

Linie j czmienia uzyskane metod krzy owania wstecznego oraz linie rekombinacyjne uzyskane technik pojedynczego ziarna posłu do realizacji celu projektu, którym jest poznanie ekspresji genu nsLTP2 (non-specific lipid transfer proteins 2; synonim B11E) w zróżnicowanych warunkach środowiska, tj. stresu deficytu wody, zasolenia oraz wysokiej temperatury w celu oceny roli detekcji białka i jako czynnika w ocenie zawartości lipidów. Zintegrowane badania pozwolą zweryfikować hipotezę o wzmożonej ekspresji genu LTP2 w warunkach stresów abiotycznych, determinując jej zmienność w obrębie lipidomu i fenomu. Badania dotyczące oznaczania poziomu białka, będącego produktem ekspresji genu LTP2 i wykazującego silne działanie alergogenne, pozwolą uzyskać odpowiedź, czy następuje wzrost syntezy tych alergenów w warunkach stresów abiotycznych. Materiałem roboczym w projekcie są linie BC j czmienia wytypowane na podstawie polimorfizmu markera SNP 954-1377 zmapowanego w chromosomie 4H w MLOC_53422, który adnotowany jest przez Ensembl Plants jako gen LTP2, oraz linie rekombinacyjne linie własne (F8) populacji MCam uzyskane ze skrzyżowania odmiany Maresi oraz syryjskiej linii hodowlanej Cam/B1/CI08887/CI05761 (CamB1) zaadaptowanej do warunków niedoboru wody. Zastosowana analiza stabilności linii j czmienia w czasie w zbadaniu z danymi dotyczącymi fenomu i genomu umożliwiła wyselekcjonowanie linii MCam 1 charakteryzujących korzystne cechy/allele obu form rodzicielskich, to jest wczesno odmian syryjskich z półkarłowatością wnoszoną przez odmianę Maresi z równoczesnym stabilnym plonem ziarna w warunkach niedoboru wody (analiza interakcji G x E, Sergen; $P < 0,01$). Zastosowany materiał pozwoli ocenić poziom ekspresji genu LTP2 oraz białko, które koduje, zmieniając się w zależności od zastosowanych warunków stresowych w obrębie populacji BC oraz MCam. Populacje te posiadają wspólną formę rodzicielską (Maresi), lecz z drugiej strony to forma ojcowska CamB1 determinuje adaptację do warunków niedoboru wody. Materiał został tak dobrany, aby ocenić, czy i jak zmienia się ekspresja genu LTP2, synteza jego produktu oraz zawartość lipidów w liniach MCam o zwiększonym przystosowaniu do warunków stresowych w porównaniu do linii BC.

Obserwacje fenotypowe przeprowadzone zostaną w doświadczeniach założonych zarówno w warunkach szklarniowych jak i w fitotronie w trzech powtórzeniach. W ramach projektu przeprowadzona będzie seria komplementarnych i skoordynowanych doświadczeń, w których wybrane formy j czmienia będą poddawane stresom abiotycznym w stadium krzewienia przez okres 14 dni, natomiast cechy fenotypowe obserwowane i mierzone będą w czasie formowania plonu oraz w stadium dojrzałości pełnej. Fenotypowanie obejmować będzie 20 cech związanych między innymi z morfologią kłosa, architekturą rosliny, masą ziarna, a także terminami osiągnięcia w późniejszych fazach rozwojowych. Wraz z fenotypowaniem będzie badany skład jako-ciowo-ilo-ciowy lipidów ze szczególnym uwzględnieniem steroli z wykorzystaniem LC-MS. Będzie także obserwowany poziom transkrypcji genu LTP2 z wykorzystaniem reakcji PCR w czasie rzeczywistym. Detekcja białka LTP2 nastąpi z wykorzystaniem metody Western Blot. Wszystkie pomiary będą przeprowadzone na próbkach biologicznych uzyskanych w warunkach kontrolnych oraz po zastosowaniu stresów abiotycznych (susza, wysoka temperatura, zasolenie). Wyniki doświadczeń będą analizowane pod względem zmienności w obrębie badanych linii j czmienia. W doświadczeniach obejmujących zastosowanie stresów abiotycznych polimorfizm ten będzie także interpretowany w odniesieniu do efektów interakcji genotypowo-środowiskowej. Powszechnie uznaje się, że pierwotnym miejscem odbioru sygnału o powstaniu deficytu wody w komórce są błony plazmatyczne. Łagodny deficyt wody przyczynia się do zmian w płynności lipidów, co stanowi sygnał inicjujący łańcuch zdarzeń prowadzących do ekspresji określonych genów odpowiedzialnych za uruchomienie mechanizmów dostosowawczych (Hoekstra i in. 2001). Jczmień stanowi ok. 10% wiatowej powierzchni uprawy zbóż (68-71 mln ha) i zajmuje czwartą pozycję na świecie pod względem wielkości produkcji, zaraz po kukurydzy, ryżu i pszenicy. Wśród zbóż jczmień należy do jednego z gatunków najlepiej rozpoznanych pod względem genetycznym. Ponadto zsekwencjonowanie genomu jczmień w ramach International Barley Genome Sequencing Consortium w 2012 roku może znacząco wpłynąć na rozwój genetyki jczmień, a w konsekwencji dostarczy nowych narzędzi w poznawaniu genomów roślin z płemienia Triticeae.

Na skutek drastycznego niedoboru wody w glebie (gwałtowna susza) dochodzi zwykle do wielu niekorzystnych zmian zarówno strukturalnych, jak i funkcjonalnych na poziomie komórkowym. Występują zmiany w selektywności błon plazmatycznych, dochodzi do hamowania aktywności enzymów, a w konsekwencji do utraty kompartmentacji komórek i zakłócenia przebiegu procesów metabolicznych. Wzrost przepuszczalności błon jest spowodowany degradacją białek oraz lipidów, która jest konsekwencją zwiększonego poziomu reaktywnych form tlenu i występowania stresu oksydacyjnego. W zależności od nasilenia stresu wzrasta również stopień peroksydacji lipidów.

Proteom dojrzałych nasion jczmień obfituje w białka odpowiedzi na stres, m.in. rodzin białek stresu roślinnego PRs (pathogenesis-related proteins). Ekspresja genów PRs regulowana jest w trakcie rozwoju rośliny. Uważa się, że białka PRs pełnią ochronną rolę w trakcie spoczynku i kiełkowania nasion, jak również zaangażowane są w odpowiedź rośliny na czynniki stresowe. Według doniesień literaturowych głównie są to stesy biotyczne, gdy wtedy następuje wzmożona ekspresja genów PRs. Białka PR wykazują zwiększoną odporność na proteolizę, wysoką temperaturę i utrzymują stabilność w środowisku o niskim pH, czyli w ekstremalnych warunkach, gdzie większość białek roślinnych ulega denaturacji. Te właściwości czynią białka PRs korzystnymi w aspekcie obrony rośliny na stres. Z drugiej jednak strony ich wysoka stabilność może przyczyniać się do indukowania alergenu. Sklasyfikowano 17 rodzin białek PR, a spośród nich 9 uznano za alergeny dla człowieka. Grupa 14 obejmuje białka transportujące lipidy (lipid transfer proteins - LTP), które występują zarówno w pyłku roślin jak i w ziarnach, owocach, warzywach czy orzechach. Białka wchodzące w skład tej rodziny stanowią jedne z najsilniejszych alergenów pokarmowych z grup PRs i powodują groźne anafilaksje. Białka transportujące lipidy podzielone są na dwie podgrupy: LTP1 o masie około 9 kDa i LTP2 o masie około 7 kDa. Kodujące je geny ulegają ekspresji przede wszystkim we wczesnych fazach rozwojowych oraz młodych tkankach dojrzałych roślin, a także w reakcji na stesy biotyczne. Mniej wiadomo o ich zaangażowaniu w odpowiedź na stesy abiotyczne, w przypadku jczmień niewiele jest na ten temat doniesień literaturowych. Stwierdzono dziesięciokrotnie niższe stężenie białka LTP2 w nasionach w porównaniu z LTP1. Jednakże to białko LTP2 charakteryzuje się wyższą temperaturą topnienia (ponad 100°C) oraz zwiększoną odpornością na stężenie detergentów niż LTP1. Może to sugerować jego silniejsze działanie alergogenne nawet przy niższym stężeniu. Ponadto LTP2 posiada zdolność do wiązania nie tylko liniowych łańcuchów lipidów (jak w przypadku LTP1), lecz również steroli (o dużym znaczeniu dla człowieka, m.in. zmniejszeniu stężenia cholesterolu całkowitego oraz frakcji LDL, nie powodując przy tym spadku frakcji HDL) dzięki czemu odznacza się wyższą aktywnością przenoszenia lipidów. Może mieć to istotne znaczenie w warunkach stresu abiotycznego. W najnowszej literaturze wiatowej informacji na temat LTP2 jest niewiele, a w przypadku jczmień prace badawcze są prowadzone w bardzo ograniczonym zakresie. W zaproponowanym projekcie zintegrowane analizy ekspresji genu oraz białka,

które koduje, jako ciowe i ilo ciowe pomiary zawarto ci lipidów, wraz z danymi obserwacji cech fenotypowych dostarcz nowej wiedzy dotycz cej LTP2. Zastosowanie linii BC o bardzo zbli onym tle genetycznym, wyselekcjonowanych ze wzgl du na gen LTP2, stanowi unikalny materiał badawczy oraz pozwoli oceni , czy obserwowane i w jakim stopniu zmiany zawarto ci lipidów pod wpływem ró nych stresów abiotycznych s efektem działania tego genu. Uzyskane wyniki b d zawierały istotne informacje dla funkcjonalnej adnotacji genomu j czmienia, który staje si modelem dla ro lin zbo owych ze wzgl du na opublikowan niedawno jego sekwencj . Podj te zintegrowane prace badawcze i zdobyta wiedza b d w przyszło ci słu y jako podstawa dla metod doskonalenia j czmienia i innych ro lin uprawnych.