

MAGDALENA TOMASZEWSKA-SOWA

Katedra Fizjologii i Podstaw Biotechnologii Roślin

Uniwersytet Technologiczno — Przyrodniczy, Bydgoszcz

Immunocytochemiczna lokalizacja epitopów pektyn i proteoglikanów AGP w regenerujących tkankach buraka cukrowego (*Beta vulgaris* L.)

Immunocytochemical localization of pectin and arabinogalactan protein epitopes in regenerating tissues of sugar beet (*Beta vulgaris* L.)

Pektyny i proteoglikany AGP, jako elementy ściany komórkowej są w istotny sposób powiązane z regulacją procesów morfogenezy i różnicowania roślin. Celem przeprowadzonych badań była próba lokalizacji epitopów charakteryzujących pektyny i proteoglikany AGP — (arabinogalactan proteins) w tkankach buraka cukrowego regenerujących z niezapłodnionych zalążków w kulturach *in vitro*. Biorąc pod uwagę dotychczasowe wyniki badań immunocytochemicznych tkanek buraka uznano za celowe przeprowadzenie analiz zmierzających do określenia różnic w dystrybucji tych związków w komórkach buraka cukrowego w zależności od rodzaju tkanki oraz składników pożywki determinujących procesy regeneracji w kulturach *in vitro*. Obecność charakterystycznych epitopów określano w różniącej się tkance kalusa z widocznymi regionami merystematycznymi, jak też w zarodkach somatycznych w stadium torpedy, powstałych w trakcie kultury niezapłodnionych zalążków. Detekcję przeprowadzono przy wykorzystaniu specyficznych przeciwciał monoklonalnych, a miejsca występowania określonych antygenów oligosacharydowych uwidaczniano *in situ* za pomocą reakcji z przeciwciałami wtórnymi sprzężonymi z alkaliczną fosfatazą. Wykazano, że cztery epitopy typowe dla pektyn, reagujące z przeciwciałami JIM5, JIM7, LM5 i LM6, występują powszechnie we wszystkich badanych tkankach i typach komórek. Wśród epitopów charakteryzujących proteoglikany AGP wyodrębniono takie, które występują w organogennym kalusie w relatywnie dużych ilościach (LM2, JIM13 i JIM14), bądź tylko w ilościach śladowych, albo takie, które w ogóle nie są obecne. W wyniku reakcji kontrolnych, wykonanych z pominięciem etapu inkubacji z przeciwciałem pierwotnym, uzyskano skrawki niezabarwione lub zabarwione w minimalnym stopniu, co świadczy o specyficzności przeprowadzonych badań immunocytochemicznych.

Słowa kluczowe: białka arabinogalaktanowe (AGP), burak cukrowy, kultury *in vitro*, pektyny, proteoglikany, zalążki, zarodki somatyczne

Pectin and arabinogalactan proteins, which are components of the cell wall, are significantly associated with the regulation processes of morphogenesis and differentiation of plants. The aim of this study was to characterize the location of the epitopes of pectins and arabinogalactan proteins in tissues of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) regenerating from unfertilized ovules in *in vitro* cultures. Considering previous results of immunocytochemical analysis of tissues of sugar beet it seemed important to determine the differences in distribution of these compounds in the cells of sugar beet depending on the

type of tissue and medium components that determine the regeneration of explants in *in vitro* cultures. The presence of specific epitopes was determined in callus tissue with visible meristematic regions, as well as in somatic embryos at torpedo stage, growing in the culture of unfertilized ovules. Detection was conducted using specific monoclonal antibodies, and the location of specific oligosaccharide antigens was visualized *in situ* by reaction with secondary antibodies conjugated with alkaline phosphatase. It has been shown that the four epitopes typical for pectin, which react with antibodies JIM5, JIM7, LM5 and LM6 are common in all examined tissues and cell types. Among the AGP epitopes that typify arabinogalactan proteins there were distinguished those that occur in callus in relatively large quantities (LM2, and JIM14 JIM13), or only in trace amounts, or which in general are not present. In the control reaction, performed without the incubation stage of the primary antibody, the sections were obtained which showed no signs of coloration or minimally colored, which indicates specificity of the immunocytochemistry procedures.

Key words: sugar beet, *in vitro* culture, pectin, proteoglycans AGPs (arabinogalactan proteins), seeds, somatic embryos

Wykaz skrótów

AGP — białka arabinogalaktanowe

BAP — 6-benzyloaminopuryna, BCIP/NBT - 5-bromo-4-chloro-3-indolilofosforan w obecności błękitu nitrotetrazolowego,

IBA — kwas indolilo-3-masłowy,

KIN — kinetyna, MS — pożywka wg Murashige i Skooga,

NAA — kwas naftylo-1-octowy,

TDZ — tidiazuron,

TIBA — kwas 2,3,5-trójiodobenzoesowy, 2,4-D - kwas 2,4-dichlorofenoksyoctowy

WSTĘP

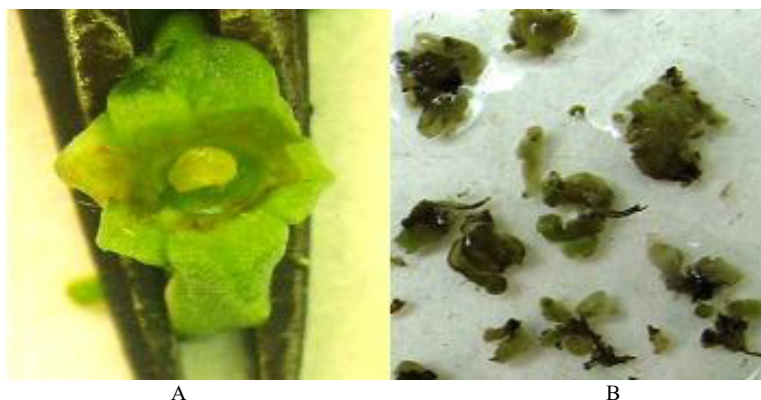
Ściana komórkowa to złożona sieć zbudowana z mikrofibryli celulozowych zanurzonych w matriks utworzonej przez polisacharydy, białka i związki fenolowe. Wymienione komponenty charakteryzują się ogromnym zróżnicowaniem struktury i przestrzennej organizacji, w zależności od gatunku i typu tkanki, a ponadto ulegają dynamicznym reorganizacjom w kolejnych etapach rozwoju. Składniki ścian komórkowych podlegają również regulacji przez czynniki środowiskowe, takie jak temperatura, wilgotność, światło, obecność jonów itp. (Varner i Lin, 1989). Wszelkie przekształcenia w obrębie ścian komórkowych są kontrolowane przez geny kodujące określone białka enzymatyczne, a mnogość biokatalizatorów świadczy o dużej aktywności metabolicznej tego kompartmentu (Fry, 1995). Ściana poprzez sieć plazmodesmów bierze udział w transporcie substancji i komunikacji międzykomórkowej. Stanowi ważny element systemu transdukcji sygnałów, gdyż enzymatyczna modyfikacja polisacharydów i proteoglikanów prowadzi do uwolnienia oligosacharydów, z których wiele jest zaangażowanych w regulację procesów morfogenezy, jak np. pektyny, które stanowią 30–50% polisacharydów budujących ściany roślin dwuliściennych (Carpita i Gibeau, 1993). Funkcja tych związków w komórce jest uzależniona od ich długości, a oligogalakturonidy zawierające od 10 do 17 jednostek mogą pełnić rolę cząstek sygnałnych uczestniczących w regulacji morfogenezy i rozwoju roślin (David i in., 1994; Liners i in., 1994; Toonen i in., 1997; Malinowski i Filipecki, 2002). Badania embriogenezy algi morskiej *Fucus spiralis* i rzodkiewnika *Arabidopsis thaliana* wykazały, iż informacja o kierunku rozwoju jest

uwalniana ze ściany komórkowej i przekazywana do protoplastu właśnie w postaci cząstek sygnałnych, które kontrolować mogą ekspresję genów i poprzez to wpływać na procesy różnicowania (Berger i in., 1994; Brownlee i Berger, 1995). Funkcję pochodzących ze ściany komórkowej cząsteczek sygnałnych zwanych oligosacharydami opisano w organogenezie tytoniu *Nicotiana tabacum* (Eberhard i in., 1989), w procesach tworzenia elementów tkanki naczyniowej cynii *Zinna elegans* (Roberts i in., 1997), podczas rozwoju zarodków somatycznych świerka *Picea abies* (Egertsdotter i von Arnold, 1995) i marchwi *Daucus carota* (van Hengel i in., 2001).

Kolejny z istotnych składników ściany komórkowej, czyli proteoglikany AGP występują powszechnie w świecie roślin, a ich obecność stwierdzono w tkankach wszystkich przebadanych dotąd gatunków (Nothnagel, 1997). Białka arabinogalaktanowe (AGP — arabinogalactan proteins) są grupą glikoprotein zewnątrzkomórkowych. Białkowy rdzeń cząsteczek AGP stanowi około 2–10% ich masy i utworzony jest głównie z proliny, hydroksyproliny, alaniny, glicyny, seryny i treoniny, natomiast rozbudowana część węglowodanowa zawiera łańcuchy galaktozy połączone wiązaniami β -1→3 i β -1→6 oraz reszty arabinozy, ramnozy, fruktozy i kwasu glukuronowego (Nothnagel, 1997). AGP obecne są głównie w plazmolemie i ścianie komórkowej, a w mniejszych ilościach również w cytoplazmie i w wakuolach. Ulegają też aktywnej sekrecji poza komórkę, stanowiąc bogaty składnik gum i śluzów roślinnych. W kulturach komórek i tkanek *in vitro* AGP są akumulowane w pożywkach i pełnią ważne funkcje regulacyjne w trakcie różnicowania. Dlatego też uznano za celowe przeprowadzenie badań zmierzających do określenia obecności zarówno proteoglikanów AGP, jak i pektyn w tkankach buraka cukrowego podczas różnicowania pędów i zarodków somatycznych.

MATERIAŁY I METODY

Roślinne kultury *in vitro*



Rys. 1. Początkowe etapy kultury *in vitro* zalążków: dno kwiatowe z zalążkiem w trakcie izolacji (A), różnicujące się zalążki w płynnej kulturze (B)
Fig. 1. Initiation of the *in vitro* culture of ovules: a flower receptacle with isolated ovule (A), differentiating ovules in the liquid medium (B)

Materiał do badań stanowiły niezapłodnione załączki buraka cukrowego (*Beta vulgaris* L.), genotyp 0170 (Kutnowska Hodowla Buraka Cukrowego), które po wyizolowaniu z pąków kwiatowych (rys. 1A) inkubowano w płynnej pożywce MS (Murashige i Skoog 1962) zawierającej 4,4 μM BAP, 30 g/l sacharozy, 100 mg/l inozytolu, 0,4 mg/l tiaminy, w celu indukcji procesów morfogenetycznych. W kolejnym etapie, po około 12 tygodniach, różnicujące się tkanki (rys. 1B) przenoszono na pożywki regeneracyjne, będące modyfikacjami pożywki MS, które zawierały różne kombinacje regulatorów wzrostu z grupy auksyn: NAA, IBA, 2,4-D i cytokinin: BAP, KIN, TDZ, oraz antyauksynę TIBA a także substancje zestalające: agar lub gerlit oraz 0,09 M sacharozę. Kontrolę stanowiła pożywka MS bez regulatorów wzrostu (tab. 1).

Tabela 1

Numer pożywki The number of medium	Skład pożywek regeneracyjnych zastosowane w doświadczeniu Composition of the regeneration media used in the experiment			
	Stężenie i rodzaj zastosowanych składników pożywki Concentration and type of components of the medium			
	cytokininy cytokinins	auksyny auxins	substancja zestalająca solidifying substance	inne other
1.	-	-	0,7% agar	-
2.	4,4 μM BAP	-	0,7% agar	-
3.	4,4 μM BAP	-	0,4% agar	-
4.	4,4 μM BAP	-	0,2% agar	-
5.	4,4 μM BAP	-	0,4%gerlit	-
6.	0,44 μM BAP	-	0,7% agar	-
7.	2,2 μM BAP	-	0,7% agar	-
8.	0,44 μM BAP	0,44 μM NAA	0,7% agar	-
9.	2,2 μM BAP	0,44 μM NAA	0,7% agar	-
10.	4,4 μM BAP	0,44 μM NAA	0,7% agar	-
11.	0,44 μM KIN	0,44 μM NAA	0,7% agar	-
12.	2,2 μM KIN	0,44 μM NAA	0,7% agar	-
13.	4,4 μM KIN	0,44 μM NAA	0,7% agar	-
14.	0,44 μM KIN	0,44 μM 2,4-D	0,7% agar	-
15.	2,2 μM KIN	0,44 μM 2,4-D	0,7% agar	-
16.	4,4 μM KIN	0,44 μM 2,4-D	0,7% agar	-
17.	4,4 μM BAP	-	0,7% agar	1,0 μM TIBA
18.	4,4 μM BAP	-	0,7% agar	2,0 μM TIBA
19.	1,0 μM TDZ	1,0 μM IBA	0,7% agar	-
20.	3,0 μM TDZ	1,0 μM IBA	0,7% agar	-
21.	5,0 μM TDZ	1,0 μM IBA	0,7% agar	-

Preparaty histologiczne

Tkanki rozwijające się na pożywkach regeneracyjnych pobrano i utrwalono w celu przygotowania preparatów mikroskopowych. Proces utrwalania zachodził w roztworze 4% paraformaldehydu i 0,5% glutaraldehydu w 0,05 M buforze Pipes. W kolejnym etapie tkanki odwadniano w roztworach alkoholu etylowego o wzrastającym stężeniu (od 30% do 100%), a następnie materiał przesycało mieszaniną bezwodnego alkoholu etylowego i ksylenu (3:1, 1:1, 1:3, 0:1) oraz paraplądu. Końcowy etap przesycań polegał na umieszczeniu materiału w czystym paraplądzie i polimeryzacji poprzez zanurzenie w zimnej wodzie. Materiał roślinny zatopiony w paraplądzie cięto przy pomocy mikrotomu

Leica RM 2155 na skrawki o grubości 10 μm , które nałożono na szkiełka podstawowe pokryte wodnym roztworem polilizyny. Po odparafinowaniu i wysuszeniu skrawki poddano analizie pod kątem obecności i lokalizacji epitopów oligosacharydowych, charakterystycznych dla proteoglikanów AGP i pektyn.

Immunocytochemiczna lokalizacja wybranych epitopów oligosacharydowych

Antygeny lokalizowano za pomocą 10 przeciwciał monoklonalnych, rozpoznających różne domeny strukturalne (tab. 2).

Tabela 2

Przeciwciała zastosowane w celu lokalizacji poszczególnych epitopów Antibodies used to detect epitopes

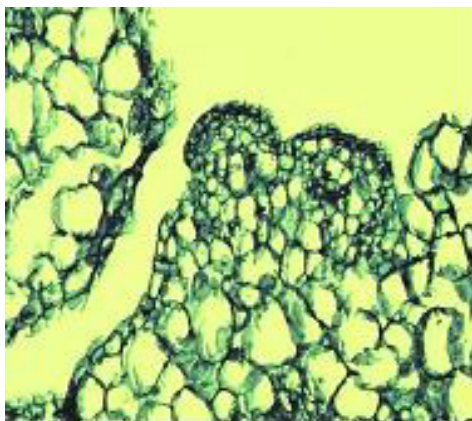
Przeciwciało pierwotne Primary antibodies	Rozpoznawany epitop Epitope	Referencje References
Przeciwciała charakterystyczne dla epitopów pektynowych Antibodies specific to pectin epitopes		
LM 5	Cztery reszty (1 \rightarrow 4)- β -D-galaktozy (RG-I) Four (1 \rightarrow 4)- β -D-galactose residues (RG-I)	Jones i in. 1997 Jones et al. 1997
LM 6	Pięć reszt (1 \rightarrow 5)- α -L-arabinozy (RG-I) Five (1 \rightarrow 5)- α -L-arabinose residues (RG-I)	Willats i in. 1999 Willats et al. 1999
JIM5	Nieznany, optymalne wiązanie z pektynami HGA o 31 – 40% estryfikacji, zawierającymi co najmniej cztery nieestryfikowane reszty GalA sąsiadujące z resztami zestryfikowanymi. Unknown, optimal binding to pectins (HGA) showing 31–40% esterification, containing epitopes composed of four or more contiguous unesterified residues adjacent to or flanked by residues with methyl-ester groups	Willats i in. 2000, Clausen i in. 2003 Willats et al. 2000, Clausen et al. 2003
JIM7	Nieznany, optymalne wiązanie z pektynami HGA o 15 – 80% estryfikacji, zawierającymi zestryfikowane reszty GalA na przemian z nieestryfikowanymi. Unknown, optimal binding to pectins (HGA) showing 15–80% esterification, containing epitopes composed of methyl-esterified residues with adjacent or flanking unesterified residues	Willats i in. 2000, Clausen i in. 2003 Willats et al. 2000, Clausen et al. 2003
Przeciwciała charakterystyczne dla epitopów AGP Antibodies specific to pectin epitopes		
LM 2	β -D-GlcpA, β -D-GlcpA (1-O-Me), oraz inne nieznanne β -D-GlcpA, β -D-GlcpA(1-O-Me) and possibly other unknown	Smallwood i in. 1996 Smallwood et al. 1996
JIM4	β -D-GlcpA-(1 \rightarrow 3)- α -D-GalpA-(1 \rightarrow 2)-L-Rha oraz inne nieznanne β -D-GlcpA-(1 \rightarrow 3)- α -D-GalpA-(1 \rightarrow 2)-L-Rha and possibly others unknown	Yates i in. 1996 Yates et al. 1996
JIM8	Nieznany Unknown	Pennell i in. 1991 Pennell et al. 1991
JIM13	β -D-GlcpA-(1 \rightarrow 3)- α -D-GalpA-(1 \rightarrow 2)-L-Rha oraz inne nieznanne β -D-GlcpA-(1 \rightarrow 3)- α -D-GalpA-(1 \rightarrow 2)-L-Rha and possibly other unknown	Yates i in. 1996 Yates et al. 1996
JIM14	L-Ara oraz inne nieznanne L-Ara and possibly other unknown	Knox i in. 1991 Knox et al. 1991
JIM15	β -D-GlcpA(1-O-Me), D-GlcA oraz inne nieznanne β -D-GlcpA(1-O-Me), D-GlcA and possibly other unknown	Yates i in. 1996 Yates et al. 1996

Detekcję wybranych epitopów zainicjowano poprzez blokowanie skrawków przy pomocy 1% albuminy wołowej, 1% odtłuszczonego mleka i buforu TBST. Wysuszone preparaty inkubowano w roztworach przeciwciał pierwotnych, a następnie wtórnych sprzężonych z alkaliczną fosfatazą. Po wypłukaniu przeciwciał w buforze AP skrawki inkubowano z

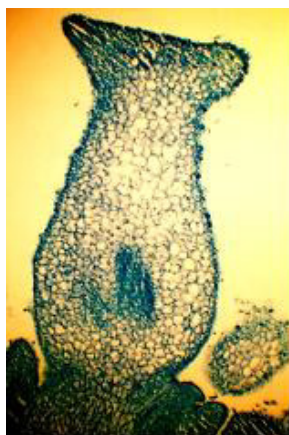
substratem BCIP/NBT przez 13 minut. Aktywności endogennej alkalicznej fosfatazy blokowano poprzez dodanie do substratu chlorowodoru lewamizolu. Reakcje kontrolne przeprowadzono bez udziału przeciwciał pierwotnych. Po wysuszeniu szkiełek preparaty poddano obserwacjom w mikroskopie świetlnym Jenalumar 2.

WYNIKI I DYSKUSJA

Obecność epitopów charakterystycznych dla pektyn i proteoglikanów AGP badano w różnicującej się tkance kalusa z widocznymi regionami merystematycznymi (rys. 2), jak też w zarodkach somatycznych w stadium torpedy (rys. 3).



Rys. 2. Merystemy na powierzchni tkanki kalusowej, (100x)
Fig. 2. Meristems on the surface of callus tissue, (100x)



Rys. 3. Zarodek somatyczny w stadium torpedy (100x)
Fig. 3. Somatic embryo at torpedo stage (100x)

Detekcję przeprowadzono na skrawkach tkanek przy wykorzystaniu specyficznych przeciwciał monoklonalnych, a miejsca występowania określonych antygenów oligosacharydowych uwidaczniano in situ za pomocą reakcji z przeciwciałami wtórnymi sprzężonymi z alkaliczną fosfatazą. Stosując tę technikę wykazano, że cztery epitopy typowe dla pektyn, reagujące z przeciwciałami JIM5, JIM7, LM5 i LM6, występują powszechnie we wszystkich badanych tkankach i typach komórek. Znakowanie w postaci brunatnej barwy obserwowano zarówno w dużych, niezróżnicowanych komórkach kalusa, w obrębie merystemów (rys. 4A - C, 5A, 5B), jak i w tkankach zarodków somatycznych (rys. 7A - D). Najbardziej intensywny sygnał uzyskano dla komórek tkanki przewodzącej (rys. 4B, 8B, 8D) (tab. 3).

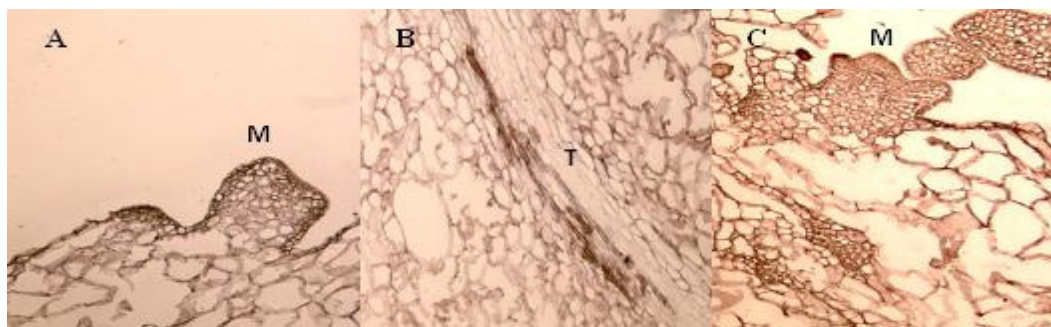
Tabela 3

Ocena intensywności sygnału w analizowanych tkankach
The degree of signal intensity in the analyzed tissue

Przeciwciała Antibodies		Intensywność sygnału — Signal intensity		
		tkanka kalusa z widocznymi strefami merystematycznymi callus tissue with visible meristematic areas	zarodki somatyczne somatic embryos	komórki tkanki przewodzącej the cells of vascular tissue
Przeciwciała charakterystyczne dla epitopów pektynowych Antibodies defining pectins epitopes	LM 5	+	+	+++
	LM 6	++	+	++
	JIM5	++	++	+++
	JIM7	+++	++	++
Przeciwciała charakterystyczne dla epitopów AGP Antibodies defining AGP epitopes	LM 2	++	+	++
	JIM4	-		-
	JIM8	-		-
	JIM13	++	+	++
	JIM14	+		-
	JIM15	-		-

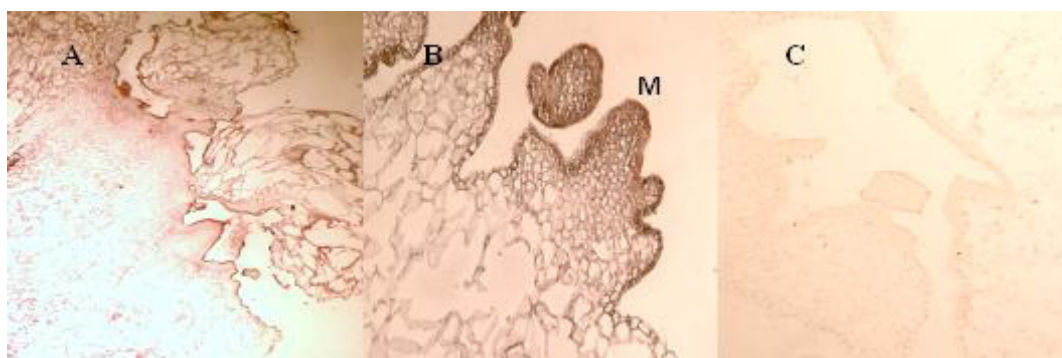
*Stopień intensywności sygnału w skali: + słaby, ++ dobry, +++ bardzo dobry, - brak sygnału

*Signal intensity scale: +weak, ++good, +++very good, - lacking



Rys. 4. Immunocytochemiczna detekcja epitopów charakterystycznych dla pektyn w różnicującym się kalusie zawierającym strefy formujących się merystemów (M) oraz elementy tkanki naczyniowej (T): JIM5 (A, B), JIM7 (C) (100x)

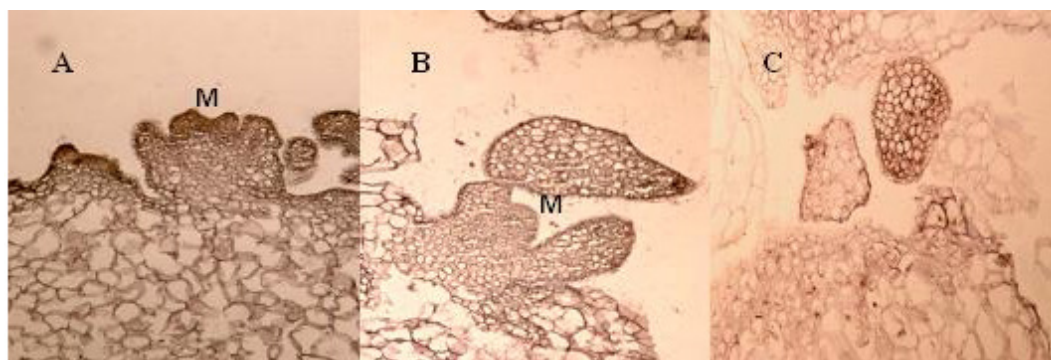
Fig. 4. Immunocytochemical detection of pectin epitopes in the differentiating callus tissue containing primordial meristems (M) and vascular tissue (T): JIM5 (A, B), JIM7 (C) (100x)



Rys. 5. Immunocytochemiczna detekcja epitopów charakterystycznych dla pektyn w różnicującym się kalusie zawierającym strefy formujących się merystemów (M): LM5 (A), LM6 (B). Reakcja kontrolna (C) (100x)

Fig. 5. Immunocytochemical detection of pectin epitopes in the differentiating callus tissue containing primordial meristems (M): LM5 (A), LM6 (B). Control reaction (C) (100x)

Wśród epitopów charakteryzujących proteoglikany AGP wyodrębniono takie, które występują w organogennym kalusie w relatywnie dużych ilościach bądź tylko w ilościach śladowych, albo takie, które w ogóle nie są obecne. Do pierwszej grupy zaklasyfikowano AGP wiążące się z przeciwciałami LM2, JIM13 i JIM14 (rys. 6A - C), do kolejnych te reagujące z JIM15, JIM4 i JIM8. W przypadku zarodków somatycznych analizowano dystrybucję dwóch epitopów charakteryzujących proteoglikany, tzn. LM2 i JIM13.

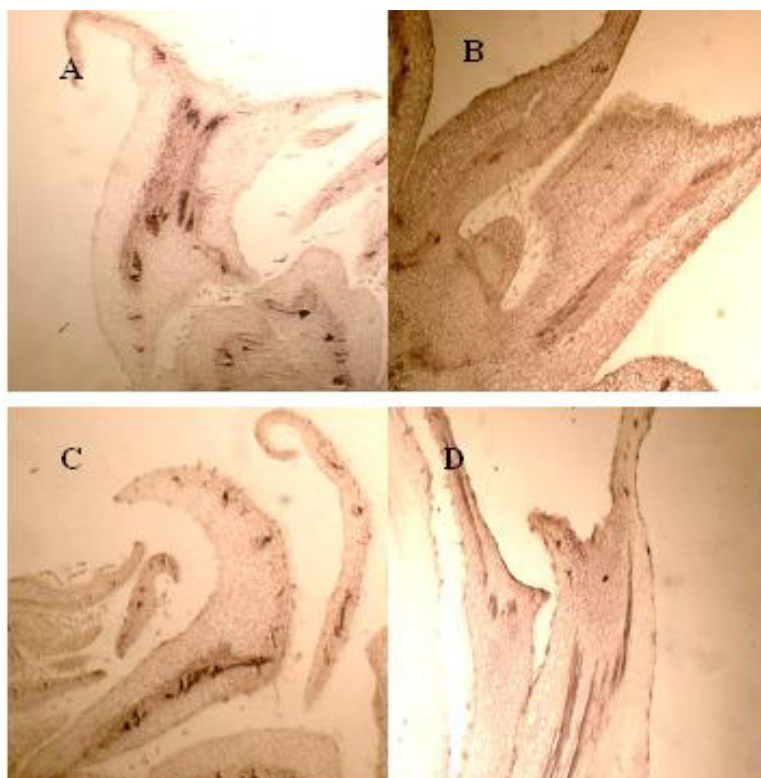


Rys. 6. Immunocytochemiczna detekcja epitopów charakterystycznych dla proteoglikanów AGP, rozpoznawanych przez przeciwciała LM2 (A), JIM13 (B), JIM14 (C) w różnicującym się kalusie zawierającym strefy formujących się merystemów (M) (100x)

Fig. 6. Immunocytochemical detection arabinogalactan protein epitopes recognized by antibodies: LM2 (A), JIM13 (B), JIM14 (C) in the differentiating callus tissue containing primordial meristems (M) (100x)

Potwierdzono, że badane domeny strukturalne są rozpowszechnione w analizowanych tkankach (rys. 8A–C) (tab. 3). W wyniku reakcji kontrolnych, wykonanych z pominięciem

etapu inkubacji z przeciwciałem pierwotnym, uzyskano skrawki niezabarwione lub zabarwione tylko w minimalnym stopniu (rys. 5C), co świadczy o specyficzności przeprowadzonych badań immunocytochemicznych. Nie stwierdzono zależności pomiędzy dystrybucją pektyn i proteoglikanów AGP w tkankach buraka cukrowego a rodzajem zastosowanego fitohormonu w pożywce regeneracyjnej. Stwierdzono, iż związki te są charakterystyczne dla wielu tkanek i faz rozwojowych.

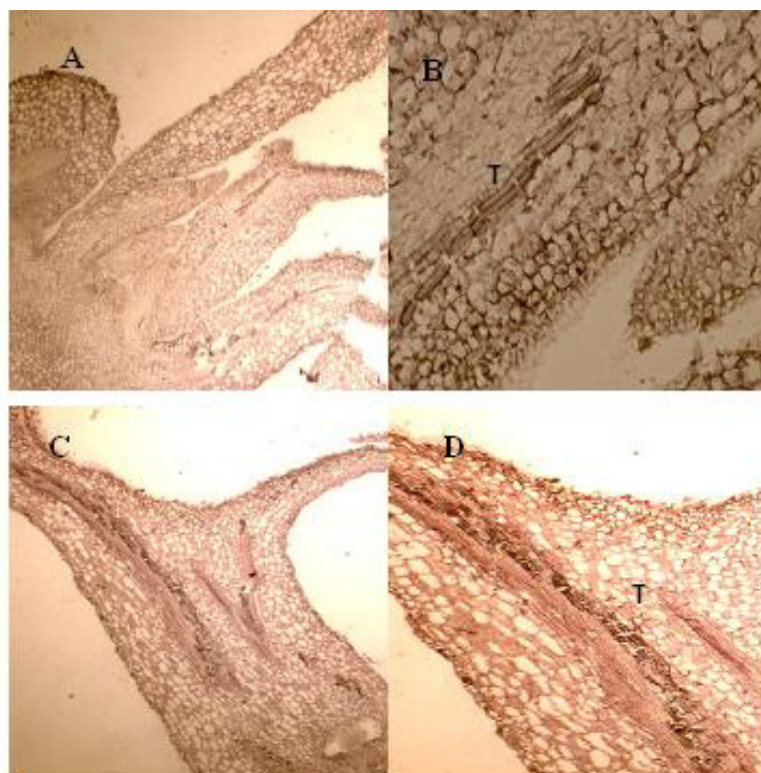


Rys. 7. Immunodetekcja epitopów charakterystycznych dla pektyn rozpoznawanych przez przeciwciała: JIM5 (A) i JIM7 (B) oraz LM5 (C) i LM6 (D) w zarodkach somatycznych (100x)
Fig. 7. Immunocytochemical detection of pectin epitopes recognized by antibodies: JIM5 (A) i JIM7 (B) oraz LM5 (C) i LM6 (D) in somatic embryos (100x)

Zastosowane w eksperymencie regulatory wzrostu i rozwoju były stymulatorem formowania się merystemów, zawiązków pędów, liści czy tkanki kalusowej. Wyniki analiz immunocytochemicznych przeprowadzonych na innych gatunkach roślin sugerują, iż niektóre z badanych związków mogą być uważane za markery procesów embriogenezy. Immunodetekcja epitopów charakterystycznych dla pektyn i proteoglikanów AGP w zarodkach somatycznych była możliwa tylko w przypadku regeneracji niezapłodnionych zalążków na pożywkach zestalonych 0,7% agarem, zawierających 2,2 μM BAP i 0,44 μM NAA, 0,44 μM KIN i 0,44 μM NAA oraz 0,44 μM KIN i 0,44 μM 2,4- D. Tylko w

obecności tych kombinacji fitohormonów zaobserwowano proces embriogenezy somatycznej buraka cukrowego.

Wyniki analiz przeprowadzonych w doświadczeniu dokumentują, że różnicowanie tkanek buraka, tzn. organogenego kalusa i zarodków somatycznych, związane jest z syntezą i depozycją epitopów pektynowych o różnym stopniu i wzorcu estryfikacji, jak też o odmiennej zawartości reszt arabinozy i galaktozy. Badania immunocytochemiczne tkanek buraka relacjonowane przez innych autorów potwierdziły obecność AGP reagujących z przeciwciałami JIM8, JIM13 i LM2 w liściach, protoplastach zawieszinowych, mezofilowych i szparkowych, w niezróżnicowanych komórkach zawieszinowych oraz w organach generatywnych (Butowt i in., 1999; Majewska-Sawka i Munster, 2003; Wiśniewska, 2006; Majewska-Sawka i Rodriguez-Garcia, 2006; Wiśniewska i Majewska-Sawka, 2007).



Rys. 8. Immunodetekcja epitopów charakterystycznych dla proteoglikanów AGP rozpoznawanych przez przeciwciała LM2 (A, B) i JIM13 (C, D) w zarodkach somatycznych z widocznymi elementami tkanki naczyniowej (T) (100x a, c i 200x b, d)

Fig. 8. Immunocytochemical detection of arabinogalactan protein epitopes recognized by antibodies: LM2 (A, B) i JIM13 (C, D) in somatic embryos with visible elements of vascular tissue (T) (100x a, c and 200x b, d)

Prezentowane wyniki dokumentują, że dwa z wymienionych epitopów, tzn. JIM13 i LM2, są również obecne w komórkach kalusa, w merystemach, w tworzących się *in vitro* organach (związkach pędów i liści) oraz w zarodkach somatycznych. Wnioski z analiz immunocytochemicznych przeprowadzonych na innych gatunkach roślin sugerują, że niektóre molekuly AGP pojawiają się w ściśle zdefiniowanych fazach rozwojowych, są zatem postrzegane jako ewentualne markery procesów organogenezy i embriogenezy. Często odmiennosc pomiędzy tkankami o właściwościach embriogennych i nieembriogennych można zdefiniować na podstawie różnic w obecności lub relatywnej zawartości poszczególnych epitopów. Zgodnie z tym stwierdzeniem wykazano, że cząsteczki reagujące z JIM13 są intensywnie syntetyzowane i akumulowane w kulturach embriogennych świerka *Picea abies* (Egertsdotter i von Arnold, 1995), w zarodkach cykorii *Cichorium* (Chapman i in., 2000), w specyficznych fazach rozwoju zarodków somatycznych i zgotycznych rzodkiewnika *Arabidopsis* (Qin i Zhao, 2006), jak też w zarodkach mikrosporowych rzepaku *Brassica napus* (Tang i in., 2006). Epitopy LM2 wydają się mieć związek z różnicowaniem kalusa wilczomlecza *Euphorbia pulcherrima*, gdyż ich całkowita zawartość w tkankach embriogennych znacznie przewyższa wartości charakteryzujące niezróżnicowane komórki kalusa (Saare-Surminski i in., 2000). Podobnie, procesy dyferencjacji kalusa pszenicy *Triticum aestivum* wydają się korelować ze zróżnicowaną ekspresją LM2 (Konieczny i in., 2007), a kalusa jodły *Abies alba* z syntezą epitopów galaktozy wykrywanych przez przeciwciało Gal4 (Samaj i in., 2008).

WNIOSKI

1. Pomimo, iż najintensywniejszy sygnał uzyskano dla komórek tkanki przewodzącej, badane epitopy typowe dla pektyn zaobserwowano we wszystkich analizowanych tkankach i typach komórek, niezależnie od stosowanej pożywki regeneracyjnej i obecnym w niej fitohormonom.
2. Stwierdzono ponadto, iż obecność domen AGP oraz synteza i depozycja epitopów pektynowych towarzyszy procesom różnicowania w obrębie tkanek buraka, tzn. organogennego kalusa i zarodków somatycznych.
3. Tylko niektóre z przeciwciał rozpoznających określone epitopy AGP mogą być uznawane za markery procesów morfogenetycznych bowiem obserwowane są w poszczególnych fazach rozwojowych inne natomiast obecne są w licznych komórkach kalusa, w merystemach, w tworzących się organach a nawet w zarodkach somatycznych.

LITERATURA

- Berger F., Taylor A., Brownlee C. 1994. Cell fate determination by the cell wall in early *Fucus* development. *Science* 263: 1421 — 1423.
- Brownlee C., Berger F. 1995. Extracellular matrix and pattern in plant embryos — on the lookout for developmental information. *Trends Genet.* 11: 344 — 348.
- Butowt R., Niklas A., Rodriguez-Garcia M. I., Majewska-Sawka A. 1999. Involvement of JIM13-and JIM8-responsive carbohydrate epitopes in early stages of cell wall formation. *J. Plant Res.* 112: 107 — 116.

- Carpita N. C., Gibeaut D. M. 1993. Structural models of primary cell walls in flowering plants: consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *Plant J.* 3: 1 — 30.
- Chapman A., Blervacq A. S., Vasseur J., Hillbert J. L. 2000. Arabinogalactan-proteins in *Cichorium* somatic embryogenesis: effect of β -glucosyl Yariv reagent and epitope localisation during embryo development. *Planta* 211: 305 — 314.
- Clausen M. H., Willats W. G. T., Knox J. P. 2003. Synthetic methyl hexagalacturonate hapten inhibitors of anti-homologalacturonan monoclonal antibodies LM7, JIM15 and JIM7. *Carbohydr. Res.* 338: 1797 — 1800.
- David H., David A., Bade P., Millet J., Morvan O., Morvan C. 1994. Cell wall composition and morphogenic response in callus derived from protoplasts of two fibre flax (*Linum usitatissimum* L.) genotypes. *J. Plant. Physiol.* 143: 379 — 384.
- Eberhard S., Doubrava N., Marfa V., Mohnen D., Southwick A., Darvill A., Albersheim P. 1989. Pectic cell wall fragments regulate tobacco thin-cell-layer explant morphogenesis. *Plant Cell* 1: 747 — 755.
- Egertsdotter U., von Arnold S. 1995. Importance of arabinogalactan proteins for the development of somatic embryos of Norway spruce (*Picea abies*). *Physiol. Plant.* 93: 334 — 345.
- Fry S.C. 1995. Polysaccharide-modifying enzymes in the plant cell wall. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant. Mol. Biol.* 46: 497 — 520.
- Hengel van A., Tadesse Z., Immerzeel P., Schols H., van Kammen A., de Vries S. 2001. N-acetylglucosamine and glucosamine-containing arabinogalactan proteins control somatic embryogenesis. *Plant Physiol.* 125: 1880 — 1890.
- Jones L., Seymour G. B., Knox J. P. 1997. Localization of pectic galactan in tomato cell walls using a monoclonal antibody specific to (1 \rightarrow 4)- β -D-galactan. *Plant Physiol.* 113: 1405 — 1412.
- Knox J. P., Linstead P. J., Peart J., Cooper C., Roberts K. 1991. Developmentally regulated epitopes of cell surface arabinogalactan proteins and their relation to root tissue pattern formation. *Plant J.* 1: 317 — 326.
- Konieczny R., Świerczyńska J., Czaplicki A. Z., Bohdanowicz J. 2007. Distribution of pectin and arabinogalactan protein epitopes during organogenesis from androgenic callus of wheat. *Plant Cell Rep.* 26: 355 — 363.
- Liners F., Gaspar T., Van Cutsem P. 1994. Acetyl- and methyl-esterification of pectins of friable and compact sugar-beet calli: consequences for intercellular adhesion. *Planta* 192: 545 — 556.
- Majewska-Sawka A., Münster A. 2003. Cell-wall antigens in mesophyll cells and mesophyll-derived protoplasts of sugar beet: possible implication in protoplast recalcitrance. *Plant Cell Rep.* 21: 946 — 954.
- Majewska-Sawka A., Rodriguez-Garcia M. I. 2006. Immunodetection of pectin and arabinogalactan protein epitopes during pollen exine formation of *Beta vulgaris* L. *Protoplasma* 228: 41 — 47.
- Malinowski R., Filipecki M. 2002. The role of cell wall in plant embryogenesis. *Cell. Mol. Biol. Lett.* 7: 1137 — 1151.
- Murashige T., Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473 — 497.
- Nothnagel E. A. 1997. Proteoglycans and related components in plant cells. *Int. Rev. Cytol.* 174: 195 — 291.
- Pennell R. I., Janniche L., Kjellbom P., Scofield G. N., Peart J. M., Roberts K. 1991. Developmental regulation of plasma membrane arabinogalactan protein epitope in oilseed rape flowers. *Plant Cell* 3: 1317 — 1326.
- Roberts A. W., Donovan S. G., Haigler C. H. 1997. A secreted factor induces cell expansion and formation of metaxylem-like tracheary elements in xylogenetic suspension cultures of *Zinnia*. *Plant Physiol.* 115: 683 — 692.
- Saare-Surmiński K., Preil W., Knox J. P., Lieberei R. 2000. Arabinogalactan proteins in embryogenic and non-embryogenic callus cultures of *Euphorbia pulcherrima*. *Physiol. Plant.* 108: 180 — 187.
- Samaj J., Terezia S., Matusova R., Salaj J., Takac T., Samajova O., Volkmann D. 2008. Arabinogalactan-protein epitope Gal4 is differentially regulated and localized in cell lines of hybrid fir (*Abies alba* x *Abies cephalonica*) with different embryogenic and regeneration potential. *Plant Cell Rep.* 27: 221 — 229.
- Smallwood M., Yates E., Willats W. G., Martin H., Knox P. 1996. Immunochemical comparison of membrane-associated and secreted arabinogalactan-proteins in rice and carrot. *Planta* 198: 452 — 459.
- Tang X.Ch., He Y.Q., Wang Y., Sun M.X. 2006. The role of arabinogalactan proteins binding to Yariv reagents in the initiation, cell developmental fate, and maintenance of microspore embryogenesis in *Brassica napus* L. cv. *Topas*. *J. Exp. Bot.*: 1 — 12.

- Toonen M.A.J., Schmidt E.D.L., van Kammen A., de Vries S.C. 1997. Promotive and inhibitory effects of diverse arabinogalactan proteins on *Daucus carota* L. somatic embryogenesis. *Planta* 203: 188 — 195.
- Qin Y., Zhao J. 2006. Localization of arabinogalactan proteins in egg cells, zygotes, and two-celled proembryos and effects of β -D-glucosyl Yariv reagent on egg cell fertilization and zygote division in *Nicotiana tabacum* L. *J. Exp. Bot.* 57: 2061 — 2074.
- Varner J. E., Lin L. S. 1989. Plant cell wall architecture. *Cell* 56: 231 — 239.
- Willats W. G. T., Steele-King C. G., Marcus S. E., Knox J. P. 1999. Side chains of pectic polysaccharides are regulated in relation to cell proliferation and cell differentiation. *Plant J.* 20: 619 — 628.
- Willats W. G. T., Limberg G., Buchholt H. C., van Alebeek G. J., Benen J., Christensen T. M. I E., Visser J., Voragen A., Mikkelsen J. D., Knox J. P. 2000. Analysis of pectic epitopes recognized by hybridoma and phage display monoclonal antibodies using defined oligosaccharides, polysaccharides, and enzymatic degradation. *Carbohydr. Res.* 327:309 — 320.
- Yates E. A., Valdor J. F., Haslam S. M., Morris H. R., Dell A., Mackie W., Knox J. P. 1996. Characterization of carbohydrate structural features recognized by anti-arabinogalactan-protein monoclonal antibodies. *Glycobiol.* 2: 31 — 39.
- Wiśniewska E. 2006. Charakterystyka cytologiczna i genetyczna komórek o wysokim i niskim potencjale do regeneracji roślin *in vitro* (*Nicotiana tabacum* L. vs *Beta vulgaris* L.). Praca doktorska. IHAR. Bydgoszcz: 1 — 149.
- Wiśniewska E., Majewska-Sawka A. 2007. Arabinogalactan-proteins stimulate the organogenesis of guard cell protoplasts-derived callus in sugar beet. *Plant Cell Rep.* 26: 1457 — 1467.

PODZIĘKOWANIA

Serdecznie dziękuję Pani Profesor Annie Majewskiej-Sawka za pomoc przy przeprowadzeniu niniejszych badań.