

ANALIZA MOLEKULARNYCH PODSTAW CYTOPLAZMATYCZNEJ MĘSKIEJ STERYLNOŚCI
U BURAKA ZWYCZAJNEGO (*BETA VULGARIS* L.)

STRESZCZENIE ROZPRAWY DOKTORSKIEJ
MGR. INŻ. WOJCIECH WESOŁOWSKI

Celem badań było opracowanie efektywnej platformy markerowej do identyfikacji alleli restorerowych w materiałach hodowlanych buraka cukrowego, jak również identyfikacja zmian struktury transkryptomu i proteomu związanych z obecnością alleli restorerowych.

Analizom poddano linie CMS wraz z odpowiadającymi im liniami dopełniającymi (liniami O) oraz populacje roślinne otrzymane w wyniku krzyżowań typu: obiekt męskosterylny (MS) × kandydat na linię dopełniającą, segregujące na rośliny męskopłodne (MP) oraz męskosterylne.

Do opracowania markerów molekularnych wykorzystano techniki RAPD-PCR, SSR, CAPS oraz DArT. W wyniku przeprowadzonych badań zidentyfikowano trzy markery typu RAPD, trzy markery typu SSR, trzy markery typu CAPS oraz 44 markery typu DArT sprzężonych z locus restorera *Z/Rf2* oraz dwa markery typu DArT i jeden marker typu RAPD sprzężony z locus restorera *X/Rf1*. Spośród opracowanych nowych markerów najściślejsze sprzężenie z restorerem *Z/Rf2* zaobserwowano dla FDSB1023, ppr821/*FspBI*, ppr681/*HpaII* oraz ppr681/*FspBI*. W związku z niedoskonałościami procesu fenotypowania roślin rzeczywiste odległości genetyczne pomiędzy loci tych markerów i locus *Z/z (Rf2/rf2)* są zapewne mniejsze od odległości wykazanych na sporządzonej mapie sprzężeń (6,4 – 18,2 cM).

W celu poznania procesów molekularnych związanych z ekspresją cechy cytoplazmatycznej męskiej sterylności u buraka wykonano sekwencjonowanie transkryptomów roślin męskosterylnych oraz z przywróconą płodnością. Z uzyskanych danych RNA-seq wynika, iż obecność restorera *Z/Rf2* była związana z podwyższoną ekspresją genów jądrowych, których produkty białkowe są zaangażowane w metabolizm reaktywnych form tlenu (ROS), rozpad ścian komórkowych oraz regulację ekspresji genów. Restorerowi *Z/Rf2* towarzyszyła podwyższona ekspresja czterech genów PPR z chromosomu 4. Spośród tych genów dwa – *104890821* i *104890681* (NCBI GeneID) – kodują białka zawierające sekwencje kierujące do mitochondriów.

Proteom mitochondrialny cytoplazmy S charakteryzuje się obecnością białkowego produktu ekspresji presekwencji genu *atp6* – preS_{ATP6}. Poziom akumulacji tego białka jest związany z plazmotypem i nie jest modyfikowany obecnością allelu restorerowego. Białko to prawdopodobnie odgrywa rolę mitochondrialnej determinanty CMS, wpływającej na zaburzenia składania/stabilności kompleksu V. Prowadzi to do nadprodukcji ROS oraz wzrostu poziomu ekspresji genu *atp9*.

Analiza danych transkryptomicznych wykazała wyższy poziom ekspresji genów plastydowych, kodujących niektóre podjednostki fotosystemów oraz białka rybosomalne u roślin męskosterylnych niż u roślin z przywróconą płodnością. U roślin CMS odnotowano również

podwyższoną ekspresję kilku mitochondrialnych otwartych ramek odczytu o nieustalonej funkcji oraz genów mitochondrialnych kodujących niektóre podjednostki kompleksów łańcucha oddechowego oraz białka rybosomalne. W przypadku mitochondrialnego genu *atp9* podwyższona akumulacja jego mRNA korelowała z podwyższoną akumulacją odpowiedniego produktu białkowego. Z badań proteomicznych wynika, iż u roślin męskosterylnych podwyższona akumulacja homooligomerycznej formy białka ATP9 może pochodzić z indukowanego przez mitochondrialną determinantę CMS, rozpadu kompleksu V, bądź z niewykorzystanej do jego składania puli tego oligomeru. Zaburzenia w metabolizmie kompleksu V (nasilony rozkład lub utrudnione składanie) można wytłumaczyć wpływem mitochondrialnej determinanty sterylności – białka preSATP6, którego akumulację u roślin z cytoplazmą S też wykryto w toku analiz proteomicznych. Zaburzenia w stabilności/składaniu kompleksu V zostały także wykazane w toku analiz zymograficznych. Poza obniżoną aktywnością kompleksu V, rośliny męskosterylne charakteryzowały się również silniejszym sygnałem dwóch dodatkowych stref aktywności, które odpowiadały kompleksom o niższej masie cząsteczkowej.

Linie męskosterylne (z cytoplazmą S i allelami dopełniającymi) charakteryzowała obniżona akumulacja reduktazy glutationowej (GR) oraz wyżej wspomniana podwyższona akumulacja homooligomerycznej formy białka ATP9. Z kolei obiekty z cytoplazmą S (męskosterylne oraz z płodnością przywróconą genem *X/Rf1*) cechowała podwyższona akumulacja mniejszej (heptamerowej) formy białka HSP60 oraz wyżej wspomniana obecność białka preSATP6. W liniach z cytoplazmą N (dopełniających) dominowała większa (tetradekamerowa) forma HSP60. Linie te cechował także brak białka preSATP6. Dla obiektów z płodnością przywróconą genem *X/Rf1* charakterystyczna była podwyższona akumulacja manganozależnej dysmutazy ponadtlenkowej.

Na podstawie otrzymanych wyników zaproponowano model tłumaczący mechanizmy molekularne odpowiedzialne za ekspresję cytoplazmatycznej męskiej sterylności u buraka. Według tego modelu, mitochondrialna determinanta CMS – preSATP6 – wpływa na zaburzenia składania/stabilności kompleksu V skutkując sterylizacją roślin. Kompensacja tych zaburzeń wymaga obniżenia poziomu akumulacji pierścienia ATP9. Restorer *X/Rf1* (z chromosomu 3) obniża tę akumulację działając na poziomie białka. Z kolei restorer *Z/Rf2* (z chromosomu 4) obniża tę akumulację poprzez zmniejszenie ilości transkryptu. Proponowany mechanizm działania restorera *Z/Rf2* znajduje poparcie w fakcie, iż chromosom 4 (w którym jest zlokalizowany gen *Z/Rf2*) cechuje nagromadzenie genów kodujących białka PPR, o których wiadomo, iż kontrolują metabolizm organellowych RNA. Być może któryś z tych genów pełni funkcję restorera. Z przeprowadzonych badań wynika, iż najlepszym kandydatem na restorer *Z/Rf2* jest jakaś forma alleliczna genu *104890821* – cechują go spodziewane dla restorera podwyższona ekspresja u roślin z przywróconą płodnością oraz kosegregacja z fenotypem męskiej płodności.