

## SPRAWOZDANIE Z REALIZACJI BADAŃ NA RZECZ POSTĘPU BIOLOGICZNEGO W PRODUKCJI ROŚLINNEJ W ROKU 2018

### **Zadanie 26: Identyfikacja czynników determinujących odporność jęczmienia ozimego (*Hordeum vulgare* L.) na suszę i mróz**

*Dotacja Ministerstwa Rolnictwa i Rozwoju Wsi, decyzja nr HOR.hn.802.15.2018*

#### **Temat badawczy 1: Analiza endogennej zawartości brasinosteroidów (BR) – zmiany indukowane pod wpływem hartowania i suszy glebowej:**

Celem przeprowadzonych badań było określenie roli jaką odgrywają BR w procesach nabywania tolerancji na mróz oraz suszę glebową. BR stanowią grupę substancji aktywnych biologicznie, regulujących procesy wzrostu i rozwoju roślin. Grupa ta liczy ponad 70 związków wykazujących duże zróżnicowanie w budowie strukturalnej i związanej z nią aktywności fizjologicznej, a poziom akumulacji tych związków zależy od gatunku, stadium rozwojowego i wieku rośliny. Zarówno zawartość jak i profil BR mogą być również modyfikowane przez warunki wzrostu roślin, w tym stres środowiskowy.

W eksperymencie wykorzystano dziesięć linii DH jęczmienia ozimego, o zróżnicowanym poziomie odporności na mróz i suszę glebową, wyselekcjonowanych na podstawie wyników uzyskanych w drugim roku realizacji projektu (2015).

Próbki (liście o łącznej masie 0,3 g, 3 próby z 6 roślin każda) pobrano z: (1) siewek w fazie 3-4 liści, po 3 tyg. hartowania w 4/2°C (dzień/noc) oraz (2) z roślin w fazie kłoszenia po 3 tyg. wzrostu w warunkach suszy glebowej (35% polowej pojemności wodnej (ppw)). Kontrolę stanowiły liście pobierane z siewek nie hartowanych, rosnących w temp. 25/17°C (dzień/noc) oraz z roślin rosnących w warunkach optymalnego nawadniania (75% ppw). Próbki zamrożono w ciekłym azocie i przechowywano w -80°C do momentu analiz.

Analizy BR przeprowadzono wg. zmodyfikowanej procedury Tarkowskiej i wsp. (2016). Materiał roślinny poddano ekstrakcji w ciekłym azocie przy użyciu 80% metanolu, przepuszczono przez kolumny SPE typu Discovery, a następnie kolumny IA z przeciwciałami przeciw BR (Laboratory of Growth Regulation, Olomouc, Republika Czeska). BR oznaczono metodą ultra wysokosprawnej chromatografii cieczerwowej z tandemową spektrometrią mas (UHPLC-MS/MS).

Bez względu na warunki wzrostu, w siewkach wszystkich badanych linii DH jęczmienia ozimego wykazano jedynie obecność homokastasteronu (BR<sub>12</sub>). Zawartość BR<sub>12</sub> była istotnie zróżnicowana i wynosiła od 12,6 do 61,7 pmol g<sup>-1</sup> św. m. Istotnie wyższy poziom BR<sub>12</sub> wykazano w siewkach linii DH wrażliwych na niskie temperatury. Natomiast, tylko u linii DH o wyższym poziomie tolerancji na mróz obserwowano istotny wzrost zawartości tego BR pod wpływem hartowania.

W roślinach jęczmienia ozimego znajdujących się w fazie kłoszenia, oprócz BR<sub>12</sub> wykryto obecność kastasteronu (BR<sub>2</sub>), teasteronu (BR<sub>8</sub>) i po raz pierwszy u roślin zbożowych - dolicholidu (BR<sub>3</sub>), jednakże poziom akumulacji tych BR był znacząco niższy. Wykazano również, iż średni poziom BR<sub>12</sub> w roślinach, w generatywnej fazie rozwoju był prawie 5-cio krotnie wyższy w stosunku do roślin znajdujących się w fazie siewki.

Poziom wszystkich zidentyfikowanych BR był warunkowany czynnikami o charakterze genotypowo-specyficznym. W większości przypadków deficyt wody wywarł istotny wpływ na poziom akumulacji BR, a reakcja roślin była zróżnicowana u linii DH o różnym poziomie tolerancji na suszę. W warunkach ograniczonej dostępności wody w podłożu, u większości wrażliwych na suszę linii DH obserwowano istotny wzrost zawartości BR<sub>12</sub>, BR<sub>8</sub> i BR<sub>3</sub>. Poziom tych BR pozostawał nie zmieniony w przypadku genotypów o wyższym poziomie tolerancji. I odwrotnie, linie DH o wyższej tolerancji na suszę reagowały wyraźnym wzrostem zawartości BR<sub>2</sub>, czego nie obserwowano u linii DH o większej wrażliwości na ten czynnik stresowy.

Tarkowska D., Novak O., Oklestkova J., Strnad M., 2016. The determination of 22 natural brassinosteroids in a minute sample of plant tissue by UHPLC-ESI-MS/MS. *Anal. Bioanal. Chem.* 408: 6799-6812.

### ***Temat badawczy 2: Analizy molekularne genów potencjalnie zaangażowanych w determinację odporności na mróz i suszę***

Celem badań była identyfikacja mechanizmów molekularnych zaangażowanych w determinację poziomu tolerancji na mróz i suszę u jęczmienia ozimego poprzez analizę zróżnicowania poziomu ekspresji wybranych genów. Selekcję wybranych do badań genów przeprowadzono na podstawie wyników analiz proteomicznych wykonanych w poprzednich latach realizacji projektu (2016/2017), opublikowanych w pracach Gołębiowska i wsp. (2017a, b). W eksperymencie dotyczącym wpływu hartowania na ekspresję wybranych genów do analiz wybrano geny kodujące: elongation factor 1 alpha (EF1a), reduktazę Ferrodoksyna – NADP, białko 14-3-3a,  $\beta$ -fructofuranozydazę oraz białka CBF4B i CBF2A. W eksperymencie dotyczącym wpływu suszy na ekspresję wybranych genów analizowano geny kodujące: aktynę, transketolazę, peryplazmatyczną proteazę serynową, izomerazę triozofosforanową, gen *groES* kodujący białko z regionem ko-chaperonu oraz gen *pfam14200* kodujący białko ricin-type beta-trefoil lectin domain-like.

Materiał roślinny stanowiło sześciu linii DH jęczmienia ozimego skrajnie zróżnicowanych pod względem poziomu tolerancji na mróz i suszę glebową. Fragmenty liści o masie 0,03-0,05 g pobierano z drugiego liścia, w przypadku badania wpływu hartowania, oraz z liścia flagowego, w przypadku badania wpływu suszy. Materiał pobierano z roślin rosnących w warunkach kontrolnych (z siewek przed hartowaniem oraz z kłoszących się roślin rosnących w warunkach optymalnego nawodnienia (75% ppw)) oraz po zadziałaniu badanego czynnika stresowego: hartowania (3 tyg. w 4/2°C (dzień/noc)) i suszy (3 tyg., 35% ppw). Fragmenty liści pobierane były w trzech powtórzeniach biologicznych w warunkach sterylnych, zamrażane w ciekłym azocie i przechowywane w -65°C do czasu izolacji RNA. Całkowite RNA izolowano przy użyciu *RNeasy Plant Mini Kit* (Qiagen, Hilden, Niemcy), według wskazań producenta zestawu. Reakcję odwrotnej transkrypcji przeprowadzano przy pomocy zestawu odczynników *QuantiTect Reverse Transcription Kit* (Qiagen). Otrzymane cDNA zamrażano w -65°C do czasu wykorzystania w reakcjach *RT qPCR*. Spośród białek wykazujących zróżnicowany poziom w warunkach optymalnego nawodnienia i w suszy (Gołębiowska-Pikania i in. 2017b), oraz przed i po hartowaniu (Gołębiowska-Pikania i in. 2017ba) wytypowano te o największych różnicach w stosunku do warunków kontrolnych.

Sekwencje aminokwasowe wybranych białek analizowano przy pomocy aplikacji tblastn ([https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=tblastn&PAGE\\_TYPE=BlastSearch&LINK\\_LOC=blasthome](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=tblastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome)). Wyszukiwanie zawężano do sekwencji pochodzących z rodzaju *Hordeum*. Dla każdego z dwóch eksperymentów (wpływ suszy i hartowania) wybrano po 6 genów, dla których w oparciu o sekwencje danego genu u *Hordeum vulgare* lub sekwencje konsensusowe, zaprojektowano startery. Do projektowania użyto programu Primer3Plus (<https://primer3plus.com/cgi-bin/dev/primer3plus.cgi>).

Analizę ekspresji genów przeprowadzono techniką ilościowego RT qPCR z wykorzystaniem aparatu Real-Time PCR 7500 System firmy Applied Biosystems (Foster City, CA, USA). W przypadku doświadczenia badającego wpływ hartowania, wewnętrzne standardy stanowiły sekwencje kodujące genów ADP i sAMD (Fiust 2017), natomiast w doświadczeniu badającym wpływ suszy były to sekwencje kodujące genów ADP i GADPH (Rapacz i in. 2012). Reakcje przeprowadzono w 3 powtórzeniach biologicznych dla genotypu i 3 powtórzeniach instrumentalnych.

Oznaczenia poziomu ekspresji badanych genów miały charakter względny. Analizy przeprowadzone zostały w oparciu o zmodyfikowaną metodę krzywych standardowych zaproponowaną przez Pfaffl'a (2001).

Analizę statystyczną wyników przeprowadzono w programie Statistica 13PL (Dell, Round Rock, TX). Statystyczną istotność różnic pomiędzy liniami określono po przekształceniu logarytmicznym wartości względnej normalizowanej ekspresji genów dla wszystkich powtórzeń biologicznych/instrumentalnych. Zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji oraz test Tukeya dla niejednakowej liczby powtórzeń.

Badania wykazały zróżnicowany poziom ekspresji badanych genów pomiędzy liniami DH jęczmienia zarówno w przypadku hartowania na mróz, jak i działania suszy. Jednakże obserwowane zmiany poziomu ekspresji jedynie częściowo wiązały się ze stopniem tolerancji na badane stesy.

W przypadku hartowania na mróz wyraźnie kontrastowały ze sobą reakcje wrażliwej na mróz linii DH575 oraz mrozoodpornej (a równocześnie nieodpornej na suszę) linii DH602. W przypadku wszystkich genów poziom ich ekspresji był statystycznie istotny, a w przypadku trzech odwrotny był kierunek obserwowanych zmian – u linii DH602 obserwowano hamowanie, a u linii DH575 wzrost poziomu ich ekspresji w porównaniu z kontrolą. Reakcja pozostałych linii (DH158 i DH534) była jednakowa, pośrednia pomiędzy DH602 i DH575. Być może obserwowane wcześniej różnice w ich mrozoodporności wynikać mogą z innych czynników, niezależnych od zmian obserwowanych w zastosowanym układzie doświadczalnym. W przypadku linii DH534, która jest zarówno mrozoodporna jak i odporna na suszę mogłoby to na przykład wynikać z istotnej w obydwu stresach możliwości zabezpieczania tkanek przed dehydratacją, która indukowana jest nie podczas hartowania na mróz w temperaturach dodatnich lecz dopiero pod wpływem mrozu.

W przypadku suszy poziom ekspresji wszystkich badanych genów obniżył się. Co więcej, u linii DH lepiej tolerujących deficyt wody poziom ekspresji większości analizowanych genów (z wyjątkiem *groES*) uległ silniejszemu obniżeniu niż u linii DH wrażliwych na suszę. Geny te nie są bezpośrednio związane z tolerancją suszy, kodują natomiast białka uczestniczące w podstawowym metabolizmie komórkowym (proteaza serynowa, izomeraza

triozofosforanów) oraz potencjalnie związane z transdukcją sygnału suszy (gen *pfam14200* kodujący lektynę).

Fiust A. (2017). Praca doktorska, UR w Krakowie.

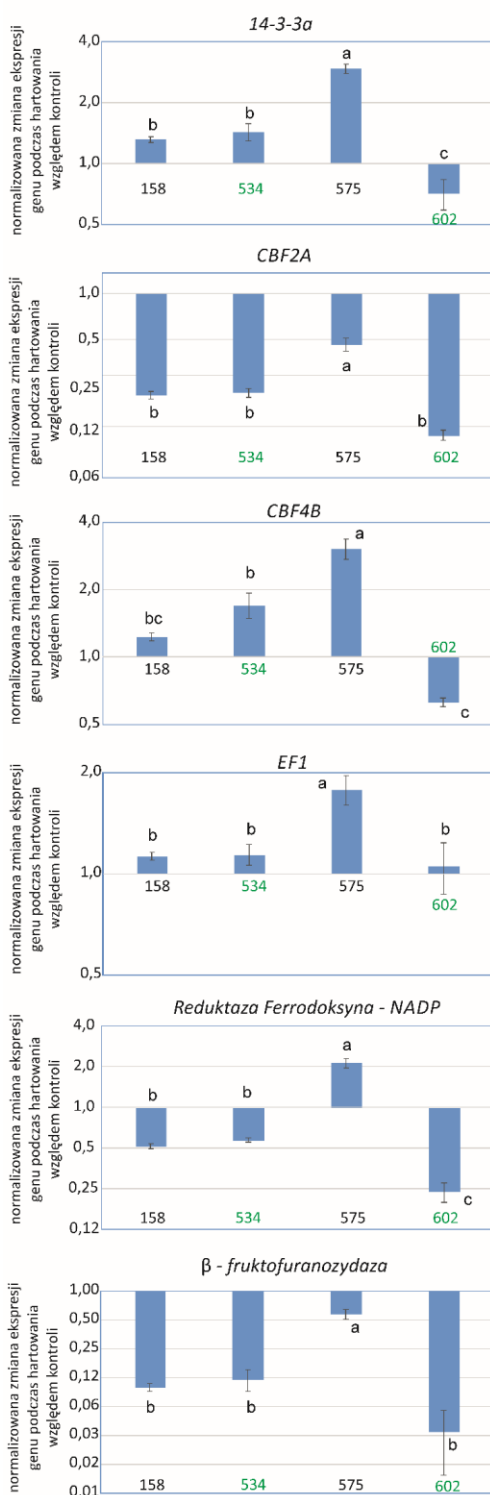
Gołębiowska-Pikania G., Kopeć P., Surówka E., Krzewska M., Dubas E., Nowicka A., Rapacz M., Wójcik-Jagła M., Malaga S., Żur I. 2017a. Changes in protein abundance and activity involved in freezing tolerance acquisition in winter barley (*Hordeum vulgare* L.). *J Proteomics* 169: 58-72.

Gołębiowska-Pikania G., Kopeć P., Surówka E., Janowiak F., Krzewska M., Dubas E., Nowicka A., Kasprzyk J., Ostrowska A., Malaga S., Hura T., Żur I. 2017b. Changes in protein abundance and activity induced by drought during generative development of winter barley (*Hordeum vulgare* L.) *J Proteomics* 169: 73-86.

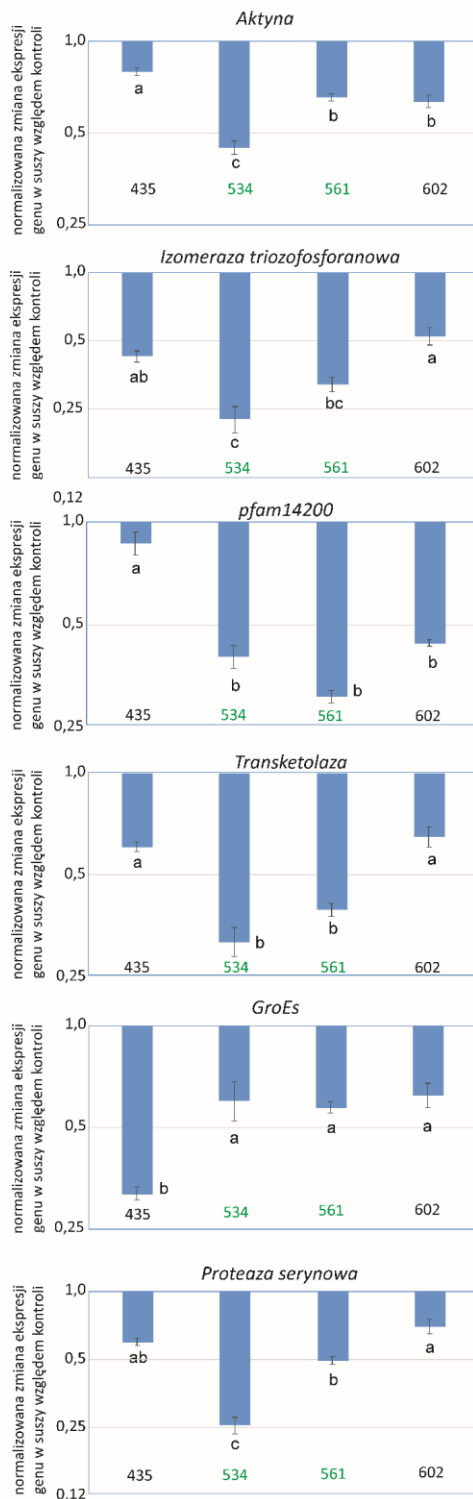
Pfaffl M.W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29(9), e45.

Rapacz M., Stępień A., Skorupa K. 2012. Internal standards for quantitative RT-PCR studies of gene expression under drought treatment in barley (*Hordeum vulgare* L.): the effects of developmental stage and leaf age. *Acta Physiol. Plant.* 34:1723–1733.

## Hartowanie na mróz



## Susza



Ryc. 1. Zlogarytmowane wartości względne wobec kontroli (rośliny niehartowane/rośliny nie poddane działaniu suszy) znormalizowanej względem genów referencyjnych akumulacji transkryptu badanych genów u wybranych linii DH jęczmienia ozimego. Kolorem zielonym zaznaczono linie o większej mrozoodporności/tolerancji suszy. Wartości średnie  $\pm$  błędy standardowe. Litery oznaczają grupy jednorodnie wyznaczone testem Tukeya dla  $p \leq 0,05$ .