



## Zmienność naturalna *Arabidopsis thaliana* jako narzędzie w badaniach molekularnych podstaw biosyntezy kumaryn

Joanna Siwińska, Katedra Biotechnologii, Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii UG & GUMed

Promotor: **prof. dr hab. Ewa Łojkowska**

Promotor pomocniczy: **dr Anna Ihnatowicz**

W przedstawionej rozprawie oznaczono poziom skopoletyny, w tkankach 28 ekotypów *Arabidopsis thaliana* pochodzących ze zróżnicowanych warunków środowiskowych i wykryto występowanie zmienności naturalnej w poziomie akumulacji tego związku. Na podstawie otrzymanych wyników wytypowano do dalszych analiz genetycznych populację mapującą uzyskaną z krzyżówki pomiędzy ekotypem Col-0, wykazującym niski poziom akumulacji skopoletyny, a ekotypem Est-1 wykazującym wysoki poziom skopoletyny. W trakcie przeprowadzonego mapowania genetycznego zlokalizowano loci cech ilościowych (QTL) warunkujące obserwowaną zmienność w akumulacji skopoletyny, a także jej formy zglikozydowanej – skopoliny.

Spośród zmapowanych regionów QTL wybrano trzy, które wyjaśniały największą część wariacji fenotypowej. Następnie, wykorzystując dostępne bazy danych oraz badania *in silico* wytypowano szereg genów kandydujących kodujących enzymy oraz czynniki transkrypcyjne, mogące warunkować zmienność naturalną w zakresie akumulacji skopoletyny i skopoliny. Na podstawie wyników sekwencjonowania wybranych genów oraz informacji dostępnych w bazach danych, wytypowano kilka interesujących polimorfizmów mogących leżeć u podłoża zmienności w akumulacji kumaryn. Wśród szczególnie interesujących genów kandydujących znalazły się: *cytochrom CYP81D11* (At3g28740), *UDP glukozyltransferaza* (At5g53990) i *dioksygenaza F6'H3* (At5g12270). Wykazano, iż UDP glukozyltransferaza posiada aktywność syntazy skopoliny *in vivo*. Oznaczono zawartość skopoletyny w tkankach korzeni mutantów insercyjnych (T-DNA) w szeregu innych genów kandydujących. Tkanki mutantów akumulowały wyższy lub niższy poziom skopoletyny w stosunku do roślin kontrolnych, ale nie wykryto różnic istotnych statystycznie.

Przeprowadzono analizę filogenetyczną dioksygenaz *A. thaliana*, w wyniku której na podstawie podobieństwa do sekwencji białkowych dioksygenaz opisanych w literaturze jako zaangażowane w końcowy etap biosyntezy skopoletyny (F6'H1 i F6'H2) wytypowano do dalszych analiz dwie kolejne dioksygenazy. Pierwsza z nich to zidentyfikowana w trakcie mapowania genetycznego dioksygenaza F6'H3 o nie poznanej dotąd funkcji. Druga zaś nie znajdowała się w regionach wykrytych podczas mapowania QTL i początkowo oznaczono ją jako F6'H4. W wyniku analiz biochemicznych scharakteryzowano funkcję F6'H4 jako syntazy fraksetyny (hydroksylazy 8-skopoletyny S8H), fraksetyna należy do grupy kumaryn. Analizy ekspresji genów oraz dane literaturowe wskazują na to, że hydroksylaza 8-skopoletyny pełni istotną rolę w odpowiedzi roślin w warunkach niedoboru żelaza.