

SANDRA CICHORZ**MAŁGORZATA MALICKA****MARIA GOŚKA**

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin — Państwowy Instytut Badawczy, Radzików

Kierownik Tematu: dr Sandra Cichorz, Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin — Państwowy Instytut

Badawczy, Radzików, 05-870 Błonie, Oddział, Bydgoszcz, Al. Powstańców Wielkopolskich 10,

85-090 Bydgoszcz, tel. 52 5816918, e-mail: s.cichorz@ihar.bydgoszcz.pl

Prace zostały wykonane w ramach badań podstawowych na rzecz postępu biologicznego w produkcji roślinnej na podstawie decyzji Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi nr HOR.hn.802.19.2018, Zadanie 46.

Badania nad mechanizmami warunkującymi proces embriogenezy gametycznej u buraka cukrowego

The research on the mechanisms responsible for gametic embryogenesis in sugar beet

Słowa kluczowe: AGP, *Beta vulgaris*, gynogeneza, haploidy

W ostatnich kilkunastu latach nieodzownym elementem strategii tworzenia nowych materiałów wyjściowych dla hodowli, jak również doskonalenia odmian buraka cukrowego stało się wykorzystanie najnowszych osiągnięć w dziedzinie biotechnologii. Otrzymanie haploidów tego gatunku okazało się możliwe dopiero w latach 80. z wykorzystaniem kultur *in vitro* niezapłodnionych zalążków i zalążni (Van Geyt i in., 1987; Doctrinal i in., 1989; Gośka, 1997), podczas których dochodzi do regeneracji haploidalnych pędów z komórek jajowych woreczka zalążkowego. Rośliny haploidalne są nieplodne, z tego względu niezbędna jest ich diploidyżacja dla uzyskania stabilnych genetycznie i cytologicznie linii podwojonych haploidów (linii DH). Jednak wykorzystanie linii DH w hodowli roślin w znacznym stopniu uwarunkowane jest efektywną metodą ich wyprowadzenia z różnych materiałów wyjściowych. Wpływ genotypu uważany jest za najważniejszy czynnik warunkujący efektywność prawie wszystkich rodzajów kultur tkankowych, a w szczególności embriogenezy gametycznej. Obecnie niewiele wiadomo na temat mechanizmów molekularnych, w tym udziału poszczególnych genów związanych z indukcją powyższego procesu. Przy czym warto podkreślić, iż identyfikacja genotypów o wysokim potencjale gynogenetycznym byłaby

wysoce pożądana. Dlatego też, aby poszerzyć wiedzę na temat genetycznych mechanizmów warunkujących rozwój haploidalnych zarodków nieodzowne są badania prowadzone na szeroką skalę, szczególnie genotypów o wysokim i niskim potencjale gynogenetycznym buraka cukrowego (Bohanec, 2009).

Z powyższych względów punktem wyjścia prowadzonych prac była między innymi cytologiczna charakterystyka komórek zalążka buraka. Zaobserwowano, iż podczas prowadzenia kultur zapłodnionych zalążków buraka cukrowego, dochodzi do zmian w obrębie ścian komórek integumentum (Bruun, 1991). Zgodnie z danymi literaturowymi, obecność poszczególnych komponentów ściany, jak też ich przestrzenna organizacja są potencjalnymi czynnikami odzwierciedlającymi lub w pewnym stopniu warunkującymi właściwości morfogenetyczne komórek i tkanek. Badania prowadzone na 3 liniach kalusa buraka cukrowego (normalnego, nieorganogenicznego i rakowego) różniących się potencjałem morfogenetycznym wykazały, iż w toku prowadzenia kultur dochodzi do zróżnicowanej ekspresji peroksydaz, chitynaz, esteraz pektynowych. Powyższe enzymy uczestniczą w modyfikowaniu właściwości komponentów ściany komórkowej, przy czym chitynazy biorą udział w szlaku przemian części białkowej arabinogalaktanów, zawierających N-acetylo-D-glukozamię (GlcNAc) oraz glukozaminę (GlcN), co prowadzi do uwolnienia oligosacharydowych cząsteczek sygnałnych (Pavoković i in., 2012). Obecny stan wiedzy pozwala stwierdzić istotną rolę komponentów ściany komórkowej jakimi są proteoglikany AGP (ang. arabinogalactan proteins) w procesach wzrostu łagiewki pyłkowej, wydłużania i różnicowania komórek, a także regulacji somatycznej embriogenezy (Capataz-Tafur i in., 2011). Ponadto wykazano obecność AGP w organach wegetatywnych i generatywnych roślin, w tym również w zalążkach (Acosta-Garcia i Vielle-Calzada, 2004; Qin i Zhao, 2006). Wyniki przytoczonych prac eksperymentalnych sugerują, że proteoglikany AGP pełnią istotną rolę w procesach morfogenezy roślin.

Dlatego też uznano za celowe porównanie struktury ścian komórkowych syntetyzowanych przez trudno i łatwo regenerujące na drodze gynogenezy genotypy buraka cukrowego, ze szczególnym uwzględnieniem lokalizacji i rearanżacji wybranych proteoglikanów i pektyn.

Obserwacje histologiczne w mikroskopie świetlnym prowadzone na skrawkach cienkich (1 μm) 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.

Obecność i dystrybucja epitopów charakterystycznych dla jednego typu proteoglikanów AGP i pektyn została wstępnie zbadana w tkankach niezapłodnionych zalążków buraka cukrowego o wysokim i niskim potencjale embriogenetycznym, utrwalonych na czterech etapach rozwojowych (w dniu pobrania oraz po 7, 9 i 14 dniach od wyłożenia na pożywki indukcyjne). Detekcję przeprowadzono na skrawkach półcienkich (0,5 μm). Miejsce wiązania przeciwciał przez antygeny komórkowe uwidoczniło *in situ* po przyłączeniu przeciwciał wtórnych znakowanych izotiocyanianem fluoresceiny (FITC) zgodnie z metodyką opisaną przez Wiśniewską i Majewską (2007). Preparaty analizowano w mikroskopie fluorescencyjnym Jenalumar. Obserwacje mikroskopowe 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 epitopów 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.

Z powyższych względów uznano, iż obecność i lokalizacja określonych domen cukrowych może mieć istotny wpływ na proces embriogenezy gametycznej buraka cukrowego, co wymaga potwierdzenia większą liczbą obserwacji w toku kolejnych badań.

LITERATURA

- Acosta-García G., Vielle-Calzada J. P. 2004. A Classical Arabinogalactan Protein Is Essential for the Initiation of Female Gametogenesis in Arabidopsis. *Plant Cell* 16: 2614 — 2628.
- Bohanec, B. 2009. Doubled haploids via gynogenesis. In: *Advances in Haploid Production in Higher Plants* (Touraev A., Forster B. P., Jain S. M. eds). Heidelberg, Berlin: Springer-Verlag: 35 — 46.
- Bruun L. 1991. Histological and semi-quantitative approaches to in vitro cellular responses of ovule, embryo and endosperm in sugar beet, *Beta vulgaris* L. *Sex Plant Reprod* 4: 64 — 72.
- Doctrinal M., Sangwan R.S., Sangwan-Norreel B.S. 1989. *In vitro* gynogenesis in *Beta vulgaris* L.: Effects of plant growth regulators, temperature, genotypes and season. *Plant Cell Improvement* 12: 346 — 357.
- Capataz-Tafur J., Trejo-Tapia G., Rodríguez-Monroy M., Sepúlveda-Jiménez G. 2011. Arabinogalactan proteins are involved in cell aggregation of cell suspension cultures of *Beta vulgaris* L. *Plant Cell Tiss. Org.* 106: 169 — 177.
- Gośka M. 1997. Haploidy i podwojone haploidy buraka cukrowego (*Beta vulgaris* L.) oraz możliwości ich wykorzystania w hodowli. *Monografie i Rozprawy Naukowe IHAR* 2: 1 — 81.
- Pavoković D., Poljuha D., Horvatić A., Ljubesić N., Hagege D., Kršnik-Rasol M. 2012. Morphological and proteomic analyses of sugar beet cultures and identifying putative markers for cell differentiation. *Plant Cell Tiss. Org.* 108: 111 — 119.
- 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. *Exp. Bot.* 57: 2061 — 2074.
- 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.
- Van Geyt J. P. C., Speckmann G. J., D'Halluin K., Jacobs M. 1987. *In vitro* induction of haploid plants from unpollinated ovules and ovaries of the sugarbeet (*Beta vulgaris* L.) *Theor. Appl. Genet.* 73: 920 — 925.