



Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin  
Państwowy Instytut Badawczy

**Marta Puchta-Jasińska**

Autoreferat rozprawy doktorskiej pt.:

## **Transkryptomyczna charakterystyka procesu starzenia się nasion**

***Hordeum vulgare L.***

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

Praca doktorska

wykonana w Krajowym Centrum Roślinnych Zasobów Genowych

### **Promotor:**

dr hab. Maja Karolina Boczkowska, prof. IHAR  
Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin  
- Państwowy Instytut Badawczy  
Krajowe Centrum Roślinnych Zasobów Genowych

### **Promotor pomocniczy:**

dr Jolanta Groszyk  
Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin  
- Państwowy Instytut Badawczy  
Krajowe Centrum Roślinnych Zasobów Genowych

### **Recenzenci:**

Prof. dr hab. Agnieszka Piotrowicz-Cieślak  
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie  
Wydział Biologii i Biotechnologii  
Katedra Fizjologii, Genetyki i Biotechnologii Roślin

Prof. dr hab. Grzegorz Bartoszewski  
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie  
Wydział Ogrodnictwa Biotechnologii i Architektury Krajobrazu

Radzików, 2022

**Część wyników uzyskanych w trakcie realizacji pracy doktorskiej została opublikowana:**

Puchta, M.; Boczkowska, M.; Groszyk, J. (2020) Low RIN Value for RNA-Seq Library Construction from Long-Term Stored Seeds: A Case Study of Barley Seeds. *Genes*, 11, 1190. <https://doi.org/10.3390/genes11101190>

Puchta, M. (2020). miRNA zaangażowane w proces starzenia i kiełkowania nasion. *Biuletyn Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin*, (290), 21-26. <https://doi.org/10.37317/biul-2020-0014>

Puchta, M.; Groszyk, J.; Małecka, M.; Koter, M.D.; Niedzielski, M.; Rakoczy-Trojanowska, M.; Boczkowska, M. (2021) Barley Seeds miRNome Stability during Long-Term Storage and Aging. *International Journal of Molecular Science*, 22, 4315. <https://doi.org/10.3390/ijms 22094315>

## WPROWADZENIE

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. Molekularna charakterystyka starzenia się nasion, spoczynku i kiełkowania wymaga kontynuacji badań w celu zrozumienia tych procesów. Wśród czynników, które mogą odgrywać kluczową rolę są małe niekodujące RNA (sRNA).

Małe RNA (sRNA) obejmują kilka grup krótkich niekodujących RNA: mikroRNA (miRNA) i małe interferujące RNA (siRNA), które regulują ekspresję genów na poziomie posttranskrypcyjnym. Zmienny poziom sRNA w komórkach roślinnych sugeruje ich regulacyjną rolę. Najlepiej scharakteryzowaną klasą roślinnych sRNA są miRNA. Są to 19-24 nukleotydowe niekodujące endogenne RNA, które odgrywają ważną rolę w regulacji ekspresji genów na poziomie potranskrypcyjnym, powodując rozszczepienie mRNA lub zahamowanie translacji docelowych transkryptów. Chociaż małe RNA są zaangażowane w wiele procesów rozwojowych, ich rola w fazach kiełkowania nasion jest słabo poznana. Das i wsp. (2018) zasugerowali, że dynamiczne zmiany w ekspresji kilku miRNA, ich genów docelowych oraz interferencja podczas przekazywania sygnału pomiędzy miRNA a ta-siRNA przyczyniają się do regulacji kiełkowania nasion u *A. thaliana*. Badania wskazują na liczne miRNA zaangażowane w dynamiczny proces kiełkowania nasion. Jednakże niewiele wiadomo na temat specyficznych regulacji miRNA i ich genów docelowych, które są potencjalnie ważnymi czynnikami przyczyniającymi się do wczesnych etapów kiełkowania nasion. Badania nad małymi RNA i ich genami docelowymi mają na celu dostarczenie informacji pozwalających na dalsze zrozumienie sieci regulacyjnej zarządzanej przez miRNA w procesie kiełkowania nasion.

## CEL I HIPOTEZY BADAWCZE

Starzenie się nasion jest powszechnie opisywane jako utrata żywotności i jakości w czasie. Długowieczność nasion jest określana jako szybkość, z jaką pogarsza się ich potencjał kiełkowania w czasie. Obniżenie jakości nasion objawia się spadkiem szybkości i równomierności kiełkowania, w którym następuje opóźnienie w pojawieniu się korzonka, co prowadzi ostatecznie do utraty żywotności.

### Celem badań jest:

1. Ocena wpływu długoterminowego przechowywania i zmian zachodzących w starzejących się nasionach jęczmienia w obrębie mikrotranskryptomu i transkryptomu
2. Ocena integralności frakcji RNA w nasionach jęczmienia o różnym stopniu żywotności poddanych długotrwałemu przechowywaniu
3. Identyfikacja różnic w transkryptomie i mikrotranskryptomie nasion jęczmienia w różnym wieku oraz o różnym poziomie żywotności
4. Identyfikacja genów docelowych powiązanych z miRNA i ich funkcji, metodami *in silico* i eksperymentalnymi
5. Identyfikacja tkankowo - specyficznych miRNA
6. Identyfikacja funkcji transkryptów różnicujących próby nasion o różnym poziomie żywotności

### Hipotezy badawcze:

1. Utrata żywotności do której dochodzi w czasie długotrwałego przechowywania nasion jęczmienia związana jest ze zmianami w miRNomie
2. Analiza degradome-Seq stanowi bardziej precyzyjne narzędzie przy identyfikacji genów docelowych dla miRNA niż analiza *in silico*
3. W nasionach jęczmienia dochodzi do równomiernej degradacji wszystkich frakcji RNA w czasie długotrwałego przechowywania i starzenia się nasion w stanie suchym
4. miRNA pełni istotną funkcję podczas zachowania żywotności nasion jęczmienia
5. W transkryptomie nasion jęczmienia o różnym poziomie żywotności występują różnice mające wpływ na zachowanie zdolności kiełkowania podczas długotrwałego przechowywani

## **MATERIAŁY I METODY**

Materiał badawczy wykorzystany w pracy doktorskiej stanowił jęczmień zwyczajny (*Hordeum vulgare* L.) odmiany Damazy. Ziarniaki przechowywano 42 lata w temperaturze otoczenia. W 2015 r. zostały przeprowadzone ponowne testy zdolności do kiełkowania. Do badań wytypowano próby ziarniaków o wysokiej żywotności na poziomie 83,3% i wilgotności 3,58% oraz niskiej żywotności 2% i wilgotności 12,5%. Nasiona o wysokiej żywotności zostały poddane rozmnożeniu w warunkach polowych w 2017/2018 r. i wysuszone do 8%. Materiał reprodukowany został użyty jako próba kontrolna we wszystkich opisanych doświadczeniach.

Metody badawcze wykorzystane w pracy doktorskiej obejmowały:

1. Izolację sRNA oraz RNA całkowitego w trzech powtórzeniach biologicznych
2. Ocenę jakościową i ilościową wyizolowanego sRNA i RNA całkowitego
3. Konstrukcję bibliotek sRNA zgodnie z protokołem producenta zestawu NebNext Multiplex Small RNA Library Prep Set for Illumina. Ocenę jakościową i ilościową przygotowanych bibliotek oraz selekcję fragmentów. Właściwe sekwencjonowanie bibliotek na platformie Illumina MiSeq stosując zestaw Reagent Kit v3

4. Optymalizację i przygotowanie bibliotek degradome-Seq. Opracowanie autorskiego protokołu bazującego na odczynnikach NebNext Multiplex Small RNA Library Prep Set for Illumina oraz własnych sekwencjach indeksów. W celu sprawdzenia poprawności konstrukcji bibliotek wykonano klonowanie i sekwencjonowanie metodą Sangera. Przygotowane biblioteki sekwencjonowano na platformie Illumina MiSeq z wykorzystaniem kaset Reagent Kit v3
5. Konstrukcję bibliotek RNA-Seq z frakcji mRNA. W celu efektywnej konstrukcji bibliotek z wykorzystaniem zestawu Takara SMARTer Stranded RNA-Seq wykonano optymalizację metodyki. Dokładny przebieg optymalizacji opisano w publikacji: Puchta, M.; Boczkowska, M.; Groszyk, J. Low RIN Value for RNA-Seq Library Construction from Long-Term Stored Seeds: A Case Study of Barley Seeds. *Genes* 2020, *11*, 1190. <https://doi.org/10.3390/genes11101190>. Biblioteki sekwencjonowano na platformie Illumina HiSeq 4000 z opcją sparowanych odczytów 2×150 pz
6. W celu potwierdzenia wyników otrzymanych podczas sekwencjonowania, dla wytypowanych miRNA oraz transkryptów przeprowadzono pomiar ilości ampliconu w czasie rzeczywistym. Analizę przeprowadzono z wykorzystaniem termocyklera Rotor-Gene 6000q series. Odczyty przyrostu fluorescencji wykonano na kanale SYBR Green po każdym cyklu. Względną ekspresję badanych genów wyliczono na podstawie analizy  $2^{-\Delta\Delta CT}$
7. Analizę bioinformatyczną i statystyczną. Jakość odczytów oceniono używając programu FastQC. W celu filtrowania oraz identyfikacji nowych i znanych miRNA użyto pakietu oprogramowania UEA Small RNA Workbench. Surowe odczyty uzyskane podczas analiz RNA-Seq poddano filtrowaniu, a następnie mapowaniu do genomu referencyjnego jęczmienia oraz analizie *de novo*. Do sekwencji miRNA oraz transkryptów dopasowano wyniki uzyskane podczas analizy degradome-Seq. W tym celu wykorzystano oprogramowanie PAREspin. Różnicowe analizy ekspresji miRNA i transkryptów wykonano używając programu DeSeq2 z pakietu SARTools dla środowiska R. Wyniki zostały przedstawione w formie graficznej wykorzystując pakiet ggplot2. Analizy statystyczne przeprowadzono w programie XLSTAT ECOLOGY 2017.1.1. Aby zdefiniować potencjalne funkcje miRNA oraz transkryptów określono biologiczne i molekularne procesy, w których biorą udział, wykorzystując w tym celu adnotacje Gene Ontology (GO). Adnotacje GO zidentyfikowano na podstawie akcesji z bazy Uniprot, a następnie przedstawiono je graficznie wykorzystując g:Profiler toolset.

## WYNIKI I DYSKUSJA

Klasa sRNA, do których zalicza się miRNA odgrywa kluczową rolę w ontogenezie roślin. Obecnie prowadzonych jest coraz więcej badań mających na celu wyjaśnienie roli miRNA w rozwoju i kiełkowaniu nasion. miRNom suchych nasion o wyciszonym metabolizmie poddanych starzeniu jest analizowany bardzo rzadko, bardziej powszechne są badania, gdzie starzenie nasion prowadzone jest w sposób sztuczny [1,3,4]. W literaturze brak jest badań dotyczących wpływu miRNA na długotrwałe przechowywanie nasion i związane z tym procesy starzenia nasion. Przeprowadzone badania pozwoliły

na ocenę wpływu długotrwałego przechowywania na zmiany w obrębie miRNA oraz ocenę ich wpływu na procesy starzenia nasion.

### **Analiza miRNomu**

Zidentyfikowano 61 znanych miRNA, które dopasowano do 13 rodzin zdeponowanych w bazie miRBase ver.22 oraz 81 nowych miRNA, z czego 13 z nich dopasowano jako izomiry do znanych dla jęczmienia rodzin miRNA.

Analiza zarodków pochodzących z suchych nasion o wyciszonej aktywności metabolicznej wykazała obecność licznych izomirów. Uzyskane wyniki badań wskazują na obecność izomirów różniących się od formy kanonicznej zdeponowanej w bazie miRBase długością lub wykazujących polimorfizm pojedynczych nukleotydów. Wszystkie zidentyfikowane w tych badaniach izomiry były krótsze od formy kanonicznej, co może świadczyć, że ich powstawanie jest związane z częściową degradacją cząsteczek miRNA w wyniku działania egzonukleazy lub zróżnicowanym przetwarzaniu przez Dicer [2, 3, 7, 13]. Brak 24-nt miRNA może wskazywać na brak aktywności białek z rodziny Dicer: DCL3 i DCL5. Białko DCL3 jest zaangażowane w biosyntezę 24 nt siRNA pochodzących głównie z transpozonów i powtarzalnych fragmentów DNA zaangażowanych w TGS [9, 5]. Długość sekwencji miRNA jest istotnym czynnikiem decydującym o ich przydzieleniu do poszczególnych kompleksów AGO. Większość miRNA o długości 21 nt wiąże się z AGO1 i AGO2, podczas gdy miRNA o długości 24 nt wiąże się z AGO4 [6]. Zróżnicowanie długości izomirów może mieć związek ze strategią różnicowania genów docelowych poprzez przypisywanie izomirów do różnych kompleksów AGO [7].

Wśród zidentyfikowanych podczas badań rodzin miRNA, 13 wykazywało znaczne różnice w poziomie ekspresji. Sześć spośród zidentyfikowanych rodzin miRNA, tj. miR156, miR159, miR166, miR168, miR171 i miR397 występuje zarówno u roślin jedno-, jak i dwuliściennych, co może wskazywać, że miRNA są zaangażowane w regulację genów kluczowych dla rozwoju i funkcjonowania roślin [5]. Ponadto, zaobserwowano, że rodziny miR156, miR159 i miR166 biorą udział w regulacji transkrypcji genów kodujących aktywatory i inhibitory kiełkowania i spoczynku [5,10]. Wśród konserwowanych rodzin miRNA: miR159, miR156, miR166 i miR168 wykazywały najwyższą ekspresję we wszystkich badanych grupach. Deng i wsp. (2016) wyjaśniali wysoką ekspresję miRNA ich krytyczną rolę we wzroście i rozwoju dzikiego jęczmienia.

Rodzina miR159, która wykazywała najwyższą ekspresję w przeprowadzonych badaniach niezależnie od próby, reguluje czynnik transkrypcyjny GAMYB, który wchodzi w interakcje podczas odpowiedzi na kwas giberelinowy (GA) [12]. Rodzina miR156 została zidentyfikowana jako jedna z rodzin ulegających największej ekspresji w *H. vulgare* subsp. *spontaneum* [8]. Reguluje ona ekspresję genów z rodziny czynników transkrypcyjnych SPL [8, 11]. Rodzina miR166, która charakteryzowała się największą liczebnością we wczesnej fazie kiełkowania nasion kukurydzy, ukierunkowana była na wiążący DNA czynnik transkrypcyjny *homeobox-leucine zipper* w dzikim jęczmieniu [8, 9]. Rodzina miR168, która jest ukierunkowana u rzodkiewnika na regulujący kompleks RISC AGO1, była również jedną z rodzin o najwyższej ekspresji w dzikim jęczmieniu [8, 13].

Zidentyfikowane nowe miRNA wykazywały niski poziom ekspresji. Według Wang i wsp. (2011) różnice w liczbie odczytów związane z poziomem ekspresji spowodowane są aktywnością różnych procesów fizjologicznych i biochemicznych zachodzących w danym momencie w nasionach. Natomiast w nasionach suchych, w których metabolizm jest stłumiony, różnice w poziomie poszczególnych miRNA mogą wskazywać, które szlaki metaboliczne zostaną uruchomione w początkowej fazie kiełkowania. Mogą one również dotyczyć procesów związanych z ostatnią fazą dojrzewania i spoczynku nasion. Podczas badań uzyskano wyniki zgodne z literaturowymi, miRNA\* stanowiły poniżej 1% nowo zidentyfikowanych miRNA i wykazywały bardzo niski poziom ekspresji.

### **Analiza *in silico* potencjalnych genów regulowanych przez miRNA w nasionach jęczmienia**

W wyniku przeprowadzonych analiz *in silico* zidentyfikowano łącznie 817 potencjalnych genów docelowych dla miRNA występujących w suchych nasionach. Na podstawie wyników GO można stwierdzić, że funkcje biologiczne genów docelowych są w dużej mierze związane z metabolizmem makrocząsteczek. Zarówno znane, jak i nowe miRNA regulują aktywność katalityczną związaną z hydrolizą. W literaturze możemy znaleźć informacje, że w nasionach jęczmienia zarówno okrywa owocowo-nasienna, jak i warstwa aleuronowa są zaangażowane w produkcję i wydzielanie enzymów hydrolitycznych, które katalizują degradację skrobi i rezerw białkowych podczas kiełkowania [14]. miR159, miR168 i miR171 mogą być zaangażowane w regulację hydrolizy skrobi. Ściany komórkowe bielma stanowią potencjalną barierę ograniczającą dostęp enzymów hydrolitycznych do ich substratów w obrębie komórek bielma. Degradacja ścian komórkowych jest więc ważnym elementem we wczesnej fazie kiełkowania. Należy jednak podkreślić, że w przypadku nasion suchych, w których metabolizm jest w fazie spoczynku, zidentyfikowane miRNA nie regulują ekspresji genów podczas wykonywania analizy. Ich rolą może być regulacja genów, których ekspresja zostanie zainicjowana dopiero w momencie pojawienia się warunków środowiskowych sprzyjających kiełkowaniu.

### **miRNA, a starzenie się nasion**

Dojrzałe nasiona zawierają przechowywane długożyjące mRNA, obecne w nasionach od późnej embriogenezy, które są kluczowe dla syntezy białek we wczesnej fazie kiełkowania [15,16]. Wyniki badań jednoznacznie wskazują jednak, że poziom miRNA w suchych nasionach jęczmienia jest stały i niezależny od ich żywotności i czasu przechowywania. Badacze wykazali, że cząsteczki miRNA o zwiększonym stosunku GC lub pozbawione AU/UA w tzw. regionie „seed” i regionie „ogona” charakteryzowały się większą stabilnością. Wyniki sugerują że, stabilność miRNA jest dość wysoka. Możemy stwierdzić, że brak istotnych różnic w poziomie miRNA wynika z naturalnie wysokiej stabilności tych cząstek. Może to świadczyć, że cząsteczki miRNA nie są niszczone przez reaktywne formy tlenu (RFT), jak ma to miejsce w przypadku innych makromolekuł.

### **Degradom nasion jęczmienia**

W celu weryfikacji genów docelowych dla miRNA zidentyfikowanych w wyniku analiz *in silico* wykorzystano sekwencjonowanie degradomu. W trakcie analizy degradome-Seq wskazano dopasowanie sekwencji degradomowych do pięciu rodzin miRNA: miR1120, miR156, miR168, miR5049 oraz miR5048. Geny docelowe powiązane z sekwencjami w próbach o niskiej żywotności

związane są z początkowym etapem kiełkowania, co może wskazywać na rozpoczęcie tego procesu podczas przechowywania nasion. Sekwencje degradomowe w próbach przechowywanych o niskiej żywotności powiązane z białkami ruchu membranowego, co może wskazywać na wznowienie metabolizmu w przechowywanych nasionach i transport substancji energetycznych i zapasowych. Przedstawione w literaturze dane pozwalają na stwierdzenie, że jedną z przyczyn utraty żywotności nasion mogą być uszkodzenia membran wpływające na zachowanie integralności komórki i prawidłowy przebieg procesów komórkowych. Analizując dane dostępne w literaturze można stwierdzić, że powiązanie sekwencji degradomowych występujących jedynie w próbie o najniższej żywotności, może wskazywać na interakcje nasion z patogenami grzybowymi w trakcie przechowywania. Wśród transkryptów regulowanych przez miRNA obecne jedynie w próbie nasion o niskiej żywotności zaobserwowano powiązanie z białkiem wykazującym aktywność kinazy serynowo-treoninowej, uczestniczących w reakcjach fosforylacji białek. Wei i wsp. (2015) podczas badań nad kiełkowaniem ryżu wykazali istotną rolę fosforylacji w interakcjach fitohormonów. Można zatem wnioskować, że udział kinaz serynowo-treoninowych w fosforylacji białek wpływający na interakcje fitohormonów, np. ABA i GA, może skutkować indukcją procesu kiełkowania przez nasiona. Na podstawie powyższych wyników można zatem postawić hipotezę, że wskutek nieznacznego wzrostu zawartości wody w nasionach zaindukowane zostały procesy metaboliczne niezbędne do rozpoczęcia kiełkowania, ale w skutek niedostatecznej dostępności wody, proces ten nie mógł zostać zakończony. Przeprowadzone podczas badań analizy sekwencji degradomowych występujących w próbach nasion o wysokiej żywotności, wskazują na powiązanie ich z genami odpowiedzialnymi za translację i aktywność rybosomów. Jest to zgodne z wcześniejszymi doniesieniami Fleming'a i wsp. (2018), którzy badając długoterminowo przechowywane nasiona soi wykazali nadreprezentację transkryptów pełniących funkcje rybosomalne. Na podstawie wyników i doniesień literaturowych stwierdzono zatem, że miRNA występujące w długo przechowywanych nasionach regulują geny odpowiedzialne za aktywność rybosomów i proces translacji, których transkrypty mogą stanowić rezerwę przechowywanych mRNA niezbędnych do uruchomienia procesu kiełkowania.

Wśród zidentyfikowanych genów występujących tylko w nasionach zregenerowanych o wysokiej żywotności zaobserwowano, że geny regulowane przez miRNA odpowiedzialne są za interakcję między organizmami, co może wskazywać na interakcje nasion z patogenami grzybowymi. W nasionach przechowywanych o wysokiej żywotności, sekwencje degradomowe powiązane także ze szlakiem degradacji askorbinianu, co może wskazywać na związek z RFT. Obecność genów z tego szlaku może być powiązana z jego udziałem w cyklu komórkowym, podczas rozpoczęcia etapu kiełkowania. Podczas niniejszych badań stwierdzono, że te same miRNA powiązane jest z kilkoma sekwencjami docelowymi. Analiza degradome-Seq pozwoliła na weryfikację genów docelowych zidentyfikowanych *in silico*. Geny docelowe zidentyfikowane podczas analizy degradome-Seq stanowiły zaledwie 2,3% genów wytypowanych w analizie *in silico*. Stwierdzono zatem, że analiza sekwencji degradomowych jest odpowiednią metodą do weryfikacji celów dla miRNA wytypowanych w ramach analiz *in silico*. Geny docelowe zidentyfikowane podczas analizy sekwencji degradomowych nie zostały zidentyfikowane



wśród genów docelowych dla jęczmienia wytypowanych w analizie *in silico*. Może to wskazywać, że w suchych nasionach nie są obecne transkrypty genów które, regulowane są podczas kiełkowania przez miRNA.

### **Transkryptom nasion jęczmienia**

Podczas badań porównano transkryptomy składane *ab initio* oraz *de novo*. W wyniku analiz stwierdzono dopasowanie transkryptów do tych samych grup funkcji i procesów biologicznych. W wyniku analiz *ab initio* otrzymano mniej transkryptów, które dopasowano do genomu referencyjnego jęczmienia, co skutkowało uzyskaniem mniejszej ilości danych. Stwierdzono, że zastosowanie podejścia składania transkryptomu na podstawie genomu referencyjnego stanowi lepsze rozwiązanie w przypadku jęczmienia. Mniejsza liczba danych uzyskanych w wyniku składania transkryptomu *ab initio* może wynikać z niedokładności złożenia genomu referencyjnego jęczmienia oraz małej liczbie adnotacji. Podczas analizy potwierdzono zachowanie tendencji w poziomach ekspresji między próbami, natomiast różnice w poziomach ekspresji transkryptów podczas analiz qPCR i NGS mogą wynikać z różnych czułości obu metod. W suchych nasionach zachowane są rezerwy długo żyjących mRNA umożliwiające zapoczątkowanie procesów niezbędnych do kiełkowania (Fleming i in. 2018). Prowadzone badania wykazały fragmentację rRNA dla prób pochodzących z nasion poddanych długotrwałemu przechowywaniu. Zastosowanie parametru RIN jako jedyne i ostateczne wskaźnika oceny integralności RNA, na podstawie wyników uzyskanych w ramach niniejszej pracy zostało uznane za dyskusyjne. Podczas przygotowania bibliotek do analiz RNA-Seq zaobserwowano, że traktowanie próbek o niskim RIN jako wysoce zdegradowanych skutkowało pominięciem etapu fragmentacji RNA podczas konstruowania bibliotek, co skutkowało wysoką koncentracją zbyt długich fragmentów, nieodpowiednich dla prawidłowo skonstruowanych bibliotek (Puchta i in. 2020). W suchych nasionach, transkrypty utrzymują się nawet przez kilkadziesiąt lat do momentu rozpoczęcia kiełkowania [20]. Postuluje się, że szybkie przywrócenie metabolizmu nasion podczas imbibicji jest wynikiem wczesnej translacji zmagazynowanego mRNA [15]. W badanym materiale zaobserwowano największą obfitość dla krótkich transkryptów do 1 000 pz długości, wraz ze wzrostem długości transkryptów ich obfitość malała. Wśród zidentyfikowanych transkryptów występowały braki w egzonach. Braki dotyczyły najczęściej pierwszych egzonów i w największym stopniu występowały w próbce nasion o niskiej żywotności przechowywanych długoterminowo. Fleming i wsp. (2018) wykazali, że u soi dłuższe transkrypty są bardziej narażone na uszkodzenia i postulowali, że jest to spowodowane oddziaływaniem RFT. Uzyskane podczas niniejszych badań wyniki pokrywają się z obserwacjami Sano i wsp. (2020). Identyfikacja funkcji związanych z translacją w przypadku egzonów, które zostały utracone w nasionach przechowywanych długoterminowo o niskiej żywotności może być przyczyną utraty zdolności kiełkowania (Sano i in. 2020). Analizując funkcje uszkodzonych transkryptów zaobserwowano ich udział w aktywności katalitycznej, aktywności transporterowej oraz translacji. Uszkodzone transkrypty powiązано z aktywnością transferaz, oksydoreduktaz, hydrolaz, białek metabolizmu kwasów nukleinowych, białek transporterowych i białek biorących udział w translacji. Uważa się, że zmagazynowane mRNA jest wykorzystywane i wystarczające do kiełkowania

w zdrowych nasionach. Brakuje jednak informacji, aby określić czy pofragmentowane mRNA utrudnia wznowienie metabolizmu, gdy nasiona o wyciszonym metabolizmie ulegną uwodnieniu. Przypuszcza się, że pofragmentowane transkrypty mogą spowalniać translację i generować dysfunkcje białek, jeśli w ogóle ulegną translacji, co jest zgodne z tezą wysnutą podczas niniejszych badań (Fleming i in. 2018). Uszkodzenia białek ulegających translacji oraz całkowitego RNA mogą stanowić jedną z głównych przyczyn utraty zdolności kiełkowania. Niezdolność do odzyskania zdegradowanych transkryptów odgrywających istotne funkcje podczas kiełkowania może być przyczyną śmiertelności nasion (Fleming i in. 2018).

#### **Analiza funkcji genów powiązanych z transkryptami zidentyfikowanymi w nasionach o wysokim poziomie żywotności**

Transkrypty, których nie zidentyfikowano w próbie o niskiej żywotności poddano analizie GO. Ich funkcje odpowiadały głównie za procesy komórkowe, procesy molekularne, aktywność katalityczną i wiązanie. Transkrypty te powiązano z białkami modyfikującymi enzymy, enzymami interkonwersji metabolitów oraz białkami metabolizmu kwasów nukleinowych. Te same funkcje powiązano z transkryptami obecnymi w próbach o wysokiej żywotności. Wyniki wzbogacenia GO wskazują nadreprezentowanie genów zaangażowanych w rozwój. Jest to zgodne z procesem inicjacji kiełkowania, w trakcie którego wiele struktur wymaga naprawy lub syntezy *de novo*. Kluczowe dla rozpoczęcia kiełkowania jest pierwsze 24 godz., podczas których następuje wznowienie metabolizmu i naprawa komórkowa. Rajjou i wsp. (2008) wykazali, że białka i mRNA przechowywane w suchych dojrzałych nasionach są wystarczające do rozpoczęcia procesu kiełkowania [23].

#### **Analiza funkcji genów powiązanych z transkryptami zidentyfikowanymi w nasionach o niskim poziomie żywotności**

W wyniku analiz transkryptów występujących tylko w nasionach przechowywanych o niskiej żywotności, wyłoniono transkrypt dopasowany do genu *Sip1* powiązanego z białkiem odpowiedzialnym za imbibicję nasion. Podczas badań genów *Sip* w pomidorze zaobserwowano, że posiada on aktywność alkalicznej  $\alpha$ -galaktozydazy [25]. Dostępne dane literaturowe pozwalają na stwierdzenie, że geny *Sip1* biorą udział w metabolizmie energetycznym komórki, przez co pozwalają uśpionemu zarodkowi na rozpoczęcie kiełkowania. Biorąc pod uwagę powyższe doniesienia należy uznać, że wyniki analizy transkryptomu i degradomu są spójne i wskazują na inicjację kiełkowania w próbie nasion o najniższej żywotności.

#### **Analiza funkcji genów dopasowanych do transkryptów wykazujących istotne obniżenie ekspresji wraz ze wzrostem żywotności**

W wyniku analiz GO stwierdzono, że transkrypty wykazujące istotne obniżenie poziomu ekspresji wraz ze wzrostem żywotności powiązano z aktywnością katalityczną transferaz i hydrolaz oraz aktywnością kinaz. Do grup białek kodowanych przez transkrypty wykazujące spadek poziomu wraz z obniżeniem żywotności zaliczono białka translacyjne, w grupie których zawierały się białka rybosomalne i czynniki translacyjne. Transkrypty wykazujące związek z wyciszaniem genów poprzez działanie RNA, może wskazywać na ich udział w utrzymaniu spoczynku. Transkrypty różnicujące próbę

przechowywaną nieżywną i próbę regenerowaną o wysokiej żywotności przyporządkowano do katalizy metylacji poprzez kompleks N-6 metyloadenozyno metylotransferaz. Dostępne dane literaturowe mogą wskazywać, że transkrypty zidentyfikowane podczas niniejszych badań brały udział w regulacji ekspresji miRNA poprzez metylację AGO podczas spoczynku nasion. Podczas analizy badań jęczmienia o niskiej żywotności prowadzonej w ramach niniejszej pracy zidentyfikowano transkrypty powiązane z białkami pełniącymi funkcje składnika strukturalnego rybosomów. Zaobserwowano, iż w próbach przechowywanych o niskiej żywotności transkrypty powiązane z defosforylacją stanowiły istotnie wyższy poziom, niż w próbie regenerowanej. Le i wsp. (1998) zaobserwowali białka SSP w dojrzałych nasionach i zasugerowali, że fosforylacja tych białek może stanowić sposób na zmagazynowanie fosforu do czasu kiełkowania. Fosforylacja białek przez kinazy białkowe MAPK sugeruje udział w kontroli ABA, a tym samym kontroli spoczynku i kiełkowania nasion [137]. Zaobserwowany podczas niniejszych badań zróżnicowany poziom ekspresji transkryptów powiązanych ze ścieżkami aktywacji cytokinin, może świadczyć o wzroście korzonka zarodkowego i rozpoczęciu kiełkowania w nasionach przechowywanych o niskiej żywotności. Hutton i Van Staden (1982) stwierdzili, iż główną rolą cytokinin może być kontrola białek i translokacja giberelin z zarodka, co uruchamia procesy biochemiczne. W wyniku analiz zidentyfikowano także transkrypty powiązane z GTPazami. Natomiast Li i wsp. (2001) wskazali, że ROP należący do rodziny GTPaz jest negatywnym regulatorem spoczynku nasion. W porównaniu do wcześniejszych wyników innych autorów, identyfikacja GTPaz w próbach o niskiej żywotności może wskazywać na ich udział w hamowaniu kiełkowania. Szczegółowa analiza transkryptów, których ekspresja była odwrotnie proporcjonalna do poziomu żywotności, także wskazuje na inicjację kiełkowania w nasionach o najniższej żywotności.

#### **Analiza funkcjonalna transkryptów powiązanych z miRNA i sekwencjami degradomowymi**

W wyniku niniejszych analiz zaobserwowano powiązanie kilku miRNA do tych samych sekwencji degradomowych i transkryptomowych, co świadczy o regulacji przez miRNA ekspresji różnych transkryptów. miR168 o wysokiej ekspresji w nasionach regenerowanych powiązано z sekwencjami degradomowymi i transkryptomowymi występującymi we wszystkich próbach. W wyniku analiz GO transkrypty powiązано z translacją i aktywnością rybosomów, transkrypty o wymienionych funkcjach zaobserwowano, również w wyniku analiz degradomu i analiz transkryptów o istotnych różnicach ekspresji między próbami. Zidentyfikowane funkcje transkryptów mogą wskazywać na ich udział w zapoczątkowaniu metabolizmu komórkowego poprzez translacje białek z mRNA przechowywanych w nasionach. miR5048 występujące we wszystkich próbach na wysokim poziomie, powiązано z sekwencjami degradomowymi zidentyfikowanymi tylko w próbie przechowywanej o wysokiej żywotności i transkryptami zidentyfikowanymi we wszystkich badanych próbach. W wyniku analiz GO transkrypty powiązано z funkcją rybulozo-fosforan-3 epimerazy (RPE) powiązanym z aktywnością racemazy i epimerazy, katalizujących zmianę konformacji jednego lub więcej centrów chiralnych w cząsteczkach węglowodanów. RPE zaangażowany jest w szlak pentozo-fosforanowy (PPP) odgrywający kluczową rolę w ochronie komórki przed stresem oksydacyjnym [30]. Podczas analizy 2 DE stwierdzono, że Cys5 była utleniana w starzejących się hepatocytach, a skutki

stresu oksydacyjnego łagodzone były przez potęgowanie działania szlaku PPP poprzez redukcję reszt Cys5 w białku RPE [30]. Zaobserwowano, że szlak pentozo-fosforanowy był alternatywą katabolizmu glukozy poprzez glikolizę i cykl Krebsa. Początkowo twierdzono, że podstawową rolą PPP jest przerywanie spoczynku zarówno roślin, jak i nasion. Udowodniono również, że w niedojrzałych nasionach szlak pentozo-fosforanowy w większym stopniu uczestniczył w utlenianiu glukozy, niż w nasionach dojrzałych morfologicznie. Utlenianie glukozy w młodych tkankach w wyniku szlaku PPP było minimalne, ale wzrastało wraz z wiekiem. W większości dotychczas przebadanych organów roślinnych stwierdzono aktywność szlaku PPP, jak i szlaku glikolitycznego [30]. Zidentyfikowane transkrypty dopasowano, również do funkcji pentozo-5-fosfato-epimerazy, która jest integralną częścią oksydacyjnego szlaku pentozofosforanowego i cyklu Calvina. Mutanty pentozo-5-fosfato-epimerazy nie wykazywały zdolności do kiełkowania bez egzogennych węglowodanów, natomiast dodatek sacharozy do podłoża powodował pobudzenie kiełkowania [31].

Analizując transkrypty powiązane z białkiem zawierającym domenę S-1 o funkcji izomerazy i inicjacji translacji, zaobserwowano powiązanie go z miR5049 zidentyfikowanym na niskim poziomie we wszystkich próbach oraz sekwencją degradomową występującą w próbach przechowywanych o wysokiej żywotności, co może świadczyć o udziale transkryptów w procesach energetycznych w trakcie początkowych etapów kiełkowania. Livesley i wsp. (1992) w zarodkach i warstwie aleuronowej kiełkujących nasion pszenicy stwierdzili aktywność disulfidoizomerazy (PDI). Zaobserwowali, że aktywność PDI w prawidłowo kiełkujących nasionach była istotnie wyższa, niż w ich nieprawidłowo kiełkujących odpowiednikach i malała w miarę postępu kiełkowania. Wang i wsp. (2015) zasugerowali udział PDI w glikolizie i cyklu TCA podczas rozwoju nasion.

Analizy GO transkryptów powiązanych z miRNA pozwoliły na zaobserwowanie ich udziału w wiązaniu kwasów nukleinowych oraz RNA, metabolizmie węglowodanów, inicjacji translacji i degradacji kwasu askorbinowego. Powiązanie kwasu askorbinowego z procesem starzenia omówiono w rozdziale dyskusji dotyczącej degradomu, gdzie zasugerowano jego udział w interakcjach z RFT.

## **PODSUMOWANIE I WNIOSKI**

1. miRNA stanowi stabilną frakcję w nasionach, niezależnie od żywotności nasion oraz długości przechowywania. miRNA to klasa RNA, która nie ulega degradacji w wyniku starzenia nasion
2. Rolą miRNA przechowywanych w nasionach jest regulacja genów, których ekspresja zostanie zainicjowana w momencie pojawienia się sprzyjających kiełkowaniu warunków środowiskowych
3. miRNA gromadzone w suchych nasionach są gwarancją prawidłowej ekspresji genów podczas początkowych etapów kiełkowania
4. W miRNomie suchych nasion jęczmienia występuje duża grupa tkankowo specyficznych miRNA, które nie zostały wcześniej zidentyfikowane w jęczmieniu
5. Wartość RIN nie wskazuje na stopień degradacji frakcji mRNA. mRNA jest dobrze zachowaną frakcją w stosunku do frakcji rRNA w suchych nasionach poddanych przechowywaniu. Różne frakcje RNA ulegają uszkodzeniu w różnym stopniu podczas starzenia

6. Analiza genów docelowych poprzez sekwencjonowanie degradomowe dostarcza bardziej miarodajnych wyników w stosunku do analizy *in silico*, uwzględniając przy tym transkrypty obecne w roślinie w momencie badania
7. Braki egzonów w nasionach o niskiej żywotności poddanych przechowywaniu wskazują na uszkodzenia transkryptów przez wolne rodniki
8. Identyfikacja transkryptów występujących podczas kiełkowania wskazuje na rozpoczęcie procesu kiełkowania podczas przechowywania w nasionach o niskiej żywotności i nieukończenie go ze względu na niesprzyjające warunki
9. W transkryptomach nasion o niskiej i wysokiej żywotności poddanych długotrwałemu przechowywaniu występują istotne różnice w poziomie ekspresji
10. Transkrypty zgromadzone w nasionach o wysokiej żywotności poddanych długotrwałemu przechowywaniu wskazują na zmagazynowanie mRNA niezbędnego do ponownego rozpoczęcia metabolizmu i inicjacji procesu kiełkowania
11. Uruchomienie procesów metabolicznych w nasionach o niskiej żywotności podczas długotrwałego przechowywania i utrata zdolności do kiełkowania, może świadczyć o rozpoczęciu procesu tożsamego z primingiem nasion

## SPIS LITERATUROWY

1. Starega-Roslan J, Koscianska E, Kozlowski P, Krzyzosiak WJ. The role of the precursor structure in the biogenesis of microRNA. *Cell Mol Life Sci.* 2011;68: 2859–2871. doi:10.1007/s00018-011-0726-2
2. Morin RD, O'Connor MD, Griffith M, Kuchenbauer F, Delaney A, Prabhu A-L, et al. Application of massively parallel sequencing to microRNA profiling and discovery in human embryonic stem cells. *Genome Res.* 2008;18: 610–621. doi:10.1101/gr.7179508
3. Ramachandran V, Chen X. Degradation of microRNAs by a family of exoribonucleases in Arabidopsis. *Science.* 2008;321: 1490–1492. doi:10.1126/science.1163728
4. Li J, Yang Z, Yu B, Liu J, Chen X. Methylation protects miRNAs and siRNAs from a 3'-end uridylation activity in Arabidopsis. *Curr Biol CB.* 2005;15: 1501–1507. doi:10.1016/j.cub.2005.07.029
5. Xie Z, Johansen LK, Gustafson AM, Kasschau KD, Lellis AD, Zilberman D, et al. Genetic and Functional Diversification of Small RNA Pathways in Plants. Detlef Weigel, editor. *PLoS Biol.* 2004;2: e104. doi:10.1371/journal.pbio.0020104
6. Mi S, Cai T, Hu Y, Chen Y, Hodges E, Ni F, et al. Sorting of small RNAs into Arabidopsis argonaute complexes is directed by the 5' terminal nucleotide. *Cell.* 2008;133: 116–127. doi:10.1016/j.cell.2008.02.034
7. Guo L, Chen F. A challenge for miRNA: multiple isomiRs in miRNAomics. *Gene.* 2014;544: 1–7. doi:10.1016/j.gene.2014.04.039
8. Deng P, Bian J, Yue H, Feng K, Wang M, Du X, et al. Characterization of microRNAs and their targets in wild barley (*Hordeum vulgare* subsp. *spontaneum*) using deep sequencing. Cloutier S, editor. *Genome.* 2016;59: 339–348. doi:10.1139/gen-2015-0224
9. Wang L, Liu H, Li D, Chen H. Identification and characterization of maize microRNAs involved in the very early stage of seed germination. *BMC Genomics.* 2011;12: 154. doi:10.1186/1471-2164-12-154
10. Hu J, Jin J, Qian Q, Huang K, Ding Y. Small RNA and degradome profiling reveals miRNA regulation in the seed germination of ancient eudicot *Nelumbo nucifera*. *BMC Genomics.* 2016;17: 684. doi:10.1186/s12864-016-3032-4
11. Wang X, Elling AA, Li X, Li N, Peng Z, He G, et al. Genome-Wide and Organ-Specific Landscapes of Epigenetic Modifications and Their Relationships to mRNA and Small RNA Transcriptomes in Maize. *Plant Cell.* 2009;21: 1053–1069. doi:10.1105/tpc.109.065714
12. Millar AA. The Arabidopsis GAMBYB-Like Genes, MYB33 and MYB65, Are MicroRNA-Regulated Genes That Redundantly Facilitate Anther Development. *PLANT CELL ONLINE.* 2005;17: 705–721. doi:10.1105/tpc.104.027920
13. Li W, Cui X, Meng Z, Huang X, Xie Q, Wu H, et al. Transcriptional regulation of Arabidopsis MIR168a and argonaute1 homeostasis in abscisic acid and abiotic stress responses. *Plant Physiol.* 2012;158: 1279–1292. doi:10.1104/pp.111.188789
14. Gibbons GC. On the relative role of the scutellum and aleurone in the production of hydrolases during germination of barley. *Carlsberg Res Commun.* 1981;46: 215–225. doi:10.1007/BF02906499
15. Sano N, Ono H, Murata K, Yamada T, Hirasawa T, Kanekatsu M. Accumulation of long-lived mRNAs associated with germination in embryos during seed development of rice. *J Exp Bot.* 2015;66: 4035–4046. doi:10.1093/jxb/erv209
16. Marcus A, Feeley J. ACTIVATION OF PROTEIN SYNTHESIS IN THE IMBIBITION PHASE OF SEED GERMINATION. *Proc Natl Acad Sci.* 1964;51: 1075–1079. doi:10.1073/pnas.51.6.1075
17. Fleming MB, Patterson EL, Reeves PA, Richards CM, Gaines TA, Walters C. Exploring the fate of mRNA in aging seeds: protection, destruction, or slow decay? *J Exp Bot.* 2018;69: 4309–4321. doi:10.1093/jxb/ery215
18. Das J, Kumar R. Plant Wnt: Deciphering a Novel Signalling Pathway in Plants. *Curr Sci.* 2016;111: 1319. doi:10.18520/cs/v111/i8/1319-1324
19. Puchta M, Boczkowska M, Groszyk J. Low RIN Value for RNA-Seq Library Construction from Long-Term Stored Seeds: A Case Study of Barley Seeds. *Genes.* 2020;11: 1190. doi:10.3390/genes11101190
20. Dure L, Waters L. Long-Lived Messenger RNA: Evidence from Cotton Seed Germination. *Science.* 1965;147: 410–412. doi:10.1126/science.147.3656.410

21. Sano N, Rajjou L, North HM. Lost in Translation: Physiological Roles of Stored mRNAs in Seed Germination. *Plants*. 2020;9: 347. doi:10.3390/plants9030347
22. Rajjou L, Gallardo K, Debeaujon I, Vandekerckhove J, Job C, Job D. The Effect of  $\alpha$ -Amanitin on the Arabidopsis Seed Proteome Highlights the Distinct Roles of Stored and Neosynthesized mRNAs during Germination. *Plant Physiol*. 2004;134: 1598–1613. doi:10.1104/pp.103.036293
23. Rajjou L, Lovigny Y, Groot SPC, Belghazi M, Job C, Job D. Proteome-Wide Characterization of Seed Aging in Arabidopsis: A Comparison between Artificial and Natural Aging Protocols. *Plant Physiol*. 2008;148: 620–641. doi:10.1104/pp.108.123141
24. Wei T, He Z, Tan X, Liu X, Yuan X, Luo Y, et al. An integrated RNA-Seq and network study reveals a complex regulation process of rice embryo during seed germination. *Biochem Biophys Res Commun*. 2015;464: 176–181. doi:10.1016/j.bbrc.2015.06.110
25. Carmi N, Zhang G, Petreikov M, Gao Z, Eyal Y, Granot D, et al. Cloning and functional expression of alkaline alpha-galactosidase from melon fruit: similarity to plant SIP proteins uncovers a novel family of plant glycosyl hydrolases. *Plant J*. 2003;33: 97–106. doi:10.1046/j.1365-313X.2003.01609.x
26. Le H, Browning KS, Gallie DR. The Phosphorylation State of the Wheat Translation Initiation Factors eIF4B, eIF4A, and eIF2 Is Differentially Regulated during Seed Development and Germination. *J Biol Chem*. 1998;273: 20084–20089. doi:10.1074/jbc.273.32.20084
27. Hubbard KE, Nishimura N, Hitomi K, Getzoff ED, Schroeder JI. Early abscisic acid signal transduction mechanisms: newly discovered components and newly emerging questions. *Genes Dev*. 2010;24: 1695–1708. doi:10.1101/gad.1953910
28. Hutton MJ, Van Staden J. Cytokinins in Germinating Seeds of Phaseolus vulgaris L. II. Transport and Metabolism of 8[14C]-Zeatin Applied to the Radicle. *Ann Bot*. 1982;49: 693–699. doi:10.1093/oxfordjournals.aob.a086297
29. Li H, Shen J-J, Zheng Z-L, Lin Y, Yang Z. The Rop GTPase Switch Controls Multiple Developmental Processes in Arabidopsis. *Plant Physiol*. 2001;126: 670–684. doi:10.1104/pp.126.2.670
30. Morales-Prieto N, López de Lerma N, Pacheco IL, Pérez J, Peinado RA, Abril N. Redox proteomics reveals the hepatoprotective effect of must from Pedro Ximénez dried grapes in aged Mus spretus mice. *J Funct Foods*. 2017;34: 89–97. doi:10.1016/j.jff.2017.04.025
31. Favery B, Lecomte P, Gil N, Bechtold N, Bouchez D, Dalmaso A, et al. RPE, a plant gene involved in early developmental steps of nematode feeding cells. *EMBO J*. 1998;17: 6799–6811. doi:10.1093/emboj/17.23.6799
32. Livesley MA, Bulleid NJ, Bray CM. Protein disulfide isomerase in germinating wheat (*Triticum aestivum*) seed and during loss of viability. *Seed Sci Res*. 1992;2: 97–103. doi:10.1017/S0960258500001197
33. Wang W-Q, Liu S-J, Song S-Q, Møller IM. Proteomics of seed development, desiccation tolerance, germination and vigor. *Plant Physiol Biochem*. 2015;86: 1–15. doi:10.1016/j.plaphy.2014.11.003