

Streszczenie

Czynniki abiotyczne występujące w środowisku naturalnym prowadzą do zmian strukturalnych i funkcjonalnych na poziomie komórkowym roślin, inicjując uruchomienie mechanizmów adaptacyjnych. Współlistnienie różnych stresów abiotycznych ma często swoje odzwierciedlenie w większym spadku produktywności roślin w porównaniu do oddzielnego występowania tych stresów. Wśród zbóż jęczmień należy do jednego z gatunków najlepiej rozpoznanych pod względem genetycznym i ze względu na wysoki konserwatyzm genomu traw stanowi roślinę modelową w wielu badaniach, w tym również związanych z potencjałem plonowania w niekorzystnych warunkach środowiska. Celem pracy była kompleksowa analiza zmian u jęczmienia jarego wywołanymi różnymi stresami abiotycznymi uwzględniająca jakościowo-ilościowe oznaczenie metabolitów, lipidów i steroli w liściach, ocenę ekspresji genu *ns-LTP2* i detekcję białka ns-LTP2 w tkankach wegetatywnych oraz składowych ziarniaka jęczmienia wraz z fenotypowaniem roślin. Integracja pozyskanych danych miała na celu dostarczenie nowej wiedzy o molekularnej adaptacji roślin do warunków stresowych.

Obiektem badań w pracy były wybrane pod względem pochodzenia, fenotypu i polimorfizmu genu *ns-LTP2* linie jęczmienia jarego oraz ich formy rodzicielskie. Analizom podlegały uzyskane metodą krzyżowania wstecznego (BC₆) linie MPW (P: MPS106 × MPS37) i zdefiniowanym polimorfizmie genu *ns-LTP2* oraz rekombinacyjne linie wsobne (RIL, F₁₀) uzyskane techniką pojedynczego ziarna – MCam (P: Maresi × CamB1). Linie MCam łączyły korzystne cechy form rodzicielskich – CamB1 (wczesność) i Maresi (półkarłowatość).

Przeprowadzono serię doświadczeń, w których wybrane formy jęczmienia w stadium krzewienia poddawano stresom abiotycznym przez okres 14 dni. Fenotypowanie miało miejsce w czasie formowania plonu oraz w stadium dojrzałości pełnej, obejmując 15 cech związanych z architekturą roślin, morfologią kłosa, masą ziarna, a także terminem kłoszenia. Doświadczenia prowadzono w kontrolowanych warunkach szklarniowych oraz w fitotronie. Suszę (D) prowadzono w doniczkach o wilgotności podłoża 20% FWC w porównaniu do wilgotności optymalnej wynoszącej 70% FWC. Zasolenie (S) uzyskano poprzez aplikację do doniczek roztworu NaCl celem uzyskania końcowego stężenia soli 250 mM·dm⁻³. Z kolei stres wysokiej temperatury (T) wiązał się z utrzymaniem temperatury w warunkach kontrolnych 22°C/18°C (dzień/noc), zaś w warunkach stresowych 30°C/10°C (dzień/noc). Oprócz wpływu stresów działających pojedynczo oceniono również wpływ ich symultanicznego oddziaływania (DS, DT, ST, DST).

Zbadano wpływ stresów abiotycznych na metabolom i lipidom badanych genotypów korzystając z technik GC/MS, GC/FID i Fast-GC/MS. Dodatkowo przeanalizowano wpływ warunków stresowych na zmianę poziomu ekspresji genu *ns-LTP2* w tkankach wegetatywnych oraz w składowych ziarniaków jęczmienia (qRT-PCR) oraz dokonano detekcji poziomu akumulacji białka *ns-LTP2* (Western blot) i poznano wpływ stresów abiotycznych na poziom tego białka w osiach zarodkowych (test ELISA).

Zidentyfikowano 384 metabolity w liściach jęczmienia. Analiza wariancji pozwoliła wykryć 122 metabolity, których udział ulegał zmianie ($p < 0,05$) pod wpływem genotypu (76), warunków stresu abiotycznego (41) oraz czasu jego trwania (21), jak i interakcji między genotypem i punktem czasowym (7), genotypem i stresem abiotycznym (29) oraz punktem czasowym i stresem abiotycznym (30). Zidentyfikowano odmienne ścieżki reakcji na stres przez szybszą akumulację aminokwasów w CamB1, węglowodanów w liniach MPS, a w Maresi stwierdzono efektywny metabolizm azotu. Wykazano, że CamB1 cechuje szybszy wzrost akumulacji osmoprotektantów i antyoksydantów w porównaniu do genotypów europejskich.

Wysoka temperatura oraz jej kombinacje (głównie DT) wpłynęły znacząco na zmianę udziału większości klas lipidów i steroli poza $\Delta 5$ -awenasterolem, którego poziom wzrósł jedynie w warunkach stresu pojedynczego (D czy T), co może sugerować nieznaną i specyficzną jego funkcję w przystosowaniu jęczmienia do niekorzystnych warunków. Linia CamB1 pochodząca z suchego i ciepłego klimatu charakteryzowała się najwyższym poziomem kampesterolu, stigmasterolu oraz $\Delta 5$ -awenasterolu w porównaniu do pozostałych genotypów. Z kolei linie MPS, różniące się formą alleliczną genu *ns-LTP2*, wyróżniały się spośród badanych genotypów poziomem akumulacji metabolitów, w tym lipidów, co mogło stanowić ważny mechanizm przetrwania w zmiennych warunkach środowiska.

Gen *ns-LTP2* nie ulegał ekspresji w dojrzałych tkankach wegetatywnych jęczmienia niezależnie od warunków stresowych, zaś jego konstytutywna ekspresja zachodziła w aleuronie i osi zarodkowej jęczmienia. Poziom ekspresji *ns-LTP2* różnił się między genotypami, a stres abiotyczny (głównie DS) wpływał na jej wzrost. W osi zarodkowej jęczmienia poziom całkowitego białka rozpuszczalnego wzrastał najbardziej pod wpływem stresu działającego pojedynczo (S), natomiast białka *ns-LTP2*, niezależnie od genotypu, w stresach działających symultanicznie (ST i DST).

Dokonano dokładnego opisu fenotypowego analizowanego materiału roślinnego rosnącego w warunkach stresowych. Linie MPS kłosiły się w zbliżonym terminie i cechowały się dobrze wykształconym kłosem głównym, podobnie jak linie MPW. MPS37 (*ns-LTP2.a*),

inaczej niż MPS106 (*ns-LTP2.b*), cechowała się najmniejszą ogólną liczbą źdźbeł i wysoką masą tysiąca ziaren (podobnie jak Maresi). Linie MCam charakteryzowały się bardzo dobrymi parametrami cech plonotwórczych (podobnie jak jeden z genotypów rodzicielskich - Maresi), oraz szybciej się kłosiły w porównaniu do innych badanych linii, (cecha charakterystyczna drugiego genotypu rodzicielskiego - CamB1).

Stwierdzono związek między poziomem akumulacji metabolitów pod wpływem warunków stresowych a cechami fenotypowymi, uzyskując informację o reakcji roślin na poziomie metabolomu i fenomu w zróżnicowanych warunkach środowiska. W warunkach jednoczesnego działania wysokiej temperatury i suszy stwierdzono dominujący charakter deficytu wody, zaś współdziałanie suszy i zasolenia miało najprawdopodobniej charakter synergii. Z kolei współdziałanie zasolenia i wysokiej temperatury oraz wszystkich trzech stresów miało charakter unikatowy z efektem zdecydowanie odmiennym w porównaniu do stresów występujących indywidualnie.

Badania dotyczące odporności oraz własności roślin rosnących w zmiennych warunkach środowiska nabierają dużego znaczenia w kontekście postępujących zmian klimatu. Duża plastyczność metabolomu CamB1, związana z przetrwaniem niekorzystnych warunków i wydaniem nasion w krótkim czasie, czyni ją dobrym kandydatem w opracowaniu odmian przystosowanych do zmiennych warunków środowiska, jednakże niewystarczającym w kontekście wysokiego plonu. Zmiany indukowane warunkami stresów abiotycznych w liniach MPS i CamB1 były często zbliżone, dając podstawy do stwierdzenia, że wyselekcjonowane w rozprawie doktorskiej linie MPS, poddane wielokierunkowym badaniom nad zmianami powodowanymi warunkami stresowymi, przy jednocześnie lepszych parametrach cech plonotwórczych niż linia syryjska, mogą stanowić obiecujące zasoby genetyczne dla zwiększenia tolerancji jęczmienia na stres abiotyczny.