

Praca doktorska:

Transkryptomiczna charakterystyka procesu starzenia się nasion *Hordeum vulgare* L.

Transcriptome characteristics while seeds ageing process *Hordeum vulgare* L.

wykonana w Krajowym Centrum Roślinnych Zasobów Genowych w Radzikowie

Promotor dr hab. Maja Karolina BOCZKOWSKA prof. Instytutu
Promotor pomocniczy dr Jolanta GROSZYK

Streszczenie

Degradacja środowiska naturalnego spowodowana działalnością człowieka wymaga intensywnej ochrony gatunkowej roślin. Zmiany molekularne związane z naturalnym procesem starzenia, obniżające żywotność i wigor nasion są głównym problemem w bankach genów. Proces starzenia zachodzi we wszystkich żywych organizmach, a jego przyczyną są wsteczne zmiany komórkowe zachodzące w trakcie życia.

Nasiona, jako organy przetrwalnikowe, stanowią zdecydowaną większość plazmy zarodkowej przechowywanej w bankach genów. Są one przechowywane na wypadek wyginięcia gatunków lub ich cennych odmian w zmieniającym się środowisku naturalnym. Podstawowym problemem w bankach genów są jednak zmiany molekularne związane z naturalnym procesem starzenia, obniżającym żywotność i wigor nasion. W ostatniej dekadzie na świecie przeprowadzono intensywne badania naukowe mające na celu identyfikację zmian w kwasach nukleinowych, białkach i metabolitach, zachodzących podczas spoczynku nasion. Pomimo postępu jaki dokonał się w ostatnich latach, niektóre ważne pytania w dalszym ciągu pozostają bez odpowiedzi.

Sekwencjonowanie o wysokiej wydajności małych niekodujących cząsteczek RNA zostało po raz pierwszy zastosowane do zbadania udziału miRNA w starzeniu się nasion jęczmienia. Badaniom poddano unikatowe próbki nasion, które pomimo identycznego składu genetycznego, różniły się żywotnością po ponad 45 latach przechowywania w stanie suchym. Łącznie w suchych nasionach zidentyfikowano 61 znanych i 81 nowych miRNA. Najwyższy poziom ekspresji stwierdzono w czterech konserwatywnych rodzinach miRNA, tj. miR159, miR156, miR166 i miR168. Jednak najbardziej zaskakującym wynikiem był brak istotnych różnic w poziomie wszystkich miRNA w próbkach nasion o istotnie różnej żywotności. Wynik ten ujawnia, że miRNA w suchych nasionach są niezwykle stabilne. Jest to również pierwsza zidentyfikowana frakcja RNA, która nie ulega degradacji wraz z utratą żywotności nasion. W celu potwierdzenia obecności genów docelowych dla miRNA zidentyfikowanych podczas analizy *in silico* przeprowadzono sekwencjonowanie degradomu. Posłużyło ono do identyfikacji miejsc rozpoznawanych przez miRNA prowadzących do degradacji transkryptów genów docelowych. Dodatkowo przeprowadzono analizę RNA-Seq w celu porównania transkryptów zgromadzonych w nasionach żywotnych i nieżywotnych. W wyniku przeprowadzonych analiz stwierdzono, że w próbkach nasion o wysokiej żywotności najwięcej rodzajów transkryptów było związane z procesami metabolizmu węglowodanów, transkrypcją i translacją oraz biogenezą rybosomów. Zidentyfikowane funkcje wskazują na to, że przechowywane transkrypty były istotne dla inicjacji kiełkowania i utrzymania żywotności. Zidentyfikowane transkrypty mogą być zaangażowane we wznowienie metabolizmu i cyklu komórkowego poprzez selektywną translację zmagazynowanego w nasionach mRNA. Uzyskane wyniki są zgodne z danymi przedstawionymi w literaturze. Analizując funkcję transkryptów zidentyfikowanych w nasionach o niskiej żywotności przypuszcza się, że w trakcie przechowywania nasiona rozpoczęły kiełkowanie, ale proces ten nie został

zakończony i w konsekwencji nasiona utraciły żywotność. Przyczyną rozpoczęcia kiełkowania mógł być wzrost wilgotności nasion, który nastąpił podczas przechowywania w jednej z kolb. Zapoczątkowanie kiełkowania podczas przechowywania mogło wpłynąć na utratę transkryptów niezbędnych do ponownego rozpoczęcia kiełkowania, co skutkowało utratą żywotności. Wyniki sugerują, że utrata żywotności nasion wiąże się z utratą funkcji niektórych transkryptów niezbędnych do ponownego rozpoczęcia kiełkowania.

Abstract

Environmental degradation due to human activities requires intensive conservation of plant species. Molecular changes associated with the natural aging process that reduces seed viability and vigor are a major concern in gene banks. The aging process occurs in all living organisms. It begins at birth and leads to death and is caused by retrograde cellular changes that occur during life. Life span is a highly variable trait among living organisms. It is greatly extended in plants relative to animals, e.g., *Pinus aristata* Engelm. at White Mountain, California, which is about 5,000 years old. Seeds have evolved for generative reproduction and, as survival organs, constitute the vast majority of germplasm stored in gene banks. They are stored in case species become extinct in the wild. However, the main problem is molecular changes associated with the natural aging process, reducing seed viability and vigor. In the last decade, intensive scientific research has been conducted to identify changes in nucleic acids, proteins, and metabolites that occur during dormancy. Despite the progress made in recent years, some important questions remain unanswered. Molecular characterization of seed aging and dormancy requires continued research to understand these processes. Among the factors that may play a key role are small non-coding RNAs, which include miRNAs that regulate gene expression at the posttranslational level, causing mRNA cleavage or inhibiting translation of target transcripts. It is estimated that genes encoding miRNAs represent 1% of the predicted genes in higher eukaryotic genomes, and the expression of 10-30% may be regulated by them. High-throughput small molecule RNA sequencing was used to investigate the involvement of miRNAs in barley seed aging. Unique seed samples were tested, that despite identical genetic background, differed in viability after more than 45 years of dry storage. A total of 61 known and 81 novel miRNAs were identified in dry seeds. The highest expression levels were found in four conserved miRNA families, namely miR159, miR156, miR166, and miR168. However, the most surprising result was that there were no significant differences in the levels of almost all miRNAs in seed samples with significantly different viability. This result reveals that miRNAs in dry seeds are extremely stable. It is also the first identified RNA fraction that does not degrade with loss of seed viability. To confirm the target genes for miRNA, degradome sequencing was performed. It was used to identify miRNA cleavage sites and associated transcripts. Additionally, RNA-Seq analysis was performed to compare transcripts stored in viable and nonviable seeds. As a result of the analyses, it has been found that in high viability seeds samples the highest abundance formed transcripts relevant to carbohydrate processing, transcription and translation processes, and ribosome biogenesis. The identified functions point at the stored transcripts were essential for germination initiation and viability maintenance. The identified transcripts may be involved in the resumption of cell metabolism and cell cycle by selective translation of RNA in stored seeds. The results obtained are in agreement with the data reported in the literature. By analyzing the function of transcripts identified in seeds with low viability, it is hypothesized that during storage the seeds started to germinate, but this process was not completed and consequently the seeds lost viability. The reason for the onset of germination may be an increase in seed moisture that occurred during storage in one flask. The initiation of germination during storage might affect the loss of transcripts necessary to restart germination resulted in a loss vitality.

(-) mgr Marta Puchta-Jasińska