



Identyfikacja zmienności genetycznej pszenicy korelującej z potencjałem plonotwórczym i wybranymi cechami systemu korzeniowego

Zadanie nr 5. Realizacja w latach 2014 - 2020

Zespół badawczy: **Anna Nadolska-Orczyk (a.orczyk@ihar.edu.pl), Karolina Szala, Hanna Ogonowska, Izabela Rajchel, Renata Wyszyńska, Maja Boczkowska, Sebastian Gasparis, Maciej Kała**

Zakład Genomiki Funkcjonalnej

**Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – Państwowy Instytut Badawczy,
Radzików**

Cele projektu

Hipoteza badawcza: zakłada, że ekspresja genów z rodziny *TaCKX* występująca w rozwijających się kłosach i/lub systemie korzeniowym wskazuje na potencjał plonotwórczy i/lub masę systemu korzeniowego.

Celami badań była:

- weryfikacja, czy profil ekspresji wskazanej grupy genów jest związany z parametrami określającymi produktywność oraz
- identyfikacja i wykorzystanie znaczników molekularno-fizjologicznych do poszerzenia puli genetycznej pszenicy o formy, których podłoże genetyczne wskazuje na podwyższony potencjał plonowania i silniejszy system korzeniowy.

Wszystkie cele główne i szczegółowe zostały osiągnięte.

Materiały i metody

Materiał:

Rok 2015 - 50 genotypów z 4 źródeł: dwóch populacji mapujących (Quarrie i in. 2005, Cuthbert i in. 2008) oraz linie hodowlane z dwóch polskich hodowli (Hodowla Roślin Strzelce, Sp. z o.o. Grupa IHAR i Hodowla Roślin Danko, Sp. z o.o.); rok 2016 – dalsze 50 genotypów; 2017 - 30 genotypów hodowlanych, 3 F₁; 2018 - 10 genotypów hodowlanych i 6 F₁; 2019 - 10 genotypów hodowlanych, 4 F₁ i 6 F₂; 2020 – 3 genotypy i 4 mieszańce pokolenia F₁, segregujące roślin F₂ z 4 mieszańców F₁, 10 linii F₃ wybranych z 10 pojedynków F₂

Metody:

- izolacja DNA, projektowanie starterów, PCR, klonowanie i sekwencjonowanie,
- izolacja RNA z korzeni i kłosów (Tri-Reagent, Sigma Aldrich i inne; dopracowanie procedury w 2016), ocena koncentracji i jakości,
- synteza cDNA na matrycy RNA z wykorzystaniem odwrotnej transkryptazy (Thermo Scientific),
- wybór genu referencyjnego (ADP-ribosylation factor),
- ilościowa analiza ekspresji genów z rodziny *TaCKX* oraz *TaNAC2-5A* (RT-qPCR) w korzeniach siewek i w dojrzewających kłosach,
- pomiary aktywności enzymu dehydrogenazy cytokininy (CKX), pomiary białka,
- wytypowanie genotypów do krzyżowań, uzyskanie mieszańców F₁, segregujących roślin F₂ oraz pokolenia F₃,
- fenotypowanie - pomiary morfometryczne cech związanych z produktywnością i masa korzeni siewek,
- analiza statystyczna w programie STATISTICA - istotność zmian przy wykorzystaniu analizy wariancji ANOVA i testów post-hoc; korelacje między badanymi cechami i znacznikami wg. Pearsona i/lub Spearmana.

Wyniki

2014:

Wybór i kolekcja 100 genotypów pszenicy z dwóch populacji mapujących.
Optymalizacja pomiaru ekspresji genów; wybór genu referencyjnego.

2015:

Wyznaczenie korelacji pomiędzy znacznikami genetyczno / biochemicznie / fizjologicznymi wybranych genów *TaCKX* a produktywnością i masą korzenia w różnych genotypach/materiałach hodowlanych, tj:

- wyznaczenie ekspresji względnej genu *TaCKX1* i *TaCKX2* w rozwijających się kłosach i korzeniach w 50 genotypach,
- pomiary aktywności enzymu CKX w rozwijających się kłosach i korzeniach; opis fenotypowy - 50 genotypów,
- sekwencjonowanie fragmentu genów *TaCKX1* i *TaCKX2* w dwóch odmianach i dwóch tkankach.

2016:

Kontynuacja analizy korelacji pomiędzy poziomem ekspresji wybranych genów *TaCKX* (*TaCKX1*, *TaCKX5*) oraz aktywnością enzymu CKX w badanych tkankach a produktywnością/masą korzenia w wybranych genotypach pszenicy zwyczajnej (kontynuacja jw. dla następnych 50 genotypów).

Ponadto:

- opracowano najnowsze dane literaturowe na temat genów głównych, odgrywających istotną rolę w produktywności pszenicy (publikacja w TAG),
- wytypowano materiały hodowlane do badań.

Wyniki

2017:

Ocena za pomocą wyznaczonych znaczników genetyczno / biochemiczno / fizjologicznych produktywności i masy korzenia w wytypowanych 30 hodowlanych genotypach / materiałach hodowlanych oraz wykonanie krzyżowań dla wybranych genotypów.

- Pomiar ekspresji genów *TaCKX1*, *TaCKX5*, *TaCKX6* i *TaNAC2-5A*, aktywności enzymu CKX (rozwijające się kłosa, korzenie siewek); ocena cech fenotypowych,
- przeprowadzenie i uzyskanie F_1 z 6 krzyżowań.

2018:

Ocena dziedziczenia znaczników genetyczno / biochemiczno / fizjologicznych produktywności i masy korzenia w przekazanych przez hodowców genotypach / materiałach hodowlanych i poszerzenie puli charakteryzowanych genotypów (ocena minimum 6 F_1 ; poszerzenie puli genotypów - minimum 10).

- oceniono poziom ekspresji względnej genów *TaCKX1*, *TaCKX6* i *TaNAC2-5A* w korzeniach siewek oraz genu *TaCKX1* w dojrzewających kłosach,
- wykonano pomiary aktywności enzymu CKX w próbkach poddawanych analizie ekspresji genów *TaCKX*,
- oceniono poziom ekspresji względnej genów *TaCKX2.1* oraz *TaCKX2.2* w kłosach 30 genotypów analizowanych w poprzednim roku,
- dane były korelowane z oceną najważniejszych cech fenotypowych związanych z produktywnością i masą korzenia siewek w celu doboru odpowiednich genotypów do dalszych krzyżowań.

Wyniki

2019:

Kontynuowano ocenę dziedziczenia znaczników genetyczno / biochemiczno / fizjologicznych produktywności i masy korzenia w przekazanych przez hodowców genotypach / materiałach hodowlanych i poszerzano pulę charakteryzowanych genotypów (ocena minimum 6 F₂; poszerzenie puli genotypów - minimum 10).

- wykonano dalsze 4 krzyżowania w celu uzyskania następnych mieszańców pokolenia F₁,
- oceniono poziom ekspresji względnej genów *TaCKX1*, *TaCKX6* oraz *TaNAC2-5A* w korzeniach siewek i genów *TaCKX1*, *TaCKX2.1/2.2* oraz *TaNAC2-5A* w dojrzewających kłosach segregujących pojedynków F₂ (z otrzymanych wcześniej 6 mieszańców pokolenia F₁) oraz wytypowanych 10 genotypów,
- dane te były korelowane z oceną najważniejszych cech fenotypowych, masą korzenia siewek, produktywnością i innymi ważnymi cechami.

2020:

Przeprowadzono ocenę znaczników genetyczno / biochemiczno / fizjologicznych produktywności i masy korzenia w segregujących materiałach i analizę dziedziczenia znaczników/cechy w pokoleniach T₂ i T₃ (trzeci rok badań), tj:

- oceniono poziom ekspresji względnej genów *TaCKX1*, *TaCKX5* i *TaNAC2-5A* w korzeniach siewek i genów *TaCKX1*, *TaCKX2.1/2.2* oraz *TaNAC2-5A* w dojrzewających kłosach: 3 genotypów rodzicielskich, 4 mieszańców F₁, 24 segregujących pojedynków F₂ (z otrzymanych wcześniej 4 mieszańców pokolenia F₁) oraz w dojrzewających kłosach 10 linii F₃ wybranych z 10 pojedynków F₂,
- dane korelowano z oceną najważniejszych cech fenotypowych, masą korzenia siewek, produktywnością i innymi ważnymi cechami.

Dyskusja

Realizację tematu badawczego rozpoczęto od dopracowania metody izolacji RNA i ilościowego pomiaru ekspresji genów w rozwijających się kłosach oraz korzeniach siewek. Kompatybilność wyników w tych dwóch różnych organach wymagała m.in. dobrania odpowiedniej procedury i genu referencyjnego.

W drugim etapie wytypowano i przetestowano ekspresję wybranych genów z rodziny *TaCKX* w 100 zróżnicowanych genotypach pszenicy. Wyniki korelacji (pozytywnej lub negatywnej) pomiędzy poziomem ekspresji genów *TaCKX* a cechami plonotwórczymi potwierdziły istotną rolę wybranych genów w rozwoju roślin, w tym korzenia i kłosa oraz produktywności. Potwierdzenie tych wyników obserwowano w kolejnych, testowanych materiałach hodowlanych z Danko HR i HR Strzelce. Wyniki te pozwoliły na wybór odpowiednich znaczników produktywności, tj. poziomu ekspresji określonych genów z rodziny *TaCKX* oraz aktywności enzymu CKX. Ponieważ ekspresja tych genów w większości jest tkankowo specyficzna, zgodnie z przewidywaniami część z nich jest znacznikami produktywności w rozwijającym się kłosie a część w korzeniu siewek. Na podstawie tych wyników dobrano odpowiednie genotypy hodowlane do krzyżowań. W celu wykazania ich dziedzicznego charakteru, wyznaczone znaczniki produktywności wykorzystano do selekcji wysokoprodukcyjnych pojedynków w F_2 i sprawdzenia ich przekazywania do pokolenia F_3 . Dane poziomu ekspresji w powiązaniu z produktywnością potwierdziły skuteczność wybranych mierników do prowadzenia selekcji produktywności w materiałach hodowlanych pszenicy.

Przedstawione badania, łącznie z dotychczas opublikowanymi (przezrocze 10; zwłaszcza Szala i in. 2020), są badaniami nowymi w skali światowej i wnoszą istotny wkład w rozwój hodowli pszenicy. Publikacja na temat dziedziczenia wyznaczonych znaczników będzie opracowana w 2021. Realizacja tematu umożliwiła przeprowadzenie badań w ramach doktoratu mgr K. Szala.

Wnioski

- Zgodnie z założoną hipotezą wyznaczony wzór ekspresji wybranych genów z rodziny *TaCKX* w różnych organach i tkankach rozwijających się roślin pszenicy może wskazywać na ich rolę w produktywności.
- Bardzo duże różnice w poziomie ekspresji genów *TaCKX2*, *TaCKX5* i *TaCKX1* w rozwijających się ziarniakach wśród testowanych materiałów hodowlanych mogą wpływać na istotność zmian związanych z produktywnością.
- Negatywna korelacja pomiędzy ekspresją genów *TaCKX1* i *TaCKX5* w kłosach badanych materiałów hodowlanych a plonem weryfikuje pozytywnie założoną hipotezę badawczą.
- Materiały z HR Strzelce wykazują znacznie większe zróżnicowanie pod względem badanych mierników (ekspresja w korzeniach, aktywność CKX w kłosach), niż materiały z HR Danko co wpływa na wyniki oczekiwanych korelacji i możliwość użycia badanych parametrów do selekcji.
- Silna (zwłaszcza w materiałach z HR Strzelce) korelacja między masą korzenia i aktywnością enzymu w tym organie wskazuje, że aktywność enzymu CKX może być użyta jako marker I fazy rozwoju korzenia.
- Negatywna korelacja pomiędzy aktywnością enzymu CKX w kłosach a plonem wskazuje, że ten czynnik może być pomocny przy ocenie potencjału plonotwórczego genotypów pszenicy.
- Brak istotnej korelacji pomiędzy ekspresją genu *TaCKX1* w kłosach zebranych z pola i w kłosach pochodzących z fitotronu świadczy o wpływie środowiska na ekspresję tego genu.
- Istotna statystycznie, silna korelacja pomiędzy ekspresją genów *TaCKX1*, *TaCKX6* oraz *TaNAC2-5A* w korzeniach siewek wskazuje na silną koregulację tych genów.
- Korelacje ekspresji genów *TaCKX1* i *TaCKX6* w korzeniu z niektórymi cechami plonotwórczymi wskazują, że mogą one być przydatne jako znaczniki masy korzenia (ekspresja *TaCKX1*) czy też produktywności (ekspresja *TaCKX6*).
- Silna, istotna statystycznie korelacja między ekspresją genów *TaCKX2.1* a *TaCKX2.2* w kłosach 7 DAP 12 rodów i odmian z HR Strzelce pochodzących z pola oraz brak istotnej korelacji między tymi genami w badanych genotypach z fitotronu świadczy o silnej współpracy tych genów w środowisku.
- Poziom ekspresji badanych genów z rodziny *TaCKX* jest dziedziczony do trzeciego pokolenia generatywnego (T_3).

Osiągnięcia projektu

- Opracowano precyzyjną metodę ilościowej analizy ekspresji genów pszenicy.
- Wykazano za pomocą korelacji, że poziom ekspresji określonych genów *TaCKX* oraz aktywność enzymu CKX w rozwijających się kłosach i/lub korzeniach siewek w materiałach hodowlanych mogą być znacznikami produktywności.
- Udokumentowano występowanie bardzo dużego zróżnicowania w poziomie ekspresji określonych genów *TaCKX* w materiałach hodowlanych, co umożliwia wybór określonych genotypów do hodowli (Rys. 2, Szala i in. 2020).
- Wykazano, że inne grupy genów *TaCKX* regulują cechy plonotwórcze na polu a inne w fitotronie (Rys. 4, Szala i in. 2020).
- Znaczniki produktywności są dziedziczone (potwierdzone w F_3) i można ich użyć do selekcji określonego fenotypu.

Publikacje oryginalne (4):

- Zalewski W., Gasparis S., Boczkowska M., Rajchel I.K., Kała M., Orczyk W., Nadolska-Orczyk A. **2014**. Expression patterns of *HvCKX* genes indicate their role in growth and reproductive development of barley. PloS ONE 9(12)1-20: e115729. (MEiN = 100 p., IF₅ = 3,227).
- Nadolska-Orczyk A, Rajchel IK, Orczyk W, Gasparis S. **2017**. Major genes determining yield-related traits in wheat and barley. Theor. Appl. Genet., 130:1081–1098, DOI : 10.1007/s00122-017-2880-x.). (MEiN = 140 p., IF₅ = 4,603).
- Ogonowska H., Barchacka K., Gasparis S., Jablonski B., Orczyk W., Nadolska-Orczyk A. 2019. Specificity of Expression of *TaCKX* Family Genes in Developing Plants of Wheat and Their Co-Operation Within and Among Organs, Plos One 14 (4): e0214239 doi: 10.1371/journal.pone.0214239. (MEiN = 100 p., IF₅ = 3,227).
- Szala K, Ogonowska H, Lugowska B, Zmijewska B, Wyszynska R, Dmochowska-Boguta M, Orczyk W, Nadolska-Orczyk A. 2020. Different sets of *TaCKX* genes affect yield-related traits in wheat plants grown in a controlled environment and in field conditions. BMC Plant Biol 20:496, 1-13, <https://doi.org/10.1186/s12870-020-02713> (MEiN = 140 p., IF₅ = 4,494).

Doniesienia konferencyjne (10):

- Nadolska-Orczyk A, Gasparis S, Zalewski W, Yanushevska Y, Orczyk W. 2014. RNAi in practice - PTGS silencing in functional studies of agronomically important cereal genes. Konferencja „Post-transcriptional gene regulation in plants”; 30. 06 – 02. 07. **2014**, Poznań; Biotechnologia Vol. 95, str. 108-109.
- Boczkowska M, Rajchel I, Orczyk W, Nadolska-Orczyk A. Tissue-specific expression analysis of cytokinin dehydrogenase genes in common wheat. Streszczenia III Ogólnopolskiej Konferencji „Genetyka i genomika w doskonaleniu roślin uprawnych – od rośliny modelowej do nowej odmiany”; 05 – 07 listopada, **2014**, Poznań; str. 83.
- Nadolska-Orczyk A, Boczkowska M, Rajchel IK, Orczyk W. **2015**. Łączenie wiedzy z praktyką w poszukiwaniu znaczników produktywności zbóż. Streszczenia Konferencyjne „Nauka dla Hodowli i Nasiennictwa Roślin Uprawnych”, Zakopane, **2015**, 02-06 luty, str. 73-77.
- Boczkowska M, Rajchel I, Onyśk A, Orczyk W, Zmijewska B, Nadolska Orczyk A. Cytokinin dehydrogenase activity and wheat yield. 3rd Conference of Cereal Biotechnology and Breeding, Berlin, 2-4 listopad 2015, str. 15 – 16
- Onyśk A, Boczkowska M, Rajchel IK, Orczyk W, Nadolska-Orczyk A. Looking for *TaCKX* genes associated with grain yield. 20th General Congress of Eucarpia (poster), Zurich, Switzerland, 29 sierpień - 1wrzesień **2016**, str 180.
- Nadolska-Orczyk A, Rajchel IK, Onyśk A. **2016**. Badania funkcji ważnych genów użytkowych zbóż i ich wykorzystanie w praktyce hodowlanej. Konferencja naukowa „Nowe osiągnięcia polskich zespołów badawczych w dziedzinie genetyki, hodowli i biotechnologii roślin” (wykład) Międzyzdroje, 8-10 czerwiec 2016, str. 48.
- Wszyńska R., Rajchel I.K., Onyśk A., Nadolska-Orczyk A. **2017**. Geny z rodziny *TaCKX* wpływające na produktywność pszenicy. Streszczenia XIII Ogólnopolskiej Konferencji Naukowej „Nauka dla Hodowli i Nasiennictwa Roślin Uprawnych”, Zakopane, 2017, 30 styczeń - 03 luty, str. 143-144.
- Barchacka K., Boczkowska M., Ogonowska H., Orczyk W., Nadolska-Orczyk A. **2018**. How *TaCKX* family genes cooperate in regulation of growth and productivity of common wheat? Abstract In vitro Cellular and Developmental Biology, 14th Congress of the IAPB, Dublin, Ireland, 19-24 sierpnia, Vol. 54, pp. S32 (wykład).
- Barchacka K., Ogonowska H., Jabłoński B., Orczyk W., Nadolska-Orczyk A. **2019**. Cooperation of *TaCKX* genes in regulation of growth and productivity of wheat (*Triticum aestivum* L.). 7th Global Summit on Plant Science, Madrid, Spain, 7-8 października, Volume 07 ISSN: 2329-955X, str. 28-29, (wykład). (przedstawiono wyniki z tego sprawozdania znajdujące się na stronach 6 – 8)
- Szala K., Nadolska-Orczyk A. **2019**. Jak dziedziczony jest poziom ekspresji genów *TaCKX* korelujący z zawartością cytokiny i produktywnością roślin pszenicy? II Konferencja Dni Młodego Naukowca, Radzików IHAR-PIB, 7-8 listopada (wykład). (wszystkie wyniki ze sprawozdania z 2019)