

Zadanie nr 8

Tytuł zadania: Tolerancja na stresy abiotyczne - genotypowanie pszenicy w oparciu o strategię genów kandydujących

Okres realizacji: 2014 - 2020

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – Państwowy Instytut Badawczy
Radzików, 05-870 Błonie

Kierownik zadania: Wacław Orczyk, prof. dr hab. w.orczyk@ihar.edu.pl

Wykonawcy:

Mgr Yuliya Yanushevskaya (Kloc)

Dr Marta Dmochowska-Boguta

mgr Przemysław Werekci

technik

Tolerancja na stresy abiotyczne - genotypowanie pszenicy w oparciu o strategię genów kandydujących

Susza w krytycznej fazie kłoszenia (np. krótka susza wiosenna) powoduje: zaburzenia mikrosporogenezy, niższą żywotność ziaren pyłku, słabsze wypełnienie kłosów i znacznie obniżony plon.

Nadrzędnym celem projektu była identyfikacja zmienności genetycznej potencjalnie sprzężonej z tolerancją pszenicy na suszę, na podstawie oceny żywotności pyłku i stopnia zawiązywania nasion w kłosie.

Cele etapowe projektu

1. Analiza cytologiczna mikrosporogenezy oraz ocena stopnia zawiązywania ziarniaków różnych genotypów pszenicy w warunkach stresu.

Cel osiągnięto

Zgromadzono 112 genotypów pszenic z których do badań wybrano 36 pochodzących z różnych regionów klimatyczno-glebowych na świecie.

Wskazano stadia rozwoju kłosów i skoordynowano z nimi kolejne fazy mikrosporogenezy w warunkach normalnych i stresie suszy w zróżnicowanej populacji genotypów.

2. Identyfikacja genów kandydujących biorących udział w hormonalnej regulacji procesów rozwojowych kłosa i warunkujących odpowiedź na stresy środowiskowe.

Cel osiągnięto

Wytypowano ponad 26 genów potencjalnie zaangażowanych w reakcję mikrosporogenezy na suszę.

Zidentyfikowano homeologi tych genów w subgenomach A, B i D pszenicy, poznano ich strukturę, sekwencje kodujące oraz warianty splicingowe.

Cele etapowe projektu c.d.

3. Analiza wybranych genów i weryfikacja ich udziału w mikrosporogenezie lub innych procesach związanych z zawiązywaniem nasion w zbadanych genotypach pszenicy,

Cel osiągnięto

Analiza ekspresji genów kandydujących w pylnikach roślin kontrolnych i po stresie suszy w genotypach o skrajnej (najsilniejszej i najsłabszej) tolerancji potwierdziły udział praktycznie wszystkich wytypowanych genów w odpowiedzi pylników na stres. Do dalszych etapów wybrano gen inwertazy *TaInv1*.

4. Identyfikacja zmienności genów kandydujących oraz weryfikacja związku tej zmienności z wybranymi cechami fenotypowymi.

Cel osiągnięto

Zidentyfikowano skafoldy genomu pszenicy zawierające homeologi genu *TaInv1*. Analiza tych skafoldów wykazała obecność kilkudziesięciu sekwencji repetytywnych.

Dwie sekwencje SSR Reg 23-404 i Reg 35-404 wykazały polimorfizm długości w 30 badanych genotypach.

Najkrótsze formy SSR Reg 23-404 (AG)₁₂ i (AG)₁₇ obecne w odmianach o najwyższej tolerancji mikrosporogenezy na krótkotrwały stres suszy mogą być markerem molekularnym cechy podwyższonej tolerancji na suszę wynikającej ze zwiększonej żywotności pyłku i wyższego współczynnika wypełnienia kłosów w roślinach poddanych stresowi.

Materiał i metody

Materiał biologiczny

1. Zebrano 112 genotypów pszenic: 24 linie i odmiany z Maize Research Institute, Belgrade, Serbia; 2 odmiany Chinese Spring i SQ1 oraz 4 linie rekombinacyjne tych odmian, 82 genotypy z Krajowego Centrum Zasobów Genowych, IHAR-PIB, Radzików.
2. Do doświadczeń wybrano 36 genotypów pochodzących z różnych regionów klimatyczno-glebowych na świecie i reprezentujących potencjalnie szeroki zakres reakcji badanej cechy tj. zaburzeń mikrosporogenezy i niepłodności pyłku na stres suszy.

Metody badawcze

1. Fenotypowanie stresu suszy:

- identyfikacja faz rozwojowych kłosa i stopnia wypełnienia kłosów,
- metody cytologiczne do badań mikrosporogenezy i żywotności pyłku

2. Identyfikacja genów kandydujących

- bioinformatyczna analiza genomowych baz pszenicy NCBI, *EnsemblePlants*,
- analizy bioinformatyczne do składania i analizy sekwencji nukleotydowych w tym m.in.: pakiet LaserGene (DNASTar), BLAST, programy do projektowania starterów,
- programy do całogenomowej identyfikacji i analizy sekwencji repetytywnych: GAMATA (Genome-wide Microsatellite Analyzing Toward Application), <http://tandem.bu.edu/trf.html> ; ISFD (Imperfect SSR Finder Documentation) <https://ssr.nwisrl.ars.usda.gov/> ; SSRIT (Simple Sequence Repeat Identification Tool) <http://www.gramene.org/db/searches/ssrtool> ; TRF (Tandem Repeat Finder) <http://tandem.bu.edu/trf.html>.

3. Metody biologii molekularnej roślin w tym m.in.: izolacja DNA i RNA, synteza cDNA, reakcje PCR i RT-PCR z pomiarem w czasie rzeczywistym, elektroforeza w żelach agarowych i PAGE.

Wyniki, Podsumowanie, Wnioski

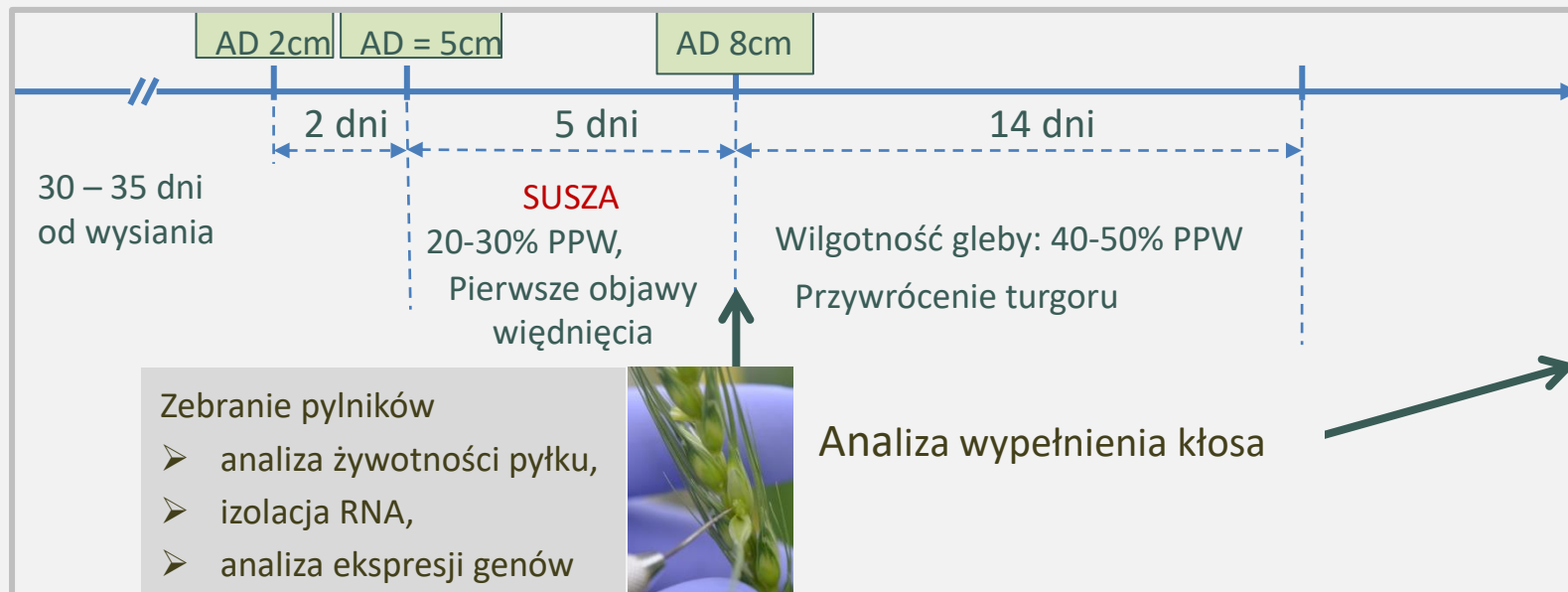
Zgromadzono kolekcję 112 genotypów pszenic z różnych regionów klimatyczno-glebowych na świecie.

Skorelowano etapy rozwoju rośliny i kłosa z fazami mikrosporogenezy.

Wykazano, że stadium AD 5-8cm koreluje z mejozą mikrosporogenezy i jest odpowiednie do aplikowania stresu suszy oraz badania oddziaływanie tego stresu na mikrosporogenezę i zawiązywanie ziarniaków.

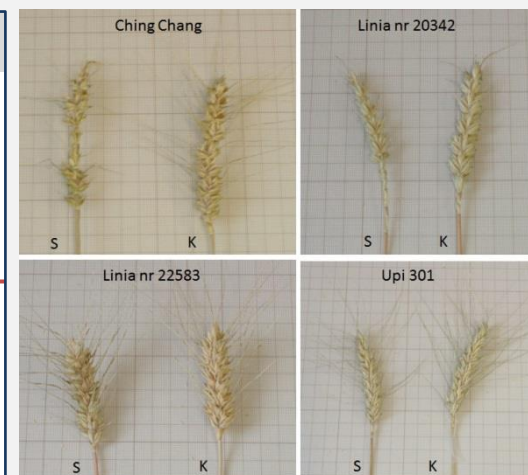
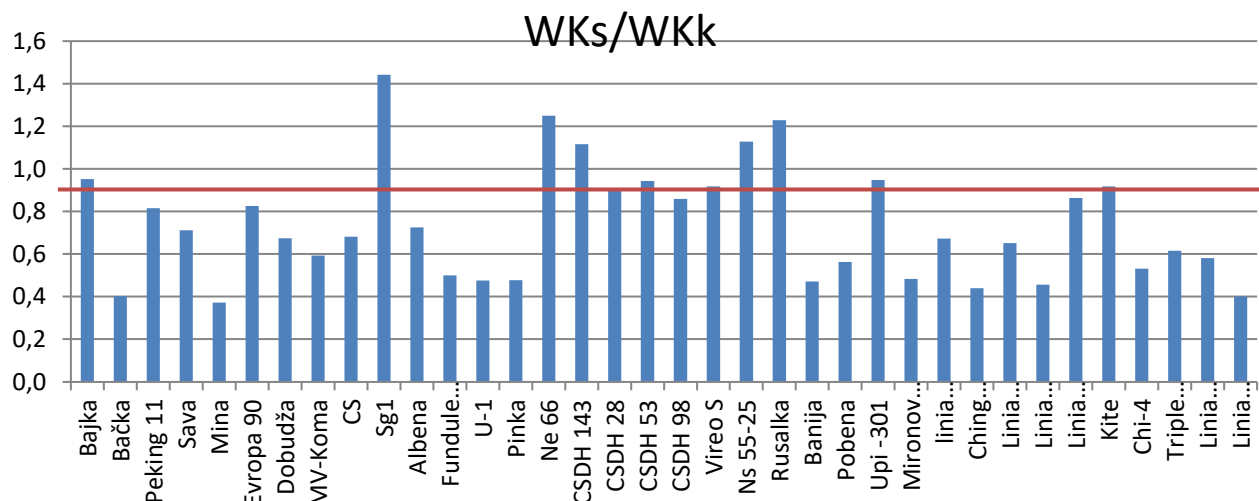


Opracowano schemat warunków wzrostu roślin, stresu suszy oraz analiz fenotypowych i molekularnych



Zbadano przebieg mikrosporogenezy i zawiązywanie ziarniaków w warunkach normalnych i stresie suszy w 36 genotypach pszenic.

Współczynnik wypełnienia kłosów w warunkach stresu suszy



Wypełnienie kłosów, warunki kontrolne (K), stres suszy (S).

Stres suszy powodował redukcję żywotności pyłku oraz wypełnienia kłosów, zmiany te zależały od genotypu.

Wykazano zgodność stopnia wypełnienia kłosa (WKS/WKk) z poziomem żywotności pyłku w roślinach po stresie suszy.

Wytypowano geny potencjalnie zaangażowane w reakcję mikrosporogenezy na suszę:

TaCWINv1, *TaCWINv2*, *Talvr1*, *Talvr3*, *Talvr5* (inwertazy wakuolarne i apoplastyczne), *TaTPS1*, *TaTP* (syntaza 6-fosforano trehalozy), *TaNCED2*, *TaNCED1*, *TaNCED2-1*, *TaNCED2-3*, *TaNCED2-2*, *TaNCED* (dioksygenaza 9-cis epoksy karetenoidowa), *TaABA8'OH1*, *TaABA8'OH1-B*, *TaABA8'OH1-D*, *TaABA8'OH1-A*, *TaABA8'OH1-B*, *TaABA8'OH1-D*, *TaABA8'OH1-A*, *TaABA8'OH1*, *TaABA8'OH1*, *TaABA8'OH1* (ABA 8'-hydroksylaza) *TaZEP1*, *TaZEP2*, *TaZEP3* (epoksydaza zeaksantyny).

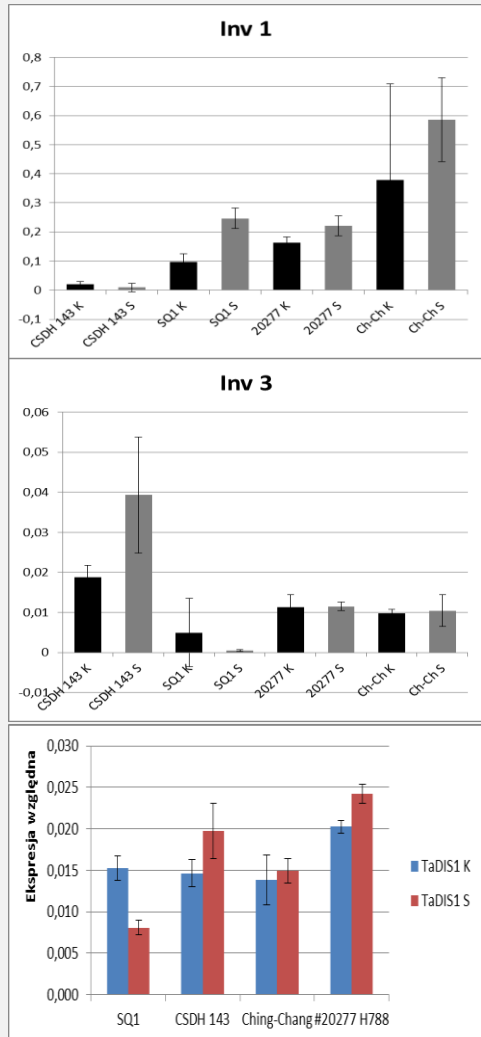
Zbadano wzory ekspresji genów w pylnikach roślin uzyskanych w warunkach normalnych i po stresie suszy. Badano genotypy o skrajnej reakcji na suszę.

Regulacja genów *TaTPS* potwierdziła ich funkcję w reakcji pylników na stres suszy w czasie mikrosporogenezy.

Geny kodujące inwertazę apoplastyczną i wakuolarną *Talnv1* i *Talnv3* wykazały przeciwstawny wzór ekspresji wskazując na różny udział w metabolizmie węglowodanów w pylnikach warunkach suszy.

Gen *TaDIS1* uległ najsilniej represji w genotypach najbardziej tolerujących suszę potwierdzając swoją rolę jako negatywnego regulatora reakcji na suszę.

Do dalszych etapów ukierunkowanych na identyfikację polimorfizmu genetycznego wybrano gen *Talnv1*



Zidentyfikowano 15 skafoldów genomu pszenicy o długości od 40 do 400 tpb zawierających jeden z wcześniej badanych genów tj. gen inwertazy *Talnv1*.

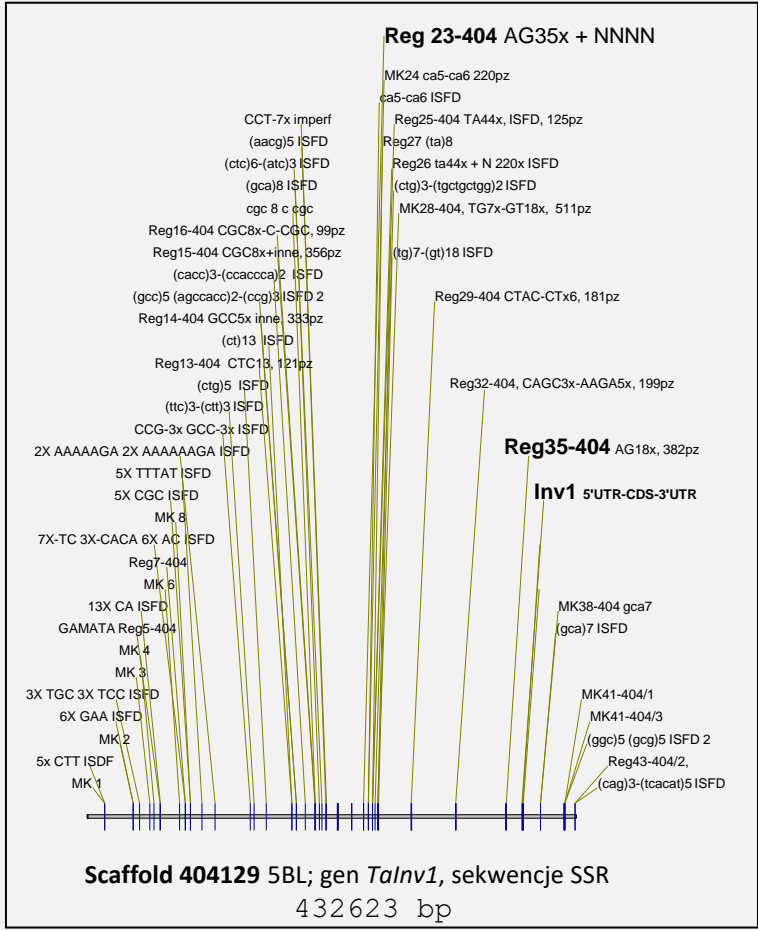
Poznano lokalizację chromosomową i genomową (A, B lub D) homeologów tego genu, określono ich strukturę oraz warianty splicingowe.

W wybranych skafoldach zidentyfikowano 28 sekwencji repetytywnych (SSR). Ich analiza wykazała, że składają się one z wielokrotnych powtórzeń motywów 2- i 3-nukleotydowych. Wśród SSR przeważały formy niedoskonałe tzn. takie, gdzie w regionie z powtórzeniami była krótka inna sekwencja.

Szczegółowa analiza 3 skafoldów wykazała, że najwięcej SSR było na skafoldzie 4041295BL (432623 pb). Oszacowane zagęszczenie wynosiło 1 SSR na ok. 10 tpb.

Wszystkie zbadane regiony z sekwencjami repetytywnymi charakteryzowały się:

- nierównomiernym rozkładem AT i GC w obszarach flankujących SSR,
- znacznie większym udziałem AT lub GC w całym regionie i
- powtórzeniami kilkunukleotydowych motywów w regionach, gdzie powinny być startery do amplifikacji.



Analiza SSR potwierdziła polimorfizm długości trzech sekwencji repetytywnych SSR w badanych genotypach pszenic.

Do szczegółowych analiz molekularnych wybrano dwa regiony SSR Reg 23-404 oraz Reg 35-404 w skafoldzie 4041295BL położone w bliskim sąsiedztwie genu kodującego inwertazę *TaInv1*.

Amplifikowano fragmenty genomowe tych regionów SSR oraz poznano ich sekwencje nukleotydową w 30 genotypach pszenic.

Wykazano, że sekwencje repetytywne SSR zbudowane są z wielokrotnych powtórzeń motywów AG lub GA, a liczba powtórzeń była różna w różnych genotypach. SSR w Reg 23-404 zbudowany z motywu (GA) wykazał bardzo duży polimorfizm długości. Liczba powtórzeń wynosiła od 12 do 59 i była różna w genotypach.

Tak duże zróżnicowanie wskazywało na znaczną dynamikę zmian molekularnych w tym regionie i potencjalną przydatność, jako markera molekularnego.

Wykazano, że wartości wypełnienia kłosów w warunkach stresu suszy są zbieżne z charakterystyką polimorfizmu sekwencji SSR w regionach Reg 23-404 i Reg 35-404. Region ten zlokalizowany jest w pobliżu genu kodującego inwertazę 1 pszenicy (*TaInv1*), w skafoldzie 4041295BL.

Dwie najkrótsze sekwencje Reg 23-404 (GA)₁₂ i (GA)₁₇ oraz Reg 354-404 (AG)₁₈ zidentyfikowano w odmianach, które (wyniki z lat 2015-2017) charakteryzowały się wysoką lub bardzo wysoką tolerancją na suszę.

Zmienność sekwencji mikrosatelitarnej SSR Reg 23-404 i Reg 35-404 może być markerem tolerancji na suszę wynikającej ze zwiększonej żywotności pyłku i wypełnienia kłosów w roślinach poddanych stresowi suszy.

Wykaz publikacji wyników projektu

Doniesienia konferencyjne:

1. Yanushevskaya Y., Nadolska-Orczyk A., Orczyk W. 2015. Fenotypowa i cytologiczna reakcja roślin pszenicy na krótkotrwały stres suszy w trakcie kłoszenia. Streszczenia Konferencyjne „Nauka dla Hodowli i Nasiennictwa Roślin Uprawnych”, Zakopane, **2015**, 02-06 luty, str. 373-375.
2. Orczyk W., Yanushevskaya Y., Nadolska-Orczyk A. 2015. Zaburzenia mikrosporogenezy wywołane stresem abiotycznym istotnie ograniczają produktywność zbóż. Streszczenia Konferencyjne „Nauka dla Hodowli i Nasiennictwa Roślin Uprawnych”, Zakopane, **2015**, 02-06 luty, str. 109-111.
3. Yuliya Yanushevskaya Y., Groszyk J., Nadolska-Orczyk A., Orczyk W. Microsporogenesis and drought tolerance of wheat. Eucarpia General Congress, 29Aug - 1 Sep **2016**. ETH Zurich, Szwajcaria. Abstract book str.197.