

**Lp. w zał. do Rozporządzenia MRiRW: 46.**

**Tytuł zadania: Badania nad mechanizmami warunkującymi proces embriogenezy gametycznej u buraka cukrowego**

**Kierownik projektu: dr hab. M. Gośka prof. nzw. IHAR-PIB**

Celem zadania było poszerzenie wiedzy na temat genetycznych mechanizmów warunkujących rozwój haploidalnych zarodków oraz analiza udziału i biologicznej roli AGP w przebiegu tego procesu. Punktem wyjścia planowanych prac była dokładna cytologiczna i molekularna charakterystyka komórek zalążka buraka. Z powyższych względów przeprowadzono detekcję wybranych epitopów AGP oraz określono ich przestrzenną dystrybucję w komórkach, tkankach i organach podczas kolejnych etapów rozwoju niezapłodnionych zalążków buraka cukrowego.

#### Materiał i metody

Materiałem wyjściowym do badań były cztery linie homozygotyczne wielonasiennych zapyłaczy buraków cukrowych o różnym potencjale embriogenetycznym. W okresie kwitnienia (czerwiec) pobierano kwiatostany z których izolowano niezapłodnione zalążki i wykładano na pożywkę indukcyjną Murashige i Skooga (MS, 1962) zawierającą  $1 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$  BAP i  $0,1 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$  NAA. Ogółem na pożywki w kulturach *in vitro* wyłożono 8000 zalążków. W okresie kwitnienia buraków pobierano również wierzchołki wzrostu pędów kwiatostanowych w celu zachowania materiału roślinnego do dalszych badań. Eksplantaty o długości 0,3–0,5 cm wykładano na pożywkę indukcyjną MS zawierającą  $1,0 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$  BAP. Prawidłowo rozwinięte pędy rozmnażano na pożywce regeneracyjnej MS z dodatkiem  $0,2 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$  BAP i ukorzeniano na pożywce MS zawierającą  $3,0 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$  IBA.

Analizy histologiczne i immunocytochemiczne materiału roślinnego przeprowadzono na niezapłodnionych zalążkach czterech linii buraka cukrowego o różnym potencjale embriogenetycznym. Niezapłodnione zalążki pobrano bezpośrednio z roślin matecznych oraz po 7, 9 i 14 dniach od wyłożenia na pożywki indukcyjne i utrwalono w mieszaninie 4% paraformaldehydu z 0,5% glutaraldehydem w 0,1 M buforze Pipes. Immunocytochemiczną analizę z użyciem przeciwciał monoklonalnych skierowanych do domen oligosacharydowych charakterystycznych zarówno dla AGP, jak i dla pektyn związanych z proteoglikanami AGP wykonano zgodnie z metodyką opisaną przez Wiśniewską i Majewską (2007). W celu wizualizacji epitopów, zastosowano drugorzędowe przeciwciała sprzężone z izotiocyanianem fluoresceiny (FITC). Analizy mikroskopowe przeprowadzono z użyciem mikroskopu świetlnego oraz fluorescencyjnego.

Materiałem wyjściowym do wykonania analiz endogennych proteoglikanów AGP były niezapłodnione zalążki 4 linii buraka, pobrane bezpośrednio z roślin matecznych oraz po 7 dniach od wyłożenia na pożywki indukcyjne. Porównano 8 ekstraktów AGP wyizolowanych z linii o różnym potencjale embriogenetycznym. Do izolacji ekstraktów AGP użyto po 300 zalążków z każdej linii. Ekstrakcję AGP przeprowadzono zgodnie z procedurą opisaną przez Wiśniewską i Majewską (2007). Następnie wykonano jakościową charakterystykę wyizolowanych proteoglikanów za pomocą immunodetekcji metodą dot-blot z zastosowaniem czterech przeciwciał: LM2, LM5, JIM7, JIM13. Stężenia AGP w próbach określono z wykorzystaniem metody elektroforezy jednokierunkowej typu „rocket” (Komalavilas i współ., 1991).

Izolację RNA przeprowadzono zgodnie z procedurą opisaną przez Chomczyńskiego i Sacchi (2006). Materiał roślinny stanowiły niezapłodnione zalążki buraka na czterech etapach rozwojowych (po 200 zalążków zamrożonych w dniu pobrania oraz po 7, 9 i 14 dniach od

wyłożenia na pożywki indukcyjne), pochodzące z dwóch genotypów o wysokim i dwóch genotypów o niskim potencjale embriogenetycznym. Jakość wyizolowanego RNA sprawdzono spektrofotometrycznie i elektroforetycznie. Następnie przeprowadzono reakcję odwrotnej transkrypcji. Frakcje nowo zsyntetyzowanego cDNA posłużyły jako matryce do szeregu półilościowych reakcji RT-PCR, które umożliwiły ustalenie zmian ekspresji genów na podstawie porównania ilości powstającego w reakcji produktu badanego genu do ilości produktu genu referencyjnego. Do analiz półilościowych wybrano gen SF3A (czynnik splajsingowy), którego ekspresja utrzymywała się na stałym poziomie w różnych tkankach. Łącznie przebadano ekspresję 13 fragmentów genów wybranych na podstawie wyników uzyskanych w poprzednich latach realizacji tematu oraz danych literaturowych.

## Wyniki i dyskusja

W trakcie kwitnienia buraków cukrowych izolowano zalążki z dwóch linii homozygotycznych o wysokim i dwóch linii o niskim potencjale embriogenetycznym. Wykładano je na pożywki indukcyjne. Do kolejnych etapów badań pobierano zalążki w trakcie ich izolacji oraz po 7, 9 i 14 dniach inkubacji na pożywce indukcyjnej (analizy histologiczne, immunocytochemiczne oraz molekularne). Potwierdzono, że wybrane genotypy charakteryzowały się różnym potencjałem embriogenetycznym i mogą stanowić materiał do kolejnych badań.

Wierzchołki wzrostu pędów kwiatostanowych izolowane z czterech linii o różnym potencjale embriogenetycznym wyłożone na pożywki indukcyjne wykazały, że genotyp rośliny rodzicielskiej miał wpływ na bezpośrednią regenerację pędów przybyszowych. Uzyskane regeneranty różniły się morfologicznie, zależnie od linii matecznych z których pochodziły. Przeprowadzone analizy ploidalności regenerantów uzyskanych z wierzchołków wzrostu buraka cukrowego wykazały, że wszystkie badane rośliny miały diploidalną liczbę chromosomów ( $2n=18$ ). Zatem metoda ta pozwala na uzyskanie jednorodnego i cytologicznie stabilnego materiału roślinnego.

Obserwacje histologiczne prowadzone na skrawkach cienkich ( $1\ \mu\text{m}$ ) wykazały, że izolacja niezapłodnionych zalążków z roślin donorowych odbyła się między 1 – 3 dniem przed stadium antezy, zaś woreczek zalążkowy był w pełni rozwinięty, dojrzały i prawidłowo zorganizowany. W przypadku genotypów o wyższym potencjale embriogenetycznym po 7 dniach od wyłożenia na pożywki regeneracyjne w niezapłodnionych zalążkach woreczek zalążkowy powiększył się, zaś synergidy uległy resorpcji. Na kolejnym etapie (po 9 dniach) widoczne były pierwsze podziały komórki jajowej i tworzenie się dwukomórkowego prazarodka. Natomiast po 14 dniach zaobserwowano rozwój trzykomórkowego prazarodka. W przypadku genotypów o niższym potencjale embriogenetycznym zaobserwowano degradację komórek w woreczku zalążkowym, a także nieprawidłowy rozwój tumorowatych struktur w jego wnętrzu, czyli wtórną embriogenezę.

Analizy immunocytochemiczne ujawniły występowanie podobieństw w lokalizacji i relatywnej zawartości domen strukturalnych rozpoznawanych przez przeciwciało JIM8. Natomiast nie stwierdzono obecności domen strukturalnych charakterystycznych dla pektyn rozpoznawanych przez przeciwciało JIM6. Epitopy charakterystyczne dla polisacharydowej części proteoglikanów AGP zlokalizowano przy pomocy przeciwciała JIM8. Analiza detekcji powyższych komponentów ściany komórkowej wykazała, że ich rozmieszczenie przebiegało według schematu porównywalnego dla wszystkich genotypów. W zalążkach przed wyłożeniem na pożywki regeneracyjne wyraźne znakowanie obserwowano głównie w ścianie komórkowej woreczka zalążkowego oraz w ścianach komórek nucellusa sąsiadujących z biegunem mikropylarnym i chlazalnym woreczka zalążkowego. W pozostałych komórkach nucellusa nie stwierdzono znakowania powyższych epiotpów. W komórkach osłonek i podstawy zalążka odnotowano słabsze, lecz równomierne znakowanie. W miarę inicjacji i

rozwoju prazarodka (7, 9, 14 dzień kultury) obecność epitopów polisacharydowych wokół woreczka zalążkowego zanikała, utrzymując nieco niższy poziom znakowania w komórkach sąsiadujących z biegunem mikropylarnym. Widoczne sygnały wskazujące na obecność AGP zawierających epitopy reagujące z JIM8 odnotowano w formujących się ścianach dwu- i trzykomórkowego prazarodka. Ponadto, w trakcie regeneracji prazarodków lokalizacja powyższych epitopów ulegała zmianie.

Wiele danych literaturowych wskazuje, że cząsteczki protoglikanów ekstrahowane są razem z pektynami. Stąd ich obecność w analizowanych ekstraktach AGP buraka. Pierwszym etapem w analizie biochemicznej AGP było określenie zawartości tych związków w badanych próbach. W oparciu o metodę elektroforezy jednokierunkowej stwierdzono duże zróżnicowanie koncentracji AGP w zalążkach poszczególnych linii, co nie pozwala jednoznacznie przyporządkować większych lub mniejszych koncentracji genotypom o wyższym i niższym potencjale embriogenetycznym.

Przeciwciała anti-AGP znalazły powszechne zastosowanie w analizach wzorca ekspresji proteoglikanów w różnych fazach rozwojowych komórek i tkanek roślinnych. Jednakże interpretacja uzyskanych wyników jest trudna z uwagi na złożoną strukturę powyższych związków. Drugi etap analizy biochemicznej z wykorzystaniem przeciwciał monoklonalnych miał na celu porównanie struktury protoglikanów wyekstrahowanych z różnych linii. Wszystkie izolaty poddane analizie charakteryzowały się powszechną obecnością JIM13, LM2 oraz JIM7 brakiem występowaniem domen wykrywanych przez przeciwciało LM5. W podobny sposób, na skrawkach komórkowych zlokalizowano wybrane domeny *in situ* w ramach tematu badawczego nr 2. Dane literaturowe wskazują na powszechne występowanie epitopów rozpoznawanych przez JIM13 i LM2. Wykryto je np. na powierzchni globularnych zarodków soamtycznych *Cichorium* oraz *Euphorbia pulcherrima* (Chapman i in. 2000; Saare-Surminski i in. 2000) Wykazano również zależność między fazami rozwojowymi, a poziomem molekuł AGP. Zostały one wykryte np. w agregatach komórek prioembriogennych w kulturach zawieszinowych świerku. Natomiast ich zanik obserwowano w późniejszych fazach rozwojowych zarodków somatycznych (Filonowa i in. 2000).

W ramach powyższego tematu dokonano izolacji całkowitego RNA z niezapłodnionych zalążków buraka cukrowego na czterech etapach rozwojowych wg metody Chomczyńskiego i Sacchi (2006). Ocena czystości i stężenia RNA w otrzymanych izolatach została przeprowadzona elektroforetycznie i spektrofotometrycznie. Dla analizowanych próbek uzyskano od 102 ng/μl do 1253 ng/μl (średnio 676 ng/μl) całkowitego RNA. Średnia wartość absorbancji  $A_{260/280}$  oraz  $A_{260/230}$  wyniosła odpowiednio 1,85 oraz 1,64. Następnie przeprowadzono reakcję odwrotnej transkrypcji. Frakcje nowo zsyntetyzowanego cDNA posłużyły jako matryce do szeregu ilościowych reakcji RT-PCR, które umożliwiły ustalenie zmian ekspresji genów na podstawie porównania ilości powstającego w reakcji produktu badanego genu do ilości produktu genu referencyjnego. Po wstępnej weryfikacji jako gen referencyjny wybrano gen czynnika splajsingowego SF3A, którego ekspresja utrzymywała się na stałym poziomie. Łącznie przebadano ilość transkryptu 13 fragmentów genów wybranych na podstawie wyników uzyskanych w poprzednich latach realizacji tematu oraz danych literaturowych. Przy użyciu ilościowej reakcji amplifikacji wykazano obecność wszystkich 13 transkryptów wybranych genów we wszystkich analizowanych liniach buraka cukrowego. Cztery transkrypty genów splA, BUD13 oraz BEL-I wykazały różnice w ilości, zarówno w obrębie linii, jak i między liniami. Wraz z wydłużeniem czasu trwania kultury obserwowano spadek ilości transkryptów za wyjątkiem linii nr 3, u której obserwowano porównywalny poziom wszystkich czterech transkryptów. Obecnie nie ma dostępnych danych literaturowych, które wskazywałyby na analizę różnic w ekspresji genów

niezapłodnionych zalążków na poszczególnych etapach rozwojowych wśród genotypów buraka cukrowego o wysokim i niskim potencjale embriogenetycznym.

#### Wnioski

1. Metoda regeneracji poprzez bezpośrednią organogenezę umożliwia efektywne rozmnażanie wartościowych genotypów buraka oraz pozwala na zabezpieczenie jednorodnego i cytologicznie stabilnego materiału do dalszych badań.
2. Zróżnicowane wyniki regeneracji haploidalnych zarodków w kulturach *in vitro* niezapłodnionych zalążków buraków cukrowych potwierdziły, że wybrane genotypy charakteryzowały się niskim i wysokim potencjałem embriogenetycznym. Mogą stanowić materiał wyjściowy do przeprowadzenia kolejnych analiz.
3. Obecność i lokalizacja określonych domen cukrowych może mieć istotny wpływ na proces embriogenezy gametycznej u buraka cukrowego. Domeny strukturalne charakterystyczne dla pektyn rozpoznawanych przez przeciwciała JIM6 nie występują w komórkach niezapłodnionych zalążków buraka cukrowego.
4. Linie buraka o wyższym potencjale embriogenetycznym wykazały porównywalną ilość AGP w stosunku do linii o niższym potencjale embriogenetycznym. Ilość i relatywna zawartość antygenów wiążących przeciwciała LM2 i JIM7 ulega zmniejszeniu w czasie trwania kultur *in vitro* niezapłodnionych zalążków.
5. Półilościowa analiza ekspresji genów *splA*, *BUD13* oraz *BEL-I* wykazała zmiany w ilości transkryptów w niezapłodnionych zalążkach buraka cukrowego o wysokim i niskim potencjale embriogenetycznym w trakcie trwania kultury. Jednakże ścisły związek zmian w ilości transkryptów z faktycznymi zmianami ekspresji powyższych genów powinien być zweryfikowany w toku kolejnych badań.

Wyniki badań zostały zaprezentowane w formie posteru na: Konferencji Międzynarodowej „Global Conference on Plant Science and Molecular Biology (GPMB 2017)”, zorganizowanej przez Magnus Group – Walencja, 11–13 września 2017r.

Tytuł posteru: „Preliminary detection of pectins and arabinogalactan proteins during ovule embryogenesis in sugar beet (*Beta vulgaris* L.)”.

Streszczenie opublikowano w materiałach konferencyjnych:

Cichorz S., Malicka M., Gośka M. 2017. Preliminary detection of pectins and arabinogalactan proteins during ovule embryogenesis in sugar beet (*Beta vulgaris* L.). Global Conference on Plant Science and Molecular Biology (GPMB 2017), September 11-13, 2017, Valencia, Spain, str.75.