

**Gatunek rośliny której dotyczy sprawozdanie:** *Lupinus angustifolius* L.

**Autor/autorzy:** RENATA GALEK<sup>1</sup>, BARTOSZ KOZAK<sup>1</sup>, DARIUSZ ZALEWSKI<sup>1</sup>, EWA SAWICKA-SIENKIEWICZ<sup>1</sup>, ADELA ADAMUS<sup>2</sup>, AGNIESZKA KIEŁKOWSKA<sup>2</sup>

**Afiliacja:** <sup>1</sup>Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, Katedra Genetyki, Hodowli Roślin i Nasiennictwa <sup>2</sup>Uniwersytet Rolniczy w Krakowie, Zakład Genetyki, Hodowli Roślin i Nasiennictwa

**Adres korespondencyjny**, adres e-mail i nr telefonu Kierownika Tematu:

Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, Katedra Genetyki, Hodowli Roślin i Nasiennictwa, Zakład Genetyki i Biotechnologii Roślin, pl. Grunwaldzki 24a, 50-363 Wrocław, e-mail: renata.galek@upwr.edu.pl, tel. 713201815 lub 713201826

**Informacja o dotacji:**

Prace zostały wykonane w ramach badań podstawowych na rzecz postępu biologicznego w produkcji roślinnej na podstawie decyzji na podstawie § 9 ust. 1 i ust. 6 do rozporządzenia Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 29 lipca 2015 r. w sprawie stawek dotacji przedmiotowych dla różnych podmiotów wykonujących zadania na rzecz rolnictwa (Dz. U. z 2017 r., poz. 1170 z późn. zm.) znak sprawy HOR.hn.802.10.2019, Zadanie nr 108

**Tytuł zadania w języku polskim:** Badania nad gametyczną embriogenezą u *Lupinus angustifolius* L. - indukcja haploidów i analiza genetycznego podłoża tego procesu

**Tytuł zadania w języku angielskim:** Research on gametic embryogenesis in *Lupinus angustifolius* L. - haploid induction and analysis of the genetic basis of this process

**Słowa kluczowe:** androgeneza, gynogeneza, haploidy, identyfikacja haploidów, krzyżowanie oddalone, łubin wąskolistny

**Cel badań**

Realizacja projektu w drugim roku badań - 2019 została podzielona na dwie części, których celami zasadniczymi były:

I część

- analiza wpływu pyłku obcego gatunku na rozwój woreczka zalążkowego w układzie krzyżowania *L. angustifolius* x *L. mutabilis*
- optymalizacja pożywek dla wybranych dwóch genotypów *L. angustifolius* – krzyżowanie oddalone, gynogeneza

II część

- charakterystyka kultur mikrospor po zastosowaniu enzymatycznego traktowania mikrospor oraz stresu chłodu
- ocena histologiczna kalusa otrzymanego z kultur mikrospor

- analiza genów ulegających ekspresji w tkance kalusa z kultur mikrospor

## Opis wyników

### I część

W pierwszej kolejności przeanalizowano stan rozwojowy zalążków dla dwóch genotypów łąbinu wąskolistnego stanowiących kontrolę, gdzie punktem odniesienia była wielkość pylników w stosunku do słupek wraz ze znamieniem: pylniki osiągające  $\frac{1}{2}$  i  $\frac{3}{4}$  długości słupek oraz pylniki rozwinięte powyżej znamienia słupek. Stwierdzono, że zalążki pobrane w pierwszym z wymienionych terminów nie miały zróżnicowanych komórek macierzystych makrospory, aczkolwiek obserwowano już zarys woreczka zalążkowego. Przy pobraniu zalążków przy  $\frac{3}{4}$  długości pylników w stosunku do słupek obserwowano od jedno do kilkukomórkowego woreczka zalążkowego. W pełni kwitnienia po przerośnięciu przez pylniki znamion obserwowano wykształcony aparat jajowy, także proces kariogamii i powstanie zygoty. Dodatkowo przeanalizowano preparaty z zalążków pobranych po 4-7 dniach od samozapylenia oraz 21. Obserwowano rozwój kilkukomórkowych prozarodków, a po dwóch tygodniach zarodki osiągnęły stadium kuliste z widocznym suspensorem. W przypadku analizowanych preparatów wykonanych z zalążków po przepaleniu *L. angustifolius* (Karo i Graf) x *L. mutabilis* LM. 13 po nie stwierdzono na żadnym z analizowanych preparatów dla dwóch genotypów łąbinu wąskolistnego procesu kariogamii, tylko obecność pojedynczych komórek po 48 h od przepylecia pyłkiem *L. mutabilis*. Po 96 h można było zaobserwować kilkukomórkowe struktury o dużych jadrach komórkowych czy po 168 h kilkunastokomórkowe nie przypominające zarodków zygotycznych. Ich położenie może wskazywać, że mamy do czynienia z partenogenezą. Po tym czasie widoczne też były degenerujące woreczki zalążkowe w zalążku.

Zarówno materiał biologiczny w postaci kalusa wyprowadzony na drodze krzyżowania oddalonego jak i gynogenezy wymaga szeregu pasażów, niewykluczone że bardzo częstych. W obu technikach podjęcie rozwoju tkanki kalusowej miało miejsce do dwóch tygodni, w kolejnych obserwacjach prowadzonych co tydzień kolejnych zalążków ze zmianami nie przybywało. Procent indukcji zmian dla trzech genotypów nie przekroczył 35% po zastosowaniu pożywki B5 z różnymi kombinacjami regulatorów wzrostu (2,4 D i lub kinetyna, B5 kontrola – łącznie 5 podłoży). Generalnie pożywka bez regulatorów wzrostu w początkowych etapach – do dwóch tygodni dała najlepsze rezultaty w przypadku krzyżowania oddalonego. W dwóch technikach indukcji haploidów generalnie odmiany Emir, Graf i Karo okazały się podatne na warunki kultury a LAE nie. Dobór regulatorów wzrostu w pożywce B5 jest kluczowy, a także kolejnych podtrzymujących rozwój eksplantatów. Bardzo ważną rolę w opracowaniu dalszych etapów regeneracji będzie uchwycenie

czasu pasażu. Biorąc pod uwagę otrzymane wyniki konieczne jest prowadzenie materiału pulsacyjnie, tzn. nie tylko zmieniając stężenia i rodzaje regulatorów wzrostu, ale też zastosowanie pożywki bez regulatorów. Zmiany częste podłoża są konieczne, ponieważ zaobserwowano szybkie przechodzenie komórek na szlak apoptozy i nie zawsze daje się ten proces zahamować czy całkowicie odwrócić. W bieżącym roku udało się ustabilizować tkanki kalusowe dla odmiany Emir. Uzyskano też znaczny postęp dla kultur załączków (gynogeneza) w stosunku do ubiegłego roku. W przypadku krzyżowania oddalonego otrzymano w tym roku dwa typy kalusa – obydwie wyraźnie wydostające się ze środka załączka.

## II część

Dane literaturowe dotyczące prób uzyskania haploidów u łubinu wskazywały, że jedną z przyczyn trudności w indukcji androgenezy może być bardzo gruba egzyzna, uniemożliwiająca dalszy rozwój mikrospory. W bieżącym roku przeprowadzono wstępne badanie dotyczące osłabienia egzyny mikrospor poprzez trawienie enzymatyczne. Wyniki wskazały, że zastosowane mieszaniny enzymatyczne w znacznym stopniu wpłynęły na zwiększenie liczby komórek splazmolizowanych (ok. 50%), w porównaniu z kontrolą (30%). W tym doświadczeniu odnotowano nieliczne podziały komórkowe głównie w kontroli, ale także oraz po zastosowaniu mieszaniny ESPP4 o bogatszym składzie enzymatycznym. Odnotowano bardzo niski odsetek żywotnych mikrospor (poniżej 10%) nie tylko po zastosowaniu badanych mieszanin enzymatycznych, ale również i w kontroli. W dalszej części badania były skoncentrowane na analizie wpływu składu pożywki oraz temperatury na indukcję androgenezy u 2 odmian łubinu. Zastosowano długotrwały szok termiczny (4°C/14 dni). Kontrolą była kultura prowadzona cały czas w stałej temperaturze 26°C. Obserwacje kultury wskazały, że większość mikrospor, niezależnie od zastosowanego szoku termicznego oraz pożywki nie wykazywała zmian morfologicznych nawet do 28 dnia kultury. Literatura z zakresu haploidyzacji roślin jasno wskazuje, że w prawidłowej kulturze, w tym czasie obserwuje się już występowanie wielokomórkowych agregatów, czego w niniejszym doświadczeniu praktycznie nie obserwowano. Odnotowano pojedyncze podziały komórkowe, jednak były one w większości zatrzymane na pierwszej lub drugiej mitozie i nie postępowały dalej. W tym doświadczeniu testowano również wpływ zróżnicowanych pożywek na rozwój mikrospor. W niniejszych badaniach zastosowanie 0,1 μM trichostatyny nie przyniosło pożądanego efektu. Podziały odnotowano najliczniej (0,9%) na pożywce 190/2 w kulturze mikrospor prowadzonej w stałej temperaturze 26°C. Pożywka ta zawierała kinetynę i 2,4-D. Tylko w jednym przypadku, u odmiany Karo prowadzonej na pożywce 190/2 w 26°C, podziały komórkowe były niezahamowane i obserwowano wytworzenie agregatu komórkowego. Analiza żywotności mikrospor potwierdziła

obserwacje z pierwszego doświadczenia, i wykazała bardzo niską żywotność mikrospor w kulturze nieprzekraczającą 14% w pierwszej dobie kultury, a wynoszącą poniżej 7% w siódmej dobie kultury.

Powyższe wyniki wskazują na potrzebę optymalizacji składu mieszaniny pod kątem osmotikum roztworu tak, aby zminimalizować plazmolizę mikrospor oraz zbadanie przyczyny tak niskiej żywotności mikrospor. Potencjalną przyczyną niskiej żywotności może być stres związany z odkażaniem materiału oraz samym procesem izolacji komórek lub specyficzne wymagania co do pożywki, która ma indukować androgenezę w mikrosporach gatunków z rodzaju *Lupinus*. Traktowanie mikrospor niską temperaturą najprawdopodobniej nie wpływa negatywnie na żywotność, gdyż jak pokazały nasze wyniki, spadek ten obserwowano również w nietraktowanej szokiem termicznym kontroli.

W bieżącym roku przeprowadzono również analizę histologiczną tkanki kalusowej uzyskanej z doświadczenia w roku 2018. Wyniki ujawniły różnice na poziomie morfologii komórek oraz elementów wiązek przewodzących między kalusem żywym i zamierającym.

Otrzymane wyniki potwierdzają doniesienia literaturowe, że indukcja androgenezы u łubinu wąskolistnego w kulturach mikrospor jest niezwykle trudna. Problem ten nie dotyczy jednak tylko tego gatunku, ale całej rodziny. Pomimo licznych prób, wyniki wskazują na otrzymanie pojedynczych agregatów lub prozarodków u gatunków z rodziny *Fabaceae*.

Uzyskane RNA z kalusa otrzymanego z mikrospor oraz roślin 'Graf' prowadzonych *in vitro* posłużyło do utworzenia bibliotek, które zostały zsekwencjonowane. Dla każdej biblioteki uzyskano 34 - 35 mln odczytów i 5,2 - 5,3 Gbp odczytanych zasad. Wykonana analiza porównawcza ekspresji pozwoliła na wskazanie 407 genów z istotną statystycznie ( $FDR < 0,01$ ) zmianą ekspresji (2x lub więcej up i down) w tkance kalusa z indukowanych mikrospor oraz w tkance kalusa uzyskanej metodami klasycznymi. W badanym materiale stwierdzono różnicę w ekspresji między badanymi próbkami dla ortologu genu LEC1. Dla kilku kluczowych genów (BBM, LEC2, FUSCA3, ABI3, AS1) z szlaku morfo i embriogenezy nie stwierdzono ekspresji w badanym materiale. Profil ekspresji genów w kalusie z mikrospor i kalusie kontrolnym oceniony na podstawie współczynników korelacji Pearsona był bardzo podobny (wartości powyżej 0.97).

Uzyskane wyniki wskazują, iż konieczne jest dokładniejsze zbadanie w kilku punktach czasowych kalusa uzyskanego z mikrospor jak również kalusa pochodzącego z krzyżowania oddalonego. We wczesnym etapie kalus ten nie wykazuje istotnych różnic w stosunku do kalusa kontrolnego. Możemy zaobserwować w nim ekspresję genów inicjujących organogenezę np. genów STM, ANT, AS1, KAN2 na poziomie zbliżonym do kalusa kontrolnego. W następnym etapie

powinna zostać także zbadana dynamika zmian ekspresji genów związanych z embriogenezą takich genów jak LEC1, BBM, AS1, KAN2 w czasie proliferacji kalusa z mikrospor oraz kalusa powstałego w wyniku krzyżowania oddalonego. Analizy takie powinny pomóc we wskazaniu punktu czasowego, w którym ekspresja zaczyna spadać i mechanizmy komórkowe uruchamiają procesy związane z śmiercią komórkową.