

## Syntetyczny opis wyników uzyskanych w pierwszym roku realizacji projektu

‘Badania nad wpływem brasinosteroidów na tolerancję roślin jęczmienia na stres niedoboru wody’

wykonywanego w ramach programu ‘Postęp biologiczny w produkcji roślinnej’ MRiRW

Brasinosteroidy (BR) są jednym z głównych klas hormonów wpływających na wzrost i rozwój roślin, w tym na pokrój zbóż, jednocześnie molekularne podstawy metabolizmu BR są słabo poznane w przypadku roślin uprawnych, w tym jęczmienia (*Hordeum vulgare*).

Celem badań jest określenie roli BR w fizjologicznej reakcji roślin jęczmienia na stres niedoboru wody. Badania dotyczą m. in. identyfikacji genów jęczmienia związanych z syntezą BR, które poddano analizie funkcjonalnej. Jej celem była identyfikacja mutantów cechujących się zaburzeniami w syntezie BR. Zidentyfikowane formy poddane zostały serii analiz fizjologicznych i biochemicznych, których celem było określenie wpływu zidentyfikowanych mutacji na reakcję roślin na stres niedoboru wody. Materiał badań stanowią linie bliskoizogeniczne (*Near-Isogenic Lines*, NILs) wyprowadzone poprzez wielokrotne krzyżowania wsteczne mutantów półkarłowych z odmianą Bowman. Rezultatem takiej procedury jest wyprowadzenie linii zawierających ograniczony rejon introgresji (pochodzący z mutantu) w tle genetycznym odmiany Bowman.

W pierwszym roku realizacji projektu dokonano identyfikacji i charakterystyki funkcjonalnej dwóch genów jęczmienia – *HvDIMINUTO1* (*HvDIM1*) oraz *HvConstitutive Photomorphogenic Dwarf* (*HvCPD*), kodujących enzymy zaangażowane we wczesne etapy syntezy BR. Potwierdzenie funkcji tych genów nastąpiło z użyciem wytypowanych na podstawie analiz molekularnych i bioinformatycznych linii bliskoizogenicznych, cechujących się zaburzeniami w syntezie BR. W realizacji projektu przeprowadzono szereg analiz z zastosowaniem technik biologii molekularnej, eksperymentów fizjologicznych oraz analiz z zastosowaniem zaawansowanych narzędzi bioinformatycznych, służących m. in. lokalizacji badanych genów w genomie jęczmienia (GenomeZipper) oraz wizualizacji wpływu zidentyfikowanych mutacji na strukturę kodowanych polipeptydów (UCSF Chimera). Zidentyfikowano pełne sekwencje genomowe obu genów oraz zidentyfikowano i scharakteryzowano biochemicznie i fizjologicznie linie NIL, niosące mutacje w analizowanych genach, co potwierdziło funkcje tych genów. Potwierdzeniem funkcji enzymów *HvCPD* oraz *HvDIM1*, kodowanych przez zidentyfikowane geny, była również analiza endogennego stężenia kastasteronu, jako końcowego produktu syntezy BR u scharakteryzowanych linii NIL z mutacjami w analizowanych genach oraz odmiany ‘Bowman’, jako genotypu referencyjnego. U linii NIL niosących mutacje w genach *HvCPD* oraz *HvDIM1* odnotowano znaczące obniżenie endogennego stężenia kastasteronu, co potwierdza funkcje zidentyfikowanych genów i jednocześnie identyfikuje genetyczne podłoże fenotypu badanych linii NIL. Wyniki badań otrzymane w trakcie realizacji tego tematu badawczego są częścią artykułu opublikowanego w grudniowym wydaniu *Plant Physiology*:

Docker\* C, Gruszka\* D, Braumann I, Druka A, Druka I, Franckowiak J, Gough S P, Janeczko A, Kurowska M, Lundqvist J, Lundqvist U, Marzec M, Matyszczyk I, Müller A H, Oklestkova J, Schulz B, Zakhrabekova S, and Hansson M (2014) Induced variations in brassinosteroid genes define barley height and sturdiness, and expand the green revolution genetic toolkit. *Plant Physiology*, 166(Dec): 1912–1927.

\*Autorzy mają status równego udziału w przygotowaniu publikacji.

Odrębnym celem prac przewidzianych w niniejszym projekcie było uzyskanie odpowiedzi na pytanie czy zaburzenia w produkcji/percepcji BR mają wpływ na efektywność fotosyntezy u roślin jęczmienia poddanych działaniu czynnika stresowego (suszy) oraz rosnących w warunkach optymalnego nawodnienia. Po przeprowadzeniu serii analiz fizjologicznych i biochemicznych na grupie linii bliskoizogenicznych, cechujących się zaburzeniami w syntezie oraz sygnalizacji BR, w warunkach niedoboru wody oraz optymalnego nawodnienia dokonano wielokierunkowej oceny przebiegu procesów fotosyntezy u analizowanych genotypów.

Do badań wyselekcjonowano trzy linie bliskoizogeniczne - BW084, BW091 i BW333, które cechują się zaburzeniami w procesie syntezy BR oraz dwie linie bliskoizogeniczne – BW312 oraz BW885, które charakteryzują się zaburzeniami w procesie szlaku transdukcji sygnału BR. Dodatkowo w analizach wykorzystana została odmiana referencyjna 'Bowman' (łącznie sześć genotypów).

W tych badaniach wyselekcjonowane linie bliskoizogeniczne poddawane były serii analiz fizjologicznych, głównie stresowi suszy glebowej w fazie siewki. Przyżyciowo przeprowadzono następujące analizy – sprawności fotosystemu II, intensywności fotosyntezy netto oraz zawartości barwników fotosyntetycznych. W następnym etapie oceniony został stopień uwodnienia liści. W ramach analiz biochemicznych określono efektywność procesów zachodzących podczas jasnej i ciemnej fazy fotosyntezy, aktywność enzymów związanych z fotosyntezą (Rubisco) oraz dokonano analizy profilu akumulacji węglowodanów.

Przeprowadzone analizy wykazały, że zaburzenia metabolizmu BR w badanych liniach bliskoizogenicznych nie wpływają na sprawność fotosystemu II w porównaniu do odmiany referencyjnej 'Bowman'. Generalną tendencją jest zwiększenie sprawności fotosystemu II podczas działania stresu niedoboru wody. Nie stwierdzono również istotnych różnic w zawartości barwników fotosyntetycznych wśród wszystkich analizowanych genotypów. Podczas prowadzonych obserwacji stwierdzono, że rośliny linii bliskoizogenicznych, cechujących się zaburzeniami w metabolizmie BR, wykazywały opóźniony moment wędnięcia i dłużej utrzymywały turgor w porównaniu z roślinami odmiany 'Bowman'. Opóźniony moment wędnięcia może być spowodowany półkarłowym fenotypem linii NIL i mniejszą wartością biomasy tych form, co wiąże się z mniejszym zapotrzebowaniem na wodę w warunkach jej niedoboru, w porównaniu z roślinami odmiany 'Bowman'. Należy również podkreślić, że w odróżnieniu od roślin odmiany 'Bowman', u roślin analizowanych linii bliskoizogenicznych nie odnotowano obniżenia aktywności Rubisco pod wpływem stresu suszy. Przeprowadzone analizy profilu akumulacji monocukrów (glukozy i fruktozy) wykazały, że ich akumulacja jest u analizowanych mutantów BR obniżona względem wartości odnotowanych dla odmiany referencyjnej – 'Bowman'. Tendencję tę obserwowano zarówno w warunkach optymalnego nawodnienia jak i w warunkach stresu niedoboru wody. Stres niedoboru wody spowodował zwiększoną (około dwukrotnie u każdego z analizowanych genotypów) względem warunków kontrolnych akumulację tych monocukrów. Uzyskane wyniki wskazują, że BR regulują aktywność enzymów uczestniczących w metabolizmie węglowodanów (np. syntetazy sacharozy), a zaburzenia w produkcji/sygnalizacji BR wpływają negatywnie na produkcję tych węglowodanów.