

Szczecin, 11.09.2018r.

**Rozprawa doktorska w dziedzinie Nauk Biologicznych, dyscyplina Biologia pt.
„Znaczenie genów kodujących białka z grupy Polycomb, Trithorax i wybranych
czynników transkrypcyjnych oraz statusu oksydacyjnego w regulacji indukcji
embriogenezy somatycznej u *Medicago truncatula* Gaertn.”**

mgr Anna Orłowska

Promotor: prof. dr hab. Ewa Kępczyńska

STRESZCZENIE W JĘZYKU POLSKIM

Embriogeneza somatyczna (SE), jest wieloetapowym procesem rozpoczynającym się od komórek somatycznych eksplantu roślinnego a kończącym na wytworzeniu somatycznych zarodków. Chociaż poczyniono znaczne postępy w poznaniu mechanizmów prowadzących do zaindukowania transmisji komórek somatycznych do stanu embriogenego, to jednak w dalszym ciągu wiedza na ten temat pozostaje niepełna. Tworzenie kalusa z eksplantów wiąże się ze znacznymi zmianami takimi jak reorganizacja tożsamości komórkowej i wzorców wzrostu. Wśród wielu induktorów procesu odróżnicowania komórek na uwagę zasługują roślinne regulatory wzrostu i stres. Działanie czynników stresowych na eksplanty roślinne wpływa na reorganizację struktury chromatyny, a tym samym na ekspresję genów, co w konsekwencji może uruchamiać program embriogeny w komórkach somatycznych. Zmiany dotyczą wielu genów, wśród których można wyróżnić kodujące czynniki transkrypcyjne m.in. z grupy LEC oraz biorące udział w organizacji centrów merystematycznych zarodków. Podczas formowania tkanki kalusowej, zróżnicowane eksplanty muszą podlegać procesom eliminującym ich pierwotne cechy. Oczywistym jest, że poszczególne typy komórek różnią się zdolnością do odróżnicowania w obrębie tego samego eksplantu (np. liścia). W tych procesach może pośredniczyć odpowiednia równowaga działania białek grupy Polycomb (PcG) i Trithorax (TrxG). Rola obu kompleksów jest kluczowa, ponieważ determinują one aktywność genów charakterystycznych dla danego okresu rozwojowego.

W literaturze brakuje informacji na temat regulacji procesu indukcji embriogenezy somatycznej na poziomie epigenetycznym przez białka grupy Polycomb i Trithorax. Dlatego podjęto badania, których celem było wyjaśnienie roli tych dwóch grup białek w procesie

indukcji SE *Medicago truncatula*. Celem niniejszej pracy było również określenie wpływu statusu oksydacyjnego (obecność $O_2^{\cdot-}$ i H_2O_2 , aktywność enzymów antyoksydacyjnych SOD, CAT, APX oraz ekspresja genów je kodujących) na proces formowania embriogenego kalusa oraz ekspresję genów kodujących wyżej wymienione czynniki epigenetyczne oraz czynniki transkrypcyjne: LEC1, L1L, WUS, WOX5 i STM.

Wykazano, że istotne znaczenie w uruchomieniu programu embriogenego w komórkach somatycznych ma aktywność białek z grupy Polycomb i Trithorax. Tkanki linii embriogennej po pierwszym tygodniu fazy indukcji charakteryzują się wyższym poziomem ekspresji genów kompleksu PRC2 (*CLF* i *MSI1*) i kompleksu PRC1 (*VRN1*) oraz genów z grupy Trithorax (*ATX2*, *ATX3.1*, *ATX3.2*) niż linii nieembriogennej, co może sugerować, że te dwie linie różnią się poziomem metylacji chromatyny w liściach co w konsekwencji przekłada się na zdolność do aktywacji szlaku związanego z nabywaniem embriogenego potencjału. Pomimo wysokiej transkrypcji tych czynników epigenetycznych w linii M9-10a w tym samym czasie obserwowano również wysoką ekspresję genów związanych z rozwojem zarodków somatycznych, co może wskazywać, że badane TFs nie znajdują się pod bezpośrednią kontrolą PcG i TrxG, ale mogą zależeć od innych mechanizmów epigenetycznych. Wykazano również, że status oksydacyjny komórek linii nieembriogennej i embriogennej *Medicago truncatula* podczas 21 dniowej fazy indukcji jest podobny, pomimo różnej zdolności tych linii do formowania zarodków w fazie różnicowania.

Ponadto wykazano, że zmiany w kumulacji reaktywnych form tlenu ($O_2^{\cdot-}$ i H_2O_2) wywołane działaniem DPI, inhibitora oksydazy NADPH, i podwyższonym stężeniem 2,4-D (5 μ M) zaburzają embriogenezę somatyczną, co wskazuje, że odpowiedni poziom $O_2^{\cdot-}$ jest niezbędny do prawidłowego przebiegu tego procesu. 2,4-D zastosowany w stężeniu powyżej 5 μ M w pożywce indukującej powodował zwiększenie kumulacji anionorodnika ponadtlenkowego i podwyższał aktywność enzymów antyoksydacyjnych, ale nie ograniczał zdolności do formowania embriogenego kalusa przez komórki somatyczne eksplantu roślinnego. Wykazano również, że ekspresja genów grupy Polycomb i Trithorax, oraz kodujących czynniki transkrypcyjne takie jak: LEC1, L1L, WUS, WOX5 i STM zależy od statusu oksydacyjnego komórek eksplantów. Zmiana tego statusu przez 2,4-D i DPI powoduje zaburzenie ekspresji tych genów.

Przeprowadzone badania dostarczają nowych danych dotyczących udziału genów kodujących czynniki epigenetycznych (PcG i TrxG), czynniki transkrypcyjne (*LEC1*, *L1L*,

WUS, WOX5 i STM) oraz statusu oksydacyjnego w regulacji fazy indukcji SE u *Medicago truncatula*.