

## Streszczenie

Włośniki to cylindryczne wypustki komórek ryzodermy korzenia, które odgrywają rolę w zakotwiczaniu rośliny w glebie i pobieraniu składników odżywczych, oraz oddziałują z mikroorganizmami w obrębie ryzosfery. Ich obecność jest kluczowa w warunkach suszy i niedoboru fosforu. Wykształcenie włośnika to złożony proces, który wymaga zaangażowania wielu genów. Jego rozwój można podzielić na następujące etapy: 1) determinacja wzoru ryzodermy, 2) inicjacja i formowanie zawiązka włośnika, 3) wzrost szczytowy wypustki. W przeciwieństwie do rośliny modelowej *Arabidopsis thaliana*, wiedza na temat molekularnych podstaw dotyczących morfogenezy włośników u jednoliściennych, w tym jęczmienia (*Hordeum vulgare*), jest ograniczona.

Celem niniejszej pracy była identyfikacja nowych genów związanych z procesami rozwoju i wzrostu włośników oraz scharakteryzowanie ich molekularnej funkcji u jęczmienia. Do realizacji tego celu wykorzystano dwa podejścia badawcze: strategię TILLING oraz klasyczną analizę genetyczną z zastosowaniem techniki sekwencjonowania egzomu. W pierwszej części badań, przy użyciu narzędzi bioinformatycznych wytypowano trzy geny kandydackie do analizy TILLING: *HvRIC10* (ang. *ROP-INTERACTIVE CRIB MOTIF-CONTAINING PROTEIN 10*), kodujący białko zaangażowane m.in. w rearanżacje cytoszkieletu i regulację egzocytozy, *HvOPR1* (ang. *12-OXOPHYTODIENOATE REDUCTASE 1*), kodujący reduktazę 12-oksofitodienanu 1 oraz *HvEXPB5* (ang. *EXPANSIN B5*), którego produktem jest  $\beta$ -ekspansyna 5. Geny te wybrano na podstawie wyników prowadzonego wcześniej eksperymentu mikromacierzowego, w którym analizowano transkryptomy korzenia mutantu bezwłośnikowego *rhl1.a* i jego odmiany wyjściowej 'Karat' (Kwasniewski i in., 2016). Wytypowano geny, których ekspresja w korzeniach mutantu była znacząco obniżona w stosunku do odmiany rodzicielskiej, funkcja biologiczna tych genów sugerowała możliwy udział w morfogenezie włośników, lecz nie potwierdzono dotąd eksperymentalnie ich roli w tym procesie u żadnego gatunku modelowego czy uprawnego. Materiał do badań stanowiła jęczmienna populacja *HorTILLUS*, otrzymana w wyniku mutagenyzy chemicznej odmiany 'Sebastian'. Dla każdego genu przeanalizowano pod kątem mutacji 5376 – 6912 roślin pokolenia M<sub>2</sub>. W przypadku genu *HvRIC10* zidentyfikowano 12 substytucji nukleotydowych, w tym trzy mutacje zmiany sensu i po jednej mutacji splice-junction i nonsensownej. W wyniku analiz przeprowadzonych dla genu *HvOPR1* znaleziono 12 mutacji, z czego trzy zmiany to

mutacje zmiany sensu, a jedna to mutacja splice-junction. Z kolei, w genie *HvEXPB5* zidentyfikowano 15 mutacji, w tym pięć mutacji zmiany sensu i jedną splice-junction. Pozostałe zmiany w każdym z analizowanych genów były ciche lub wystąpiły w rejonach niekodujących, niezwiązanych ze splicingiem.

Następnie przeprowadzono analizy fenotypowe strefy włosnikowej mutantów, będących homozygotami pod względem zidentyfikowanych mutacji typu zmiany sensu, splice-junction i STOP. W żadnym z homozygotycznych mutantów niosących zmiany w genach *HvRIC10* i *HvOPR1* nie zaobserwowano różnic w rozwoju i wzroście włosników w stosunku do odmiany rodzicielskiej. Wśród nich były też mutanty niosące przedwczesny kodon STOP, powodujący skrócenie białka *HvRIC10* o 50% i 70%, oraz takie, u których retencja intronu powodowała wstawienie nowych aminokwasów i w efekcie syntezę dłuższego białka *HvOPR1* niż w przypadku odmiany wyjściowej. Oznacza to, że aktywność genów *HvRIC10* i *HvOPR1* w korzeniach jęczmienia nie jest niezbędna do prawidłowego wykształcenia włosników u tego gatunku.

Natomiast analiza strefy włosnikowej mutantów ze zmianami w genie *HvEXPB5* wykazała jednego mutantą, niosącego allel *hvexpb5.i*, który charakteryzował się fenotypem silnie skróconych włosników, osiągających długość zaledwie 3% długości włosników odmiany wyjściowej. Mutant *hvexpb5.i* posiada tranzycję C759T, w wyniku której następuje zamiana prolina na serynę w pozycji 144 sekwencji aminokwasowej białka *HvEXPB5*. Przeprowadzona analiza populacji F<sub>2</sub>, powstałej w wyniku skrzyżowania mutantą *hvexpb5.i* z odmianą rodzicielską, wykazała jednak brak ko-segregacji allelu *hvexpb5.i* ze zmienionym fenotypem włosnikowym mutantą. Wskazuje to, że gen *HvEXPB5* nie pełni roli w utrzymaniu wzrostu szczytowego włosników u jęczmienia, a za obserwowany fenotyp mutantą odpowiada inny, niezidentyfikowany dotąd gen.

W związku z powyższym, w drugiej części badań podjęto próbę zidentyfikowania genu z mutacją odpowiedzialną za zatrzymanie wzrostu włosników mutantą *hvexpb5.i* we wczesnym stadium ich rozwoju. W tym celu skrzyżowano badanego mutantą z mutantami *rhp1.a – rhp1.d* (*root hair primordia 1*), o podobnym fenotypie włosnikowym. Przeprowadzony test alleliczności wykazał, że mutanty te są alleliczne pod względem genu odpowiedzialnego za silne skrócenie włosników, stąd przyjęto dla mutantą *hvexpb5.i* nazwę *rhp1.e*, od kolejnego allelu w locus *Rhp1*. We wcześniejszych badaniach zlokalizowano locus *Rhp1* w długim ramieniu chromosomu 1H (Janiak i in.

2007), jednak nie zidentyfikowano konkretnej sekwencji i molekularnej funkcji genu leżącego u podstaw opisywanego fenotypu.

W dalszych badaniach wykorzystano metodę „wychwytywania egzomu”, polegającą na selektywnym sekwencjonowaniu regionów kodujących, które są wychwytywane z genomowego DNA przez specjalnie zaprojektowane sondy (Ng i in., 2009). W tym celu zastosowano protokół SeqCap EZ HyperCap (Roche, Basel, Switzerland). Sekwencjonowaniu poddano osobnika F<sub>2</sub> ze skróconymi włośnikami z populacji F<sub>2</sub> oraz formę wyjściową ‘Sebastian’. Przeprowadzono je w trybie sparowanych końców 2 x 75 pz w systemie Illumina HiSeq 4000 (Illumina) w Uniwersytecie Medycznym w Białymstoku. Na podstawie wyników sekwencjonowania egzomu mutantu *rhp1.e*, wytypowano osiem genów kandydackich, zidentyfikowanych w obrębie chromosomu 1H, u których wykryto mutacje w stanie homozygotycznym. Kierując się danymi dotyczącymi lokalizacji fizycznej *locus Rhp1*, informacjami na temat ontologii genów, a także potencjalnym wpływem mutacji na funkcjonowanie białka, jako pierwszy do analizy został wybrany gen *HORVU1Hr1G077230*, kodujący syntazę celulozy C1 (HvCSLC1), biorącą udział w syntezie ksyloglukanu u jęczmienia.

Mutacja zidentyfikowana w genie *HORVU1Hr1G077230* (*HvCSLC1*) u mutantu *rhp1.e* obejmowała substytucję G1674A, powodującą zatrzymanie intronu 2, a co za tym idzie wydłużenie sekwencji dojrzałego mRNA o 117 nukleotydów. Efektem tego jest powstanie przedwczesnego kodonu STOP we wstawionym intronie, co powoduje skrócenie 699-aminokwasowego białka o 344-aminokwasowy fragment, zawierający część domeny funkcjonalnej CESA i domen międzybłonowych (TMD). W efekcie, zidentyfikowana mutacja może zaburzać aktywność białka HvCSLC1. Co ciekawe, u mutantu wykazano obniżony poziom ekspresji genu *HORVU1Hr1G077230* (*HvCSLC1*) we wszystkich strefach korzenia mutantu, przy czym największą różnicę zanotowano w strefie włośnikowej. Stwierdzono także pełną ko-segregację zidentyfikowanego allelu ze zmienionym fenotypem włośnikowym w populacji F<sub>2</sub> krzyżówki mutantu z formą rodzicielską. Uzyskane wyniki wskazują, że obecność zidentyfikowanej mutacji w genie *HORVU1Hr1G077230* (*HvCSLC1*) jest związana z zaburzeniami w rozwoju włośników. Potwierdzeniem tego wniosku jest wykrycie u wszystkich badanych mutantów allelicznych (*rhp1.a* – *rhp1.d* i *rhp1.f*) obecności różnych substytucji nukleotydowych w obrębie sekwencji genu *HORVU1Hr1G077230* (*HvCSLC1*). Ponadto u mutantu *rhp1.b* nie wykryto mutacji w pozostałych genach kandydackich z chromosomu 1H.

Biorąc pod uwagę otrzymane wyniki oraz dostępne dane literaturowe, przedyskutowano rolę genu *HORVUIHr1G077230 (HvCSLC1)* w rozwoju włóśników u jęczmienia, a dokładniej w biosyntezę ksyloglukanu podczas wzrostu szczytowego. Wytypowano i przeanalizowano także ekspresję innych genów, potencjalnie współdziałających z genem *HvCSLC1*, czego efektem jest proponowany schemat biosyntezy ksyloglukanu we włóśnikach *H. vulgare*.

## **Referencje**

Janiak, A. i I. Szarejko. 2007. *Euphytica* 157: 95–111

Kwasniewski, M., A. Daszkowska-Golec, A. Janiak, K. Chwialkowska, U. Nowakowska,  
G. Sablok i I. Szarejko. 2016. *J. Exp. Bot.* 67(4): 1079–1094

Ng, S.B., E.H. Turner, P.D. Robertson, S.D. Flygare, A.W. Bigham, C. Lee, T. Shaffer,  
M. Wong, A. Bhattacharjee, E.E. Eichler, M. Bamshad, D.A. Nickerson  
i J. Shendure. 2009. *Nature* 461: 272–276