

**Sprawozdanie z realizacji badań podstawowych na rzecz postępu biologicznego w  
produkcji roślinnej, finansowanych przez MRiRW w ramach zadania nr 25  
"Molekularne podstawy zjawiska albinizmu w kulturach izolowanych mikrospor  
jęczmienia" w roku 2014**

Brak chlorofilu (albinizm), występujący u znacznej części regenerantów z kultur pylnikowych lub kultur izolowanych mikrospor zbóż, jest podstawowym problemem zmniejszającym efektywność uzyskiwania podwojonych haploidów w procesie androgenyzy. Szczególnie u jęczmienia, wysoka częstotliwość regeneracji roślin albinotycznych, dochodząca u wielu genotypów do 90% regenerantów, znacząco obniża praktyczne wykorzystanie procesu androgenyzy w programach hodowlanych tego gatunku. Rośliny albinotyczne zawierają niefunkcjonalne chloroplasty, co powoduje, że ich wzrost poza kulturą *in vitro* nie jest możliwy. Dotychczasowe badania przyczyn powstawania albinotycznych regenerantów podczas androgenyzy u gatunków z rodziny *Poaceae* nie przyniosły jednoznacznych rezultatów. Badania prowadzone w ramach prezentowanego zadania mają na celu identyfikację molekularnych mechanizmów prowadzących do albinizmu w kulturach androgenicznych jęczmienia oraz określenie endo- i egzogennych czynników wpływających na powstawanie albinotycznych roślin.

W roku 2014 realizowano dwa tematy badawcze. Celem pierwszego tematu było określenie efektywności regeneracji roślin zielonych w kulturze *in vitro* izolowanych mikrospor 20 odmian jęczmienia jarego pochodzących z Krajowego Rejestru Odmian COBORU oraz, na podstawie uzyskanych wyników, wybór dwóch genotypów jęczmienia różniących się najbardziej częstotliwością regeneracji roślin zielonych w stosunku do albinotycznych, które stanowić będą materiał do badań molekularnych. Odmiany wytypowane do badań pochodziły z różnych firm hodowlanych i wybrane zostały z uwzględnieniem ich pochodzenia, aby jak najbardziej zróżnicować pulę badanych genotypów. Rośliny donorowe, z których pobierano materiał do badań, prowadzono w kontrolowanych warunkach w fitotronie, w temperaturze 18°C w dzień i 16°C w nocy, przy 16/8h fotoperiodzie i naświetleniu 320  $\mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ . Z roślin tych pobrano kłosa zawierające mikrospory w średnio-późnym do późnego stadium rozwoju. Kłosa poddano przedtraktowaniu przez okres od 18 do 21 dni w temperaturze 4°C. Mikrospory izolowano i kulturę prowadzono według protokołu opisanego przez Coronado i współpracowników (2005). Analiza regeneracji w kulturze izolowanych mikrospor obejmowała liczbę roślin zielonych i albinotycznych, uzyskanych po 4 tygodniach od przeniesienia kultury na światło, w przeliczeniu na 100.000 mikrospor. Dla każdej odmiany określono także stosunek roślin zielonych do albinotycznych wśród otrzymanych regenerantów.

Częstotliwość regeneracji roślin z kultur *in vitro* izolowanych mikrospor różniła się znacząco wśród badanych odmian jęczmienia jarego, co potwierdza wysoki poziom zależności tego procesu od genotypu. Analiza statystyczna z wykorzystaniem testu t-Studenta dla prób niezależnych umożliwiła podział odmian na kilka grup, w zależności od poziomu regeneracji roślin. Wśród badanych odmian można wyróżnić grupę charakteryzującą się wysoką zdolnością do regeneracji roślin, wynoszącą ponad 100 zregenerowanych roślin na 100.000 mikrospor. Należą do niej odmiany: 'Bruce', 'Argento', 'Mercada' i 'Jersey'. Odmiany 'Nadek', 'Skald', 'KWS Aliciana', 'Justina', 'Atico' i 'Scalett' można scharakteryzować jako formy o wysokim potencjale regeneracyjnym (kilkadziesiąt zregenerowanych roślin na 100.000 mikrospor). Niższym poziomem regeneracji roślin charakteryzowały się odmiany 'Ella', 'Serwal', 'Iron', 'Conchita', 'Henrike', 'Sebastian', 'Natasia', 'Rubinek' i 'Goodluck', a najniższą odpowiedź androgeniczną spośród wszystkich badanych genotypów wykazały odmiany 'Żeglarz' i 'Nagradowski', dla których uzyskano tylko 3-4 roślin na 100.000 mikrospor.

Badane odmiany różniły się też znacznie proporcją roślin zielonych do albinotycznych wśród zregenerowanych roślin, choć dla większości z nich stosunek ten był mniejszy od 1. Jedynie dla odmian 'Bruce' i 'Jersey' stwierdzono wyższy poziom roślin zielonych niż albinotycznych wśród otrzymanych regenerantów, przy czym odmiana 'Jersey' okazała się być formą o najwyższej zdolności do wytwarzania zielonych regenerantów. Całkiem odmienną, od odmian; Jersey' i 'Bruce', zdolność do wytwarzania w kulturze roślin zielonych wykazały dwie pozostałe odmiany zakwalifikowane do form o najwyższym potencjale regeneracyjnym, tj. 'Argento' i 'Mercada'. Dla odmiany 'Mercada' stosunek roślin zielonych do albinotycznych (0,03) był najniższy wśród wszystkich badanych genotypów.

Przy wyborze odmian jęczmienia do badań nad molekularnymi podstawami zjawiska albinizmu w kulturach *in vitro* izolowanych mikrospor kierowano się dwoma przesłankami: 1) odmiany powinny wykazywać wysoki poziom regeneracji roślin ogółem, oraz 2) przy zbliżonym poziomie regeneracji, odmiany powinny wykazać maksymalnie różny udział roślin zielonych wśród całości regenerantów. Oba kryteria w najwyższym stopniu spełniają odmiany 'Jersey' i 'Mercada', i dlatego te dwa genotypy wytypowano do badań molekularnych. Obie odmiany wytwarzają ponad 100 roślin/100.000 mikrospor, lecz ponad 90% regenerantów odmiany 'Jersey' to rośliny wytwarzające chlorofil, podczas gdy w odmianie 'Mecada' takie regeneranty stanowią zaledwie 3%. Obie te odmiany są jare, dwurzędowe, różnią się natomiast kierunkiem użytkowania: 'Jersey' to odmiana browarna, natomiast 'Mercada' jest formą pastewną.

W roku 2014 zrealizowano pierwszą część badań tematu badawczego 2, której celem był wybór genów a także zaprojektowanie i sprawdzenie starterów do analizy poziomu ekspresji genów podczas rozwoju ziaren pyłku *in vivo* i kultury mikrospor *in vitro*. Na podstawie danych literaturowych wybrano do analizy 28 genów, zaangażowanych w biogenezę chloroplastów, 6 genów, związanych z biogenezą amyloplastów oraz 42 geny, których produkty zaangażowane są w proces fotosyntezy. Wytypowano geny, kodowane zarówno w genomie plastydowym, jak i jądrowym, które zaangażowane są w transkrypcję i translację genów chloroplastowych oraz geny kodowane w genomie jądrowym, które odpowiedzialne są za import białek z cytozolu do stromy chloroplastów, syntezę błon tylakoidów, regulację różnicowania i rozwoju chloroplastów oraz syntezę chlorofilu. Następną grupą genów wybranych do analiz stanowią geny związane z różnicowaniem plastydów w amyloplasty, kodowane przez genom jądrowy oraz geny związane z funkcjonowaniem chloroplastów, kodowane w genomie chloroplastowym. Produkty tych genów wchodzi w skład fotoskładów I i II, kompleksu dehydrogenazy NADH oraz cytochromu  $b_6/f$ , bądź stanowią podjednostki syntazy ATP, uczestniczącej w syntezie ATP podczas fotosyntezy. Dodatkowo, wybrano geny z genomu jądrowego i chloroplastowego, kodujące dużą podjednostkę enzymu RubisCo. Dla wszystkich wybranych genów zidentyfikowano sekwencje kodujące, wykorzystując do tego bazy NCBI oraz CR-EST. Z wykorzystaniem aplikacji Primer3 zaprojektowano startery dla 26 genów, związanych z biogenezą chloroplastów, 6 genów, związanych z biogenezą amyloplastów i 40 genów zaangażowanych w fotosyntezę. Wszystkie startery zostały sprawdzone w reakcji RT-qPCR i dla wszystkich produktów amplifikacji uzyskano prawidłowe krzywe topnienia, świadczące o amplifikacji jednego produktu.

Coronado, M. J., G. Hensel, S. Broeders, I. Otto and J. Kumlehn. 2005. Immature pollen-derived doubled haploid formation in barley cv. Golden Promise as a tool for transgene recombination. *Acta Physiol. Plant.* 27: 591-599