

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 2015

Mikrospory i niedojrzałe ziarna pyłku zawierają proplastydy, które w procesie mikrosporogenezy *in vivo* rozwijają się zazwyczaj w amyloplasty, magazynujące skrobię i stanowiące źródło węglowodanów. Natomiast w procesie androgenozy *in vitro*, niezróżnicowane proplastydy mogą przekształcić się zarówno w amyloplasty, jak i w chloroplasty. Jeśli podczas androgenozy nie nastąpi różnicowanie proplastydów w kierunku funkcjonalnych chloroplastów, rośliny zregenerowane w kulturze *in vitro* będą albinotyczne. Wykazano, że rośliny albinotyczne zregenerowane z mikrospor zawierają amyloplasty lub plastydy zatrzymane w rozwoju, nie wiadomo jednak, jakie mechanizmy molekularne odpowiadają za brak przekształcenia proplastydów w chloroplasty. Nie prowadzono również badań nad porównaniem przekształceń proplastydów podczas rozwoju gametofitycznego mikrospor *in vivo* i sporofitycznego *in vitro*. 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 ubiegłym roku, na podstawie efektywności regeneracji w kulturze izolowanych mikrospor, spośród 20 genotypów jęczmienia jarego wybrano dwa, wykazujące wysoki poziom regeneracji roślin ogółem oraz maksymalnie różny udział roślin zielonych wśród ogółu regenerantów. Wytypowane odmiany do badań molekularnych to 'Jersey' i 'Mercada', które w bieżącym roku sprawozdawczym ponownie porównano pod względem poziomu regeneracji roślin, potwierdzając wyniki uzyskane w roku ubiegłym. Poziom regeneracji ogółem wyniósł średnio 100,8 roślin dla odmiany 'Jersey' oraz 87,4 roślin dla odmiany 'Mercada' na 100.000 wyizolowanych mikrospor. Zielone regeneranty stanowiły 93,8% regenerantów uzyskanych dla odmiany 'Jersey' i tylko 10,2% dla odmiany 'Mercada'. W ramach pierwszego tematu badawczego, dla wytypowanych odmian utworzono bibliotekę cDNA, obejmującą trzy etapy rozwoju ziaren pyłku *in vivo* (mikrospory w stadium wczesnym jednojądrowym, mikrospory w stadium średnio-późnym do późnego oraz dojrzałe ziarna pyłku), pięć etapów rozwoju mikrospor w kulturze *in vitro* (mikrospory po przedtraktowaniu, struktury wielokomórkowe po 7, 21, 35 i 43 dniach kultury) jak również zielone i albinotyczne regeneranty. Utworzona biblioteka jest wykorzystywana do analiz poziomu ekspresji genów związanych z biogenezą chloroplastów i amyloplastów oraz funkcjonowaniem chloroplastów w badaniach prowadzonych w niniejszym zadaniu

W ramach kolejnych tematów badawczych analizowano poziom ekspresji genów związanych z procesem transkrypcji w plastydach (biogeneza chloroplastów), kodowane zarówno w genomie plastydowym: geny *rpoA* (*RNA polymerase alpha subunit*), *rpoB* (*RNA polymerase beta subunit*), *rpoC1* (*RNA polymerase beta' subunit*), *rpoC2* (*RNA polymerase beta" subunit*); jak i w genomie jądrowym: *rpoTp* (*RNA polymerase T phage-like*), *sig2* (*sigma factor 2*), *sig6* (*sigma factor 6*). Analizowano również poziom ekspresji genów zlokalizowanych w genomie jądrowym, zaangażowanych w import białek do plastydów (geny *Toc159* (*translocase of chloroplast 159*) i *Tic21* (*translocon at inner membrane of chloroplasts21*)), oraz kodujących enzymy syntezy skrobi (geny *AgpS* (*Adenylyltransferase small subunit*) i *AgpP* (*Adenylyltransferase large subunit*)). Porównano profile ekspresji wymienionych wyżej genów podczas rozwoju pyłku *in vivo* oraz w kulturze mikrospor *in vitro*. Ponadto, w 35. i 43. dniu kultury oraz u zielonych i albinotycznych regenerantów określono również poziom ekspresji genów zlokalizowanych w genomie plastydowym kodujących podjednostki syntazy ATP zlokalizowanej w błonach tylakoidów w chloroplastach (geny *atpA* (*ATP synthase CF1 alpha subunit*), *atpB* (*ATP synthase CF1 beta subunit*), *atpE* (*ATP synthase CF1 epsilon subunit*), *atpF* (*ATP synthase CF0 subunit I*), *atpH* (*ATP synthase CF0 subunit III*) oraz *atpI* (*ATP synthase CF0 subunit IV*)).

Analiza poziomu ekspresji genów związanych z transkrypcją oraz importem białek do plastydów podczas rozwoju ziaren pyłku *in vivo* wykazała, że u odmiany 'Mercada', charakteryzującej się wysokim udziałem albinotycznych regenerantów, w mikrosporach w stadium średnio-późnym do późnego, stanowiącym stadium wyjściowe do kultury *in vitro*, wszystkie analizowane geny ulegały podwyższonej ekspresji (od 2 do nawet 50 razy) w stosunku do odmiany 'Jersey'. W przypadku siewek istotne różnice między odmianami obserwowano tylko dla genów *rpoA* oraz *rpoTp*. Wyniki te wskazują na odmienną dynamikę procesów związanych z rozwojem plastydów u obu odmian podczas rozwoju ziaren pyłku i brak takich różnic w rozwoju plastydów w tkankach wegetatywnych. Ekspresja większości analizowanych genów była znacząco obniżona w stadium dojrzałego pyłku, co wskazuje na zakończenie procesu różnicowania plastydów na tym etapie.

Przedtraktowanie mikrospor przez dwa dni w pożywce SMB1 wywołało zmiany w poziomie ekspresji większości genów w stosunku do mikrospor nieprzedtraktowanych, jednak zmiany te były odmienne u obu odmian. W odmianie 'Jersey' ekspresja wszystkich genów pochodzenia plastydowego (*rpoA*, *rpoB*, *rpoC1*, *rpoC2*) oraz większości genów jądrowych z wyjątkiem *tic21* i *toc159* uległa podniesieniu, podczas gdy u odmiany 'Mercada' zaobserwowano znaczące obniżenie ekspresji wszystkich genów po przedtraktowaniu. Należy przy tym zaznaczyć, że mimo zmian wywołanych przedtraktowaniem, poziom ekspresji większości genów u odmiany 'Mercada' pozostał istotnie wyższy niż u odmiany 'Jersey', podobnie do ekspresji tych genów w materiale wyjściowym dla kultur tj. w stadium średnio-późnym do późnego.

Analiza profilu ekspresji analizowanych genów podczas procesu androgenyzy wskazuje na ich znacznie wyższą ekspresję u odmiany 'Mercada', w stosunku do odmiany 'Jersey', szczególnie w późniejszych dniach kultury (35. i 43. dzień, a dla większości genów także 21. dzień kultury). Natomiast w 7. dniu kultury większość genów, poza dwoma genami kodowanymi w plastydowym DNA: *rpoA* i *rpoC1*, oraz kodowanym jądrowo *sig2*, wykazywała podobny poziom ekspresji u obu odmian. Transkrypcja genów zaangażowanych w syntezę skrobi we wszystkich analizowanych stadiach rozwoju ziaren pyłku *in vivo* i w kulturze *in vitro* była wyższa u odmiany 'Mercada' niż u odmiany 'Jersey'. Podczas procesu androgenyzy, transkrypcja obu genów rosła u obu odmian, jednak z zachowaniem wyższego poziomu ekspresji w odmianie 'Mercada', w stosunku do odmiany 'Jersey', w każdym etapie kultury *in vitro*. Wyniki te sugerują, że u odmiany 'Mercada' następuje wcześniejsze, niż u odmiany 'Jersey', różnicowanie plastydów w amyloplasty, hipoteza ta wymaga jednak potwierdzenia w dalszych eksperymentach.

Analiza poziomu ekspresji genów kodujących podjednostki syntazy ATP wykazała bardzo niską ekspresję tych genów w albinotycznych regenerantach, co wskazuje, że aparat fotosyntetyczny nie jest w pełni wykształcony u roślin albinotycznych. Co interesujące, zarówno w stadium siewki, jak i u zielonych regenerantów, odmiana 'Mercada' miała niższy poziom ekspresji badanych genów, w porównaniu z odmianą 'Jersey'. Wynik ten, razem z obserwacjami ekspresji genów związanych z syntezą skrobi w plastydach wskazuje, że obie odmiany mogą charakteryzować się odmienną dynamiką procesów zachodzących w plastydach na poziomie molekularnym. Dalsze badania są niezbędne do zweryfikowania tej hipotezy.

W roku 2015 przeprowadzono również analizy ultrastruktury plastydów podczas rozwoju mikrospor i dojrzewania ziaren pyłku *in vivo* u odmian 'Jersey' i 'Mercada'. Materiał badań stanowiły pylniki, zawierające mikrospory i ziarna pyłu w różnych stadiach rozwoju. Materiał ten został utrwalony i następnie pokrojony na ultracienkie skrawki i analizowany w transmisyjnym mikroskopie elektronowym, w celu opisanego ultrastruktury i określenia liczby plastydów. Proplastydy obecne były w trzech pierwszych stadiach (stadium tetrady, wczesno jednojądrowe oraz średnio-poźne), natomiast od stadium dwujądrowego obserwowano w plastydach odkładanie ziaren skrobi, co pozwala na zaliczenie tych organelli do amyloplastów. W dojrzałym ziarnie pyłku wszystkie z obserwowanych plastydów zawierały przynajmniej jedno ziarno skrobi. Dla trzech wybranych stadiów rozwojowych ziaren pyłku przeanalizowano również liczbę plastydów w przeliczeniu na powierzchnię, przy

czym pod uwagę brano wyłącznie obszar zajęty przez cytoplazmę. Porównanie otrzymanych wyników pozwoliło na wykazanie, że istotne statycznie różnice występują pomiędzy odmianami w stadium dwujądrowym. U odmiany 'Jersey' obserwowano w tym stadium blisko dwa razy więcej plastydów niż w odmianie 'Mercada'. Z kolei obserwacje dojrzałych ziaren pyłku wykazały obecność w nich licznych amyloplastów i brak różnic między odmianami pod względem ich ilości. Otrzymane wyniki wskazują, że niezbędne jest przeprowadzenie bardziej szczegółowych analiz, które pozwolą wyjaśnić wystąpienie różnic w liczbie plastydów oraz prześledzić dynamikę rozwoju amyloplastów u badanych odmian.