

**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 2016**

W procesie rozwoju ziaren pyłku *in vivo*, proplastydy zostają przekształcone w amyloplasty, których podstawową funkcją jest magazynowanie rezerw węglowodanów, wykorzystywanych następnie w promowaniu wzrostu łagiewki pyłkowej. Wykazano, że poziom zróżnicowania plastydów podczas rozwoju mikrospor jest związany z ich zdolnością do modyfikowania programu genetycznego i zmiany drogi rozwoju z gametofitycznego na sporofityczny w kulturze *in vitro*. Obecność ziaren skrobi świadczy o nieodwracalnym zróżnicowaniu mikrospor, które nie są już zdolne do zainicjowania procesu androgenyzy. Jeśli natomiast proces androgenyzy zostanie zainicjowany i w jego wyniku rozwiną się z mikrospor androgeniczne zarodki, obecne w nich proplastydy mogą rozwinąć się albo w funkcjonalne chloroplasty, albo niefunkcjonalne plastydy i wytworzyć, odpowiednio, normalnie zielone lub albinotyczne rośliny. 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

W badaniach wykorzystano dwie odmiany jęczmienia jarego 'Jersey' oraz 'Mercada' charakteryzujące się podobnym poziomem regeneracji roślin ogółem przy jednoczesnym maksymalnie różnym udziale roślin zielonych wśród regenerantów. Odmiana 'Jersey' charakteryzuje się wysokim poziomem natomiast odmiana 'Mercada' bardzo niskim poziomem regeneracji roślin zielonych. Celem prowadzonych badań było stwierdzenie czy różnice w poziomie regeneracji zielonych roślin między badanymi genotypami jęczmienia jarego związane są ze zmianami w budowie plastydów i liczbie kopii plastydowego DNA oraz z różnicami w ekspresji genów związanych z biogenezą chloroplastów i amyloplastów podczas rozwoju ziaren pyłku *in vivo*, czy też różnice te pojawiają się dopiero podczas androgenyzy i związane są z różną reakcją odmian na warunki w kultury *in vitro*. Analizy obejmowały 5 stadiów rozwoju ziaren pyłku *in vivo*: mikrospory w stadium wczesno jednojądrowym, w stadium średnim, w stadium średnio-późnym do późnego, w stadium dwujądrowym oraz dojrzałe ziarna pyłku; oraz 7 etapów kultury *in vitro* izolowanych mikrospor: mikrospory po przedtraktowaniu w pożywce SMB1; struktury wielokomórkowe i zarodki po 1, 3 i 5 tygodniach kultury w ciemności; zarodki po 3 dniach kultury na świetle; rośliny zielone i albinotyczne po 3 tygodniach od przeniesienia zarodków na pożywkę regenerującą. Wykonano szczegółową analizę ultrastruktury plastydów i ich zagęszczenia, określono poziom ekspresji genów zawartych w genomie jądrowym i plastydowym, związanych z różnymi procesami biogenezy plastydów (transkrypcja, translacja, replikacja genomu plastydowego, podziały plastydów) oraz genów związanych z funkcjonowaniem chloroplastów i biogenezą amyloplastów. Analizowano także liczbę kopii genomu plastydowego.

Analiza ultrastruktury plastydów podczas rozwoju pyłku *in vivo* wykazała, że proplastydy zawarte w mikrosporach najpierw rozpoczynają syntezę błon wewnętrznych, a następnie przekształcają się w amyloplasty, które można podzielić na niedojrzałe, rozpoczynające odkładanie skrobi oraz dojrzałe, w całości wypełnione ziarnem skrobi. Z użyciem transmisyjnego mikroskopu w mikrosporach na etapach wczesnym jednojądrowym (EU, early uninucleate) oraz średnio-późnym do późnego (ML-L, mid-late to late) wykazano wyższą liczbę plastydów u odmiany 'Jersey', w porównaniu do odmiany 'Mercada', jednak u

odmiany 'Mercada' obserwowano szybsze dojrzewanie plastydów. W stadium ML-L u odmiany Jersey obserwowano wyłącznie proplastydy nieodróżniane i różnicujące się, podczas gdy u odmiany 'Mercada' w tym samym stadium rozwojowym obecne były już zarówno młode jak i zróżnicowane amyloplasty. Z kolei, analizy zielonych regenerantów z kultur izolowanych mikrospor potwierdziły obecność w ich liściach w pełni wykształconych chloroplastów u obu odmian. Nie wykazano różnic w wielkości, kształcie czy ilości chloroplastów pomiędzy odmianami, chloroplasty obserwowane w komórkach miększu zawierały tylakoidy ułożone w grana. Natomiast w liściach albinotycznych regenerantów obu odmian plastydy były mniejsze od dojrzałych chloroplastów i nie zawierały gran. Jednakże, u odmiany 'Mercada' zdecydowana większość plastydów przypominała nieodróżniane proplastydy, a zaledwie w przypadku 12,8% plastydów zaobserwować można było obecność ciała prolamelarnego, wskazującego na początkowe etapy różnicowania. Natomiast u odmiany 'Jersey' większość z obserwowanych plastydów zawierała ciało prolamerlarne oraz zaczątki tylakoidów, wskazujące na ich różnicowanie.

Badane odmiany podczas rozwoju ziaren pyłku *in vivo* wykazały znaczące różnice w profilu ekspresji genów związanych z transkrypcją i translacją genów plastydowych. W stadium średnio-późnym do późnego (ML-L), czyli w stadium pobierania mikrospor do inicjacji kultury *in vitro*, różnice w poziomie ekspresji badanych genów między porównywanymi odmianami była bardzo wysoka. Relatywny poziom ekspresji u odmiany 'Mercada', w porównaniu z ekspresją tych samych genów u odmiany 'Jersey' był od 2 do 26 razy wyższy dla genów związanych z transkrypcją i od 2 do nawet 40 razy wyższy dla genów związanych z translacją. Analiza poziomu ekspresji genów związanych z biogenezą skrobi wykazała, że u odmiany 'Mercada' aparat do syntezy skrobi uruchamiany był już w stadium wczesno-średnim (EM, early-mid). Na tym etapie rozwoju mikrospor relatywny poziom ekspresji badanych genów był od 3 do nawet 500 razy wyższy u odmiany 'Mercada' w porównaniu do odmiany 'Jersey', a w stadium ML-L osiągał najwyższy poziom. U odmiany 'Jersey' uruchomienie ekspresji tych genów następowało w stadium ML-L, a poziom ekspresji był najwyższy w stadium dwujądrowym (BN, binucleate). Tym samym w stadium, w którym pobiera się mikrospory do kultur *in vitro*, relatywny poziom ekspresji analizowanych genów był znacząco wyższy u odmiany 'Mercada' niż u odmiany 'Jersey'.

Podczas rozwoju pyłku *in vivo* u odmiany 'Jersey' w mikrosporach w stadium EU liczba plastomów wyniosła średnio  $109 \pm 17$  kopii i na tym poziomie utrzymała się do stadium ML-L. Dopiero w stadium dwujądrowym doszło do znaczącego spadku liczby kopii genomów plastydowych u tej odmiany. U odmiany 'Mercada', w stadium EU liczba kopii genomu plastydowego była znacząco wyższa, niż u odmiany 'Jersey' (wyniosła średnio  $171 \pm 59$  kopii) i spadała istotnie w każdym kolejnym stadium rozwojowym. W stadium ML-L, czyli w stadium, w którym mikrospory są pobierane do kultur, liczba kopii plastomu u odmiany 'Mercada' była dwukrotnie niższa w porównaniu z tym samym stadium odmiany 'Jersey'.

Poziom ekspresji genów związanych z biogenezą plastydów, bezpośrednio po przedtraktowaniu pożywką SMB1 ulegał zmianom w odniesieniu do mikrospor w stadium ML-L, jednakże u obu badanych odmian wystąpiły odmienne tendencje zmian. U odmiany 'Jersey', bezpośrednio po przedtraktowaniu poziom ekspresji większości analizowanych genów był podwyższony w stosunku do mikrospor w stadium ML-L niepoddanych traktowaniu wstępnemu. U odmiany 'Mercada' ogólną tendencją obserwowaną po przedtraktowaniu pożywką SMB1 było obniżenie relatywnego poziomu ekspresji genów bądź brak zmian. Natomiast podczas trwania kultury *in vitro*, poza kilkoma wyjątkami, poziom

ekspresji analizowanych genów był podobny u obu odmian. W przeciwieństwie do rozwoju ziaren pyłku *in vivo*, ekspresja wszystkich genów związanych z syntezą skrobi została w kulturze *in vitro* zahamowana i w trakcie trwania kultury poziom jej był niższy, niż w materiale wyjściowym (stadium ML-L). Już po przedtraktowaniu mikrospor pożywką SMB1, relatywny poziom ekspresji wszystkich badanych genów u odmiany 'Mercada' uległ znaczącemu obniżeniu w stosunku do mikrospor w stadium ML-L, natomiast u odmiany 'Jersey' obniżenie poziomu ekspresji wystąpiło w 7 dniu kultury.

Relatywny poziom ekspresji genów związanych z fotosyntezą został określony w androgenicznych zarodkach po 43. dniach kultury *in vitro* oraz w zielonych i albinotycznych regenerantach. Nie wykazano znaczących różnic między odmianami w poziomie ekspresji badanych genów w androgenicznych zarodkach. W roślinach albinotycznych obu odmian poziom ekspresji genów *rRNA* oraz genów związanych z fotosyntezą był zdecydowanie niższy niż u zielonych regenerantów. Z kolei poziom ekspresji większości genów związanych z biogenezą plastydów u roślin albinotycznych odmiany 'Jersey' był niższy, niż u roślin zielonych, podczas gdy u odmiany 'Mercada' wiele genów ulegało podwyższonej ekspresji w odniesieniu do zielonych regenerantów. Wyniki te wskazują na nieprawidłowości w budowie aparatu fotosyntetycznego u roślin albinotycznych.

Podczas procesu androgenezy, po traktowaniu wstępnym pożywką SMB1 liczba kopii plastomu u obu odmian podwyższyła się, co sugeruje inicjację procesu replikacji genomu plastydowego. W większości badanych etapów kultury *in vitro* liczba kopii plastomu u odmiany 'Jersey' była znacząco wyższa w porównaniu do odmiany 'Mercada'. Między 21 a 35 dniem kultury nastąpił znaczący spadek ilości genomów plastydowych u obu odmian. Natomiast u roślin albinotycznych obu odmian wystąpiły bardzo duże różnice w liczbie kopii plastomów. W odmianie 'Jersey' liczba kopii genomów plastydowych była 3-krotnie niższa, w porównaniu do zielonych regenerantów tej odmiany, podczas gdy w odmianie 'Mercada', przeciwnie, liczba kopii genomów plastydowych u roślin albinotycznych była ponad dwukrotnie wyższa w stosunku do kopii plastomów u zielonych regenerantów tej odmiany. Wynik ten wskazuje na odmienne procesy związane z replikacją genomów plastydowych, zachodzące podczas regeneracji zarodków w rośliny u badanych odmian.