

Streszczenie rozprawy doktorskiej pt. „Aspekty genetyczno – molekularne i biochemiczne regeneracji *in vitro* dwupiennego gatunku *Rumex thyrsiflorus*”

Autor: mgr Katarzyna Dziedzic

Dwupienność jest wśród roślin zjawiskiem stosunkowo rzadkim – odnotowano ją zaledwie u ok. 6% roślin okrytozalążkowych. Wiąże się ona z występowaniem dymorfizmu płciowego, który jest przedmiotem badań wielu gałęzi nauki zajmujących się jego aspektami ewolucyjnymi, fizjologicznymi, fitochemicznymi, genetycznymi, a nawet oddziaływaniami pomiędzy roślinami dwupiennymi a innymi organizmami. Badania nad dymorfizmem płciowym w rodzaju *Rumex* są nieliczne. Dotyczą głównie zaburzonych pierwotnych i wtórnych proporcji płci oraz różnic w morfologii. Dodatkowo, badania nad zależnymi od płci różnicami u przedstawicieli rodzaju *Rumex* uwzględniają cykl życiowy roślin, aspekty geograficzne i dostępność zasobów, czy fenologię kwitnienia.

Rumex thyrsiflorus Fingerh. (szczaw rozpierzchły) jest dwupienną rośliną z heteromorficznymi chromosomami płci (u osobników żeńskich $2n = 12A + XX$, u męskich $2n = 12A + XY_1Y_2$). Należy do rodziny *Polygonaceae* i wraz z blisko spokrewnionym gatunkiem *R. acetosa* L. uznawany jest za wartościowy obiekt badań dotyczących budowy, funkcji i ewolucji chromosomów płci u roślin.

Wykazano wyraźne zaburzenia w proporcjach płci występujące w nasionach i populacjach naturalnych *R. thyrsiflorus* oraz podjęto próby ustalenia przyczyn tego zjawiska. Aby móc pełniej zrozumieć podłoże i mechanizmy zaburzeń proporcji płci w populacjach *R. thyrsiflorus*, warto było uzupełnić wspomniane wyżej badania o fizjologiczne analizy cech wegetatywnych. W związku z tym postanowiono doświadczalnie zweryfikować hipotezę zakładającą istnienie wykraczającego poza zróżnicowanie organów rozrodczych dymorfizmu płciowego w gatunku *R. thyrsiflorus*. Niezbędnym narzędziem koniecznym do podjęcia badań było opracowanie wydajnego i stabilnego pod względem genetycznym modelu doświadczalnego, umożliwiającego prowadzenie eksperymentów w warunkach kultur *in vitro*, dotyczących mechanizmów zaburzonych proporcji płci. Sprawdzone, czy w materiale pochodzącym z roślinnych hodowli *in vitro* istnieją różnice zależne od płci w:

- a. potencjale morfogenetycznym eksplantatów (z wykorzystaniem 5–ciu różnych pożywek regeneracyjnych),

- b. stabilności genetycznej regenerantów [z wykorzystaniem techniki opartej na polimorfizmie fragmentów DNA znajdujących się pomiędzy loci mikrosatelitarnymi (ISSR, ang. Inter-Simple Sequence Repeat)],
- c. profilach aktywności dysmutazy ponadtlenkowej [z wykorzystaniem natywnej elektroforezy w żelu poliakrylamidowym w warunkach niedenaturujących (Native PAGE, ang. Polyacrylamide Gel Electrophoresis)],
- d. rodzajach i zawartości związków fenolowych [z wykorzystaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej z detektorem o matrycy diodowej (HPLC-DAD, ang. High-Performance Liquid Chromatography with Diode Array Detection)].

Efektom przeprowadzonych badań jest opracowanie gwarantującej stabilność genetyczną protokołu mikropropagacji (na drodze organogenezy pośredniej *via* kalus) *R. thyrsoiflorus* z hipokotyli izolowanych z 11 – dniowych siewek płci żeńskiej i męskiej na podłożu stałym o składzie MS (Murashige & Skoog) + 0,5 mg/l TDZ + 3% sacharoza. Na podstawie uzyskanych wyników można wnioskować, że:

- a. poprzez odpowiednie manipulacje składem podłoża hodowlanych w kulturach *in vitro* można modyfikować potencjał morfogenetyczny eksplantatów w postaci hipokotyli wyizolowanych z męskich i żeńskich siewek *Rumex thyrsoiflorus*;
- b. wykorzystane do analizy zmienności somaklonalnej markery ISSR wskazują na niezależną od płci stabilność genetyczną roślin zregenerowanych w kulturze *in vitro* na pożywce z TDZ względem materiału matecznego;
- c. analiza profili aktywności form dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) nie wskazuje na zależne od płci różnice w materiale pochodzącym ze wspomnianej powyżej kultury *in vitro* i jest przesłanką do pogłębienia badań o ilościową analizę aktywności form SOD;
- d. w przeprowadzonej analizie wybranych związków fenolowych (kwasów fenolowych, flawonoidów i katechiny) po raz pierwszy stwierdzono obecność w ekstraktach metanolowych *R. thyrsoiflorus* następujących związków fenolowych: kwas chlorogenowy, kwas ferulowy, kwas kryptochlorogenowy, kwas *p*-kumarowy, kwas neochlorogenowy, kwas protokatechowy i kwas wanilinowy, izokwercetyna, kwercytryna i witeksyna oraz wykazano występowanie różnic statystycznie istotnych w zawartości większości ze wszystkich szesnastu oznaczonych związków fenolowych, w zależności od pochodzenia materiału, z którego je izolowano oraz płci roślin.

Opracowany protokół mikropropagacji można wykorzystać do prowadzenia badań podstawowych dotyczących różnic fizjologicznych i biochemicznych pomiędzy osobnikami przeciwnych płci oraz czynników postzygotycznych wpływających na zaburzenia proporcji płci w populacjach tego gatunku.

29. 07. 2010

fucluf

Kotomys Drieduë

Summary

Dioecy is an uncommon phenomenon among plants. It was noted in only about 6% of angiosperm plants' species. It is associated with the sexual dimorphism, which is subject of evolutionary, physiological, phytochemical, and genetic research. Studies on sexual dimorphism in *Rumex* species are scarce and concern mainly a biased sex ratio (both, primary and secondary), and differences in morphology. Additionally, studies on sex – related differences among the *Rumex* genus take into consideration the life cycle of plants, geographical aspects, availability of resources, and flowering phenology.

Rumex thyrsiflorus Fingerh. (thyrsesorrel) is one of the few dioecious plant species with heteromorphic sex chromosomes: females $2n = 12A + XX$, males $2n = 12A + XY_1Y_2$. It has been the subject of studies on the structure and functions of sex chromosomes in plants. There was observed both, the primary and the secondary female – biased sex ratio in populations of this species.

The development of an efficient and genetically stable micropropagation protocol, as a tool allowing the study on biased sex ratio under *in vitro* conditions was one of the aims of this study. The verification of the hypothesis concerning the occurrence of sexual dimorphism, beyond the diversity of reproductive organs in the species *R. thyrsiflorus* was also undertaken.

The following aspects of sex–related differences in material derived from a plant *in vitro* culture were investigated:

- a. the morphogenetic potential of explants (using five different regeneration media),
- b. genetic stability of regenerated plants [using the technique based on Inter – Simple Sequence Repeat polymorphism (ISSR)],
- c. superoxide dismutase (SOD) activity profiles [using Native Polyacrylamide Gel Electrophoresis (PAGE) under non–denaturing conditions]
- d. qualitative and quantitative analysis of phenolic compounds [using High–Performance Liquid Chromatography with Diode Array Detection (HPLC–DAD)].

A reproducible and genetically stable micropropagation protocol for *R. thyrsiflorus* was developed. It was done by obtaining indirect plant regeneration (adventitious shoots formation *via* callus) from hypocotyls isolated from 11 – day – old female and male seedlings. It has been achieved on solid MS (Murashige & Skoog) medium supplemented with 0,5 mg/l TDZ and 3% sucrose.

Based on the results of the experiments, it can be concluded that:

- a. the morphogenetic potential of *R. thyrsoiflorus* hypocotyls isolated from seedlings of opposite sexes can be modified through the appropriate manipulation of the culture media composition,
- b. ISSR markers used for the analysis of somaclonal variation revealed that regenerated on TDZ – enriched medium plants are genetically stable compared to mother material, regardless of their sex,
- c. analysis of the activity of superoxide dismutase (SOD) forms does not indicate sex – related differences in the material from *in vitro* culture, the quantitative analysis of the activity of SOD forms is recommended,
- d. the analysis of selected phenolic compounds (phenolic acids, flavonoids and catechins) confirmed for the first time the presence of following phenolic compounds in *R. thyrsoiflorus* methanolic extracts: chlorogenic acid, ferulic acid, cryptochlorogenic acid, *p*-coumaric acid, neochlorogenic acid, protocatechuic acid, vanillic acid, isoquercetin, quercitrin and vitexin. Statistically significant differences concerning the content of sixteen identified phenolic compounds were revealed. They depend on the origin of plant material and the sex of the plant.

The developed micropropagation protocol can be useful for basic research on the physiological and biochemical sex – related differences and also postzygotic factors affecting biased sex ratio in *R. thyrsoiflorus*.

29.07.2010

Lučman
Kekempeš Džedić