

Tytuł: Alternatywne czynniki redukujące zjawisko albinizmu roślin regenerowanych z androgenicznych kultur pszenicy i pszenżyta

Okres realizacji: 2015-2020

Kierownik:

dr hab. Magdalena Szechyńska-Hebda
szechynska@wp.pl

Główni wykonawcy:

prof. dr hab. Maria Wędzony
dr Mateusz Dyda
mgr Natalia Hordyńska
dr Joanna Troczyńska
dr Zofia Banaszak
dr inż. Mirosław Sobczak
dr Elżbieta Różańska
dr Iwona Wąsek
dr Maria Pilarska
prof. dr hab. Ireneusz Ślesak

Celem projektu była weryfikacja hipotez badawczych:

H1: Rozwój plastydów może być modyfikowany na najwcześniejszych etapach androgenezy przez aplikację odpowiednich czynników abiotycznych; krótkie okresy wysokiej temperatury i wysokiego natężenia światła mogą być stosowane alternatywnie do indukcji chłodowej oraz ograniczać zjawisko albinizmu.

H2: Zjawisko albinizmu jest rezultatem niezbalansowanego zapotrzebowania energetycznego komórek lub braku odpowiednich sygnałów rozwojowych, a w konsekwencji zaburzeń rozwoju i eliminacji plastydów podczas przeprogramowania rozwoju gametofitowego w kierunku sporofitycznym.

H3: Zjawisko albinizmu jest rezultatem niezbalansowania reaktywnych form tlenu i indukcji programowanej śmierci komórki, która z kolei prowadzi do autoeliminacji komórek gametycznych zdolnych do przeprogramowania rozwoju w kierunku sporofitycznym.

Cel projektu osiągnięto.

Material i metody

Pszenżyto ozime: Rotondo (G1), Torino (G2), Twingo (G3), DC07064-16 (G4)

Pszenica ozima: C1612/13 (G5), C1622/13 (G6), C3494/8 (G7), C3494/17 (G8)

Indukcja androgenezy: 4°C, 32°C, 1500 μmol fotonów $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$

Analiza: kłosa/pylniki przed i po aplikacji stresu, kalus, zregenerowane pędy

H1-H2:

- cytologiczna charakterystyka rozwoju plastydów (mikroskopia konfokalna);
- organizacja membran tylakoidów (transmisyjna mikroskopia elektronowa);
- efektywność funkcjonowania chloroplastów (fluorescencja chlorofilu *a* - FluorCAM);
- składniki chloroplastów: barwniki fotosyntetyczne (wysokosprawna chromatografia cieczowa), białka markerowe rozwój chloroplastów (Western Blot), ekspresja genów (RT-PCR);
- stan energetyczny komórek: zawartość cukrów (wysokosprawna chromatografia cieczowa), efektywność fotosyntezy (fluorescencja chlorofilu *a* - FluorCAM), intensywność oddychania i emisja ciepła (kalorymetria izotermiczna).

H3:

- rozwój mikrospor po zastosowaniu stresów indukcyjnych z uwzględnieniem: indukcji programowanej śmierci komórki (mikroskopia fluorescencyjna: TUNEL, DAPI, TB, FDA), roli ROS (mikroskopia fluorescencyjna i świetlna: NBT, H_2O_2 , DCFH-DA), poziomu antyoksydantów (mikroskopia fluorescencyjna: monobromobimane).

Temat 1: Określenie efektywności chłodu, wysokiej temperatury, wysokiego natężenia światła o określonej kompozycji świetlnej w indukcji androgenezy i ograniczeniu zjawiska albinizmu.

Wnioski:

- zależność genotypowa podatności na proces androgenezy i regeneracja roślin zielonych *vs* albinotyczne jest czynnikiem krytycznym; modyfikującym czynnikiem jest termin zbioru kłosów, determinowany środowiskowo (temp. wzrostu roślin donorowych) i genotypowo (wczesność faz rozwojowych);
- proces tworzenia struktur androgenicznych w kalusie jest zależny od czynników determinujących przełączenie programu rozwoju mikrospor z gametofitycznego do sporofitycznego; jednak mechanizmy regeneracji muszą być odpowiednio ukierunkowane przez odpowiednie warunki hodowli;
- stres chłodu jest pozytywnym regulatorem przeprogramowania rozwoju mikrospor i regeneracji roślin zielonych; dodatkowo zastosowany stres wysokiego natężenia światła podwyższa parametry regeneracji genotypów podatnych; efektem zastosowania dodatkowego stresu wysokiego natężenia światła w genotypach opornych jest szybsze dojrzewanie ziarn pyłku w miejsce przeprogramowania mikrospor; stres wysokiej temperatury indukuje androgenezę, ale jest czynnikiem negatywnym regeneracji roślin zielonych.

Temat 2: Cytologiczna charakterystyka rozwoju plastydów i efektywności ich funkcjonowania.

Wnioski:

- żaden z zastosowanych rodzajów stresu nie powoduje krytycznego obniżenia żywotności mikrospor;
- zróżnicowanie wieku mikrospor w obrębie jednego kłosa jest czynnikiem, który decyduje o efektywności androgenezy; względnie większa obecność młodszych lub późniejszych faz rozwojowych mikrospor charakteryzuje genotypy słabiej indukujące struktury androgeniczne; mikrospory genotypów podatnych zawierają drobne ziarnistości będące proplastydami lub amyloplastami;
- indukcja struktur androgenicznych i regeneracja są w niewielkim stopniu skorelowane, podobnie procentowy udział zregenerowanych roślin albinotycznych względem całkowitej liczby zregenerowanych roślin;
- u roślin albinotycznych obecne są plastydy, nie namnażające się w komórkach miękiszu liścia w sposób typowy, upośledzona jest w nich synteza chlorofilu i formowanie aparatu fotosyntetycznego.

Temat 3: Analiza organizacji membran tylakoidów.

Wnioski:

- mikrospory w trakcie i po indukcji chłodowej podejmują podziały komórkowe, prowadzące do powstania struktur androgenicznych w sposób genotypowo zależny; liczne podziały zachodzą w genotypach indukujących androgenezę; większość mikrospor genotypów opornych jest silnie zwakuolizowana i indukuje PCD;
- w mikrosporach pszenżyta występują prowakuole gromadzące materiały zapasowe, liczne oleosomy, w pszenicy występują wakuole lityczne i ziarna skrobi; mikrospory obu gatunków zawierają proste strukturalnie proplastydy bez wewnętrznych membran i centralnego obszaru nukleiodopodobnego lub amyloplasty;
- obecność prostych strukturalnie proplastydów bez wewnętrznych membran i centralnego obszaru nukleiodopodobnego lub amyloplastów o mniejszym stopniu wykształcenia ziarn skrobi jest pozytywnie skorelowana z powstawaniem centrów regeneracji i regeneracją zielonych pędów na etapie kultur *in vitro*; deregulacja syntezy skrobi i tłuszczów, prowadząca do powstania licznych i bardzo rozbudowanych amyloplastów oraz zwiększonej liczby oleosomów jest wskaźnikiem ograniczenia efektywności androgenezy;
- liście roślin albinotycznych są słabiej ustrukturyzowane, ich komórki zawierają sferyczne proplastydy bez wewnętrznych membran; na problemy z formowaniem membran wewnętrznych i różnicowaniem proplastydów wskazuje obecność ciał prolamemarnych (analogiczne jak w etioplastach), pęcherzyków (jak w plastydach przedgranowych), plastoglobuli na terenie stromy (elementy charakterystyczne dla chloroplastów i chromoplastów globularnych), napęczniałych tylakoidów i talerzykowatych proplastydów;
- rośliny zielone, niezależnie od genotypu, wykształcają chloroplastowy system membran wewnętrznych; pszenicę charakteryzuje bardzo skomplikowany systemem membran tylakoidowych;
- rozwój proplastydów może być modyfikowany przez aplikację odpowiednich czynników abiotycznych i modulację ich natężenia.

Temat 4: Analiza syntezy składników chloroplastów: barwników fotosyntetycznych i białek markerowych oraz analiza ekspresji genów kodujących te białka.

Wnioski:

- podatność na proces androgenezy związana jest z zwiększoną syntezą barwników fotosyntetycznych w pylnikach, kłosach, kalusie i roślinach zregenerowanych; jednakże zbalansowanie syntezy poszczególnych barwników stanowi warunek prawidłowego wbudowania w membrany fotosyntetyczne;
- zregenerowane rośliny albinotyczne zawierają 100 razy mniej barwników fotosyntetycznych, w tym w sposób szczególnie ograniczona jest synteza wiolaksantyny, zeaksantyny, luteiny, chlorofilu b;
- zawartość białek fotosyntetycznych np. PsbO, Lhcb2, D2 w zregenerowanych roślinach albinotycznych jest na granicy detekcji; względnie wyższą zawartością charakteryzują się rośliny albinotyczne genotypu najbardziej podatnego;
- spośród enzymów antyoksydacyjnych stanowiących ochronę w stanie niezbalansowania fotosyntetycznego, peroksydazy (PXs) są najbardziej specyficzne na poziomie aktywności białka w pylnikach, genotypy, które scharakteryzowano jako podatne mają prawie czterokrotnie wyższe wartości aktywności PXs; zmiany aktywności dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) są w sposób szczególnie zależne od warunków środowiskowych, wyższe wartości aktywności obserwowano po potraktowaniu światłem o wysokim natężeniu; zmiany aktywności katalazy (CAT) są gatunkowo zależne, znacznie wyższe wartości aktywności uzyskano dla pszenżyta w porównaniu do pszenicy; aktywność PXs i CAT jest specyficzna dla zielonych regenerantów genotypów podatnych; na poziomie ekspresji genów najbardziej charakterystyczne zmiany obserwowano dla SOD; zmiany ekspresji genu CAT nie korelują z procesem androgenezy i z rodzajem traktowania;
- podwyższenie ekspresji genu SSIII (synteza skrobi) dla genotypów podatnych jest istotne na każdym etapie androgenazy, wszystkie czynniki stresowe podwyższają wartość ekspresji genu SSIII, najsilniejszy efekt indukuje traktowanie tkanek światłem o wysokim natężeniu;
- najwyższy poziom ekspresji genu kodującego białko D1 obserwowano po zastosowaniu stresu niskiej temperatury oraz wysokiego natężenia światła dla genotypu podatnego na proces androgenezy.

Temat 5: Określenie stanu energetycznego komórek.

Wnioski:

- stres niezbędny jest do regeneracji roślin zielonych w procesie androgenezy, jako czynnik zmieniający status energetyczny komórek; wyższy poziom metabolizmu na poziomie fotosyntezy w liściach flagowych i mikrosporach po inkubacji chłodowej charakteryzuje genotypy zdolne do regeneracji roślin zielonych zarówno dla pszenicy jak i pszenżyta; szybsza degradacja i wycofywanie asymilatów liścia flagowego bezpośrednio przed terminem izolacji pylników koreluje z lepszym zaopatrzeniem pylników i mikrospor w składniki odżywcze; wysoki poziom stresu indukuje mechanizmy regulacji rozwoju mikrospor, jednak dla pylników charakterystyczna jest tendencja odwrotna, wskazując, że lepsza kondycja metaboliczna tkanek pylnika jest niezbędna dla zapewnienia odpowiedniego odżywiania mikrospor;
- stężenie cukrów stanowi czynnik różnicujący genotypy odporne i podatne na każdym etapie androgenezy; genotypy podatne charakteryzuje największa zawartość cukrów; stężenie cukrów jest zależne od zastosowanego stresu indukującego proces androgenezy; w okresie trzech tygodni chłodzenia kłosów zawartość cukrów w pylnikach systematycznie i drastycznie obniża się; stres wysokiego natężenia światła wydaje się spowalniać proces degradacji cukrów w pylnikach chłodzonych; po stresie wysokiej temperatury stężenie cukrów w pylnikach obniża się prawie dwudziestokrotnie w porównaniu do pylników traktowanych chłodem;
- większa aktywność metaboliczna tkanek genotypów podatnych na proces androgenezy, jest związana z większymi przemianami energetycznymi, jako efekt intensywnie zachodzących procesów fizjologicznych; podatność na proces androgenezy związany jest z znacznie szybszym uruchamianiem procesów oddychania i fotosyntezy; szybkość procesów metabolicznych i elastyczność ich dostosowania w warunkach stresu przeprogramowania rozwoju mikrospor jest czynnikiem determinującym kierunek ich rozwoju, a w późniejszych etapach procesu androgenezy - czynnikiem wspomagającym indukcję struktur androgenicznych i regenerację roślin zielonych; brak dopływu produktów fotosyntezy może powodować eliminację plastydów nie tylko w wyniku priorytetowego rozwoju gametofitowego, ale również niezbalansowanego zapotrzebowania energetycznego.

Temat 6: Analiza rozwoju komórek mikrospor z uwzględnieniem indukcji programowanej śmierci komórki (PCD) oraz roli reaktywnych form tlenu (ROS) i antyoksydantów.

Wnioski:

- zjawisko albinizmu genotypów opornych jest rezultatem niezbalansowania ROS i ich wpływu na indukcję PCD mikrospor, która ostatecznie prowadzi do autoeliminacji komórek gametycznych zdolnych do przeprogramowania rozwoju w kierunku sporofitycznym; w komórkach kalusa, indukcja PCD jest charakterystyczna dla większości genotypów, czynnikiem determinującym efektywność androgenезy jest bezwzględna liczba obumarłych komórek; w przypadku zielonych liści, wczesne wskaźniki indukcji PCD są oznaczane w jądrach komórek szparkowych i komórek mezofilu, a także w chloroplastach;

- każdy typ stresu, którego podstawą jest niezbalansowanie nadmiaru energii wzbudzenia oraz regulacji ROS, w indukcji procesu androgenезy pszenicy i pszenżyta może stanowić:

(1) dla genotypów podatnych na proces androgenезy sygnał dla indukcji biogenезy chloroplastów na etapie syntezy ich składników i formowania membran tylakoidowych, w tym może stanowić induktor retro-sygnałów zaangażowanych w balansowanie ROS i indukcję PCD; brak odpowiednich sygnałów na poziomie plastydów/chloroplastów prowadzi do autoeliminacji mikrospor zdolnych do przeprogramowania rozwoju w kierunku sporofitycznym (indukcja PCD), a rola ROS jest priorytetowa w tych procesach;

(2) dla genotypów opornych na proces androgenезy czynnik determinujący uruchamianie blokady podziałów komórkowych i indukcję nadmiernej PCD; traktowanie niską temperaturą i wysokim natężeniem światła korzystnie wpływa na rozwój mikrospor genotypów podatnych na proces androgenезy, natomiast wysoka temperatura i wysokie natężenie światła dereguluje rozwój mikrospor opornych genotypów;

Dodatkowy temat badawczy w 2016r.

Wnioski:

Indukcja mikrospor z udziałem światła białego o wysokim natężeniu i skrócony okres chłodzenia wpływa na zwiększenie żywotności mikrospor w pylnikach, ale ogranicza sporofityczny rozwój mikrospor na korzyść rozwoju gametofitycznego; zastosowanie światła LED białego i czerwonego o wysokim natężeniu może wspomagać proces regeneracji.

Osiągnięcia projektu:

- wytypowanie genotypów podatnych na proces androgenezy: G1, G3, G5 i opornych na indukcję androgenezy G2, G4, G6-7;
- wskazanie, że stres chłodu jest pozytywnym regulatorem przeprogramowania rozwoju mikrospor; dodatkowo zastosowany stres wysokiego natężenia światła podwyższa parametry regeneracji genotypów podatnych; stres wysokiej temperatury indukuje androgenezę, ale jest czynnikiem negatywnym regeneracji roślin zielonych;
- wskazanie markerów i mechanizmów odpowiedzialnych za blokadę procesu androgenezy tj.: obecność wakuol litycznych w mikrosporach; indukcja PCD; deregulacja syntezy skrobi i tłuszczów (bardzo rozbudowane amyloplasty, zwiększona liczba oleosomów, ekspresja genu SSIII); problemy z formowaniem membran wewnętrznych i różnicowaniem proplastydów (deregulacja syntezy barwników fotosyntetycznych, szczególnie wiolaksantyny, zeaksantyny i luteiny i chlorofilu b, gen kodujący białko D1); niższy poziom metabolizmu na poziomie fotosyntezy w liściach flagowych i mikrosporach oraz wolniejsza degradacja i wycofywanie asymilatów liścia flagowego bezpośrednio przed terminem izolacji pylników; wolniejsze uruchamianie procesów fotosyntezy / oddychania w warunkach światło / ciemność i elastyczność ich dostosowania w warunkach stresu przeprogramowania rozwoju mikrospor; niższe stężenie cukrów i szybsza ich degradacja; niezbalansowanie ROS (szczególnie ograniczenie funkcjonowania PXs na poziomie białka i ekspresji genów) i ich wpływu na indukcję PCD.

Wykaz publikacji

Szechyńska-Hebda M., Sobczak M., Rożańska E., Troczyńska J., Banaszak Z., Dyda M., Wędzony M. Ultrastructural and transcriptomic studies of the androgenesis. 4th International Symposium on Genomics of Plant Genetic Resources Giessen, Germany 3-7 wrzesień, 2017.

Dyda M., Troczyńska J., Banaszak Z., Wędzony M., Szechyńska-Hebda M. Androgenesis of wheat and triticale. 4th International Symposium on Genomics of Plant Genetic Resources Giessen, Germany 3-7 wrzesień, 2017.

Szechyńska-Hebda M., Sobczak M., Różańska E., Troczyńska J., Banaszak Z., Hordyńska N., Dyda M., Wędzony M. Improving the efficiency of wheat and triticale androgenesis: ultrastructural and transcriptomic. 20th International Conference on Plant Physiology and Pathology, Zurich, Switzerland, 13 – 14 wrzesień 2018.

Hordyńska N., Szechyńska-Hebda M., Sobczak M., Różańska E., Troczyńska J., Banaszak Z., Wędzony M. Metabolic Changes during Reprogramming of Wheat and Triticale Microspores. 20th International Conference on Plant Physiology and Pathology, Zurich, Switzerland, 13 – 14 wrzesień 2018.

Szechyńska-Hebda M., Hordyńska N., Pilarska M., Ślesak I., Banaszak Z., Troczyńska J. Factors determining the albinism of plants regenerated from androgenic cultures of wheat and triticale. International Plant Science Conference University of Rostock, Germany, 15–19 wrzesień 2019.