

STRESZCZENIE

Rośliny nieprzerwanie narażone są na niekorzystne czynniki środowiskowe. W ostatnich latach zmieniające się warunki klimatyczne wpływają na występowanie nie tylko suszy, ale także nadmiernych opadów, które zalewając systemy korzeniowe upraw generują brak dostępu tlenu tzw. stres hipoksji. Rośliny muszą szybko aktywować mechanizmy obronne na poziomie morfologicznym, fizjologicznym i molekularnym, pozwalające im na przetrwanie i adaptację do warunków stresowych. Mechanizmy zachodzące na poziomie molekularnym najczęściej dotyczą zmian w poziomie ekspresji genów, która może być m.in. regulowana przez niekodujące cząsteczki RNA (ncRNA).

Celem badań była identyfikacja ncRNA u ogórka, w odpowiedzi na stres hipoksji wywołanego przez zalanie systemu korzeniowego wodą. Do ncRNA zaliczamy między innymi krótkie (miRNA) i długie (lncRNA) cząsteczki RNA. Dodatkowo, celem było sprawdzenie wpływu drugiego zalania roślin ogórka na zmiany ekspresji genów. W wyniku przeprowadzonych wstępnych analiz biometrycznych i fizjologicznych wyselekcjonowano dwa obiekty ogórka (linie podwojonych haploidów) o przeciwstawnej reakcji na stres hipoksji tj. DH2 (tolerancyjny) i DH4 (wrażliwy). Złożono transkryptomy dla obydwu obiektów ogórka oraz przeprowadzono analizę różnicowej ekspresji genów, która wykazała różnice pomiędzy badanymi obiektami poddanymi stresowi zalania. Większą pulą genów oraz lncRNA o różnicowej ekspresji względem roślin nietraktowanych stresem charakteryzowała się linia wrażliwa DH4 w porównaniu do linii tolerancyjnej DH2. Dokonano również sekwencjonowania miRNA. Zidentyfikowano nowe miRNA ulegające regulacji u ogórka pod wpływem stresu zalania. Najmniejszą liczbę miRNA o różnicowej ekspresji określono dla roślin linii DH4 zalanych jednokrotnie, a największą dla linii DH2 poddanej stresowi zalania dwukrotnie. Zidentyfikowano szlaki i procesy, w które zaangażowane są geny kodujące białka i lncRNA o różnicowej ekspresji względem roślin kontrolnych pod wpływem jednokrotnego i dwukrotnego zalania systemu korzeniowego wodą. Ponadto, określono geny docelowe potencjalnie regulowane przez miRNA w trakcie zalania. Wskazano także cząsteczki miRNA oraz lncRNA biorące udział w początkowej reakcji na stres hipoksji. Dodatkowo, zidentyfikowano 6 genów oraz 71 cząsteczek lncRNA, które potencjalnie mogą być odpowiedzialne w nabywaniu tolerancji na stres zalania u ogórka. Po raz pierwszy określono interakcje, jakie mogą zachodzić pomiędzy miRNA i lncRNA w trakcie odpowiedzi na stres hipoksji, wskazując sposoby regulacji cząsteczek ncRNA między sobą.

Z wykorzystaniem technologii RNA-Seq oraz miRNA-Seq zsekwencjonowano po raz pierwszy transkryptomy oraz krótkie RNA badanych obiektów ogórka traktowanych jednokrotnie i dwukrotnie stresem hipoksji. Dane te stanowią źródło do dalszych analiz molekularnych i bioinformatycznych. Uzyskane wyniki poszerzyły wiedzę w zakresie identyfikacji cząsteczek ncRNA zaangażowanych w odpowiedź rośliny (komórki) na stres. Potwierdzono, że stres zalania może być czynnikiem stymulującym w nabywaniu tolerancji na stres hipoksji u ogórka.

SUMMARY

Plants are continuously exposed to unfavourable environmental factors. In recent years, changing climatic conditions have affected not only in drought but also in excessive rainfalls, which by flooding the root systems of crops have generated a lack of oxygen, the so-called hypoxic stress. Plants must quickly activate the defence mechanisms at the morphological, physiological, and molecular levels, allowing them to survive and adapt to stress conditions. Mechanisms occurring at the molecular level most often involve changes in the level of gene expression, which can be, among other factors, regulated by non-coding RNA (ncRNA) molecules.

The aim of the study was to identify ncRNAs in cucumber in response to hypoxia stress induced by waterlogging of the root system with water. The ncRNAs include, among others, short (miRNA) and long (lncRNA) RNA molecules. Additionally, the purpose was to investigate the effect of a second flooding of cucumber plants on genes expression changes. As a result of preliminary biometric and physiological analyses, two cucumber accessions (doubled haploid lines) with opposite responses to hypoxia stress i.e. DH2 (tolerant) and DH4 (sensitive) were selected. Transcriptomes for both cucumber accessions were assembled and differential genes expression analysis was performed, which revealed differences between the waterlogged accessions. A higher number of genes and lncRNAs with differential expression relative to the non-stress-treated plants were characterized in the sensitive line DH4 compared to the tolerant line DH2. Sequencing of miRNAs was also performed. Novel miRNAs up-regulated in cucumber under waterlogging stress were identified. The lowest number of differentially expressed miRNAs was determined for plants of DH4 line flooded once and the highest for DH2 line subjected to flooding stress twice. The pathways and processes involving protein-coding genes and lncRNAs with differential expression relative to control plants under single and double waterlogging of the root system were identified. Furthermore, target genes potentially regulated by miRNAs during waterlogging were identified. The miRNA and lncRNA molecules involved in the initial response to hypoxia stress were also identified. In addition, 6 genes and 71 lncRNA molecules were identified that could potentially be responsible in the acquiring of the tolerance to waterlogging stress in cucumber. For the first time, the interactions that may occur between miRNAs and lncRNAs during the hypoxia stress response were determined, indicating the ways in which ncRNA molecules regulate each other.

Using RNA-Seq and miRNA-Seq technologies, transcriptomes and short RNAs of cucumber accessions treated once and twice with hypoxia stress were sequenced for the first

time. These data provide a source for further molecular and bioinformatic analyses. The obtained results extended the knowledge in identifying ncRNA molecules involved in the plant (cell) stress response. It was confirmed that waterlogging stress may be a stimulatory factor in the acquiring of hypoxia stress tolerance in cucumber.