

# Określenie profilu ekspresji genu *HvSNAC1* (*Stress-responsive NAC1*) u jęczmienia podczas traktowania stresem zimna

Paulina Kościelniak i Marzena Kurowska

Katedra Genetyki, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Uniwersytet Śląski w Katowicach, Polska  
adres email: pkoscielniak1@us.edu.pl

## WSTĘP

Rodzina NAC jest jedną z największych rodzin czynników transkrypcyjnych, specyficzną dla roślin. Nazwa jej pochodzi od nazw pierwszych zidentyfikowanych członków tej rodziny *NAM* (*No Apical Meristem*), *ATAF1-2* (*Arabidopsis thaliana Transcription Factor*) oraz *CUC2* (*Cup-shaped Cotyledon*). Białka należące do tej rodziny posiadają wysoce konserwowaną domenę wiążącą DNA, zlokalizowaną na końcu N-terminalnym, nazywaną domeną NAC. Członkowie tej rodziny pełnią ważne dla roślin funkcje we wzroście, rozwoju oraz tolerancji na stresy abiotyczne i biotyczne. Gen *HvSNAC1* (*Stress-responsive NAC1*) jest członkiem rodziny czynników transkrypcyjnych NAC i został zidentyfikowany w genomie jęczmienia jako ortolog wcześniej opisanego genu u ryżu (Kurowska i inni, 2011). *SNAC1* u ryżu reguluje kompleksową sieć genów, powodując zwiększoną tolerancję na stres spowodowany niedoborem wody oraz zasoleniem. Regulowane geny związane są ze szlakiem transdukcji sygnału, który prowadzi do zamknięcia aparatów szparkowych, produkcji osmolitów, detoksyfikacji i utrzymania potencjału redox oraz ochrony makromolekuł. Natomiast u jęczmienia ekspresja genu *HvSNAC1* jest indukowana np. przez suszę. Stres zimna jest jednym ze stresów abiotycznych, który wpływa na wzrost, rozwój i produktywność roślin. Identyfikacja czynników transkrypcyjnych, które regulują ekspresję innych genów oraz poznanie molekularnych podstaw odporności na stres zimna u zbóż jest bardzo ważnym aspektem badań mających na celu uzyskanie odmian z podwyższoną tolerancją na stres zimna.

## CEL PRACY

Celem przedstawionej pracy jest stwierdzenie: (1) czy ekspresja genu *HvSNAC1* jest indukowana przez stres zimna u jęczmienia, (2) określenie profilu ekspresji tego genu podczas traktowania stresem zimna.

## MATERIAŁ I METODY

Materiał do badań stanowił jęczmień jary, odmiany dwurzędowej 'Sebastian'. Odmiana ta charakteryzuje się wysokim potencjałem plonotwórczym, dobrą jakością słodowania, odpornością na wyleganie i wysoką odpornością na rdzę źdźbłową (*Puccinia graminis*) oraz rdzę jęczmienia (*Puccinia hordei*). Charakteryzuje się również średnią odpornością na mączniaka prawdziwego (*Blumeria graminis* f.sp. *hordei*), plamistość siatkową jęczmienia (*Pyrenophora teres*) oraz rynchosporiozę liści jęczmienia (*Rhynchosporium secalis*) (Szurman-Zubrzycka i inni, 2018).

### Traktowanie stresem zimna

- Sterylizacja ziarniaków jęczmienia przez 20 minut w 20% podchlorynie sodu
- Ziarniaki wyłożono na sterylną wilgotną watę i zamknięto w dwóch szklanych próbkach typu Hagedorn
- Probówki połączone parafilmem i umieszczono na statywie
- Wzrost roślin był prowadzony w pokoju hodowlanym w temperaturze 21° C, fotoperiodzie 16| 8 h (dzień| noc), przy oświetleniu 200  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}^{-1}$  przez 6 dni
- Nagłe wychłodzenie przez 20 minut w lodzie (Figura 1) – rozpoczęcie traktowania
- Przeniesienie do pokoju hodowlanego o stałej temperaturze 4° C (Figura 2)
- Pobranie tkanki z liścia w wybranych punktach czasowych: 1, 6, 24 i 48 h oraz 3, 4 i 5 dniach traktowania stresem zimna
- Tkankę liści zamrażano w ciekłym azocie i umieszczano w temperaturze - 80° C do czasu izolacji RNA

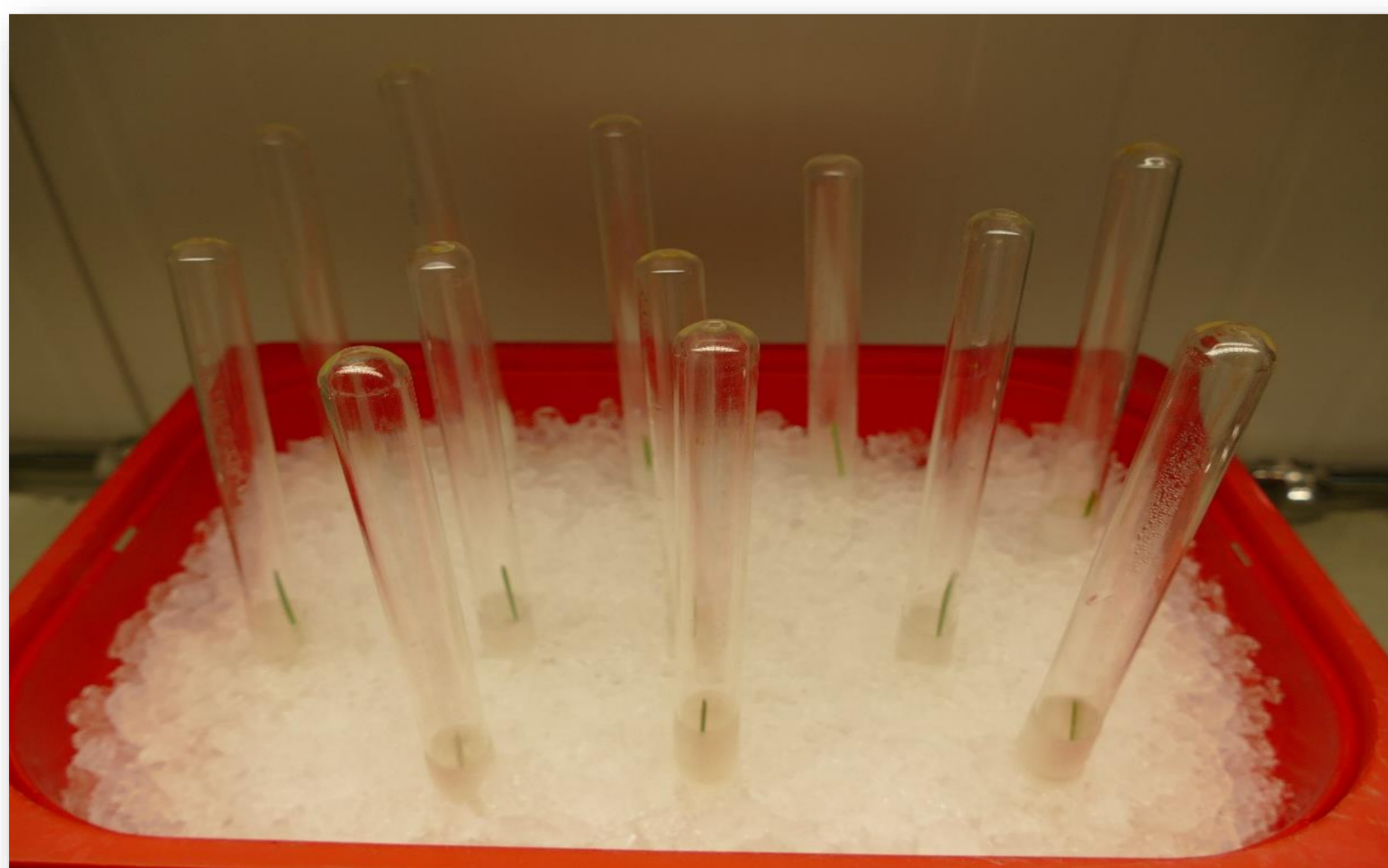


Figura 1. Siewki jęczmienia rosnące w aeroponie poddane nagłemu wychłodzeniu przez włożenie do lodu.

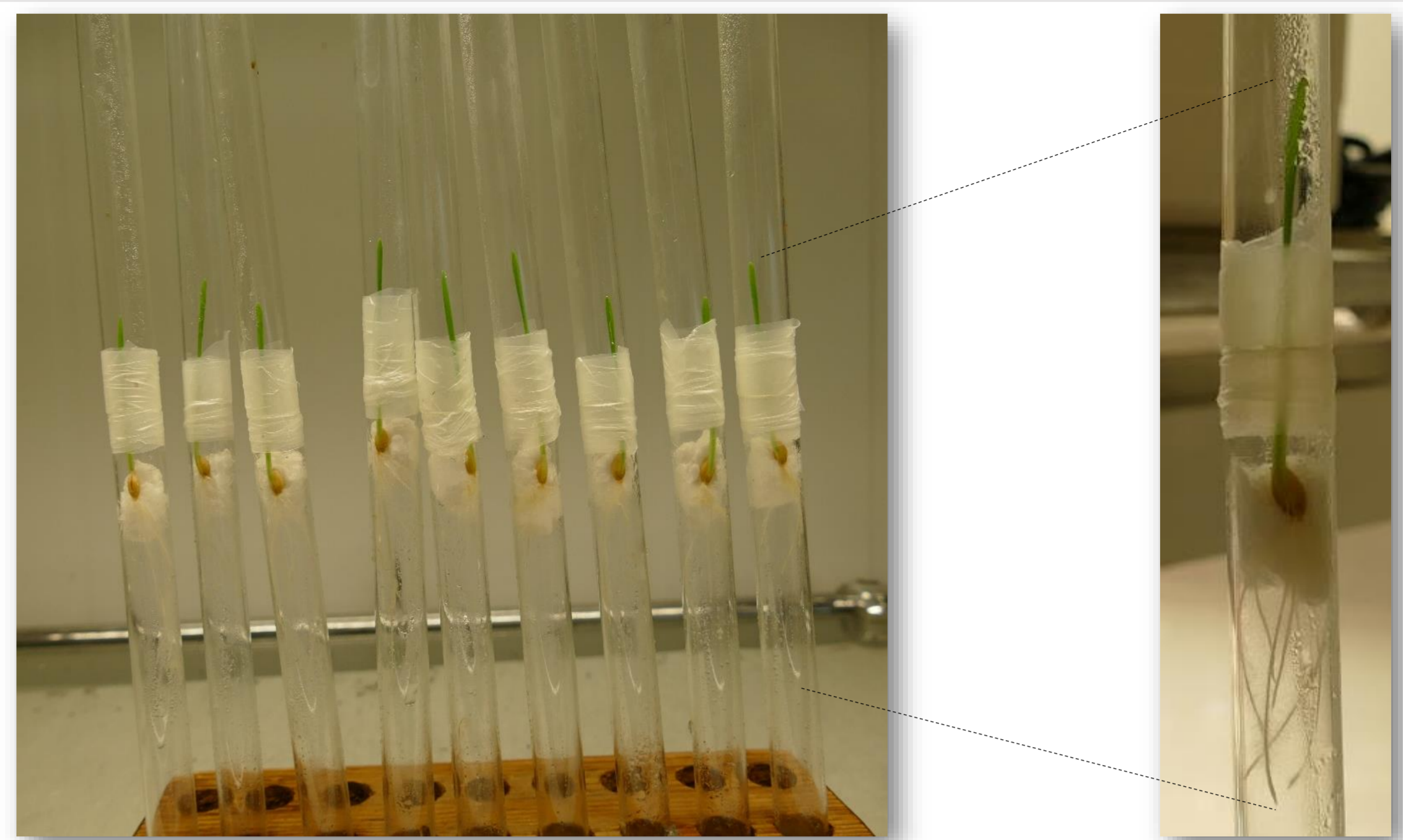
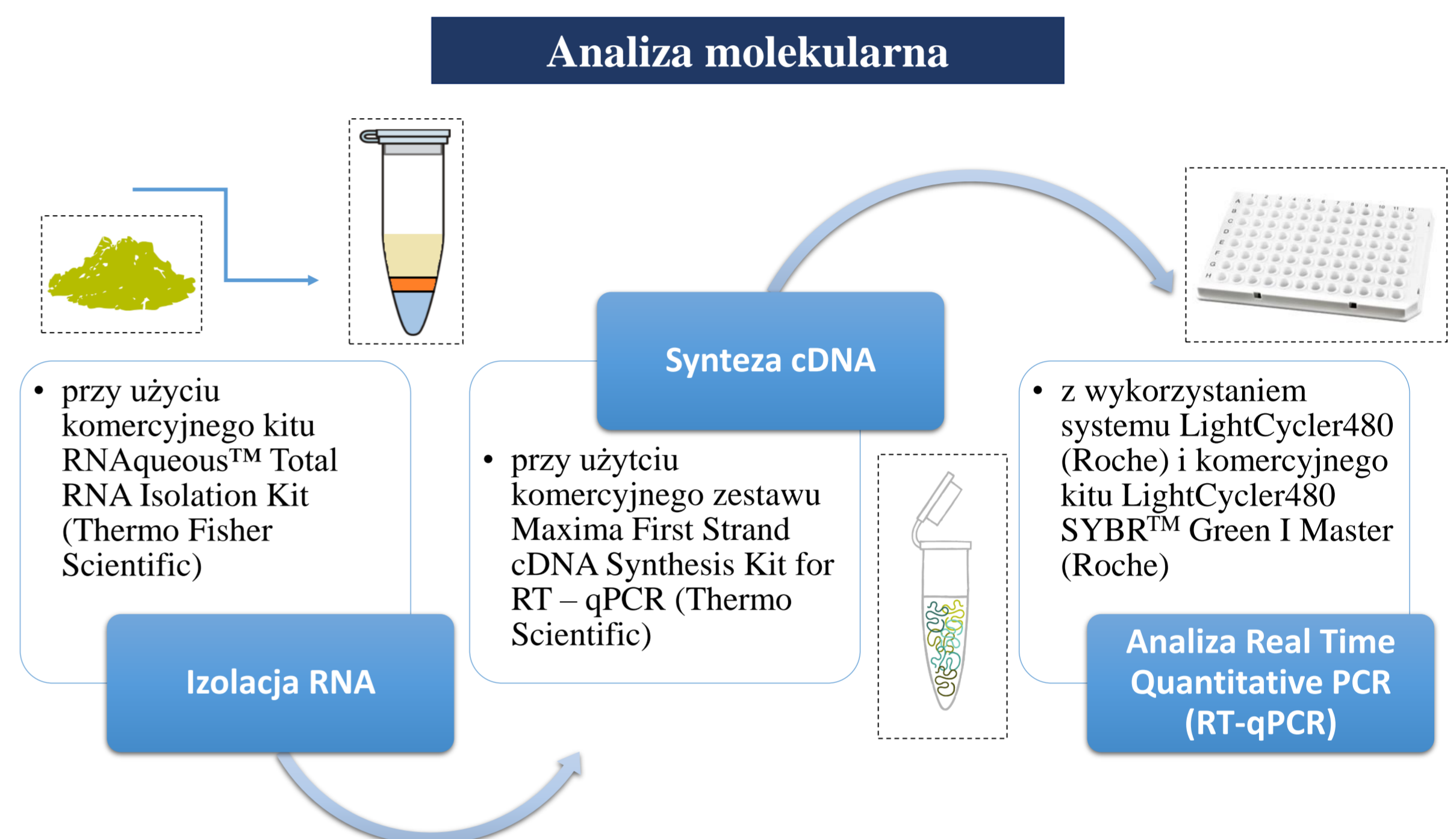


Figura 2. Siewki jęczmienia rosnące w aeroponie w pokoju hodowlanym o temperaturze 4° C, fotoperiodzie 16| 8 godzin (dzień| noc), przy oświetleniu 200  $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}^{-1}$ .



Obliczono względny poziom ekspresji oparty o porównywanie wartości Ct dla genu badanego i referencyjnego (metoda  $\Delta\Delta\text{Ct}$ ) (Livak i Schmittgen, 2001). Jako genu referencyjnego użyto *ADP* (*ADP-ribozylacja factor 1*).

## WYNIKI

Określono profil ekspresji genu *HvSNAC1* podczas traktowania stresem zimna (Figura 3). Największy wzrost ekspresji, bo 11-krotny zaobserwowano po 6 h traktowania stresem zimna. Analizowany gen ulega również podwyższonej ekspresji po 1 i 24 h traktowania. Jednak ten wzrost nie był już tak duży, blisko 3-krotny.

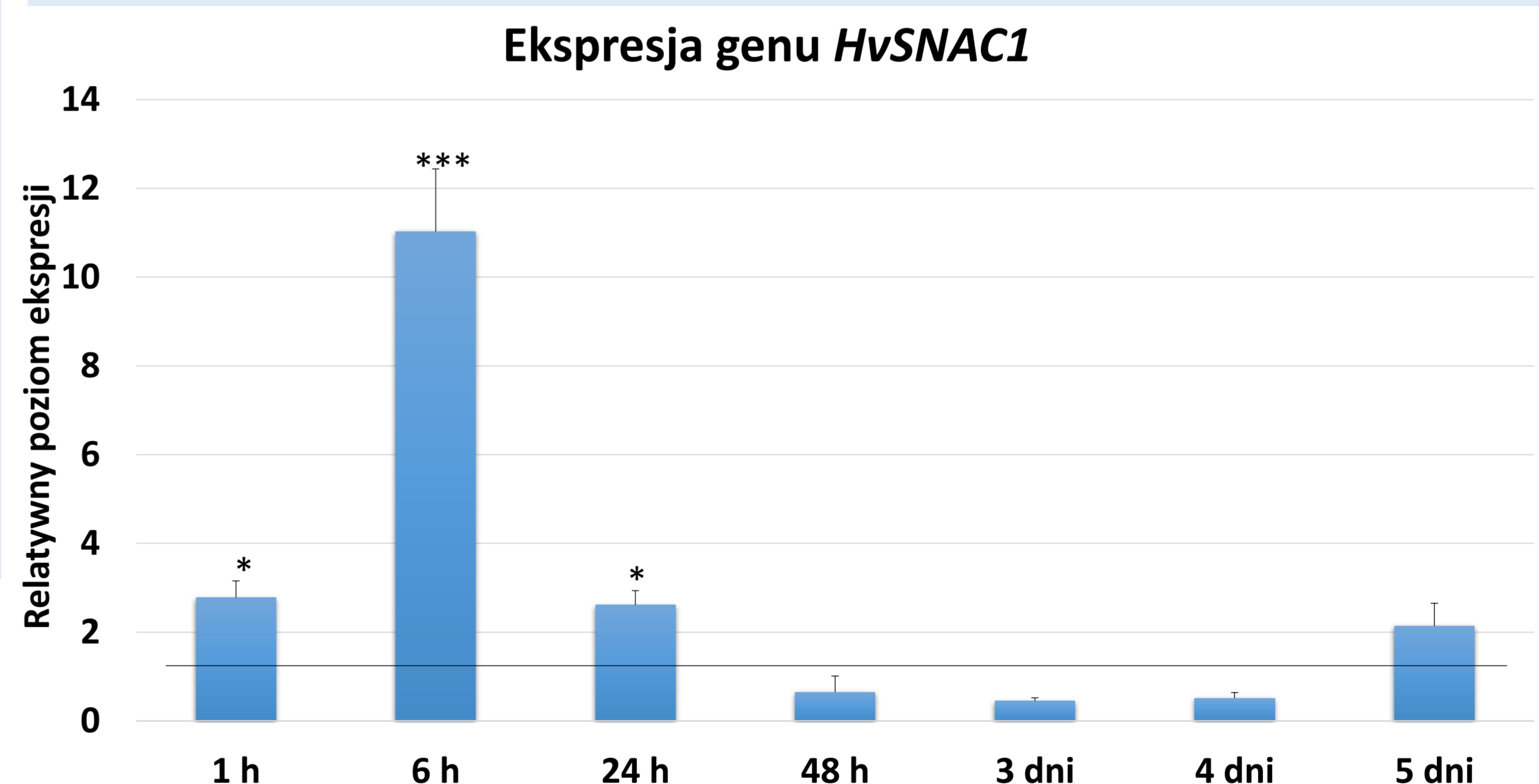


Figura 3. Względny poziom ekspresji genu *HvSNAC1* u odmiany 'Sebastian' po traktowaniu stresem zimna przez 1, 6, 24 i 48 h oraz 3, 4 i 5 dni. Linia zaznacza poziom ekspresji genu *HvSNAC1* u nietraktowanych zimnem siewek odmiany 'Sebastian'. Analiza statystyczna została przeprowadzona z wykorzystaniem testu Fishera najmniejszych istotnych różnic (NIR). Różnice istotne statystycznie względem siewek jęczmienia nietraktowanych zimnem są zaznaczone odpowiednio: \* $p \leq 0,05$ ; \*\*\* $p \leq 0,001$ . Analizę przeprowadzono wykorzystując 3 powtórzenia biologiczne stanowiące liście zebrane z 3 indywidualnych siewek w każdym analizowanym punkcie traktowania i 2 techniczne.

## WNIOSKI

Ekspresja genu *HvSNAC1* jest indukowana przez stres zimna, a największy jej wzrost następuje po 6 h traktowania.

## PODZIĘKOWANIA

Badania prezentowane na niniejszym plakacie zostały wykonane w ramach grantu Rektora Uniwersytetu Śląskiego dla najlepszych studentów w roku 2018 oraz programu tutorskiego realizowanego na Wydziale Biologii i Ochrony Środowiska Uniwersytetu Śląskiego (www.tutor.us.edu.pl).

## REFERENCJE

- Livak T. and Schmittgen T. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  method. *Methods* 25:402–408
- Kurowska M., Goras S., Daszkowska-Golec A., Maluszyński M. and Szarejko I. 2011. *Hordeum vulgare* subsp. *vulgare* cultivar Sebastian stress-induced transcription factor *SNAC1* gene. *NCBI GeneBank*. Account number: JF796130.1
- Szurman-Zubrzycka M., Zbieszek J., Marzec M., Jelonk J., Chmielewska B., Kurowska M., Krok M., Daszkowska-Golec A., Guzy-Wroblewska J., Gruska D., Gajewska M., Gajewska P., Stolarek M., Tylec P., Segal P., Lip S., Kudelko M., Lorek M., Gornik-Wales M., Malolepszy A., Podsiadło N., Strycharz K., Keina A., Mbanzo Z., Todorowska E., Gaj M., Nita Z., Orłowska-Job W., Maluszyński M. and Szarejko I. 2018. *HorTILLUS* – a rich and renewable source of induced mutations for forward/reverse genetics and pre-breeding programs in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Frontiers in Plant Science* 9:216