

Rozprawa doktorska pt.

„Identyfikacja zmienności genetycznej pszenicy zwyczajnej (*Triticum aestivum* L.) związanej z gospodarką cytokininy i korelującej z potencjałem plonotwórczym”

- cykl 3 publikacji

Identification of the genetic variation of common wheat (*Triticum aestivum* L.) related to the cytokinin metabolism and correlating with grain yield.

- Compilation of 3 publications

mgr inż. Karolina Maria SZALA

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

o nadanie stopnia doktora nauk rolniczych w dziedzinie nauk rolniczych, dyscyplinie agronomia*/

Promotor: prof. dr hab. Anna NADOLSKA-ORCZYK

Promotor pomocniczy: dr Marta DMOCHOWSKA-BOGUTA

STRESZCZENIE

Ziarno pszenicy zwyczajnej odgrywa ważną rolę w zapewnieniu podstaw żywienia na całym świecie. Znaczny wzrost konsumpcji oraz zmiany klimatu wskazują na potrzebę otrzymywania nowych odmian zbóż, o wyższym potencjale plonotwórczym. Rozwój zaawansowanej biotechnologii oraz biologii molekularnej pozwala poznać rolę genów głównych, które w sposób istotny wpływają na potencjał plonotwórczy i system korzeniowy roślin pszenicy i innych zbóż. Są to między innymi geny biorące udział w regulacji zawartości cytokininy w roślinie, tj. geny z rodziny *TaCKX*. Cytokina jest jednym z głównych fitohormonów, który odpowiada za regulację wielu procesów rozwojowych, w tym za cechy plonotwórcze. Geny *TaCKX* kodują enzym oksydazę/dehydrogenazę cytokininy (CKX), który bierze udział w nieodwracalnej reakcji rozkładu cytokininy. Zarówno poziom ekspresji poszczególnych genów *CKX*, jak również aktywność kodowanego przez nie enzymu jest tkankowo-specyficzna. Wykazaliśmy, że wzór ekspresji tych genów w rozwijających się organach może wskazywać na ich rolę we wzroście i rozwoju generatywnym, co umożliwia wybór tych, które odgrywają istotną rolę w produktywności. Innym ważnym genem związanym z produktywnością jest *TaNAC2-5A*, kodujący jeden z czynników transkrypcyjnych NAC. W naszych badaniach stwierdzono silną korelację pomiędzy ekspresją genu *TaNAC2-5A* oraz ekspresją niektórych genów *TaCKX* w korzeniach siewek oraz dojrzewających kłosach, co może świadczyć o silnej koregulacji tych genów. Celem pracy było wyznaczenie znaczników molekularno-biochemicznych korelujących z gospodarką cytokininy i potencjałem plonotwórczym pszenicy, a także użycie ich do identyfikacji i selekcji form pszenicy o podwyższonej produktywności.

W pierwszym etapie badań sprawdzono ekspresję 15 wcześniej opisanych w literaturze genów *TaCKX*. Stwierdzono, iż są one tkankowo- i rozwojowo-specyficzne. Zgodnie z wzorem ekspresji podzielono je na 4 grupy: 1) *TaCKX4*, *TaCKX5* i *TaCKX10* (obecnie 9) były wysoce specyficzne dla liści; 2) *TaCKX6* (obecnie 3), *TaCKX11* (obecnie 8) i *TaCKX3* (obecnie 11), w których ekspresja wyrażana była na różnych poziomach we wszystkich badanych tkankach; 3) *TaCKX1*, *TaCKX2.3* (obecnie 2.1), *TaCKX2.2* (obecnie 2.2.2), *TaCKX2.1* (obecnie 2.2.1), *TaCKX2.4* i *TaCKX2.5* były specyficzne dla rozwijających się kłosów i kwiatostanów; 4) *TaCKX7*, *TaCKX8* i *TaCKX9* (obecnie 10), były wysoce specyficzne dla korzeni. W oparciu o analizę transkryptów oraz białek kodowanych przez poszczególne geny *TaCKX*, zaproponowaliśmy nową numerację i ograniczyliśmy ich liczbę do 11. Wykazaliśmy także, iż grupy tych genów wykazują silną korelację w obrębie danego organu jak i pomiędzy nimi. Wskazaliśmy na te geny z rodziny *TaCKX*, które mogą odgrywać kluczową rolę w determinacji cech plonotwórczych.

W drugim etapie badań porównano wzory ekspresji i koekspresję pomiędzy genami *TaCKX* i *TaNAC2-5A* w 60 odmianach i liniach uprawnych pszenicy rosnących w kontrolowanych warunkach i na polu. Wykazano bardzo duże zróżnicowanie między poziomami ekspresji poszczególnych genów *TaCKX* wśród genotypów hodowlanych, co korelowało z cechami plonotwórczymi i predysponuje użycie tego miernika do prowadzenia selekcji. Zarówno te różnice jak i analizy korelacji pomiędzy poziomem ekspresji genów w obydwu środowiskach oraz cechami plonotwórczymi wskazywały na zróżnicowaną regulację zależną od środowiska. W przypadku części badanych genów nie stwierdzono istotnych różnic w poziomie ekspresji w zależności od warunków uprawy. Umożliwia to wykorzystanie pomiaru ekspresji w kłosach z fitotronu i użycie go jako miernika potencjału produktywności w warunkach polowych. Niektóre z badanych genów ulegały ko-ekspresji z innymi zarówno w kłosach z pola jak i z fitotronu. Wykazano również korelacje między poziomem ekspresji wybranych genów z rodziny *TaCKX* oraz *TaNAC2-5A* dla korzenia siewek a cechami fenotypowymi części nadziemnej rośliny.

W kolejnych badaniach porównano wzory ekspresji genów z rodziny *TaCKX* i *TaNAC2-5A* (dla kłosów 7 DAP i korzeni siewek) oraz cechy plonotwórcze pomiędzy rodzicami a ich pokoleniem segregującym F_2 po krzyżowaniu wzajemnym. Wykazaliśmy koregulację ekspresji niektórych par genów albo grup genów z rodziny *TaCKX*, a także regulację przeciwstawną. Stwierdziliśmy, iż w pokoleniu F_2 wzór poziomu ekspresji niektórych genów oraz cecha produktywności pochodzą od ojca. Przedstawiliśmy modele regulacji ekspresji genów *TaCKX* i cech plonotwórczych w F_2 dla niskoplonującego komponentu matecznego krzyżowanego z wysokoplonującym komponentem ojcowskim. Wykazaliśmy specyficzne korelacje w F_2 pomiędzy pojedynczymi cechami plonotwórczymi a poziomem ekspresji genów *TaCKX* i *TaNAC2-5A*. Na przykład gen *TaCKX2.1* w kłosach dodatnio korelował z liczbą kłosów, ich długością, liczbą ziaren, a także masą korzeni siewek, zaś geny *TaCKX1* i *TaNAC2-5A* w korzeniu ujemnie korelowały z w/w cechami plonotwórczymi. Wzory ekspresji genów *TaCKX* oraz *TaNAC2-5A* dla kłosów 7 DAP i korzeni siewek, a także cechy plonotwórcze w pokoleniu F_2 wskazywały na imprinting ojcowski.

ABSTRACT

Common wheat grains play an important role in providing the basis of food throughout the world. A significant increase in consumption and climate change indicate the need to obtain new varieties of cereals with a higher yield potential. The development of advanced biotechnology and molecular biology allows us to learn the role of the main genes that significantly affect the yield potential and root system of wheat and other cereal plants. These include genes involved in the regulation of cytokinin content in the plant, i.e., genes from the *TaCKX* family. Cytokinin is one of the main phytohormones responsible for the regulation of many developmental processes, including yield traits. The cytokinin oxidase/dehydrogenase (CKX) enzyme, which is involved in the irreversible cytokinin degradation, plays an important role in the regulation of this hormone in plants. Both, the level of expression of individual CKX genes and the activity of the enzyme encoded by them are tissue-specific. The expression pattern of these genes in developing organs has been shown to indicate their role in growth and generative development, allowing the selection of those that might play an important role in productivity. Another important gene related to productivity is *TaNAC2-5A*, which encodes one of the NAC transcription factors. In our study, a strong correlation was found between the expression of the *TaNAC2-5A* and the expression of some *TaCKX* genes in seedling roots and maturing spikes, indicating a strong co-regulation of these genes.

The purpose of the work was to determine molecular and biochemical markers correlated with wheat cytokinin metabolism and yield potential and to use them to identify and select wheat genotypes with increased productivity.

In the first stage of the investigation, the expression of 15 *TaCKX* genes previously described in the literature was checked. They were found to be tissue and developmentally-specific. According to the expression pattern, they were divided into 4 groups: 1) *TaCKX4*, *TaCKX5* and *TaCKX10* (now 9) were highly leaf specific; 2) *TaCKX6* (now 3), *TaCKX11* (now 8) and *TaCKX3* (now 11) expressed at different levels in all tissues tested; 3) *TaCKX1*, *TaCKX2.3* (currently 2.1), *TaCKX2.2* (currently 2.2.2), *TaCKX2.1* (currently 2.2.1), *TaCKX2.4* and *TaCKX2.5* were specific to developing spikes and inflorescences; 4) *TaCKX7*, *TaCKX8* (currently 6)? and *TaCKX9* (currently 10), highly specific to roots. Based on the analysis of transcripts and proteins encoded by individual *TaCKX* genes, we proposed a new numbering of genes and limited their number to 11. We also demonstrate that groups of these genes showed a strong correlation within and between organs. Genes from the *TaCKX* family that may play a key role in determining yield-relating traits were indicated.

In another publication we compared expression patterns and coexpression between the *TaCKX* and *TaNAC2-5A* genes were compared in 60 wheat breeding genotypes grown under controlled conditions and in the field. A very large variation was shown in the levels of expression of individual *TaCKX* genes between them, which was correlated with yield-related traits and allowed the use of this marker for selection. Differences in the expression levels of some *TaCKX* genes were also observed between the plants grown in growth chamber and the field. Both these differences and subsequent analyzes of correlations between the level of gene expression in both environments and yield-related traits indicated environment-dependent regulation. In the case of some of the genes studied, no significant differences in the level of expression depended on the cultivation conditions were found. This allows the level of expression of selected genes to be applied as a marker of productivity under both conditions. Some of the genes studied were co-expressed with others in both environments. Correlations were presented between the level of genes relative expression of tested in seedling roots and the aboveground part of the plant.

In the next research, the levels of expression of the *TaCKX* family genes and *TaNAC2-5A* in 7 DAP spikes and seedling roots, as well as yield characteristics between the parents and their F₂ segregating generation of reciprocal crosses were compared. We have demonstrated co-regulation of expression of some pairs or groups of genes from the *TaCKX* family, as well as opposing regulation. We found that in the F₂ generation, the gene expression pattern and the productivity trait came from the father. We presented models of regulation of *TaCKX* gene expression and yield trait in F₂ for a low-yielding maternal component crossed with a high-yielding paternal component. Both traits were inherited according to the paternal component. We showed specific correlations in F₂ between individual, yield-related traits and the level of expression of the *TaCKX* and *TaNAC2-5A* genes. For example, the *TaCKX2.1* gene in spikes was positively correlated with the number of spikes, their length, number of grains, and seedling root weight, while the *TaCKX1* or *TaNAC2-5A* genes in the root negatively correlated with the above-mentioned yield traits. The level of expression of *TaCKX* and *TaNAC2-5A* genes for 7 DAP spikes and seedling roots, as well as yield trait in the F₂ generation, indicated paternal imprinting.

Wykaz publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej:

1. Ogonowska H., **Barchacka K.**, Gasparis S., Jablonski B., Orczyk W., Dmochowska-Boguta M., 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; 5-letni IF: 4,069
2. **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 Biology* 2020, 20(1):496 DOI 10.1186/s12870-020-02713-9; 5-letni IF: 5,761
3. **Szala K.**, Dmochowska-Boguta M., Bocian J., Orczyk W., Nadolska-Orczyk A. (2023). Transgenerational paternal inheritance of *TaCKX* GFMs expression patterns indicate a way to select wheat lines with better parameters for yield-related traits. *International Journal of Molecular Sciences* 2023, 24, 8196. DOI <https://doi.org/10.3390/ijms24098196>; 5-letni IF: 6,628

Radzików, 19.06.2023 r.

(-) mgr inż. Karolina Maria Szala

*/ przewód doktorski wszczęty do 30 kwietnia 2019 r. realizowany jest w dyscyplinie agronomia, nadanie stopnia doktora po 30 kwietnia 2019 r. następuje w dyscyplinie rolnictwo i ogrodnictwo.