

EMILIA WILMOWICZ
AGATA KUĆKO
KATARZYNA MARCINIAK
ALEKSANDRA GADZIKOWSKA
KRZYSZTOF PRZEDNICZEK
JAN KOPCEWICZ

Katedra Fizjologii Roślin i Biotechnologii, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, ul. Lwowska 1,
87-100 Toruń

Obecny stan wiedzy na temat regulacji powstawania oraz funkcjonowania strefy odcinania kwiatów *Lupinus luteus*

The current stage of knowledge concerning regulation of floral abscission zone differentiation and functioning in *Lupinus luteus*

Aktywność strefy odcinania (AZ, ang. *abscission zone*) warunkuje separację organów od rośliny macierzystej. U *Lupinus luteus* AZ kwiatów powstaje u podstawy szypułek tych organów. Zmiany na poziomie komórkowym są skorelowane ze zmieniającą się ekspresją *BLADE-ON-PETIOLE (LIBOP)*. Poziom mRNA tego genu regulowany jest także przez hormonalne stymulatory odcinania kwiatów — etylen (ET) i kwas abscysynowy (ABA) — co wskazuje, że *LIBOP* jest zaangażowany nie tylko w powstawanie AZ, ale także w późniejsze etapy jej funkcjonowania. Kwas abscysynowy wpływając na akumulację transkryptów genów kodujących enzymy biosyntezy etylenu ET (syntazę i oksydazę kwasu 1-aminocyclopropano-1-karboksyłowego (ACC) i jednocześnie powodując wzrost poziomu prekursora tego fitohormonu w AZ, pośrednio reguluje czas odcinania kwiatów *L. luteus*.

Słowa kluczowe: etylen, fitohormony, kwas abscysynowy, łubin, odcinanie organów, strefa odcinania

The activity of abscission zone (AZ) determines the separation of organs from plant body. In *L. luteus* floral AZ develops at the base of the pedicel. Changes observed at the cellular level are correlated with fluctuations in *BLADE-ON-PETIOLE (LIBOP)* expression. The mRNA content of this gene is regulated by phytohormonal stimulators of flower separation — ethylene (ET) and abscisic acid (ABA) — suggesting that *LIBOP* is involved not only in the AZ differentiation, but also further stages of its functioning. Abscisic acid causing an accumulation of transcripts of genes, encoding ethylene biosynthesis enzymes (synthase and oxidase of 1-aminocyclopropano-1-carboxylic acid, ACC), and at the same time increasing the level of ethylene precursor, indirectly regulates the time of flower separation in *L. luteus*.

Key words: abscisic acid, abscission zone, ethylene, lupin, organ abscission, phytohormones

WSTĘP

Odcinanie organów od rośliny macierzystej, np. liści, elementów okwiatu czy pędów, jest zjawiskiem fizjologicznym wpisanym w realizację jej programu rozwojowego. Jednak przedwczesna separacja kwiatów oraz owoców, zwłaszcza u gatunków użytkowych o ważnym znaczeniu gospodarczym, stanowi duży problem ekonomiczny. Przyczyn odcinania organów generatywnych upatruje się w niedostatecznym zapyleniu, zapłodnieniu lub stresie wywołanym niedoborem wody i/lub składników mineralnych. Bez względu na rodzaj działającego bodźca separacja kwiatów i owoców, podobnie jak innych organów, jest możliwa dzięki aktywności warstwy wyspecjalizowanych komórek tworzących tzw. strefę odcinania (AZ, ang. *abscission zone*) (Estornell i in., 2013). Wyniki badań prowadzonych m.in. na rzodkiewniku pospolitym (*Arabidopsis thaliana*), soi zwyczajnej (*Glycine max*), pomidorze zwyczajnym (*Solanum lycopersicum*), cytrusach (*Citrus*), liczi (*Litchi chinensis*), grochu zwyczajnym (*Pisum sativum*) oraz lucernie (*Medicago truncatula*) wykluczają istnienie uniwersalnego mechanizmu regulującego powstawanie i funkcjonowanie AZ. Można natomiast wyróżnić pewne podstawowe i wspólne dla wszystkich gatunków roślin etapy przebiegu tego procesu. Po wytworzeniu AZ, komórki tej strefy nabywają kompetencji do percepcji sygnałów aktywujących odcinanie, w konsekwencji dochodzi do dojrzewania pokładu rozdzielającego (ang. *separation layer*), separacji organu i wytworzenia tkanki zabezpieczającej powierzchnię powstałej blizny (Estornell i in., 2013). Analizy dotyczące molekularnej regulacji tego procesu prowadzono głównie na *A. thaliana*. Niemniej jednak, niektóre mechanizmy poznane u *A. thaliana* nie funkcjonują u innych gatunków. Dlatego obecnie istnieje potrzeba znalezienia nowych modeli badawczych, zwłaszcza wśród roślin użytkowych, w tym strączkowych. Zgodnie z trendem ekologicznego rolnictwa, jaki panuje obecnie na świecie, mogą one stanowić bogate źródło białka. Doskonałym kandydatem na nową roślinę modelową jest łubin (*Lupinus L.*), głównie ze względu na łatwe do identyfikacji miejsce odcinania organów generatywnych, co umożliwi dokładną analizę zmian zachodzących w AZ, a także precyzyjne zebranie materiału do badań molekularnych. Dodatkowo, łubin posiada szereg zalet ekonomicznych, proekologicznych oraz agronomicznych. Istotnym problemem bezpośrednio rzutującym na niski areał upraw tego gatunku w Polsce jest obniżone plonowanie wynikające z nagłego i nadmiernego odcinania kwiatów. U łubinu żółtego (*L. luteus L.*) na pierwszym piętrze kwiatostanu opada do 60%, na drugim niemal 90%, a na pozostałych piętrach kwiatostanu wszystkie zawiązane kwiaty (Prusiński i Borowska, 2002; Frankowski i in., 2017). Zatem opisanie molekularnych i biochemicznych czynników odpowiedzialnych za regulację powstawania oraz funkcjonowania AZ u *L. luteus*, a także wyselekcjonowanie genów, enzymów lub fitohormonów będących potencjalnymi markerami tego procesu ma nie tylko charakter poznawczy, ale także praktyczny i jest istotne dla podejmowania działań zmierzających do poprawy plonowania. Jest to ważne zwłaszcza u odmian samoocierających, które charakteryzują się

wysokim potencjałem produktywności fotosyntetycznej oraz wyższym, w porównaniu z formami tradycyjnymi, współczynnikiem plonowania, a także większą równomiernością dojrzewania i krótszym okresem wegetacji.

Celem niniejszej pracy jest podsumowanie obecnego stanu wiedzy na temat regulacji powstawania oraz funkcjonowania strefy odcinania kwiatów *L. luteus*.

POWSTAWANIE STREFY ODCINANIA KWIATÓW *L. LUTEUS*

Z uwagi na fakt, że miejsce występowania i czas różnicowania AZ u poszczególnych gatunków roślin są zaprogramowane genetycznie, na początku doświadczeń prowadzonych przez nasz zespół badawczy kluczową kwestią było określenie lokalizacji tkankowej oraz czasu powstawania AZ kwiatów *L. luteus*. Wykonaliśmy analizę histologiczną utrwalonych preparatów szypułek kwiatów pochodzących z różnych stadiów rozwoju tych organów (Frankowski i in., 2015). W pełni wykształcona AZ występowała u podstawy szypułek rozwiniętych kwiatów. Obserwowano w niej wyraźnie zróżnicowane, małe, ciasno ułożone komórki (Frankowski i in., 2015). Co więcej wykazaliśmy, że podczas powstawania AZ zmieniała się aktywność transkrypcyjna nowo zidentyfikowanego homologa genu *BLADE ON PETIOLE (LIBOP)*. Maksymalną relatywną ekspresję *LIBOP* obserwowano w AZ w pełni rozwiniętych kwiatów i było to skorelowane z przemianami zachodzącymi na poziomie komórkowym (Frankowski in., 2015). Podobne wyniki, wskazujące na zaangażowanie *BOP* w powstawanie AZ opisano u *A. thaliana* i tytoniu szlachetnego (*Nicotiana tabacum*) (Couzigou i in., 2012; Khan i in., 2014; McKim i in., 2008; Wu i in., 2012). U obydwu gatunków obserwowane zmiany dotyczyły jedynie elementów okwiatu, a mutacje w genach *BOP* skutkowały zahamowaniem wytwarzania AZ.

Czynnikiem koordynującym przemiany anatomiczne i fizjologiczne zachodzące w powstającej AZ są fitohormony. U *L. luteus* podczas różnicowania AZ kwiatów wzrastał poziom mRNA genu kodującego syntazę kwasu 1-aminocyklopropano-1-karboksyowego (*ACC*) odpowiedzialną za przekształcenie *S*-adenozylometioniny do *ACC* (prekursora ET) oraz oksydazę *ACC (LIACO)* katalizującą utlenienie prekursora do ET (Frankowski i in., 2017). Fitohormon ten wpływając na ekspresję genów kodujących enzymy hydrolityczne oraz samą aktywność ich białkowych produktów np. poligalakturonaz, peroksydaz i esteraz, bierze czynny udział w reorganizacji struktury ścian komórkowych, przez co bezpośrednio wpływa na rozpuszczenie blaszki środkowej łączącej sąsiadujące komórki (Roberts i in., 2000; Taylor i Whitelaw, 2001; Van Doorn, 2002). Ponieważ fitohormony wchodzi w liczne interakcje, nie można wykluczyć roli także innych, m.in. kwasu abscysynowego (*ABA*), auksyn, giberelin, cytokinin i jasmonianów (*JAs*) w regulacji powstawania AZ. Dowodem są doniesienia naukowe dotyczące kontrolowanej przez *ABA* i *JAs* ekspresji genów kodujących enzymy odpowiedzialne za remodelowanie ściany komórkowej towarzyszące odcinaniu elementów okwiatu u *A. thaliana* (Estornell i in., 2013).

FUNKCJONOWANIE STREFY ODCINANIA KWIATÓW *L. LUTEUS*

Wytworzenie AZ nie gwarantuje separacji organu, musi dojść do aktywacji komórek w tej strefie. Konsekwencją tego są zmiany struktury ścian komórkowych. Dane literaturowe wskazują, że w AZ nierozpuszczalne pektyniany wapnia przekształcane są w kwas pektynowy i rozpuszczalną pektynę. Wskutek działania enzymów hydrolitycznych dochodzi do rozpuszczenia blaszki środkowej spajającej ze sobą ściany sąsiadujących komórek, a w konsekwencji odrzucenia organu (Estornell i in., 2013).

Analizy dotyczące funkcjonowania AZ u *L. luteus* prowadziliśmy w trzech wariantach. W pierwszym badano przemiany zachodzące w naturalnie aktywnej AZ, w drugim zastosowano zabieg jej sztucznej aktywacji przez usunięcie kwiatu u nasady, z kolei w trzecim — kontrolnym, zbierano fragment zawierający nieaktywną AZ z szypułek kwiatów utrzymywanych na roślinach (Frankowski i in., 2015). Nieaktywna AZ była zbudowana z okrągłych, luźno ułożonych komórek, podczas gdy komórki aktywnej AZ ulegały intensywnym podziałom czego przejawem było występowanie nowo zakładających się ścian komórek potomnych. Obecność dużych jąder komórkowych w aktywnej AZ, licznych ziarnistości cytoplazmatycznych, pęcherzyków oraz plazmodesm świadczyła o intensywnych przemianach metabolicznych tych komórek. Sztuczna aktywacja strefy odcinania, powodowała zmiany komórkowe, podobne do tych które obserwowano w AZ naturalnie odpadających kwiatów (dane nieopublikowane).

Co ciekawe, podczas aktywacji tej strefy zmieniał się także poziom mRNA *LIBOP*. Po dobie był on ponad siedmiokrotnie wyższy w odniesieniu do kontroli, natomiast w naturalnie aktywnej AZ osiągał niemal połowę wartości, którą obserwowano w aktywowanej strefie. Zwiększona akumulacja transkryptu *LIBOP* w sztucznie aktywowanej AZ wynika prawdopodobnie z jego udziału w regulacji wczesnych etapów aktywacji, kiedy dochodzi do uruchomienia mechanizmów indukujących odcinanie. Natomiast zmiany obserwowane w naturalnie aktywnej AZ są wynikiem przemian związanych z degradacją komórek. Dane przedstawiające fluktuacje w poziomie mRNA genu *LIBOP* były pierwszym opublikowanym dotychczas dowodem sugerującym, że może on być zaangażowany nie tylko w powstawanie AZ, tak jak ma to miejsce u innych gatunków roślin, ale także w jej aktywację i późniejsze funkcjonowanie. Potwierdziły to wyniki pionierskich badań, w których hormonalne modulatory odcinania kwiatów *L. luteus*, m.in. ABA i ET wpływały na aktywność transkrypcyjną *LIBOP* (Frankowski i in., 2015). Wykazaliśmy, że najsilniejszym hormonalnym stymulatorem odcinania kwiatów *L. luteus* jest ET (Frankowski i in., 2017). Efekt wywołany przez ten fitohormon był częściowo odwracany przez aminoetoksywinyloglicynę (AVG) — inhibitor biosyntezy ET lub całkowicie znoszony przez zablokowanie jego działania norbornadienem (NBD). Co więcej, w aktywnej AZ kwiatów poziom ekspresji kluczowych genów biosyntezy ET *LIACS* (syntaza kwasu 1-aminocyklopropano-1-karboksyłowego) i *LIACO* (oksydaza kwasu 1-aminocyklopropano-1-karboksyłowego) był wyższy niż w badaniu kontrolnym.

Stopniową akumulację mRNA badanych genów powodowała sztuczna aktywacja AZ. Analizy z użyciem przeciwciał znakowanych fluorescencyjnie (anty-ACC) wykazały obecność prekursora ET na terenie cytoplazmy dzielących się komórek aktywnej AZ.

Silny sygnał obserwowano również w elementach wiązek przewodzących szypułki kwiatu, a także w jej części proksymalnej (Frankowski i in., 2017).

Nieco słabszy od ET efekt fizjologiczny wywoływał ABA (Wilmowicz i in., 2016). Niemniej jednak endogenny poziom tego fitohormonu w aktywnej AZ był ponad dwukrotnie wyższy w porównaniu do kontroli (Wilmowicz i in., 2016). Co więcej, zaobserwowano silną fluorescencję po reakcji z przeciwciałem anti-ABA potwierdzającą obecność tego fitohormonu w centralnej części aktywnej AZ. Analizy chromatograficzne i mikroskopowe wykazały, że aplikacja inhibitora biosyntezy ABA — kwasu nordihydrogwaretowego (NDGA) skutecznie obniżała jego poziom w komórkach AZ (Wilmowicz i in., 2016).

Kolejne doświadczenia wykazały, że jednoczesna aplikacja ABA i NBD skutkowałą utrzymaniem kwiatów na roślinach (Wilmowicz i in., 2016). Te interesujące wyniki wytyczyły nowy nurt badawczy naszego zespołu. Powstało zatem pytanie, czy ABA jest czynnikiem wystarczającym do aktywacji AZ? Czy może działa jedynie przez ET tak, jak w przypadku kontroli wzrostu wydłużeniowego korzenia, rozwoju nasion lub fotoperiodycznej indukcji kwitnienia (Ghassemian i in., 2000; Wilmowicz i in., 2008)? Kwas abscysynowy powodował akumulację transkryptów genów zaangażowanych w biosyntezę ET. Kontynuując nasze badania zaobserwowaliśmy, że podnosił także poziom ACC w komórkach AZ. Efekt ten był znoszony przez NDGA (Wilmowicz i in., 2016). Podobny wzorec lokalizacji ACC, jak w przypadku aktywnej AZ, obserwowano cztery godziny po aplikacji ABA. Na poziomie komórkowym prekursor ET występował w postaci drobnych agregatów rozsianych na terenie cytoplazmy (Frankowski i in., 2017).

Reasumując, odcinanie kwiatów wywołane ABA może wynikać z jego stymulującego wpływu na ekspresję kluczowych genów biosyntezy ET (*LIACS* i *LIACO*), poziom ACC, a co za tym idzie wzrost produkcji tego fitohormonu — głównego efektora odcinania.

PODSUMOWANIE

W ostatnim czasie badania dotyczące poznania mechanizmu regulującego odcinanie organów generatywnych spotykają się z bardzo dużym zainteresowaniem środowisk naukowych, głównie ze względu na praktyczne zastosowanie uzyskiwanych wyników. Istnieje potrzeba prowadzenia tego typu analiz u roślin strączkowych, które zgodnie ze światowymi tendencjami propagowania ekologicznego rolnictwa dla ochrony środowiska naturalnego powinny zwiększyć areał upraw w Polsce. W celu zmniejszenia w przyszłości realnych strat, wynikających z odcinania kwiatów i owoców *L. luteus*, niezbędne jest poznanie kolejnych elementów szlaku transdukcji sygnału prowadzącego do aktywacji AZ, m.in. genów związanych z funkcjonowaniem (*HAE/HSL2*, *NEV*) i aktywacją (*IDA*) komórek AZ, określenie wpływu fitohormonów na ich ekspresję, sprawdzenie czy zidentyfikowane geny kodują funkcjonalne białka, wykazujące aktywność enzymatyczną. Opisanie tego zagadnienia na wielu poziomach i przy zastosowaniu różnorodnych technik badawczych umożliwi nam w niedalekiej przyszłości

utworzenie zintegrowanego modelu hormonalnej i molekularnej regulacji odcinania kwiatów *L. luteus*.

LITERATURA

- Couzigou J. M., Zhukov V., Mondy S., Abu el Heba G., Cosson V., Ellis T.H., Ambrose M., Wen J., Tadege M., Tikhonovich I., Mysore K. S., Putterill J., Hofer J., Borisov A. Y., Ratet P. 2012. Nodule root and cochleata maintain nodule development and are legume orthologs of *Arabidopsis* BLADE-ON-PETIOLE genes. *Plant Cell* 24: 4498 — 4510.
- Estornell L. H., Agustí J., Merelo P., Talón M., Tadeo F. R. 2013. Elucidating mechanisms underlying organ abscission. *Plant Sci.* 199/200: 48 — 60.
- Frankowski K., Wilmowicz E., Kućko A., Mączkowski R., Marciniak K., Kopcewicz J. 2014. The generative development of traditional and self-completing (restricted branching) cultivars of white lupin (*Lupinus albus* L.), yellow lupin (*L. luteus* L.) and narrow-leafed lupin (*L. angustifolius* L.) grown under different phytotron conditions. *Plant Breed. Seed Sci.* 69: 47 — 57.
- Frankowski K., Wilmowicz E., Kućko A., Zienkiewicz A., Zienkiewicz K., Kopcewicz J. 2015. Profiling the BLADE-ON-PETIOLE gene expression in the abscission zone of generative organs in *Lupinus luteus*. *Acta Physiol. Plant.* 37: 220.
- Frankowski K., Wilmowicz E., Kućko A., Zienkiewicz A., Zienkiewicz K., Alché J. D., Kopcewicz J. 2017. Ethylene-dependent effects on generative organ abscission of *Lupinus luteus*. *Acta Soc. Bot. Pol.* 86: 3540.
- Ghassemian M., Nambara E., Cutler S., Kawaide H., Kamiya Y., McCourt P. 2000. Regulation of abscisic acid signaling by the ethylene response pathway in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 12: 1117 — 1126.
- Haugn G. W. 2008. The BLADE-ON-PETIOLE genes are essential for abscission zone formation in *Arabidopsis*. *Development* 135: 1537 — 1546.
- Khan M., Xu H., Hepworth S. R. 2014. BLADE-ON-PETIOLE genes: Setting boundaries in development and defense. *Plant Sci.* 215/216: 157 — 171.
- McKim S.M., Stenvik G. E., Butenko M. A., Kristiansen W., Cho S. K., Hepworth S. R., Aalen R. B., Prusiński J., Borowska M. 2002. Potencjał biologiczny roślin strączkowych i jego wykorzystanie. Cz. I Zastosowanie regulatorów wzrostu w uprawie roślin strączkowych. *Hod. Rośl. Nasien.* 2: 33 — 38.
- Roberts J. A., Whitelaw C. A., Gonzalez-Carranza Z. H., McManus M. T. 2000. Cell separation processes in plants: models, mechanisms and manipulation. *Ann. Bot.* 86: 223 — 235.
- Taylor J. E., Whitelaw C. A. 2001. Signals in abscission. *New Phytol.* 151: 323 — 340.
- Van Doorn W. G. 2002. Effect of ethylene on flower abscission: a survey. *Ann. Bot.* 89: 689 — 693.
- Wilmowicz E., Kęsy J., Kopcewicz J. 2008. Ethylene and ABA interactions in the regulation of flower induction in *Pharbitis nil*. *J. Plant Physiol.* 165: 1917 — 1928.
- Wilmowicz E., Frankowski K., Kućko A., Świdziński M., Alché J. D., Nowakowska A., Kopcewicz J. 2016. The influence of abscisic acid on ethylene biosynthesis pathway in the functioning of flower abscission zone in *Lupinus luteus*. *J. Plant Physiol.* 206: 49 — 58.
- Wu X. M., Yu Y., Han L. B., Li C. L., Wang H. Y., Zhong N. Q., Yao Y., Xia G. X. 2012. The tobacco BLADE-ON-PETIOLE2 gene mediates differentiation of the corolla abscission zone by controlling longitudinal cell expansion. *Plant Physiol.* 159: 835 — 850.