

Osiągnięcia projektu (w punktach)

1. Zoptymalizowanie metody ekstrakcji białek z pylników pszenżyta ozimego i ich rozdziału z wykorzystaniem elektroforezy dwuwymiarowej uzupełniło i poszerzyło zakres badań zespołu badawczego Zakładu Biologii Komórki IFR PAN.
2. Zakup specjalistycznego oprogramowania – PDQuest ver 8.0 umożliwiającego analizy bioinformatyczne, takie jak porównanie profili białkowych pomiędzy badanymi obiektami wzbogaciło zaplecze badawcze IFR PAN. Program ten, zostanie wykorzystany w realizacji innych projektów naukowych, m. in w realizowanym obecnie projekcie finansowanym z Ministerstwa Rolnictwa „Identyfikacja czynników determinujących odporność jęczmienia ozimego (*Hordeum vulgare* L.) na suszę i mróz”.
3. Realizacja projektu umożliwiła nawiązanie współpracy ramowej z Uniwersytetem Jagiellońskim – Wydziałem Chemii w Krakowie oraz z Instytutem Genetyki i Biotechnologii Roślin Słowackiej Akademii Nauk w Nitrze.
4. Dr Monika Krzewska poprzez nowo nabyte umiejętności wzbogaciła swoje doświadczenie i rozwój naukowy.
5. Część uzyskanych wyników projektu, dotycząca badania efektywności procesu androgenyzy w kulturach pylnikowych została włączona w rozprawę doktorską dr Moniki Krzewskiej.
6. Wyniki zrealizowanego projektu posłużyły do opracowania dwóch manuskryptów, które są obecnie na ukończeniu. Ich publikacja planowana jest w czasopiśmie międzynarodowym.
7. Zidentyfikowane białka potencjalnie związane z podatnością na indukcję androgenyzy mogą być w przyszłości wykorzystane do udoskonalenia technologii wyprowadzania podwojonych haploidów pszenżyta, pszenicy czy żyta.

Uzyskane wyniki (krótki opis)

Populacja mapująca pszenżyta ozimego wyprowadzona z mieszańca F1 „Saka 3006” × „Modus”, obejmująca 90 linii podwojonych haploidów (*ang. doubled haploids*, DHs) została oceniona pod względem efektywności procesu androgenyzy. Badania przeprowadzono w warunkach *in vitro* z wykorzystaniem kultur pylnikowych. Do oceny efektywności procesu androgenyzy wybrano parametry opisujące:

- zdolność do indukcji procesu androgenyzy: SA/100P - liczba uzyskanych struktur androgenicznych (SA) w przeliczeniu na 100 pylników (P) rośliny macierzystej;
- zdolność do regeneracji uzyskanych struktur androgenicznych: ZR/100SA - liczba struktur androgenicznych regenerujących zielone rośliny (ZR) w przeliczeniu na 100 SA pasażowanych na pożywkę regeneracyjną, AR/100SA - liczba SA regenerujących rośliny albinotyczne (AR) w przeliczeniu na 100 SA pasażowanych na pożywkę regeneracyjną, oraz R/100SA - liczba wszystkich regenerujących struktur androgenicznych (R) w przeliczeniu na 100 SA;
- końcową efektywność procesu androgenyzy: ZR/100P - liczba struktur androgenicznych regenerujących zielone rośliny (ZR) w przeliczeniu na 100 pylników (P) rośliny macierzystej, AR/100P - liczba SA regenerujących rośliny albinotyczne (AR) w przeliczeniu na 100 P, R/100P - liczba wszystkich regenerujących struktur androgenicznych (R) w przeliczeniu na 100 P.

Każda linia została oceniona według wybranych kryteriów a średnia danego parametru została policzona przynajmniej z sześciu powtórzeń (szalka zawierająca 100 pylników). Populacja wykazała szerokie spektrum odpowiedzi androgenicznej: średnia liczba uzyskanych struktur androgenicznych w przeliczeniu na 100 pylników zawierała się w przedziale od 5 do 183, całkowita ilość uzyskanych regeneratów wyniosła od 2 do 31, przy czym roślin zielonych otrzymano od 1 do 18 a roślin albinotycznych 1 do 19 w przeliczeniu na 100 struktur androgenicznych. Z kolei końcowa efektywność procesu androgenyzy zawierała się w przedziale od 0 do 28 R/100P, 0 do 11 AR/100P oraz od 0 do 23 ZR/100P. Na podstawie uzyskanych wyników dokonano selekcji czterech linii DH o wysokim (DH28, DH47) oraz o niskim (DH19, DH72) stopniu efektywności procesu androgenyzy. Linie te były obiektem dalszych analiz mających na celu zidentyfikowanie białek różnicujących badane obiekty a tym samym określenie tych białek, które mogą być bezpośrednio związane z wysoką efektywnością procesu androgenyzy.

Pula białek została wyekstrahowana z pylników pobieranych ze świeżo ściętych kłosów oraz z kłosów traktowanych niską temperaturą (3tyg w 4C), która inicjuje proces androgenyzy w przypadku pszenżyta ozimego. Do ekstrakcji wykorzystano metodę fenolową, która okazała się być najbardziej efektywna spośród trzech testowanych. Białka rozdzielono za pomocą elektroforezy dwuwymiarowej a otrzymane żele porównano według następującego schematu:

- profil białkowy z pylników kontrolnych vs. profil białkowy pylników po traktowaniu chłodem,
- profil białkowy linii DH o wysokiej efektywności procesu androgenyzy vs. profil białkowy pylników z linii DH o niskim stopniu odpowiedzi androgenicznej (kłosa kontrolne)
- profil białkowy linii DH o wysokiej efektywności procesu androgenyzy vs. profil białkowy pylników z linii DH o niskim stopniu odpowiedzi androgenicznej (kłosa chłodzone)

Dla każdej badanej linii DH wykonano po trzy powtórzenia biologiczne. Analizy bioinformatyczne wykonano przy użyciu specjalnego oprogramowania PDQuest ver. 8.0 (Bio-Rad).

Dzięki porównaniu profili białkowych pomiędzy pylnikami kontrolnymi a poddanymi czynnikowi inicjującemu androgenyzę (chłód) wybrano plamy białkowe, które są najprawdopodobniej związane z zaaplikowanym stresem. Z wybranych 26 plam do identyfikacji udało się określić 13 białek, których akumulacja wzrastała po wstępnym traktowaniu kłosów niską temperaturą. Były to białka związane z:

- odpowiedzią na stres: białka szoku cieplnego (heat shock cognate 70 kDa protein), białko wiążące RNA indukowane niską temperaturą (low temperature-responsive RNA-binding protein) czy peroksydaza askorbinianowa (L-ascorbate peroxidase 1);
- metabolizmem komórki: beta galaktozydaza (Beta-galactosidase 1), peroksydaza fosfoglicerynianowa (Phosphoglycerate kinase, chloroplastic), czy kinaza ksylulozowa (Xylulose kinase);
- z biosyntezą białek: czynnik elongacyjny Tu (Elongation factor Tu, chloroplastic), rodzina izomeraz disiarczkowych białek (Protein disulfide isomerase family protein 1-2).

Zidentyfikowano również białka, które przed aplikacją czynnika stresowego różnicowały linie o wysokim stopniu efektywności procesu androgenyzy. Do tych białek należały m.in.: aminotransferaza asparaginianowa (Aspartate aminotransferase, mitochondrial), fosforybulokinaza (Phosphoribulokinase), białko przetwarzające macierzy (Mitochondrial-processing peptidase subunit alpha), czy V-ATPaza (V-type proton ATPase subunit B 1). Zaangażowane są one głównie w procesy metaboliczne, energetyczne oraz biorą udział w biosyntezie białek.

Kolejne 12 białek, które zidentyfikowano to białka najprawdopodobniej związane bezpośrednio z wysoką efektywnością procesu androgenezy. Sześć spośród nich bierze udział w przemianach metabolicznych, np. syntaza S-adenozylometioniny (S-adenosylmethionine synthase), czy beta-amylaza (Beta-amylase). Ponadto trzy białka związane z odpowiedzią rośliny na czynniki stresowe również wykazały większy stopień akumulacji w pylnikach linii DH o wysokim stopniu efektywności procesu androgenezy. Do tych białek należy jeden z homologów białka stresu cieplnego (Heat shock cognate 70 kDa protein 4). Większą akumulację zanotowano również w przypadku białek zapasowych, takich jak: globuliny 12S i 11S (12S seed storage globulin 1, 11S globulin seed storage protein 2) czy związanych z przemianami energetycznymi: syntaza ATP (ATP synthase CF1 beta subunit (chloroplast)). Podsumowując, określenie stopnia zróżnicowania pod względem efektywności procesu androgenezy w badanej populacji, pozwoliło na wyselekcjonowanie linii o wysokim i niskim stopniu efektywności tego procesu. Kolejne analizy z wykorzystaniem elektroforezy dwuwymiarowej i analiz bioinformatycznych posłużyły do wytypowania i identyfikacji białek potencjalnie związanych z odpowiedzią na stres aplikowany w celu inicjacji procesu androgenezy jak i tych białek, które mogą być markerami oceny wysokiej efektywności procesu androgenezy.

Realizowane cele (które cele założone we wniosku o finansowanie projektu udało się zrealizować, a które nie i dlaczego; czy i jakie dodatkowe cele osiągnięto)

Głównym celem przeprowadzonych badań było poszerzenie wiedzy na temat fizjologicznego podłoża procesu androgenezy poprzez analizę i identyfikację białek regulujących indukcję i warunkujących efektywność tego procesu. Cel ten został osiągnięty – zidentyfikowano łącznie 31 białek zaangażowanych zarówno w odpowiedź na czynniki stresowe jakim poddane są mikrospory jak i te białka, które są związane z efektywnością procesu androgenezy. Nowe informacje, które zostały uzyskane dzięki realizacji tego projektu mogą posłużyć w dalszej pracy do udoskonalenia technologii wyprowadzania podwojonych haploidów zarówno pszenżyta jak i pokrewnych gatunków – żyta i pszenicy. Dodatkowym celem, który został osiągnięty było udoskonalenie metod analitycznych wykorzystywanych w analizie profili białkowych. Zoptymalizowano metodę ekstrakcji białka z pylników pszenżyta przy użyciu fenolu, jak i sam sposób rozdziału białek za pomocą elektroforezy dwuwymiarowej (2D). Poszerzono warsztat badawczy IFR PAN o specjalistyczne oprogramowanie do obróbki i analizy uzyskanych elektroforegramów, który będzie stanowił niezbędne narzędzie do realizacji kolejnych eksperymentów prowadzonych w ramach nowych projektów badawczych. Ponad to nawiązano współpracę z Uniwersytetem Jagiellońskim – Wydziałem Chemii w Krakowie oraz z Instytutem Genetyki i Biotechnologii Roślin Słowackiej Akademii Nauk w Nitrze, która będzie kontynuowana przy realizacji kolejnych projektów.

Wpływ na dyscyplinę

(aktualny i oczekiwany wpływ projektu na rozwój dyscypliny naukowej oraz rozwój innych dyscyplin)

W chwili obecnej za najnowocześniejszą metodę zwiększania i doskonalenia produkcji rolniczej uważa się postępowanie biologiczne. Przez nowe odmiany charakteryzujące się mniejszymi wymaganiami glebowymi czy klimatycznymi oraz większą odpornością na różnego typu stresy zarówno biotyczne jak i abiotyczne, możliwe jest zagospodarowanie nowych, dotychczas rolniczo niewykorzystanych terenów oraz uzyskanie znacznej wyżki plonu bez obniżania jego jakości i degradacji środowiska naturalnego. Zastosowanie

nowoczesnych metod hodowlanych wykorzystujących technologię podwojonych haploidów (*ang. doubled haploids, DH*), mogłoby w dużej mierze obniżyć koszty i skrócić czas niezbędny do wprowadzenia nowych, dostosowanych do potrzeb nowoczesnego rolnictwa, odmian. Do uzyskiwania linii DH wykorzystywany jest najczęściej proces androgenyzy (indukcji rozwoju sporofitowego w komórkach męskiej linii gametofitowej) ze względu na potencjalnie najwyższą efektywność i stosunkowo proste procedury. Jednakże, proces ten jest warunkowany wieloma czynnikami takimi jak np.: genotyp, stan fizjologiczny roślin macierzystych, rodzaj i natężenie czynnika stresowego, warunki prowadzenia kultury *in vitro*, żywotność mikrospor, odpowiedni stosunek endogennych regulatorów wzrostu czy sprawność mechanizmu obronnego (antyoksydacyjnego) rośliny. Tak wiele czynników sprawia, że mechanizm procesu androgenyzy jest niezwykle skomplikowany i nie został do końca poznany. Zespół naukowy Zakładu Biologii Komórki z Instytutu Fizjologii Roślin *im. Franciszka Górskiego* Polskiej Akademii Nauk w Krakowie we współpracy z wieloma europejskimi placówkami naukowymi od lat prowadzi badania skoncentrowane głównie na ulepszaniu roślin zbożowych, w tym także nad identyfikacją molekularnych i fizjologicznych parametrów determinujących podatność na indukcję embriogenezy w kulturach androgenicznych roślin jedno- i dwuliściennych. Zrealizowany projekt doskonale uzupełnił i wniósł nowe informacje dotyczące fizjologicznych czynników zaangażowanych w przebieg procesu androgenyzy. Porównanie profili białkowych pylników wyizolowanych z kłosów świeżo ściętych (bez czynnika stresowego) oraz pylników pobranych z kłosów traktowanych niską temperaturą pozwoliło na wskazanie białek biorących udział w mechanizmach związanych z odpowiedzią rośliny na stres. Co więcej kolejne porównania otrzymanych elektroforegramów pomiędzy obiektami o wysokim zróżnicowaniu pod względem efektywności androgenyzy pozwoliło na wyodrębnienie a później identyfikację białek zaangażowanych w mechanizm kontrolujący powstawanie zarodków androgenicznych, które regenerują haploidy/podwojone haploidy. Uzyskane wyniki w ramach zrealizowanego projektu nie tylko poszerzają wiedzę teoretyczną na temat fizjologicznego podłoża procesu indukcji androgenyzy, ale mogą zostać również wykorzystane w celach praktycznych do optymalizacji procedur technologii DH pszenżyta, która do tej pory nie jest jeszcze wystarczająco efektywna by stosować ją na szerszą skalę. Co więcej wyniki te można potencjalnie wykorzystać nie tylko w badaniach nad pszenżytem, ale także nad jego pokrewnymi gatunkami, takimi jak pszenica czy żyto. W przedstawionym projekcie wykorzystano nowe, proteomiczne, podejście do zagadnienia androgenyzy u pszenżyta. W światowej literaturze brak jest doniesień na ten temat, zatem uzyskane wyniki zdają się być bardzo cenną informacją dla wielu badaczy zajmujących się tematem androgenyzy nie tylko z punktu badań podstawowych, ale również z wykorzystaniem wyników w celach praktycznych. Zastosowanie nowoczesnych programów hodowlanych, takich jak technika DH, selekcja wspomagana markerami (*ang. Marker Assisted Selection, MAS*) w połączeniu z klasycznymi metodami hodowlanymi to sposób dla polskich hodowców na szybkie wyprowadzanie nowych, dostosowanych do zapotrzebowania rynkowego odmian pszenżyta. Jednakże, by metoda uzyskiwania linii DH mogła być wprowadzona do programów hodowlanych musi spełniać określone kryteria: musi być efektywna dla szerokiego spektrum genotypów a uzyskiwane linie DH powinny być genetycznie stabilne. Zatem opracowanie efektywnych technologii wyprowadzania DH stanowić będzie zachętę dla polskich rolników do szerszej uprawy pszenżyta zarówno przy tradycyjnej agrotechnice oraz w gospodarce niskonakładowej i organicznej. W chwili obecnej areał upraw pszenżyta w Polsce (0,9 mln ha) według danych GUS z 2013 roku zbliża się do areału upraw żyta (1,0 mln ha). Świadczy

to może o wzrastającym zainteresowaniu polskich rolników tym zbożem. Co więcej polscy hodowcy pszenżyta dostarczają obecnie 70% odmian tego gatunku uprawianych w Europie, a polskie odmiany znajdują również nabywców w Kanadzie, RPA i Nowej Zelandii. Tak więc praktyczne wykorzystanie wyników projektu może w przyszłości przyczynić się w konsekwencji do umocnienia pozycji polskiej hodowli i dalszego zwiększenia konkurencyjności polskich produktów na rynkach europejskich czy światowych.