

Streszczenie

W wyniku postępujących zmian klimatycznych stres suszy coraz częściej redukuje plonowanie roślin uprawnych. W celu otrzymywania nowych odmian tolerancyjnych na suszę konieczne jest dokładne zrozumienie mechanizmów umożliwiających adaptację roślin do tego stresu. Kwas abscysynowy (ABA) jest głównym fitohormonem regulującym odpowiedź rośliny na stesy abiotyczne, w tym na suszę. Na poziomie fizjologicznym ABA powoduje zamykanie aparatów szparkowych i hamowanie fotosyntezy, natomiast na poziomie molekularnym wpływa na regulację ekspresji genów odpowiedzi na stres. U *Arabidopsis*, ABA INSENSITIVE 5 (ABI5) oraz białka ABRE BINDING FACTOR/ABRE-BINDING PROTEIN (ABF/AREB) pełnią funkcję ABA-zależnych czynników transkrypcyjnych z domeną zamka leucynowego (BASIC LEUCINE ZIPPER, bZIP), które regulują ekspresję genów związanych z procesami warunkującymi adaptację do niekorzystnych warunków środowiska.

Przedstawiona praca miała na celu opisanie roli *HvABI5*, jęczmiennego homologa *AtABI5* oraz *AtABF/AREB*, w odpowiedzi na suszę u jęczmienia (*Hordeum vulgare*), a także identyfikację genów potencjalnie docelowych dla *HvABI5*. Wykorzystanie populacji TILLING jęczmienia, wyprowadzonej w Katedrze Genetyki Uniwersytetu Śląskiego, pozwoliło na identyfikację mutantu *hvabi5.d* niosącego mutację punktową G1751A w obrębie genu *HvABI5*. Zidentyfikowana mutacja skutkowałą substytucją argininy na lizynę 274, która znajduje się w pobliżu domeny bZIP białka *HvABI5*. Mutant *hvabi5.d* odznaczał się niższą wrażliwością na ABA w stadium kiełkowania ziarniaków w porównaniu z odmianą wyjściową 'Sebastian' oraz wykazywał niższą wartość parametrów fotosyntetycznych, wskaźnika funkcjonowania PSII (PI_{ABS}) oraz maksymalnej wydajności fotochemicznej PSII (ϕP_0), a także wyższy poziom osmolitu proliny po traktowaniu ABA w stadium wczesnej siewki. Reakcja analizowanego mutantu na ABA pozwoliła przypuszczać, że *HvABI5* może regulować odpowiedź na stres suszy u jęczmienia. Po traktowaniu suszą *hvabi5.d* wykazywał wyższą o 13% wartość parametru względnej zawartości wody w liściu (Relative Water Content, RWC) względem odmiany 'Sebastian'. Zwiększona tolerancja na suszę *hvabi5.d* była związana z niższym stopniem uszkodzenia błon komórkowych, wyższą zawartością flawonoidów (flawonoli oraz antocyjanów) oraz szybszym zamykaniem aparatów szparkowych niż obserwowano to u odmiany rodzicielskiej. Co więcej, w porównaniu do odmiany wyjściowej mutant odznaczał się po suszy wyższą ekspresją znanych genów docelowych czynnika *HvABI5*: *HVA1* oraz *HVA22*, a także genu kodującego ABA-zależny czynnik transkrypcyjny *DEHYDRATION-RESPONSIVE FACTOR 1 (HvDRF1)*. Z drugiej strony zawartość chlorofilu oraz wartości

parametrów fotosyntetycznych PI_{ABS} oraz ϕP_0 były obniżone u *hvabi5.d* po suszy. W celu sprawdzenia, czy *HvABI5* funkcjonuje zależnie od ABA, przeanalizowano ekspresję genów związanych z metabolizmem oraz sygnalizacją ABA po suszy u obu analizowanych genotypów. Ekspresja kluczowych genów związanych ze ścieżką ABA była zróżnicowana pomiędzy mutantem i odmianą ‘Sebastian’ w obecności stresu. U *hvabi5.d* obserwowano po suszy 2-20-krotnie wyższą ekspresję genów *HvNCED1* i *HvBG8*, zaangażowanych w biosyntezę i metabolizm ABA oraz *HvSnRK2.1* i *HvPP2C4*, głównych komponentów sygnalizacji ABA. Ponadto *hvabi5.d* wykazywał ponad 2-krotnie wyższą endogenną zawartość ABA niż odmiana ‘Sebastian’ po suszy, a w promotorach *HvNCED1*, *HvSnRK2.1* oraz *HvPP2C4* zidentyfikowano potencjalne miejsca wiązania ABI5. Wyższą ekspresję *HvNCED1* i *HvSnRK2.1* oraz szybsze zamykanie aparatów szparkowych stwierdzono również u *hvabi5.d* po traktowaniu 200 μ M ABA, co potwierdza ABA-zależne działanie *HvABI5* w odpowiedzi na stres suszy u jęczmienia.

Globalna analiza transkryptomu przeprowadzona z wykorzystaniem mikromacierzy Agilent wykazała 2688 genów po 5-dniowym okresie obniżania wilgotności gleby oraz 1959 genów po 10-dniowej suszy, które ulegały specyficznemu zróżnicowaniu ekspresji u *hvabi5.d*. Wśród nich zidentyfikowano geny, które mogły odpowiadać za mechanizmy warunkujące tolerancję na stres mutanta. W celu wskazania genów potencjalnie docelowych dla *HvABI5* przeprowadzono analizę promotorów genów ulegających zróżnicowanej ekspresji u *hvabi5.d* po okresie obniżania wilgotności gleby oraz po suszy pod względem obecności *cis*-elementów ABA RESPONSIVE ELEMENT (ABRE) wiązanych przez ABI5. Występowanie elementów *cis* ABRE stwierdzono w promotorach 49 genów o zróżnicowanej ekspresji po okresie obniżania wilgotności gleb oraz w promotorach 48 genów wykazujących zróżnicowaną ekspresję po suszy. Przeprowadzono analizę wzorów ekspresji wybranych 22 genów, potencjalnie docelowych dla *HvABI5*, po działaniu suszy i po traktowaniu ABA. Odmienną aktywność transkrypcyjną u *hvabi5.d* i odmiany ‘Sebastian’ po obu traktowaniach wykazano dla 12 genów, co wskazuje na regulację tych genów przez *HvABI5* w odpowiedzi na suszę na drodze ABA-zależnej. Funkcja tych genów jest powiązana z adaptacją rośliny do warunków stresu, biosyntezą fitohormonów, regulacją ekspresji genów, fosforylacją białek, funkcjonowaniem lipidów oraz podstawowym działaniem komórek. Jedynie 5 z 22 badanych genów, których funkcja była powiązana z odpowiedzią na stres, regulacją sygnalizacji komórkowej w odpowiedzi na gibereliny, reakcją obronną na patogeny oraz regulacją translacji, odznaczało się zróżnicowaną ekspresją u mutantu jedynie po suszy, co wskazuje, że *HvABI5* może także działać jako komponent innych szlaków sygnalizacyjnych. Należy

podkreślić, że zidentyfikowane w niniejszej pracy geny potencjalnie docelowe dla *HvABI5* nie były dotąd opisane w literaturze, a funkcja tym genom została przypisana bioinformatycznie, na podstawie terminów GO oraz adnotacji funkcjonalnych dostępnych w bazach danych dla sekwencji odpowiadającym ich identyfikatorom HORVU.

Podsumowując, otrzymane wyniki świadczą, że *HvABI5* reguluje odpowiedź na suszę u jęczmienia na drodze zależnej od ABA. Rola *HvABI5* polega na regulacji ekspresji genów, które są powiązane z mechanizmami warunkującymi adaptację rośliny do suszy. Ponadto *HvABI5* może modulować biosyntezę oraz sygnalizację ABA na zasadzie sprzężenia zwrotnego w obecności suszy. Należy także podkreślić, że ABA-zależne mechanizmy działania *HvABI5* w trakcie kiełkowania nasion i odpowiedzi na suszę są odmienne.