Streszczenie sprawozdania

W piątym roku realizacji zadania wykonano analizy histologiczne, immunocytochemiczne oraz molekularne niezapłodnionych zalążków czterech linii buraka cukrowego. Analizy immunocytochemiczne ujawniły występowanie w znacznych ilościach relatywnej zawartości domen strukturalnych charakterystycznych dla pektyn rozpoznawanych przez przeciwciało LM6. Natomiast obecności domen strukturalnych rozpoznawanych przez przeciwciało JIM14 odnotowano w śladowych ilościach. Analiza detekcji powyższych komponentów ściany komórkowej wykazała, że ich rozmieszczenie przebiegało według schematu porównywalnego dla wszystkich genotypów. Reakcje kontrolne do powyższych analiz, wykonane z pominięciem etapu inkubacji z przeciwciałem pierwotnym, wykazały brak znakowania komórek zalążka, co świadczy o poprawnym wykonaniu analiz immunocytochemicznych. Epitopy charakterystyczne dla pektyn zlokalizowano przy pomocy przeciwciała LM6. W zalążkach przed wyłożeniem na pożywki regeneracyjne wyraźne znakowanie obserwowano głównie w ścianie komórkowej woreczka zalążkowego oraz nieco słabsze w ścianach komórek nucellusa sąsiadujących z biegunem mikropylarnym. W pozostałych komórkach nucellusa, osłonek i podstawy zalążka odnotowano słabsze, lecz równomierne znakowanie. W miarę inicjacji i rozwoju prazarodka (7, 9, 14 dzień kultury) obecność epitpów polisacharydowych wokół woreczka zalążkowego zanikała, utrzymując nieco wyższy poziom znakowania w części mikropylarnej nucellusa. Ponadto, widoczne sygnały wskazujące na obecność AGP zawierających epitopy reagujące z LM6 odnotowano w formujących się ścianach dwu- i trzykomórkowego prazarodka. W przypadku lokalizacji epitopów charakterystycznych dla polisacharydowej części proteoglikanów AGP rozpoznawanych przez przeciwciało JIM14 w zalążkach przed wyłożeniem na pożywki regeneracyjne wyraźne znakowanie obserwowano w ścianie komórkowej woreczka zalążkowego oraz ścianach komórek nucellusa sąsiadujących z biegunem mikropylarnym. W pozostałych komórkach nie stwierdzono znakowania powyższych epitopów. W kolejnych dniach prowadzenia inicjacji regeneracji obecność epitopów polisacharydowych wokół woreczka zalążkowego zanikała, utrzymując niski poziom znakowania w komórkach kolumnowych kanału mikropylarnego.

Dodatkowo przeprowadzono charakterystykę proteoglikanów AGP wyizolowanych z niezapłodnionych zalążków oraz ocenę jakościową i ilościową uzyskanych ekstraktów. Izolaty poddano analizie dot-blot z użyciem przeciwciał LM6, JIM6, JIM8, JIM14. W wyniku przeprowadzonych doświadczeń proteoglikany AGP i pektyny z niezapłodnionych zalążków o wyższym i niższym potencjale embriogenetycznym nie wykazały różnic. Analizowane ekstrakty były szczególnie bogate w antygeny wiążące przeciwciała LM6, zawierały niewielkie lub śladowe ilości domen strukturalnych rozpoznawanych przez przeciwciało JIM8, zaś w żadnej z prób nie odnotowano obecności antygenów wiążących przeciwciała JIM6 oraz JIM14. Jedyne zaobserwowane różnice w ilości i relatywnej zawartości antygenów wiążących przeciwciała LM6 występowały w zależności od czasu trwania kultury. Niezapłodnione zalążki bezpośrednio pobrane z rośliny matecznej wykazały relatywnie wyższą zawartość epitopów rozpoznawanych przez LM6, niż niezapłodnione zalążki po 14 dniach prowadzenia kultury *in vitro*. Takich różnic nie zaobserwowano w przypadku domen strukturalnych rozpoznawanych przez pozostałe przeciwciała.

Ponadto, przeprowadzono analizę wpływu inaktywacji syntezy endogennych proteoglikanów AGP na przebieg procesu embriogenezy gametycznej z wykorzystaniem odczynnika Yariva. W toku prac własnych stwierdzono, że wpływ inaktywacji puli endogennych AGP na potencjał embriogenetyczny zależał od genotypu. W przypadku linii nr 1 nie zaobserowano zmian pomiędzy kontrolą a pożywkami zawierającymi dodatek Yariva. U linii nr 2 oraz 4 odnotowano zwiększenie liczby regenerujących zalążków wyłącznie na pożywce z dodatkiem 15 μM Yariva. Linia nr 3 wykazała niewielkie zwiększenie potencjału embriogenetycznego.

Półilościowa analiza ekspresji genów splA oraz BUD13 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.