

Lp. w zał. do Rozporządzenia MRiRW: 8.

Tytuł zadania: **Tolerancja na stresy abiotyczne - genotypowanie pszenicy w oparciu o strategię genów kandydujących.**

Kierownik zadania: *prof. dr hab. W. Orczyk*

#### Cel zadania

Celem zadania realizowanego w roku 2014 było zbadanie korelacji wybranych etapów mikrosporogenezy z fazami rozwojowymi rośliny w warunkach kontrolnych, ustalenie eksperymentalnych warunków suszy wpływających na mikrosporogenezę, wykonanie oceny żywotności pyłku i stopnia zawiązywania nasion w roślinach, które rosły w warunkach kontrolnych lub były poddane stresowi suszy. Kolejnym celem była identyfikacja genów kandydujących przy wykorzystaniu danych literaturowych i baz sekwencji nukleotydowych oraz zapoczątkowanie weryfikacji molekularnej genów. Założone cele zostały zrealizowane w całości.

#### Materiały i metody

Materiałem biologicznym było 36 odmian pszenic pochodzących z różnych regionów klimatycznych świata. Rośliny uprawiano w kontrolowanych warunkach w szklarni. Wilgotność gleby mierzono sondą wilgotności (SM150, Geomor Technik), uzupełniając wodą do 30% wg wilgotnościomierza, co odpowiada 60-70% PPW. Oznaczono pędy główne, które były używane do badania faz rozwojowych kłosa, żywotności pyłku i liczby zawiązanych ziarniaków. Do określenia fazy rozwojowej kłosa, w której zachodziły procesy mejozy (proces powstawania młodych mikrospor), użyto parametru AD (*Auricle Distance*), wyrażany jest on w cm i odpowiada odległości pomiędzy uszkami liścia flagowego a przedostatniego liścia.

Stres suszy ustalono na poziomie 10% wilgotności gleby mierzonej wilgotnościomierzem. U roślin poddanych stresowi AD wynosiło 5cm. Suszę utrzymywano przez 5 dni. Następnie rośliny podlewano do 20% wilgotności gleby wg odczytów wilgotnościomierza przez 2 tygodnie, a później przywrócono warunki normalne. Z pędu głównego roślin kontrolnych w fazach rozwojowych 5 liści, początku krzewienia, AD 5cm i AD 8cm izolowano rozwijający się kłos i określano jego fazę rozwojową. Z pylników robiono gniecione preparaty, barwione w 3% roztworze acetokarminu. W mikroskopie świetlnym obserwowano stadia rozwojowe mikrosporogenezy oraz w oceniano żywotność pyłku. Żywotność pyłku w roślinach kontrolnych oraz poddanych stresowi suszy określano na podstawie koloru zabarwienia cytoplazmy i obecności komórek plemnikowych.

Liczono nasiona wypełniające kłos oraz liczbę kłosków i kwiatków, które określały możliwą liczbę nasion w danym kłosie badanej odmiany u roślin kontrolnych i traktowanych stresem suszy. Na podstawie tych dwóch parametrów obliczano stopień wypełnienia kłosa i wyznaczano współczynnik WKs /WKk.

Wykorzystując wyniki literaturowe oraz bazy danych, wytypowano grupy procesów metabolicznych, uczestniczące w nich enzymy oraz kodujące je geny, które mogą odgrywać istotną rolę w makrosporogenezie oraz zaburzeniach mikrosporogenezy indukowanych stresem.

#### Wyniki i dyskusja

Obserwacje kolejnych faz rozwojowych rośliny i kłosa pozwoliły na skorelowanie kolejnych etapów tych dwóch procesów. Wykazano, że w roślinach pszenicy w stadium 5 liści kłos jest w stadium od rozwoju wzgórków kłoskowych do inicjacji zawiązków plew. W początkowych stadiach krzewienia kłos jest w stadium inicjacji wzgórków kwiatowych. W dalszym stadium krzewienia roślin, kłos jest w stadium od inicjacji pręcików do dalszych bardziej dojrzałych etapów rozwoju. Rośliny, w których wartość AD wynosi 5cm zawierają kłos z pylnikami kwiatów bazalnych w stadium mejozy oraz kłosa w stadium młodych mikrospor. Młode mikrospory są uwalnianie z tetrad w roślinach, gdy wartość AD wynosi od 5 do 8cm, zależnie od genotypu. Badano stadia mikrosporogenezy w kwiatkach I, II i III-rzędowych wypreparowanych z kłosa V roślin AD 5cm. W pylnikach kwiatów I rzędu obserwowano młode mikrospory, w pylnikach kwiatu II rzędu występowały tetrady mikrospor, natomiast w pylnikach kwiatu III rzędu obecna była jeszcze młoda tkanka sporogenna. Stadium uwalniania z tetrad młodych mikrospor było obserwowane w roślinach AD od 5 do 8cm w środkowej części kłosa. Na tej podstawie ustalono, że stres suszy będzie aplikowany w stadium AD 5cm.

Wyniki badania etapów rozwoju wegetatywnego rośliny oraz faz rozwoju kłosa umożliwiają skorelowanie tych procesów. Pozwala to wystarczająco dokładnie określić fazy rozwojowe kłosa

w tym mikrosporogenezy w oparciu o łatwą do określenia fazę rozwoju wegetatywnego. Do celów projektu najważniejsze było określenie wczesnych etapów mikrosporogenezy. Zgodnie z tymi wynikami, w badanych odmianach wczesne fazy mejozy i fazy mikrosporogenezy zachodzą w roślinach gdy AD wynosi 5-8 cm. Wyniki te dobrze odpowiadają wynikom literaturowym.

W trakcie realizacji zadania zebrano kolekcję 112 genotypów pszenicy pochodzących z różnych regionów klimatycznych. Do doświadczeń wybrano 36 genotypów, które reprezentują potencjalnie szeroki zakres reakcji badanej cechy tj. zaburzeń mikrosporogenezy i niepłodności pyłku na stres suszy. W roślinach testowanych genotypów obserwowano duże zróżnicowanie wypełnienia kłosa w roślinach, które były poddane stresowi suszy (WKs). Najniższe wartości WKs 8% miała odmiana Triple Dirk S, a najwyższe ponad 75% odmiany CSDH 143, CSDH 98, Upi-301. Współczynnik WKs/WKk pozwolił uwzględnić rzeczywiste i potencjalne wypełnienie kłosów, w warunkach kontrolnych i stresowych. Wartości tego parametru były zróżnicowane i wahały się od 0.37 (Mina), do ponad 0,9 (Bajka, CSDH 28, CSDH 53 Mironovska 808 i Kite, SQ1, Pinka, CSDH143, Ns-55-25, Rusalka).

Żywotność pyłku z roślin kontrolnych wynosiła 100% u wszystkich genotypów. Żywotność pyłku pobranego z roślin poddanych stresowi suszy była zróżnicowana i wahała się od 0% do 100%. Najniższe wartości (0%) obserwowano u odmian: Ching Chang 6, Linia #20277, Triple Dirk S i Linia #21134 wartości najwyższe u odmian: Peking 11, Sava, CS, SQ1, Albena, U-1, CSDH 143, CSDH 53, Vireo S i Linii #22583. Wyniki wskazują na znaczną zgodność współczynnika WKs/WKk z żywotnością pyłku w stresie suszy.

Na podstawie danych literaturowych oraz zdeponowanych w bazach sekwencji nukleotydowych wybrano 26 klonów (głównie cDNA), w tym jeden klon genomowy i jedną sekwencję przypuszczalnego pseudogenu. Wybrane transkrypty reprezentują geny kodujące białka enzymatyczne / regulatorowe procesów ważnych w czasie mikrosporogenezy i jednocześnie tych, których zaburzenie stresem powoduje niepłodność pyłku. Profil ekspresji wytypowanych genów będzie analizowany w trakcie dalszych etapów realizacji zadania. Pierwszy etap projektowania i weryfikacji starterów do tej analizy wskazał, że część z nich spełniała kryteria przydatności do qPCR.

#### Wnioski

1. Stadium rozwoju rośliny AD 5-8cm, odpowiadające fazie rozwojowej kłosów w stadium mejozy jest odpowiednim etapem rozwoju do aplikowania stresu suszy i badania wpływu tego stresu na przebieg mikrosporogenezy.
2. Obserwowano duże zróżnicowanie zawiązywania nasion i wypełnienia kłosa w roślinach wybranych genotypów pszenicy w warunkach normalnych oraz po stresie suszy.
3. Niezaburzona mikrosporogenez w warunkach normalnych warunkowała wysoką żywotność pyłku we wszystkich badanych genotypach pszenic.
4. Duże zróżnicowanie żywotności pyłku w roślinach tych samych genotypów poddanych stresowi suszy wskazywało na: i) negatywny efekt stresu na przebieg mikrosporogenezy oraz ii) duże zróżnicowanie reakcji na ten stres zależne od genotypu.
5. Korelacja współczynnika wypełnienia kłosa (WKs/WKk) oraz żywotności pyłku pozytywnie weryfikuje jedno z głównych założeń projektu.
6. Wytypowano 26 genów pszenicy, ważnych w procesie mikrosporogenezy i jednocześnie potencjalnie ulegających zróżnicowanej ekspresji w czasie stresu suszy.
7. Pierwsza część badań molekularnych potwierdziła, że pięć wybranych genów metabolizmu węglowodanów oraz syntezy i katabolizmu ABA ulega ekspresji w komórkach rozwijającego się kłosa.