

Lp. w zał. do Rozporządzenia MRiRW: 46.

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

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

Celem zadania jest 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 jest dokładna cytologiczna i molekularna charakterystyka komórek zalążka buraka. Z powyższych względów, planowane jest przeprowadzenie detekcji wybranych epitopów AGP oraz precyzyjne określenie ich przestrzennej dystrybucji w komórkach, tkankach i organach podczas kolejnych etapów rozwoju niezapłodnionych zalążków buraka cukrowego.

Materiałem wyjściowym do badań były wielonasienne diploidalne zapylacze buraka cukrowego pochodzące z Kutnowskiej Hodowli Buraka Cukrowego - Stacji Hodowli Roślin w Straszku. Korzenie 8 różnych linii DH wysadzono w kwietniu 2014 roku na poletku doświadczalnym znajdującym się na terenie IHAR-PIB O/Bydgoszcz. W okresie kwitnienia (czerwiec) pobierano kwiatostany, z których izolowano zalążki z zamkniętych pąków znajdujących się na pędzie powyżej kwiatu w stadium antezi. Niezapłodnione zalążki 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 pożywkę w okresie kwitnienia buraków cukrowych wyłożono 7000 zalążków. Na podstawie liczby regenerujących zarodków określono potencjał embriogenetyczny badanych linii i wybrano 4 genotypy (niski i wysoki potencjał regeneracyjny), które stanowiły materiał roślinny do analiz w kolejnych etapach badań.

W okresie kwitnienia buraków cukrowych 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. Ogółem wyłożono 400 wierzchołków wzrostu (8 linii po 50 wierzchołków). Prawdłowo rozwinięte pędy rozmnażano na pożywce regeneracyjnej MS z dodatkiem $0,2 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ BAP. Po czterech tygodniach kultury na pożywce regeneracyjnej, pędy przenoszono na pożywkę ukorzeniającą MS zawierającą $3,0 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ IBA. Ukorzone w kulturach *in vitro* rośliny przesadzono do doniczek o średnicy 9 cm, zawierających mieszaninę sterylizowanej ziemi z piaskiem w stosunku 3:1 i umieszczono w kabinach o wysokiej wilgotności. Bezpośrednia regeneracja roślin z wierzchołków wzrostu pędów kwiatostanowych buraka cukrowego pozwala na otrzymanie regenerantów o genotypie rośliny rodzicielskiej, stabilnych cytologicznie. Umożliwia również efektywne rozmnażanie wartościowych genotypów oraz pozwala na zabezpieczenie jednorodnego materiału w kolejnych latach badań.

W pierwszym roku realizacji zadania wykonano wstępne analizy histologiczne oraz immunocytochemiczne materiału roślinnego. 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) oraz z fosfatazą alkaliczną. Analizy mikroskopowe przeprowadzono z użyciem mikroskopu świetlnego oraz fluorescencyjnego.

Obserwacje mikroskopowe ujawniły występowanie podobieństw w obecności i relatywnej zawartości domen strukturalnych rozpoznawanych przez przeciwciało JIM7, jak również różnic w obecności i relatywnej zawartości domen strukturalnych rozpoznawanych przez przeciwciało LM2, które wydają się szczególnie ważne ze względu na związek z odmiennym potencjałem embriogenetycznym buraka. Analizy preparatów mikroskopowych wykazały, że obecność antygenów typowych dla pektyn, reagujących z przeciwciałem JIM7 stwierdzono w większości komórek zalążka linii o wysokim i niskim potencjale embriogenetycznym. Natomiast, zaobserwowano pewne różnice w detekcji epitopów charakterystycznych dla części polisacharydowej proteoglikanów AGP, rozpoznawanych przez przeciwciało LM2. Stwierdzono tendencję wskazującą na to, iż epitopy te występują w większej ilości w komórkach zalążków pochodzących z linii o niższym potencjale embriogenetycznym. Reakcje kontrolne do powyższych analiz, wykonane z pominięciem etapu inkubacji z przeciwciałami pierwotnymi, wykazały brak znakowania komórek zalążka, co świadczy o poprawnym wykonaniu analiz immunocytochemicznych.

Przeprowadzono również optymalizację izolacji RNA z niezapłodnionych zalążków buraka. Izolację przeprowadzono na materiale pochodzącym z jednej linii buraka. Do ewaluacji procedur użyto łącznie 8 próbek, z których każda zawierała po 100 niezapłodnionych zalążków. Przeprowadzono spektrofotometryczną i elektroforetyczną ocenę jakości i ilości uzyskanego RNA, co umożliwiło ostateczny wybór optymalnej metody izolacji RNA z tkanek generatywnych. Ponadto przeprowadzono analizę różnic w ekspresji genów roślin matecznych na czterech etapach rozwojowych wśród genotypów o wysokim i niskim potencjale embriogenetycznym. Frakcje nowo zsyntetyzowanego cDNA posłużyły jako matryca do amplifikacji PCR z zastosowaniem łącznie po 15 kombinacji starterów RAPD, ISSR. Na podstawie uzyskanych wyników reakcji PCR zidentyfikowano potencjalne produkty różnicujące poszczególne etapy rozwoju roślin matecznych (wegetatywny, początek wybijania w pędy, pełnia kwitnienia, początek wiązania nasion) wśród genotypów buraka cukrowego o różnym potencjale embriogenetycznym.

W wyniku przeprowadzonych reakcji PCR uzyskano łącznie 75 produktów reakcji. Z 15 przetestowanych starterów typu ISSR i 15 starterów typu RAPD, 6 okazało się przydatnych do dalszych analiz. Liczbę prążków generowanych przez jeden starter wyniosła od 6 do 19, a ich wielkość zawierała się w przedziale od 250 pz do 1562 pz. Łącznie uzyskano 10 produktów wykazujących zmienioną ekspresję. Dwa z tych produktów charakteryzowały się większą ilością w kolejnych etapach rozwojowych. Jeden produkt wykazał wyższą intensywność u genotypów słabo regenerujących, zaś nieco niższą u genotypów dobrze regenerujących. Pozostałych siedem produktów charakteryzowało się zmienioną ilością w zależności od typu użytkowego analizowanych linii buraka. Zaobserwowane różnice wstępujące w produktach reakcji PCR między analizowanymi liniami miały charakter ilościowy, co objawiało się zwiększoną lub zmniejszoną intensywnością prążków. Ścisły związek powyższych produktów z faktycznymi różnicami wynikającymi z etapów rozwojowych powinien być zweryfikowany w toku kolejnych badań.

Wyniki badań zostały zaprezentowane w formie posteru pt. „Immunolocalization of pectin and arabinogalactan protein epitopes in unpollinated ovules of *Beta vulgaris* L. genotypes” na III Ogólnopolskiej Konferencji pt. „Genetyka i genomika w doskonaleniu roślin uprawnych – od rośliny modelowej do nowej odmiany”, która organizowana była przez Instytut Genetyki Roślin Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu w dniach 5–7 listopada. Streszczenia str. 102.