

STRESZCZENIE

Rośliny ze względu na niezdolność do aktywnego poruszania się, w trakcie ewolucji wykształciły szereg mechanizmów działających na różnych poziomach organizacji strukturalnej, które pozwoliłyby na minimalizowanie szkodliwego wpływu czynników środowiskowych. W odpowiedzi na czynniki stresowe rośliny wykorzystują różnorodne szlaki sygnalizacji na poziomie fizjologicznym, biochemicznym i molekularnym. Zbyt niska lub zbyt wysoka temperatura w okresie wegetacyjnym może powodować znaczące zmniejszenie plonu wielu gatunków roślin uprawnych, w tym roślin kapustnych (*Brassisaceae*) takich jak kalafior (*Brassica oleracea* var. *botrytis*). Należy on do najważniejszych gatunków uprawianych zarówno w Polsce, jak i w całej Europie.

Białka z rodziny GRP (ang. *glycine-rich proteins*) stanowią jedną z grup białek biorących czynny udział w procesach związanych ze wzrostem, rozwojem i odpowiedzią na niekorzystne warunki środowiskowe u roślin. Zaangażowanie białek z tej rodziny zostało potwierdzone między innymi w takich procesach, jak kwitnienie, rozwój pyłku, czy wzrost komórek roślinnych. Wiadomo, że białka GRP są zaangażowane w systemy obrony roślin zarówno przed stresem abiotycznym, jak i biotycznym. Dotychczas opublikowane doniesienia sugerowały czynny udział białek GRP w odpowiedzi roślin na zróżnicowane warunki stresowe, m.in. stres obniżonej temperatury, a w mniejszym stopniu podczas aklimatyzacji do stresu ciepła.

Celem niniejszej pracy było kompleksowa charakterystyka odpowiedzi kalafiora na poziomie fizjologicznym, transkryptomycznym, proteomicznym i metabolomicznym w warunkach aklimatyzacji i de-aklimatyzacji do stresu temperaturowego. Drugim, istotnym celem prowadzonych badań było również określenie roli wybranych białek GRP w tych samych warunkach.

W ramach niniejszej pracy opisano zmiany ilościowe i jakościowe w całkowitym transkrytomie, metabolomie i proteomie kalafiora w warunkach aklimatyzacji do stresu chłodu i stresu ciepła oraz w fazie de-aklimatyzacji po zakończeniu działania stresu chłodu i ciepła. Wyniki tych analiz wskazują na udział licznych białek, w tym białek GRP, a zwłaszcza białek GRP2 i GRP4 w odpowiedzi na stres temperaturowy u kalafiora. Dane proteomiczne wskazują również na to, że poza białkami z rodziny GRP w odpowiedzi kalafiora na stres temperaturowy zaangażowane są również inne rodziny białek. Ponadto wykazano, że podczas aklimatyzacji do stresu temperaturowego zmianom ulega poziom

akumulacji metabolitów związanych z odpowiedzią na stres obniżonej i podwyższonej temperatury. W tych warunkach następowało zwiększenie akumulacji aminokwasów, co może świadczyć o zmianach w metabolizmie białek. Zaobserwowano również zmiany w akumulacji cukrów rozpuszczalnych. Dodatkowo akumulacja związków o charakterze neutralizującym wolne rodniki (np. związków przeciwutleniających) i osmoprotekcyjnym (przykładowo proliny) pozwalała roślinom kalafiora utrzymać stan homeostazy i zmniejszyć poziom stresu oksydacyjnego wywołanego działaniem niekorzystnej temperatury.

Analiza danych transkryptomicznych pozwoliła na poznanie rodzin czynników transkrypcyjnych związanych z odpowiedzią kalafiora na stres chłodu i ciepła. Poziom transkryptów kodujących czynniki należące między innymi do rodzin NAC, MYB, ERF, DREB ulegał regulacji w roślinach poddanych działaniu stresu temperaturowego. Pozwalało to na zwiększenie ekspresji genów kodujących inne białka związane z odpowiedzią na stres abiotyczny, jakim jest obniżona lub podwyższona temperatura.

Dodatkowo przeprowadzono analizę odpowiedzi kalafiora podczas aklimatyzacji i de-aklimatyzacji do stresu temperaturowego na poziomie fizjologicznym. Przeprowadzono m.in. pomiary względnej zawartości chlorofilu i flawonoidów, określono poziom wycieku elektrolitów w odpowiedzi na stres temperaturowy, a także pomiar parametrów związanych z efektywnością fotosyntezy w liściach kalafiora. Zdecydowanie większy wyciek elektrolitów następował w stresie ciepła niż chłodu, co związane było z wyższym w tych warunkach stresem oksydacyjnym, oraz zwiększoną akumulacją flawonoidów, neutralizujących wolne rodniki powstające na skutek stresu oksydacyjnego. W analizowanych warunkach stresu temperaturowego chloroplasty komórek miękiszu liści kalafiora funkcjonowały prawidłowo, a proces fotosyntezy nie był zaburzony.

ABSTRACT

Plants, due to their inability to move actively, developed during the evolution a number of mechanisms operating at different levels of the structural organization, which would allow to minimize the harmful effects of environmental factors. In response to stress factors, plants use a variety of signaling pathways at the physiological, biochemical and molecular levels. Too low or too high temperature during the growing season can significantly reduce the yield of many crop species, including cruciferous plants (*Brassicaceae*) such as cauliflower (*Brassica oleracea* var. *botrytis*). It belongs to the most important cultivated plants both in Poland and throughout Europe.

Proteins from the GRP family (glycine-rich proteins) are one of the protein groups actively involved in processes related to growth, development and response to unfavorable environmental conditions in plants. The involvement of proteins from this family has been confirmed in such processes as flowering, pollen development and plant cell growth, among others. GRP proteins are known to be involved in plant defense systems against both abiotic and biotic stress. So far, reports have been published suggesting the active participation of GRP proteins in the response of plants to various stress conditions, e.g. low temperature stress and (in lesser extent) during heat acclimation.

The aim of this study was the comprehensive characteristics cauliflower responses at the physiological, transcriptomic, proteomic and metabolomic levels under conditions of acclimation and de-acclimation to the temperature stress. Another important goal of the research was to determine the role of selected GRP proteins in the studied conditions.

As part of this work, a comparative analysis of quantitative and qualitative alterations within the cauliflower total transcriptome, proteome and metabolome of cauliflower under heat and cold acclimation and after de-acclimatization phase, after cold and heat cessation. Results of those analyses indicate for the participation of numerous proteins, including proteins from the GRP family, especially GRP2 and GRP4 proteins in response to temperature stress in cauliflower. The proteomic data indicate also for the participation of non-GRP proteins from various families in the cauliflower response to the temperature stress. In addition, during acclimation to the temperature stress, the level of metabolite accumulation alters. In such conditions, the accumulation of amino acids was increased, indicating changes in the protein metabolism. Accumulation of soluble sugars was also observed. In addition, the accumulation of compounds neutralizing free radicals (e.g. antioxidant compounds) and osmoprotective (e.g. proline) allows cauliflower plants to maintain homeostasis and reduce the level of oxidative stress caused by unfavorable temperature.

The analysis of transcriptomic data allows for the characterization of the members of transcription factor family that are connected with cauliflower response to cold and heat stress. Notably, the level of messengers coding for transcription factors from NAC, MYB, ERF, DREB families was regulated in plants under temperature stress. This was accompanied by the increase of the expression level of genes for other proteins related with the stress response, including the lowered or increased temperature.

Additionally, an analysis of the cauliflower responses regarding the acclimation and de-acclimation to temperature stress was performed at the physiological level. The analysis included the measurements of chlorophyll and flavonoid relative content, the determination of the level of electrolyte leakage in response to temperature stress as well as the measurement of parameters related with the efficiency of photosynthesis in cauliflower leaves. It has been observed that under heat acclimation (and not in the cold) a much notable leakage of electrolytes was detected, which was accompanied by a higher oxidative stress and a higher flavonoid accumulation in these conditions, that could neutralize free radicals resulting from the oxidative stress. Under the investigated conditions of temperature stress, chloroplasts of the cauliflower leaf mesophyll functioned properly and the photosynthesis process was not disturbed.