

Streszczenie

Glin jest trzecim najczęściej występującym pierwiastkiem w skorupie ziemskiej. Wykazuje on toksyczne działanie w glebach kwaśnych. W środowisku o niskim pH glin działa genotoksycznie, powodując uszkodzenia DNA oraz zatrzymanie cyklu komórkowego. Jęczmień jest jednym z najbardziej wrażliwych zbóż na stres glinu, a efekt jego działania przejawia się w ograniczeniu wzrostu i rozwoju roślin, a w konsekwencji obniżeniu plonów. Zahamowanie wzrostu korzeni jest powszechnie znanym wskaźnikiem w odpowiedzi na stres glinu. Obok pH na toksyczność glinu wpływa wiele czynników, w tym rodzaj pożywki (w warunkach laboratoryjnych), stężenie glinu i czas ekspozycji.

Celem pracy doktorskiej była ocena efektów działania glinu w komórkach korzeni jęczmienia zwyczajnego odmiany wyjściowej Sebastian oraz mutantu *hvatr.g* (Ataxia Telangiectasia and RAD3 Related, ATR), o podwyższonej tolerancji na glin, ze szczególnym uwzględnieniem uszkodzeń DNA oraz zaburzeń cyklu komórkowego. W związku z wpływem glinu na wzrost korzeni przeprowadzono również analizę zmian histologiczno-anatomicznych korzeni oraz składu ściany komórkowej.

Wykazano, że glin powoduje w komórkach jęczmienia odmiany wyjściowej Sebastian działanie genotoksyczne – indukuje powstawanie mikrojąder, uszkodzeń jąder komórkowych, oraz bezpośrednich uszkodzeń DNA w formie pęknięć wykrywanych w teście TUNEL. W ramach oceny wpływu glinu na cykl komórkowy zastosowano cytometrię przepływową oraz metodę inkorporacji i wykrywania analogu tymidyny EdU. Zmiany w cyklu komórkowym obejmowały, obok obniżenia aktywności mitotycznej komórek, zmniejszenie częstości jąder komórkowych w fazie S i zwiększenie ich częstości w fazie G2/M.

Analiza histologiczna korzeni odmiany wyjściowej Sebastian i mutantu *hvatr.g* rosnących w pożywkach o różnych pH i z dodatkiem chlorku glinu pokazała różnice w budowie korzeni. Wśród nich zaobserwowano wzrost średnicy korzenia, skrócenie czapeczki korzenia, wzrost wielkości komórek ryzodermalnych oraz podziały komórek egzodermy i kory.

Analiza obecności i rozmieszczenia epitopów pektynowych, rozpoznawanych przez przeciwciała LM5, LM6, LM19 i LM20 wykazała różnice w korzeniach odmiany Sebastian: kontrolnych i traktowanych chlorkiem glinu. Ponadto wykazano, że odpowiedź komórek na glin może być wyrażona przez specyficzne rozmieszczenie pektyn w ścianie komórkowej, a tym samym brać udział w mechanizmie hamowania wzrostu korzeni. Ponadto wykazano, że metyloestryfikowane HG mogą być markerem nowo powstających ścian komórkowych

w warunkach stresu glinu. Obserwowano zmiany histologiczne w korzeniach odmiany rodzicielskiej w kontroli o pH 6, pH 4 i z dodatkiem chlorku glinu.

Wykorzystanie mutantu *hvatr.g* pozwoliło na opisanie roli ATR w szlaku DDR w komórkach jęczmienia oraz funkcji genu *HvATR* w odpowiedzi na uszkodzenia DNA wywołane toksycznością glinu. Podjęto również analizę możliwej roli szlaku DDR, zależnego od ATR, w odpowiedzi na inny czynnik uszkadzający DNA, chemiczny klastogen – hydrazyd kwasu maleinowego (MH). Komórki merystematyczne korzeni mutantu *hvatr.g* charakteryzowały się wysokim poziom uszkodzeń DNA w warunkach kontrolnych, co może wskazywać na zaburzony szlak DDR. Wysoka częstość uszkodzeń DNA nie prowadziła do zahamowania cyklu komórkowego, ale mutant wykazywał zwiększoną liczbę komórek w fazie G2/M. W odpowiedzi na traktowanie chlorkiem glinu i MH, *hvatr.g* wykazywał wysoki poziom tolerancji – nie zaobserwowano zatrzymania wzrostu korzeni tak jak u odmiany wyjściowej Sebastian. Ponadto traktowanie chlorkiem glinu i MH zwiększało poziom uszkodzeń DNA, ale nie wpływało na aktywność mitotyczną i profil cyklu komórkowego w komórkach mutantu *hvatr.g*. Badania efektu działania glinu i MH w komórkach mutantu *hvatr.g* jęczmienia, o uszkodzonej ścieżce naprawy DNA, i jego odmiany wyjściowej Sebastian pozwoliły na potwierdzenie roli genu *HvATR* w mechanizmie odpowiedzi na badane czynniki. Upośledzony mechanizm odpowiedzi na uszkodzenia DNA może być przyczyną tolerancji na glin i MH.