

Streszczenie

Białka germinopodobne (GLP) stanowią dużą i bardzo zróżnicowaną rodzinę białek roślinnych występujących w większości tkanek i organów, gdzie pełnią funkcje strukturalne i enzymatyczne na wszystkich etapach rozwoju rośliny, a także biorą udział w odporności na stresory środowiskowe.

Mesembryanthemum crystallinum L. (kryształka lśniaca) jest fakultatywnym halofitem z rodziny Aizoaceae, rząd *Caryophyllales* i rośliną modelową w badaniach nad odpowiedzią roślin na działanie różnych czynników stresu środowiskowego. W korzeniach *M. crystallinum* zidentyfikowano transkrypt białka germinopodobnego (McGLP) (Michałowski i Bohnert, 1992). Funkcje i lokalizacja komórkowa aktywnego białka McGLP w roślinie nie zostały do tej pory zbadane.

Nadrzędnym celem prowadzonych eksperymentów było określenie funkcji białka germinopodobnego z kryształki lśniacej we wzroście i rozwoju oraz adaptacji do życia w warunkach deficytu wody.

Eksperymenty prowadzono na *M. crystallinum* oraz na przygotowanych w ramach niniejszej pracy transgenicznym roślinach *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. W czasie prac nad konstrukcją roślin transgenicznych wykazano, że rejon kodujący genu *McGLP* zawiera dodatkowy nukleotyd, cytozynę w pozycji 590, w stosunku do sekwencji zdeponowanych w bazach danych. Powoduje to przesunięcie ramki odczytu, zmianę sekwencji aminokwasowej C-końcowej części kodowanego białka i skrócenie jego długości w związku z pojawieniem się wcześniejszego kodonu stop. Roboczo, dla odróżnienia od sekwencji z baz danych przyjęto oznaczenie *McGLP-BIS*.

W pracy weryfikowano następujące hipotezy badawcze:

- Nadekspresja genu *McGLP-BIS* wpływa korzystnie na wzrost i rozwój *A. thaliana* w warunkach deficytu wody,
- McGLP-BIS jest białkiem apoplastycznym,
- McGLP-BIS uczestniczy w wzroście i rozwoju *M. crystallinum*.

Analiza ekspresji *McGLP-BIS* w cyklu życiowym *M. crystallinum* wykazała, że gen jest regulowany rozwojowo. Wzrost poziomu transkryptu zbiegał się z okresem intensywnego wzrostu korzeni, liści i pędów, co pozwala przypuszczać, że białko McGLP-BIS pośrednio lub bezpośrednio uczestniczy w ich rozwoju. Wykazano również, że ekspresja *McGLP-BIS* jest zależna od auksyny.

Nadekspresja białka McGLP-BIS miała pozytywny wpływ na wzrost i rozwój *A. thaliana*. Rośliny transgeniczne rosnące w warunkach nie stresowych ulegały silniejszemu krzewieniu niż rośliny typu dzikiego (WT). W porównaniu do roślin WT cechowały się także wyższą zawartością gibereliny GA_1 w 2 tygodniu uprawy oraz wyższym poziomem gibereliny GA_3 w 6 tygodniu uprawy. Różnice między WT a roślinami transgenicznymi dotyczyły również endogennego poziomu auksyn i cytokinin. Stwierdzone różnice w profilach fitohormonalnych wydają się być częściowo odpowiedzialne za bujniejszy wzrost roślin transgenicznych w warunkach nie stresowych.

W porównaniu z roślinami typu dzikiego, transgeniczne rośliny *A. thaliana* wykazywały podwyższoną odporność na towarzyszące deficytowi wody zaburzenia fotosyntezy i stres oksydacyjny. Na podstawie analizy parametrów fluorescencji chlorofilu *a* stwierdzono m.in., że rośliny transgeniczne w porównaniu do roślin WT charakteryzują się mniejszym rozpraszaniem energii przechwyconej przez fotosystem II (PSII) oraz wyższą maksymalną wydajnością fotochemiczną PSII. Wyniki te wskazują, że rośliny

z nadekspresją *McGLP-BIS* rosnące w warunkach deficytu wody cechowały się wydajniej działającym aparatem fotosyntetycznym. Potwierdzają to także wyniki uzyskane z pomiarów fotosyntezy netto, oraz znacznie wyższy stosunek chlorofil *a*/ chlorofil *b* w porównaniu do roślin WT.

Nadekspresji białka *McGLP-BIS* w *A. thaliana* towarzyszyło wyraźne zwiększenie całkowitej aktywności dysmutaz ponadtlenkowych (SOD), a w szczególności izoformy manganowej (MnSOD), której aktywność w warunkach nie stresowych była ok 65% wyższa niż u WT. Wyższą całkowitą aktywność SOD w porównaniu do WT wykazano również u roślin transgeniczných rosnących w warunkach deficytu wody. Można przypuszczać, że ta utrzymująca się na stałym poziomie wysoka aktywność dysmutaz ponadtlenkowych związana z nadekspresją *McGLP-BIS* była jedną z przyczyn wydajniejszej fotosyntezy roślin transgeniczných podczas okresu niepodlewania. Rośliny transgeniczne cechowały się również stałą, niezależną od warunków hodowli koncentracją nadtlenku wodoru, podczas gdy u roślin WT stwierdzono ponad dwukrotny wzrost jego stężenia jako skutku niepodlewania. Rezultaty te wskazują na ograniczenie, będącego wynikiem hodowli w warunkach deficytu wody, stresu oksydacyjnego u roślin transgeniczných.

Na podstawie obserwacji mikroskopowych stwierdzono, że białko *McGLP-BIS* rozmieszczone jest w rejonie apoplastu oraz w kanałach i cysternach siateczki śródplazmatycznej.

Podsumowując białko *McGLP-BIS*, które obecne jest w apoplaście oraz siateczce śródplazmatycznej zwiększa bujność roślin w warunkach nie stresowych oraz zwiększa tolerancję roślin do życia w warunkach deficytu wody. Korzystny wpływ badanego białka związany jest z jego oddziaływaniem na metabolizm fitohormonów, aktywność fotosyntetyczną oraz antyoksydacyjną.

akceptacja R. H. U. King
[signature]

Summary

Germin-like proteins (GLPs) are a large and diverse family of plant proteins. Various GLPs play multiple functions related to plant development and resistance to environmental stress. Their expression was reported in all plant developmental stages and in majority of plant tissues and organs.

Mesembryanthemum crystallinum L. (Ice Plant) is a facultative halophyte of the Aizoaceae family, order Caryophyllales and a model plant for plant stress resistance research. A germin-like protein transcript was identified in the roots of *M. crystallinum* (McGLP) (Michalowski and Bohnert 1992). The functions and cellular location of the protein has not been studied so far.

The main goal of the study was to determine the function of the germin-like protein from *M. crystallinum* in growth and development and adaptation to water deficit conditions.

The experiments were carried out on *M. crystallinum* and on the transgenic *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh plants prepared for the purpose of this study. During work on the construction of transgenic plants, it was shown that the coding region of the McGLP gene contains an additional nucleotide, cytosine at position 590, in relation to the sequences deposited in the databases. This resulted in a frame shift, a change in the amino acid sequence of the C-terminal part of the encoded protein and also shortened its length due to the appearance of an earlier stop codon. The new sequence to distinguish it from the database sequences was named *McGLP-BIS*.

The following research hypotheses were verified in the work:

- overexpression of *McGLP-BIS* has a positive effect on the growth and development of plants in conditions of water deficit,
- *McGLP-BIS* is an apoplastic protein,
- *McGLP-BIS* is involved in plant growth and development.

Analysis of *McGLP-BIS* expression in the *M. crystallinum* life cycle showed that the gene is developmentally regulated. An increase in the level of the transcript coincided with the period of intensive growth of roots, leaves and shoots, which suggests that the *McGLP-BIS* protein is directly or indirectly involved in their development. *McGLP-BIS* expression has also been shown to be auxin dependent.

McGLP-BIS protein overexpression had a positive effect on the growth and development of *A. thaliana*. Transgenic plants grown under control conditions were more branched than wild-type (WT) plants. Concentration of GA₁ gibberellin in the 2nd cultivation week and GA₃ gibberellin in the 6th cultivation week was increased in transgenic plants. The differences between WT and the transgenic plants also concerned the endogenous levels of auxins and cytokinins. The differences found in phytohormonal profiles seem to be partly responsible for the more abundant growth of transgenic plants under non-stressed conditions.

Compared to wild-type plants, transgenic *A. thaliana* plants showed increased resistance to disturbances in photosynthesis functionality and oxidative stress associated with water deficit. Based on the analysis of the parameters of chlorophyll *a* fluorescence, it was found, inter alia, that transgenic plants, compared to WT plants, are characterized by lower scattering of the energy captured by photosystem II (PSII) and a higher maximum photochemical efficiency of PSII. These results clearly show that the PS efficiency of *A. thaliana* overexpressing *McGLP-BIS* under water deficit is significantly higher. This was confirmed by the results obtained from net photosynthesis measurements, and the much higher chlorophyll *a*/ chlorophyll *b* ratio.

Overexpression of the McGLP-BIS protein in *A. thaliana* was accompanied by a marked increase in the total activity of superoxide dismutases (SOD), in particular the manganese isoform (MnSOD), whose activity under non-stress conditions was about 65% higher than in WT. Higher total SOD activity compared to WT was also demonstrated in transgenic plants growing under water deficit. It can be assumed that this sustained high activity of superoxide dismutases associated with the overexpression of McGLP-BIS was one of the reasons for the more efficient photosynthesis of transgenic plants during the non-watering period. The transgenic plants were also characterized by a constant concentration of hydrogen peroxide independent of the breeding conditions, whereas in WT plants more than twofold increase in its concentration was found as a result of not watering.

Based on microscopic observations, it was found that the McGLP protein localizes in the apoplast region and in the channels and cisterns of the endoplasmic reticulum.

To sum up the McGLP-BIS, which is present in the apoplast and the endoplasmic reticulum, increases the lushness of plants under non-stressed conditions and increases the tolerance of plants to vegetation under water deficit. The beneficial effect of the studied protein is related to its influence on the metabolism of phytohormones, photosynthetic and antioxidant activity.

okceptoje Rlt Ubiny
Jolly