



## Komórkowe aspekty regeneracji w kulturach protoplastów łubinu żółtego (*Lupinus luteus* L.)

Alina Wiszniewska, Anna Pindel

Katedra Botaniki i Fizjologii Roślin, Wydział Ogrodniczy,  
Uniwersytet Rolniczy, Kraków

### Cellular aspects of regeneration in protoplast culture of yellow lupin (*Lupinus luteus* L.)

#### Summary

Yellow lupin (*Lupinus luteus*), like many other *Fabaceae* species, exhibits strong recalcitrance to *in vitro* conditions of protoplast culture, where regeneration capacity is extremely limited, and only incipient mitoses are observed. In case of the restricted morphogenetic potential of yellow lupin protoplasts, special attention should be paid to the cellular mechanisms that control gaining of totipotency in culture. These are especially: the structure and functioning of new cell wall, elements of cytoskeleton, as well as some cell components of signaling properties. Detailed investigation on these structures and their behaviour in culture conditions may contribute to the understanding and bypassing of the recalcitrance problem in yellow lupin.

#### Key words:

yellow lupin, protoplasts, cell wall regeneration, cytoskeleton, arabinogalactan proteins.

#### Adres do korespondencji

Alina Wiszniewska,  
Katedra Botaniki  
i Fizjologii Roślin,  
Wydział Ogrodniczy,  
Uniwersytet Rolniczy,  
Al. 29 Listopada 54,  
31-425 Kraków;  
e-mail:  
a.wiszniewska@ogr.ur.kra-  
kow.pl

### 1. Wstęp

Warunki regeneracji roślin w kulturach izolowanych protoplastów zostały opisane dla wielu gatunków, szczegółowego przeglądu dokonali ostatnio Davey i wsp. (1). Łubin żółty, podobnie jak wiele roślin z rodziny *Fabaceae*, reaguje na stresowe warunki kultury protoplastów silnie obniżoną zdolnością regeneracyjną (2). Do tej pory nie udało się uzyskać z protoplastów

tęgo gatunku materiału do regeneracji w warunkach *in vitro* roślin, ani nawet ich organów, chociaż notuje się pewien postęp (3). Prowadzone badania mają na celu przełamanie istniejących barier i wywołanie pełnej odpowiedzi morfogenetycznej. W sytuacji ograniczonego potencjału regeneracyjnego, szczególną uwagę należy zwrócić na komórkowe aspekty nabywania zdolności podziałowej przez protoplasty, takie jak odbudowa ściany komórkowej, organizacja cytoszkieletu czy też rola pewnych składników komórkowych, pełniących funkcje sygnałne. Określenie sekwencji zachodzących procesów i ich ewentualnych zaburzeń może przyczynić się do zrozumienia problemu nadwrażliwości protoplastów łubinu i podwyższenia ich aktywności morfogenetycznej.

## 2. Ściana komórkowa

W pierwszych badaniach nad kulturami protoplastów Nagata i Takebe (4) udowodnili, że podziały są uwarunkowane uprzednią odbudową ściany komórkowej. Później stwierdzano wielokrotnie, że mitozę zachodzi tylko po prawidłowym odtworzeniu struktur ściany (5), dlatego też niska częstotliwość podziałów protoplastów łubinu żółtego może być wynikiem zaburzeń w tym procesie. Pojawianie się składników ściany na powierzchni błony komórkowej protoplastu jest u niektórych gatunków obserwowane już w ciągu kilku godzin od zawieszenia w pożywce, a po 2-4 dniach kultura staje się zawieszoną komórek (6). U protoplastów hypokotylowych łubinu żółtego po 4 dniach kultury tylko u ok. 30% stwierdzono obecność fragmentów ściany komórkowej, w postaci pojedynczych włókien celulozy. W kolejnych dniach układ fibryl celulozowych był nieregularny i chaotyczny. Z kolei szybsze tempo odtwarzania ściany przez protoplasty liścieniowe wiązało się z powstawaniem na powierzchni protoplastów rozległych obszarów bez celulozy, widocznych w postaci okrągłych luk. W optymalnych warunkach, gdy ściana odbudowywana była wolniej, pasma celulozy układały się w pierścienie obejmujące cały protoplast. U protoplastów uzyskanych z mezofilu liści naprzemiennie występowały obszary o stosunkowo grubym i cieńszym pokładzie celulozy (badania własne). W świetle najnowszych badań brak wydajnych cytokinez u protoplastów łubinu żółtego można uznać za konsekwencję nieprawidłowości w regeneracji ściany. Uważa się, że przegroda komórkowa powstająca po podziale nie jest budowana tylko z nowo syntetyzowanych składników, ale ich część jest wycofywana z już istniejącej ściany i transportowana do nowo powstającej (7). Interesujący jest również fakt, że odtwarzanie ściany przez protoplasty uzyskane z różnych eksplantatów łubinu żółtego zachodzi według odmiennych wzorów. Jest to znacząca informacja, ponieważ prócz zmian składu chemicznego ściany, także zmiany jej architektury stanowią integralną część procesu różnicowania i oba czynniki odpowiadają za procesy morfogenetyczne w trakcie rozwoju roślin (8). Na obecnym etapie badań trudno określić przyczynę zaburzeń procesu regeneracji nowej ściany komórkowej u łubinu żółtego. Uważa

się, że poznanie składu ściany, poprzez badania antygenów jej składników, może przyczynić się do zrozumienia tego problemu. Potwierdzają to badania na protoplastach buraka, gdzie wykazano, że profil antygenów ścian odgrywa istotną rolę we wrażliwości protoplastów w kulturze (8). Jednakże sposób ułożenia mikrofibryl celulozy w regenerowanej ścianie jest ściśle kontrolowany i uwarunkowany układem elementów szkieletu komórkowego. Seagull i wsp. (9) zasugerowali, że filamenty aktynowe mogą brać udział w tworzeniu rusztowania z mikrotubul. Dzięki tej strukturze kompleks syntetyzujący włókna celulozy odkłada ją w sposób uorganizowany. Zaburzenia funkcjonowania cytoszkieletu wywołane stresem izolacji mogą zatem skutkować nieprawidłowościami w tym pierwszym stadium regeneracji protoplastów łubinu żółtego, jakim jest resynteza ściany komórkowej. Poszukując wyjaśnienia problemu nadwrażliwości na warunki kultury protoplastów u tego gatunku warto przyjrzeć się bliżej układowi ściana komórkowa-cytoszkielet.

### 3. Szkielet komórkowy

W trakcie morfogenezy roślin plan podziału komórek musi być ściśle kontrolowany. Za jego prawidłową realizację podczas mitozy odpowiada cytoszkielet, zbudowany z mikrotubul i filamentów aktynowych (10). Oba składniki biorą udział w czynnym pozycjonowaniu organelli dzielącej się komórki, przy czym filamenty aktyny odpowiadają za rozdział organelli, natomiast mikrotubule za umiejscowienie przegrody międzykomórkowej, przez co również wpływają na kształt komórek potomnych. W naszym laboratorium przeprowadzono wstępne badania nad immunolokalizacją białek tubulinowych w protoplastach łubinu żółtego. Metodę znakowania przystosowano do szczególnych warunków, które muszą być zapewnione, aby prowadzić obserwacje na tych delikatnych i labilnych obiektach. Bezpośrednio po izolacji mikrotubule tworzyły sieć, obejmującą proporcjonalnie cały protoplast. Układ sieci był najlepiej widoczny u protoplastów hypokotylowych. W rejonach peryferyjnych protoplastów obserwowano większe skupiska tubuliny, co może świadczyć o zachodzącej w tych miejscach odbudowie ściany. Wiele składników do syntezy ściany jest transportowanych przez pęcherzyki Golgiego, a mikrotubule są w komórce odpowiedzialne za ukierunkowanie ich ruchu (7). Obecność mikrotubul jest zatem niezbędna do odtworzenia ściany komórkowej i zajścia podziałów protoplastu (11). Zmiany organizacji cytoszkieletu tubulinowego w początkowych stadiach kultury protoplastów *Solanum lycopersicoides* pozwoliły na wyznaczenie pewnych wzorów, związanych z konkretnymi stadiami rozwojowymi protoplastów (11). Stwierdzono, że zmiany w strukturze systemu mikrotubularnego wywołane są samym procesem izolacji protoplastów. Układ mikrotubul z uporządkowanego przechodzi wtedy w chaotyczną sieć. Najprawdopodobniej związane jest to z usunięciem ściany komórkowej oraz reorganizacją struktur jądra komórkowego. W kulturach protoplastów tytoniu dowiedziono, że zarówno mikrotubule jak i filamenty ak-

tynowe, ułożone „przypadkowo” w sferycznych komórkach, ulegają reorganizacji podczas wydłużania się komórki. Tworzą wtedy zespoły pierścieni, ustawionych prostopadle do dłuższej osi komórki (12). U lucerny stwierdzono, że występowanie delikatnych, rozgałęziających się i bezładnie ułożonych mikrotubul wiązało się z asymetrycznym podziałem powstałej z protoplastu komórki, natomiast podział symetryczny zachodził, wówczas gdy grube wiązki mikrotubul ułożone były równolegle (13). Poznany jest również prawidłowy układ sieci elementów cytoszkieletu w dzielących się komórkach *in vivo* (14). Ze względu na ogromną rolę tej struktury komórkowej w procesach, które z trudnością są wywoływane u łubinu żółtego: cytokineza, tworzenie mikrokolonii, określenie wzorów układu cytoszkieletu i skorelowanie ich ze stadiami nabywania zdolności podziałowej jest uzasadnione. Potwierdzili to także Sinha i Caligari (15), którzy jako jeden z dalszych kierunków badań nad protoplastami łubinu białego wyznaczili przeprowadzenie oceny funkcjonowania cytoszkieletu.

#### 4. Rola białek arabinogalaktanowych

Po odtworzeniu ściany komórkowej, u protoplastów łubinu żółtego podjęto próby lokalizacji białek arabinogalaktanowych (AGP, ang. *arabinogalactan proteins*), będących jednym z jej komponentów. Łańcuch węglowodanowy stanowi ponad 90% masy całej cząsteczki, dlatego też czasem zalicza się je do proteoglikanów. AGP występują praktycznie w każdej komórce wszystkich gatunków roślin, od mszaków do okrytozalążkowych (16). Białka te są zlokalizowane w błonie komórkowej i jednocześnie zakotwiczone w ścianie, łącząc je, a ich zmieniająca się struktura może stanowić znacznik tożsamości komórki lub sygnał dla komórek sąsiadujących. U łubinu żółtego białka AGP wykryto tylko u około 40% protoplastów liściennych (badania własne). W pracach na innych gatunkach wykazano, że unieczynnienie AGP glukozylową pochodną (tzw. odczynnikiem Yariva) wywołuje zahamowanie podziałów lub powiększania się komórek, czasem prowadząc nawet do ich obumarcia (17). W innych badaniach dowiedziono, że pewne białka AGP, obecne w ścianach oznaczają, że komórka wchodzi na drogę programowanej śmierci (18). W świetle tych badań można uznać, że protoplasty łubinu, zawierające AGP, stopniowo obumierały, a te, u których białek tych nie wykryto, rozwijały się normalnie. Jednakże uważa się, że białka arabinogalaktanowe stymulują wiele procesów różnicowania się komórek. Potwierdzono to w badaniach na protoplastach buraka (19) i w kulturach mikrospor pszenicy (20). U buraka udowodniono udział białek AGP w odtwarzaniu ściany komórkowej przez nieembriogeniczne komórki oraz ich rolę we właściwym łączeniu składników nowej ściany (19). Zaangażowanie AGP w proces regeneracji kulturowanych protoplastów udowodniono również u wątrobowca *Marchantia polymorpha* (21). U tego gatunku żywotność protoplastów była podwyższona, jeśli na początku kultury, w fazie odbudowy ściany komórkowej, AGP połączono z odczynnikiem

Yariva, blokując w ten sposób aktywność pewnych typów tych białek podczas łączenia się składników nowo powstającej ściany komórkowej. Autorzy na podstawie tych wyników zasugerowali, że obniżenie zawartości lub całkowity brak  $\beta$ -1,3-glukanów może zapobiegać obumieraniu protoplastów na drodze apoptozy. Wielość możliwych kierunków oddziaływania AGP na kultywowane komórki roślinne skłania do podjęcia szerszych badań z tego zakresu u łubinu żółtego.

## 5. Podsumowanie

Przedstawione kierunki badań nad komórkowymi aspektami nabywania totipotencji przez protoplasty łubinu żółtego są nowatorskie u tego gatunku i wdrażane obecnie w naszym laboratorium. Identyfikacja sekwencji, zmian czy zaburzeń w budowie i funkcji składników komórki na etapie odtwarzania struktury i zadań pełnej komórki może dać solidne podstawy do ich eliminacji, zapewnienia ciągłości podziałów i regeneracji roślin w kulturach protoplastów łubinu, a także innych gatunków nadwrażliwych na warunki *in vitro*.

## Literatura

1. Davey M. R., Anthony P., Power J. B., Lowe K. C., (2005a), *Biotech. Adv.*, 23, 131-171.
2. Babaoglu M., (2000), *Turk. J. Bot.*, 24, 177-185.
3. Wiszniewska A., Pindel A., (2009), *Austr. J. Bot.*, 57, 502-511.
4. Nagata T., Takebe I., (1970), *Planta*, 92, 301-308.
5. Tylicki A., Burza W., Malepszy S., Kuraś M., (2001), *Biol. Biull., Poznań*, 38, 97-101.
6. Davey M. R., Anthony P., Power J. B., Lowe K. C., (2005b), *Acta Physiol. Plant.*, 27, 117-129.
7. Wojtaszek P., Hejnowicz Z., (2007), *Biologia komórki roślinnej, II. Funkcja*, red. Wojtaszek P., Woźny A., Ratajczak L., 392-437, Wyd. Nauk. PWN, Warszawa.
8. Majewska-Sawka A., Münster A., (2003), *Plant Cell Rep.*, 21, 946-954.
9. Seagull R. W., Falconer M. M., Weerdenburg C. A., (1987), *J. Cell Biol.*, 104, 995-1004.
10. Kost B., Mathur J., Chua N-H., (1999), *Curr. Opin. Plant Biol.*, 2, 462-470.
11. Tylicki A., Burza W., Malepszy S., Kuraś M., (2003), *Plant Cell Rep.*, 22, 312-319.
12. Vissenberg K., Quelo A-H., van Gestel K., Olyslaegers G., Verbelen J-P., (2000), *Cell Biol. Int.*, 24, 343-349.
13. Meijer E. G. M., Simmonds D. H., (1988), *Physiol. Plant.*, 72, 511-517.
14. Wasteneys G. O., (2002), *J. Cell Sci.*, 115, 1345-1354.
15. Sinha A., Caligari P. D. S., (2005), *Ann. Appl. Biol.*, 146, 441-448.
16. Majewska-Sawka A., Nothnagel E. A., (2000), *Plant Physiol.*, 122, 3-9.
17. Nothnagel E. A., (1997), *Int. Rev. Cytol.*, 174, 195-291.
18. Gao M., Showalter A. M., (1999), *Plant J.*, 19, 321-332.
19. Wiśniewska E., Majewska-Sawka A., (2007), *Plant Cell Rep.*, 26, 1457-1467.
20. Letarte J., Simion E., Miner M., Kasha K., (2006), *Plant Cell Rep.*, 24, 691-698.
21. Shibaya T., Sugawara Y., (2007), *Physiol. Plant.*, 130, 271-279.