Raport za rok 2018/2019 z projektu NCN 2017/25/B/NZ9/00148 pt. Badanie mechanizmu degeneracji woreczków zalążkowych i aborcji kwiatów jako przyczyny słabego zawiązywania nasion gryki zwyczajnej(*Fagopyrum esculentum* Moench.)

Kierownik projektu: prof. dr hab. Agnieszka Płażek, Katedra Fizjologii Roślin, Wydział Rolniczo-Ekonomiczny

Celem projektu jest zbadanie mechanizmu aborcji kwiatów i zarodków gryki zwyczajnej pod wpływem stresu termicznego lub troficznego.

Temat zadania badawczego:

Analiza zmian proteomicznych w kwiatach w różnych fazach rozwojowych oraz w liściach donorowych pod wpływem stresu termicznego.

Hipoteza badawcza zakładała, że wysoka temperatura wpływa na zmiany w proteomie gryki zwyczajnej, a niektóre zidentyfikowane białka o różnym poziomie akumulacji w warunkach stresowych, będą mogły stanowić markery reakcji tego gatunku na wysoką temperaturę. Badania przeprowadzono na roślinach gryki polskiej odmiany Panda i rodu PA15 w warunkach fitotronowych. Nasiona uzyskano z Zakładu Produkcyjnego w Palikijach (Małopolska Hodowla Roślin Sp. z o.o.). Rośliny uprawiano w doniczkach, w temperaturze 20°C (kontrola), oraz w 30°C (stres cieplny) przy zachowanym 16-godzinnym fotoperiodzie i świetle PPFD (z ang. photosynthetic photon flux density) o natężeniu 200 µmol m⁻² s⁻¹. W okresie kwitnienia pobierano kwiaty w różnych stadiach rozwojowych (pąki, rozwinięte kwiaty i przekwitające kwiaty).

Analizę proteomiczną przeprowadzono z wykorzystaniem kombinacji elektroforezy 2-D DIGE (two-dimensional difference gel electrophoresis) z techniką MALDI-TOF (matrix assisted laser desorption ionisation-time of flight). Ekstrakcja białek i dwukierunkowa elektroforeza żelowa została przeprowadzona według opracowanego protokołu (Klubicova i in. 2011) z wykorzystaniem aparatu IPGPhor3 i Ettan DALT six Unit firmy GEHealthcare. Wybrane białka o różnej ekspresji w badanych obiektach trawiono z żelu wg protokołu Shevchenko i in. (1996). Próbki analizowano z wykorzystaniem spektrometru masowego MALDI-TOF.

Metoda identyfikacji białek:

Białka były identyfikowane dwoma metodami LC-MS/MS oraz PMF w zależności od stężenia białka w wyciętym fragmencie żelu poliakrylamidowego. Przed obiema analizami próbki przygotowywano poprzez ich trypsynizację. Analizę LC-MS/MS wykonano z wykorzystaniem chromatografu Ultimate 300 (kolumna o średnicy wewnętrznej 75 µm, długości 10 cm oraz złożu C18) sprzężonego z spektrometrem masowym Amazon SL firmy Bruker Daltonics (Brema, Niemcy). Analizę PMF wykonano z użyciem spektrometru MALDI-TOF/TOF ultrafleXtreme firmy Bruker Daltonics (Brema, Niemcy).

Zadanie to rozpoczęto w 2018 roku, w którym pobrano próbki z roślin oraz dokonano elektroforezę dwukierunkową. Identyfikacji białek dokonano w roku 2019. Wyniki uzyskane w 2018 roku zostały przedstawione w raporcie z tego projektu za 2018. Poniżej przedstawiono wyniki z identyfikacji białek.

Wyniki

W Tabeli 1. oraz na Fig. 1. Przedstawiono liczbę zidentyfikowanych białek w poszczególnych organach badanych genotypów gryki. Białka te pełnią różne funkcje w komórce: sygnałową, w hydrolizie ATP, w procesach fotosyntezy, syntezy białek, rozkładzie proteolitycznym białek, metabolizmie węglowodanów i azotu, organizacji komórki. Poniżej wymieniono zidentyfikowane białka w poszczególnych kategoriach.

Spis białek skategoryzowanych:

Trandsukcja sygnału:

- 1.V-type proton ATPase catalytic subunit A
- 2.ABC transporter F family member 5
- 3.ABC transporter C family member 2
- 4. Guanosine nucleotide diphosphate dissociation inhibitor

Synteza białek:

- 5.60S ribosomal protein L6-2
- 6.Heat shock cognate 70 kDa protein 2
- 7. Probable mediator of RNA polymerase II transcription subunit 37c

- 8. ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit clpA homolog CD4B
- 9. 40S ribosomal protein S12-2
- 10. 30S ribosomal protein S7, chloroplastic
- 11. Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit
- 12. DEAD-box ATP-dependent RNA helicase 15

Hydroliza ATP:

13. Protein Ycf2

Fotosynteza:

- 14. RuBisCO large subunit-binding protein subunit alpha
- 15. Ribulose bisphosphate carboxylase/oxygenase activase
- 16. Carbonic anhydrase, chloroplastic
- 17. 6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating 1
- 18. Triosephosphate isomerase, chloroplastic

Metabolizm węglowodanów:

- 19. Phosphoglycerate kinase, cytosolic
- 20. Pyruvate, phosphate dikinase regulatory protein 2
- 21. Probable 2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase 2
- 22. Phosphoglycerate kinase, cytosolic
- 23. Fructose-bisphosphate aldolase cytoplasmic isozyme

Proteoliza białek:

- 24. Proteasome subunit alpha type-5
- 25. Proteasome subunit alpha type-1
- 26. 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 4 homolog

Metabolizm azotu:

- 27. Spermidine synthase 1
- 28. Cysteine synthase, chloroplastic/chromoplastic

Organizacja komórki:

- 29. Tubulin alpha-1 chain
- 30. Alpha-1,4-glucan-protein synthase [UDP-forming]
- 31. Actin-depolymerizing factor

Jak wynika z Tabeli 1. pod wpływem stresu termicznego we wszystkich badanych organach więcej białek powstało w roślinach rodu PA15 niż odmiany 'Panda'. Dominowały głównie białka niezidentyfikowane. Najwięcej białek pod wpływem tego stresu wykryto w przekwitniętych kwiatach rodu PA15. W tych kwiatach również w przypadku odmiany 'Panda' stres cieplny zaindukował wzmożoną syntezę białek. Stres ten wpłynął głównie na syntezę białek biorących udział w transdukcji sygnałów, syntezie białek i fotosyntezie.

W pąkach odmiany 'Panda' białka te były zlokalizowane tylko w cytoplazmie, u rodu PA15 w większości w cytoplazmie i w niewielkiej części (13%) w chloroplastach (Fig. 2). W otwartych kwiatach odmiany 'Panda' były to białka tylko cytoplazmatyczne, a u rodu PA15 połowa białek występowała w cytoplazmie, a druga połowa w chloroplastach. W przekwitniętych kwiatach odmiany 'Panda' 20% białek było zlokalizowanych w chloroplastach, reszta w cytoplazmie, a u rodu PA15 22% białek występowało w chloroplastach, 11% w wakuolach, a pozostała część w cytoplazmie. W liściach obu genotypów białka były zlokalizowane tylko w chloroplastach.

Figura 3 przedstawia liczbę tych samych dla obu genotypów białek syntetyzowanych pod wpływem wysokiej temperatury. W przekwitniętych kwiatach wykryto 9 takich samych białek powstałych w stresie termicznym, jednocześnie w tych organach badane genotypy różniły się największą liczbą białek w porównaniu do pąków, otwartych kwiatów i liści.

W Tabeli 2 przedstawiono procent prawidłowo wykształconych woreczków zalążkowych w temperaturze kontrolnej i w stresie termicznym. W przypadku odmiany 'Panda' wysoka temperatura już w pąkach spowodowała istotny spadek prawidłowo rozwiniętych woreczków, a proces degeneracji zwiększył się w otwartych kwiatach. U rodu PA15 wpływ wysokiej temperatury na rozwój zalążków był widoczny dopiero w otwartych kwiatach, zdolnych do zapłodnienia. Wynik ten wskazuje, że odmiana 'Panda' szybciej reaguje na stres termiczny i jest bardziej wrażliwa niż PA15. Z Tabeli 1. wynika, że w pąkach rodu PA15 pod wpływem stresu termicznego powstały dodatkowe białka biorące udział w fotosyntezie (dehydrogenaza 6-fosfoglutaminowa i izomeraza triozofosforanu), metabolizmie cukrów (białko regulatorowe fosfopirogronianu) i rozkładzie białek (podjednostki alfa typu 5 i typu 1 proteosomu). Te białka nie były syntetyzowane w iękoszyhc ilościach pod wpływem stresu termicznego w pąkach odmiany 'Panda'. Ponadto w pąkach PA15 wykryto zdecydowanie

więcej białek niezidentyfikowanych w porównaniu do odmiany 'Panda'. Nie można jednak jednoznacznie stwierdzić, które białka odegrały kluczową rolę w ochronie zalążków rodu PA15 przed wpływem wysokiej temperatury, można jednak przypuszczać, że białka pełniące funkcje w tak istotnych procesach komórki, jak fotosynteza czy przemiana cukrów mogły przyczynić się do ochrony rozwijających się woreczków.

Warto też zwrócić uwagę, że w liściach rodu PA15 zebranych w czasie pełnego kwitnienia powstało istotnie więcej niezidentyfikowanych białek w reakcji na wysoką temperaturę niż w liściach odmiany 'Panda'. Należy też przypomnieć wyniki uzyskane z analiz dotyczących zmian w akumulacji białek szoku cieplnego HSP-70 i HSP-90 w badanych roślinach gryki. Figura 4 przedstawia te zmiany, które wskazują, że w pąkach kwiatowych PA15 powstaje zdecydowanie więcej białka HSP-70 niż w pąkach odmiany 'Panda'. Białko HSP-70 jest niezbędne do zapobiegania agregacji i pomaga w ponownym fałdowaniu nienatywnych białek zarówno w warunkach normalnych, jak i stresowych. Cząsteczki te są często zaangażowane w fałdowanie polipeptydów syntetyzowanych *de novo* i translokację prekursorów białek. Z kolei główną rolą HSP-90 jest zarządzanie fałdowaniem białek. Białko to odgrywa także kluczową rolę w transdukcji sygnału, kontroli cyklu komórkowego i degradacji białka. Tego białka było więcej w pąkach roślin traktowanych wysoką temperaturą niż w kontrolnych roślinach, a także nieznacznie więcej niż w pąkach odmiany 'Panda'.

Tabela 1. Liczba białek pełniących różne funkcje zidentyfikowanych w pąkach, kwiatach otwartych i przekwitniętych oraz lisicach odmiany Panda i rodu PA15 uprawianych w stresie termicznym. Kolorem czerwonym oznaczono numery białek zidentyfikowanych (jak podano powyżej)

		Transdukcja sygnału	Synteza białek	Hydroliza ATP	Fotosyn- teza	Metabolizm Węglowo- danów	Proteoliza białek	Metabolizm azotu	Organizacja komórki	Białka niezidenty- fikowane
Pąki	Panda	2 – 2; 3	1 - 9	1 – 13	0	0	0	0	0	13
	PA15	2 – 2; 3	1 – <mark>12</mark>	1 – 13	2 – 17; 18	1 – 20	2 – 24;26	0	0	26
Kwiaty	Panda	1 - <mark>3</mark>	1 - <mark>10</mark>	0	0	0	0	0	0	11
	PA15	0	1 – 11	0	0	0	0	0	0	20
Przekwitłe kwiaty	Panda	1 – 4	3 – 6;7;8	0	0	1 – 19	0	0	0	23
	PA15	0	0	0	1 – 16	3 – 21;22;23	1 – 25	1 – 27	3 – 29; 30; 31	58
Liście	Panda	0	1 – 5	0	3 - 14;15;16	0	0	0	0	7
	PA15	1-1	0	0	1 – 17	0	0	1 – 28	0	28

Tabela 2. Procent prawidłowo rozwiniętych woreczków zalążkowych w pąkach i w pełni rozwiniętych kwiatach (B) gryki odmiany Panda i rodu PA15 w warunkach stresu termicznego. Gwiazdką zaznaczono istotne różnice pomiędzy średnimi dla temperatury 30°C względem temperatury kontrolnej (20°C) (test chi2).

Organ	P	anda	PA15		
	20°C	30°C	20°C	30°C	
Pąki	100	57,7*	83,3	79,5	
Kwiaty otwarte	88,2	44,4*	77,8	26,7*	
Kwiaty przekwitnięte	83,3	80,0	81,3	78,9	



Fig. 1. Udział białek uczestniczących w odpowiedzi gryki na stres wysokiej temperatury oraz klasyfikacja według ich funkcji

Fig. 2. Klasyfikacja białek uczestniczących w odpowiedzi gryki na stres wysokiej temperatury według ich lokalizacji w komórce



Fig. 3. Diagramy Venna ilustrujące liczbę białek gryki różnych oraz wspólnych dla odmiany Panda i linii hodowlanej PA15 uczestniczących w odpowiedzi roślin na stres wysokiej temperatury.



Fig. 4. Zmiany w akumulacji HSP-70 i HSP-90 w pąkach kwiatowych (FB), kwiatach otwartych (OF), przekwitniętych kwiatach (WF) i liściach donorowych (DL) roślin PA15 i "Panda" uprawianych w temperaturze 20 ° C (kontrola) i 30 ° C (stres termiczny).

