

Rozprawa doktorska pt.: „**Identyfikacja i analiza funkcji genów z rodziny GSK w jęczmieniu (*Hordeum vulgare* L.)**”

Title: Identification and functional analysis of genes from the GSK family in barley (*Hordeum vulgare* L.)

Jolanta GROSZYK

IHAR-PIB w Radzikowie, Zakład Inżynierii Genetycznej

o nadanie stopnia doktora nauk rolniczych w dziedzinie nauk rolniczych, dyscyplina agronomia

Promotor: prof. dr hab. Waclaw Orczyk

STRESZCZENIE

Kinaza syntazy glikogenu (GSK) jest enzymem katalizującym fosforylację białkowych czynników transkrypcyjnych i w konsekwencji regulujących wiele procesów rozwojowych roślin. Dotychczas wykazano, że enzym o aktywności GSK warunkuje fosforylację czynników transkrypcyjnych z rodziny BES uczestniczących w szlaku sygnałowym brasinosteroidów (BR), a ostatnie doniesienia wskazują na udział GSK w regulacji czynników transkrypcyjnych szlaku sygnałowego kwasu abscysynowego (ABA) i auksyn. Roślinne GSK kodowane są przez cztery grupy genów. Ortologi tych genów w *Hordeum vulgare* L. nie zostały dotychczas poznane. Celem niniejszej pracy była identyfikacja i analiza funkcji genów z rodziny GSK w jęczmieniu. Pracę rozpoczęto od analizy bioinformatycznej ukierunkowanej na identyfikację genów jęczmienia wykazujących duże podobieństwo sekwencji nukleotydowej i aminokwasowej do znanych GSK w *Arabidopsis thaliana* oraz gatunkach z rodziny *Poaceae*. Zidentyfikowane geny jęczmienia przyporządkowano do czterech wcześniej opisanych grup. Scharakteryzowano strukturę tych genów oraz skorygowano adnotację jednego z genów w bazie danych Ensemble Plants. Spośród zidentyfikowanych ortologów wybrano cztery geny do eksperymentalnej części pracy, której celem była weryfikacja udziału *HvGSK* w wybranych procesach fizjologicznych i rozwojowych. Do analizy funkcji tych genów wybrano technologię siRNA. Pozwala ona otrzymać rośliny z obniżoną ekspresją badanego genu a następnie, w tak uzyskanych roślinach, scharakteryzować wybrane cechy i porównując je z kontrolą wnioskować o funkcji analizowanego genu. W tym celu skonstruowano cztery wektory ekspresyjne z kasetą wyciszającą przeznaczone do transformacji genetycznej jęczmienia metodą wykorzystującą *Agrobacterium tumefaciens*. W wyniku Agro-transformacji uzyskano 71 roślin transgenicznych. Uzyskane linie transgeniczne charakteryzowano w warunkach stresu osmotycznego i zasolenia oraz w wybranych stadiach rozwojowych. Uzyskano wyniki wskazujące na udział *HvGSK* w procesach rozwojowych oraz odpowiedzi roślin jęczmienia na stres osmotyczny i zasolenia. Wykazano zależność pomiędzy ekspresją *HvGSK* a *HvDhn5* w roślinach pod wpływem stresu, co może potwierdzać udział GSK w szlaku sygnałowym ABA. Wykazano silną korelację pomiędzy ekspresją *HvGSK1.2* a masą tysiąca ziarniaków oraz wykazano, że obniżenie ekspresji *HvGSK* wpływa na redukcję pędów w jęczmieniu. W liniach z obniżoną ekspresją *HvGSK2.1* i *HvGSK3.1* obserwowano wzrost ekspresji *HvDwarf4*, co może odzwierciedlać udział tych genów w szlaku sygnałowym BR, a zmiany fenotypowe w stresie zasolenia dowodzą, że gen *HvGSK2.1* może być funkcjonalnym ortologiem *OsGSK21*.

Słowa kluczowe: brasinosteroidy, GSK, *Hordeum vulgare*, Kinaza Syntazy Glikogenu, RNAi, stres abiotyczny.

ABSTRACT

Glycogen Synthase Kinase (GSK) is an enzyme that catalyzes the phosphorylation of protein transcription factors and as a consequence regulates many plant developmental processes. It has been demonstrated so far that the enzyme with GSK activity determines the phosphorylation of BES transcription factors involved in the brassinosteroids (BR) signaling pathway. Recent reports indicate the involvement of GSK in the regulation of transcription factors of the abscisic acid (ABA) and auxins signal pathway. Plant GSKs are encoded by four groups of genes. The orthologues of these genes in the barley have not been known so far. The aim of this study was to identify and analyze the function of genes from the GSK family in barley. The research began with a bioinformatic analysis aimed at identification of barley genes which indicate a high similarity of nucleotide and amino acid sequences to known *GSKs* in *Arabidopsis thaliana* and species from the *Poaceae* family. Identified barley genes were assigned to the four previously described groups. The structure of these genes was characterized and the annotation of one of the genes in the Ensemble Plants database was corrected. Among the identified orthologs, four genes were selected for the experimental part of the work, the aim of which was to verify the involvement of *HvGSK* in selected physiological and developmental processes. siRNA technology was chosen to analyze the function of these genes. It allows to obtain plants with reduced expression of the gene under investigation and then, in the plants obtained in this way, characterize selected traits and compare them with the control to infer the function of the analyzed gene. For this purpose, four expression vectors were constructed with a silencing cassette intended for barley genetic transformation using the *Agrobacterium tumefaciens*. Agro-transformation resulted in 71 transgenic plants. The obtained transgenic lines were characterized under conditions of osmotic stress and salinity as well as in selected stages of development. Obtained results indicated the participation of *HvGSK* in developmental processes and the response of barley plants to osmotic stress and salinity. The relationship between *HvGSK* and *HvDhn5* expression in plants under stress was demonstrated, which may confirm the involvement of GSK in the ABA signaling pathway. A strong correlation between the *HvGSK1.2* expression and the thousand kernel weight was found and it was shown that the reduction of *HvGSK* expression influences the reduction of shoots in barley. In lines with decreased expression of *HvGSK2.1* and *HvGSK3.1*, an increase in *HvDwarf4* expression was observed, which may reflect the role of these genes in the BR signaling pathway, and phenotypic changes in salinity stress proved that the *HvGSK2.1* gene can be a functional orthologue of *OsGSK21*.

Key words: brassinosteroids, GSK, barley, Glycogen Synthase kinase, RNAi, abiotic stress.