROSSNIKLA US U, SPILLANE CH, P AGE DR, KOHLER C. Genomie imprinting and seed development: endosperm with and without sex. *Curr Opin Plant Biol*2001; 4: 21-27.
- [25] HABLE WE, KROPF DL. Sperm entry induees polarity in fueoid zygotes. *Development* 2000; 127: 493-501.
- [26] HARDTKE CS, BERLETH T. *TheArabidopsis* gene *MONOPTEROS* encodes a trancription factor mediating embryo axis formation and vaseular development. *EMBO J* 1998; 17: 14051411.
- [27] HELARIUTTA Y, FUKAKI H, WYSOCKA-DILLER J, NAKAJIMA K, JUNG J, SENA G, HAUSER, BENFEY PN. The *SHORT-ROOT*gene controls radial patterning *oftheArabidopsis* root through radial signalling. *Cell*2000; 101: 555-567.
- [28] JANG Je, FUJIOKA S, TASAKA M, SETO H, TAKATSUTO S, ISHII A, AIDA M, YOSHIDA S, SHEEN I. A critical role of sterols in embryonic patterning and meristem programming revealed by the *Jackel* mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Genes Dev* 2000; 14: 1485-1497.
- [29] JEONG S, TROTOCHAUD A, CLARK S. The *Arabidopsis* *CLA VATA2* gene encodes a receptor-like protein required for the stability ofthe *CLA VATA1* receptor-like kinase. *Plant Cell* 1999;11: 1925-1934.
- [30] nJRGENS G. Axis formation in plantembryogenesis: cues and clues. *Cell*1995; 81: 467-470. [31] KAYA H, SHIBAHARA KI, TAOKA KI, IWABUCHI M, STILLMAN B, ARAKI T. *FASCIATA* genes for chromatin assembly factor-I in *Arabidopsis* maintain the cellular organization of apical meristems. *Cell*2001; 104: 131-142.
- [32] KRAGH KM, DE JONG AJ, HENDRIKS T, BUCHERNA N HOJRUP P, MIKKELSEN JD, DE VRIES SC. Characterization of chitinases able to rescue somatic embryos of the temperature-sensitive carrot variant ts11. *Plant Mol Bio*1996; 31: 631-645.
- [33] KREUGER M, VAN HOLST GJ. Arabinogalactan proteins and plant differentiation. *Plant Mol Bio*1996; 30: 1077-1086.
- [34] KROPF DL. Induction ofpolarity in fucoid zygotes. *Plant Cell*1997; 9: 1011-1020.
- [35] LAUX T, JURGENS G. Embryogenesis: A new start in life. *Plant Cell*1997; 9: 989-1000. [36] LEVIN JZ, FLETCHER JC, CHEN X, MEYEROWITZ EM. A genetic screen for modifiers of *UFO* meristem activity identifies three novel *FUSED FLORAL ORGANS* genes required for early flower development in *Arabidopsis*. *Genetics* 1998; 149: 579-595.
- [37] UMJ, HELARIUTTA Y, SPECHTCD, JUNG J, SIMSL,BRUCE WB, DIEHN S,BENFEY PN. Molecular analysis of the *SCARECROW* gene in maize reveals a common basis for radial patterning in diverse meristems. *Plant Cell*2000; 12: 1307-1318.
- [38] LON G JA, MOAN EI, MEDFORD JI, BARTON MK. A member of the KNOTTED class of homeodomain proteins encoded by the *STM* gene of *Arabidopsis*. *Nature* 1996; 379: 66-69. [39] LONG JA, BARTON MK. The development of apical embryonic pattern in *Arabidopsis*. *Development* 1998; 125: 3027-3035.
- [40] LOTAN T, OHTO M, YEE KM, WEST MA, LO R, KWONG RW, Y AMAGISHI K, FISCHER RL, GOLDBERG RB, HARADA JJ. *Arabidopsis* *LEAFY COTYLEDON1* is sufficient to induce embryo development in vegetative cells. *Cell*1998; 93: 1195-1205.
- [41] LU P, PORAT R, NADEAU JA, O'NEILL SD. Identification of a meristem llayer-specific gene in *Arabidopsis* that is expressed during embryonic pattern formation and defines a new class ofhomeobox genes. *Plant Cell*1996; 9: 2155-2168.
- [42] LUO Y, KOOP HU. Somatic embryogenesis in cultured immature zygotic embryos and leaf protoplasts of *A rab idopsis thaliana* ecotypes. *Planta* 1997; 202: 387-396.
- [43] LUO M, BILODEAU P, KOLTUNOW A, DENNIS ES, PEACOCK WJ, CHAUDHURY AM. Genes controlling fertilization-independent seed development in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci* 1999; 5: 296-301.
- [44] MAHONEN AP, BONKEM, KAUPPINENL, RIIKONENM,BENFEYPN, HELARIUTTA Y. A no vel two-component hybrid molecule regulates vascular morphogenesis of the *Arabidopsis* root. *Genes Dev* 2000; 14: 2938-2943.
- [45] MAJEWSKA-SA WKA A, NOTHNAGEL EA. The multiple roles of arabinogalactan proteins in plant development. *Plant Physiol*2000; 122: 3-9.
- [46] MALAMY JE, BENFEY PN. Organization and cell differentiation in lateral roots of *Arabidopsis thaliana*. *Development* 1997; 124: 33-44.
- [47] MANSFIELD SG, BRIARTY LG. Early embryogenesis in *Arabidopsis thaliana*. II. The developing embryo. *Can J Bot* 1991; 69: 461-476.
- [48] MARCEL A, TOONEN E, SCHMIDT A, DE VRIES A. Promotive and inhibitory effects of diverse arabinogalactan proteins on *Daucus carota* L. somatic embryogenesis. *Planta* 1997; 203: 188-195.
- [49] MA YER U, TORESS RUIZ RA, BERLETH T, MISERA S, JURGENS G. Mutations affecting body organization in the *Arabidopsis* embryo. *Nature* 1991; 353: 402-407.
- [50] MA YER U, BDTTNER G, JDRGENS G. Apical-basal patten formation in the *Arabidopsis* embryo: studies on the role of the *gnom* gene. *Development* 1993; 117: 149-162.
- [51] MA YER KFX, SCHOOF H, HAECKER A, LENHARD M, JDRGENS G, LAUX T. Role of *WUSCHEL* in regulating stem cell fate in the *Arabidopsis* shoot meristem. *Cell* 1998; 95: 805-815.
- [52] OGAS J, CHENG JC, SUNG ZR, SOMERVILLE C. Cellular differentiation regulated by gibberellin in the *Arabidopsis thaliana* *pickle* mutant. *Science* 1997; 277: 91-94.
- [53] OGAS J, KAUFMANN S, HENDERSON J, SOMERVILLE CH. *PICKLE* is a CHD3 chromatin-remodeling factor that regulates the transition from embryonic to vegetative development in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 94: 13839-13844.
- [54] OXLEY D, BACIC A. Structure of the glycosylphosphatidylinositol anchor of an arabinogalactan protein from *Pyrus communis* suspension-cultured cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 14246-14251.
- [55] PEYROCHE A, PARIS S, JACKSON CL. Nucleotide exchange on ARF mediated by yeast Gea1 protein. *Nature* 1996;

- [56] PRZEMECK GK, MA TTSSON J, HARADTKE CS, SUNG ZR, BERLETH T. Studies on the role of the *Arabidopsis* gene *MONOPTEROS* in vascular development and plant cell axialization. *Planta* 1996; 200: 229-237.
- [57] PYSH LD, WYSOCKA-DILLER JW, CAMILLERI C, BOUCHEZ D, BENFEY PN. The *GRAS* gene family in *Arabidopsis*: sequence characterization and basic expression analysis of the *SCARECROW-LIKE* genes. *Plant J* 1999; 18: 111-119.
- [58] QUATRANO RS, SHAW SLo Role of the cell wall in the determination of cell polarity and the plane of cell division in *Fucus* embryos. *Trends in Plant Science* 1997; 2: 15-21.
- [59] REISER L, SANCHEZ-BARACALDO P, HAKE S. Knots in the family tree: evolutionary relationships and functions of knox homeobox genes. *Plant Mol Biol* 2000; 42: 151-166.
- [60] SAMACH A, KLENZ JE, KOHALMI SE, RISSEEUW E, HAUGHN GW, CROSBY WL. The *UNUSUAL FLORAL ORGANS* gene of *Arabidopsis thaliana* in an F-box protein required for normal patterning and growth in the floral meristem. *Plant J* 1999; 20: 433-445.
- [61] SCHERES B, DI LAURENZIO L, WILLEMSSEN V, HAUSER MT, JANMAAT K, WEISBEEK P, BENFEY PN. Mutations affecting the radial organisation of the *Arabidopsis* root display specific defects throughout the embryonic axis. *Development* 1995; 121: 53-62.
- [62] SCHERES B, MCKHANN HI, VAN DEN BERG C. Roots redefined: Anatomical and genetical analysis of root development. *Plant Physiol* 1996a; 111: 959-964.
- [63] SCHERES B, MCKANN H, VAN DER BERG C, WILLEMSSEN V, WOLKENFELTH, DE VRIEZEG, WEISBEEK P. Experimental and genetic analysis of root development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Soil* 1996; 187: 97-105.
- [64] SCHERES B, WOLKENFELT H. The *Arabidopsis* root as a model to study plant development. *Plant Physiol Biochem* 1998; 36: 21-32.
- [65] SCHMIDT EDL, GUZZO F, TOONEN MAJ, DE VRIES Sc. A leucine-rich repeat containing receptor-like kinase marks somatic plant cells competent to form embryos. *Development* 1997; 124: 2049-2062.
- [66] SCHOOF H, LENHARD M, HAECKER A, MA YER KF, JURGENS G, LAUX T. The stem cell population of *Arabidopsis* shoot meristems is maintained by a regulatory loop between the *CLAVATA* and *WUSCHEL* genes. *Cell* 2000; 100: 635-644.
- [67] SCHRICK K, MA YER U, HORRICH A, KUHN C, BELLINI C, DANGEL J, SCHMIDT J, JURGENS G. *FAKEL* is a sterol C-14 reductase required for organized cell division and expansion in *Arabidopsis* embryogenesis. *Genes Dev* 2000; 14: 1471-1484.
- [68] SESSIONS A, WEIGEL D, ANOFKY MF. The *Arabidopsis thaliana* Meristem Layer 1 promoter specifies epidermal expression in meristems and young primordia. *Plant J* 1999; 20: 259-263.
- [69] SHEVELL DE, LEU WM, GILLMOR CS, XIA G, FELDMANN KA, CHUA NH. *EMB30* is essential for normal cell division, cell expansion, and cell adhesion in *Arabidopsis* and encodes a protein that has similarity to Sec7. *Cell* 1994; 77: 1051-1062.
- [70] SHEVELL DE, KUNKEL T, CHUA NH. Cell wall alterations in the *Arabidopsis emb30* mutant. *Plant Cell* 2000; 12: 2047-2059.
- [71] SORENSSEN MB, CHAUDHURY AM, ROBERT H, BANCHAREL E, BERGER F. Polycomb group genes control pattern formation in plant seed. *Curr Biol* 2001; 4: 277-281.
- [72] STEINMANN T, GELDNER N, GREBE M, MANGOLD S, JACKSON CL, PARIS S, GALWEILER L, PALME K, JURGENS G. Coordinated polar localization of auxin efflux carrier PIN1 by GNOM ARF GEF. *Science* 1999; 286: 316-318. [73] TAKADAS, HIBARAK, ISHIDA T, TASAKAM. The *CUP-SHAPED COTYLEDON1* gene of *Arabidopsis* regulates shoot apical meristem formation. *Development* 2001; 128: 1127-1135. [74] TORRES-RUIZ RA, JURGENS G. Mutations in the *FASS* gene uncouple pattern formation and morphogenesis in *Arabidopsis* development. *Development* 1994; 120: 2967-2978.
- [75] TORRES-RUIZ RA, LOHNER A, JURGENS G. The *GURKE* gene is required for normal organisation of the apical region in the *Arabidopsis* embryo. *Plant J* 1996; 10: 1005-1016. [76] TROTOCHAUD A, JEONG S, CLARKS. *CLAVATA3*, multimeric ligand for the *CLAVATA1* receptor-kinase. *Science* 2000; 289: 613-617.
- [77] UGGLA C, MELLEROWICZ E, SUNDBERG B. Indole-3-acetic acid controls cambial growth in Scots pine by positional signalling. *Plant Physiol* 1998; 117: 113-121.
- [78] VAN DER BERG C, WILLEMSSEN V, HAGE W, WEISBEEK P, SCHERES B. Cell fate in the *Arabidopsis* root meristem determined by directional signalling. *Nature* 1995; 378: 62-65. [79] VAN DER BERG C, WILLEMSSEN V, HENDRIKS G, WEISBEEK P, SCHERES B. Short-range control of cell differentiation in the *Arabidopsis* root meristem. *Nature* 1997; 390: 287-289.
- [80] VAN HENGEL AJ, GUZZO F, VAN KAMMEN A, DE VRIES S.C. Expression pattern of the carrot EP3 endochitinase genes in suspension cultures and in developing seeds. *Plant Physiol* 1998; 117: 43-53.
- [81] VIELLE-CALZADA JP, BASKAR R, GROSSNIKL A U. Delayed activation of the paternal genome during seed development. *Nature* 2000; 404: 91-94.
- [82] WILLEMSSEN V, WOLKENFELT H, DE VRIEZE G, WEISBEEK P, SCHERES B. The *HOBBIT* gene is required for formation of the root meristem in the *Arabidopsis* embryo. *Development* 1998; 125: 521-531.
- [83] YOUL N, BACIC A, OXLEY D. Arabinogalactan-proteins from *Nicotiana glauca* and *Pyrus communis* contain glycosylphosphatidylinositol membrane anchors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 7921-7926.

Redaktor prowadzący - Maria Olszewska

Otrzymano: 26.01.2001 r. Przyjęto: 18.07. 2001 r.

Adres autora: ul. Nowoursynowska 166,02-787 Warszawa [kwasiak@alpha.sggw.waw.pl](mailto:kwasiak@alpha.sggw.waw.pl)