

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

1. Najważniejsze osiągnięcia projektu

Stres termiczny

- Wysoka temperatura nie obniża żywotności ziaren pyłku odmiany Panda, natomiast nieznacznie zmniejsza żywotność mikrosporodu PA15. W warunkach kontrolnych (20°C) żywotność pyłku odmiany Panda jest istotnie mniejsza od PA15.
- Proces megasporofitogenezy i megagametogenezy jest zdecydowanie bardziej wrażliwy na wpływ wysokiej temperatury. W pąkach kwiatowych rozwój woreczków zalążkowych przebiega prawidłowo w 100% w obu temperaturach, jedynie w przypadku odmiany Panda w 30°C obserwuje się tylko 45% dobrze rozwiniętych zalążków. Gwałtowny wzrost przypadków degeneracji woreczków u badanej odmiany irodu pod wpływem stresu termicznego (50% w stosunku do kontrolnej temperatury) notuje się w pełni rozwiniętych kwiatach. Nieprawidłowości w tym rozwoju, polegające głównie na przeroście komórek i wadliwej wakuolizacji związane są ze wzrostem poziomu aktywnych form gibereliny oraz cytokinin. W kwiatach przekwitniętych prawie 100% woreczków ulega obumarciu. Odmiana Panda jest bardziej wrażliwa na stres termiczny od PA15.
- Profil hormonalny przebiega specyficznie w zależności od temperatury i dla badanego organu (pąk, kwiat w pełni rozwinięty i przekwitnięty, liść donorowy).
- Białko szoku cieplnego Hsp-70 pod wpływem stresu termicznego akumuluje się w istotnie większych ilościach w pąkach i kwiatach roślin odmiany Panda niż PA15.
- W 30°C drastycznie zwiększa się zawartość białka ogólnego w kwiatach dobrze rozwiniętych i przekwitniętych oraz liściach odmiany Panda. Pod względem zmian w zawartości białka, rośliny PA15 są dużo mniej wrażliwe na wpływ wysokiej temperatury.
- Dodatkowym wynikiem uzyskanym jest stwierdzenie, że wszystkie analizowane parametry kinetyki fluorescencji chlorofilu a były wyższe w temperaturze 30°C niż w 20°C, co by wyraźnie wskazywało na to, że rośliny gryki lepiej rozwijają się w wyższej temperaturze. Wynik ten wskazuje, że wyższa temperatura sprzyja rozwojowi wegetatywnemu gryki, ale obniża procent prawidłowo wykształconych woreczków zalążkowych.

Stres troficzny

- Najwięcej degenerujących woreczków zalążkowych w warunkach kultur słupków w warunkach *in vitro* obserwuje się na pożywce zawierającej tylko 1/3 składników odżywczych w porównaniu do pożywki kontrolnej o pełnym składzie. Większy procent degeneracji w tych warunkach występuje u PA15 niż u odmiany Panda.
- Ród PA15 jest bardziej wrażliwy na stres troficzny od odmiany Panda.

2. Krótki opis wyników

1. Badanie stresu termicznego na proces embriogenezy u odmiany Panda irodu PA15 gryki zwyczajnej

- Ocena przebiegu mikro- i megasporogenezy oraz mikro- i megagametofitogenezy w dwóch temperaturach: 20°C i 28°C

W czasie prowadzenia doświadczenia zdecydowano się na zwiększenie temperatury stresu termicznego do 30°C. Z danych przedstawionych w Tabeli 1a. wynika, że wysoka temperatura nie obniżyła żywotności ziaren pyłku odmiany Panda, natomiast nieznacznie zmniejszyła żywotność mikrosporodu PA15 (Fot.1). Spadek ten nie był jednak statystycznie istotny. Warto natomiast podkreślić, że w warunkach kontrolnych (20°C) żywotność pyłku odmiany Panda była istotnie mniejsza od PA15.

Tabela 1. Procent żywotnych ziaren pyłku (A) oraz procent prawidłowo rozwiniętych woreczków zalążków w pąkach i w pełni rozwiniętych kwiatach (B) gryki odmiany Panda irodu PA15 w warunkach stresu termicznego. Gwiazdką zaznaczono istotne różnice pomiędzy średnimi dla temperatury 30°C względem temperatury kontrolnej (20°C) (test χ^2).

A

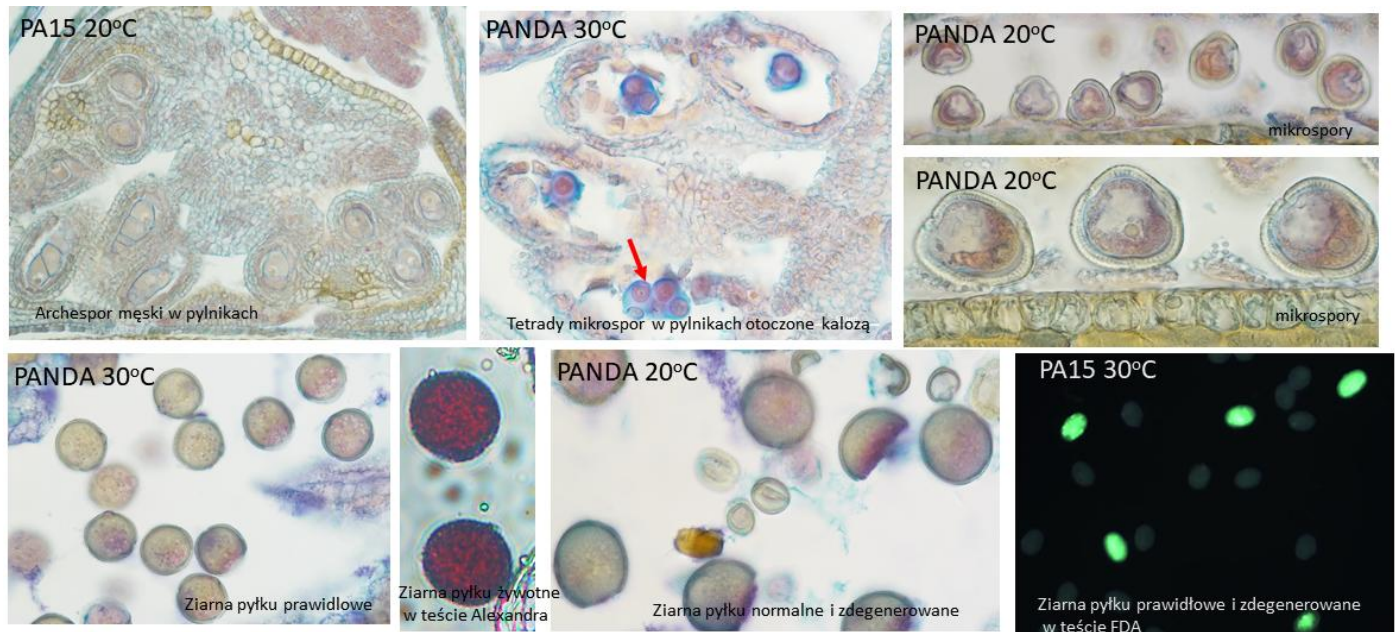
Odmiana/ród	20°C	30°C
Panda	82,2	89,5
PA15	96,3	90,4

B

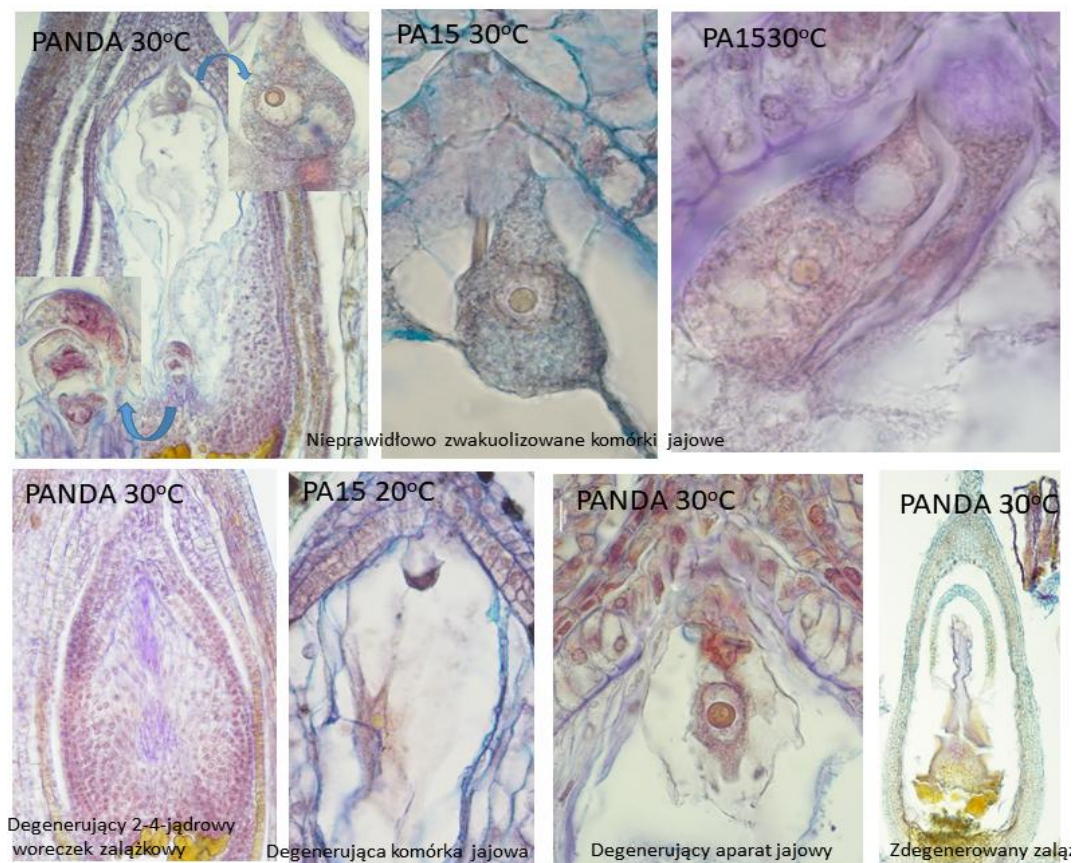
Odmiana	Pąki		Kwiaty rozwinięte	
	20°C	30°C	20°C	30°C
Panda	100	45,5*	88,2	44,4*
PA15	100	100	77,8	28,5*

Proces megasporofitogenezy i megagametogenezy był zdecydowanie bardziej wrażliwy na wpływ wysokiej temperatury w porównaniu do mikrosporofitogenezy i mikrogametogenezy (Tabela 1B).

Fot. 1. Prawidłowo wykształcone i zdegenerowane ziarna pyłku gryki w kwiatkach roślin rosnących w 20°C i 30°C (Fot. A. Słomka)



Fot. 2. Zdegenerowane zalążki gryki w temperaturze kontrolnej i w stresie termicznym (fot. A. Słomka)



W wyższej temperaturze w pełni rozwiniętych kwiatach obserwowano istotnie mniej prawidłowo wykształconych woreczków zalążkowych niż w temperaturze kontrolnej. U odmiany Panda obserwowano dwa razy mniej prawidłowo wykształconych zalążków, a u PA15 2,7 razy mniej. Zaburzenia te polegały na rozroście komórek integumentów, wadliwej wakuolizacji komórek jajowych, zapadanie się światła woreczka zalążkowego czy braku synergid (Fot. 2). W przypadku odmiany Panda w 30°C proces silnego rozrostu komórek woreczka zalążkowego można łączyć z istotnym wzrostem poziomu aktywnych giberelin, cytokinin i estru metyloвого kwasu jasmonowego. W kwiatach w pełni rozwiniętych u roślin Pandy uprawianych w 30 °C obserwowano istotny wzrost poziomu wolnego kwasu abscysynowego, natomiast w takich samych kwiatach rodu PA15 następowało obniżenie zawartości tego hormonu. Należy tu zaznaczyć sygnalną rolę ABA w starzeniu się różnych organów, w tym także kwiatów.

W pąkach kwiatowych jedynie u odmiany Panda pod wpływem wysokiej temperatury występowały zaburzenia w rozwoju zalążków. Jak można zauważyć, sygnał ABA występuje w jeszcze w młodych, ale w pełni rozwiniętych kwiatach, które są zdolne do zapłodnienia tylko przez jeden dzień. W kwiatach przekwitniętych poziom ABA istotnie spada.

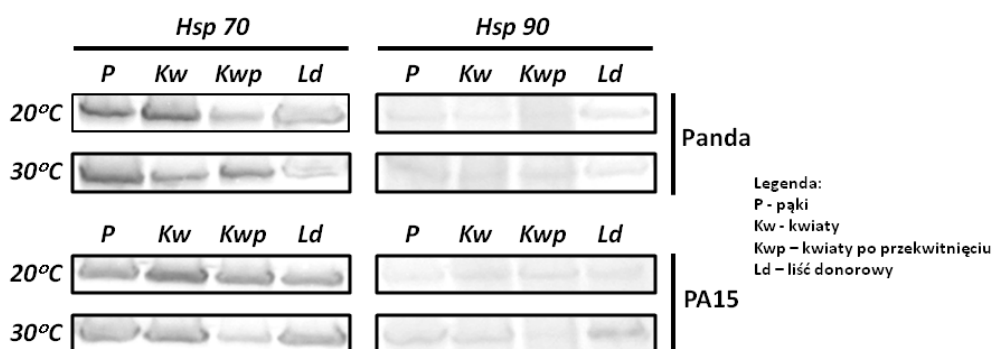
b. Określenie profilu hormonalnego w różnych fazach rozwojowych kwiatów oraz liści donorowych (leżących najbliżej badanych kwiatów).

Poziom poszczególnych hormonów zależał głównie od odmiany oraz organu. Najmniejsza ilość cytokinin występowała w liściach w porównaniu do pąków, dobrze rozwiniętych i przekwitniętych kwiatów. Aktywne formy gibereliny (GAs) i nieaktywna GA₈ występowały głównie w dobrze rozwiniętych i przekwitniętych kwiatach. Najwyższy poziom auksyny kwasu indolilo-3-octowego (IAA) wykryto w przekwitniętych kwiatach, a najniższy w liściach. Większe ilości kwasu abscysynowego stwierdzono w dobrze rozwiniętych kwiatach w porównaniu do innych organów. Z kolei największą ilość estru glukozylowego kwasu abscysynowego (ABA) stwierdzono w liściach. Wszystkie stadia rozwojowe kwiatów wykazywały wyższy poziom kwasu salicylowego (SA) niż w liściach, w przeciwieństwie do kwasu jasmonowego i metyloвого estru tego kwasu (JA i JA-Met), których najwyższą zawartość oznaczono właśnie w liściach. Stres termiczny zwiększył istotnie zawartość cytokinin w kwiatach dobrze rozwiniętych i przekwitniętych odmiany Panda, poziom IAA w przekwitniętych kwiatach PA15 oraz zawartość aktywnych i nieaktywnych giberelin w kwiatach odmiany Panda. W temperaturze 30 °C stwierdzono z kolei obniżenie zawartości kwasu abscysynowego w kwiatach PA15 oraz JA w pąkach wszystkich roślin. Pod wpływem wysokiej temperatury zwiększyła się zawartość metylowej formy JA w pąkach i kwiatach odmiany Panda. Zawartość SA nie ulegała zmianie pod wpływem stresu termicznego. Stosunek ilościowy GAs/ABA jest dużo wyższy w 30°C niż w 20°C we wszystkich badanych organach. Stosunek IAA/CYT i IAA/ABA w pąkach w 30°C jest dużo wyższy niż w 20°C, odwrotnie niż w kwiatach.

c. Oznaczenie białek szoku cieplnego HSP-70 i HSP-90 w kwiatach w różnych fazach rozwojowych

Analiza poziomu białek metodą Western blot wykazała wzrost akumulacji białka Hsp-70 w porównaniu do Hsp90 (Rys.1). Dotyczyło to wszystkich badanych organów, zarówno odmiany Panda, jak i rodu PA15. W przypadku odmiany Panda wyraźny wzrost poziomu białka Hsp-70 pod wpływem stresu termicznego zanotowano w pąkach i kwiatach przekwitniętych w stosunku do roślin kontrolnych, natomiast poziom tego białka był wyższy w kwiatach otwartych w 20°C. W liściu donorowym tej odmiany poziom Hsp-70 był niższy w 30°C niż w kontroli. U PA15 wyraźnie wyższy poziom Hsp-70 zaobserwowano w kwiatach otwartych i przekwitniętych w 20°C. W pąkach i liściach donorowych zawartość tego białka była większa w 30°C. Największą zawartość białka Hsp-90 zanotowano u odmiany PA15 w liściach donorowych w temperaturze 30°C. Była ona jednocześnie wyraźnie wyższa w porównaniu do poziomu obserwowanego w liściach roślin kontrolnych tego rodu, a także w odniesieniu do liści donorowych odmiany Panda z obu badanych temperatur. W przypadku odmiany Panda stres termiczny nie wpłynął na zawartość białka Hsp-90 we wszystkich badanych organach.

Rys.1. Zmiany w zawartości białka Hsp-7- i Hsp-90 w poszczególnych organach roślin odmiany Panda i rodu PA15 pod wpływem stresu termicznego.



d. *Analiza zmian proteomicznych w kwiatach w różnych fazach rozwojowych oraz w liściach donorowych.*

Zmiany te zostały wykryte metodą elektroforezy dwukierunkowej. Poniżej przedstawiono przykładowe żele dla każdego z badanych organów w 20°C i 30°C i dla badanej odmiany i rodu. W Tabeli 2. przedstawiono ogólną zawartość białka w przeliczeniu 1 g tkanki.

Tabela 2. Zawartość białka [$\mu\text{g g}^{-1}$ suchej masy] w pąkach, kwiatach w pełni rozwiniętych i przekwitniętych oraz liściach odmiany Panda i rodu PA15 gryki zwyczajnej w temperaturze kontrolnej (20°C) oraz pod wpływem stresu termicznego (30°C). Gwiazdkami zaznaczono dla każdego organu odmiany i rodu istotne różnice pomiędzy wartościami uzyskanymi w 30°C w stosunku do kontroli (20°C): * - $p < 0,05$; ** - $p < 0,01$; *** - $p < 0,001$ (test Studenta).

Odmiana	Pąk		Kwiat rozwinięty		Kwiat przekwitnięty		Liść	
	20°C	30°C	20°C	30°C	20°C	30°C	20°C	30°C
Panda	2890	2193*	2124	3576***	873	2646***	414	2809***
PA15	2557	2689	1768	1831	2252	1587**	1682	1918*

Wysoka temperatura istotnie zwiększyła zawartość białka ogólnego w kwiatach rozwiniętych (1,68 razy) i przekwitłych (trzykrotnie) oraz liściach (prawie siedmiokrotnie) odmiany Panda, a w pąkach kwiatowych zmniejszyła (1,3 razy). Ród PA15 zdecydowanie był mniej wrażliwy na stres termiczny pod względem zawartości białka ogólnego. Wysoka temperatura zmniejszyła zawartość białka 1,4 razy w kwiatach przekwitniętych i zwiększyła jego zawartość niewiele razy więcej w liściach. W pąkach i kwiatach dobrze rozwiniętych tego rodu obserwowano nieistotny wzrost zawartości białka. Zawartość białka ogólnego wzrosła w stresie termicznym we wszystkich badanych organach odmiany Panda, a największy wzrost notowano w kwiatach przekwitłych i liściach. Rośliny rodu PA15 były mniej wrażliwe na wysoką temperaturę, która w kwiatach przekwitłych obniżyła wręcz zawartość białka, a zwiększenie jego zawartości obserwowano jedynie w liściach. Porównanie zmian w proteomie badanych organów wykonywano pomiędzy roślinami rosnącymi w 30°C i w 20°C dla każdego genotypu oddzielnie (Rys.2). Do identyfikacji wytypowano z żeli poliakrylamidowych 200 białek, które akumulowały się co najmniej dwukrotnie mniejszym lub większym stopniu u roślin rosnących w wyższej temperaturze w stosunku do rosnących w warunkach kontrolnych. Analiza jakościowa białek została zlecona Instytutowi Farmakologii PAN w Krakowie, a wyniki tej analizy mają być podane w najbliższym czasie.

Tabela 3. Całkowita liczba zidentyfikowanych białek oraz liczba białek różnicujących proteomy badanych organów dwóch genotypów gryki zwyczajnej rosnących w 20°C i 30°C, zobrazowanych na mapach białkowych.

Organ	odmiana Panda		ród PA15		liczba białek różnicujących występujących u obu genotypów
	liczba białek	liczba białek różnicujących	liczba białek	liczba białek różnicujących	
Pąk kwiatowy	1189	16	1159	34	4
Kwiat	900	13	977	21	1
Przekwitnięty kwiat	1117	28	1097	64	10
Liść	701	11	826	21	1

Doświadczenie 2.

2. Wpływ warunków troficznych na przebieg megasporogenezy i megagametofitogenezy w izolowanych słupkach gryki odmiany Panda i rodu PA15 w warunkach *in vitro*.

Zielone pąki kwiatowe pobierano z roślin uprawianych w 20°C i wykładano na pożywki agarowe zawierające niezbędne elementy dla prawidłowego przebiegu procesów embriologicznych. Stres troficzny polegał na hodowli pąków na pożywkach agarowych zawierających połowę lub 1/3 składu pożywek kontrolnych, z wyjątkiem hormonów, których skład był w danym wariancie taki sam.

Pożywka 1. (Kontrola). Bazowa pożywka wyjściowa: $\frac{1}{2}$ MS (Murashige i Skoog 1962) + 3% sacharozy + 1mg/l BA + 0.1 mg/l NAA. Pożywka 1A – zawierała połowę składników odżywczych pożywki 1. 1B – 1/3 składników odżywczych pożywki 1.

