

### **Cel badań/Hipoteza:**

Celem projektu jest analiza aktywności czterech cząsteczek miRNA (miR160, miR166, miR167 i miR393) podczas tranzycji embriogenicznej *in vitro* komórek somatycznych *Arabidopsis*.

Zaangażowanie wybranych do analiz miRNA w proces SE założono biorąc pod uwagę rolę auksyny w procesie somatycznej embriogenezy (SE). Syntetyczna forma auksyny 2,4-D jest głównym induktorem SE u roślin w tym u rośliny modelowej *Arabidopsis thaliana*. Cząsteczki miR160 i miR167 negatywnie regulują ekspresję *AUXIN RESPONSE FACTORS (ARF6, ARF8, ARF10, ARF16, ARF17)*, a genami docelowymi dla miR393 są *TRANSPORT INHIBITOR1* i *AUXIN F-BOX PROTEIN (AFB1, AFB2, AFB3)* kodujące receptory auksyny z rodziny TAAR. Z kolei miR166 reguluje ekspresję *PHABULOSA* i *PHAVOLUTA*, pozytywnych regulatorów *LEAFY COTYLEDON2 (LEC2)* - markera genetycznego procesu SE., zaangażowanego w biosyntezę endogennej auksyny.

### **Metoda badawcza:**

Do badań procesu SE wykorzystana zostanie modelowa roślina genomiki funkcjonalnej, *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. oraz transgeniczne linie sensorowe wytworzone w ramach niniejszego projektu.

Celem potwierdzenia hipotezy o zaangażowaniu miR160, miR166, miR167 i miR393 w proces tranzycji embriogenicznej komórek somatycznych *Arabidopsis*, planuje się stworzyć nowatorskie narzędzie, linie sensorowe, pozwalające na monitorowanie aktywności badanych miRNA poprzez analizę ekspresji genu reporterowego *GFP* działającego pod promotorem genu *LEC2* ulegającego specyficznej ekspresji w komórkach somatycznych podlegających tranzycji embriogenicznej. Pomiędzy sekwencją promotora, a *GFP* zostanie wbudowana sekwencja docelowa, rozpoznawana przez badaną cząsteczkę miRNA. Analizy SE z udziałem linii sensorowych pozwolą na przeprowadzenie pierwszej w swoim rodzaju czasoprzestrzennej oceny aktywności cząsteczek miRNA, tylko w komórkach/tkankach eksplantatu, które podlegają procesowi SE. Proces SE będzie indukowany w kulturze eksplantatów (niedojrzałych zarodków zygocyticznych) z zastosowaniem efektywnej metody opracowanej w zespole opiekuna naukowego projektu. Czasoprzestrzenna analiza wzoru aktywności cząsteczek miRNA w SE zostanie przeprowadzona przy użyciu mikroskopu konfokalnego umożliwiającego wykonanie przekrojów optycznych w czasie ciągłym. Celem oceny regulacyjnych powiązań pomiędzy miR166, miR160, ich genami docelowymi (*ARF10, ARF16, PHB, PHV*) i *LEC2* zostaną wykorzystane linie transgeniczne o zaburzonej aktywności genów *MIRNA* oraz genów docelowych dla badanych miRNA. Oceniany będzie potencjał embriogeniczny tych linii w kulturze *in vitro*.

### **Wpływ rezultatów:**

Wyniki projektu pozwolą poszerzyć wiedzę na temat genetycznego mechanizmu włączającego embriogeniczny program rozwojowy w komórkach somatycznych. W mechanizmie tym istotną rolę wydają się pełnić cząsteczki miRNA. Biorąc pod uwagę ewolucyjną konserwatywność sekwencji miRNA, opisanie genetycznych czynników zaangażowanych w indukcję embriogeniczną w kulturze *in vitro* *Arabidopsis*, przyczyni się do poznania molekularnych podstaw totipotencji komórek roślin, w tym gatunków uprawnych. Obok wartości poznawczej, identyfikacja kluczowych czynników genetycznych regulujących proces SE wnosi również ważny wkład praktyczny w doskonalenie technik regeneracji roślin szeroko wykorzystywanych w biotechnologii roślin. Wiedza o czynnikach regulujących proces SE jest bowiem podstawą do optymalizacji metod kultur *in vitro* stosowanych w mikropropagacji roślin, tworzeniu sztucznych nasion oraz genetycznym modyfikowaniu roślin.