

Syntetyczny opis wyników uzyskanych w trzecim 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), auksyny, gibereliny, kwas abscysynowy oraz kwas salicylowy wspólnie regulują ekspresję puli genów zaangażowanych w różne procesy morfogenetyczne i fizjologiczne, jak również w reakcję roślin na warunki stresowe. Ponadto molekularne procesy transdukcji sygnału tych fitohormonów również wchodzi z sobą w interakcje. Takie skoordynowane działanie różnych hormonów roślinnych umożliwia lepsze dostosowanie tempa wzrostu i rozwoju roślin do warunków środowiska. Badania przeprowadzone w ramach realizowanego projektu pozwoliły na określenie profilu zmian w akumulacji BR u jęczmienia w odpowiedzi na stres niedoboru wody, jak również na analizę wpływu zaburzeń w biosyntezie i sygnalizacji BR na profil akumulacji innych hormonów w warunkach kontrolnych oraz stresu niedoboru wody. Uzyskane wyniki pozwoliły na lepsze zrozumienie skoordynowanej hormonalnej regulacji wzrostu i rozwoju roślin jęczmienia w warunkach optymalnych oraz stresu suszy.

Celem niniejszego zadania była analiza koncentracji BR oraz innych hormonów wzrostowych (auksyny i gibereliny) oraz hormonów stresowych (kwas abscysynowy i kwas salicylowy) w tkankach mutantów brasinosteroidowych oraz odmiany referencyjnej ‘Bowman’ w warunkach kontrolnych oraz niedoboru wody w fazie siewki.

Materiał badań stanowiły linie bliskoizogeniczne (*Near-Isogenic Lines*, NILs) wyprowadzone poprzez wielokrotne krzyżowania wsteczne mutantów półkarłowych z odmianą Bowman. Rezultatem takiej procedury było wyprowadzenie linii zawierających ograniczony rejon introgresji (pochodzący z mutantu) w tle genetycznym odmiany Bowman. Jednolite tło genetyczne tych linii jest wielką zaletą tej kolekcji, ponieważ ułatwia prowadzenie porównawczych analiz fenotypowych i biochemicznych. 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 wykorzystano odmianę referencyjną ‘Bowman’. Badania prowadzone z wykorzystaniem wymienionych powyżej genotypów wykonywano niezależnie w dwóch warunkach wzrostu roślin: niedoboru wody oraz optymalnego nawodnienia. Po przeprowadzeniu ekstrakcji wykonano serie analiz akumulacji endogennych fitohormonów z wykorzystaniem wysokosprawnej chromatografii cieczonej, określając profil akumulacji tych fitohormonów w warunkach kontrolnych oraz stresu niedoboru wody, a także wykazano rolę endogennych BR w regulacji homeostazy innych fitohormonów.

Analiza akumulacji endogennych brasinosteroidów wykazała, że w odpowiedzi na stres niedoboru wody stężenie kastasteronu (jako najbardziej aktywnej biologicznie formy BR u jednoliściennych) uległo znaczącemu zwiększeniu u wszystkich analizowanych genotypów, jednak efekt ten był najbardziej znaczący w przypadku dwóch linii niewrażliwych na działanie BR: BW312 i BW885. Ten wynik wskazuje, że kastasteron pełni rolę w regulacji odpowiedzi

roślin jęczmienia na stres niedoboru wody. Funkcjonowanie tego indukowanego stresem suszy mechanizmu adaptacji fizjologicznej jest utrzymane zarówno u mutantów wykazujących zaburzenie w biosyntezie, jak i sygnalizacji BR, u których również obserwowano zwiększenie akumulacji kastasteronu w odpowiedzi na stres suszy. W niniejszych badaniach nie wykazano akumulacji 24-epikastasteronu. Nie wykazano również akumulacji brasinolidu, co wskazuje, że u jęczmienia głównym, aktywnym biologicznie przedstawicielem tej klasy hormonów jest kastasteron. Jednak niniejsze analizy wykazały akumulację relatywnie niewysokich stężeń innej formy BR, 24-epibrasinolidu. W warunkach kontrolnych ten związek ulegał akumulacji specyficznemu u jednego z analizowanych genotypów – linii BW885. Stres niedoboru wody spowodował akumulację 24-epibrasinolidu u wszystkich analizowanych genotypów. Wynik ten sugeruje, że 24-epibrasinolid jest kolejnym obok kastasteronu przedstawicielem brasinosteroidów, którego akumulacja jest indukowana stresem niedoboru wody, przy czym poziom akumulacji 24-epibrasinolidu w warunkach stresu suszy jest porównywalny u wszystkich analizowanych genotypów. W niniejszym zadaniu określono również profil akumulacji przedstawiciela 29-węglowych BR - homokastasteronu. Związek ten ulega akumulacji w znacznych stężeniach u wszystkich analizowanych genotypów zarówno w warunkach kontrolnych, jak i w stresie suszy. Zaobserwowano ciekawą zależność po porównaniu profili akumulacji homokastasteronu pomiędzy analizowanymi genotypami. W warunkach kontrolnych akumulacja homokastasteronu jest odwrotnie skorelowana z akumulacją kastasteronu, a ten wniosek wydaje się prawdziwy dla wszystkich analizowanych genotypów: mutanty cechujące się zaburzeniem w biosyntezie kastasteronu akumulują najwyższe koncentracje homokastasteronu, jednocześnie niewrażliwa na BR linia BW312, u której wykryto najwyższe stężenie kastasteronu, wykazuje najniższą akumulację homokastasteronu. Co ciekawe, stres suszy nie spowodował zwiększenia akumulacji homokastasteronu w analizowanych genotypach, zarówno u odmiany 'Bowman' oraz u analizowanych linii bliskoizogenicznych koncentracje homokastasteronu były porównywalne z wartościami kontrolnymi.

Analiza profilu akumulacji biologicznie aktywnej formy giberelin, GA₇, wykazała, że w warunkach kontrolnych linie bliskoizogeniczne zawierały znacząco obniżone koncentracje tego związku (ok. 14% - 46% wartości odnotowanej u odmiany 'Bowman'). Stres niedoboru wody spowodował znaczący wzrost w akumulacji endogennej GA₇ u wszystkich analizowanych genotypów, jednak u linii bliskoizogenicznych ten efekt był jeszcze bardziej znaczący (ok. 370% - 1050% wartości kontrolnych), niż u odmiany 'Bowman' (ok. 180% wzrost akumulacji względem wartości kontrolnej). W rezultacie w warunkach stresu suszy koncentracje endogennej GA₇ były porównywalne u wszystkich analizowanych genotypów. Te wyniki wskazują, że u jęczmienia giberelina GA₇ jest główną aktywną biologicznie formą giberelin, której akumulacja jest znacząco indukowana przez stres suszy. Ta stymulacja przez warunki stresowe jest szczególnie znacząca u linii bliskoizogenicznych, cechujących się zaburzeniami biosyntezy lub sygnalizacji BR, mimo że w warunkach kontrolnych te genotypy charakteryzują się znacząco niższą koncentracją GA₇ w porównaniu do odmiany referencyjnej 'Bowman'.

W warunkach kontrolnych akumulacja kwasu absycynowego (ABA) w liniach bliskoizogenicznych osiągała podobne wartości do odnotowanych u odmiany 'Bowman', różnice nie były istotne statystycznie, ponadto nie odnotowano żadnej tendencji. Zgodnie z oczekiwaniami stres niedoboru wody spowodował bardzo znaczący wzrost akumulacji ABA u

wszystkich analizowanych genotypów. Akumulacja ABA wzrosła co najmniej siedmiokrotnie, jednak między genotypami nie obserwowano żadnej tendencji, również po określeniu dla każdego z genotypów względnego wzrostu w akumulacji ABA względem wartości kontrolnej. Wyniki te wskazują, że zaburzenia w biosyntezie lub sygnalizacji BR nie wpływają na homeostazę ABA w warunkach kontrolnych, jak również nie zmniejszają zdolności mutantów BR do reakcji na stres niedoboru wody, objawiającej się znaczącym wzrostem akumulacji ABA.

W warunkach kontrolnych poziom akumulacji kwasu indolilo-3-octowego (IAA) był bardzo podobny u wszystkich analizowanych genotypów. Stres niedoboru wody spowodował wzrost koncentracji endogennego IAA u wszystkich badanych genotypów (ok. 120% - 160% wartości odnotowanych w warunkach kontrolnych), jednak różnice między genotypami nie były statystycznie istotne. Podobne wyniki uzyskano po analizie profilu akumulacji innego przedstawiciela auksyn – kwasu Chloro-indolilo-3-octowego (ClIAA). Te wyniki wskazują, że u jęczmienia stres suszy powoduje wzrost akumulacji obu reprezentantów auksyn, a zaburzenia biosyntezy i sygnalizacji BR nie wpływają na homeostazę auksyn w obu warunkach wzrostu roślin.

Analiza profili akumulacji kwasu salicylowego (SA) wykazała, że w warunkach kontrolnych większość z analizowanych linii bliskoizogenicznych zawiera podobne do odmiany 'Bowman' stężenia tego hormonu. Stres niedoboru wody spowodował bardzo znaczący wzrost stężenia SA u wszystkich badanych genotypów (ok. 190% - 500% wartości kontrolnych), jednak nie obserwowano żadnej tendencji pomiędzy genotypami. Wyniki te wskazują, że zmiany w homeostazie SA są fizjologiczną reakcją roślin jęczmienia na stres niedoboru wody. Zaburzenia w metabolizmie BR wydają się nie mieć wpływu na homeostazę SA w warunkach kontrolnych oraz nie zaburzają zdolności fizjologicznej mutantów BR do reakcji na stres suszy, objawiającej się zwiększeniem akumulacji SA. Dodatkowym potwierdzeniem wniosku, że endogenne BR nie wpływają na homeostazę SA było określenie profilu akumulacji kwasu benzooesowego, który jest prekursorem biosyntezy SA. W warunkach kontrolnych wszystkie analizowane genotypy charakteryzowały się bardzo podobnym stężeniem kwasu benzooesowego. Podczas stresu niedoboru wody stężenie endogennego kwasu benzooesowego było również bardzo podobne u wszystkich analizowanych genotypów. U badanych genotypów nie odnotowano znaczących zmian w stężeniu endogennego kwasu benzooesowego w warunkach niedoboru wody (względem warunków kontrolnych). Wyniki te pozwalają wnioskować, że stymulowany przez suszę znaczący wzrost w akumulacji endogennego SA odbywa się, przynajmniej u jęczmienia, na późniejszym etapie syntezy tego hormonu, niż poziom prekursora (kwasu benzooesowego).

W celu określenia profilu akumulacji cytokin w badanych genotypach w odpowiedzi na stres przeanalizowano koncentracje dwóch przedstawicieli tej klasy fitohormonów: *cis*-zeatyny (*cZ*) i *trans*-zeatyny (*tZ*). W warunkach kontrolnych akumulacja *cZ* wykazywała bardzo podobne wartości u wszystkich badanych genotypów. W warunkach niedoboru wody stężenia *cZ* były również bardzo podobne u wszystkich badanych genotypów. Stres suszy nie wpłynął stymulująco na akumulację *cZ* u żadnego z badanych genotypów. W przypadku *tZ* poziom akumulacji był podobny u wszystkich badanych genotypów w warunkach kontrolnych, jednak w odróżnieniu od *cZ*, poziom akumulacji *tZ* był znacznie podniesiony u wszystkich badanych genotypów w odpowiedzi na stres niedoboru wody (130% - 180% wartości kontrolnych). W

warunkach stresu suszy nie odnotowano znaczących różnic w stężeniach *tZ* między badanymi genotypami. Wyniki te wskazują, że zaburzenia procesów biosyntezy i sygnalizacji BR u analizowanych linii bliskoizogenicznych nie mają wpływu na poziom akumulacji *cZ* i *tZ*, a także nie zmniejszają zdolności badanych linii do reakcji na stres niedoboru wody, objawiającej się zwiększeniem endogennej akumulacji *tZ*.

Wyniki uzyskane w ramach realizowanego projektu w roku 2016 zostały opublikowane w czasopiśmie *Frontiers in Plant Science*:

Gruszka D., Janeczko A., Dziurka M., Pocięcha E., Oklestkova J., Szarejko I. 2016. Barley brassinosteroid mutants provide an insight into phytohormonal homeostasis in plant reaction to drought stress. *Frontiers in Plant Science*, 7: 1824. doi:10.3389/fpls.2016.01824