



Wykorzystanie tkanki kalusowej w badaniach nad molekularnymi podstawami fotoperiodycznej indukcji kwitnienia

Iwona Szyp¹, Grażyna Dąbrowska², Andrzej Tretyn¹

¹Zakład Fizjologii i Morfogenezy Roślin, Uniwersytet Mikołaja Kopernika, Toruń

²Pracownia Genetyki, Uniwersytet Mikołaja Kopernika, Toruń

Application of callus tissue in the studies on molecular mechanism of flower induction

Summary

Flowering is a crucial turning point in the life cycle of most plants. The process of flowering is controlled by external factors such as light and temperature. Floral induction is the first step in the transition from the vegetative to reproductive stage of development. In the photoperiodically sensitive plants this process is regulated by the duration of light and darkness during a 24-h cycle. The aim of our study was to determine whether the undifferentiated callus tissue obtained from cotyledons, is suitable for molecular investigations on the mechanisms of flower induction. The callus tissue was obtained from cotyledons of *Pharbitis nil* plants, which were cultivated in inductive or non-inductive conditions. The callus obtained after two subcultures was used for isolation of RNA. The total RNA was extracted as described by Chomczynski (1993). We have examined the changes in the pattern of RNA in these two types of callus, using the technique of differential display by the polymerase chain reaction (PCR). Differential display is a method for the identification and cloning of differentially expressed eucaryotic genes.

We have found the differences between patterns of RNA derived from callus tissue cultivated under non-inductive conditions and callus tissue cultivated under inductive conditions. In conclusion we can suggest that the tested callus preserved the information on the photoperiodic induction in cells. The process of undifferentiation did not result in the loss of the properties acquired by cotyledon tissue during the photoperiodic treatment.

Adres do korespondencji

Iwona Szyp,
Zakład Fizjologii
i Morfogenezy Roślin,
Uniwersytet Mikołaja
Kopernika,
ul. Gagarina 9,
87-100 Toruń.

biotechnologia

2 (53) 165–169 2001

Key words:

differential display, flowering, PCR, *Pharbitis nil*.

1. Wstęp

Kwitnienie roślin jest jednym z najbardziej istotnych procesów fizjologicznych zapewniających ciągłość życia i decydującym o przetrwaniu danego gatunku. Zjawisko to jest kontrolowane przez czynniki środowiskowe: temperaturę i światło. Jedną z modelowych i najczęściej badanych roślin krótkodniowych jest *Pharbitis nil*. Fotoperiodyczna indukcja kwitnienia polega na percepcji przez roślinę właściwego dla niej fotoperiodu, co w konsekwencji powoduje uruchomienie łańcucha reakcji metabolicznych prowadzących do morfogenezy kwiatu. Organami percepcji bodźca świetlnego są liście bądź liścienie, w których powstaje określony impuls zwany „induktorem kwitnienia” (1). Do tej pory nie ustalono jeszcze chemicznej natury tej substancji. Prawdopodobnie ilości domniemanego bodźca kwitnienia w roślinach są zbyt małe, by można było dokonać jego dokładnej analizy i izolacji. Ponadto przypuszcza się, że ich synteza zachodzi na terenie niewielkiej liczby wyspecjalizowanych komórek. Dlatego dalszym krokiem w badaniach powinno być zastosowanie metod biotechnologicznych. Jednym z najwłaściwszych systemów doświadczalnych, który umożliwiłby uzyskanie wystarczających ilości poszukiwanych związków jest, jak się wydaje, kultura zawieszinowa, uzyskana z organów uczestniczących w odbiorze bodźców świetlnych.

Celem prowadzonych doświadczeń było sprawdzenie czy odróżnicowane kultury tkanek uzyskanych z liścieni (kalus), mogą być wykorzystywane w badaniach nad mechanizmem indukcji kwitnienia. Zastosowano technikę różnicowego namnażania – różnicowej amplifikacji (*differential display* – DD PCR), która pozwala na porównanie RNA pochodzącego z tkanek hodowanych w różnych warunkach (indukcyjne/nieindukcyjne) i umożliwia uchwycenie minimalnych różnic w ekspresji genów.

2. Materiały i metody

Materiałem badawczym był kalus otrzymany z liścieni *Pharbitis nil*. Liścienie pochodziły z 7-dniowych siewek zaindukowanych i nie poddanych indukcji. Rośliny indukowano 16-godzinnym okresem ciemności, a wariant nie indukowany hodowano na ciągłym świetle. Z dwóch typów tkanki kalusowej pochodzącej z drugiego pasażu wyizolowano całkowity RNA wg metody Chomczynskiego (2), który porównywalno techniką *differential display* przez reakcję łańcuchową polimerazy (PCR). Jakość uzyskanego całkowitego RNA sprawdzano spektrofotometrycznie i przeprowadzając elektroforezę w żelu agarozowym. Pierwszym etapem stosowanej metody jest przepisanie informacji z całkowitego RNA na cDNA w procesie odwrotnej transkrypcji. Otrzymane cDNA stanowiło matrycę w reakcji PCR. Do przeprowadzenia odwrotnej transkrypcji pobierano 0,5-2 µg całkowitego RNA w objętości 2 µl oraz 2 µl startera oligo-dT (TOR5) (20 µM) i uzupełniano DEPC-H₂O do objętości 14 µl. Mieszanie denaturowano w 70°C przez 10 minut i dodawano:

- 4 μ l 5 \times buforu dla odwrotnej transkryptazy MMLV (Promega),
- 1 μ l mieszaniny dNTP (10 mM) (Promega).

Następnie dodawano 1 μ l odwrotnej transkryptazy MMLV o stężeniu 200 U/ μ l. Reakcje prowadzono 50 min w 37°C. Enzym inaktywowano 15 min w 70°C. Produkt odwrotnej transkrypcji rozcieńczano w taki sposób aby do reakcji PCR uzyskać odpowiednie stężenie matrycy. Mieszaninę reakcyjną stanowiły:

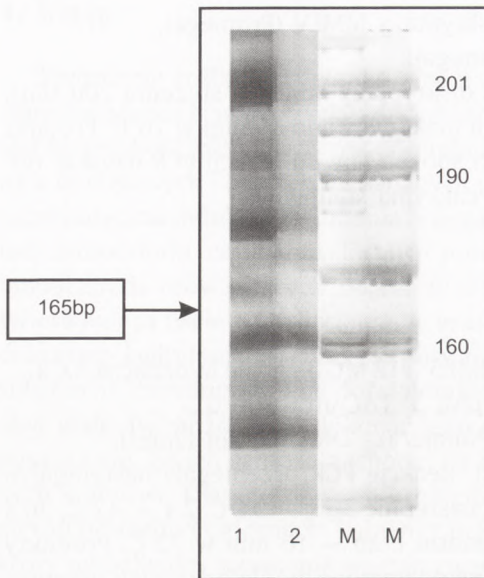
- 1 μ l cDNA (20-100 ng),
- 3 μ l 10 \times bufor dla polimerazy,
- 0,24 μ l mieszanina dNTP (10 mM),
- 3 μ l MgCl₂ (25 mM),
- 3 μ l starter zakotwiczony TOR 5 (20 μ M) 5' T12 MG 3', gdzie M oznacza A,C,G,
- 3 μ l starter przypadkowy TOR 1 (2 μ M) 5' TACAACGAGG 3',
- 0,18 μ l Fragment Stoffel AmpliTag Polimeraza DNA (Perkin Elmer).

Reakcje prowadzono w objętości 30 μ l. Reakcje PCR przebiegały następująco: pierwszy etap to 4 min denaturacji w 95°C, następnie 30 s - 94°C, 2 s - 42°C, 30 s - 72°C powtarzane cyklicznie 40 razy i ostatni etap - 10 min w 72°C. Produkty PCR rozdzielano na 6% natywnym żelu poliakrylamidowym. Elektroforezę przeprowadzano 2 godziny w buforze 1 \times TBE przy napięciu 1200 V. Rozdzielone próby wybarwiano azotanem srebra przy użyciu zestawu Silver Sequence™ DNA Sequencing System (Promega).

3. Wyniki i dyskusja

U *Pharbitis nil*, jak i u wielu innych roślin, regulacja procesów związanych z fotoperiodyczną indukcją kwitnienia pojawia się na wielu poziomach, włączając w to poziom ekspresji genów. Wielokrotnie badano reakcje molekularne zachodzące w liściach lub liścieniach podczas indukcji kwitnienia. Rezultaty pochodzące z badań nad inhibitorami ekspresji genów u *Pharbitis nil* sugerują, że zmiany zachodzące na tym poziomie są związane z fotoperiodyczną indukcją kwitnienia (3-5). Tkanki roślinne hodowane *in vitro* wykazują najczęściej szereg zmian chromosomalnych w porównaniu z materiałem wyjściowym. Przydatność takiego materiału do badań nad molekularnymi podstawami fotoperiodycznej indukcji kwitnienia sprawdzano metodą różnicowego namnażania. Choć istnieje w literaturze wiele doniesień na temat izolacji RNA z roślin, niewiele poświęconych jest izolacji RNA z kultur zawieszonych lub kalusa (6). Kalus jest trudnym materiałem badawczym w związku z tym, że tkanka ta zawiera duże ilości wody.

Całkowite RNA z obu wariantów, izolowano z 1 g tkanki i średnia ilość wynosiła 20 μ g RNA. Jednym z ważniejszych etapów dla powodzenia metody DD PCR, jest użycie RNA wolnego od zanieczyszczeń chromosomalnym DNA. Ponieważ często zdarza się, że preparaty RNA są w niewielkim stopniu zanieczyszczone genomowym DNA, które może być matrycą w reakcji PCR, preparaty trawiono DNazą wolną od



Rys. 1. Elektroforeza na 6% żelu poliakrylamidowym; ścieżka 1 – produkty PCR pochodzące z tkanki nie indukowanej, ścieżka 2 – produkty PCR pochodzące z tkanki indukowanej, M – znacznik pBR 322/Mspl.

RNazy. Takie postępowanie pozwoliło zredukować poziom produktów fałszywie pozytywnych. Innym czynnikiem decydującym o powodzeniu stosowanej metody jest stężenie RNA w próbie. Liang i wsp. (7) przypuszczają, że optymalną ilością jest 0,02 μg na 20 μl mieszaniny reakcyjnej. W przypadku mniejszego stężenia rzędu 0,002 μg otrzymany wzór rozdziału elektroforetycznego wykazuje mniejszą ilość produktów amplifikacji, dlatego używane w doświadczeniach próby zawierały zawsze ilości RNA odpowiadające stężeniu optymalnemu.

W celu uniknięcia fałszywie pozytywnych prążków:

- powtórzono reakcję odwrotnej transkrypcji i PCR na RNA pochodzącym z innej izolacji,
- zachowano szczególną czystość podczas przygotowywania roztworów i sprzętu,
- powtarzano reakcję PCR na tym samym produkcie odwrotnej transkrypcji.

Namnożone fragmenty cDNA rozdzielano na żelach poliakrylamidowych i analizowano różnice w powielaniu fragmentów porównywanych populacji mRNA. Fragmenty żelu zawierające prążki różnicowe z dużą dokładnością wycinano z żeli, a zawarte w nich DNA poddawano reamplifikacji. Analizę produktów PCR na matrycy cDNA obu typów kalusa przedstawiono na rysunku 1. Po analizie obrazów profili elektroforetycznych uzyskano prążki różnicowe o wielkości około 165 bp. Do określenia wielkości rozdzielonych produktów używano markera pBR 322 trawionego enzymem MspI. Wykryte w pracy różnice między mRNA pochodzącym z tkanki pierwotnie poddanej indukcji fotoperiodycznej, a mRNA z tkanki hodowanej w warunkach nieindukcyjnych pozwalają przypuszczać, że kalus pomimo znacznego odróżnicowania, zachowuje zmiany w poziomie ekspresji genów zaangażowanych praw-

dopodobnie w przejście z fazy wegetatywnej do generatywnej. Wyniki te potwierdzono za pomocą analizy Northern, w której wyznakowane produkty różnicowe służyły jako sonda molekularna podczas hybrydyzacji.

Wykaz stosowanych skrótów

- DD PCR – metoda różnicowego namnażania (*differential display*),
- PCR – reakcja łańcuchowa polimerazy (*polymerase chain reaction*),
- RNA – kwas rybonukleinowy,
- DEPC – pirowęglan dwuetylu (*diethylpyrocarbonate*),
- MMLV – myszy wirus leukemii Moloneya,
- dNTP – trójfosforany deoksyrybonukleotydów,
- DNA – kwas deoksyrybonukleinowy.

Literatura

1. Chomczynski P., (1993), *BioTechniques*, 15, 532-537.
2. Bernier G., Havelange A., Houssa C., Harms C., (1993), *Plant Cell*, 5, 1147-1155.
3. Vince-Prue D., Gressel J., (1985), *Handbook of Flowering*, Ed. A. H. Halevy, Vol. IV, CRC Press, Boca Raton, FL, 47-81.
4. O`Neil S. D., (1992), *Photochem Photobiol.*, 56, 789-801.
5. Sage-Ono K., Ono M., Harada H., Kamada H., (1998), *Plant Physiology*, 116, 1479-1485.
6. Liao Y. C., Prassard J., Nahrung J. M., Fisher R., (1997), *BioTechniques*, 23, 996-1000.
7. Liang P., Averboukh L., Pardee A. B., (1993), *Nucleic Acids Research*, 21, 3269-3275.