

**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 2017**

Do analiz wykorzystano dwie odmiany jęczmienia jarego 'Mercada' i 'Jersey', które charakteryzują się różną częstotliwością regeneracji roślin zielonych w kulturze izolowanych mikrospor. Odmiany te wybrano na podstawie wcześniejszych analiz wykonanych w roku 2014 w Katedrze Genetyki UŚ w ramach niniejszego zadania.

Celem tematu badawczego 1 było przygotowanie bibliotek do sekwencjonowania NGS plastomów odmian 'Mercada' i 'Jersey' z poszczególnych etapów kultury izolowanych mikrospor, tj. z mikrospor w stadium średnio-późnym do późnego (M-L, stadium wykorzystywane do inicjacji kultury) oraz zarodków w 21. i 46. dniu kultury *in vitro*, a także z zielonych i albinotycznych regenerantów. Biblioteki te będą sekwencjonowane w roku 2018. Dodatkowo, przygotowano biblioteki chloroplastowego DNA z siewek wzrastających na świetle obu odmian, które posłużą jako sekwencje referencyjne. Uzyskane wyniki w ramach tematu badawczego 1 posłużą w kolejnym roku do sprawdzenia, czy albinizm roślin uzyskiwanych z androgenicznych zarodków zależy od delekcji/rearanżacji genomów chloroplastowych u regenerujących z zarodków roślin i w jakim etapie kultury *in vitro* te zmiany zachodzą.

Kolejnym realizowanym celem (temat badawczy 2) było ustalenie co następuje ze zróżnicowanymi już plastydami po zastosowaniu przedtraktowania niezbędnego do indukcji procesu androgenyzy. Analiza obejmowała zarówno mikrospory *in vivo* w stadium M-L, mikrospory po zastosowaniu traktowania wstępnego pożywką SMB1 oraz początkowe etapy kultury izolowanych mikrospor (2., 4. oraz 7. dzień kultury) dwóch odmian jęczmienia. Materiał roślinny pozyskany na tych etapach posłużył do analizy ekspresji genów związanych z biogenezą oraz degradacją plastydów, określenia liczby kopii genomu plastydowego oraz do analiz morfologii plastydów. W mikrosporach w stadium M-L odmiany 'Jersey' obecne były wyłącznie proplastydy oraz eoplasty, stanowiące większość puli plastydów, natomiast u odmiany 'Mercada' obserwowano o połowę mniejszą, w odniesieniu do odmiany 'Jersey' liczbę eoplastów i podobną liczebnie pulę proplastydów. Ponadto, u odmiany 'Mercada' obecne były amyloplasty, które nie występowały u odmiany 'Jersey'. Przedtraktowanie mikrospor pożywką SMB1 nie wpłynęło na różnice w zagęszczeniu plastydów w cytoplazmie mikrospor, ani na udział poszczególnych typów plastydów w mikrosporach. Natomiast w 4. dniu kultury po raz pierwszy zaobserwowano u odmiany 'Jersey' obecność amyloplastów. Jednocześnie ponownie wzrósł udział proplastydów u odmiany 'Jersey', co skutkowało podobną liczebnością wszystkich trzech typów plastydów: proplastydów, eoplastów i amyloplastów na tym etapie kultury. U odmiany 'Mercada' najliczniejszą klasą pozostawały amyloplasty, których liczba była dwukrotnie wyższa w porównaniu do pozostałych typów plastydów.

W celu opisanego molekularnych aspektów rozwoju plastydów po zastosowaniu przedtraktowania, określono profil ekspresji genów związanych z biosyntezą skrobi oraz transkrypcją oraz translacją zachodzącą w plastydach. Relatywny poziom ekspresji genów związanych z biosyntezą skrobi już po przedtraktowaniu mikrospor pożywką SMB1 uległ znaczącemu obniżeniu w stosunku do mikrospor w stadium M-L u obu odmian, a w kulturze *in vitro* ekspresja tych genów była dalej zahamowana. Analiza poziomu ekspresji genów związanych z transkrypcją i translacją plastydową wykazała, że u odmiany 'Jersey', bezpośrednio po przedtraktowaniu, ekspresja większości analizowanych genów pozostawała na podobnym poziomie w stosunku do mikrospor w stadium M-L niepoddanych traktowaniu wstępnemu. W odróżnieniu od odmiany 'Jersey', u odmiany 'Mercada' ogólną tendencją obserwowaną po przedtraktowaniu pożywką SMB1 było obniżenie ekspresji tych

genów, wzrost ich ekspresji obserwowano dopiero w 7. dniu kultury. Analiza ekspresji genów związanych z proteolizą białek plastydowych i degradacją plastydów wykazała znacząco wyższy wzrost ekspresji tych genów u odmiany 'Jersey'. W mikrosporach w stadium M-L stwierdzono dwukrotnie niższą liczbę kopii plastomu u odmiany 'Mercada' w porównaniu do odmiany 'Jersey'. Podczas procesu androgenezy, po traktowaniu wstępnym pożywką SMB1 nastąpił wzrost liczby kopii plastomu u obu odmian, lecz znacznie wyższy u odmiany 'Mercada'.

Celem szczegółowego porównania różnicowania plastydów w regenerujących zarodkach obu odmian podczas ich konwersji w roślinki wykonano analizę poziomu ekspresji genów związanych z biogenezą plastydów oraz różnicowaniem się chloroplastów, określono liczbę kopii plastomów oraz morfologię plastydów (Temat badawczy 3). W analizie wykorzystano zarodki w 43. dniu kultury (po 3 dniach ekspozycji na światło) oraz zarodki na pożywce regenerującej, w 46., 50., i 55. dniu kultury, a także zregenerowane rośliny albinotyczne i zielone. Obserwacje mikroskopowe wykazały, że w 46. dniu kultury, w przypadku odmiany 'Jersey' zdecydowaną większość plastydów obecnych w pojedynczych komórkach miękiszu stanowiły zróżnicowane chloroplasty, a dodatkowo obserwowano niewielką frakcję etioplastów różnicujących się w chloroplasty. Natomiast u odmiany 'Mercada' obecne były eoplasty oraz etioplasty w podobnych proporcjach. W 50. i 55. dniu kultury u odmiany 'Jersey' obserwowano wyłącznie chloroplasty, a u odmiany 'Mercada', wśród badanych regenerantów nie znaleziono takich, które w swoich komórkach miękiszu posiadałyby chloroplasty. W przypadku wielkości, czy ultrastruktury chloroplastów pochodzących z liści zielonych regenerantów wzrastających na świetle nie odnotowano różnic między odmianą 'Jersey' i 'Mercada'. U obu odmian widoczne były dobrze zróżnicowane tylakoidy ułożone w grana, co świadczy o występowaniu w pełni zróżnicowanych chloroplastów. Oprócz chloroplastów nie obserwowano innych typów plastydów w liściach zielonych regenerantów. Jednakże, w liściach zielonych regenerantów odmiany 'Jersey' obserwowano wyższą liczbę chloroplastów, w porównaniu do odmiany 'Mercada'. W przypadku regenerantów albinotycznych, u obu odmian obserwowano wyłącznie eoplasty oraz etioplasty na różnych etapach różnicowania, rozpoczynając od etioplastów z kształtującym się ciałem prolamelarnym w przypadku odmiany 'Jersey', po etioplasty z zaczątkami tylakoidów występujące u odmiany 'Mercada', które jednak nigdy nie osiągały uporządkowania obserwowanego w chloroplastach. U odmiany 'Mercada' na pojedynczym przekroju przez komórkę miękiszu obserwowano istotnie statystycznie wyższą liczbę plastydów, jednak procentowy udział eoplastów i etioplastów u obu odmian był podobny. W żadnym przypadku nie obserwowano dojrzałych chloroplastów o wielkości i układzie tylakoidów podobnym do obecnych w zielonych regenerantach obu odmian.

Analiza ekspresji genów związanych z translacją wykazała, że u odmiany 'Jersey' geny kodujące cząsteczki 16S i 23S rRNA, wykazują stopniowy wzrost poziomu ekspresji w 46. i 50. dniu kultury, a następnie 6 i 8-krotny wzrost poziomu ekspresji w 55. dniu kultury. Takiego podwyższenia ekspresji nie zaobserwowano u odmiany 'Mercada' zarówno podczas procesu regeneracji, jak i w roślinach albinotycznych. Nie stwierdzono znaczących różnic pomiędzy odmianami, porównując profile ekspresji genów fotoreceptorów podczas procesu regeneracji roślinek w wyniku ekspozycji na światło. Jednakże, w przypadku odmiany 'Jersey', od 46. dnia kultury następował znaczący stopniowy wzrost ekspresji czynników transkrypcyjnych związanych z odpowiedzią na światło, co oznacza prawidłową indukcję przez fotoreceptory różnicowania chloroplastów pod wpływem światła. Nie obserwowano podobnego wzrostu ekspresji tych genów podczas regeneracji roślinek u odmiany 'Mercada', co oznacza zablokowanie różnicowania chloroplastów na etapie konwersji zarodków i zatrzymanie rozwoju plastydów u tej odmiany na etapie etioplastów. U odmiany 'Jersey' w 43. dniu kultury zidentyfikowano  $33 \pm 14$  kopie genomu plastydowego, którego liczba wzrastała podczas procesu regeneracji roślinek i osiągnęła poziom ok. 150 kopii w roślince zielonej. U odmiany 'Mercada' natomiast, liczba kopii plastomu w początkowych etapach regeneracji nie różniła się

znacząco w odniesieniu do odmiany 'Jersey' i od 43. do 55 dnia kultury również wzrastała, jednakże obserwowano znaczące różnice w liczbie kopii poszczególnych genów plastydowych. Podobne dysproporcje zaobserwowano w albinotycznych regenerantach odmiany 'Mercada', natomiast u zielonych regenerantów tej odmiany liczba kopii poszczególnych genów plastydowych była proporcjonalna, jednak liczba plastomów była dwukrotnie niższa, w porównaniu do odmiany 'Jersey'.

W celu określenia zależności pomiędzy stanem różnicowania plastydów podczas rozwoju pyłku *in vivo* a poziomem regeneracji roślin zielonych przeprowadzono analizę poziomu ekspresji genów kodujących enzymy uczestniczące w syntezie skrobi. U odmian, u których poziom regeneracji roślin zielonych był niższy niż 60% zaobserwowano znaczący wzrost poziomu ekspresji analizowanych genów w stadium wczesno-średnim. Wzrost poziomu ekspresji tych genów nie było obserwowany u odmian, które w kulturze izolowanych mikrospor produkowały powyżej 60% roślinek zielonych. Wykazano silną, pozytywną korelację pomiędzy poziomem regeneracji roślin albinotycznych, a poziomem ekspresji analizowanych genów w stadium EM. Proste barwienie z wykorzystaniem płynu Lugola wykazało, że w mikrosporach w stadium M-L odmian produkujących poniżej 60% roślin zielonych zaobserwowano zabarwione ziarna skrobi, świadczące o obecności amyloplastów.