

**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 2018**

Głównym tematem badawczym realizowanym w roku 2018 w ramach zadania nr 25 było sekwencjonowaniem genomów plastydowych izolowanych w różnych dniach kultury *in vitro* izolowanych mikrospor i androgenicznych regenerantów. Celem tematu było określenie sekwencji i integralności genomów plastydowych dla sprawdzenia czy przyczyną albinizmu roślin uzyskiwanych z androgenicznych zarodków mogą być mutacje genowe i delecje/rearanżacje ich genomów plastydowych i, jeśli zmiany takie mają miejsce, w jakim etapie kultury *in vitro* zachodzą. Dla ustalenia sekwencji i integralności genomów plastydowych wykorzystano sekwencjonowanie NGS oraz analizę bioinformatyczną uzyskanych wyników.

Przygotowane w 2017 roku biblioteki NGS zostały zsekwenconowane w sekwenatorze Illumina HiSeq 4000 w Centrum Analiz Genomowych Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku. W poprzednim roku realizacji zadania przygotowano biblioteki z DNA pochodzącego z mikrospor w stadium średnio-późnym (ML, tj. stadium wykorzystywane do inicjacji kultury izolowanych mikrospor) oraz zarodków w 21. i 46. dniu kultury *in vitro*, a także z zielonych i albinotycznych regenerantów. Badania prowadzono w trzech powtórzeniach biologicznych dla dwóch odmian jęczmienia jarego 'Jersey' i 'Mercada', które różnią się poziomem 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.

Przeprowadzone analizy wykazały brak różnic w sekwencji chloroplastowego DNA między odmianami 'Morex' (genom referencyjny), 'Mercada' i 'Jersey'. Ponadto, wykazano, że zielone regeneranty uzyskane w kulturach izolowanych mikrospor z odmian 'Mercada' i 'Jersey' posiadają genomy chloroplastowe identyczne jak siewki roślin wyjściowych. Co ciekawe jednak, stwierdzono znaczny poziom zmian w sekwencji genomu chloroplastowego mikrospor *in vivo* w czasie pobierania materiału do kultur (stadium ML) oraz zarodków w 21. dniu kultury. Zmiany te dotyczyły szeregu mutacji, precyzyjnie zlokalizowanych we fragmencie genomu chloroplastowego obejmującego region od nukleotydu 35093 do 41800. Zidentyfikowane mutacje prowadziły do zmiany sensu szeregu aminokwasów w genach *atpA*, *rps14*, *psaB*, *psaA*, oraz zmian nukleotydów w genach tRNA *trnM-CAU*, *trnR-UCU*, *trnS-GGA*, *trnL-UAA* i *trnF-GAA*. Mutacje występowały w genomach chloroplastowych zarówno odmiany 'Mercada' jak i 'Jersey'. Co szczególnie interesujące, zarodki pochodzące z 46. dnia kultury odmiany 'Mercada' wykazywały się podobnym profilem mutacyjnym jak mikrospory w stadium ML oraz zarodki w 21. dniu kultury tej odmiany, natomiast zarodki pochodzące z 46. dnia kultury odmiany 'Jersey' posiadały genom plastydowy identyczny jak chloroplasty roślin wyjściowych, czyli bez mutacji, lub wykazywały tylko kilka mutacji cichych. Wykazano więc, że zarodki analizowane

w 46. dniu kultury izolowanych mikrospor znacznie różnią się pomiędzy odmianami. Zarodki odmiany 'Mercada' posiadały genomy plastydowe z mutacjami zmiany sensu w kluczowych genach związanych z fotosyntezą oraz z translacją białek, natomiast zarodki odmiany 'Jersey' posiadały plastydy z genomami bez zmian mutacyjnych prowadzących do zmian w funkcji genów. Co istotne, albinotyczne regeneranty obu odmian (stanowiące tylko kilka procent regenerantów u odmiany 'Jersey' i ponad 90% regenerantów u odmiany 'Mercada') wykazały istnienie zmian mutacyjnych identycznych jak zmiany obserwowane w 46. dniu kultury u odmiany 'Mercada'.

Na podstawie uzyskanych wyników można postawić hipotezę, że mechanizmy kontroli i reperacji DNA w plastydach mikrospor jęczmienia są zahamowane lub nie funkcjonują prawidłowo, co prowadzi do wystąpienia szeregu zmian mutacyjnych w genomach plastydowych. W rezultacie, genomy plastydowe mikrospor wykazują się dużą zmiennością mutacyjną – jednak wśród genomów zmutowanych identyfikuje się również genomy o prawidłowej, niezmięnionej sekwencji. W toku prowadzenia kultury, w dniu 21. dniu, ta zmienność mutacyjna obserwowana jest w dalszym ciągu zarówno u odmiany 'Mercada' jak i 'Jersey'. W dalszym procesie prowadzenia kultury, u odmiany 'Jersey' następuje selekcja zarodków z prawidłowymi genomami plastydowymi i w konsekwencji dochodzi do regeneracji głównie zarodków prawidłowych, fotosyntetyzujących. W przypadku odmiany 'Mercada' taka selekcja nie ma miejsca – zarodki w 46. dniu kultury bardzo często posiadają zmutowane genomy plastydowe. W rezultacie większość zregenerowanych roślin odmiany 'Mercada' to mutanty albinotyczne, niezdolne do fotosyntezy.