

Syntetyczny opis wyników uzyskanych w piątym 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

W poprzednich latach realizacji projektu określono reakcję fizjologiczną półkarłowych mutantów brasinosteroidowych (BR) jęczmienia na stres niedoboru wody w fazie siewki, jako etapie rozwoju wpływającym na kondycję roślin. Określono również rolę endogennych BR w regulacji różnych procesów fizjologicznych w trakcie suszy wczesnej oraz wpływ BR na homeostazę innych fitohormonów (Janeczko i in., 2016, *Plant Physiol Biochem*; Gruszka i in., 2016, *Front Plant Sci*). Wykazano również, że endogenne BR oraz prawidłowy przebieg procesów biosyntezy i sygnalizacji tych hormonów pełnią istotną rolę w regulacji homeostazy kluczowych nieenzymatycznych antyoksydantów zarówno w warunkach optymalnego nawodnienia, jak i podczas suszy (Gruszka i in., 2018, *Physiol Plant*). W poprzednim roku realizacji projektu dokonano oceny wysokości plonowania półkarłowych mutantów brasinosteroidowych oraz odmiany referencyjnej ‘Bowman’ poddanych działaniu suszy glebowej w fazie kłoszenia oraz podczas wegetacji w warunkach polowych.

W celu pełnego scharakteryzowania plonu tych mutantów BR oraz odmiany referencyjnej w roku 2018 wykonana została analiza jakościowa (składu chemicznego) plonu ziaren uzyskanych w warunkach niedoboru wody w fazie siewki oraz w fazie kłoszenia. Analiza składu chemicznego została również przeprowadzona dla plonu ziaren badanych genotypów uzyskanych w warunkach polowych. Tym samym, uzyskane wyniki stanowią cenne uzupełnienie danych odnoszących się do plonowania oraz pozwalają na jego całościowy opis. Konieczność badań prowadzonych w tej tematyce wynikała również z braku danych literaturowych na temat ewentualnego wpływu metabolizmu BR i jego zaburzeń na skład jakościowy (chemiczny) nasion gatunków modelowych i uprawnych, jak również plon zbóż. **Uzyskane w niniejszym zadaniu wyniki mają istotne znaczenie, biorąc pod uwagę możliwość potencjalnego wykorzystania półkarłowych mutantów BR jęczmienia w przyszłych programach hodowlanych, która jak wykazano w niniejszym projekcie, wynika z ich podwyższonej tolerancji na niedobór wody.**

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 mutanta) w tle genetycznym odmiany ‘Bowman’. Jednolite tło genetyczne tych linii jest wielką zaletą tej kolekcji, gdyż umożliwia prowadzenie fenotypowych analiz porównawczych. Do badań wyselekcjonowano trzy linie bliskoizogeniczne - BW084, BW091 i BW333, które cechują się zaburzeniami w procesie biosyntezy 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).

Badania prowadzone z wykorzystaniem wymienionych powyżej genotypów wykonywane były niezależnie dla plonu ziaren uzyskanych w różnych warunkach wzrostu roślin: optymalnego nawodnienia, niedoboru wody w fazie siewki oraz niedoboru wody w fazie kłoszenia. Dodatkowo analizy zostały wykonane dla plonów roślin poszczególnych genotypów uzyskanych w warunkach polowych. W badaniach przeanalizowanych zostało po 100 ziaren dla każdego z genotypów, w trzech powtórzeniach biologicznych dla każdego z warunków wzrostu roślin (optymalne nawodnienie/niedobór wody).

Ocena składu chemicznego ziaren została wykonana poprzez zastosowanie spektroskopii w bliskiej podczerwieni przy użyciu analizatora InfraXact™ firmy Foss (Dania). Analiza chemiczna składu ziaren została przeprowadzona w 3 powtórzeniach technicznych na próbkę. Każda próbka była

skanowana 6 razy i porównana z dwoma wewnętrznymi wzorcami (punktami odniesienia) przed uśrednieniem. Pomiar został wykonany w zakresie długości fal 570-1850 nm. Metodyka, która została zastosowana w przedstawianych badaniach pozwoliła na oznaczenie następujących parametrów:

- popiół (ogółem),
- błonnik,
- białko (ogółem),
- skrobia,
- tłuszcz (ogółem).

W pierwszym z przeprowadzonych eksperymentów analizowano wpływ warunków niedoboru wody w fazie siewki (rośliny 28-dniowe) na zawartość składników mineralnych (popiół ogółem) w plonie mutantów brasinosteroidowych oraz odmiany 'Bowman'. W warunkach kontrolnych zbliżone wartości tego parametru odnotowano u odmiany 'Bowman' oraz linii BW333, natomiast u pozostałych mutantów były one znacząco wyższe ($P \leq 0.05$), osiągając od 125 do 150% wartości odnotowanej u odmiany 'Bowman'. Stres niedoboru wody w fazie siewki nie spowodował znaczących zmian w zawartości składników mineralnych w plonie odmiany 'Bowman' oraz linii BW333, jednak wywołał znaczny wzrost w wartości tego parametru u pozostałych genotypów, u których zawartość składników mineralnych osiągnęła od 150 – 200% wartości odnotowanej u odmiany 'Bowman'.

W kolejnym eksperymencie określono wpływ niedoboru wody w fazie kłoszenia na zawartość składników mineralnych (popiół ogółem) w plonie badanych genotypów. W warunkach kontrolnych wartości odnotowane u poszczególnych genotypów odpowiadały wartościom uzyskanym w warunkach kontrolnych eksperymentu opisanego powyżej. Stres niedoboru wody w fazie kłoszenia spowodował wzrost rzędu ok. 10-30% w wartościach tego parametru u wszystkich badanych genotypów, jednak u odmiany 'Bowman' i linii BW333 pozostał znacznie niższy niż u reszty mutantów.

Analizowano również wpływ warunków niedoboru wody w fazie siewki na zawartość błonnika w plonie mutantów brasinosteroidowych oraz odmiany 'Bowman'. W warunkach kontrolnych najwyższe zawartości błonnika odnotowano u niewrażliwych na BR linii BW312 oraz BW885, u których wartości tego parametru wynosiły odpowiednio ok. 115% i 110% wartości odnotowanej u odmiany 'Bowman'. U odmiany 'Bowman' oraz pozostałych genotypów odnotowano bardzo zbliżone wartości tego parametru. Stres niedoboru wody w fazie siewki nie spowodował znaczących zmian w zawartości błonnika u badanych genotypów, a najwyższą zawartość błonnika odnotowano w ziarnie linii BW312 i była ona znacząco wyższa ($P \leq 0.05$) od wartości odnotowanych u pozostałych genotypów.

W kolejnym eksperymencie określono wpływ niedoboru wody w fazie kłoszenia na zawartość błonnika w ziarnie badanych genotypów. W warunkach kontrolnych wartości odnotowane u poszczególnych genotypów odpowiadały wartościom uzyskanym w warunkach kontrolnych eksperymentu opisanego powyżej. Po wystąpieniu stresu niedoboru wody zawartość błonnika w ziarnach nie uległa znaczącym zmianom i u wszystkich genotypów była zbliżona.

W realizowanych badaniach analizowano również wpływ warunków niedoboru wody w fazie siewki na zawartość białka (ogółem) w ziarnach mutantów brasinosteroidowych oraz odmiany 'Bowman' w porównaniu do wartości tego parametru w plonie tych genotypów uzyskanym w warunkach kontrolnych. W warunkach kontrolnych najniższą zawartość białka odnotowano w ziarnach odmiany 'Bowman'. U mutantów zawartości białka były znacząco ($P \leq 0.05$) wyższe i wynosiły od ok 120% (u linii BW333) do ok. 135% (u linii BW091) wartości tego parametru odnotowanej u odmiany 'Bowman'. Stres niedoboru wody w fazie siewki nie spowodował znaczących zmian w zawartości białka w ziarnach odmiany 'Bowman'. U analizowanych mutantów stres ten wywołał u niektórych genotypów niewielkie zmiany w wartości tego parametru, jednak nie wykazano wyraźnej tendencji tych zmian. Po wystąpieniu stresu niedoboru wody w fazie siewki najniższą zawartość białka w ziarnach

odnotowano u odmiany 'Bowman' oraz linii BW333. Wartości odnotowane u pozostałych mutantów wynosiły od ok. 116% (BW312) do ok. 150% (BW084) wartości odnotowanej u odmiany 'Bowman'.

W kolejnym eksperymencie określono wpływ niedoboru wody w fazie kłoszenia na zawartość białka (ogółem) w ziarnach mutantów brasinosteroidowych oraz odmiany 'Bowman'. W warunkach kontrolnych wartości odnotowane u poszczególnych genotypów odpowiadały wartościom uzyskanym w warunkach kontrolnych eksperymentu opisanego powyżej. Stres niedoboru wody w fazie kłoszenia wywołał wzrost zawartości białka u wszystkich badanych genotypów.

W realizowanych badaniach analizowano również wpływ warunków niedoboru wody w fazie siewki na zawartość skrobi w ziarnach badanych genotypów. W warunkach kontrolnych wartość tego parametru u wszystkich genotypów przyjmowała bardzo zbliżone wartości. Po zastosowaniu stresu niedoboru wody w fazie siewki zawartość skrobi była zbliżona w ziarnach odmiany 'Bowman' oraz mutantów biosyntezy BR (linie BW084, BW091 oraz BW333), jednak znacznie ($P \leq 0.05$) niższa u linii BW312 oraz BW885 cechujących się zaburzeniami w procesie sygnalizacji BR. U linii BW312 oraz BW885 zawartość skrobi była o ok. 10-15% niższa w porównaniu do pozostałych genotypów.

Określono również wpływ niedoboru wody w fazie kłoszenia na zawartość skrobi w ziarnach mutantów brasinosteroidowych oraz odmiany 'Bowman'. W warunkach kontrolnych wartości odnotowane u poszczególnych genotypów odpowiadały wartościom uzyskanym w warunkach kontrolnych eksperymentu opisanego powyżej. Stres niedoboru wody w fazie kłoszenia nie wywołał zmian w zawartości skrobi u żadnego z badanych genotypów. W odróżnieniu od stresu niedoboru wody w fazie siewki, w przypadku zastosowania stresu niedoboru wody w fazie kłoszenia nie odnotowano różnic w zawartości skrobi pomiędzy mutantami sygnalizacji BR a resztą badanych genotypów.

Analizowano również wpływ warunków niedoboru wody w fazie siewki na zawartość tłuszczu (ogółem) w ziarnach badanych genotypów. W warunkach kontrolnych wartości tego parametru były zróżnicowane u badanych genotypów. Najwyższe wartości odnotowano u dwóch linii cechujących się zaburzeniem biosyntezy BR (BW084 i BW333), zaś najniższe u dwóch linii cechujących się zaburzeniami sygnalizacji BR (BW312 i BW885). Zawartość tłuszczu (ogółem) odnotowana u odmiany 'Bowman' miała wartość pośrednią między wyżej wymienionymi. Zastosowanie stresu niedoboru wody w fazie siewki spowodowało zmiany w zawartości tłuszczu w ziarnach (szczególnie widoczne u mutantów BR). Najwyższą wartość parametru odnotowano u odmiany 'Bowman', u mutantów biosyntezy BR (BW084, BW091 i BW333) zawartość tłuszczu w ziarnach była zróżnicowana, natomiast najniższą zawartość tłuszczu odnotowano w przypadku ziaren mutantów cechujących się zaburzeniami sygnalizacji BR.

W kolejnym eksperymencie określono wpływ niedoboru wody w fazie kłoszenia na zawartość tłuszczu (ogółem) w ziarnach mutantów brasinosteroidowych oraz odmiany 'Bowman'. W warunkach kontrolnych wartości odnotowane u poszczególnych genotypów odpowiadały wartościom uzyskanym w warunkach kontrolnych eksperymentu opisanego powyżej. Stres niedoboru wody w fazie kłoszenia wywołał obniżenie zawartości tłuszczu w ziarnach większości badanych genotypów (z wyjątkiem linii BW091). Po zastosowaniu stresu niedoboru wody w fazie kłoszenia najwyższe wartości badanego parametru odnotowano u linii BW091 i BW333, u których były one znacząco wyższe ($P \leq 0.05$) niż u pozostałych genotypów.

W kolejnych eksperymentach dokonano analizy składu chemicznego plonu mutantów brasinosteroidowych oraz odmiany 'Bowman' uzyskanego w doświadczeniu polowym. Pierwszym z parametrów analizowanych w trakcie eksperymentu polowego była zawartość składników mineralnych (popiołu ogółem) w ziarnie badanych genotypów. Analiza wykazała, że zawartość składników mineralnych w ziarnach badanych mutantów BR była co najmniej tak wysoka, jak w przypadku ziaren odmiany 'Bowman'. Najwyższą zawartość popiołu odnotowano u linii BW084 (120% wartości odnotowanej u odmiany 'Bowman'). U pozostałych genotypów (w tym odmiany 'Bowman') odnotowane wartości były zbliżone, a różnice nieistotne statystycznie. Drugim z parametrów

analizowanych w eksperymencie polowym była zawartość błonnika w ziarnach badanych genotypów. U wszystkich badanych genotypów zawartość błonnika w ziarnach wykazywała zbliżoną wartość, a obserwowane różnice nie były statystycznie istotne. Kolejnym z analizowanych parametrów była zawartość białka (ogółem) w ziarnach badanych genotypów w warunkach polowych. W przypadku tego parametru najniższą jego wartość odnotowano u odmiany 'Bowman'. W przypadku większości mutantów BR zawartość białka w ziarnie była nieznacznie wyższa niż u odmiany. W przypadku ziaren linii BW084 odnotowano istotnie ($P \leq 0.05$) wyższą zawartość białka niż w przypadku odmiany 'Bowman' (120% wartości odnotowanej u tej odmiany). Analizowano również zawartość skrobi w ziarnach badanych genotypów w warunkach polowych. U wszystkich badanych genotypów zawartość skrobi przyjmowała bardzo zbliżone wartości. Ostatnim z analizowanych parametrów była zawartość tłuszczu (ogółem) w ziarnach badanych genotypów w warunkach polowych. Najwyższą średnią wartość tego parametru (choć ze znaczącym odchyleniem standardowym) odnotowano w przypadku odmiany 'Bowman'. U analizowanych mutantów zawartość tłuszczu (ogółem) w ziarnach była niższa, a w przypadku linii BW084, BW312 oraz BW885 znacznie ($P \leq 0.05$) niższa niż wartość odnotowana u odmiany 'Bowman'.

Dodatkowo, w roku 2018 opublikowano artykuł przeglądowy dotyczący roli BR w regulacji procesów rozwoju roślin i reakcji na stresy środowiskowe:

Gruszka D. 2018. Crosstalk of the brassinosteroid signalosome with phytohormonal and stress signaling components maintains a balance between the processes of growth and stress tolerance. *Int J Mol Sci*, 19: 2675. doi:10.3390/ijms19092675.

Artykuł ten przedstawia wyniki uzyskane w ramach tego projektu w szerszej perspektywie.