

Historia rozwoju badań z wykorzystaniem rośliny modelowej *Arabidopsis* z perspektywy genu *WUSCHEL*

STRESZCZENIE

Rośliny mają zdolność do nieograniczonego wzrostu i organogenezy. Nieprzerwany rozwój nadziemnych części roślin jest zależny od prawidłowego funkcjonowania merystemu apikalnego pędu (ang. *shoot apical meristem*, SAM), w którym utrzymywana jest pula nieróżnicowanych komórek inicjalnych. Główną funkcją SAM jest namnażanie komórek i samoodtwarzanie się. Dotychczas zidentyfikowano wiele genów zaangażowanych w regulację SAM, a jako kluczowe wymienia się m.in. *SHOOTMERISTEMLESS*, *CLAVATA* i *WUSCHEL*. Prowadzone przez dekady badania eksperymentalne pozwoliły szczegółowo określić rolę genu *WUSCHEL* w utrzymaniu tożsamości komórek inicjalnych (ang. *stem cells*). Niebagatelną rolę w historii tych badań odegrał wybór *Arabidopsis thaliana* jako rośliny modelowej. Jak odkryto, a następnie wyjaśniono mechanizm działania genu *WUSCHEL*? Na te pytania postaramy się odpowiedzieć w tej pracy, podkreślając jednocześnie, w jaki sposób wybór modelu do badań umożliwił scharakteryzowanie funkcji genu *WUSCHEL*.

CHARAKTERYSTYKA *ARABIDOPSIS THALIANA* JAKO ROŚLINY MODELOWEJ

Z punktu widzenia badań eksperymentalnych, organizm pretendujący do miana rośliny modelowej musi wykazywać szereg pożądanych cech, takich jak: krótki cykl życiowy, duża liczba produkowanych zarodników lub nasion, niewielkie rozmiary i łatwość prowadzenia upraw, poznana sekwencja genomu, łatwość pozyskiwania transformantów i mutantów oraz możliwość wyprowadzenia stabilnych linii transgenicznych [1]. Wszystkie wymienione wyżej kryteria spełnia *Arabidopsis thaliana* (L.) Heyn. (rzodkiewnik pospolity), niewielka roślina należąca do rodziny kapustowatych (Brassicaceae), do której należą również liczne gatunki użytkowe np. rzepak, kalafior. Pokrój *Arabidopsis* zmienia się w zależności od fazy rozwoju. Początkowo, w fazie wegetatywnej, roślina rozwija się tworząc liście zebrane w rozetę. Faza generatywna, obejmująca etapy kwitnienia i owocowania, rozpoczyna się wraz z charakterystyczną zmianą pokroju rośliny. Z rozety liściowej wyrastają wówczas wysokie na 15–25 cm smukłe pędy kwiatostanowe, wytwarzające dużą liczbę drobnych białych kwiatów [2–4]. Wzrost i rozwój roślin nie byłyby możliwe, gdyby nie działalność merystemów, czyli grup komórek proliferujących, wśród których znajdują się nieróżnicowane komórki inicjalne (ang. *stem cells*). Szczególne znaczenie dla rozwoju nadziemnych części roślin ma merystem wierzchołkowy pędu (ang. *shoot apical meristem*, SAM). SAM powstaje podczas rozwoju zarodkowego i funkcjonuje przez cały okres życia rośliny. W obrębie SAM utrzymywana jest samoodnawiająca się pula komórek inicjalnych, których pochodne ulegają różnicowaniu i współtworzą wszystkie organy nadziemne, takie jak łodyga, liście, pąki pachwinowe czy kwiaty. W wyniku eksperymentów prowadzonych z wykorzystaniem *Arabidopsis* wykazano, że bez funkcjonalnych komórek inicjalnych w SAM roślina zamiera już na etapie kilkudniowej siewki.

Arabidopsis nie jest rośliną wymagającą zapewnienia jakichś szczególnych warunków do wzrostu. Jednocześnie wykazuje wyraźną plastyczność fenotypową zależnie od typu prowadzonej uprawy (rodzaju podłoża) i warunków kultury (temperatura, długość dnia i nocy, stosowane pożywki). Obecnie uprawę roślin prowadzi się zarówno na ziemi, imitując naturalne warunki wzrostu, na specjalnie przygotowanych pożywkach *in vitro*, jak i w uprawie hydroponicznej o ściśle określonym składzie chemicznym pożywki. Oprócz światła słonecznego wykorzystuje się także sztuczne oświetlenie zapewniane w specjalnie przystosowanych pomieszczeniach (fitotronach) lub szafach hodowlanych. Dostępność różnych typów uprawy i optymalizacja warunków jej prowadzenia pozwala na badanie różnego typu zjawisk, w tym określenie wpływu czynników zewnętrznych [1].

mgr Anna Brzostowska,

dr hab. inż. Alicja Dolzblasz✉

Zakład Biologii Rozwoju Roślin, Wydział Nauk Biologicznych, Uniwersytet Wrocławski

https://doi.org/10.18388/pb.2021_404

✉ autor korespondujący: alicja.dolzblasz@uwr.edu.pl

Słowa kluczowe: *Arabidopsis thaliana*, komórki inicjalne, merystem apikalny pędu, *WUSCHEL*

Skróty: Col – ekotyp Columbia; EMS – metanosulfonian etylu; GFP – białko zielonej fluorescencji (ang. *Green Fluorescence Protein*); GUS – enzym β -glukuronidaza; *Ler* – ekotyp *Landsberg erecta*; OC – centrum organizacyjne merystemu apikalnego pędu (ang. *Organizing Center*); SAM – merystem apikalny pędu (ang. *Shoot Apical Meristem*); WUS – gen *WUSCHEL*

Co ważne, *Arabidopsis* jest zdolna do samozapylenia dzięki posiadaniu żeńskich i męskich organów generatywnych (słupków i pręcików) dojrzewających równocześnie w kwiecie i braku samoniezgodności. Budowa kwiatu *Arabidopsis* umożliwia ponadto sztuczne i kierunkowe krzyżowanie osobników z różnych linii transgenicznych i mutantów [1,5]. Szacuje się, że z jednej rośliny można pozyskać nawet do kilku tysięcy nasion [2]. Nasiona *Arabidopsis* można również poddawać działaniu fizycznych i chemicznych czynników mutagennych, co w przeszłości przyczyniło się znacząco do rozwoju badań z zakresu genetyki roślin [3,6-7]. Warto podkreślić, że nasiona rzodkiewnika mogą być przechowywane przez wiele lat, a także przekazywane między grupami badawczymi. Czyni to *Arabidopsis* szeroko dostępnym organizmem modelowym, umożliwiając wymianę nasion, a tym samym szybszy postęp badań biologii rozwoju roślin.

EKOTYPY ARABIDOPSIS

Zdolność do samozapylenia, oprócz wydajnego owocowania, a tym samym tworzenia dużej liczby nasion, ma również znaczenie w kontekście utrwalenia cech adaptacyjnych o podłożu genetycznym w dziko rosnących populacjach *Arabidopsis* na całym świecie. W naturze rzodkiewnik występuje na wszystkich kontynentach i w każdej strefie klimatycznej [8]. Populacje przystosowane do funkcjonowania w zajmowanym siedlisku odznaczają się wysokim stopniem homozygotyczności genomu, będącej skutkiem samozapłodnienia i izolacji przestrzennej od innych populacji. Tego typu populacje nazywamy ekotypami [4].

Już w latach trzydziestych ubiegłego wieku niemiecki uczony, Friedrich Laibach, zwrócił uwagę na występującą dywersyfikację w czasie kwitnienia pomiędzy poszczególnymi populacjami *Arabidopsis* pochodzącymi z różnego typu środowisk [7]. Z czasem zaczęto wyróżniać i nazywać kolejne ekotypy, a także deponować nasiona z ich rodzimych populacji. Obecnie opisuje się ekotypy zróżnicowane pod wieloma aspektami, w tym odmiany jare (kielkujące wiosną i kwitnące późnym latem) oraz ozime (kielkujące jesienią, zimujące w fazie wegetatywnej i kwitnące wczesną wiosną, wymagające wernalizacji (chłodu) do indukcji kwitnienia), czy też odmiany odporne na różne przejawy stresu środowiskowego (susza, długość dnia, temperatura, itp.). Różnorodność prezentowanych cech znajduje zastosowanie w wielu gałęziach biologii roślin, takich jak badania filogenetyczne czy fizjologiczne [4].

Naukowcy reprezentujący biologię rozwoju czy genetykę roślin wykorzystują w swojej pracy dwa główne ekotypy: Landsberg *erecta* (*Ler*) i Columbia (*Col*) [7]. Landsberg *erecta* jest mutantem, który został wyizolowany po mutagenizie przeprowadzonej z użyciem naświetlania promieniami Roentgena roślin ekotypu Landsberg. Columbia jest zaś odmianą naturalną, wyizolowaną z dziko rosnącej, nienasświetlanej populacji ekotypu Landsberg [9]. Oba ekotypy reprezentują odmiany jare, niewymagające wernalizacji, co przyspiesza i ułatwia ich uprawę. W optymalnych warunkach wzrostu czas od wykiełkowania nasiona do osiągnięcia pełnej dojrzałości i produkcji pierwszych owoców

wynosi nie więcej niż 2 miesiące [1-2]. Wykorzystanie tych dwóch ekotypów umożliwia uzyskiwanie porównywalnych do siebie wyników, niwelując ich zmienność wynikającą z różnic w strukturze genomu, a więc ułatwia też interpretację danych i pozwala na odkrycie uniwersalnych mechanizmów leżących u podstaw funkcjonowania roślin okrytonasiennych [7].

POCZĄTKI BADAŃ NAUKOWYCH Z WYKORZYSTANIEM ARABIDOPSIS

Pomimo licznych zalet ten niepozorny chwast nie zawsze zajmował dominującą pozycję w świecie nauki. O status organizmu modelowego konkurował z roślinami uprawnymi, takimi jak pomidor, kukurydza czy tytoń, mającymi znaczenie w życiu człowieka. Dziś, pomimo swojego znaczenia dla nauki, *Arabidopsis* pozostaje wciąż rośliną dobrze znaną jedynie biologom. Niska świadomość społeczna dotycząca znaczenia tego gatunku dla rozwoju nauki bywa utrudnieniem w pozyskiwaniu funduszy na prowadzenie badań naukowych z wykorzystaniem tego modelu [3].

Arabidopsis w literaturze naukowej zadebiutowała w 1907 r., dzięki wspomnianemu wcześniej Friedriechowi Laibachowi [7]. Był on wówczas doktorantem Edwarda Strasburgera, wybitnego naukowca polsko-niemieckiego pochodzenia, którego liczne odkrycia istotnie przyczyniły się do rozwoju botaniki. Laibach prowadził analizy cytologiczne na różnych gatunkach roślin, w tym także na zaproponowanym przez Strasburgera rzodkiewniku [6,7]. W swojej rozprawie doktorskiej Laibach scharakteryzował 5 par chromosomów *Arabidopsis thaliana*. Wśród roślin taka liczba chromosomów jest niewielka, ponadto są one bardzo małe [7,10]. Z jednej strony było to istotnym utrudnieniem w przeprowadzaniu analiz cytologicznych na początku XX wieku, z uwagi na brak odpowiednich narzędzi i metod, z drugiej zaś, niewielki genom jest obecnie dużym ułatwieniem w badaniach związanych z genetyką roślin.

Obecnie wiadomo już, że cały genom *Arabidopsis* ma wielkość jedynie 125 Mbp i zawiera około 25 tysięcy genów – podobnie jak genom człowieka, który jest jednak ponad 20 razy większy. Niewielki rozmiar genomu u *Arabidopsis* jest związany z brakiem licznych powtórzeń i duplikacji, choć są one powszechnie obecne w genomach roślinnych [1,10]. U większości znanych nam gatunków roślin genomy są bardzo duże, zorganizowane w liczne chromosomy, a przez to wysoce skomplikowane. Z uwagi na te cechy długo uważano próby wykonywania analiz genetycznych u roślin za niemożliwe, choć badania, które dały początek genetyce, były przeprowadzone przez Gregora Mendla właśnie z wykorzystaniem roślin. Dziś, głównie dzięki rozwojowi technologii, z powodzeniem bada się genomy różnych roślin, choć z uwagi na swoje, opisane wyżej, cechy głównym modelem pozostaje *A. thaliana*.

Laibach zaniechał pracy nad rzodkiewnikiem aż do lat trzydziestych XX wieku. Po powrocie do badań z wykorzystaniem *Arabidopsis*, przez 20 lat Laibach i jego współpracownicy zebrali ponad 150 różnych ekotypów z licznych siedlisk, nadając im nazwy według miejscowości zbioru materiału [3,7]. Laibach, dzięki swojej długoletniej pracy i

doskonalemu poznaniu biologii *Arabidopsis*, będąc świadomym jej licznych walorów, już w 1943 r. zaproponował stosowanie jej jako modelu badawczego. Według niego *Arabidopsis* miała potencjał stać się dla botaników tak ważną rośliną, jak *Drosophila melanogaster* dominująca wówczas wśród badań związanych z biologią rozwoju zwierząt i genetyką [11,12]. Oba te organizmy łączy duża podatność na czynniki mutagenne (a tym samym możliwość uzyskiwania mutantów i badanie funkcji genów), zdolność do utrzymania linii homozygotycznych i łatwość ukierunkowanego krzyżowania [9].

Pierwsze indukowane mutanty *A. thaliana* zostały wyizolowane przez Ernę Reinholz, doktorantkę F. Laibacha, w pierwszej połowie lat czterdziestych XX wieku [13]. W tym celu Reinholz wykorzystwała promieniowanie Roentgena, które okazało się być wysoce wydajnym czynnikiem modyfikującym materiał genetyczny *Arabidopsis*. Co ciekawe, już w 1955 r. na łamach *Nature* opublikowano doniesienia o wyizolowaniu mutantu *Arabidopsis* [14]. Wówczas, po raz pierwszy w historii, wyniki badań z wykorzystaniem rzodkiewnika ukazały się w tak ważnym i poczytnym czasopiśmie naukowym. Autorem wspomnianej pracy był młody Australijczyk, John Langridge, który podobnie jak Reinholz jako mutagen zastosował promieniowanie Roentgena [7,12,14]. Wkrótce mutageneza *Arabidopsis* zyskała na znaczeniu, co podkreślały udane próby stosowania nowych czynników mutagennych, takich jak EMS i promieniowanie UV.

ROZWÓJ BADAŃ Z WYKORZYSTANIEM ARABIDOPSIS W EUROPIE I USA

Popularność rzodkiewnika w Europie zaczęła powoli wzrastać w drugiej połowie lat pięćdziesiątych XX wieku, kiedy to *Arabidopsis* stało się modelem stosowanym w kilku różnych krajach. Uczeni z Niemiec, Czechosłowacji, Belgii i Holandii utworzyli zwartą społeczność prowadzącą badania między innymi nad rozwojem metod mutagenezy i analizą pozyskiwanych mutantów [7]. W 1964 r. rozpoczęto wydawanie rocznego newslettera/biuletynu, który był przez lata publikowany jako AIS (z ang. *Arabidopsis Information Service*), a w 1965 r. w Getyndze odbyła się pierwsza międzynarodowa konferencja naukowa poświęcona w całości *Arabidopsis* [3]. W wyniku dostrzeżonej potrzeby i starań badaczy na początku lat dziewięćdziesiątych utworzono powszechny bank nasion, w którym zdeponowano ekotypy z kolekcji Laibacha i większość wyizolowanych już w tym czasie mutantów [15]. W późniejszych latach AIS przekształcony został w dobrze rozwiniętą internetową bazę danych na temat *Arabidopsis* (TAIR – *The Arabidopsis Information Resource*), w której znajdują się obecnie także wszystkie archiwalne wydania newsletterów AIS [3].

Rozwój badań nad *Arabidopsis* w USA rozpoczął się w latach pięćdziesiątych wraz z emigracją węgierskiego botanika, G. Redeiego. Redei, współpracujący z Laibachem i dzielący jego poglądy na *Arabidopsis* jako roślinę modelową, zabrał ze sobą nasiona czterech ekotypów z kolekcji Laibacha: Graz, Limburg, Estland i Landsberg. Przez niemal 20 lat pozostawał kierownikiem jedyne laboratorium w Ameryce Północnej, w którym przeprowadzano badania z wykorzystaniem rzodkiewnika [7,9]. W 1975 r. opublikował

artykuł [6], w którym intensywnie podkreślał zalety *Arabidopsis* jako modelu badawczego powołując się na uzyskane przez siebie wyniki, dokonania F. Laibacha i odkrycia europejskich badaczy. Szczególną uwagę zwrócił na intensywne stosowanie czynników o potencjale mutagennym: od fizycznych po chemiczne [6]. Podczas gdy w Stanach Zjednoczonych intensywnie badano genetykę organizmów prokariotycznych z uwagi na łatwość prowadzenia analiz, oraz zwierzęcych ze względu na możliwość wykorzystania wyników w medycynie, botaniczne oblicze genetyki pozostawało poza obszarem zainteresowania szerokiego grona naukowców. Pomimo stale rosnącego zainteresowania *Arabidopsis*, przejawiającego się powstawaniem nowych zespołów badawczych skupiających się wokół tej rośliny i nawiązywaniem międzynarodowej współpracy, dużym problemem okazało się zwrócenie uwagi środowiska naukowego i fundacji na zaniedbywany dotychczas obszar badań molekularnych z wykorzystaniem roślin. Pełen rozkwit badań nad genetyką roślin nastąpił dopiero pod koniec XX wieku w Stanach Zjednoczonych, w wyniku dostrzeżenia pogłębiającej się przepaści pomiędzy wiedzą o różnych grupach organizmów i wzrastającej konkurencji między genetykami [3,7].

U schyłku lat siedemdziesiątych na potrzebę ustanowienia modelu roślinnego dla badań genetycznych zwrócił nawet uwagę jeden ze współodkrywców struktury DNA, James Watson. W wyniku jego starań przystąpiono wtedy do badań z wykorzystaniem petunii (*Petunia* sp.), a wkrótce jako drugi model zastosowano także *A. thaliana*. Rządki okazał się również wdzięczną pomocą naukową podczas kursu biologii molekularnej roślin skierowanego do studentów i młodych badaczy, co pozwoliło ponownie uwydatnić zalety tej rośliny jako potencjalnego organizmu modelowego [3]. Uprawa *Arabidopsis* była łatwa, szybka i tania; możliwości manipulacji i analizowania różnych struktur bardzo rozległe, a sama roślina charakteryzowała się prostą, ale typową dla roślin okrytonasiennych budową. Pod koniec lat osiemdziesiątych, dzięki silnemu wpływowi Jamesa Watsona i wzrastającej konkurencji między National Institute of Health, finansującym Human Genome Project, a National Science Foundation (NSF), NSF zdecydowała się przekazać fundusze na poczet niedowartościowanych dotychczas badań w zakresie genetyki roślin. Spopularyzowanie *Arabidopsis* jako modelu badawczego w Stanach Zjednoczonych przyciągnęło uwagę młodych uczonych, których badania ugruntowały pozycję rzodkiewnika jako modelu badawczego: Freda Ausubela, Elliota Meyerowitza, Dave'a Meinkego, Randy'ego Scholla, Shauny i Chrisa Somerville'ów oraz Martina Koornneefa. Wzrost zainteresowania i napływ funduszy pozwoliły poszerzyć zakres badań i przyspieszyć ich rozwój, co szybko wysunęło Stany Zjednoczone na pozycję lidera badań z wykorzystaniem *Arabidopsis* [3,7].

ERA PIERWSZYCH ANALIZ GENETYCZNYCH

Lata osiemdziesiąte i dziewięćdziesiąte to „złote lata” dla rozwoju metod mutagenezy i analiz genetycznych, które dostarczyły przełomowych wyników dzięki którym dobitnie wykazano, że badania genetyczne można z sukcesem prowadzić także na wielokomórkowych eukariotycznych organizmach, w tym na *Arabidopsis thaliana*. Stosowane

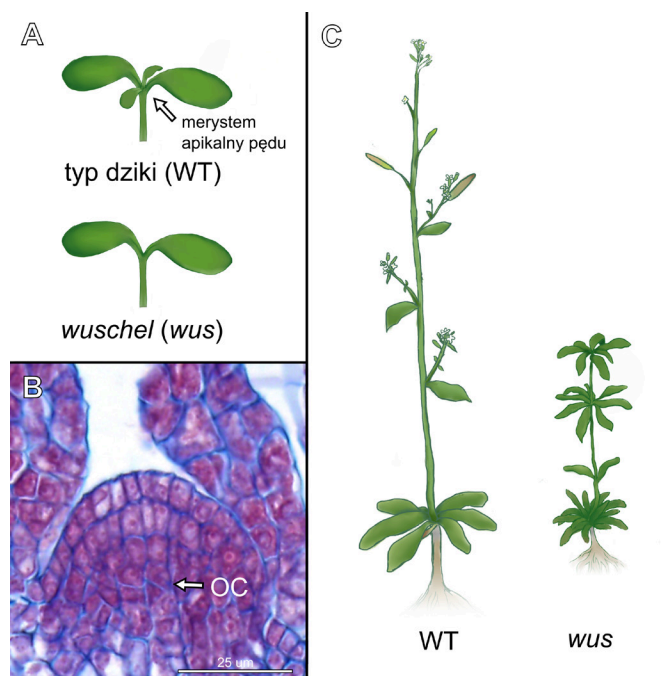
początkowo rodzaje mutagenyzy, wykorzystujące promieniowanie Roentgena, naświetlanie UV lub traktowanie czynnikiem alkilującym EMS powodowały losowe zmiany pojedynczych nukleotydów, co stanowiło jednak znaczącą trudność w kontekście mapowania mutacji. Wymagało ówczasie dużego nakładu pracy i czasu, generując także wysokie koszty przy ograniczonej efektywności. Niekwestionowaną zaletą *Arabidopsis* okazał się niewielki rozmiar genomu i, pomimo niedoskonałości metod, skutecznie mapowano geny, których mutacje wywoływały efekty fenotypowe. Choć przez długi czas narzędzia molekularne nie były powszechnie stosowane w badaniach nad biologią rozwoju roślin, mutagenyza nasion *A. thaliana* okazała się prostym i skutecznym podejściem, a uzyskane dzięki jej zastosowaniu wyniki przyczyniły się znacząco do poszerzenia wiedzy o funkcjonowaniu roślin także na podłożu genetycznym. W konsekwencji rola rzodkiewnika jako rośliny modelowej została ugruntowana, czego wynikiem jest ogromna liczba opublikowanych obecnie prac naukowych na jej temat.

GEN WUSCHEL (WUS)

Z uwagi na kluczowe znaczenie merystemu apikalnego pędu (SAM) dla funkcjonowania rośliny, a także ze względu na potencjalną „nieśmiertelność”, komórki inicjalne (merystematyczne) są szczególnie ważnym obiektem badań. Nie dziwi więc, że od rozpoczęcia pracy z mutantami *Arabidopsis* uwaga naukowców zwrócona była także na ich selekcję i badanie potencjału merystematycznego pod kątem fenotypowych zaburzeń funkcjonowania SAM. Poszukiwania mutantów tego typu prowadzono jednocześnie w Europie i Stanach Zjednoczonych, wykorzystując do tego odpowiednio najpopularniejsze w obrębie tych kontynentów ekotypy: Landsberg *erecta* (*Ler*) w Europie i Columbia (*Col*) w USA. Wytypowano wówczas m. in. kilka mutantów o fenotypach wskazujących na zaburzenia funkcjonowania merystemów, które po dalszych analizach okazały się być mutantami genów *SHOOTMERISTEMLESS* (*STM*, [16]), *CLAVATA1* i *CLAVATA3* (*CLV1*, 3; [17-19]), a także *WUSCHEL* (*WUS*, [20]). Warto wspomnieć, że prace opisujące fenotypy wszystkich tych mutantów były początkowo publikowane jedynie w czasopiśmie *Development*, które stało się tym samym główną platformą wymiany myśli naukowej w zakresie biologii rozwoju.

ODKRYCIE GENU WUSCHEL

Gen *WUSCHEL* został odkryty i opisany po raz pierwszy przez niemieckiego uczonego Thomasa Lauxa pod koniec XX wieku [20]. T. Laux, pracujący wówczas w zespole Gerda Jurgensa, poszukiwał fenotypów świadczących o zaburzeniach w regulacji SAM w młodych siewkach *Arabidopsis thaliana* *Ler*, kielkujących z nasion poddanych mutagenyzy z EMS. W siewkach o prawidłowo funkcjonującym SAM pierwsza para liści wykształca się ok. siódmego dnia od wykiełkowania. Dwa zidentyfikowane przez Laux i wsp. (1996) mutanty *wus* (*wus-1* i *wus-2*), w odróżnieniu do typu dzikiego (WT), nie posiadały liści na tym etapie (Ryc. 1A). Co ciekawe, mutanty *wus* nie kończyły jednak swojego rozwoju, czego można byłoby się spodziewać w przypadku nieodwracalnego uszkodzenia lub niewykształcenia SAM. Niemniej jed-



Rycina 1. Fenotyp roślin *Arabidopsis thaliana* typu dzikiego (WT) i mutantów *wus-1*. A) fenotyp siedmiodniowych siewek *A. thaliana*. Białą strzałką zaznaczono miejsce występowania w siewkach WT merystemu apikalnego pędu; B) przekrój podłużny przez merystem apikalny pędu (z ang. shoot apical meristem, SAM) siewek WT *A. thaliana*. Białą strzałką zaznaczono strefę OC (z ang. organising center); C) fenotyp roślin *A. thaliana* w stadium generatywnym

nak dorosłe mutanty *wus* różniły się znacząco od roślin WT: miały bardziej „krzaczący” pokrój, co było wynikiem nieciągłego tworzenia zawiązków liści w fazie wegetatywnej. Fenotyp mutantu *wuschel* został opisany jako „stop and go”, gdyż jego nieregularne rozety liściowe powstawały z wytwarzanych *de novo* komórek inicjalnych w częściach peryferycznych merystemów. Zawiązujące się w ten sposób nowe merystemy powielały los pierwszego funkcjonującego SAM, ulegając przedwczesnemu zróżnicowaniu komórek merystematycznych. Co ciekawe, mutanty *wus* były w stanie przejść z fazy wegetatywnej do generatywnej i wytworzyć pędy kwiatostanowe (które charakteryzowały się występowaniem powietrznych rozet liściowych i były zdolne do wytworzenia jedynie kilku kwiatów), choć miało to miejsce z bardzo dużym opóźnieniem względem WT [20] (Ryc. 1C). Szczegółowo przeprowadzone analizy fenotypu na poziomie organizmowym, tkankowym i komórkowym wykazały, że gen *WUSCHEL* nie jest konieczny do inicjacji merystemu apikalnego pędu (SAM), ale jest wymagany do utrzymania niezdefiniowanej tożsamości komórek w jego obrębie. Tworzenie się nowych organów w mutantach *wus* ma charakter nieregularny zarówno w stadium wegetatywnym, jak i generatywnym. Wiadomo również, że *WUSCHEL* pełni istotną rolę w podtrzymywaniu prawidłowego funkcjonowania merystemu kwiatostanowego; w tej pracy skupimy się jednak wyłącznie na jego roli w odniesieniu do merystemu apikalnego pędu (SAM).

Mutant *wus-1* i *wus-2* powstały na drodze mutagenyzy chemicznej z wykorzystaniem czynnika alkilującego EMS. Poznanie dokładnej chromosomalnej lokalizacji zmienione-

go nukleotydu (a więc w konsekwencji identyfikacja genu *WUSCHEL*) było więc wyzwaniem. W tym celu zastosowano kosztowną i pracochłonną metodę *Map-Based cloning*, a uzyskane wyniki opublikowano w czasopiśmie *Development* w 1998 roku [21]. Analiza sekwencji wyjściowej wykonana przez zespół T. Lauxa pozwoliła określić, że gen *WUS* koduje białko homeotyczne nowego typu, złożone z 291 aminokwasów i zawierające dwa typy domen funkcjonalnych: 1) domenę wykazującą podobieństwo do homeodomen wiążących DNA; 2) domenę kwaśnych aminokwasów przypominającą podobne domeny, obecne w czynnikach pozytywnie regulujących transkrypcję.

Do poznania funkcji genu rutynowo wykorzystuje się dzisiaj rośliny transgeniczne, dzięki którym możliwa jest np. lokalizacja aktywności promotora czy białka w odniesieniu do tkanek, komórek i organelli komórkowych, mobilności białek lub aktywowanie i dezaktywowanie badanego genu w systemach indukcyjnych. Tego typu eksperymenty nie były jednak prowadzone powszechnie u rzodkiewnika ze względu na konieczność stosowania kultur tkankowych, niskiej skuteczności transformacji i braku dostępności zoptymalizowanych protokołów. Dopiero opracowanie metody „*floral dip*” w 1998 r. [22] ułatwiło wydajną transformację *Arabidopsis*, otwierając szeroko drzwi do niewyeksplorowanych dotąd pól badań. W pierwszych publikacjach dotyczących roślin transgenicznych w kontekście *WUSCHEL* zastosowano więc metodę stabilnej transformacji (wykorzystując w tym celu korzenie i hodowlę tkankową) wyłącznie podczas przeprowadzania „*Map-based cloning*”. W celu komórkowego zlokalizowania produktu białkowego genu *WUSCHEL* (poprzez jego fuzję z genem reporterowym kodującym β -glukuronidazę GUS) zastosowano metodę ekspresji przejściowej w komórkach epidermy cebuli [21]. Dowodem aktywności enzymu GUS jest obecność niebieskiego produktu w tkance do której podano substrat. Dzięki zastosowaniu tej metody możliwe było potwierdzenie jądrowej lokalizacji produktu genu *WUSCHEL*, a ponadto, łącząc tę wiedzę z wnioskami odnoszącymi się do domen funkcjonalnych w sekwencji, zaklasyfikowano *WUSCHEL* jako czynnik transkrypcyjny.

Hybrydyzacja *in situ* była wówczas powszechnie stosowaną metodą, która umożliwiała efektywne sprawdzenie poziomu ekspresji genów. Opierała się o detekcję mRNA i nie wymagała wcześniejszego transformowania roślin. Brak konieczności tworzenia roślin transgenicznych to walor, dzięki któremu technika ta stała się wykorzystywana powszechnie w badaniach genetycznych z wykorzystaniem *A. thaliana*. Dzięki jej zastosowaniu dowiedziono między innymi, że transkrypt genu *WUSCHEL* pojawia się po raz pierwszy w zarodku w stadium 16 komórkowym, a jego lokalizacja jest ograniczona do czterech komórek. Na późniejszych etapach rozwoju zarodka oraz w rozwoju pozarodkowym sygnał pochodzący od mRNA genu *WUS* jest obecny tylko w niewielkiej grupie komórek w centralnej części merystemu apikalnego pędu, pod komórkami inicjalnymi, którą to strefę zidentyfikowano później jako strefę OC (z ang. *organising center*, OC, Fig. 1B), odpowiadającą wyróżnianej wcześniej strefie centralnych komórek macierzystych (CKM). Ekspresja

genu *WUSCHEL* jest więc ściśle związana ze strefą OC w SAM, odpowiedzialną za utrzymanie niezróżnicowanego charakteru komórek inicjalnych (z ang. *stem cells*) znajdujących się dystalnie [21].

WUSCHEL A INNE GENY REGULUJĄCE FUNKCJONOWANIE MERYSTEMU APIKALNEGO PĘDU

Poznanie genetycznych zależności pomiędzy nowo odkrytymi genami, mającymi związek z funkcjonowaniem merystemu apikalnego pędu, było ważną częścią badań prowadzonych w tamtych latach. Zanim zidentyfikowano *WUSCHEL*, już wcześniej znano kilka innych genów pełniących rolę w funkcjonowaniu SAM, takich jak *CLAVATA* czy *SHOOTMERISTEMLESS* [16,23]. Rutynowo wykonywano eksperymentalną analizę oddziaływań genetycznych między genami o potencjalnie podobnej roli biologicznej. Analizę fenotypu pojedynczych i podwójnych mutantów (połączoną często z hybrydyzacją *in situ* dla określenia zmian w ekspresji genów) stosowano więc też z powodzeniem przy określaniu interakcji między genami o potencjalnie „merystematycznej” roli. Pozwoliło to między innymi wykazać, że dwa geny (*WUS* i *STM*), uczestniczące w podtrzymaniu puli niezróżnicowanych komórek w obrębie SAM, regulują ten proces na drodze różnych ścieżek sygnałnych. Mutacja w genie *WUSCHEL* nie skutkowała powstaniem dodatkowych morfologicznych zmian w siewkach mutantów *stm* z całkowitą utratą funkcji (*stm-5*), zaś wzmacniała fenotyp mutantu hipermorficznego (np. *stm-2*). Fenotyp podwójnego mutantu *wus-1 stm-2* był identyczny jak ten charakteryzujący mutant *stm-5*. Co więcej, ekspresja genu *WUS*, którą u roślin WT obserwuje się w komórkach strefy OC merystemu apikalnego pędu, nadal była wykrywana w zarodkach mutantów *stm-5*, zaś ekspresja genu *STM*, która w typie dzikim występuje na całym obszarze SAM z wyłączeniem zawiązków organów bocznych, była wykrywana w zarodkach mutantów *wus-1*. Ponadto oba te geny nie ulegały już ekspresji w pełni zróżnicowanych wierzchołkach siewek odpowiednich mutantów. Sugeruje to, że u obu mutantów pewien poziom merystematycznej tożsamości jest nadal zachowywany w stadium zarodkowym, ale już nie w stadium siewek, oraz że brak jest wzajemnej zależności w inicjowaniu ekspresji *WUS* i *STM* podczas rozwoju zarodka. Wszystkie uzyskane wyniki (fenotypowanie pojedynczych i podwójnych mutantów oraz poziomy ekspresji genów *WUS* i *STM* w roślinach WT i pojedynczych mutantach) skłoniły badaczy do postawienia hipotezy, że istnieją oddzielne ścieżki regulujące aktywność merystematyczną z wykorzystaniem genów *WUS* i *STM* [21,23]. Dziś wiadomo, że *WUSCHEL* jest wymagany do utrzymania puli komórek inicjalnych, podczas gdy *STM* kontroluje proliferację ich pochodnych zapobiegając ich różnicowaniu się.

Wyizolowanie mutantów genów z rodziny *CLAVATA* zaangażowanych w regulację SAM nastąpiło kilkakrotnie w wyniku mutagenez przeprowadzonych jeszcze przed odkryciem genu *WUSCHEL* [m.in.: 17,18]. Fenotyp zidentyfikowanych w latach osiemdziesiątych mutantów *clv* stanowił przejaw nieprawidłowego działania SAM, czego efektem była fascjacja (rozrost) pędów. Podobnie jak w przypadku genu *STM*, geny *CLV* były analizowane na różnych poziomach organizacji rośliny. Po odkryciu genu

WUSCHEL, przeprowadzono również analizy genetyczne mające wykazać interakcje genetyczne między *WUS* i genami z rodziny *CLAVATA*. Co ciekawe, analizy podwójnych mutantów wykazały, że fenotypy *wus-1 clv1* i *wus-1 clv3* są nierozróżnialne względem pojedynczych mutantów *wus-1* [20,24]. Kontrastujące ze sobą fenotypy pojedynczych mutantów i zmiany we wzorcach ekspresji *WUS* i *CLAVATA* u analizowanych linii (tj. brak ekspresji *CLV3* w mutancie *wus-1* i wzmożona ekspresja *WUS* w mutancie *clv3*), sugerują, że aktywność *WUS* jest negatywnie regulowana i ograniczona do strefy OC przez aktywność genów *CLV* [24-25]. Ten negatywny charakter regulacji *WUSCHEL* przez geny *CLAVATA* został następnie wielokrotnie potwierdzony na drodze eksperymentalnej. Obecnie wiadomo, że geny *CLV* kodują elementy szlaku sygnałowego: *CLV1* kinazę receptorową, *CLV2* białko asystujące w kompleksie sygnałowym, a *CLV3* peptyd sygnałowy [26].

OPRACOWANIE METODY „FLORAL DIP”

Jak wcześniej wspomniano, w 1998 r. opublikowano protokół nowatorskiej i prostej metody transformacji roślin opracowanej dla *Arabidopsis thaliana* tzw. „floral dip” [22]. Technika ta wymaga jedynie, aby rozwijające się młode kwiatostany roślin *Arabidopsis* były zanurzone na około minutę w roztworze zawierającym bakterie *Agrobacterium tumefaciens*, będącymi powszechnie stosowanym wektorem do przeniesienia transgenów do rośliny. Po zakończeniu ekspozycji na drobnoustroj z pożądanym konstruktem genetycznym, rośliny hoduje się w standardowych warunkach w pokoju hodowlanym oczekując na wytworzenie nasion, z których część zawiera transgeniczne zarodki. Metoda „floral dip” ze względu na swoją prostotę i dostępność zrewolucjonizowała badania nad rozwojem roślin, ułatwiając znacząco pozyskiwanie transgenicznych roślin *Arabidopsis*.

Merystem apikalny pędu już w tamtych latach był przedmiotem wielu nowatorskich badań. Nie dziwi więc fakt, że opracowanie protokołu „floral dip” zdecydowanie przyspieszyło także badania dotyczące genu *WUSCHEL* w kontekście molekularnej regulacji funkcjonowania SAM. Dzięki zastosowaniu różnorodnych metod eksperymentalnych potwierdzono rolę *WUSCHEL* w kontrolowaniu funkcjonowania SAM. Dużą rolę odegrały tutaj transformacje *Arabidopsis*, gdyż pozwoliły na stworzenie i użycie roślin transgenicznych ze stabilną ekspresją genów reporterowych, będących pod kontrolą badanych promotorów lub przyłączanych do innych genów przy zachowaniu zgodności ramki odczytu (co było istotne dla sprawdzenia aktywności promotorów lub lokalizacji białek), z konstytutywną ekspresją genu, z ekspresją genu spod innego promotora niż endogennej, czy z indukcją ekspresji w określonym momencie życia (np. przez zastosowanie czynnika chemicznego).

Dzięki wykorzystaniu różnych podejść badawczych, w tym transformacji roślin i tworzenia roślin transgenicznych, analiz genetycznych z użyciem pojedynczych i podwójnych mutantów oraz wizualizacji ekspresji genu *WUS* z użyciem hybrydyzacji *in situ* (u roślin WT i mutantów *clavata*), udało się między innymi jednoznacznie wykazać, że w obrębie merystemu apikalnego pędu geny *CLV* ulegają ekspresji w komórkach inicjalnych (ang. *stem cells*), a ich rolą jest hamo-

wanie ekspresji genu *WUSCHEL* na poziomie transkryptu, ograniczając domenę ekspresji genu *WUS* do komórek OC. Ponadto ekspresja genu *WUS* okazała się być konieczna i równocześnie wystarczająca do indukcji tożsamości leżących w strefie komórek inicjalnych położonych dystalnie do strefy OC i ekspresji ich markera (genu *CLV3*). Dowiedziono także znaczenia tej samoregulującej się pętli *WUSCHEL-CLAVATA* typu ujemnego sprzężenia zwrotnego dla utrzymania względnie stabilnej puli komórek inicjalnych w SAM przez całe życie rośliny. *WUS* promuje utrzymanie tożsamości komórek inicjalnych i ekspresję genu *CLAVATA3*, który negatywnie reguluje ekspresję genu *WUS*, co jest kluczowe dla utrzymania niezdeteminowanego potencjału wzrostu roślin *Arabidopsis* [m.in.: 24-25,27-28].

ZSEKWENCJONOWANIE GENOMU *ARABIDOPSIS* ORAZ ROZWÓJ TECHNIK MIKROSKOPOWYCH A POSTĘP BADAŃ NAD GENEM *WUSCHEL*

Wzrost zainteresowania badaniami z wykorzystaniem rzodkiewnika, a także rozwój metod sekwencjonowania i zwiększenie nakładów finansowych na badania genetyczne przyczyniły się do zainicjowania głośnych projektów, których celem było poznanie sekwencji genomów nie tylko człowieka, ale także organizmów modelowych, takich jak *Arabidopsis thaliana*. W poznanie genomu rzodkiewnika zaangażowało się wiele zespołów badawczych tworzących tzw. AGI (z ang. *Arabidopsis Genome Initiative*), co pozwoliło znacząco przyspieszyć prace, podobnie jak miało to miejsce w najsłynniejszym projekcie sekwencjonowania – HUGO (ang. *The Human Genome Project*). Żywiono wówczas nadzieję, że uzyskane wyniki odmienią oblicze badań naukowych i pozwolą na ich prowadzenie na nieznaną dotąd skalę. Jednym z kamieni milowych w badaniach nad rzodkiewnikiem było opublikowanie w czasopiśmie *Nature* pełnej sekwencji genomu tej rośliny niedługo po opracowaniu metody „floral dip”, tj. w 2000 r. Doprowadziło to do szybkiego pozyskania nowych danych, co wraz z istniejącą wiedzą, będącą owocem dekad badań nad *Arabidopsis*, wymusiło znalezienie sposobu na wygodne deponowanie informacji i ich odczytywanie. Dzięki dążeniom środowiska naukowego do powstania kanału umożliwiającego szybką i powszechną wymianę wiedzy utworzono bazę danych TAIR (z ang. *The Arabidopsis Information Resource*), poświęconą wyłącznie rzodkiewnikowi [29]. Jako matrycę do sekwencjonowania wybrano ekotyp Columbia, co wynikało z jego popularności, dostępności oraz wiedzy, jaką dotychczas zgromadzono, a także naturalnego pochodzenia tego ekotypu. Po opublikowaniu sekwencji jądrowego DNA *Arabidopsis* możliwe stało się prowadzenie badań w skali całego genomu, czyli stosowanie metod pozwalających na analizowanie ekspresji wielu genów jednocześnie, takich jak mikromacierze, a następnie RNAseq, opierające się na detekcji obecnego w komórce RNA z wykorzystaniem technologii sekwencjonowania drugiej generacji.

Ogromny postęp w badaniach nad SAM osiągnięto nie tylko dzięki postępowi w rozwoju narzędzi biologii molekularnej. Innym ważnym czynnikiem, który to umożliwił, był rozwój technik związanych z obserwacjami mikroskopowymi. Coraz bardziej zaawansowane mikroskopy i wykorzystanie znaczników fluorescencyjnych umożliwiły naukow-

com lokalizację białek znakowanych, których ekspresja jest słaba i zachodzi głęboko w strukturach roślinnych (np. białka WUS ulegające ekspresji w niewielkiej liczbie komórek strefy OC w warstwach podpowierzchniowych merystemu, dodatkowo schowanego pod licznymi zawiązkami nowych organów). Postęp w technikach mikroskopowych i biologii molekularnej umożliwił w XXI wieku prowadzenie coraz bardziej precyzyjnych i zaawansowanych badań, które zaowocowały przełomowymi odkryciami związanymi z mechanizmem działania genu *WUSCHEL* i jego roli w regulowaniu funkcjonowania SAM. Z wielu takich odkryć, warto wspomnieć w szczególności o kilku.

Udowodniono, że peptyd sygnałowy *CLAVATA3* jest mobilny, a jego regulowane rozprzestrzenianie się między komórkami warunkuje rozpoczęcie różnicowania się komórek w strefie peryferycznej SAM, przy jednoczesnym zachowaniu stabilnej puli komórek inicjalnych w strefie centralnej [m. in.: 28,30]. Innym ważnym osiągnięciem było odkrycie pierwszych bezpośrednich, negatywnie regulowanych przez *WUSCHEL* genów w SAM, czyli genów *ARABIDOPSIS RESPONSE REGULATOR (ARR)* typu A [31]. Od lat podejrzewano, że *WUSCHEL* działa jako represor w regulacji utrzymania SAM, ale aż do 2005 roku znany był tylko jeden bezpośredni gen docelowy i był to pozytywnie regulowany gen *AGAMOUS* w merystemach kwiatowych. Nic więc dziwnego, że odkrycie pierwszego hamowanego bezpośrednio przez *WUSCHEL* genu, mającego istotne znaczenie dla funkcjonowania SAM, zostało opublikowane w *Nature*. Kolejnym wartym odnotowania osiągnięciem jest wykazanie, że białko *WUS* przemieszcza się z komórek OC, gdzie gen *WUS* jest transkrybowany, do wyżej położonych komórek inicjalnych poprzez plazmodesmy, gdzie bezpośrednio pozytywnie reguluje liczbę komórek inicjalnych i aktywuje transkrypcję genu *CLV3* [32]. Naukowcy przez lata poszukiwali sygnału transportowanego z OC, gdzie zachodzi ekspresja *WUS*, do dystalniepołożonych komórek inicjalnych. Odkrycie mobilności białek *WUS* było zatem wielkim przełomem o szczególnym znaczeniu, którego nie udało się osiągnąć bez ogromnego postępu także w mikroskopii. Zauważono także, że międzykomórkowa mobilność białka *WUS* była ważną innowacją ewolucyjną, która pojawiła się u wspólnego przodka roślin nasiennych po wyodrębnieniu się od paproci. Wydaje się to być kluczowym czynnikiem, który ułatwił *WUSCHEL* funkcjonowanie jako kluczowy gen merystemu apikalnego pędu w roślinach nasiennych [33].

Co istotne, koherentne doniesienia literaturowe wskazują, że zdobywana przez lata wiedza ma szansę przyczynić się także do tego, że geny *WUSCHEL* i *CLAVATA* mogą zostać wykorzystane do zwiększenia wydajności plonowania u roślin użytkowych takich jak pomidor (zwiększenie owoców) czy kukurydza (zwiększenie liczby nasion) [m.in.: 34-35], co ostatecznie może również znacząco podnieść wagę samej *Arabidopsis thaliana*.

PODSUMOWANIE

Wybór *Arabidopsis thaliana* jako potencjalnej rośliny modelowej i wszystkie wymienione wyżej aspekty pozwoliły na daleko idące wykorzystanie technik genetycznych i róż-

nych narzędzi biologii molekularnej oraz niezwykle szybkie osiągnięcie postępu w rozwoju narzędzi do analizy całego genomu u roślin. Cechy dotyczące biologii rzodkiewnika oraz łatwy dostęp do wyników badań z jego wykorzystaniem oraz ich porównywalność, czynią więc *Arabidopsis* nie tylko wartościowym modelem badawczym, ale też najlepiej poznaną spośród wszystkich roślin nasiennych. Co ważne, wnioski płynące z projektów opartych o *Arabidopsis* od dawna znajdują swoje przełożenie w badaniach nad różnymi innymi reprezentantami świata roślin. Stało się to możliwe również dzięki postępowi, jaki osiągnięto dopracowując protokoły do różnych technik molekularnych najpierw na „prostszy” modelu roślinnym, *Arabidopsis*, które przenosi się i coraz skuteczniej wykorzystuje także u roślin użytkowych.

Zwiększające się z czasem możliwości badań, a także coraz łatwiejszy dostęp do nowatorskich metod, były z sukcesem wykorzystywane w próbach szczegółowego wyjaśnienia ważnego aspektu biologii rozwoju roślin, jakim jest funkcjonowanie SAM i leżąca u jego podstaw pętla *WUSCHEL-CLAVATA* typu ujemnego sprzężenia zwrotnego. Warto również zauważyć, że wyżej wspomniane odkrycia dotyczące roli genu *WUSCHEL* to jedynie przykłady uzyskiwanych przez lata wyników badań z zastosowaniem stale udoskonalanych technik mikroskopowej wizualizacji i szeroko zakrojonych badań genomu. Ponadto rozszyfrowywanie z czasem funkcji wzajemnie regulujących się i współdziałających genów związanych z SAM w konsekwencji zwiększyło powszechną wiedzę na temat roli *WUSCHEL*. Badania tego genu nadal są prowadzone – np. w ostatnim czasie Ma i wsp. wykazali (2019) rolę *WUSCHEL* w balansowaniu efektu działania fitohormonów uczestnicząc w ich ścieżce sygnałowej w SAM [36]. Najnowsze doniesienia pozwalają przypuszczać, że w przyszłości odkryte zostaną kolejne interesujące oblicza genu *WUSCHEL*, a dalsze badania pozwolą lepiej zrozumieć pełnią przez niego rolę.

PIŚMIENNICTWO

1. Woodward AW, Bartel B (2018) Biology in Bloom: A Primer on the *Arabidopsis thaliana* Model System. *Genetics* 208(4): 1337-1349
2. Bowman J (1994) *Arabidopsis*, An Atlas of Morphology and Development. Springer-Verlag, New York
3. Sommerville C, Koornneef M (2002) A fortunate choice: the history of *Arabidopsis* as a model plant. *Nat Rev Genet* 3(11): 883-889
4. Szymanska R, Gabruk M, Kruk J (2015) Ekotypy *Arabidopsis thaliana* – nowe narzędzie w badaniach biochemicznych i fiogenetycznych. *Postępy Biochemii* 61(1): 102-113
5. Kramer U (2015) The Natural History of Model Organisms: Planting molecular functions in an ecological context with *Arabidopsis thaliana*. *eLife* 2015; 4: e06100
6. Redei G (1975) *Arabidopsis* as a Genetic Tool. *Annu Rev Genet* 9: 111-127
7. Koornneef M, Meinke D (2010) The development of *Arabidopsis* as a model plant. *Plant J* 61: 909-921
8. Hoffmann M (2002) Biogeography of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. (Brassicaceae). *J Biogeogr* 29: 125-134
9. Somssich M, (2019) A Short History of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Columbia-0. PeerJ Preprints 7:e26931v5
10. Meinke DW, Cherry MJ, Dean C, Rounsley SD, Koornneef M (1998) *Arabidopsis thaliana*: A Model Plant for Genome Analysis. *Science* 282(5389): 662, 679-682

11. Laibach F (1943) *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. als object fur genetische und entwicklungsphysiologische untersuchungen. Bot Archiv 44: 439-455
12. Langridge J (1994) *Arabidopsis thaliana*, a plant Drosophila. BioEssays 16(10): 775-778
13. Laibach F, Muller AJ, Redei GP, Velemink J (1966) The Arabidopsis Information Service (AIS) Robbelen G (ed), No. 3, Institut far Pflanzenbau und Pflanzenziichtung, Universitat Gottingen, Gottingen
14. Langridge J (1955) Biochemical Mutations in the Crucifer *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Nature 4475: 260-261
15. Scholl RL, May ST, Ware DH (2000) Seed and Molecular Resources for Arabidopsis. Plant Physiol 124: 1477-1480
16. Barton MK, Poethig RS (1993) Formation of the shoot apical meristem in *Arabidopsis thaliana*: An analysis of development in the wild type and in the shoot meristemless mutant. Development 119: 823-831
17. Leyser HMO, Furner IJ (1992) Characterisation of three shoot apical meristem mutants of *Arabidopsis thaliana*. Development 116: 397-403
18. Clark SE, Running MP, Meyerowitz EM (1993) CLAVATA1, a regulator of meristem and flower development in Arabidopsis. Development 119: 397-418
19. Clark SE, Running MP, Meyerowitz EM (1995) CLAVATA3 is a specific regulator of shoot and floral meristem development affecting the same processes as CLAVATA1. Development 121: 2057-2067
20. Laux T, Mayer KFX, Berger J, Jürgens G (1996) The WUSCHEL gene is required for shoot and floral meristem integrity in Arabidopsis. Development 122: 87-96
21. Mayer KFX, Schoof H, Haecker A, Lenhard M, Jürgens G, Laux T (1998) Role of WUSCHEL in regulating stem cell fate in Arabidopsis shoot meristem. Cell 95: 805-815
22. Clough SJ, Bent AF (2008) Floral dip: A simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. Plant J 16(6): 735-743
23. Endrizzi K, Moussian B, Haecker A, Levin JZ, Laux T (1996) The SHOOT MERISTEMLESS gene is required for maintenance of undifferentiated cells in Arabidopsis shoot and floral meristems and acts at a different regulatory level than the meristem genes WUSCHEL and ZWILLE. Plant J 10: 967-979
24. Schoof H, Lenhard M, Haecker A, Mayer KFX, Jürgens G, Laux T (2000) The stem cell population of Arabidopsis shoot meristems is maintained by a regulatory loop between CLAVATA and WUSCHEL genes. Cell 100: 635-644
25. Brand U, Fletcher JC, Hobe M, Meyerowitz EM, Simon R (2000) Dependence of stem cell fate in Arabidopsis on a feedback loop regulated by CLV3 activity. Science 289: 617-619
26. Somssich M, Je BI, Simon R, Jackson D (2016) CLAVATA-WUSCHEL signaling in the shoot meristem. Development 143: 3238-3248
27. Brand U, Grünwald M, Hobe M, Simon R (2002) Regulation of CLV3 Expression by Two Homeobox Genes in Arabidopsis. Plant Physiol 129(2): 565-575.
28. Lenhard M, Laux T (2003) Stem cell homeostasis in the Arabidopsis shoot meristem is regulated by intercellular movement of CLAVATA3 and its sequestration by CLAVATA. Development 130: 3163-3173
29. Huala E, Dickerman AV, Garcia-Hernandez M, Weems D, Reiser L, LaFond F, Hanley D, Kiphart D, Zhuang M, Huang W, Mueller L, Bhattacharyya D, Bhaya D, Sobral B, Beavis W, Meinke D, Town C, Somerville C, Rhoe S (2001) The Arabidopsis Information Resource (TAIR): a comprehensive database and web-based information retrieval, analysis, and visualization system for a model plant. Nucl Acids Res 29: 102-105
30. Rojo E, Sharma VK, Kovaleva V, Raikhel NV, Fletcher JC (2002) CLV3 Is Localized to the Extracellular Space, Where It Activates the Arabidopsis CLAVATA Stem Cell Signaling Pathway. Plant Cell 14: 969-977
31. Leibfried A, To JP, Busch W, Stehling S, Kehle A, Denmar M, Kieber JJ, Lohman JU (2005) WUSCHEL controls meristem function by direct regulation of cytokinin-inducible response regulators Nature 438: 1172-1175
32. Yadav RK, Perales M, Gruel J, Girke T, Jönsson H, Reddy GV (2011) WUSCHEL protein movement mediates stem cell homeostasis in the Arabidopsis shoot apex. Genes Dev 25: 2025-2030
33. Two-Step Functional Innovation of the Stem-Cell Factors WUS/WOX5 during Plant Evolution Zhang Y, Jiao Y, Jiao H, Zhao H, Zhu YX (2016) Mol Biol Evol 34(3): 640-653
34. Somssich M, Je BI, SimonR, Jackson D (2016) CLAVATA-WUSCHEL signaling in the shoot meristem. Development 143: 3238-3248
35. Fletcher JC (2018) The CLV-WUS Stem Cell Signaling Pathway: A Roadmap to Crop Yield Optimization. Plants 7: 87
36. Ma Y, Miotk A, Šutiković Z, Ermakova O, Wenzl Ch, Medzihradský A, Gaillochot Ch, Forner J, Utan G, Brackmann K, Galvan-Ampudia C, Vernoux T, Greb T, Lohmann JU (2019) WUSCHEL acts as an auxin response rheostat to maintain apical stem cells in Arabidopsis. Nat Commun 10: 5093

A history of *Arabidopsis* as a model plant from *WUSCHEL* gene perspective

Anna Brzostowska and Alicja Dolzblasz✉

Faculty of Biological Sciences, University of Wrocław

✉corresponding author: alicja.dolzblasz@uwr.edu.pl

Key words: *Arabidopsis thaliana*, stem cells, shoot apical meristem, *WUSCHEL*

ABSTRACT

Plants possess the ability of indeterminate growth and organogenesis. Uninterrupted development of aerial parts of plants strongly depends on the activity of the shoot apical meristem (SAM), where a pool of undifferentiated stem cells is kept throughout the plant life. The main function of SAM is cell proliferation and self-maintenance. Numerous genes functioning within the SAM have already been discovered, including *SHOOTMERISTEMLESS*, *CLAVATA* and *WUSCHEL*. The biological significance of *WUSCHEL* gene for specification of the stem cells fate was proven by various, performed over the years experiments. This was doable, also because the research was performed on *Arabidopsis thaliana* as a model organism. How was the *WUSCHEL* gene mechanism of action discovered, and subsequently experimentally proven? In this review, we will address these questions, pinpointing also how the use of a model organism enabled *WUSCHEL* gene functional characterisation.

