

Rozprawa doktorska pt.  
**Rola wybranych genów *TaCKX* w regulacji rozwoju i produktywności  
pszenicy zwyczajnej (*Triticum aestivum* L.)**

**mgr inż. Bartosz JABŁOŃSKI**

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin - Państwowy Instytut Badawczy w Radzikowie  
Zakład Genomiki Funkcjonalnej

o nadanie stopnia doktora w dziedzinie nauki rolniczej, w dyscyplinie rolnictwo i ogrodnictwo

Promotor: prof. dr hab. Anna Nadolska-Orczyk

Promotor pomocniczy: dr inż. Sebastian Gasparis

### **Streszczenie**

Geny z rodziny genów *TaCKX* (oksydaza/dehydrogenaza cytokininowa) odgrywają zasadniczą rolę w metabolizmie cytokinin podczas rozwoju pszenicy zwyczajnej (*Triticum aestivum*), wpływając tym samym w znaczący sposób na cechy plonotwórcze. Głównym celem pracy była szczegółowa analiza biologicznej funkcji wyżej wymienionych genów za pomocą technologii opartej na interferencji RNA (RNAi). Hipoteza badawcza zakładała, że wyciszenie ekspresji poszczególnych genów w danych tkankach i organach, na określonym etapie rozwoju, będzie determinować zmiany molekularne, fizjologiczne i fenotypowe u badanych roślin. W celu weryfikacji hipotezy uzyskano linie pszenicy dwóch odmian, bezostnej Kontesa i ościstej Ostka Smolicka z wyciszonymi genami *TaCKX1* oraz *TaCKX2* w pokoleniach T<sub>0</sub>, T<sub>1</sub> i T<sub>2</sub>. W liniach pokoleń T<sub>1</sub> i T<sub>2</sub> przeprowadzono analizę ekspresji wyciszanych genów *TaCKX* oraz innych genów z tej rodziny, *TaNAC2-5A*, aktywności enzymu CKX w kłosach 7 DAP oraz charakterystykę fenotypową, a w T<sub>2</sub> dodatkowo pomiary zawartości fitohormonów. Porównano efekt wyciszania obu genów na ekspresję pozostałych genów z rodziny *TaCKX* w dwóch odmianach pszenicy różniących się m.in. obecnością ości w kłosach. W odmianie bezostnej, Kontesa z silnie wyciszonym *TaCKX1* w pokoleniu T<sub>2</sub> zaobserwowano silne obniżenie ekspresji *TaCKX11*, podwyższenie *TaCKX2.1*, podwyższenie poziomu większości cytokinin rozkładanych przez enzym CKX oraz wzrost plonu (fenotyp o wyższej liczbie kłosów, ziaren i wyższym plonie ziarna, ale niższej masie tysiąca ziaren). Wyciszenie genu *TaCKX2* w tej samej odmianie wiązało się z wyciszeniem trzech genów, posiadających ponad 90% homologię sekwencji kodujących: *TaCKX2.1*, *TaCKX2.2.1* i *TaCKX2.2.2*. Silnemu wyciszeniu genu *TaCKX2.2* w T<sub>2</sub> towarzyszyło nieznaczne obniżenie ekspresji *TaCKX2.1* i silna regulacja w górę *TaCKX5* i *TaCKX11* oraz podwyższenie poziomu aktywnych cytokinin, ich koniugatów i auksyny (IAA) przy jednoczesnym obniżeniu benzyloadeniny (BA) i kwasu abscysynowego (ABA) i redukcji kwasu giberelinowego (GA<sub>3</sub>). W przypadku odmiany ościstej, Ostka Smolicka, udokumentowano mechanizm sprzężenia zwrotnego regulacji ekspresji w którym wyciszenie *TaCKX1* podwyższało ekspresję genów *TaCKX2* i na odwrót. Ponadto obniżenie ekspresji *TaCKX2* (głównie *TaCKX2.2.1* i *TaCKX2.2.2*) silnie podwyższyło ekspresję *TaCKX5*, *TaCKX11* i *TaNAC2-5A* natomiast ekspresja tych genów w roślinach z wyciszonym *TaCKX1* była obniżona. Wyciszone linie *TaCKX1* T<sub>2</sub> z obniżoną blisko o połowę ekspresją miały istotnie wyższą masę tysiąca ziaren (MTZ) i masę korzeni siewek. Wyciszone linie *TaCKX2* T<sub>2</sub> z ekspresją *TaCKX2.2.1* i *TaCKX2.2.2* obniżoną o ok. 30% miały znacznie wyższą zawartość chlorofilu w liściach flagowych. Dodatkowo zaobserwowano wpływ transformacji z użyciem *Agrobacterium* na badane cechy. Udokumentowano, że główne mechanizmy regulacji ekspresji genów z rodziny *TaCKX* były podobne w różnych odmianach pszenicy jarej, ale w zależności od zawartości i składu fitohormonów w różny sposób wpływały na regulację cech związanych z plonem.

Doctoral thesis entitled:  
**Role of selected *TaCKX* genes in regulation of development and productivity  
of common wheat (*Triticum aestivum* L.)**

**Abstract**

The genes of the *TaCKX* gene family (cytokinin oxidase/dehydrogenase) play an essential role in cytokinin metabolism during the development of common wheat (*Triticum aestivum*), thus significantly affecting yield-related traits. The main aim of the work was a detailed analysis of biological function of the genes using RNA interference technology (RNAi). The research hypothesis assumed that silencing the expression of individual genes in particular tissues and organs, at a specific stage of development, would determine molecular, physiological, and phenotypic changes in tested plants. To verify the hypothesis, wheat lines of two cultivars, Kontesa and Ostka Smolicka, with silenced *TaCKX1* and *TaCKX2* genes in T<sub>0</sub>, T<sub>1</sub> and T<sub>2</sub> generations were obtained. The expression of *TaCKX* genes and *TaNAC2-5a* of the same family was analysed in the T<sub>1</sub> and T<sub>2</sub> generation lines, followed by the CKX enzyme activity assay in 7 DAP spikes, the analysis of phytohormone content in T<sub>2</sub>, and morphological traits in T<sub>1</sub> and T<sub>2</sub>. The effect of silencing both genes on the expression of other genes from the *TaCKX* gene family members (GFM) was compared in two wheat cultivars differing in the presence of awns in spikes. In the awnless cultivar Kontesa with a strong silencing of *TaCKX1* in T<sub>2</sub> generation, a strong decrease in *TaCKX11* expression, an increase in *TaCKX2.1* expression, an increase in the content of most cytokinins degraded by the CKX enzyme and an increase in yield were observed (phenotype with a higher number of spikes, grains, and a higher grain yield but a lower thousand grain weight). The silencing of the *TaCKX2* in the same cultivar resulted in the silencing of three genes with more than 90% homology of the coding sequences: *TaCKX2.1*, *TaCKX2.2.1* and *TaCKX2.2.2*. Strong silencing of the *TaCKX2.2.2* gene in T<sub>2</sub> was accompanied by a slight decrease in *TaCKX2.2.1* expression and a strong up-regulation of *TaCKX5* and an *TaCKX11* and increase in the level of active cytokinins, their conjugates and auxin (IAA) with a simultaneous decrease in benzyladenine (BA), abscisic acid (ABA) and gibberellic acid (GA<sub>3</sub>) reduction. In the case of the awned cultivar, Ostka Smolicka, a feedback mechanism of expression regulation was documented, in which silencing *TaCKX1* increased the expression of *TaCKX2* genes and vice versa. Furthermore, downregulation of *TaCKX2* (mainly *TaCKX2.2.1* and *TaCKX2.2.2*) strongly increased the expression of *TaCKX5*, *TaCKX11*, and *TaNAC2-5A*, while the expression of these genes in *TaCKX1* silenced plants were down-regulated. Silenced *TaCKX1* T<sub>2</sub> lines with reduced expression by nearly half had significantly higher thousand grain weight (TGW) and seedling root weight. Silenced *TaCKX2* T<sub>2</sub> lines with reduced expression of *TaCKX2.2.1* and *TaCKX2.2.2* of approximately 30% had significantly higher chlorophyll content in flag leaves. In addition, the investigated traits were affected by transformation with *Agrobacterium*. We documented that the main mechanisms that regulate the expression of *TaCKX* GFM were similar in different cultivars of spring wheat, but depending on the content and composition of phytohormones, they affected the regulation of yield-related traits in different ways.

Radzików, 17.03.2023 r.

(-) mgr inż. Bartosz Jabłoński