

**„Rola i mechanizm regulacji ekspresji genów kodujących dioksygenazy
w adaptacji roślin do wzrostu i rozwoju w warunkach panujących na łądzie”**

mgr Izabela Perkowska

Kolonizacja łądy przez rośliny była jednym z najbardziej przełomowych wydarzeń w historii życia na Ziemi, wymagającym głębokich przemian w funkcjonowaniu ich szlaków biochemicznych i regulacyjnych. W odpowiedzi na nowe czynniki środowiskowe, takie jak deficyt wody czy zwiększone promieniowanie UV, w tkankach roślin zaszły liczne adaptacyjne przekształcenia, obejmujące m. in. regulację mechanizmów biosyntezy metabolitów wtórnych.

W ramach przedstawianej pracy doktorskiej przeanalizowałam wzajemne zależności pomiędzy genotypami rośliny modelowej *Arabidopsis thaliana* (rzodkiewnik pospolity), abiotycznymi i biotycznym stresami środowiskowymi, a metabolizmem wtórnym. Szczególną uwagę poświęciłam kumarynom – metabolitom wtórnym, syntetyzowanym w szlaku fenylopropanoidów, które odgrywają istotną rolę w strategiach adaptacyjnych roślin do niekorzystnych warunków środowiskowych. Kumaryny wykazują właściwości chelatujące jony żelaza (Fe), a także mają działanie antyoksydacyjne i przeciwdrobnoustrojowe. Łącząc metabolomikę, transkryptomikę, filogenetykę oraz odwrotną genetykę, przedstawiona praca przyczynia się do pogłębienia wiedzy na temat odpowiedzi roślin na niekorzystne warunki środowiskowe w kontekście biosyntezy kumaryn i regulacji szlaku biosyntezy fenylopropanoidów.

Badania przedstawiono w postaci cyklu pięciu tematycznie powiązanych publikacji, z których trzy zostały opublikowane w recenzowanych międzynarodowych czasopismach, natomiast dwie kolejne przedstawiono w postaci manuskryptów będących na etapie przygotowania. Pierwsze trzy prace, odpowiednio publikacje nr 1, 2 i 3, dotyczą pierwszego celu badawczego, którym było zbadanie korelacji między poziomem akumulacji kumaryn, zróżnicowaniem genotypowym roślin (naturalne akcesje i mutanty), a oddziaływaniem wybranych czynników stresowych – w szczególności dostępnością Fe, oraz infekcją *Dickeya* spp. Badania miały na celu zrozumienie, w jaki sposób *A. thaliana* dostosowuje metabolizm kumaryn w odpowiedzi na zmienne warunki środowiskowe, z uwzględnieniem różnic genotypowych roślin i rodzaju czynnika stresowego.

W pierwszej publikacji opisano zmienność naturalną w zakresie akumulacji wybranych prostych kumaryn (skopoletyny, umbeliferonu i eskuletyny) i ich glikozylowanych form w 28 naturalnych akcesjach *A. thaliana*. Profilowanie metaboliczne (UHPLC-MS) wykazało istotne zróżnicowanie wewnątrzgatunkowe zawartości kumaryn, na które wpływają genotyp i środowiskowe warunki wzrostu (Perkowska *et al.*, 2021a). W kolejnej publikacji wykazano, że akumulacja kumaryn koreluje z niedoborem Fe i jest powiązana z odpornością roślin na *Dickeya* spp. – nekrotroficzne patogeny bakteryjne o znaczeniu

agronomicznym, wybrane ze względu na ich wysoką wirulencję i zdolność do wychwytywania Fe ze środowiska. Uzyskane wyniki wskazują, że kumaryny mogą ułatwiać pozyskiwanie Fe, jak i wspierać indukowane stresem biotycznym mechanizmy obronne (Perkowska *et al.*, 2021b). Badania opisane w trzeciej publikacji skupiały się na powiązaniu dynamiki ekspresji genów z akumulacją wybranych kumaryn w różnych tkankach roślinnych, w wybranych warunkach środowiskowych. Bazując na wcześniejszej analizie akumulacji kumaryn wybrano trzy genetycznie zróżnicowane, naturalne akcesje *A. thaliana* (Col-0, Est-1 i Tsu-1), dla których wykazano zróżnicowaną akumulację tych związków. Aby symulować kontrastujące warunki środowiskowe, rośliny uprawiano w hodowli płynnej *in vitro*, jak i w glebie. Korzenie i pędy zbierano w celu równoległego profilowania metabolitów (UHPLC-MS) oraz analizy ekspresji genów (qRT-PCR) ze szlaku biosyntezy fenylopropanoidów. Re-sekwencjonowanie wybranych genów pozwoliło na identyfikację polimorfizmów, które mogą wyjaśniać zróżnicowanie zawartości kumaryn między badanymi akcesjami (Ihnatowicz *et al.*, 2024).

W trzech pierwszych publikacjach przedstawiono, jak zmienność genotypowa i warunki środowiskowe wpływają na biosyntezę kumaryn w tkankach *A. thaliana*, ujawniając zależności między poziomem metabolitów wtórnych, ekspresją genów szlaku fenylopropanoidów i potencjałem adaptacyjnym akcesji. Czwarta publikacja dotyczy charakterystyki genów *DOXC21-A*, jego antysensownego transkryptu (NAT) oraz paralogu *DOXC21-B*. *DOXC21-A* i *DOXC21-B* kodują dioksygenazy (2OGD) o nieznannej funkcji biologicznej. Analiza filogenetyczna potwierdziła ich wysoki stopień konserwacji u roślin lądowych, co sugeruje ewolucyjnie zachowaną rolę oraz podkreśla potencjalne znaczenie biologiczne. Rośliny hodowano w warunkach niskiego pH (4,5) i stresu osmotycznego (3% PEG), a następnie przeprowadzono analizy transkryptomiczne, metabolomiczne i fenotypowe. Uzyskane wyniki pozwoliły zaproponować model, w którym *DOXC21-A* i NAT tworzą jednostkę regulacyjną, mogącą koordynować z udziałem hormonów przekierowanie szlaku fenylopropanoidowego z lignin w stronę flawonoidów. Stwierdzono także obecność konserwowanej sekwencji homologicznej do regionów prekursorowych miRNA u roślin lądowych, co może sugerować udział w regulacji posttranskrypcyjnej. Odmienne fenotypy mutantów *doxc21-a* i *nat* sugerują, że chociaż obydwa elementy przyczyniają się do reakcji na stres abiotyczny, mogą działać poprzez nakładające się, ale nieredundantne szlaki molekularne.

Ostatnie badania skupiają się na charakterystyce funkcjonalnej UGT79B9 (AT3G53990), UDP-glukozyltransferazie potencjalnie zaangażowanej w glikozylację związków indukowanych stresem. Badania przeprowadzone na mutantach *ugt79b9* typu knockout i nadekspresorach *UGT79B9* pozwoliły na wykazanie, że UGT79B9 wpływa na profile eksudatów korzeniowych i poziom glikozylacji metabolitów, gromadzonych na skutek wystąpienia stresu środowiskowego (niedobór Fe, stres osmotyczny, susza). Nieukierunkowana analiza metabolomiczna ujawniła szereg dotąd

niezidentyfikowanych sygnałów m/z związanych z występowaniem mutacji w badanym genie *UGT79B9* i odpowiedzią na stres osmotyczny indukowany PEG.

Podsumowując, wyniki badań przedstawionych w pięciu publikacjach składających się na niniejszą rozprawę doktorską poszerzają wiedzę o tym, jak *A. thaliana* integruje sygnały środowiskowe z regulacją metabolizmu wtórnego, ze szczególnym uwzględnieniem biosyntezy kumaryn. Uzyskane rezultaty, podkreślając znaczenie zmienności genetycznej i plastyczności regulacyjnej w odporności roślin na stres abiotyczny i biotyczny, wspierają tezę o złożonej sieci interakcji pomiędzy 2OGD, UGT i NAT, które wspólnie uczestniczą w adaptacyjnym przeprogramowaniu szlaków metabolicznych.

Perkowska, I., Siwinska, J., Olry, A., Grosjean, J., Hehn, A., Bourgaud, F., Lojkowska, E., & Ihnatowicz, A. (2021a). Identification and Quantification of Coumarins by UHPLC-MS in *Arabidopsis thaliana* Natural Populations. *Molecules*, 26(6), 1804

Perkowska, I., Potrykus, M., Siwinska, J., Siudem, D., Lojkowska, E., & Ihnatowicz, A. (2021b). Interplay between coumarin accumulation, iron deficiency and plant resistance to *Dickeya* spp. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(12), 6449

Ihnatowicz, A., Siwinska, J., **Perkowska, I.**, Grosjean, J., Hehn, A., Bourgaud, F., Lojkowska, E., & Olry, A. (2024). Genes to specialized metabolites: accumulation of scopoletin, umbelliferone and their glycosides in natural populations of *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biology*, 24(1), 806