



Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin  
Państwowy Instytut Badawczy

**Jolanta Groszyk**

Autoreferat rozprawy doktorskiej pt.:

**Identyfikacja i analiza funkcji genów z rodziny *GSK*  
w jęczmieniu (*Hordeum vulgare* L.)**

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

Praca doktorska wykonana  
w Zakładzie Inżynierii Genetycznej IHAR-PIB w Radzikowie

**Promotor:**

Prof. dr hab. Waław Orczyk  
Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin  
- Państwowy Instytut Badawczy w Radzikowie  
Zakład Inżynierii Genetycznej

**Recenzenci:**

Prof. dr hab. Grzegorz Bartoszewski  
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie  
Wydział Ogrodnictwa Biotechnologii i Architektury Krajobrazu  
Katedra Genetyki Hodowli i Biotechnologii Roślin

Prof. dr hab. Cezary Mądrzak  
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu  
Katedra Biochemii i Biotechnologii  
Zakład Biologii Molekularnej

Radzików, 2019

## WPROWADZENIE

Dynamiczny rozwój nauki oraz dostępność metod biologii molekularnej doprowadziły do poznania pełnych sekwencji genomowych nie tylko modelowych, ale również innych gatunków roślin uprawnych. Jednak samo zidentyfikowanie struktury sekwencji stanowi początkowy etap charakterystyki funkcji genu, stąd od wielu lat obserwowany jest rozwój nowych i bardziej precyzyjnych technik inżynierii genetycznej. Wykorzystanie metod prowadzących do wyciszenia lub zwiększenia ekspresji danego genu pozwala wnioskować o jego funkcji w badanym organizmie. Zboża, ze względu na istotny udział w produkcji żywności stanowią ważną grupę w hodowli roślin oraz badaniach podstawowych. W związku ze stale rosnącym zapotrzebowaniem na żywność oraz malejącą powierzchnią upraw, zastosowanie metod inżynierii genetycznej przyczyniło się do postępu w hodowli roślin, a wykorzystanie nowoczesnych metod biotechnologii pozwoliło na skrócenie procesu hodowlanego. Obecne narzędzia biotechnologiczne pozwalają na wytworzenie roślin precyzyjnie spełniających wymagania żywnościowe i środowiskowe na całym świecie oraz stanowiących punkt wyjścia w poszukiwaniu materiału roślinnego o określonych cechach wykorzystywanych w hodowli. Jedną ze strategii poznania funkcji genu poprzez wyciszenie jego ekspresji jest technologia RNAi, wykorzystująca zjawisko interferencji RNA (RNAi). RNAi jest naturalnym mechanizmem regulacji ekspresji genów w organizmach eukariotycznych. Mechanizm ten obejmuje kaskadę reakcji zależnych od biogenezy krótkich interferujących RNA (siRNA) prowadzących do degradacji transkryptu lub metylacji DNA. Strategia wyciszania genów poprzez siRNA jest rutynowo wykorzystywana w analizie funkcji genów zbóż, w tym jęczmienia. W przedstawionej pracy doktorskiej za cel przyjęto poznanie funkcji genów kodujących rodzinę roślinnych kinaz syntazy glikogenu (GSK) w jęczmieniu zwyczajnym (*Hordeum vulgare* L.) odmiany Golden Promise, poprzez wyciszenie ekspresji wybranych genów *HvGSK*. Dotychczas nie ukazała się żadna praca o tematyce *GSK* w jęczmieniu, a prezentowana praca stanowi początek badań związanych z udziałem genów *HvGSK* w regulacji szlaków sygnałowych fitohormonów oraz w rozwoju roślin. Analiza funkcji tych genów sprowadzała się jedynie do udziału kodowanych przez nie kinaz, szczególnie kinazy *AtSK21* w szlaku sygnałowym brasinosteroidów (BR) w *Arabidopsis thaliana* L. Badania molekularne i biochemiczne pozwoliły na określenie udziału BR w wielu procesach rozwojowych roślin, m. in. w podziałach komórkowych, fotomorfogenezie, rozwoju kwiatostanów i merystemów kwiatowych, wielkości, kształcie i liczbie nasion, architekturze części nadziemnej i systemu korzeniowego. Stwierdzono, że egzogenne BR korzystnie wpływają na tolerancję niekorzystnych warunków środowiska, wydajność procesu fotosyntezy oraz plon ziarna roślin. Wiadomo również, że wiele z przedstawionych procesów, regulowanych jest przez geny *GSK*, które uczestniczą w regulacji rozwoju korzeni bocznych, aparatów szparkowych, regulacji cyklu dobowego oraz wydłużaniu pędu i korzenia poprzez bezpośrednią regulację wielu grup czynników transkrypcyjnych. Obecnie wiadomo, że również *AtSK21* i jego paralogi uczestniczą nie tylko w szlaku sygnałowym BR, ale również innych fitohormonów, między innymi auksyn i kwasu abscysynowego (ABA). Zatem obserwowane po traktowaniu BR zmiany mogą być wynikiem bardziej złożonego procesu zależności, który został zaobserwowany między innymi we wzajemnej regulacji szlaku sygnałowego kwasu gibberelinowego (GA) i BR. Przedstawione dane potwierdzają, że kodowane przez pojedyncze geny białka bardzo rzadko zaangażowane są tylko w jeden proces, stąd coraz częściej sama analiza molekularna jest niewystarczająca do określenia funkcji genu i konieczne jest włączanie metod fizjologicznych i biochemicznych. Ze względu na brak informacji związanych z genami *GSK* w jęczmieniu i ograniczoną liczbę publikacji z udziałem *GSK* w innych gatunkach z rodziny *Poaceae*, wyniki prezentowane w pracy doktorskiej będą odnoszone głównie do ortologów tych genów scharakteryzowanych w *A. thaliana*.

## CEL I ZAKRES PRACY

Głównym celem prezentowanej pracy doktorskiej była identyfikacja i charakterystyka funkcji genów z rodziny *GSK* w jęczmieniu zwyczajnym.

W pierwszej części pracy wykonano analizę bioinformatyczną ukierunkowaną na identyfikację genów jęczmienia wykazujących duże podobieństwo sekwencji nukleotydowej i aminokwasowej do znanych *GSK* w *A. thaliana* oraz gatunkach z rodziny *Poaceae*. Zidentyfikowane geny przyporządkowano do

czterech grup scharakteryzowanych w tej rodzinie genów w *A. thaliana*. Spośród zidentyfikowanych ortologów wybrano geny do eksperymentalnej części pracy, której celem była weryfikacja udziału *HvGSK* w wybranych procesach fizjologicznych i rozwojowych jęczmienia. W tym celu skonstruowano wektory typu RNAi przeznaczone do wyciszenia ekspresji wybranych *HvGSK*, wykonano transformację genetyczną z wykorzystaniem *Agrobacterium tumefaciens* i wyprowadzono homozygotyczne linie transgeniczne z obniżoną ekspresją genów *HvGSK1.2*, *HvGSK2.1*, *HvGSK3.1* oraz *HvGSK4.1* przeznaczonych do analizy funkcji. Uzyskane linie transgeniczne charakteryzowano w warunkach stresu osmotycznego i stresu zasolenia. W wybranych stadiach rozwojowych opisano wybrane cechy fenotypowe części nadziemnej oraz systemu korzeniowego.

## MATERIAŁY I METODY

Materiał badawczy wykorzystany w pracy doktorskiej stanowił jęczmień zwyczajny (*Hordeum vulgare* L.) odmiany Golden Promise oraz szczepy bakterii kompetentnych *Escherichia coli*: DB3.1, OmniMax 2T1, DH5 $\alpha$  i *A. tumefaciens*: AGL1 oraz plazmidy pCR8/GW/TOPO (pENTR), pBract207 i pSoup wykorzystywane na etapie konstruowania kaset wyciszających oraz wektorów ekspresyjnych przeznaczonych do transformacji genetycznej jęczmienia.

Metody badawcze wykorzystane w pracy doktorskiej obejmowały:

1. Analizę bioinformatyczną i identyfikację genów *GSK* w jęczmieniu.
2. Uzyskanie profili ekspresji zidentyfikowanych *HvGSK* w wybranych stadiach rozwojowych jęczmienia (izolacja RNA, oczyszczanie z zanieczyszczeń DNA i synteza cDNA, pomiar ekspresji genów z wykorzystaniem metody Real-Time PCR).
3. Konstruowanie kasety wyciszającej typu hpRNA (amplifikacja fragmentów genów *GSK*, konstruowanie plazmidów pENTR z fragmentem *HvGSK1.2*, *HvGSK2.1*, *HvGSK3.1* lub *HvGSK4.1* i weryfikację uzyskanych konstruktów; rekombinacja Gateway i weryfikacja prawidłowego utworzenia matrycy do syntezy hpRNA) oraz uzyskanie wektora *A. tumefaciens* z odpowiednim plazmidem ekspresyjnym do transformacji genetycznej jęczmienia.
4. Transformację genetyczną niedojrzałych zarodków jęczmienia i regenerację roślin w kulturach *in vitro*.
5. Analizę transformantów (izolacja DNA, identyfikacja roślin posiadających T-DNA z wykorzystaniem metod LAMP i PCR).
6. Identyfikację roślin homozygotycznych (izolacja DNA, oznaczanie liczby kopii T-DNA w roślinach transgenicznych metodą Real Time PCR).
7. Charakterystykę fenotypu linii transgenicznych w warunkach kontrolnych oraz stresorów: 15% PEG 10 000 i 200 mM NaCl (izolacja RNA i synteza cDNA, pomiar ekspresji wyciszanych genów, pomiar biomasy oraz długości pędów i korzeni, oznaczenie suchej masy liści, oznaczenie nadtlenu wodoru, wyciek elektrolitów oraz wybrane parametry fluorescencji chlorofilu *a*).
8. Charakterystykę fenotypu linii homozygotycznych w wybranych stadiach rozwojowych (czas pyleńia, parametry fluorescencji chlorofilu *a*, względna zawartość chlorofilu, pomiar powierzchni liścia flagowego, oznaczenie liczby pędów, wysokość pierwszego pędu, długość międzywęźli i kłosa).
9. Charakterystykę systemu korzeniowego w warunkach kontrolnych i stresora zasolenia (sterylizacja ziarniaków, kiełkowanie i uprawa roślin, pomiar parametrów architektury korzeni: całkowita długość, powierzchnia, objętość oraz liczba wierzchołków i oznaczenie suchej masy korzeni).

## WYNIKI I DYSKUSJA

Dotychczas wykazano, że *GSK* występują we wszystkich organizmach eukariotycznych, w których wykonano analizy pod kątem ich identyfikacji [1]. Dowiedziono, że w ssakach *GSK* kodowana jest przez dwa geny: *GSK3 $\alpha$*  i *GSK3 $\beta$* , natomiast w roślinach *GSK* funkcjonują jako rodzina kinaz, kodowana przez cztery grupy genów [2]. Udowodniono, że *GSK* regulują szereg procesów rozwojowych, uczestniczą

w odpowiedzi roślin na czynniki stresowe biotyczne i abiotyczne oraz pośredniczą w regulacji fitohormonalnej roślin. Najnowsze prace dostarczają dowodów, że roślinne GSK stanowią ośrodek sieci zależności na poziomie rozwojowym, odpornościowym i fitohormonalnym, jednak mimo wielu prac potwierdzających rolę GSK w roślinach, uwarunkowania genetyczne regulacji kinaz w rodzinie *Poaceae* najdokładniej poznano jedynie w ryżu [3-5]. Do dziś ukazały się pojedyncze prace w których przedstawiono sekwencje dwóch ortologów w *T. aestivum* [6] i jednego ortologa w *B. distachyon* [7]. Dotychczas nie ukazała się żadna praca w której analizowana była sekwencja i/lub funkcja GSK w jęczmieniu. Przedstawiona praca, jest pierwszą w której podjęto tematykę analizy genów *HvGSK*. W pracy przedstawiono wyniki z analizy bioinformatycznej polegającej na identyfikacji genów z rodziny GSK w jęczmieniu. W kolejnej części pracy wybrano geny *HvGSK* do analizy funkcji i wykonano transformację genetyczną jęczmienia prowadzącą do wyciszenia ekspresji wytypowanych genów. W części eksperymentalnej wykonano analizę cech molekularnych i fizjologicznych linii transgenicznych uprawianych w warunkach kontrolnych oraz stresorów, określono architekturę systemu korzeniowego roślin uprawianych w warunkach kontrolnych i stresu zasolenia, a także wykonano charakterystykę linii transgenicznych w wybranych stadiach rozwojowych. Na podstawie uzyskanych wyników wnioskowano o potencjalnej funkcji wybranych *HvGSK*.

### ***Analiza bioinformatyczna i identyfikacja genów z rodziny GSK***

Wyszukanie w bazie danych iTAK sekwencji kinaz GSK pozwoliło na odnalezienie dwunastu sekwencji GSK w jęczmieniu. Dalsza analiza bioinformatyczna z wykorzystaniem dostępnych baz danych NCBI i Ensembl Plants pozwoliła na weryfikację zdeponowanych w iTAK sekwencji. W wyniku analizy bioinformatycznej dostępnych sekwencji nukleotydowych i aminokwasowych *A. thaliana* oraz dostępnych sekwencji gatunków z rodziny *Poaceae*, tj. *O. sativa*, *T. aestivum* i *B. distachyon* wyodrębniono siedem genów *HvGSK* kodujących GSK w jęczmieniu oraz przypisano je do czterech scharakteryzowanych na przykładzie *A. thaliana* grup. Geny te oznaczono podobnie, jak w innych gatunkach, dodając do pierwszych liter nazwy łacińskiej człon „GSK” oraz grupę i numer genu. Do pierwszej grupy przypisano geny *HvGSK1.1*, *HvGSK1.2* i *HvGSK1.3*, do grupy drugiej geny *HvGSK2.1* i *HvGSK2.2*, do grupy trzeciej *HvGSK3.1* i do grupy czwartej *HvGSK4.1*.

Analiza sekwencji aminokwasowej pozwoliła na zidentyfikowanie konserwowanej domeny kinazy białkowej, w której, podobnie jak w innych gatunkach jednoliściennych, w rzodkiewniku oraz w ssakach, zidentyfikowano powtarzające się motywy. W domenie kinazy białkowej zidentyfikowano motyw MEYV charakterystyczny dla II grupy i motyw LEYV występujący w I i III grupie kinaz GSK, zawierający kluczowe reszty wiążące bikiinę, tj. inhibitor roślinnych GSK [8], motywy CDFGSAK i SYICSR obecne tylko w grupie serynowo-treoninowych kinaz białkowych, motyw SIDIW konserwowany tylko w II grupie kinaz oraz motyw TREE obecny zarówno w roślinnych jak i zwierzęcych GSK [3, 6] mający kluczowe znaczenie w funkcjonowaniu szlaku sygnałowego BR [9]. W N-końcowej części domeny kinazy białkowej zidentyfikowano konserwowany region VGTGSFGIVFQAKCLETGESVAIK wiążący ATP.

Szczegółowa analiza sekwencji jęczmienia pozwoliła na identyfikację lokalizacji chromosomowej wytypowanych genów *HvGSK* w wyniku której wykazano, że *HvGSK1.3*, *HvGSK2.2* i *HvGSK3.1* zlokalizowane są na chromosomie 1, *HvGSK1.1* i *HvGSK2.1* na chromosomie 3, *HvGSK1.2* i *HvGSK4.1* na chromosomie 5.

Analiza *HvGSK4.1* wykazała, że sekwencja tego genu występuje w bliskim sąsiedztwie oksydazy aminowej, a część wariantów splicingowych (HORVU5Hr1G119790.1/2/3/5/6/4/7/8/9 i 11) zdeponowanych w bazie danych Ensembl Plants sugeruje ciągłość transkryptu kodującego oksydazę aminową i *HvGSK4.1*. W wyniku analizy eksperymentalnej DNA jęczmienia referencyjnej odmiany Morex i badanej Golden Promise potwierdzono ciągłość genomową, jednak analiza cDNA pomimo potwierdzenia obecności obu transkryptów wykazała, że są to dwa niezależnie syntetyzowane mRNA [10]. Uzyskane wyniki jednoznacznie wskazują, że geny te, pomimo bliskiej lokalizacji tworzą niezależne transkrypty.

Bioinformatyczna analiza sekwencji nukleotydowej wykazała, że geny *HvGSK1.1*, *HvGSK2.1* i *HvGSK2.2* w sekwencji których zlokalizowano 12 egzonów i 11 intronów oraz *HvGSK3.1* w sekwencji którego wykazano obecność 13 egzonów i 12 intronów, posiadają zachowaną strukturę obserwowaną w *A. thaliana* i *O. sativa* [2, 3, 11]. W sekwencji *HvGSK4.1* zlokalizowano 14 egzonów i 13 intronów, a w pozostałych genach, tj. *HvGSK1.2* i *HvGSK1.3* po 13 egzonów i 12 intronów, co stanowi zróżnicowanie genetyczne inne, niż obserwowane w I i IV grupie genów rzodkiewnika i ryżu, w których wykazano obecność 12 egzonów i 11 intronów.

Analiza ekspresji *HvGSK* w wybranych tkankach w stadium wegetatywnym i generatywnym podobnie jak analiza ekspresji *AtSK* w pracy Charrier i współautorów [12] wykazała, że geny kodujące roślinne GSK najwyższej ekspresji ulegają w organach generatywnych, co w jęczmieniu obserwowano w kłosie premejotycznym i mejotycznym, natomiast w *A. thaliana* w pąkach kwiatowych i otwartych kwiatach. Zaobserwowano także, że ekspresja *HvGSK3.1* notowana na najniższym poziomie w porównaniu do profilu ekspresji pozostałych *HvGSK* we wszystkich testowanych tkankach, w *A. thaliana* w pędach kwiatostanowych, pąkach kwiatowych i otwartych kwiatach była dwukrotnie wyższa niż ekspresja genów *AtSK* reprezentujących I, II i III grupę.

### ***Eksperymentalna weryfikacja funkcji HvGSK w jęczmieniu***

Analiza roślin transgeniczných ryżu z wyciszoną ekspresją *OsGSK21* wykazała zwiększoną tolerancję roślin transgeniczných na stresor zasolenia w porównaniu z nietransgenicznymi segregantami [3]. Na podstawie tej pracy oraz wykonanych w Zakładzie Inżynierii Genetycznej IHAR-PIB doświadczeń z wykorzystaniem roślin transgeniczných z wyciszoną ekspresją genu *HvGSK1.1* założono, że funkcją wybranych genów *HvGSK* jest regulacja tolerancji na stresory środowiskowe, a wyciszenie ekspresji *GSK* w jęczmieniu będzie skutkowało między innymi podniesioną tolerancją roślin na zasolenie. Założono również, zgodnie z danymi literaturowymi, że geny te biorą udział w regulacji rozwoju organów generatywnych, co w roślinach transgeniczných będzie obserwowane w postaci zmiany cech morfologiczných. Dotychczas nie opisano genów kodujących kinazy *GSK* w jęczmieniu. W celu charakterystyki funkcji wybranych na podstawie wstępnej analizy bioinformatycznej genów *HvGSK* wykonano transformację genetyczną jęczmienia prowadzącą do wyciszenia ekspresji wybranych genów. W tak uzyskanych roślinach transgeniczných uprawianych w warunkach kontrolnych oraz stresorów charakteryzowano wybrane cechy fenotypowe i molekularne, a następnie, na podstawie uzyskanych wyników wnioskowano o funkcji genów *GSK* w jęczmieniu. Do analizy funkcji genów z rodziny *GSK* w jęczmieniu wytypowano cztery reprezentujące każdą z grup geny, tj. *HvGSK1.2*, *HvGSK2.1*, *HvGSK3.1* i *HvGSK4.1*.

W celu wyciszenia ekspresji genów *HvGSK* zastosowano metodę transformacji genetycznej z wykorzystaniem *A. tumefaciens* bazującą na technologii RNAi. Metoda ta z powodzeniem wykorzystywana jest w wielu badaniach polegających na wyciszeniu ekspresji genów, zarówno w królestwie roślin w tym jęczmieniu, jak i królestwie zwierząt. Wyciszanie ekspresji określonego genu technologią RNAi polega na wprowadzeniu transgeny, którego ekspresja warunkowana przez promotor konstytutywny lub rozwojowo-specyficzny powoduje syntezę transkryptu o strukturze hpRNA. Powstały hpRNA w wyniku kaskady reakcji zależnych od enzymów szlaku biogenezy siRNA powoduje degradację mRNA docelowego genu. Korzystając z sekwencji cDNA zdeponowanych w dostępnych bazach danych przygotowano cztery plazmidy ekspresyjne służące do wyciszenia ekspresji badanych genów. W tym celu wykorzystano fragmenty sekwencji kodującej cDNA genów *HvGSK1.2*, *HvGSK2.1*, *HvGSK3.1* i *HvGSK4.1*, które amplifikowano w rejonach o najbardziej zróżnicowanej sekwencji nukleotydowej. Wszystkie plazmidy przygotowano bazując na jednym typie konstruktów, gdzie fragmenty badanego genu umieszczano względem siebie antyrównolegle, po dwóch stronach krótkiego intronu (5'3'/intron/3'5'). Tak uzyskana kasetta wyciszająca była matrycą transkrypcji w wyniku której syntetyzowany mRNA tworzył strukturę hpRNA. Obecność hpRNA indukowała kaskadę procesów RNAi i w konsekwencji degradację transkryptu docelowego genu.

Do transformacji genetycznej przeznaczono niedojrzałe zarodki jęczmienia odmiany Golden Promise. Odmiana ta jest wykorzystywana w transformacji genetycznej jęczmienia i dobrze regeneruje w kulturach

*in vitro*, ponadto dostępny jest opracowany protokół transformacji [13-15]. Do transformacji genetycznej wykorzystano szczep AGL1 *A. tumefaciens* wykorzystywany w transformacji jęczmienia [15] oraz innych gatunków zbóż [16-18], zawierający odpowiedni plazmid ekspresyjny z kasetą wyciszającą gen *HvGSK1.2*, *HvGSK2.1*, *HvGSK3.1* lub *HvGSK4.1*. Wykorzystany do transformacji genetycznej plazmid pBract207 posiadał gen fosfotransferazy higromycyny B (*hpt*), warunkujący odporność transformantów na higromycynę B, którą w stężeniu  $50 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$  pożywki wykorzystywano podczas selekcji. Wydajność transformacji dla poszczególnych konstruktów wynosiła od 0,61% do 2,38%, co pozwoliło na uzyskanie 52 roślin transgeniczných reprezentujących wyciszenie wszystkich przewidzianych do analizy genów *HvGSK*.

Analiza DNA uzyskanego z 614 roślin jęczmienia pokolenia segregującego  $T_1$  uzyskanych z 52 roślin transgeniczných ( $T_0$ ) pozwoliła na wyodrębnienie 402 roślin posiadających transgen po segregacji i 212 roślin w których nie zidentyfikowano obecności T-DNA. Analizę wykonywano metodą LAMP, pozwalającą na szybką identyfikację określonej sekwencji. W kolejnym etapie pracy z zidentyfikowanych 402 roślin transgeniczných izolowano genomowy DNA i z wykorzystaniem metody Real Time PCR oznaczano homozygoty i hemizygoty, a także potencjalną liczbę kopii zintegrowanego T-DNA. Wśród 402 roślin transgeniczných, zgodnie z założeniem zidentyfikowano homozygoty posiadające T-DNA na dwóch chromosomach homologicznych i hemizygoty posiadające T-DNA na jednym chromosomie. W roślinach, wśród których zidentyfikowano homozygoty i hemizygoty oraz negatywne segreganty, zgodnie z założeniem stwierdzono że T-DNA występuje w jednej kopii. W części roślin z uwagi na zróżnicowany poziom proporcji *hpt/act* oraz brak negatywnych segregantów w grupie przynajmniej 12 roślin potomnych wnioskowano, że T-DNA został zintegrowany do genomu jęczmienia w więcej niż jednym locus i/lub kopi. W dalszej części pracy wykorzystywano rośliny homozygotyczne pokolenia  $T_2$  i opisywano jako linie transgeniczne.

Wykonano analizę ekspresji wyciszanego genu w liniach transgeniczných uzyskanych po transformacji wektorami do wyciszenia ekspresji genów *HvGSK*. Dla każdego genu wykonano analizę dziewięciu linii w trzech powtórzeniach biologicznych. Wyniki analizy ekspresji pozwoliły na wytypowanie linii z wyciszoną ekspresją od 11% do 48% genu *HvGSK1.2*, od 15% do 36% genu *HvGSK2.1*, od 57% do 77% genu *HvGSK3.1* i od 51% do 85% genu *HvGSK4.1*.

Jęczmień zaliczany jest do zbóż o najwyższym progu tolerancji na zasolenie notowanym na poziomie od 0,2% do 0,5% [19]. Odpowiedź roślin na stres zasolenia ma charakter dwufazowy. W pierwszej określonej jako stres osmotyczny dochodzi do zmian w przepuszczalności błon komórkowych i ograniczenia transportu wody do rośliny [20]. Druga faza określana jest jako stres jonowy i wywołwana jest przez nadmierne stężenie jonów i ich toksyczne oddziaływanie na komórkę [21]. W efekcie stresu osmotycznego i jonowego obserwowane są zmiany takie jak zahamowanie tempa wzrostu, zmniejszenie powierzchni liści, ograniczenie transpiracji oraz obniżenie suchej masy pędu. Zbyt długotrwały stres prowadzi do ostatecznego zamierania roślin [20]. Charakterystyczne zmiany wywołane stresem osmotycznym i stresem zasolenia zaobserwowano również w analizowanych w niniejszej pracy roślinach kontrolnych jęczmienia odmiany Golden Promise, które po traktowaniu 15% PEG 10 000 i 200 mM NaCl indukującym odpowiednio stres osmotyczny i stres zasolenia charakteryzowały się spowolnieniem tempa wzrostu oraz ponad 2-krotnie mniejszą biomasa, krótszym pędem, zmniejszeniem powierzchni pierwszego liścia oraz zmniejszeniem suchej masy liści. Wykazano, że stres zasolenia wpływa na obniżenie wydajności procesów biochemicznych, takich jak fotosynteza i oddychanie mitochondrialne [22], w następstwie czego dochodzi do zamykania aparatów szparkowych i ograniczenia wnikania  $\text{CO}_2$  do liścia oraz zwiększonej produkcji reaktywnych form tlenu (RFT). Zasolenie prowadzi do uszkodzenia struktury błony gran i stromy tylakoidów, zakłóca transport elektronów oraz fotosyntetyczny metabolizm węgla, a obniżenie zawartości chlorofilu pod wpływem NaCl jest powszechnie obserwowanym zjawiskiem w badaniach nad stresem zasolenia [22]. Pod wpływem stresu zasolenia uszkodzeniu mogą ulec centra reakcji fotosystemu II (PSII) oraz inne składniki aparatu fotosyntetycznego. Kalaji i współautorzy [23] wykazali, że PSII w stresie zasolenia charakteryzuje się niższą sprawnością absorpcji energii, co spowo-

dowane jest prawdopodobnie oddysocjowaniem kompleksu zbierającego energię świetlną z PSII. W analizowanych 14-dniowych roślinach kontrolnych jęczmienia odmiany Golden Promise uzyskano prawie 2-krotnie wyższą zawartość nadtlenu wodoru zarówno w stresie osmotycznym jak i stresie zasolenia. Analiza podstawowych parametrów fluorescencji chlorofilu *a* takich jak wydajność kwantowa PSII, wydajność reakcji rozszczepiania wody i transportu elektronów, czy wskaźniki reakcji świetlnych [ $\phi P0/(1-\phi P0)$ ] lub ciemieniowych [ $\psi 0/(1-\psi 0)$ ] charakteryzujących się obniżeniem wartości w stresie zasolenia w roślinach jęczmienia podatnych na zasolenie [24], w roślinach odmiany Golden Promise były notowane na tym samym lub nieistotnie różnym poziomie. Dane te potwierdzają silną tolerancję Golden Promise na zasolenie, notowaną również w innych pracach [25, 26]. Nie mniej jednak w roślinach tych uzyskano istotne obniżenie minimalnej fluorescencji, w czasie otwarcia wszystkich centrów reakcji PSII, obniżenie szybkości zamykania centrów reakcji PSII, a także obniżenie przepływu energii przez aktywne centrum reakcji.

Wysoka tolerancja Golden Promise na stres zasolenia wymagała użycia markera molekularnego tego stresu, jakim jest oznaczenie poziomu genów *Dhn* (dehydryn) kodujących białka LEA, tzw. białka stresu. W tym celu wykonano analizę ekspresji *HvDhn5*, która w testach wstępnych w porównaniu z innymi testowanymi genami: *HvDhn4*, *HvDhn6* i *HvDhn13* ulegała silnej indukcji zarówno pod wpływem stresu zasolenia, jak i stresu osmotycznego. Wykazano, że stres zasolenia prowadzi do regulacji ekspresji wielu genów, w tym genów kodujących rodzinę GSK. Dowiedziono, że ekspresja genów *GSK* w *A. thaliana* (*AtSK*) regulowana jest pod wpływem temperatury, natężenia światła, a także stresorów abiotycznych takich jak chłód, zasolenie i susza [12]. Zmiany ekspresji *GSK* pod wpływem testowanych stresorów zaobserwowano również w jęczmieniu. Wykazano istotnie niższą ekspresję *HvGSK1.2* w zasoleniu oraz wyższą ekspresję *HvGSK2.1* i niższą ekspresję *HvGSK3.1* w obydwu testowanych stresorach. Ekspresja *HvGSK4.1* nie wykazała znacznych zmian w testowanych warunkach stresowych, jednak można zaobserwować wzrost ekspresji genu w stresie osmotycznym i zmniejszenie w stresie zasolenia. W testowanych roślinach kontrolnych uprawianych w 15% PEG 10 000 wykazano skrócenie korzenia o 5% oraz istotne ( $p \leq 0,005$ ) skrócenie korzeni o 23% podczas uprawy w 200 mM NaCl. W roślinach tych, uprawianych odpowiednio w stresorze osmotycznym i stresorze zasolenia wykazano większą odpowiednio o 21% i 155% ( $p \leq 0,005$ ) przepuszczalność membran charakteryzowaną w niniejszej pracy stopniem wycieku elektrolitów [27]. Szereg badań wskazuje również na udział kodowanej przez geny *GSK* rodziny kinaz serynowo-treoninowych, m. in. w regulacji fitochromalnej roślin. Badania wykonane w roślinach modelowych rzodkiewnika oraz mutantach szlaku syntezy brasinosteroidów (BR) potwierdzają głównie udział kinazy *AtSK21* w literaturze opisywanej jako *BIN2* w regulacji szlaku syntezy wspomnianych BR [9, 28-32], ale również kwasu absycynowego (ABA) [33, 34], auksyn [35, 36], a także kwasu giberelinowego (GA) [37-39]. Wykazano, że tylko kinazy *AtSK* reprezentujące I, II i III grupę reagują obniżonym poziomem na inhibitor roślinnych GSK, tj. bikiwinę [8]. W celu określenia udziału *HvGSK* w szlaku biosyntezy BR wykonano analizę ilościową ekspresji *HvDwarf4*, genu kodującego enzym katalizujący przekształcanie 6-oksokampasterolu (6-OxoCN) do katasteronu (CT) [40]. Założono, że *HvDwarf4*, jako gen kontrolujący syntezę BR będzie ulegał podwyższonej reakcji na obniżoną ekspresję *HvGSK*. Dotychczas wykazano, że rośliny jęczmienia odmiany Bowman reagują na stres suszy zwiększoną zawartością kastasteronu (CS) i 24-epibrasinolidu (24-epiBL) oraz brakiem różnic w zawartości 28-homokastasteronu (28-homoCS) [41]. Mimo oczekiwanego udziału *HvDwarf4* w biosyntezie BR, nie ma prac, w których analizowano ekspresję *HvDwarf4* i zawartość BR z wykorzystaniem tego samego materiału biologicznego. W wyniku analizy ilościowej ekspresji *HvDwarf4* wykazano istotne obniżenie ekspresji tego genu w stresie osmotycznym i nieznaczny wzrost ekspresji genu w stresie zasolenia.

Zgodnie z jednym ze wstępnych założeń, że rośliny z obniżoną ekspresją niektórych genów *HvGSK* będą lepiej tolerowały stres zasolenia wykonano doświadczenia mające na celu określenie cech fenotypowych uzyskanych w wyniku transformacji genetycznej linii transgenicznych. W tym celu wykonano trzy eksperymenty. W pierwszym, określano cechy molekularne i morfologiczne 14-dniowych roślin jęczmienia uprawianych w warunkach kontrolnych i stresorów. W tym celu rośliny uprawiano w pożywce Hoa-

glanda i pożywce Hoaglanda z odpowiednim stresorem, tj. z 15% PEG 10 000 lub 200 mM NaCl, indukującym w roślinach odpowiednio stres osmotyczny i stres zasolenia. Eksperyment drugi polegał na charakterystyce cech fenotypowych roślin w wybranych stadiach rozwojowych, ponieważ duża część prac szczególnie w pierwszych latach analiz genów kodujących kinazy serynowo-treoninowe, związana była z udziałem genów w regulacji rozwoju kwiatostanu i modelowania merystemu kwiatowego [42-44]. Trzeci eksperyment polegał na określeniu architektury systemu korzeniowego linii transgenicznych uprawianych w warunkach kontrolnych oraz stresora zasolenia.

Analiza 14-dniowych roślin jęczmienia z wyciszoną ekspresją genu *HvGSK1.2* podobnie jak roślin *A. thaliana* z supresją lub nadekspresją *AtSK11* [45], ortologa reprezentującego tę samą grupę, pozwoliła na zaobserwowanie istotnych zmian cech fenotypowych roślin uprawianych w warunkach kontrolnych. W grupie tej uzyskano większą o  $5,7 \pm 6,1\%$  biomasa oraz dłuższe o  $10,4 \pm 1,9\%$  pędy i o  $16,0 \pm 3,1\%$  korzenie, a także mniejszą o  $11,6 \pm 6,9\%$  powierzchnię pierwszego liścia. Obserwowano niższą o  $12,7 \pm 8,4\%$  zawartość nadtlenku wodoru oraz mniejszy o  $10,7 \pm 5,5\%$  wyciek elektrolitów w porównaniu z kontrolą. Wykazano silną ujemną korelację ( $-0,84$ ,  $p=0,039$ ) pomiędzy ekspresją *HvGSK1.2* a długością korzeni roślin uprawianych w warunkach kontrolnych oraz silną ujemną korelację ( $-0,88$ ,  $p = 0,022$ ) pomiędzy biomasa a zawartością nadtlenku wodoru. Rośliny z obniżoną ekspresją *HvGSK1.2* pod wpływem stresu osmotycznego miały większą o  $15,3 \pm 12,0\%$  biomasa, większą o  $6,0 \pm 5,5\%$  powierzchnię pierwszego liścia oraz większą o  $30,6 \pm 8,0\%$  suchą masę liści, jednak charakteryzowały się krótszym o  $17,4 \pm 1,2\%$  pędem oraz krótszymi o  $7,0 \pm 1,0\%$  korzeniami. W grupie tej wykazano większą o  $23,2 \pm 23,5\%$  zawartość nadtlenku wodoru oraz mniejszą o  $57,7 \pm 9,2\%$  stabilność membran. W roślinach z obniżoną ekspresją *HvGSK1.2* uprawianych w 200 mM NaCl wykazano większą o  $13,6 \pm 7,1\%$  biomasa, dłuższe o  $10,9 \pm 2,0\%$  pędy, większą o  $32,9 \pm 2,7\%$  suchą masę liści oraz mniejszą o  $68,6 \pm 8,5\%$  stabilność membran. Wykazano także, że rośliny w stresie zasolenia mają krótsze o  $18,7 \pm 1,9\%$  korzenie. W grupie tej uzyskano silną dodatnią korelację pomiędzy ekspresją *HvGSK1.2* a długością pędu ( $0,90$ ,  $p=0,016$ ) oraz silną ujemną korelację pomiędzy ekspresją *HvGSK1.2* a wyciekami elektrolitów ( $-0,99$ ,  $p=0,000$ ). W roślinach z obniżoną ekspresją *HvGSK1.2* uzyskano również niższą o  $54,4 \pm 1,5\%$  ekspresję genu *HvDhn5* w stresie osmotycznym i o  $36,0 \pm 0,8\%$  w stresie zasolenia. Wykazano silną ujemną korelację ( $-0,83$ ,  $p=0,042$ ) pomiędzy ekspresją *HvDhn5* a suchą masą liści w stresie zasolenia. Wykazano, że obniżenie ekspresji *HvGSK1.2* wpływa na długość pędu, stabilność błon komórkowych oraz ekspresję *HvDhn5*. Co ważne, w grupie tej nie zanotowano zmian w ekspresji genu *HvDwarf4*. Analiza fenotypu linii transgenicznych jęczmienia z supresją *HvGSK1.2* wykazała mniejszą o  $25 \pm 7,0\%$  liczbę pędów, większą o  $76 \pm 30,2\%$  powierzchnię liścia flagowego oraz większą o  $24 \pm 0,9\%$  średnią masę tysiąca ziarniaków. Wykazano silną ujemną korelację ( $-0,92$ ,  $p=0,009$ ) pomiędzy ekspresją *HvGSK1.2* a masą tysiąca ziarniaków, a także bardzo silną dodatnią korelację wysokości pierwszego pędu z długością międzywęzła ( $0,99$ ,  $p=0,000$ ) oraz długością kłosa ( $0,97$ ,  $p=0,001$ ) i długości międzywęzła z długością kłosa ( $0,93$ ,  $p=0,007$ ). Wyniki analizy linii transgenicznych z obniżoną ekspresją *HvGSK1.2* jednoznacznie wskazują na udział genu w odpowiedzi roślin jęczmienia zarówno w stresie osmotycznym jak i stresie zasolenia. Potwierdzeniem jest większa biomasa roślin, większa sucha masa liści, większa długości pędów oraz obniżona ekspresja *HvDhn5*. Należy zatem przypuszczać, że *HvGSK1.2* uczestniczy w tolerancji roślin na stres osmotyczny i zasolenia, co może być związane również ze szlakiem sygnałowym ABA. Wskazują na to wyniki ekspresji *HvDhn5*, której indukowana stresem osmotycznym i stresem zasolenia ekspresja w roślinach WT, w roślinach transgenicznych z obniżoną ekspresją *HvGSK1.2* jest się o połowę niższa. Gen *HvDhn5* należy do rodziny genów kodujących białka LEA, tzw. białka stresu, w literaturze występujące również pod nazwą dehydryn, znane przede wszystkim z odpowiedzi na stresory fizjologiczne i środowiskowe roślin, które regulowane są przez ABA. Według najnowszych doniesień kinaza *AtSK21* pozytywnie reguluje odpowiedź ABA poprzez fosforylację *ABI5* [34] oraz *SnRK2.3* [33], a ostatnio udowodniono również udział *BZR1* w modulowaniu ekspresji genu *ABI5* [46]. Nie można zatem wykluczyć, że zwiększona tolerancja roślin jęczmienia z obniżoną ekspresją *HvGSK1.2* na testowane stresory związana jest z regulacją ABA. Z kolei brak reakcji *HvDwarf4* może świadczyć o braku udziału *HvGSK1.2* w regulacji syntezy BR, nie mniej jednak w celu potwierdzenia tej hipotezy w przyszłości należy oznaczyć poziom BR.



Należy również zauważyć, że obniżona ekspresja *HvGSK1.2* prowadzi do redukcji liczby pędów, zwiększenia średniej masy tysiąca ziarniaków, a także zwiększenia powierzchni liścia flagowego. Analiza linii transgenicznych z obniżoną ekspresją *HvGSK2.1*, którego ortolog został najlepiej poznany w *A. thaliana* wykazała, że rośliny te charakteryzują się większą o  $15,0 \pm 10,2\%$  biomasa, jednak w grupie tej uzyskano mniejszą o  $19,9 \pm 2,1\%$  powierzchnię pierwszego liścia, mniejszą o  $35,6 \pm 2,1\%$  suchą masę liści, krótsze o  $7,0 \pm 4,2\%$  pędy roślin oraz większą o  $34,0 \pm 2,8\%$  stabilność błon komórkowych roślin uprawianych w warunkach kontrolnych. Zmiany te mogą świadczyć o przystosowaniu się roślin z obniżoną ekspresją *HvGSK2.1* do warunków środowiska. Jest to także jedyna grupa, w której obniżenie ekspresji *HvGSK* powodowało zwiększenie całkowitej długości korzeni o  $27,1 \pm 3,7\%$ , powierzchni korzeni o  $29,3 \pm 7,0\%$ , objętości korzeni o  $39,0 \pm 10,8\%$  oraz liczby wierzchołków korzeni o  $29,0 \pm 12,3\%$ . Wykazano silną korelację ( $0,86, p=0,027$ ) pomiędzy ekspresją *HvGSK2.1* a suchą masą liści oraz silną dodatnią korelację pomiędzy powierzchnią pierwszego liścia, suchą masą liści oraz wyciekami elektrolitów. W grupie tej uzyskano również wyższą o  $10,6 \pm 2,1\%$  ekspresję *HvDwarf4*. Charakterystyczne zmiany uzyskano w liniach transgenicznych z supresją *HvGSK2.1*, uzyskane w postaci większej o  $25,2 \pm 12,4\%$  biomasy, większej o  $49,8 \pm 6,1\%$  powierzchni pierwszego liścia i większej o  $8,5 \pm 3,0\%$  suchej masy liści oraz mniejszej o  $24,7 \pm 1,4\%$  długości pędu, niższej o  $53,2 \pm 5,3\%$  zawartości  $H_2O_2$  i większej o  $25,8 \pm 3,6\%$  stabilności błon komórkowych, uprawianych w 15% PEG 10 000. W roślinach pod wpływem stresu zasolenia uzyskano większą o  $16,8 \pm 10,1\%$  biomasa, większą o  $32,4 \pm 5,1\%$  powierzchnię pierwszego liścia, większą o  $7,3 \pm 8,2\%$  suchą masę liści, zwiększoną o  $14,9 \pm 5,5\%$  długość pędu oraz mniejszą o  $32,6 \pm 4,2\%$  zawartość nadtlenu wodoru i mniejszą o  $17,6 \pm 2,8\%$  stabilność błon komórkowych. Wykazano również niższą ekspresję *HvDhn5* o  $33,7 \pm 2,7\%$  w stresie osmotycznym i o  $51,2 \pm 1,0\%$  w stresie zasolenia. Wykazano silną dodatnią korelację ( $0,82, p=0,046$ ) pomiędzy ekspresją *HvGSK2.1* a *HvDhn5* oraz silną korelację pomiędzy ekspresją *HvGSK2.1* a zawartością nadtlenu wodoru ( $0,85, p=0,034$ ) i wyciekami elektrolitów ( $0,91, p=0,012$ ) w stresie osmotycznym, a także silną dodatnią korelację ( $0,85, p=0,030$ ) pomiędzy ekspresją *HvDhn5* a zawartością nadtlenu wodoru w stresie zasolenia. Analiza linii transgenicznych z supresją *HvGSK2.1* pozwoliła na zaobserwowanie redukcji liczby pędów o  $15,1 \pm 7,2\%$ . Analiza fenotypu linii transgenicznych z obniżoną ekspresją *HvGSK2.1* nie wskazała na jednoznaczny udział *HvGSK2.1* w fenotypie roślin dorosłych. Doświadczenia wykonane w roślinach 14-dniowych z obniżoną ekspresją *HvGSK2.1* poprzez zwiększoną ekspresję *HvDwarf4* sugerują większą zawartość BR w liniach transgenicznych, co byłoby zgodne z opisywanymi cechami w mutantach *bin2* w których nadprodukcja kinazy AtSK21 powodowała zaburzenie szlaku syntezy BR, a rośliny miały fenotyp karłowaty. Podobnie jak w roślinach ryżu w których obniżenie ekspresji *OsGSK21* skutkowało niższą zawartością nadtlenu wodoru i większą tolerancją roślin na stres zasolenia [3], w roślinach jęczmienia z supresją *HvGSK2.1* podobne zmiany uzyskano zarówno w stresie zasolenia jak i stresie osmotycznym. Należy zatem przypuszczać, że *HvGSK2.1* uczestniczy w tolerancji roślin na testowane stresse abiotyczne. Nie mniej jednak dane literaturowe wskazują na złożony proces regulacji, co potwierdzają obserwowane w doświadczeniach wyniki ekspresji *HvDhn5*, *HvDwarf4* oraz dane literaturowe sugerujące, że kodowane przez *HvGSK* kinazy uczestniczą w regulacji aktywności dehydrogenazy glukozo-6-fosforanu [45]. Należy zatem zakładać, że uzyskane wyniki są następstwem bardziej złożonego mechanizmu regulacji tolerancji. Ponadto, podobnie jak w pierwszej grupie, supresja *HvGSK2.1* może prowadzić do zwiększenia aktywności czynnika transkrypcyjnego BZR1 i regulacji szlaku sygnałowego ABA, co w tej grupie wykazano w postaci niższej ekspresji *HvDhn5* w stresie osmotycznym i stresie zasolenia.

Supresja *HvGSK3.1* w 14-dniowych roślinach jęczmienia spowodowała wzrost biomasy o  $14,7 \pm 4,5\%$ , zmniejszenie powierzchni pierwszego liścia o  $35,5 \pm 4,9\%$ , zmniejszenie suchej masy liści o  $29,3 \pm 2,4\%$ , skrócenie długości pędu o  $16,7 \pm 1,8\%$  i korzenia o  $18,8 \pm 1,3\%$ , zwiększenie zawartości nadtlenu wodoru o  $28,1 \pm 22,0\%$  oraz zwiększenie o  $17,6 \pm 4,9\%$  stabilności błon komórkowych w warunkach kontrolnych. W roślinach transgenicznych z supresją *HvGSK3.1* uprawianych w 15% PEG 10 000 wykazano wzrost biomasy o  $36,3 \pm 7,5\%$  oraz mniejszą o  $15,6 \pm 2,1\%$  długość korzeni. Pozostałe zmiany notowane w liniach transgenicznych pod wpływem stresu osmotycznego oscylowały w zakresie zmian notowanych w warunkach kontrolnych. Zatem można przypuszczać, że gen ten nie uczestniczy w reakcji roślin na stres

osmotyczny. W roślinach uprawianych w 200 mM NaCl z obniżoną ekspresją *HvGSK3.1* stwierdzono wyższą o 35,8±7,9% biomasa, większą o 6,9±3,1% suchą masę liści, mniejszą o 7,0±1,7% powierzchnię pierwszego liścia, krótsze o 18,2±3,5% pędy oraz krótsze o 21,7±2,1% korzenie, a także większą przepuszczalność błon komórkowych o 20,3±1,4% oraz niższą o 13,1±10,6% zawartość nadtlenku wodoru. W grupie tej stwierdzono wyższą o 10,2±2,2% ekspresję *HvDwarf4* oraz niższą o 51,0±2,0% ekspresję *HvDhn5*. Wykazano silną dodatnią korelację (0,98 p = 0,001) pomiędzy ekspresją *HvGSK3.1* a ekspresją *HvDhn5* w stresie zasolenia. Analiza linii transgenicznych z obniżoną ekspresją *HvGSK3.1* wykazała redukcję liczby pędów o 12,2±4,8%, większą o 9,7±1,4% wysokość pierwszego pędu, większą o 5,4±5,8% długość międzywęźli oraz dłuższe o 5,7±2,0% kłosa. Wykazano silną korelację (0,96, p=0,003) pomiędzy wysokością pierwszego pędu i długością międzywęźli oraz silną ujemną korelację (-0,92, p=0,009) pomiędzy liczbą pędów a długością kłosa. Uzyskane w pierwszej części pracy wyniki mogą wskazywać na udział *HvGSK3.1* w szlaku sygnałowym BR, ponieważ wszystkie testowane linie charakteryzował wyższy poziom ekspresji *HvDwarf4*, zarówno w warunkach kontrolnych jak i pod wpływem działania stresorów. Rośliny te charakteryzowały się też większą biomasa. Mutanty *A. thaliana* o zwiększonej aktywności *AtSK32*, ortologa z tej samej grupy wykazywały fenotyp podobny do mutantów *bri1* [47], co dodatkowo potwierdza hipotezę udziału *HvGSK3.1* w szlaku sygnałowym BR. Tylko rośliny uprawiane w 200 mM NaCl wykazały obniżony poziom ekspresji *HvDhn5*, co może sugerować, że *HvGSK3.1* poprzez regulację szlaku sygnałowego ABA uczestniczy w tolerancji jęczmienia na stres zasolenia.

Wykazano, że linie transgeniczne z obniżoną ekspresją *HvGSK4.1* uprawiane w warunkach kontrolnych mają większą o 8,6±8,3% biomasa, mniejszą o 16,5±5,7% powierzchnię pierwszego liścia, mniejszą o 9,7±10,3% suchą masę liści, większą o 10,9±8,2% zawartość nadtlenku wodoru, mniejszą stabilność membran o 23,5±6,7% oraz wyższą ekspresję *HvDhn5* notowaną na poziomie 14,1±1,1% i *HvDwarf4* na poziomie 5,6±2,2%. Wykazano ujemną korelację (-0,089, p=0,019) pomiędzy ekspresją *HvGSK4.1* a ekspresją *HvDhn5*, a także dodatnią korelację (0,87, p=0,025) pomiędzy biomasa a zawartością nadtlenku wodoru. Linie transgeniczne uprawiane w 15% PEG 10 000 podobnie jak linie transgeniczne uprawiane w warunkach kontrolnych wykazały większą o 4,6±6,5% biomasa, mniejszą o 14,0±8,3% powierzchnię pierwszego liścia, mniejszą o 14,3±9,0% suchą masę liści, krótsze o 18,6±4,5% pędy oraz krótsze o 22,3±1,4% korzenie, większą o 14,0±19,2% zawartość nadtlenku wodoru oraz niższą o 11,1±3,0% ekspresję i wyższą o 4,6±3,5% ekspresję *HvDwarf4*. Supresja *HvGSK4.1* w liniach transgenicznych uprawianych w 200 mM NaCl wykazała większą o 8,2±3,5% biomasa, mniejszą o 16,2±2,6% długość pędu, oraz krótsze o 19,3±3,4% korzenie, mniejszą o 7,8±6,7% suchą masę liści, niższą o 13,1±10,6% zawartość nadtlenku wodoru, mniejszą o 29,9±1,5% stabilność membran oraz niższą o 49,0±0,9% ekspresję *HvDhn5*. Wykazano silną dodatnią korelację (0,99, p=0,000) pomiędzy ekspresją *HvGSK4.1* a ekspresją *HvDhn5*. W liniach transgenicznych z supresją *HvGSK4.1* uzyskano redukcję liczby pędów o 19,8±8,1%, większą o 65,5±9,7% powierzchnię liścia flagowego oraz większą o 5,6±6,0% masę tysiąca ziarniaków. Wykazano dodatnią zależność pomiędzy poziomem ekspresji *HvGSK4.1* a liczbą pędów i ujemną zależność pomiędzy ekspresją *HvGSK4.1* a powierzchnią liścia flagowego.

Przedstawione wyniki badań ze względu na ogólny charakter doświadczeń wykonanych w celu określenia funkcji *HvGSK* w jęczmieniu stanowią podstawę do dalszych projektów prowadzących do bardziej sprecyzowanej charakterystyki genów ukierunkowanej na stadium rozwojowe roślin i docelowe miejsce działania kodowanego przez *HvGSK* enzymu.

## PODSUMOWANIE I WNIOSKI

1. Zidentyfikowano siedem genów *HvGSK* w jęczmieniu, które zaklasyfikowano do czterech scharakteryzowanych w *A. thaliana* grup.
2. Większość *HvGSK*, podobnie jak ich ortologi w *A. thaliana* i *O. sativa* charakteryzuje zachowana struktura intronów i egzonów. Kodowane przez nie białka mają konserwowane motywy charakterystyczne dla kinaz kodowanych przez tę rodzinę genów.

3. Wykazano, że geny *HvGSK* w jęczmieniu podobnie jak w *A. thaliana* najwyższej ekspresji ulegają w organach generatywnych.
4. *HvGSK3.1* uczestniczy w regulacji rozwoju roślin uprawianych w warunkach kontrolnych. W roślinach z supresją genu *HvGSK3.1* wykazano większą biomasę oraz mniejszą długość pędu, powierzchnię pierwszego liścia i suchą masę liści.
5. Regulacja zależna od *HvGSK* jest niezbędna do prawidłowego rozwoju korzeni w warunkach kontrolnych. Obniżenie ekspresji *HvGSK1.2*, *HvGSK3.1* i *HvGSK4.1* inhibuje rozwój korzeni, natomiast obniżenie ekspresji *HvGSK2.1* działa przeciwnie, stymulując rozwój korzeni.
6. *HvGSK* regulują rozwój roślin w warunkach stresu osmotycznego i zasolenia. Obniżenie ekspresji *HvGSK1.2* i *HvGSK3.1* a także *HvGSK2.1* koreluje z mniejszą długością pędów odpowiednio w zasoleniu i w stresie osmotycznym.
7. Wyższa ekspresja *HvDwarf4* w roślinach z obniżoną ekspresją genów *HvGSK2.1* i *HvGSK3.1* uprawianych w stresorze zasolenia, wskazuje na indukcję szlaku biosyntezy BR i udział tych dwóch genów w tolerancji zasolenia.
8. Niższa ekspresja *HvDhn5* w roślinach z obniżoną ekspresją genów *HvGSK* uprawianych w stresorze osmotycznym i stresorze zasolenia wskazuje na udział *HvGSK* w regulacji szlaku sygnałowego ABA. Niższą ekspresję *HvDhn5* (genu regulowanego przez ABA) uzyskano w liniach z obniżoną ekspresją *HvGSK1.2* i *HvGSK2.1* w stresie osmotycznym oraz wszystkich *HvGSK* w stresie zasolenia.
9. *HvGSK1.2* uczestniczy w rozwoju ziarniaków oraz reguluje rozwój kwiatostanu. Wykazano silną ujemną korelację pomiędzy ekspresją *HvGSK1.2* a masą tysiąca ziarniaków.
10. Geny *HvGSK1.2* i *HvGSK4.1* regulują rozwój liścia flagowego. Wykazano ujemną zależność pomiędzy ekspresją tych genów a powierzchnią liścia flagowego.
11. Geny *HvGSK* wpływają na liczbę rozwijanych pędów. Obniżenie ekspresji genów *HvGSK* powodowało redukcję liczby pędów w jęczmieniu.
12. *HvGSK3.1* reguluje wysokość roślin. Wykazano ujemną zależność pomiędzy ekspresją *HvGSK3.1* a wysokością pierwszego pędu i długością międzywęzła.

## LITERATURA

1. Saidi Y, Hearn TJ, Coates JC: Function and evolution of 'green' GSK3/SHAGGY-like kinases. *Trends Plant Science* 2012, 17(1):39-46.
2. Yoo M-J, Albert VA, Soltis PS, Soltis DE: Phylogenetic diversification of Glycogen Synthase Kinase 3/SHAGGY-like kinase genes in plants. *BMC Plant Biology* 2006, 6(1):3.
3. Koh S, Lee SC, Kim MK, Koh JH, Lee S, An G, Choe S, Kim SR: T-DNA tagged knockout mutation of rice *OsGSK1*, an orthologue of Arabidopsis *BIN2*, with enhanced tolerance to various abiotic stresses. *Plant Mol Biol* 2007, 65(4):453-466.
4. Tong H, Chu C: Brassinosteroid signaling and application in rice. *Journal of Genetics Genomics* 2012, 39(1):3-9.
5. Tong H, Jin Y, Liu W, Li F, Fang J, Yin Y, Qian Q, Zhu L, Chu C: DWARF AND LOW-TILLERING, a new member of the GRAS family, plays positive roles in brassinosteroid signaling in rice. *The Plant Journal* 2009, 58(5):803-816.
6. Bittner T, Campagne S, Neuhaus G, Rensing SA, Fischer-Iglesias C: Identification and characterization of two wheat Glycogen Synthase Kinase 3/SHAGGY-like kinases. *BMC Plant Biology* 2013, 13(1):64.
7. Corvalan C, Choe S: Identification of brassinosteroid genes in *Brachypodium distachyon*. *BMC Plant Biology* 2017, 17(1):5.
8. De Rybel B, Audenaert D, Vert G, Rozhon W, Mayerhofer J, Peelman F, Coutuer S, Denayer T, Jansen L, Nguyen L *et al*: Chemical inhibition of a subset of *Arabidopsis thaliana* GSK3-like kinases activates brassinosteroid signaling. *Chemistry & Biology* 2009, 16(6):594-604.
9. Choe S, Schmitz RJ, Fujioka S, Takatsuto S, Lee MO, Yoshida S, Feldmann KA, Tax FE: Arabidopsis brassinosteroid-insensitive *dwarf12* mutants are semidominant and defective in a Glycogen Synthase Kinase 3beta-like kinase. *Plant Physiology* 2002, 130(3):1506-1515.
10. Groszyk J, Yanushevska Y, Zielezinski A, Nadolska-Orczyk A, Karlowski WM, Orczyk W: Annotation and profiling of barley Glycogen Synthase3/Shaggy-like genes indicated shift in organ-preferential expression. *PLoS One* 2018, 13(6):e0199364.
11. Youn JH, Kim TW: Functional insights of plant GSK3-like kinases: multi-taskers in diverse cellular signal transduction pathways. *Molecular Plant* 2015, 8(4):552-565.

12. Charrier B, Champion A, Henry Y, Kreis M: Expression profiling of the whole Arabidopsis SHAGGY-like kinase multigene family by real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Plant Physiology* 2002, 130(2):577-590.
13. Harwood WA, Bartlett JG, Alves SC, Perry M, Smedley MA, Leyl N, Snape JW: Barley transformation using Agrobacterium-mediated techniques. *Methods Molecular Biology* 2009, 137-147
14. Marthe C, Kumlehn J, Hensel G: Barley (*Hordeum vulgare* L.) transformation using immature embryos. In: *Agrobacterium Protocols*. Springer 2015: 71-83.
15. Zalewski W, Galuszka P, Gasparis S, Orczyk W, Nadolska-Orczyk A: Silencing of the *HvCKX1* gene decreases the cytokinin oxidase/dehydrogenase level in barley and leads to higher plant productivity. *Journal of Experimental Botany* 2010, 61(6):1839-1851.
16. Gasparis S, Nadolska-Orczyk A: Oat (*Avena sativa* L.). In: *Agrobacterium Protocols*. Springer; 2015: 143-153.
17. Ishida Y, Tsunashima M, Hiei Y, Komari T: Wheat (*Triticum aestivum* L.) transformation using immature embryos. In: *Agrobacterium Protocols*. Springer; 2015: 189-198.
18. Main M, Frame B, Wang K: Rice, Japonica (*Oryza sativa* L.). In: *Agrobacterium Protocols*. Springer; 2015: 169-180.
19. Chen Z, Newman I, Zhou M, Mendham N, Zhang G, Shabala S: Screening plants for salt tolerance by measuring K<sup>+</sup> flux: a case study for barley. *Plant, Cell & Environment* 2005, 28(10):1230-1246.
20. Tang X, Mu X, Shao H, Wang H, Brestic M: Global plant-responding mechanisms to salt stress: physiological and molecular levels and implications in biotechnology. *Critical reviews in biotechnology* 2015, 35(4):425-437.
21. Munns R: Comparative physiology of salt and water stress. *Plant, cell & environment* 2002, 25(2):239-250.
22. Parida AK, Das AB: Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. *Ecotoxicology and environmental safety* 2005, 60(3):324-349.
23. Kalaji HM, Jajoo A, Oukarroum A, Brestic M, Zivcak M, Samborska IA, Cetner MD, Łukasik I, Goltsev V, Ladle RJ: Chlorophyll *a* fluorescence as a tool to monitor physiological status of plants under abiotic stress conditions. *Acta Physiologiae Plantarum* 2016, 38(4):102.
24. Kalaji HM, Bosa K, Kościelniak J, Hossain Z: Chlorophyll *a* fluorescence - a useful tool for the early detection of temperature stress in spring barley (*Hordeum vulgare* L.). *Omics: A Journal of Integrative Biology* 2011, 15(12):925-934.
25. Adem GD, Roy SJ, Zhou M, Bowman JP, Shabala S: Evaluating contribution of ionic, osmotic and oxidative stress components towards salinity tolerance in barley. *BMC Plant Biology* 2014, 14(1):113.
26. Wei W, Bilsborrow PE, Hooley P, Fincham DA, Lombi E, Forster BP: Salinity induced differences in growth, ion distribution and partitioning in barley between the cultivar Maythorpe and its derived mutant Golden Promise. *Plant and Soil* 2003, 250(2):183-191.
27. Bajji M, Kinet J-M, Lutts S: The use of the electrolyte leakage method for assessing cell membrane stability as a water stress tolerance test in durum wheat. *Plant Growth Regulation* 2002, 36(1):61-70.
28. Li J, Nam KH: Regulation of brassinosteroid signaling by a GSK3/SHAGGY-like kinase. *Science* 2002, 295(5558):1299-1301.
29. Li J, Nam KH, Vafeados D, Chory J: BIN2, a new brassinosteroid-insensitive locus in Arabidopsis. *Plant Physiology* 2001, 127(1):14-22.
30. Wang Z-Y, Nakano T, Gendron J, He J, Chen M, Vafeados D, Yang Y, Fujioka S, Yoshida S, Asami T *et al*: Nuclear-localized BZR1 mediates brassinosteroid-induced growth and feedback suppression of brassinosteroid biosynthesis. *Developmental Cell* 2002, 2(4):505-513.
31. Yan Z, Zhao J, Peng P, Chihara RK, Li J: BIN2 functions redundantly with other Arabidopsis GSK3-like kinases to regulate brassinosteroid signaling. *Plant Physiology* 2009, 150(2):710-721.
32. Yin Y, Wang Z-Y, Mora-Garcia S, Li J, Yoshida S, Asami T, Chory J: BES1 accumulates in the nucleus in response to brassinosteroids to regulate gene expression and promote stem elongation. *Cell* 2002, 109(2):181-191.
33. Cai Z, Liu J, Wang H, Yang C, Chen Y, Li Y, Pan S, Dong R, Tang G, Barajas-Lopez Jde D: GSK3-like kinases positively modulate abscisic acid signaling through phosphorylating subgroup III SnRK2s in Arabidopsis. *Proceedings of National Academy of Sciences of the USA* 2014, 111(26):9651-9656.
34. Hu Y, Yu D: BRASSINOSTEROID INSENSITIVE2 interacts with ABSCISIC ACID INSENSITIVE5 to mediate the antagonism of brassinosteroids to abscisic acid during seed germination in Arabidopsis. *Plant Cell* 2014, 26(11):4394-4408.
35. Okushima Y, Mitina I, Quach HL, Theologis A: AUXIN RESPONSE FACTOR 2 (ARF2): a pleiotropic developmental regulator. *The Plant Journal* 2005, 43(1):29-46.
36. Vert G, Walcher CL, Chory J, Nemhauser JL: Integration of auxin and brassinosteroid pathways by Auxin Response Factor 2. *Proceedings of National Academy of Sciences of the USA* 2008, 105(28):9829-9834.
37. Bai MY, Shang JX, Oh E, Fan M, Bai Y, Zentella R, Sun TP, Wang ZY: Brassinosteroid, gibberellin and phytochrome impinge on a common transcription module in Arabidopsis. *Nature Cell Biology* 2012, 14(8):810-817.

38. Gallego-Bartolomé J, Minguet EG, Grau-Enguix F, Abbas M, Locascio A, Thomas SG, Alabadi D, Blázquez MA: Molecular mechanism for the interaction between gibberellin and brassinosteroid signaling pathways in Arabidopsis. *Proceedings of National Academy of Sciences of the USA* 2012, 109(33):13446-13451.
39. Wang L, Wang Z, Xu Y, Joo SH, Kim SK, Xue Z, Xu Z, Wang Z, Chong K: OsGSR1 is involved in crosstalk between gibberellins and brassinosteroids in rice. *Plant Journal* 2009, 57(3):498-510.
40. Gruszka D, Szarejko I, Maluszynski M: Identification of barley DWARF gene involved in brassinosteroid synthesis. *Plant Growth Regulation* 2011, 65(2):343-358.
41. Gruszka D, Janeczko A, Dziurka M, Pocięcha E, Oklestkova J, Szarejko I: Barley brassinosteroid mutants provide an insight into phytohormonal homeostasis in plant reaction to drought stress. *Frontiers in Plant Science* 2016, 7:1824.
42. Dornelas MC, Van Lammeren AA, Kreis M: *Arabidopsis thaliana* SHAGGY-related protein kinases (AtSK11 and 12) function in perianth and gynoecium development. *The Plant Journal* 2000, 21(5):419-429.
43. Dornelas MC, Wittich P, von Recklinghausen I, van Lammeren A, Kreis M: Characterization of three novel members of the Arabidopsis SHAGGY-related protein kinase (ASK) multigene family. *Plant Molecular Biology* 1999, 39(1):137-147.
44. Jonak C, Heberle-Bors E, Hirt H: Inflorescence-specific expression of AtK-1, a novel Arabidopsis thaliana homologue of SHAGGY/Glycogen Synthase Kinase-3. *Plant Molecular Biology* 1995, 27(1):217-221.
45. Dal Santo S, Stampfl H, Krasensky J, Kempa S, Gibon Y, Petutschnig E, Rozhon W, Heuck A, Clausen T, Jonak C: Stress-induced GSK3 regulates the redox stress response by phosphorylating glucose-6-phosphate dehydrogenase in Arabidopsis. *The Plant Cell* 2012:tpc.112.101279.
46. Yang X, Bai Y, Shang J, Xin R, Tang W: The antagonistic regulation of abscisic acid-inhibited root growth by brassinosteroids is partially mediated via direct suppression of ABSCISIC ACID INSENSITIVE 5 expression by BRASSINAZOLE RESISTANT 1. *Plant Cell Environmental* 2016, 39(9):1994-2003.
47. Rozhon W, Mayerhofer J, Petutschnig E, Fujioka S, Jonak C: ASKtheta, a group-III Arabidopsis GSK3, functions in the brassinosteroid signalling pathway. *Plant Journal* 2010, 62(2):215-223.