

Syed Muhammad Muntazir Mehdi

Temat pracy: Identyfikacja nowego i regulowanego przez ABA miRNA oraz charakterystyka jego genu docelowego - AtBro1 w procesach wzrostu i w odpowiedzi na stres abiotyczny u *Arabidopsis thaliana*.

(Thesis Topic: Identification of novel and ABA-regulated miRNA and characterization of its target gene-AtBro1 upon growth and abiotic stress response in *Arabidopsis thaliana*).

Wiele czynników środowiskowych, takich jak podwyższona temperatura, zasolenie i susza, mają wpływ na wzrost i produktywność upraw. Kluczowym szlakiem sygnałowym uczestniczącym w regulacji odpowiedzi roślin na stres jest rdzeniowa sygnalizacja kwasu absysynowego (ABA). ABA kontroluje reakcje roślin poprzez regulację ekspresji genów, także z udziałem ścieżek zależnych od miRNA. miRNA biorą udział w różnych procesach biologicznych, w tym w reakcjach adaptacyjnych na stres abiotyczny.

Celem mojej pracy doktorskiej jest identyfikacja nowych miRNA zaangażowanych w regulację ekspresji genów w odpowiedzi na ABA. Aby zrealizować postawiony cel badania prowadzono z zastosowaniem rośliny modelowej *Arabidopsis thaliana* formy dzikiej (WT) oraz mutantów szlaku sygnałowego ABA: *abiltd*, *mkkk17* i *mkkk18*. Analizy z wykorzystaniem RNAseq umożliwiły identyfikację 10 nowych miRNA w odpowiedzi na ABA (ath-miRn-1, ath-miRn-2, ath-miRn-3, ath-miRn-4, ath-miRn-5, ath-miRn-6, ath-miRn-7, ath-miRn-8, ath-miRn-9 and ath-miRn-10) u formy dzikiej *A.thaliana* oraz 1 nowy miRNA u mutantu *mkkk17*. Ponadto, analiza wyników ujawniła, że trzy, siedem i dziewięć znanych miRNA ulegało różnej ekspresji w odpowiedzi na ABA u mutantów *abiltd*, *mkkk17* i *mkkk18*. Wyniki sekwencjonowania zostały potwierdzone za pomocą ilościowego RT-PCR we wszystkich badanych genotypach. By zidentyfikować geny docelowe i potencjalne miejsca cięcia dla nowozidentyfikowanych miRNA wykorzystano psRNA-Target oraz 5' RLM-RACE. Analiza ontologii wykazała, że potencjalne geny docelowe znanych i nowych miRNA reagujących na ABA są zaangażowane w różne procesy komórkowe w roślinach, w tym rozwój i ruchy aparatów szparkowych. Wyniki te sugerują, że wiele zidentyfikowanych miRNA odgrywa ważną rolę w odpowiedziach roślin na stres środowiskowy i może pełnić wspólne funkcje regulacyjne w szlaku sygnałowym ABA.

W kolejnym etapie badania koncentrowały się na charakterystyce nieznanego białka BRO1, zawierającego domenę podobną do BRO (AT1G73390), które jest celem jednego z nowo zidentyfikowanych miRNA, ath-miRn-1. W toku analiz wykazano, że w odpowiedzi na zasolenie, ABA i mannitol transkrypt *BRO1* ulegał indukcji. Transgeniczne linie *A.thaliana* z nadekspresją *BRO1* wykazywały silną tolerancję na suszę i stres solny wskazując, że *BRO1* reguluje reakcje odpornościowe u roślin. Promotor *AtBRO1* w fuzji z GUS wykazywał ekspresję głównie w liściach rozety i kwiatach, zwłaszcza w pylnikach. Analiza lokalizacji subkomórkowej *BRO1::GFP* wykazała, że białko to lokalizuje się przy błonie cytoplazmatycznej protoplastu. Wyniki analizy

transkrypcyjnej mutanta typu nokaut w genie *BRO1*, *bro1-1*, w odniesieniu do linii dzikiej *Arabidopsis*, wykazały zmiany w ekspresji wielu genów, o których wiadomo, że są zaangażowane w odpowiedź roślin na stres. Stwierdzono, że *BRO1* może odgrywać ważną rolę w regulacji odpowiedzi transkrypcyjnej na ABA i indukcji odpowiedzi roślin na stres abiotyczny.

Podsumowując, wyniki badań przedstawione w prezentowanej rozprawie, umożliwiły poznanie nowych mechanizmów regulujących odpowiedź roślin na stres abiotyczny i powiązanych z sygnalizacją ABA. Najważniejszym wynikiem pracy jest identyfikacja aż 10 nieznanych miRNA i głębsza charakterystyka funkcjonowania jednego ze z nich - *ath-miRn-1* – w powiązaniu z identyfikacją nowego efektora w reakcji roślin na stres i nieznanego dotąd *BRO1*. Wyniki uzyskane w ramach pracy rzucają światło na mechanizmy leżące u podstaw tolerancji na stres.

Słowa kluczowe: Kwas abscysynowy, stres abiotyczny, nowe miRNA, AtBOR1, kiełkowanie nasion, *Arabidopsis*.