

## STRESZCZENIE

### Regulacja różnicowania systemu przewodzącego w pędzie kwiatostanowym *Arabidopsis thaliana*

Magdalena Zyzak

System przewodzący jest jednym z najważniejszych układów tkankowych w roślinach, niezbędnym do ich prawidłowego wzrostu i funkcjonowania. W pędzie tworzy on ciągły, ściśle określony wzór przestrzenny. Wnikając do wszystkich organów, zaopatruje je w wodę i niezbędne składniki odżywcze, a co najważniejsze, jest ścieżką szybkiego przesyłania sygnałów, dzięki czemu integruje cały organizm. Pomimo, iż proces waskularyzacji jest przedmiotem wielu badań, mechanizm regulacji tego procesu nie został do tej pory w pełni wyjaśniony. Rozwój systemu przewodzącego w pędzie jest ściśle związany z powstawaniem organów na merystemie apikalnym pędu (SAM, ang. shoot apical meristem), a zgodnie z literaturą głównym czynnikiem regulującym oba te procesy, organogenezę i waskularyzację jest auksyna i jej polarny transport (PAT, ang. polar auxin transport) z udziałem białek PIN1. Ponadto proces formowania pojedynczego pasma waskularnego, łączącego nowo-inicjowany organ z systemem przewodzącym pędu, zachodzi wieloetapowo, a liczne badania wskazują, że PAT jest zaangażowany w regulację każdego z tych etapów, nie wyjaśniają one jednak dokładnie mechanizmów tej regulacji.

W związku z tym, celem niniejszej rozprawy doktorskiej było poznanie mechanizmów regulujących rozwój systemu przewodzącego w pędzie kwiatostanowym *Arabidopsis*, a w szczególności zrozumienie funkcji auksyny i PAT w kolejnych etapach tego procesu. Drugim celem pracy było ustalenie roli genów indukowanych auksyną, związanych z waskularyzacją: *AtHB8* i *MP/ARF5*, w tworzeniu ciągłych połączeń waskularnych, zaopatrujących organy boczne powstające na SAM.

W badaniach wykorzystano dwa opracowane układy eksperymentalne, które pozwalają na analizę rozwoju pojedynczego pasma waskularnego w warunkach uszkodzonego i funkcjonalnego PAT. W pierwszym z nich wykorzystano metodę indukcji pojedynczego organu i pasma waskularnego poprzez aplikację egzogennej auksyny na SAM mutantu *pin1*. Natomiast w drugim hamowano PAT poprzez podanie NPA, a następnie go przywracano poprzez odstawienie inhibitora z pożywki. W obu układach eksperymentalnych, wykorzystano rośliny linii transgenicznych z markerami specyficznymi dla najwcześniejszych etapów różnicowania waskularnego (J1721::GFP<sub>er</sub>, Q0990::GFP<sub>er</sub>), z markerami biosyntezy auksyn (pYUC1::GUS i pYUC4::GUS) i odpowiedzi auksynowej (pDR5rev::GFP), a także genami reporterowymi wizualizującymi aktywność promotorów genów *AtHB8* i *MP/ARF5*. Ponadto dopracowano i wykorzystano protokół immunolokalizacji auksyny w celu jej bezpośredniej lokalizacji tkankowej.

Uzyskane wyniki pokazały, że PAT nie jest jedynym źródłem auksyny, niezbędnej dla organogenezy i różnicowania waskularnego. Oprócz PAT istnieją jeszcze co najmniej dwa dodatkowe jej źródła dla tych procesów: lokalna biosynteza w SAM i akropetalny transport w pasmach waskularnych.

Udało się także ustalić, że PAT z udziałem białek PIN1 ma istotne znaczenie dla rozwoju preprokambium - wpływając na cały wzór przestrzenny systemu przewodzącego i dla różnicowania ksylemu - wpływając na efektywność tego różnicowania, nie jest jednak dla tych procesów niezbędny. Z kolei rozwój prokambium i floemu zachodzi bez udziału PAT zależnego od PIN1, a ich rozwój prawdopodobnie jest indukowany auksyną transportowaną akropetalnie z rejonów zróżnicowanych. Ponadto analizy ekspresji pAtHB8::GUS i pMP::GUS pokazały, że *AtHB8* uczestniczy w różnicowaniu waskularnym zachodzącym zarówno w sposób zależny i jak i niezależny od PAT, natomiast *MP/ARF5* prawdopodobnie tylko w waskularyzacji niezależnej od PAT. Na najwcześniejszych etapach rozwoju systemu przewodzącego w pędzie, w przeciwieństwie do liścia, współdziałanie tych dwóch genów prawdopodobnie nie jest konieczne do specyfikacji komórek prowaskularnych. Natomiast mogą one ze sobą współdziałać podczas różnicowania ksylemu i prawdopodobnie floemu, przynajmniej w warunkach uszkodzonego PAT z udziałem białek PIN1.

Zawarte w rozprawie wyniki pozwoliły na znalezienie dowodów na istnienie co najmniej dwóch mechanizmów regulujących proces waskularyzacji pędu kwiatostanowego i tworzenie ciągłych połączeń waskularnych pomiędzy organami bocznymi a pędem. Oba są warunkowane wysokim stężeniem auksyny, jednak jeden z nich związany jest z jej wpływem bazypetalnym z apikalnego źródła w SAM i ekspresją reportera odpowiedzi auksynowej pDR5rev::GFP, natomiast drugi jest zależny od auksyny transportowanej ze źródła bazalnego, akropetalnie, systemem przewodzącym i zachodzi bez aktywacji pDR5rev::GFP.

25.10.2022 Magdalena Żyzak

## ABSTRACT

### Regulation of the vascular system differentiation in the inflorescence stem of *Arabidopsis thaliana*

Magdalena Zyzak

The vascular system is one of the most important tissue systems in plants, necessary for their proper growth and functioning. In the stem, it forms a continuous, well-defined spatial pattern. Penetrating all organs, it supplies them with water and essential nutrients, and most importantly, it is a path of rapid signal transmission, thus it integrates the entire organism. Although the process of vascularization is the subject of many studies, the mechanism of the regulation of this process has not been fully explained thus far. The development of the vascular system is closely related to the formation of organs at the shoot apical meristem (SAM). According to the literature, the main factor regulating both these processes, organogenesis and vascularization, is auxin and its polar transport (PAT). Furthermore, the formation of a single vascular strand connecting the newly initiated organ with the existing vascular system is multi-stage, and numerous studies indicate that PAT is involved in the regulation of all the stages, but at the same time they do not fully explain the mechanisms of this regulation.

Therefore, this doctoral dissertation aimed to study the mechanisms regulating the development of the vascular system in the *Arabidopsis* inflorescence stem, and in particular to understand the functions of auxin and PAT in the subsequent stages of vascularization. The second aim was to determine the role of auxin-induced genes related to vascularization, *AtHB8* and *MP/ARF5*, in the formation of continuous vascular connections supplying the lateral organs initiated at SAM.

Two experimental systems were used in the research, which allowed analyzing the development of a single vascular strand both in shoots with damaged and functional PAT. In the first system, the method of a single organ and vascular strand induction by applying exogenous auxin to the SAM of the *pin1* mutant was used. In the second one, PAT was inhibited by NPA, and then restored by removing the inhibitor from the medium. In both experimental systems, plants of transgenic lines with markers specific to the earliest stages of vascular differentiation (*J1721::GFP*, *Q0990::GFP*), markers of auxin biosynthesis (*pYUC1::GUS* and *pYUC4::GUS*) and auxin response (*pDR5rev::GFP*) were used, as well as reporter genes visualizing the activity of the promoters of the *AtHB8* and *MP/ARF5* genes. In addition, an auxin immunolocalization protocol was refined and used for direct auxin tissue localization.

The obtained results showed that PAT is not the only source of auxin necessary for organogenesis and vascular differentiation. In addition to PAT, there are at least two other sources of auxin for these processes: local biosynthesis in SAM and acropetal transport in vascular strands.

It was also found that PAT with the participation of PIN1 proteins is important for the development of preprocambium, affecting the entire spatial pattern of the conducting system; and for xylem differentiation, having an impact on the efficiency of this differentiation, but it is not necessary for

both these processes. In turn, the development of procambium and phloem occurs without the participation of PIN1- dependent PAT, probably induced by auxin transported acropetally from differentiated regions. In addition, analysis of pAtHB8::GUS and pMP::GUS expression showed that *AtHB8* participates in both PAT-dependent and PAT-independent vascular differentiation, while *MP/ARF5* probably only in PAT-independent vascularization. In the earliest stages of the vascular system development of the stem, contrary to the leaf, the interaction of these two genes probably is not necessary for pro-vascular cell specification. On the other hand, they can cooperate during xylem and probably phloem differentiation, at least under conditions of damaged PAT involving PIN1 proteins.

The results presented in the dissertation proved the existence of at least two mechanisms regulating the process of vascularization of the inflorescence stem and the formation of continuous vascular connections between lateral organs and the shoot. Both are dependent on the high concentration of auxin, however, one of them is related to its basal flow from an apical source in the meristem and the expression of the auxin response reporter pDR5rev::GFP, while the other one is relies on auxin transported acropetally from the basal source, via the vascular system and occurs without the activation of the pDR5rev::GFP.

25.10.2022 Magdalena Zysak