

Lp. w zał. do Rozporządzenia MRiRW: 5.

Tytuł zadania: **Identyfikacja zmienności genetycznej pszenicy korelującej z potencjałem plonotwórczym i wybranymi cechami systemu korzeniowego.**

Kierownik zadania: **prof. dr hab. A. Nadolska-Orczyk**

Celem zadania w roku 2014 było przygotowanie technik i materiału badawczego, które umożliwią w kolejnych latach weryfikację założonej na podstawie wcześniejszych badań hipotezy badawczej. Zakłada ona, że ekspresja genów z rodziny *TaCKX* występująca w rozwijających się kłosach i/lub systemie korzeniowym wskazuje na potencjał plonotwórczy i/lub masę systemu korzeniowego. W ramach przygotowania technik opracowano i wybrano najlepsze techniki genotypowania poszczególnych genów *TaCKX*. Przygotowanie materiału badawczego polegało na wyborze i kolekcji różnych populacji blisko spokrewnionych genotypów pszenicy o zróżnicowanym plonowaniu.

#### Materiały i metody:

Analizie bioinformatycznej poddano 32 sekwencje genów *TaCKX* zidentyfikowanych w bazie sekwencji NCBI Nukleotide. Sekwencje zostały porównane wzajemnie przy pomocy algorytmu BLAST oraz ClustalW. W oparciu o sekwencje o numerach akcesyjnych JN128583 i JN128584 zidentyfikowanych jako *TaCKX1* i *TaCKX2*, zaprojektowano specyficzne startery amplifikujące produkty o długości 188 i 182 nukleotydów.

W oparciu o dane literaturowe wytypowano do badań 4 geny referencyjne. Materiałem badawczym były trzy polskie odmiany pszenicy zwyczajnej: Ostka Smolicka, Torka i Brawura. Rośliny rosły w kontrolowanych stabilnych warunkach w komorze fitotronowej.

RNA izolowano z korzeni 5-dniowej siewki, młodego w pełni rozwiniętego liścia, niedojrzałych kwiatostanów w dwóch stadiach rozwojowych i rozwijających się kłosów: w dniu zapylenia, oraz po 7 i 14 dniach od zapylenia (DAP). Każdą odmianę reprezentowały trzy powtórzenia biologiczne. Wstępny pólilościowy PCR wykonano dla wszystkich zaprojektowanych par starterów. Jako matrycy używano cDNA zsyntetyzowanego na matrycy RNA wyizolowanego z korzenia, liścia i kłosa 7 DAP. Analizę ilościowego RT-PCR (qRT-PCR) wszystkich badanych materiałów prowadzono w obecności barwnika EvaGreen. Względny poziom ekspresji genów *TaCKX1* i *TaCKX2* określano przy pomocy metody  $\Delta\Delta C_t$  w stosunku do wybranego genu referencyjnego.

Wykonano sekwencjonowanie fragmentu genu *TaCKX2* i otrzymane wyniki poddano analizie bioinformatycznej w celu sprawdzenia ich poprawności i stopnia podobieństwa z sekwencjami zdeponowanymi w bazie NCBI.

Na podstawie danych literaturowych i konsultacji z hodowcami, do dalszych badań wytypowano i pozyskano linie z dwóch populacji mapujących oraz linie hodowlane z dwóch polskich hodowli (Hodowla Roślin Strzelce Sp. z o.o. Grupa IHAR i Hodowla Roślin Danko, Sp. z o.o.).

#### Wyniki i dyskusja:

W bazach sekwencji nukleotydowych NCBI Nukleotide zidentyfikowano łącznie 32 rekordy zawierające pełną lub częściową sekwencję genów *CKX*. Były to zarówno sekwencje genomowe jak i mRNA. Siedem z nich opisano, jako *TaCKX1* a 11 jako *TaCKX2*. Poszczególne sekwencje porównane zostały przy pomocy algorytmu megaBLAST. Sekwencje dwóch analizowanych genów wyraźnie różnią się od siebie poza podobieństwem domeny wiążącej kofaktor FAD.

Do ilościowej analizy ekspresji badanych genów konieczne było wytypowanie genu referencyjnego. Został on wybrany spośród czterech genów referencyjnych wytypowanych na podstawie literatury i przetestowanych na naszym materiale badawczym. Ilościową analizę ekspresji genów *TaCKX* poprzedziły testowe reakcje pólilościowe, które miały za zadanie zweryfikować poprawność zaprojektowanych starterów i wytypować tkanki, w których zachodzi najwyższa ekspresja badanych genów. Ilościowa analiza ekspresji badanych genów w różnych organach i tkankach rosnących roślin pszenicy wykazała, że profile ekspresji tych genów są bardzo podobne. Wysoką ekspresję obserwowano w czasie rozwoju kłosa, niską w korzeniu i praktycznie brak ekspresji w pozostałych tkankach. Taki profil ekspresji, zgodnie z naszą hipotezą może sugerować, że obydwa geny odgrywają istotną rolę w produktywności pszenicy. Poziom ekspresji genu *TaCKX2* był o  $10^2$  wyższy niż *TaCKX1*, co może wpływać na skalę oddziaływania na kontrolowaną cechę.

W ramach realizacji zadania zgromadzono również kolekcję 116 genotypów pszenicy. W skład kolekcji wchodziły wybrane linie z dwóch populacji mapujących oraz materiały wytypowane przez polskich hodowców. Zgromadzone materiały są blisko spokrewnione ale różnią się produktywnością.

Profile ekspresji wybranych do badań genów *TaCKX* wskazują, że mogą one być użyte do weryfikacji postawionej przez nas hipotezy. Następny etap badań będzie wymagał określenia czy istnieje korelacja pomiędzy poziomem transkrypcji genów ulegających wysokiej ekspresji w rozwijających się ziarniakach i produktywnością. Do realizacji tego zadania zgromadzono populacje genotypów o zbliżonym tle genetycznym ale różniące się produktywnością.

Wnioski:

1. Sekwencje genów *TaCKX1* i *TaCKX2* nie wykazują homologii poza regionem zawierającym domenę wiążącą kofaktor FAD. Analiza bioinformatyczna umożliwiła wybór specyficznych starterów do analiz ekspresji tych genów.
2. Spośród czterech testowanych genów referencyjnych tylko jeden ulegał ekspresji we wszystkich analizowanych tkankach i został wybrany do dalszych badań.
3. Reakcje półilościowe ekspresji genów *TaCKX* umożliwiły zweryfikowanie poprawności zaprojektowanych starterów i wytypowanie tkanek, w których zachodzi najwyższa ekspresja badanych genów.
4. Pomiar względnego poziomu ekspresji w określonych tkankach był możliwy jedynie za pomocą ilościowego RT-PCR (qRT-PCR).
5. Ekspresja genów *TaCKX1* i *TaCKX2* wzrastała w czasie rozwoju kłosa między 0 a 14 DAP, w związku z tym mogą one brać udział w regulacji stężenia cytokinin w rozwijających się ziarniakach.
6. Zgodnie z założoną hipotezą wyznaczony wzór ekspresji genów *TaCKX1* i *TaCKX2* w różnych organach i tkankach rozwijających się roślin pszenicy może wskazywać na ich rolę w produktywności.
7. Bardzo duże różnice w poziomie ekspresji genów *TaCKX2* i *TaCKX1* w rozwijających się ziarniakach mogą wpływać na istotność zmian związanych z produktywnością.
8. Zgromadzone populacje umożliwią wyznaczenie korelacji pomiędzy poziomem ekspresji genów *TaCKX* a produktywnością i masą korzenia.