

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 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.

Materiał i metody

Materiałem wyjściowym do badań były 4 linie homozygotyczne wielonasiennych zapylaczy buraka cukrowego 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. Niezapłodnione zalążki stanowiące materiał do badań znajdowały się na czterech etapach rozwojowych: w dniu izolacji z rośliny matecznej oraz po 7, 9 i 14 dniach od wyłożenia na pożywki indukcyjne. 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 izolacji endogennych proteoglikanów były niezapłodnione zalążki wyizolowane bezpośrednio z rośliny matecznej. Porównano 4 ekstrakty AGP wyizolowane z 4 linii buraka cukrowego o różnym potencjale embriogenetycznym. Do wykonania analiz endogennych proteoglikanów AGP użyto po 600 zalążków z każdej linii. Ekstrakcję AGP przeprowadzono zgodnie z procedurą opisaną przez Wiśniewską i Majewską (2007). Stężenia AGP w próbach określono z wykorzystaniem metody elektroforezy jednokierunkowej typu „rocket” (Komalavilas i współ., 1991). Następnie wykonano jakościową charakterystykę wyizolowanych proteoglikanów za pomocą immunodetekcji metodą dot-blot z zastosowaniem czterech przeciwciał.

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, 14 i 28 dniach inkubacji na pożywce indukcyjnej) 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 amplifikacji PCR z zastosowaniem łącznie po 15 różnych starterów RAPD, ISSR (opracowane na podstawie danych literaturowych). Na podstawie uzyskanych wyników reakcji PCR zidentyfikowano potencjalne produkty różnicujące poszczególne etapy rozwoju niezapłodnionych zalążków wśród genotypów buraka cukrowego o różnym potencjale embriogenetycznym, które poddano klonowaniu i sekwencjonowaniu.

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 (analizy histologiczne i immunocytochemiczne) oraz po 7, 14 i 28 (analizy molekularne) dniach inkubacji na pożywce indukcyjnej. 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 JIM13, jak również niewielkich różnic w relatywnej zawartości domen strukturalnych rozpoznawanych przez przeciwciało LM5. 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. W miarę rozwoju prazarodka obecność epitopów polisacharydowych wokół woreczka zalążkowego zanikała, utrzymując nieco niższy poziom znakowania w komórkach sąsiadujących z biegunem mikropylarnym. Ponadto, widoczne sygnały wskazujące na obecność AGP zawierających epitopy reagujące z JIM13 odnotowano w formujących się ścianach dwu- i trzykomórkowego prazarodka. Natomiast w przypadku lokalizacji epitopów charakterystycznych dla części polisacharydowej proteoglikanów AGP rozpoznawanych przez przeciwciało LM5

zaobserwowano istnienie drobnych różnic w komórkach woreczka zalążkowego w zalążkach genotypów o wysokim i niskim potencjale embriogenetycznym. W zalążkach z degradującymi komórkami woreczka zalążkowego nie odnotowano lokalizacji epitopów rozpoznawanych przez przeciwciała JIM13 i LM5.

Przeprowadzono charakterystykę proteoglikanów AGP wyizolowanych z niezapłodnionych zalążków. 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. Analizowane izolaty charakteryzowały się powszechną obecnością JIM13, LM2 oraz JIM7 i relatywnie rzadszym występowaniem domen wykrywanych przez przeciwciała LM5. Dane literaturowe wskazują na powszechne występowanie epitopów rozpoznawanych przez JIM13 i LM2. Wykryto je np. na powierzchni globularnych zarodków soamitycznych *Cichorium* oraz *Euphorbia pulcherrima* (Chapman i in. 2000; Saare-Surminski i in. 2000). Wielu autorów podkreśla, że cząsteczki proteoglikanów ekstrahowane są razem z pektynami. Stąd ich obecność w analizowanych ekstraktach AGP buraka.

Analizę różnic w ekspresji genów niezapłodnionych zalążków na czterech etapach rozwojowych wśród genotypów o wysokim i niskim potencjale embriogenetycznym dokonano z zastosowaniem metody differential display opartej na systemie markerów molekularnych RAPD i ISSR. W wyniku przeprowadzonych reakcji PCR uzyskano łącznie 52 produkty. Z 15 przetestowanych starterów ISSR i 15 starterów RAPD, 5 okazało się przydatnych do dalszych analiz. Liczba prążków generowanych przez jeden starter wyniosła od 4 do 14, a ich wielkość zawierała się w przedziale od 293 pz do 2103 pz. Łącznie wytypowano 4 różne produkty wykazujące zmienioną ekspresję. Spośród wymienionych produktów prążek nr 1 (około 1094 pz) częściej występował u genotypów dobrze regenerujących, zaś w mniejszej ilości u genotypów słabiej regenerujących. Ponadto wytypowano dwa produkty nr 2 (około 618 pz) oraz nr 3 (około 670 pz) charakterystyczne wyłącznie dla zalążków wyizolowanych bezpośrednio z rośliny matecznej. Dodatkowo, produkt nr 4 (około 813 pz) był typowy dla genotypów słabiej regenerujących. Powyższe produkty wycięto z żelu i poddano je klonowaniu i sekwencjonowaniu w ramach usług badawczych. Następnie przeprowadzono analizę BLAST otrzymanych sekwencji z sekwencjami znajdującymi się w bazie danych NCBI. Zgodnie z naszą wiedzą, 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.
4. Linie buraka o wyższym potencjale embriogenetycznym wykazały porównywalną ilość AGP w stosunku do linii o niższym potencjale embriogenetycznym, dlatego nie stwierdzono zależności między zawartością tych proteoglikanów a potencjałem embriogenetycznym.

5. Zaobserwowano obecność 4 różnic występujących w produktach reakcji PCR między analizowanymi liniami oraz etapami rozwojowymi. Ścisły związek powyższych produktów z faktycznymi różnicami powinien być zweryfikowany w toku kolejnych badań.

Wyniki badań zostały zaprezentowane w formie posteru na: International Conference "Plants In Vitro: Theory and Practice", zorganizowana przez Vienna International Conferences and Events Association w dniach 8 – 9 lutego 2016 r. we Wiedniu.

Tytuł posteru: „Preliminary investigation of molecular changes during ovule embryogenesis in sugar beet (*Beta vulgaris* L.)”.

Streszczenie opublikowano w materiałach konferencyjnych:

Cichorz S., Malicka M., Gośka M. 2016. Preliminary investigation of molecular changes during ovule embryogenesis in sugar beet (*Beta vulgaris* L.). Plants Cells In Vitro: Theory and Practice, Vienna, Austria February 8-9, 2016, str. 37.