



Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin
– Państwowy Instytut Badawczy

Karolina Maria Szala
Autoreferat rozprawy doktorskiej pt.:

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

(zbiór publikacji)

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

(compilation of publications)

Praca wykonana w Zakładzie Genomiki Funkcjonalnej

Promotor: Prof. dr hab. Anna Nadolska-Orczyk

Promotor pomocniczy: Dr Marta Dmochowska-Boguta

Recenzenci:

Prof. dr hab. Grzegorz BARTOSZEWSKI

Katedra Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Dr hab. Paweł MILCZARSKI, prof. ZUT

Katedra Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin
Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie

Radzików, 2023

Badania wykonano w ramach projektów:

Postęp Biologiczny w Produkcji Roślinnej w latach 2014-2020, zad. nr 5 (4-1-01-4-02)
„Identyfikacja zmienności genetycznej pszenicy korelującej z potencjałem plonotwórczym i wybranymi cechami systemu korzeniowego”. Główny wykonawca.
Kierownik projektu: prof. dr hab. Anna Nadolska-Orczyk.

Grant NCN UMO-2014/13/B/NZ9/02376 w ramach konkursu "OPUS 7" (2015-2019)
„Rola genów *TaCKX* w regulacji procesów rozwoju roślin pszenicy zwyczajnej (*Triticum aestivum* L.)”. Wykonawca.
Kierownik projektu: prof. dr hab. Anna Nadolska-Orczyk.

Wykaz publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej

1. Ogonowska H., **Barchacka K.**, Gasparis S., Jablonski B., Orczyk W., Dmochowska-Boguta M., Nadolska-Orczyk A. Specificity of expression of *TaCKX* family genes in developing plants of wheat and their co-operation within and among organs.
Plos One (2019), 14 (4):e0214239
DOI 10.1371/journal.pone.0214239
IF₂₀₁₉ (impact factor): 2,74
5-letni IF: 4,069
2. **Szala K.**, Ogonowska H., Lugowska B., Zmijewska B., Wyszynska R., Dmochowska-Boguta M., Orczyk W., Nadolska-Orczyk A. 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
IF₂₀₂₀ (impact factor): 4,215
5-letni IF: 5,761
3. **Szala K.**, Dmochowska-Boguta M., Bocian J., Orczyk W., Nadolska-Orczyk A. Transgenerational paternal inheritance of *TaCKX* GFM's 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>
IF₂₀₂₁ (impact factor): 6,208
5-letni IF: 6,628

Sumaryczny IF: 13,163

Streszczenie

Podniesienie zdolności plonotwórczych pszenicy jest jednym z głównych zadań hodowlanych. Rozwój technik biologii molekularnej i biotechnologii umożliwia poznanie funkcji genów użytkowych, które mogą być włączone do programów hodowlanych. Do takich genów, ściśle powiązanych z cechami plonotwórczymi, należy rodzina genów *TaCKX*. Biorą one udział w nieodwracalnym rozkładzie cytokinin. Celem pracy było, w oparciu o rodzinę genów *TaCKX*, 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* w kłosach 7 DAP i korzeniach siewek oraz cechy plonotwórcze pomiędzy rodzicami a ich pokoleniem segregującym F₂ po krzyżowaniu wzajemnym. Wykazaliśmy koregulację ekspresji niektórych par genów albo grup genów z rodziny *TaCKX*, a także regulację przeciwną. Stwierdziliśmy, iż w pokoleniu F₂ wzór poziomu ekspresji niektórych genów oraz cecha produktywności pochodzą od ojca. Przedstawiliśmy modele regulacji ekspresji genów *TaCKX* i cech plonotwórczych w F₂ dla niskoplonującego komponentu matecznego krzyżowanego

z wysokoplonującym komponentem ojcowskim. Wykazaliśmy specyficzne korelacje w F₂ 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 F₂ wskazywały na imprinting ojcowski.

Wprowadzenie

Ziarno pszenicy zwyczajnej odgrywa ważną rolę w zapewnieniu podstaw żywienia na całym świecie (Rachoń i in. 2011; Schnurbusch 2019). Znaczny wzrost konsumpcji oraz zmiany klimatu wskazują na potrzebę otrzymywania nowych odmian zbóż, o wyższym potencjale plonotwórczym. Spektakularny postęp w hodowli pszenicy spowodował tzw. gen zielonej rewolucji (gen szlaku metabolicznego giberelin) w połączeniu z odpowiednią agrotechniką (Börner i in. 1996; Nadolska-Orczyk i in. 2017; Chen i in. 2020). 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* (Nadolska-Orczyk i in. 2017). Cytokinina 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 (Mok i Mok 2001; Ashikari i in. 2005; Zalewski i in. 2010; Zhang i in. 2011; Song i in. 2012; Zalewski i in. 2012; Zhao i in. 2015; Chen i in. 2020). 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 (He i in. 2015, Zhao i in. 2015). NAC jest jedną z największych rodzin czynników transkrypcyjnych (TF) specyficznych dla roślin, kodowanych przez geny *NAC*. *NAC* to skrót pochodzący od trzech różnych genów (*NAM* - *Non Apical Meristem*; *ATAF* – *Arabidopsis Transcription Activation Factor*; *CUC* - *Cup-Shaped Cotyledon*). Według dostępnych danych dla pszenicy w Plant Transcription Factor Database v.4 zgłoszono ponad 250 genów *NAC*, co czyni je jednymi z najliczniejszych indywidualnych przedstawicieli białek NAC występujących u roślin (Singh i in. 2021, Iqbal i in. 2022). Coraz więcej badań wskazuje, iż czynniki transkrypcyjne NAC są ważnymi regulatorami cech plonotwórczych, m.in.: związanymi z liczbą ziaren czy masą ziarna (He i in. 2015; Iqbal i in. 2022). W przypadku pszenicy opisano funkcje tylko kilku genów *TaNAC*. Jednym z nich jest *TaNAC2-5A* (He i in. 2015, Zhao i in. 2015). Jego nadekspresja indukowana azotanami, przyczynia się do opóźnienia starzenia liści, zwiększenia wzrostu korzeni, pobierania azotanów oraz wzrostu plonu ziarna. 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.

Hipoteza badawcza i cele prowadzonych badań

Celem badań było poznanie oraz poszerzenie puli genetycznej pszenicy o takie formy, których podłoże genetyczne związane z gospodarką cytokininy wskazuje na podwyższony potencjał plonotwórczy i będą mogły być wykorzystane do selekcji.

Cele szczegółowe:

1. Wskazanie znaczników molekularno-biochemicznych korelujących z gospodarką cytokininy i potencjałem plonotwórczym pszenicy.
2. Użycie ich do identyfikacji i selekcji form pszenicy o podwyższonej produktywności.

Hipoteza naukowa:

Geny z rodziny *TaCKX*, które wykazują wysoką ekspresję w rozwijających się kłosach i/lub w systemie korzeniowym, istotnie wpływają na potencjał plonotwórczy i/lub masę systemu korzeniowego.

Materialiały i metody

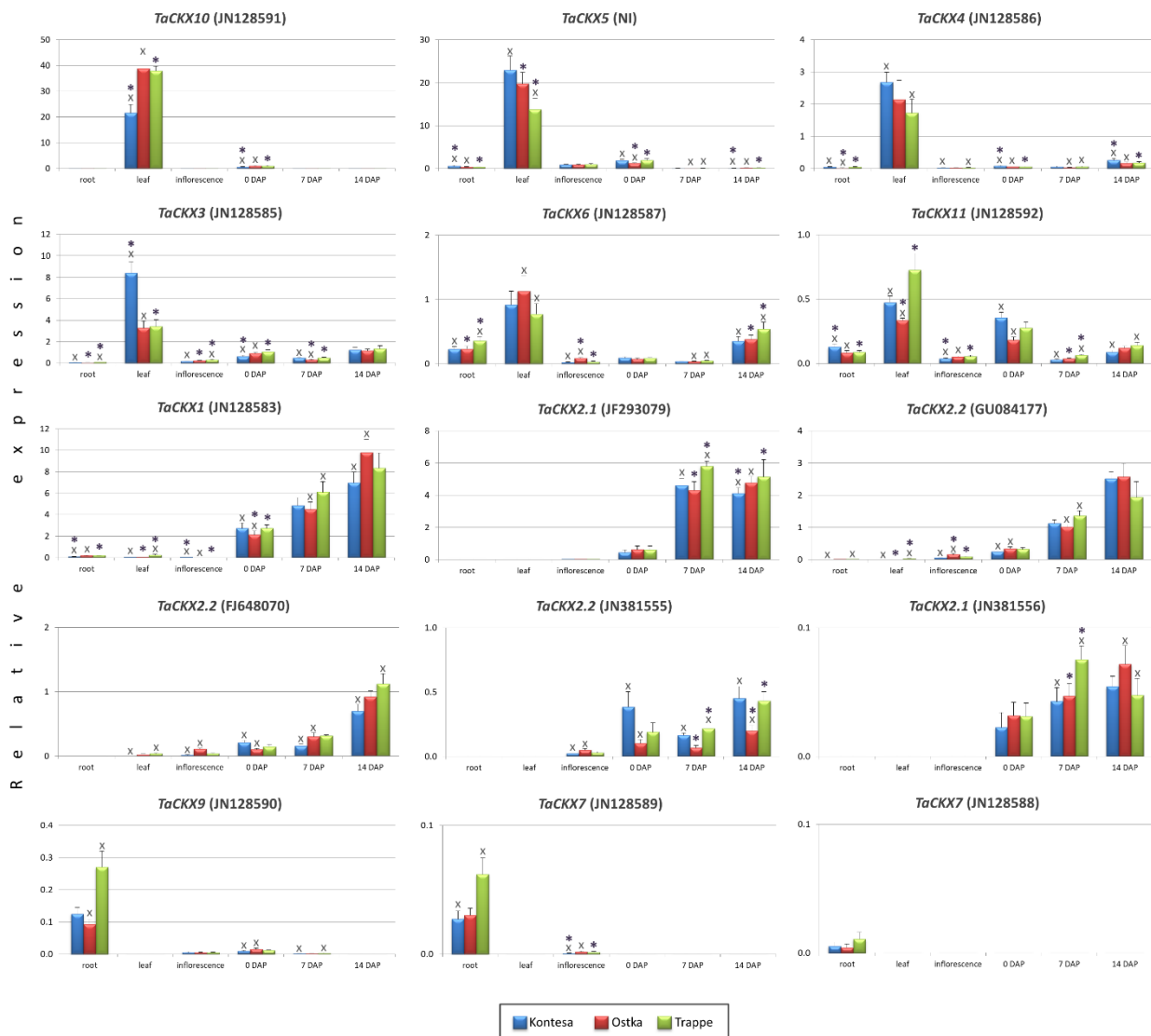
Pierwszy etap badań przeprowadzono na trzech odmianach pszenicy zwyczajnej: Kontesa, Ostka i Trappe. Do dalszych badań włączone zostały 34 linie hodowlane i odmiany dostarczone przez Hodowlę Roślin Strzelce, grupę IHAR-PIB oraz 23 linie hodowlane i odmiany uzyskane z Danko Hodowli Roślin. Materiałem roślinnym w trzeciej pracy było 5 linii hodowlanych i odmian, użytych do krzyżowania wzajemnego oraz pokolenie F₂ tych krzyżowań. W każdym z ośmiu krzyżowań szczegółowo badano po 6 roślin F₂. Głównymi organami pobieranymi do analiz były kłosa w siódmym dniu po zapyłaniu (7 DAP) oraz 5-dniowe siewki korzenia, kiełkowane na szalkach Petriego.

W badaniach zastosowano następujące metody: izolację RNA z różnych organów, syntezę cDNA, testy PCR, elektroforezę, ilościowy RT-qPCR, pomiar aktywności enzymatycznej, pomiary morfometryczne roślin oraz analizy statystyczne. Pomiary morfometryczne obejmowały: wysokość roślin, długość kłosa, liczbę kłosów na roślinę, liczba ziaren na roślinę, masę ziaren na roślinę oraz masę tysiąca ziaren.

Wyniki badań wg publikacji

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. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0214239>

Badania nad rodziną genów *TaCKX* rozpoczęto od zebrania danych dotyczących całej rodziny dostępnych w bazach danych i w literaturze. Korzystano zarówno z bazy NCBI (z ang. National Center for Biotechnology Information) jak i Ensemble Plants IWGSC (z ang. International Wheat Genome Sequencing Consortium). Ponadto dokonano porównania filogenetycznego białek kodowanych przez geny *TaCKX* z blisko spokrewnioną rodziną jęczmiennych *HvCKX*. Podobieństwa białek kodowanych przez geny *CKX* jęczmienia i pszenicy wspierały sugerowaną przez nasz zespół numerację genów *CKX* w pszenicy. Ich liczba była spójna dla obu gatunków. Specyfikę ekspresji genów *TaCKX* przebadano w 5-dniowych korzeniach siewek, liściach 4-tygodniowych roślin, kwiatostanach o długości 5–6 cm oraz kłosach w różnych stadiach rozwoju, 0 DAP, 7 DAP i 14 DAP w trzech odmianach, Kontesa, Ostka oraz Trappe przedstawia to Rys. 1. Na tej podstawie geny przypisano do 4 grup: 1) *TaCKX4*, *TaCKX5* i *TaCKX10* (obecnie 9) 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* specyficzne dla rozwijających się kłosów i kwiatostanów; 4) *TaCKX7*, *TaCKX8* i *TaCKX9* (obecnie 10), wysoce specyficzne dla korzeni.



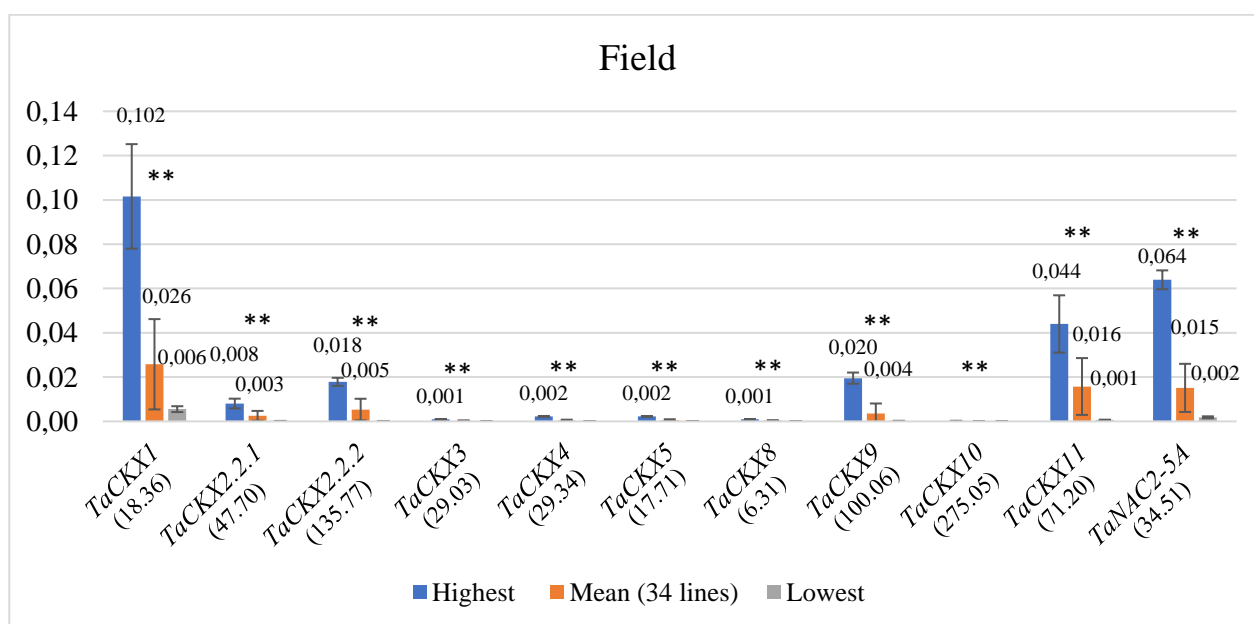
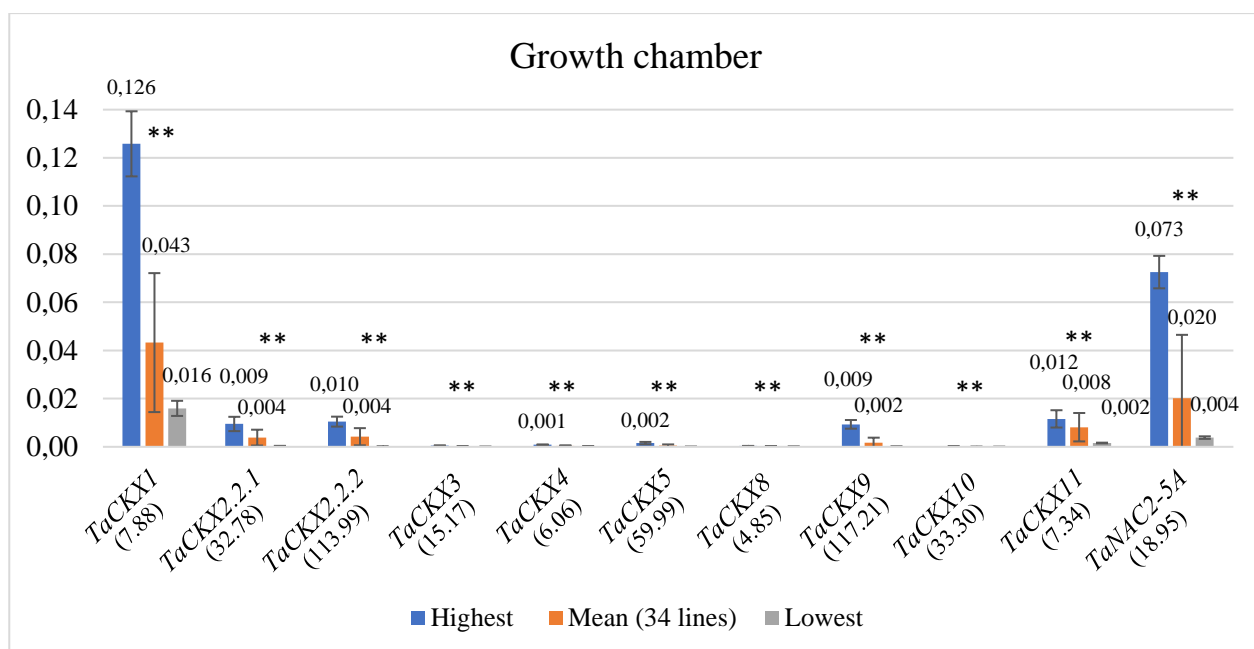
Rys. 1. Specyfika ekspresji genów z rodziny *TaCKX* w rozwijających się tkankach/organach. Względna ekspresję genów mierzono w: korzeniu siewki, dobrze rozwiniętym liściu 4-tygodniowej rośliny, kwiatostanie, w kłosach 0 DAP, 7 DAP i 14 DAP u trzech odmian Kontesa, Ostka, Trappe. Kolejno przedstawiono wykresy dla genów od najwyższej do najniższej ekspresji. * –istotne różnice przy $P < 0,05$.

Sprawdzono również, czy występują różnice w poziomach ekspresji *TaCKX* w pierwszych (I) i drugich (II) kłosach 7 DAP poszczególnych roślin w trzech badanych odmian. Chociaż poziomy ekspresji poszczególnych genów *TaCKX* są tkankowo-specyficzne, to mierzone w poszczególnych tkankach w większości przypadków istotnie różnią się między trzema odmianami zastosowanymi w badaniach. Jak przedstawię w następnej pracy, różnice te są znacznie większe w większej grupie materiału hodowlanego i mogą wynikać ze zróżnicowania alleli badanych genów, co wskazuje na możliwą selekcję tych alleli do hodowli.

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*, 20(1):496, str. 1 - 13. <https://doi.org/10.1186/s12870-020-02713-9>

Głównym celem pracy było sprawdzenie zróżnicowania w poziomie ekspresji genów *TaCKX* między sześćdziesięcioma liniami, rodami oraz odmianami pszenicy uprawnej. Ponadto testowano czy występują różnice w poziomach ekspresji między roślinami uprawianymi w warunkach laboratoryjnych czyli w fitotronie w porównaniu do tych z pola. Szukaliśmy odpowiedzi, czy poziom ekspresji danego genu w danym genotypie mierzony w roślinach rosnących w fitotronie odpowiada temu z roślin rosnących na polu. W konsekwencji czy geny te będą regulowały rozwój rośliny i jej produktywność podobnie lub inaczej. Ponadto interesowało nas współdziałanie tych genów. Do badań został włączony gen *TaNAC2-5A (NAC2)*, gdyż oczekiwano, iż będzie odgrywał istotną rolę we współregulacji genów z rodziny *TaCKX*. Z naszych badań wynika, że wykazywał on ekspresję w różnych organach rozwijających się roślin pszenicy; przy czym najwyższy poziom ekspresji był w liściu.

Najwyższy, średni oraz najniższy poziom ekspresji w badanych liniach hodowlanych i odmianach przedstawiono na Rys. 2. Najwyższy poziom ekspresji w badanych genotypach hodowlanych wykazywały geny: *TaCKX1*, 2.2.1, 2.2.2, 9, 11 i *NAC2*. Badane linie hodowlane znacznie różniły się poziomem ekspresji poszczególnych genów. Na przykład w przypadku roślin rosnących w fitotronie dla genu *TaCKX1* różnice między genotypem z najwyższą ekspresją a najniższą są ponad trzykrotne, dla genu *TaCKX8* pięciokrotne a dla *TaCKX9* ponad stukrotne. Różnice te dla roślin rosnących na polu wahały się od sześciokrotnego dla genu *TaCKX8* aż do 275-krotnego dla genu *TaCKX10*. Tak duże zróżnicowanie poziomu ekspresji wśród badanych genotypów umożliwia użycie tego miernika do prowadzenia selekcji. Różnice w poziomie ekspresji względnej mierzone w kłosach pochodzących z fitotronu i z pola zaobserwowano dla siedmiu genów. Były to: *TaCKX1*, *TaCKX3*, *TaCKX4*, *TaCKX5*, *TaCKX10*, *TaCKX11* oraz *TaNAC2-5A*. Brak różnic dla niektórych z nich (*TaCKX2.2.1*, *TaCKX2.2.2*, *TaCKX8*, *TaCKX9*) świadczy o możliwości prowadzenia pomiaru ekspresji w roślinach uprawianych w fitotronie i wykorzystania jako miernika niezależnie od warunków uprawy. Wyniki koekspresji genów z rodziny *TaCKX* i *NAC2* opracowano na podstawie współczynników korelacji. Przedstawiono je zgodnie z pochodzeniem materiałów hodowlanych oraz poletek doświadczalnych oddzielnie dla Spółki Hodowlanej Danko i Strzelce oraz razem Danko + Strzelce. Zaobserwowano różnice w poziomie ekspresji względnej większości badanych genów mierzonej w kłosach pochodzących z fitotronu i z pola.

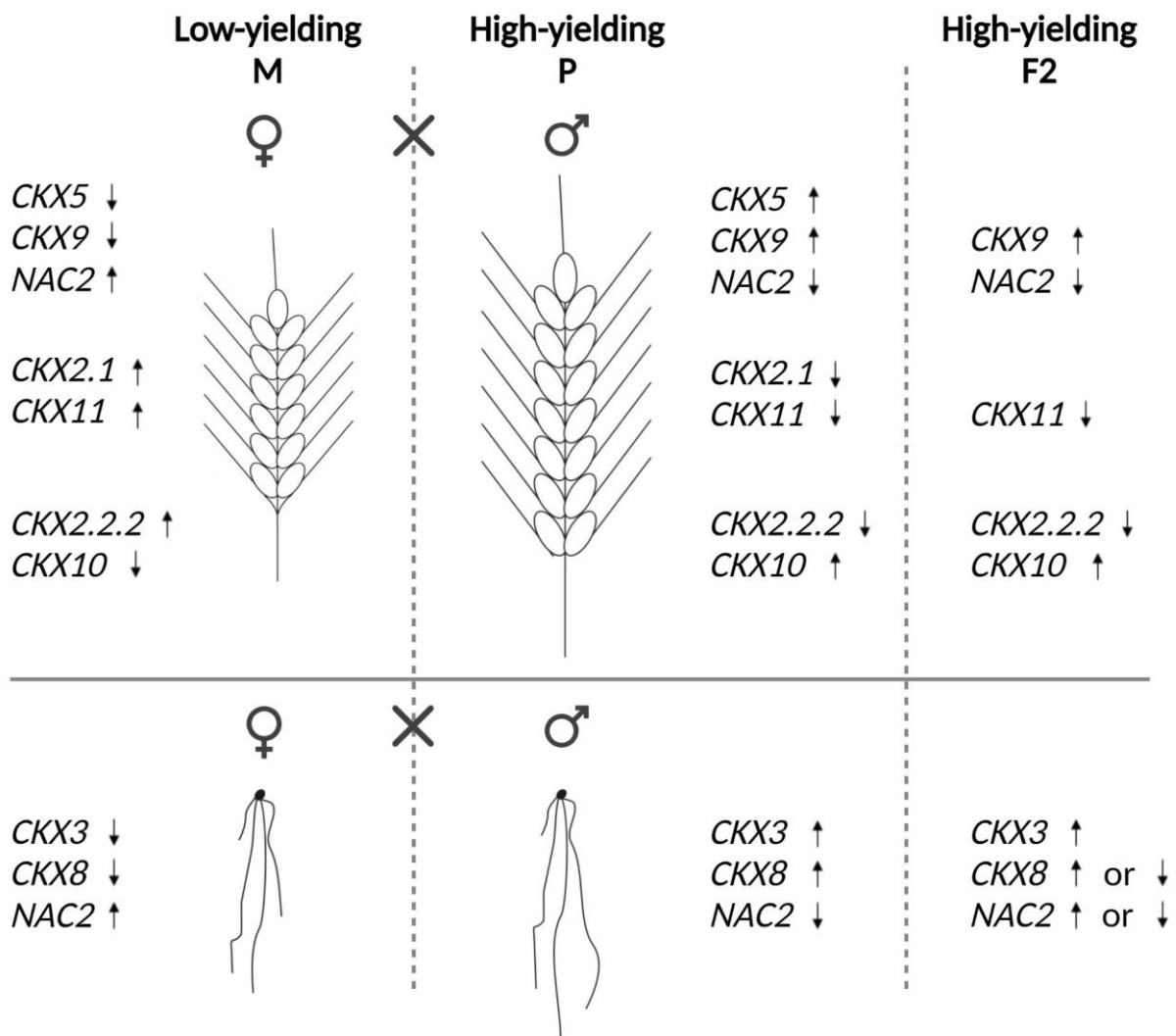


Rys. 2. Najwyższy, średni oraz najniższy poziom ekspresji genów z rodziny *TaCKX* i *TaNAC2-5A* w kłosach 7 DAP dla 34 linii hodowlanych uprawianych w warunkach kontrolowanych oraz na polu. ** – istotna przy $p \leq 0,01$ (między najwyższą a najniższą). (...) – iloraz zmienności.

W konsekwencji, badane geny w różny sposób regulowały cechy związane z produktywnością w fitotronie i na polu. Tylko w kontrolowanych warunkach fitotyonu gen *TaNAC2-5A* brał udział w negatywnej regulacji liczby źdźbeł i aktywności CKX w korzeniach siewek. Niektóre z genów, które uległy ekspresji w korzeniach siewek, wpłynęły negatywnie na liczbę źdźbeł i pozytywnie regulowały masę korzeni siewek, aktywność CKX w kłosach, masę tysiąca ziaren (MTZ) oraz tworzenie półpustych kłosów.

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, 24, 8196, str. 1 - 24. <https://doi.org/10.3390/ijms24098196>

W ramach pracy przeprowadzona została analiza mająca na celu ustalenie, w jaki sposób wzory ekspresji genów *TaCKX*, wraz z ekspresją genu kodującego czynnik transkrypcyjny NAC, *TaNAC2-5A*, oraz cechy plonotwórcze są dziedziczone. Tę wiedzę będziemy chcieli wykorzystać w hodowli pszenicy do przyspieszenia procesu selekcji materiałów hodowlanych. Poziom ekspresji genów *TaCKX*, *TaNAC2-5A* i cechy plonotwórcze zostały zbadane w kłosach 7 DAP i korzeniach siewek rodziców ze strony matki i ojca oraz ich potomstwie w pokoleniu segregującym F₂ w czterech wzajemnych krzyżowaniach (w sumie osiem krzyżowań). Poziomy ekspresji większości z nich, a także produktywność w F₂ dziedziczone były po rodzicu ze strony ojca. Zgodnie z tym wzory ekspresji genów *TaCKX* i *TaNAC2-5A* w nisko produktywnych roślinach matecznych skrzyżowanych z wysoko produktywnymi roślinami ojcowskimi odtwarzały w F₂ wzory ekspresji genów i produktywność zgodne z rodzicem ojcowskim. Wyniki tych krzyżowań oraz towarzyszących im wzrostach oraz spadkach ekspresji genów z rodziny *TaCKX* oraz *TaNAC2-5A* w pokoleniu F₂ przedstawiono na Rys. 3. Wyjątkiem był gen *TaCKX5* w kłosach 7 DAP i *TaCKX3* w korzeniach siewek, dla których poziom ekspresji w pojedynczych krzyżówkach był podobny do rodzica matecznego. Ponadto wysoka albo niska produktywność była w przeważającej mierze odziedziczona po rodzicu ze strony ojca, ale już masa korzenia od obojga rodziców lub w jednej krzyżówce odwrotnej, od rodzica ze strony matki. Współczynniki korelacji pomiędzy genami z rodziny *TaCKX*, *TaNAC2-5A* i cechami związanymi z produktywnością w wysoko produktywnym potomstwie F₂ wskazywały, które z tych genów były specyficznie skorelowane z indywidualnymi cechami związanymi z wydajnością. Genem, którego poziom ekspresji korelował z największą liczbą cech plonotwórczych był mierzony w kłosach 7 DAP *TaCKX2.1*. Korelował on dodatnio z liczbą ziaren, masą ziarna, liczbą kłosów i długością kłosów, a także masą korzeni siewek. Badane poziomy ekspresji *TaCKX1* lub *TaNAC2-5A* w korzeniach siewek były ujemnie skorelowane z tymi cechami. Przeciwnie, masa tysiąca ziaren była ujemnie skorelowana z poziomem ekspresji *TaCKX2.2.2*, *TaCKX2.1* i *TaCKX10* w kłosach 7 DAP. Zazwyczaj, podobnie jak w niniejszej pracy, ujemne korelacje między ekspresją tych trzech genów w kłosach a masą tysiąca ziaren, liczbą ziaren, masą ziarna, liczbą kłosów są skorelowane z wyższą produktywnością, a dodatnie z niższą produktywnością. Jednak w przypadku masy korzeni siewek to dodatnie korelacje pomiędzy ekspresją tych genów a badaną cechą warunkują wyższą produktywność w F₂. Wyższa produktywność w F₂ była również związana ze zrównoważoną aktywnością enzymu CKX w kłosach i korzeniach siewek.



Rys. 3. Modele regulacji w górę (↑) lub w dół (↓) genów z rodziny *TaCKX* i *TaNAC2-5A* u rodziców ze strony matek o niskiej wydajności skrzyżowanych z rodzicami ze strony ojca o wyższej wydajności i ich potomstwem F₂.

Podsumowanie i wnioski

1. Na podstawie danych zebranych z baz (NCBI i Ensembl Plants), porównania transkryptów oraz białek kodowanych przez geny *TaCKX* pszenicy i *HvCKX* jęczmienia stwierdzono, że:
 - geny *TaCKX2.3*, *TaCKX2.5* i *TaCKX6a02* i kodowane przez nie białka są zgrupowane razem z genem i białkiem kodowanym przez *HvCKX2.1*, dlatego przypisano w/w geny jako *TaCKX2.1*,
 - geny *TaCKX2.1*, *TaCKX2.2*, *TaCKX2.4* i *TaCKX6D1* i kodowane przez nie białka były zgrupowane z genem i białkiem kodowanym przez *HvCKX2.2*, dlatego przypisano te cztery geny pszenicy jako *TaCKX2.2*,
 - geny *TaCKX7* i *TaCKX8* i kodowane przez nie białka były zgrupowane razem z białkiem kodowanym przez *HvCKX7*, stąd geny te przypisano jako *TaCKX7*.
2. Wykazano, że geny z rodziny *TaCKX* są tkankowo i rozwojowo specyficzne. W zależności od specyfiki ich 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.
3. Istotne różnice w poziomie ekspresji genów *TaCKX* pomiędzy pierwszym i drugim kłosem oraz pomiędzy kłosami zbieranymi o różnych porach dnia wskazują na potrzebę pobierania do badań tego samego kłosa o stałej porze dnia.
4. Wielokrotne różnice w poziomie ekspresji wybranych genów *TaCKX* i *TaNAC2-5A* wśród linii hodowlanych i ich korelacja z cechami plonotwórczymi umożliwiają użycie tych danych jako miernika do prowadzenia selekcji.
5. Brak istotnych różnic w poziomie ekspresji względnej między kłosami pochodzącymi z fitotronu i z pola dla niektórych badanych genów (*TaCKX2.2.1*, *TaCKX2.2.2*, *TaCKX8*, *TaCKX9*) umożliwia prowadzenie pomiaru ekspresji tych genów tylko w fitotronie i wykorzystania tego miernika w selekcji polowej.
6. Korelacje pomiędzy ekspresją niektórych genów *TaCKX* w kłosach 7 DAP oraz masą korzenia i odwrotnie, pomiędzy ich ekspresją w korzeniach oraz cechami plonotwórczymi potwierdzają możliwość użycia ich jako mierników do oceny wzrostu korzeni siewek i cech plonotwórczych a tym samym prognozowania produktywności roślin.
7. Indywidualne cechy plonotwórcze są pozytywnie lub negatywnie regulowane przez różne grupy genów. Liczba ziaren, produktywność i liczba kłosów, długości kłosa i masy korzeni były pozytywnie regulowane w kłosach 7 DAP wysoko produktywnego potomstwa F₂ przez *TaCKX2.1* i *TaCKX10* oraz negatywnie w korzeniach siewek przez *TaCKX1*. Cecha MTZ i wysokości roślin były regulowane odmiennie.
8. Antagonistyczne wzorce ekspresji genów dla niektórych istotnych cech plonotwórczych, takich jak liczba ziaren, plon ziarna i liczba kłosów w stosunku do MTZ może być wynikiem mechanizmu sprzężenia zwrotnego regulacji poziomu ekspresji pomiędzy genami *TaCKX1* i *TaCKX2* oraz innymi genami.

9. Kooperacja między genami *TaCKX* i *TaNAC-5A* w komponentach rodzicielskich wpływa na regulację cech plonotwórczych w segregującym potomstwie F₂, prowadząc do uzyskania określonej produktywności. Na przykład wysoko produktywny komponent ojcowski z niską ekspresją genów *TaCKX2.1* i *TaCKX11* w kłosach 7 DAP i wysoką *TaCKX3* i *TaCKX8* oraz niską *TaNAC2-5A* w korzeniach w porównaniu z komponentem matczym przekaże te wzory ekspresji do F₂, co będzie skutkowało wysoką produktywnością.
10. Wykazano, iż wzory ekspresji genów *TaCKX* i *TaNAC2-5A* mierzone w kłosach 7 DAP i korzeniach siewek, a także cecha produktywności wskazują na dziedziczenie ojcowskie w F₂.
11. Geny z rodziny *TaNAC* mogą być istotnymi, dodatkowymi regulatorami genów z rodziny *TaCKX* a tym samym cech plonotwórczych pszenicy, dlatego też powinny być brane pod uwagę w hodowli pszenicy.

Literatura

- Ashikari M., Sakakibara H., Lin S., Yamamoto T., Takashi T., Nishimura A., Angeles E.R., Qian Q., Kitano H., Matsuoka M. (2005). Cytokinin oxidase regulates rice grain production. *Science*, 309 (5735), 741–745.
- Börner A., Plaschke J., Korzun V., Worland A.J. (1996). The relationships between the dwarfing genes of wheat and rye. *Euphytica* 89, 69–75.
- Chen L., Zhao J., Song J., Jameson P.E. (2020). Cytokinin dehydrogenase: a genetic target for yield improvement in wheat. *Plant Biotechnology Journal*, 18 (3), 614–630.
- He X., Qu B., Li W., Zhao X., Teng W., Ma W., Ren Y., Li B., Li Z., Tong Y. (2015). The nitrate-inducible NAC transcription factor *TaNAC2-5A* controls nitrate response and increases wheat yield. *Plant Physiology*, 169 (3), 1991–2005.
- Iqbal A., Bocian J., Hameed A., Orczyk W., Nadolska-Orczyk A. (2022). *Cis*-Regulation by NACs: A Promising Frontier in Wheat Crop Improvement. *International Journal of Molecular Sciences*, 23, 15431.
- Mok D.W.S., Mok M.C. (2001). Cytokinin metabolism and action. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 52, 89–118.
- Nadolska-Orczyk A., Rajchel I.K., Orczyk W., Gasparis S. (2017). Major genes determining yield-related traits in wheat and barley. *Theoretical and Applied Genetics*, 130, 1081–1098.
- Rachoń L., Szumiło G., Stankowski S. (2011). Porównanie wybranych wskaźników wartości technologicznej pszenicy zwyczajnej (*Triticum aestivum* ssp. *vulgare*), twardej (*Triticum durum*) i orkiszowej (*Triticum aestivum* ssp. *spelta*). *Fragmenta Agronomica*. 28 (4) 2011, 52–59.
- Schnurbusch T. (2019). Wheat and Barley Biology: towards new frontiers. *Journal of Integrative Plant Biology*, 61 (3), 198–203.
- Singh S., Koyama H., Bhati K.K., Alok A. (2021). The biotechnological importance of the plant-specific NAC transcription factor family in crop improvement. *Journal of Plant Research*, 134, 475–495.
- Song J., Jiang L., Jameson P.E. (2012). Co-ordinate regulation of cytokinin gene family members during flag leaf and reproductive development in wheat. *BMC Plant Biology*, 12, 78.
- Uauy C., Brevis J.C., Dubcovsky J. (2006a). The high grain protein content gene *Gpc-B1* accelerates senescence and has pleiotropic effects on protein content in wheat. *Journal of Experimental Botany*, 57 (11), 2785–2794.
- Uauy C., Distelfeld A., Fahima T., Blechl A., Dubcovsky J. (2006b). A NAC gene regulating senescence improves grain protein, zinc, and iron content in wheat. *SCIENCE*, 314, 1298–1301.
- Zalewski W., Galuszka P., Gasparis S., Orczyk W., Nadolska-Orczyk A. (2010). Silencing of the *HvCKX1* gene decreases the cytokinin oxidase/dehydrogenase level in barley and leads to higher plant productivity. *Journal of Experimental Botany*, 61 (6), 1839–1851.
- Zalewski W., Orczyk W., Gasparis S., Nadolska-Orczyk A. (2012). *HvCKX2* gene silencing by biolistic or *Agrobacterium*-mediated transformation in barley leads to different phenotypes. *BMC Plant Biology*, 12, 1–12.
- Zhang J., Liu W., Yang X., Gao A., Li X., Wu X., Li L. (2011). Isolation and characterization of two putative cytokinin oxidase genes related to grain number per spike phenotype in wheat. *Molecular Biology Reports*, 38 (4), 2337–2347.
- Zhao J., Bai W., Zeng Q., Song S., Zhang M., Li X., Hou L., Xiao Y., Luo M., Li D. Luo X. Y., Pei Y. (2015). Moderately enhancing cytokinin level by down-regulation of *GhCKX* expression in cotton concurrently increases fiber and seed yield. *Molecular Breeding*, 35 (2), 60.