

STRESZCZENIE

Molekularne i fizjologiczne podstawy osmokondycjonowania nasion rzepaku (*Brassica napus* L.)

Kiełkowanie to bardzo złożony i dynamiczny etap w rozwoju ontogenetycznym rośliny, obejmujący szereg przemian metabolicznych rozpoczynających się pobraniem wody przez suche, dojrzałe nasiono a zakończonych przebicciem okrywy nasiennej przez oś zarodkową. Osmokondycjonowanie to jedna z metod stosowanych w celu zwiększenia zdolności nasion do kiełkowania a także tolerancji na abiotyczne i biotyczne czynniki środowiskowe. Zabieg ten polega na uwodnieniu nasion w ściśle kontrolowanych warunkach w stopniu pozwalającym na rozbudzenie ich aktywności metabolicznej ale niewystarczającym do przebiccia okrywy nasiennej. Celem nadrzędnym pracy doktorskiej było poznanie molekularnych i fizjologicznych mechanizmów odpowiedzialnych za polepszenie parametrów kiełkowania kondycjonowanych nasion *Brassica napus*. Określono zmiany ekspresji genów oraz profili białkowych nasion podczas kluczowych etapów kondycjonowania (moczenie nasion w PEG-u, suszenie nasion) jak również podczas kiełkowania kondycjonowanych nasion. W celu poznania mechanizmów odpowiedzialnych za zwiększenie tolerancji kondycjonowanych nasion na zasolenie, zbadano poziom akumulacji proliny oraz zmiany ekspresji genów i aktywność enzymów zaangażowanych w obrót metaboliczny proliny podczas kondycjonowania i kiełkowania kondycjonowanych nasion rzepaku na wodzie oraz w obecności chlorku sodu o stężeniu 100 mM.

Osmokondycjonowanie zwiększyło wigor nasion rzepaku, co manifestowało się osiągnięciem lepszych parametrów kiełkowania (wzrost tempa kiełkowania, skrócenie czasu T50, zwiększenie procentu skiełkowanych nasion, wyrównanie kiełkowania). Analiza transkryptomyczna wykazała, że zabieg osmokondycjonowania powodował zmianę poziomu ekspresji 952 genów. Większość genów wykazywała podwyższony poziom ekspresji zarówno podczas kiełkowania jak i osmokondycjonowania nasion. Podczas moczenia nasion w PEGu obserwowano hamowanie ekspresji genów kodujących białka z grupy LEA (*LEA4-1*, *LEA4-5* i *SMP*), natomiast podczas suszenia nasion geny te ulegały aktywacji. Osmokondycjonowanie indukowało ekspresję genów zaangażowanych w transport wody (*TIP2* i *TIP4.1*). Odnotowano także 20-sto krotny wzrost poziomu ekspresji genu *TIP2* w trakcie kiełkowania nasion kondycjonowanych. Podczas fazy moczenia nasion w PEGu zaobserwowano spadek mRNA dla genu *ABI5*, którego następstwem była obniżona ekspresja genów *EM1* i *EM6* podczas kiełkowania. Stwierdzono, że zabieg kondycjonowania wpłynął na zmianę ekspresji genów, których produkty zaangażowane są w translację (*eIF-2*, *eIF4E*, *eEF1B*, *eEF2*), modyfikacje potranslacyjne (*HSP90-7* i *HSP70*), modyfikacje ściany komórkowej (*ELP* i *XTH*), podziały komórkowe (*CDC48C*, *MAP65-1* i *MAP70-2*), organizację cytoszkieletu (*TUBG1*, *TUBB1* i *TUBB3*), transkrypcję (czynniki transkrypcyjne należące do rodzin MYB i NAC oraz podrodziny DREB), degradację innych białek (*DEG2*, *FTSH*, *UBP19*, *UBP21*, *UBP 23*, *SAG12*, geny kodujące karboksypeptydazy serynowe *SCPL*) oraz odpowiedź na stres oksydacyjny (*PER13*, *PER21*, *CAT2*, *MSRB1* i *FER1*). Stosując metodę elektroforezy dwukierunkowej sprzężonej z tandemową spektrometrią mas zidentyfikowano 75 białek, których poziom akumulacji uległ zmianie podczas kluczowych faz osmokondycjonowania oraz kiełkowania osmokondycjonowanych nasion. Większość zidentyfikowanych białek

wykazywała wzrost akumulacji podczas kondycjonowania jak i na etapie kiełkowania nasion. Wśród nich znalazły się białka zaangażowane w translację (eIF4A, eIF3 podjednostka K, eIF6, eEF1), potranslacyjne modyfikacje (HSP70B, HSP17.9, HSP22 i 14-3-3), degradację innych białek (podjednostka alfa proteasomu typu 2-A) oraz w odpowiedź na stres oksydacyjny (POX12, Cu/ZnSOD, GR i DHAR). Wykazano, że te same kategorie funkcjonalne genów i białek podlegały regulacji podczas osmokondycjonowania i kiełkowania osmokondycjonowanych nasion. Poszczególne kategorie funkcjonalne reprezentowane były jednak przez różne zestawy genów i białek (nieliczna grupa genów i białek wykazywała zmiany poziomu ekspresji we wszystkich analizowanych fazach osmokondycjonowania i podczas kiełkowania osmokondycjonowanych nasion). Wynik ten wskazuje, że określony zestaw genów i białek podlega regulacji w ściśle określonej fazie osmokondycjonowania i/lub podczas kiełkowania nasion. Jednocześnie w każdej z faz (moczenie, suszenie, kiełkowanie) uruchamiane są procesy fizjologiczne i biochemiczne specyficzne dla danej fazy. Stwierdzono obecność tylko 12 par transkryptów i odpowiadających im białek, co może wskazywać, że podczas osmokondycjonowania jak kiełkowania osmokondycjonowanych nasion bardzo ważną rolę odgrywa regulacja translacji mRNA i modyfikacje potranslacyjne białek.

Zaobserwowano, że osmokondycjonowanie nasion rzepaku poprawia szybkość i zdolność do kiełkowania w obecności 100 mM NaCl. Stwierdzono, że osmokondycjonowane nasiona akumulowały więcej proliny zarówno w warunkach kontrolnych jak i w obecności NaCl. Poziom proliny był o 60% wyższy podczas ekspozycji kondycjonowanych nasion na zasolenie w porównaniu z nasionami niekondycjonowanymi. W nasionach kondycjonowanych obserwowano znaczący wzrost ekspresji genu *P5CSA* oraz wzrost aktywności enzymu *P5CS* w porównaniu do nasion niekondycjonowanych kiełkujących zarówno w warunkach kontrolnych jak i w warunkach zasolenia. Wykazano również, że poziom ekspresji genu *PDH* i aktywność dehydrogenazy proliny były wyższe w kiełkujących nasionach niekondycjonowanych w porównaniu do nasion kondycjonowanych. Enzym ten odpowiedzialny jest za rozkład proliny, co może sugerować, że podczas kiełkowania w nasionach niekondycjonowanych ma miejsce wzmożony rozkład proliny. Dodatkowo, stwierdzono wyższy poziom nadtlenu wodoru w nasionach osmokondycjonowanych w porównaniu do nasion niekondycjonowanych.

Wyniki analizy transkryptomicznej i proteomicznej wskazują, że wzrost wigoru osmokondycjonowanych nasion może być wynikiem aktywacji procesu syntezy białek, modyfikacji potranslacyjnych i ukierunkowanej proteolizy białek. Ponadto za przyczynę polepszanego kiełkowania kondycjonowanych nasion można uznać podwyższoną ekspresję genów i akumulację białek zaangażowanych w transport wody, modyfikację ściany komórkowej, organizację cytoszkieletu, podziały komórkowe oraz odpowiedź na stres oksydacyjny. Wyniki uzyskane z analiz dotyczących kiełkowania nasion kondycjonowanych w warunkach zasolenia wskazują, że osmokondycjonowanie zwiększa tolerancję kiełkujących nasion rzepaku na zasolenie. Zwiększona tolerancja nasion osmokondycjonowanych na stres zasolenia może wynikać między innymi z akumulacji proliny, która jest wynikiem indukowanej przez nadtlenu wodoru ekspresji genu *P5CSA* oraz zwiększonej aktywności enzymu *P5CS*.