

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 2015 roku była weryfikacja korelacji pomiędzy poziomem ekspresji genów *TaCKX1* i *TaCKX2* oraz aktywnością enzymu CKX w określonych tkankach a produktywnością/masą korzenia w wybranych genotypach pszenicy zwyczajnej.

Jest to kolejny etap weryfikacji hipotezy badawczej zakładającej, że ekspresja genów z rodziny CKX w rozwijających się kłosach lub/i systemie korzeniowym wskazuje na produktywność lub masę systemu korzeniowego.

Realizacja tematu przebiegała w kilku etapach i obejmowała wytypowanie i fenotypowanie materiału doświadczalnego, analizę ekspresji *TaCKX*, ocenę aktywności enzymu CKX, sekwencjonowanie fragmentów *TaCKX* oraz analizę statystyczną i bioinformatyczną wyników.

Materiał i metody

Materiał badawczy stanowiły linie i rody hodowlane zgromadzone w ramach tematu w 2014 roku. Analiza obejmowała 50 linii w tym: 10 linii pochodzących z populacji mapującej Cuthbert i in. 2008, 15 linii z populacji mapującej Quarrie i in. 2005, 10 rodów przekazanych przez Hodowlę Roślin Strzelce Sp. z o.o. Grupa IHAR, 10 rodów udostępnionych przez Hodowlę Roślin Danko, Sp. z o.o., 5 odmian współczesnych.

Opis fenotypowy roślin został wykonany na podstawie doświadczenia wazonowego założonego w tunelu foliowym.

Analiza ekspresji względnej genów *TaCKX1* i *TaCKX2* wykonano zgodnie z opracowaną w ubiegłym roku procedurą w ilościowej reakcji RT-PCR. Względny poziom ekspresji genów *TaCKX1* i *TaCKX2* określano przy pomocy metody $\Delta\Delta C_t$ w stosunku do genu referencyjnego - cell division control protein, AAA-subfamily of ATPases.

Aktywność enzymu dehydrogenazy cytokininowej, mierzono w korzeniach 5-cio dniowych siewek i kłosach 7DAP wg. procedury opracowanej i opisanej przez Frebort i in. 2002. Całkowitą ilość białka w otrzymanych ekstraktach określano za pomocą standardowej metody Bradforda (1976).

Sekwencjonowanie obejmowało fragmenty genów *TaCKX1* i *TaCKX2* pochodzące z genomowego DNA i cDNA kłosa 7DAP odmiany Ostka Smolicka i Brawura. Analiza bioinformatyczna wyników sekwencjonowania obejmowała porównanie uzyskanych sekwencji z dostępnymi bazami danych przy pomocy algorytmu BLAST N.

Na podstawie wyników analizy ekspresji wyliczono względną ekspresję genów *TaCKX1* i *TaCKX2* z uwzględnieniem współczynnika korygującego wahania genu referencyjnego.

Wyniki opisu morfologicznego, ekspresji względnej genów *TaCKX* i aktywności enzymatycznej CKX poddano analizie korelacji.

Wyniki

W doświadczeniu wazonowym obserwowano 11 cech morfologicznych i fenologicznych. Wśród badanych obiektów liczba dni do kłoszenia wahała się od 39 do 62. Największe zróżnicowanie tej cechy obserwowano w obrębie populacji mapującej Quarrie i in. 2005. Rody otrzymane z Hodowli Roślin Strzelce charakteryzowały się późniejszym kwitnieniem w porównaniu do materiałów otrzymanych z Hodowli Roślin Danko. Badane materiały charakteryzowały się zróżnicowaną długością okresu od kłoszenia do pylenia, wynosił on od

jednego do siedmiu dni. Największe zróżnicowanie tej cechy obserwowano w populacji mapującej Quarrie i in. 2005. Średnia liczba kłosów na roślinę mieściła się w przedziale 3,5– 8,2. Generalnie obiekty z Hodowli Roślin Strzelce charakteryzowały się mniejszą liczbą kłosów/roślinę w stosunku do materiałów otrzymanych z Hodowli roślin Danko. Wśród badanych materiałów średnia liczba ziaren/roślinę wahała się od 30 do 284,7. Największą zmienność tej cechy obserwowano w populacji mapującej Cuthbert i in. 2008. Materiały otrzymane z Hodowli Roślin Danko miały największą średnią liczbę ziaren/roślinę. Średnia masa ziaren/roślinę mieściła się w przedziale 1,1g – 9,8g. Plon z wiaderka badanych materiałów wykazywał ponad 10-krotną różnicę i wynosił od 5,25g do 58,9g. Grupa materiałów wytypowanych do analizy w 2015 roku charakteryzowała się zróżnicowaną wysokością roślin tj. od 38 cm do 127 cm. Rody z hodowli Roślin Danko były wyższe i bardziej zróżnicowane pod względem tej cechy od materiałów otrzymanych z Hodowli Roślin Strzelce. Długość kłosa mieściła się w przedziale od 6,37 cm do 10,6 cm. Masa tysiąca ziaren wynosiła od 21,7 g do 41,7 g. Masa części nadziemnej wynosiła od 10,1 g do 24,8 g. Analizę ekspresji względnej wykonano dla wytypowanych w 2014 roku genów *TaCKX1* i *TaCKX2*. Gen *TaCKX1* charakteryzował się 100-krotnie wyższą ekspresją w kłosie 7 DAP od genu *TaCKX2*. W korzeniu 5-dniowej siewki nie obserwowano ekspresji genu *TaCKX2*. Aktywność względna enzymu CKX w korzeniu 5-dniowych siewek mieściła się w przedziale 0,023 do 0,165 pKat/mg. W kłosie 7 DAP aktywność względna wynosiła od 0,017 do 0,208 pKat/mg.

Nie wykazano istotnej zależności między ekspresją względną *TaCKX1* i *TaCKX2* w badanych tkankach. Natomiast zaobserwowano negatywną korelację między ekspresją względną *TaCKX1* w korzeniu 5-dniowych siewek i w kłosach 7 DAP (-0,41). Między ekspresją względną genu *TaCKX1*, a aktywnością względną enzymu CKX w korzeniu 5-dniowej siewki zaobserwowano negatywną korelację (-0,29). Ekspresja genu *TaCKX2* w kłosie 7 DAP wykazywała silną pozytywną korelację z aktywnością względną enzymu CKX (0,82). Względna ekspresja *TaCKX1* w korzeniu 5-dniowych siewek wykazywała istotną korelację z liczbą dni do kłoszenia (0,52), liczbą kłosów (-0,63). Natomiast w kłosie 7 DAP względna ekspresja tego genu korelowała z wysokością roślin (0,37) i plonem (-0,34). Ekspresja względna genu *TaCKX2* w kłosie 7 DAP wykazywała istotną korelację z liczbą kłosów (0,43), masą ziarniaków/roślinę (0,43) i plonem (0,45).

Na podstawie sekwencji DNA i cDNA, mimo braku sekwencji referencyjnych przypisanych do określonego genomu, udało się ustalić, że w przypadku odmiany Ostka Smolicka ekspresji ulegają dwa geny *TaCKX1*, najprawdopodobniej pochodzące z różnych homeologicznych genomów, a w przypadku odmiany Brawura ekspresji ulega tylko jeden z nich.

Na podstawie sekwencji referencyjnych o zidentyfikowanej lokalizacji określono, że w odmianie Ostka Smolicka ekspresji ulega gen *TaCKX2* zlokalizowany na chromosomie 3A i 3B, natomiast w odmianie Brawura ekspresji ulega tylko gen *TaCKX2* położony na chromosomie 3A.

Dyskusja

Analiza wykonana w bieżącym roku potwierdza istnienie zależności między wysokością plonu a poziomem ekspresji genów kodujących dehydrogenazę cytokininową. Stosunkowo niska wartość korelacji *TaCKX1* z plonem może mieć związek z doбором materiału do testów. Song i in. (2012) postulowali również, iż obniżenie ekspresji genów *TaCKX1*, *TaCKX2* lub *TaCKX6* w czasie rozwoju ziarniaków może skutkować wzrostem liczby i masy ziaren. Podobnie badania przeprowadzone u ryżu wskazują na istnienie takiej zależności (Ashikari i in., 2005). Plonowanie zależy również od szeregu innych genów i ich efekt fenotypowy może skutecznie maskować oddziaływania genów kodujących CKX na

plonowanie. Zasadne wydaje się, dalsze poszukiwanie linii o bardzo zbliżonym tle genetycznym a różniących się poziomem plonowania.

Podsumowanie i wnioski

Ekspresja genu *TaCKX1* jest kilkukrotnie wyższa w kłosach 7 DAP niż w korzeniach 5-dniowych siewek.

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.

Bardzo duże różnice w poziomie ekspresji genów *TaCKX2* i *TaCKX1* w rozwijających się ziarniakach mogą wpływać na istotność zmian związanych z produktywnością.

W badanym materiale występuje korelacja między ekspresją *TaCKX1* i plonem.

Literatura

- 1) Ashikari M, Sakakibara H, Lin S, Yamamoto T, Takashi T, Nishimura A, Angeles ER, Quian Q, Kitano H, Matsuoka M. 2005. Cytokinin oxidase regulates rice grain production. *Science* 309, 741-745.
- 2) Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72: 1-2.
- 3) Cuthbert JL, Somers DJ, Brule-Babel AL, Brown PD, Crow GH. 2008. Molecular mapping of quantitative trait loci for yield and yield components in spring wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theor. Appl. Genet.* 117: 595-608.
- 4) Frébort I, Šebela M, Galuszka P, Werner T, Schmölling T, Peč P. 2002. Cytokinin oxidase/cytokinin dehydrogenase assay: optimized procedures and applications. *Analytical Biochemistry*, 306, 1-7.
- 5) Song J, Jiang L, Jameson PE. 2012. Co-ordinate regulation of cytokinins gene family members during flag leaf and reproductive development in wheat. *BMC Plant Biol.* 12: 78.
- 6) Quarrie SA, Steed A, Calestani C, Semikhodskii A, Lebreton C, Chinoy C, Steele N, Pljevljakusić D, Waterman E, Weyen J, Schondelmaier J, Habash DZ, Farmer P, Saker L, Clarkson DT, Abugalieva A, Yessimbekova M, Turuspekov Y, Abugalieva S, Tuberosa R, Sanguineti MC, Hollington PA, Aragués R, Royo A, Dodig D. 2005. A high-density genetic map of hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.) from the cross Chinese Spring x SQ1 and its use to compare QTLs for grain yield across a range of environments. *Theor. Appl. Genet.* 110:865-80