

Streszczenie

Zmieniający się klimat, który prowadzi do tzw. stepowienia coraz większych obszarów Polski powoduje, że problem suszy jest coraz bardziej dotkliwy dla upraw. Niedobór wody jest głównym czynnikiem środowiskowym ograniczającym produktywność roślin na całym świecie, a jego wpływ manifestuje się zmianami niemalże w każdym procesie komórkowym. Odbiór i transdukcja sygnału suszy oraz mechanizmy regulujące odpowiedź na ten stres nadal nie są do końca poznane. Stąd podjęcie badań mających na celu poznanie różnych aspektów odpowiedzi roślin na stres suszy.

W pracy podjęto próbę zidentyfikowania elementów szlaku sygnałowego suszy u roślin jęczmienia oraz sekwencji DNA związanych z regulacją ekspresji wybranych genów związanych z odpowiedzią na ten stres.

W przeprowadzonych badaniach materiał badawczy stanowiły linie jęczmienia jarego otrzymane techniką SSD oraz ich dwie odmiany rodzicielskie o zróżnicowanej reakcji na deficyt wody. Badano wrażliwą niemiecką odmianę Maresi oraz charakteryzującą się tolerancją warunków suszy linię CAM/B1/CI wyprowadzoną z lokalnej odmiany syryjskiej. Analizy wykonano na roślinach poddanych działaniu suszy glebowej w 2 fazach rozwojowych: w fazie siewki i po ukazaniu się liścia flagowego. W części eksperymentów związanych z badaniem profilu ekspresji genów zastosowano suszę glebową, która trwała 10 dni. W doświadczeniach mikroskopowych zastosowano symulowany stres, susząc materiał roślinny przy zachowaniu odpowiednich parametrów. W analizach molekularnych określono profil ekspresji genu *HVA1* kodującego dehydrynę z rodziny LEA (syntetyzowane pod wpływem deficytu wody i innych czynników powodujących odwodnienie komórek) oraz genu *Srg6* kodującego hipotetyczny czynnik transkrypcyjny biorący udział w regulacji odpowiedzi na suszę u jęczmienia.

Obydwa badane geny wykazały wyższy poziom ekspresji podczas suszy działającej w fazie siewki, ponadto akumulacja transkryptu genu *HVA1* była wyższa u wrażliwej odmiany Maresi, natomiast poziom ekspresji genu *Srg6* w przypadku wprowadzenia stresu w fazie siewki był znacznie wyższy u odpornej odmiany CAM/B1/CI. Na podstawie map genetycznych zidentyfikowano eQTL-e związane z regulacją ekspresji badanych genów, co pokazało, że wiąże się ona z aktywnością cyklu ubiquitynacji. Anotacje funkcjonalne eQTL-i

opisujących zmianę ekspresji genów *HVA1* oraz *Srg6* pośrednio wskazują także na powiązanie ścieżki sygnałowej suszy z hormonami roślinnymi (kwas jasmonowy, auksyny).

Oprócz analiz RNA i sekwencji DNA związanych z ekspresją genów przeprowadzono analizy rearanżacji cytoszkieletu aktynowego w reakcji na suszy deficyt wody w liściach. Materiał roślinny stanowiły siewki poddane symulowanej suszy. Poprawność aplikowanego stresu potwierdzano każdorazowo mierząc względną zawartość wody (RWC) w tkankach liścia. Obrazy mikroskopowe uwidocznily zmiany w aranżacji włókien aktynowych w odpowiedzi na stres. U odmiany Maresi widoczne były grube, poskręcane włókna zlokalizowane w pobliżu plazmalemy. Także poziom transkryptu genu kodującego aktynę był wyższy u odmiany wrażliwej, a względna akumulacja białka aktyny w jej liściach zwiększyła się 40-krotnie pod wpływem działaniem suszy. Zaobserwowano także zmiany profilu ekspresji innych genów, których produkty związane są z budową cytoszkieletu. Ponadto zastosowanie inhibitora aktyny (latrunkuliny-B) pozwoliło potwierdzić bezpośredni związek aktywacji ekspresji genu *HVA1* z rearanżacją włókien aktynowych w odpowiedzi na suszę.

Abstract

The observed changes of climate, which leads to the expansion of steppe areas in Poland, causes the problem of drought with increasing severity for crops. Water scarcity is a major environmental factor that limits plant productivity around the world. Moreover, its influence is featured by changes in almost every cellular process. Reception and signal transduction of drought and the mechanisms regulating the stress response have not been fully understood yet. Hence, it was decided to undertake research aimed at understanding the various aspects of plant response to drought stress.

The thesis attempts to identify the components of the drought signaling pathway in barley plants and the DNA sequences associated with the regulation of the expression of selected genes involved in the response to this stress.

The experiments were performed on two spring barley accessions with various water-stress tolerance: Maresi – sensitive German cultivars and CAM/B1/CI – tolerant Syrian landrace-delivered line. These genotypes were used as parental forms for SSD lines. In the gene expression profiles study plants were subjected to 10-day soil-drought in seedling- and flag leaf stages. In microscopic observations, the drought stress was simulated by drying the plant material under controlled conditions. The expression profiles of *HVA1* gene which, encodes dehydrin from LEA family (synthesized under the water deficit and other factors that cause dehydration of cells) and the *Srg6* gene which, encodes the hypothetical transcription factor involved in the regulation of responses to drought in barley were analyzed. Both analyzed genes showed higher expression level during the drought applied in the seedling stage. Furthermore, accumulation of the *HVA1* gene transcript was higher in the sensitive cultivar Maresi, while the level of *Srg6* gene expression, with the drought stress applied in the phase of the seedlings, was significantly higher in tolerant CAM/B1/CI. Based on genetic maps, eQTLs associated with the regulation of gene expression, were identified. Further bioinformatic analysis showed, that the expression of both genes is related to ubiquitination cycle. eQTL-functional annotations, which describe the change in *HVA1* and *Srg6* genes expression level, also indicated indirectly a link between the drought signaling pathway and plant hormones (jasmonic acid, auxin).

In addition to the analysis of RNA and DNA sequences related to the gene expression, the analysis of actin cytoskeletal rearrangement in response to water deficit in leaves were completed. The experiment was performed on two barley cultivars treated by simulated

drought. The level of applied stress was controlled by measuring the Relative Water Content (RWC) in leaves. Microscopic images highlighted changes in the arrangement of actin filaments in response to drought stress. In Maresi cultivar thick, curly fibres located near to plasmalemma were visible. Also, the level of the transcript of a gene encoding an actin protein was higher in sensitive cultivar. The relative accumulation of actin protein in the leaf increased 40-times under the drought. Changes in the expression profile of other genes encoding products involved in the cytoskeleton structure formation were also observed. What is more, the application of an actin inhibitor (latrunculin-B) enabled confirmation of the direct connection between the activation of *HVA1* gene expression and the rearrangement of actin filaments in the response to drought.