

Uniwersytet Mikołaja Kopernika
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska

Mariusz Banach
nr albumu: 501621

Rozprawa doktorska
na kierunku Biologia

Wpływ temperatury oraz egzogennie
podawanych hormonów na ekspresję genów
szlaku autonomicznego u *Lupinus luteus*

Promotor dr hab. Jacek Kęsy
Katedra Fizjologii Roślin i Biotechnologii
Promotor pomocniczy dr Waldemar Wojciechowski
Katedra Fizjologii Roślin i Biotechnologii

Toruń 2019

Składam serdeczne podziękowania panu dr hab. Jackowi Kęsemu za pomoc, cierpliwość i cenne wskazówki przy napisaniu niniejszej pracy.

Składam serdeczne podziękowania panu dr Waldemarowi Wojciechowskiemu za pomoc, cierpliwość i cenne wskazówki przy napisaniu niniejszej pracy.

Spis treści

	str.
Spis treści	4
Streszczenie	7
Abstract	8
Wykaz skrótów	10
1. Wstęp	15
1.1. Ontogeneza roślin telomowych.....	15
1.2. Percepcja sygnałów przez rośliny.....	16
1.3. Indukcja kwitnienia.....	18
1.4. Szlaki indukcji kwitnienia.....	20
1.4.1. Szlak fotoperiodycznej indukcji kwitnienia.....	21
1.4.2. Szlak indukcji kwitnienia związany z jakością światła.....	25
1.4.3. Szlak wernalizacyjny indukcji kwitnienia.....	26
1.4.4. Szlak indukcji kwitnienia związany z temperaturą otoczenia.....	31
1.4.5. Szlak hormonalny indukcji kwitnienia.....	32
1.4.6. Szlak indukcji kwitnienia związany z dojrzałością fizjologiczną.....	34
1.4.7. Autonomiczny szlak indukcji kwitnienia.....	37
1.4.7.1. Gen <i>FCA</i>	40
1.4.7.2. Gen <i>FY</i>	42
1.4.7.3. Gen <i>FLD</i>	43
1.4.7.4. Gen <i>FLK</i>	44
1.4.7.5. Gen <i>FPA</i>	45
1.4.7.6. Gen <i>FVE</i>	47
1.4.7.7. Gen <i>LD</i>	49
1.4.7.8. Gen <i>SDR6</i>	50
1.4.7.9. Inne geny szlaku autonomicznego.....	50
1.4.8. Współdziałanie szlaku autonomicznego z innymi szlakami indukcji kwitnienia.....	50
1.5. Charakterystyka gatunkowa łubinu żółtego.....	55
1.5.1. Uprawy łubinu żółtego.....	56
1.5.2. Wiązanie azotu.....	58
1.5.3. Łubin żółty jako roślina modelowa.....	60
2. Cel pracy	62
3. Materiały i metody	63

3.1. Odczynniki chemiczne i zestawy do izolacji kwasów nukleinowych	63
3.2. Zestawy odczynników do reakcji PCR, Real TimePCR i klonowania	63
3.3. Zestawy odczynników do odwrotnej transkrypcji	64
3.4. Środki chemiczne do uprawy roślin oraz hormony roślinne	64
3.5. Specjalistyczne programy komputerowe	64
3.6. Materiał badawczy do identyfikacji genów	65
3.6.1. Warunki uprawy	65
3.6.2. Izolacja i walidacja RNA	65
3.6.3. Reakcja odwrotnej transkrypcji	66
3.7. Identyfikacja genów szlaku autonomicznego <i>Lupinus luteus</i>	67
3.7.1. Specyficzne wydłużanie końców cDNA genów AP techniką RACE	70
3.8. Oznaczenie ekspresji genów szlaku autonomicznego <i>L. luteus</i>	75
3.8.1. Warunki polowe uprawy łubinu	75
3.8.2. Izolacja i walidacja RNA	79
3.8.3. Reakcja odwrotnej transkrypcji	79
3.8.4. Reakcja Real Time PCR	79
4. Wyniki	82
4.1. Gen <i>FCA-like</i>	82
4.1.1. Identyfikacja sekwencji kodującej genu <i>LIFCA-like</i>	82
4.1.2. Analiza przewidywanej sekwencji białkowej LIFCA-like	83
4.1.3. Analiza ekspresji <i>LIFCA-like</i>	84
4.2. Gen <i>FY-like</i>	89
4.2.1. Identyfikacja cDNA genu <i>LIFY-like</i>	89
4.2.2. Analiza przewidywanej sekwencji aminokwasowej LIFY-like	89
4.2.3. Ustalenie wzorca ekspresji <i>LIFY-like</i>	91
4.3. Gen <i>FLD-like</i>	96
4.3.1. Identyfikacja genu <i>LIFLD-like</i>	96
4.3.2. Analiza przewidywanego białka LIFLD-like	97
4.3.3. Analiza wzorca ekspresji <i>LIFLD-like</i>	98
4.4. Gen <i>FPA-like</i>	103
4.4.1. Identyfikacja sekwencji kodującej <i>LIFPA-like</i>	103
4.4.2. Analiza przewidywanej sekwencji białkowej LIFPA-like	104
4.4.3. Analiza ekspresji <i>LIFPA-like</i>	106
4.5. Gen <i>FVE-like</i>	110
4.5.1. Identyfikacja cDNA genu <i>LIFVE-like</i>	110

4.5.2. Analiza przewidywanej sekwencji aminokwasowej LIFVE-like	111
4.5.3. Ustalenie wzorca ekspresji <i>LIFVE-like</i>	113
4.6. Gen <i>FLK-like</i>	117
4.6.1. Identyfikacja genu <i>LIFLK-like</i>	117
4.6.2. Analiza przewidywanego białka LIFLK-like	117
4.7. Gen <i>LD-like</i>	119
4.7.1. Identyfikacja sekwencji kodującej <i>LILD-like</i>	119
4.7.2. Analiza przewidywanej sekwencji białkowej LILD-like	121
5. Dyskusja	123
5.1. Identyfikacja genów szlaku autonomicznego u łubinu żółtego	124
5.2. Analiza ekspresji wybranych genów szlaku autonomicznego u łubinu żółtego	130
5.2.1. Wpływ fitohormonów na aktywność transkrypcyjną badanych genów	130
5.2.1.1. Wpływ giberelin na ekspresję 5 genów szlaku autonomicznego u łubinu żółtego	130
5.2.1.2. Wpływ ABA na ekspresję 5 genów szlaku autonomicznego u łubinu żółtego	133
5.2.2. Wpływ temperatury na aktywność transkrypcyjną badanych genów	136
5.2.3. Podsumowanie analizy ekspresji genów szlaku autonomicznego u łubinu żółtego	137
5.3. Zakończenie	139
Wnioski	141
Literatura	142

Streszczenie

Ontogeneza roślin okrytonasiennych jest procesem wieloetapowym i kontrolowanym przez czynniki zewnętrzne oraz wewnętrzne. Indukcja kwitnienia, związana z przejściem rośliny z fazy wzrostu wegetatywnego do fazy rozwoju generatywnego, kontrolowana jest przez 7 współdziałających ze sobą szlaków indukcji kwitnienia: szlak fotoperiodyczny, szlak zależny od jakości światła, szlak wernalizacyjny, szlak związany z temperaturą otoczenia, szlak hormonalny, szlak związany z dojrzałością fizjologiczną oraz szlak autonomiczny. Kontrola rozwoju generatywnego ma kluczowe znaczenie dla plonowania roślin. Jedną z roślin, z którą związane są duże nadzieje dla polskiej gospodarki jest łubin, którego plonowanie jest wyjątkowo silnie uzależnione od warunków uprawy. Od kilku lat realizowany jest rządowy program „Ulepszanie krajowych źródeł białka roślinnego”. Z jednej strony prowadzone są badania nad ograniczeniem opadania organów generatywnych a z drugiej badania powiązane z efektywnością i optymalizacją czasu kwitnienia. Wydaje, że szczególnie ważną rolę w procesie indukcji kwitnienia u łubinów odgrywa szlak autonomiczny, który jest stosunkowo słabo poznany od strony regulacji jego aktywności.

W oparciu o sekwencje genów poznanych u innych gatunków roślin z rodziny bobowatych, w pracy zidentyfikowano 7 genów szlaku autonomicznego *LIFCA*, *LIFY*, *LIFLD*, *LIFPA*, *LIFLK*, *LIFVE* i *LILD* obecnych u łubinu żółtego. Porównanie uzyskanych sekwencji cDNA wykazało największe podobieństwo do sekwencji homologicznych genów pochodzących od łubinu wąskolistnego. Analiza bioinformatyczna przewidywanych sekwencji białkowych tych genów pokazała występowanie konserwowanych domen charakterystycznych dla poszczególnych białek genów szlaku autonomicznego u *Arabidopsis thaliana*.

Analizy ekspresji 5 wybranych genów szlaku autonomicznego *LIFCA*, *LIFY*, *LIFLD*, *LIFPA* i *LIFVE* przeprowadzone z wykorzystaniem reakcji RT-qPCR, wykazały wrażliwość tych genów na egzogennie podawane fitohormony ABA i GA. Reakcja *LIFCA-like* na egzogenną aplikację ABA jest podobna do reakcji *A. thaliana*, gdzie ABA stymuluje ekspresję *FCA*. Egzogennie podane ABA lub GA powodują wzrost ekspresji badanych genów w liściach dolnych a w przypadku *LIFCA-like* oraz *LIFVE-like*, także w części wierzchołkowej. Zmiany aktywności transkrypcyjnej badanych genów w ogonkach liściowych oraz w liściach górnych po aplikacji GA względem liści dolnych są na ogół przeciwstawne. Wzrost ekspresji badanych genów w liściach górnych zaobserwowano także wraz ze wzrostem temperatury otoczenia pomiędzy porankiem a wczesnymi godzinami popołudniowymi.

Przedstawiona praca jest jedną z niewielu opisujących wpływ czynników zewnętrznych na ekspresję genów szlaku autonomicznego. Uzyskane wyniki podważają pogląd o niezależności szlaku autonomicznego od wpływu warunków środowiskowych.

Abstract

The ontogenesis of angiosperms is a multi-step process, controlled by both internal and external factors. The induction of flowering, involved in the plant's transition from vegetative development phase to the generative one, is controlled by seven interacting signaling pathways: photoperiodic pathway, light quality dependent pathway, vernalization pathway, ambient temperature pathway, hormonal pathway, physiological maturity dependent pathway and autonomous pathway. Regulation of the reproductive phase of development is crucial for crop yield and one of the main plants of significant importance for the Polish economy is lupine, whose yield is strongly dependent on the conditions of cultivation. For several years, a governmental program "Enhancing domestic sources of vegetable protein" has been implemented in Poland. On one hand, the conducted research is aimed at the suppression of generative organs abscission, on the other hand, studies related to the efficiency and optimization of flowering time are performed. It appears that it is the autonomous pathway, whose activity regulation mechanism is relatively poorly known, that plays a particularly important role in the induction of flowering in lupine.

Based on gene sequences known from other species of legume, seven genes of the autonomous pathway: *LIFCA*, *LIFY*, *LIFLD*, *LIFPA*, *LIFLK*, *LIFVE* and *LILD* were identified in yellow lupine in this work. Homology analysis of the obtained sequences revealed the highest similarity to the sequence of homologous genes from narrow-leaved lupine. Bioinformatic analysis of the predicted protein sequences for these genes showed the presence of conserved domains characteristic for particular autonomous pathway proteins from *Arabidopsis thaliana*.

Real-time PCR expression analysis of five selected genes of autonomous pathway *LIFCA*, *LIFY*, *LIFLD*, *LIFPA* and *LIFVE* indicated their sensitivity to exogenously applied phytohormones ABA and GA. The *LIFCA-like* gene response to exogenous ABA was similar to that of *A. thaliana*, where ABA stimulates the expression of *FCA*. Exogenously applied ABA or GA caused an increase in the expression of examined genes in the lower leaves, and in the case of *LIFCA-like* and *LIFVE-like* also in the apical part of the shoot. Changes in the transcriptional activity of *LIFCA*, *LIFY*, *LIFLD*, *LIFPA* and *LIFVE* in petioles and in the upper leaves after GA application was generally contrary

to the changes observed in the lower leaves. The increased expression of the examined genes in the upper leaves was also observed with the increase of ambient temperature between the morning and early afternoon hours.

The presented work is one of the few describing the effects of external factors on the autonomous pathway genes expression. The obtained results undermine the view of independence of the autonomous pathway from the impact of environmental conditions.

Wykaz skrótów

ABA – kwas abscysynowy	AtWDR5a – COMPASS-LIKE H3K4
ABI5 – ABA-INSENSITIVE 5	HISTONE METHYLASE
AG – AGAMOUS	COMPONENT WDR5A
AP – Autonomiczny szlak indukcji kwitnienia	BIK1 – BOTRYTISINDUCED KINASE1
AP1 – APETALA1	BZR1 – BRASSINAZOLE
AP2 – APETALA2	RESISTANT1
AP3 – APETALA 3	CAF-1 – chromatin assembly complex
ASH2R – ARABIDOPSIS ASH2 RELATIVE	CBP – ARABIDOPSIS
AtBMI1A – DREB2A-INTERACTING PROTEIN 2	CREB-BINDING PROTEIN
AtBMI1B - DREB2A-INTERACTING PROTEIN 1	CCA1 – CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1
AtBMI1C – PROBABLE E3	CDC73/PHP – PLANT HOMOLOGOUS TO PARAFIBROMIN
UBIQUITIN PROTEIN LIGASE DRIPH	CDF1 – CYCLING DOF FACTOR1
ATC – ARABIDOPSIS THALIANA CENTRORADIALIS HOMOLOGUE	CLF – CURLY LEAF
ATHB2 – ARABIDOPSIS THALIANA HOMEBOX PROTEIN 2	CO – CONSTANS
<i>AtMu</i> - <i>Mutator</i> elements from <i>Arabidopsis</i>	COBORU - Centralny Ośrodek Badania Odmian Roślin Uprawnych
atPRMT5 – PRTEIN ARGININE METHYLTRANSFERASE 5	COP1 – CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC 1
ARP6 – ACTIN-RELATED PROTEIN 6	COP10 – CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC 10
<i>AtSN1</i> - <i>Arabidopsis thaliana</i> SINE like element 1	CRY 1 – KRYPTOCHROM 1
ATX1 – HOMOLOG OF ANTI-OXIDANT 1	CRY 2 – KRYPTOCHROM 2
ATX2 – HOMOLOG OF ANTI-OXIDANT 2	CUL4–DDB1 ^{MS14} – CULLIN-RING UBIQUITIN LIGASE
ATXR7/SDG25 – ARABIDOPSIS TRITHORAX-RELATED7	DCL1 – DICER-LIKE 1
	DDB1 – DAMAGED DNA BINDING PROTEIN 1
	DET1 – DE-ETIOLATED1
	EFS/SDG8 – HISTONE-LYSINE N-METHYLTRANSFERASE ASHH2
	ELF3 – EARLY FLOWERING 3

ELF4 – EARLY FLOWERING 4
 ELF7 – EARLY FLOWERING 7
 ELF8/VIP6 – EARLY FLOWERING 8
 DNA – kwas deoksyrybonukleinowy
 EMF1 – EMBRYONIC FLOWER 1
 EMF2 – EMBRYONIC FLOWER 2
 ERF4 – ETHYLENE RESPONSE
 FACTOR 4
 ESD1 – EARLY IN SHORT DAYS 1
 EZH2 – ENHANCER OF ZESTE 2
 POLYCOMB REPRESSIVE COMPLEX
 2 SUBUNIT
 FAD – Dinukleotyd flawinoadeninowy
 FCA – RNA BINDING / FLOWERING
 TIME CONTROL PROTEIN FCA
 ALPHA
 FES1 – FRIGIDA ESSENTIAL1
 FIE – FERTILIZATION-
 INDEPENDENT ENDOSPERM
 FKF1 – FLAVIN-BINDING KELCH
 REPEAT FBOX1
 FLC – FLOWERING LOCUS C
 FLD – FLOWERING LOCUS D
 FLL4 – FLOWERING LOCUS C
 EXPRESSOR-LIKE 4
 FLK – FLOWERING LOCUS KH
 DOMAIN
 FLG22 - FLAGELLIN
 FLM – FLOWERING LOCUS M
 FLX – FLC EXPRESSOR
 FPA – FLOWERING TIME CONTROL
 PROTEIN FPA
 FRI – FRIGIDA
 FRL1 – FRIGIDA LIKE1
 FRL2 – FRIGIDA LIKE2
 FT – FLOWERING LOCUS T
 FUL – FRUITFULL
 FVE – HISTONE-BINDING PROTEIN
 FVE
 FY – FLOWERING TIME CONTROL
 PROTEIN FY
 GA – giberelina
 GAI – GA-INSENSITIVE
 GI – GIGANTEA
 GID 1 – GA INSENSITIVE DWARF1
 GID 2 – GA INSENSITIVE DWARF2
 GNC – CARBON-METABOLISM
 INVOLVED
 GNL – GNC-LIKE
 HAC1 – HISTONE
 ACETYLTRANSFERASE 1
 HAC5 – HISTONE
 ACETYLTRANSFERASE 5
 HAC12 – HISTONE
 ACETYLTRANSFERASE 12
 HDA5 – HISTONE DEACETYLASE5
 HDA6 – HISTONE DEACETYLASE6
 HDAC – HISTONE DEACETYLASE
 COMPLEX
 HOS1 - E3 UBIQUITIN LIGASE HIGH
 EXPRESSION OF OSMOTICALLY
 RESPONSIVE GENE 1
 HOX - Homeodomain / Homeobox
 DNA-binding factors
 HUA2 – ENHANCER OF AG-4
 PROTEIN 2
 HUB1 – HISTONE
 MONO-UBIQUITINATION 1
 HUB2 – HISTONE
 MONO-UBIQUITINATION 2

HYL1 – HYPONASTIC LEAVES 1
 IAA – kwas 3-indoliloctowy
 IG/LINE – Long interspersed nuclear elements
 IPA – kwas 3-indolilopirogronowy
 KH – domena wiążąca RNA (ang. K homology RNA-binding domain)
 LD – LUMINIDEPENDENS
 LFY – LEAFY
 LHP1 – LIKE HETEROCHROMATIN PROTEIN 1
 LHY – LATE ELONGATED HYPOCOTYL
 LKP2 – LOV KELCH PROTEIN 2
 MAF 1 – MADS AFFECTING FLOWERING 1
 MAF 4 – MADS AFFECTING FLOWERING 4
 MAF 5 – MADS AFFECTING FLOWERING 5
 MSI1 – ARABIDOPSIS MULTICOPY SUPPRESSOR OF IRA1
 MSI4 – alternatywna nazwa białka FVE
 MYB33 – MYB DOMAIN PROTEIN 33
 NAD - dinukleotydy nikotynoamidoadeninowy
 NGS – Next Generation Sequencing
 nt – nukleotydy
 PAF1 – POLYMERASE ASSOCIATED FACTOR COMPLEX
 PAMP – Pathogen Associated Molecular Patterns
 PCFS4 - PCF11P-SIMILAR PROTEIN 4
 PCR – reakcja łańcuchowa polimerazy (ang. polymerase chain reaction)
 PEP – PEPPER
 PER1 – 1-CYSTEINE PEROXIREDOXIN 1
 PFL1 – PIF LIKE 1
 PFT1 – PHYTOCHROME AND FLOWERING TIME 1
 PHYA – FITOCHROM A
 PHYB – FITOCHROM B
 PHYC – FITOCHROM C
 PHYD – FITOCHROM D
 PHYE – FITOCHROM E
 PKS1 – PHYTOCHROME KINASE SUBSTRATE 1
 PI – PISTILLATA
 PIE1 – PHOTOPERIOD INDEPENDENT EARLY FLOWERING1
 PIF3 – PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR 3
 PIF4 – PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR 4
 PNF – POUND-FOOLISH
 PNY – PENNYWISE
 PPLPP – motyw PPLPP prolina- prolina-leucyna- prolina- prolina
 PRC1 -like – POLYCOMB REPRESSION COMPLEX 1 like
 PRC2 – POLYCOMB REPRESSION COMPLEX 2
 PTI – Pattern Triggered Immunity
 pz – pary zasad
 QPVNG – motyw QPVNG złożony z powtórzeń glutamina-prolina-walina-asparagina-glicyna

RACE PCR – rapid amplification of cDNA ends PCR	SHB1 – SHORT HYPOCOTYL UNDER BLUE1
RBBP4 – domena wiążąca histony wchodzącą w skład podjednostki C kompleksu CAF1	SI – siew I
REF6 – RELATIVE OF EARLY FLOWERING 6	SII – siew II
RGA – REPRESSOR OF GA1-3	SIII – siew III
RGL1 – RGA LIKE 1	SIV – siew IV
RGL2 – RGA LIKE 2	SOC1 – SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CO1
RGL3 – RGA LIKE 3	SMZ – SCHLAFMÜTZE
RNA – kwas rybonukleinowy	SNZ – SCHNARCHZAPFEN
RNA-seq – RNA sequencing)	SPA1 – SUPPRESSOR OF PHYA 1
ROS - reaktywne formy tlenu	SPL – SQUAMOSA-PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE
RRM - RNA recognition motif	SPOC – Domena SPOC (ang. Span Paralog and ortholog C-terminal) jest zaangażowana w sygnalizację rozwojową.
RT-PCR – reakcja PCR na matrycy cDNA (ang. reverse transcription PCR)	SUF3 – SUPPRESSOR OF FRI 3
RT-qPCR – reakcja Real Time PCR na matrycy cDNA uzyskanej w reakcji odwrotnej transkrypcji	SUF4 – SUPPRESSOR OF FRIGIDA4
SAR – systemic acquired resistance)	SUMO – SMALL UBIQUITIN-LIKE MODIFIER
SCF – E3 SKP1–CUL1–F-BOX-PROTEIN	SV – siew V
SCI1 – SWINGER/CURLY LEAF INTERACTOR1	SVP – SHORT VEGETATIVE PHASE
SDR – krótki łańcuch dehydrogenazy/reduktazy	SWN – SET DOMAIN-CONTAINING PROTEIN
SDR6/ T1N6_22 – ROSSMANN-FOLD NAD(P)-BINDING DOMAIN-CONTAINING PROTEIN	SWIRM – Domena SWIRM (nazwa domeny pochodzi od białek SWI3, RSC8 i MOIRA, w których została odkryta po raz pierwszy)
SE – SERRATE	TEK – TRANSPOSABLE ELEMENT SILENCING VIA AT-HOOK
SEF – SERRATED LEAVES AND EARLY FLOWERING	TEM2 / RAV2 – TEMPRANILLO2
SEP3 – SEPALATA 3	TLD – liście dolne (trzecie liście licząc od liścieni)

TLG – liście górne (trzecie liście licząc od wierzchołka wzrostu)
TOC1 – TIMING OF CAB EXPRESSION
TOE1 – TARGET OF EAT1
TOE2 – TARGET OF EAT2
TOE3 – TARGET OF EAT3
TOLG – ogonki liściowe liści górnych
TPL – TOPLESS
TSF – TWIN SISTER OF FT
TWW – część wierzchołkowa
UBC 1 – UBIQUITIN CONJUGATING ENZYME 1
UBC 2 – UBIQUITIN CONJUGATING ENZYME 21
UBC 3 – UBIQUITIN CONJUGATING ENZYME 3

VRN1 – VERNALIZATION 1
VRN2 – VERNALIZATION 2
VIL1 – VRN5/ VIN3-LIKE 1
VIN3 – VERNALIZATION INSENSITIVE 3
WD – domena WD zawierająca wielokrotne powtórzenia tryptofan- kwas asparaginowy
WDR6 – WD Repeat Domain 6
WRKY – gen WRKY
WW – domena posiadająca dwie konserwowane reszty tryptofanu
WWP – domena posiadająca dwie konserwowane reszty tryptofanu
YUC8 – FLAVIN-CONTAINING MONOOXYGENASE YUCCA8
ZTL – ZEITLUPE

1. Wstęp

1.1. Ontogeneza roślin telomowych

Wzrost i rozwój roślin jest wieloetapowym procesem podlegającym kontroli zarówno genetycznej jak i środowiskowej. Ontogeneza roślin okrytonasiennych składa się z pięciu faz: 1 – rozwój zarodkowy, 2 – kiełkowanie nasion, 3 – rozwój wegetatywny, 4 - rozwój generatywny oraz 5 – okres starzenia się i obumierania. Każdy z etapów jest kontrolowany przez czynniki zewnętrzne i wewnętrzne. Do tych pierwszych zalicza się długość dnia i nocy, jakość światła, temperaturę, wilgotność, skład mineralny gleby, dostępność tlenu i dwutlenku węgla, obecność innych roślin, bodźce mechaniczne, obecność patogenów i żerowanie zwierząt, pole grawitacyjne. Natomiast czynnikami endogennymi są m.in. fitohormony, ekspresja genów, aktywność białek, regulatorowe RNA, stężenie cukrów i jonów (Huijser i Schmid 2011).

Rozwój zarodkowy rozpoczyna się w momencie tzw. podwójnego zapłodnienia, w którym dochodzi do zapłodnienia komórki jajowej i powstania diploidalnej zygoty. Równocześnie zachodzi fuzja centralnej komórki gametofitu z drugą komórką plemnikową, co prowadzi do wytworzenia triploidalnej komórki macierzystej bielma. W następstwie tych zdarzeń dochodzi do rozwoju zarodka oraz komórek odżywczych, które stanowią materiał zapasowy nasiona. Na tym etapie determinowana jest oś zarodkowa, merystemy wierzchołkowe pędu i korzeni oraz liścienia/liścieni. Dojrzały zarodek wraz z materiałem zapasowym tworzy nasiono, kończąc pierwszą fazę rozwojową (Poethig 2013).

Kiełkowanie nasion jest procesem dość złożonym, determinowanym warunkami środowiskowymi oraz endogennymi. W pierwszym jego stadium rozwijający się zarodek wykorzystuje zgromadzone materiały zapasowe. Jednocześnie dochodzi do rozwoju pierwszych liści, syntezy chlorofilu i rozpoczęcia fotosyntezy, co diametralnie zmienia sposób odżywiania rośliny. Siewki przechodzą wówczas do fazy rozwoju wegetatywnego (Née i in 2017).

Rozwój wegetatywny składa się z dwóch faz: młodocianej i dojrzałej. Przejście z etapu młodocianego do dojrzałego determinowane jest osiągnięciem przez siewkę odpowiedniej wielkości. Wówczas roślina staje się wrażliwa na czynniki inicjujące kwitnienie. Przejście do kolejnej fazy następuje po indukcji kwitnienia (Poethig 2013, Wojciechowski i Kopcewicz 2011).

Podczas rozwoju generatywnego, wzrost wegetatywny w zależności od gatunku rośliny, jest zahamowany lub spowolniony. Roślina wytwarza kwiaty, które po zapyleniu przekształcane są w nasiona. Zapylenie rozpoczyna jednocześnie pierwszą fazę rozwojową

dla roślin potomnych. Dojrzałe nasiona oddzielają się od rośliny macierzystej. Rośliny monokarpiczne przechodzą do fazy starzenia się i obumierania. Z kolei u roślin wieloletnich klimatu umiarkowanego, np. bylin, drzew i krzewów, zachodzą procesy mające przygotować roślinę do przetrwania niekorzystnych warunków zimowych. Polegają one m.in. na akumulacji substancji pokarmowych, które umożliwią wznowienie wegetacji wiosną. U bylin zamierają części nadziemne, a u drzew i krzewów opadają liście (nie dotyczy tzw. gatunków „zimozielonych”). U roślin wieloletnich dochodzi do wielokrotnego przejścia z fazy wegetatywnej do generatywnej, a następnie ponownie do wegetatywnej. W wielkim uproszczeniu powiedzieć można, że procesy te są kontrolowane przez szlaki indukcji kwitnienia (McClung i in. 2016, Poethig 2013, Wojciechowski i Kopcewicz 2011).

1.2. Percepcja sygnałów przez rośliny

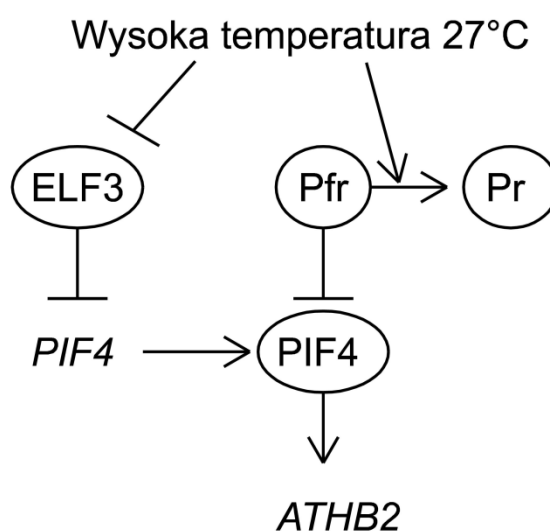
Rośliny wyższe, podobnie jak pozostałe organizmy żywe, poddawane są działaniu wielu bodźców. Istotne dla funkcjonowania rośliny informacje są odpowiednio odbierane i przetwarzane. Proces transdukcji sygnału w roślinie jest wieloetapowy. Pierwszym etapem jest odbiór sygnału, za który odpowiadają najczęściej receptory białkowe. Następną fazą jest przekształcenie sygnału na formę biochemiczną dostępną dla komórki, jego wzmocnienie poprzez aktywację wtórnych przekaźników i wywołanie zmian metabolicznych oraz fizjologicznych w roślinie. Niektóre sygnały endogenne, do których zaliczamy regulatorowe RNA, są zdolne do bezpośredniego wywoływania zmian, jak w przypadku interferencji RNA, prowadzącej do wybiórczego wyciszenia ekspresji genów (McClung i in. 2016, Song 2016, Zienkiewicz i in. 2006).

Do najważniejszych czynników egzogennych, z punktu indukcji kwitnienia, zaliczamy światło i temperaturę. U roślin występuje kilkanaście fotoreceptorów. Receptorami światła czerwonego i dalekiej czerwieni są fitochromy, niebieskiego kryptochromy, fototropiny, zeaksantyna i białka z rodziny ZEITLUPE, a ultrafioletu białka UVR8. Barwniki fotosyntetyczne, takie jak chlorofile oraz karoteny i ksantofile, poza światłem zielonym i częścią dalekiej czerwieni absorbują prawie cały zakres promieniowania widzialnego (390-750 nm). Białka i barwniki nie absorbują fal światła o ściśle określonej długości, co potwierdzają widma absorpcyjne tych związków obliczone w oparciu o ich strukturę. Z tego powodu fitochromy uznawane za receptory światła czerwonego absorbują również fale o inne długości. W identyczny sposób zachowują się pozostałe białka i barwniki. Pierwsze badania Juliusa von Sachsa, Harryego Ardella

Allarda i Wightmana Wellsa Garnera nad indukcją kwitnienia dotyczyły indukcji fotoperiodycznej (McClung i in. 2016, Song 2016, Zienkiewicz i in. 2006).

Światło jest zaangażowane w bardzo wiele przemian fizjologicznych u roślin. Bierze udział w przerywaniu spoczynku nasion fotoblastycznie dodatnich, w fotosyntezie, morfogenezie liści, fototropizmie oraz w indukcji kwitnienia. W każdym z tych procesów uczestniczy światło o różnej intensywności i jakości. Przerwanie spoczynku nasion jest w stanie indukować już światło Księżyca, ale w pozostałych procesach niezbędne jest światło słoneczne. Jakość i intensywność tego bodźca jest specyficzna dla siedliska zajmowanego przez dany gatunek rośliny. Jego nadmiar jest zazwyczaj niekorzystny dla roślin i prowadzi do uruchomienia procesów chroniących przez fotouszkodzeniami, do zahamowania fotosyntezy włącznie (Andersson i in. 2003, Chen i in. 2013).

U roślin nie występują klasyczne termoreceptory, jakie znamy u zwierząt. Za odpowiedź na zmiany temperatury odpowiedzialne są modyfikacje aktywności różnych białek, odmienna przepuszczalność błon komórkowych, niektóre frakcje RNA oraz struktury chromatyny. Stanowią one podstawę dwóch szlaków indukcji kwitnienia, wernalizacyjnego oraz związanego z temperaturą otoczenia (Jung i in. 2016, McClung i in. 2016, Song 2016).



Ryc. 1. Schemat percepcji temperatury u *A. thaliana* (Jung i in. 2016, zmieniona).

Temperatura, podobnie jak światło, jest zaangażowana w regulację wielu procesów podczas całej ontogenezy. Zarówno niskie jak i wysokie temperatury mogą indukować różne procesy. Niskie temperatury (wernalizacja) są zaangażowane w stratyfikację nasion i indukcję kwitnienia. Wzrost temperatury reguluje cały metabolizm, ponieważ rośliny są organizmami zmiennocieplnymi. Indukcja kwitnienia jest regulowana przez zmiany temperatury, także na innej drodze niż wernalizacja. U *Arabidopsis thaliana* poniekąd

funkcję receptora temperatury może pełnić fitochrom B. Temperatura kontroluje szybkość przejścia aktywnej formy fitochromu Pfr do nieaktywnej formy Pr. Wzrost temperatury przyspiesza ten proces, natomiast spadek spowalnia (Ryc. 1). Wydaje się, że odbywa się to poprzez regulację aktywności innych białek. Wysoka temperatura prowadzi do spadku aktywności EARLY FLOWERING 3 (ELF3), który jest represorem *PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR 4* (*PIF4*). Aktywny fitochrom Pfr hamuje aktywność PIF4, ale w warunkach wysokiej temperatury (27°C) dochodzi do przekształcenia Pfr do nieaktywnego Pr, który nie ma już negatywnego wpływu na funkcjonowanie tego peptydu. Z przeprowadzonych badań wynika, iż szlak odpowiedzi na temperaturę prowadzi przez podwyższenia aktywności PIF4, będącego aktywatorem promotora *ATHB2*, który inicjuje dalsze reakcje (Ryc. 1) (Jung i in. 2016).

1.3. Indukcja kwitnienia

Indukcja kwitnienia jest procesem złożonym, dlatego szczegółowo na poziomie molekularnym scharakteryzowano ją tylko u niewielu gatunków roślin. Najwięcej badań przeprowadzono na gatunkach modelowych takich, jak *Arabidopsis thaliana* czy *Ipomoea nil*. Jednakże fizjologiczna charakterystyka warunków indukujących kwitnienie ma szczególne znaczenie dla wielu roślin uprawnych (Wojciechowski i in. 2007, Zeevaart 2006).

Za początek badań nad fizjologią kwitnienia można uznać uprawy roślin w oranżeriach, które zapoczątkowano już w XVI wieku. Badania naukowe nad indukcją kwitnienia na szerszą skalę rozpoczęto na początku XX wieku. Pionierskie badania Harryego Ardella Allarda i Wightmana Wellsa Garnera w USA dotyczyły fotoperiodycznej regulacji zakwitania u krótko dniowej odmiany tytoniu olbrzymiego Maryland Mammoth. Wykazali oni, że kwitnienie i owocowanie roślin zależy od długości dnia i nocy – fotoperiodu (Garner i Allard 1920). Tymczasem w innej części świata, w Moskwie, badania nad fotoperiodyczną kontrolą kwitnienia prowadził zespół naukowy kierowany przez Mikhaila Chailakhyana. W 1936 roku opublikował on teorię florigenu. Założeniem tej koncepcji było, że pod wpływem fotoperiodycznej indukcji powstaje w liściach specyficzny, uniwersalny „hormon” kwitnienia – florigen, który jest transportowany floemem do wierzchołka wzrostu i zapoczątkowuje jego przekształcenie z wegetatywnego w generatywny. Założono także jego uniwersalność działania w obrębie badanych roślin, co dowodziły eksperymenty ze szczepieniami. Obserwowano inicjację rozwoju generatywnego zrazów niezaindukowanych zaszczepionych na podkładkach zaindukowanych do kwitnienia zarówno tego samego, jak i różnych gatunku. Początkowo

prowadzono badania na roślinach dnia krótkiego *Chrysanthemum indicum* i *Helianthus tuberosus* L. oraz fotoperiodycznie neutralnej *Helianthus annuus* L. W późniejszych latach do badań włączono rośliny dnia długiego. Eksperymenty przeprowadzone także na innych gatunkach potwierdziły, że florigen jest uniwersalnym dla wszystkich roślin „hormonem” kwitnienia. Jednakże badania w wielu ośrodkach naukowych na całym świecie nad izolacją i biochemiczną identyfikacją zakończyły się niepowodzeniem (Chailakhyan 1936, Wojciechowski i in. 2007, Zeevaart 2006).

W 1956 roku Anton Lang odkrył, że kwitnienie roślin rozetowych dnia długiego mogą indukować gibereliny (Lang 1965). W 1958 roku Chailakhyan zmodyfikował pierwotną koncepcję florigenu, zakładając, że jest on dwuskładnikowym kompleksem złożonym z giberelin i antezyn. Gibereliny miałyby być odpowiedzialne za tworzenie łodyg kwiatowych, a antezyny za tworzenie kwiatów. Chailakhyan zaproponował, że w warunkach nieindukcyjnych u roślin dnia długiego gibereliny są czynnikiem limitującym kwitnienie, a u roślin dnia krótkiego tym czynnikiem są antezyny. Za warunki nieindukcyjne uznaje się uprawę roślin dnia krótkiego w warunkach dnia długiego i na odwrót. Podobnie jak w przypadku florigenu zaczęto poszukiwać antezyny, ale zakończyły się to również niepowodzeniem. W późniejszych latach Chailakhyan ponownie modyfikował swoją pierwotną teorię wprowadzając pojęcie antyflorigenu – inhibitora kwitnienia, w której za proces kwitnienia odpowiedzialna była równowaga pomiędzy florigenem a antyflorigenem (Wojciechowski i in. 2007, Zeevaart 2006).

W 1977 roku Wesley P. Hackett i Roy M. Sachs zaproponowali hipotezę różnorodności pokarmowej zwaną również teorią asymilatów. Głównym założeniem było, że specyficzny transport asymilatów do wierzchołków wzrostu, jako wynik indukcji fotoperiodycznej jest czynnikiem indukującym kwitnienie przy jednoczesnym zablokowaniu transportu inhibitorów kwitnienia (Sachs i Hackett 1977). Dekadę później powstała kolejna teoria indukcji kwitnienia opublikowana w 1988 roku przez Georgesa Berniera. W wielkim uproszczeniu, jego wieloczynnikowy model kwitnienia zakłada, że za indukcję kwitnienia odpowiada wypadkowa czynników regulowanych przez hormony, fitochrom, asymilaty oraz czynniki fizyczne i chemiczne. Zakładał on istnienie wielu aktywatorów i inhibitorów kwitnienia oraz zaprzeczał istnieniu uniwersalnego „czynnika” kwitnienia czy pary takich „czynników”, co było zaprzeczaniem teorii florigenu z jej późniejszymi modyfikacjami. (Bernier 1988). Dopiero rozwój biologii molekularnej, technik identyfikacji genów oraz sekwencjonowania umożliwił dalsze postępy w wyjaśnieniu mechanizmów indukcji kwitnienia. Fakt, że współczesne modele znacząco różnią się od zaprezentowanych wcześniej teorii nie zaprzecza sensu

przeprowadzenia ówczesnych badań. W ich wyniku scharakteryzowano rośliny pod kątem fizjologii kwitnienia. Zidentyfikowano rośliny dnia krótkiego/długiego, fotoperiodycznie neutralne oraz gatunki wymagające wernalizacji. Nikt nie zaprzeczył, że asymilaty nie biorą udziału w procesie kwitnienia, a nawet potwierdzono udział cukrów w tym procesie. Najnowsze badania pokazują, że kwitnienie jest procesem o wiele bardziej złożonym niż uważali autorzy opisanych powyżej teorii (Wojciechowski i in. 2007, Zeevaart 2006).

1.4. Szlaki indukcji kwitnienia

Cykl życiowy roślin telomowych składa się z kilku następujących po sobie etapów. Prawidłowy ich przebieg i precyzyjna kontrola czasu następowania ich po sobie wymaga współdziałania wielu mechanizmów działających na różnych poziomach organizacji komórki. Jednym z najważniejszych wydarzeń jest indukcja kwitnienia (McClung i in 2016, Song 2016, Zienkiewicz i in. 2006).

Kluczowym czynnikiem zapewniającym sukces reprodukcyjny jest optymalny dla rozwoju, wynikających z warunków środowiskowych, termin kwitnienia. Zbyt wczesne lub zbyt późne zainicjowanie tej fazy rozwoju odbywałoby się odpowiednio u roślin za młodych, lub nie możliwe byłoby wydanie nasion przed końcem okresu wegetacyjnego. Produkcja dojrzałych, prawidłowo wykształconych organów generatywnych o możliwie dużym zróżnicowaniu genetycznym sprzyja rozwojowi nie tylko następnego pokolenia, ale i całego gatunku (McClung i in. 2016, Song 2016, Zienkiewicz i in. 2006).

Na podstawie badań prowadzonych od kilkadziesiąt lat na *Arabidopsis thaliana* opisano i scharakteryzowano różne drogi inicjujące i kontrolujące rozwój generatywny. Ze względu na pochodzenie bodźca i jego charakter podzielono je na egzogenne i endogenne. Pierwsze inicjowane są działaniem na roślinę takich czynników, jak jakość światła oraz czas jego trwania, czy temperatura otoczenia i jej okresowe obniżenie lub podwyższenie. W oparciu o rozliczne badania wyszczególniono odpowiadające im szlaki. Endogenna kontrola inicjacji kwitnienia obejmuje również zmiany ekspresji wielu innych genów i aktywności szeregu białek. Wszystkie je podzielono na kilka grup, ze względu na wrażliwość i współdziałanie we wspólnych mechanizmach molekularnych. Dzięki temu wyróżniono dodatkowo szlaki związane z determinacją wieku rośliny, hormonalny i autonomiczny. Dotychczas wyróżniono 7 szlaków indukcji kwitnienia (McClung i in. 2016, Song 2016, Zienkiewicz i in. 2006).

Proces indukcji kwitnienia jest wieloetapowy. Do jego rozpoczęcia niezbędny jest egzo- lub endogenne bodziec działający w fazie dojrzałego rozwoju wegetatywnego, w którym roślina jest na dany typ induktora wrażliwa. Sygnały te odbierane są także

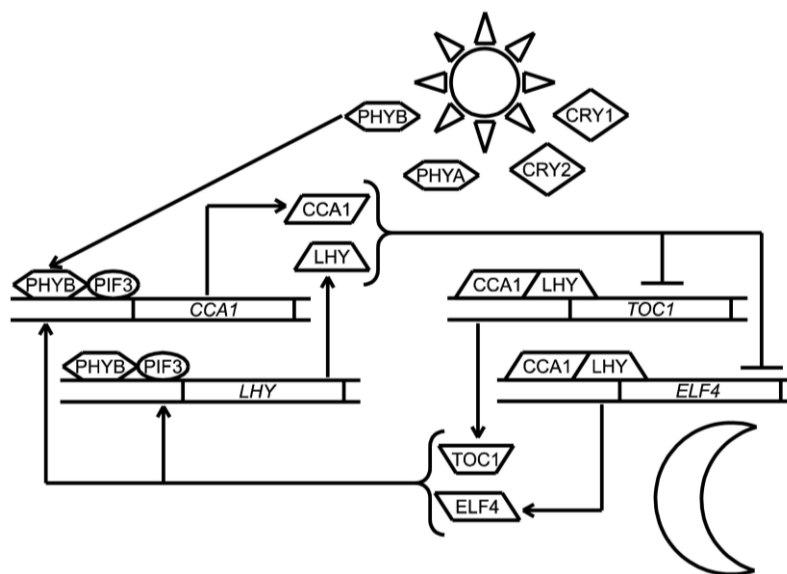
na innych etapach rozwoju, jednak rośliny nie są w stanie na nie odpowiadać w postaci inicjacji kwitnienia. U zaindukowanych roślin zachodzą zmiany metaboliczne mające wprowadzić roślinę w fazę rozwoju generatywnego. Zmiana ekspresji genów integratorowych kwitnienia oraz transport ich produktów w roślinie indukuje ekspresję genów efektorowych, co umożliwia rozwój pąków kwiatowych, gametofitu, a po zapłodnieniu wydanie nasion (McClung i in. 2016, Song 2016, Zienkiewicz i in. 2006).

Wszystkie szlaki indukcji kwitnienia, choć wydaje się, że mogą działać samodzielnie, to jednak, na różnych etapach, są ze sobą ściśle powiązane. Żaden ze szlaków indukcji kwitnienia nie jest zdolny do samodzielnego zainicjowania rozwoju generatywnego, a efekt końcowy uzyskiwany jest dzięki współdziałaniu zwykle dwóch lub trzech z nich. Prowadzi to w konsekwencji do zmian ekspresji nielicznej grupy genów integratorowych. U rzodkiewnika pospolitego obejmuje ona cztery geny: *FLOWERING LOCUS T (FT)*, *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CO1 (SOC1)*, *LEAFY (LFY)*, *TWIN SISTER OF FT (TSF)*, które wyznaczają czas kwitnienia wywołany aktywnością transkrypcyjną genów tożsamości merystemu i rozwoju kwiatów. Od kilku lat, ze względu na wzajemne interakcje pomiędzy szlakami indukcji kwitnienia sugeruje się istnienie sieci wzajemnych powiązań prowadzących do zapoczątkowanie rozwoju generatywnego. Najlepiej i kompleksowo opisano ją w przypadku mechanizmów funkcjonowania tych dróg u rzodkiewnika pospolitego *Arabidopsis thaliana* (McClung i in. 2016, Song 2016, Zienkiewicz i in. 2006).

1.4.1. Szlak fotoperiodycznej indukcji kwitnienia

Najwcześniej i najdokładniej opisanym jest szlak fotoperiodycznej indukcji kwitnienia. Istotą jego działania jest transdukcja sygnału świetlnego wyznaczanego długością dnia i nocy, a następnie poprzez zmiany ekspresji *FT*, wywołanie odpowiedzi prowadzącej do inicjacji kwitnienia. Za odbiór bodźców odpowiadają fotoreceptory, które odpowiedzialne są za regulację genów zegara okołodobowego. Centralną część tego układu stanowi wewnętrzny oscylator. U *A. thaliana* składa się on z co najmniej czterech genów: *CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1 (CCA1)*, *LATE ELONGATED HYPOCOTYL (LHY)*, *TIMING OF CAB EXPRESSION (TOC1)* i *EARLY FLOWERING 4 (ELF4)* (Ryc. 2). Najprostszym sposobem regulacji funkcjonowania zegara okołodobowego jest działanie światła czerwonego i udział w tych mechanizmach FITOCHROMU B (PHYB). Nieaktywna forma fotoreceptora jest w cytoplazmie związana z białkiem PHYTOCHROME KINASE SUBSTRATE 1 (PKS1). Fotokonwersja PHYB

z formy Pr do Pfr pod wpływem światła czerwonego powoduje aktywację domeny kinazowej apoproteiny. Katalizuje ona autofosforylację i fosforylację PKS1, co prowadzi do zmian konformacyjnych i rozdzielania białek. Umożliwia to transport zaktywowanego PHYB do jądra komórkowego. Fotoreceptor w jądrze komórkowym wiąże się z czynnikiem transkrypcyjnym PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR 3 (PIF3) (Ryc. 2), który aktywuje ekspresję *LHY* i *CCA1*. Szczyt akumulacji białek kodowanych przez obydwa wspomniane geny następuje dwie godziny po inicjacji transkrypcji. Po przetransportowaniu *LHY* i *CCA1* do jądra komórkowego wiążą się one z sekwencją EVENING ELEMENT promotorów *TOC1* i *ELF4*, co prowadzi do hamowania ekspresji tych ostatnich w ciągu dnia. Spadek ilości *TOC1* i *ELF4* prowadzi do obniżenia ekspresji *LHY* i *CCA1*. Najniższą aktywność transkrypcyjną tych ostatnich obserwuje się po zmierzchu. Brak ich produktów białkowych pozwala na ponowne uruchomienie ekspresji *TOC1* oraz *ELF4*. Konsekwencją akumulacji *TOC1* przypadającej na czas nocy jest oddziaływanie np. *TOC1* z PIF3 i PIF LIKE 1 (PFL1), co wywołuje aktywację transkrypcji *LHY* i *CCA1* o wschodzie słońca (de Montaigu i in. 2010, Zienkiewicz i in. 2006).

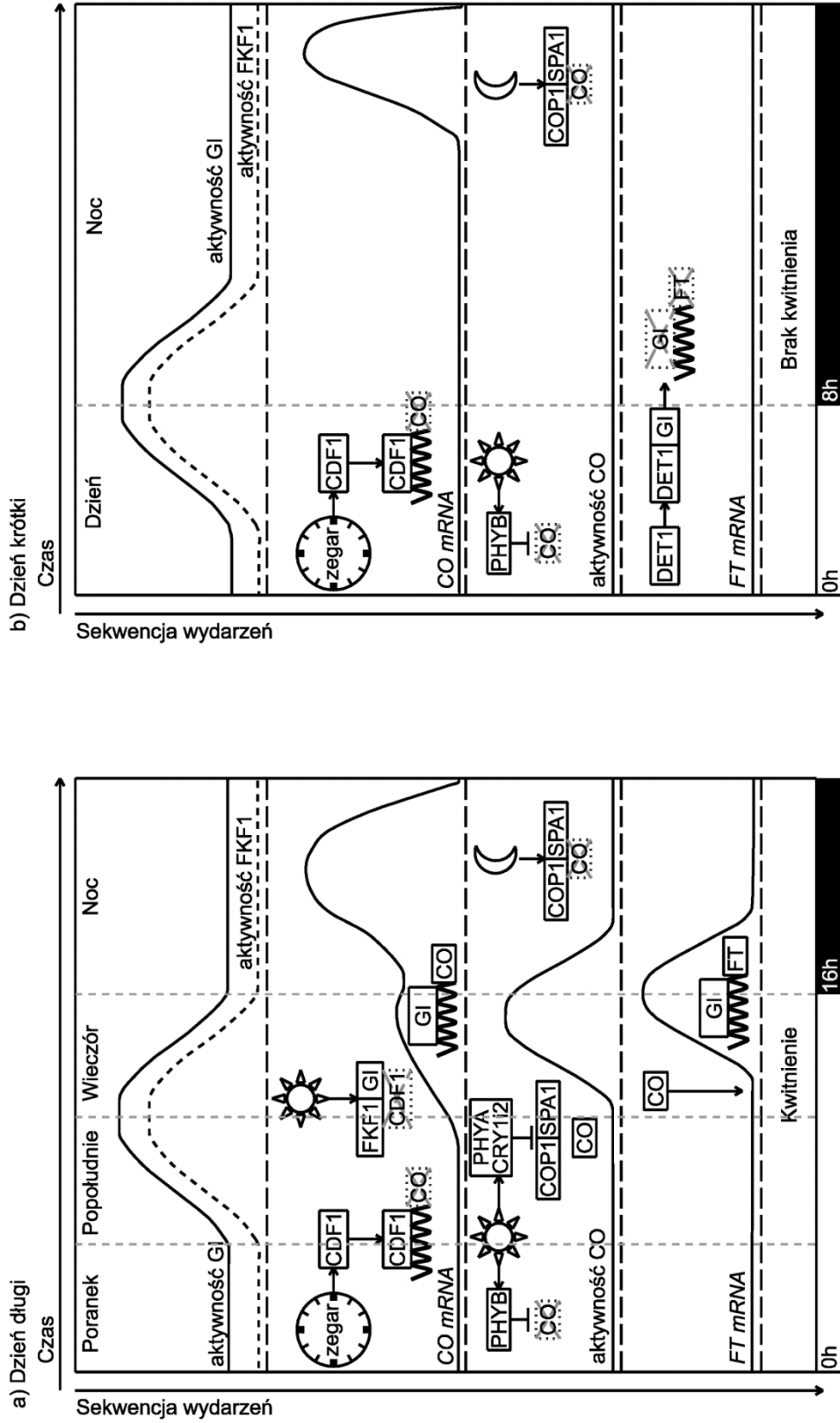


Ryc. 2. Uproszczony schemat zegara okołodobowego u *A. thaliana* (de Montaigu i in. 2010, Zienkiewicz i in. 2006, zmieniona).

Nie tylko PHYB bierze udział w przekazywaniu sygnału świetlnego. W regulację zegara okołodobowego zaangażowane są również pozostałe fitochromy A, C, D i E oraz kryptochromy 1 i 2 (CRY 1 i 2). Analiza poczwórnego mutantu *phyAphyBcry1cry2* nie wykazała u niego zaburzeń w cyklu okołodobowym, co dowodzi istnienia innych białek uczestniczących w tym szlaku transdukcji sygnału. Zidentyfikowano 3 białka należące

do rodziny ZEITLUPE, do których zalicza się ZEITLUPE (ZTL), LOV KELCH PROTEIN 2 (LKP2) i FLAVIN-BINDING KELCH REPEAT FBOX1 (FKF1). Są one flawoproteinowymi receptorami światła niebieskiego. Białka należące do tej rodziny posiadają 3 domeny funkcjonalne. Na N-końcu posiadają domenę LOV, która jest odpowiedzialna za interakcje białko-białko i wiązanie grupy chromoforowej FMN (mononukleotyd flawinowy). W środkowej części zidentyfikowano motyw F-box zaangażowany w procesy ubikwitynacji i degradacji białek. Na C-końcu peptydu oznaczono sześć powtórzeń domeny KELCH, która bierze udział w interakcjach białko-białko (de Montaigu i in. 2010, Zienkiewicz i in. 2006).

Wewnętrzny oscylator kontroluje ekspresję genu kodującego białko GIGANTEA (GI), które wraz z FKF1 jest zaangażowane w regulację ekspresji *CONSTANS* (*CO*) (Ryc. 3). Aktywność GI i FKF1 zmienia się wraz z cyklem okołodobowym i wzrasta w godzinach popołudniowych, osiągając maksimum wieczorem, a spada nocą. Kolejnym z opisanych peptydów ważnych w funkcjonowaniu szlaku fotoperiodycznej indukcji kwitnienia jest CYCLING DOF FACTOR1 (CDF1). Jest to represor transkrypcji genu *CO* (Ryc. 3). W warunkach dnia długiego światło niebieskie promuje i stabilizuje interakcje pomiędzy GI i FKF1. Powstały w ten sposób kompleks wiąże się z CDF1 i wyznacza je do ubikwitynozależnej degradacji w proteasomie (Ryc. 3). Konsekwencją usunięcia represora ekspresji jest aktywacja transkrypcji *CO*. Apogeum aktywności *CO* wypada jednak nie wieczorem a w nocy. Lecz mimo wzmożonej syntezy mRNA tego genu, ilość białka jest niska (Ryc. 3). Jest to związane z wyznaczaniem *CO* do degradacji w proteasomie 26S przez ubikwitynację zależną od kompleksu ligaz CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC 1 (COP1) i SUPPRESSOR OF PHYA 1 (SPA1) (Ryc. 3). W ciągu dnia aktywność ligaz COP1/SPA1 jest hamowana przez światło za pośrednictwem fotoreceptorów PHYA, CRY1 i CRY2. W nocy dochodzi do aktywacji obu białek i spadku ilości *CO*. Jednakże akumulacja *CO* obserwowana w czasie dnia jest wystarczająca do aktywacji ekspresji *FT*, a następnie akumulacji białka *FT* co jest decydującym zdarzeniem na drodze prowadzącej do zakwitania w warunkach dnia długiego (Ryc. 3). Transkrypt *FT* lub/i dojrzałe białko są transportowane z liści do wierzchołka wzrostu, co prowadzi do inicjacji ekspresji genów tożsamości merystemu wierzchołkowego i w konsekwencji ewokacji (de Montaigu i in. 2010, Zienkiewicz i in. 2006).



Ryc. 3. Uproszczony schemat fotoperiodycznego szlaku indukcji kwitnienia. a) W warunkach dnia długiego akumulacja GI i FKF1 z światłem umożliwia akumulację CO i indukcję kwitnienia. b) W warunkach dnia krótkiego szczyt akumulacji GI i FKF1 przypada na koniec dnia, co uniemożliwia ubikwitinację CDF1 przez kompleks GI/FKF1 z powodu braku jego aktywacji przez światło. Nie dochodzi do akumulacji CO i indukcji kwitnienia (Kang i in. 2015, de Montaigu i in. 2010, Zienkiewicz i in. 2006 zmodyfikowana).

Przeprowadzono także badania, w których wykazano, że GIGANTEA może kontrolować ekspresję *FT* niezależnie od *CO*. Dochodzi do tego w wyniku związania GI w obrębie promotora *FT*, co prowadzi do inicjacji ekspresji tego genu. Potwierdzono w ten sposób, że ilość tego białka jest kontrolowana nie tylko przez zegar okołodobowy. Wyniki doświadczeń wykonanych na rzodkiewniku pokazały, że z tym peptydem regulatorowym oddziałuje jeszcze czynnik DE-ETIOLATED1 (DET1). Do wiązania dochodzi w warunkach dnia krótkiego, a utworzony kompleks DET1 GI znosi powinowactwo drugiego z białek do promotora *FT*. Zidentyfikowano także inny negatywny regulator aktywności GIGANTEA. Białko zegara okołodobowego ELF4 hamuje wiązanie wspomnianego peptydu do elementów typu cis w promotorze genu *CO*. Wykazano również dodatkowe oddziaływania pomiędzy wspomnianymi wcześniej DET1 oraz GI z LHY i CCA1. W warunkach dnia krótkiego pierwszy z peptydów współdziała z elementami wewnętrznego oscylatora uniemożliwiając wiązania się GI z promotorem *FT*. Pomimo opisanego wielu zależności, które przedstawiono powyżej, dokładny mechanizm działania DET1 jest słabo poznany (Kang i in. 2015).

1.4.2. Szlak indukcji kwitnienia związany z jakością światła

Szlak indukcji kwitnienia związany z jakością światła reguluje indukcję kwitnienia w zależności od rejestrowanego widma docierającego do rośliny. W klasycznym ujęciu fotoreceptory PHYA, PHYB, PHYC, PHYD i PHYE odpowiedzialne są za transdukcję sygnału będącego wypadkową intensywności światła czerwonego R do dalekiej czerwieni FR. Wzajemny stosunek ilości obu długości fal świetlnych nosi nazwę współczynnika R:FR. Wartość R:FR zmienia się w ciągu dnia i dla światła dziennego wynosi 1,05-1,25, a o zmroku 0,65-1,15. W przypadku siedlisk zacienionych, takich jak dno lasu iglastego R:FR przybiera wartość 0,76-0,77, a dla lasu równikowego 0,22-0,25. Warunki świetlne, w jakich dane rośliny są w stanie kwitnąć są specyficzną cechą gatunkową. Klasyczne badania fizjologiczne nad fotoindukcją kwitnienia wykazały wpływ innych długości fal światła na kwitnienie. Znaczenie ma również intensywność światła, ponieważ fotoreceptory absorbują każdą falę światła, ale z różną intensywnością. Dlatego fitochromy są receptorami światła czerwonego, ponieważ czerwone światło jest absorbowane najefektywniej, ale światło niebieskie i zielone jest absorbowane na bardzo niskim poziomie, kilka tysięcy razy niższym niż czerwone. Ma to znaczenie jedynie przy świetle o bardzo dużej intensywności na granicy stresu świetlnego i w warunkach fizjologicznych nie odgrywa większej roli (Iñigo i in. 2012, Zienkiewicz i in. 2006).

Według zaproponowanej kilka lat temu hipotezy fitochromy PHYB i PHYE są negatywnymi regulatorami przypuszczalnego czynnika transkrypcyjnego X kontrolującego ekspresję genu PHYTOCHROME AND FLOWERING TIME 1 (PFT1). Do aktywacji PFT1 dochodzi w warunkach zacienienia (spadku współczynnika R:FR), co prowadzi do przyspieszenia kwitnienia. PFT1 przyspiesza kwitnienie dwiema drogami. Pierwsza z nich obejmuje promowanie ekspresji genu *CO*, co powoduje wzrost ekspresji genów integratorowych indukcji kwitnienia *FT*, *SOC1* i *LFY*. Druga droga jest niezależna od *CO* i polega na bezpośrednim promowaniu ekspresji genu *FT*. Prowadzone badania wykazały także udział PFT1 w odpowiedziach roślin na jasmoniany oraz zmiany temperatury otoczenia (Iñigo i in. 2012, Zienkiewicz i in. 2006).

1.4.3. Szlak wernalizacyjny indukcji kwitnienia

Szlak wernalizacyjny jest jednym z dwóch szlaków bezpośrednio związanych z warunkami termicznymi wzrostu roślin. W przeciwieństwie do szlaku związanego z temperaturą otoczenia, dotyczy on niskich temperatur, w zależności od gatunku, od 1-3 do 7-17°C. Efektem działania szlaku wernalizacyjnego w wielkim uproszczeniu sprowadza się do represji transkrypcji genu *FLOWERING LOCUS C (FLC)* (Kim i in. 2009).

Rzodkiewnik pospolity wykazuje duże zróżnicowanie genetyczne. Jego pierwotny zasięg występowania obejmuje całą Europę, prawie całą Azję oraz północną Afrykę. Gatunek ten został zawleczony przez człowieka do centralnej i południowej Afryki, USA, Kanady, Australii, Japonii oraz do południowej części Ameryki Południowej. W bazie *Arabidopsis* Biological Resource Center znanych jest ponad 5000 ekotypów, a w bazie Versailles *Arabidopsis* Stock Center ponad 700. W ramach projektu 1001 Genomes dostępne są *on-line* sekwencje ponad 1100 ekotypów tego gatunku. Każdy z nich wykazuje zróżnicowanie cech morfologicznych i fizjologicznych. Jedną z tych różnic jest wymóg wernalizacji do indukcji kwitnienia. Dla części ekotypów wernalizacja jest czynnikiem obligatoryjnym tzw. „ekotypy ozime”, a część „ekotypy jare” zakwitają bez działania niskich temperatur (Szymańska i in. 2015).

W wyniku badań przeprowadzonych na rzodkiewniku pospolitym wykazano, że szlak wernalizacyjny składa się z co najmniej pięciu genów *VERNALIZATION 1 (VRN1)*, *VERNALIZATION 2 (VRN2)*, *VRN5/ VIN3-LIKE 1 (VIL1)*, *VERNALIZATION INSENSITIVE 3 (VIN3)* i *PROTEIN ARGININE METHYLTRANSFERASE 5 (atPRMT5)*. Ekspresja pierwszych trzech z wymienionych jest konstytutywna i nie zależy od zmian warunków otoczenia. Obniżenie temperatury i utrzymywanie się tego stanu przez kilka dni powoduje wzrost aktywności transkrypcyjnej *VIN3*, a pojawienie się białka przezeń

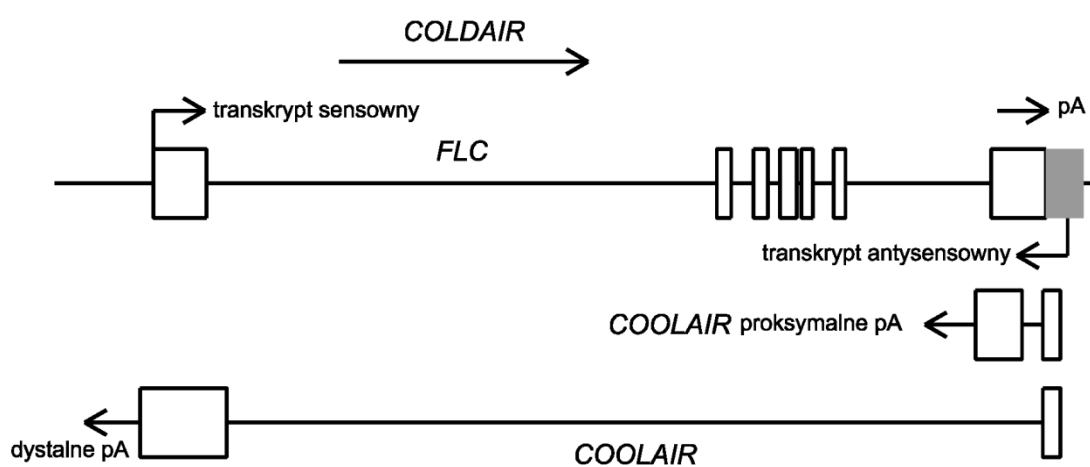
kodowanego inicjuje przemiany charakterystyczne dla szlaku wernalizacyjnego (Kim i in. 2009, Kim i Sung 2014).

Kluczowym w funkcjonowaniu tej drogi prowadzącej do kwitnienia jest inhibitor tego procesu, gen *FLC*. U rzodkiewnika opisano kilka mechanizmów kontrolujących jego ekspresję. Wykazano równocześnie, że jego produkt białkowy wpływa na aktywność transkrypcyjną, co najmniej kilku genów ważnych w procesie inicjacji kwitnienia i ewokacji kwiatu. W czasie ontogenezy dochodzi do swoistej rywalizacji czynników pozytywnie oraz negatywnie wpływający na ekspresję *FLC*. Dynamika przemian wyznaczona przez jedną i drugą grupę decyduje o aktualnym stanie metabolicznym i wyznacza czas inicjacji rozwoju generatywnego (Kim i in. 2009, Kim i Sung 2014).

U ekotypów ozimych rolę aktywatora ekspresji *FLC* pełni kompleks FRIGIDA (FRI) złożony z ośmiu białek FRIGIDA ESSENTIAL1 (FES1), FLC EXPRESSOR (FLX), FRI, FRIGIDA LIKE1 (FRL1), FRIGIDA LIKE2 (FRL2), SUPPRESSOR OF FRIGIDA4 (SUF4), HISTONE-LYSINE N-METHYLTRANSFERASE ASHH2 (EFS/SDG8) i FLOWERING LOCUS C EXPRESSOR-LIKE 4 (FLL4). Oddziałuje on z białkami wiążącymi czapkę mRNA i reguluje poziom mRNA *FLC*. Ponadto wraz z kompleksem PAF1 (złożony z PLANT HOMOLOGOUS TO PARAFIBROMIN (CDC73/PHP), EARLY FLOWERING 7 (ELF7) i EARLY FLOWERING 8 (ELF8/VIP6)) bierze udział w trimetylacji histonów, a dokładnie lizyny 4 i 36, histonu H3, odpowiednio H3K4triMe i H3K36triMe (Ryc. 5). Kompleks COMPASS (złożony z ARABIDOPSIS ASH2 RELATIVE (ASH2R), HOMOLOG OF ANTI-OXIDANT 1 (ATX1), HOMOLOG OF ANTI-OXIDANT 2 (ATX2), ARABIDOPSIS TRITHORAX-RELATED7 (ATXR7/SDG25) i COMPASS-LIKE H3K4 HISTONE METHYLASE COMPONENT WDR5A (AtWDR5a)) jest zaangażowany w utrzymanie wysokiego poziomu H3K4triMe, co podtrzymuje transkrypcję *FLC* na wysokim poziomie (Ryc. 5). Kolejny z opisanych kompleksów białkowych obejmuje RAD6-BRE1 (złożony z białek HISTONE MONO-UBIQUITINATION 1 1 i 2 (HUB1 i 2) i UBIQUITIN CONJUGATING ENZYME 1, 2 i 3 (UBC 1,2 i 3)) i zaangażowany jest w ubikwitynację ogona histonu H2B, co promuje elongację transkrypcji *FLC*. Modyfikacja ta nosi nazwę H2Bub1. Kompleks SWR1 (złożony z PHOTOPERIOD INDEPENDENT EARLY FLOWERING 1 (PIE1), ACTIN-RELATED PROTEIN 6 (ARP6)/ SUPPRESSOR OF FRI 3 (SUF3)/ EARLY IN SHORT DAYS 1 (ESD1) i SERRATED LEAVES AND EARLY FLOWERING (SEF)) bierze udział w zamianie histonu H2A na wersję alternatywną H2AZ (Ryc. 5). Taki stan strukturalny chromatyny, determinowany przez wszystkie z wymienionych komponentów,

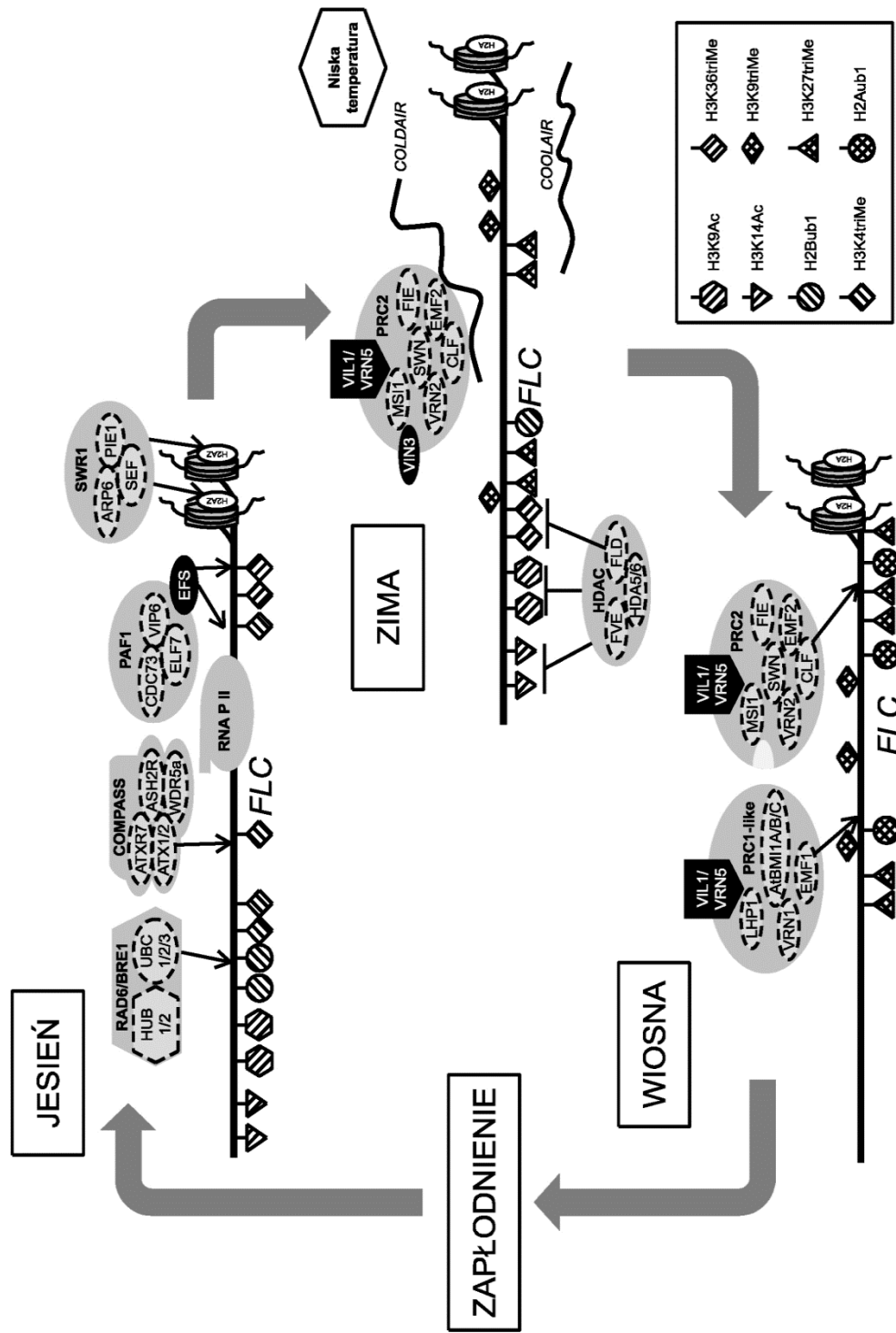
utrzymuje się u roślin dopóki nie dojdzie do wernalizacji, czyli okresowego obniżenia temperatury (Kim i in. 2009, Kim i Sung 2014).

Spadek temperatury i utrzymywanie się jej przez dłuższy czas, w zależności od gatunku od kilku dni do kilku tygodni, inicjuje wernalizację. Dopiero niedawno opisany został mechanizm tłumienia ekspresji tego nadrzędnego inhibitora kwitnienia. Wykazano bardziej skomplikowaną strukturę locus *FLC* niż początkowo zakładano. Stwierdzono obecność dodatkowego promotora oraz opisano dwa dodatkowe transkrypty powstające na matrycy tego locus. W pierwszej kolejności dochodzi do ekspresji antysensownego transkryptu *FLC COOLAIR*, który ulega alternatywnemu składaniu polegającemu na wyborze jednego z dwóch miejsca poliadenylacji (Ryc. 4). Dłuższy transkrypt *COOLAIR* powstaje poprzez wybór dystalnego miejsca pA, do którego nie wiązane jest białko FPA. Nie zmienia on ekspresji genu kodującego FLOWERING LOCUS C, ponieważ nie rekrutuje czynników zaangażowanych w modyfikacje chromatyny w tym regionie. Krótszy transkrypt *COOLAIR*, który bierze udział w wyciszaniu ekspresji *FLC* poprzez FLD (demetylacja H3K4), powstaje przy udziale FCA, FPA i FY, dzięki oddziaływaniom z proksymalnym miejscem polyA (Ietswaart i in 2012, Kim i in. 2009, Kim i Sung 2014).



Ryc. 4. Transkrypty sensowne oraz antysensowne genu *FLC*. (Ietswaart i in 2012, Sonmez i Dean 2012 zmieniona).

Po ok. dwóch tygodniach chłodu dochodzi do dziesięciokrotnego wzrostu ekspresji obydwóch form *COOLAIR* przy jednoczesnym utrzymaniu ekspresji *FLC* na niezmiennym poziomie. Po tym czasie zaobserwować można nieznaczny wzrost ilości proksymalnej formy *COOLAIR* przy jednoczesnej supresji pre-mRNA *FLC*, ale nie funkcjonalnego transkryptu. Po kolejnych dwóch tygodniach dochodzi do spadku ekspresji mRNA *FLC*, ale ten efekt może być łatwo odwrócony przez wzrost temperatury, ponieważ te zmiany nie są trwałe (Ietswaart i in 2012, Kim i in. 2009, Kim i Sung 2014).



Ryc. 5. Schemat szlaku wernalizacyjnego indukcji kwitnienia. Po zapłodnieniu kompleksy RAD6/BRE1, COMPASS, PAF1 i SWR1 modyfikują chromatynę genu *FLC*, co prowadzi do aktywacji ekspresji tego genu. W warunkach zimowych spadek temperatury prowadzi do ekspresji alternatywnych transkryptów *COOLAIR* i *COLDIAIR* oraz genów *VIL1/VRN5* i *VIN3*. Prowadzi to do rekrutacji kompleksów PRC2 i PRC1-like, co prowadzi do uniecznienienia chromatyny genu *FLC*. Ponadto geny szlaku autonomicznego *FVE* i *FLD* będące członkami kompleksu HDAC są zaangażowane w demetylację i deacetylację chromatyny genu *FLC*, co prowadzi do represji ekspresji *FLC* (Ietswaart i in. 2012, Kim i in. 2009, Kim i Sung 2014, zmieniona).

Po trzech tygodniach chłodu dochodzi do ekspresji transkryptu *COLDAIR* kodowanego w obrębie intronu 1 opisywanego locus. Posiada on czapeczkę na 5' końcu, ale niezaopatrzony jest w poliadenylowany koniec 3'. *COLDAIR* oddziałuje z elementem kompleksu (POLYCOMB REPRESSION COMPLEX 2) PRC2 CURLY LEAF (CLF), co promuje metylację histonu 3 H3K27triMe (Ryc. 5). Odpowiednio długi okres chłodu inicjuje ekspresję *VIN3* i *VIL1/VRN5*, które wiążą się z kompleksem białek Polycomb PRC2 złożonym z CLF, SET DOMAIN-CONTAINING PROTEIN 10 (SWN), VRN2, FERTILIZATION-INDEPENDENT ENDOSPERM (FIE), ARABIDOPSIS MULTICOPY SUPPRESSOR OF IRA1 (MSI1), EMBRYONIC FLOWER 2 (EMF2) odpowiedzialnymi za trimetylację lizyny 27 histonu 3 H3K27triMe (Ryc. 5). Prowadzi to do kondensacji chromatyny i ograniczenia transkrypcji *FLC*. Kolejnym zdarzeniem jest rekrutacja białka LIKE HETEROCHROMATIN PROTEIN 1 (LHP1) będącego członkiem kompleksu PRC1-like (złożonego z VIL1/VRN5, LHP1, VRN1, EMBRYONIC FLOWER 1 (EMF1), DREB2A-INTERACTING PROTEIN 2 (AtBMI1A), DREB2A-INTERACTING PROTEIN 1 (AtBMI1B) i PROBABLE E3 UBIQUITIN PROTEIN LIGASE DRIPH (AtBMI1C)) zaangażowanego wraz z PRC2 w metylację histonu 3 H3K27triMe i H3K9triMe (właściwa metylaza nie została dotychczas zidentyfikowana w bezpośredni sposób) i ubikwitynację histonu 2 H2Aub1 (Ryc. 5). Konsekwencją wszystkich tych modyfikacji jest wyciszenie ekspresji *FLC*. Do opisanych zmian na poziomie chromatyny dochodzi przy współdziałaniu białek FLD demetylującego H3K4 i FVE deacetylującego H3, które funkcjonują także w regulacji szlaku autonomicznego. Po zakończeniu okresu niskiej temperatury dochodzi do spadku ekspresji *VIN3*, a wyciszenie na poziomie chromatyny jest utrzymywane dzięki aktywności VRN1 i jest zachowywane po podziałach mitotycznych komórki. Wernalizacja nie jest utrzymywana wiecznie i gdy nie dojdzie do inicjacji kwitnienia przez inne szlaki mogące zaindukować ten proces, zmiany te ulegają cofnięciu do etapu wyjściowego. Ponadto podczas rozwoju generatywnego dochodzi do przeciwnych zmian w remodelowanej chromatynie i odtworzenie pierwotnego stanu sprzed modyfikacji (Ryc. 5) (Ietswaart i in 2012, Kim i in. 2009, Kim i Sung 2014).

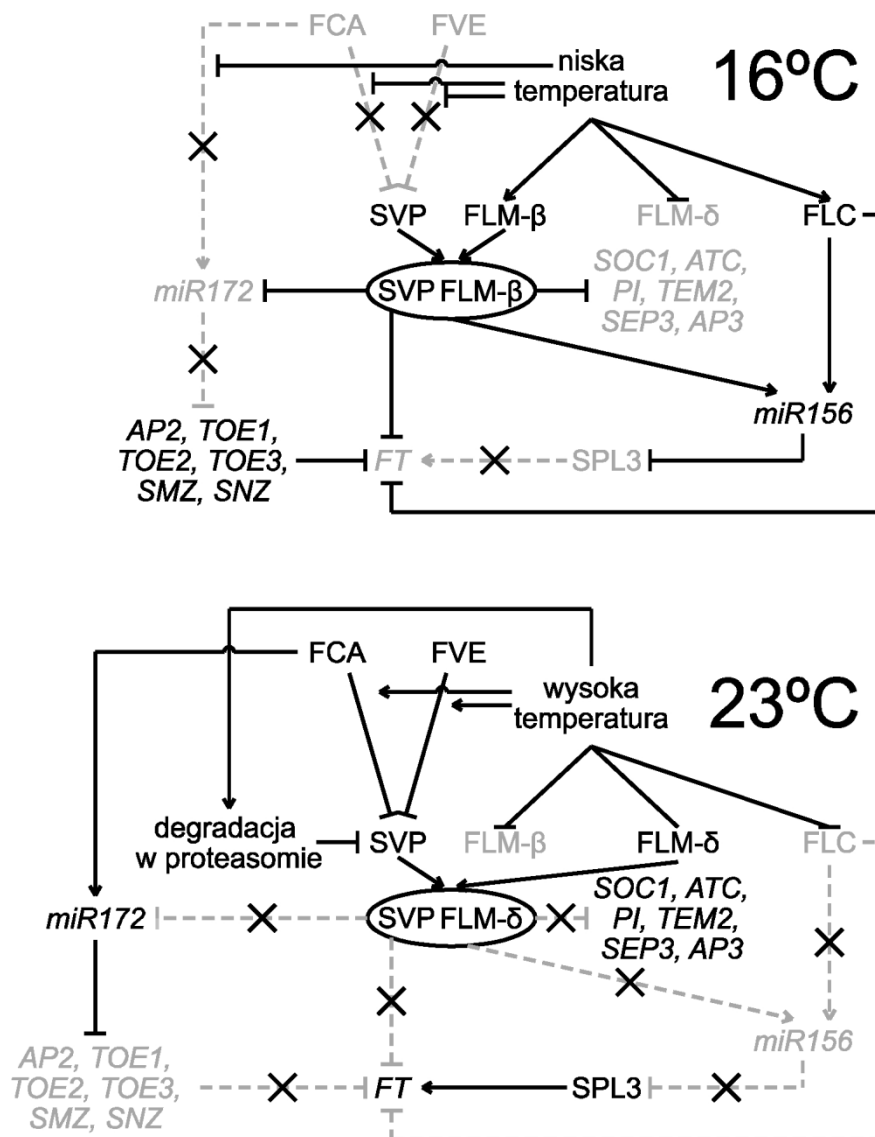
Za utrzymanie procesu wernalizacji odpowiada również gen *atPRMT5*, który pełni funkcje metylotransferazy. Aktywność *atPRMT5* prowadzi do symetrycznej metylacji argininy 3 histonu 4 (sMeH4R3). Skutkiem takiej zmiany jest hamowanie ekspresji *FLC*. U *A. thaliana* występują jeszcze dwie inne modyfikacje argininy 3 histonu 4, niesymetryczna metylacja lub monometylacja, jednakże obie modyfikacje prowadzą do aktywacji transkrypcji omawianego inhibitora kwitnienia (Kim i in. 2009, Kim i Sung 2014, Schmitz i in. 2008).

1.4.4. Szlak indukcji kwitnienia związany z temperaturą otoczenia

Szlak indukcji kwitnienia związany z temperaturą otoczenia jest drugim ze bezpośrednio zależnym od warunków termicznych otoczenia. W przeciwieństwie do wernalizacyjnego wrażliwy jest on na wyższe temperatury od ok. 16 do 27°C (Capovilla i in. 2015, Nilsson 2013).

Kluczową rolę pełnią tu dwa geny *FLOWERING LOCUS M (FLM)* oraz *SHORT VEGETATIVE PHASE (SVP)*, których ekspresja oraz aktywność kodowanych przez nie białek jest kontrolowana przez zmiany temperatur (Ryc. 6). Transkrypt *FLM* w zależności od ekotypu *A. thaliana* posiada cztery lub dwie formy powstające w wyniku alternatywnego składowania. Powstające na tych matrycach białka różnią się zdolnością wiązania do DNA. U ekotypu Wassilewskija (Ws) występują cztery formy: α , β , γ i δ . Natomiast u ekotypu Columbia (Col-0) występują głównie dwie formy β i δ , które są najlepiej scharakteryzowane, ponieważ ekotyp Col-0 jest znacznie częściej badany niż Ws (Capovilla i in. 2015, Nilsson 2013, Posé i in. 2013).

Mechanizm wpływu temperatury na alternatywne składowanie form transkryptu *FLM* jest nieznan. W warunkach niskiej temperatury (16°C) powstaje forma *FLM- β* , kodująca funkcjonalne białko *FLM- β* , które wiąże się z inhibitorem kwitnienia *SVP*. Powstały w ten sposób kompleks w odpowiednich warunkach termicznych zaangażowany jest w represję *miR172*, *FLOWERING LOCUS T (FT)*, *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CO 1 (SOC1)*, *ARABIDOPSIS THALIANA CENTRORADIALIS HOMOLOGUE (ATC)*, *TEMPRANILLO2 (TEM2)*, *SEPALATA 3 (SEP3)*, *APETALA 3 (AP3)* i *PISTILLATA (PI)* (Ryc. 6). Ponadto pośrednio wzmacnia ekspresję inhibitorów kwitnienia takich jak *APETALA2 (AP2)*, *TARGET OF EAT1 (TOE1)*, *TARGET OF EAT2 (TOE2)*, *TARGET OF EAT3 (TOE3)*, *SCHLAFMÜTZE (SMZ)* i *SCHNARCHZAPFEN (SNZ)* oraz wspólnie z *FLC* podnosi ekspresję *miR156*, który jest represorem *SPL3* będącego aktywatorem ekspresji *FT* (Ryc. 6). Kompleks *SVP-FLC* jest zdolny do wiązania się z DNA jako represor transkrypcji, podobnie jak kompleks *SVP-FLC*. Wzrost temperatury promuje biosyntezę formy *FLM- δ* , która jest нефункциональным białkiem. Co prawda wiąże się z *SVP*, ale ten kompleks jest niezdolny do wiązania się z DNA, przez co nie może pełnić funkcji represora transkrypcji. Wykazano także, iż wzrost temperatury prowadzi do spadku aktywności *SVP*. Dochodzi do tego równocześnie dzięki degradacji w proteasomie wynikającej z działania *FCA* i *FVE*. Ponadto w takich warunkach termicznych *FCA* aktywuje biogenezę *miR172*, który hamuje ekspresję represorów kwitnienia takich jak: *AP2*, *TOE1*, *TOE2*, *TOE3*, *SMZ* i *SNZ* (Ryc. 6) (Capovilla i in. 2015, Nilsson 2013, Posé i in. 2013).



Ryc. 6. Uproszczony model działania szlaku indukcji kwitnienia związanego z temperaturą otoczenia u *A. thaliana* Col-0 (Capovilla i in. 2015, Nilsson 2013, zmodyfikowana).

Dodatkowo ekspresja *miR156* ulega znacznemu obniżeniu ze względu na brak aktywności *FLM-β* i *FLC*, które w przypadku tego genu są aktywatorami ekspresji. Spadek ilości funkcjonalnego *miR156* umożliwia ekspresję *SPL3* – aktywatora *FT*. Wszystkie te przemiany prowadzą w konsekwencji do inicjacji rozwoju generatywnego warunkowanego zmianami temperatury otoczenia (Ryc. 6) (Capovilla i in. 2015, Nilsson 2013, Posé i in. 2013).

1.4.5. Szlak hormonalny indukcji kwitnienia

Szlak hormonalny indukcji kwitnienia u *A. thaliana* nosi również nazwę giberelinowego szlaku indukcji kwitnienia. Jest to konsekwencją badań Langa z lat 50 i Berniera z lat 80 XX wieku. Wykazali, że podawane egzogennie gibereliny (GA) mogą indukować kwitnienie wielu różnych gatunków roślin rosetowych dnia długiego

i niektórych gatunków roślin dwuletnich, rosnących w warunkach nieindukcyjnych. GA stanowią bardzo dużą grupę złożoną ze 136 różnych związków chemicznych, z czego 128 jest produkowanych przez rośliny, a pozostałe występują w komórkach grzybów i bakterii. Tylko nieliczne spośród nich to formy aktywne biologicznie (GA₁, GA₃, GA₄, GA₅, GA₆ i GA₇), a pozostałe GA są prekursorami lub produktami ich katabolizmu. Należy zaznaczyć, że niniejsze wnioski pochodzą najczęściej z eksperymentów polegających na ich egzogennym podawaniu lub analizie mutantów biosyntezy lub działania tych fitohormonów. GA nie są trwałymi związkami chemicznymi i są niestabilne w środowisku pozakomórkowym, co znacząco utrudnia interpretację badań. Ponadto występują duże różnice międzygatunkowe we wrażliwości na poszczególne gibereliny (Marciniak i in. 2012).

Szlak indukcji kwitnienia zależny od giberelin składa się z niewielkiej grupy genów. Pierwszym z nich jest kodujący receptor giberelin *GA INSENSITIVE DWARF1* (*GID 1*), który u *A. thaliana* posiada 3 ortologi – *GID1a*, *GID1b* i *GID1c*. Ważnymi elementami uczestniczącymi w regulacji działania fitohormonu są białka DELLA, które u *A. thaliana* kodowane są przez 5 loci: *RGA* (*REPRESSOR OF GAI-3*), *GAI* (*GA-INSENSITIVE*) i *RGL1/RGL2/RGL3* (*RGA LIKE 1/2/3*). Wszystkie należące do tej rodziny proteiny są represorami działania czynników transkrypcyjnych kontrolujących transkrypcje wiele genów. Związanie GA z receptorem *GID1* prowadzi do uruchomienia procesu, którego efektem jest ubikwitynacja białek DELLA i ich degradacja w proteasomie. W ten proces zaangażowany jest kompleks ligazy ubikwitynowej E3 *SKP1–CUL1–F-BOX-PROTEIN* (*SCF*) i *GA INSENSITIVE DWARF2* (*GID 2*). Podstawą w zapoczątkowaniu tego mechanizmu są zmiany konformacyjne białek receptorowych oraz DELLA, które umożliwiają interakcję między nimi tylko w obecności GA (Sun 2010).

W szlaku giberelinowym kluczowym etapem jest degradacja *GAI* i *RGA*, które są represorami ekspresji *SOC1*. Degradacja DELLA w obecności GA prowadzi do aktywacji ekspresji *miR159* oraz *MYB DOMAIN PROTEIN 33* (*MYB33*). Wspomniany mały RNA jest negatywnym regulatorem ekspresji *MYB33*. Dzięki kontrolowanemu przez *miR* cięciu dojrzałego transkryptu dochodzi do zahamowania ekspresji genu kodującego czynnik transkrypcyjny pozytywnie kontrolujący ekspresję *miR159*. Prowadzi to do wzajemnej regulacji ekspresji tych regulatorów. *MYB33* w warunkach dnia krótkiego w obecności GA jest aktywatorem ekspresji *LFY*. Dynamika zmian pomiędzy GA, DELLA, *miR159* i *MYB33*, przy współdziałaniu *SOC1* oraz szlaku fotoperiodycznego prowadzi do inicjacji rozwoju kwiatów. *MYB33* należy do dużej rodziny białek, która u rzodkiewnika liczy 198

członków, z czego ekspresja tylko 3 jest aktywowana przez GA (*MYB33*, *MYB65* i *MYB101*). Autorzy niektórych publikacji sugerują, że pozostałe białka GAMYB podlegają podobnej regulacji jak *MYB33*. Dotychczas jednak nie przebadano szczegółowo wszystkich białek należących do tej rodziny, a tym bardziej mechanizmów regulujących ekspresję genów je kodujących (Achard i in. 2004, Marciniak i in. 2012, Mutasa-Göttgens i Hedden 2009).

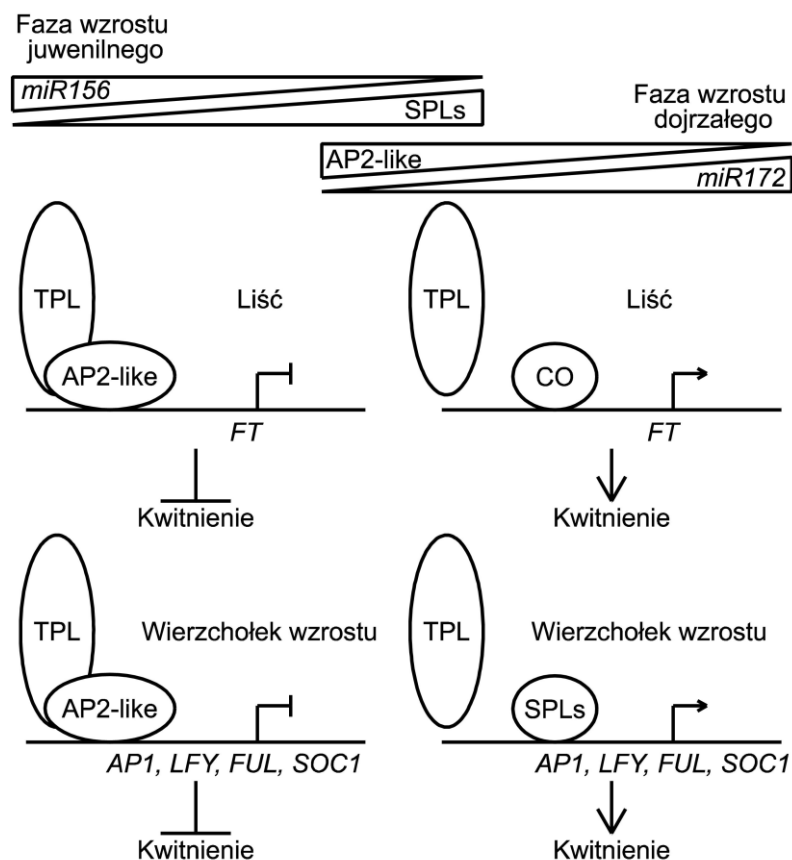
Wyniki przeprowadzonych badań pokazują, że gibereliny kontrolują także w sposób bezpośredni lub pośredni ekspresję *FT*. W pierwszym przypadku odbywałoby się to przy udziale czynników transkrypcyjnych, wrażliwych na ten hormon, wiążących się w obrębie promotora genu docelowego. Drugi model zakłada kontrolę *FT* poprzez regulowanie transkrypcji aktywatora jego ekspresji, którym jest *CO*. Egzogenna aplikacja GA na liście *Lolium temulentum* prowadzi do wzrostu ilości mRNA *CO*, ale nie wiadomo czy ma to wpływ na aktywność samego białka (Turnbull 2011).

Jak wynika z badań prowadzonych w ostatnich latach nie tylko, GA mają wpływ na indukcję kwitnienia. Cytokiny pozytywnie regulują ekspresję *TSF* i *SOCI*, które także są integratorami kwitnienia. W konsekwencji prowadzi to do zainicjowania rozwoju generatywnego (Turnbull 2011). Każdy z hormonów kontrolujący ekspresję genów lub aktywność białek zaangażowanych w ten proces bierze udział w jego przebiegu. Znany jest wpływ brasinosteroidów i kwasu salicylowego na ekspresję *FLD* (Zhang i in. 2013). Na ten gen mają również pośredni wpływ jasmoniany, które są zaangażowane w kontrolę odpowiedzi systemicznej roślin na obecność patogenów. Kwas abscysynowy powoduje wzrost ekspresji *FCA*. *FPA* reguluje aktywność ETHYLENE RESPONSE FACTOR 4 (*ERF4*), który jest genem szlaku transdukcji sygnały etylenowego. Zależności pomiędzy hormonami a kwitnieniem nie są jednokierunkowe. Wykazano, że wiele z białek uczestniczących w szlakach indukcji kwitnienia wpływa także na biosyntezę, transport czy aktywność hormonów. Jednym z przykładów jest udział *FCA* w powstawaniu auksyn w warunkach wysokiej temperatury. Na podstawie wielu prac dotyczących funkcjonowania szlaku hormonalnej indukcji kwitnienia stwierdzić można, że za indukcję kwitnienia nie odpowiada pojedynczy hormon, lecz homeostaza tych regulatorów wzrostu, czyli wzajemne relacje pomiędzy nimi i zmiany ich stężenia w czasie (Lee i in. 2014, Lee i in. 2015).

1.4.6. Szlak indukcji kwitnienia związany z dojrzałością fizjologiczną

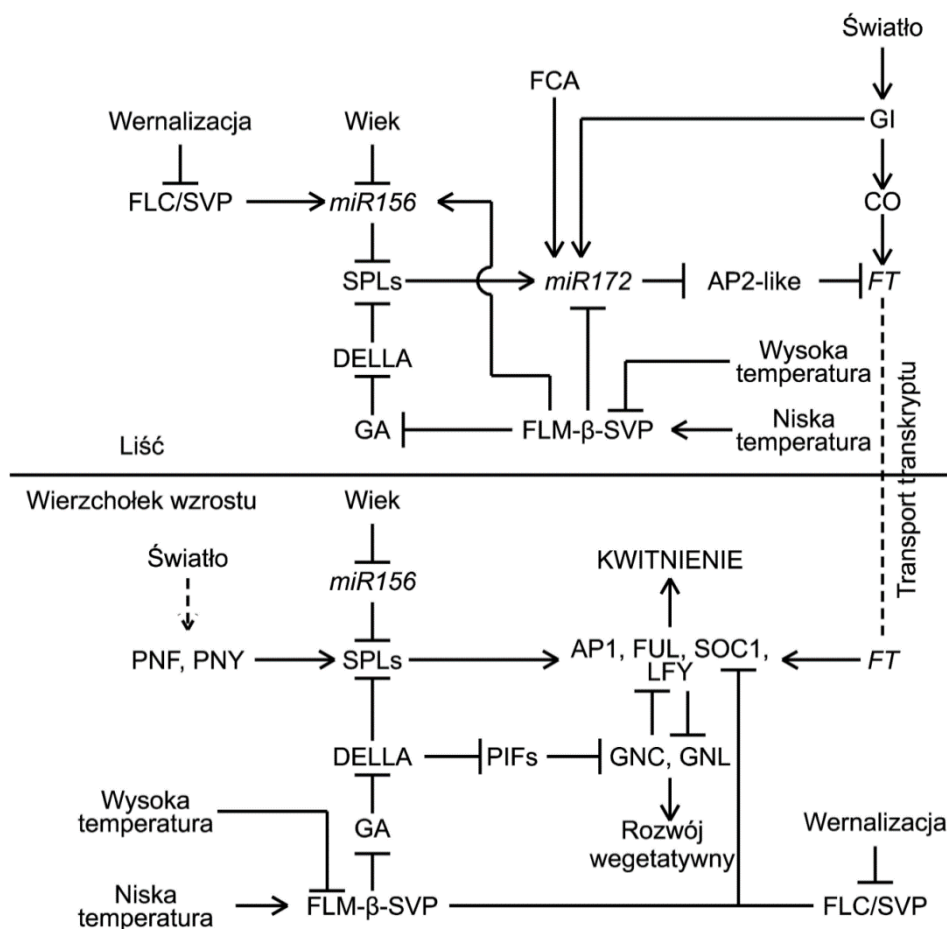
Przejście z fazy rozwoju juwenilnego do fazy dorosłej rozwoju wegetatywnego i indukcji kwitnienia jest kluczowym wydarzeniem w szlaku indukcji kwitnienia

związany z dojrzałością fizjologiczną. Decydującą rolę pełnią w nim zmiany ekspresji *miR156* i *miR172* oraz genów przez niekontrolowanych należących odpowiednio do rodziny *SQUAMOSA-PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE* (*SPL*) oraz *AP2*, a także w dalszej kolejności genów integratorowych i tożsamości merystemów. Inicjacja kwitnienia związana z dojrzałością fizjologiczną jest zintegrowana z innymi drogami kontrolującymi ten proces, poprzez zaangażowanie w regulację ekspresji tych samych genów. Najlepiej udokumentowano te współdziałania ze szlakami fotoperiodycznym, wernalizacyjnym, hormonalnym, autonomicznym oraz szlakiem związanym z temperaturą otoczenia (Wang 2014). Dokładny mechanizm percepcji wieku przez roślinę jest nieznan. Najprawdopodobniej wiek jest wyznaczany poprzez integrację sygnałów wewnątrzkomórkowych, hormonalnych, termicznych i fotoperiodycznych. Jednocześnie obserwuje się korelację wieku rośliny z ekspresją wielu różnych genów. Wraz z wiekiem rośliny i przejściem z fazy juvenilnej do fazy dojrzałej dochodzi do spadku ekspresji *miR156* i *AP2-like* oraz wzrostu *miR172* i *SPLs*. U *A. thaliana* występuje 11 białek *SPL*: *SPL2*, *SPL3*, *SPL4*, *SPL5*, *SPL6*, *SPL9*, *SPL10*, *SPL11*, *SPL13*, *SPL13-like* i *SPL15*, które są kodowane przez geny negatywnie regulowane przez *miR156* (Wang 2014).



Ryc. 7. Uproszczony model działania szlaku indukcji kwitnienia związanego z dojrzałością fizjologiczną u *A. thaliana* związany z ekspresją genów integratorowych kwitnienia oraz genów związanych z ewokacją kwitnienia (Wang 2014 zmieniona).

W fazie wzrostu juwenilnego dochodzi do represji genu *FT* w liściach oraz *APETALA 1 (AP1)*, *LFY*, *FRUITFULL (FUL)* i *SOC1* w wierzchołku wzrostu. W hamowaniu ekspresji tych genów pośredniczy białko TOPLESS (TPL), które wiąże się z inhibitorami kwitnienia z grupy AP2-like. Spadek ilości AP2-like postępujący wraz z wiekiem prowadzi do aktywacji transkrypcji wszystkich wymienionych wcześniej genów docelowych (Ryc. 7). W inicjowaniu ekspresji tych genów biorą udział białka z rodziny SPL oraz CO (ze szlaku fotoperiodycznego). TPL może hamować ekspresję tylko, gdy występuje jako dimer z AP2-like, tak więc czynnikiem regulatorowym zależnym od wieku w tym układzie jest drugi z peptydów (Ryc. 7) (Wang 2014).



Ryc. 8. Model działania szlaku indukcji kwitnienia związanego z dojrzałością fizjologiczną u *A. thaliana* wykazujący powiązanie tego szlaku z innymi szlakami. FCA ze szlaku autonomicznego, GI ze szlaku fotoperiodycznego oraz SPLs aktywują ekspresję *miR172*, który hamuje ekspresję AP2-like. Spadek aktywności AP2-like umożliwia ekspresję *FT*. Ekspresja *SPLs* jest hamowana przez *miR156* oraz DELLA ze szlaku giberelinowego. W warunkach niskiej temperatury FLM-β-SVP jest zaangażowane w obniżenie poziomu giberelin i *miR172* oraz aktywację ekspresji *miR156*. Wzrost temperatury prowadzi do spadku aktywności FLM-β-SVP na rzecz nieaktywnej formy FLM-δ-SVP. W wyniku wernalizacji dochodzi do represji *FLC*. Na niniejszym schemacie pokazano współdziałanie 6 z 7 szlaków indukcji kwitnienia (Richter i in. 2013, Wang 2014, zmodyfikowana).

Decydująca o większości przemian zależnych od wieku jest także ekspresja i biogeneza *miR172*. Wiele prowadzonych badań potwierdziło, że jest ona kontrolowana także przez inne czynniki. Do pozytywnych jego regulatorów zaliczyć należy FCA, SPL9 i GI (Ryc. 8). Przeciwnie do nich działają kompleksy SVP-FLC i SVP-FLM- β powodując spadek ilości dojrzałej formy tego miRNA. U roślin zaindukowanych do kwitnienia zdeterminowanego fotoperiodycznie ekspresja *SPL3*, *SPL4* i *SPL5* jest indukowana przez białka PENNYWISE (PNY) i POUND-FOOLISH (PNF), które posiadają domenę BELL1-like (Ryc. 8). Produkt białkowy pierwszego z wymienionych powyżej genów bezpośrednio indukuje ekspresję *SOC1* (Wang 2014).

Inny mechanizm, choć nie do końca poznany, opisano w przypadku pozytywnej regulacji *miR172* przez GI. Wykazano, że obecność GIGANTEA nie wpływa na poziom pierwotnego transkryptu tego miRNA, ale zmienia efektywność obróbki dojrzewającego *miR172* (Wang 2014).

Pod nieobecność giberelin w komórce białka DELLA są represorami SPLs i PHYTOCHROME INTERACTING FACTORS (PIFs) (Ryc. 8). Mechanizm działania jest uniwersalny, a podobne zależności do opisanych wcześniej prowadzą do degradacji DELLA w proteasomie, co umożliwia aktywację transkrypcji rodziny *SPL*. Ponadto białka DELLA, przy udziale GATA, NITRATE-INDUCIBLE, CARBON-METABOLISM INVOLVED (GNC) i GNC-LIKE (GNL), w pośredni sposób hamują ekspresję *SOC1* (Ryc. 8). W konsekwencji działania giberelin degradacja DELLA umożliwia ekspresję *PIFs*, które są zaangażowane w represję GNC i GNL co skutkuje odblokowaniem transkrypcji *SOC1* (Ryc. 8). Wykazano doświadczalnie, że *SOC1* jest również negatywnym regulatorem GNC i GNL (Richter i in. 2013, Wang 2014). Wszystkie wspomniane powyżej sposoby regulacji genów związanych z indukcją kwitnienia oraz liczne mechanizmy i czynniki uczestniczące w nich wskazują jak wiele istnieje dróg prowadzących w konsekwencji do zapoczątkowania rozwoju generatywnego.

1.4.7. Autonomiczny szlak indukcji kwitnienia

Jednym z pierwszych opisanych u rzodkiewnika, na poziomie molekularnym, był autonomiczny szlak indukcji kwitnienia. Początkowo wszystkie opisane geny, związane z tą drogą inicjacji rozwoju generatywnego, wyselekcjonowano u mutantów wykazujących fenotypowo opóźnienie ewokacji. Badane rośliny nie wykazywały jednak wrażliwości na warunki fotoperiodyczne uprawy, a fenotyp odwracany mógł być jedynie zmianą warunków termicznych (wernalizacja). Wyniki późniejszych badań pokazały, że szlak autonomiczny wbrew temu, co sugeruje nazwa, nie jest do końca całkowicie niezależny

od innych czynników determinujących kwitnienie. Wykazano, że w większości przypadków współdziała on z genami funkcjonującymi w ścieżce zależnej od wernalizacji, wrażliwej na temperatury otoczenia czy zmiany homeostazy hormonalnej. Oddziaływania te możliwe są dzięki różnorodnym funkcjom, jakie spełniają białka przypisane do tej drogi regulacji czasu kwitnienia. U rzodkiewnika wyróżniono siedem podstawowych peptydów: RNA BINDING / FLOWERING TIME CONTROL PROTEIN FCA ALPHA (FCA), FLOWERING TIME CONTROL PROTEIN FY (FY), FLOWERING LOCUS D (FLD), FLOWERING LOCUS KH DOMAIN (FLK), FLOWERING TIME CONTROL PROTEIN FPA (FPA), HISTONE-BINDING PROTEIN FVE (FVE) i LUMINIDEPENDENS (LD). Wyniki badań prowadzonych w ostatnich latach sugerują, że może być ich jednak więcej i wskazuje się dodatkowo białko ROSSMANN-FOLD NAD(P)-BINDING DOMAIN-CONTAINING PROTEIN (T1N6_22, SDR6) jako nowy element opisywanego szlaku. Budowę i funkcję genów szlaku autonomicznego zaprezentowano w Tabelach 1 i 2 (Srikanth i Schmid 2011, Xing i in. 2014).

Tab. 1. Wykaz i charakterystyka genów szlaku autonomicznego indukcji kwitnienia opisanych u *A. thaliana* (zestawiono na podstawie publikacji Aukerman i in. 1999, Ausin i in. 2004, He i in. 2003, Lim i in. 2004, Lee i in. 1994, Macknight i in. 1997, Mockler i in. 2004, Schomburg i in. 2001, Simpson i in. 2003, Sun i in. 2012, Xing i in. 2014).

Nazwa genu	Chromosom		Wielkość genu [nt]	Liczba eksonów	Długość transkryptu [nt]		Wielkość białka[aa]
	Lokalizacja	Nr					
<i>FCA</i>	9206597..9214825	4	8229	21	<i>FCA</i> α	5113	-
					<i>FCA</i> β	1315	-
					<i>FCA</i> δ	2880	-
					<i>FCA</i> γ	3037	747
<i>FY</i>	4326638..4331557	5	4920	18	2196		647
<i>FLD</i>	3229293..3232345	3	3053	5	2655		884
<i>FLK</i>	1250553..1254873	3	4321	6	2058		577
<i>FPA</i>	18025247..18031243	2	5997	6	3312		901
<i>FVE/MSI4</i>	8455936..8459525	2	3590	15	1884		507
<i>LD</i>	1123490..1128421	4	4932	13	3197		953
<i>SDR6/TIN6.22/TIN6_22</i>	293342..295040		1699	5	1094		296

Tab. 2. Właściwości strukturalne, funkcja i lokalizacja komórkowa białek szlaku autonomicznego indukcji kwitnienia u *A. thaliana* (zestawiono na podstawie publikacji Aukerman i in. 1999, Ausín i in. 2004, He i in. 2003, Lim i in. 2004, Lee i in. 1994, Macknight i in. 1997, Mockler i in. 2004, Schomburg i in. 2001, Simpson i in. 2003, Sun i in. 2012, Xing i in. 2014).

Nazwa	Budowa i funkcja	Lokalizacja
FCA	<ul style="list-style-type: none"> • 2 domeny RRM – wiązanie RNA • 1 domena WW – wiązanie FY • wyciszanie genów na poziomie chromatyny zależnego od RNA • rozwój kwiatów, woreczka zarodkowego, zarodka i nasion • regulacja wielkości komórek oraz długości włókien 	<ul style="list-style-type: none"> • cytoplazma • jądro • komórkowe • chromatyna
FY	<ul style="list-style-type: none"> • 2 motywy PPLPP oddziałuje z domenę WW FCA • 7 domen WD • obróbka RNA • autoregulacja FCA • regulacja ekspresji <i>FLC</i> • rozwój zarodka liści i kwiatów, dojrzewanie i spoczynek nasion • modyfikacja histonów • regulacja transkrypcji • defosforylacja i ubikwitynacja białek • akumulacja lipidów 	<ul style="list-style-type: none"> • jądro • komórkowe • kompleks ligazy ubikwityny Cul4-RING E3 • kompleksy zaangażowane w cięcie i poliadenylację RNA
FLD	<ul style="list-style-type: none"> • 1 domena SWIRM pośredniczy w interakcjach białko-białko w zespole kompleksów chromatyny i białek • demetylaza lizyny H3K4 • 1 domena o aktywności oksydazy poliaminowej • regulacja rozwoju kwiatów oraz transkrypcji 	<ul style="list-style-type: none"> • jądro • komórkowe • kompleks deacetylazy histonów HDAC
FLK	<ul style="list-style-type: none"> • 3 domeny KH wiążą RNA • region N terminalny bogaty w glutaminę zawierający 3 powtórzenia 8 aminokwasowego motywu LEPQQYEV • regulacja rozwoju kwiatów oraz transkrypcji 	<ul style="list-style-type: none"> • jądro • komórkowe • cytoplazma
FPA	<ul style="list-style-type: none"> • 3 domeny RRM są zaangażowane w alternatywny splicing, stabilizację, destabilizację i cięcie RNA oraz inicjację translacji • 1 domena SPOC o nieznannej funkcji • współdziałanie z FCA w regulacji ekspresji <i>FLC</i> • wyciszanie chromatyny zależne od RNA • regulacja rozwoju kwiatów oraz poliadenylacji • embriogeneza 	<ul style="list-style-type: none"> • jądro • komórkowe • cytoplazma
FVE	<ul style="list-style-type: none"> • 6 domen WD regulacja transdukcji sygnału, transkrypcji i cyklu komórkowego • wiązanie białek i jonów metali • naprawa DNA • rozwój kwiatów • modyfikacje chromatyny • morfogeneza liści i włosków • reakcja na promieniowanie UV-B. 	<ul style="list-style-type: none"> • jądro • komórkowe • kompleks ligazy ubikwityny Cul4-RING E3 • cytoplazma
LD	<ul style="list-style-type: none"> • 5 motywów QPVNG • prawdopodobnie pełni funkcję czynnika transkrypcyjnego, ale nie spełnia jego klasycznej definicji • wiąże się z DNA i RNA 	<ul style="list-style-type: none"> • jądro • komórkowe
SDR6/ T1N6.22	<ul style="list-style-type: none"> • 1 domena Rossmann-fold wiążąca NAD(P) • krótki łańcuch dehydrogenazy / reduktazy (SDR) • bierze udział w indukcji kwitnienia, ale pełen mechanizm nie jest znany 	<ul style="list-style-type: none"> • cytoplazma • ściana • komórkowa

Dzięki dużemu zróżnicowaniu funkcjonalnemu, białkowe produkty loci szlaku autonomicznego uczestniczą w mechanizmach kontroli aktywności transkrypcyjnej genów na wielu poziomach. Najważniejszym z docelowych dla nich jest główny inhibitor kwitnienia *FLOWERING LOCUS C (FLC)*. Kontrola ekspresji tego genu przez elementy szlaku autonomicznego związana jest z remodelowaniem chromatyny, syntezą antysensownego RNA oraz innymi przemianami w obrębie opisywanego locus. Ponadto w regulację *FLC* są zaangażowane inne szlaki indukcji, zwłaszcza te zależne od temperatury. Niektóre białka szlaku autonomicznego mogą pełnić również inne funkcje niezwiązane z indukcją kwitnienia (Srikanth i Schmid 2011, Xing i in. 2014).

1.4.7.1. Gen *FCA*

Pierwszym szczegółowo opisanym genem szlaku autonomicznego był *FCA*. Badania molekularne wykazały, że jego pierwotny transkrypt podlega alternatywnemu składaniu. W wyniku tego procesu powstają cztery alternatywne formy mRNA różniące się długością, ale tylko jeden z nich stanowi matrycę dla w pełni funkcjonalnego białka (Tab. 1) (Macknight i in. 1997).

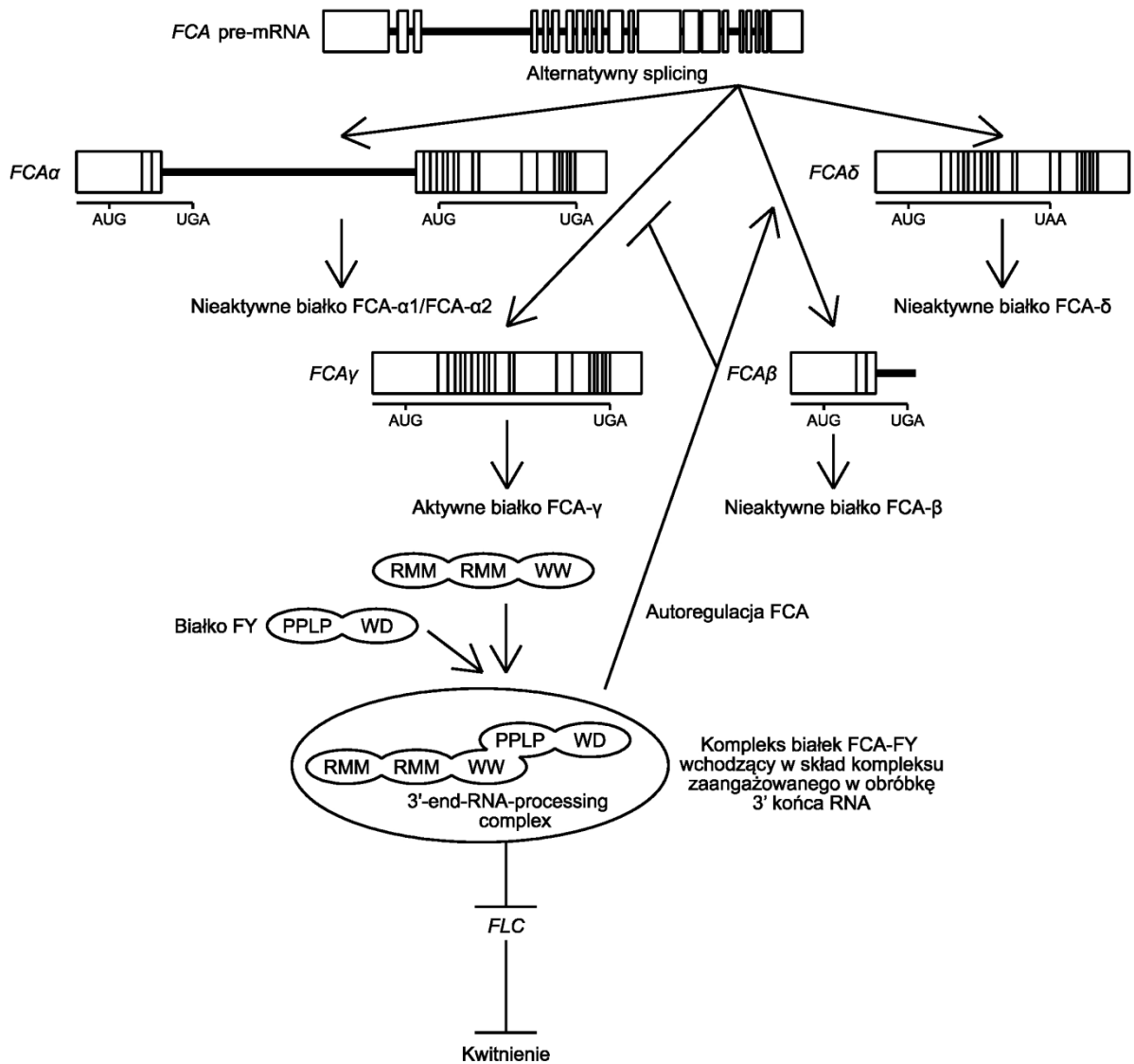
Transkrypt *FCA α* ma długość 5113 nt i powstaje ze złożenia 21 eksonów oraz intronu 3, który nie zostaje wycięty podczas alternatywnego składania (Ryc. 9). Intron ten zawiera kodon STOP, co prowadzi do przedwczesnej terminacji translacji. W konsekwencji powstaje niefunkcjonalne białko FCA- α 1 o długości 260 aminokwasów. Wykazano, że powstający w ten sposób peptyd nie zawiera dwóch funkcjonalnych domen wiążących RNA (RRM) oraz domeny WW (konserwowane dwie reszty tryptofanu). W drugiej części transkryptu pojawia się kodon START w identycznej ramce odczytu względem funkcjonalnego białka FCA gamma. Powstające w ten sposób białko FCA- α 2 o długości 505 aminokwasów pozbawione jest dwóch charakterystycznych domen RRM, ale zawiera domenę WW (Macknight i in. 1997).

Transkrypt *FCA β* ma długość 1315 nt i powstaje ze złożenia 3 pierwszych eksonów oraz fragmentu intronu nr 3 (Ryc. 9). Powstające na takiej matrycy białko FCA- β ma długość 260 aminokwasów, a jego sekwencja jest identyczna z peptydem FCA- α 1 i podobnie jak on nie zawiera zachowywanych ewolucyjnie domen RRM i WW (Macknight i in. 1997).

Transkrypt *FCA δ* ma długość 2880 nt i powstaje ze złożenia 21 eksonów (Ryc. 9). Ekson nr 13 podlega alternatywnemu składaniu, przez co jest on krótszy względem eksonu 13 w transkryptach *FCA α* i *FCA γ* . Prowadzi to do pojawienia się przedwczesnego kodonu STOP i powstania niefunkcjonalnego białka FCA- δ o długości 533 aminokwasów. Białko

FCA- δ zawiera dwie konserwowane domeny RRM, ale nie posiada domeny WW (Macknight i in. 1997).

Transkrypt *FCA γ* ma długość 3037 nt i powstaje ze złożenia 21 eksonów (Ryc. 9). Białko FCA- γ ma długość 747 aminokwasów i zawiera wszystkie funkcjonalne domeny: dwie RRM oraz WW. Posiadanie obydwu rodzajów domen jest warunkiem koniecznym, aby białko FCA mogło efektywnie wiązać RNA oraz oddziaływać na przykład z FY, a tym samym pełnić swoją rolę (Macknight i in. 1997).



Ryc. 9. Formy splicingowe *FCA* oraz mechanizm autoregulacji aktywności *FCA*. Tylko forma *FCA- γ* jest aktywna i może oddziaływać z białkiem FY, wraz z którym wchodzi w skład kompleksu zaangażowanego w obróbkę 3' końca RNA. Pozostałe formy *FCA- α 1*, *FCA- α 2*, *FCA- β* i *FCA- δ* są nieaktywne, ale to nie oznacza, że są zbędne w komórce. Aktywność form *FCA- β* i *FCA- γ* podlega procesowi autoregulacji. Gdy aktywność formy *FCA- γ* osiągnie wartość progową, dochodzi wtedy do uruchomienia procesu autoregulacji, który polega na promowaniu alternatywnego splicingu intronu 3, a następnie poliadenylacji w obrębie jego powstałego transkryptu, co prowadzi do powstawania formy *FCA- β* i zaprzestania powstawania nowych kopii formy *FCA- γ* (Macknight i in. 1997, Quesada i in. 2005, Quesada i in. 2003, Simpson i in. 2003, zmodyfikowana).

Domena WW białka FCA- γ bierze udział w autoregulacji ekspresji *FCA* (Ryc. 9), która polega na przedwczesnym cięciu i poliadenylacji pre-mRNA *FCA* na poziomie potranskrypcyjnym. Do domeny WW wiąże się białko FY (Tab. 2). Alternatywne miejsce cięcia i poliadenylacji znajduje się w intronie 3. Jeżeli ilość białka FCA- γ osiągnie wartość progową dochodzi wtedy do zahamowania ekspresji genu. Dochodzi do tego poprzez promowanie syntezy i akumulacji w komórce formy *FCA β* transkryptu. Odbywa się to w efekcie oddziaływań FCA- γ i FY i priorytetowego wybierania proksymalnego miejsca alternatywnej poliadenylacji w mRNA opisywanego genu (Ryc. 9). Badania na mutantach i roślinach transgenicznym wykazały, że elementem niezbędnym w autoregulacji aktywności *FCA* jest obecność, w obrębie intronu 3, elementu regulatorowego typu *cis*. Przypuszcza się, że odpowiada on za ujemne sprzężenie zwrotne pomiędzy aktywnością FCA- γ , a ekspresją *FCA γ* . Usunięcie elementu *cis* w intronie 3 prowadzi do nadekspresji *FCA γ* i wzrostu ilości FCA- γ (Quesada i in. 2003).

Rola białka *FCA* nie ogranicza się tylko do regulacji ekspresji *FLC*. Według zakładanego modelu *FCA* i *FPA* współdziałają w kontroli transkryptomu, jako część zależnego od RNA mechanizmu wyciszana na poziomie remodelowania chromatyny ekspresji wielu genów. (Bäurle i Dean 2008). Wszystkie te wyniki potwierdzają udział białek szlaku autonomicznego w mechanizmach regulacji aktywności transkrypcyjnej elementów niezwiązanych z kontrolą rozwoju generatywnego.

1.4.7.2. Gen *FY*

W świetle licznych badań można stwierdzić, że białko *FY* pełni w komórce wiele ważnych funkcji. Najdobitniejszym potwierdzeniem tego stwierdzenia było wykazanie letalności roślin z mutacją *fy* typu null. Większość z funkcji zaprezentowana w tabeli 2 została określona w oparciu o analizy bioinformatyczne. Tylko funkcje powiązane z obróbką RNA, embriogenezą i regulacją kwitnienia potwierdzono eksperymentalnie. *FY* bierze udział w autoregulacji *FCA* i regulacji ekspresji *FLC*, co zostało opisane w poprzednim podrozdziale.

Mechanizm działania *FY* jest dość zagadkowy. Na podstawie wyników badań opisanych w zaledwie dwóch publikacjach Feng i Michaels 2011 oraz Feng i in. 2011 stwierdzono, iż białko *FY* może być w zależności od aktywności *FCA*, aktywatorem lub represorem *FLC*. Jeżeli *FY* jest związane z *FCA* to wtedy dochodzi do zahamowania lub obniżania ekspresji *FLC*. Jeżeli białko *FY* występuje samodzielnie, a funkcjonalne białko *FCA* jest nieobecne w komórce, to pierwsze z nich aktywuje ekspresję *FLC*. Nieznany jest jednak mechanizm na zasadzie, którego miałyby się to odbywać. Autorzy publikacji

sugerują, że ten model jest prawdopodobny i wymaga dalszych badań, które go uzupełnią i potwierdzą (Feng i Michaels 2011, Feng i in. 2011).

1.4.7.3. Gen *FLD*

Kolejnym z elementów szlaku AP jest gen *FLD*. Przeprowadzone na białku kodowanym przez ten gen wykazały że ma ono aktywność demetylasy lizyny H3K4 (Tab. 2). U mutantów *fld* obserwuje się hiperacetylację histonów H3 i H4 locus *FLC*. Efektem podwyższonego poziomu metylowanej lizyny 4 jest aktywacji jego transkrypcji. *FLD* wchodzi w skład kompleksu deacetylasy histonów HDAC. W skład tego kompleksu wchodzi HISTONE DEACETYLASE6 (*HDA6*), która wiąże się C-terminalnym regionem (aminokwasy 333–471) z domeną *SWIRM* obecną w *FLD*. U podwójnego mutantu *axe1-5/fld-6* (*axe1-5* jest mutantem *HDA6*) dochodzi do wzrostu ekspresji *FLC*, *MADS AFFECTING FLOWERING 1 (MAF 1)*, *MADS AFFECTING FLOWERING 4 (MAF 4)* i *MADS AFFECTING FLOWERING 5 (MAF 5)*, co prowadzi do opóźnienia kwitnienia. Ponadto *HDA6* wiąże się do chromatyny powyżej miejsca startu transkrypcji, w rejonach 5' sekwencji wymienionych loci. Wzrost ekspresji tych genów jest wyraźnie wyższy u podwójnego niż u pojedynczych mutantów genów kodujących białka *FLD* oraz *HDA6*. Sugeruje to, że na ekspresje genów rodziny *MADS* ma wpływ zarówno metylacja jak i acetylacja histonów. Mimo tego, poziom acetylacji lizyny K9 oraz i potrójnej metylacji H3K4 jest podobny, zarówno u podwójnego jak u pojedynczego mutantu. Na tej podstawie wnioskować można, że modyfikacje histonów nie są w tym przypadku jedynym czynnikiem odpowiedzialnym za regulację ekspresji tych genów (He i in. 2003, Luo i in. 2015, Yu i in. 2011).

Stwierdzono także udział białek *FLD* wraz z *HDA6* w regulacji innych zjawisk. Wykazano, że są one zaangażowane w wyciszanie aktywności transpozonów. Aktywność *HDA6* jest niezbędna do utrzymania metylacji cytozyny oraz interakcji z metylotransferazą *MET1* (Luo i in. 2015).

FLD może się wiązać również z HISTONE DEACETYLASE5 (*HDA5*) w analogiczny sposób jak z *HDA6*. W przeciwieństwie do tych drugich oddziaływań, pierwsze z wymienionych nie jest zaangażowane w wyciszanie aktywności transpozonów. Kompleks utworzony z połączenia *HDA5* z *FLD* wykazuje zdolność wiązania chromatyny w loci *FLC* i *MAF 1*. W efekcie takich oddziaływań dochodzi do deacetylacji histonów tych genów, co prowadzi do zablokowania ich ekspresji. U mutantów *hda5* i *hda6* obserwowano spadek ekspresji integratorowych genów kwitnienia *FLOWERING LOCUS T (FT)* oraz *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CO 1 (SOC1)*, co jest wynikiem

hamowania ich aktywności transkrypcyjnej przez geny *FLC* i jemu podobne (Luo i in. 2015).

Jak pokazują szczegółowe doświadczenia molekularne, aktywność białka FLD jest regulowana przez sumoilację. Przyłączenie SMALL UBIQUITIN-LIKE MODIFIER (SUMO) do demetylazy lizyny powoduje jej inaktywację, co w konsekwencji prowadzi do derepresji *FLC*. Wiązanie SUMO katalizowane jest przez ligazę SUMO E3 AtSIZ1, która jest niezależna od szlaku fotoperiodycznego i giberelinowego indukcji kwitnienia. Wykazano jednak, iż aktywność tego enzymu jest regulowana przez kwas salicylowy (SA). U mutantu *siz1* dochodzi do przyspieszenia kwitnienia, co jest wywoływane spadkiem ekspresji *MAF4* i wzrostem ilości transkryptu *SOCI*. SIZ1 jest pozytywnym regulatorem ekspresji *FLC* i *MAF4*, które są inhibitorami kwitnienia (Jin i in. 2008).

Jeszcze inne badania aktywność FLD wykazały, że jest ona regulowana w odpowiedzi systemicznej roślin na patogeny, jednakże mechanizm kontroli ekspresji samego genu w SAR (systemic acquired resistance) jest nieznan. W wyniku przeprowadzonych badań zaobserwowano kilka zmian, do jakich dochodzi w czasie tego zjawiska. Oznaczono m.in. wahania stężenia SA, modulowanie struktury chromatyny i efektywność sumoilacji białek. Reasumując, można stwierdzić, że AtSIZ1 jest negatywnym regulatorem kwitnienia i SAR, a w procesach, jakie w tym rodzaju odpowiedzi zachodzą uczestniczy białka AP kodowane przez *FLD* (Banday i Nandi 2015).

1.4.7.4. Gen *FLK*

Białko FLK bierze udział w obróbce pre-mRNA oraz regulacji stabilności dojrzałego mRNA *FLC*. U mutantu *flk* dochodzi do wzrostu ekspresji *FLC*, a w konsekwencji do spadku aktywności transkrypcyjnej genów integratorowych kwitnienia *FT* oraz *SOCI*. Ustalenie dokładnej funkcji FLK jest utrudnione ze względu na występowanie w genomie *A. thaliana* 26 białek posiadających domeny KH wiążącej RNA oraz 196 białek posiadających domeny RRM wykazującą podobne właściwości (Tab. 2). Jedynie niewielka część tych białek jest scharakteryzowana (Lim i in. 2004).

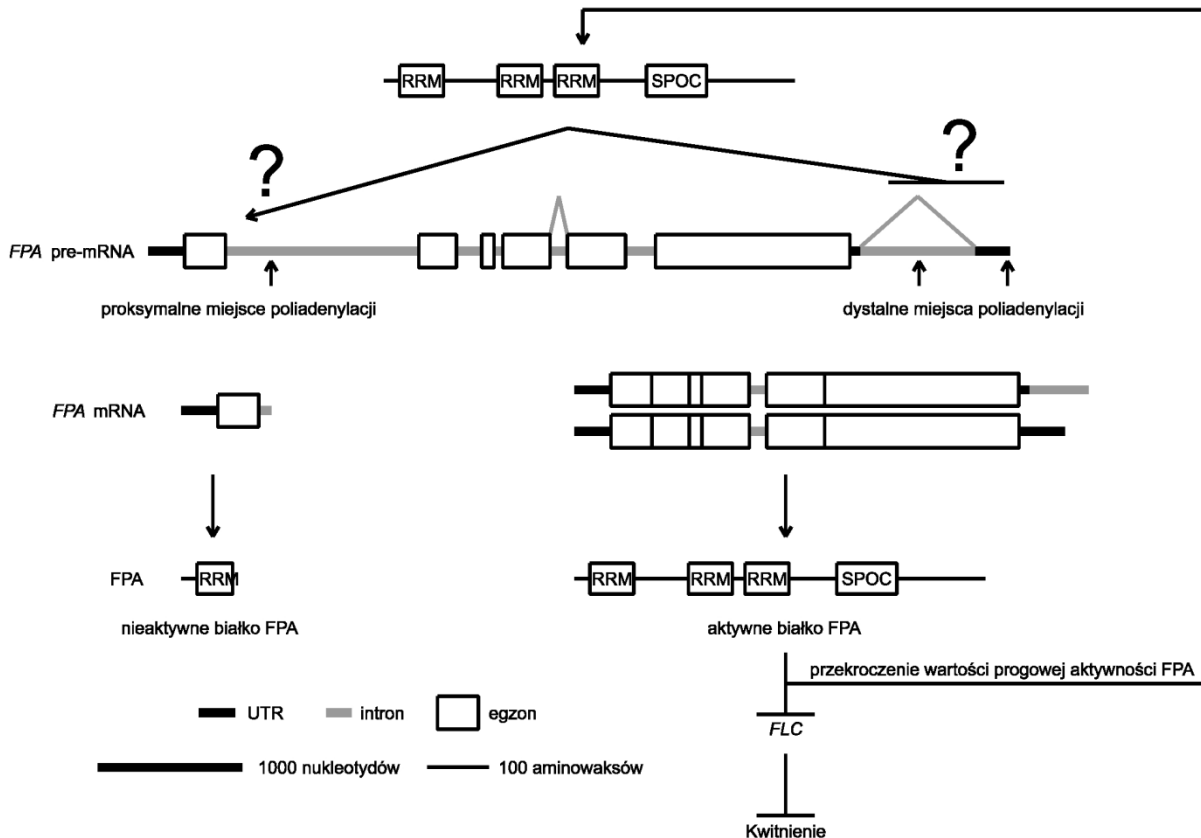
Jak można wnioskować na podstawie wyników przeprowadzonych badań FLK wycisza ekspresję *FLC* poprzez negatywną regulację aktywatorów ekspresji *FLC*, którymi są *PEPPER (PEP)* i *ENHANCER OF AG-4 PROTEIN 2 (HUA2)*. PEP jest białkiem posiadającym domenę KH i wspólnie z HUA2 oddziałują z mRNA *FLC* (Ripoll i in. 2009). Wykazano dodatkowo, że FLK wraz z PEP odgrywają kluczową rolę w potranskrypcyjnej regulacji genu tożsamości merystemów *AGAMOUS (AG)* nie należące do rodziny MADS-box. FLK i PEP oddziałują bezpośrednio z białkami zaangażowanymi

w obróbkę jego *pre-mRNA*, co przekłada się na regulację ekspresji tego genu. W efekcie końcowym FLK i PEP promują morfogenezę kwiatów, ponieważ są pozytywnymi regulatorami AG (Rodríguez-Cazorla i in. 2015). Ekspresja *FLK* zmienia się wraz z wiekiem roślin i jest rozwojowo specyficzna (Lim i in. 2004).

1.4.7.5. Gen *FPA*

FPA jest zaangażowane, poprzez regulacje alternatywnej poliadenylacji w kontrolę ekspresji wielu różnych genów (Tab. 2) (Sonmez i Dean 2012). W wyniku przeprowadzonych badań udowodniono, że bierze ok udział w regulacji odpowiedzi roślin na patogen. Wykazano także zaangażowanie tego białka w regulacji aktywności ETHYLENE RESPONSE FACTOR 4 (*ERF4*), który uczestniczy w modulowaniu poziomu reaktywnych form tlenu ROS. Egzogennie podany peptyd flg22 pochodzący od bakterii promuje dystalną poliadenylację *pre-mRNA ERF4*, a powstające w ten sposób białko *ERF4-A* powoduje spadek ilości ROS, co jest zjawiskiem niekorzystnym dla rośliny podczas zwalczania patogenów bakteryjnych. U roślin *FPA* promuje wybór proksymalnego miejsca poliadenylacji *pre-mRNA ERF4*. W konsekwencji, powstające białko *ERF4-R* wywołuje wzrost stężenia ROS, co ułatwia zwalczanie patogenów. Regulacja aktywności *ERF4* nie tłumaczy wszystkich zmian ilości reaktywnych form tlenu w odpowiedzi na *FLG22*. Najprawdopodobniej *FPA* reguluje jeszcze inne dotychczas niezidentyfikowane geny kontrolujące Pathogen Associated Molecular Patterns (*PAMP*), Pattern Triggered Immunity (*PTI*), a to mogłoby wyjaśniać wzrost ROS (Lyons i in. 2013). Ilość funkcjonalnego białka *FPA* podobnie jak *FCA*, podlega procesowi autoregulacji (Ryc. 10) (Hornyik i in. 2010).

Wybór proksymalnego miejsca wiąże się z powstaniem mRNA o długość ok. 600 nukleotydów, a dystalnego ok. 3500 nukleotydów. Białko powstające na matrycy najkrótszego transkryptu jest niefunkcjonalne i posiada jedynie większy fragment domeny RRM. Białko powstające z obydwóch form dłuższych jest w pełni funkcjonalne i ma długość 901 aminokwasów. Mechanizm autoregulacji *FPA* jest podobny do mechanizmu autoregulacji *FCA*. Podobnie jak w tamtym przypadku przekroczenie wartości progowej ilości funkcjonalnego białka *FPA* prowadzi do promowania miejsca proksymalnego poliadenylacji w *pre-mRNA* omawianego genu. Wywołuje to powstawanie krótkiego peptydu i brak funkcji. Spadek poniżej wartości progowej prowadzi ponownie do wzrostu ekspresji dłuższych transkryptów *FPA*. Dokładny mechanizm nie jest znany, ponieważ dotychczas nie zidentyfikowano białek, które współdziałają z *FPA* w wyborze miejsca poliadenylacji w obrębie *pre-mRNA* (Hornyik i in. 2010).



Ryc. 10. Hipotetyczny mechanizm autoregulacji aktywności FPA. *FPA* posiada 3 alternatywne formy transkryptu. Jest to związane z wyborem miejsca poliadenylacji (Hornik i in. 2010, zmodyfikowana).

Białko FPA jest kolejnym czynnikiem uczestniczącym w wielu przemianach nie zawsze związanych regulacją rozwoju generatywnego. Jest ono także doskonałym przykładem, w jaki sposób elementy AP mogą współuczestniczyć z innymi mechanizmami wzrostowych i rozwojowych roślin.

FCA wraz z FPA promują proksymalną poliadenylację antysensownego transkryptu *FLC*, który rekrutuje demetylazę FLD oraz bierze udział w transkrypcyjnym wyciszaniu *FLC*. Gdy białka FCA i FPA są nieaktywne, dochodzi do promowania dystalnej poliadenylacji antysensownego transkryptu *FLC*, który jest niezdolny do hamowania ekspresji opisywanego genu. Powoduje to utrzymanie transkrypcji *FLC* na wysokim poziomie. FCA wraz z FPA współdziałają w wyciszaniu genów na poziomie remodelowania chromatyny, wyciszaniu niskokopijnych transpozonów i sekwencji powtórzonych, a także systemicznego wyciszania RNA oraz metylacji DNA. U podwójnego mutantu *fcaffa* dochodzi do zmian ekspresji około 2% genów poprzez zmiany końca 3' ich mRNA. Funkcje większości z nich są nieznane (Sonmez i Dean 2012).

Współdziałanie FCA i FLD prowadzi do remodelowania chromatyny *FLC* zależnej i niezależnej od RNA. Pierwsze z białek wiąże się z chromatyną *FLC* w obrębie eksonu 6 i intronu 6. Drugie ma aktywność demetylazy H3K4. Obydwa białka nie oddziałują ze sobą bezpośrednio, jednak FCA ma pośredni udział w rekrutowaniu demetylazy w sąsiedztwie locus regulowanego w ten sposób genu. Cały proces jest kontrolowany przez niskocząsteczkowe RNA, w którego biogenezie bierze udział Dicer-like 3 (DCL3) (Liu i in 2007).

1.4.7.6. Gen *FVE*

Jednym z lepiej opisanych białek szlaku autonomicznego indukcji kwitnienia jest FVE wchodzący w skład kompleksu HDAC i rekrutujący deacetylazę histonów (Tab. 2.). Jak wykazały badania, nie ma ono zdolności bezpośredniego oddziaływania z chromatyną. Wiąże się z nią za pośrednictwem białka TRANSPOSABLE ELEMENT SILENCING VIA AT-HOOK (TEK). Deacetylacja H3 przy równoczesnej metylacji H3K9me2 prowadzi do wyciszenia ekspresji genów na poziomie chromatyny. W skład kompleksu HDAC wchodzi HDA6 lub/i HDA5 (białka opowiedziane za deacetylację) oraz metylotransferaza DNA MET1. Modyfikacje chromatyny prowadzą do zahamowania transkrypcji *FLC* oraz elementów ruchomych w genomie (m.in. transpozony) (Xu i in. 2013). Ponadto FVE jest zaangażowane w rekrutację deacetylaz H4. U mutantu *fve* dochodzi do hiperacetylacji histonów H3 i H4 chromatyny locus *FLC* i jego ekspresji (Jeon i Kim 2011).

Obecność FVE wykazano także w kompleksach związanych z HDA6. W takim układzie jest ono zaangażowane w wyciszanie elementów ruchomych i powtórzonych retroelementów AtSN1, transpozonów DNA AtMu1 oraz elementów IG/LINE. U mutantów *fve* i *hda6* dochodzi do ich derepresji oraz podwyższonej transkrypcji genu *FLC*. Jeszcze inne wyniki badań pokazują, że FVE bierze udział w odpowiedzi komórki na promieniowanie UV-B (Kenzior i Folk 2015).

Jak pokazały inne badania, białko FVE jest także składnikiem kompleksu złożonego z ligazy ubikwityny CULLIN-RING UBIQUITIN LIGASE (CUL4–DDB1^{MSI4}), metylotransferazy histonów CLF, kompleksu białek polycomb POLYCOMB REPRESSIVE COMPLEX 2 (PRC2) i ENHANCER OF ZESTE 2 POLYCOMB REPRESSIVE COMPLEX 2 SUBUNIT (EZH2) (Tab. 2). Jak udowodniono, jest on odpowiedzialny za metylacje H3K27me3 chromatyny locus *FLC*, co prowadzi do wyciszenia ekspresji tego genu. Przypuszcza się, że CUL4–DDB1^{MSI4} najprawdopodobniej reguluje aktywność kompleksu CLF-PRC2 lub modyfikuje białka chromatyny przez

ubikwytynacje. Druga ze wspomnianych funkcji jest niezbędna do właściwego działania wspomnianego wcześniej kompleksu remodelującego chromatynę. Jednakże dotychczas proces ten nie został dostatecznie wyjaśniony u roślin i ma charakter modelu, który musi być potwierdzony dalszymi badaniami. W doświadczeniach opartych na technice koimmunoprecypitacji oraz dwuhybrydowym systemie drożdżowym, wykazano zdolność wiązania się z DDB1 nie tylko FVE, ale także FY innego elementu szlaku autonomicznego. Badania te nie pozwoliły jednak potwierdzić biologicznej funkcji tych interakcji (Pazhouhandeh i in. 2011).

FVE wiąże się z wieloma białkami posiadającymi domeny RRM lub PWWP. Pozwala to wyjaśnić jego plejotropowe działanie i pełnienie wielu funkcji. Zaopatrzone w domeny wspomniane powyżej są m.in. opisane wcześniej DDB i HDA6. Jednak analizy bioinformatyczne wskazują na obecność w komórce wielu różnych partnerów białkowych dla FVE. Część z nich została już opisana i przedstawiona w poprzednich akapitach, jednakże o wielu z nich nie jesteśmy w chwili obecnej w stanie powiedzieć za wiele, włącznie z tym, jaka jest ich funkcja. Co kilka miesięcy prezentowane są natomiast doniesienia o oddziaływaniu FVE z białkami o ustalonej coraz to roli. Do takich należy na przykład SWINGER/CURLY LEAF INTERACTOR1 (SCI1) przypisany do rodziny białek polycomb, zaangażowanych w regulację rozwoju zarodka i kontrolę cyklu komórkowego (Kenzior i Folk 2015).

Ekspresja *FVE* jest regulowana przez DE-ETIOLATED1 (DET1). W warunkach dnia krótkiego DET1 prowadzi do hamowania transkrypcji *FVE*. Efektem tego jest wzrost poziomu trimetylacji H3K4me3 i spadek metylacji H3K27me3 chromatyny *FLC*. Zmiany te indukują wzrost ekspresji *FLC*, co skutkuje spadkiem ekspresji *FT* i *SOC1*. Wykazano dodatkowo, że DET1 wpływa również na szlak fotoperiodyczny poprzez hamowanie transkrypcji *GIGANTEA* (GI). Zmniejszenie ilości funkcjonalnego białka GI wywołuje spadek aktywności transkrypcyjnej *FT*. DET1 wchodzi w skład kompleksu CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC 10 (COP10) i DAMAGED DNA BINDING PROTEIN 1 (DDB1) indukującego ubikwytynację białek docelowych i obniżenia ich aktywności. W konsekwencji, regulator ekspresji *FVE* jest represorem fotomorfogenezy kwitnienia w warunkach dnia krótkiego i jest zaangażowany w regulacje cyklu dobowego. Jednym ze sposobów działania może być jednocześnie kontrolowanie tych przemian poprzez modulowanie aktywności szlaku autonomicznego i fotoperiodycznego (Kang i in. 2015).

1.4.7.7. Gen *LD*

Transkrypt *LD* ma długość 3197 nt i zawiera trzy kodony start oraz trzy kodony stop. Z pierwszej ramki odczytu powstaje 13 aminokwasowy polipeptyd, a z drugiej 47 aminokwasowy. Jednakże zostały one zidentyfikowane tylko w analizie bioinformatycznej, a ich sekwencja nie jest charakterystyczna dla sekwencji ulegających translacji. Dopiero z trzeciego powstaje funkcjonalne białko *LD*, które składa się z 953 aminokwasów. *LD* posiada dwa dwuczęściowe sygnały lokalizacji jądrowej. *LD* bliżej C końca zawiera rejon bogaty w glutaminę, który jest charakterystyczny dla czynników transkrypcyjnych. Z tego powodu niektórzy badacze wysunęli hipotezę, że *LD* jest czynnikiem transkrypcyjnym, ale dalsze badania wykazały, że *LD* wiąże się zarówno z DNA jak i RNA, co jest niezgodne z klasyczną definicją czynnika transkrypcyjnego. Ponadto brak jest jednoznacznych dowodów, że *LD* wiąże się do chromatyny i jednocześnie rekrutuje inne ogólne/szczególne czynniki transkrypcyjne niezbędne do inicjacji transkrypcji. W centralnej części *LD* występuje pięciokrotnie powtórzona sekwencja QPVNG rozdzielona 4 innymi aminokwasami (Tab. 1 i 2) (Aukerman i in. 1999, Lee i in. 1994).

Białko *LD* oddziałując z SUPPRESSOR OF FRIGIDA4 (*SUF4*) zapobiega jego wiązaniu się z FRIGIDA (*FRI*). *FRI-C* rekrutuje podstawowe czynniki transkrypcyjne i czynniki modyfikujące chromatynę, czego efektem jest wzmożona transkrypcja *FLC* i w konsekwencji zahamowanie kwitnienia. Wiązanie *LD* do *SUF4* zapobiega tworzeniu funkcjonalnego kompleksu, co powoduje inhibicję transkrypcji nadrzędnego inhibitora kwitnienia (Choi i in. 2011, Kim i in. 2006).

Przeprowadzone badania wykazały, w warunkach dnia krótkiego lub fotoperiodycznie nieindukcyjnych, udział SHORT HYPOCOTYL UNDER BLUE1 (*SHB1*) w stymulacji ekspresji *LD*. Jednak *SHB1* nie oddziałuje bezpośrednio z promotorem *LD*. Według hipotetycznego modelu *SHB1* reguluje ekspresję genów, których dopiero produkty białkowe mają zdolnością wiązania locus *LD*. Skutkiem tych zdarzeń, prowadzących do pojawienia się funkcjonalnego białka LUMINIDEPENDENS jest wyciszenia ekspresji *FLC*, co umożliwia odblokowanie transkrypcji *SOCI* i inicjację rozwoju generatywnego. W warunkach dnia długiego lub indukcyjnego fotoperiodu, *SHB1* aktywuje ekspresję *CONSTANS (CO)*, co w konsekwencji powoduje wzrost aktywności transkrypcyjnej *FT* i w dalszej kolejności *SOCI*, czyli genów integratorowych umożliwiających ewokację. Wyniki badań wskazują, że podobnie jak w opisywanych wcześniej białkach wiążących FVE, również w przypadku *SHB1*, łączy on współdziałanie szlaku fotoperiodycznego i autonomicznego (Zhou i Ni 2009).

1.4.7.8. Gen *SDR6*

Fenotyp mutantu *sdr6* przejawia się opóźnionym kwitnieniem zarówno w warunkach dnia długiego, jak i krótkiego. Traktowanie mutantów egzogenicznie podawanymi giberelinami przyspiesza kwitnienie, co obserwowano także u mutantów *flk* i *fca*. U mutantu *sdr6* dochodzi, w porównaniu do roślin typu dzikiego, do spadku ekspresji *FVE*, *LD* i *SOCI* przy jednoczesnym wzroście transkrypcji inhibitora kwitnienia *FLC*. U roślin pozbawionych funkcji omawianego genu, poza wspomnianymi powyżej, nie obserwowano zmian aktywności transkrypcyjnej kluczowych elementów szlaku fotoperiodycznego, giberelinowego i wernalizacyjnego. Przeprowadzone badania wykazały wysoką ekspresję *SDR6* w liściach, łodygach, korzeniach i kwiatach. Niski poziom mRNA wspomnianego genu odnotowano natomiast w łuszczykach. Powyższe obserwacje sugerują, że *SDR6* może być jeszcze jednym elementem autonomicznego szlaku indukcji kwitnienia (Xing i in. 2014).

1.4.7.9. Inne geny szlaku autonomicznego

Według autorów niektórych publikacji do szlaku autonomicznego zaliczane są również geny: *RELATIVE OF EARLY FLOWERING 6 (REF6)*, *PCF11P-SIMILAR PROTEIN 4 (PCFS4)*, *ARABIDOPSIS CREB-BINDING PROTEIN (CBP)* homolog *HISTONE ACETYLTRANSFERASE OF THE CBP FAMILY: HISTONE ACETYLTRANSFERASE 1 (HAC1)*, *HAC5* i *HAC12*. Nie są one jednak uznawane za klasyczne elementy szlaku autonomicznego, ponieważ nie działają bezpośrednio na gen *FLC*, co nie jest w pełni zgodne z klasyczną definicją szlaku autonomicznego (Choi i in. 2009).

1.4.8. Współdziałanie szlaku autonomicznego z innymi szlakami indukcji kwitnienia

Początkowo szlak autonomiczny uznany został za niezależną od innych czynników drogę kontroli kwitnienia. Dokładniejsze badania prowadzone zwłaszcza na poziomie molekularnym, wykazały cały szereg oddziaływań pomiędzy nim, a innymi składowymi sprawującymi kontrolę nad indukcją rozwoju generatywnego. Szlak autonomiczny jest powiązany ze szlakiem zależnym od temperatury otoczenia. Wraz ze zmianą warunków termicznych modulowana jest zarówno aktywność transkrypcyjna *FCA*, jak również działanie kodowanego przez ten gen białka. Wyniki przeprowadzonych badań wykazały spadek ekspresji tego genu w obniżonej, względem warunków kontrolnych, temperaturze odpowiednio (16 i 23°C). Dokładny mechanizm tej zależności jest nieznan, a autorzy

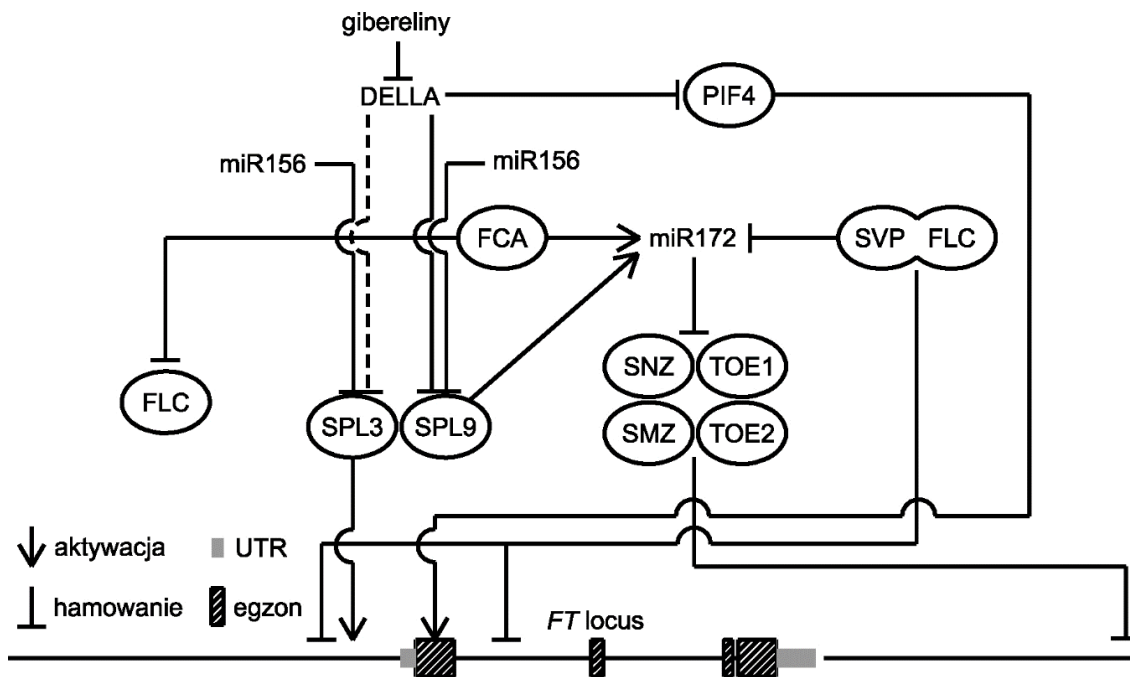
publikacji skupili się na skutkach zmian poziomu FCA i mechanizmu kontroli innych genów przez to białko (Jung i in. 2012).

W innych doświadczeniach wykazano udział FCA w regulacji biogenezy *microRNA172* pod wpływem zmian temperatury otoczenia (Ryc. 11). Wysoki poziom *miR172* powoduje hamowanie ekspresji genów *APETALA2 like (AP2 like)* -, *TARGET OF EAT 1 (TOE1)*, *TOE2*, *TOE3*, *SCHLAFMÜTZE (SMZ)* i *SCHNARCHZAPFEN (SNZ)*, które są represorami *FT* (Ryc. 11). Ilość dojrzałego *miR172* jest niższy w temperaturze 16°C niż w 23°C. Wykazano dodatkowo, że ekspresja *miR172* jest negatywnie regulowana przez *SHORT VEGETATIVE PHASE (SVP)*, który wiąże się z III i V motywem CARG w obrębie promotora *miR172* w temperaturze 16°C (Ryc. 11). Wzrost temperatury prowadzi do degradacji SVP w 26S proteasomie. Umożliwia to inicjację transkrypcji zależną od białka *SPL9* genu kodującego niskocząsteczkowe RNA oraz zapoczątkowuje wzrost wydajności jego biogenezy regulowanej przez FCA (Cho i in. 2012, Jung i in. 2012, Song i in. 2013).

U mutantu *fca-9* poziom *miR172* jest niezależny od temperatury otoczenia. Świadczy to o zaangażowaniu, pośrednim lub bezpośrednim białka FCA w regulację powstawania tego małego RNA. Badania technikami biologii molekularnej wykazały, że FCA wiąże się z *pri-miR172* i *pre-miR172b*. FCA reguluje biogenezę tego RNA poprzez regulację obróbki jego pierwotnego transkryptu. Ilość prekursora jest nieznacznie wyższa w temperaturze 16°C, co stanowi odwrotną zależność niż ta zaobserwowana dla dojrzałego *miR172*. Poziom drugiej formy pre-miRNA, przybierającej strukturę szpilki do włosów, jest na niskim poziomie niezależnie od temperatury. Pomimo wiązania się do *pri-miR172*, FCA nie ma aktywności rybonukleazy i dlatego nie jest w stanie samodzielnie prowadzić obróbki tego transkryptu. Jednak w świetle prowadzonych badań wydaje się, że omawiane białko rekrutuje elementy kompleksu *DICER-LIKE 1 (DCL1)* zaangażowanego w cięcie RNA. Kompleks *DCL1* jest złożony z peptydów *DCL1*, *HYPONASTIC LEAVES 1 (HYL1)* i *SERRATE (SE)*. Wykazano dodatkowo, że białka szlaku autonomicznego FCA wraz z *FY* regulują dojrzewanie końca 3' *pri-miR172*. Implikuje to zmiany strukturalne *pri-miR172* niezbędne do dalszych etapów obróbki, aczkolwiek nie są znane wszystkie białka zaangażowane w ten proces (Jung i in. 2012).

Jak pokazują ostatnie badania, FCA reguluje podczas zmian temperatury otoczenia także ekspresję *miR156* (Ryc. 11), *miR398* i *miR399*. Wzorzec biogenezy *miR398* i *miR399* jest identyczny jak *miR172*, ale ilość *miR156* wykazuje dokładnie odwrotne zależności. Poziom *miR156* jest wyższy w temperaturze 16°C niż w 23°C. Ponadto dojrzewanie *miR156* zmienia się w czasie rozwoju roślin, jest najefektywniejsze u młodych

i spada wraz z wiekiem. Dojrzały *miR156* reguluje ekspresję genów z rodziny *SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE (SPL)* (Ryc. 11). Dwa z nich są bezpośrednio zaangażowane w indukcję kwitnienia. *SPL3* bezpośrednio aktywuje *FT* poprzez wiązanie się do promotora tego genu (Ryc. 11). Drugi zaś, *SPL9* inicjuje transkrypcję *MIR172* (Ryc. 11). W temperaturze 16°C, u młodych roślin, *miR156* hamuje ekspresję obu wspomnianych powyżej genów rodziny *SPL* (Ryc. 11). W temperaturze 23°C spadek ekspresji *miR156* implikuje wzrost aktywności transkrypcyjnej *SPL3* i *SPL9* (Ryc. 11) (Jung i in. 2012, Lee i in. 2010, Song i in. 2013).



Ryc. 11. Schemat regulacji transkrypcji *FT* przez elementy szlaku zależnego od wieku, GA i temperatury otoczenia. W niskiej temperaturze otoczenia *SVP* wiąże się z promotorem *miR172* i hamuje jego ekspresję. *SVP* tworzy także kompleks białkowy z *FLC*, który po związaniu z promotorem *FT* zatrzymuje jego transkrypcję (Jung i in. 2012, Lee i in. 2010, Song i in. 2013).

Geny z rodziny *SPL* są dezaktywowane przez białko aktywne *DELLA* pod nieobecność giberelin. Wzrost stężenia hormonu prowadzi do degradacji białka *DELLA* w proteasomie i aktywacji ekspresji *PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR4 (PIF4)*, który następnie aktywuje ekspresję *FT* poprzez wiązanie się z elementem G-box zidentyfikowanym w jego promotorze. Zaobserwowano także w przypadku wzrostu temperatury spadek ilości zmodyfikowanego histonu H2A.Z w obrębie promotora tego kluczowego integratora kwitnienia. Zmiana ta umożliwia wiązanie czynnika transkrypcyjnego *PIF4* (Capovilla i in. 2015, Song i in. 2013).

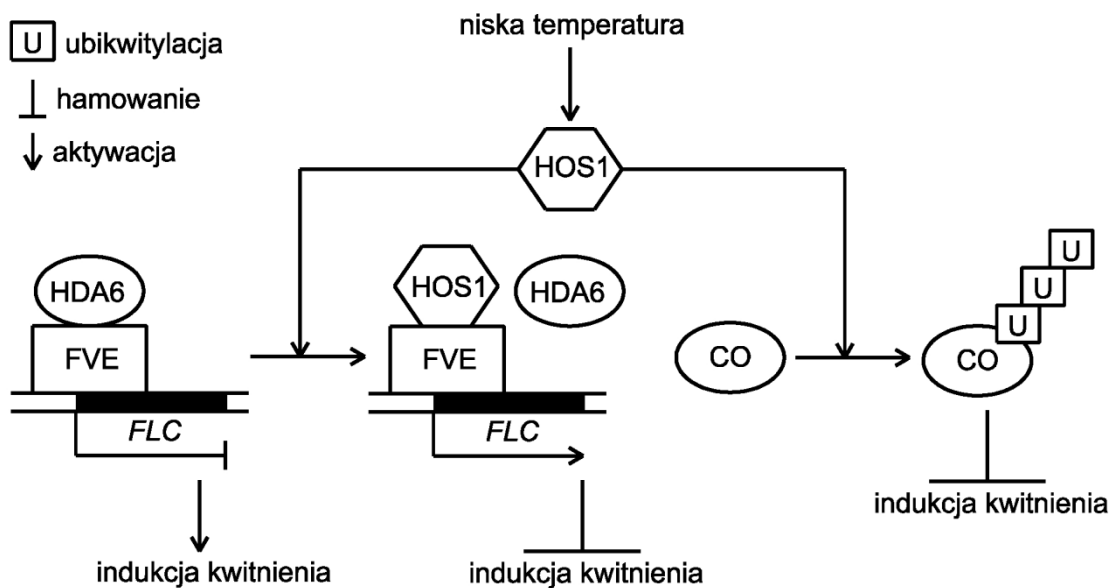
Aktywności białek *FVE* i *FLK* są regulowane przez temperaturę otoczenia, poprzez wiązanie się ich z ligazą ubikwitynową *E3 UBIQUITIN LIGASE HIGH EXPRESSION OF OSMOTICALLY RESPONSIVE GENE 1 (HOS1)*. *HOS1* został pierwotnie

zidentyfikowany jako negatywny regulator podczas stresu chłodu 4°C. Późniejsze badania wykazały, że HOS1 może pełnić także funkcje regulatorowe w wyższych temperaturach. Ekspresja *HOS1* jest regulowana przez temperaturę otoczenia, ale nie przez szlak wernalizacyjny i giberelinowy (Lee i in. 2012, Kenzior i Folk 2015).

U mutantu *hos1-3* dochodzi w warunkach dnia długiego, do wyraźnego wzrostu ekspresji *FT* i *TWIN SISTER OF FT (TSF)*, nieznacznego podwyższenia transkrypcji *SOC1* i spadku ilości mRNA *FLC* zarówno w temperaturze 16, jak i 23°C. U roślin typu dzikiego w temperaturze 16°C poziom transkryptu *FT* spada, przy jednoczesnym wzroście *FLC*. Różnice w ekspresji genów *TSF* i *SOC1* są nieznaczące. HOS1 reguluje ekspresję *FT* i *TSF* niezależnie od *FLC*, co potwierdzają badania porównawcze na mutantach *hos1-3* i *hos1-3 flc-3*. U mutantów *hos1*, w porównaniu do roślin typu dzikiego, nie dochodzi do zmian ekspresji genów regulowanych przez temperaturę otoczenia takich jak *SVP*, *SPL3*, *SPL9* i *MIR172* (Lee i in. 2012).

Zmiany temperatury implikują zmiany lokalizacji HOS1 w komórce. W temperaturze 4°C większość tego białka jest zlokalizowana w jądrze komórkowym. Wzrost temperatury do 16 lub 23°C powoduje przemieszczenie się części białka HOS1 do cytoplazmy. Badania z wykorzystaniem dwuhybrydowego systemu drożdżowego wykazały, że HOS1 wiąże się z FVE (Ryc. 12) lub FLK, ale nie z FLD (Lee i in. 2012). Oddziaływanie HOS1 z pierwszym z wymienionych białek powoduje utratę zdolności FVE do wiązania się z HDA6 (Ryc. 12). Skutkuje to wzrostem poziomu acetylacji chromatyny *FLC* i uruchomieniem ekspresji tego genu, co w konsekwencji prowadzi do represji kwitnienia. HOS1 ma również wpływ na szlak fotoperiodyczny i w warunkach chłodu wywołuje ubikwitynację białka CONSTANS (CO) (Ryc. 12). Efektem takiej aktywności opisywanego peptydu jest inaktywacja białka modyfikowanego, co ostatecznie powoduje zahamowanie ekspresji *FT* i *TSF* oraz brak indukcji kwitnienia (Jung i Park 2013, Lee i in. 2012).

Wiele przeprowadzonych dotychczas badań wskazuje, że szlak autonomiczny powiązany jest licznymi zależnościami z pozostałymi drogami indukcji kwitnienia. Coraz więcej danych potwierdza takie współdziałania ze szlakiem hormonalnym. Jednym z lepiej udokumentowanych przykładów takiej zależności jest regulowanie ekspresji *FLD* przez brasinosteroidy oraz kwas salicylowy. Jak przedstawione zostało to wcześniej, *FLD* jest związany z odpowiedzią systemiczną roślin na patogen. Proces ten jest regulowany m.in. przez jasmoniany, które także mają wpływ, choć pośredni, na aktywność transkrypcyjną *FLD*. Innym przykładem jest współdziałanie giberelin z *FCA* za pośrednictwem *SPL9* w aktywacji ekspresji i biogenezie *miR172* (Jung i Park 2013).



Ryc. 12. Schemat współdziałania HOS1 z elementami szlaku autonomicznego i foteriodycznego w kontroli indukcji kwitnienia. Podkreślenie podwójnej roli tego białka w mechanizmach inaktywacji FVE oraz inicjacji modyfikacji CO prowadzącej do zahamowania kwitnienia w warunkach niskiej temperatury (Jung i Park 2013).

W warunkach wysokiej temperatury otoczenia powyżej 28°C, FCA znosi działanie PIF4, który jest między innymi aktywatorem transkrypcji *FLAVIN-CONTAINING MONOOXYGENASE YUCCA8 (YUC8)*. Dokładny mechanizm działania jest jednak nieznan. Wyniki badań sugerują, że FCA w takich warunkach termicznych rekrutuje demetylaza, które modyfikują chromatynę *YUC8*. Usunięcie dwóch reszt metylowych (H3K4me2) może prowadzić do wyciszenia transkrypcji w podobny sposób jak ma to miejsce w mechanizmach regulacji transkrypcji genu *FLC*. Według hipotetycznego modelu, FCA uniemożliwia wiązanie się PIF4 do miejsca G-box w obrębie promotora *YUC8*. Wynika to z faktu, że FCA w temperaturze 23°C wiąże się do miejsca P2 regulowanego locus, a wzrost temperatury do 28°C znacząco zwiększa siłę oddziaływania. Ponadto w tej temperaturze FCA wykazuje także powinowactwo do miejsca P1, położonego ok 500 nt powyżej miejsca P2, genu docelowego. Zakłada się, że w ten sposób FCA osłabia działanie PIF4 z promotorem *YUC8*. W warunkach stresu cieplnego u mutantów *fca* dochodzi do szybszego wzrostu łodygi, a u roślin transgenicznych wykazujących nadekspresję FCA, zależność jest odwrotna. Można na podstawie wyników badań stwierdzić, że FCA odpowiada za adaptację do wysokich temperatur poprzez ograniczenie wzrostu elongacyjnego. Spadek aktywności *YUC8* prowadzi do spadku stężenia auksyn w komórce, co sugeruje pośredni wpływ FCA na ich stężenie. (Lee i in. 2014).

Białko kodowane przez ten *YUC8* jest enzymem zaangażowanym w biosyntezę auksyn. Występuje w co najmniej 2 z 4 dobrze opisanych szlaków biosyntezy IAA. Jest kluczowym enzymem działającym na drugim etapie syntezy tego hormonu. *YUC8* katalizuje przemianę tryptaminy do N-hydroksytryptaminy, która następnie jest w kolejnym etapie przekształcana w auksynę w pierwszym szlaku oraz kwasu 3-indolilopirogronowego (IPA) do kwasu 3-indoliloctowego (IAA). Białko kodowane przez *YUC8*, obok enzymów zaangażowanych w przemianę tryptofanu w substraty dla *YUC8*, jest kluczowym enzymem zaangażowanym w kontrolę biosyntezy auksyn (Sugawaraa i in 2009).

Jeszcze jedną z wykazanych zależności pomiędzy szlakiem autonomicznym a hormonalnym jest współdziałanie FCA i kwasu abscysynowego (ABA). W warunkach stresu cieplnego FCA oddziałuje z ABA-INSENSITIVE 5 (*ABI5*) – elementem szlaku transdukcji sygnału tego fitohormonu. *ABI5* jest czynnikiem transkrypcyjnym, który promuje ekspresję *1-CYSTEINE PEROXIREDOXIN 1 (PER1)*. We wspomnianych warunkach, kodowane przez ten gen białko bierze udział w detoksykacji reaktywnych form tlenu (ROS). Wyniki przeprowadzonych doświadczeń wykazały także zależność ekspresji *ABI5* od ABA i FCA. Na poziomie peptydowym FCA ułatwia wiązanie *ABI5* do DNA. Wykazano także niezależną od *ABI5* drogę detoksykacji ROS, w której funkcjonuje FCA oraz niezidentyfikowane jeszcze w pełni inne czynniki transkrypcyjne. Ta rola FCA została opisana w oparciu o mutantą *abi5-3*, a niescharakteryzowane czynniki transkrypcyjne zostały nazwane czynnikiem X (Lee i in. 2015).

1.5. Charakterystyka gatunkowa łubinu żółtego

Łubin żółty (*Lupinus luteus* L.) jest rośliną jednoroczną należącą do rodziny motylkowatych *Fabaceae* Lindl. (*Papilionaceae* Giseke). W obecnej systematyce rodzina ta posiada podwójne nazewnictwo i jej druga nazwa to bobowate. Obejmuje ona ponad 20000 gatunków należących do 700 rodzajów. Rośliny z tej rodziny są zdolne do symbiozy z bakteriami wiążącymi azot atmosferyczny. Umożliwia im to wzrost na glebach ubogich w azot. Z tego powodu są wykorzystywane jako poplon w celu wzbogacenia gleby w ten pierwiastek. Nie dochodzi do zubożenia gleby w pozostałe pierwiastki, ponieważ cała materia organiczna tych roślin wraca z powrotem do gleby, a po jej rozkładzie stają się one ponownie dostępne dla roślin następczych. Gatunki należące do bobowatych charakteryzują się wysoką zawartością białka w nasionach i są jego cennym źródłem dla ludzi i zwierząt. Stanowią podstawowy składnik wysokobiałkowych pasz zwierzęcych. Nasiona przodków gatunków uprawnych z opisywanej rodziny zawierały duże ilości

alkaloidów, co eliminowało je jako źródło pożywienia. W wyniku długotrwałych procesów hodowli i selekcji, uzyskano wiele nowych odmian niskoalkaloidowych odpowiednich do celów żywieniowych. Niestety u łubinów w wyniku tego procesu doszło do spadku stabilności plonowania i wielkości plonu. Ponadto niektóre gatunki są źródłem gum roślinnych np. guma arabska, guma guar, tragakant i barwników np. indygo, hematoksylina (Wolko i in 2011).

Badania cytologiczne i cytogenetyczne wykazały organizację genomu *L. luteus* w postaci 52 chromosomów. Generalnie w obrębie rodzaju *Lupinus* liczba chromosomów waha się w zależności od gatunku od $2n=24$ do $2n=96$. Wśród łubinów zidentyfikowano zarówno gatunki jednoroczne jak i rośliny wieloletnie. Są w tej bardzo zróżnicowanej grupie także wyraźne różnice pod względem rozmiaru, począwszy od małych roślin zielnych, przez krzewy, po małe formy drzewiaste. Na przestrzeni wielu lat szacowano liczbę gatunków na 200-500, a w ostatnim czasie zawężono ją do ok. 280. Na obszarach Europy i północnej Afryki występuje 12 gatunków i form botanicznych łubinów. Przedstawiciele tej grupy spotykani są na znacznych obszarach Europy, obu Ameryk, Australii i północnej Afryki. Najpowszechniej są uprawiane tylko trzy gatunki pochodzące z rejonu Morza Śródziemnego i północnej Afryki: *L. albus*, *L. angustifolius*, *L. luteus* (Naganowska i in. 2003, Wolko i in 2011).

1.5.1. Uprawy łubinu żółtego

Najwcześniej uprawianym gatunkiem był łubin biały, który wykorzystywany był już w 2000 r. p.n.e. na obszarach starożytnej Grecji i Egiptu. Substancje antyżywniowe jakimi są inhibitory trypsyny były usuwane przez gotowanie, natomiast alkaloidy przez długotrwałe płukanie, pozwalało to na wykorzystanie nasion w żywieniu. Uprawa tego gatunku rozprzestrzeniła się około 1000-800 r. p.n.e. na obszarach starożytnego Rzymu, a następnie na cały basen Morza Śródziemnego. Na obszarach Polski łubin rozpowszechniony był już w VI w. p.n.e. Niemal równocześnie na kontynencie Amerykańskim w 700-600 r. p.n.e. rozpoczęto uprawę *L. mutabilis*. W 1810 r. doświadczenie Wulfena w Niemczech wykazało przydatność łubinów jako zielony nawóz. Dopiero w latach 40-60 XIX w. rozpoczęto uprawę *L. angustifolius*, *L. luteus* w krajach Bałtyckich. W 1927-1928 w Niemczech opracowano metodę uzyskiwania mutantów niskoalkaloidowych, a już kilka lat później 30-70 XX w. Europie wyprowadzono pierwsze odmiany niskoalkaloidowe wszystkich trzech najpowszechniej stosowanych gatunków łubinów (Wolko i in 2011).

Selekcja odmian uprawnych była ukierunkowana na kilka aspektów. Najważniejszym z nich była i jest obecność substancji antyżywniowych, którymi są m.in. alkaloidy. Stężenie alkaloidów w nasionach *L. luteus* wynosiła początkowo ok 1-4%. Selekcja odmian była prowadzona w kierunku znacznego obniżenia ich stężenia. U zarejestrowanych w Polsce aktualnie odmian niskoalkaloidowych wynosi ono 0,017-0,022% według danych Centralnego Ośrodka Badania Odmian Roślin Uprawnych (COBORU). W wyniku selekcji obniżono również zawartość pozostałych substancji antyżywniowych, do których zaliczamy m.in. galaktooligosacharydy, rafinozę, stachiozę i werbaskozę, które nie są metabolizowane przez zwierzęta nieprzeżuwające (Wolko i in 2011).

Innymi cennymi z punktu widzenia ułatwienia uprawy i zabezpieczenia plonów były cechy gwarantujące prawidłowy rozwój i odporność roślin na czynniki biotyczne i abiotyczne. Stosunkowo wcześniej zostały wyprowadzone odmiany o niepekających strąkach, cesze zapewniającej pozostanie w nich nasion i ułatwiającej ich zbiór. Kolejną ważną cechą użytkową roślin jest odporność na wyleganie oraz choroby. U obecnie uprawianych odmian na drodze selekcji znacząco poprawiono odporność na antraknozę, najczęściej porażającą rośliny, chorobę od grzybową. Ważną z punktu widzenia optymalizacji czasu kwitnienia i tempa rozwoju roślin jest także termoneutralność odmian. Wszystkie zarejestrowane obecnie odmiany uprawne *L. luteus* w Polsce są niewrażliwe na wernalizację (za wyjątkiem odmiany Parys) i nie wymagają jej w okresie wschodów. U odmian podatnych na działanie niskiej temperatury siew powinien być przeprowadzony dość wcześnie, aby siewki mogły być poddane jaryzacji. Łubin żółty jest zdolny do kiełkowania w temperaturze 4°C. Jednak zbyt wczesny wysiew niesie ryzyko porażenia roślin przez przymrozki poniżej -5°C. Opóźnienie siewu prowadzi do niewernalizowania roślin, przez co dochodzi do znacznego zwiększenia masy organów wegetatywnych, kosztem organów generatywnych to zaś powoduje obniżenia plonu. Dlatego też odmiany termoneutralne wyparły niemal całkowicie w uprawach odpowiedniki wrażliwe na wernalizację. U łubinów nie dochodzi do całkowitego zablokowania kwitnienia z powodu braku wernalizacji, jednakże indukcja kwitnienia zachodzi później, a rośliny wytwarzają mniejszą liczbę organów generatywnych i gorzej plonują (Podleśny i Podleśna 2008, Wolko i in 2011).

Poza niestabilnością plonowania dużym problemem jest także nierównoczesne dojrzewanie strąków na całej roślinie. Utrudnia to zbiór, a także pozyskane nasiona charakteryzują się równą wilgotnością, o ile nie zastosuje się wcześniejszej desykcji. Odmiany tradycyjne posiadają pędy boczne, co wyraźnie odróżnia je od epigonalnych

(samokończących) o niepękających strąkach. Rośliny szybciej zakwitają i zawiązują strąki na pędzie głównym niż na pędach bocznych. Gdy na pędzie głównym nasiona są już dojrzałe i gotowe do zbioru, na pędach bocznych pozostają jeszcze w fazie wypełniania i dlatego trzeba stosować desykanty, żeby móc zebrać cały plon nasion jednocześnie i aby miały one zbliżoną wilgotność. Odwlekanie terminu zbioru w czasie, aż dojrzeją wszystkie strąki na pędach bocznych, może doprowadzić do przesuszenia strąków na pędzie głównym i w konsekwencji ich pęknięcia oraz utraty części plonu. Ponadto pędy boczne wymuszają mniejszą obsadę roślin do 90 – 100 roślin/m². Wyselekcjonowanie odmian epigonalnych rozwiązało te problemy i pozwoliło uzyskiwać lepsze, choć nadal niestabilne, plonowanie łubinów. Rośliny nie wytwarzają pędów bocznych, ale w ich miejscu kwiaty i strąki pachwinowe. Z reguły strąki roślin odmian samokończących dojrzewają równomiernie i o kilka dni wcześniej (5-6 dni) od odmian tradycyjnych. Wadą tych odmian jest konieczność stosowania większej obsady roślin do 100 – 110 roślin/m² (Karpińska 2014).

1.5.2. Wiązanie azotu

Łubin żółty podobnie jak inne gatunki z rodziny *Fabaceae* jest zdolny do symbiozy z bakteriami wiążącymi azot atmosferyczny. Umożliwia to wzrost roślin na glebach ubogich w ten pierwiastek. Rośliny mogą pobierać azot w formie nieorganicznej i organicznej. Jony NH_4^+ i NO_3^- oraz mocznik są źródłem azotu nieorganicznego, z czego jony azotanowe są najbardziej dostępne. Ze względu na ujemny ładunek nie są one wiązane przez ujemnie naładowane związki w glebie i dlatego są obecne w tzw. „roztworze glebowym”. Jony NH_4^+ są korzystniejszym pod względem energetycznym źródłem azotu, ponieważ w przeciwieństwie do NO_3^- nie muszą być redukowane przed wbudowaniem w aminokwasy. Ich wadą jednak jest wiązanie przez kompleks sorpcyjny gleby. Pula azotu nieorganicznego jest wzbogacana w wyniku rozpadu martwej materii organicznej. Powstający w tym procesie amoniak jest przekształcany do NH_4^+ , a następnie przez bakterie w wyniku nityfikacji NH_4^+ jest przekształcany do NO_3^- . Są to jednak związki nieorganiczne. Wykazano także, iż rośliny są zdolne do pobierania aminokwasów z gleby. W nielicznych eksperymentach udowodniono pobieranie di- i tripeptydów, a nawet białek do wielkości 14 kDa. Powyższy opis dotyczy pobierania azotu przez korzenie. Innym przykładem jest pobieranie azotu przez rośliny owadożerne gdzie źródłem azotu jest białko pochodzenia zwierzęcego (Adamczyk i Godlewski 2010, Boscari i in. 2013, Luciński i in. 2002).

Rośliny z rodziny *Fabaceae* wykorzystują jeszcze jedno źródło azotu. Jest nim azot atmosferyczny wiązany przez bakterie brodawkowe. Symbioza pomiędzy roślinami a bakteriami prowadzi do wytworzenia brodawek w korzeniach. Bakteryjna nitrogenaza azotowa katalizuje przekształcenie wolnego azotu w NH_4^+ . Kofaktorami nitrogenazy są jony żelaza i molibdenu. Jest to proces wysokoenergetyczny i wieloetapowy. Sumaryczna reakcja przekształcenia azotu do postaci amonowej wygląda następująco: $\text{N}_2 + 8\text{H}^+ + 16\text{MgATP} + 8\text{e}^- \rightarrow 2\text{NH}_3 + \text{H}_2 + 16\text{MgADP} + 16\text{Pi}$. Produktem reakcji jest amoniak, ale w środowisku wodnym ulega on przekształceniu do NH_4^+ według reakcji dysocjacji: $\text{NH}_3 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{NH}_4^+ + \text{OH}^-$. Następnie jony NH_4^+ są transportowane do komórek roślinnych. Tam są wbudowywane w aminokwasy i transportowane w takiej formie pomiędzy komórkami. Jony NH_4^+ pod wpływem syntetazy glutaminowej są przyłączane do kwasu glutaminowego (Glu), a produktem tej reakcji jest glutamina (Gln), która pod wpływem syntetazy asparaginowej jest przekształcana do asparaginy (Asn), a ta jest eksportowana do pozostałych komórek roślinnych. Bakterie brodawkowe nie są organizmami samożywymi. W zamian za zaopatrywanie w azot roślina odżywia bakterie. Asymilaty w postaci cukrów są transportowane do komórek korzenia przyległych do symbiotycznych bakterii. Regulacja procesu pozyskiwania azotu atmosferycznego zachodzi za pośrednictwem tlenku azotu NO, jednakże nie wszystkie elementy tego mechanizmu zostały potwierdzone eksperymentalnie (Adamczyk i Godlewski 2010, Boscari i in. 2013, Luciński in. 2002).

Symbioza pomiędzy bakteriami a roślinami jest specyficzna gatunkowo lub rodzajowo. Dla rodzaju *Lupinus* bakteriami wchodzącymi w symbiozie są bakterie z rodzaju *Bradyrhizobium*. Z tego powodu w uprawach należy stosować odpowiednie, swoiste do uprawianego gatunku szczepionki bakteryjne. Mikroorganizmy mają zdolność do przeżycia poza symbiozą z roślinami do kilku lat w glebie. Stosowanie płodozmianu w uprawach roślin strączkowych wymusza czteroletnie przerwy w ich uprawie ze względu na występowanie chorób grzybowych i wzbogacenie gleby w azot. Z tego powodu zaleca się każdorazowe zaprawianie nasion szczepionką bakteryjną. Stosowanie zapraw nasiennych ma negatywny wpływ na bakterie, ale jest koniecznością ze względu na ochronę przed chorobami grzybowymi. Z tego powodu zaleca się wysiew nasion od razu po zaprawieniu nitraginą. Wiązanie azotu przez bakterie zapobiega przed zbytnim wyjałowieniem gleb i zapewnia wysokie plony, bez konieczności dodatkowego nawożenia, na glebach słabszych. Rośliny strączkowe ze względu na produkcję znacznych ilości białek zapasowych mają duże zapotrzebowanie na ten pierwiastek w porównaniu do roślin, u których materiałem zapasowym jest skrobia. Symbioza z bakteriami zapewnia roślinom

dostępność azotu do niezaburzonej produkcji białek zapasowych, nawet w przypadku jego niedoboru w glebie (Martyniuk 2012).

1.5.3. Łubin żółty jako roślina modelowa

Opisywany gatunek nie jest klasyczną rośliną modelową, jaką w badaniach biologii molekularnej jest *A. thaliana*. Posiada on bardzo duży genom złożony z $2n = 52$ chromosomów. Genom *L. luteus* w przeciwieństwie do *A. thaliana* nie został jeszcze w pełni zsekwencjonowany. Aktualnie sekwencjonowany jest genom *L. angustifolius*, który został oszacowany na wielkość 1.153 Gpb i jest złożony z 57807 genów. Oszacowana wielkość genomu *L. luteus* metodą cytometrii przepływowej wartości 1C wynosi 1pb (dla *L. angustifolius* 0,93pb), a wartości 2C 2,44pb (dla *L. angustifolius* 2,07pb). *L. angustifolius* posiada $2n = 40$ chromosomów. Z powyższego wynika, że *L. luteus* ma większy genom niż *L. angustifolius*. Dla porównania wielkość genomu *A. thaliana* wynosi 134634692 pb i składa się z 32 041 genów, z czego 27029 koduje białka, 3889 pseudogenów lub elementów ruchomych i 1123 genów kodujących ncRNA. (Swarbreck i in. 2008, Yang i in. 2013, Wolko i in 2011).

Badania prowadzone w ostatnim czasie pozwoliły także na zsekwencjonowanie genomu chloroplastowego łubinu żółtego, który składa się z 155 894 pb. Genom tych organelli komórkowych składa się z 111 genów, z czego 77 genów koduje białka, 30 koduje tRNA i 4 kodują rRNA (Martin i in. 2014).

Pomimo wielkości genomu *L. luteus* jest rośliną, która doskonale nadaje się do badań molekularnych. Wszystkie typy badań są możliwe do przeprowadzenia włącznie z sekwencjonowaniem DNA. W dotychczasowych badaniach z zastosowaniem różnych technik, analizowano ekspresje genów, sekwencjonowano transkryptomy i degradomy (Parra-González i in. 2012), a także określano aktywności białek. Ponadto znana jest technika regeneracji *L. luteus* w warunkach kultury *in vitro* oraz transgenizacji (Li i in. 2000, Pniewski i in. 2006). Mechanizmy kwitnienia u *L. luteus* i *A. thaliana* pozwalają na zakwitanie tym roślinom w różnych warunkach i nie można jednoznacznie zdefiniować warunków indukcyjnych i nieindukcyjnych jak uczyniono to dla *Ipomoea nil*, modelowej rośliny dnia krótkiego. Podstawową zaletą *A. thaliana* jest krótki cykl rozwojowy, ale poważną wadą są małe rozmiary, które uniemożliwiają badanie pojedynczych roślin w niektórych aplikacjach. Małe rozmiary rośliny są zarazem dużą zaletą, jeżeli badania prowadzone są na dużą skalę np. screening mutantów. Z kolei zaletą łubinu jest jego rozmiar i małe wymagania glebowe. W porównaniu z *A. thaliana* ontogeneza *L. luteus* jest dość długa. Stanowi to wadę w aspekcie czasu trwania eksperymentu. Zaletą natomiast jest

dłuższe trwanie poszczególnych faz rozwojowych, co ułatwia dokładniejsze ich badanie, a także nie pozostawia wątpliwości, co do czasu zbioru materiału badawczego. Okres wegetacji *L. luteus* w warunkach polowych nie jest relatywnie długi i wynosi, w zależności od odmiany, 110-130 dni. Dla przykładu u powszechnie badanej kukurydzy osiąga 120-180 dni. Uprawy *L. luteus* można prowadzić w warunkach naturalnych, uprawach wazonowych w szklarniach lub fitotronowych.

Znaczenie roślin strączkowych w badaniach rośnie z roku na rok, a najlepszym tego przykładem są intensywnie badane molekularnie. Zsekwencjonowano już genomy *L. angustifolius* i *Glycine max* i kilku innych gatunków tej grupy systematycznej. Znanych jest bardzo dużo transgenicznych odmian *G. max*, w tworzeniu, których prym wiedzie firma Monsanto. Groch siewny był obiektem badań pioniera badań genetycznych Grzegorza Mendla. Wykorzystywany był także powszechnie, od połowy ubiegłego wieku, do pierwszych badań nad mutantami oraz początkowymi analizami molekularnymi. Rośliny strączkowe ze względu na dużą zawartość białka są niezbędnym składnikiem pasz. Największą wadą *G. max* jest brak możliwości jej uprawy w chłodniejszych rejonach klimatu umiarkowanego. Plon *G. max* jest niski, ale największą trudność sprawia jego mechaniczny zbiór, który jest niewydajny ze względu na zbyt niski wzrost roślin, co ma miejsce m.in. w Polsce. Z tego powodu prowadzi się badania nad wykorzystaniem innych gatunków roślin strączkowych, które co prawda zawierają mniejsze ilości białka lub posiadają wady charakterystyczne, ale są zdolne do efektywnego plonowania poza strefą tropikalną i zwrotnikową.

2. Cel pracy

Analizując wyniki badań prowadzonych na różnych gatunkach roślin w tym także uprawnych, nie da się nie zauważyć mnogości powiązań pomiędzy poszczególnymi elementami wielu szlaków kontrolujących kwitnienie. Dlatego też niezwykle ważnym jest poznanie podstaw molekularnych przemian związanych z inicjacją rozwoju generatywnego oraz opisanie mechanizmów wzajemnych zależności pomiędzy poszczególnymi drogami, prowadzącymi do powstania organów generatywnych.

Pierwszym celem niniejszej pracy było zidentyfikowanie sekwencji kodujących genów szlaku autonomicznego występujących u łubinu żółtego. Na podstawie przeprowadzonych analiz bioinformatycznych oraz uzyskanych wyników, postanowiono przeprowadzić charakterystykę przewidywanych sekwencji aminokwasowych oraz opisać wzorce ich ekspresji w organach wegetatywnych tego gatunku. W związku z mnogością interakcji szlaku AP z innymi drogami kontroli rozwoju generatywnego, jakie zaobserwowano u innych gatunków, postanowiono również przeanalizować wpływ warunków termicznych uprawy, kwasu abscysynowego oraz gibereliny na aktywność transkrypcyjną wyselekcjonowanych genów szlaku AP. Opisanie udziału wspomnianych hormonów ma być pierwszym z serii badań nad zależnościami w sieci kontrolnej indukcji kwitnienia istniejącej u *Lupinus luteus*.

Pomimo dużego potencjału jaki niesie ze sobą uprawa łubinu żółtego, gatunek ten pozostaje niemal całkowicie poza kręgiem zainteresowania rolników. Związane jest to zwłaszcza z niestabilnością plonowania i relatywnie wysoką wrażliwością na warunki uprawy. Szczególnie podatny jest on na deficyt wody czy zmiany temperatury otoczenia w czasie wegetacji. Spadek plonowania wiąże się u tego gatunku nie tylko z takimi zjawiskami, jak odpadanie organów generatywnych, ale także z efektywnością i optymalizacją czasu kwitnienia. Część z tych czynników związana jest ze stale postępującymi zmianami klimatycznymi. Jak zaprezentowano w poprzedniej części niniejszej pracy, inicjacja kwitnienia zależy od wielu czynników w tym od zmian temperatury otoczenia. Ten ostatni parametr fizyczny może powodować znaczne przyspieszenie lub opóźnienia czasu kwitnienia. To zaś w konsekwencji spowoduje, iż rozwój generatywny przypada na okres o zbyt wysokiej temperaturze, zbyt intensywnym nasłonecznieniu, zbyt małej ilości opadów lub w warunkach diametralnie odmiennych. Efektem będzie zaburzony przebieg fazy rozwoju generatywnego, a to doprowadzi do utraty części plonu.

3. Materiały i metody

3.1. Odczynniki chemiczne i zestawy do izolacji kwasów nukleinowych

Agar	ICN Biomedicals
Agarozabio STANDARD	Prona
Ampicylina	ICN Biomedicals
AxyPrep DNA Gel Extraction Kit	Axygen Biosciences
AxyPrep PCR Clean-up Kit	Axygen Biosciences
AxyPrep Plasmid Miniprep Kit	Axygen Biosciences
β -merkaptoetanol	ICN Biomedicals
Chlorek sodu (czda)	Avantor Performance Materials Poland S.A.
Chloroform (czda)	Avantor Performance Materials Poland S.A.
Ekstrakt drożdżowy	BTL sp. z o.o.
GeneRuler 100 bp DNA Ladder SM0241	Thermo Fisher Scientific Inc
GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder SM0321	Thermo Fisher Scientific Inc
ISOLATE II RNA Plant Kit	Bioline
Lambda DNA/Eco130I Marker, 16 SM0161	Thermo Fisher Scientific Inc
6X LoadingDye R0611	Thermo Fisher Scientific Inc
Mieszanina fenol:chloroform pH 4.5	Thermo Fisher Scientific Inc
NucleoSpin RNA Plant	Macherey-Nagel
oligonukleotydy	Genomed
Pepton K	BTL sp. z o.o.
TBE 5X GPB-Tris-Borate-EDTA buffer 5X	Geno Plast Biochemicals
X-Gal - Blirt	DNA Gdańsk

3.2. Zestawy odczynników do reakcji PCR, Real TimePCR i klonowania

BD SMART™ RACE cDNA Amplification Kit	Clontech
Fast Digest EcoRI	Thermo Fisher Scientific Inc
FirstChoice® RLM-RACE Kit	Ambion
KAPA3G Plant PCR Kits	Kapa Biosystems
KAPA Taq HotStart PCR Kit	Kapa Biosystems
KAPA Taq Ready Mix PCR Kit	Kapa Biosystems
PCR 2X KAPA PROBE FAST qPCR Master Mix2 Universal	Kapa Biosystems

SMARTer RACE 5'/3' Kit	Clontech
Sondy UPL do Real Time PCR	Roche
StrataClone PCR Cloning Kit	Agilent Technologies

3.3. Zestawy odczynników do odwrotnej transkrypcji

First Strand cDNA Synthesis Kit	Thermo Fisher Scientific
TRANSCRIPTME RNA kit - Blirt	DNA Gdańsk

3.4. Środki chemiczne do uprawy roślin oraz hormony roślinne

Giberelina GA3	Tokyo Chemical Industry (TCI) CO., LTD.
Kwas abscysynowy	Fluorochem Ltd
Nitragina szczepionka bakteryjna dla łubinu	Zakład Przetwórczo-Uługowo- Handlowy "BIOFOOD s.c."
VITAVAX200FS	Chemtura Netherlands B.V.
Tween ® 20	SERVA Electrophoresis GmbH

3.5. Specjalistyczne programy komputerowe

- The Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) – analiza sekwencji nukleotydowych BLASTN i białkowych BLASTP (Boratyn i in. 2013.)
- ClustalX – porównanie i analiza sekwencji – (Larkin i in. 2007)
- LightCycler® 480 Software (Roche) – kontrola przebiegu reakcji qPCR oraz analiza wyników ekspresji genów
- MAFFT version 7 – analiza sekwencji – porównywanie sekwencji nukleotydowych i białkowych (Yamada i in. 2016)
- MyHits – narzędzie Motif Scan do analizy białek (Pagni i in. 2007)
- Primer3 (v. 0.4.0) – projektowanie starterów do reakcji PCR (Koressaar i Remm 2007, Untergasser i in. 2012)
- Phylo.io – wizualizacja drzew filogenetycznych (Robinson i in. 2016).
- TranslateTool – narzędzie do przewidywania sekwencji aminokwasowej białka w oparciu o sekwencję nukleotydową (Artimo i in. 2012)
- Probe Finder (Roche) – projektowanie sond UPL i optymalizowanych z nimi starterów do qPCR
- QuantityOne (Bio-Rad) – wizualizacja i archiwizacja elektroforogramów

3.6. Materiał badawczy do identyfikacji genów

3.6.1. Warunki uprawy

Materiał roślinny do badań nad identyfikacją oraz charakterystyką cDNA genów homologicznych stanowiły 33 i 55 dniowe siewki łubinu żółtego odmiany Taper. Nasiona pozyskiwano z Poznańskiej Hodowli Roślin Sp. z o.o. oddział Wiatrowo. Gleba do upraw fitotronowych, klasy III, pochodziła z pola uprawnego w miejscowości Szewa w gminie Kowalewo Pomorskie w powiecie golubsko-dobrzyńskim. Materiał siewny był zaprawiany środkiem przeciwwgrzybicznym VITAVAX 200 FS (Chemtura Netherlands B.V.) i każdorazowo pozostawiany do spęcznienia przez co najmniej 6 godzin. Po tym czasie dodawano Nitraginę (Zakład Przetwórczo-Usługowo-Handlowy "BIOFOOD s.c.") i kontynuowano inkubację około 30 min. Tak przygotowane nasiona wykładano do doniczek o pojemności 10L w trzech rzędach, po 3 sztuki na głębokość 3 cm. Rośliny uprawiano w komorze hodowlanej w warunkach dnia długiego (16 godz. światła, 8 godz. ciemności) w temperaturze około 23°C (Ryc. 13).



Ryc. 13. Przykład prowadzonych upraw łubinu żółtego odmiany Taper w układzie sztucznym (Fot. Mariusz Banach, Waldemar Wojciechowski, Natalia Klajn).

Natężenie światła w komorze fitotronowej wynosiło $80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, Panel oświetleniowy złożony był z 5 świetlówek liniowych 36W białe T8 36W/840 NW (Kanlux SA, Radzionków) oraz 5 świetlówek liniowych Osram Fluora T8 L 36W/77 (OSRAM Licht AG, München) ułożonych naprzemiennie. Świetłówki znajdowały się ok. 90 cm od górnej krawędzi doniczek.

3.6.2. Izolacja i walidacja RNA

Do identyfikacji genów wykorzystywano całkowity RNA wyizolowany z liści i kwiatów łubinu żółtego odmiany Taper. Po zebraniu wspomnianych organów zmrażano je w ciekłym azocie i przechowywano w zamrażarce niskotemperaturowej -80°C do dnia ekstrakcji kwasu nukleinowego.

W celu izolacji RNA zebrane organy roślinne homogenizowano w ciekłym azocie w porcelanowych moździerzach. Rozdrobnione tkanki porcjowano, przygotowując w probówkach Eppendorff naważki po 100 mg. Z uzyskanych w ten sposób naważek izolowano całkowity RNA zestawem RNA NucleoSpin RNA Plant firmy Macherey-Nagel, zgodnie z zaleceniami producenta. Do lizy komórek wykorzystano bufor RAP oraz β -merkaptopetanol. Wyizolowany RNA zawieszano w 40 μ l wody wolnej od RNaz.

Stężenie RNA mierzono spektrofotometrycznie z wykorzystaniem urządzenia NanoDrop 1000 Spectrophotometer. Czystość RNA określano w oparciu o stosunek absorbancji A260/A280, który dla czystego RNA wynosi około 2,0 oraz A260/A230, który dla czystego RNA wynosi 1,8-2,2. Spadek tych wartości może świadczyć o zanieczyszczeniu próby białkami, polifenolami lub polisacharydami. Jakość i ilość RNA sprawdzano również stosując rozdział elektroforetyczny w 1,4% żelu agarozowym w buforze 0,5X TBE przy napięciu 55V. W żel agarozowy nakładano około 400 ng wyizolowanego RNA. Do oceny wielkości rozdzielanego kwasu rybonukleinowego zastosowano dwa markery wielkości GeneRuler 100 bp DNA Ladder oraz Lambda DNA/Eco130I Marker (Thermo Fisher Scientific Inc). Kwasy nukleinowe i marker obciążano buforem 6X Loading Dye (Thermo Fisher Scientific Inc). W celu określenia jakości, porównywano intensywność fluorescencji frakcji 28S i 18S rybosomalnego RNA. Dla preparatów o bardzo wysokiej jakości stosunek 28S do 18S wynosi ok. 2.0. Wyraźnie wyróżnione frakcje wysokocząsteczkowego rRNA oraz brak smużenia w ścieżce z rozdzielanym kwasem nukleinowym, a także mała ilość szybko migrujących niewielkich fragmentów RNA, świadczy o braku degradacji. Rozdział elektroforetyczny umożliwia także określenie, czy wyizolowany całkowity RNA jest zanieczyszczony genomowym DNA.

3.6.3. Reakcja odwrotnej transkrypcji

Pozytywnie zweryfikowany RNA był wykorzystywany jako matryca do syntezy cDNA. Reakcję odwrotnej transkrypcji przeprowadzono przy użyciu zestawu do syntezy cDNA First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific Inc), zgodnie z zawartą w zestawie instrukcją. Do reakcji używano 1 μ g całkowitego RNA. Mieszaninę reakcyjną inkubowano każdorazowo w optymalnych warunkach w termocyklerze z podgrzewaną pokrywą w celu ograniczenia parowania. Uzyskany w ten sposób cDNA wykorzystywano jako matrycę w reakcjach PCR.

3.7. Identyfikacja genów szlaku autonomicznego *Lupinus luteus*

Amplifikacje fragmentów cDNA genów szlaku autonomicznego u łubinu żółtego przeprowadzano w reakcjach PCR typu TouchDown z wykorzystaniem starterów zdegenerowanych. W pierwszej kolejności wyszukiwano w Banku Genów sekwencje kodujące genów szlaku autonomicznego u innych gatunków roślin, należących do roślin strączkowych. Następnie wykonywano porównanie tych sekwencji w programie ClustalX. Do zidentyfikowanych miejsc o największej homologii projektowano startery do reakcji PCR. Niejednokrotnie odnalezienie sekwencji o długości 20-35 nt o pełnej zgodności nie jest możliwe, dlatego w tych miejscach dokonywano zdegenerowania starterów. Najczęściej stosowano startery, w których liczba miejsc degeneracji nie przekraczała 4. Startery zaprojektowano w programie Primer3, a degenerację starterów wykonywano „ręcznie”. Dla każdego zidentyfikowanego genu zaprojektowano od dwóch do czterech par starterów umożliwiających amplifikację fragmentów o różnej długości (Tab. 3). Ze względu na różnice międzygatunkowe oraz zdegenerowanie kodu genetycznego, nie zawsze zastosowanie pojedynczego zestawu starterów zapewniałoby uzyskanie pozytywnego wyniku. W tabeli 3 zestawiono nazwy i sekwencje używanych par starterów.

Amplifikację fragmentów cDNA zidentyfikowanych genów przeprowadzano w reakcjach PCR typu Touch Down. Obniżanie temperatury przyłączania starterów w kolejnych cyklach reakcji prowadzone było do wartości nawet o blisko 5°C niższej od granicznej wynoszącej 5°C poniżej temp. topnienia startera.

Jako matryce do reakcji wykorzystywano cDNA uzyskiwane z RNA wyizolowanego z liści i kwiatów 33 i 55 dniowych roślin. Do przeprowadzenia łańcuchowej reakcji polimerazy używano trzech zestawów firmy Kappa Biosystem czy jakoś tak to do sprawdzenia: KAPA3G Plant PCR Kits, KAPA Taq HotStart PCR Kit i KAPA Taq Ready Mix PCR Kit. Warunki reakcji w kolejnych cyklach PCR przedstawiono w Tab. 5. W wyjściowej mieszance reakcyjnej stosowano co najmniej 2,5 mM stężenie jonów magnezu. W przypadku braku pozytywnych wyników lub małej wydajności reakcji PCR zmieniano następujące warunki prowadzenia reakcji: czas przyłączania starterów, temperatura przyłączania starterów, stężenie koaktywatora polimerazy czy czas elongacji starterów. W skrajnych przypadkach parametry te wynosiły: czas przyłączania wynosił 2 min, czas elongacji 3 min, stężenie jonów magnezu 4 mM, a temperatura hybrydyzacji starterów było o 5°C niższa niż najniższa wartość zalecana dla prowadzenia klasycznej reakcji PCR.

Tab. 3. Wykaz oligonukleotydów używanych jako startery w reakcjach PCR.

Nazwa oligonukleotydu	Sekwencja 5'→3'	Długość (nt)	Temperatura topnienia (°C)
FCAFP1	CATACTCTTCCCGGAGGTGTTGGTCCC	27	64,9
FCARP1	CAACTCTTCGGGTTTCTCCCACCGAC	26	65
FCARP2	TGCTGAGATGAATGAAAGCTTGCTTG	26	64,9
FCARP3	CATGGCATTGCCTATAAATGCAGGTGG	27	64,8
FYFP1	AATCCATCMACAAGYTTTGCTGC	23	62,3
FYRP1	GCATTGCARCTCCAAYACWGAATG	26	65
FYRP2	AGCCAATGGAARATGGAWCCATCA	24	60,7
FLDFP1	TGYTTGATTGGCCTCTTGCAAA	22	62
FLDRP1	GTGGCCTCRCCWGCAAAGAACA	22	63,3
FLDFP2	AAGGTTGTSGTTTTTGAAGGYAGGA	25	62,8
FLDRP3	TGTATKGGATYAGGCACAWTGATGCC	26	63
FPAFP1	TCTTCAGAGACAGAAATACTGCATGTG	27	62,5
FPARP1	CAACAAATTTGGCAACACCAGCACG	25	63,3
FPAFP2	GTCCAAACTGGAAAMGGCCATCTCCTC	27	65
FPARP2	CTCAGGTGTTAATGCRACCTCCAGCTTG	27	64,7
FPARP3	GAGGAGATGGCCKTTTCCAGTTTGGAC	27	65
LDFP1	TGAAGCTGCTTGACATGATCAAGAG	25	64
LDRP1	GGGTCCCAGTGTCRGAAGAACCCC	25	64,2
LDFP2	GAGAAGGTGGAAGTTTCTCTCCCATC	26	62,2
LDRP3	CTAGTTGGACTATTYTCMGGACTCCATG	28	64
FLKFP1	GTTAGAGTTCTTGGARCAGARGACCT	26	62,8
FLKRP1	GCTGTTTGGACTTGRGAAGCAGTTCCA	27	64,8
FLKFP2	ATTGGRCGCAAAGGRGAGTWCATHAA	26	62,9
FLKRP2	TCAACWGTGATCTCCCCAGGAAC	23	61,3
FVEFP2NEW	CTTTCTGAGCAGACTGATGGTAG	23	61,9
FVERP1NEW	ACTCATGCGCCATATCTGCAATGTTC	26	64,8
FVEFP1NEW	GAGGTGAACAGAATTAGGGAATTGCC	26	61,2
FVERP2NEW	GCATGTTGAAAAACAACCTGGAGG	26	62,8

Tab. 4. Zestawy starterów stosowanych w reakcjach PCR wraz z przewidywaną długością uzyskanych produktów.

Nazwa lewego startera (forward primer)	Nazwa prawego startera (reverse primer)	Prognozowana długość produktu PCR (nt)
FCAFP1	FCARP1	1440
FCAFP1	FCARP2	1121
FCARP3	FCARP1	892
FYFP1	FYRP1	1147
FYFP1	FYRP2	818
FLDFP1	FLDRP1	778
FLDFP2	FLDRP1	1163
FLDFP2	FLDRP3	1025
FLDFP1	FLDRP3	640
FPAFP1	FPARP1	1338
FPAFP2	FPARP2	944
FPAFP1	FPARP3	816
LDFP1	LDRP1	1108
LDFP2	LDRP1	1016
LDFP1	LDRP3	994
LDFP2	LDRP3	902
FLKFP1	FLKRP1	632
FLKFP2	FLKRP1	962
FLKFP2	FLKRP2	929
FLKFP1	FLKRP2	599
FVEFP2NEW	FVERP1NEW	1122
FVEFP1NEW	FVERP1NEW	963
FVEFP2NEW	FVERP2NEW	998
FVEFP1NEW	FVERP2NEW	839

Produkty reakcji rozdzielano w 1,4% żelu agarozowym w celu oceny ich wielkości oraz specyficzności amplifikacji. Długość powielanych cDNA oceniano na podstawie tempa migracji wobec markera wielkości GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific Inc) i porównywano z długościami przewidywanych amplikonów sekwencji homologicznych na podstawie których zaprojektowano startery (Tab. 4). Warunki prowadzenia elektroforezy zachowano takie jak w przypadku wcześniej opisanym. Produkty cDNA pozytywnie zweryfikowane były ponownie rozdzielane z wykorzystaniem techniki elektroforezy preparatywnej. Następnie fragmenty cDNA o właściwej wielkości izolowano z żelu zestawem AxyPrep DNA Gel Extraction Kit (Axygen Biosciences) i klonowano w systemie bakteryjnym z zastosowaniem zestawu StrataClone PCR Cloning Kit (Agilent Technologies) zgodnie z zaleceniami producenta wydłużając jedynie nieznacznie czas trwania szoku cieplnego do 55 sekund.

Tab. 5. Warunki reakcji PCR typu Touch Down.

Temperatura reakcji [°C]	Czas trwania etapu reakcji [min]	Liczba powtórzeń cyklu
95	3	1
95	1	3
60	1	
72	1	
95	1	3
59	1	
72	1	
95	1	3
58	1	
72	1	
95	1	3
57	1	
72	1	
95	1	3
56	1	
72	1	
95	1	25
55	1	
72	1	
72	3	1

Bakterie po transformacji wysiewano na stałą pożywkę selekcyjną LB z dodatkiem ampicyliny i X-gal. Do dalszych analiz wybierano tylko białe kolonie bakteryjne. Zastosowany plazmid niósł gen oporności na ampicylinę, a miejsce MCS, do którego ligowano produkt PCR, było położone w obrębie genu *LacZ*. Obecność wstawki powodowała unieczynnienie tego genu, co prowadziło do braku zabarwienia kolonii bakteryjnych, które zawierały plazmid niosący wklonowany produkt PCR. Bakterie z białych kolonii przenoszono do próbek zawierających płynną pożywkę LB z dodatkiem ampicyliny. Hodowle prowadzono przez noc, a następnie z namnożonych bakterii zestawem Axy Prep Plasmid Miniprep Kit (Axygen Biosciences) zgodnie

z instrukcją producenta izolowano plazmidy. Uzyskane plazmidy poddawano enzymatycznej hydrolizie z zastosowaniem restryktazy Fast Digest EcoRI (Thermo Fisher Scientific Inc). Wyniki reakcji obserwowano po rozdiale elektroforetycznym w 1,4% żelu, a różnice w migracji otrzymanych fragmentów DNA pomiędzy próbą nietrawioną i trawioną, świadczyły o prawidłowym wstawieniu fragmentu cDNA namnożonego w reakcji PCR.

Plazmidy zawierające fragment cDNA poddawano sekwencjonowaniu. Uzyskane sekwencje cDNA po obróbce bioinformatycznej (usuwanie sekwencji wektora oraz składanie sekwencji) zostały poddane analizie programem BLAST.

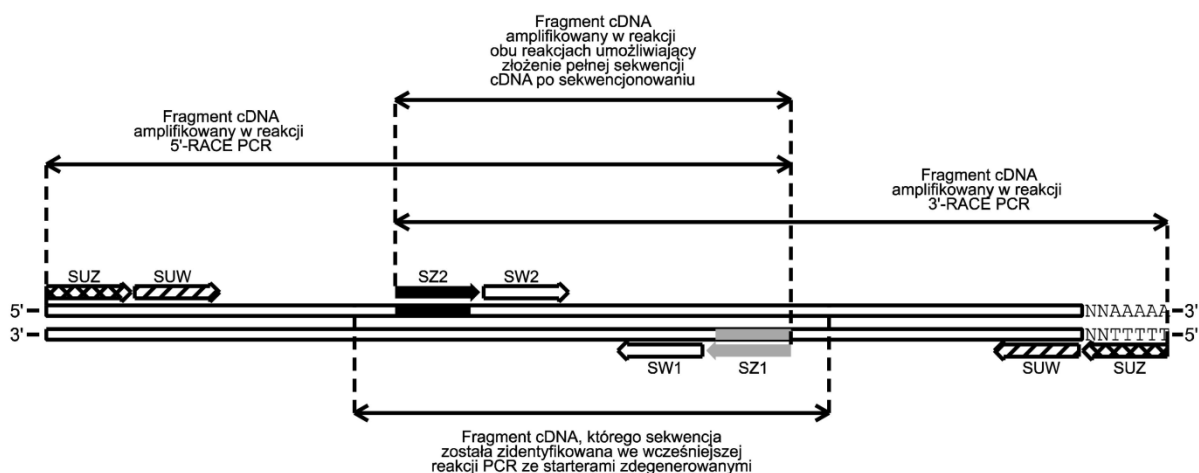
Umożliwiło to zweryfikowanie zakładanej zgodności badanego fragmentu cDNA z homologicznymi sekwencjami zdeponowanymi w Banku Genów, występującymi u innych gatunków roślin. W ten sposób scharakteryzowano fragmenty cDNA siedmiu genów: *FCA*, *FY*, *FLD*, *FPA*, *FLK*, *FVE* i *LD* występujących u *L. luteus*.

3.7.1. Specyficzne wydłużanie końców cDNA genów AP techniką RACE

Zastosowane podejście eksperymentalnie pozwala na uzyskanie sekwencji cDNA pełnej długości. Aby móc wykorzystać tę technikę konieczne jest jedna poznać przynajmniej fragmentu badanej sekwencji. Przeprowadzenie reakcji 5' i 3' RACE PCR pozwala na wydłużenie końców znanego fragmentu cDNA oraz zidentyfikowanie pełnych długości sekwencji kodujących badane geny.

Sekwencje cDNA pełnej długości genów szlaku autonomicznego uzyskano w wyniku przeprowadzenia szeregu reakcji RACE PCR (Ryc. 14). W oparciu o zidentyfikowane fragmenty cDNA badanych genów zaprojektowano startery specyficzne do przeprowadzenia reakcji RACE PCR. Dla każdego z wydłużanych fragmentów cDNA zaprojektowano po dwie pary starterów. Pierwsza para (SZ1 i SZ2) stosowana była do amplifikacji fragmentu DNA o większej długości powstającego w opisywanej reakcji. reakcji RACE PCR. Drugi zestaw starterów, wewnętrzne, zakotwiczone (SW1 i SW2), wykorzystano do tzw. PCR zakotwiczonego i były one komplementarne do produktu amplifikowanego w pierwszej reakcji namnażania. Dodatkowa seria reakcji z zastosowaniem drugiego rodzaju starterów zwiększa prawdopodobieństwo amplifikacji specyficznego produktu.

Reakcje RACE PCR prowadzono początkowo zestawem BD SMART™ RACE cDNA Amplification Kit (Clontech). Produkty reakcji rozdzielano w 1,4% żelu agarozowym w celu oceny ich wielkości. Warunki reakcji 5' i 3' RACE PCR zaprezentowano w Tab. 7, a wykaz zastosowanych starterów w Tab. 6.



SZ – starter specyficzny do sekwencji amplifikowanego fragmentu genu tzw. starter zewnętrzny
 SW – starter specyficzny do sekwencji amplifikowanego fragmentu genu znajdujący się w obrębie fragmentu amplifikowanego za pomocą startera SZ tzw. starter wewnętrzny
 SUZ– starter specyficzny do sekwencji adaptera doligowanego do RNA podczas syntezy cDNA tzw. starter uniwersalny zewnętrzny
 SUW– starter specyficzny do sekwencji adaptera doligowanego do RNA podczas syntezy cDNA znajdujący się w obrębie fragmentu amplifikowanego za pomocą startera SUZ tzw. starter uniwersalny wewnętrzny

Ryc. 14. Uproszczony schemat reakcji 5', 3' RACE PCR. Startery SZ1/2 i SW1/2 zaprojektowano w oparciu o wcześniej poznaną sekwencję fragmentu cDNA zidentyfikowanego w reakcji ze starterami zdegenerowanymi. Startery SUZ i SUW są komplementarne do adapterów, które zostały dodane na 5' końcach podczas syntezy cDNA. Na rysunku nie zachowano proporcji długości amplifikowanych sekwencji. Rycinę opracowano w oparciu o instrukcję firmy Clontech do produktu SMARTer® RACE 5'/3' o numerze katalogowym 634858 i 634859 (Chenchik i in 1996, Chenchik i in 1998).

Tab. 6. Wykaz oligonukleotydów stosowanych jako startery w pierwszej reakcji 5', 3' RACE PCR.

Nazwa oligonukleotydu	Sekwencja 5'→3'	Długość (nt)	Temperatura topnienia (°C)
5'LiFCAex	GCATTGGTGCTTGAGGTTTCAGGGTGCA	27	62,8
5'LiFCAin	GCTGGTGAGCAGGTGGCAACTCCT	24	62,5
3'LiFCAex	TGCTGTGCCGCTTCAAATCCTCGGGT	27	62,8
3'LiFCAin	GCAGCCACTTCAACCTCATCAGCAGTCC	28	64,3
5'LiFLDex	AGGATCATCTTGATCCCAATGGGCAGC	27	61,3
5'LiFLDin	GCCAATCAAGCAAAGGGCGAATTCCA	26	59,5
3'LiFLDex	ACCACACTGTTTCTGGAGGGCCACAC	27	64,3
3'LiFLDin	TTGGTGGCTGGTGAGGCTGCACAA	24	60,8
5'LiFYex	CCAGAGAGTGAATTCCCCAGTCTGCGA	27	62,8
5'LiFYin	GAGCCAGTAATAAGACGCCGTCCTCGTT	27	62,8
3'LiFYex	TGGTCTCTGGTGATGATGGAGGCGCA	26	62,7
3'LiFYin	TAAGTGGCAGGCCATGGTTGGGAT	24	59,1
5'LiLDex	AACTGCAGCGCCAGTAATCTGCTTCCA	27	61,3
5'LiLDin	TGTAGCGCAAATGTTGGTGGCTGTTGC	27	61,3
3'LiLDex	GCATCTTCGGCTAACTTACCTGGTGCA	27	61,3
3'LiLDin	ACACCATCACTTCCGGCCACACAGCAA	27	62,8
5'LiFLKex	AACTTCCTGCTTGTGAGGCTGGCACTA	27	61,3
5'LiFLKin	TTCCACCCACACCTGAAGGAGCA	24	60,8
3'LiFLKex	TGGACCCACTCCTCAATACATGCCACC	27	62,8
3'LiFLKin	CTCCGGTGGAGAAACAGCCCCATCAT	26	62,7
LiFPA5RACE2013	GCCAAAGCTTTTCCCTGAAATTGCC	27	59,7
LiFPA3RACE2013	TTCTGCCCGACAGCGAAGAAGATTTTGC	28	61,4
5'LiFVEex	ACCACCCAGATTTGGAGCCTGTGGCA	26	62,7
5'LiFVEin	GTTTCAGTTGGGCACATTGCAAGAGCA	26	59,5
3'LiFVEex	ACCATGGACATGAGGATGCCGTCGAA	26	61,1
3'LiFVEin	GTTTCGCATGTTTGACCGCCGCAA	23	58,8

Produkty pozytywnie zweryfikowane w wyniku przeprowadzonej elektroforezy sprawdzającej zostały ponownie rozdzielone w żelu preparatywnym, a następnie izolowano je zestawem AxyPrep DNA Gel Extraction Kit (Axygen Biosciences) i klonowano w systemie bakteryjnym zestawem StrataClone PCR Cloning Kit (Agilent Technologies). Cała procedura klonowania i sekwencjonowania była identyczna jak dla fragmentów cDNA, amplifikowanych przy użyciu starterów zdegenerowanych.

Tab. 7. Warunki reakcji 5' i 3' RACE PCR.

Temperatura reakcji [°C]	Czas trwania etapu reakcji [min]	Liczba powtórzeń cyklu
95	3	1
95	1	5
72	3	
95	1	5
70	1	
72	3	
95	1	25
68	1	
72	3	
72	5	1

Plazmidy niosące fragment cDNA poddano sekwencjonowaniu. Uzyskiwane sekwencje po obróbce bioinformatycznej oraz zestawieniu ze zidentyfikowanymi już wcześniej fragmentami cDNA poddane zostały analizie programem BLAST. Zweryfikowano w ten sposób czy zsekwencjonowany fragment cDNA jest identyczny z fragmentem pierwotnie zidentyfikowanej sekwencji cDNA opisanej u łubinu żółtego i czy jest homologiczny do zidentyfikowanego genu u innych gatunków. Ze względu na wielkość zidentyfikowanych genów, w pierwszej rundzie RACE PCR nie poznano cDNA pełnej długości badanych genów, dlatego zaprojektowano kolejne kombinacje starterów do reakcji RACE PCR tym razem komplementarnych do wydłużonych już fragmentów cDNA badanych genów. Całą procedurę powtórzono z zastosowaniem nowego zestawu do RACE PCR RACE PCR SMARTer RACE 5'/3' Kit (Clontech). Warunki drugiej serii reakcji 5' i 3' RACE PCR zaprezentowano w Tab. 8, a wykaz zastosowanych starterów w Tab. 9. Sekwencjonowanie przeprowadzono z wykorzystaniem specyficznych zakotwiczonych starterów reakcji na matrycy amplifikowanych fragmentów cDNA, z pominięciem etapu klonowania w układzie bakteryjnym.

Uzyskiwane sekwencje po obróbce bioinformatycznej (składanie sekwencji) zostały poddane analizie programem BLAST. Podejście takie pozwoliło potwierdzić czy zsekwencjonowany fragment cDNA jest homologiczny do zidentyfikowanego genu u innych gatunków oraz czy zidentyfikowano sekwencje cDNA pełnej długości. Dla genów *LIFLD*, *LIFPA* i *LIFVE* nie uzyskano sekwencji cDNA pełnej długości, dlatego wykonano trzecią rundę reakcją 5', 3' RACE PCR w analogiczny sposób jak poprzednią, o parametrach przedstawionych w Tab. 8, a wykaz zastosowanych starterów w Tab. 10.

Tab. 8. Warunki drugiej i trzeciej reakcji 5' i 3' RACE PCR.

Temperatura reakcji [°C]	Czas trwania etapu reakcji [min]	Liczba powtórzeń cyklu
95	3	1
95	1	2
72	3	
95	1	2
70	1	
72	3	
95	1	2
68	1	
72	3	
95	1	2
66	1	
72	3	
95	1	2
64	1	
72	3	
95	1	2
62	1	
72	3	
95	1	2
60	1	
72	3	
95	1	2
58	1	
72	3	
95	1	2
57	1	
72	3	
95	1	2
56	1	
72	3	
95	1	2
55	1	
72	3	
95	1	25
54	1	
72	3	
72	5	1

Tab. 9. Wykaz oligonukleotydów używanych jako startery w drugiej reakcji 5', 3' RACE PCR.

Nazwa oligonukleotydu	Sekwencja 5'→3'	Długość (nt)	Temperatura topnienia (°C)
LIFCA5RACE2013	AGCTGGTGAGCAGGTGGCAACTCCT	25	62,6
LIFCA3RACE2013	CATTCGTCACAGCAAGTGTCTCCCAGC	30	62,9
LIFLD5RACE2013	CATTGCCTCCAGCAAGAAAGCAGTGATC	30	61,4
LIFLD3RACE2013	GTGAGGGTTCATCCGGTGGCGATTGT	28	62,7
LIFY5RACE2013	CGAGCCAGTAATAAGACGCCGTCCCGT	29	64,3
LIFY3RACE2013	AGGAGCTTGAATCATTCCGTGGACATCA	30	59,9
LILD5RACE2013	CGAAGATGCTTCTGTGCTCCATCCACTC	30	62,9
LILD3RACE2013	CATCACTTCCGGCCACACAGCAACA	27	61
LIFLK5RACE2013	CCGTCAATGAGCCGTTTATGAACCCTCA	30	61,4
LIFLK3RACE2013	TGCCTACGGAAGAGATGCTTCAATGGGT	30	61,4
LIFVE5RACE2013	CACATAGGGTTCAGTTGGGCACATTGCA	30	61,4
LIFVE3RACE2013	TGCACTTACGTCAAATGGAGTTGGGTCA	30	59,9

Tab. 10. Wykaz starterów specyficznych wykorzystywanych w trzeciej reakcji 5', 3' RACE PCR.

Nazwa oligonukleotydu	Sekwencja 5'→3'	Długość (nt)	Temperatura topnienia (°C)
5RACELIFLD148	CCTCCAGCAAGAAAGCAGTGATCACCAC	28	62,9
5RACELIFLD109	GGATCATCTTGATCCCAATGGGCAGC	26	61,1
3RACELIFLD642	ATTGTCGTGCCTGATCCAATTCAGTCAGT	29	60,1
3RACELIFLD722	TGGTGTGGGTTTCATCCGGTGGC	22	60,4
5RACELIFPA151	AGAGACCGAAATACTGCATGTTTGGACGA	29	60,1
5RACELIFPA73	TGGTCTCCAGCTTGAGTAGCATCGTCC	27	62,8
3RACELIFPA2	CTGTTGCACACAATGATGGAAACCAATCTC	30	60,3
3RACELIFPA38	GGAAACCAGAGCATCCGATTGTTGA	25	57,7
5RACELIFVE86	TGGTCTTGTACTTCTTCACAAATGGGGATCG	31	61,7
5RACELIFVE74	TCTTCACAAATGGGGATCGAGCTTCTTCA	29	60,1
3RACELIFVE1	AAAGCTGCTGTTCTTTGTGTTTCAGTGGTCTCC	32	63,1
3RACELIFVE58	TCTGCAGAAGATGGTCTCTTGAACATTTGGGA	32	61,8

Równoległe reakcje 5' i 3' RACE PCR prowadzono z zastosowaniem zestawu firmy Ambion First Choice® RLM-RACE Kit (Shaefer 1995). W przeciwieństwie do poprzednich, w reakcji tej wykonywana jest selekcja RNA, dzięki czemu do jej przeprowadzenia wykorzystywane jest wyłącznie pełnej długości mRNA. W zestawach firmy Clontech reakcje 5' i 3' RACE PCR mogą być teoretycznie przeprowadzone na mRNA niepełnej długości. Adaptory stosowane w tej metodzie oraz komplementarne do nich startery charakteryzują się innym profilem temperaturowym, niż te stosowane w zestawach firmy Clontech Tab. 11. Umożliwia to przeprowadzenie reakcji 5' i 3' RACE PCR z wykorzystaniem innych starterów (z reguły o niższej temperaturze topnienia), których sekwencje zaprezentowano w Tab. 11. Profil temperaturowy reakcji ze względu na adaptory został zdeterminowany przez producenta, dlatego nie było możliwe zastosowanie reakcji PCR typu Touch Down. Produkty 5', 3' RACE PCR powielane z wykorzystaniem tego drugiego zestawu również klonowano w systemie bakteryjnym i sekwencjonowano w analogiczny sposób jak dla zestawu firmy Clontech.

Tab. 11. Wykaz oligonukleotydów stosowanych jako startery w reakcji 5', 3' RACE PCR wykonanej zestawem firmy Ambion.

Nazwa oligonukleotydu	Sekwencja 5'→3'	Długość (nt)	Temperatura topnienia (°C)
LIFCA5RACEwew	GCAGGTGGCAACTCCTGAGATGATTGA	27	61,3
LIFCA3RACEwew	TTCGTACACAGCAAGTGTCTCCAGCTT	28	61,4
LIFLD5RACEwew	CAGCAAGAAAGCAGTGATCACCACCCA	27	61,3
LIFLD3RACEzew	CTCTCATGTTGGTGAGGGTTCATCCGGT	28	62,9
LIFY5RACEwew	CCAGTAATAAGACGCCGTCCTGGTGGGA	27	62,8
LIFY3RACEzew	TGAAGGAGCTTGAATCATTCCGTGGACA	28	59,9
LILD5RACEwew	GCTTCTGTGCTCCATCCACTCGTTCCTTG	28	62,9
LILD3RACEzew	CACAAACACCATCACTTCCGGCCACA	26	61,1
LIFLK5RACEwew	AATCAGGCTCCTCTTTCCCGATACCA	27	61,3
LIFLK3RACEwew	GGGTGTTTCATGCACCTTCAAATACCCAA	28	59,9
LIFPA5RACEzew	TCAGTGTGGCCAAAGCTTTTTCCCTGA	27	59,7
FPA3RACEwew	GCCCCACAGCGAAGAAGATTTTGCTTC	27	67,3
LIFVE5RACEzew	CAGAGAGCACATAGGGTTCAGTTGGGCA	28	62,9
LIFVE3RACEzew	CACTGTGTTGATTGGAGTCCCCATGATG	28	61,4

Uzyskane techniką 5'3' RACE-PCR sekwencje cDNA genów szlaku autonomicznego porównano z danymi otrzymanymi w wyniku sekwencjonowania RNA-seq przeprowadzonego na bibliotekach cDNA z organów wegetatywnych i generatywnych *Lupinus luteus* (Glazińska i in. 2017). Wykonane porównanie miało potwierdzić poprawność przeprowadzenia etapu identyfikacji cDNA badanych genów oraz zgodność zidentyfikowanych sekwencji. Otrzymane cDNA poddano analizie programem BLAST. Umożliwiło to zweryfikowanie homologii badanego cDNA z sekwencjami zdeponowanymi w Banku Genów występującymi u innych gatunków roślin. W oparciu o te wyniki skonstruowano drzewa filogenetyczne dla każdego genu w programie MAFFT version 7, które zwizualizowano w programie Phylo.io. Dla każdej ze zidentyfikowanych sekwencji cDNA badanych genów wytypowano przewidywaną sekwencje aa wyznaczona w programie Translate Tool. Przewidywana sekwencja aminokwasowa białek kodowanych przez te geny została poddana analizie w programie MyHits. Wykorzystano narzędzia Motif Scan z domyślnymi ustawieniami oraz przeskanowano wszystkich dostępnych baz motywów i domen białkowych. W ten sposób scharakteryzowano sekwencje siedmiu genów szlaku autonomicznego: *FCA*, *FY*, *FLD*, *FPA*, *FLK*, *FVE* i *LD* występujących u *L. luteus* oraz potencjalnie kodowanych przez nich peptydów.

3.8. Oznaczenie ekspresji genów szlaku autonomicznego *L. luteus*

3.8.1. Warunki polowe uprawy łubinu

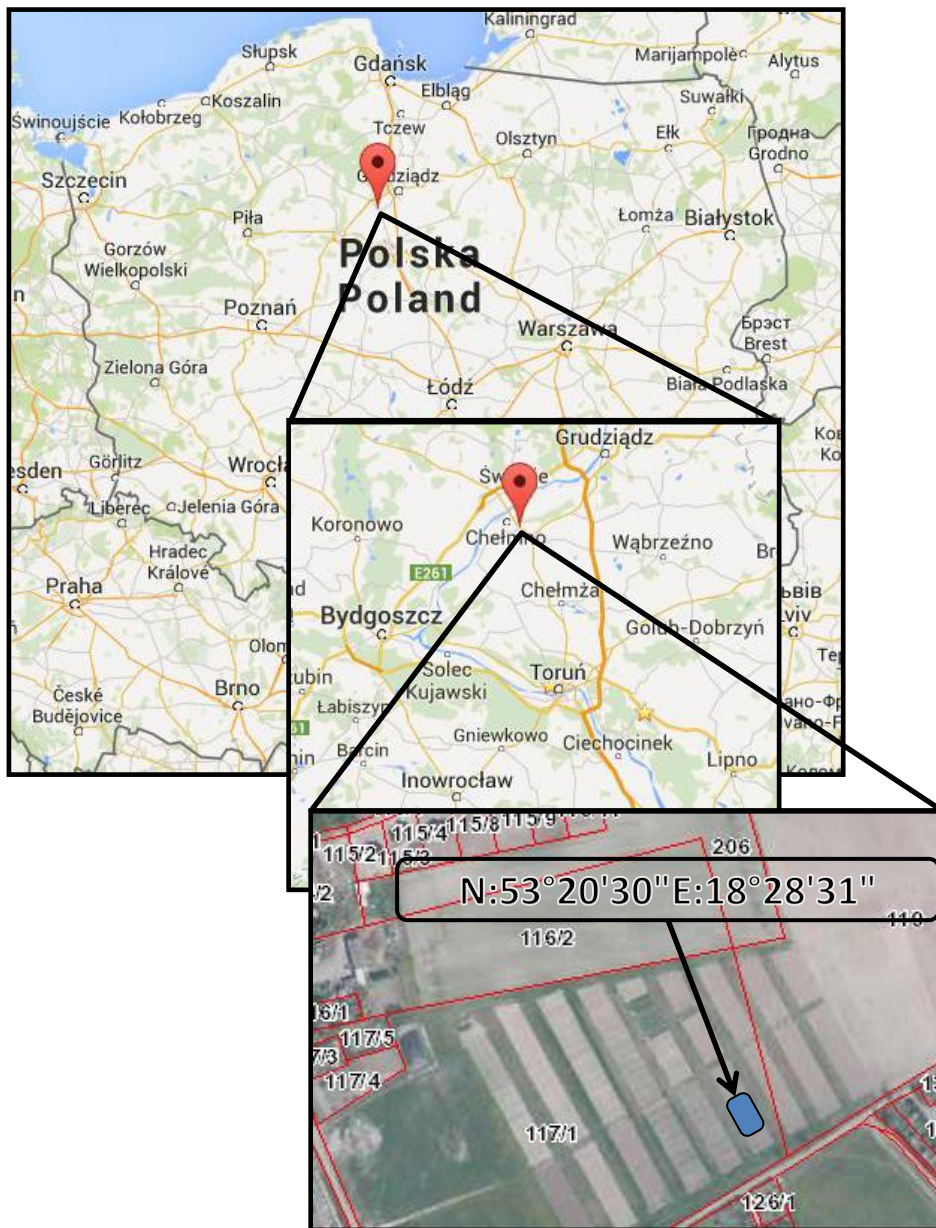
Uprawy w warunkach naturalnych łubinu żółtego odmiany Taper prowadzono na poletkach pokazowych w Grubnie (N:53°20'30"E:18°28'31") w glebie klasy III (Ryc. 15).

Nasiona przed wysiewem mechanicznym zaprawiano preparatem VITAVAX 200 FS oraz Nitraginą według przepisu producenta. Wysiew odbywał się w pięciu terminach (SI, SII, SIII, SIV, SV), w odstępach jednodniowych. Do analiz molekularnych wykorzystano rośliny z siewu I, III i V.

Pozostałe warianty uprawy tj. siew II i IV potraktowano jako rośliny rezerwowe w przypadku gdyby doszło do niepowodzeń w uprawie roślin z siewu I, III lub V (Ryc. 16).

Po około 34 dniach od wysiania ostatnich roślin pole podzielono na 5 części wg schematu przedstawionego na rycinie 17. W tym celu usunięto część roślin tworząc odstępy między poletkami. Każde z wydzielonych poletek zostało opryskane wodnym roztworem fitohormonu o stężeniu 0,1 mM z dodatkiem 0.05% Tween20 (każde poletko w ramach jednego siewu – ok 3m², opryskano innym roztworem fitohormonu, na każdy

wariant doświadczalny zużyto 2,5 litrów roztworu). Wszystkie opryski zostały wykonane w tym samym czasie przez 3 osoby, a czas aplikacji wynosił 10 minut. Skład zastosowanych roztworów zamieszczono w tabeli 12.



Ryc. 15. Lokalizacja poletka doświadczalnego. Źródło: <http://www.geoportal.gov.pl/>.



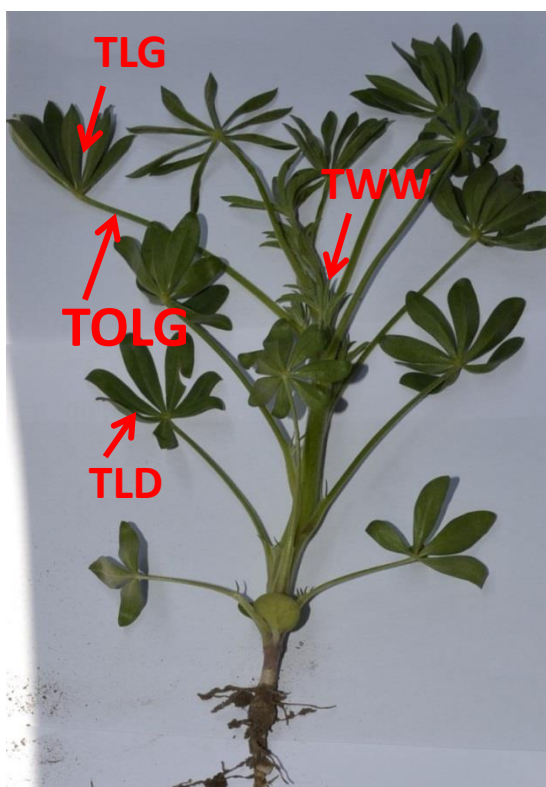
Ryc. 16. Układ uprawy polowej łubinu żółtego odmiany Taper prowadzonej w Grubnie SI - siew pierwszy, SII – siew drugi, SIII – siew trzeci, SIV – siew czwarty, SV – siew piąty (Fot. Mariusz Banach, Waldemar Wojciechowski, Natalia Klajn).

Tab. 12. Skład ilościowy zastosowanych roztworów fitohormonów.

Nazwa fitohormonu		Objętość roztworu	
		1 litr	5 litrów
Kwas abscysynowy (ABA)	ABA 0,1 mM	26,432 mg	132,16 mg
	0.05% TWEEN	500 µl	2500 µl
Giberelina GA3 (GA)	GA 0,1 mM	34,637 mg	173,185 mg
	0.05% TWEEN	500 µl	2500 µl
Wariant kontrolny (K)	0.05% TWEEN	500 µl	2500 µl

Numer poletka	SV	SIV	SIII	SII	SI
1	K	X	K	X	K
2	ABA	X	ABA	X	ABA
3	GA	X	GA	X	GA
Wiek roślin w dniu oprysku od dnia siewu	34	41	48	55	62

Ryc. 17. Schemat doświadczenia polowego. Zastosowano skrócone nazwy fitohormonów i wariantu kontrolnego (K), kwas abscysynowy (ABA), giberelina GA3 (GA), siew I (SI), siew II (SII), siew III (SIII), siew IV (SIV), siew V (SV). X oznacza poletka nieopryskane roztworami fitohormonów.



Ryc. 18. Przykładowy obraz około 34 dniowych siewek łubinu żółtego. Strzałkami zaznaczono organy pozyskiwane w celu izolacji oraz zbadania w nich aktywności genów szlaku autonomicznego. Na czerwono zaznaczono liście dolne (trzeci liść licząc od liścieni) – TLD, liście górne (trzeci liść licząc od wierzchołka) – TLG, ogonki liściowe liści górnych – TOLG oraz część wierzchołkową – TWW. Przykładowe zdjęcie wykonane w roku 2014 (Fot. Mariusz Banach, Waldemar Wojciechowski, Natalia Klajn).



Ryc. 19. Cześć wierzchołkową (TWW) roślin ok. 62 dniowych TWW przekształca się w kwiatostan. Po kolejnych 7 dniach powstaje w pełni wykształcony kwiatostan (Ryc. 20), na którym cześć kwiatów jest w pełni rozwinięta, a część z nich została zapylona i przekształca się w strąk. Przykładowe zdjęcie wykonane w roku 2014 (Fot. Mariusz Banach, Waldemar Wojciechowski, Natalia Klajn).



Ryc. 20. Kwiatostany roślin ok. 69 dniowych nie były zbierane jako materiał badawczy do badania ekspresji genów. Przykładowe zdjęcie wykonane w roku 2014 (Fot. Mariusz Banach, Waldemar Wojciechowski, Natalia Klajn).

Po wykonaniu oprysków zbierano wybrane organy łubinu, które stanowiły materiał badawczy. Kolekcjonowano cztery rodzaje organów z co najmniej kilkunastu roślin: liście dolne (trzecie liście licząc od liścieni) – TLD, liście górne (trzecie liście licząc od wierzchołka wzrostu) – TLG, ogonki liściowe liści górnych – TOLG oraz cześć wierzchołkową – TWW (Ryc. 18). Wymienione powyżej części roślin pozyskiwano w kilku wariantach czasowych. Pierwszy stanowiły te kolekcjonowane tuż przed opryskami. Następnie z każdego wariantu zbierano organy po 1, 4, 24 godzinie oraz 7 dniach od podania oprysku. W ostatnim wariantcie czasowym nie zbierano TLD, ponieważ były one już zaschnięte. Nie zbierano również części wierzchołkowej, ponieważ była przekształcona w kwiatostan (Ryc. 19 i 20).

Materiał roślinny po zbiorze umieszczono w 15 ml probówce wirówkowej typu falcon i natychmiast zamrażano w ciekłym azocie. Transport tkanek roślinnych odbywał się w takich samych warunkach w temperaturze poniżej -192°C , która gwarantowała zahamowanie wszelkich przemian biologicznych mogących wpływać na jakość analizowanych prób.

W laboratorium materiał badawczy przenoszono do zamrażarki niskotemperaturowej -80°C , i przechowywano go do czasu izolacji RNA.

3.8.2. Izolacja i walidacja RNA

Zebrane organy łubinu żółtego, z których izolowano RNA, rozcierano w moździerzach porcelanowych w obecności ciekłego azotu. Następnie z utartego materiału pobierano po 100 mg naważki do probówek wirówkowych typu Eppendorf. Izolacje RNA prowadzono przy użyciu zestawu RNA ISOLATE II RNA Plant Kit według zaleceń producenta. Do ekstrakcji i lizy komórek roślinnych wybierano bufor RLY, a jako czynnik redukujący zastosowano β -merkaptoetanol. Jediną modyfikacją procedury było wydłużenie do 30 minut czasu hydrolizy DNA genomowego na kolumnie wiążącej z zastosowaniem DNazyI. Elucje RNA przeprowadzono objętością $40\mu\text{l}$ wody wolnej od nukleaz. W celu zwiększenia wydajności izolacji RNA wymywano z membrany ponownie pierwotnym przesączem. W przypadku walidacji RNA postępowano identycznie jak opisano w podrozdziale 3.6.2. Izolacja i walidacja RNA.

3.8.3. Reakcja odwrotnej transkrypcji

Pozytywnie zweryfikowany RNA był wykorzystywany, jako matryca do syntezy cDNA. Reakcje odwrotnej transkrypcji przeprowadzono przy użyciu zestawu do syntezy TRANSCRIPTME RNA kit w 52°C , a RNA przed reakcją poddano denaturacji cieplnej. Do każdej reakcji używano $1\mu\text{g}$ całkowitego RNA. Odwrotną transkryptazę inaktywowano termicznie. Pozostałości RNA usuwano enzymatycznie z wykorzystaniem RNazą H, którą po reakcji również inaktywowano termicznie. Reakcje prowadzono w termocyklerze z podgrzewaną pokrywą. Uzyskany w ten sposób cDNA wykorzystywano, jako matrycę w reakcjach Real Time PCR. cDNA po syntezie przechowywano w zamrażarce w temperaturze -20°C do czasu przygotowania reakcji ilościowego PCR.

3.8.4. Reakcja Real Time PCR

Tak uzyskane matryce cDNA rozcieńczano pięciokrotnie wodą ultra czystą. Reakcje Real Time PCR przeprowadzono z wykorzystaniem zestawu 2X KAPA PROBE

FAST qPCR Master Mix2 Universal. Mieszanki reakcyjne przygotowywano w 96 dołkowych płytkach w zmniejszonej objętości 11 µl, według tabeli nr 13. Stosowano profil reakcji zalecany przez producenta z temperaturą przyłączenia starterów 58°C. Reakcje przeprowadzono w termocyklerze Light Cycler 480 Real-Time PCR System firmy Roche. Na każdej płytce, dla każdego z badanych w parach genów, przygotowywano po dwie próby ślepe oraz dwie reakcje z „kalibratorem” – wybraną i zawsze identyczną matrycą cDNA. „Kalibrator” umożliwia porównywanie wyników reakcji RT-qPCR pomiędzy kolejnymi powtórzeniami lub pomiędzy odrębnymi badanymi wariantami. Dodatkowo na każdej płytce prowadzono dwie reakcje stanowiące powtórzenie dwóch punktów krzywej kalibracyjnej wykonywanej wcześniej dla każdego z badanych genów.

Tab. 13. Skład mieszaniny reakcyjnej do Real Time PCR.

Nazwa odczynnika	Objętość µl
2X KAPA PROBE FAST qPCR Master Mix2 Universal	5,5
Starter prawy (10 µM)	0,2
Starter lewy (10 µM)	0,2
Sonda UPL	0,1
Matryca cDNA	5

Startery oraz rodzaje sond UPL przedstawiono w tabeli nr 14. Sekwencje starterów oraz rodzaje sond zaprojektowano w oprogramowaniu ProbeFinder firmy Roche. W tym celu wykorzystano zidentyfikowane we wcześniej przeprowadzanych eksperymentach, sekwencje cDNA zidentyfikowanych genów szlaku autonomicznego.

Tab. 14. Wykaz oligonukleotydów użytych jako startery w reakcji Real Time PCR, sekwencji powielanych amplikonów oraz rodzajów użytych sond UPL.

Nazwa oligonukleotydu	Sekwencja 5'→3'	Długość (nt)	Temperatura topnienia (°C)	Długość produktu PCR (nt)	Sonda UPL
FPLIFCAUPL98	GGACAATTTCCAACCTTCTCAGTC	23	59	71	#98
RPLIFCAUPL98	TGAAGAACCCGAGGATTTGA	20	60		
FPLIFLUDUPL130	TGGTTTTTCCGCATGTTTTT	20	60	72	#130
RPLIFLUDUPL130	GTTGATGACTTTGTCCGTTGAG	22	59		
FPLIFYUPL9	GTCACAATGACAACCTGGATGGT	22	59	72	#9
RPLIFYUPL9	TGTTTCATGTTGTTCTGCCAAT	21	59		
FPLILDUPL83	ATTCCGGCTGCTGACAATA	19	59	60	#83
RPLILDUPL83	CGATGATTGTAGCGCAAATG	20	60		
FPLIFLKUPL22	CAGGGTCTTCCTCATCCAAA	20	60	71	#22
RPLIFLKUPL22	GGAGGTGGCATGTATGAGG	20	60		
FPLIFPAUPL67	GTAAGGTGGGTCCAACTGG	20	59	65	#67
RPLIFPAUPL67	TGCAGGAGATGGAAGTAGCC	20	60		
FPLIFVEUPL130	AAGTTCTCGCCCAGATTTGA	20	59	78	#130
RPLIFVEUPL130	GGTTCAGTTGGGCACATTG	19	59		
FPLIACTUPL9	TGGACGTACTACAGGTATTGTGC	23	59	60	#9
RPLIACTUPL9	ATGGGCACTGTATGGCTCAC	20	60		

Analizę wyników wykonywano w oprogramowaniu LightCycler 480 Software dostarczonym przez producentów urządzenia. Uzyskane wyniki zestawiono w formie wykresów uwzględniając średni błąd przedstawiony jako słupek błędów. Ze względu na czytelność wykresów zaprezentowano tylko dodatnie słupki, a ujemne pominięto.

W danym roku wykonano pojedyncze powtórzenie biologiczne eksperymentu. Z zebranego materiału izolowano RNA w wystarczającej ilości, aby móc przeprowadzić syntezę cDNA. W zależności od tkanki wykonywano po kilka izolacji, które po ocenie ilościowej i jakościowej łączono w pojedynczej próbówce lub analizowano oddzielnie w niezależnych reakcjach. Tak przygotowane RNA stanowiło matrycę do syntezy cDNA. Wykonywano po dwie niezależne syntezy cDNA. Każda z nich stanowiła matrycę do reakcji Real Time PCR w trzech powtórzeniach technicznych. Eksperyment połowy został powtórzony w trzech kolejnych okresach wegetacyjnych. Ze względu na suszę, w jednym z nich zestawiono wyniki eksperymentów z dwóch lat.

Tab. 15. Wykaz oligonukleotydów użytych jako „startery flankujące”.

Nazwa oligonukleotydu	Sekwencja 5'→3'	Długość (nt)	Temperatura topnienia (°C)	Długość produktu PCR (nt)
FPLIFCAFLANK	CAACTTCCTCTCTCTGCTGGCAA	23	58,9	226
RPLIFCAFLANK	CTGGGAGAACACTTGCTGTGACG	23	60	
FPLIFLDFLANK	GTTGTCGTCGGGGGCCAAGTT	21	61,7	300
RPLIFLDFLANK	CAACAACCCAAAACCCAGCCTTTC	24	61,5	
FPLLFLDFLANK ^{new}	CAAGTTTTTCGTGCACAAATTGCCT	25	54,4	254
RPLLFLDFLANK ^{new}	TCCAACCTTCTAGTGCCACCAATGC	25	57,7	
FPLIFYFLANK	AGACTGGGGAATTCACCTCTCTGG	23	57,9	253
RPLIFYFLANK	AAGACTCTTCTTGACAGCGTGCAA	24	58,4	
FPLILDFLANK	AGATGTATGGAGAGTTAGGCAAAATGGC	28	60	262
RPLILDFLANK	CGATGGTGTGTTGTATATGCACAGAGGA	27	60	
FPLIFLKFLANK	ACGTGGAGCAGCACATGCCACC	22	62	183
RPLIFLKFLANK	GATGGGGCTGTTTCTCCACCGGA	23	60	
FPLIFPAFLANK	CCCGGCTTTAATGAGGCGAGC	21	60,9	224
RPLIFPAFLANK	CCCACGACCTTCTATCCTTGAACG	24	59,1	
FPLIFPAFLANK ^{new}	TTTTCTGGACAGTTACCACCTAGTGGT	28	59,9	342
RPLIFPAFLANK ^{new}	CCCATATGTTGTTCATAGCTAACCCA	28	58,5	
FPLIFVEFLANK ^{new}	ACTCATACAGACAGCCCTGATGTTCTCA	28	59,9	231
RPLIFVEFLANK ^{new}	TGTGGCAGCAGATGTTATGTGATCTTC	27	58,2	
FPACT	GGTTGCAGAAGATGGCTGATGCT	23	62	511
RPACT1	ATGGGCACTGTATGGCTCACACCA	24	64,8	

Jako gen referencyjny wykorzystano wcześniej zidentyfikowaną u łubinu żółtego sekwencję cDNA genu aktyny (*LI*ACT). Przyrównywano do niego ekspresję badanych genów *LIFCA*, *LIFLD*, *LIFY*, *LIFPA* i *LIFVE*. Dla każdego z nich sporządzano krzywe kalibracyjne wyznaczające wydajność reakcji i umożliwiające prowadzenie analiz ilościowych. Matryce w tych reakcjach stanowiły fragmenty genów długości od ok. 200 nt do ok. 500 nt zawierające w sobie odcinki amplifikowanych we właściwej reakcji qPCR (Tab. 15). Dla każdego genu przygotowywano stężenie wyjściowe ok. 1 ng/μl, a następnie serie jego rozcieńczeń od 10 do 1000000 razy. Na tak uzyskanych matrycach przeprowadzono reakcję Real Time PCR w analogiczny sposób, jak dla właściwych analiz ilościowych badanych genów. Reakcję powtórzono sześciokrotnie.

4. Wyniki

W wyniku przeprowadzonych wieloetapowych analiz zidentyfikowano u badanego gatunku homologii 7 podstawowych genów szlaku autonomicznego. Oznaczono je u lubinu żółtego odmiany Taper jako *LIFCA-like*, *LIFY-like*, *LIFLD-like*, *LIFPA-like*, *LIFLK-like*, *LIFVE-like* i *LILD-like*. Scharakteryzowano nie tylko sekwencje kodujące, ale w większości przypadków także sekwencje 5' oraz 3' UTR. Ze względu na wybraną technikę nie była możliwa identyfikacja pełnej długości genu zawierającego introny, sekwencje regulatorowe oraz promotorowe. Do dokładniejszych analiz bioinformatycznych wybrano jedynie fragmenty cDNA, zawierające przewidywane sekwencje aminokwasowe wytypowanych peptydów. Zidentyfikowane sekwencje kodujące wykorzystano także do analizy ekspresji genów.

4.1. Gen *FCA-like*

4.1.1. Identyfikacja sekwencji kodującej genu *LIFCA-like*

```
TTGCGATTCCTTTTGATAGATACATAGGGGTAGAATATTTTTGTAATCTTAGAATTAATTTTCGTATAAAGTTGTTTTCTT
AATCAAAGAAGTGCAAGAAATACAGAAAGGAGAAGAAGAAGGCACAGACAGAGTTGTATCGCTCTTTCCCTCCCTCATTC
GTCTTCGTCGTCATTTACACACATCTTCGTATATTCGTATATCACATCATAACGAGAAGAAGGTACTCTTCAATCTCAA
TTCCTTCGTACCTTAGGGTTAGGGTCCATCGCGTTAGTCAAGCTGGATAGACACAGAGGAGACCGTTACGGCAACAACA
ACAATGATCCTTCCGGTTATCGTCACCCGAGGAATCAATCTCGTTTCTCAGATTCTCCCATGAACTACCACAACCCCGGCC
GGAGCCCCGCTTCCGGCTTCCGTGGTCCCGCTCCCCCTCACCACCGCGCATTGATAGTCTCCGAGCTGGTCTCCTGGTA
AGGGCGGAGGGTTTCGACCAATTGGAGGCGACGGCGAAGGGTTTCGACCAATTGGAGGCGACGGCGAAGGGTTCAAGCCAA
TGGGTGGGTTCAATGCTCATCATCAGCAGCAACCGCCATTGTCTGGTCAGAAAACGAGGGTTTCCATTCTCTGGTCGTGAAG
GTTCGCCCCGATCGTTTTGATGGGGGAAGTTTTGCCAAACTTTTTGTTGGATCTGTTCCCCGTACGGCCACCGAAGAAGATA
TTCCGGCCTTTGTTTGAGCAACATGGGAATGTGATTGAAGTTGCACTGATCAAAGATAAAAGAAGTGGACAACATCAAGGTT
GTTGTTTTATAAAGTATGCTACGTCTGAAGATGCTGACCAGGCAATTAGAGCATGACACAATCAACATACTCTTCCCTGGAG
GTATTGGTCCAATCCAAGTGGGTATGCTGATGGTGAACGGGAACGCCTCGGTGCAGTAGAGTACAAATATTTGTTGGGCT
CTCTGAACAAACAGGCTACTGTAAAGGAAGTTGAGAAATATTTCAAAGTATGGGCGTGTAGAAGATGTTTTATCTTATGC
GTGATGAGAGGAAAACAAAGCCGTGGATGTGGTTTTGTGAAGTATTCAAATCGAGATATGGCACTGTCAGCTATAAATGCAC
TAAATGGAATCTATAACAATGAGGGGTTGTGATCAACCACTAATTTGCCGTTTTGCTGATCCTAAAAGACCTCGTCAAGGAG
ATTCCAGGGTCCGACATTTGGGGATCCAGGATCAGGTCCTAGATTTGACCCACCAGGTGCAAGATTTCCCTCCCAATACTA
GTATTCATATGGATGATCGAATGCCTCCCCAAATGCATGGCGTCTATGCATCCATCAAATATGAGACAATCCTCTAATG
CTGATAATCATGGTATGGAGACTCAATGGTTTTCAAGATCTGGTGACACAACATCGGCTATAAATGCAGGTGGTCCATGTA
CTGGCATGGGAGGCCCCATAGATGGTTCGTTTTAAGGTTGAGTCTCTGACATCAATGTCACAACAGAAATTTTCATCCAGCCTC
TATCGCATATTCACCACCTCAACCAAGAAATATCACCATTGCAGAAAACCTGTTCAATCATCTCAGGAGTTGCCACCTGCTC
ACCAGCTGCACCCTGAACCTCAAGCACAATGCCTACTCCCAATTCATCACAATCATCTCTTCGGCTAGTTGGCCAAAC
CACAACCTCCTCTCTCTGCTGGCAAGCAAGGATTTAGCACAATGGACAATTTCCAACCTCTCAGTCACAAAATCAGCAGA
GTGCTGTGCCTGCTTCAAATCCTCGGTTCTTATGATACCAACTTCCAACCTAATACACAGCAAGTTCTCTCACTCTGTGC
AGCAGCAGCCACTTCAACCTCATCAGCAGTCCCTTCTCAGTTAGCTCAGATGTTGTCAACAACAAAACAGACTTTTACAAG
CAAGTCTTCAATTCGTACAGCAAGTGTCTCCAGCTTCAACAACAAGTACAGATGATGCAACCACTTAGTCAAACATTA
CAATGCAGCAAAATGCAGCAATTGCTAACAAGCAGCAGGCCAGCAATTCACAGCTGCACCCATTGGAGACCTGTCTTCAT
CCACATCTGCTACTACTGTGCGCACCAGGGATAAGCCAGAATATGGCTCTTGCTAAATGTAATGGACAGAGCATTTATCTC
CTGAGGGATTCAGTACTACTACAATAGTGTGACTGGTGAAAGTCCGTTGGGAGAAAACCGGAGGAGTTGACATTATCTGAAC
AGCAAAAAGCAACAGCAAAGGCTACCTAGTCAGCACTCACAACCTCAGTCACAATCTTCAATGATATCTTCCAGCAAGTTC
CACAATGCAACAGGCTCAGGCTCAAGCTCAAGCTCAGGCTCAAGCTCAGATTTCTCCAGCAGCAACAATGCAGCAGCCTT
CCTTGTCTTCTTCGGCATATGGAGTACAGGTCATCAAATGTTTCAAGGACGTTGGTTATAAACAGTTTCAAGGCATCAGCTG
TTTCTGCTGGTGATCCTGGACACTACTCACAGGGTATTCTACTACACAAGACTGGATGTGGAAAAACAAGCCTGCAGGGA
CTTGACGTTGCTGGGTTGAGCTTGGAGCTGCACATTGAAATGTTGAGTTTTTAAATAGAACAGAATCTCAAATTTGATGA
TGGTCAAAGGTAGGGCATCATTTTCACCCAAAGTTATATGTAACAGTATTTGCATTCATGAGTTACTTGGGTCCTATTGT
TGAGGTTTACATTTTTACTAATACATATTAACCCACCTCTCTGGCCTGCGGGGTTCAATGTCAGATCCTCCTCTTATGCA
ATATGGTTTTCTTTATACATATATTTTAACTTTAACCAATAGTTTTAGGGACACAACTTGGGAGACAATTTCTAAGGTGC
TTGTGGTTTTGTTCCGTAATAATAGAGCACATTTTTTTTTTTCACACCATGAAAAATTAATGTTTTTCTAGGATPATACAG
TAGAAAAATATCAAATTCGAACCTTGTTTTTGTCACTTGCTGAAATGTTGAGTACGTTAAATGTCTTTTGCATGTAG
GGTGCCAGTAACCATTCACCTCAGGACCTATCTGGTGAACACATATTACCAGAAAAGTCAAATTTAAACGGGAACACA
TCTGCTGTCCCATTTTTTGTACCCTACATGTACCATCATTCTAATTTGTTGAAAAAATTTA
```

Ryc. 21. Sekwencja nukleotydoma genu *LIFCA-like* o długości 3233 nt. Kolorem **żółtym** zaznaczono 2207 nt sekwencję kodującą przewidywane białko LIFCA-like.

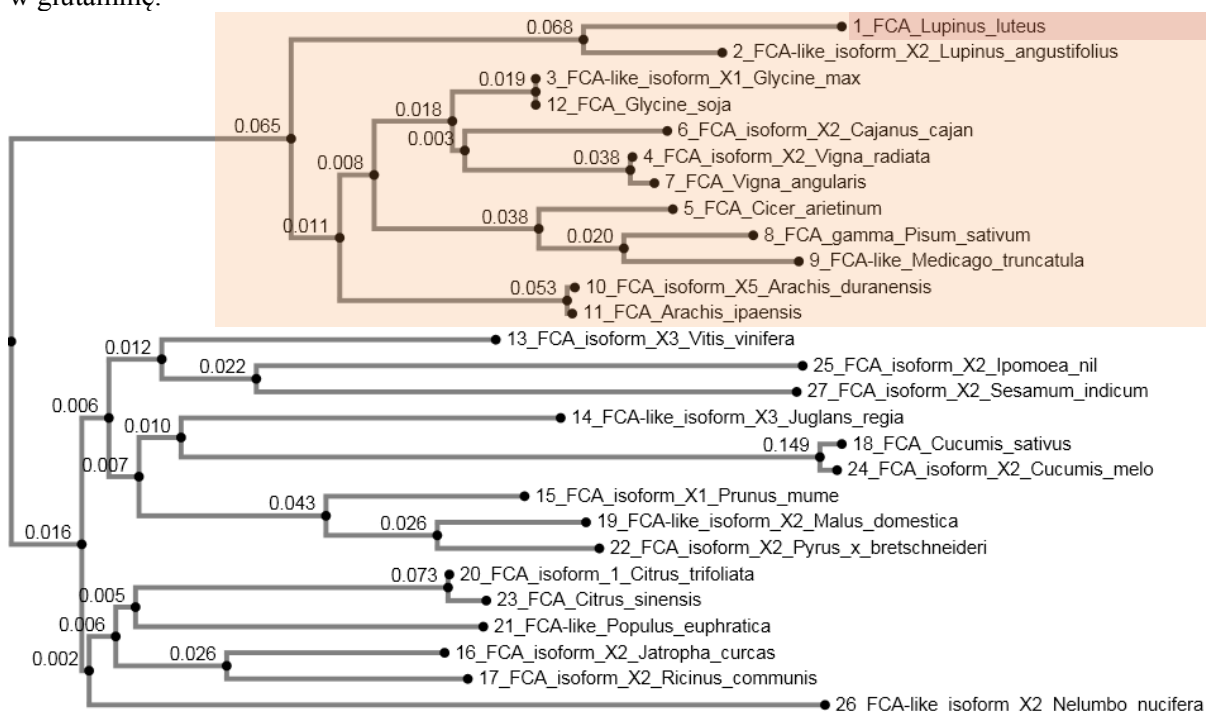
Z zastosowaniem opisanych w rozdziale 3.7. identyfikacja genów szlaku autonomicznego *Lupinus luteus* metod zidentyfikowano sekwencje kodująca homologa genu FCA występującego u łubinu żółtego. W związku z długością cDNA konieczne było przeprowadzenie kilku reakcji RACE PCR, a całość sekwencji uzyskano w wyniku złożenia jej fragmentów. Prawidłowość dopasowania zestawiono ze znanymi cDNA genów występujących u gatunków pokrewnych. Na rycinie 21 zaprezentowano zidentyfikowaną sekwencję nukleotydową cDNA *LIFCA-like*.

4.1.2. Analiza przewidywanej sekwencji białkowej LIFCA-like

Na podstawie zidentyfikowane sekwencji kodującej wytypowano przewidywaną sekwencje aminokwasową białka kodowanego przez *LIFCA-like*. Analiza bioinformatyczna pozwoliła na dokładniejsze scharakteryzowanie potencjalnego peptydu (Ryc. 22).

MNYHNPRRSPASGFRGPAPPHRAFDSPPSWSPGKGGGFRPIGGDGEGRPIGGDGEGRPMGGFNAHHQQQPPLSGQKRG
 FPFSGREGSPDRFDGGSFAKLFVGSVPRTATEEDIRPLFEQHGNIIEVALIKDKRTOGHQGCCFIKYATSEADQAIRALH
 NQHTLPGGIGPIQVRYADGERERELGAVEYKLFVGSLNKQATVKEVEEIFSKYGRVEDVYLMRDERKQSRGCGFVKYSNRDM
 ALSAINALNGIYTMRGCDQPLIVRFADPKRPRQGDSTRGPTFGDPGSGPRFDPPGARFPNPTSIHMDDRMPPPNAWRPMHPS
 NMRQSSNADNHGMETQWFFRSGDTTSAINAGGPMTGMGGPIDGRFKVESLTSMSQQNFIQPLSHIPLLNQEIISPLQKPVQS
 SQELPPAHLHPPEQAMPYSQIPSSSLRLVGPQLPLSAGKQGFSTNGQFPPTSQSQNQSSAVPASNPRVLHDTNFPNT
 QQVPHSVQQQLQPHQQSPSOLAQMLSQOKOTLQASLHSSQQVFSQLQQQVQMMQPSSTLTMQQNAAIANKQQASNSTAA
 PIGDLSSTSATTVAPGISQNMALAKCNWTEHLSPEGFKYIYNSVTGESRWEKPEELTLSEQQKQQRLPSQHSQTQS
 MISSQQVPQMQAQAQAQAQAQAQILQQQQMQQPSLSSSAYGVTGHQNVQDVGYKQFQASAVSAGDPGHYSQGIHTTQDWM
 WKNKPAGS

Ryc. 22. Przewidywana sekwencja aminokwasowa białka LIFCA-like o długości 737 aminokwasów. Kolorem **żółtym**, w pozycji 596-621 aa, zaznaczono domenę WW posiadającą kieszeń wiążącą białko FY-like w pozycji 607-618 aa co zaznaczono **pogrubioną i podkreśloną czcionką**. Kolorem **niebieskim**, w pozycjach 100-181 aa i 191-271 aa, zaznaczono 2 domeny RRM. **Zieloną czcionką** w pozycjach 34-97 aa i 379-706 aa, zaznaczono regiony bogate w glutaminę.



Ryc. 23. Drzewo filogenetyczne dla białka LIFCA-like opracowane w oparciu o sekwencje aminokwasowe białek kodowanych przez geny homologiczne innych gatunków roślin.

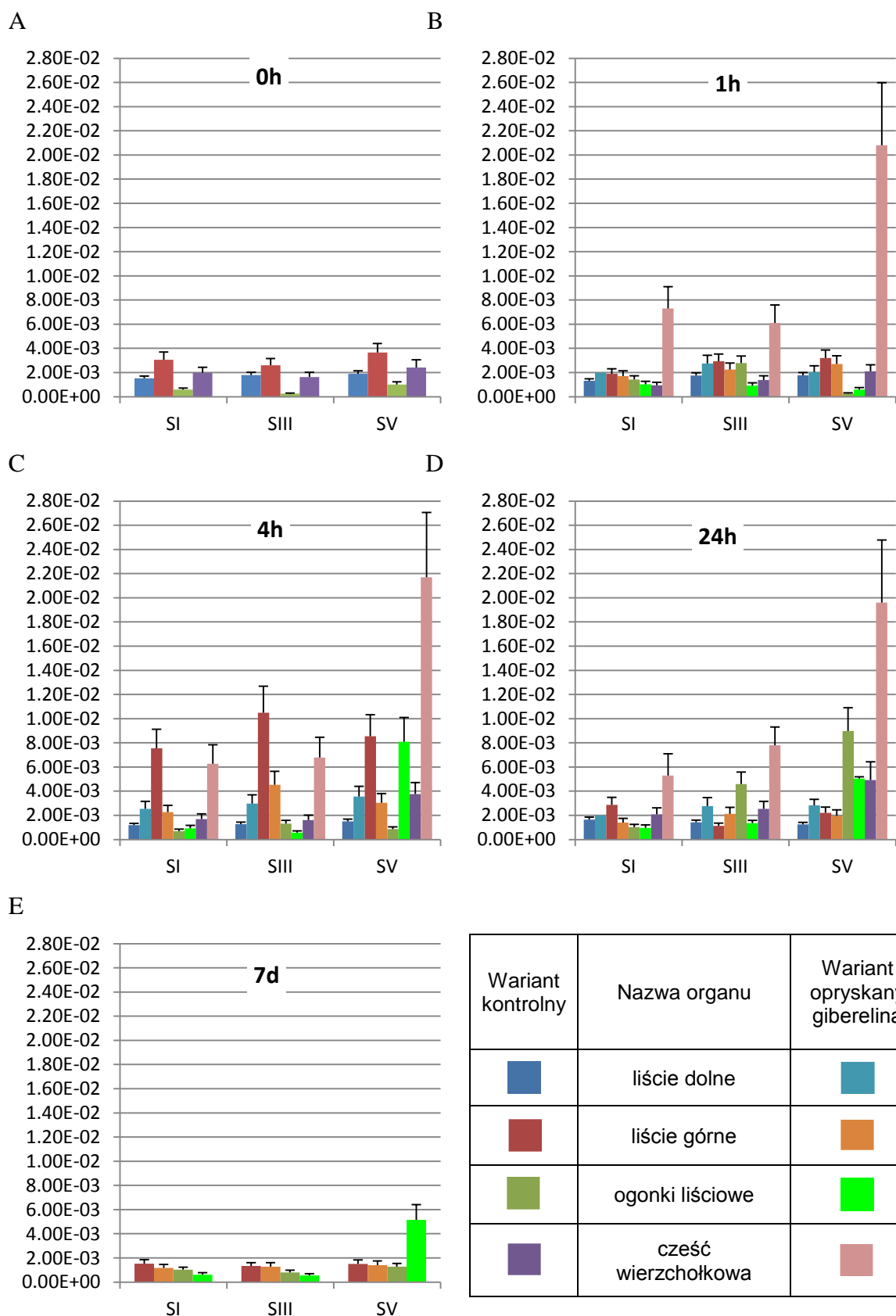
Kolorem zaznaczono gatunki roślin należące do rodziny bobowatych. Kolorem zaznaczono zidentyfikowaną sekwencję. Wykaz użytych sekwencji wraz z Accession Number: FCA *Lupinus luteus* zidentyfikowana sekwencja, FCA-like isoform X2 *Lupinus angustifolius* XP_019463263.1, FCA-like isoform X1 *Glycine max* XP_003550740.1, FCA isoform X2 *Vigna radiata* XP_014509365.1, FCA *Cicer arietinum* XP_004508132.1, FCA isoform X2 *Cajanus cajan* XP_020230201.1, FCA *Vigna angularis* XP_017438076.1, FCA gamma *Pisum sativum* AAX20016.1, FCA-like *Medicago truncatula* XP_003609803.2, FCA isoform X5 *Arachis duranensis* XP_015936884.1, FCA *Arachis ipaensis* XP_016198298.1, FCA *Glycine soja* KHN02877.1, FCA isoform X3 *Vitis vinifera* XP_002279515.2, FCA-like isoform X3 *Juglans regia* XP_018825673.1, FCA isoform X1 *Prunus mume* XP_008223385.1, FCA isoform X2 *Jatropha curcas* XP_012084108.1, FCA isoform X2 *Ricinus communis* XP_015574743.1, FCA *Cucumis sativus* XP_004148821.1, FCA-like isoform X2 *Malus domestica* XP_008390423.1, FCA isoform 1 *Citrus trifoliata* AOT83883.1, FCA-like *Populus euphratica* XP_011014276.1, FCA isoform X2 *Pyrus x bretschneideri* XP_009372107.1, FCA *Citrus sinensis* XP_006488823.1, FCA isoform X2 *Cucumis melo* XP_008458335.1, FCA isoform X2 *Ipomoea nil* XP_019180780.1, FCA-like isoform X2 *Nelumbo nucifera* XP_010259243.1, FCA isoform X2 *Sesamum indicum* XP_011100740.1.

W przewidywanej sekwencji aminokwasowej białka LIFCA-like zidentyfikowane kilka ewolucyjnie zachowywanych domen obecnych w białkach homologicznych. Stwierdzono występowanie domeny WW w pozycji 596-621 odpowiedzialnej za wiązanie białka FY, posiadającej w pozycji 607-618 kieszeń wiążącą to białko oraz dwie RRM położonej pomiędzy 100-181 oraz 191-271 odpowiedzialne za wiązanie RNA. Wykazano na podstawie porównania sekwencji aminokwasowych wysoki stopień zachowywania ewolucyjnego zwłaszcza w obrębie wytypowanych domen.

Porównanie to wykazało najwyższą homologie do sekwencji białek opisanych u łubinu wąskolistnego wynosiła ona od 76% dla izoformy białka FCA-like X7 do 82% dla izoformy białka FCA-like X2 (Ryc. 23). Dla porównania dla soi uprawnej uzyskano homologie na poziomie 68-70%, a dla pozostałych gatunków roślin strączkowych wynosiła ona, co najmniej 65%. Dla reszty analizowanych gatunków identyczność na poziomie sekwencji aminokwasowej nie przekraczała 59%.

4.1.3. Analiza ekspresji *LIFCA-like*

W wyniku przeprowadzonych doświadczeń RT-qPCR ustalono wzorzec ekspresji genu *FCA-like* w organach wegetatywnych roślin kontrolnych oraz poddanych działaniu GA lub ABA. Na kolejnych panelach przedstawiono zmiany poziomu RNA w 1, 4 i 24 godzinie oraz 7 dniach po rozpoczęciu doświadczenia. Dla każdej z przeprowadzonych reakcji i dla każdego genu stosowano kalibrator umożliwiający standaryzację uzyskanych wyników. Dla każdego z wariantów przeprowadzono 3 niezależne powtórzenia biologiczne.



Ryc. 24. Poziom transkryptu *LIFCA-like* w wybranych organach. Słupki błędów wyrażają odchylenie standardowe otrzymanych wyników.

Na ryc. 24A poziom badanego transkryptu był najwyższy w liściach górnych najmłodszych roślin, a najniższy w ogonkach liściowych liści górnych roślin z III siewu.

Badany gen w obrębie każdego z siewów najwyższą ekspresję wykazywał w liściach górnych najniższą w ogonkach liściowych roślin kontrolnych.

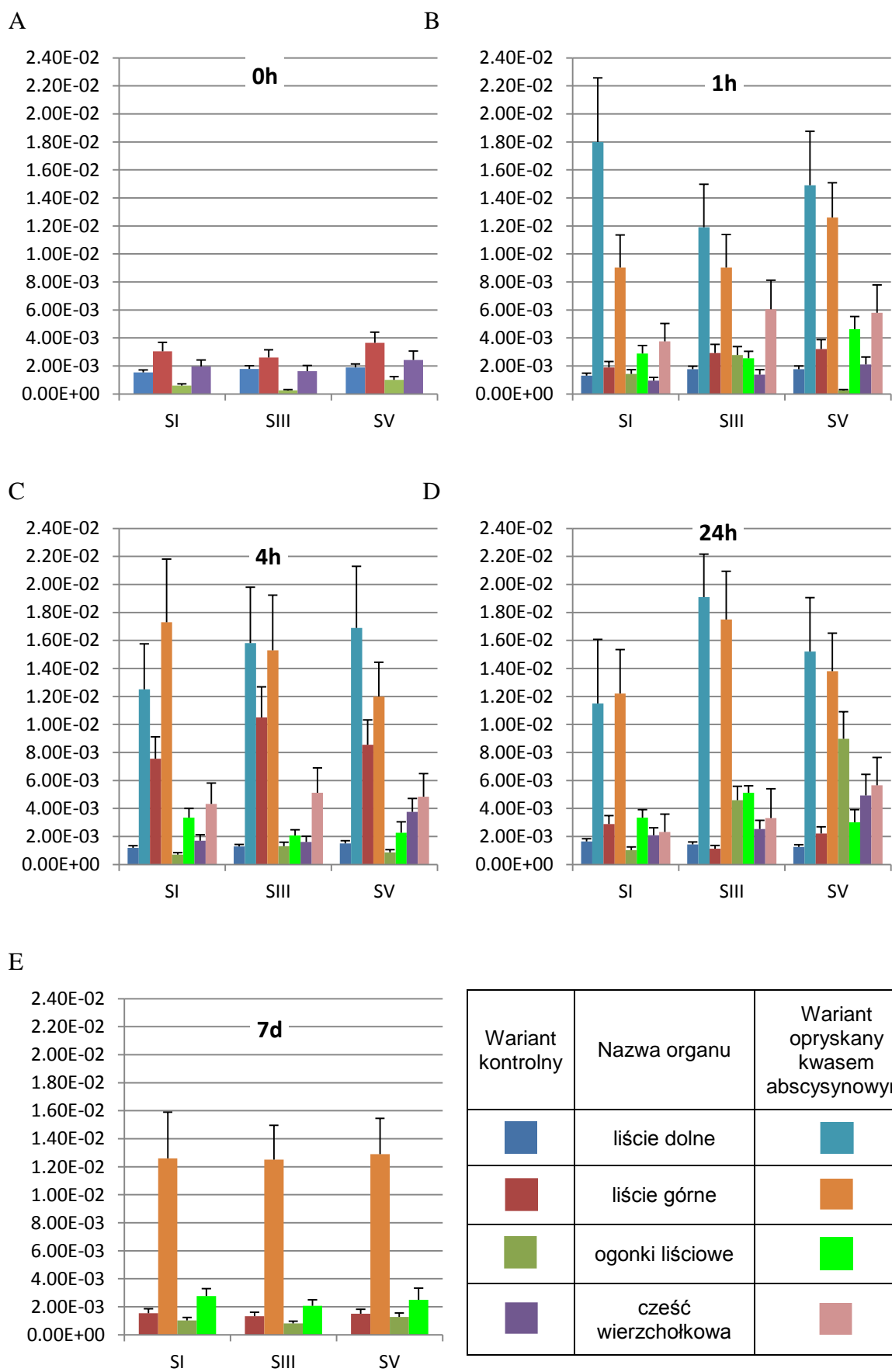
W wariancie po upływie 1 godziny od oprysku (Ryc. 24B) aktywność transkrypcyjna *LIFCA-like* była najwyższa w części wierzchołkowej najmłodszych roślin, a najniższa w ogonkach liściowych roślin kontrolnych siewu V. Badany transkrypt w obrębie każdego z siewów najwyższą ekspresję wykazywał w części wierzchołkowej po upływie 1 godziny od opryskania rośliny GA, a najniższą w tym samym organie roślin kontrolnych (za wyjątkiem siewu V). Egzogennie podana GA po upływie 1 godziny prowadzi do wzrostu aktywności transkrypcyjnej *LIFCA-like* w liściach dolnych i w części wierzchołkowej oraz spadku w pozostałych organach (za wyjątkiem siewu V).

Po upływie 4 godzin od rozpoczęcia eksperymentu (Ryc. 24C) ekspresja *LIFCA-like* była najwyższa w części wierzchołkowej najmłodszych roślin, a najniższa w ogonkach liściowych najstarszych roślin kontrolnych. Egzogennie podana GA po upływie 4 godzin prowadzi do wzrostu aktywności transkrypcyjnej *LIFCA-like* w liściach dolnych i w części wierzchołkowej oraz spadku w liściach górnych. W przypadku ogonków liściowych znaczy wzrost poziomu badanego genu odnotowano wyłącznie u najmłodszych roślin.

W wariancie po upływie 1 dnia od rozpoczęcia doświadczenia (Ryc. 24D) poziom *LIFCA-like* był najwyższy w części wierzchołkowej najmłodszych roślin, a najniższy w ogonkach liściowych roślin kontrolnych siewu I. Egzogennie podana GA po upływie 24 godzin prowadzi do wzrostu ekspresji *LIFCA-like* w liściach dolnych i w części wierzchołkowej oraz spadku w ogonkach liściowych. W liściach górnych do wzrostu dochodzi wyłącznie u roślin z siewu III, a u pozostałych do spadku ekspresji *LIFCA-like*.

W ostatnim wariancie po upływie 7 dni od aplikacji GA (Ryc. 24E) ekspresja *LIFCA-like* była najwyższa w ogonkach liściowych najmłodszych roślin, a najniższy w tym samym organie opryskanych roślin z siewu III. Egzogennie podana GA po upływie 7 dni prowadzi do spadku ekspresji w liściach górnych oraz w ogonkach liściowych (za wyjątkiem najmłodszych roślin).

Podsumowując poza małymi wyjątkami egzogennie podana GA prowadzi do wzrostu ekspresji *LIFCA-like* w liściach dolnych oraz w części wierzchołkowej przy jednoczesnym spadku w pozostałych organach za wyjątkiem liści górnych SIII po upływie 24 godzin od opryskania rośliny GA i ogonków liściowych SV upływie 4 godzin i 7 dni. Ponadto w 4 godzinie eksperymentu ekspresja *LIFCA-like* w liściach górnych roślin kontrolnych wzrosła względem pozostałych prób, a w 4 i 24 godzinie w części wierzchołkowej siewu V. W pozostałych organach nie zaobserwowano istotnych zmian poziomu transkryptu w czasie.



Ryc. 25. Poziom transkryptu *LIFCA-like* w wybranych organach. Słupki błędów wyrażają odchylenie standardowe otrzymanych wyników.

W momencie rozpoczęcia eksperymentu (Ryc. 25A) poziom *LIFCA-like* był najwyższy w liściach górnych najmłodszych kontrolnych roślin, a najniższy w ogonkach liściowych kontrolnych roślin z siewu III. W obrębie każdego z siewów najwyższą ekspresję *LIFCA-like* wykazywały liście górne a najniższą ogonki liściowe.

Po upływie 1 godziny od rozpoczęcia eksperymentu (Ryc. 25B) ekspresja *LIFCA-like* była najwyższa w liściach dolnych najstarszych roślin, a najniższa w ogonkach liściowych najmłodszych kontrolnych roślin. W obrębie każdego z siewów najwyższy poziom badanego transkryptu był w liściach dolnych roślin po upływie 1 godziny od opryskania rośliny ABA, a najniższy w ogonkach liściowych kontrolnych roślin. Egzogennie podany ABA prowadzi do wzrostu ekspresji we wszystkich badanych organach za wyjątkiem ogonków liściowych roślin siewu III.

W wariancie po upływie 4 godzin od oprysku (Ryc. 25C) poziom *LIFCA-like* był najwyższy w liściach dolnych najstarszych roślin, a najniższy w ogonkach liściowych najstarszych kontrolnych roślin. W obrębie każdego z siewów najwyższy poziom badanego transkryptu był w liściach dolnych lub górnych roślin po upływie 4 godzin od opryskania rośliny ABA, a najniższy w ogonkach liściowych kontrolnych roślin. Egzogennie podany ABA prowadzi do wzrostu ekspresji we wszystkich badanych organach.

Po upływie 24 godzin od aplikacji ABA (Ryc. 25D) ekspresja badanego genu była najwyższa w liściach dolnych roślin z siewu III, a najniższa w ogonkach liściowych najstarszych kontrolnych roślin. W obrębie każdego z siewów najwyższy poziom badanego transkryptu był w liściach dolnych lub górnych roślin po upływie 24 godzin od opryskania rośliny ABA. Egzogennie podany ABA prowadzi do wzrostu ekspresji we wszystkich badanych organach za wyjątkiem ogonków liściowych roślin siewu V.

W ostatnim wariancie po upływie 7 dni od rozpoczęcia doświadczenia (Ryc. 25E) poziom *LIFCA-like* był najwyższy w liściach dolnych najstarszych roślin, a najniższa w ogonkach liściowych kontrolnych roślin z siewu III. Egzogennie podany ABA prowadzi do wzrostu ekspresji we wszystkich badanych organach.

Podsumowując egzogennie podany ABA prowadzi do wzrostu ekspresji *LIFCA-like* we wszystkich badanych organach za wyjątkiem ogonków liściowych siewu III po upływie 1 godziny od opryskania rośliny ABA oraz ogonków liściowych siewu V po upływie 24 godzin. Ponadto w 4 godzinie eksperymentu ekspresja *LIFCA-like* w liściach górnych roślin kontrolnych wzrosła względem pozostałych prób, a w 24 godzinie w części wierzchołkowej siewu III i V. W pozostałych organach nie zaobserwowano istotnych zmian poziomu transkryptu w czasie.

4.2. Gen *FY-like*

4.2.1. Identyfikacja cDNA genu *LIFY-like*

```
AGAAATTATAATCCATACCAGATTTCTTTTTTTGTATCTTTTTTTCTGCCGCGCGCTCACTCACATTTCTTCCCCAATTCC
CACATCACAAATTCGAAAGGAGTTTAGGGTTCTCTCTCTTCCCTCTACAACCTGCAATCTCAATTATCCATTGAATCAAACAC
CTTCATCTTATTATTTCTGCATTTACTTCCACAATGATGATGATGGTGATCCTCATAACCACCATCCGCAACAGCACCAGCAGC
AGCCGCCACACAATTTTCAGCACCCACCAGCAGCCAGGTCAGAAATTCACCGTGGACCCGCGCCGCGCCGCGCAGATGA
TGCGACAACCTTCTGCCTCGTCCATTAACATAGCCCCAGAGTTTACCACCCTCCTCCTCATTACGATGTTACGCGGATA
GCCATGGTGCAAAAAGAATAAGAAAGCTTGCTCAAAGGAGGGCAGTTGATTATACGAGCACAGTTGTGCGTTATATGCAGA
TTCGTATGTGCCAGCGTGATTCAAGGGATAGGACAGTACTCCAACCTACCCCAGCAGCAGCAATTGACATGTTGCCAGCAG
TTGGCTATTACAGATAATCCATCTACAAGCTTTTCTGCTAAGTTTGTTCATACATCTGTGAATAAAAATCGCTGCCCTATTA
ATCGTGTCTTTGGACTCCAACAGGACGACGTTAATTACTGGTTCACAGACTGGGGAATTCACCTTTTGAATGGACAAT
CATTTAATTTGAAATGATTTCTCAGGCACATGACCAAGCAATTAGATCCATGGTCTGGAGTCACAATGACAACCTGGATGG
TCTCTGGTGATGATGGAGGCGCAATAAAGTATTGGCAGAACAACATGAACAATGTTAAAGCCAACAATCTGCTCATAAAG
AATCAGTCCGTGACTTAAGTTTCTGTAGGACAGATTTGAAATTCGTTCATGCTCTGATGATACTACTGTTAAAGTTTGGG
ATTTTGCACGCTGTCAAGAAGAGTCTTCATTAACCTGGCCATGGTTGGGATGTCAAGAGTGTGACTGGCATCCTACAAAAT
CCCTATTAGCATCAGGTGGGAAGGACAACCTTGTGAAACTTTGGGATGCTAAATCAGGCAAGGAACCTTGTTCATTTTCATG
GGCATAAAAATACTGTGCTATGTGTCAGAGTGAATCAAAAATGGTAACTGGGTGTTAACAGCTTCAAAGGATCAAAATAGTAA
AGCTTTATGACATAAGGGCTATGAAGGAGCTTGAATCATTCCGCGGGCATCGGAAGGATGTTACTGCTTTGGCTTGGCATC
CATTTTCATGAGGAGTACTTTGTCAGTGGGAGTCATGATGGTTCCATCTTCCATTGGCTTGTGGGACATGAAACTCCGCAAA
TTGAAGTTACTGGTGCTCATGATAAATAATGTGTGGACCTTGCATGGCATCCTATTGGGTACCTGCTCTGCAGTGGTAGTA
GTGATCATAACAACAAAGTTTGGTGCAGAAATAGGCCAGGAGACACTGCTCGTGATAGATTTAACAATGGCATGCAAGGAT
ATGCTGAGCAAAAATCCCCTGGTGGTGGTGGTGGTAACTTTGCGATGCCTGAAGTCCCAACAACCTCCGGGACCATTTC
CCCCTGGGTTGAATCGAAATGAAGGCACCATTCCAGGTGTTGGAGTTGCAATGCCCTTACTTGATGTGCCCTCAGGTTGAGC
AGATGCAGCCCCATCCTGCTTCAATGGGTGCTCCTCCTCTTCCACCAGGTCCACATCCCTCTCTTCTTAATGCCAATCAAC
AGAGACCAATACCAGCAGAATCCTCAGCAGACCCCAACAATCAACACCAGGGGCTACCACAACAATGGGTCTTTGGCTA
TGCCCCAAATATGCCACAGCTACAGAACCCTTCCAGTCATCCATGGTCCCTCATCCACATATGCCTCGCCCTCCACACC
AAATGCCACTTGGAAATGCCAGGTCCATGTACATCAGATGCCAATGCCAGGTCCAATGGGGATGCAGGGTGAATGAATC
AGATGGGTCTCCAATGCCACAAGGTCAATATGGGGGCATGAATCAAAATGCATTCAGGATCCTTGCTCCGAGTGGAGGGC
CGCTGTTGGTGTTTTCCAGGCAACTTGCCCTAATATGCAAGGACCACCAAAATACCAGTTATCCTCAAGGAGCATTCAACC
GACCTCAAGGCGGACAAATCCCTTTGATGCAAGGGTATAATCCTTACCAGTCTGGAAATCAATCTGGGATGCCTCCAAACG
CACAAACCAGGGGCACCACACTCTCAAATGCCTCAAATAGAAAAGGAATTTGTTATTTTGTACTTCTTTGATGTTAATTAT
CTGTAACCTTTCTCTTTGGTTGTGAGTAATTTGAGAATTTCAATTAAGGCTTTACAATGAGCAAGTTACACATTTGCATCA
TTTAGCAAAGTACAATAACGTTCTCATGTACACTCTCCAAACTTTGCCATTGTTTTCATGTACTCATTTGAAAGACT
TTTTTTGTTGTATATGTTTGTATTTACCCTAACCCCTAGCAAAGTCAAATAAATTTCTTGTATGTGTCAATTTCTCACAGT
CCCCTCTAATACGTTTCGCATCGTGGCCTTGTAAATAAAATTTGCCAAAAGAATACTTTGAACCCCTTAAAAACAGGAAT
GAACGCAGGAACATGGTACGAGGAATTGACATTAGATATGAAATGCTACCAATTTTGAAGCATCAGAGTGGTAAATTTATG
TTGCTTATGTTTGTATCTAATTTCTTTAATGTTTGGCGAAGCTTGAGGCATAAGGAGGTGATGAAAGTGTGAT
```

Ryc. 26. Sekwencja nukleotydowa genu *LIFY-like* o długości 2829 nt. Kolorem **żółtym** zaznaczono 2109nt sekwencję kodującą przewidywane białko LIFY-like.

Kolejną z wyselekcjonowanych była sekwencja *LIFY-like*, która została poddana analizie podobnej do poprzednio opisanej ryc. 26. Równolegle prowadzona dla wszystkich genów identyfikacja techniką 5', 3'RACE PCR pozwoliła namnożyć fragment o długości 2829 nt w obrębie, którego zidentyfikowano sekwencje cDNA homologiczną do wspomnianego genu.

4.2.2. Analiza przewidywanej sekwencji aminokwasowej LIFY-like

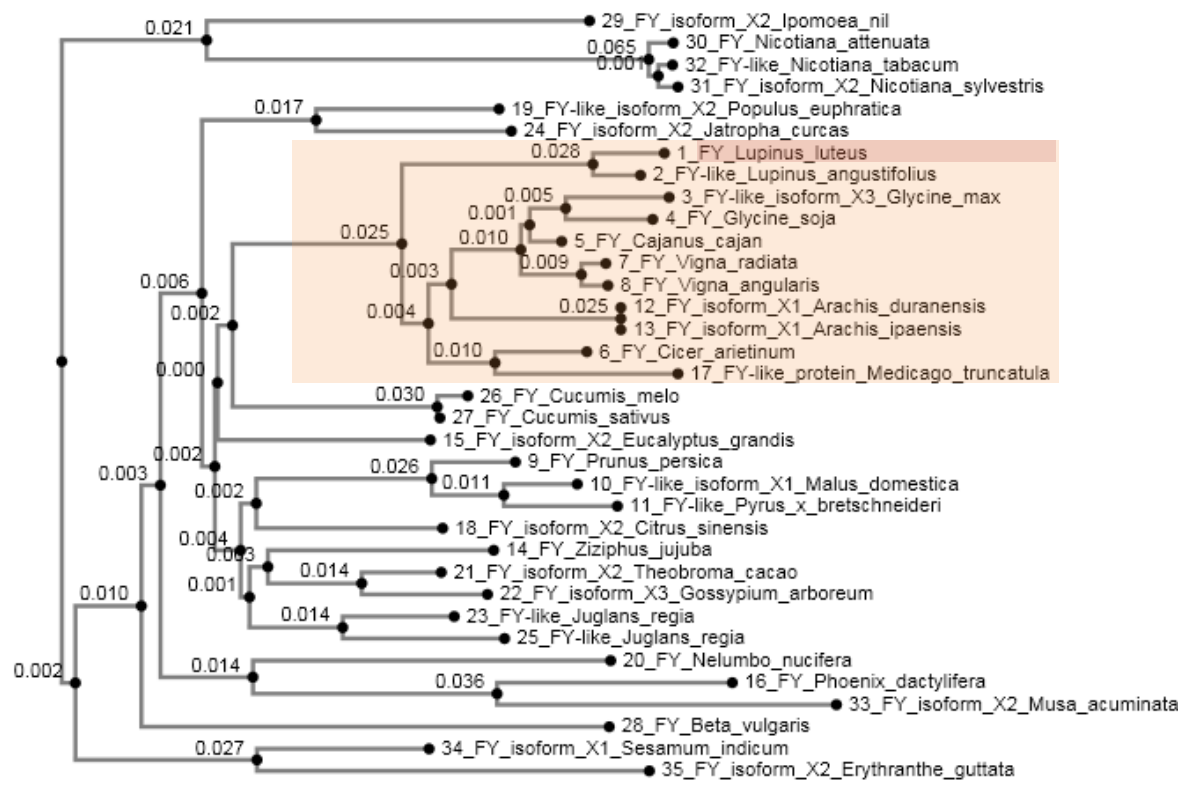
Identyfikacja sekwencji kodującej pozwoliła na dokładniejszą analizę obejmującą wytypowanie przypuszczalną sekwencję peptydową wyznaczaną przez informacje zapisane badanego locus występującym u *L. luteus* (Ryc. 27).

Porównanie to wykazało najwyższą homologię do sekwencji białek opisanych u łubinu wąskolistnego wynosiła ona od 76% dla izoformy białka FCA-like X7 do 82% dla

izoformy białka FCA-like X2. Dla porównania dla soi uprawnej uzyskano homologie na poziomie 68-70%, a dla pozostałych gatunków roślin strączkowych wynosiła ona, co najmniej 65%. Dla pozostałych gatunków identyczność na poziomie sekwencji aminokwasowej nie przekraczała 59%.

MMYGDPHNHHPQHQHQQPPHNFQHQHQPGPEFHRGPPPPPPQMMRQPSASSINIAPEFHHPHYDVGDSHGAKRIRKLA
 QRRAVDYTSTVVRVMQIRMCQRDSRDRTVLQPTAAAIIDMLPAVGYSNDPSTSFSAKVFVHTSVNKNRCPINRVLWTPTGRR
 LITGSQTGEFTLWNQGSFNFEMILQAHDQAIRSMVWVSHNDNWMVSGDDGGAIKYWQNNMNNVKANKSAHKESVRDLSFCRT
 DLKFCSCSDDTTVKVVWDFARCOEESLSTGHGWVKSVDWHPTKSLASGGKDNLVKLWDAKSGKELCSFHGHKNTVLCVKW
 NQNGNWVLTASKDQIVKLYDIRAMKELESFRGHRKDVLTALAWHPFHEEYFVSGSHDGSIFHWLVGHETPQIEVTGAHDNNV
 WDLAWHPIGYLLCSGSSDHTTKFWCRRNRPDGTARDRFNNGMQGYAEQNPVAGRVAGNFAMFEVPTTPGFPFPGLNRNEGTI
 PGVGVAMPPLLDVPOGEQMOPHPASMGALVLLVGPSPSLLNANQQRFYQONPQOTPQHQQHGLPQQMGFLPMPFNMPQLQNP
 SQSSMVPHPMPRPPHQPMLGMPGPMHQMPMPGPMGMQGGMNQMGPPMPQGGYGGMNQMHSGSLPPSGGPPVGVFPGNLP
 NMQGPPNTSYPOGAFNRPOGGQIPLMQGYNPNYQSGNQSGMPPNAQPGAPHSQMBQ

Ryc. 27. Przewidywana sekwencja aminokwasowa białka LIFY-like o długości 703 aminokwasów. Kolorem **żółtym**, w pozycjach 138-176 aa, 180-218 aa, 222-260 aa, 264-302 aa, 306-344 aa, 348-387 aa i 392-430 aa, zaznaczono 7 domen WD40. **Fioletowa podkreślona czcionką**, w pozycji 514-518 aa, zaznaczono motyw PPLPP. Kolorem **zielonym**, w pozycjach 18-63 aa i 466-702 aa, zaznaczono rejony bogate w prolinę. **Pochyłą podkreślona czcionką**, w pozycji 552-627 aa, zaznaczono rejon bogaty w metioninę. **Czerwoną czcionką**, w pozycji 529-569 aa, zaznaczono rejon bogaty w glutaminę.



Ryc. 28. Drzewo filogenetyczne podobieństwa białka LIFY-like opracowane w oparciu o sekwencje aminokwasowe białek kodowanych przez geny homologiczne zidentyfikowane u innych gatunków roślin. Kolorem **żółtym** zaznaczono gatunki roślin należące do rodziny bobowatych. Kolorem **niebieskim** zaznaczono scharakteryzowaną sekwencję badanego gatunku. Wykaz użytych sekwencji wraz z Accession Number: FY *Lupinus luteus*

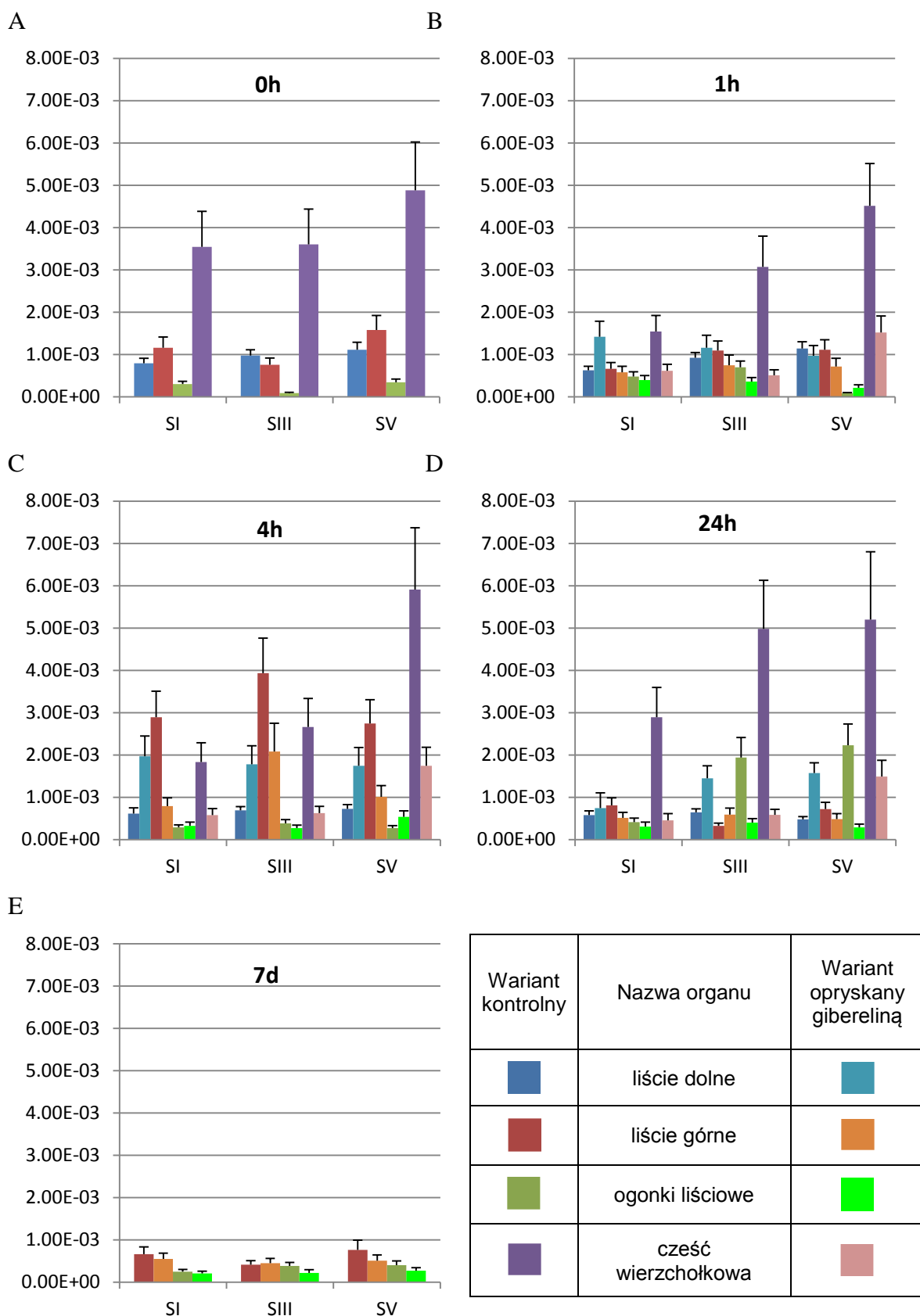
zidentyfikowana sekwencja, FY-like *Lupinus angustifolius* XP_019453491.1, FY-like isoform X3 *Glycine max* XP_014621179.1, FY *Glycine soja* KHN27331.1, FY *Cajanus cajan* XP_020204413.1, FY *Cicer arietinum* XP_004511026.1, FY *Vigna radiata* KRH13396.1, FY *Vigna angularis* XP_017433523.1, FY *Prunus persica* XP_007220674.2, FY-like isoform X1 *Malus domestica* XP_008344583.2, FY-like *Pyrus x bretschneideri* XP_009361967.1, FY isoform X1 *Arachis duranensis* XP_015946784.1, FY isoform X1 *Arachis ipaensis* XP_016180561.2, FY *Ziziphus jujuba* XP_015876294.1, FY isoform X2 *Eucalyptus grandis* XP_010067739.1, FY *Phoenix dactylifera* XP_008800196.1, FY-like protein *Medicago truncatula* XP_003627809.2, FY isoform X2 *Citrus sinensis* XP_006470852.1, FY-like isoform X2 *Populus euphratica* XP_011000559.1, FY *Nelumbo nucifera* XP_010276573.1, FY isoform X2 *Theobroma cacao* XP_017984997.1, FY isoform X3 *Gossypium arboreum* XP_017649161.1, FY-like *Juglans regia* XP_018849443.1, FY isoform X2 *Jatropha curcas* XP_012068650.1, FY-like *Juglans regia* XP_018849443.1, FY *Cucumis melo* XP_008465965.1, FY *Cucumis sativus* XP_004140291.2, FY *Beta vulgaris* XP_010670469.1, FY isoform X2 *Ipomoea nil* XP_019185533.1, FY *Nicotiana attenuata* XP_019226657.1, FY isoform X2 *Nicotiana glauca* XP_009783624.1, FY-like *Nicotiana tabacum* XP_016493887.1, FY isoform X2 *Musa acuminata* XP_009397614.1, FY isoform X1 *Sesamum indicum* XP_011088557.1, FY isoform X2 *Erythranthe guttata* XP_012836419.1.

W przewidywanej sekwencji aminokwasowej białka LIFY-like zidentyfikowano kilka ewolucyjnie zachowywanych domen obecnych w białkach homologicznych. Stwierdzono występowanie 7 domen WD40 w pozycjach 138-176, 180-218, 222-260, 264-302, 306-344, 348-387 i 392-430 aa oraz motywu PPLPP w pozycji 514-518 znajdującym się w regionie bogatym w prolinę zawierającej się pomiędzy 466 a 702 aminokwasem. Z prowadzonych na *A. thaliana* badań wynika, że motyw PPLPP oddziałuje z domeną WW białka FCA i jest kluczowy dla funkcji kompleksu. Ponadto w przewidywanej sekwencji peptydowej odnaleziono regiony bogate w glutaminę i metioninę. Podobnie do analiz poprzedniego białka, na podstawie porównania sekwencji aminokwasowych, także w przypadku LIFY-like wykazano wysoki stopień zachowywania ewolucyjnego. Największą identycznością sekwencji charakteryzują się zwłaszcza rejony wytypowanych jako domeny funkcjonalne omawianego peptydu.

Porównanie to wykazało najwyższą homologię, wynoszącą 93%, do sekwencji białka FY-like opisanego u łubinu wąskolistnego (Ryc. 28). Zestawiona identyczność przewidywanej sekwencji aminokwasowej danego genu dla soi uprawnej wynosi 88-89%, a dla pozostałych gatunków roślin strączkowych wynosiła nie mniej niż 83%. Dla roślin nienależących do tej rodziny nie przekraczała ona 83%, ale w każdym z analizowanych przypadków była większa niż 65%.

4.2.3. Ustalenie wzorca ekspresji *LIFY-like*

Podobnie jak miało to miejsce w przypadku badań aktywności transkrypcyjnej wcześniej omawianego genu także i w celu ustalenia względnej ekspresji *LIFY-like* wykorzystano technikę RT-qPCR z detekcją specyficzną. Poziom mRNA badanego genu odnoszono do ilości transkryptu genu aktywny.



Ryc. 29. Poziom transkryptu *LIFY-like* w wybranych organach. Słupki błędów wyrażają odchylenie standardowe otrzymanych wyników.

Na ryc. 29A poziom badanego transkryptu był najwyższy w części wierzchołkowej najmłodszych roślin, a najniższy w ogonkach liściowych liści górnych roślin z III siewu.

Badany gen w obrębie każdego z siewów najwyższą ekspresję wykazywała część wierzchołkowa, a najniższą w ogonkach liściowych roślin kontrolnych. W siewie I i V ekspresja w liściach górnych była wyższa niż w liściach dolnych, a w siewie III zależność była odwrotna. W części wierzchołkowej wraz w wiekiem roślin spadał poziom *LIFY-like*.

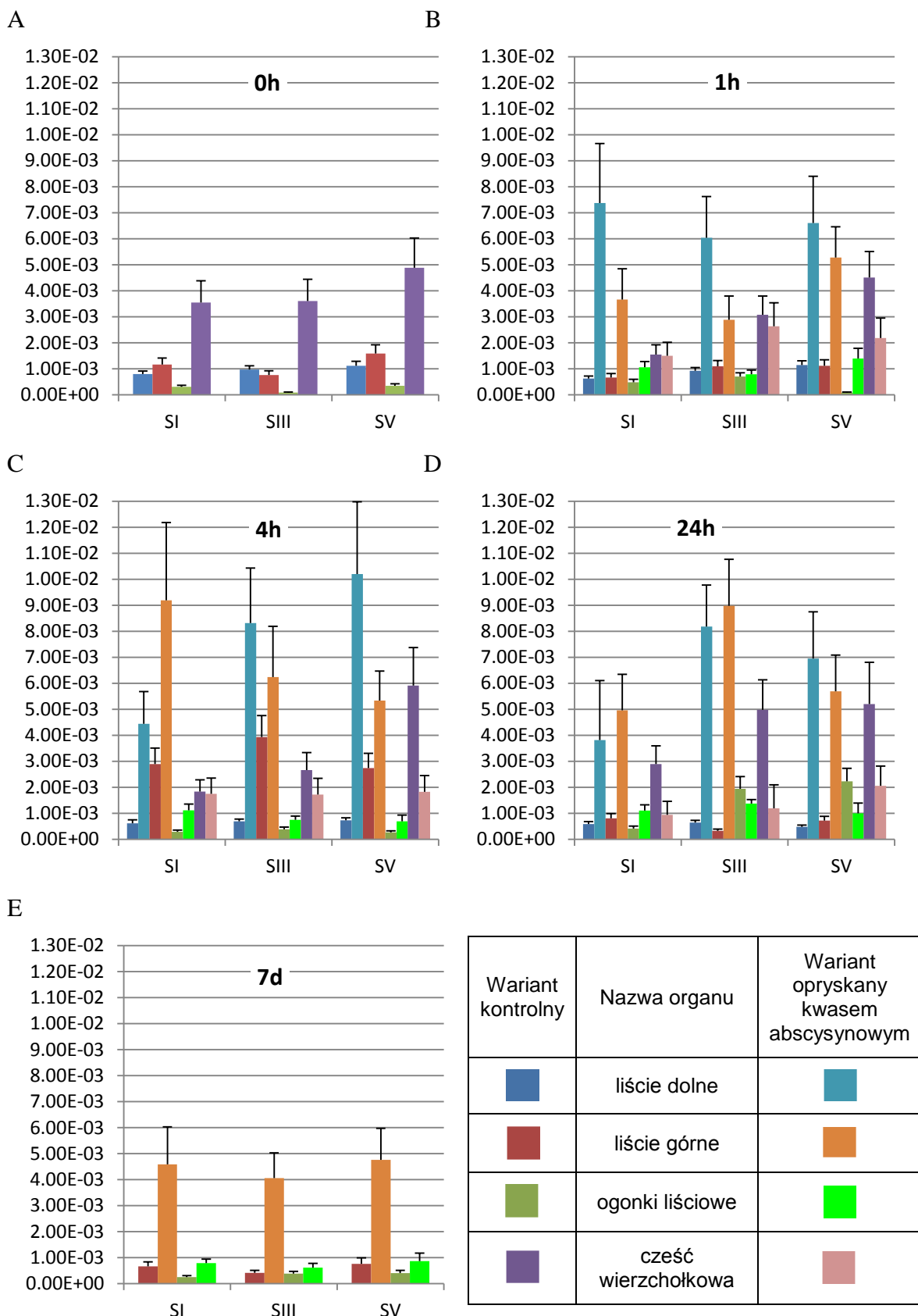
Po upływie 1 godziny od rozpoczęcia eksperymentu (Ryc. 29B) aktywność transkrypcyjna *LIFY-like* była najwyższa w części wierzchołkowej najmłodszych roślin nieopryskanych GA, a najniższa w ogonkach liściowych tych samych roślin. Egzogennie podana GA po 1 godzinie prowadzi do znacznego spadku ekspresji badanego genu w części wierzchołkowej. Ponadto znacznie mniejszy spadek zaobserwowano w liściach górnych wszystkich siewów oraz w ogonkach liściowych za wyjątkiem najmłodszych roślin. W liściach dolnych starszych roślin zależność jest dokładnie odwrotna za wyjątkiem najmłodszych roślin. W obrębie każdego z siewów najwyższą ekspresję wykazywała część wierzchołkowa, a najniższą ogonki liściowe roślin kontrolnych.

W wariacie po upływie 4 godzin od aplikacji GA (Ryc. 29C) ekspresja *LIFY-like* była najwyższa w części wierzchołkowej najmłodszych roślin nieopryskanych GA, a najniższa w ogonkach liściowych tych samych roślin podobnie jak na ryc. 29B. Egzogennie podana GA po 4 godzinach prowadzi do znacznego spadku ekspresji *LIFY-like* w części wierzchołkowej oraz w liściach górnych wszystkich siewów. W liściach dolnych starszych roślin zależność jest dokładnie odwrotna.

Po upływie 24 godzin od rozpoczęcia doświadczenia (Ryc. 29D) aktywność transkrypcyjna *LIFY-like* była najwyższa w części wierzchołkowej roślin z siewu III i V nieopryskanych GA, a najniższa w ogonkach liściowych najstarszych roślin. Egzogennie podana GA po 24 godzinach prowadzi do znacznego spadku ekspresji badanego genu w części wierzchołkowej oraz w ogonkach liściowych. W liściach dolnych zależność jest dokładnie odwrotna. W obrębie każdego z siewów najwyższą ekspresję *LIFY-like* wykazywała część wierzchołkowa, a najniższą ogonki liściowe roślin kontrolnych.

Po upływie 7 dni od aplikacji GA (Ryc. 29E) poziom transkrypcyjny *LIFY-like* był najwyższy w liściach górnych najmłodszych roślin, a najniższy w ogonkach liściowych najstarszych roślin. Egzogennie podana GA po 24 godzinach prowadzi do spadku ekspresji badanego genu w liściach górnych (za wyjątkiem siewu III oraz w ogonkach liściowych).

Podsumowując poza małymi wyjątkami egzogennie podana GA prowadzi do wzrostu ekspresji *LIFY-like* w liściach dolnych przy jednoczesnym spadku w pozostałych organach. Poziom *LIFY-like* nie zmieniał się wraz z upływem czasu z wyjątkiem części wierzchołkowej w 4 godzinie eksperymentu.



Ryc. 30. Poziom transkryptu *LIFY-like* w wybranych organach. Słupki błędów wyrażają odchylenie standardowe otrzymanych wyników.

Na ryc. 30A poziom badanego transkryptu był najwyższy w części wierzchołkowej najmłodszych kontrolnych roślin, a najniższy w ogonkach liściowych kontrolnych roślin

z siewu III. W obrębie każdego z siewów najwyższą ekspresję *LIFY-like* wykazywała część wierzchołkowa a najniższą ogonki liściowe.

W wariancie po upływie 1 godziny od rozpoczęcia eksperymentu (Ryc. 30B) ekspresja *LIFY-like* była najwyższa w liściach dolnych najstarszych roślin, a najniższa w ogonkach liściowych najmłodszych kontrolnych roślin. W obrębie każdego z siewów najwyższy poziom badanego transkryptu był w liściach dolnych roślin po upływie 1 godziny od opryskania rośliny ABA, a najniższy w ogonkach liściowych kontrolnych roślin. Egzogennie podany ABA prowadzi do wzrostu ekspresji badanego genu w liściach dolnych i górnych oraz ogonkach liściowych, a spadku w części wierzchołkowej.

W wariancie po upływie 4 godzin od oprysku ABA (Ryc. 30C) poziom *LIFY-like* był najwyższy w liściach dolnych roślin z siewu III, a najniższy w ogonkach liściowych najmłodszych kontrolnych roślin. W obrębie każdego z siewów najwyższy poziom badanego transkryptu był w liściach dolnych roślin po upływie 4 godziny od opryskania rośliny ABA (za wyjątkiem siewu I gdzie najwyższą ekspresję zmierzono w liściach górnych), a najniższy w ogonkach liściowych kontrolnych roślin. Egzogennie podany ABA prowadzi do wzrostu ekspresji w liściach dolnych i górnych oraz ogonkach liściowych a spadku w części wierzchołkowej.

Po upływie 24 godzin od aplikacji ABA (Ryc. 30D) ekspresja badanego genu była najwyższa w liściach górnych roślin z siewu III, a najniższa w liściach górnych roślin kontrolnych z siewu III. Egzogennie podany ABA prowadzi do wzrostu poziomu *LIFY-like* w liściach dolnych i górnych, a spadku w części wierzchołkowej oraz ogonkach liściowych (za wyjątkiem najstarszych roślin).

W ostatnim wariancie po upływie 7 dni od rozpoczęcia doświadczenia (Ryc. 30E) poziom badanego transkryptu był najwyższy w liściach górnych najmłodszych roślin, a najniższy w ogonkach liściowych najstarszych kontrolnych roślin. W obrębie każdego z siewów najwyższą ekspresję *LIFY-like* była w liściach górnych roślin po upływie 7 dni od opryskania rośliny ABA, a najniższa w ogonkach liściowych kontrolnych roślin. Egzogennie podany ABA prowadzi do wzrostu ekspresji w liściach górnych oraz w ogonkach liściowych.

Podsumowując egzogennie podany ABA prowadzi do wzrostu ekspresji *LIFY-like* w liściach dolnych i górnych oraz ogonkach liściowych (za wyjątkiem siewu III i V po upływie 24 godzin od opryskania rośliny ABA) a spadku w części wierzchołkowej. Poziom *LIFY-like* nie zmieniał się wraz z upływem czasu z wyjątkiem części wierzchołkowej w 4 godzinie eksperymentu.

4.3. Gen *FLD-like*

4.3.1. Identyfikacja genu *LIFLD-like*

```
CTTATTTGGAAAAGATCTGCCAATTCCGAAAAGAGATTAATTGATAAAAATAAAATAGGCTACCCGAGCTTCATGTGTAGCA
GTGAAATTGAAGTTTGGTGATTAAGGCCATGGCTATGCAATGGTGGTAGACTGGTAGCATATGGAAGAAGATTTACGTAGA
TTCTGATTCCTCTTTCAAACCTCATAACCGTTTTTCATTAACCTCAATTTTTATTTTTTCAAAAAAATCAAATCACTCTGT
AACTGTTATGGATCCCTCCACCTCAATTTCCACCATTTCCTTAGATTCTCAAGAAAACCCCTAACCCCTAACCCCTAACTCTAT
ATTGGATCCCAATCCCGATTCAATTTCAAATTGGGACCAGAAATCCAAATCCAAACCCGATTCCGAATCCCAACTGGATCA
CTATCTCCCTTTCTCAGTTCCCAAGAAGAGGAGACGCGGTAGGTTCCCAACGCATTCCGGCGTCGTTTTCGTGCCCTCTTAA
TTCAATGCATCTTCTTTCCAGTAACAACGATCCTCCTTCTGTTGTTTCGGCCCGAAACACCTCTTCGTTGGTGCAACC
TTCTAAGGTACCCGATGTTAGTGATGAGATCAATGTGATCAACAAAGAAGCGAAAACCGAGGCCTTGATCGCCCTTACGGC
TGGTTTTCCCTGCTGATTCCGTGACCCGAGGAAGAAATCGAAGGCGGGGTATCCCTGTTATTGGAGGGATAGAGCAGGTGAA
TTACACTCTCATTAGGAATCACATTATTGCTAGGTGGCGTGAGAATGTGTCTAATTGGGTTACTAAGGAAATGTTCAATGG
TTATATACCCGAGCATTATCATACCCTTTTGATTCTGCTTATAATTATCTTGTCTCATGGGTATATTAATTTTGGGGT
TGCTCCCTTATTAAGGAAAGGATTGCGGCTGAGCCGAGCAAGCCGGGTGTGATTGTAATTGGCGCTGGCCTTGTGGGT
GGCTGCTGCGCGGCAGCTGATGCGGTTTTGGGTTAAAGTGACTGTTTTGGAGGGGAGGAAGCGTGTGGCGGACGGGTTTA
TACGAAGAAAATGGAGGGAGGAATAGGTTGTGCGCTGCTGCTGATTAGGTGGTAGTGTGTTTGCAGGTACGCTAGGGAA
TCCTCTTGGGATTGTGGCTCGGCAGTTAGGTGAGATGCTTTATAAGGTGAGAGACAGGTGTCCGCTTTATAGTCTCGATGG
AAAGCCAGTTGACCCTGATATGGATATGAAGTGGAATCAGCTTTAACCCTTTGTTAGACAAGCGCAGCAGGCTTAGGCA
GTTGATGGGGGAGGTATCTGTTGATGTGTGCTTGGTGCGGCAC TAGAAACATTCAGGCAGCTATATACCCATGCAGTGAA
TGATGAAGAGATAAACTTGTTC AATTGGCATCTTGCAAATTTGGAGTATGCAAATGCTGGTTTTACTATCAAATCTTCACT
TGCATTTTGGGACCAAGATGATCCATATGATATGGGAGGGGATCATTGCTTTTTGCGGGAGGAAACGGAAAAC TGGTTCA
AGCTTTGTCTGAGAATGTGCCTATCCTATACGAGAAAACGTACATACTATAAGGTATGGTAGTGACGGAGTGACGGTGAT
TGCAGGAAGTCAGGTCTTTGAGGGTGACATGGCAGTGTGCACGTGTTCCGCTAGGTGATTAAGAAGGGGTCTATCAAATT
TATACCAGAGTTGCCTCAAAGAAAACCTTGACGGAATAAAAAGATTGGGTTTTGGTCTACTGAATAAGGTGTCTATGCTTTT
CCCCATGTGTTTTGGGAGATGGATCTTGACACATTTGGACATCTTTCTGATGATCCAAGTAGTCTGGGGAGTTTTTTCT
GTTTTACAATTATGCAACAGTTGCTGGTGGTCCCTTGTGATTGCTTTAGTTG CAGGGGAAGCTGCGCATAAGTTTGAGAG
CATGCCCCCTACGGATGCAGTCACACAGGTTATTCAAATCTCAAGGGCATTATGAACCAAAAAGGAATCAATGTTCTCTGA
ACCTATTCAGACTGTCTGTACTAGATGGGCTAGTGATCCCTTCTGCTTTGGTCTTACTCTAATGTGCTGTGGAGCTTC
AGGCGATGATTATGATATTTTAGCAGAAAGTGTGGGAGATGGTAGACTTTTTCTTTGCCGGAGAGGCAACCCTAGGCGCTA
TCCTGCTACTATGCACGGGGCTTTTCTGAGTGGTCTCAGGGAAGCTGCTAATATGGCCCACTATGCTAATATTAGATCCCT
GAGAATGAAGGTTGATAGGACCCCTTCAAATGCTTATTCGTCGCTTCTCTCTCTGCTGATTTATTTAGAGAACCCTGATAT
AGAATTTGGGAGCTTTTCTGTCATCTTTGATCCTAAGAATCGAGATCCTAAGTCACCAGCAATCTTGAGGGTAACATTTGG
TGAGCCTAAAAAGAAGAGTCATGACATTTGCAAAGCATGACCAACACTCAAACAATTACTTTTTTCAGCAACTTCAATCACA
TTTTAACCAACAACAGCAGCTTCATGTTTACACCCTACTATCAAGGCAACAGGTTCTTGACCTACGAGAGGTAAGAGGTGG
CGATGAGATGAGATTGAATCACCTTTGTGAAAAGCTAGGAGTCAAGCTGGTTGGAAGAAAAGGTTAGGGCCAAGTGTGTA
TTCTGTGCTTGTCTCCATTAAGCGGAGAGGGCAATCGCAAACCTGTTCCAACCTCTGTGTCTCTTAAACCAGGGATGTC
AAAGCTGAAGGCTGGCATTATGAAGCGGAAGCTAATCAGAAAGGCGAAAGTGGTGAAGAAAAGCAATGGGCCTGTCTCCA
TGCTGACATGAATGGGGGAGTGTGCGCAAAGTACCAGAAGAGACTCGGATAACAGATCAAGTGTCTCTGATGTGCCAGT
CTCAGGAAAAAATCAAATGACTTGTCAAATCCAATGAGTGAATGGCCTTTCTCTCTACTAAAAGAAAGGCTTCGGAGTTTG
ATGTCATTTCAACTTGTCTCTCTGAGTGTCTGTTGGATCATCCTCAGTAGGATATGAACAATATTTGTTGATTTTTTTT
GAAGAAATGCATTTAGTTTTTAGTAAACTATCTGTAAATAAAGATATATCAGCATAACAATTAGATCCAAGATCCTGATCA
TAATGCTACATTTGGCTGTGCAATAAACACCGTTACAAAGATACTTTCTCCCTGACTTCATATTCTCATTAAAGGCATCAG
CTGTTACCCGAATTTTCGTAATCAGCCTTGAGGTATATGTTTTCTTTGGTTATAATATGAATTTATGTACCTTTTTTCTGGA
TCATACTAGGGTCTAGGTGCATTATATTAATGAAATGAAGATGTTCTCTTGCTTGCAAATCCCTTAGTTGCTGATGGTGG
TATGATGCTTCACATTTGGCTTTGTACTATATCTATTCTAAATCCAAGTAACAGAAAGTTGATGTTGCCTTGTCTGCACTCT
ACACTCACCTGCCTTGGATGCCAAAAAATAGTTGCCACAGAAGAGATGAACCCTGAATAGGGTGCCTGAAAGAATTGTGA
TAGGTCTCAGTTTCATCATGCACATTTGTCTTGACAGATTGAGATGGGCCATTGTCTTTTAGGTGGAGTGCCACATTAAG
TCAGAAAACAGGAAAAAGAAAATAGCTTTGGTTAAGACTGTGGACTTGGAAATGTGCTTCTTGCACTCAAGTTTTATAGGA
CATGAAACGACACAGTAACCTTGATATATATGATAAGAAATGGTTATCCTTAAACTTGTTCGTGTAAGTTAAAGTGACAAA
ACGGTTTTTGGCACA AAAAATGGGATTGGGTACTGAGTTTATGCATAATCTTCTGTTGTTTAGGCCTTCTATAATGTCTTT
TGCAAATAGATTAATATTCACATTTCTCTTTACTGGGCTTAATTTTTATTGATGGTAGTGCCTTTGTGAAATACCATGAC
GTCAAATTCATGTAACCGTGGCCAAGTTTTCACTCTAATTTAGTGAAGTTTTATAAAAATGGGGCTTTTGTCTTTATAA
TTTTCA
```

Ryc. 31. Sekwencja nukleotydoma genu *LIFLD-like* o długości 4055 nt. Kolorem **żółtym** zaznaczono 2700nt sekwencję kodującą przewidywane białko LIFLD-like.

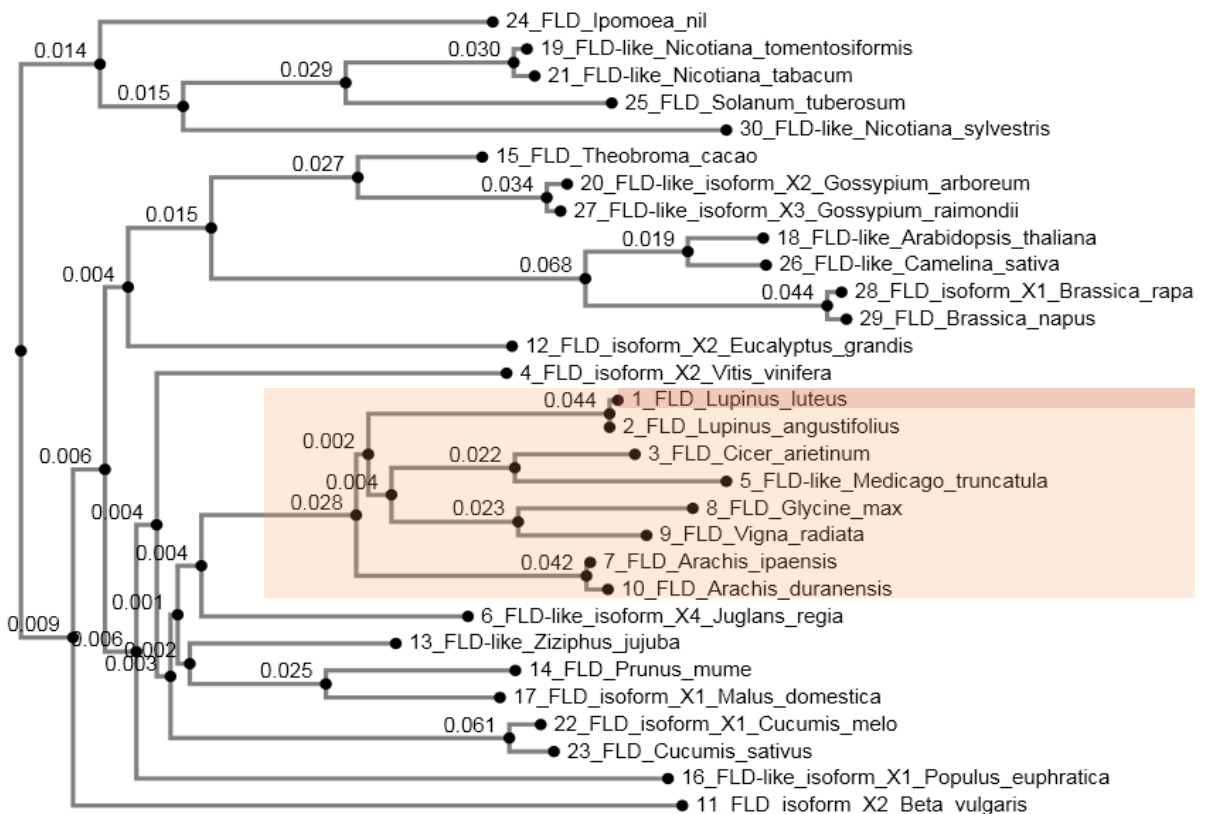
Kolejnym ze zidentyfikowanych genów szlaku autonomicznego była sekwencja cDNA genu *LIFLD-like*. Poza odcinkiem kodującym zidentyfikowano także przyległe do niego fragmenty UTR. Całość wyselekcjonowanej sekwencji zaprezentowano na rycinie 31.

4.3.2. Analiza przewidywanego białka LIFLD-like



Na podstawie zidentyfikowane sekwencji kodującej wytypowano przewidywaną sekwencję aminokwasową białka kodowanego przez LIFCA-like. Analiza bioinformatyczna pozwoliła na dokładniejsze scharakteryzowanie potencjalnego peptydu (Ryc. 32).

MDPPQFPFFPLDSQENPNPNPILDPNPDSSISNWDQNPNNPIPNPNLDHYLPFSVPKRRRRGRSQRIPASFRAPLNFN
 ASSFTSNNDPPSVVSARNTSSLVQPSKVPDVSDEIIVI NKEAKTEALIALTAGFPADSLTEEEIEGGVIVPIGGIEQVNYT
 LIRNHIIARWRENVSNWVTKEMFIGYIPQHYHTLLDSAYNYLVSHGYINFGVAPLIKERIAAEPSKPGVIVIGAGLAGLAA
 ARQLMRFGFKVTVLEGRKRAGGRVYTKKMEGGNRLCAAADLGGSVLTGTGLGNPLGIVARQLGEMLYKVRDRCPYSLDGKP
 VDPDMDMKVESAFNRLLDKASRLRQLMGEVSVVSLGAALETFRQLYTHAVNDEEINLFWHLNLANLEYANAGLLSNLSLAF
 WDQDDPYDMGGDHCFLPGGNGKLVQALSENVPILYEKTVHTIRYGSQVVIAGSQVFEQDQMAVCTVPLGVLKKGSIKFI
 ELPQRKLDGIKRLGFLLNKVAMLFPHVFWEMDLDTFGHLSDDPSSRGEFFLFYNYATVAGGPLLIALVAGEAAHKFESMP
 PTDAVTQVIQILKGIYEPKGINVPEPIQTVCTRWASDPFCFGSYSNVAVGASGDDYDILAESVGDGRLFFAGEATRRYPA
 TMHGAFSLGSLREANMAHYANIRSLRMKVDRTPSNAYSSASLLADLFREPDIEFGSFSVILDPKNADPKSPAILRVTFGEP
 KKKSHDIAKHDQHSNKLQFQQLQSHFNQQQLHVYITLLSRQQVLDLREVRGGDEMRLNHLCEKLGKLVGRKGLGPSADSV
 VASIKAEGRNRKPVPTSVSLKPGMSKLGKAGIMKRKLRKAKVVKKSNPVLHADMNGGSVAKVPEETRIDQVLPDVPVSG
 KNQNDLSNP

Ryc. 32. Przewidywana sekwencja aminokwasowa białka LIFLD-like o długości 900 aminokwasów. Kolorem **żółtym**, w pozycji 3-59 aa, zaznaczono region bogaty w prolinę. Kolorem **zielonym**, w pozycji 120-221 aa, zaznaczono domenę SWIRM. Kolorem **niebieskim** i **niebieskim**, w pozycji 230-645 aa, zaznaczono domenę o aktywności oksydoreduktazy zależnej od FAD. **Czerwoną czcionką**, w pozycji 230-265 aa, zaznaczono domenę wiążącą FAD / NAD. **Pochylną czcionką** w pozycji 194-208 aa, zaznaczono domenę zawierającą centrum aktywne kapsazy histydynowej.



Ryc. 33. Drzewo filogenetyczne LIFLD-like opracowane w oparciu o porównanie sekwencji aminokwasowe białek kodowanych przez geny homologiczne zidentyfikowane

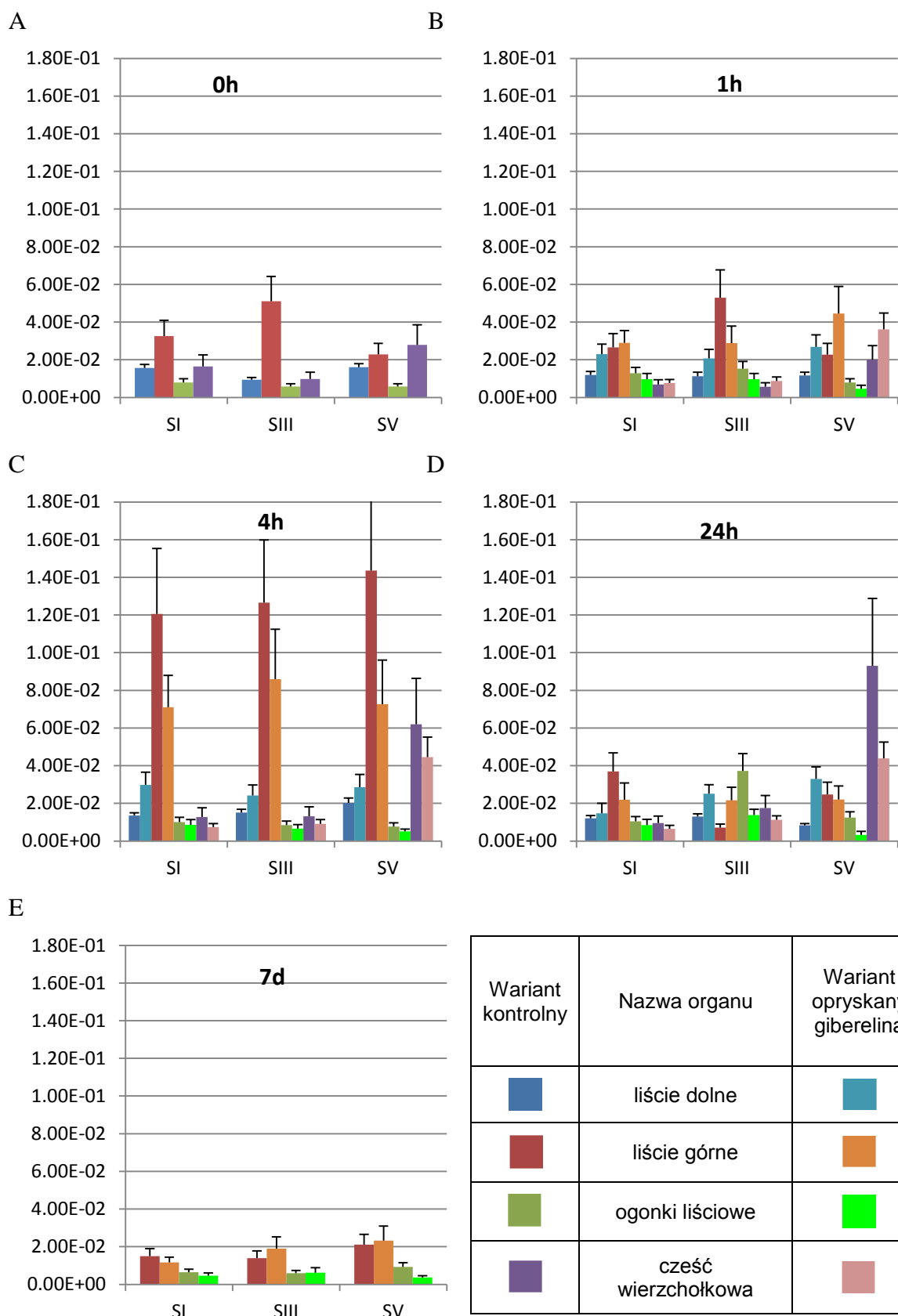
u innych badanych gatunków roślin. Kolorem  zaznaczono gatunki roślin należące do rodziny bobowatych. Kolorem  zaznaczono zidentyfikowaną sekwencję. Wykaz użytych sekwencji wraz z Accession Number: FLD *Lupinus luteus* zidentyfikowana sekwencja, FLD *Lupinus angustifolius* XP_019449823.1, FLD *Cicer arietinum* XP_004504519.1, FLD isoform X2 *Vitis vinifera* XP_010658366.1, FLD-like *Medicago truncatula* XP_013467388.1, FLD-like isoform X4 *Juglans regia* XP_018851628.1, FLD *Arachis ipaensis* XP_016203145.1, FLD *Glycine max* XP_003520261.1, FLD *Vigna radiata* XP_014513819.1, FLD *Arachis duranensis* XP_015967685.1, FLD isoform X2 *Beta vulgaris* XP_010669563.1, FLD isoform X2 *Eucalyptus grandis* XP_018715189.1, FLD-like *Ziziphus jujuba* XP_015866666.1, FLD *Prunus mume* XP_008233274.1, FLD *Theobroma cacao* XP_017984999.1, FLD-like isoform X1 *Populus euphratica* XP_011041070.1, FLD isoform X1 *Malus domestica* XP_008363874.1, FLD-like *Arabidopsis thaliana* NP_187650.4, FLD-like *Nicotiana tomentosiformis* XP_009589578.1, FLD-like isoform X2 *Gossypium arboreum* XP_017646066.1, FLD-like *Nicotiana tabacum* XP_016469385.1, FLD isoform X1 *Cucumis melo* XP_016902004.1, FLD *Cucumis sativus* XP_011657505.1, FLD *Ipomoea nil* XP_019194432.1, FLD *Solanum tuberosum* XP_006361683.1, FLD-like *Camelina sativa* XP_010486641.1, FLD-like isoform X3 *Gossypium raimondii* XP_012449527.1, FLD isoform X1 *Brassica rapa* XP_009135109.1, FLD *Brassica napus* AKA09717.1, FLD-like *Nicotiana sylvestris* XP_009785541.1.

W przewidywanej sekwencji aminokwasowej białka LIFLD-like zidentyfikowano kilka ewolucyjnie zachowywanych domen obecnych w białkach homologicznych. Analiza bioinformatyczna pozwoliła stwierdzić występowanie domeny SWIRM pomiędzy 120 a 221 aminokwasem. Największą część potencjalnego peptydu zajmuje motyw o aktywności oksydoreduktazy zależnej od FAD. Zlokalizowany w pozycji 230-645 aa może pełnić rolę oksydazy mono- i poliaminowej, a dodatkowo wykazano, że zawiera miejsce wiązania FAD/NAD położone między 230-265 aminokwasem omawianej sekwencji. Ponadto w pozycji 3-59 aa odnaleziono region bogaty w prolinę (Ryc. 32). Na podstawie porównania przewidywanej sekwencji aminokwasowych ze znanymi homologami FLD-like występujących u innych roślin wykazano wysoki stopień zachowywania ewolucyjnego zwłaszcza w obrębie wymienionych powyżej domen.

Porównanie to wykazało najwyższą homologię, wynoszącą 98%, do sekwencji białka FLD-like opisanego u łubinu wąskolistnego (Ryc. 33). Zestawienie jej z homologami występującymi u innych roślin należących do bobowatych wykazało identyczność nie mniejszą niż 81%, a w przypadku innych grup systematycznych 70%.

4.3.3. Analiza wzorca ekspresji *LIFLD-like*

W wyniku przeprowadzonych eksperymentów RT-qPCR ustalono aktywność transkrypcyjną genu *LIFLD-like* w organach wegetatywnych roślin kontrolnych oraz poddanych działaniu GA lub ABA. Na kolejnych panelach przedstawiono zmiany poziomu RNA w 1, 4 i 24 godzinie oraz 7 dniach po rozpoczęciu doświadczenia.



Ryc. 34. Poziom transkryptu *LIFLD-like* w wybranych organach. Słupki błędów wyrażają odchylenie standardowe otrzymanych wyników.

Na ryc. 34A poziom badanego transkryptu był najwyższy w liściach górnych roślin z siewu III, a najniższy w ogonkach liściowych tych samych roślin. W obrębie każdego

z siewów najwyższą ekspresję *LIFLD-like* wykazywały liście górne za wyjątkiem siewu V gdzie najwyższą aktywność transkrypcyjną badanego genu wykazywała część wierzchołkowa, a najniższą ogonki liściowe roślin kontrolnych.

Po upływie 1 godziny od opryskania rośliny GA (Ryc. 34B) ekspresja *LIFLD-like* była najwyższa w liściach górnych roślin kontrolnych z siewu III, a najniższa w ogonkach liściowych roślin. W obrębie siewu I i V najwyższą aktywność transkrypcyjną *LIFLD-like* wykazywały liście górne po upływie 1 godziny od opryskania rośliny GA, a w obrębie siewu III liście górne roślin kontrolnych. W obrębie siewu I i III najniższą ekspresję badanego genu wykazywała część wierzchołkowa roślin kontrolnych, a w obrębie siewu V w ogonkach liściowych roślin po upływie 1 godziny od opryskania rośliny GA. Egzogennie podana GA po upływie 1 godziny prowadzi do wzrostu poziomu badanego transkryptu w liściach dolnych i górnych (za wyjątkiem siewu III) i w części wierzchołkowej, a spadku w ogonkach liściowych.

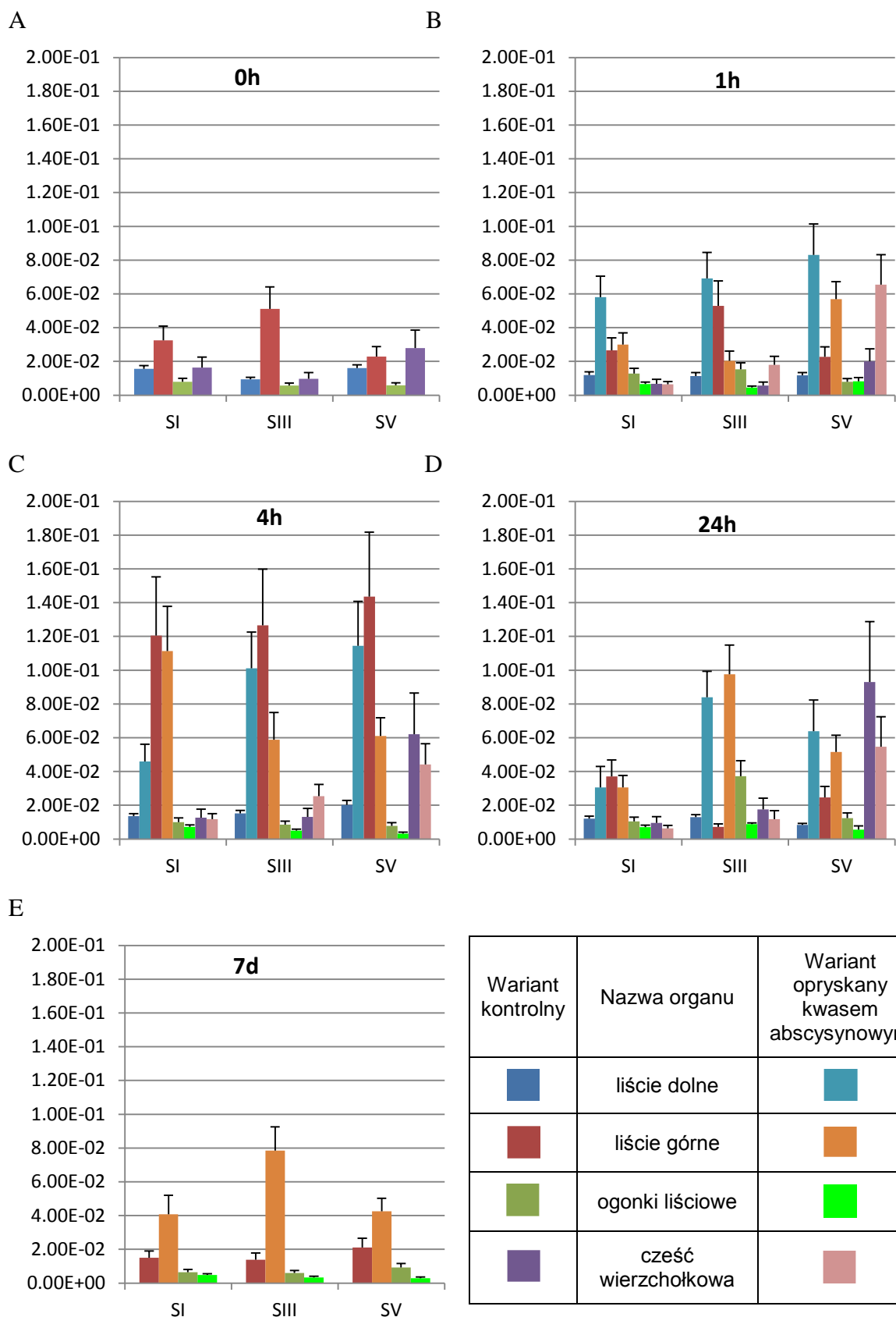
Po upływie 4 godzin od rozpoczęcia eksperymentu (Ryc. 34C) poziom badanego transkryptu był najwyższy w liściach górnych roślin z siewu V, a najniższy w ogonkach liściowych. W obrębie każdego z siewów najwyższą ekspresję *LIFLD-like* wykazywały liście górne roślin kontrolnych najniższą po upływie 4 godzin od opryskania rośliny GA (za wyjątkiem najstarszych roślin). Egzogennie podana GA po upływie 4 godzin prowadzi do wzrostu ekspresji *LIFLD-like* w liściach górnych i spadku w pozostałych organach.

W wariancie po upływie 1 doby od aplikacji GA (Ryc. 34D) ekspresja *LIFLD-like* była najwyższa w części wierzchołkowej najmłodszych roślin kontrolnych, a najniższa w ogonkach liściowych. W obrębie każdego z siewu najwyższą ekspresję badanego genu wykazywały różne ograny w przeciwieństwie do rycin 34A-C. Egzogennie podana GA po upływie 24 godzin prowadzi do wzrostu aktywności transkrypcyjnej w liściach dolnych oraz spadku w ogonkach liściowych i części wierzchołkowej. W przypadku liści górnych dochodzi do wzrostu ekspresji *LIFLD-like* w roślinach z siewu I i V oraz spadku z III.

Po upływie 7 dni od rozpoczęcia eksperymentu (Ryc. 34E) poziom *LIFLD-like* był najwyższy w liściach górnych roślin, a najniższy w ogonkach liściowych tych samych roślin. Egzogennie podana GA po upływie 7 dni prowadzi do spadku ekspresji badanego genu u najstarszych roślin i wzrostu u roślin z siewu III. U najmłodszych roślin dochodzi do wzrostu w liściach górnych i spadku w ogonkach liściowych.

Egzogennie podana GA powoduje wzrost ekspresji *LIFLD-like* w liściach dolnych, a w pozostałych organach zmiany zależą od wieku roślin i rodzaju badanego organu. Ponadto w 4 godzinie eksperymentu ekspresja *LIFLD-like* w liściach górnych roślin kontrolnych, w 4 i 24 godzinie w części wierzchołkowej najmłodszych roślin i w 24 godzinie w ogonkach liściowych SIII wzrosła względem pozostałych prób,

a w pozostałych organach nie zaobserwowano istotnych zmian poziomu transkryptu w czasie.



Ryc. 35. Poziom transkryptu *LIFLD-like* w wybranych organach. Słupki błędów wyrażają odchylenie standardowe otrzymanych wyników.

W momencie rozpoczęcia eksperymentu (Ryc. 35A) poziom badanego transkryptu był najwyższy w liściach górnych kontrolnych roślin z siewu III, a najniższy w ogonkach liściowych tych samych roślin. W obrębie każdego z siewów najwyższą ekspresję *LIFLD-like* wykazywały liście górne a najniższą ogonki liściowe.

Po upływie 1 godziny od aplikacji ABA (Ryc. 48B) ekspresja *LIFLD-like* była najwyższa w liściach dolnych najmłodszych roślin, a najniższa w ogonkach liściowych opryskanych roślin z siewu III. W obrębie każdego z siewów najwyższy poziom badanego transkryptu był w liściach dolnych roślin po upływie 1 godziny od opryskania rośliny ABA, a najniższy w ogonkach liściowych opryskanych roślin. Egzogennie podany ABA prowadzi do wzrostu ekspresji liściach dolnych, liściach górnych (za wyjątkiem siewu III i w części wierzchołkowej (za wyjątkiem najstarszych roślin) oraz spadku w ogonkach liściowych (za wyjątkiem najmłodszych roślin).

W wariacie po upływie 4 godzin od opryskania rośliny ABA (Ryc. 35C) poziom *LIFLD-like* był najwyższy w liściach górnych najmłodszych kontrolnych roślin, a najniższy w ogonkach liściowych najmłodszych roślin. W obrębie każdego z siewów najwyższa ekspresja badanego genu była w liściach górnych kontrolnych roślin, a najniższa w ogonkach liściowych roślin po upływie 4 godzin od opryskania rośliny ABA. Egzogennie podany ABA prowadzi do wzrostu poziomu *LIFLD-like* w liściach dolnych oraz spadku w liściach górnych, ogonkach liściowych i części wierzchołkowej (za wyjątkiem roślin z siewu III).

Po upływie 1 doby od rozpoczęcia doświadczenia (Ryc. 35D) ekspresja *LIFLD-like* była najwyższa w liściach górnych roślin z siewu III, a najniższa w ogonkach liściowych roślin z siewu V po upływie 24 godzin od opryskania rośliny ABA. W obrębie siewów I i III najwyższą ekspresję *LIFLD-like* wykazywały liście po upływie 24 godzin od opryskania rośliny ABA, a u najmłodszych kontrolnych roślin w części wierzchołkowej. Egzogennie podany ABA prowadzi do wzrostu poziomu *LIFLD-like* w liściach dolnych i w liściach górnych (bez najstarszych roślin) oraz spadku w pozostałych organach.

W ostatnim wariacie po upływie 7 dni od opryskania rośliny ABA (Ryc. 35D) poziom badanego genu był najwyższy w liściach górnych roślin z siewu III, a najniższy w ogonkach liściowych najmłodszych kontrolnych roślin. Egzogennie podany ABA prowadzi do wzrostu poziomu *LIFLD-like* w liściach dolnych oraz spadku w ogonkach liściowych.

Podsumowując egzogennie podany ABA prowadzi do wzrostu ekspresji *LIFCA-like* w liściach dolnych i spadku w ogonkach liściowych. Reakcje pozostałych

organów zależą od wieku roślin i czasu, który upłynął od egzogennej aplikacji ABA. Ponadto w 4 godzinie eksperymentu ekspresja *LIFLD-like* w liściach górnych roślin kontrolnych wzrosła względem pozostałych prób, a w pozostałych organach nie zaobserwowano istotnych zmian poziomu transkrypty w czasie.

4.4. Gen *FPA-like*

4.4.1. Identyfikacja sekwencji kodującej *LIFPA-like*

```
CTCTCTCTCTCTCTCTATAATATCCATCTTCTCTCTCCTAGGGTTTCTCCGCGAGTAAAAATTTTCTCATCCCCA
AACCTTTCATTATTTTTCTCTCAATTTTTTCATTTCTATACATTTCTTTTCTTCAATCATCCGATTCTAATGCCC
CTTCCGATTAAATCAATGAGGCCGTGCTCATGGCGGTGGCGGCAAGGATTTGACGACGTTCTCTCTCGAACACCT
ATGGGTGGTAATCTAGCGCCGAGTGAACCGACTCCGATCTGATGAATCTGTTGACACAATACGGCGCTTTAGATA
GCGTCACATCGTATTCGTCTCGGAGTTACGCTTTTCGTTTTCTTCAAGCGCTTGAAGATGCTAAATCCGCCAAGAAC
AATCTACAAGGATTCGCTCTCCGTGGCAATTAAGATTGAGTTTGCAGACCCGGCGAAGCCATGTAAACAGCT
TTGGGTGGGTGGTATTAGCACGGCTGTCACAAAGGAAGAATTAGAAGCTGAATTTTGTAAATTTGGTAAAGTTGAGG
AGTTTAAAGTTCTTACAGAGACCGAAATACTGCTTGTGTTGAATTTTTCAATTTGGACGATGCTACTCAAGCTATGAAA
ATAATGAATGGAAAACGTATGGGTGGAGACCATTTACGTGTAGACTTTCTTCGATCTAACACTTTGAAAAAGATCA
GATGCTTGATTATGGGCAATTTTCAGGAAAAAGCTTTGGCCACACTGATTCCTATACTGGACAGAAAAGACCCTGA
ATTCACAACCTTCCAATGGGGAGGAAGGGCGATAGTCAACCTAGCAATGTTTTGTGGATAGGTTATCCTCCTGATGTT
CAGATTGATGAGCAAAATGCTCCACAACGCCATGATTTTATTTGGTGAGATTGAGAGAATCAAGAGTTTTCTTCGAG
GAATTAATTCGTTTGTGAAATTTAGAAGTGTGATGAAGCTAGACGTGCAAAAAGGCCTTCAAGGACGCCTTTTTA
ATGACCCTCGAATAACAATCTTGTATTCAAGCAGTGTCCGGTACCTGGCAAAGACTATCCTGGTTATTATCCCGGA
AATGATGGGCTAAGACCCGATATATCTTGAACGAGCATGCTTTTCGTCCATTACAAATGGATGATTTGGTCAATC
TCCTATGGTTCCTAATAATTTTTCTGGACAGTTACCACCTAGTGGTATTGGATCAACTGCACCAATGCGGCCCTTCG
TTCTCAAGGTAGTCTTGAATCTCGAATTTCTGGCCCCGGCTTTAATGAGGCGAGCTCACTCCACAAATTTCAAGAT
GGTAGTCCAAGAGTAAGGTGGGTCCAACTGAAAAGACCATCCCTCCAGCATCAGGCTACTTCCATCCTCCTGC
ATCAGTACTAGGCTTCTGCAAGATCTGCCTTGGTGCATGGGATGTACTCGACATAAACCATATCCAGAGATT
CTAAACGTTCAAGGATAGAAGGTCGTGGTTAGCTATGGAACAAACATATGGGATGGATCCAGCTCATCTTGGTCCA
GTGAGCTCAAGGATTGCAGCCGGAGTACATGGGCCTGCCGAACCTGATAGTGATCATATATGGCGTGGAAATATTGC
TAAAGGGGAACTCCTGTTTGTGTCATGCTAGATGTGTCCCTATCGGGAAAGGGATAGGGACTGAGCTTCTGATGTTG
TTGATTGCTCAGCGAGGACAGGATTGGATATACTCACAAAACACTATGCTGATGCAATTTGGTTTTGACATTGTTTTC
TTTTGCCCCGACAGCGAAGAAGATTTTGTCTTACACTGAATTTCTTCGCTACCTTAGTGCAAAAAGATCGTGTGG
TGTGCTAAGTTTGTGATAACACCACCTTATTCTTGGTACCTCCTTCTGATTTTCTGACAAAAGTTTTGAAAGTCC
CAGGGCCTGAACGTCTATATGGTGTGGTTCTGAAGTTTCTCAAGTGCCAAATAGCACACCAATGCCACAATCATCA
CATTTGCCATAACAGTCTACTCAGTATATGCAGCAGATTCTCTCTCACCAGCTGAGTATGGTTTTGATTTCTGCAAA
GGAGAACAGGTTTTGCCAATGGACTATAACAGACTATTGCTTGGAGATTCTAAGCTTCCCCCTAAACCAGTATATC
CAGTTACAAGTGGCCCTCCTTCAAGTTCAGCTATGCGTACCGATTTTGTCTCCAGCAGTAATGCTTCTCTGTCCCAA
GCTGGTGTACATTAACACCGGAGCTTATTGCAACATTAACCAATTTTTCTCCCTGCAACTACACCAATATCTGCCAC
TGATGGTACCAGCTCCGCAGGAGGCTCCTTGACTGTGAAACCTCCATTTCCCCCTGTTGCACACAATGATGGAAACC
AATCTCAATTAATGGAAACCAGAGCATCCAATTTGTTGATCAATCTATTACCCCTCCTCAGCCATTGGGGAATATGAT
AACATTCATAATGCTCACTATCAGCCTTATCCAGTGGCACCTACATCTGTCCACCCAGTGGTCTCAAGCAGTTCTCA
CATCCAAGAGACTGTTTTCCAGCTTACAGCAGCAAGGTGCTGTGTCATCTAGACCCATGACTAATTACATGATGCCCT
CTCAAAGTGGACAGTTAACTGTATCCCCACATGTCAATCATCAGTACCAAGTTCAACACTCCCCTGGCGCTCAGAAA
GGCTTTGTAGGAATGCAAGGAACAGATACCTCTGTTTTATACAATTTCTCAGGCTTTCTGGATTCTAATAATTTCTT
TACCTCATCTAATCATGTTCAAAGTGTAACTCTTCCAGCAGCAAACTGTGATGCCATATACAGTGGAGCAAGTAA
ACTCAGACCTTTCCAATCAACAGGCTCCTTATTTGGAGTTGGTCAGGGCACATCAGAAGTGGAGGCCGATAAGAAT
CAGAGATAACCAGTCGACATTACAGTTTGCAGCGAACCTTCTCCACCAATACAGCAGCAGCAACAGCAGCAACCAAC
AACC CAAGGAGGATCTGGGCCAGGAATCCAACAA TGAGAATTATTCTTGTGTTGCAACACTAAGCGTGTGTTTTAAAT
TCTCACATATTTCGTGGACCTGCGATTGTAATGTGATGGCTTCTGCGCTTCTGCTGTGAGACGTACGGACATTTGGT
AGCGATTTCCAGTTCATGCTCCCATCATTTCAATCTTTTCATTTCAACCAACTTTTGTCACTTGTCTTTTTTATTTATC
CCTATCAACTTTTCGTGCTGTTTTCTTTTATATTTTTATAAACTGTCGAGGTTTAGAGTTGGATTTTCATTCTGTTTC
TGTTCAATGTACATAATCGTTTTTTTATCTCAACCGGGATGCAAGTTTTCATCTATGTTTATCCGCACTTTCTCCA
TTAAGAAGCAAACTATCACTTATTTATTTTTTGTGCATAAAAAATAAAAAGTTTGTGTTTAGTTCAAGTGGGTTTAT
TTGGCAAGATTAGTTGATGCATTATTTATTTTAGTTTAGTTGAAGTTAAGTTGGAG
```

Ryc. 36. Sekwencja nukleotydowa genu *LIFPA-like* o długości 3521 nt. Kolorem **żółtym** zaznaczono 2889 nt sekwencję kodującą przewidywane białko LIFPA-like.

Równocześnie prowadzono analizy wyselekcjonowanych sekwencji homologicznych do cDNA homologów genu *FPA-like*. Złożenie amplifikowanych fragmentów pozwoliło zidentyfikować pełnej długości sekwencję kodującą *LIFPA-like*. Rozpoznano fragment długości 3521 nt w obrębie, której znajduje się cDNA wspomnianego genu liczące 2889 nt (Ryc. 36).

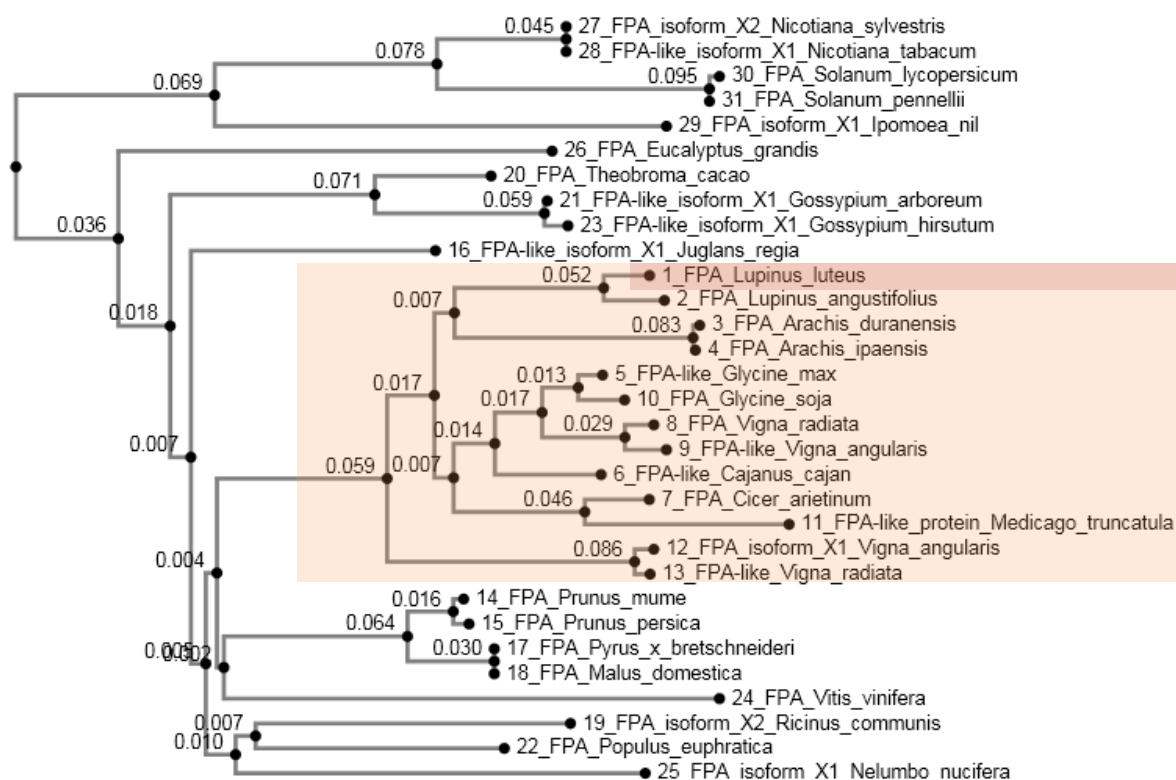
4.4.2. Analiza przewidywanej sekwencji białkowej LIFPA-like

Identyfikacja sekwencji kodującej pozwoliła na dokładniejszą analizę obejmującą wytypowanie przypuszczalną sekwencję peptydową wyznaczaną przez informacje zapisane badanego locus występującym u *L. luteus* (Ryc. 37).

```
MPLPIKSMRPAHGGGGKDFDDVPPSNNLWVGNLAPSVTDSDLMLNFAQYGALDSVTSYSSRSYAFVFFKRVEDAKSA
KNNLQGFALRGNLYLKIEFARPAKPCQQLWVGGISTAVTKEELEAEFCKFGKVEEFKFFRDRNTACVEFFNLDDATQA
MKIMNGKRMGGDHLRVDFLRSNTLKKDQMLDYQGFQGKSFGHSTSYTGQKRPLNSQLPMGRKGDSQPSNVLWIGYPP
DVQIDEQMLHNAMILFGEIERIKSFPSRNYSFVEFRSVDEARRAKEGLQGRLFNDPRITILYSSSDPVP GKDYPGYY
PGNDGLRPDI FLNEHAFRPLQMDVFGHTPMVFNFPQGLPPSGIGSTAPMRPFVFPQGSLESRISGPGFNEASSLHKF
QDGSSKSKVGNWKRPSPPASGLLPSASGTRLPARSASGAWDVL DINHISRDSKRSRIEGRGLAMEQTYGMDPAHL
GPVSSRIAAGVHGPAEPDSDHIVRGI IAKGGTPVCHARCVP I GKGIGTEL PDVVDCSARTGLDILTKHYADAIGFDI
VFFLPDSEEDFASYTEFLRYLSAKDRAGVAKFADNTTLFLVPSDFLTKVLKVPGERLYGVVLKFPQVPNSTPMPQ
SSHLPKQSTQYMQQIPPSPAEYGLI PAKEEQVLPMDYNRLLED SKLPPKPVYPTSGPPSVQPMRTDFAPSSNASL
SQAGVTLTPELIATLTNFLPATTPISATDGTSSAGGSLTVKPPFPVAHNDGNQSQLWKPEHPIVDQSIHPPQPLGN
MYNIHNAHYQPYVPAPTSVHPVSSSHIQETVSSLQQQGA VSSRPMTNMMP SQSGQLTVSPHVNHQYVQVQHS PGA
QKGFVGMQGTDTSVLYNSQAF LDSNNSFTSSNHVQSANPSRQQTVMPTVEQVNSDLSNQAPLFGVGQGTSEVEAD
KNQRYQSTLQFAANLLHQIQQQQQQQQQQQQQQQQQRQKLMQLPQQQQQQLAQQTQFRQSAMQGMGQLHGQHMQQFS
QPLGHQQFQGRQLTTGHVQHSMASQLNQG NQMTRLSQFSGPANNALFSAAQTT PNSQMLPNMSATMPSQPLLPRMQ
FGLSGNNPQRSHASQMLS DQMYNMGCGNLGGMMPMQQQQQQHQSGGAFGSMASNAQNLSGMVTLQNTQQNH PNF
SQQRQQNPQ
```

Ryc. 37. Przewidywana sekwencja aminokwasowa białka LIFPA-like o długości 1164 aminokwasów. Kolorem żółtym, w pozycjach 26-98 aa, 103-175 aa i 223-296 aa, zaznaczono 3 domeny RMM. Kolorem błękitnym, w pozycji 807-1164 aa, zaznaczono region bogaty w glutaminę. Kolorem zielonym, w pozycji 485-581 aa, zaznaczono domenę SPOC.

W przewidywanej sekwencji aminokwasowej białka LIFPA-like zidentyfikowano w pozycjach 26-98, 103-175 i 223-296 aa 3 domeny RMM odpowiedzialne za wiązane RNA. Ponadto odnaleziono motyw SPOC w pozycji 485-581 aa, którego funkcja nie jest do końca poznana, a jedyna informacja pochodząca z bazy konserwowanych domen białkowych NCBI wskazuje na jego zaangażowanie w sygnalizację związaną z następstwem procesów rozwojowych. Na odcinku od 807 do 1164 aa zidentyfikowano także region bogaty w glutaminę. Na podstawie porównania sekwencji aminokwasowych wykazano wysoki stopień zachowywania ewolucyjnego opisywanego białka zwłaszcza w obrębie wymienionych powyżej domen.



Ryc. 38. Drzewo filogenetyczne dla białka LIFPA-like opracowane w oparciu o sekwencje aminokwasowe białek kodowanych przez geny homologiczne innych gatunków roślin. Kolorem zaznaczono gatunki roślin należące do rodziny bobowatych. Kolorem zaznaczono zidentyfikowaną sekwencję. Wykaz użytych sekwencji wraz z Accession Number: FPA *Lupinus luteus* zidentyfikowana sekwencja, FPA *Lupinus angustifolius* XP_019413411.1, FPA *Arachis duranensis* XP_015952121.1, FPA *Arachis ipaensis* XP_016187112.1, FPA-like *Glycine max* XP_006592142.1, FPA-like *Cajanus cajan* XP_020216196.1, FPA *Cicer arietinum* XP_004507346.1, FPA *Vigna radiata* XP_014493911.1, FPA-like *Vigna angularis* XP_017433067.1, FPA *Glycine soja* KHN25306.1, FPA-like protein *Medicago truncatula* XP_003606822.1, FPA isoform X1 *Vigna angularis* XP_017424922.1, FPA-like *Vigna radiata* XP_014521928.1, FPA *Prunus mume* XP_008222429.1, FPA *Prunus persica* XP_020420285.1, FPA-like isoform X1 *Juglans regia* XP_018812781.1, FPA *Pyrus x bretschneideri* XP_009341170.1, FPA *Malus domestica* XP_008369175.1, FPA isoform X2 *Ricinus communis* XP_015581056.1, FPA *Theobroma cacao* XP_007033896.2, FPA-like isoform X1 *Gossypium arboreum* XP_017633624.1, FPA *Populus euphratica* XP_011037125.1, FPA-like isoform X1 *Gossypium hirsutum* XP_016714010.1, FPA *Vitis vinifera* XP_010650623.1, FPA isoform X1 *Nelumbo nucifera* XP_010258515.1, FPA *Eucalyptus grandis* XP_010046755.1, FPA isoform X2 *Nicotiana sylvestris* XP_009787476.1, FPA-like isoform X1 *Nicotiana tabacum* XP_016465699.1, FPA isoform X1 *Ipomoea nil* XP_019165769.1, FPA *Solanum lycopersicum* XP_004240984.1, FPA *Solanum pennellii* XP_015079421.1.

Porównanie to wykazało najwyższą identyczność wynoszącą ok 95% do sekwencji homologicznego białka FPA-like opisanego u łubinu wąskolistnego (Ryc. 38). Przeprowadzona analiza porównawcza pozwoliła określić homologię dla soi uprawnej na poziomie 74%, a dla pozostałych gatunków roślin strączkowych co najmniej 70%. Dla reszty zestawionych sekwencji peptydowych gatunków pochodzących z różnych grup systematycznych podobieństwo nie przekraczało 60%, ale było również nie mniejsze niż 46%.

4.4.3. Analiza ekspresji *LIFPA-like*

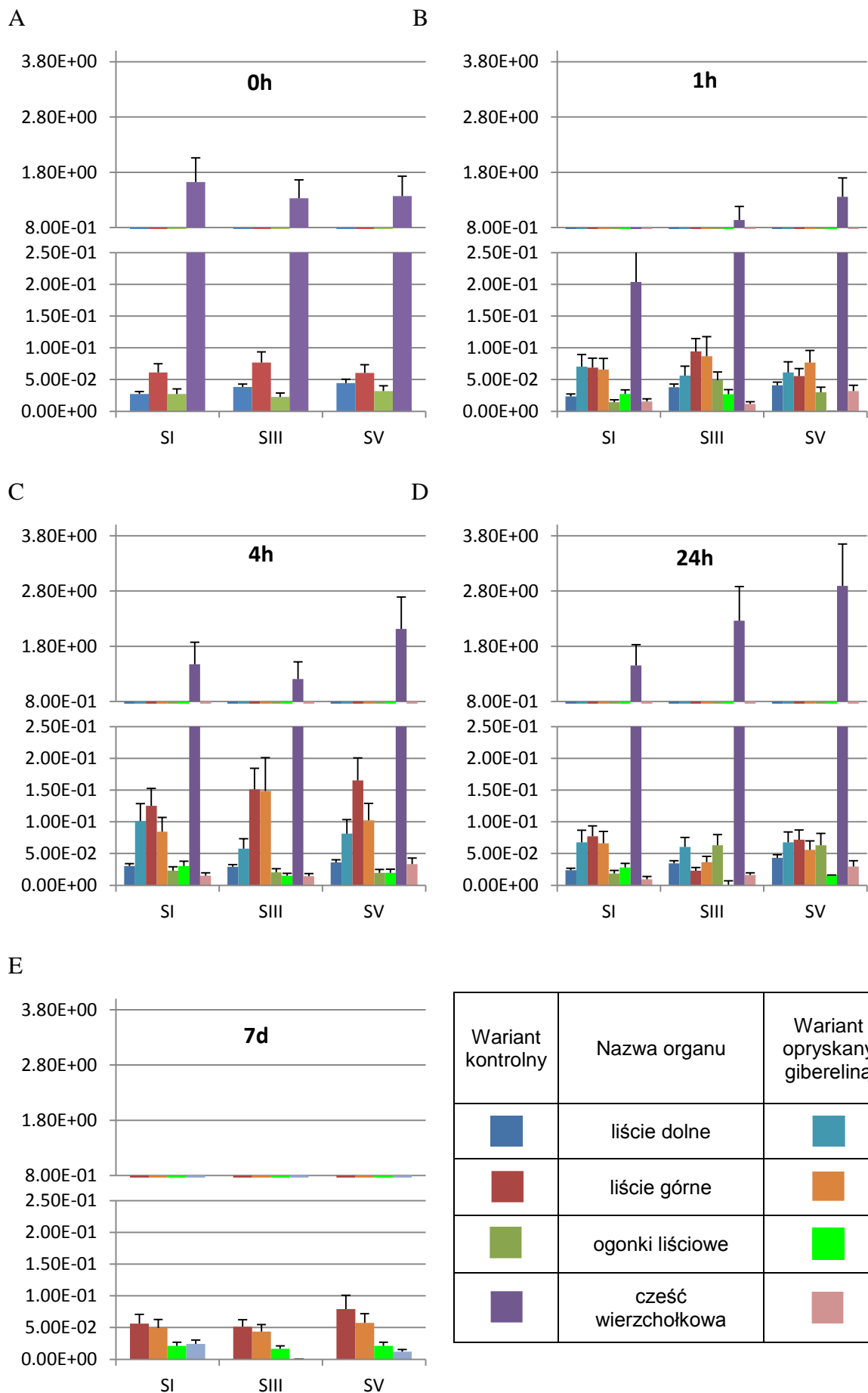
Podobnie jak miało to miejsce w przypadku badań aktywności transkrypcyjnej wcześniej omawianego genu także i w celu ustalenia względnej ekspresji *LIFPA-like* wykorzystano technikę RT-qPCR z detekcją specyficzną. Poziom mRNA badanego genu odnoszono do ilości transkryptu genu aktywny. Na kolejnych panelach przedstawiono zmiany poziomu RNA w 1, 4 i 24 godzinie oraz 7 dniach po rozpoczęciu doświadczenia. Dla każdego z wariantów przeprowadzono 3 niezależne powtórzenia biologiczne.

W pierwszym wariantcie w momencie rozpoczęcia doświadczenia (Ryc. 39A) poziom badanego transkryptu był najwyższy w części wierzchołkowej najstarszych kontrolnych roślin, a najniższy w ogonkach liściowych tych samych roślin. W obrębie każdego z siewów najwyższą ekspresję *LIFPA-like* wykazywała część wierzchołkowa a najniższą ogonki liściowe.

Po upływie 1 godziny od opryskania rośliny GA (Ryc. 39B) ekspresja *LIFPA-like* była najwyższa w części wierzchołkowej najmłodszych kontrolnych roślin, a najniższa w ogonkach liściowych najmłodszych roślin. W obrębie każdego z siewów najwyższą aktywność transkrypcyjną *LIFPA-like* wykazywała część wierzchołkowa roślin kontrolnych. Egzogennie podana GA po upływie 1 godziny prowadzi do wzrostu aktywności transkrypcyjnej badanego genu w liściach dolnych oraz spadku w ogonkach liściowych i części wierzchołkowej.

W wariantcie po upływie 4 godzin od oprysku (Ryc. 39C) poziom *LIFPA-like* był najwyższy w części wierzchołkowej najmłodszych kontrolnych roślin, a najniższy w tym samym organie. W obrębie każdego z siewów najwyższą ekspresję *LIFPA-like* wykazywała część wierzchołkowa roślin kontrolnych, a najniższa w tym samym organie po upływie 4 godzin od opryskania rośliny GA. Egzogennie podana GA po upływie 4 godzin prowadzi do wzrostu aktywności transkrypcyjnej w liściach dolnych oraz spadku w ogonkach liściowych i części wierzchołkowej.

Po upływie 1 doby od aplikacji GA (Ryc. 39D) ekspresja badanego genu była najwyższa w części wierzchołkowej najmłodszych kontrolnych roślin, a najniższa w ogonkach liściowych roślin z siewu III i V po upływie 24 godzin od opryskania rośliny GA. W obrębie każdego z siewów najwyższą aktywność transkrypcyjną *LIFPA-like* wykazywała część wierzchołkowa roślin kontrolnych, a najniższą w ogonkach liściowych roślin po upływie 24 godzin od opryskania rośliny GA. Egzogennie podana GA po upływie 24 godzin prowadzi do wzrostu aktywności transkrypcyjnej *LIFPA-like* w liściach dolnych oraz spadku w ogonkach liściowych i części wierzchołkowej.



Ryc. 39. Poziom transkryptu *LIFPA-like* w wybranych organach. Słupki błędów wyrażają odchylenie standardowe otrzymanych wyników.

7 dni po oprysku GA (Ryc. 39E) aktywność transkrypcyjna badanego genu była najwyższa w liściach górnych najmłodszych kontrolnych roślin, a najniższa w ogonkach liściowych z siewu V. Egzogennie podana GA po upływie 7 dni prowadzi do spadku ekspresji *LIFPA-like* w liściach dolnych.

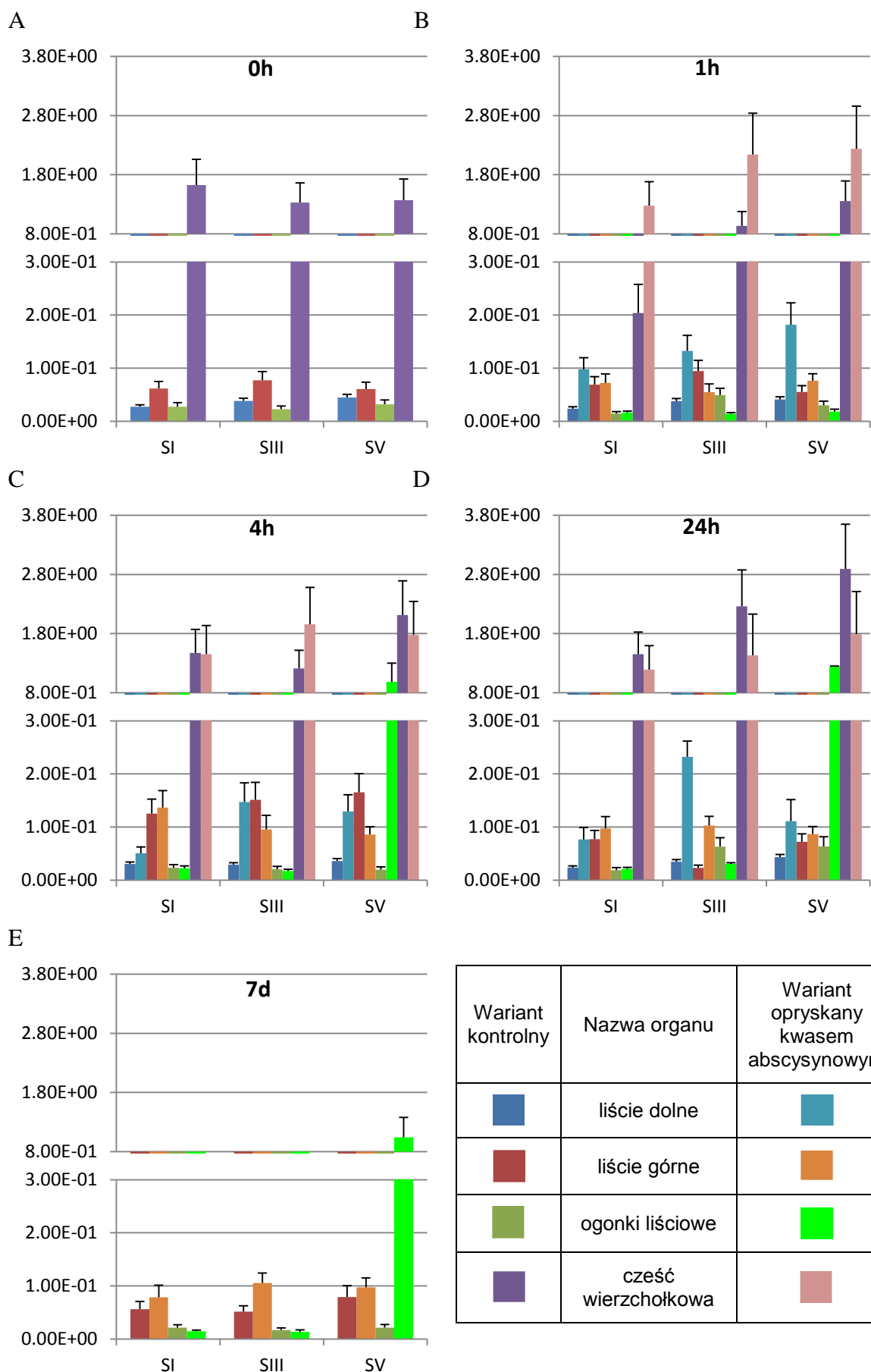
Podsumowując poza małymi wyjątkami egzogennie podana GA prowadzi do wzrostu ekspresji *LIFPA-like* w liściach dolnych przy jednoczesnym spadku w pozostałych organach. Ponadto w 4 godzinie eksperymentu ekspresja *LIFPA-like* w liściach górnych roślin kontrolnych wzrosła względem pozostałych prób. W pozostałych organach nie zaobserwowano istotnych zmian poziomu transkryptu w czasie.

W momencie rozpoczęcia eksperymentu (Ryc. 40A) poziom badanego transkryptu był najwyższy w części wierzchołkowej najstarszych roślin, a najniższy w ogonkach liściowych tych samych roślin. W obrębie każdego z siewów najwyższa ekspresja *LIFPA-like* była w części wierzchołkowej, a najniższa w ogonkach liściowych.

W wariacie po upływie 1 godziny od aplikacji ABA (Ryc. 40B) ekspresja *LIFPA-like* była najwyższa w części wierzchołkowej najmłodszych roślin, a najniższa w ogonkach liściowych opryskanych roślin z siewu III. W obrębie każdego z siewów najwyższy poziom badanego transkryptu był w części wierzchołkowej najmłodszych roślin po upływie 1 godziny od opryskania rośliny ABA, a najniższy w ogonkach liściowych opryskanych roślin. Egzogennie podany ABA prowadzi do wzrostu ekspresji w liściach dolnych i w części wierzchołkowej oraz spadku w ogonkach liściowych (za wyjątkiem najstarszych roślin).

Po upływie 4 godzin od rozpoczęcia doświadczenia (Ryc. 40C) poziom *LIFPA-like* był najwyższy w części wierzchołkowej roślin z siewu III, a najniższy w ogonkach liściowych najmłodszych kontrolnych roślin. W obrębie każdego z siewów najwyższa ekspresja *LIFPA-like* była w części wierzchołkowej roślin kontrolnych (za wyjątkiem siewu III), a najniższa w ogonkach liściowych kontrolnych roślin. Egzogennie podany ABA prowadzi do wzrostu ekspresji w liściach dolnych oraz spadku w liściach górnych (za wyjątkiem siewu I), części wierzchołkowej (za wyjątkiem siewu III) i w ogonkach liściowych (za wyjątkiem siewu V).

24 godziny od oprysku ABA (Ryc. 40D) ekspresja badanego genu była najwyższa w części wierzchołkowej najmłodszych kontrolnych roślin, a najniższa w ogonkach liściowych najstarszych roślin kontrolnych. W obrębie każdego z siewów najwyższy poziom *LIFPA-like* była w części wierzchołkowej roślin kontrolnych. Egzogennie podany ABA prowadzi do wzrostu ekspresji w liściach dolnych i górnych oraz w ogonkach liściowych (za wyjątkiem siewu III) i spadku w części wierzchołkowej.



Ryc. 40. Poziom transkryptu *LIFPA-like* w wybranych organach. Słupki błędów wyrażają odchylenie standardowe otrzymanych wyników.

W ostatnim wariantcie po upływie 7 dni od opryskania roślin (Ryc. 40E) poziom *LIFPA-like* był najwyższy w ogonkach liściowych najmłodszych roślin, a najniższy w ogonkach liściowych najstarszych opryskanych roślin. Egzogennie podany ABA prowadzi do wzrostu ekspresji w liściach górnych oraz spadku w ogonkach liściowych (za wyjątkiem siewu V).

Egzogennie podany ABA prowadzi do wzrostu ekspresji w liściach dolnych. Reakcje pozostałych organów zależą od wieku roślin i czasu, który upłynął od egzogennej aplikacji ABA. Ponadto w 4 godzinie eksperymentu ekspresja *LIFPA-like* w liściach górnych roślin kontrolnych wzrosła względem pozostałych prób, a w pozostałych organach nie zaobserwowano istotnych zmian poziomu transkryptu w czasie.

4.5. Gen *FVE-like*

4.5.1. Identyfikacja cDNA genu *LIFVE-like*

```
CTTCATTCTCACTTTTTTTTTTCTCTCTCTACCCATAACTTGTAAATAGAGAGTGAAAAAACAACACAACACTAAA
AAAAAGTACCACACTTTGTATAGTGTGAAACTGCAGAGTGCAGAGTGATTGAGAAAGAGAGAAAAAGATCTAA
AGCAGAAAAGAAAATGGACACTCCTCCTCAACAACAAGGTTCTGTGGTGAAGAAGAAGGAAACAAGGGGACGA
AAACCCAAACCTAAAACCAACGACCAATCTCAACAAAACAAAACCCCAAGAGGGTAAGAAATCACAACATC
ATCAACAACATCAACATCAACATCAACAACAACACCATCTCACTTCAGAAGACAAGTACAATCATTGGAAATC
AGTTGTCCCTGTTCTCTACGACTGGCTCGCCAATCACAATCTCGTTTGGCCCTCTCTCTCTTGC CGGTGGGGT
CCTCAGCTTGACCATGCTACTCAGAAGAATCGCCAGCGTCTCTATCTTTCTGAGCAGACTGACGGTAGTGTTC
CCAATACCCCTCGTGATTGCAAACCTGTGAGGTTGTTAAGCCTAGGGTTGCTGCCGCAGAGCACATATCACAGTT
TAATGAAGAAGCTCGATCCCCATTCGTGAAGAAGTACAAGACCATCATAACATCCAGGAGAGGTGAACAGAATT
AGGGAACGCCACAAAATCTAAGATAGTGGCTACTCATAACAGACAGCCCTGATGTTCTCATTGGGGATGTTG
AAGCTCAGCCTAATCGTCATGCTGTCTTAGGAGCTACAAGTTCTCGCCAGATTTGATATTGACTGGACACCA
AGATAATGCAGAAATTTGCTCTTGCAATGTGCCAACTGAACCCATATGTGCTCTCTGGGGGAAAGGATAGATCA
GTGGTGTGTGGAGTATTGAAGATCACATAACATCTGCTGCCACAGGCTCCAAATCTGGTGGGTCAATTATCA
AACAGAATGCCAAATCTGGGGAAGGCAATGATAAACTGCAAATGGCCCATCTGTTGGACCCCGGGGTATCTA
CCATGGACATGAGGATACCGTCAAGATGTGACTTTCTGTCTTCTAGTGACAGGAGTTTTGTAGTGTGGGA
GATGATTCTTGTCTCATATTATGGGATGCACGTATTGGCACTACTCCTGCTGTTAAGGTGGAAAAAGCTCATA
ATGCTGATCTTCACTGTGTTGATTGGAGTCCCCATGATGTTAATCTGATTCTTACTGGGTCGGCAGATAATTC
TGTTTCGCATGTTTGACCGCCGCAAACTTACGTCAAATGGAGTTGGGTACCTATCCATAACTTTGAGGGTCAC
AAAGCTGCTGTTCTTTGTGTTTCACTGGTCTCCTGACAAATCATCTGTTTTTGGAAAGCTCTGCAGAAGATGGTC
TCTTGAACATTTGGGATTTTCGAGAAGGTGGGCAACAATACGGAGCAATCAAGTGCTCCTCCAGGGTTATTTTT
TCAACATGCAGGTCACAGAGACAAAGTAGTTGACTTCCACTGGAATGCATACGATCCATGGACTATTGTTAGT
GTGTCAGATGACTGTCAAAGTACTGGTGGAGGGGGAACATTGCAGATATGGCGTATGAGTGATTTCTTTTACA
GGCCTGAAGAGGAGTTTTTGGCAGAGCTGGAGAGTTTTCAAATCTCATGTGGAGACATGTGCTTCAATCTCTGA
AAACTGATATACATATGCATAAATTATGTGTCTTATAGACTCTTGATATGATTTTCAGGATCTTATCATGTTAA
TCTTCATTCGCATTGGATGTTTCTTAGCTTGAGTACTAGGGAATCTTATATTGCAGCATATAATGACTAGAAT
TTCTTGTTTTAGTTAATCAACATTTAATAACAATTGTATGATCCTTTGCTTTTGTGGTTCCTTAATTATGTT
CCGCAAAAATCTGCGGTTGTCAAATTATACTTCAATTCATTATATTCATGAATTAGATCAATTATAGTG
```

Ryc. 41. Sekwencja nukleotydoma genu *LIFVE-like* o długości 1967 nt. Kolorem **żółtym** zaznaczono 1524 nt sekwencję kodującą przewidywane białko LIFVE-like.

Kolejną z badanych sekwencji był cDNA homologa genu *FVE-like*. Zidentyfikowano u łubinu żółtego sekwencje długości 1967 nukleotydów w obrębie, której znajduje się liczący 1524 nt fragment kodujący potencjalny peptyd *LIFVE-like* (Ryc. 41). Na podstawie wyselekcjonowanego fragmentu możliwym jest wytypowanie przewidywanej sekwencji aminokwasowej. Ta opisana sekwencja liczy sobie 508 aminokwasów i zawiera podstawowe dla jej funkcjonowania domeny identyfikowane w białkach występujących u innych gatunków roślin.

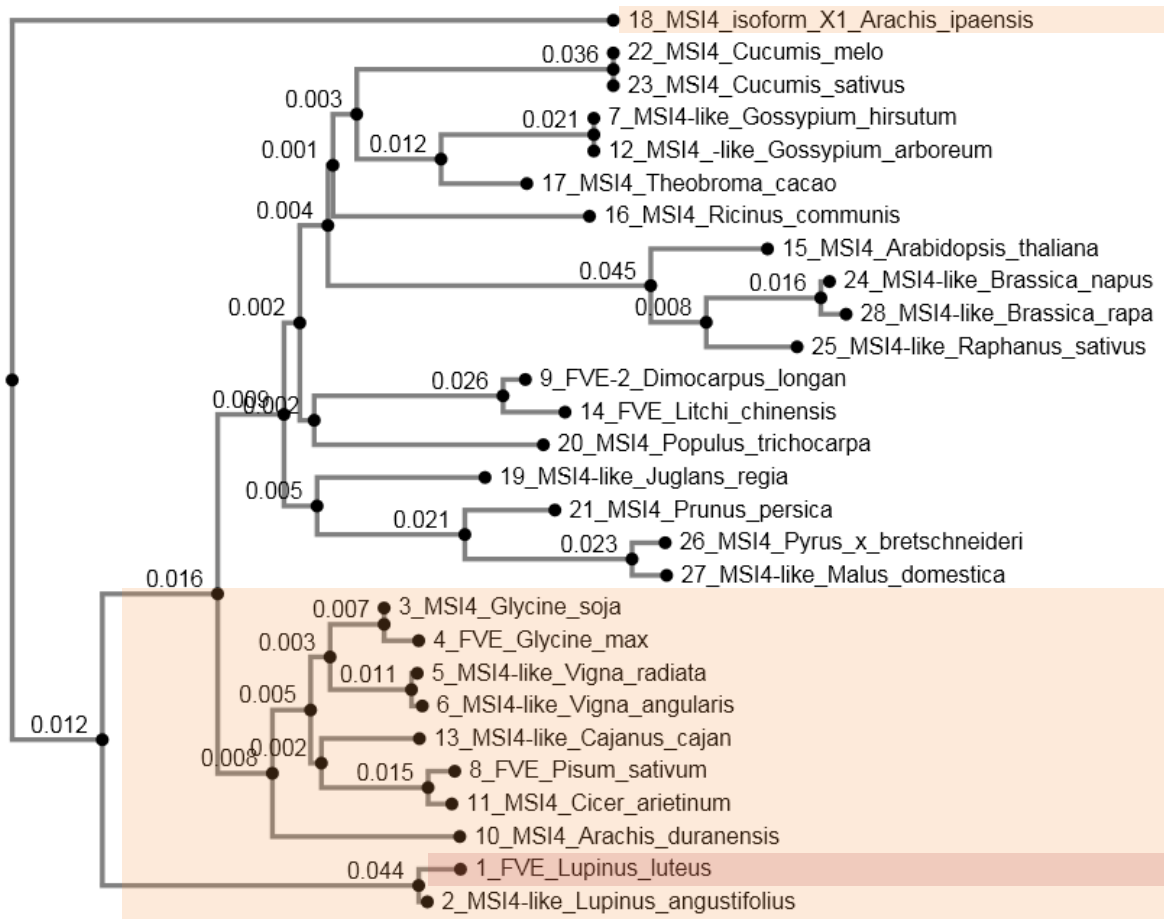
4.5.2. Analiza przewidywanej sekwencji aminokwasowej LIFVE-like

Identyfikacja sekwencji kodującej pozwoliła na dokładniejszą analizę obejmującą wytypowanie przypuszczalną sekwencję peptydową wyznaczaną przez informacje zapisane badanego locus występującym u *L. luteus* (Ryc. 42).

W przewidywanej sekwencji aminokwasowej białka LIFVE-like zidentyfikowano przede wszystkim 6 domen WD40 - występujący w białkach zaangażowanych w regulację transdukcji sygnału, transkrypcji i cyklu komórkowego. Ponadto odnaleziono w pozycji 44-57 aa region bogaty w histydynę. Wykazano na podstawie porównania sekwencji aminokwasowych wysoki stopień zachowywania ewolucyjnego zwłaszcza w obrębie wytypowanych domen.

MDTPPQQQGSVVKKKETRGRKPKPKTNDQSQQNKTPKEGKKSQHHQQHQHQHQQQHHLTSEDKYNHWKSVVVPV
 LYDWLANHNLVWPSLSRWGPQLDHATQKNRQRLYLSEQTDGSPNTLVIANCEVVKPRVAAAEHISQFNEEA
 RSPFVKKYKTI IHPGEVNRIRELPQNSKIVATHDSDPDLIWDVEAQPNRHAVLGATSSRPDLILTGHQDNAE
 FALAMCPTPEPYVLSGGKDRSVVLWSIEDHITSAATGSKSGGSI IKQNAKSGEGNDKTANGPSVGPGRGIYHGHE
 DTVEDVTFPCSSAQEFCSVGDDSLILWDARIGTTPAVKVEKAHNADLHCVDWSPHDVNLILTGSADNSVRMF
 DRRKLTSGVGSPIHNFEGHKAAVLCVQWSPDKSSVFGSSAEDGLLNIIWDFEKGNNTEQSSAPPGLFFQHAG
 HRDKVVDFHWNAYDPWTIVSVSDDCQSTGGGGTLQIWRMSDFLYRPEEEVLAELESFKSHVETCASISEN

Ryc. 42. Przewidywana sekwencja aminokwasowa białka LIFVE-like o długości 508 aminokwasów. Kolorem **żółtym**, w pozycjach 164-213 aa, 218-255 aa, 296-332 aa, 340-383 aa, 389-437 aa i 443-475 aa, zaznaczono 6 domen WD40. Kolorem **błękitnym**, w pozycji 44-57 aa, zaznaczono region bogaty w histydynę. Kolorem **zielonym**, w pozycjach 62-130 aa, zaznaczono domenę RBBP4 wiążącą histony wchodzącą w skład podjednostki C kompleksu CAF1.



Ryc. 43. Drzewo filogenetyczne dla białka LIFVE-like opracowane w oparciu o sekwencje aminokwasowe białek kodowanych przez geny homologiczne innych gatunków roślin. Kolorem zaznaczono gatunki roślin należące do rodziny bobowatych. Kolorem zaznaczono zidentyfikowaną sekwencję. Wykaz użytych sekwencji wraz z Accession Number: FVE *Lupinus luteus* zidentyfikowana sekwencja, MSI4-like *Lupinus angustifolius* XP_019442855.1, MSI4 *Glycine soja* KHN24607.1, FVE *Glycine max* NP_001276199.1, MSI4-like *Vigna radiata* XP_014502046.1, MSI4-like *Vigna angularis* XP_017421558.1, MSI4-like *Gossypium hirsutum* XP_016726179.1, FVE *Pisum sativum* AAX47182.1, FVE-2 *Dimocarpus longan* AGG38122.1, MSI4 *Arachis duranensis* XP_015954449.1, MSI4 *Cicer arietinum* XP_004488042.1, MSI4-like *Gossypium arboreum* KHG09090.1, MSI4-like *Cajanus cajan* XP_020224017.1, FVE *Litchi chinensis* AGN88924.1, MSI4 *Arabidopsis thaliana* AAD10151.2, MSI4 *Ricinus communis* XP_002514113.1, MSI4 *Theobroma cacao* XP_007012838.2, MSI4 isoform X1 *Arachis ipaensis* XP_016202090.1, MSI4-like *Juglans regia* XP_018845607.1, MSI4 *Populus trichocarpa* XP_006381682.1, MSI4 *Prunus persica* XP_007201952.1, MSI4 *Cucumis melo* XP_008450857.1, MSI4 *Cucumis sativus* XP_004135716.2, MSI4-like *Brassica napus* CDX81933.1, MSI4-like *Raphanus sativus* XP_018434013.1, MSI4 *Pyrus x bretschneideri* XP_009352654.1, MSI4-like *Malus domestica* XP_008337707.1, MSI4-like *Brassica rapa* XP_009112615.1.

Porównanie to wykazało najwyższą homologię rzędu 97% do sekwencji białka FVE-like opisanego u łubinu wąskolistnego (Ryc. 43). MSI4 jest to alternatywna nazwa białka FVE-like. Na drzewie filogenetycznym zastosowano oryginalne nazwy pochodzące z GeneBank. W porównaniu przeprowadzonym dla soi uprawnej uzyskano homologię na poziomie 86%, a dla pozostałych gatunków roślin strączkowych co najmniej 83%. Dla reszty analizowanych gatunków nie przekraczała ona 85%, ale nie była również niższa niż 78%.

4.5.3. Ustalenie wzorca ekspresji *LIFVE-like*

W wyniku przeprowadzonych eksperymentów RT-qPCR ustalono wzorzec ekspresji genu *LIFVE-like* w organach wegetatywnych roślin kontrolnych oraz poddanych działaniu fitohormonów GA lub ABA. Na kolejnych panelach przedstawiono zmiany aktywności transkrypcyjnej badanego genu w 1, 4 i 24 godzinie oraz 7 dniach po rozpoczęciu doświadczenia. Dla każdej z przeprowadzonych reakcji i dla każdego genu stosowano kalibrator umożliwiający standaryzację uzyskanych wyników. Dla każdego z wariantów przeprowadzono 3 niezależne powtórzenia biologiczne.

W pierwszym wariantcie w momencie rozpoczęcia aplikacji GA (Ryc. 44A) poziom badanego transkryptu był najwyższy w liściach górnych najmłodszych kontrolnych roślin, a najniższy w liściach dolnych kontrolnych roślin z siewu III. W obrębie każdego z siewów najwyższą ekspresję *LIFVE-like* wykazywały liście górne a najniższą liście dolne (za wyjątkiem siewu V).

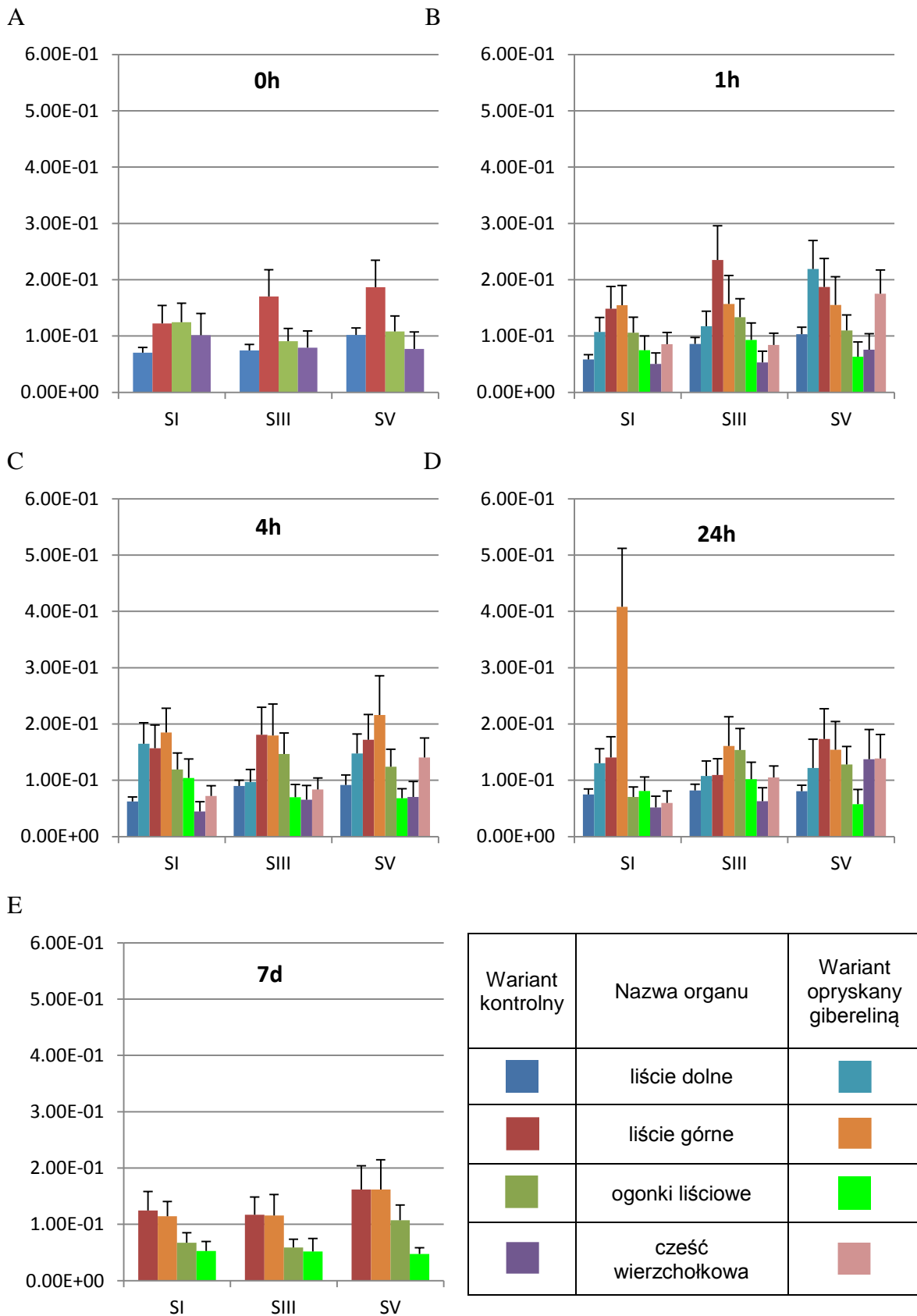
Po upływie 1 godziny od oprysku (Ryc. 44B) ekspresja *LIFVE-like* była najwyższa w liściach górnych kontrolnych roślin z siewu III, a najniższa w części wierzchołkowej tych samych roślin. Egzogennie podana GA po upływie 1 godziny prowadzi do wzrostu aktywności transkrypcyjnej w liściach dolnych i w części wierzchołkowej oraz spadku w ogonkach liściowych oraz liściach górnych (za wyjątkiem najstarszych roślin).

W wariantcie po upływie 4 godzin od rozpoczęcia doświadczenia (Ryc. 44C) poziom *LIFVE-like* był najwyższy w liściach górnych, a najniższy w części wierzchołkowej najstarszych roślin. Egzogennie podana GA po upływie 4 godzin prowadzi do spadku ekspresji *LIFVE-like* w ogonkach liściowych oraz jej wzrostu w pozostałych organach.

Po upływie 1 dnia od rozpoczęcia pomiarów (Ryc. 44D) poziom badanego transkryptu był najwyższy w liściach górnych najstarszych roślin, a najniższy w części wierzchołkowej najstarszych roślin kontrolnych. Egzogennie podana GA po upływie 24 godzin prowadzi do wzrostu ekspresji *LIFVE-like* w liściach górnych, części wierzchołkowej oraz liści górnych (za wyjątkiem najmłodszych roślin), spadku w ogonkach liściowych (za wyjątkiem najstarszych roślin).

Po raz ostatni dokonano pomiaru ekspresji *LIFVE-like* po upływie 7 dni od opryskania rośliny GA (Ryc. 44E), która była najwyższa w liściach górnych najmłodszych roślin kontrolnych, a najniższa w ogonkach liściowych najmłodszych roślin. W obrębie każdego z siewów najwyższy poziom badanego transkryptu był najwyższy w liściach górnych roślin kontrolnych, a najniższy w ogonkach liściowych najmłodszych

roślin po upływie 7 dni od opryskania rośliny GA. Egzogennie podana GA po upływie 7 dni prowadzi do spadku ekspresji w badanych organach.



Ryc. 44. Poziom transkryptu *LIFVE-like* w wybranych organach. Słupki błędów wyrażają odchylenie standardowe otrzymanych wyników.

Podsumowując poza małymi wyjątkami egzogennie podana GA prowadzi do wzrostu ekspresji *LIFVE-like* w liściach dolnych oraz w części wierzchołkowej przy jednoczesnym spadku w ogonkach liściowych. Zmiany poziomu badanego transkryptu w liściach górnych zależą od wieku roślin oraz czasu, który upłynął od egzogennej aplikacji GA.

Na ryc. 45A poziom badanego transkryptu był najwyższy w liściach górnych najmłodszych roślin, a najniższy w liściach dolnych najstarszych roślin.

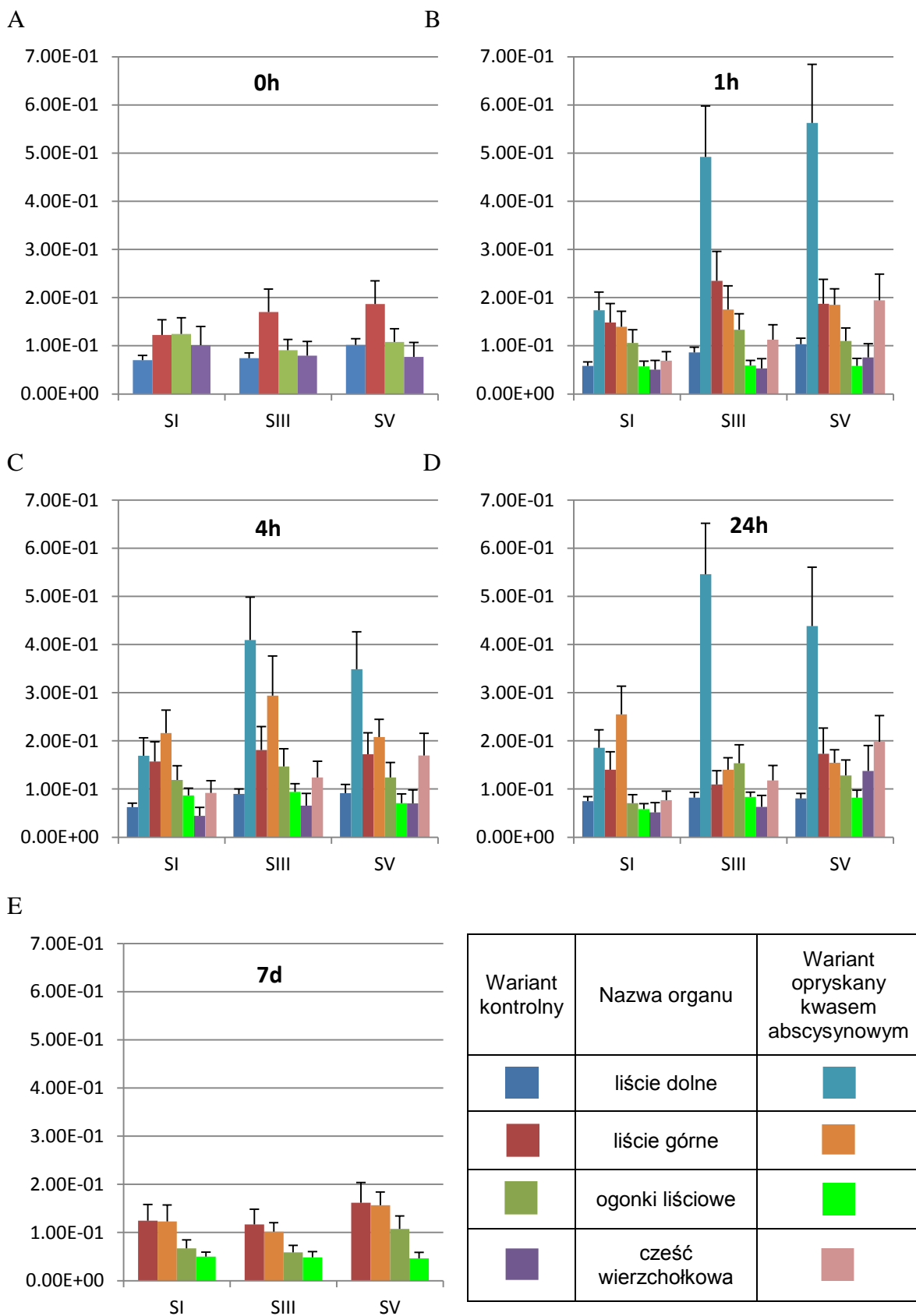
W wariacie po upływie 1 godziny od aplikacji ABA (Ryc. 45B) ekspresja *LIFVE-like* była najwyższa w liściach dolnych najmłodszych roślin, a najniższa w części wierzchołkowej najstarszych kontrolnych roślin. W obrębie każdego z siewów poziom *LIFVE-like* był najwyższy w liściach dolnych najmłodszych opryskanych roślin, a najniższy w części wierzchołkowej najstarszych kontrolnych roślin (za wyjątkiem najmłodszych roślin). Egzogennie podany ABA prowadzi do wzrostu ekspresji w liściach dolnych i w części wierzchołkowej oraz spadku w liściach górnych i w ogonkach liściowych.

Po upływie 4 godzin od rozpoczęcia doświadczenia (Ryc. 45C) poziom *LIFVE-like* był najwyższy w liściach dolnych roślin z siewu III, a najniższy w części wierzchołkowej najstarszych kontrolnych roślin. W obrębie każdego z siewów ekspresja badanego genu była najwyższa w liściach dolnych opryskanych roślin ABA (za wyjątkiem siewu I), a najniższa w części wierzchołkowej kontrolnych roślin. Egzogennie podany ABA prowadzi do wzrostu ekspresji *LIFVE-like* w liściach dolnych i górnych oraz w części wierzchołkowej a spadku w ogonkach liściowych.

Po upływie 1 dnia od oprysku ABA (Ryc. 45D) ekspresja badanego genu była najwyższa w liściach dolnych roślin z siewu III, a najniższy w części wierzchołkowej najstarszych kontrolnych roślin. W obrębie każdego z siewów poziom *LIFVE-like* był najwyższy w liściach dolnych opryskanych roślin (za wyjątkiem siewu I), a najniższa w części wierzchołkowej kontrolnych roślin (za wyjątkiem najmłodszych roślin). Egzogennie podany ABA prowadzi do wzrostu ekspresji w liściach dolnych i górnych (za wyjątkiem najmłodszych roślin) oraz w części wierzchołkowej, a spadku w ogonkach liściowych.

W ostatnim wariacie po upływie 7 dni od opryskania roślin (Ryc. 45E) poziom badanego transkryptu był najwyższy w liściach górnych najmłodszych kontrolnych roślin, a najniższy w ogonkach liściowych. W obrębie każdego z siewów ekspresja *LIFVE-like* była najwyższa w liściach górnych kontrolnych roślin, a najniższa w ogonkach liściowych

opryskanych roślin. Egzogenicznie podany ABA prowadzi do spadku poziomu *LIFVE-like* w badanych organach.



Ryc. 45. Poziom transkryptu *LIFVE-like* w wybranych organach. Słupki błędów wyrażają odchylenie standardowe otrzymanych wyników.

Egzogennie podany ABA prowadzi do wzrostu ekspresji w liściach dolnych i w części wierzchołkowej, a spadku w ogonkach liściowych. Reakcje liści górnych zależą od wieku roślin i czasu, który upłynął od egzogennej aplikacji ABA.

4.6. Gen *FLK-like*

4.6.1. Identyfikacja genu *LIFLK-like*

```
CCCCCCCCCCCCCGTCCTATGGCTGAAGTTGATTATCAAAGTGGCACAGTTGAACATGAGGACGAGGCAGATCAAATA  
ATTGACAACCTCAGAGCCCCAACAGATTGATCAAGTGGAGGAACCACCAGTTGCCACCACAGGAGGAGGGAAGGAGCATCA  
GCAGCAGCAGCAGTTTCTGCTGAGAAGAGATGGCCAGGGTGGCCCGGAGAGAGTGTGTTCCGTATGTTAGTCCCTGCTCAG  
AAGGTTGGGGGTATTATTGGGCGTAAAGGAGAGTTCATCAAGAAAATCGTTGAAGAGACACGAGCTCGCGTTAAAATCTCT  
GATGGCCCCCTGGAACCTCAGAAAGGGCTGTAATGGTATCGGGGAAAGAGGAGCCTGATTCTTCTCTCCTCCTGCTGTG  
GATGTTTTATTGAGGTTTCATAAACGGCTCATTGACGGTTTAGAGAGTGATTTTTCTCATGCTCCTTCAGGTGTGGTGGG  
AAGTTTTCTACAAAACCTCTAGTGCCAGCCTCACAAGCAGGAAGTTAATTGGGAAACAAGGAGGAACGTAAAATCTATA  
CAAGAAGCATCAAATTGTATTGTTAGAGTTCTCGAGCAGAAGACCTGCCTATATTGCTCTTCAAGATGATAGGGTAGTT  
GAAGTAGTTGGGATTCTACTGCGGTGCATCAGGCAATCAAGCTAATTGCTTCCCACCTAAGGAAGTTTTAGTTGATCGC  
AGTATAATTCCAATTTTTGAGATGAATATGCAAATGGCAAATTCCTCGTGGTCATCACGTGGAGCAGCACATGCCACCTCCT  
CACCAATCATGGGTCCACCTCAGGGTCTTCTCATCCAAATGCTGGTGGAGGTCTGGCTTTGGACCCACTCCTCAATAC  
ATGCCACCTCCACGACAGCTTGATAGTTACTATCCACAGCCTGAAATGCCTCCTCCGGTGGAGAAAACAGCCCCATCATGGT  
ATATCTGCCTACGGAAGAGATGCTTCAATGGGTGTTTCATGCACCTTCAAATACCCAATCAGCACCTTCGGTAGTCACACAG  
ATCACACAGCAAATGCAAATTCCTCTATCTTATGCAGATGCTGTTATTGGAACAGCTGGTGCAAGTATAAGCTATATAAGA  
CGAGCTAGTGGAGCTACTGTTACTATACAAGAAACCAGAGGTGTTCCCTGGGGAGATGACAGTTGAAATCAGTGGGACTGCT  
TCTCAAGTCCAAACAGCACAGCAACTGATACAGAATTTTATGGCTGAAACTGCAGCACCAACACAGCAACAAACAGCTGGG  
CCTCCTGCAGATCAAGGATACAATGCTTATCCAGCTCATACTTCTGTCTACACATCTCCACCAGCCAACCCTGCAGGACAA  
GTTGGAGGAGGCCATGGCTCAATTTATGGTGCAAATATGGGTACTAAGCTAGGGGCAATGCAACTAAATCTTCCCATTAT  
TGAATGGATAATGCTGGGATCAGCTTGTGTGCTATTTTATAAATTACAACGACATTTTGCTAAATGCTTTGTTTCTAAAT  
TATATACAAAAAATGTCATTTTGTGGACAAAATAGTATTCGGATTACTGGTAGTGATTGGGAATGTTAAAACAGAC  
TATTTGTGGTCTTGTGTGTAGTGTGTTGTGTGTGTCATCTATCTAGTATGATAGAGCAGAGACATAATGTTGCTGTTT  
GATCTATGTAATCATTCTGTCTACTAGGACTACAACAACCTATGCCACTTAGTTTTGCAAAAAC TAGAAGCTGGTTAAAT  
ACTAGGGGAAGTGAACAAAGGAAAAATGCATATGGGTGAAATGTCACTGAGCCTAATCTTTTAAAGACTGAGGTCTAA  
ATAGAATGTCAATCAGCATCATGCCTCTTAGCCTTAGCCTTAGGCAATAAAGCAAATCACGTTTTTCATTATTTTGTGGAG  
ATTCCTTTTTTAACTAACCAT
```

Ryc. 46. Sekwencja nukleotydowa genu *LIFLK-like* o długości 1967 nt. Kolorem **żółtym** zaznaczono 1401nt sekwencję kodującą przewidywane białko LIFLK-like.

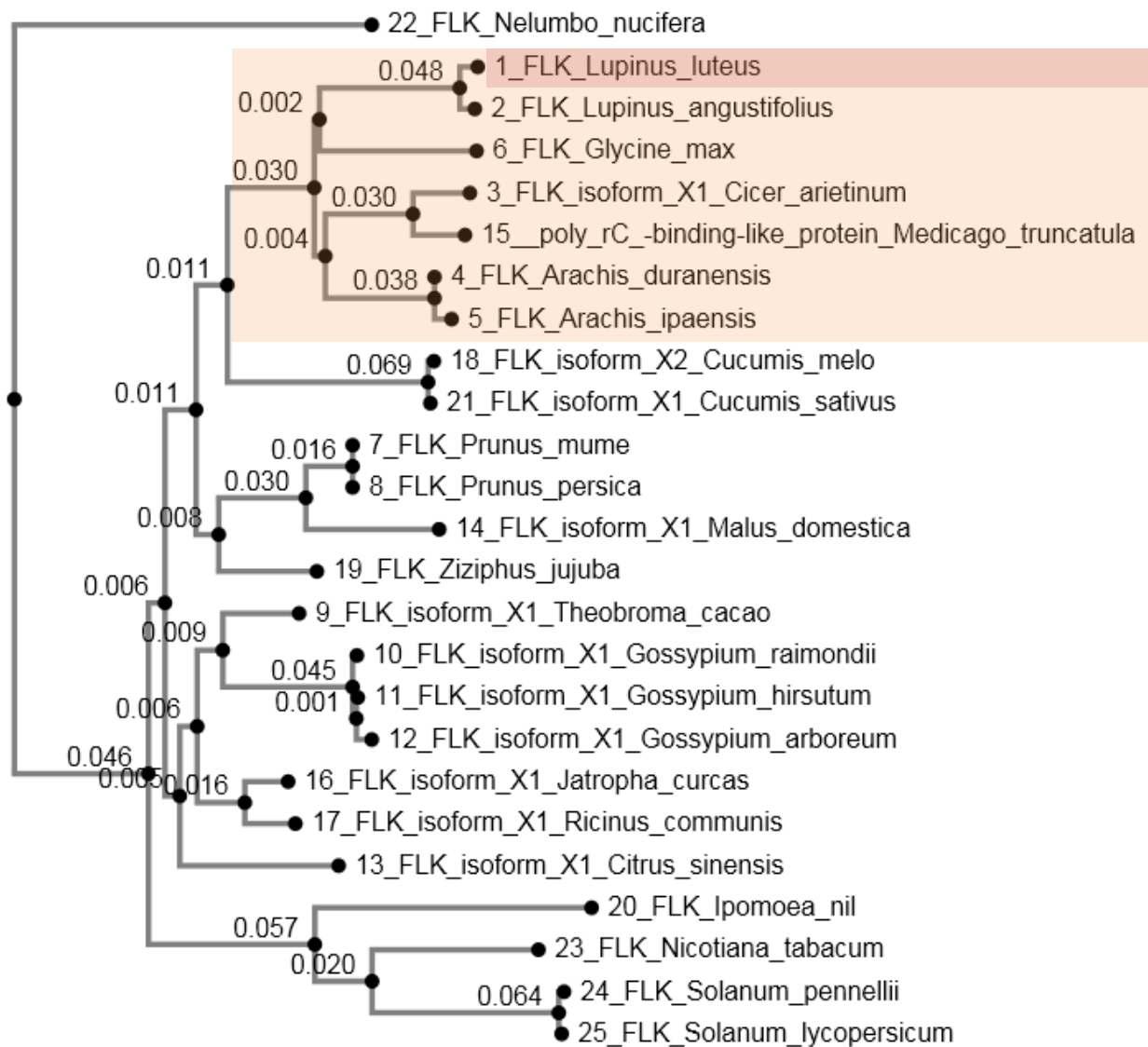
Kolejnym z badanych homologów genów szlaku autonomicznego występujących u łubinu żółtego był *LIFLK-like*. Przeprowadzone badania pozwoliły zidentyfikować sekwencje kodujące tego genu liczącą sobie 1401nt (Ryc. 46). Zidentyfikowano także fragmenty przyległe do niej z całości zidentyfikowanej sekwencji wynosi 1967nt. W przeciwieństwie do wcześniej analizowanych genów nie wykonano analizy ekspresji *LIFLK-like*.

4.6.2. Analiza przewidywanego białka LIFLK-like

Na podstawie rozpoznanej sekwencji nukleotydowej wytypowano przewidywaną sekwencję aminokwasową białka LIFLK-like (Ryc. 47) oraz poddano ją analizie bioinformatycznej.

MAEVDYQSGTVEHEDEADQIIDNSEPQQIDQVEEPPVATTGGGEGASAAAASAEKRWPGWPGESVFRMLVPA
 QKVGGIIGRKGEFIKKIVEETRARVKILDGPPGTSERAVMVSQKEEPPDSSLPPAVDGLLRVHKRLIDGLESDF
 SHAPSGVGGKVESTKLLVPASQAGSLIGKQGGTVKSIQEASNCIVRVLGAEDLPIFALQDDRVEVVDSTAVH
 QAIKLIASHLRKFLVDRSIIPIFEMNMQMANSRGGHVEQHMPPPHOSWGGPPQGLPHPNAGGGPGFGPTPQYMP
 PPRQLDSYYPQPEMPPVVEKQPHHGISAYGRDASMGVHAPSNTQSAPSVVTQITQQMQIPLSYADAVIGTAGA
 SISYIRRASGATVTIQETRGVPGEMTVEISGTASQVQTAQQLIQNFMAETAAPTQQQTAGPPADQGYNAYPAH
 TSVYTSPPANPAGQVGGGHGSIYGANYGY

Ryc. 47. Przewidywana sekwencja aminokwasowa białka LIFLK-like o długości 467 aminokwasów. Kolorem żółtym, w pozycjach 64-131 aa, 156-225 aa i 344-408 aa, zaznaczono 3 domeny KH. Kolorem zielonym, w pozycji 261-314 aa, zaznaczono region bogaty w prolinę. Kolorem błękitnym, w pozycjach 7-28 aa oraz 409-460 aa, zaznaczono regiony bogate w glutaminę.



Ryc. 48. Drzewo filogenetyczne dla białka LIFLK-like opracowane w oparciu o sekwencje aminokwasowe białek kodowanych przez geny homologiczne innych gatunków roślin. Kolorem zaznaczono gatunki roślin należące do rodziny bobowatych. Kolorem

zaznaczono zidentyfikowaną sekwencję. Wykaz użytych sekwencji wraz z Accession Number: FLK *Lupinus luteus* zidentyfikowana sekwencja, FLK *Lupinus angustifolius* XP_019419737.1, FLK isoform X1 *Cicer arietinum* XP_004494715.1, FLK *Arachis duranensis* XP_015968477.1, FLK *Arachis ipaensis* XP_016205402.1, FLK *Glycine max* XP_003554712.1, FLK *Prunus mume* XP_008218287.1, FLK *Prunus persica* XP_007204990.1, FLK isoform X1 *Theobroma cacao* EOY11034.1, FLK isoform X1 *Gossypium raimondii* XP_012492805.1, FLK isoform X1 *Gossypium hirsutum* XP_016713232.1, FLK isoform X1 *Gossypium arboreum* XP_017631272.1, FLK isoform X1 *Citrus sinensis* XP_006487774.1, FLK isoform X1 *Malus domestica* XP_008370717.1, poly(rC)-binding-like protein *Medicago truncatula* XP_013450538.1, FLK isoform X1 *Jatropha curcas* XP_012089292.1, FLK isoform X1 *Ricinus communis* XP_002521945.1, FLK isoform X2 *Cucumis melo* XP_008456230.1, FLK *Ziziphus jujuba* XP_015875416.1, FLK *Ipomoea nil* XP_019197169.1, FLK isoform X1 *Cucumis sativus* XP_004139248.1, FLK *Nelumbo nucifera* XP_010274156.1, FLK *Nicotiana tabacum* XP_016462448.1, FLK *Solanum pennellii* XP_015059413.1, FLK *Solanum lycopersicum* XP_004230074.1.

W przewidywanej sekwencji aminokwasowej białka LIFLK-like zidentyfikowano 3 domeny KH w pozycjach 64-131 aa, 156-225 aa i 344-408 aa zawierające motywy G-X-X-G oraz miejsca wiązania kwasów nukleinowych. Ponadto odnaleziono regiony bogate w prolinę w pozycji 261-314 aa oraz glutaminę w pozycjach 7-28 aa oraz 409-460 aa. Podobnie do poprzednich analiz także i te wykonane w przypadku opisywanego genu wykazują wysoki stopień zachowywania ewolucyjnego zwłaszcza w obrębie wytypowanych domen.

Porównanie to wykazało największą identyczność z sekwencją białka FLK-like opisanego u łubinu wąskolistnego i wynosiła ona 97% (Ryc. 48). Dla porównania dla soi uprawnej uzyskano homologię na poziomie 85%, a dla pozostałych gatunków roślin strączkowych wynosiła co najmniej 77%. Dla reszty analizowanych gatunków nie przekraczała 81%, ale była również nie niższa niż 70%.

4.7. Gen *LD-like*

4.7.1. Identyfikacja sekwencji kodującej *LILD-like*

W wyniku przeprowadzonych reakcji RACE PCR ustalono sekwencje nukleotydową odpowiadającą cDNA genów homologicznych z *LUMINIDEPENDENS*. W wyniku przeprowadzonych amplifikacji oraz w następnej kolejności sekwencjonowań wyznaczono odcinek zawierający 3742 nukleotydów (Ryc. 49). W obrębie tej sekwencji zidentyfikowano pełnej długości cDNA kodujący homolog LD-like występujący u łubinu żółtego.

GCTGAATCTCGAACAAGGTATATTTCTCTCTCATCGCACTCCAAACACTCTCTATCTAACTTTCTCTCTCCAA
AATTTGCACCGAGAAAACCCTAATCTGCGACATAGACCGTGTATTATGATTCAATTTCAATTTCAATTCGCTGTT
GAATGTGTATTTTCGCGAACACTTATTACTTTTCAATCCTTGTATTATTAACGATGGAGGTTTTCCAACGACGAT
TTCATGGAGGTGGAGATTGGAAGCTCCGTGGAATCGTTGCAGAACTTTTTGGCTTCGCAGAGAGATCTATTTT
ATAGCCAGATCGATCAGTTTTCAACAAATTGTTGTGCAGCAATGCAAACCTACCGGTGTTAATCCTCTCTCTCA
AGAAATGGCAGCTGGTGCSTTTATCAATAAATATCGGAAAAAGACCTAGGGATTTATTAACCCAAAGGCTGTA
AATTACATGCAATCAGTTTTTTCTATTAAAGATGCCATTAGCAAGAAAGAATCTCGTGAGATCAGTGCTTTAT
TTGGTATCACGGTGAACAGGTGCGTGACTTTTTTGTAGTCAACGTTCAAGAGTAAGGAGACTAGTTCAGTT
GTCAAGAGAGAGGGCGTTAATATCTAATCTTGTGAAGAATCTCATGATGGACAGATAAACTCTGATGATCCT
ATGAGACCAATAAATCCAGTTCCCTTGAACCTCTGTTGGTCCCATAAATGCGGAGGAAGCATCTTGTTCACAC
AAGAAGCAACTTTGTCTGGTCTAGATGGCTTAGATAAACAGTTTTGTTGATAACATTTTTAGTCTAATGCAGAA
AGAGGAAACATTTTCTGGGCAGGAGAAATTGATGGAGTGGATATTGACTGTGCAAAATTTGTAGTATTGTTG
TGGTTTTTGACCAGAGGTGGTGTATGATTTTAGCAACTTGGTTGAGTACAGCAGCTATTGAAGAGCAAACAA
GTGTCCCTTCTTATCTTAAAGGTTCTTTGTCAATTTGCCTTTACATAAAGCCCCTCCCGCACAAATATCAGC
TATATTGCAGAGTGTAAATAGACTGCGGTTCTACAGAACCTCAGACATTTCAAACAGGGCAAGAGTTTTGTTA
GCAAAGTGGAGCAAATTACTAGCAAGGAACCAAGCAATAAAGAAACCTAATGGTGTAAATCTTCTAGTGATG
GTAAAAGAGAAACAATGCTTTCTCATAGTATTGGTCAAATTATGGGATCTGAATCATGGCATTCAAATGTTGA
TGTTCCCTGAAGATATTCTTGCTCTCTCAAATGAATGTTCCGATAATCTCAGGAAAAATGGAACCACTGCAAGTT
TTGAAATGTTGCCATCTTGCTCGGATGATTCAAATAAGAAGCCTGGCCTTGGTTTTATCTTCATCGCAATTC
GCGAGCGCAGAAAAGTGAATTTGGTGGAACAGCCAGGTCAAAAAACAGGAAGCAGAAGCCACAGGCAGCAAC
GACAAGCCTGTTACTCAAGGCCGTCCCATGTCTGCTGATGATATCCAGAAAGCAAAAATGCGTGCCTATTT
ATGCAGAGTAAGTATGGGAAAACGGTCTGCAAAAGAAAGTAAAGGAGCAAAGATTAATGGTCTGAATAAAC
CTCAGACAAATCAGGCAAGTATTTAGCTTCTTCTAAAGTTCTTCCACTCAAATTTGAAGAAGACAA
GAAATCTCCACCGCTTCCCTCCAAAATCACTAGTAGGTGGAAGCTTCTTATTCTAACCTGAAAATGGATTTG
AAGGAACCTCTCTGGGAGAAGTGAAGAGGGTGAATCCCATGGAAGACTCCAGCAGAAGTGATCATTGATG
GTAGCTGGAGAATTGGTGTGGTCAAATAGCAAAGAGGTTGATGTGGAGAAAAACAGAAACCGCAGGGATAA
GGAACTATCTACCAATCTATCCAAGAGATGCCATCTAATCCGAAGGAGCCATGGGACATTGAAATGGACTAT
GATGACACTTTGACACCAGAGATCCCTATTGAACAACCTACCAGATGATGACGGTGTGGTGCAGGATAGAAA
TTGACCCTAATCAGGTTGCAATTCATGATGTTCAAGTTCAAGGGTAGCTACCACATCTTCAAATGGTAATAA
TAATGCAGTTACTGCTGAACCTGATTTAGAGCTTCTTGCTGTGCTTCTAAAAAATCCAGAGTTGGTATTTGCC
TTAACTTCTGGACAAGCTGGTAGCATAACAAATGAGGATACAGTGAAGTTGCTTGACATGATCAAAGTGGTG
GGTTGAACTTGAGTGGTTTTAAGTGAATAAATGCAAATGCAAATACAAATACAAATGACAATTATGGCATGAG
TGCAAAGGCCCCAGAGACAGTGGAAAGTTTTCTCTCCCATCCCCAACTCCTTCAAGTAATCCAAGAACGAGTGG
TGGAGCACAGAAGCATCTTGAAGAATCCATTTTCACGGCAAAGCTTACCAACTGATAGAATTATCCACAAC
CCTCCACTGTGGTAACTACCAACTTATTATCTCAGATTCGGGCTGCTGACAATATGGTAAGGCAACAGCCACC
AACATTTGCGCTACAATCATCGAAGCAGATTACTGGCGCTGCAGTTTCACGCTATTCACTGCCTCAGGCAACC
AATGTTTTTCTGAAAGGCAACCACCACATGCTCTTTCTCTGTGCATATACAAACACCATCGCCGGAAATAG
GTTTAGCAACCATGAAGAAGAACATAATCGGTGCAAATGCATCTTCCGCTAACTTACCTGGTGCACATTCACC
ACTAGCAATGCAGGTTGATGGCACTAGTAATGTAAGACCAGTACCTAAATTGAGTGTACAAGAGGGTGTGTCT
AATTCATACCCACAATACTCCATGTTGACCTCACAAACACCATCACTTCCGGCCACACAGCAACATAGACATG
CTGCACATTTGATGCAGCAACAACAACAGACCCATTTCTCTGAACCTTCATACCATAGTAACACTCTACATTC
ATATCAACCACAAATGAAAAACCAGGTCCAGTATCAGATGTATGGAGAGTTAGGCAAAATGGCATGCCATCA
AGTTATCATCAATCTGAAAGAAACCAAACAGTATAACAACACATTGGTTGGGAGATCCATGCAATCTAGTT
CTTCATGGGATAGAAATAATCATGGTAGTAGTAGTAGTAGGGGAAGGATTTGAAACATGGAGCCCTGAGAA
TAGTCCAACTAGAAATCCTAGCCATGTTCCAGGTAGAAATTTCAAGTGAATCCAGAATGAATGATAATCATGGA
AGAAATGTTAGACCTGAATGGTCAAGGCAACAGAGGGGTTCTTCTGGATACTGGGATCCTGCTAGGCAGGGGA
ACAAAAAATGGAATGATCAGAGAAGAATGATTCTTTGTTACATGAACACTGTTGCAGTGTGAAGATTGTCATGA
GTTTACTTGTGTTGCAACTGTAAAATCCAAAAAATATCTAAATCTAAACTATGAAATCAAGATTACAAGAAA
TTATTGCATGTTGTTTCAATCACATCTTCATCATTGATTCAAATAAATTTAGTTAATTTTAAATCATTGGTG
CATTATTAGTTGGGATGGTGACTCTGGATAATGTAATAAATTTATCCTTGTATGCCCCAAAAGGACTGTTTTT
TCATTCACCTTATGTATCTTCATGAATCTAAGTATAGTTAGGTATTTTTAGTGCTCTTGACTTGAATTTGATG
AGAAATACTAAAACTAAC

Ryc. 49. Sekwencja nukleotydoma genu *LILD-like* o długości 3742 nt. Kolorem **żółtym** zaznaczono 3186 nt sekwencję kodującą przewidywane białko LILD-like.

W przeciwieństwie do wcześniej analizowanych genów nie wykonano analizy ekspresji *LILD-like*.

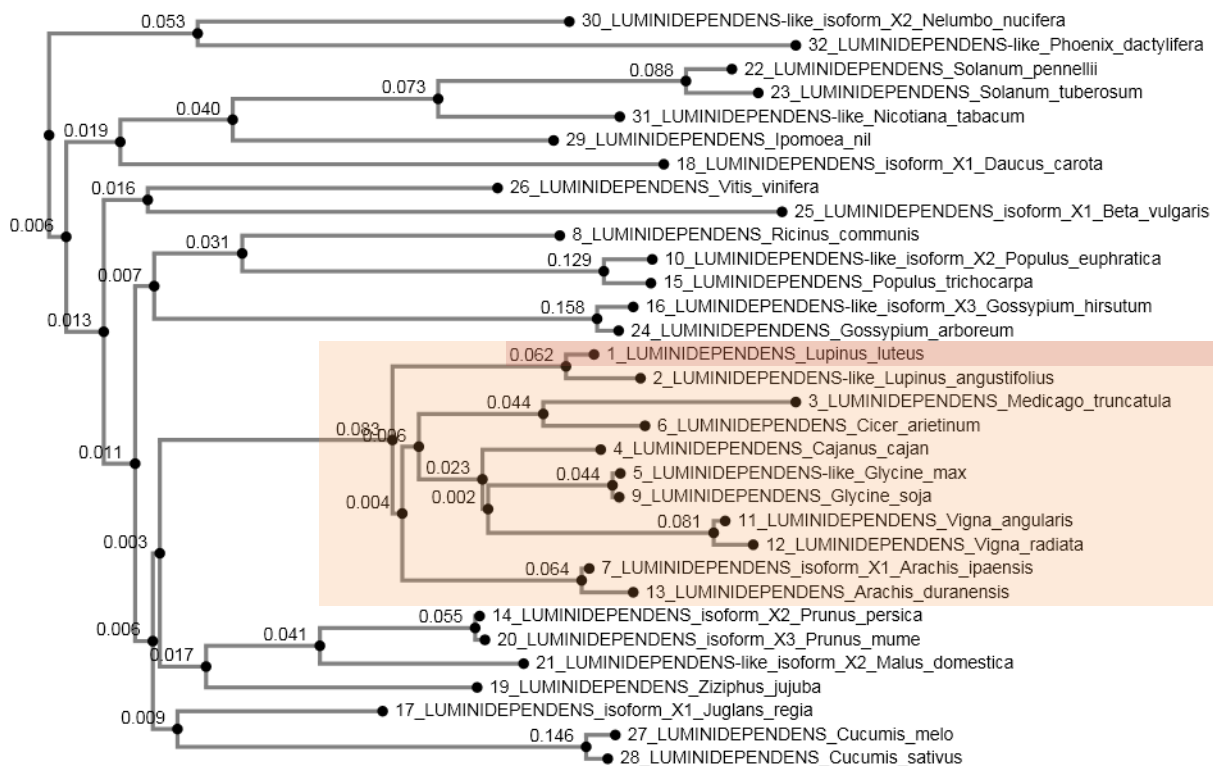
4.7.2. Analiza przewidywanej sekwencji białkowej LILD-like

MEVSNDDFMEVEIGSSVESLQNFLASQRDLFHSQIDQFQQIVVTQCKLTGVNPLSQEMAAGALSINIGKRPRD
LLNPKAVNYMQSVFSIKDAISKKESREISALFGITVKQVRDFFASQRSRVRLVQLSRERALISNSCEESHG
QINSDDPMRPINPVLNSVGPINAEASCSTQEATLSGLDGLDKQFVDNIFSLMQKEETFSGQEKLMEWILTV
QNFVLLWFLTRGGVMILATWLS TAAIEEQTSVLLILKVLCHLPLHKAPPAQISAILQSVNRLRFYRTSDIS
NRARVLLAKWSKLLARNQAIAIKKPNGVNSSSDGKRETMLSHSIGQIMGSESWHSNVDVPEDILALSNECSDNLR
KMEPLQVLKLLPSCSDDSNKKPGLGLSSSQFRERRK VQLVEQPQKGTGSRSPQAATTRPVTQGRPMSADDIQK
AKMRALFMQSKYGKTGPAKESKGAKINGLNKQTNQASISACSSKVPLPLKIEEDKKSPLPSKITSRSEASY
SNLKMDLKEPLWEKCKRVQIPWKTPAEVIIDGSRIGVQNSKEVDVEKRNRRDKETIYQSIQEMPSNPKEP
WDIEMDYDDTLTPEIPIEQLPDDGDGAEIEIDPNQVAIHVQVQGVATTSSNGNNNAVTAEPDLELLAVLLK
NPELVFALTSGQAGSITNEDTVKLLDMIKSGGLNLSGLSENNANANTNTNDNYGMSAKAPETVEVSLPSPTPS
SNPRTSGWSTEASSKNPFSRQSLPTDRIIHNSSTVVTNLLSQIPAADNMVRQPPPTFALQSSKQITGAAVSR
YSLPQATNVFPERQPPHALSSVHIQTPSPEIGLATMKNIIGANASSANLPGAHSPLAMQVDGTSNVRPVPKL
SVQEGVSNSYPQYSMLTSQTPSLPATQQHRHAAHLMQQQQQTHFSEPSYHSNTLHSYQPQIEKPGVSDVWRV
RQNGMPSSYHQSERNQYNNTLVGRSMQSSSSWDRNNHGSSSSSREGFETWSPENSPTRNPSHVPGRNFSES
RMNDNHGRNVRPEWSRQQRGSSGYWDPARQGNKKWNDQRR

Ryc. 50. Przewidywana sekwencja aminokwasowa białka LILD-like o długości 1062 aminokwasów. Kolorem **żółtym**, w pozycji 66-126 aa, zaznaczono domenę HOX / Homeodomain / Homeobox. Kolorem **błękitnym**, w pozycji 385-401 aa, zaznaczono dwuczęściowy sygnał lokalizacji jądrowej. Kolorem **zielonym**, w pozycji 243-306 aa, zaznaczono N-końcową domenę czynnika elongacji transkrypcji S-II.

U badanego gatunku wyznaczono przewidywaną sekwencję aminokwasową peptydu liczącą 1062 aminokwasy. W jej obrębie zidentyfikowano zachowywane ewolucyjnie domeny (Ryc. 50). Zlokalizowano także dwuczęściowy sygnał lokalizacji jądrowej. Łącznie występowanie rozpoznanych motywów może wskazywać na udział LILD-like w procesy związane z polimeryzacją RNA.

W przewidywanej sekwencji aminokwasowej białka LILD-like zidentyfikowano domenę HOX w pozycji 66-126 aa wiążącą DNA odpowiedzialną za regulację transkrypcyjną kluczowych procesów rozwojowych. Ponadto odnaleziono charakterystyczny dwuczęściowy sygnał lokalizacji jądrowej w pozycji 385-401 aa. Funkcja N-końcowej domeny czynnika transkrypcyjnego elongacyjnego S-II w pozycji 243-306 aa przy współudziale z polimerazą II RNA jest związana z wiązaniem, cięciem i polimeryzacją RNA.



Ryc. 51. Drzewo filogenetyczne dla białka LILD-like opracowane w oparciu o sekwencje aminokwasowe białek kodowanych przez geny homologiczne innych gatunków roślin. Kolorem zaznaczono gatunki roślin należące do rodziny bobowatych. Kolorem zaznaczono zidentyfikowaną sekwencję. Wykaz użytych sekwencji wraz z Accession Number: LUMINIDEPENDENS *Lupinus luteus* zidentyfikowana sekwencja, LUMINIDEPENDENS-like *Lupinus angustifolius* XP_019440851.1, LUMINIDEPENDENS *Medicago truncatula* XP_013450339.1, LUMINIDEPENDENS *Cajanus cajan* XP_020211335.1, LUMINIDEPENDENS-like *Glycine max* XP_006577137.1, LUMINIDEPENDENS *Cicer arietinum* XP_004494351.1, LUMINIDEPENDENS isoform X1 *Arachis ipaensis* XP_016205166.1, LUMINIDEPENDENS *Ricinus communis* XP_015575659.1, LUMINIDEPENDENS *Glycine soja* KHN28216.1, LUMINIDEPENDENS-like isoform X2 *Populus euphratica* XP_011033582.1, LUMINIDEPENDENS *Vigna angularis* XP_017418614.1, LUMINIDEPENDENS *Vigna radiata* XP_014495914.1, LUMINIDEPENDENS *Arachis duranensis* XP_015969024.1, LUMINIDEPENDENS isoform X2 *Prunus persica* XP_020426188.1, LUMINIDEPENDENS *Populus trichocarpa* XP_002321023.1, LUMINIDEPENDENS-like isoform X3 *Gossypium hirsutum* XP_016697552.1, LUMINIDEPENDENS isoform X1 *Juglans regia* XP_018835439.1, LUMINIDEPENDENS isoform X1 *Daucus carota* XP_017253167.1, LUMINIDEPENDENS *Ziziphus jujuba* XP_015891991.1, LUMINIDEPENDENS isoform X3 *Prunus mume* XP_016650853.1, LUMINIDEPENDENS-like isoform X2 *Malus domestica* XP_008386640.1, LUMINIDEPENDENS *Solanum pennellii* XP_015088490.1, LUMINIDEPENDENS *Solanum tuberosum* XP_006359408.1, LUMINIDEPENDENS *Gossypium arboreum* XP_017615515.1, LUMINIDEPENDENS isoform X1 *Beta vulgaris* XP_010684373.1, LUMINIDEPENDENS *Vitis vinifera* XP_010652054.1, LUMINIDEPENDENS *Cucumis melo* XP_008451616.1, LUMINIDEPENDENS *Cucumis sativus* XP_011659347.1, LUMINIDEPENDENS *Ipomoea nil* XP_019164258.1, LUMINIDEPENDENS-like isoform X2 *Nelumbo nucifera* XP_010269459.1, LUMINIDEPENDENS-like *Nicotiana tabacum* XP_016449138.1, LUMINIDEPENDENS-like *Phoenix dactylifera* XP_008810783.1.

Porównanie wyselekcjonowane przewidywane sekwencji peptydowej omawianego białka z homologami występującymi u innych gatunków roślin wykazało najwyższe podobieństwo do LD-like z łubinu wąskolistnego i wynosiło ono 93% (Ryc. 51). Dla porównania u soi uprawnej opisano homolog dzielący jedynie 72% identyczności z potencjalnym białkiem z łubinu żółtego. Wśród pozostałych gatunków roślin strączkowych homologia ta wynosiła co najmniej 67%. U mniej spokrewnionych z łubinem żółtym roślin podobieństwo nie przekraczało 52%, ale była również nie mniejsze niż 43%.

5. Dyskusja

Wbrew temu, co sugeruje nazwa, szlak autonomiczny nie jest do końca całkowicie niezależny od innych czynników determinujących kwitnienie. Wykazano, że w większości przypadków współdziała on z genami funkcjonującymi w ścieżce zależnej od wernalizacji, wrażliwej na temperatury otoczenia czy zmiany homeostazy hormonalnej (Jung i in. 2012, Lee i in. 2015, Sugawaraa i in 2009). Wykazano również, że autoregulacja FCA, ważnego białka szlaku autonomicznego, może być modulowana przez czynniki nie należące bezpośrednio do szlaku. Do takich czynników zaliczamy chociażby białko PCFS4, które promuje alternatywną poliadenylację w obrębie intronu 3, co prowadzi do wzrostu ekspresji transkryptu FCA β kosztem FCA γ (Xing i in. 2008). Okazuje się również, że rola samego FCA nie ogranicza się tylko do regulacji poziomu *FLC*. Według zakładanego modelu FCA, FPA, FLD oraz FVE współdziałają w kontroli transkryptomu, jako część zależnego od RNA mechanizmu wyciszania ekspresji wielu genów na poziomie remodelowania chromatyny. Analiza pojedynczych i podwójnych mutantów tych genów wykazała wzrost ekspresji transpozonu DNA *AtMu1*. Ekspresja elementu ruchomego IG/LINE podlega podobnym regulacjom. Mutacja w obrębie 4 powyższych genów prowadzi do derepresji retro elementu *AtSN1* (Bäurle i Dean 2008), co potwierdza udział białek szlaku autonomicznego w mechanizmach regulacji aktywności transkrypcyjnej elementów niezwiązanych z kontrolą rozwoju generatywnego. Ponadto aktywność tych białek obserwuje się już na etapie rozwoju juwenilnego.

Obserwacje pokazują, że szlak autonomiczny może być zależny od fitohormonów. Wykazano, że czynnik transkrypcyjny BRASSINAZOLE RESISTANT1 (BZR1), aktywowany w obecności brasinosteroidów wykazuje negatywny wpływ na poziom transkryptu FLD. Aktywacja innego białka PATTERN TRIGGERED IMMUNITY (PTI) w odpowiedzi systemicznej na patogen prowadzi do uruchomienia BOTRYTISINDUCED KINASE1 (BIK1), który jest supresorem BRZ1. Efektem końcowym tych zdarzeń jest wzmożona ekspresja FLD. Zaobserwowano także, iż CYCLOPHILIN CYP20-2 wiążąc się z BRZ1 prowadzi do degradacji obu białek. Dezaktywacja BRZ1 umożliwia ekspresję FLD i prowadzi do indukcji kwitnienia (Banday i Nandi 2015, Zhang i in. 2013). Jest to kolejny zaproponowany hipotetyczny model funkcjonowania sygnalizacji hormonalnej w mechanizmach indukcji kwitnienia angażujących elementy szlaku autonomicznego.

FLD bierze udział w regulacji ekspresji genów WRKY w odpowiedzi systemicznej na patogen, podczas której dochodzi do wzrostu ekspresji WRKY6 i WRKY29, na drodze remodelowania chromatyny. Mechanizm jest dość zagadkowy, ponieważ FLD jest demetylaza, a w obrębie promotorów tych genów dochodzi do metylacji histonów

H3K4me2. Według hipotezy Singh i in. 2014 aktywność FLD prowadzi do wyciszenia ekspresji innej nieznanej demetylazy odpowiedzialnej za demetylację histonów loci WRKY6 i WRKY29. Wspomniane geny docelowe są zaangażowane w procesy odpornościowe roślin na patogen, indukcji SAR, generowaniu mobilnego sygnału SAR i jego ekspansji w tkankach. Ponadto FLD bierze udział w utrzymaniu podstawowego poziomu ekspresji WRKY38, WRKY65 i WRKY53 oraz odpowiada za zmiany poziomu transkryptów wszystkich trzech genów w odpowiedzi systemicznej (Singh i in. 2014).

Uzyskane w niniejszej pracy wyniki potwierdzają wpływ dodatkowych czynników fizycznych i chemicznych na ekspresję badanych genów szlaku autonomicznego u łubinu żółtego. Wskazują także na potencjalny udział kodowanych przez nie białek w przebiegu szeregu procesów fizjologicznych zachodzących w trakcie ontogenezy badanego gatunku.

5.1. Identyfikacja genów szlaku autonomicznego u łubinu żółtego

W wyniku przeprowadzonych analiz zidentyfikowano 7 genów szlaku autonomicznego u *L. luteus*. Nie zidentyfikowano pozostałych genów ze względu na ich niejednoznaczną kwalifikację, jako klasycznych elementów szlaku autonomicznego, a w przypadku genu *SDR6* ze względu na niewielką ilość badań – pojedyncza publikacja opisująca funkcję tego genu. Uzyskane sekwencje nukleotydowe zostały wykorzystane do wyznaczenia *in silico* przewidywanej sekwencji aminokwasowej białek kodowanych przez cDNA zidentyfikowanych genów. We wszystkich przypadkach zidentyfikowano domeny charakterystyczne, które są obecne m.in. u *A. thaliana*.

W przewidywanej sekwencji białkowej wyselekcjonowanego u łubinu żółtego homologa FCA zidentyfikowano 2 domeny RRM oraz domenę WWP (inna poprawna nazwa tej domeny to WW). Jak wynika z wielu badań prowadzonych na rzodkiewniku pierwszy z motywów odpowiada za wiązanie RNA. Drugi zaś, zwany także WWP, dzięki specjalnej kieszeni wiążącej, zdolny jest do oddziaływań z białkami podobnymi do FY oraz z nim samym. Dla białka FCA z rzodkiewnika pospolitego wykazano doświadczalnie funkcje tak RRM jak i WWP. Zarówno budowa obydwu rodzajów domen jak również ich topografia w strukturze białka opisanego u *L. luteus* są podobne do homologicznych sekwencji opisanych u innych gatunków roślin zwłaszcza roślin strączkowych. Domeny odpowiedzialne za wiązanie RNA znajdują się bliżej końca N LIFCA-like, natomiast w końcu C położona jest domena WWP. W badaniach prowadzonych na *A. thaliana* wykazano bezsprzecznie, że do prawidłowego działania konieczna jest obecność w strukturze białka obydwu domen. Brak którejkolwiek z nich powoduje postanie krótszego, niefunkcjonalnego peptydu. Niemniej jednak wydaje się, że funkcjonowanie

niepełnej długości transkryptów czy peptydów jest niezwykle ważne z autoregulacji biosyntezy czy funkcji białka FCA. Wobec tego konieczne są dalsze badania nad ekspresją omawianego genu, trwałością oraz formą jego transkryptów, a także obecnością w komórkach funkcjonalnego białka oraz niepełnej długości peptydów. Dopiero analiza wszystkich tych danych pozwoli uzyskać kompleksową odpowiedź na pytanie, jakie znaczenie dla kontroli przebiegu całego szeregu procesów życiowych ma białko FCA i w jaki sposób może współdziałać z innymi proteinami w kontroli nie tylko szlaku autonomicznego, ale całego szeregu przemian obserwowanych w czasie ontogenezy roślin. (Macknight i in. 1997, Quesada i in. 2005, Quesada i in. 2003, Simpson i in. 2003).

W obrębie prognozowanej sekwencji białka LIFY-like zidentyfikowano od strony N-końca 7 domen WD40 oraz motyw PPLPP. Domeny WD40 występują w białkach zaangażowanych w wiele procesów komórkowych od transdukcji sygnału i regulacji transkrypcji aż po kontrolę cyklu komórkowego, autofagii i apoptozy. Uczestniczą one także w interakcjach z elementami kompleksów białkowych, których członkiem jest FY. Domeny WD40 są szeroko rozpowszechnione wśród ogromnej liczby eukariotycznych białek np. u *A. thaliana* rozpoznano 218 białek, z czego 111 zawiera 7 domen WD40, a 102 z nich zawierają dodatkowo inne domenę/domeny niż WD40 (Smith 2013). Drugi z elementów, motyw PPLPP, oddziałuje z domeną WW białka FCA. Dokładny mechanizm działania FY jest nieznan, ponieważ mutant null jest letalny. Prace Feng i Michaels 2011 oraz Feng i in. 2011 wykazały, że FY może pełnić dwie zupełnie przeciwstawne funkcje represora albo aktywatora FLC. Zależą one od obecności FCA w komórce. Jeżeli FY zwiąże się z FCA w wspólny kompleks białkowy to wtedy pełni funkcję represora FLC. W drugim wariantcie, jeżeli FY występuje w stanie wolnym niezwiązanym z FCA oraz białko FCA jest nieaktywne w komórce to pełni funkcję aktywatora FLC. Dowodzi to, że obecność motywu PPLPP jest niezbędna do funkcjonowania tego białka. W przewidywanej sekwencji LIFY-like jest zachowany układ domen występujący u *A. thaliana* (Simpson i in. 2003).

W domniemanej sekwencji białkowej LIFLD-like zidentyfikowano domenę SWIRM oraz motyw o aktywności oksydoreduktazy zależnej od FAD zawierający miejsce wiązania FAD/NAD. Domena SWIRM jest odpowiedzialna za wiązanie się tego białka do peptydów wchodzących w skład kompleksu deacetylazą histonów 4 HDA6. FLD w obrębie tego kompleksu pełni rolę demetylazy lizyny H3K4. FLD u *A. thaliana* posiada miejsca wiązania FAD oraz jest oksydoreduktazą. Przewidywane białko LIFLD-like jest podobne do zidentyfikowanego homologicznego białka u *A. thaliana* (He i in. 2003, Luo i in. 2015, Yu i in. 2011).

W obrębie prognozowanej sekwencji białka LIFPA-like zidentyfikowano 3 domeny RMM odpowiedzialne za wiązanie RNA oraz domenę SPOC. Analogiczny układ domen występuje u rzodkiewnika. FPA podobnie jak FCA ulega procesowi autoregulacji, w którym ważny jest układ domen w obrębie białka oraz ich funkcja, co opisano dokładnie w przypadku białka FCA. Domeny RRM są odpowiedzialne za interakcje z RNA, natomiast funkcja domeny SPOC jest nieznana (Hornyik i in. 2010, Sonmez i Dean 2012).

W przewidywanej sekwencji aminokwasowej białka LIFVE-like zidentyfikowano 6 domen WD40 - występujący w białkach zaangażowanych w regulację transdukcji sygnału, transkrypcji i cyklu komórkowego. Identyczny układ domen występuje w białku FVE *A. thaliana*. Zachowanie układu domen umożliwia interakcje z innymi białkami wchodzącymi w skład kompleksów HDAC, CUL4–DDB1^{MSI4}, PRC2 i EZH2 oraz z białkami posiadającymi domeny RRM lub PWWP (Jeon i Kim 2011, Kenzior i Folk 2015, Pazhouhandeh i in. 2011).

W przewidywanej sekwencji białkowej kodowanej przed gen LIFLK-like zidentyfikowano 3 domeny KH. Homologiczne białko u *A. thaliana* posiada identyczny układ domen. Białko FLK bierze udział w obróbce pre-mRNA. Funkcja FLK nie jest do końca ustalona, ponieważ w genomie *A. thaliana* występuje 26 genów kodujących białka posiadające domeny KH wiążące RNA, a tylko niewielka część tych białek została scharakteryzowana (Lim i in. 2004).

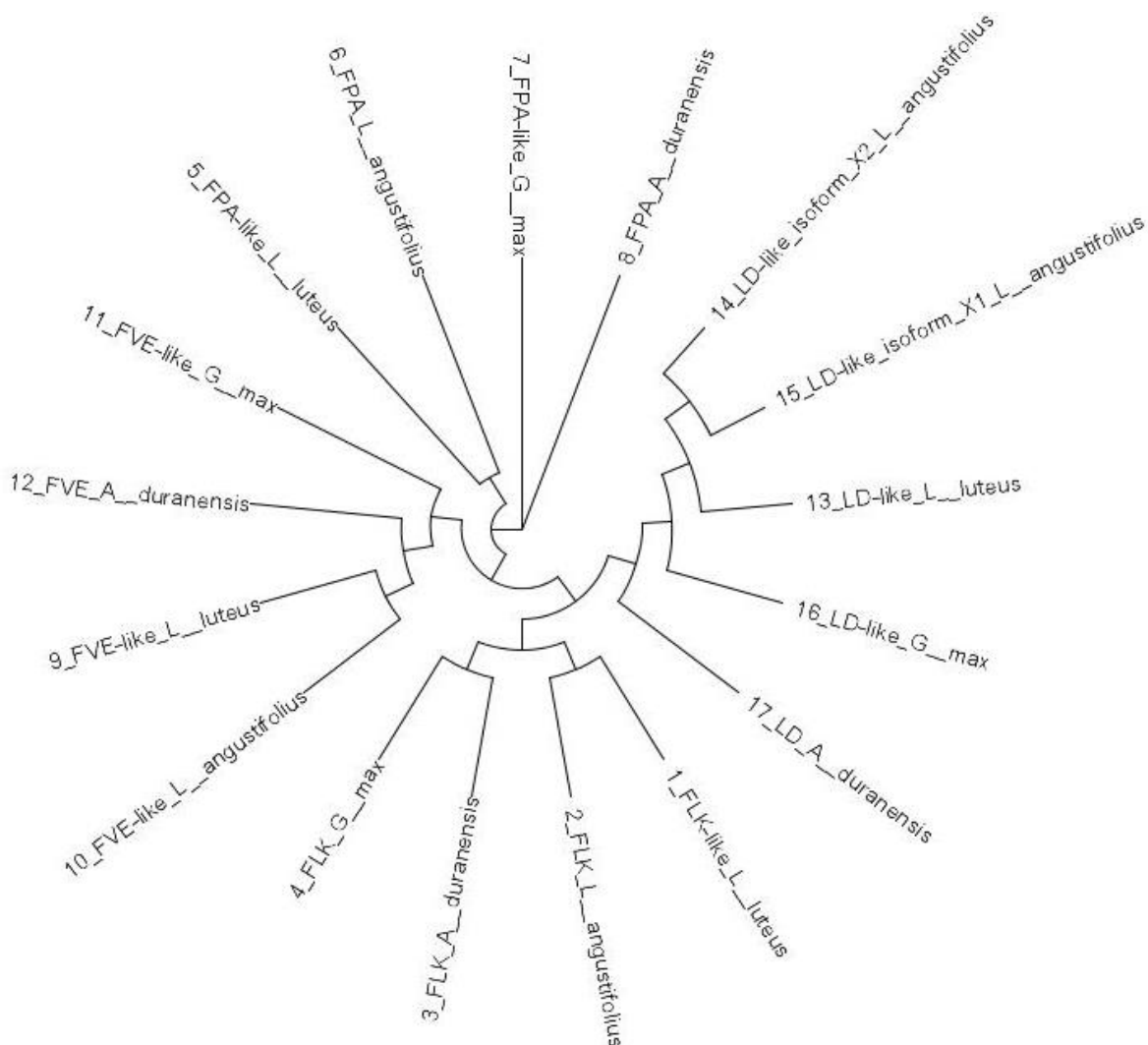
W obrębie domniemanej sekwencji białka LILD-like zlokalizowano dwuczęściowy sygnał lokalizacji jądrowej oraz N-końcową domenę czynnika elongacji transkrypcji S-II. Białko LD u rzodkiewnika posiada podobną budowę jak u LILD-like i zawiera motywy charakterystyczne dla czynników transkrypcyjnych, ale LD nie spełnia definicji klasycznego czynnika transkrypcyjnego, ponieważ posiada zdolności wiązania DNA oraz RNA (Aukerman i in. 1999, Choi i in. 2011, Lee i in. 1994, Kim i in. 2006).

Przewidywane sekwencje białkowe zostały porównane z sekwencjami już zidentyfikowanymi u innych gatunków roślin przy użyciu programu BLAST P. Wybrano sekwencje białkowe, ponieważ ich stopień identyczności z sekwencjami homologicznymi jest wyższy w porównaniu do zdegenerowanego na poziomie nukleotydowym kodu generycznego. W oparciu o te zestawienia stworzono drzewa filogenetyczne, które wykazują największe podobieństwo zidentyfikowanych genów do homologicznych genów łubinu wąskolistnego, a w następnej kolejności do gatunków należących do rodziny bobowatych. Sekwencje cDNA opisane u gatunków roślin spoza tego taksonu wykazują niższe podobieństwo. Ze względu na zastosowaną technikę identyfikacji genów jest niemożliwe jednoznaczne określenie ile izoform danego genu występuje u *L. luteus*.

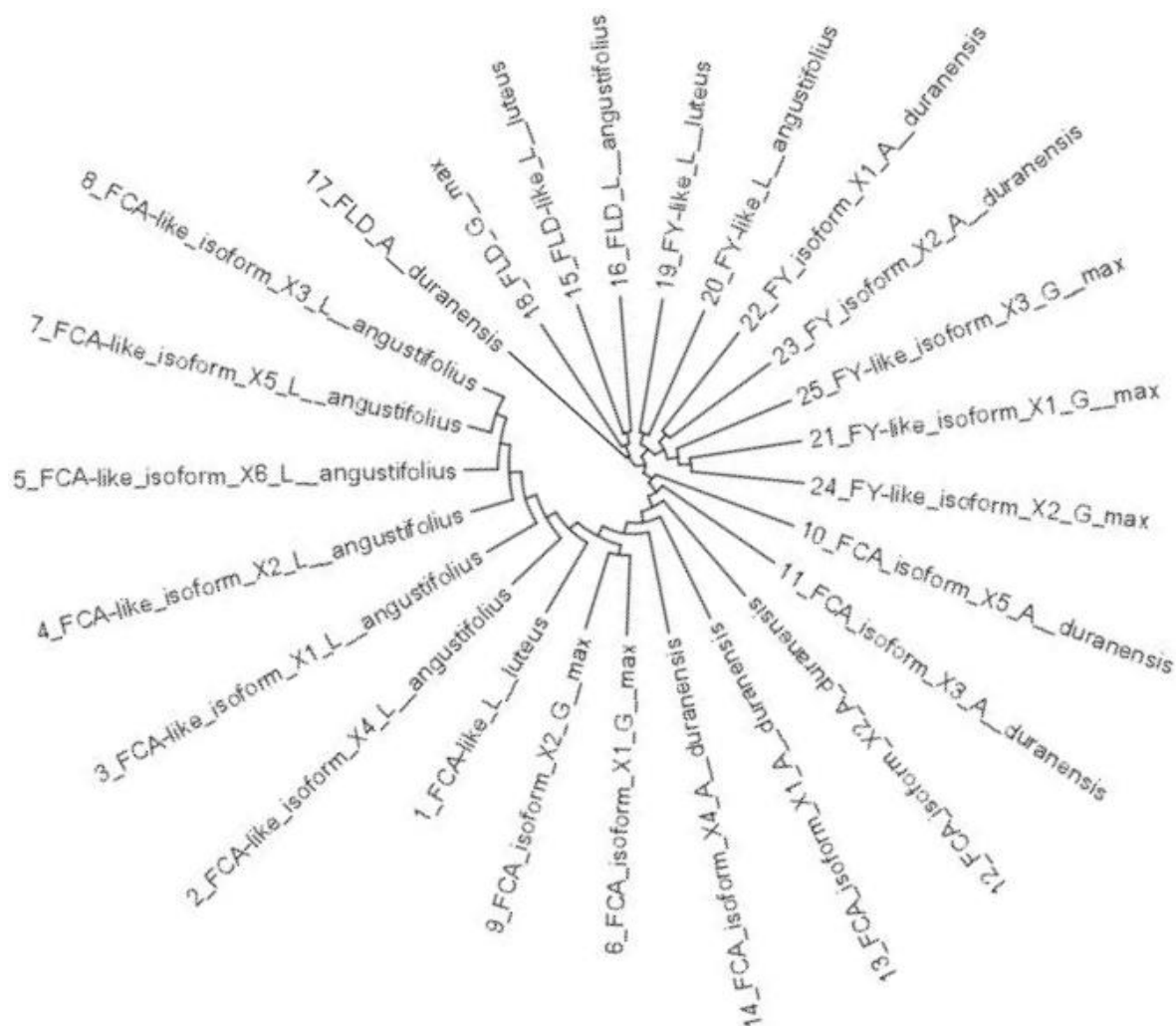
W przypadku genu *FCA* i *FPA* u *A. thaliana* występują odpowiednio 4 i 2 formy transkrypcyjne związane z autoregulacją ekspresji tych genów. W tym celu wykonano porównania zidentyfikowanych genów ze znanymi formami transkrypcyjnymi występującymi u *L. angustifolius*, *G. max* i *A. duranensis* (Ryc. 52 i 53). W przypadku genu *FCA* zidentyfikowana sekwencja jest najbardziej podobna do izoformy 4, a *LD* izoformy 2 zidentyfikowanej u *L. angustifolius*. W przypadku pozostałych genów *FLD*, *FY*, *FPA* i *FVE* u *L. angustifolius* nie występują izoformy tych genów jednakże gen *FY* u *G. max* posiada 3 izoformy, a u *A. duranensis* 2. Gen *FCA* posiada zidentyfikowane izoformy u wszystkich 3 analizowanych gatunków. Zidentyfikowany gen *GmFLD* u soi zastępuje funkcjonalnie białko *FLD* u mutantu *fld A. thaliana* co pozwala stwierdzić, że *GmFLD* jest ontologiem *FLD*. Te wyniki badań potwierdzają również, że komponenty szlaku autonomicznego są ewolucyjnie konserwowane u soi także na poziomie funkcjonalnym (Hu i in. 2014).

Pojawienie się technik biologii molekularnej, w tym sekwencjonowania nowej generacji umożliwiającego analizę całych genomów oraz transkryptomów, z wielokrotnością ilość informacji, jakie w jednym eksperymencie można zdobyć. Ich szczegółowa analiza pozwala, nie tylko odpowiedzieć na znacznie większą ilość pytań, ale umożliwia jednocześnie postawienie wiele nowych bardziej szczegółowych i rozstrzygnięcie bardziej precyzyjne wątpliwości oraz zagadnień, z jakimi boryka się współcześnie badacz biologii doświadczalnej roślin. Jedną z takich technik jest RNA-seq. Została ona wykorzystana w równoległym realizowanym projekcie. Celem eksperymentu była identyfikacja oraz aktywność transkrypcyjna genów w liściach oraz wierzchołkach wzrostu łubinu żółtego w kolejnych etapach wzrostu roślin. Do przygotowania bibliotek transkryptomowych użyto RNA izolowanego z liści roślin w wieku 10 i 37 dni, a także z części wierzchołkowej łodygi 20, 30 oraz 37 dniowych siewek. Przeprowadzone sekwencjonowanie umożliwiło zidentyfikowanie kilkudziesięciu tysięcy sekwencji nukleotydowych przynależnych do wielu form transkrypcyjnych różnych genów. Wśród tak licznej puli sekwencji były też te oznaczone innymi technikami i opisane w tej pracy. Wykazano zgodność na poziomie sekwencji kodujących pomiędzy sekwencjami wyselekcjonowanymi z wykorzystaniem wspomnianych technik. W danych otrzymanych w wyniku sekwencjonowania transkryptomów stwierdzono występowanie tych samych domen w przewidywanych sekwencjach białek kodowanych przez opisane geny szlaku autonomicznego u łubinu żółtego. Możliwości NGS są jednak zdecydowanie większe niż technik do niedawna uważanych jeszcze za nowoczesne w identyfikowaniu sekwencji genów. Dlatego też poza danymi odpowiadającymi wynikom uzyskanym innymi technikami wykazano także

w badanych transkryptomach obecność dodatkowych izoform cDNA genów opisywanego szlaku autonomicznego. Analiza bioinformatyczna ujawniła występowanie u łubinu żółtego, jedynie w badanych wariantach, 6 alternatywnych form genów LIFPA-like oraz LIFCA-like. Poza opisaną już wcześniej formą LIFLK-like obecne są także dwie inne zidentyfikowane techniką RNA-seq. Dla każdego z pozostałych opisywanych w niniejszej pracy genów wyselekcjonowano jedna dodatkową formę cDNA.



Ryc. 52. Drzewo filogenetyczne dla białek LILD-like, LIFPA-like, LIFLK-like i LIFVE-like, opracowane w oparciu o sekwencje aminokwasowe białek kodowanych przez geny homologiczne *L. angustifolius*, *G. max* i *A. duranensis*. Wykaz użytych sekwencji wraz z Accession Number: LD *L. luteus* zidentyfikowana sekwencja, LD-like isoform X2 *L. angustifolius* XP_019419654.1, LD-like isoform X1 *L. angustifolius* XP_019419653.1, LD-like *G. max* XP_006577137.1, LD *A. duranensis* XP_015969024.1, FPA *L. luteus* zidentyfikowana sekwencja, FPA *L. angustifolius* XP_019413411.1, FPA-like *G. max* XP_006590932.1, FPA *A. duranensis* XP_015952121.1, FLK *L. luteus* zidentyfikowana sekwencja, FLK *L. angustifolius* XP_019419737.1, FLK *A. duranensis* XP_015968477.1, FLK *G. max* XP_003554712.1, FVE *L. luteus* zidentyfikowana sekwencja, FVE-like *L. angustifolius* XP_019442855.1, FVE-like *G. max* XP_003533752.1, FVE *A. duranensis* XP_015954449.1.



Ryc. 53. Drzewo filogenetyczne dla białek LIFCA-like, LIFY-like i LIFLD-like, opracowane w oparciu o sekwencje aminokwasowe białek kodowanych przez geny homologiczne *L. angustifolius*, *G. max* i *A. duranensis*. Wykaz użytych sekwencji wraz z Accession Number: FCA *L. luteus* zidentyfikowana sekwencja, FCA-like isoform X1 *L. angustifolius* XP_019463262.1, FCA-like isoform X2 *L. angustifolius* XP_019463263.1, FCA-like isoform X3 *L. angustifolius* XP_019463264.1, FCA-like isoform X4 *L. angustifolius* XP_019463265.1, FCA-like isoform X5 *L. angustifolius* XP_019463267.1, FCA-like isoform X6 *L. angustifolius* XP_019463268.1, FCA isoform X1 *G. max* XP_003550740.1, FCA isoform X2 *G. max* XP_006600382.1, FCA isoform X1 *A. duranensis* XP_020981472.1, FCA isoform X2 *A. duranensis* XP_020981474.1, FCA isoform X3 *A. duranensis* XP_020981476.1, FCA isoform X4 *A. duranensis* XP_020981478.1, FCA isoform X5 *A. duranensis* XP_015936884.1.

Przeprowadzone doświadczenia RNA-seq potwierdziły zgodność opisywanych w niniejszej pracy sekwencji. Pozwoliły one także w badanych wariantach oznaczyć ich ekspresję. Niestety zakres badań, a co za tym idzie wykorzystane w nich warianty nie pokrywały się ze sobą, dlatego też nie można porównać ich wyników. Niemniej widać, że do zmian ekspresji różnych izoform badanych genów dochodzi w czasie ontogenezy łubinu żółtego, co potwierdza rolę tych genów i ich niezależność od warunków środowiska. Jednak przeprowadzenie innego doświadczenia może z powodzeniem koncepcji tej przeczyć i pokazać zależną o wielu innych czynnikach zmiany ekspresji genów AP.

5.2. Analiza ekspresji wybranych genów szlaku autonomicznego u łubinu żółtego

5.2.1. Wpływ fitohormonów na aktywność transkrypcyjną badanych genów

Wpływ fitohormonów na indukcję kwitnienia jest znany od dawna. Pierwsze prace związane z giberelinami były prowadzone już pod koniec XIX, choć same gibereliny, jako związek chemiczny zidentyfikowano dopiero w roku 1935, a jako fitohormon dopiero w latach 50. XX wieku. Do niedawna uważano, że gibereliny odgrywają główną rolę w kontroli inicjacji rozwoju generatywnego, jednakże obecnie nie mniejszą rolę przypisuje się także innym fitohormonom (Hedden i Sponsel 2015).

5.2.1.1. Wpływ giberelin na ekspresję 5 genów szlaku autonomicznego u łubinu żółtego

Egzogennie podana GA prowadzi do zmian ekspresji przebadanych genów szlaku autonomicznego u łubinu żółtego. Zaobserwowano zarówno wzrost, jak i spadek ekspresji w zależności od badanego organu. Zmiany ekspresji badanych genów były niewielkie albo stanowiły wielokrotność ekspresji roślin kontrolnych.

Opisane w niniejszej pracy zmiany ekspresji genu *FCA* pod wpływem aplikacji GA pozwalają domniemywać, że zmiany ilości transkryptu tego genu do pewnego stopnia zależne są od procesów kontrolowanych przez wspomniany hormon (Tab. 16). Widać jednocześnie, iż odpowiedź ta zależy nie tylko od wieku, w jakim aplikowany jest fitohormon, ale także od organu, w którym ekspresje ustalano. Dotychczasowe badania prowadzone u różnych gatunków nie wykazywały takich zależności. Badania te jednak zwykle ograniczają się do jednego czy 2 etapów w życiu roślin. Nie ma też danych pokazujących wzorzec ekspresji omawianego genu w różnych organach przed i po podaniu GA. Dlatego też uzyskane wyniki stanowią nowe dane uzupełniające wiedzę na temat aktywności transkrypcyjnej homologa *FCA* i pozwalające domniemywać jego udział w licznych przemianach związanych także z kontrolą hormonalną. Tego typu postulat pojawiał się już w nielicznych publikacjach naukowych, ale w zupełnie innym kontekście roli fitohormonów w regulacji dynamiki zmian struktury chromatyny. Nie dotyczyły one jednak tego konkretnego genu szlaku autonomicznego.

Wyniki przeprowadzonych badań pozwalają stwierdzić, że poza nielicznymi wyjątkami egzogennie podana GA prowadzi do wzrostu ekspresji *LIFY-like* w liściach dolnych przy jednoczesnym spadku w pozostałych organach (Tab. 16). Poziom *LIFY-like* nie zmieniał się wraz z upływem czasu z wyjątkiem części wierzchołkowej w 4 godzinie eksperymentu.

Wykonane doświadczenia wskazują na istotny wpływ egzogennie aplikowanej gibereliny na zmiany aktywności transkrypcyjnej genu *LIFLD-like* (Tab. 16). Ustalono,

że już po upływie jednej godziny od podania fitohormonu dochodzi do zwiększenia ilości transkryptu badanego genu w porównaniu do roślin kontrolnych nietraktowanych hormonem. Wyniki przeprowadzonych eksperymentów pozwalają stwierdzić, iż po początkowych wzrostach ekspresji w kolejnych godzinach doświadczenia gibereliny raczej stabilizują poziom ekspresji, a sam jej przyrost jest mniejszy niż w roślinach kontrolnych. Może jednak mieć to związek także z warunkami, w jakich prowadzono doświadczenie. Wydaje się, iż istotny wpływ na aktywność transkrypcyjną *LIFLD-like* mają także czynniki fizyczne. Widać to wyraźnie w przypadku roślin kontrolnych. Poziom ekspresji jest w nich wyższy niż u roślin poddanych działaniu GA. Zaobserwowano, że wpływ ten w sposób istotny zależy od organu, w którym ekspresję badano. Pozytywna odpowiedź na hormon w postaci wzrostu ilości transkryptu opisywanego genu odnotowana w liściach dolnych może mieć bezpośredni związek ze stanem fizjologicznym tego organu jego wiekiem oraz przemianami molekularno-fizjologicznymi, jakie w nim zachodzą. W przypadku pozostałych organów wydaje się, że działanie hormonu raczej hamuje lub stabilizuje ekspresję badanego genu na poziomie niższym od tej obserwowanej w roślinach kontrolnych. Egzogennie podawana giberelina jest dodatkowym czynnikiem regulującym stan metaboliczny komórki. Jak można przypuszczać w przypadku opisywanego genu nie jest to jednak jedyny czynnik kontrolny. W przeprowadzonych doświadczeniach hormon ten może wpływać w sposób negatywny inicjując przemiany wynikające z aktywacji negatywnych pętli sprzężenia zwrotnego. Tego typu regulacje obserwowano już niejednorodnie w przypadku giberelin.

Reasumując poza małymi wyjątkami egzogennie podana GA prowadzi do wzrostu ekspresji *LIFPA-like* w liściach dolnych przy jednoczesnym spadku w pozostałych organach (Tab. 16). W części wierzchołkowej zaobserwowano wielokrotny spadek poziomu badanego transkryptu. Zmniejszanie ilości mRNA w pozostałych organach były niewielkie. Ponadto po 4 godzinach od rozpoczęcia pomiarów w opisywanych eksperymentach ekspresja *LIFPA-like* w liściach górnych roślin kontrolnych wzrosła wyraźnie względem pozostałych prób. W pozostałych organach nie zaobserwowano istotnych zmian poziomu transkryptu w czasie. Poziom *LIFPA-like* w części wierzchołkowej był kilkadziesiąt razy wyższy niż w pozostałych organach.

Przeprowadzone doświadczenia wyraźnie wskazują na zróżnicowanie w odpowiedzi na podawany hormon wynikający wprost z rodzaju organu, w jakim badanie wykonywano. W przypadku liści dolnych oraz części wierzchołkowej łodygi odnotowywano wyraźny wzrost ekspresji *LIFVE-like*, podczas gdy w ogonkach liści górnych dochodziło do spadku jego ekspresji (Tab. 16). W liściach górnych zaś ilość

transkryptu zależna była w zasadniczy sposób od wieku rośliny. Wydaje się, że z tym faktem skorelowana jest także odpowiedź w postaci wzrostu aktywności transkrypcyjnej badanego genu.

Niezwykle ważne wydaje się też to, iż każda z wprowadzanych do komórek rośliny substancji o aktywności regulatora wzrostu ma swój obrót metaboliczny, czas trwania oraz może ona w sposób negatywny kontrolować poziom endogennego odpowiednika. W związku z tym wyniki przeprowadzonych badań powinny zostać skorygowane o czynniki, jakimi są endogenne poziomy hormonów, oraz wpływ aplikacji na ten poziom. Jedynie wtedy można z całą stanowczością stwierdzić, że odnotowane wyniki są bezwzględnie związane z faktem egzogennej aplikacji czynnika regulatorowego, a nie pośrednich zmian, jakie sam wywołuje w komórce. Zasadnym wydaje się też pytanie czy i w jaki sposób precyzyjnie określić wiek fizjologiczny tkanki, a co za tym idzie jej aktywność i zdolność do opowiadania na bodźce.

Tab. 16. Wpływ egzogenicznie podanej GA na wybrane geny szlaku autonomicznego (+ oznacza wzrost ekspresji, - spadek ekspresji, * istnieją nieliczne wyjątki, zwielokrotnione znaki + lub - oznaczają wielkość zmian ekspresji).

Gen	Liście dolne	Liście górne	Ogonki liściowe	Część wierzchołkowa
<i>LIFCA-like</i>	+	- *	- *	+++
<i>LIFY-like</i>	+	-	-	--
<i>LIFLD-like</i>	++	+/-	-	+ 1h / -
<i>LIFPA-like</i>	++	- *	- *	---
<i>LIFVE-like</i>	+	+ 24h i * 7d	-	+

Egzogenicznie podana GA prowadzi do wzrostu ekspresji badanych genów w liściach dolnych oraz spadku w ogonkach liściowych we wszystkich przypadkach. Różnice występują w reakcji liści górnych oraz w części wierzchołkowej (Tab. 16). Różne reakcje poszczególnych organów można wytłumaczyć transportem transkryptów oraz białek pomiędzy organami. Przykładem takiego szlaku jest transport transkryptu *FT* z liści do wierzchołka wzrostu, gdzie kontrola ekspresji *FT* zachodzi w liściach np. pośrednio przez miR172 regulowany m.in. przez FCA, a w obrębie wierzchołka nie dochodzi do regulacji aktywności *FT* na poziomie transkrypcyjnym. Ponadto zarówno w liściach jak w wierzchołkach wzrostu gibereliny kontrolują ekspresję różnych genów co wynika z ich tkankowo specyficznej ekspresji. Ponadto liście oraz część wierzchołkowa wykazują różną aktywność podziałową, co przekłada się na różny poziom endogennych fitohormonów oraz ich zdolności do wnikania do komórek ze względu na zróżnicowanie grubości oraz składu ściany komórkowej (Richter i in. 2013, Wang 2014). Spadek ekspresji badanych genów

może wynikać z zbyt wysokiego poziomu GA w komórce po sumarycznym efekcie endogennej syntezy oraz wnikania hormonu ze źródła egzogennej, co powoduje aktywację pętli sprzężeń odpowiedzialnej na homeostazę hormonalną, co prowadzi do spadku endogennej poziomu GA, co następnie prowadzi do spadku ekspresji badanych genów.

Tab. 17. Wpływ wieku rośliny na ekspresję wybranych genów szlaku autonomicznego (+ oznacza wzrost ekspresji, - spadek ekspresji, 0 brak zmian ekspresji).

Gen	Liście dolne	Liście górne	Ogonki liściowe	Część wierzchołkowa
<i>LIFCA-like</i>	0	4h + / potem -	24h w SIII i SV +	4h i 24h w SV +++
<i>LIFY-like</i>	0	0	0	24h w SIII i SV +
<i>LIFLD-like</i>	0	4h + / potem -	4h i 24h SV ++	24h SIII +
<i>LIFPA-like</i>	0	4h + / potem -	0	0
<i>LIFVE-like</i>	0	0	0	0

W przypadku liści na ekspresję genów szlaku autonomicznego nie ma wpływu wiek rośliny (Tab. 17). Zróżnicowanie terminów siewów miało wpływ na temperaturę otoczenia, w której rosły rośliny. W przypadku genu *LIFCA* zaobserwowano wzrost ekspresji u roślin młodszych, które rosły w wyższej temperaturze niż rośliny starsze (Tab. 17). Temperatura otoczenia ma wpływ na aktywność FCA u *A. thaliana*, gdzie niska temperatura 16°C hamuje jego aktywność a 23°C aktywuje. Podobne zależności występują dla białka FVE. W temperaturze ok 4 °C FVE wiąże się z HOS1 i staje się niezdolne do wiązania z HDA6, co powoduje inaktywację FVE na poziomie białkowym (Capovilla i in. 2015, Jung i Park 2013, Nilsson 2013). W wykonanym eksperymencie nie zaobserwowano zmian *LIFVE-like* na poziomie transkrypcyjnym (Tab. 17) więc regulacja aktywności poprzez zmiany temperatury otoczenia *LIFVE-like* zachodzi najprawdopodobniej na poziomie białkowym. Ekspresja badanych genów szlaku autonomicznego u łubinu w przebadanych wariantach nie zależy w większości przypadków od wieku rośliny oraz pory dnia, czyli najprawdopodobniej nie są regulowane przez cykl okołodobowy, ale do zbadania tego zjawiska należałoby wykonać jeszcze dodatkowe badania zmian ekspresji np. co godzinę.

5.2.1.2. Wpływ ABA na ekspresję 5 genów szlaku autonomicznego u łubinu żółtego

Wielokrotnie w podręcznikach akademickich czy publikacjach naukowych pojawia się stwierdzenie o antagonistycznym działaniu GA i ABA. Wskazuje się przy tym

na pozytywne efekty, stymulujące wzrost i rozwój rośliny zwłaszcza temu pierwszemu. Wydaje się jednak zasadnym postawienie pytania czy dotyczy to wszystkich procesów, jakie w czasie ontogenezy zachodzą, czy dotyczy zmian krótkotrwałych lub czy podobna odpowiedź dotyczy pojedynczych genów nawet, jeśli funkcjonują w regulacji jednego procesu lub są zaangażowane w podobne przemiany komórkowe. Te kwestie wymagają indywidualnego podejścia, ponieważ już niejednokrotnie, także w wyniku własnych obserwacji poczynionych na wielu innych genach badanych u łubinu żółtego wynika, że wspomniany na początku antagonizm jest wyraźnie ograniczony. Może wiązać się on raczej z działaniem procesów zależnych od innych czynników takich jak światło, temperatura otoczenia czy wiek roślin. Nie raz obserwowano ze stymulatorem ekspresji wielu genów jest ABA, podczas gdy GA aplikowany egzogenie raczej stabilizuje aktywność transkrypcyjną badanych genów, a w niektórych przypadkach wręcz ją hamuje.

Taki stymulujący ekspresję genu LIFCA-like wpływ kwasu abscysynowego odnotowano we wszystkich badanych organach łubinu żółtego odmiany Taper (Tab. 18). Co więcej wszystkie badane geny wykazywały wzmożoną transkrypcję w liściach dolnych (Tab. 18). Poza częścią wierzchołkową łodygi obserwowano także wyraźny wzrost ilości transkryptu genu *LIFY-like* (Tab. 18). Równocześnie i w podobny sposób regulowana przez ten hormon ekspresja genów *FCA* i *FY* może wynikać z faktu współdziałania obu w kontroli podobnych przemian. Interesujący jest również fakt, że do przeciwstawnej odpowiedzi dochodzi w wierzchołkach. Może to sugerować, iż gen *FY* poza współdziałaniem z *FCA* może także inicjować niektóre przemiany związane z kwitnieniem niezależnie czy może działać samodzielnie.

Zasadnym pytaniem, jakie można postać na podstawie przeprowadzonych badań jest czy możliwe jest usystematyzowanie wiedzy na temat wrażliwości badanych genów ze względu na aktywność białek, jakie kodują. Odpowiedź jednak zależy jeszcze od wielu dodatkowych czynników i danych. Zestawienie zaprezentowane w tabelach 16 i 18 prezentuje zbiorcze wyniki eksperymentów i potwierdza negatywne działanie lub brak wpływu GA na ekspresję badanych genów oraz w większości przypadków stymulujący wpływ na nie ABA. Wyraźnie zaobserwowano także poziom odpowiedzi, który zależny był od pory dnia, wieku rośliny i rodzaju organu. W przypadku ABA zaobserwować to można zwłaszcza w przypadku większości zbadanych genów. Taki stan rzeczy wydaje się w pełni uzasadniony zważywszy na fakt, iż biosynteza hormonów czy ich dystrybucja w roślinie jest rzeczą bardzo zmienną i dynamiczną. Zapewne to także przekłada się na odpowiedź komórkową na podawany hormon. Niemniej jednak w przypadku ABA można wskazać stymulujący wpływ aplikacji egzogennej hormonu na ekspresję badanych

genów. Być może jest to wynikiem mechanizmów, które w komórkach kontrolowane są przez ten hormon. Wynika to z jego współdziałania w wielu przemianach związanych ze stanem chromatyny czy aktywacją specyficznych czynników transkrypcyjnych.

Tab. 18. Wpływ egzogennie podanego ABA na wybrane geny szlaku autonomicznego (+ oznacza wzrost ekspresji, - spadek ekspresji, * istnieją nieliczne wyjątki, zwielokrotnione znaki + lub - oznaczają wielkość zmian ekspresji).

Gen	Liście dolne	Liście górne	Ogonki liściowe	Część wierzchołkowa
<i>LIFCA-like</i>	+++	+++	+++ *	+++
<i>LIFY-like</i>	+++	+++	+ *	-
<i>LIFLD-like</i>	+++	1h SIII -, SV + 4h wzrost względem 1h, ale niższy niż w kontroli 24h SIII dalszy wzrost 7d wyższa ekspresja niż w kontroli spadek względem 24h	-	+/-
<i>LIFPA-like</i>	++	+*	SV od 4h +	+/-
<i>LIFVE-like</i>	++	4h i 24h + 1h i 7d -	-	++

Egzogennie podany ABA prowadzi do wzrostu ekspresji badanych genów w liściach dolnych (Tab. 18). W przypadku genu *LIFCA-like* zaobserwowano wzrost ekspresji we wszystkich badanych organach co znajduje potwierdzenie w wynikach uzyskanych u *A. thaliana* (Lee i in. 2015). W przypadku kolejnego genu *LIFY-like* uzyskano podobne rezultaty za wyjątkiem części wierzchołkowej co stanowi zagadkę ponieważ białka FCA oraz FY oddziałują ze sobą tworząc wspólny kompleks białkowy jednakże nie dochodzi do zahamowania ekspresji *LIFY-like* w części wierzchołkowej (Tab. 18). Ostatnie badania pokazują jednak, że białko FCA może być zastępowane przez FPA. FCA oddziałuje z FY zmieniając jego właściwości. Współdziałanie tych białek decyduje o funkcji jaką FY pełni w komórce, ponieważ gdy występuje w kompleksie z FCA jest represorem *FLC*, a gdy występuje samodzielnie pełni dokładnie odwrotną rolę i jest jego aktywatorem (Feng i Michaels 2011, Feng i in. 2011). Wydaje się, że utworzenie kompleksu FPA-FY nie zmienia samej aktywności, a jedynie wpływa na miejsce działania ostatniego z białek wspomnianego kompleksu. Kolejnym białkiem współdziałającym z FCA i FY jest FPA. W jego przypadku poziom transkryptu ulega podniesieniu tylko w liściach we wszystkich badanych wariantach. Szczegółowy mechanizm współdziałania wspomnianych peptydów nie został jeszcze opisany, a wniosek ten pochodzi z analizy podwójnych mutantów *fca/fpa* (Bäurle i Dean 2008). Współdziałanie FCA, FPA i FY w kontroli *FLC* oraz tworzeniu *COOLAIR* i wyborze miejsca alternatywnej poliadenylacji

FLC opisano w rozdziałach 1.4.3. Szlak wernalizacyjny indukcji kwitnienia, 1.4.7.1. Gen *FCA* oraz 1.4.7.5. Gen *FPA* (Ietswaart i in 2012, Kim i in. 2009, Kim i Sung 2014, Macknight i in. 1997, Quesada i in. 2005, Quesada i in. 2003, Simpson i in. 2003, Sonmez i Dean 2012).

Kolejną parą genów, które współdziałają ze sobą są *LIFLD-like* oraz *LIFVE-like*, które wchodzi w skład kompleksów deacetylaz histonów i współdziałają w wyciszeniu ekspresji *FLC* na poziomie chromatyny (He i in. 2003, Kenzior i Folk 2015, Luo i in. 2015, Yu i in. 2011). Zaobserwowano podobieństwa w ustalonym wzorcu ekspresji poza małymi wyjątkami.

Wszystkie badane geny szlaku autonomicznego indukcji kwitnienia zaangażowane są w kontrolę ekspresji *FLC*. Białka *FCA*, *FY*, *FPA* są zaangażowane w obróbkę transkryptu *FLC*. *FPA* oraz *FCA* mogą się wzajemnie zastępować rolami oraz obydwa podlegają procesowi autoregulacji. *FLD* i *FVE* biorą udział w remodelowaniu chromatyny *FLC* oraz wchodzi w skład kompleksów remodelujących HDAC. *FVE* ponadto jest członkiem kompleksów *PRC* remodelujących chromatynę, które również są powiązane ze szlakiem wernalizacyjnym indukcji kwitnienia. *FLD* i *FVE* pełnią bardzo podobne funkcje, które mogą w pewnym zakresie wzajemnie się zastępować (Aukerman i in. 1999, Ausín i in. 2004, He i in. 2003, Lim i in. 2004, Lee i in. 1994, Macknight i in. 1997, Mockler i in. 2004, Schomburg i in. 2001, Simpson i in. 2003, Sun i in. 2012, Xing i in. 2014).

Egzogennie podanie *ABA* oraz *GA* powoduje wzrost ekspresji badanych genów w liściach dolnych. W przypadku genów *LIFCA-like* oraz *LIFVE-like* obydwa hormony powodują wzrost ekspresji w części wierzchołkowej. Egzogennie podany *ABA* powoduje wzrost poziomu *LIFCA-like* we wszystkich badanych organach. Egzogennie podany *GA* powoduje spadek aktywności transkrypcyjnych badanych genów w ogonkach liściowych oraz w liściach górnych (za wyjątkiem *LIFVE-like*).

5.2.2. Wpływ temperatury na aktywność transkrypcyjną badanych genów

Wykazanie wpływu warunków temperaturowych na ekspresję badanych genów w warunkach polowych jest niemożliwe do wykonania w sposób całkowicie niezależny od pozostałych czynników. Nie ma także możliwości kontrolowania tego parametru, który jest zmiennym tak w czasie trwania sezonu wegetacyjnego jak również w trakcie doby. Niemniej jednak doświadczenie zaplanowano tak żeby warunki termiczne w poszczególnych wariantach były różne. Nasiona wysiewano w kilku terminach od końca marca w odstępach tygodniowych. Przyrost temperatury w tym czasie jest najbardziej widoczny. Jest on jednak bardzo zmienny i zdarzają się zwłaszcza pod koniec okresów

wysiewu dni z bardzo niską temperaturą zbliżoną do wariantów reprezentowanych przez rośliny najstarsze (SI). Takie zmiany oczywiście przekładają się na przebieg wielu procesów realizowanych tak na poziomie fizjologicznym jak i molekularnym. Wydaje się jednak, że nie są one bezpośrednią przyczyną zmian ekspresji obserwowanych już w fazie wzrostu wegetacyjnego czy inicjacji kwitnienia. Różnice odnotowane w tym czasie można natomiast wynikają raczej z wahań dobowych temperatury. Próby zbierano w godzinach przedpołudniowych 9-10 rano oraz wczesnym popołudniem. W godzinach tych zazwyczaj odnotowywano wyraźne różnice temperatury. Często także odnotowywano wzrost ekspresji po 4h od rozpoczęcia zbierania materiału roślinnego w warunkach, kiedy termika była najwyższa. Nie można jednak jednoznacznie usystematyzować wyników tych prac ze względu na zbyt dużą zmienność warunków, a tym samym zmienność ekspresji genów. Z danych literaturowych wynika, że co najmniej jeden z badanych genów (FVE) podlega kontroli zależnej od temperatury. W przeprowadzonych badaniach zidentyfikowany homolog charakteryzuje się jednak względnie stałą ekspresją w warunkach kontrolnych, a zmiany obserwowane są głównie po podaniu hormonów.

5.2.3. Podsumowanie analizy ekspresji genów szlaku autonomicznego u łubinu żółtego

Egzogennie aplikowane GA lub ABA mają wpływ na ekspresję genów szlaku autonomicznego u łubinu żółtego. W zależności od organu i czasu aplikacji wpływ był stymulujący lub hamujący. Zarówno GA jak i ABA podnoszą ekspresję *LIFCA-like*, *LIFY-like*, *LIFLD-like*, *LIFPA-like* i *LIFVE-like* w liściach dolnych. Wpływ GA na ogonki liściowe jest dokładnie odwrotny. Natomiast ABA promuje ekspresję *LIFCA-like* i *LIFY-like*, a hamuje *LIFLD-like* i *LIFVE-like*. Obserwowana odpowiedź w postaci zmian ilości mRNA badanych genów w liści górnych są odmienne od tej odnotowanej liści dolnych. GA powoduje spadek poziomu *LIFCA-like*, *LIFY-like* i *LIFPA-like*, a ABA działa przeciwnie i go podnosi. GA oraz ABA stymulują ekspresję *LIFCA-like* i *LIFVE-like*, a obniża *LIFY-like* w części wierzchołkowej. Tylko w przypadku genu *LIFCA-like* reakcja na ABA jest jednakowa we wszystkich organach – wzrost ekspresji. Ta odpowiedź roślin na egzogenne podania tego fitohormonu zdaje się znajdować potwierdzenia w badaniach nad *A. thaliana* gdzie ABA stymuluje ekspresję FCA, a u jęczmienia podczas embriogenezy ją indukuje (Lee i in. 2015). U *Rosa chinensis* ‘Old Blush’ ABA jest inhibitorem kwitnienia. Wpływa na ekspresje form transkrypcyjnych FCA i zmienia proporcje pomiędzy formami krótkimi a długimi transkryptów tego genu, co w konsekwencji ma decydujące znaczenie w aktywność funkcjonalnej formy FCA (Guo i in. 2017). Mechanizm ten zidentyfikowany po raz pierwszy u rzodkiewnika pospolitego

opisano szczegółowo w rozdziale 1.4.7.1. Podczas przejścia z fazy wegetatywnej do fazy generatywnej u tego gatunku dochodzi do spadku stężenia GA1, GA3 i GA4 oraz ABA. U *Litchi chinensis* obserwuje się odwrotne relacje. ABA podnosi ekspresję *APETALA 1* (*LcAPI*) i promuje kwitnienie. Podawanie inhibitora biosyntezy ABA naproxenu powodowało opóźnienie kwitnienia oraz spadek ekspresji *LcAPI* (Cui i in. 2013). Różne odpowiedzi różnych organów na ten sam hormon utrudniają porównywanie uzyskanych wyników z wynikami uzyskanymi przez innych badaczy. Wzrost ekspresji *LIFCA-like* i *LIFY-like* w liściach dolnych i spadek w liściach górnych pod wpływem GA sugeruje zróżnicowaną ekspresję w tym samym typie organów i w przypadku oznaczeń ekspresja we wszystkich liściach może spowodować „uśrednienie” wyników i w rezultacie brak różnic statystycznie istotnych po podaniu GA. Ponadto łąbiny oraz rzodkiewnik – roślina modelowa różnią się pokrojem, co utrudnia porównywanie wyników. Ponadto w przypadku *Arabidopsis* ogonki liściowe nie są zbyt częstym obiektem badań ze względu na swoje rozmiary podobnie jak część wierzchołkowa. Najczęściej w przypadku rzodkiewnika badane są wszystkie liście bez podziału na podgrupy ze względu na swoje rozmiary.

Geny szlaku autonomicznego pełnią bardzo wiele funkcji nie tylko związanych z kwitnieniem i represją *FLC*. Badania transkryptomów rzodkiewnika wykazały, że współdziałające ze sobą *FVE*, *FLD* i *HDA6* są zaangażowane w kontrolę 383 genów z czego funkcja 95 jest nieznana. Część z 383 genów związana jest z remodelowaniem chromatyny, transportem komórkowym, funkcjonowaniem kinaz, strukturą ściany komórkowej; czynnikami transkrypcyjnymi; metabolizmem etylenu, auksyn, cytokinin, jasmonianów i giberelin; rozwojem nasion, korzeni, pędów oraz kwiatów. Mechanizm regulacji transportu komórkowego przez *FVE*, *FLD* i *HDA6* jest na razie nieznan (Yu i in. 2016). *FLK* jest ponadto zaangażowany w regulację odpowiedzi systemicznej roślin na patogeny, a *FCA*, *FVE* i *FLK* w percepcję temperatury otoczenia (Jung i Park 2013, Lee i in. 2012).

Badania funkcjonowania szlaku autonomicznego, przeprowadzone u różnych gatunków roślin wykazały, że ekspresja opisanych w nim genów oraz aktywność kodowanych przez nie białek jest regulowana przez czynniki egzogenne, co zaprzecza pierwotnej nazwie szlak autonomiczny, która ma znaczenie raczej historyczne. Podobna sytuacja dotyczy szlaku giberelinowego indukcji kwitnienia. Wieloletnie badania wykazały wpływ nie tylko giberelin na kwitnienie roślin. Wykazano wpływ auksyn, kwasu giberelinowego, kwasu salicylowego, jasmonianów oraz etylenu na indukcję kwitnienia, z założeniem, że u różnych gatunków roślin wykazują one różne efekty (Nie i in. 2016).

Geny szlaku autonomicznego indukcji kwitnienia pełną wiele różnych funkcji, z czego jedynie część związana z indukcją kwitnienia. Jak wykazano w wielu badaniach nazwa szlak autonomiczny ma obecnie znaczenie historyczne, ponieważ geny wchodzące w jego skład są regulowane przez fitohormony, temperaturę otoczenia oraz ich ekspresja zmienia się wraz z wiekiem roślin. Białka szlaku autonomicznego oddziałują z białkami nienależącymi do szlaku, np. HOS1, HDA5, czy HDA6, tworząc kompleksy, na aktywność których mają wpływ wszystkie składniki. Liczne publikacje wskazują na współdziałanie szlaków indukcji kwitnienia w kontroli stosunkowo niewielkiej grupy białek lub miR, np. FLC, miR156 czy miR172, które w następnej kolejności regulują aktywność genów integratorowych kwitnienia *FT* i *SOC1*. Skutkiem współdziałania szlaków indukcji kwitnienia jest zdolność roślin do kwitnienia w zróżnicowanych warunkach środowiskowych. Modelowa roślina dnia krótkiego *Ipomea nil* odmiany Violet, w późniejszym wieku w warunkach suszy może zakwitnąć również w warunkach dnia długiego.

5.3. Zakończenie

Niewielka ilość badań dotyczących roli szlaku autonomicznego w indukcji kwitnienia u roślin bobowatych wymusiły konieczność porównywania uzyskanych przeze mnie wyników badań do danych opisanych u roślin należących do odrębnych grup systematycznych. Gatunki te wykazują niejednokrotnie odmienną wrażliwość, co może skutkować istotnymi różnicami na poziomie tak ekspresji genów, jak i ilości oraz aktywności różnych białek.

Prezentowane w rozprawie wyniki znajdują jednak potwierdzenie w uzyskanych w późniejszym czasie w Katedrze Fizjologii Roślin i Biotechnologii UMK wynikach badań transkryptomów łubinu żółtego (dane nieopublikowane), w których analizowano m.in. omawiane w niniejszej pracy geny z uwzględnieniem aktywnych transkrypcyjnie izoform. Porównując ekspresję w liściach górnych oraz w części wierzchołkowej roślin w badanych przeze mnie układach doświadczalnych z aktywnością transkrypcyjną w odpowiadających im wariantach roślin uprawianych w warunkach sztucznych (liście 10 i 37 dniowych roślin oraz części wierzchołkowe 20,30 i 37 dniowych roślin) wykazano szereg podobieństw.

W liściach 37 dniowych roślin wykazano wzrost ekspresji wariantu transkrypcyjnego varX1 genu *LIFLK*, a dla *LIFVE* spadek względem młodszych roślin. Dla pozostałych genów szlaku autonomicznego u roślin uprawianych w warunkach sztucznych nie zaobserwowano zmian aktywności transkrypcyjnej.

W przypadku większości badanych transkryptów w części wierzchołkowej roślin uprawianych w warunkach sztucznych najwyższą ekspresję genów szlaku autonomicznego zaobserwowano u 30 dniowych roślin. U 20 i 37 dniowych roślin poziom aktywności transkrypcyjnej był niższy. Podobną zależność zaobserwowano dla genów *LIFY-like* i *LIFLD-like* u roślin uprawianych w warunkach naturalnych, jednakże dla *LIFCA-like* szczyt aktywności występował u roślin najmłodszych, a dla pozostałych badanych genów nie wykazano statystycznie istotnych różnic.

Ze względu na wrażliwość roślin na zmienne warunki rozwoju w pierwotnym układzie doświadczalnym zaproponowano przeprowadzenie wszystkich eksperymentów w warunkach sztucznych. Uprawy nie przyniosły jednak zadowalających efektów, ponieważ rośliny wyraźnie różniły się pokrojem względem roślin uprawianych w warunkach naturalnych. W fazie rozwoju generatywnego wytworzona liczba okółków kwiatowych a następnie strąków była, co najmniej 3 krotnie niższa niż u roślin uprawianych w warunkach naturalnych. Z tego powodu eksperymenty związane z badaniem ekspresji genów przeprowadzono w warunkach naturalnych, a materiał pozyskany z upraw fitotronowych przeznaczono do identyfikacji badanych genów.

W niniejszej pracy wykazano wrażliwość badanych genów szlaku autonomicznego na zmiany temperatury otoczenia oraz egzogennie podawane fitohormony. Powyższe reakcje mogą stanowić dodatkową nieznaną dotychczas ścieżkę w hormonalnym szlaku indukcji kwitnienia oraz w szlaku związanym z temperaturą otoczenia. Hipoteza taka wymaga dalszych badań.

Wnioski

- 1) Na podstawie analizy sekwencji kodujących oraz wzorców ekspresji wybranych genów potwierdzono występowanie i aktywność szlaku autonomicznego u łubinu żółtego odmiany Taper.
- 2) Przeprowadzone analizy bioinformatyczne potwierdziły występowanie w obrębie sekwencji cDNA badanych genów elementów zachowywanych ewolucyjnie u różnych gatunków roślin. Szczególnie bobowatych.
- 3) Wykazano wrażliwość genów szlaku autonomicznego na egzogennie podawane fitohormony ABA i GA. Potwierdza to hipotezę postulującą współdziałanie różnych szlaków indukcji kwitnienia w regulacji tego procesu i nie pozostawia wątpliwości, co do autonomiczności szlaku AP.
- 4) Wyniki przeprowadzonych doświadczeń pozwalają wnioskować, że na ekspresją badanych genów wpływ mają fluktuacje termiczne, do których dochodzi w cyklu dobowym. Nie potwierdzono natomiast bezpośredniego wpływu warunków termicznych uprawy we wczesnych etapach wzrostu łubinu żółtego na obserwowane wzorce ekspresji badanych genów AP.

Literatura

1. Achard P., Herr A., Baulcombe DC., Harberd NP., 2004. *Modulation of floral development by a gibberellin-regulated microRNA* Development 131, 3357-3365
2. Adamczyk B., Godlewski M., 2010. *Różnorodność strategii pozyskiwania azotu przez rośliny*, Kosmos 59 (1-2), 211-222
3. Andersson U., Heddad M., Adamska I., 2003. *Light stress-induced one-helix protein of the chlorophyll a/b-binding family associated with photosystem I* Plant Physiology 132, 811–820
4. Artimo P., Jonnalagedda M., Arnold K., Baratin D., Csardi G., Edouard de Castro E., Duvaud S., Flegel V., Fortier A., Gasteiger E., Grosdidier A., Hernandez C., Ioannidis V., Kuznetsov D., Liechti R., Moretti S., Mostaguir K., Redaschi N., Rossier G., Xenarios I., Stockinger H., 2012. *ExPASy: SIB bioinformatics resource portal* Nucleic Acids Research 40(Web Server issue): W597–W603
5. Aukerman MJ., Lee I., Weigel D., Amasino RM., 1999. *The Arabidopsis flowering-time gene LUMINIDEPENDENS is expressed primarily in regions of cell proliferation and encodes a nuclear protein that regulates LEAFY expression* The Plant Journal 18(2), 195-203
6. Ausín I., Alonso-Blanco C., Jarillo JA., Ruiz-García L., Martínez-Zapater JM., 2004. *Regulation of flowering time by FVE, a retinoblastoma-associated protein* Nature Genetics 36(2), 162-166
7. Banday ZZ., Nandi AK., 2015. *Interconnection between flowering time control and activation of systemic acquired resistance* Frontiers in Plant Science 6, 174
8. Bäurle I., Dean C., 2008. *Differential Interactions of the Autonomous Pathway RRM Proteins and Chromatin Regulators in the Silencing of Arabidopsis Targets* PLoS One 3(7), e2733
9. Bernier G., 1988. *The control of floral evocation and morphogenesis* Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 39, 175–219
10. Boratyn GM., Camacho C., Cooper PS., Coulouris G., Fong A., Ma N., Madden TL., Matten WT., McGinnis SD., Merezhuk Y., Raytselis Y., Sayers EW., Tao T., Ye J., Zaretskaya I., 2013. *BLAST: a more efficient report with usability improvements* Nucleic Acids Research 41 (W1), W29-W33
11. Boscari A., Meilhoc E., Castella C., Bruand C., Puppo A., Brouquisse R., 2013. *Which role for nitric oxide in symbiotic N₂-fixing nodules: toxic by-product or useful signaling/metabolic intermediate?* Frontiers in Plant Science 9 (4), 384

12. Capovilla G., Schmid M., Posé D., 2015. *Control of flowering by ambient temperature* Journal of Experimental Botany 66(1), 59-69
13. Chailakhyan M.Kh., 1936. *New facts in support of the hormonal theory of plant development* C. R. Acad. Sci. URSS 13, 79–83
14. Chen H., Cao M., Baskin JM., Baskin CC., 2013. *Temperature regulates positively photoblastic seed germination in four ficus (moraceae) tree species from contrasting habitats in a seasonal tropical rainforest* American Journal of Botany 100(8), 1683-1687
15. Chenchik A., Moqadam F. Siebert P., 1996. *A new method for full-length cDNA cloning by PCR* W: Krieg PA., *A Laboratory Guide to RNA: Isolation, Analysis, and Synthesis* 273–321 Wiley-Liss, Inc, New York
16. Chenchik A., Zhu Y., Diatchenko L., Li R., Hill J., Siebert P., 1998. *Generation and use of high-quality cDNA from small amounts of total RNA by SMART PCR* W: Siebert P., Larrick J., *Gene Cloning and Analysis by RT-PCR* 305–319 BioTechniques Books Natick Massachusetts
17. Cho HJ., Kim JJ., Lee JH., Kim W., Jung JH., Park CM., Ahn JH., 2012. *SHORT VEGETATIVE PHASE (SVP) protein negatively regulates miR172 transcription via direct binding to the pri-miR172a promoter in Arabidopsis* FEBS Letters 586, 2332–2337
18. Choi J., Hyun Y., Kang MJ., In Yun H., Yun JY., Lister C., Dean C., Amasino RM., Noh B., Noh YS., Choi Y., 2009. *Resetting and regulation of FLOWERING LOCUS C expression during Arabidopsis reproductive development* The Plant Journal 57, 918–931
19. Choi K., Kim J., Hwang HJ., Kim S., Park C., Kim SY., Lee I., 2011. *The FRIGIDA complex activates transcription of FLC, a strong flowering repressor in Arabidopsis, by recruiting chromatin modification factors* The Plant Cell 23(1), 289-303
20. Cui Z., Zhou B., Zhang Z., Hu Z., 2013. *Abscisic acid promotes flowering and enhances LcAPI expression in Litchi chinensis Sonn* South African Journal of Botany 88, 76-79
21. Feng W., Jacob Y., Veley KM., Ding L., Yu X., Choe G., Michaels SD., 2011. *Hypomorphic alleles reveal FCA-independent roles for FY in the regulation of FLOWERING LOCUS C* Plant Physiology 155, 1425–1434
22. Feng W., Michaels SD., 2011. *Dual roles for FY in the regulation of FLC* Plant Signaling & Behavior 6:5, 703-705

23. Garner W.W., Allard H.A., 1920. *Effect of the relative length of day and night and other factors of the environment on growth and reproduction in plants* Journal of Agricultural Research 18, 553–606
24. Glazińska P., Wojciechowski W., Kulasek M., Glinkowski W., Marciniak K., Klajn N., Kesy J., Kopcewicz J., 2017. *De novo Transcriptome Profiling of Flowers, Flower Pedicels and Pods of Lupinus luteus (Yellow Lupine) Reveals Complex Expression Changes during Organ Abscission* Frontiers in Plant Science 8, 641
25. Guo X., Yu C., Luo L., Wan H., Zhen N., Xu T., Tan J., Pan H., Zhang O., 2017. *Transcriptome of the floral transition in Rosa chinensis 'Old Blush'* BMC Genomics 18, 199
26. He Y., Michaels SD., Amasino RM., 2003. *Regulation of Flowering Time by Histone Acetylation in Arabidopsis* Science. 302(5651), 1751-1754
27. Hedden P., Sponsel V., 2015. *A Century of Gibberellin Research* Journal of Plant Growth Regulation 34, 740–760
28. Hornyik C., Terzi LC., Simpson GG., 2010. *The spen family protein FPA controls alternative cleavage and polyadenylation of RNA* Developmental Cell 18, 203–213
29. Hu Q., Jin Y., Shi H., Yang W., 2014. *GmFLD, a soybean homolog of the autonomous pathway gene FLOWERING LOCUS D, promotes flowering in Arabidopsis thaliana* BMC Plant Biology 14, 263
30. Huijser P., Schmid M., 2011. *The control of developmental phase transitions in plants* Development 138, 4117-4129
31. Ietswaart R., Wu Z., Dean C., 2012. *Flowering time control: another window to the connection between antisense RNA and chromatin* Trends in Genetics 28(9), 445-453
32. Iñigo S., Alvarez MJ., Strasser B., Califano A., Cerdán PD., 2012. *PFT1, the MED25 subunit of the plant Mediator complex, promotes flowering through CONSTANS dependent and independent mechanisms in Arabidopsis* The Plant Journal 69, 601–612
33. Jeon J., Kim J., 2011. *FVE, an Arabidopsis Homologue of the Retinoblastoma-Associated Protein That Regulates Flowering Time and Cold Response, Binds to Chromatin as a Large Multiprotein Complex* Molecules and Cells 32(3), 227-34
34. Jin JB., Jin YH., Lee J., Miura K., Yoo CY., Kim WY., Van Oosten M., Hyun Y., Somers DE., Lee I., Yun DJ., Bressan RA., Hasegawa PM., 2008. *The SUMO E3 ligase, AtSIZ1, regulates flowering by controlling a salicylic acid-mediated floral*

- promotion pathway and through affects on FLC chromatin structure* The Plant Journal 53, 530–540
35. Jung JH., Seo PJ., Ahn JH., Park CM., 2012. *Arabidopsis RNA-binding protein FCA regulates microRNA172 processing in thermosensory flowering* The Journal Of Biological Chemistry 287(19), 16007–16016
 36. Jung JH., Park CM., 2013. *HOS1-mediated activation of FLC via chromatin remodeling under cold stress* Plant Signaling & Behavior 8(12), e27342.
 37. Jung JH., Domijan M., Klose C., Biswas S., Ezer D., Gao M., Khattak AK., Box MS., Charoensawan V., Cortijo S., Kumar M., Grant A., Locke JC., Schäfer E., Jaeger KE., Wigge PA., 2016. *Phytochromes function as thermosensors in Arabidopsis* Science 354(6314), 886-889
 38. Kang MY., Yoo SC., Kwon HY., Lee BD., Cho JN., Noh YS., Paek NC., 2015. *Negative regulatory roles of DE-ETIOLATED1 in flowering time in Arabidopsis* Scientific Reports 5, 9728
 39. Karpińska E., 2014. *Zapach łubinu wśród pól twój doradca* ROLNICZY RYNEK 11, 32-35
 40. Kenzior A., Folk WR., 2015. *Arabidopsis thaliana MSI4/FVE associates with members of a novel family of plant specific PWWP/RRM domain proteins* Plant Molecular Biology 87, 329–339
 41. Kim DH., Doyle MR., Sung S., Amasino RM., 2009. *Vernalization: winter and the timing of flowering in plants* Annual Review of Cell and Developmental Biology 25, 277-299
 42. Kim DH., Sung S., 2014. *Genetic and Epigenetic Mechanisms Underlying Vernalization* The Arabidopsis Book/American Society of Plant Biologists 12, e0171
 43. Kim S., Choi K., Park C., Hwang HJ., Lee I., 2006. *SUPPRESSOR OF FRIGIDA4, encoding a C2H2-Type zinc finger protein, represses flowering by transcriptional activation of Arabidopsis FLOWERING LOCUS C* The Plant Cell 18(11), 2985-2998
 44. Koressaar T., Remm M., 2007. *Enhancements and modifications of primer design program Primer3* Bioinformatics 23(10), 1289-91
 45. Lang A.. 1965. *Physiology of flower initiation*. [w:] Encyclopedia of Plant Physiology Vol. XV, Part 1, W. Ruhland, ed (Berlin: Springer), 1380–1536
 46. Larkin MA., Blackshields G., Brown NP., Chenna R., McGettigan PA., McWilliam H., Valentin F., Wallace IM., Wilm A., Lopez R., Thompson JD., Gibson TJ.,

- Higgins DG., 2007. *Clustal W and Clustal X version 2.0* Bioinformatics 23, 2947-2948
47. Lee H., Yoo SJ., Lee JH., Kim W., Yoo SK., Fitzgerald H., Carrington JC., Ahn JH., 2010. *Genetic framework for flowering-time regulation by ambient temperature-responsive miRNAs in Arabidopsis* Nucleic Acids Research 38(9), 3081-3093
 48. Lee I., Aukerman MJ., Gore SL., Lohman KN., Michaels SD., Weaver LM., John MC., Feldmann KA., Amasino RM., 1994. *Isolation of LUMINIDEPENDENS: a gene involved in the control of flowering time in Arabidopsis* The Plant Cell 6(1), 75-83
 49. Lee HJ., Jung JH, Cortés Llorca L, Kim SG, Lee S, Baldwin IT, Park CM., 2014. *FCA mediates thermal adaptation of stem growth by attenuating auxin action in Arabidopsis* Nature Communications 5, 5473
 50. Lee JH., Kim JJ., Kim SH., Cho HJ., Kim J., Ahn JH., 2012. *The E3 ubiquitin ligase HOS1 regulates low ambient temperature-responsive flowering in Arabidopsis thaliana* Plant Cell Physiology 53(10), 1802-1814
 51. Lee S., Lee HJ., Jung JH., Park CM., 2015. *The Arabidopsis thaliana RNA-binding protein FCA regulates thermotolerance by modulating the detoxification of reactive oxygen species* New Phytologist 205(2), 555-569
 52. Li H., Wylie S.J., Jones M.G.K., 2000. *Transgenic yellow lupin (Lupinus luteus)* Plant Cell Reports 19, 634–637
 53. Lim MH., Kim J., Kim YS., Chung KS., Seo YH., Lee I., Kim J., Hong CB., Kim HJ., Park CM., 2004. *A new Arabidopsis gene, FLK, encodes an RNA binding protein with K homology motifs and regulates flowering time via FLOWERING LOCUS C* The Plant Cell 16, 731–740
 54. Liu F., Quesada V., Crevillén P., Bäurle I., Swiezewski S., Dean C., 2007. *The Arabidopsis RNA-Binding Protein FCA Requires a Lysine-Specific Demethylase 1 Homolog to Downregulate FLC* Molecular Cell 28, 398–407
 55. Luciński R., Polcyn W., Ratajczak L., 2002. *Nitrate reduction and nitrogen fixation in symbiotic association Rhizobium — legumes* Acta Biochimica Polonica 49(2), 537–546
 56. Luo M., Tai R., Yu CW., Yang S., Chen CY., Lin WD., Schmidt W., Wu K., 2015. *Regulation of flowering time by the histone deacetylase HDA5 in Arabidopsis* The Plant Journal 82, 925–936

57. Lyons R., Iwase A., Gänsewig T., Sherstnev A., Duc C., Barton GJ., Hanada K., Higuchi-Takeuchi M., Matsui M., Sugimoto K., Kazan K., Simpson GG., Shirasu K., 2013. *The RNA-binding protein FPA regulates flg22-triggered defense responses and transcription factor activity by alternative polyadenylation* Scientific Reports 3, 2866
58. Macknight R., Bancroft I., Page T., Lister C., Schmidt R., Love K., Westphal L., Murphy G., Sherson S., Cobbett C., Dean C., 1997. *FCA, a Gene Controlling Flowering Time in Arabidopsis, Encodes a Protein Containing RNA-Binding Domains* Cell 89, 737–745
59. Marciniak K., Świeżawska B., Kęsy J., Tretyn A., Kopcewicz J., 2012. *Gibereliny – percepcja i transdukcja sygnału u roślin* Postępy Biologii Komórki 39(1), 24-47
60. Martin GE., Rousseau-Gueutin M., Cordonnier S., Lima O., Michon-Coudouel S., Naquin D., de Carvalho JF., Ainouche M., Salmon A., Ainouche A., 2014. *The first complete chloroplast genome of the Genistoid legume Lupinus luteus: evidence for a novel major lineage-specific rearrangement and new insights regarding plastome evolution in the legume family* Annals of Botany 113, 1197–1210
61. Martyniuk S., 2012. *Naukowe i praktyczne aspekty symbiozy roślin strączkowych z bakteriami brodawkowymi* Polish Journal of Agronomy 9, 17–22
62. McClung CR., Lou P., Hermand V., Kim JA., 2016. *The Importance of Ambient Temperature to Growth and the Induction of Flowering* Frontiers in Plant Science 7, 1266
63. Mockler TC., Yu X., Shalitin D., Parikh D., Michael TP., Liou J., Huang J., Smith Z., Alonso JM., Ecker JR., Chory J., Lin C., 2004. *Regulation of flowering time in Arabidopsis by K homology domain proteins* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 101(34), 12759–12764
64. de Montaigu A., Tóth R., Coupland G., 2010. *Plant development goes like clockwork* Trends in Genetics 26, 296–306
65. Mutasa-Göttgens E, Hedden P., 2009. *Gibberellin as a factor in floral regulatory networks* Journal of Experimental Botany 60(7), 1979–1989
66. Naganowska B., Wolko B., Sliwińska E., Kaczmarek Z., 2003. *Nuclear DNA content variation and species relationships in the genus Lupinus (Fabaceae)* Annals of Botany 92, 349-355
67. Née G., Xiang Y., JJ Soppe WJJ., 2017. *The release of dormancy, a wake-up call for seeds to germinate* Current Opinion in Plant Biology 35, 8–14

68. Nie S., Li C., Wang Y., Xu L., Muleke EM., Tang M., Sun X., Liu L., 2016. *Transcriptomic Analysis Identifies Differentially Expressed Genes (DEGs) Associated with Bolting and Flowering in Radish (Raphanus sativus L.)* *Frontiers in Plant Science* 7, 682
69. Nilsson O., 2013. *Plant science. A pathway to flowering-why staying cool matters* *Science* 342(6158), 566-567
70. Pagni M., Ioannidis V., Cerutti L., Zahn-Zabal M., Jongeneel CV., Hau J., Martin O., Kuznetsov D., Falquet L., 2007. *MyHits: improvements to an interactive resource for analyzing protein sequences* *Nucleic Acids Research* 35(suppl_2), W433-7
71. Parra-González LB., Aravena-Abarzúa GA., Navarro-Navarro CS., Udall J., Maughan J., Peterson LM., Salvo-Garrido HE., Maureira-Butler IJ., 2012. *Yellow lupin (Lupinus luteus L.) transcriptome sequencing: molecular marker development and comparative studies* *BMC Genomics* 13, 425
72. Pazhouhandeh M., Molinier J., Berr A., Genschik P., 2011. *MSI4/FVE interacts with CUL4-DDB1 and a PRC2-like complex to control epigenetic regulation of flowering time in Arabidopsis* *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108(8), 3430-3435
73. Pniewski T., Kapusta J., Płucienniczak A., 2006. *Agrobacterium-mediated transformation of yellow lupin to generate callus tissue producing HBV surface antigen in a long-term culture* *Journal of Applied Genetics* 47(4), 309-318
74. Podleśny J., Podleśna A., 2008. *Wpływ temperatury w początkowym okresie wzrostu na plonowanie termo- i nietermoneutralnych odmian łubinu żółtego* *Acta Agrophysica* 12(2), 499-508
75. Poethig RS., 2013. *Vegetative phase change and shoot maturation in plants* *Current Topics in Developmental Biology* 105, 125-52
76. Posé D., Verhage L., Ott F., Yant L., Mathieu J., Angenent GC., Immink RG., Schmid M., 2013. *Temperature-dependent regulation of flowering by antagonistic FLM variants* *Nature* 503(7476), 414-417
77. Quesada V., Dean C., Simpson GG., 2005. *Regulated RNA processing in the control of Arabidopsis flowering* *The International Journal of Developmental Biology* 49(5-6), 773-780
78. Quesada V., Macknight R., Dean C., Simpson GG., 2003. *Autoregulation of FCA pre-mRNA processing controls Arabidopsis flowering time* *The EMBO Journal* 22, 3142-3152

79. Richter R., Bastakis E., Schwechheimer C., 2013. *Cross-repressive interactions between SOCI and the GATAs GNC and GNL/CGA1 in the control of greening, cold tolerance, and flowering time in Arabidopsis* Plant Physiology 162(4), 1992-2004
80. Ripoll JJ., Rodríguez-Cazorla E., González-Reig S., Andújar A., Alonso-Cantabrana H., Perez-Amador MA., Carbonell J., Martínez-Laborda A., Vera A., 2009. *Antagonistic interactions between Arabidopsis K-homology domain genes uncover PEPPER as a positive regulator of the central floral repressor FLOWERING LOCUS C* Developmental Biology 333, 251–262
81. Robinson O., Dylus D., Dessimoz C., 2016. *Phylo.io: interactive viewing and comparison of large phylogenetic trees on the web* Molecular Biology and Evolution 33 (8), 2163-2166
82. Rodríguez-Cazorla E., Ripoll JJ., Andújar A., Bailey LJ., Martínez-Laborda A., Yanofsky MF., Vera A., 2015. *K-homology nuclear ribonucleoproteins regulate floral organ identity and determinacy in arabidopsis* PLoS Genetics 11(2):e1004983
83. Sachs RM., Hackett WP., 1977. *Chemical control of flowering* Acta Horticulturae 68, 29-49.
84. Schmitz RJ., Sung S., Amasino RM., 2008. *Histone arginine methylation is required for vernalization-induced epigenetic silencing of FLC in winter-annual Arabidopsis thaliana* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 105(2), 411-416
85. Schomburg FM., Patton DA., Meinke DW., Amasino RM., 2001. *FPA, a gene involved in floral induction in Arabidopsis, encodes a protein containing RNA-recognition motifs* The Plant Cell 13, 1427–1436
86. Shaefer B. 1995. *Revolution in rapid amplification of cDNA ends: new strategies for polymerase chain reaction cloning of full-length cDNA ends* Analytical Biochemistry 227 (2), 255-273.
87. Simpson GG., Dijkwel PP., Quesada V., Ian Henderson I., Dean C., 2003. *FY Is an RNA 3 End-Processing Factor that Interacts with FCA to Control the Arabidopsis Floral Transition* Cell 113, 777–787
88. Singh V., Roy S., Singh D., Nandi AK., 2014. *Arabidopsis flowering locus D influences systemic-acquired-resistance- induced expression and histone modifications of WRKY genes* Journal of Biosciences 39(1), 119-126

89. Smith TF. 2013. *Diversity of WD-repeat Proteins* w Madame Curie Bioscience Database Austin (TX): Landes Bioscience, 2000-2013 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK6426/>
90. Song YH., 2016. *The Effect of Fluctuations in Photoperiod and Ambient Temperature on the Timing of Flowering: Time to Move on Natural Environmental Conditions* Molecules and Cells 39(10), 715-721
91. Song YH., Ito S., Imaizumi T., 2013. *Flowering time regulation: photoperiod- and temperature-sensing in leaves* Trends in Plant Science 18(10), 575-583
92. Sonmez C., Dean C., 2012. *Transcription beyond borders has downstream consequences* RNA Biology 9(2), 143–147
93. Srikanth A., Schmid M., 2011. *Regulation of flowering time: all roads lead to Rome*, Cellular and Molecular Life Sciences 68, 2013–2037
94. Sugawara S., Hishiyama S., Jikumaru Y., Hanada A., Nishimura T., Koshikawa T., 2009. *Biochemical analyses of indole-3-acetaldoxime-dependent auxin biosynthesis in Arabidopsis* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 106 (13), 5430–5435
95. Sun F., Liu C., Zhang C., Qi W., Zhang X., Wu Z., Kong D., Wang Q., Shang H., Qian X., Li F., Jinshui Yang J., 2012. *A conserved RNA recognition motif (RRM) domain of Brassica napus FCA improves cotton fiber quality and yield by regulating cell size*, Molecular Breeding 30, 93–101
96. Sun T-P., 2010. *Gibberellin-GIDI-DELLA: A Pivotal Regulatory Module for Plant Growth and Development* Future Perspectives in Plant Biology 154, 567–570
97. Swarbreck D., Wilks C., Lamesch P., Berardini TZ., Garcia-Hernandez M., Foerster H., Li D., Meyer T., Muller R., Ploetz L., Radenbaugh A., Singh S., Swing V., Tissier C., Zhang P., Huala E., 2008. *The Arabidopsis Information Resource (TAIR): gene structure and function annotation* Nucleic Acids Research 36, D1009–D1014
98. Szymańska R., Gabruk M., Kruk J., 2015. *Ekotypy Arabidopsis thaliana – nowe narzędzie w badaniach biochemicznych i filogenetycznych* Postępy Biochemii 61 (1), 102-113
99. Turnbull C., 2011. *Long-distance regulation of flowering time* Journal of Experimental Botany 62(13), 4399-4413
100. Untergasser A., Cutcutache I., Koressaar T., Ye J., Faircloth BC., Remm M., Rozen SG., 2012. *Primer3 - new capabilities and interfaces* Nucleic Acids Research 40(15), e115

101. Wang JW., 2014. *Regulation of flowering time by the miR156-mediated age pathway*, Journal of Experimental Botany 65(17), 4723-4730
102. Wojciechowski W., Kopcewicz J., 2011. *Molekularne mechanizmy kwitnienia roślin drzewiastych* Zarządzanie ochroną przyrody w lasach 5, 155-177
103. Wojciechowski W., Kęsy J., Kopcewicz J., 2007. *Florigen - legenda czy rzeczywistość?* Postępy Biologii Komórki 34(1), 31-47
104. Wolko B., Clements J.C., Naganowska B., Nelson M.N., Yang H., 2011. *Lupinus* W: Kole Ch., *Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources: Legume Crops and Forages* 153-206, Springer Heidelberg Dordrecht London New York
105. Xing D., Zhao H., Xu R., Li QQ., 2008. *Arabidopsis PCFS4, a homologue of yeast polyadenylation factor Pcf11p, regulates FCA alternative processing and promotes flowering time* The Plant Journal 54, 899–910
106. Xing J., Zhang J., Yang P., Jiang C., Fan J., Han J., Dong J., 2014. *SDR6 is involved in regulation of flowering time in Arabidopsis thaliana* Plant Biotechnology 31, 133–139
107. Xu Y., Wang Y., Stroud H., Gu X., Sun B., Gan ES., Ng KH., Jacobsen SE., He Y., Ito T., 2013. *A Matrix Protein Silences Transposons and Repeats through Interaction with Retinoblastoma-Associated Proteins* Current Biology 23, 345–350
108. Yang H., Tao Y., Zheng Z., Zhang Q., Zhou G., Sweetingham MW., Howieson JG., Li C., 2013. *Draft genome sequence, and a sequence-defined genetic linkage map of the legume crop species Lupinus angustifolius L* PLoS One 29, 8(5), e64799.
109. Yamada KD., Tomii K., Katoh K., 2016. *Application of the MAFFT sequence alignment program to large data—reexamination of the usefulness of chained guide trees* Bioinformatics 32 (21), 3246-3251
110. Yu CW., Liu X., Luo M., Chen C., Lin X., Tian G., Lu Q., Cui Y., Wu K., 2011. *HISTONE DEACETYLASE6 interacts with FLOWERING LOCUS D and regulates flowering in Arabidopsis* Plant Physiology 156, 173–184
111. Yu CW., Chang KC., Wu K., 2016. *Genome-Wide Analysis of Gene Regulatory Networks of the FVE-HDA6-FLD Complex in Arabidopsis* Frontiers in Plant Science 7, 555
112. Zeevaart JAD., 2006. *Florigen Coming of Age after 70 Years* The Plant Cell 18, 1783–1789
113. Zhang Y., Li B., Xu Y., Li H., Li S., Zhang D., Mao Z., Guo S., Yang C., Weng Y., Chong K., 2013. *The cyclophilin CYP20-2 modulates the conformation*

- of BRASSINAZOLE-RESISTANT1, which binds the promoter of FLOWERING LOCUS D to regulate flowering in Arabidopsis* The Plant Cell. 25(7), 2504-2521
114. Zhou Y., Ni M., 2009. *SHB1 plays dual roles in photoperiodic and autonomous flowering* Developmental Biology 331, 50–57
115. Zienkiewicz A., Kozłowska E., Kopcewicz J., 2006. *Regulacja kwitnienia przez światło* Postępy Biologii Komórki 33(3), 493-507