

IWONA SZAREJKO
MONIKA GAJECKA
MIROSLAW KWAŚNIEWSKI
MAREK MARZEC
BEATA CHMIELEWSKA
JANUSZ JELONEK
JUSTYNA ZBIESZCZYK

Katedra Genetyki, Uniwersytet Śląski w Katowicach

Kierownik Tematu: Prof. dr hab. Iwona Szarejko Uniwersytet Śląski w Katowicach, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Katedra Genetyki ul. Jagiellońska 28, 40-032 Katowice, tel. (32) 2009570, fax. (32) 2009396, e-mail: iwona.szarejko@us.edu.pl

Prace zostały wykonane w ramach badań podstawowych na rzecz postępu biologicznego w produkcji roślinnej na podstawie decyzji Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi nr HOR.hn.802.7.2018, Zadanie 25.

Molekularne podstawy zjawiska albinizmu w kulturach izolowanych mikrospor jęczmienia

Molecular basis of albinism in barley isolated microspore culture

Słowa kluczowe: albinizm, amyloplasty, androgeneza, kultura izolowanych mikrospor, plastyd

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 androgenезy, Szczególnie u jęczmienia, wysoka częstotliwość regeneracji roślin albinotycznych, dochodząca u wielu genotypów do 90% regenerantów, znacząco obniża praktyczne wykorzystanie procesu androgenезy w programach hodowlanych tego gatunku. Rośliny albinotyczne zawierają нефункционалне chloroplasty, co powoduje, że ich wzrost poza kulturą *in vitro* nie jest możliwy.

Mikrospory i niedojrzałe ziarna pyłku zawierają proplastydy, które w procesie mikrosporoģenezy *in vivo* rozwijają się zazwyczaj w amyloplasty, magazynujące skrobię i stanowiące źródło węglowodanów (Clement i Pacini, 2001). Natomiast w procesie androgenезy *in vitro*, niezróznicowane proplastydy mogą przekształcić się zarówno w amyloplasty, jak i w chloroplasty. Plastydy posiadają genom, który występuje

w postaci wielu kopii kolistego DNA. Genom chloroplastowy jęczmienia jest kolistą, dwuniciową cząsteczką DNA o długości 136.462 pz. Zawiera on sekwencje ok. 140 genów, w tym geny dla polimerazy RNA, tRNA, rRNA, podjednostki rybosomów i białek będących podjednostkami enzymów uczestniczących w fotosyntezie (Pyke, 2007). Zarówno rozwój plastydów, jak i inicjacja różnicowania plastydów w chloroplasty pod wpływem światła pozostają pod kontrolą jądra komórkowego, w którym kodowane są czynniki transkrypcyjne oraz większość białek wymaganych dla funkcjonowania plastydów (Pyke, 2007; Sakamoto i in., 2008). Badania ultrastrukturalne wykazały, iż rośliny albinotyczne zregenerowane z mikrospor zawierają amyloplasty lub plastydy zatrzymane w rozwoju, lecz nie zidentyfikowano przyczyn obserwowanych defektów (Caredda i in., 2004). Wykazano, iż rośliny albinotyczne uzyskane w procesie androgenezy posiadają delecje lub reorganizacje w genomie chloroplastowym (Day i Ellis, 1985), jednakże zidentyfikowano także rośliny albinotyczne posiadające niezmienny genom chloroplastowy. Rośliny te wykazywały jednak zmiany w poziomie transkrypcji lub zaburzenia w procesie translacji genów chloroplastowych (Ankele i in., 2005). Nie stwierdzono dotąd jednoznacznej przyczyny albinizmu u roślin zregenerowanych w procesie androgenezy, jak również nie określono przyczyn regeneracji roślin albinotycznych zależnej od genotypu.

Głównym tematem badawczym realizowanym w roku 2018 w ramach zadania nr 25 było sekwencjonowanie genomów plastydowych izolowanych w różnych dniach kultury *in vitro* izolowanych mikrospor i androgenicznych regenerantów jęczmienia. 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/rearanzacje 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 zsekwencjonowane w sekwenatorze Illumina HiSeq 4000 w Centrum Analiz Genomowych Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku. Biblioteki te pochodziły z DNA wyizolowanego z mikrospor w stadium średnio-późnym (ML, tj. stadium wykorzystywane do inicjacji kultury izolowanych mikrospor) oraz z androgenicznych zarodków w 21. i 46. dniu kultury *in vitro*. Analizowano także plastydowe DNA zielonych i albinotycznych regenerantów oraz 10-dniowych siewek. Badania prowadzono w trzech powtórzeniach biologicznych dla dwóch odmian jęczmienia jarego 'Jersey' i 'Mercada', które w kulturze izolowanych mikrospor wykazały podobny poziom regeneracji roślin ogółem, lecz różniły się poziomem regeneracji roślin zielonych. Odmiana 'Jersey' produkuje ponad 90% zielonych regenerantów, podczas gdy ponad 90% regenerantów odmiany 'Mercada' to rośliny albinotyczne. Odmiany te wybrano na podstawie wcześniejszych doświadczeń wykonanych w roku 2014 w Katedrze Genetyki UŚ w ramach niniejszego zadania.

Przeprowadzone analizy wykazały brak różnic w sekwencji chloroplastowego DNA między siewkami odmian '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 mikrospor i 21-dniowych zarodków zarówno odmiany 'Mercada' jak i 'Jersey'.

Co szczególnie interesujące, zarodki pochodzące z 46. dnia kultury odmiany 'Mercada' charakteryzowały 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 'Jersey' i 'Marcada'. 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 ich genomach plastydowych. W rezultacie, genomy plastydowe mikrospor wykazują się dużą zmiennością mutacyjną, jednak wśród genomów zmutowanych identyfikuje się również genomy o prawidłowej, niezmienionej 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 prawidłowo 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 plastydowe, niezdolne do fotosyntezy.

LITERATURA

- Ankele E., Heberle-Bors E., Pfosser M. F., Hofinger B. J. 2005. Searching for mechanisms leading to albino plant formation in cereals. *Acta Physiol. Plant.* 27: 651 — 664.

- Caredda S., Devaux P., Sangwan R. S., Prout I., Clément C. 2004. Plastid ultrastructure and DNA related to albinism in androgenetic embryos of various barley (*Hordeum vulgare*) cultivars. *Plant Cell. Tissue Organ Cult.* 76: 35 — 43.
- Clement C., Pacini E. 2001. Anther plastids in Angiosperms. *Bot. Rev.* 67: 54 — 73.
- Day A., Ellis, T. H. N. 1985. Deleted forms of plastid DNA in albino plants from cereal anther culture. *Curr. Genet.* 9: 671 — 678.
- Pyke K. 2007. Plastid biogenesis and differentiation. In: *Cell and Molecular Biology of Plastids*: 51 — 79.
- Sakamoto W., Miyagishima S., Jarvis P. 2008. Chloroplast Biogenesis: Control of Plastid Development, Protein Import, Division and Inheritance. In: *The Arabidopsis Book*: 1.