

**Raport HOR hn. 802.15.2018 umieszczony na stronie internetowej IFR PAN:**

## **Raport 2018**

Projekt MRiRW, zadanie numer 84: Identyfikacja czynników determinujących efektywność otrzymywania podwojonych haploidów żyta (*Secale cereale* L.) metodami androgenezy i krzyżowań oddalonych.

Dotacja MRiRW: HOR hn. 802.15.2018

Temat badawczy 1/2018: Identyfikacja fizjologicznego podłoża warunkującego efektywną produkcję DH żyta

Z uwagi na wzrastające zainteresowanie żytem w przemyśle paszowym i spożywczym, istotnym jest przyspieszenie hodowli tego zboża. Zastosowanie metod biotechnologicznych, w tym haploidyzacja na drodze androgenezy, pozwala na szybkie wyprowadzanie nowych, dostosowanych do potrzeb rynku rolnego odmian, stanowiąc konkurencję dla organizmów genetycznie zmodyfikowanych. Zasadniczą trudność w opracowaniu protokołu efektywnej produkcji podwojonych haploidów DH żyta stanowi jednak zmienność genotypowa oraz wrażliwość roślin donorowych/eksplantów na warunki wzrostu i rozwoju. Dodatkowy problem stanowią zahamowanie rozwoju zaindukowanych androgenicznych struktur zarodkowych (SA) na wczesnym etapie kultury *in vitro* oraz nieprawidłowy przebieg czy nawet brak regeneracji SA w rośliny. Z tych względów, bardzo istotna jest identyfikacja czynników fizjologicznych warunkujących zwiększoną efektywność haploidyzacji żyta w androgenezie na etapach indukcji oraz regeneracji DH.

Celami nadrzędnymi realizowanego w 2018 roku projektu była **identyfikacja fizjologicznego podłoża warunkującego efektywną produkcję DH żyta**.

Celami pośrednimi były: (1) Określenie związku pomiędzy aktywnością wybranych enzymów antyoksydacyjnych a podatnością/lub jej brakiem na indukcję i/lub regenerację sporofitowego rozwoju gametofitu męskiego na etapie wstępnego traktowania indukującego androgenezę w kulturze pylników, (2) Ustalenie wpływu warunków wstępnego traktowania kłosów w metodzie indukcji androgenezy w kulturze pylników/izolowanych mikrospor na aktywność enzymatycznych składników systemu antyoksydacyjnego w pylnikach ze modyfikowaną aktywnością peroksydazy glutationowej Gpx, (3) Ustalenie wpływu warunków wstępnego traktowania kłosów w metodzie indukcji androgenezy w kulturze pylników na zawartość endogennego poziomu glutationu w pylnikach ze modyfikowaną aktywnością peroksydazy glutationowej Gpx, (4) Określenie związku pomiędzy fragmentacją DNA *in situ* (inaczej programowaną śmiercią komórki PCD) a podatnością/lub jej brakiem na indukcję sporofitowego rozwoju gametofitu męskiego w kulturze pylników i izolowanych mikrospor

W przeprowadzonych badaniach rozpoznano, jak aktywowany jest system antyoksydacyjny (aktywność enzymów szlaku glutationowego oraz stężenia glutationu) w pylnikach żyta wyizolowanych z kłosów poddanych traktowaniu wstępnemu. Przedstawiono różnice pomiędzy liniami pogrupowanymi w kategorii podatności na indukcję androgenezy, traktowaniami kłosów a aktywnością komórkowego systemu antyoksydacyjnego. Przedstawiono trójskładnikowość systemu enzymatycznego odpowiadającego za rozkładanie, czyli „zmiatanie” wolnych rodników ROS w kontekście endogennego stężenia glutationu. Wykazano, że peroksydaza GPX i reduktaza GR glutationowa są enzymami, dzięki aktywności których komórki, w pylnikach poddanych indukcji androgenezy, skutecznie bronią się przed konsekwencjami nadmiernej produkcji i akumulacji ROS. Wykazano, że zastosowane traktowania kłosów (LT, LT\_Mn, LT\_GSH, LT\_Mn\_GSH) różnicują aktywność tych enzymów. W kontekście badań enzymatycznych pokazano, w analizie statystycznej PCA, dodatnie zależności pomiędzy parametrem AS/Spike (efektywność indukcji androgenezy) oraz regeneracji  $R_{Total}/Spike$  a parametrem aktywności GST (po traktowaniu LT\_control) lub dodatnią zależność pomiędzy parametrem regeneracji  $R_{Total}/Spike$  a parametrem aktywności GR w kulturze pylników (po traktowaniu LT\_Mn\_GSH).

Chemiczne modyfikacje (SS, LNAC) aktywności peroksydazy glutationowej GPX, w kłosach wstępnie traktowanych, wpłynęły na zmiany w aktywności wszystkich badanych enzymatycznych składników systemu antyoksydacyjnego: GPX, GR i GST. Najwięcej różnic istotnych statystycznie zanotowano dla GPX. Znalaziono dodatnią zależność pomiędzy parametrem AS/Spike (efektywność indukcji androgeny) oraz regeneracji  $R_{Total}/Spike$  a parametrem aktywności GST (po traktowaniu LT\_control) oraz dodatnią zależność pomiędzy parametrem regeneracji  $R_{Total}/Spike$  a parametrem aktywności GR w kulturze pylników. Wzrost aktywności reduktazy i transferazy glutationowej, po traktowaniu SS, wiązało się z poprawą efektywności indukcji androgeny u linii opornych i średnio podatnych. Oddziaływanie na aktywność peroksydazy glutationowej GPX, w kłosach wstępnie traktowanych, wpłynęło na zmiany w zawartości endogenego glutationu w tkance pylników. Tendencja we wzroście stężenia GSH, po traktowaniu Mn\_GSH\_SS w mikrosporach linii opornych i średnio podatnych na tym etapie indukcji korzystnie przełożyła się na parametry wyższej efektywności indukcji androgeny u linii opornych i średnio podatnych. Zaobserwowano istotną statystycznie zależność pomiędzy zawartością endogenego glutationu w tkance pylników a podatnością na indukcję androgeny.

W doświadczeniu poświęconym analizie fragmentacji DNA *in situ* (inaczej programowaną śmiercią komórki PCD) w kontekście podatności/lub jej braku na indukcję sporofitowego rozwoju gametofitu męskiego w kulturze zawieszinowej mikrospor, wyjaśniono przyczynę wysokiej śmiertelności mikrospor/zarodków androgenicznych w stadium globularnym. Stwierdzono, że na skutek uszkodzenia jąder komórkowych poprzez fragmentację DNA w procesie programowanej śmierci komórki (PCD), obniżeniu ulega żywotność mikrospor poddawanych indukcji androgeny na etapie wstępnego traktowania kłosów oraz zahamowany zostaje rozwój struktur androgenicznych na etapie kultury *in vitro*.

W związku z tym, że śmierć komórki oraz związana z nią aktywność programowanej śmierci komórki PCD można zmniejszyć poprzez dodanie do kultury *in vitro* substancji chroniących przed uszkodzeniami oksydacyjnymi, w tym hamujących produkcję wolnych rodników np. N-Acetyl-L-cysteinę (LNAC) lub działanie proteolitycznych kaspaz Ac-YVAD-cmk, zastosowano dwuetapowe traktowanie LNAC/SS lub jednoetapowe inhibitorem kaspaz Ac-DEVD-CHO. Wykazano, że zaproponowane traktowanie SS/LNAC (na etapie wstępnego traktowania kłosów) korzystnie wpływało na: ochronę DNA przed uszkodzeniami związanymi ze stresem indukującym proces androgeny, przeżywalność mikrospor zarówno u linii opornych, jak i podatnych, efektywność procesu androgeny w kulturze izolowanych mikrospor i pylników. Udowodniono, że przyczyną obumierania 6-godniowych zarodków jest nie tylko fragmentacja DNA, ale także aktywność kaspazy 1. Przedstawiono, że zastosowanie w kulturach izolowanych mikrospor inhibitorów PCD: caspase 1-inhibitor lub caspase 1-inhibitor z LNAC poprawia wydajność procesu indukcji, a u linii opornych takie traktowanie w ogóle umożliwia uzyskanie struktur androgenicznych. Test TUNEL w całej tkance 'whole mount' zarodków androgenicznych żyta pozwolił na ocenę jakości AS. Wykazano obecność licznych jąder pozytywnie wyznakowanych w kierunku PCD, której uruchomienie powodowało obumieranie SA.