

Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu
Wydział Nauk Biologicznych i Weterynaryjnych

mgr Wojciech Glinkowski
Nr albumu 502622

Rozprawa doktorska
na kierunku Biologia

Zaangażowanie mikro RNA w regulację rozwoju
strąków łubinu żółtego (*Lupinus luteus* L.)

Promotor dr hab. Krzysztof Jaworski, prof. UMK
Katedra Fizjologii Roślin i Biotechnologii

Promotor pomocniczy dr Paulina Glazińska
Katedra Fizjologii Roślin i Biotechnologii

Toruń 2022

Podziękowania

Składam serdeczne podziękowania:

Promotorowi niniejszej pracy, dr hab. Krzysztofowi Jaworskiemu prof. UMK, za pomoc, wsparcie merytoryczne oraz cenne wskazówki udzielane podczas trwania doktoratu i pisania pracy.

Promotorowi pomocniczemu, dr Paulinie Glazińskiej, za pomoc, cierpliwość oraz wieloletnią współpracę niezbędną w realizacji niniejszej pracy.

Wszystkim koleżankom i kolegom doktorantom, w szczególności mgr Milenie Kulasek, mgr Natalii Klajn, mgr Paulinie Kościelak i mgr Julii Rachowce, za nieocenione wsparcie i miłą atmosferę.

Wszystkim pracownikom Katedry Fizjologii Roślin i Biotechnologii oraz pracownikom Interdyscyplinarnego Centrum Nowoczesnych Technologii za miłą atmosferę pracy oraz serdeczność.

Finansowanie

Niniejsza praca powstała przy finansowym udziale:

Grant NCN SONATA nr 2015/19/D/NZ9/03601 pt.: „Udział niskocząsteczkowych regulatorowych RNA i ich genów docelowych w rozwoju organów generatywnych łubinu żółtego (*Lupinus luteus*)” kierowany przez dr Paulinę Glazińską.

Spis treści

Streszczenie	8
Abstract	9
Cel pracy.....	10
Wykaz skrótów	11
1. Wstęp	13
1.1. CHARAKTERYSTYKA ŁUBINU ŻÓLTEGO.....	13
1.2. WARUNKI UPRAWNE ŁUBINU ŻÓLTEGO	14
1.3. ROLA EKONOMICZNA ŁUBINÓW	15
1.4. ŁUBIN ŻÓŁTY W BADANIACH NAUKOWYCH	16
1.5. ROLA MAŁYCH RNA W ROZWOJU ROŚLIN	18
1.6. BIOGENEZA miRNA I MECHANIZM ICH DZIAŁANIA	20
1.7. ZAANGAŻOWANIE MIKRO RNA W REGULACJĘ PROCESÓW WZROSTU I ROZWOJU ORAZ ODPOWIEDZI NA CZYNNIKI STRESOWE	22
1.7.1. Mikro RNA 156.....	23
1.7.2. Mikro RNA 159.....	24
1.7.3. Mikro RNA 160.....	25
1.7.4. Mikro RNA 164.....	26
1.7.5. Mikro RNA 167.....	27
1.7.6. Mikro RNA 169.....	28
1.7.7. Mikro RNA 319.....	29
1.7.8. Mikro RNA 390.....	30
1.7.9. Mikro RNA 393.....	30
1.7.10. Mikro RNA 396.....	31
1.8. FITOHORMONY W ROZWOJU, WZROŚCIE I ODPOWIEDZI ROŚLIN NA STRES.....	32
1.8.1. Auksyny.....	32
1.8.2. Gibereliny.....	35
1.8.3. Kwas abscysynowy.....	38
1.8.4. Kwas jasmonowy	39
1.8.5. Kwas salicylowy	40
1.9. INTERAKCJE FITOHORMONÓW.....	42
1.9.1. Interakcje na poziomie miRNA – fitohormony	45
2. Materiały i metody.....	47
2.1. POZYSKIWANIE MATERIAŁU DO BADAŃ.....	47
2.1.1. Uprawa roślin w warunkach polowych.....	47
2.1.2. Uprawa roślin w warunkach fitotronowych.....	50
2.1.3. Zbiór i przechowywanie materiału.....	53
2.2. HOMOGENIZACJA MATERIAŁU ROŚLINNEGO	55
2.3. IZOLACJA CAŁKOWITEGO RNA.....	56
2.4. WALIDACJA WYIZOLOWANEGO RNA.....	58
2.4.1. Spektrofotometryczne określenie stężenia oraz czystości RNA.....	58
2.4.2. Elektroforeza RNA.....	59
2.4.3. Elektroforeza kapilarna.....	60
2.5. SEKWENCJONOWANIE RNA.....	60
2.5.1. Opracowanie wyników sekwencjonowania	61
2.5.2. Składanie transkryptomu de novo i anotacja	62

2.5.3. Degradomy	62
2.5.4. Identyfikacja sekwencji docelowych dla zidentyfikowanych miRNA	62
2.6. ANALIZA EKSPRESJI WYBRANYCH GENÓW I miRNA	63
2.6.1. Reakcja odwrotnej transkrypcji	65
2.6.2. Reakcja odwrotnej transkrypcji z wykorzystaniem starterów stem-loop	66
2.6.3. Reakcja RT-qPCR.....	67
2.6.4. Analizy <i>in silico</i> wybranych genów oraz miRNA	69
2.7. BADANIE POZIOMU WYBRANYCH FITOHORMONÓW	69
2.7.1. Przygotowanie próbek do analizy.....	70
2.7.2. Ocena ilościowa i jakościowa fitohormonów w próbach	72
2.7.3. Analiza statystyczna i interpretacja otrzymanych wyników analizy poziomu hormonów	73
2.8. BADANIE TOLERANCJI ROŚLIN NA STRES SUSZY	73
2.8.1. Metoda oznaczania ilości wody w liściach	74
3. Wyniki	75
3.1. ZBIÓR MATERIAŁU	75
3.2. IZOLACJA ORAZ WALIDACJA RNA	80
3.2.1. Elektroforeza kapilarna	83
3.3. SEKWENCJONOWANIE RNA	85
3.3.1. Transkryptomy.....	86
3.3.2. Biblioteki sRNA	87
3.3.3. Degradom.....	89
3.4. ANALIZY RÓŻNICOWYCH miRNA	89
3.5. ANALIZY WYBRANYCH PAR miRNA- GEN DOCELOWY	94
3.5.1. Analiza Ll-miR380/miR396 i jego genu docelowego <i>LIGRF9</i>	95
3.5.2. Analiza Ll-miR276/miR167 i jego genu docelowego <i>LIARF6</i>	98
3.5.3. Analiza Ll-miR329/miR160 i jego genu docelowego <i>LIARF17</i>	102
3.5.4. Analiza Ll-miR169 i jego genu docelowego <i>LINF-YA5</i>	106
3.5.5. Analiza Ll-miR446/miR159 i jego genu docelowego <i>LIGAMYB</i>	109
3.6. WYNIKI REAKCJI RT-QPCR.....	112
3.6.1. Analiza ekspresji reprezentatywnych par miRNA -gen docelowy w rozwoju strąków.....	113
a) Ll-miR380/miR396 i jego gen docelowy <i>LIGRF9</i>	114
b) Ll-miR276/miR167 i jego gen docelowy <i>LIARF6</i>	115
c) Ll-miR329/miR160 i jego gen docelowy <i>LIARF17</i>	117
d) Ll-miR446/miR159 i jego gen docelowy <i>LIGAMYB</i>	118
3.6.2. Analiza ekspresji wybranych par miRNA-gen docelowy w rozwoju strąków w zależności od położenia na okółkach kwiatostanu	119
a) Ll-miR380/miR396 i jego gen docelowy <i>LIGRF9</i>	121
b) Ll-miR276/miR167 i jego gen docelowy <i>LIARF6</i>	123
c) Ll-miR329/miR160 i jego gen docelowy <i>LIARF17</i>	124
d) Ll-miR446/miR159 i jego gen docelowy <i>LIGAMYB</i>	126
3.6.3. Analiza ekspresji wybranych par miRNA-gen docelowy podczas rozwoju strąków w różnych okółkach kwiatostanu z podziałem na nasiona i ściany strąków	127
a) Ll-miR380/miR396 i jego gen docelowy <i>LIGRF9</i>	129
b) Ll-miR329/miR160 i jego gen docelowy <i>LIARF17</i>	132
c) Ll-miR169 oraz jego gen docelowy <i>LINF-YA5</i>	135
3.6.4. Analiza ekspresji wybranych par miRNA -gen docelowy w odpowiedzi na stres suszy krótkotrwałej.....	137
a) Ll-miR380/miR396 i jego gen docelowy <i>LIGRF9</i>	139
b) Ll-miR329/miR160 i jego gen docelowy <i>LIARF17</i>	140
c) Ll-miR169 i jego gen docelowy <i>LINF-YA5</i>	142
d) <i>LIHEX3</i> i <i>LIPYL10</i>	143
e) <i>LIPROT1</i> i <i>LIPROT2</i>	144

3.6.5. Analiza ekspresji wybranych par miRNA -gen docelowy w odpowiedzi na stres suszy długotrwałej	145
a) Ll-miR380/miR396 i jego gen docelowy <i>LIGRF9</i>	146
b) Ll-miR329/miR160 i jego gen docelowy <i>LIARF17</i>	147
c) Ll-miR169 i jego gen docelowy <i>LINF-YA5</i>	148
d) <i>LIHEX3</i> i <i>LIPYL10</i>	148
e) <i>LIPROT1</i> i <i>LIPROT2</i>	149
3.6.6. Analiza ekspresji wybranych par miRNA- gen docelowy po egzogennej aplikacji fitohormonów	150
a) Ll-miR380/miR396 i jego gen docelowy <i>LIGRF9</i>	151
b) Ll-miR276/miR167 i jego gen docelowy <i>LIARF6</i>	152
c) Ll-miR329/miR160 i jego gen docelowy <i>LIARF17</i>	153
d) Ll-miR169 oraz jego gen docelowy <i>LINF-YA5</i>	154
e) Ll-miR446/miR159 i jego gen docelowy <i>LIGAMYB</i>	155
3.7. ANALIZA NASYCENIA GLEBY WODĄ	156
3.7.1. Pomiary wilgotności gleby	157
3.7.2. Pomiary wilgotności gleby podczas eksperymentu krótkotrwałej suszy.....	160
3.7.3. Pomiary wilgotności gleby podczas eksperymentu długotrwałej suszy	161
3.7.4. Pomiary względnego poziomu wody w liściach	162
3.8. ANALIZY ILOŚCI WYBRANYCH FITOHORMONÓW W NASIONACH I ŚCIANACH STRĄKÓW ŁUBINU ŻÓLTEGO	164
3.8.1. Fitohormony w rozwoju strąków	165
3.8.2. Fitohormony w rozwoju strąków rozwijających się na różnych okółkach kwiatostanu.....	166
3.8.3. Fitohormony w w odpowiedzi na stres krótkotrwałej suszy	168
3.8.4. Fitohormony w odpowiedzi na stres długotrwałej suszy	170
4. Dyskusja	172
4.1. INTERPRETACJA UZYSKANYCH WYNIKÓW	173
4.2. ZMIANY EKSPRESJI BADANYCH GENÓW.....	173
4.2.1. Ll-miR380/miR396 i <i>LIGRF9</i>	174
4.2.2. Ll-miR276/miR167 i <i>LIARF6</i>	175
4.2.3 Ll-miR329/miR160 i <i>LIARF17</i>	176
4.2.4. Ll-miR446/miR159 i <i>LIGAMYB</i>	177
4.2.5. Ll-miR169 i <i>LINF-YA5</i>	178
4.2.6. <i>LIHEX3</i> , <i>LIPYL10</i> , <i>LIPROT1</i> oraz <i>LIPROT2</i>	180
4.3. ZMIANY POZIOMU TRANSKRYPTÓW I FITOHORMONÓW W ROZWOJU STRĄKÓW .	181
4.4. PODSUMOWANIE	185
5. Wnioski.....	187
Bibliografia.....	188
Suplement.....	202

Streszczenie

Łubin żółty (*Lupinus luteus* L.) należący do bobowatych (*Fabaceae* L.), podobnie jak pozostali przedstawiciele tej rodziny ma ogromne znaczenie gospodarcze. Stanowi on bogate źródło białka obecnego w nasionach, a dzięki symbiozie z bakteriami brodawkowymi wykorzystuje azot atmosferyczny i znajduje zastosowanie jako naturalny środek wzbogacający glebę w azot. Pomimo swojego wielkiego potencjału, wydajność plonowania łubinu jest jednak ograniczona ze względu na zjawisko nadmiernego odcinania organów generatywnych, co dyskwalifikuje łubin jako gospodarczo użyteczną roślinę. Stąd tak ważne jest poznanie molekularnego mechanizmu tego procesu. U łubinu żółtego wzorzec odcinania strąków jest przewidywalny, z im młodszego kwiatu powstaje owoc, tym większe prawdopodobieństwo jego odcięcia, co stanowi istotną zaletę umożliwiającą badanie podstaw molekularnych tego zjawiska.

Mikro RNA (miRNA) to niekodujące, krótkie, jednoniciowe cząsteczki sygnałowe, biorące udział w procesie wyciszania genów, polegającym na inaktywacji ich ekspresji. Roślinne miRNA uczestniczą w regulacji szerokiego wachlarza procesów morfogenetycznych, wliczając w to rozwój, dojrzewanie oraz odcinanie owoców, w wielu przypadkach z udziałem fitohormonów, wyciszając geny kodujące białka związane z percepcją lub interpretacją sygnałów hormonalnych.

Celem niniejszej pracy była weryfikacja hipotezy zakładającej, iż zmiany akumulacji wybranych miRNA i mRNA ich genów docelowych mają istotny wpływ na określenie tego, czy owoce łubinu żółtego będą rozwijać się w sposób prawidłowy, czy też zostaną predeterminowane do odcięcia.

Dla zrealizowania tego celu wykonano identyfikację mikro RNA oraz transkryptów ich genów docelowych związanych z rozwojem strąków oraz nasion łubinu żółtego. Ponadto, zbadano zależność pomiędzy ekspresją wybranych modułów miRNA - gen docelowy oraz poziom wybranych fitohormonów w warunkach optymalnych i podczas stresu suszy.

Na podstawie uzyskanych danych z sekwencjonowania bibliotek mRNA, sRNA oraz degradomu zidentyfikowano miRNA oraz geny zaangażowane w rozwój oraz procesy odcinania strąków. Wyniki badań porównawczych z ekspresji genów oraz pomiarów stężeń fitohormonów ze strąków roślin rozwijających się w warunkach optymalnych oraz warunkach stresowych, pozwoliło wskazać zależności pomiędzy modułami miRNA - gen docelowy oraz fitohormonami. Kluczowymi czynnikami dla prawidłowego rozwoju strąków okazały się być zarówno odpowiednie poziomy miRNA, w szczególności miR167, miR169 oraz miR396, transkryptów genów *ARF6*, *NF-AY5* oraz *GRF9*, będące sekwencjami docelowymi ww. miRNA, oraz fitohormonów: auksyn, giberelin i kwasu abscysynowego.

Uzyskane w toku eksperymentów wyniki rzucają nowe światło na procesy związane z regulacją wzrostu i rozwoju strąków łubinu żółtego, jak również odpowiadają na pytanie w jaki sposób stres abiotyczny może wpływać na te procesy. Wyniki pozwoliły wykazać, że pary miRNA-gen docelowy z powodzeniem mogą być wykorzystane jako markery zarówno prawidłowego wzrostu, jak i markery wskazujące na odpadanie organów generatywnych łubinu żółtego, a w przyszłości stanowić podstawę do stworzenia linii łubinu żółtego bardziej odpornej na odpadanie strąków.

Abstract

Yellow lupine (*Lupinus luteus* L.) belongs to the legume family (*Fabaceae* L.) and like other representatives of this family, has a great economic importance. Thanks to the symbiosis with nitrogen-fixing bacteria, this plant can use atmospheric nitrogen, and therefore can be used as a source of valuable protein present in its seeds or as a natural nitrogen enrichment for the soil. Despite its high potential, the efficiency of crop yield from this plant is limited, because of the generative organ abscission phenomenon, which renders it economically unfavorable. Thereby, it is important to understand the molecular mechanisms underlying this process. In yellow lupine the abscission pattern is very predictable: the younger the flower, the higher the chance of its abscission, which is an important trait that enables the exploration of molecular mechanisms responsible for this process.

MicroRNAs (miRNAs) are non-coding, short, single-stranded signaling molecules involved in the mechanism of gene silencing based on the transcriptional inactivation of their target genes. Plant miRNAs participate in regulation of wide array of morphogenetic processes, including development, fruit ripening and abscission, in many cases in tandem with phytohormones, silencing the genes encoding proteins which perceive or rendition hormonal cues.

This study was aiming to verify the assumptive hypothesis, that changes in accumulation of selected miRNAs and mRNAs of their respective target genes plays a major role in the determination of either normal fruit development, or induced fruit abscission in yellow lupine.

In order to verify this hypothesis, identification of micro RNAs and transcripts of their target genes involved in pods and seeds development present in yellow lupine was carried out. Additionally, the relationship between miRNA-target gene expression patterns and levels of selected phytohormones in optimal growth conditions, as well as during the drought was investigated.

Based on the collected data from mRNA and sRNA library sequencing, as well as degradome analysis, miRNAs involved in pod development and abscission were identified. The results of comparative studies of gene expression and phytohormone accumulation, in optimal and drought conditions, allowed to specify the relationship between miRNA-target gene modules and phytohormones. The key factors for optimal fruit growth were proved to be specific levels of miRNAs, especially miR167, miR169 and miR396, as well as their target genes, *ARF6*, *NF-YA5* and *GRF*, respectively, along with auxin, gibberellin and abscisic acid phytohormone levels.

The data gathered from these experiments is shedding a new light on the processes involved in growth regulation and development of yellow lupine's pods, but also reveal the impact of abiotic stress on these processes. Insights from these studies lead to a conclusion, that pairs of miRNA-target genes can be used as markers of both regular development, as well as fruit abscission. This knowledge might be useful in the future, and form the foundation in creation of yellow lupine transgenic lines more resistant to pod abscission.

Cel pracy

Celem nadrzędnym było określenie zaangażowania miRNA i ich genów docelowych w kluczowe procesy związane ze wzrostem i rozwojem strąków łubinu żółtego (*Lupinus luteus* L.). Badania obejmowały:

- Identyfikację mikro RNA oraz ich genów docelowych uczestniczących we wzroście i rozwoju strąków oraz określenie ich potencjalnego wpływu na regulację procesu ich odcinania;
- Określenie wpływu pozycji strąków w obrębie kwiatostanu na profil ekspresji wybranych miRNA i ich genów docelowych;
- Zbadanie poziomu ekspresji wybranych miRNA oraz ich genów docelowych w warunkach stresu suszy;
- Zbadanie poziomu wybranych fitohormonów zarówno w warunkach optymalnego wzrostu i rozwoju, jak i w warunkach stresu abiotycznego, w celu określenia, czy istnieją korelacje pomiędzy modułami regulacyjnymi miRNA/mRNA i homeostazą fitohormonów.

Wykaz skrótów

1-MCP - 1-metylocyklopropan
2n – liczba chromosomów
ABA – kwas abscysynowy
ABI3 - ang., ABSCISSIC ACID INSENSITIVE 3
ABRE – ang., ABA-responsive element
AFB – ang., Auxin Signaling F-Box
AGO1 - ang., ARGONAUTE 1
ARE - ang., AUXIN RESPONSE ELEMENTS
AREB - ang., ABA-responsive Transcription Factors
ARF - ang., Auxin Response Factor
AUX/IAA – wczesne geny reagujące na auksynę
AuxRE - ang., auxin response DNA elements
CDPK - ang., Calcium-Dependent Protein Kinases
COI1 - ang., CORONATINE INSENSITIVE 1
CPS – syntaza difosforanu ent-kopalilu
CUC1/CUC2 – ang., Cup-shaped Cotyledon
DAA - ang. Days After Anthesis
DAB - ang., Days After Blooming
DCL1 - ang., DICER-LIKE 1
Degradom – biblioteka transkryptów podlegających degradacji
DELLA – rodzina białek regulatorowych
DNA - kwas deoksyrybonukleinowy
GA – giberelina
GAMYB – rodzina czynników transkrypcyjnych
Genom – kompletna informacja genetyczna danego organizmu
geny MIR - gen kodujące miRNA
GGDP – difosforan geranylogeranylu
GID1 - ang., GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF 1
Gpz - giga par zasad, miliard nukleotydów
GRF - ang., Growth Response Factor
hairpin - ang., "szpilka do włosów"
HEN1 - ang., HUA ENHANCER 1
HSL - ang., Hormone-Sensitive Lipase
HYL1 - ang., HYPNOSTATIC LEAVES 1
IAA - kwas indolilo-3-octowy, auksyna
JA - kwas jasmonowy
JA-Me – jasmonian metylu
KS – syntaza ent-kaurenu
lncRNA - ang., long non-coding RNA
LOX2 – enzym biorący udział w syntezie kwasu jasmonowego
miRNA - ang., micro RNA
Mpz - mega par zasad, milion nukleotydów
mRNA - ang., messenger RNA
MYB – ang., myeloblastosis viral oncogene homolog
NAC – akronim od ang., NAM, ATAF1/2, CUC2
NF-YA - ang., NUCLEAR FACTOR-Y subunit A
NGS – ang., New Generation Sequencing

ORE1 - ang., ORESARA1
PIN1 – ang., PINFORMED1
PPRP – ang., Pentatricopeptide repeat protein
pre-miRNA ang., precursor miRNA
pri-miRNA - ang., primary RNA
PYL – białko wewnątrzkomórkowego receptora ABA
PYR – receptor ABA
RISC - ang., RNA-Induced Silencing Complex
RNA - kwas rybonukleinowy
RNA-seq - ang., RNA Sequencing
SE – ang., SERRATE
siRNA - ang., small interfering RNA
SIAP2 - ang., AP2-like ethylene-responsive transcription factor
SPB - ang., SQUAMOSA Promotor Binding
SPL - ang., SQUAMOSA Promotor Binding-Like
sRNA - ang., small RNA
TAAR – ang., transport inhibitor response1/auxin signaling f-box1 auxin receptor
TAS – geny prekursorowe dla ta-siRNA
tasiARF – ta-siRNA regulujące aktywność ARF
ta-siRNA – ang., trans-acting small interfering RNA
TCP – rodzina czynników transkrypcyjnych
TIR/TIR1 – receptor Auksyny
Transkryptom – zbiór wszystkich transkrybowanych genów z danego organizmu lub organu
WRKY – Rodzina czynników transkrypcyjnych
YUC – ang., YUCCA

1. Wstęp

1.1. Charakterystyka łubinu żółtego

Łubin żółty, należy do rodziny (*Fabaceae* Lindl., *Papilionaceae* Giseke) bobowatych zwanej też motylkowymi. Rodzina ta, pomimo ogromnego zróżnicowania zarówno gatunkowego, morfologicznego i siedliskowego, obejmującego 730 rodzajów i ponad 19 400 gatunków, wykazuje kilka charakterystycznych cech wspólnych. Wszystkie są zdolne do symbiozy z bakteriami brodawkowymi, które zapewniają możliwość wiązania azotu atmosferycznego, jednym typem wytwarzanych owoców - strąków, oraz zbliżoną anatomicznie budową kwiatów. Badania molekularne potwierdzają, że *Fabaceae* stanowią monofiletyczną rodzinę, która jest blisko spokrewniona z rodzinami takimi jak mydłodziurkowate (*Quillajaceae*), krzyżownicowate (*Polygalaceae*) i zabłądowate (*Surianaceae*) wspólnie należącymi do rzędu bobowców (*Fabales*) (Rahman i in., 2014).

Łubin należy również do jednego z najbardziej zróżnicowanych i rozpowszechnionych rodzajów roślin kwitnących. Dzikie gatunki łubinów występują naturalnie w Ameryce Północnej i Południowej, regionie Morza Śródziemnego i Afryce Północnej. W rejonie Morza Śródziemnego można obecnie spotkać naturalnie występujące gatunki najważniejszych z rolniczego punktu widzenia gatunków łubinu, takie jak *Lupinus albus* L., *Lupinus angustifolius* L. oraz *Lupinus luteus* L. Na łubiny w regionie Morza Śródziemnego głęboki wpływ miała działalność człowieka, której ślady można znaleźć przynajmniej od czasów neolitycznych. Łubin żółty (*Lupinus luteus* L.) w swoim naturalnym habitatcie występuje głównie na Półwyspie Iberyjskim. Starożytni Egipcjanie, Grecy i Rzymianie używali *L. albus* do ulepszenia gleby i poprzedzania zbóż w płodozmianie, a nasiona przed spożyciem moczono w solance w celu usunięcia z nich alkaloidów odpowiedzialnych za ich gorzki smak. Pozostaje do ustalenia, czy współczesne typy wschodnio- i zachodniośródmorskich łubinów są ich bezpośrednimi potomkami. Wpływ człowieka mógł zagrozić istnieniu niektórych dzikich gatunków łubinów i wzmocnić rozprzestrzenienie się innych, dzikich lub częściowo udomowionych gatunków tych roślin (Cowling, 2001; Wolko i in., 2011).

Najstarsze dane o uprawie łubinu żółtego, jako rośliny ozdobnej w niektórych krajach Europy Południowej, pochodzą z XVI wieku, natomiast już w połowie XIX w. zyskał on popularność jako roślina uprawna, zaś szczególny wkład w rozpowszechnienie

tego trendu mieli rolnicy Pruscy. Wstępne udomowienie objęło dzikie populacje o wielu prymitywnych cechach, takich jak: wysoka zawartość alkaloidów, pęknięcie strąków, twarda okrywa nasion. Największą zaletą łubinów była wówczas ich wysoka zdolność do wiązania azotu (200 kg/ha) na glebach ubogich i piaszczystych. Pierwszymi ośrodkami uprawy łubinu żółtego były Niemcy, a następnie Polska, Białoruś i Rosja na przełomie XIX i XX wieku. Ze względu na intensywne prace hodowlane w tym okresie wyselekcjonowano liczne, spontaniczne mutanty o pożądanych cechach roślin uprawnych, m.in. znacznie ograniczonym stężeniu alkaloidów. W związku z tym w Niemczech, Polsce i Rosji uzyskano wiele odmian "słodkich" charakteryzujących się niską zawartością tych związków (Święcicki i in., 2000; Musco i in., 2017).

1.2. Warunki uprawne łubinu żółtego

Dawniej, rośliny łubinu żółtego wymagały wernalizacji we wczesnej fazie wzrostu (niskie temperatury, 2-4°C przez około dwa tygodnie), aby osiągnąć stadium generatywne i wytworzyć wysoki plon nasion. Bez wernalizacji początkowy wzrost był długi, rośliny dojrzewały późno, a wiele okazów ulegała zakażeniu wirusem żółtej mozaiki fasoli (Święcicki i in., 2000). Z drugiej strony zbyt wczesny wysiew niósł za sobą ryzyko porażenia roślin w wyniku przymrozków. Z tego powodu jednym z kamieni milowych w procesie ulepszania cech uprawnych łubinów, oprócz redukcji poziomu alkaloidów, było otrzymanie termoneutralnych odmian łubinu żółtego (Podleśny i in., 2008), które praktycznie wyparły uprawy swoich nietermoneutralnych (wymagających wernalizacji) odpowiedników. W warunkach polowych wschód roślin następuje w okresie od czterech do dwunastu dni od momentu wysiania, w zależności od warunków temperaturowych. Pełny okres wegetacyjny łubinu jest stosunkowo długi i w zależności od warunków atmosferycznych wynosi około 120 dni. Okres wzrostu można podzielić na fazę wegetatywną oraz generatywną, która wypada na okres około 50-75 dnia uprawy i charakteryzuje się zawiązywaniem kwiatów oraz owoców, zakończoną naturalnym etapem desykcji (wysychania). Proces desykcji w przypadku roślin dziko rosnących zakończony jest pęknięciem strąków i uwolnieniem nasion, cecha ta jednak została wyeliminowana z odmian uprawnych, gdyż stanowiła jeden z głównych problemów związanych z plonowaniem i zbiorami. Ze względu na zdolność asymilacji azotu, łubiny mają skromne wymagania glebowe niezbędne do efektywnego wzrostu. Rośliny te z powodzeniem można

uprawiać nawet na glebach typu V, uznawanych za słabo urodzajne, suche i ubogie w substancje organiczne. Łubiny cechują się również dobrą tolerancją na niedostępność wody, będąc w stanie rosnąć przy sumarycznej ilości opadów występujących w okresie wegetacyjnym na poziomie około 100-200 mm (Faligowska i in., 2013).

1.3. Rola ekonomiczna łubinów

Łubin żółty doskonale pełni funkcję ekologicznego nawozu jako roślina poprzedzająca inne uprawy. Dzięki symbiozie z bakteriami brodawkowymi potrafi wiązać zarówno związki azotu zawarte w glebie, jak również azot atmosferyczny (Luciński i in., 2002). Wykorzystanie łubinu jako przedplonu wzbogaca glebę w łatwo dostępny dla innych roślin azot, nie zubożając jej dodatkowo w inne pierwiastki, które wracają do gleby wraz z materią organiczną.

Rośliny strączkowe, w tym między innymi soja (*Glycine max*) oraz łubin mają również ogromne znaczenie praktyczne. Nasiona łubinów zawierają wysoki poziom białka zapasowego, które stanowi średnio do 40% ich suchej masy, dlatego są często wykorzystywane jako surowiec do produkcji pasz wysokobiałkowych lub źródło białka dla ludzi (Boukid i in., 2022). Nasiona łubinu żółtego wykazują ponadto największe stężenie białka (ok. 465g/kg) w stosunku do pozostałych dwóch odmian łubinów uprawianych w Polsce, łubinu białego (ok. 360g/kg) oraz łubinu wąskolistnego (330g/kg) (Sujak i in., 2006).

Oprócz ogólnej zawartości białka, wartość odżywcza nasion roślin strączkowych, w tym łubniu żółtego, jest wypadkową kilku dodatkowych czynników, takich jak profil aminokwasowy czy zawartość składników antyodżywczych (głównie z grupy alkaloidów). Jednym z głównych niedoborów wartości żywieniowych w przypadku tych roślin jest niska zawartość aminokwasów siarkowych (metioniny i cysteiny) oraz tryptofanu.

Nasiona roślin strączkowych zawierają głównie dwa rodzaje białek: globuliny i albuminy, przy czym białka z frakcji albumin posiadają znacznie bardziej pożądaną kompozycję aminokwasową z wyższą zawartością aminokwasów egzogennych, przede wszystkim metioniny i tryptofanu (Kaczmarek i in., 2016). Stwierdzono, że odmiany łubinu żółtego są również dobrym źródłem lizyny i argininy, a obecne w odmianach *L. luteus* alkaloidy wykazują niewielkie stężenie i mają znikomy wpływ na strawność składników odżywczych (Gatel, 1994).

1.4. Łubin żółty w badaniach naukowych

Chociaż łubin żółty nie stanowi standardowej rośliny modelowej, przejawia on duży potencjał do badania kilku procesów takich jak: nodulacja związana z symbiozą z bakteriami brodawkowymi, odcinanie kwiatów i strąków czy jego potencjalnego wykorzystania w procesach remediacji gleb (Prusiński, 2007; Wilmowicz i in., 2016; Glazinska i in., 2017; Pietrzykowski i in., 2017; Marciniak i in., 2020). Długi okres rozwoju i specyficzny typ kwiatostanów umożliwia wykorzystanie łubinu jako idealnego modelu do badania wielu procesów fizjologicznych czy mechanizmów molekularnych, zarówno we wzroście i rozwoju, jak i odcinaniu organów generatywnych (Byszewski 1969). W przypadku łubinu żółtego kwiatostany (grona), jak również przysze strąki zlokalizowane są w okółkach (piętrach kwiatostanu) zorganizowanych w uporządkowany i przewidywalny wzór.

Prawdopodobieństwo aborcji (odpadania) zarówno kwiatów jak i strąków rośnie proporcjonalnie do lokalizacji organu na kwiatostanie, poczynając od najniższego (pierwszego) okółka, prawdopodobieństwo odpadania strąków osiąga niemal 100% dla strąków powyżej okółka czwartego (Byszewski 1969). W praktyce na roślinie pojawia się więc maksymalnie 10-15 w pełni wykształconych strąków, przy pierwotnej liczbie kwiatów wynoszącej niejednokrotnie 25-35. Problem odcinania kwiatów jak i owoców stanowi jeden z głównych czynników zniechęcających rolników do uprawy łubinów w celach innych, niż wykorzystanie ich jako wspomnianego wcześniej przedplonu.

Badania genetyczne i cytologiczne pozwoliły na określenie organizacji genomu łubinu żółtego. Ilość chromosomów wynosi $2n=52$ i jest to wartość umiarkowanie wysoka w porównaniu z innymi członkami rodziny, w których to waha się od $2n=32$ dla *L. cosentinii* (Naganowska i in., 2003) do $2n=96$ dla *L. paniculatus* i *L. pubescens*, które normalnie posiadają $2n=48$, jednak mieszańce wśród gatunków alaskańskich mogą posiadać $2n=96$ chromosomów (Turner, 1994). Niestety, do tej pory nie jest dostępny w pełni poznany genom *L. luteus*, a jedyną odmianą dla której genom udało się w pełni zsekwencjonować jest blisko spokrewniony *Lupinus angustifolius*. Wielkość tego genomu szacuje się na ok. 1.15 Gpb (Giga par zasad), przy jednoczesnej organizacji w $2n=40$ chromosomów. Biorąc pod uwagę te liczby, można założyć, że genom *L. luteus* jest o niemal 20% większy od genomu *L. angustifolius*, a co za tym idzie w analizach sekwencjonowań genomowych

i RNA-seq (ang. RNA Sequencing), genom łubinu wąskolistnego nie nadaje się jako genom referencyjny dla analiz dla łubinu żółtego. Dla porównania genom najbardziej popularnej rośliny modelowej, rzodkiewnika pospolitego (*Arabidopsis thaliana*) wynosi w porównaniu z wyżej wymienionym łubinem wąskolistnym zaledwie 134.6 Mpz (Mega par zasad) co stanowi około jedną dziesiątą genomu łubinów (Swarbreck i in., 2008; Wolko, 2011).



Rycina 1. Zdjęcie kwiatostanu oraz strąków łubinu żółtego. Bar = 1cm
Źródło: zdjęcie i edycja: Wojciech Glinkowski

Na przestrzeni ostatnich kilkunastu lat udało się dokonać wielu badań z zakresu biologii molekularnej na tej roślinie. Duży wkład w badania nad odmianami łubinu, w tym również łubinu żółtego, mają polscy badacze m.in.: dr hab. (np. Książek, 1962), prof. Janusz Prusiński (np. Prusiński, 2007), dr hab. Emilia Wilmowicz (np. Wilmowicz i in., 2017),

dr Paulina Glazińska (np. Glazińska i in. 2019) czy dr Katarzyna Marciniak (np. Marciniak i in., 2020).

Pośród badań molekularnych wykonanych przez polskich i zagranicznych badaczy można wymienić: zsekwencjonowanie genomu chloroplastowego łubinu żółtego (Martin i in., 2014), sekwencjonowanie transkryptomów i degradomów (Parra-Gonzalez i in., 2012; Glazinska i in., 2017; Glazinska i in., 2019), stworzenie bibliotek małych RNA (Glazinska i in., 2019; Glazinska i in., 2020). Udało się również opracować pilotażowe metody regeneracji łubinu żółtego w warunkach *in vitro* oraz jego transgenizacji (Li i in., 2000; Pniewski i in., 2006). Ponadto, przeprowadzone zostały liczne badania na poziomie morfogenezy oraz zbadano profil biochemiczny i skład aminokwasowy białek obecnych w nasionach (Byszewski, 1969; Prusiński, 2007; Kaczmarek i in., 2016). W ciągu ostatnich kilkunastu lat znaczenie roślin strączkowych, w szczególności soi (*G. max*), grochu (*Pisum sativum*), łubinu oraz nikli indyjskiej (*Cajanus cajan*) znacząco wzrosło, w kontekście rolniczo-ekonomicznym, jak również naukowo-badawczym. W wyniku upraw selektywnych stworzono nowe, bardziej korzystne, z ekonomicznego i biologicznego punktu widzenia, odmiany tych roślin, jak również wiele transgenicznych odmian, głównie soi (Wilcox 2001; De Ronde i in., 2004). Znaczenie ekonomiczne oraz poznawcze roślin strączkowych wciąż rośnie. Dowodem na to, że trend ten nie słabnie są liczne publikacje naukowe, które ujrzały światło dzienne na przestrzeni ostatnich lat (Kamphuis i in., 2021).

1.5. Rola małych RNA w rozwoju roślin

Postęp w badaniach molekularnych na przestrzeni kilku ostatnich dekad pozwolił na odkrycie i sklasyfikowanie wielu regulatorowych RNA. Pierwotnie uznawane za cząsteczki zbędne i niewiele znaczące, z czasem ukazały swoją istotną rolę w regulacji wielu procesów komórkowych (Silva i in., 2014). Powszechnie stosowany jest podział regulatorowych RNA na długie niekodujące RNA (lncRNA, ang., long non-coding RNA) o długości większej niż 200 nukleotydów, oraz małe RNA (sRNA, ang., small-RNA), które stanowią różnorodną grupę niskocząsteczkowych, niekodujących RNA biorących udział w szeroko pojętej regulacji procesów transkrypcyjnych w obrębie komórek, w tym również komórek roślinnych.

Najbardziej powszechne sRNA to małe interferujące RNA (siRNA) wytwarzane z dwuniciowych prekursorów RNA, które w zależności od ich biogenezy mogą podlegać

dalszej klasyfikacji, oraz mikro RNA (miRNA) będące liczną i wszechobecną klasą małych RNA, które pochodzą z jednoniciowych prekursorów RNA tworzących struktury przypominające szpilki do włosów (ang., hairpin). Mikro RNA mają swój początek w dwuniciowym RNA, które ulega odpowiedniej obróbce przez skomplikowaną maszynę wewnątrzkomórkową. Biogeneza miRNA jest wieloetapowym procesem, obejmującym transkrypcję, modyfikacje post-transkrypcyjne, oraz wycinanie dojrzałych miRNA o długości 21-24 nukleotydów z ich prekursorów.

Chociaż w ciągu ostatnich dwóch dekad zidentyfikowano setki sRNA, często będących wysoce konserwowanymi ewolucyjnie na przestrzeni wielu gatunków roślin przedstawicielami dobrze sklasyfikowanych rodzin, dokładna mechanika ich działania w wielu aspektach rozwojowych wciąż pozostaje niedostatecznie dobrze zbadana.

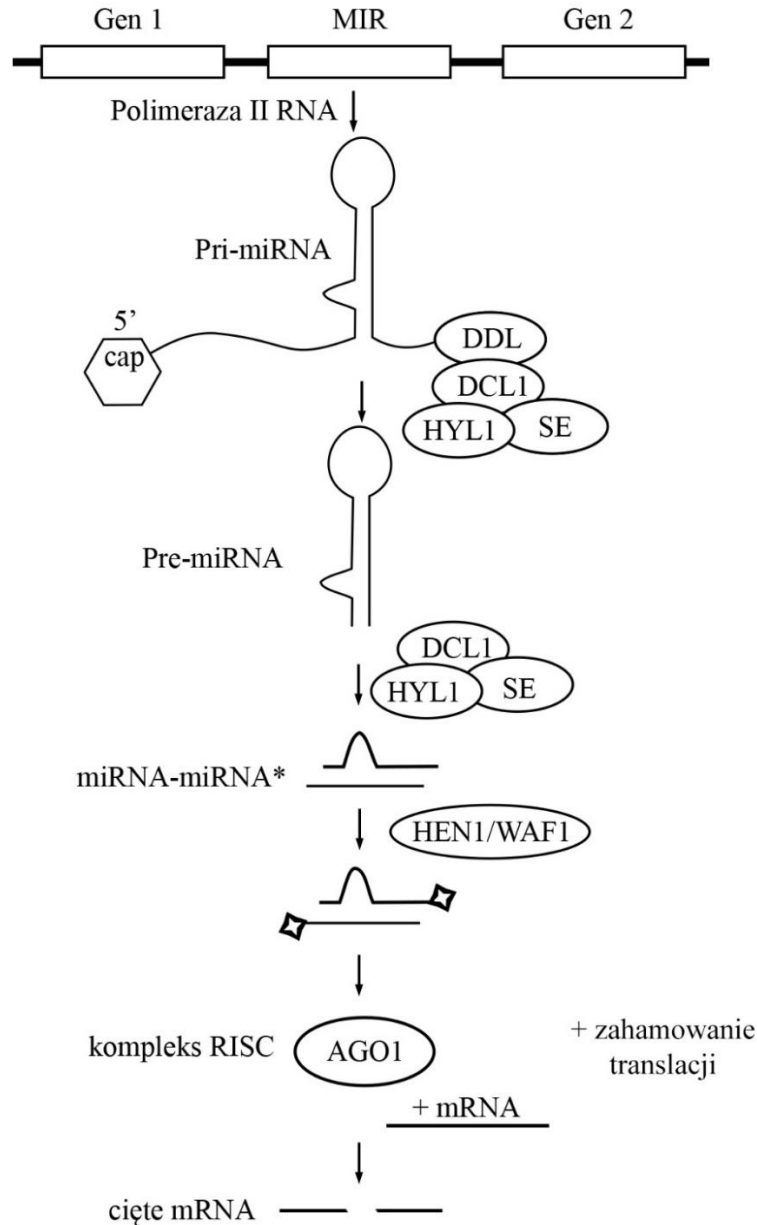
U roślin miRNA biorą udział w post-transkrypcyjnej regulacji ekspresji genów mających wpływ na różne aspekty wzrostu i rozwoju (Achard i in., 2004; Wu i in., 2009; Silva i in., 2014), a także tolerancji na stres (Macovei i in., 2012; Liang i in., 2012; Du i in., 2014). Dzięki niemal idealnemu dopasowaniu sekwencji miRNA do ich genów docelowych możliwe jest dokładne określenie działania związanego z represją genów będących często kluczowymi czynnikami transkrypcyjnymi. Wiele z wyciszanych za pomocą miRNA czynników stanowi elementy szlaków regulacyjnych pełniących ważną rolę w rozwoju generatywnym, w tym w rozwoju owoców u roślin strączkowych (Shamimuzzaman i in., 2012).

Liczba roślinnych miRNA zdeponowanych w publicznych bazach danych takich jak np. miRBase (Kozomara i in., 2014; Kozomara i in., 2019), gwałtownie wzrosła w ciągu ostatnich dwóch dekad. Wśród roślin okrytozalążkowych można wyróżnić ponad 20 rodzin wysoce konserwowanych genetycznie miRNA, z dużą liczbą genów docelowych kodujących czynniki transkrypcyjne, z których wiele reguluje ważne aspekty wzrostu i rozwoju roślin (Zhang i in., 2006). U roślin większość docelowych mRNA zawiera tylko jedno miejsce komplementarne do danego miRNA, które wykazuje z nim niemal absolutną homologię, co prowadzi następnie do post-transkrypcyjnego wyciszenia danego mRNA. Dzięki tak ścisłemu dopasowaniu możliwe jest określenie z dużym prawdopodobieństwem, również metodami bioinformatycznymi genów, które mogą podlegać regulacji przez miRNA a co za tym idzie procesów, które mogą być regulowane już na poziomie post-transkrypcyjnym (Palatnik i in., 2007).

1.6. Biogeneza miRNA i mechanizm ich działania

Podobnie jak w przypadku genów kodujących białka, geneza miRNA rozpoczyna się od transkrypcji genów *MIR* przez polimerazę II RNA, w wyniku czego generowane są pierwotne transkrypty miRNA (ang., primary miRNA, pri-miRNA), które posiadają czapkę (ang., cap) na końcu 5' oraz łańcuch poli-A na końcu 3' (Xie i in., 2005). Obecność sekwencji *TATA-box* w promotorach genów *MIR* sugeruje ich podobieństwo do genów kodujących funkcjonalne białka. Pri-miRNA ulega następnie modyfikacji do charakterystycznej struktury spinki do włosów (ang., hairpin) przez kompleks białek w skład którego wchodzi DCL1 (ang. DICER-LIKE 1) HYL1 (ang., HYPONASTIC LEAVES 1) oraz SE (ang., SERRATE). W wyniku działania tego kompleksu powstaje pre-miRNA (ang., precursor miRNA), a następnie duplex miRNA-miRNA* (Vazquez i in., 2004). Badania *in vitro* wykazały, że HYL1 i DCL1 są niezbędne do dokładnego wycinania pre-miRNA z prekursorów pri-miRNA, a mutacje w obrębie tych genów drastycznie obniżały ilość dojrzałych miRNA (Vazquez i in., 2004; Yang i in., 2006).

Kolejnym etapem jest metylacja dupletu miRNA-miRNA* na 2'OH grupie końca 3' przez białko HEN1 (ang., HUA ENHANCER 1), będące metylotransferazą miRNA, która działa w oparciu o specyficzność sekwencji oraz specyficzność strukturalną (Yu i in., 2005). Finalnym etapem w dojrzewaniu miRNA jest inkorporacja pojedynczego już miRNA, powstałego w wyniku rozpadu dupletu miRNA-miRNA* do kompleksu białkowego AGO1 (ang., ARGONAUTE 1), co powoduje jego jednoczesną aktywację. Aktywny AGO1 łączy się następnie z kolejnymi białkami, tworząc kompleks tzw. RISC (ang., RNA-Induced Silencing Complex). Kompleks ten posiada właściwości endonukleolityczne, umożliwiające cięcie dupletów mRNA-miRNA niemal w ich centrum (Baumberger i in., 2005; Qi i in., 2005). Powyższy proces ilustruje rycina 2, zaś miejsce cięcia transkryptów kanonicznie wypada na odcinek pomiędzy 10 a 11 nukleotydem miRNA w rejonie komplementarnym z mRNA. Dodatkowo, roślinne miRNA biorą również udział w zahamowaniu translacji, a najnowsze dane sugerują, że represja translacyjna jest pierwszym mechanizmem indukowanej przez miRNA represji genów, jak również dedenylacja mRNA i ostatecznie jego degradacja (Bazzini i in., 2012; Djuranovic i in., 2012).



Rycina 2. Uproszczony schemat poszczególnych etapów biogenezy oraz działania miRNA u roślin.

Źródło: Opracowanie własne na podstawie Xie i in 2005 oraz Baumberger i in., 2005.

Mutacje w obrębie genów kodujących istotne elementy szlaku biogenezy sRNA prowadzą do plejotropowych defektów rozwojowych roślin, co podkreśla funkcjonalne znaczenie sRNA, w tym również miRNA, w kształtowaniu różnych aspektów rozwoju roślin. Elementy szlaku biogenezy sRNA i ich funkcja są w znacznym stopniu konserwowane wśród różnych, często niespokrewnionych ze sobą gatunków roślin, co potwierdza ewolucyjne znaczenie tego mechanizmu regulacji ekspresji genów (Gao i in., 2021).

Z jednej strony kompleks DCL1 i pozostałych białek jest niezbędny do rozpoznawania i przetwarzania pri-miRNA. Z drugiej strony aktywność genów *DCL1*, *HYL1* i *SE* jest jednocześnie regulowana na poziomie transkrypcyjnym, potranskrypcyjnym i potranslacyjnym. Do tych elementów regulacyjnych zaliczyć można również miRNA. U soi (*Glycine max*) ekspresja *DCL2* jest regulowana przez miR1515 (Li i in., 2010), a u *Medicago truncatula* przez miR1507 (Zhai i in., 2011). Przeprowadzone analizy wskazują, że w przypadku łubinu żółtego dla żadnego z tych miRNA transkrypt kodujący DCL2 nie jest docelowy. W łubinie żółtym zidentyfikowany został natomiast nowy regulator DCL2 - nowy miRNA o nazwie L1-miRn30, zdeponowany w bazie LuluDB pod numerem ID486 (Głazinska i in., 2019). Ponadto, analizy danych dla miR162 obecnego u *L. luteus* wskazują, że reguluje on ekspresję *DCL1* tak jak w innych roślinach takich jak *Arabidopsis thaliana*, kukurydza (*Zea mays*) oraz ziemniak (*Solanum tuberosum*) (Xie i in., 2003; Liu i in., 2014; Szajko i in., 2019).

W ostatnich dwóch dziesięcioleciach zidentyfikowano wiele czynników modulujących biogenezę miRNA. Analizy białek i odpowiednie mutanty roślinne doprowadziły do lepszego zrozumienia procesu generowania miRNA. Jednak pełne zrozumienie biogenezy miRNA pozostaje ogromnym wyzwaniem. Funkcje biochemiczne wielu czynników białkowych oraz niebiałkowych oraz ich wzajemne interakcje są wciąż nieznane (Gao i in., 2021).

1.7. Zaangażowanie mikro RNA w regulację procesów wzrostu i rozwoju oraz odpowiedzi na czynniki stresowe

Wiele dobrze zbadanych i konserwowanych ewolucyjnie pomiędzy różnymi gatunkami roślin miRNA pełni istotną funkcję w regulacji naturalnych procesów rozwojowych, jak również modulacji tych procesów w odpowiedzi na bodźce zewnętrzne. W poniższych podrozdziałach szczegółowo scharakteryzowano te, które odgrywają szczególnie istotną rolę w procesach związanych z kwitnieniem, rozwojem zarodkowym, rozwojem i dojrzewaniem owoców oraz regulacją odpowiedzi roślin na stres.

1.7.1. Mikro RNA 156

Mikro RNA 156 (miR156) należy do dobrze konserwowanej rodziny genów *MIR156*, która obejmuje obecnie ponad 300 sekwencji zidentyfikowanych w obrębie kilkunastu gatunków roślin, zarówno jedno- jak i dwuliściennych, na podstawie danych z miRBase (Kozomara i in., 2019). Liczne badania wskazują, że genami docelowymi dla miR156 są sekwencje czynników transkrypcyjnych z grupy *SPB* (ang., *SQUAMOSA Promotor Binding*), które biorą udział w morfogenezie i rozwoju roślin, w szczególności w rozwoju liści, liścieni i nasion (Wu i in., 2009). Badania wskazują również, że miR156 oddziałuje na geny *SPL* (ang., *SQUAMOSA Promotor Binding-Like*), które wykazują wysokie podobieństwo do genów *SPB*. Udowodniono, że regulacja transkryptów *SPL* za pośrednictwem miR156 odgrywa kluczową rolę w regulacji rozwoju zarodka u *Arabidopsis thaliana* (Nordine i in., 2010).

MiRNA156 wraz z innymi miRNA (miR157 i miR172) moduluje w owocach pomidora (*Solanum lycopersicum*) czynnik odpowiedzi na auksynę *ARF* (ang., Auxin Response Factor) i inne regulatory dojrzewania, takie jak *SIAP2* (ang., AP2-like ethylene-responsive transcription factor) czy czynniki transkrypcyjne z rodziny *SPL* (Karlova i in., 2013). W przypadku pomidora zarówno miR156, jak i miR172 modułują poziomy mRNA swoich genów docelowych podczas dojrzewania owocu, bez całkowitego ich wyciszenia. Obejmują one ośmiu członków rodziny czynników transkrypcyjnych *SPL* (*SPL2*, *SPL3*, *SPL4*, *SPL6*, *SPL10*, *SPL11*, *SPL13*, *SPL15*) ulegających ekspresji podczas rozwoju liści, kwiatów i owoców. Wykazano, że cele miR156 i miR172 odgrywają również kluczową rolę w kontroli czasu kwitnienia i różnych aspektów rozwoju wegetatywnego u *Arabidopsis* (Wu i in., 2009). Nadekspresja prekursora *AtMIR156b* natomiast generowała nieprawidłową morfologię kwiatów i owoców u pomidora poprzez wyciszenie genów *SBP* (Silva i in., 2014).

W przypadku *Arabidopsis*, nadekspresja *MIR156* prowadziła do karłowatości roślin, skutkując fenotypem z długimi liśćmi oraz wydłużoną fazą wegetatywną (Xie i in., 2006). Przeprowadzono również badania, które wykazały zmiany w poziomie ekspresji kilku rodzin genów *MIR*, skutkujące zmianami w poziomie akumulacji miR156, miR162, miR171, miR393 i miR172 podczas egzogennej aplikacji etylenu i jego antagonisty u bananowca (*Musa acuminata*). Geny te wykazywały zwiększoną ekspresję po traktowaniu etylenem i inhibicję po traktowaniu 1-MCP (1-metylocyklopropen, inhibitor receptorów etylenu).

Efekty te wskazują na ważną rolę tych rodzin miRNA podczas procesu dojrzewania owoców (Bi i in., 2015).

1.7.2. Mikro RNA 159

Mikro RNA 159 (miR159) jest wysoce konserwowanym miRNA z potwierdzoną rolą w procesie kwitnienia, rozwoju pylników oraz rozwoju i kiełkowaniu nasion, represując geny czynników transkrypcyjnych MYB znanych również jako GAMYB (Alonso-Peral i in., 2010). Rodzina genów *MIR159* obejmuje obecnie ponad 100 sekwencji na podstawie danych z miRBase (Kozomara i in., 2019).

Liczne badania wykazały, że miR159 ujemnie reguluje ekspresję genów *GAMYB* na poziomie potranskrypcyjnym. *GAMYB* został po raz pierwszy zidentyfikowany jako cel sygnalizacyjny GA w komórkach aleuronowych jęczmienia (*Hordeum vulgare* L.). Stwierdzono również, że członkowie rodziny *MYB* odgrywają ważną rolę w odpowiedzi na kwas abscysynowy podczas rozwoju nasion ryżu (*Oryza sativa* L.) i owoców orzecha ziemnego (*Arachis hypogaea* L.) (Ma i in., 2018). Zmiany ekspresji genów docelowych miR159 mają również istotne znaczenie w rozwoju owoców pomidora (Buxdorf i in., 2010).

U *Arabidopsis* czynniki transkrypcyjne MYB33 i MYB101 działają jako pozytywne regulatory odpowiedzi na kwas abscysynowy (ABA) podczas kiełkowania nasion. Jednak w kiełkujących nasionach ABA indukuje akumulację miR159 poprzez aktywność czynnika transkrypcyjnego ABI3 (ang., ABSCISSIC ACID INSENSITIVE 3). Stwierdzono, że transkrypty *MYB33* i *MYB101* ulegają degradacji w procesie post-transkrypcyjnego wyciszania genów za pośrednictwem kompleksu RISC i miR159. Obserwacje te zostały również poparte nadwrażliwością na ABA w liniach podwójnych mutantów *myb33* i *myb101* oraz roślinach transgenicznych z nadekspresją *MIR159* (Reyes i in., 2007).

Wykazano także, że miR159 reguluje rozwój pylników i owoców poprzez cięcie transkryptu *MYB33*. Podwójne mutanty *A. thaliana miR159a;159b* lub posiadające mutację miejsca wiązania miR159 w mRNA *MYB33* wykazywały defekty plejotropowe, w tym poważnie upośledzoną płodność, karłowate pylniki, małe łuszczyzny i małe nasiona. Co ciekawe, akumulacja miR159 była podwyższona po traktowaniu gibereliną (GA), a mutanty z niedoborem GA wykazywały niską akumulację miR159. Traktowanie mutantów GA wystarczyło, aby zwiększyć akumulację miR159 powyżej poziomu

obserwowanego w roślinach typu dzikiego (Achard i in., 2004), co jest kolejnym przykładem wzajemnego oddziaływania miRNA i hormonów w rozwoju roślin.

U granatu (*Punica granatum* L.) wykazano, że geny *MIR159A*, *MIR159B* i *MIR319B* przejawiały podwyższony poziom ekspresji podczas późniejszych etapów rozwoju owoców (Saminathan i in., 2016). Rodzina *MIR159* jest bardzo blisko spokrewniona w rodziną *MIR319*. Podczas gdy miR319 ma ograniczoną zdolność do regulowania celów miR159, to miR159 nie są specyficznie ukierunkowane na miejsca wiązania dla miR319. Rodziny miRNA o wysokiej ekspresji (PgmiR156, PgmiR157, PgmiR159, PgmiR160, PgmiR172 i PgmiR319) oraz ich warianty (PgmiR156a, PgmiR156g, PgmiR157b, PgmiR157c i PgmiR159b) zidentyfikowano w liściach, różnych stadiach rozwoju męskich i żeńskich kwiatów oraz owoców granatu. MiRNA PgmiR156, PgmiR156a, PgmiR159a, PgmiR159b, PgmiR160b i mPgmiR319b były silnie akumulowane podczas późnych etapów rozwoju owoców. Genami docelowymi dla wymienionych miRNA są transkrypty *MYB* regulujące rozwój roślin i sygnalizację fitohormonów.

1.7.3. Mikro RNA 160

Kolejnym z mikro RNA, który pełni kluczową rolę zarówno w rozwoju, jak i regulacji hormonalnej u roślin jest miR160. Głównymi genami docelowymi dla miR160 są geny kodujące czynniki transkrypcyjne odpowiedzi na auksyny, *ARF* (ang., Auxin Response Factor). Geny z rodziny *ARF* uczestniczą w procesie kiełkowania nasion i programów rozwojowych zarodków, korzeni, liści i organów kwiatowych. Czynniki transkrypcyjne ARF wraz z białkami AUX/IAA odpowiedzialne są za regulację ekspresji genów posiadających w sekwencjach promotorowych motyw *AuxRE* (ang., auxin response DNA elements) (Ulmasov i in., 1997; Li i in., 2016). Wykazano, że interakcje pomiędzy mRNA *ARF16* i miR160a, a dokładniej zmniejszona ekspresja *MIR160a* i wynikający z tego wzrost poziomu akumulacji transkryptu *ARF16* wpływały na zwiększenie wrażliwości nasion na auksynę (IAA) (Ma i in., 2018).

Z badań prowadzonych na daktylowcu (*Phoenix dactylifera* L.) wynika, że miR160 jest w stanie brać udział w wyciszaniu ekspresji pięciu czynników odpowiedzi na auksynę *ARF* i chociaż eksprymowany jest na szczególnie niskim poziomie podczas rozwoju

owoców, jest to ściśle związane z wysoką aktywnością transkrypcyjną jego genów docelowych (Xin i in., 2015).

Wykazano także udział miR160 w rozwoju systemu korzeniowego u *Arabidopsis* w warunkach niedoboru azotu w glebie. Dane z sekwencjonowania bibliotek małych RNA (Liang i in., 2012) wskazały 6-krotnie podwyższony poziom miR160 w takich warunkach. Zaobserwowano również dodatnią korelację akumulacji miR160a i mRNA genów docelowych, *ARF16* i *ARF17*. Badania sugerowały, że miR160 kontroluje tworzenie korzeni bocznych poprzez pośredniczenie w regulacji *ARF16*. Aby zweryfikować tę hipotezę skonstruowano rośliny transgeniczne z nadekspresją *MIR160a* (*35S::miR160a*). Wszystkie rośliny z podwyższoną akumulacją miR160a wytwarzały więcej korzeni bocznych niż rośliny typu dzikiego. Wyniki te wykazały, że niedobór azotu indukuje ekspresję *MIR160*, który promuje produkcję korzeni bocznych u *A. thaliana* poprzez dezaktywację *ARF16* (Liang i in., 2012).

W badaniach prowadzonych na soi zidentyfikowano transkrypt genu *SBP* ulegający ekspresji we wczesnej fazie rozwoju nasion odmiany Heinong44, jako gen docelowy dla gma-miR160. Wyniki te sugerują, że członkowie rodziny *MIR160* w określonych warunkach mogą brać udział w regulacji poziomu ekspresji czynników transkrypcyjnych innych niż *ARF* (Shamimuzzaman i in., 2012).

1.7.4. Mikro RNA 164

U *A. thaliana* rodzina *MIR164* składa się z trzech członków, miR164a, miR164b i miR164c, które ujemnie regulują aktywność kilku genów kodujących czynniki transkrypcyjne typu *NAC*, biorące udział w kontroli różnicowania tkanek (Rhoades i in., 2002; Laufs i in., 2004). Wykazano, że transkrypt *ORE1* (ang., *ORESARA1*), który jest zaangażowany w regulację śmierci komórek indukowanej starzeniem, podlega również regulacji za pośrednictwem miR164 (Kim i in., 2009).

Podczas rozwoju owoców opuncji figowej (*Opuntia ficus-indica*) akumulację miR164 obserwowano w strefach merystematycznych pąków kwiatowych, w kwiatach (podstawa słupka i pręciki) oraz równomiernie w całym owocu na etapie dojrzewania (Rosas-Cárdenas i in., 2015). Wysoka akumulacja miR164 w całym owocu i związana z tym

represja jego genów docelowych sugeruje udział w procesie dojrzewania oraz regulacji procesu indukowanej starzeniem się śmierci komórek.

W badaniu Macovei i in., (2012) zidentyfikowano u ryżu *osa-MIR164e*, oraz jego gen docelowy, helikazę *DEAD-box*. Geny z rodziny *DEAD-box* są zaangażowane w regulację aktywności ATPazy i helikazy. Helikazy biorą udział w procesach rekombinacji, inicjacji replikacji i translacji, naprawie pęknięć dwuniciowych, utrzymywaniu długości telomerów, naprawie wycinania nukleotydów czy podziałach i proliferacji komórek (Tuteja, 2003). ATPazy stanowią natomiast grupę enzymów charakteryzujących się zdolnością do hydrolizy adenozy-5'-trifosforanu (ATP) i wykorzystywaniu uwolnionej energii do przeprowadzania innych reakcji energetyczno-zależnych (Palmgren, 2001).

1.7.5. Mikro RNA 167

Podobnie jak w przypadku miR160, miR167 jest związany głównie z regulacją ekspresji genów *ARF*. Nadekspresja *MIR167* w pomidorach typu dzikiego powoduje defekt w rozwoju kwiatów i sterility żeńskiej poprzez tłumienie ekspresji *ARF6* i *ARF8* (Liu i in., 2014). Wykazano, że wpływa on także na regulację genu *PPRP* (ang., Pentatricopeptide Repeat Protein), który odgrywa ważną rolę w pierwszym podziale mitotycznym podczas gametogenezy oraz proliferacji komórek podczas embriogenezy (Lu i in., 2011).

Dokładne analizy ekspresji *MIR167*, jak i *ARF6/ARF8* u *Arabidopsis* pokazują, że zarówno w zalążku, jak i pylniku, wzory ekspresji *MIR167* i *ARF6/ARF8* wzajemnie się wykluczają (Wu i in., 2006). Zatem miR167 ma kluczowe znaczenie dla zdefiniowania prawidłowych domen ekspresji przestrzennej *ARF6* i *ARF8* w pręcikach i zalążkach, aby zapewnić prawidłowy rozwój zalążków i pylników.

Wiele miRNA może działać synergistycznie poprzez wspólną regulację powiązanych funkcjonalnie genów lub szlaków, np.: miR160, miR167, miR390 i miR156 współregulują różne czynniki odpowiedzi na auksynę (*ARF*). MiR167 jest jednym z najsilniej ekspymowanych podczas rozwoju nasion rzepaku (*Brassica napus*), szczególnie w okrywie nasion i bielmie. Istnieją dwa maksima akumulacji miR167, w 25 i 40 DAA (ang., Days After Anthesis, dni po zapyleniu), a ekspresja *MIR167* była ujemnie skorelowana z ekspresją jego docelowych *ARF6* i *ARF8*. Wysoka i specyficzna akumulacja

miR165/166, miR167, miR160 i miR164 wskazują, że te miRNA odgrywają ważną rolę w utrzymaniu prawidłowej sygnalizacji i homeostazy auksyny w rozwoju nasion (Huang i in., 2013).

1.7.6. Mikro RNA 169

Rodzina genów *MIR169* kodujących miR169 jest wysoce konserwowana wśród roślin. Mikro RNA z tej rodziny regulują ekspresję genów kodujących podjednostkę uniwersalnego czynnika transkrypcyjnego NF-YA (ang., NUCLEAR FACTOR-Y subunit A) poprzez mechanizm wyciszania potranskrypcyjnego. Czynniki NF-Y stanowią trimer złożony z trzech podjednostek: NF-YA, NF-YB i NF-YC, które wiążą się do sekwencji CCAAT w rejonie promotorowym genów. Uniwersalności tego kompleksu dowodzi fakt, iż obecność motywu wiążącego go można wykryć w niemal 30% promotorów eukariotycznych (Luan i in., 2015).

Moduł regulacyjny miR169/*NF-YA* odgrywa szczególnie istotną rolę w wielu procesach rozwojowych jak np: kwitnienie, odpowiedź na stres abiotyczny, w szczególności stres suszy i wysokiego zasolenia oraz reakcji roślin na zmienne stężenie ABA. Dynamiczne i skomplikowane wzorce zmian ekspresji zarówno miR169 jak i *NF-YA* można obserwować w warunkach długiej i krótkiej suszy, co zostało potwierdzone badaniami przeprowadzonymi na siewkach ryżu (Luan i in., 2015).

Ze względu na znaczną ilość przedstawicieli zarówno rodziny *MIR169* jak i czynników *NF-YA*, możliwe jest osiągnięcie wysokiej specyficzności w regulacji tego modułu. Przykładowo, w ryżu zma-miR169a/b wycisza sześciu przedstawicieli *ZmNF-YA*, podczas gdy zma-miR169o jedynie czterech, przy czym różnice w sekwencji zarówno miRNA jak i wspomnianych genów docelowych wynoszą zaledwie kilka nukleotydów (Luan i in., 2014). Różnice te mogą wynikać z konieczności precyzyjnej regulacji ekspresji genów kontrolowanej przez miR169/*NF-YA* zarówno w odmiennych tkankach, jak i podczas różnych stadiów rozwojowych (Ni i in., 2013).

1.7.7. Mikro RNA 319

MiR319 reguluje wzrost i rozwój liści poprzez regulację ekspresji genów z rodziny TCP, stanowiących grupę czynników transkrypcyjnych (Palatnik i in., 2003). TCP bezpośrednio regulują gen kodujący LOX2, który z kolei bierze udział w pierwszym etapie syntezy kwasu jasmonowego (JA), miR319 ma również zdolność do regulowania szlaku sygnałowego zależnego od JA poprzez regulację ekspresji wielu genów odpowiedzialnych za tolerancję na stres. Potwierdzono, że miR319 odgrywa ważną rolę w reakcjach roślin na stesy biotyczne i abiotyczne, gdzie przykładowo był zaangażowany w reakcje roślin odpowiednio na gronowca szarego (*Botrytis cinerea*) i stres wywołany niską temperaturą (Chen i in., 2015).

MIR319 występujący w granacie (*Punica granatum L.*, mPgiR319b) był silnie ekspresjonowany podczas późnych etapów rozwoju owoców i zaangażowany w regulację czynników transkrypcyjnych *MYB* (Saminathan i in., 2016). Istotną funkcję miR319 podczas rozwoju generatywnego wykazano również u *Arabidopsis*, poprzez wykorzystanie allelu *tcp4*, który zawiera mutację w miejscu wiązania miR319a. Allel ten, który występuje w mutantach roślin *A. thaliana*, powodując utratę funkcji miR319a, przyczynia się do powstawania aberracji w rozwoju kwiatów (Nag i in., 2009).

Interesujące jest, że u *Arabidopsis* rodzina *MIR319* jest bardzo blisko spokrewniona z rodziną *MIR159*. Obie rodziny posiadają identyczność sekwencji w 17 z 21 nukleotydów dojrzałego miRNA. Pomimo że miR319 ma zdolność do regulowania genów docelowych miR159: *MYB33*, *MYB65* i *MYB101*, ograniczona domena jego ekspresji i niski poziom akumulacji zapobiegają regulacji genów *MYB* przez miR319 w znaczący sposób. W przeciwieństwie do tego, miR159a i miR159b nie są wydajnie ukierunkowane na *TCP2*, *TCP3*, *TCP4*, *TCP10* i *TCP24* ze względu na różnice sekwencji między miejscami wiązania miR159 i miRNA w genach *TCP*. Podsumowując, rodzina miR319 ma zdolność regulowania ekspresji zarówno *TCP*, jak i *MYB*, chociaż w warunkach *in vivo* obserwowane jest to zazwyczaj tylko w przypadku *TCP*. Natomiast, pomimo podobieństw, rodzina miR159 oddziałuje tylko z genami *MYB* (Palatnik i in., 2007).

1.7.8. Mikro RNA 390

Dotychczasowe badania potwierdzają, że główną funkcją miR390 jest modulacja procesu tworzenia ta-siRNA z transkryptów genu niekodującego białka *TAS3*. W *Arabidopsis* miR390 nakierowany jest na pojedynczy transkrypt *TAS3* i indukuje wieloetapową produkcję ta-siRNA z tego prekursora, zaczynając od rozszczepionego miejsca docelowego dla miRNA od strony 3'. Wykazano, że dwa dominujące produkty siRNA z tego prekursora są komplementarne do mRNA genów kodujących ARF3 i ARF4 (Allen i in., 2005). Ponadto, homologiczne transkrypty *TAS3*, z przewidywanym miejscem docelowym dla miR390, zostały znalezione w różnych gatunkach roślin dwuliściennych i jednoliściennych, co sugeruje, że *TAS3* jest wysoce konserwowany w roślinach wyższych (Cabrera i in., 2016)

Mikro RNA 390 może kontrolować indukcję somatycznej embriogenezy poprzez udział w produkcji ta-si-ARF, które tłumią transkrypty *ARF2*, *ARF3* i *ARF4*. Obserwowano wyraźny spadek poziomu transkryptów *ARF2* oraz *ARF3* we wczesnej i zaawansowanej hodowli embriogenicznej w połączeniu ze znaczną akumulacją miR390 podczas somatycznej embriogenezy. Z kolei *ARF* mogą kontrolować ekspresję *MIR160*, *MIR167* i *MIR390* poprzez elementy *Aux RE* (ang., *AUXIN RESPONSE ELEMENTS*), które wykryto w promotorach tych genów (Gutierrez i in., 2009).

1.7.9. Mikro RNA 393

MiR393 reguluje ekspresję różnych zestawów genów z rodziny *TAAR* kodujących receptory auksyny, *TIR1* i *AFB2*, podczas zakażenia roślin patogenami, lub traktowaniu azotanami. Bierze on również udział w regulacji rozwoju, współgrając z auksyną. Wykazano, że mutanty niezdolne do produkcji miR393 wykazywały nieprawidłowości rozwojowe liści i liścieni, przypominające zmiany wywołane przez zwiększoną percepcję auksyny związaną ze zwiększoną aktywnością genów *TAAR* (Si-Ammour i in., 2011).

W badaniach nad *Arabidopsis* potwierdzono również, że miR393 przyczynia się do przejścia z fazy wegetatywnej do generatywnej, poprzez regulację ekspresji genów kodujących receptory auksyny, *TIR1* i *AFB2* oraz modulowanie wrażliwości tkanek na poziom auksyny (Wójcik i in., 2016). Dane te pozwalają na umieszczenie miR390

w grupie miRNA związanych z sygnalizacją hormonalną oraz regulacją rozwoju, takich jak. miR159, miR160, miR164, miR319 czy miR396.

Moduł regulacyjny miR393/AFB3 został ponadto zidentyfikowany jako element, który kontroluje architekturę systemu korzeniowego w odpowiedzi na zewnętrzną i wewnętrzną dostępność azotu (Vidal i in., 2010), gdzie poziom ekspresji miR393 był wyraźnie podwyższony w warunkach niedostatecznej dostępności azotu.

Inne badania wskazują też na potencjalną rolę genów z rodziny *MIR393a* w odporności na infekcje bakteryjne. Ekspresja *MIR393* i *MIR444* zmniejszyła się po zakażeniu wirusem MCMV, natomiast miR393 podlegał indukcji w odpowiedzi na infekcję bakteryją (Navarro i in., 2006). Ponadto, podwyższona akumulacja miR393 przyczynia się do zmniejszenia tolerancji na suszę u ryżu (Xia i in., 2012). Wszystkie wyżej wymienione oddziaływania wskazują na wszechstronne oddziaływanie miR393 na wiele kluczowych procesów rozwojowych i adaptacyjnych.

1.7.10. Mikro RNA 396

Sekwencjami docelowymi dla miR396 są w głównie czynniki transkrypcyjne *GRF* (ang., Growth Response Factor) odpowiedzialne za wiele procesów związanych ze wzrostem i rozwojem, poprzez regulację procesu mitotycznego podziału komórek. Ponadto, miR396 uczestniczy w procesach odpowiedzi roślin na stres wysokiego zasolenia, suszy i niskiej temperatury. Zaobserwowano, że poziom miR396a w *A. thaliana* ulegał wzrostowi, gdy rośliny traktowano wyżej wymienionymi czynnikami (Liu i in., 2008). Autorzy sugerują również, że nadekspresja Ath-miR396a i Ath-miR396b i wynikająca z tego powodu regulacja genów docelowych tych miRNA może przyczyniać się do ograniczenia rozwoju pasożytniczych nicieni u *Arabidopsis* (Hewezi i in., 2012).

Podczas badań nad rozwojem owoców pomidora (*S. lycopersicum*) odkryto również, że oprócz czynników transkrypcyjnych z rodziny *GRF*, miR396 posiada zdolność do wiązania z transkryptami homologów genów typu *MADS-box* i *DNA (cytozyny-5-)-metylotransferazy*. Funkcja tych nowo zidentyfikowanych genów docelowych jak i ich regulacja przez miRNA w rozwoju owoców pomidora nie jest wyjaśniona, autorzy sugerują jednak iż może mieć ona pośredni wpływ na regulację procesu metylacji DNA (Karlova i in., 2013).

1.8. Fitohormony w rozwoju, wzroście i odpowiedzi roślin na stres

Rośliny opracowały złożone mechanizmy odbierania sygnałów zewnętrznych i odpowiedniej reakcji na nie, zmieniając ekspresje licznych genów oraz poziom obronnych cząsteczek sygnałowych. Najczęstsze reakcje roślin na stres to opóźnienie wzrostu i zmniejszony metabolizm, aby zmaksymalizować przeżywalność w niekorzystnych warunkach środowiskowych. Działania te wpływają na szeroki zakres procesów, takich jak modyfikacja fotosyntezy, zwiększona aktywność antyoksydacyjna, akumulacja metabolitów wtórnych, zmiany w ekspresji genów i wiele innych (Krasensky i in., 2012).

Fitohormony mają kluczowe znaczenie dla zdolności roślin do adaptacji na niekorzystne zmiany środowiskowe poprzez pośredniczenie w szerokim zakresie reakcji adaptacyjnych, takich jak wzrost, rozwój czy alokacja składników odżywczych. Wszystkie wymienione wcześniej procesy, które są zaangażowane we wzrost i plastyczność rozwojową, kontrolowane są przez równowagę hormonów i ich wzajemne interakcje (Kohli i in., 2013). Pojawiające się w ostatnich latach dowody sugerują, że auksyna funkcjonuje jako główny regulator w większości interakcji hormonalnych w warunkach stresowych. Pozostałe hormony roślinne, cytokininy, brassinosteroidy, etylen, kwas abscysynowy, gibereliny, kwas jasmonowy i strigolaktyny oddziałują albo synergistycznie lub antagonistycznie z auksyną, aby wywołać kaskadę zdarzeń prowadzących do reakcji odpowiedzi na warunki stresowe (Rahman, 2013).

Wahania w obrębie poziomu poszczególnych fitohormonów oddziałują nie tylko na geny kontrolujące odpowiedź roślin na stres oraz czy regulację procesów rozwojowych, lecz również pośrednio, zmieniają poziom ekspresji licznych miRNA, które regulują wiele hormono-zależnych czynników transkrypcyjnych.

1.8.1. Auksyny

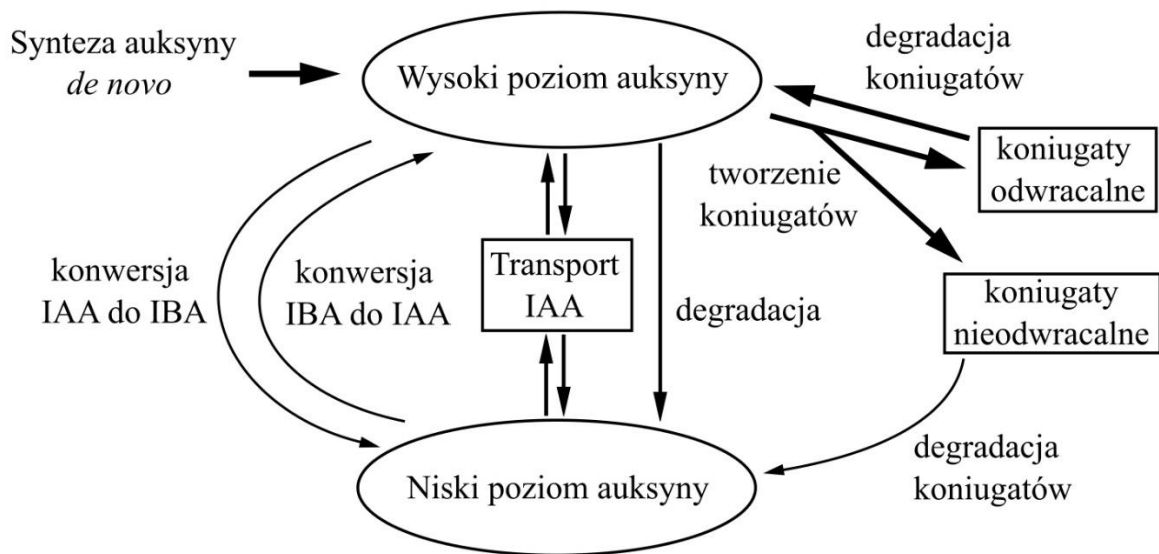
Auksyna to jeden z najbardziej wszechobecnych i wszechstronnych hormonów roślinnych, który odgrywa rolę w licznych procesach wzrostu i rozwoju roślin (Cooke i in., 2002). Auksyna jest obecna we wszystkich gatunkach roślin, a także u alg. Obecność auksyny i mechanizmów jej sygnalizacji nawet w jednokomórkowych algach wskazuje, że auksyna mogła odgrywać kluczową rolę podczas ewolucyjnej adaptacji roślin

do zróżnicowanych środowisk (De Smet i in., 2010). Opracowanie precyzyjnych metody ilościowych, dobrych systemów modelowych do analiz *in vivo* oraz wykorzystanie mutantów pozwoliło na znaczny postęp w poznaniu funkcji auksyn (głównie kwasu indolo-3-octowego, IAA), ich metabolizmu i sposobu działania.

IAA jest najobficiej występującą i najlepiej zbadaną auksyną, choć w warunkach fizjologicznych występuje obok pochodnych, takich jak kwas indol-3-masłowy (IBA), kwas 4-chloroindolo-3-octowy (4-Cl-IAA) czy też kwas fenylloctowy (PAA). Pula auksyn składa się z mieszaniny wolnej auksyny, koniugatów i pochodnych auksyn, nieaktywnych prekursorów oraz nieaktywnej forma estru metylowego IAA, IAA-Me. Wolna auksyna stanowi ok. 25% całkowitej puli auksyn w zależności od rodzaju tkanki oraz gatunku rośliny. Koniugaty IAA to związki w których IAA zostaje połączona np.: z aminokwasami, przykładem tego może być np.: koniugat IAA i alaniny (IAA-ala) (Novák i in. 2012) (rycina 3).

Biosynteza auksyny odbywa się za pośrednictwem wielu szlaków obejmujących monooksygenazy zawierające flawinę (białka YUCCA), aminotransferazy tryptofanu (TAA) i dekarboksylazy, oksydazy aldehydowe, czy nitylasy. Biosynteza *de novo* auksyny i uwalnianie jej z koniugatów auksyn to czynniki przyczyniające się do pozytywnej regulacji stężenia auksyn w roślinach.

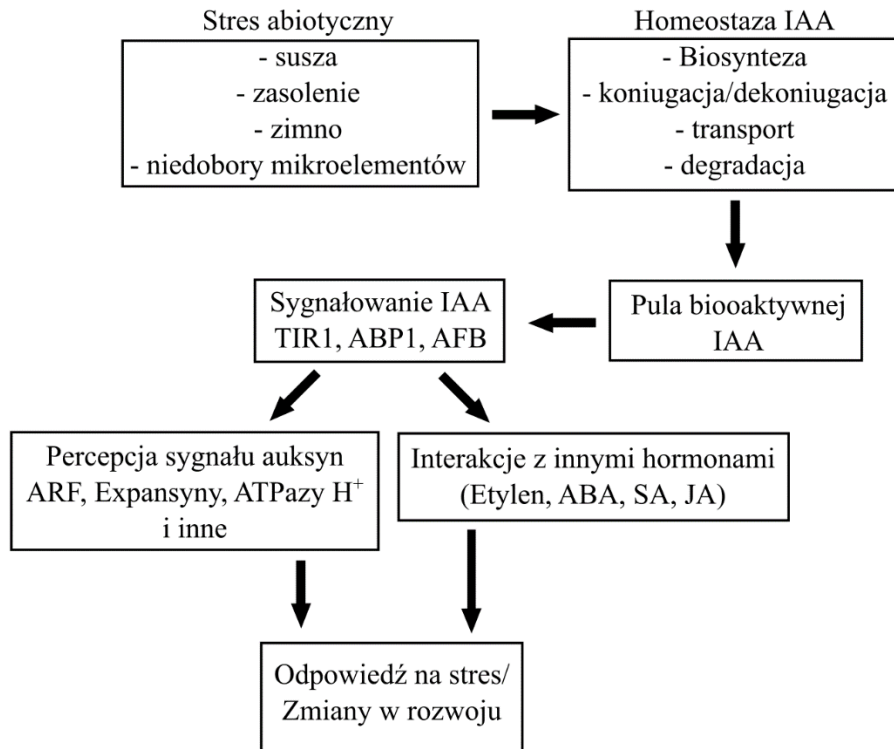
Do procesu tego można zaliczyć również aktywny transport tego hormonu w obrębie rośliny (Tivendale i in., 2014). Auksyna jest transportowana dwoma drogami: szybszym bezkierunkowym transportem na długie dystanse przez floem oraz wolniejszym, kierunkowym transportem na krótkie dystanse przez nośniki napływu i wypływu na błonie komórkowej (Prasad i in., 2013). Kierunkowy transport z komórki do komórki i gradienty auksyny wraz z różnicową dystrybucją szlaków sygnałowych auksyn pozwalają na prawidłową regulację rozwoju w warunkach optymalnych oraz w odpowiedzi na silnie zmieniające się środowisko (Simon i in., 2011; Korasick i in., 2013).



Rycina 3. Uproszczony schemat homeostazy auksyny. Do procesów podwyższających poziom IAA u roślin należą synteza *de novo*, transport oraz konwersja IBA do IAA jak również konwersja odwracalnych koniugatów. Procesami obniżającymi poziom auksyn jest ich bezpośrednia degradacja, koniugacja w sposób nieodwracalny, konwersja do IBA a także aktywny transport.

Źródło: Opracowanie własne na podstawie Novák i in. 2012.

W przypadku topoli (*Populus L.*) stwierdzono, że zawartość wolnej auksyny spada podczas zasolenia i suszy (Popko i in., 2010) (rycina 4), a liczba koniugatów auksyn była zwiększona. W badaniach nad homeostazą auksyn w warunkach stresu abiotycznego, transgeniczna linia *Arabidopsis DR5::GUS* okazała się szczególnie przydatnym narzędziem do monitorowania zmian w akumulacji i dystrybucji auksyny. Eksperymenty przy użyciu tych roślin transgenicznych potwierdziły znaczną supresję odpowiedzi auksyn podczas suszy (Shi i in., 2014).



Rycina 4. Schematyczne przedstawienie wpływu stresu abiotycznego na homeostazę IAA. Zmiany poziomu IAA wywołują transdukcję sygnału, która z kolei wpływa na regulację poziomu innych hormonów oraz moduluje ekspresję innych genów i czynników transkrypcyjnych co w rezultacie powoduje efekt w postaci reakcji na warunki stresu.

Źródło: Opracowanie własne na podstawie Popko i in., 2010.

Osiągnięcie lepszego zrozumienia roli auksyn w stresie abiotycznym możliwe było również dzięki eksperymentom z wykorzystaniem zmutowanych linii nadekspresyjujących kluczowe enzymy w szlakach metabolizmu auksyn (Sharma i in., 2015).

1.8.2. Gibereliny

Gibereliny obok auksyn to kolejny fitohormon promujący wzrost, który niedawno stał się również rozpoznawalny jako kluczowy element w tolerancji roślin na stres abiotyczny. Jego podstawowa rola we wzroście i rozwoju roślin obejmuje kiełkowanie nasion, wzrost wegetatywny, promowanie kwitnienia, a także regulacja rozwoju kwiatów, owoców i nasion (Sun, 2010).

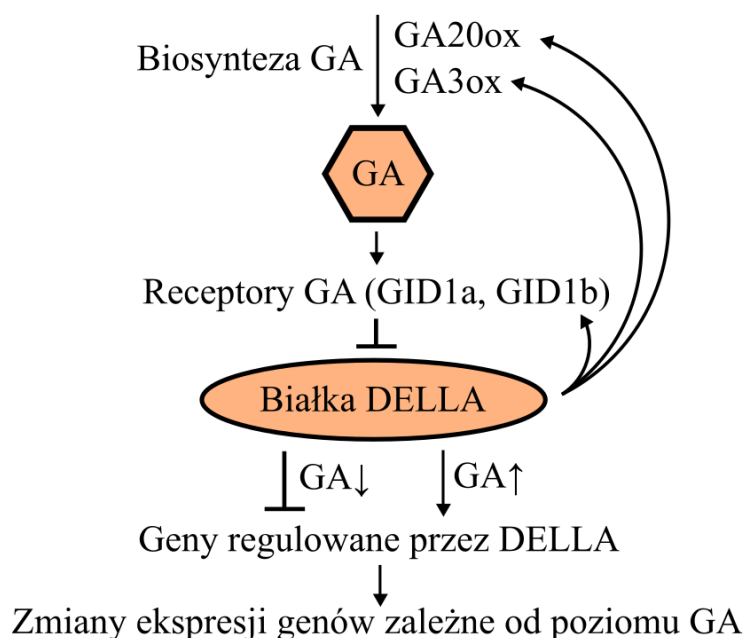
GA są syntetyzowane z kluczowego izoprenoidu, difosforanu geranylogeranylu (GGDP), poprzez szereg etapów konwersji, które początkowo prowadzą do powstania GA12

i zakończone są produkcją bioaktywnych giberelin takich jak GA1, GA3, GA4 i GA7. Konwersja GGDP do GA12 wymaga ośmiu reakcji realizowanych za pośrednictwem czterech enzymów, dwa z nich, syntaza difosforanu ent-kopalilu (CPS) i syntaza ent-kaurenu (KS), należą do klasy enzymów cyklaz terpenowych i katalizuje konwersję GGDP do ent-kaurenu poprzez difosforan ent-kopalilu (CDP). Synteza ent-kaurenu jest kluczowym etapem szlaku biosyntezy GA, ponieważ określa poziom endogennych GA (Moore i in., 1991). Ogólnie uważa się, że aktywna biosynteza GA zachodzi w ich miejscu/miejscach działania. W oparciu o wzorce ekspresji genów *KO* i *GA3ox*, przewiduje się, że synteza bioaktywnej GA podczas kiełkowania nasion *Arabidopsis* zachodzi w szybkim tempie w komórkach korowych zarodka, promując w ten sposób wzrost zarodka i ułatwienie wyrastania korzonków. Co ciekawe geny kodujące CPS występują w typach komórek innych niż te, które wykazują ekspresję *KO* i *GA3ox*, wskazując, że biosynteza GA wymaga międzykomórkowej translokacji związków pośrednich, przypuszczalnie ent-kaurenu (Yamaguchi i in., 2001; Yamaguchi 2008).

W przeciwieństwie do biosyntezy GA, która jest dobrze scharakteryzowana, do niedawna niewiele było wiadomo o podstawowym mechanizmie molekularnym percepcji i sygnalizacji GA. Bazując na hydrofobowym charakterze GA, uważano, że rośliny posiadają błonowe oraz rozpuszczalne receptory do wiązania GA (Hooley i in., 1992). Poszukiwania tych receptorów rozpoczęły się około dwie dekady temu, kiedy pierwszy rozpuszczalny receptor GA *GID1* (ang. GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF 1) został zidentyfikowany w ryżu (Ueguchi-Tanaka i in., 2005). *GID1* koduje białko, które ma homologię do rodziny białek z grupy lipaz wrażliwych na hormony (HSL, ang., Hormone-Sensitive Lipase). Sugeruje to, że wiązanie *GID1* z bioaktywnym GA umożliwia interakcję z inhibitorami GA, promując w ten sposób sygnalizację GA. Przed identyfikacją *GID1*, supresor sygnalizacji GA, zwany białkami DELLA, był już znany (Silverstone i in., 1997). DELLA należy do podrodziny białek regulatorowych GRAS, powszechnych w całym królestwie roślin, które działają na ograniczenie wzrostu roślin poprzez negatywną regulację sygnalizacji GA. DELLA jest kodowana przez gen *SLENDER RICE 1 (SLR1)* w ryżu (Ikeda i in., 2001) oraz *GIBBERELLIN INSENSITIVE1 (GAI1)*, *REPRESSOR OF GAI (RGA)* i *RGA-like 1-3 (RGL1-3)* u *Arabidopsis* (Silverstone i in., 1998).

Po degradacji białka DELLA następuje transkrypcyjne przeprogramowanie genów reagujących na GA. Te domniemane dalsze cele obejmują geny kodujące enzymy

biosyntezy GA (GA3ox1 i GA20ox2), receptory GA (GID1a, GID1b) i czynniki transkrypcyjne (MYB, bHLH137, bHLH154, WRKY27), które również wykazują wczesne odpowiedzi na białka DELLA (Zentella i in., 2007) (rycina 5). Schemat tych interakcji ilustruje poniższa rycina.



Rycina 5. Uproszczony schemat interakcji gibereliny z białkami DELLA wpływający na zmiany ekspresji genów podlegających represji przez to białko.

Źródło: Opracowanie własne na podstawie Zentella i in. 2007.

Obecnie wiadomo, że w optymalnych warunkach GA stymuluje wzrost i rozwój poprzez szlak degradacji DELLA indukowany przez GID1 (Colebrook i in., 2014). Więc jaka jest rola GA podczas ekspozycji roślin na niekorzystne warunki środowiskowe? We wstępnych badaniach Achard i in., (2006) stwierdzili, że poczwórne mutanty DELLA *Arabidopsis* wykazywały się lepszą tolerancją przy ekspozycji na wysoką zawartość soli w porównaniu z sadzonkami typu dzikiego. Innymi słowy, rośliny modulują poziom GA i DELLA zwiększając przeżywalność w niesprzyjających warunkach, ale kosztem zahamowania wzrostu i rozwoju.

Dowody, które jasno wskazywały na rolę GA w odpowiedzi na stres abiotyczny uzyskano w eksperymentach na *Arabidopsis*, które pokazały, iż niektóre czynniki stresowe takie jak zacienienie (Franklin, 2008) oraz podtopienie wpływające na poziom GA za pośrednictwem zmian w poziomie etylenu (rycina 6), zbadane również w przypadku ryżu (Bailey-Serres i in., 2010), prowadzą do zwiększonego wzrostu jako strategii „ucieczki”. Natomiast w przypadku stresu suszy GA przyczynia się do zmniejszenia tempa

wzrostu i szeregu innych reakcji mających na celu zwiększenie odporności roślin na niedobór wody (Skirycz i in., 2010).

1.8.3. Kwas abscysynowy

ABA to wszechobecny hormon roślinny i cząsteczka sygnałowa, która odgrywa kluczową rolę w procesach fizjologicznych takich jak zamykanie aparatów szparkowych, morfogeneza zarodków, rozwój nasion, synteza białek zapasowych i lipidów, kiełkowanie, starzenie się liści, czy też mechanizmach obrony przed patogenami (Finkelstein, 2013). Wysokie zasolenie, susza i warunki niskotemperaturowe są uważane za główne czynniki indukujące zwiększoną syntezę ABA.

Ekspresja genów w reakcji na stres jest regulowana na ścieżkach zależnych i niezależnych od ABA (Yamaguchi-Shinozaki i in., 2006). Istnieją cztery główne elementy kaskady sygnalizacyjnej ABA w warunkach stresowych: receptor ABA PYL (PYR1, ang., Pyrabactine Resistance 1; PYL, PYR1-like; RCAR1, ang., Regulatory Component of ABA Receptor ABA 1), regulator ujemny PP2C (Protein Phosphatase type 2C) -, pozytywny regulator SnRK2 (Sucrose non-fermenting kinase 2) oraz czynnik transkrypcyjny AREB (ABA-responsive Transcription Factors) (Cutler i in., 2010; Raghavendra i in., 2010; Zhang i in., 2015). Ścieżki te łączą się również z kanałami jonowymi, czynnikami transkrypcyjnymi i innymi komponentami regulatorowymi, zapewniając w ten sposób bezpośrednie połączenie między fitohormonem a odpowiedziami indukowanymi przez ABA.

Elementy reagujące na ABA (*ABRE* – ang., ABA-responsive element) będące sekwencjami DNA w promotorach genów reagujących na ABA oraz grupa czynników transkrypcyjnych wiążących *AREB*, (*AREB/ABF*) odgrywają ważną rolę w zależnej od ABA regulacji ekspresji genów. *AREB* są indukowane głównie w tkankach wegetatywnych w odpowiedzi na znaczną utratę wody, wysokie zasolenie i traktowanie ABA, (Kim i in., 2004, Fujita i in., 2005).

Sygnały ABA pod wpływem stresu abiotycznego są rozpoznawane i przekazywane do kolejnych elementów układu percepcyjnego, w których kluczowymi składnikami są kinazy białkowe i fosfatazy. Specyficzne dla roślin kinazy stresu abiotycznego to zależne od wapnia kinazy białkowe CDPK (ang., Calcium-Dependent Protein Kinases lub CPK, ang., Calcium Proteins Kinases) (Zuoi in., 2013).

CDPK stanowią jeden z głównych receptorów sygnału Ca^{2+} u roślin (Sanders i in., 2002) pełniąc jednocześnie wiele funkcji, wliczając w to regulację wzrostu, rozwoju, czy odpowiedzi na stresy zarówno iotyczne jak i abiotyczne (Shulz i in., 2013, Romeis i in., 2014).

U *Arabidopsis thaliana* CPK10 uczestniczy w procesie zamykania aparatów szparkowych w odpowiedzi na stres suszy, a reakcja ta jest modulowana przez Ca^{2+} oraz ABA (Zou i in., 2010). Dwa homologi AtCPK4 i AtCPK11 działają jako pozytywne regulatory w szlakach sygnałowych ABA, gdzie biorą udział w procesach kiełkowania nasion, wzrostu siewek, ruchach aparatów szparkowych i odpowiedzi na stres wysokiego zasolenia (Zhu i in., 2007). AtCPK12 został natomiast zidentyfikowany jako negatywny regulator odpowiedzi na ABA (Zhao i in., 2011). Zakrojone na szeroką skalę badania genomów roślin ryżu (*O. sativa*), kukurydzy (*Zea mays*), topoli (*Populus trichocarpa*) czy rzepaku (*Brassica napus*) wskazują, że wzorce ekspresji genów kodujących CDPK pełnią ważną funkcję w regulacji prawidłowego rozwoju, oraz regulacji odpowiedzi na czynniki stresowe oraz poziomu fitohormonów (Ray i in., 2007; Kong i in., 2013; Zuo i in., 2013; Zhang i in., 2014).

1.8.4. Kwas jasmonowy

Jasmoniany to grupa bardzo zróżnicowanych substancji, które powstają podczas procesu utleniania wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (ang. PUFA, Poly-unsaturated Fatty Acids). Pochodne JA obejmują między innymi ester metylowy JA (JA-Me), pochodną jasmonyl izoleucyny (JA-Ile), cis-jasmon oraz jasmonyl ACC (JA-ACC).

Wszystkie wymienione powyżej związki są naturalnie występującymi regulatorami wzrostu roślin, które modulują wzrost i rozwój roślin wyższych w odpowiedzi na bodźce zewnętrzne poprzez regulację komórkowych odpowiedzi metabolicznych i ekspresję genów jądrowych (Creelman i in., 1995).

JA jako cząsteczka sygnalizacyjna bierze udział w regulację ekspresji różnych genów zaangażowanych w wzrost i rozwój oraz reakcje roślin na stres. Różne czynniki transkrypcyjne, takie jak MYC2, MYC3 i MYC4 są pozytywnymi regulatorami odpowiedzi na JA (Wu i in., 2019).

Białko COI1 (ang., CORONATINE INSENSITIVE 1) w *Arabidopsis* zostało zidentyfikowane jako składnik kompleksu koreceptorów jasmonianów (Xie i in., 1998; Browse 2009; Yan i in., 2009), który należy do rodziny białek F-box i działa jako receptor JA inicjujący jego sygnalizację (Thines i in., 2007; Katsir i in., 2008).

Białka domeny Jasmonate-ZIM (JAZ) zostały odkryte i zidentyfikowane jako represory ekspresji genów indukowanej przez JA i do tej pory zidentyfikowano około 12 białek JAZ u *Arabidopsis thaliana* (Chini i in., 2007; Thines i in., 2007; Yan i in., 2007; Chung i in., 2009; Pauwels i in., 2011; Wager i in., 2012). JA promuje wiązanie JAZ do z białkiem SCF^{COI1}, w celu utworzenia kompleksu receptyjnego wywołując degradację represorów JAZ, w wyniku której dochodzi do regulacji ekspresji genów zaangażowanych w różne funkcje roślin.

Jasmoniany biorą również udział w odpowiedzi na stres abiotyczny (Wang i in., 2001). Potencjał antystresowy wolnego kwasu jasmonowego i jego różnych koniugatów został zbadany w warunkach stresu zasolenia w jęczmieniu (*Hordeum vulgare*) (Tsonev i wsp., 1998), ekspozycji na światło UV w *A. thaliana* (Mackerness i in., 1999) czy niskich temperatur m. in. w kukurydzy (*Zea mays*) (Wilenski i in., 1994). Egzogenne stosowanie JA indukowało tolerancję miedzi w sadzonkach *Cajanus cajan* poprzez wzmocnienie ekspresji genów kodujących enzymy antyoksydacyjne i większą akumulację pigmentów fotosyntetycznych, co uczyniło rośliny bardziej tolerancyjnymi na stres Cu (Poonam i in., 2013). W ryżu susza i stres zasolenia zwiększyły poziom jasmonianu w liściach i korzeniach, a także zwiększył indukcję genów odpowiedzialnych za biosyntezę JA (Moons i in., 1997; Tani i in., 2008). Stres solny wywoływałał ponadto przejściowe podwyższenie poziomu ekspresji genów biorących udział w biosyntezie JA w roślinach cytrusowych, który osiągnął swój maksymalny poziom po 6 godzinach oddziaływania wspomnianego powyżej czynnika stresowego (Mahouachi i in., 2007; Arbona i in., 2008; Arbona i in., 2010).

1.8.5. Kwas salicylowy

Kwas salicylowy (SA) to związek o charakterze fenolowym wytwarzany przez szeroką gamę zarówno prokariotycznych jak i eukariotycznych organizmów.

Zsyntetyzowany wolny SA może zostać przekształcony w kilka form koniugatów. W roślinach proces ten zachodzi na drogach glukozytacji, metylacji i koniugacji aminokwasów. Zarówno salicylan metylu (MeSA) i metyl-SAG (MeSAG) są biologicznie nieaktywne, ale zwiększają przepuszczalność błon, aby skuteczniej transportować sygnały obronne na duże odległości (Seskar i in., 1998).

Badania z ostatnich dwóch dekad wykazały, że SA odgrywa ważną rolę w regulacji wzrostu i rozwoju roślin poprzez np. zamykanie plazmodesm, regulację kiełkowania nasion, kwitnienie i termogenezę, interakcje z innymi organizmami, reakcje na stresy środowiskowe, a także fakt, że indukuje odporność roślin na choroby (Fragniere i in., 2011). W roślinach SA bierze udział w ogólnoustrojowej oporności nabytej (SAR, ang., Systemic Acquired Resistance) i miejscowej odporności nabytej (LAR, ang., Localized Acquired Resistance) w odpowiedzi na różne ataki patogenów (Vlot i in., 2009). Najbardziej konserwatywnie ustalona rola SA polega na pełnieniu funkcji cząsteczki sygnałowej w odpowiedziach obronnych roślin (Shah, 2003). SA został uznany za sygnał modulujący odpowiedź roślin na szeroki zakres stresów abiotycznych, takich jak ekspozycja na promieniowanie UV lub reaktywne formy tlenu, suszę, zasolenie, wychłodzenie, wysokie temperatury, oraz tolerancję metali ciężkich (Yuan i in., 2008). SA współdziałając z innymi fitohormonami, takimi jak kwas jasmonowy, etylen (ET), auksyna, kwas giberelinowy, kwas abscysynowy oraz cytokinina. SA jest częścią sieci sygnalizacyjnej wykorzystującej współdziałanie i synergię (Dempsey i in., 2011; Pieterse i in., 2012).

Poziom SA w liściach *Phillyrea angustifolia* w czasie suszy wzrastał nawet 5-krotnie (Munne-Bosch i in., 2003), zaś w korzeniach jęczmienia około dwukrotnie (Bandurska i in., 2005). Mutanty *Arabidopsis: adr1* (czynnik transkrypcyjny), *myb96-1d* (czynnik transkrypcyjny), *siz1* (ligaza SUMO), *acd6* (białko transbłonowe) i *cpr5* (czynnik transkrypcyjny) gromadzące endogennie SA wykazały tolerancję na suszę oraz zależną od SA odporność na choroby (Bowling i in. 1997; Chini i in. 2004; Seo i in., 2010). Ponadto podczas suszy zanotowano zależną od SA ekspresję genów białek obronnych PR1 i PR2 (Miura i in., 2013). Egzogenna aplikacja SA powodowała wyższą zawartość wody w tkankach, wzrost aktywności enzymów antyoksydacyjnych, spadek poziomu peroksydacji lipidów i uszkodzeń błon, a także chroniła aktywność reduktazy azotanowej w warunkach suszy (Hayat i in. 2010). SA indukował także wzrost zawartości reaktywnych formy tlenu (ROS, ang., Reactive Oxygen Species) w tkankach fotosyntetyzujących, co skłania

do wniosku, iż SA mogą powodować wysoki poziom stresu oksydacyjnego, zmniejszając w ten sposób tolerancję na stres abiotyczny (Borsani i in., 2001).

1.9. Interakcje fitohormonów

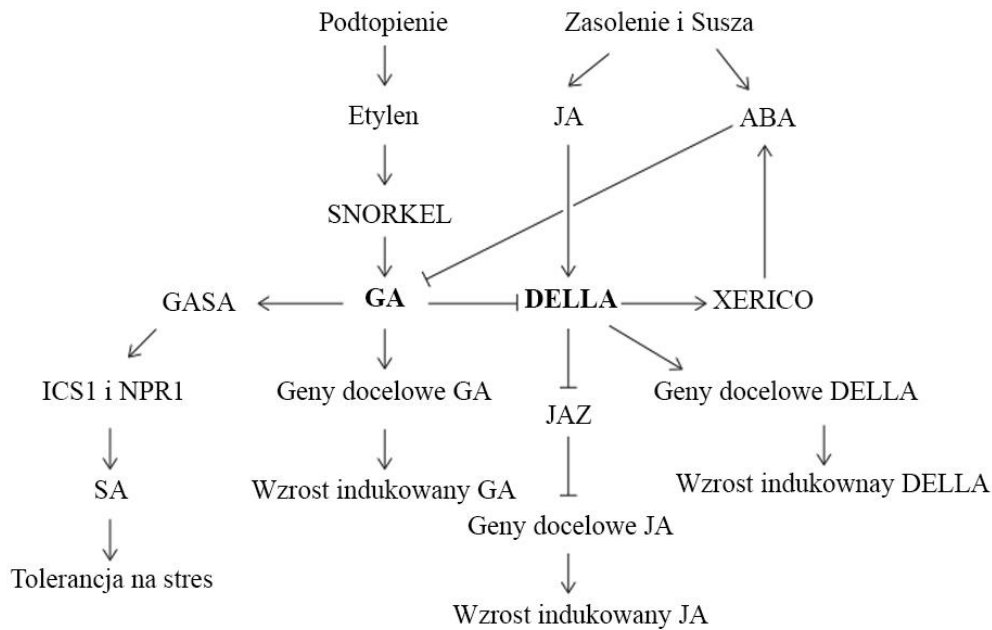
Zdolność roślin do reagowania na zmieniające się środowisko jest bardzo elastyczna i kontrolowana przez zmiany równowagi w jakiej znajdują się hormony roślinne (Kohli i in., 2013) oraz ich wzajemne interakcje. W ostatnich kilkudziesięciu latach jednym z głównych trendów badawczych w dziedzinie fizjologii roślin było badanie profili hormonalnych w różnych warunkach stresu środowiskowego. Pomimo wielu badań w tej materii, skomplikowana i zmienna sieć wzajemnych interakcji wydaje się wciąż być niedostatecznie zbadana, szczególnie ze względu na jej znaczną zmienność i niejednorodność w obrębie różnych gatunków roślin.

Rola auksyny jako głównego mediatora wzrostu i rozwoju roślin krzyżuje się ze szlakami sygnalizowania innych hormonów, takich jak kwas abscysynowy (ABA), kwas jasmonowy (JA) gibereliny (GA), kwas salicylowy (SA) i etylen. W kwestii tolerancji na stres abiotyczny, kwas abscysynowy odgrywa kluczową rolę w regulacji reakcji na ten stres w różnych stadiach rozwojowych oraz warunkach środowiskowych (Saab i in., 1990). Wspólna koordynacja wzrostu przez IAA i ABA ukazuje jeden z mechanizmów przystosowawczych roślin do zmiennego środowiska, w sytuacjach gdzie zwiększony poziom ABA może mieć działanie hamujące wzrost (rycina 6). W jednym z doświadczeń Salopek-Sondi i in., (2013) wykazali, że egzogenne traktowanie ABA powodowało zahamowanie wzrostu korzeni u siewek *Brassica rapa*, bez znaczącego wpływu na poziom auksyny. Dodatkowo, opóźnienie wzrostu we wczesnym etapie rozwojowym siewek *Arabidopsis* również było stymulowane przez ABA za pośrednictwem wzmocnienia szlaku sygnałowego auksyny przez *AXR2/IAA7*. Ekspresja genu *AXR2/IAA7* w optymalnych warunkach środowiskowych jest zlokalizowana w strefie wydłużenia osi embrionalnej i indukowana auksyną oraz wyciszana przez traktowanie ABA. Mutacja w genie *axr2* przyczynia się do niewrażliwości siewek *A. thaliana* na traktowanie auksyną, etylenem oraz ABA i skutkuje brakiem hamowania wzrostu korzeni (Wilson i in., 1990). Staje się więc jasne, że ABA powodował represję *AXR2/IAA7* podczas wzrostu po kiełkowaniu, co przedstawia związek między ABA a regulacją wzrostu za którą odpowiada IAA.

Zaangażowanie ABA w szlakach auksynowych wykazano również za pomocą analiz obejmujących transkryptom *Arabidopsis* (Yang i in., 2014). Zmieniona ekspresja genów szlaku transdukcji sygnału auksyn w odpowiedzi na zarówno krótkie, jak i długotrwałe traktowanie roślin ABA wskazuje na zależność ABA-IAA jako sposób na utrzymanie wzrostu również w warunkach stresu.

Oprócz ABA, interakcje auksyn z kwasem jasmonowym wpływają na wzrost roślin podczas stresu. Rolę JA w koordynowaniu reakcji na stres wykazano w badaniu tolerancji na stres *Brassica oleracea* (Wu i in., 2012) gdzie traktowanie Me-JA zwiększyło tolerancję sadzonek na stres suszy. Podczas gdy poziom JA i ekspresja genów odpowiedzialnych za indukcję szlaków JA ulegały podwyższeniu w przypadku stresu zimna i suszy, odwrotna sytuacja miała miejsce podczas stresu wysokich temperatur, co sugeruje inną regulację biosyntezy i sygnalizacji JA oraz IAA w przypadku różnych stresów abiotycznych (Du i in. 2013). Wpływ stresu abiotycznego na homeostazę auksyn poprzez promowanie lub tłumienie enzymów zaangażowanych w odwracalną koniugację IAA/hydrolizę koniugatów stanowi możliwe ogniwo łączące IAA z innymi hormonami odpowiedzi na stres. Wykazano, że zwiększenie ekspresji *IAR3*, enzymu niezbędnego do cięcia koniugatów auksynowych do wolnej IAA razem z podwyższeniem poziomu IAA następuje, gdy siewki *Brassica rapa* poddaje się traktowaniu JA.

SA indukuje tolerancję na stresy abiotyczne u roślin (Horvath i in., 2007), wpływa również na termotolerancję u niektórych gatunków roślin, np.: gorczycy (*Sinapsis alba*) (Dat i in., 1998), *Arabidopsis* (Clarke i in., 2004; Larkindale i in., 2008) oraz grochu (*Pisum sativum*) (Pan i in. 2006). Podczas stresu oksydacyjnego SA zwiększa zdolność antyoksydacyjną i w ten sposób zmniejsza stopień peroksydacji lipidów (Strobel i in., 1995; Ananieva i in., 2002). Badania proteomów (bibliotek białek) wykazały, że SA indukuje wyższe poziomy dwóch dysmutaz ponadtlenkowych, poprawiających kiełkowanie nasion w warunkach stresu solnego oraz zwiększa również zdolność antyoksydacyjną siewek *Arabidopsis* (Rajjou i in., 2006).



Rycina 6. Schemat odpowiedzi roślin na stres za pośrednictwem Gibereliny. Akumulacja etyleny w przypadku podtopienia powoduje zwiększenie poziomu SNORKEL1 i SNORKEL2, co z kolei prowadzi do zwiększonego poziomu bioaktywnych GA, powodując szybkie wydłużenie międzywęzła w celu uniknięcia zanurzenia. Wzrost poziomu ABA w roślinach w odpowiedzi na stres solny i suszę, obniża poziom GA i powoduje zahamowanie wzrostu. XERICO (czynnik palca cynkowego RING-H2), będący docelowym celem transkrypcyjnym białek DELLA, reguluje biosynteza ABA i tolerancja na suszę oraz pełni funkcję węzła abiotycznych reakcji stresowych u roślin i łączy szlaki sygnałowe GA i ABA. Zastosowanie GA3 egzogennie lub nadekspresja GASA odwraca hamujące działanie stresów abiotycznych poprzez modulowanie biosyntezy SA przez gen GASA, jako domniemany pośrednik między GA i SA. Wysokie zasolenie i susza zwiększają poziom JA w roślinach. JA indukuje białko DELLA (RGL3), które oddziałuje z białkami JAZ tłumiąc jego aktywność, a to z kolei wzmacnia ekspresję genów reagujących na JA w celu przezwyciężenia stresu. **Źródło:** opracowanie własne na podstawie Wigoda i in., 2006 oraz Ko i in., 2007.

Wczesne dowody sugerujące rolę GA w termotolerancji pojawiły się w wyniku traktowania roślin odmiany Kentucky bluegrass inhibitorem GA (Heckman i in., 2002), co sprawiło, że były bardziej podatne na wysokie temperatury niż rośliny niepoddane traktowaniu. Geny *GASA*, rodzina indukowanych przez GA genów, są zaangażowane w odpowiedzi roślin na stresse abiotyczne (Wigoda i in., 2006; Ko i in., 2007). Transgeniczne linie *Arabidopsis FsGASA4* są bardziej odporne na wysokie zasolenie, utlenianie i stres cieplny podczas kiełkowania nasion (Alonso-Ramírez i in., 2009). Transgeniczne nasiona *FsGASA4* wykazują zwiększoną koncentrację SA w porównaniu z nasionami typu dzikiego, natomiast sadzonki podczas wzrostu na pożywce z dodatkiem GA3, wykazują zwiększoną ekspresję *ICS1* i *NPR1* zaangażowanych odpowiednio w biosyntezę i działanie SA (Alonso-Ramírez i in. 2009). Sugeruje to, że GA odgrywają aktywną rolę w biosyntezie i działaniu SA (rycina 6). Zastosowanie GA3 egzogennie lub nadekspresja *GASA* odwraca

hamujący wpływ stresów abiotycznych na rozwój siewek *A. thaliana* poprzez modulowanie biosyntezy SA.

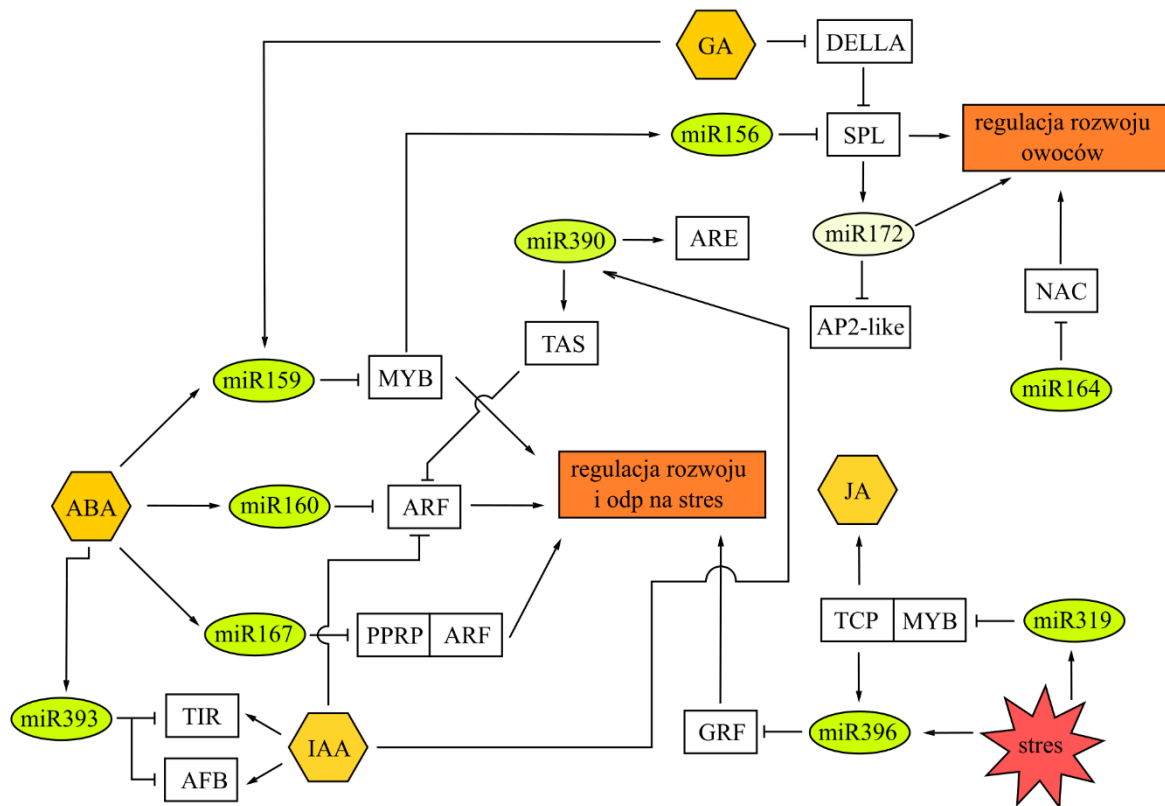
1.9.1. Interakcje na poziomie miRNA – fitohormony

Mikro RNA pełnią wiele istotnych funkcji koniecznych do prawidłowego rozwoju oraz funkcjonowania roślin w zmiennym i często nieprzyjawnym do rozwoju środowisku. Wiele z nich pośredniczy również w regulacji szlaków hormonalnych poprzez represję genów kodujących białka, które związane są z percepcją lub interpretacją sygnałów hormonalnych (rycina 7). Kompletna mapa tych interakcji jest niezwykle trudna do stworzenia, ze względu na pojawiające się różnice w niektórych mechanizmach pomiędzy poszczególnymi gatunkami roślin i nieznaną kompletnością elementów szlaków sygnałowych.

Najnowsze dowody jednoznacznie łączą mikro RNA i fitohormony z odpowiedzią na biotyczne i abiotyczne czynniki stresowe (Sunkar i in., 2007). W przypadku auksyn zidentyfikowanych zostało kilka miRNA, które w bezpośredni sposób wpływają na szlak transdukcji sygnału tego fitohormonu. Mikro RNA 393, to indukowane stresem (w warunkach odwodnienia, zimna i stresu zasolenia) miRNA oddziałujące z mRNA receptora auksyny *TIR1* oraz genów innych receptorów auksyny typu F-box, *AFB1*, *AFB2* oraz *AFB3*. Hamowanie ich ekspresji przez miR393 prowadzi do stabilizacji genów *IAA/AUX* powodując represję genów zależnych od auksyny. Nadekspresja stabilnej (nieulegającej regulacji przez miRNA) formy genu *TIR1* (*mTIR1*) u *Arabidopsis* prowadziła do zwiększenia wrażliwości rośliny na auksynę, co powoduje zmniejszenie wzrostu korzenia głównego i korzeni bocznych (Navarro i in., 2006).

W przypadku rzodkiewnika regulacja ścieżek sygnalizacji i biosyntezy auksyny może służyć więcej niż jednemu celowi zarówno w przypadku stresu abiotycznego jak i biotycznego. W rozwój korzeni zaangażowany jest również miR164 regulujący poziom transkryptu białka NAC – czynnika transkrypcyjnego biorącego udział w kontroli różnicowania tkanek (Rhoades i in., 2002). Rośliny *Arabidopsis* typu dzikiego charakteryzujące się ekspresją genu *NAC1* (*Myc-NAC1*) i rośliny transgeniczne ekspresujące odporny na cięcie przez miR164 (*Myc-NAC1m*) wykazywały kontrastujące

fenotypy korzeni, gdzie linie *Myc-NAC1m* charakteryzowały się obfitym rozgałęzieniem się korzeni w porównaniu z liniami *Myc-NAC1* (Guo i in., 2005).



Rycina 7. Uproszczony model interakcji pomiędzy miRNA (kolor zielony) a fitohormonami (kolor pomarańczowy) w regulacji rozwoju i odpowiedzi na stres u roślin. W białych polach znajdują się skrócone nazwy białek (patrz: wykaz skrótów). IAA – auksyna; ABA – kwas abscysynowy; JA – kwas jasmonowy; GA – giberelina.

Źródło: opracowanie własne na podstawie Creelman i in., 1995, Horvath i in., 2007 i Popko i in., 2010.

Warunki wysokiego ciśnienia osmotycznego mogą doprowadzić do nadprodukcji mRNA genu *IAR3* u *Arabidopsis* poprzez obniżenie aktywności kompleksu wyciszającego ekspresję tego genu. JA może indukować ekspresję *IAR3*, podczas gdy miR167 poprzez ARF6 i 8 może wpływać na produkcję JA, powodując tworzenie pętli regulacyjnych wpływających na architekturę korzeni bocznych (Kinoshita i in., 2012).

Wahania w obrębie poziomu fitohormonów takich jak ABA, IAA, JA czy GA oddziałują nie tylko bezpośrednio na geny kontrolujące odpowiedź roślin na stres oraz rozwój kwiatów i owoców, lecz również pośrednio, zmieniając poziom ekspresji niektórych miRNA, które z kolei regulują wiele czynników transkrypcyjnych. Przykładami niektórych z tych czynników mogą być WRKY (Jiang i in., 2015), YABBY (Zhang i in., 2020) czy ARF (Tvorogova i in., 2013).

Większość miRNA biorących udział w interakcjach na szlakach transdukcji fitohormonów łączy szlak IAA ze szlakami ABA i/lub ET. Ewolucja roślin lądowych wymagała adaptacji do zmian środowiskowych, w tym do zmienności pór roku i licznych czynników stresowych, dla których niezbędna była komunikacja między IAA (głównym hormonem kontrolującym morfogenezę roślin) a ABA i ET (hormonami związanymi ze stresem), co wskazuje, że miRNA były częścią ścieżki ewolucyjnej, która doprowadziła do przystosowania się roślin do stresu. Regulacja z udziałem miRNA następuje głównie poprzez regulację ekspresji genów reagujących na fitohormony, wpływając tym samym tylko na część procesów rozwojowych regulowanych przez te cząsteczki (Reyes i in., 2007; Liu i in., 2008; Okuma i in., 2014).

2. Materiały i metody

2.1. Pozyskiwanie materiału do badań

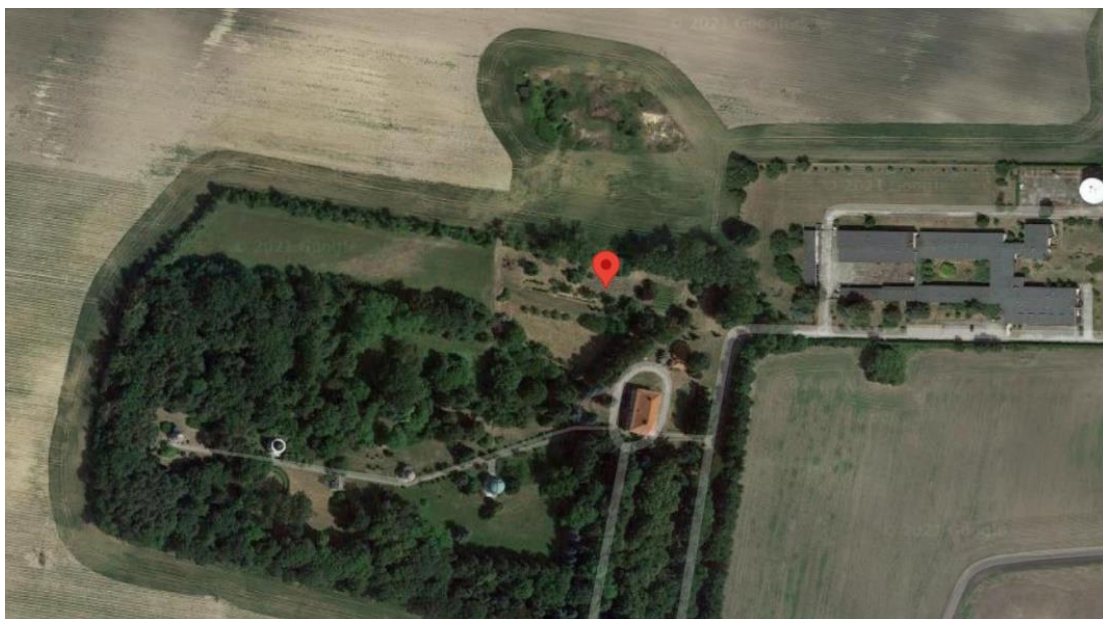
Nasiona łubinu żółtego (*Lupinus luteus* L.) odmiany Taper, będącego jednoroczną rośliną uprawną z rodziny bobowatych, zostały zakupione w Poznańskiej Hodowli Roślin Sp. z o.o. (PHR) z siedzibą w Tulcach koło Poznania, oddział Wiatrowo, Wągrowiec (woj. Wielkopolskie). Uśredniona masa 1 000 nasion wynosiła 118-117 g. Nasiona te zostały wykorzystane do wszystkich przeprowadzonych wysiewów i następujących po nich badań. W okresie poprzedzającym wysiewy nasiona były przechowywane w materiałowych workach w warunkach chłodniczych (w temperaturze 12-14 °C) w celu utrzymania ich w stanie bezwzględnej spoczynku (Solberg i in., 2020). Przechowywane w ten sposób nasiona były wykorzystywane zarówno do wysiewów polowych jak i tych w komorach klimatycznych przez okres nie dłuższy niż trzy lata. Zaobserwowany próg żywotności nasion nigdy nie spadł poniżej 80%, zazwyczaj wynosząc około 84-89%.

2.1.1. Uprawa roślin w warunkach polowych

Wszystkie eksperymentalne uprawy polowe w latach 2016-2021 zostały przeprowadzone na terenie Obserwatorium Astronomicznego w Piwnicach koło Torunia, należącego do Centrum Astronomii Uniwersytetu Mikołaja Kopernika. Wysiewy odbywały się na przygotowanych wcześniej poletkach eksperymentalnych o powierzchni około

84-90 m², które podlegały późniejszemu podziałowi na trzy lub cztery około 15-20 m² siewy. Gleba klasy IV wg klasyfikacji bonitacyjnej (kompleks żytnej dobry (5), źródło: mapy glebowe województwa kujawsko-pomorskiego oraz Marcinek i in., 2011), na której prowadzono uprawy nie była nawożona w sztuczny bądź naturalny sposób, zaś jedynym zabiegiem agrotechnicznym poprzedzającym wysiew było jej zaoranie. Ze względu na brak stosowania jakichkolwiek herbicydów, poletka uprawne niejednokrotnie zostawały przerastane przez rośliny potocznie uznawane za chwasty, takie jak babka zwyczajna (*plantago maior*), bylica pospolita (*artemisia vulgaris*), komosa biała (*chenopodium album*), krwawnik pospolity (*achillea millefolium*), mleczyk polny (*sonchus arvensis*) czy rdest ptasi (*polygonum arviculare*). Aby zniwelować negatywny wpływ tych roślin na łąbiny (konkurencja o światło, wodę i składniki mineralne), średnio co 2-3 tygodnie konieczne było ich mechaniczne usuwanie (pielenie) z zachowaniem odpowiednich środków ostrożności w celu nie uszkodzenia roślin eksperymentalnych.

Nasiona bezpośrednio przed wysiewem traktowane były preparatem zawierającym żywe bakterie brodawkowe z rodzaju *Rhizobium* lub *Bradyrhizobium* zdolne do wiązania wolnego azotu atmosferycznego w symbiozie z roślinami motylkowymi, dedykowane dla łąbinów (Nitragina dla nasion łąbinu, firmy BIOFOOD S.C z siedzibą w Wałczu). Ilość stosowanego preparatu w stosunku do masy wykorzystanych nasion była zachowana zgodnie z wytycznymi producenta. Wysiewy przeprowadzane były ręcznie przy użyciu siewnika taczkowego jednorzędowego w okresie od drugiej połowy marca do początku kwietnia w jedno lub dwutygodniowych odstępach czasu. Głębokość wysiewu wynosiła około 3-4 cm, rozstaw rzędów około 15-20 cm, zgodnie z zaleceniami w publikacji Prusiński, 1997a.



Rycina 8. Dokładna lokalizacja poletek uprawnych, długość i szerokość geograficzna: 53°05'42.0"N, 18°33'24.6"E.

Źródło: Google maps.

Separacja czasowa wysiewów miała na celu zminimalizowanie ryzyka utraty zbiorów w związku z niekorzystnymi warunkami atmosferycznymi i zwiększenie szansy na wzrost roślin w odpowiednich warunkach (Prusiński, 1997b). Zbiór materiału miał miejsce po upływie około 3 miesięcy, w zależności od tempa rozwoju roślin, które stanowiło główny indyktor konieczności pobierania materiału. W niemal wszystkich przypadkach okres ten przypadał na czerwiec lub początek lipca.

Dodatkowo, każdego roku lokalizacja poletek uprawnych ulegała zmianie, w celu uniknięcia zubożenia gleby o cenne składniki mineralne takie jak np.: potas, fosfor i magnez, co mogło by znacząco wpłynąć na kondycję roślin eksperymentalnych. W latach 2016-2017 pozyskano rośliny wykorzystane do badań NGS (ang., New Generation Sequencing, sekwencjonowanie nowej generacji), oraz analiz ekspresji wybranych genów w różnych wariantach badawczych rozwoju strąków. Natomiast w latach 2018, 2020 oraz 2021 pozyskano rośliny wykorzystane do badań rozwoju strąków na poszczególnych piętrach kwiatostanu (okółkach) w określonym czasie od zakwitnięcia (ang. Days After Blooming, DAB) oraz drugą grupę strąków i nasion do w/w badań i analiz ekspresji wybranych genów.



Rycina 9. Przykładowe zdjęcie poletka uprawnego w Piwnicach koło Torunia. Na zdjęciu widać rozstaw rzędów roślin w obrębie jednego siewu oraz siewy sąsiadujące, oddzielone szerszymi pasami ziemi.
Źródło: fotografia: Wojciech Glinkowski.

Dokumentacja fotograficzna powstała w trakcie badań wykonana została przy użyciu aparatu fotograficznego Cannon PowerShot A70 (Cannon, Tokyo, Japonia).

2.1.2. Uprawa roślin w warunkach fitotronowych

Rośliny uprawiane w komorach klimatycznych (fitotronach) znajdujących się w budynku Wydziału Nauk Biologicznych i Weterynaryjnych UMK w Toruniu były utrzymywane w stałych warunkach oświetleniowych tzw. długiego dnia (16 godzin światła, 8 godzin ciemności) w temperaturze 21 ± 1 °C w trakcie dnia oraz 18 ± 1 °C w ciągu nocy. Intensywność naświetlenia wynosiła średnio $115\text{-}130 \mu\text{mol fotonów} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ /dzień, bazując na pracy Sikorski i in., 2015 i była osiągnięta z zastosowaniem dziesięciu świetlówek na każdy stół hodowlany. Wartości zmierzone zostały przy użyciu HD2302.0 LightMeter (DELTA OHM, Caselle di Selvazzano, PD, Włochy) z sonda do analizy fal od 400 do 700 nm na długościach fali 450 i 650 nm (Matsui i in., 1974). Pod każdym zestawem świetlówek w odległości około 1,2 metra znajdował się stół, który był w stanie pomieścić trzy kuwety z doniczkami, po 18 doniczek (o pojemności ok. 2l i wymiarze 10x10x20 cm) na każdą kuwetę, do której nalewana była woda (rycina 10). W latach 2016-2019 oświetlenie

zapewniał zestaw świetlówek do uprawy roślin FLUORA® (Osram, Monachium, Niemcy) oraz standardowych świetlówek światła białego Cool Daylight (Pila, Piła, Polska) w stosunku 4:6. Od roku 2020 wprowadzone zostały dodatkowo świetlówki LED ze światłem białym LED TUBE T8 (Spectrum LED, Katowice, Polska) oraz świetlówki LED dedykowane do uprawy roślin LUNO PRO T8 LED TUBE G/P (rgbTechnik, Warszawa, Polska). Zmiany te nie spowodowały zmian stosunku ilości typów świetlówek na poszczególnych stołach hodowlanych, intensywności oraz spektrum światła dostępnego dla roślin. W związku z naturalnym procesem zużywania świetlówek poziom intensywności naświetlenia był monitorowany kilka razy do roku i w przypadku zaistniałej konieczności wyeksploatowane świetlówki zostawały wymieniane na nowe.



Rycina 10. Przykładowe zdjęcie lúbinu uprawianego w komorze klimatycznej (fitotronie).

Źródło: fotografia: Wojciech Glinkowski.

Nasiona przed wysianiem w komorach klimatycznych traktowane były zaprawą grzybobójczą VITAVAX 200FS (Chemtura AgroSolutions, Middlebury, CT, USA) w stężeniu 3,5 ml/kg nasion, zgodnie z zaleceniami producenta. Następnie, po uprzednim opłukaniu wodą, nasiona traktowane były wodnym roztworem Nitraginy (BIOFOOD S.C)

i ręcznie siane w doniczkach wypełnionych lekko ubitą, komercyjnie dostępną ziemią ogrodową (Podłoże uniwersalne, Verve, Sheldon Square, Londyn, Anglia). Ilość ziemi w każdej z doniczek określała była na podstawie masy ustalonej na 1500 ± 30 g. Na każdą doniczkę umieszczano dokładnie 5 nasion (z których cztery umieszczone w okolicy narożników oraz jedno centralnie) na głębokości około 2-3 cm. Po okresie kiełkowania trzy z pięciu siewek zostawało usuwanych. Usunięciu podlegały w pierwszej kolejności rośliny, które wizualnie odbiegały od pozostałych rozmiarem, morfologią bądź przejawiały oznaki opóźnionego wschodu.

W przypadku upraw roślin w eksperymentach stresu suszy, traktowanie roślin kontrolnych nie różniło się od standardowych procedur. W przypadku łubinów poddawanych stresowi suszy podlewanie roślin zostawało wstrzymane w określonym dniu eksperymentu, tak aby ustalona eksperymentalnie względna wilgotność gleby w doniczkach osiągnęła określony poziom w okresie kwitnienia i zawiązywania strąków (Kalandyk i in., 2012). Wilgotność gleby jako względny procent zawartości wody (wilgotność objętościowa gleby (m^3 wody/ m^3 gleby = % obj.) mierzona w oparciu o zasadę FDR (reflektometr w dziedzinie częstotliwości), mierzono przy użyciu aparatu SM150 soil Moisture sensor (AT delta-T devices, Cambridge, Anglia), sensor sm150, licznik HH2. Pomiarów dokonywano w regularnych odstępach czasu celem ustalenia tempa jej wysychania w doniczkach i związanego z tym deficytu dostępności wody dla roślin.

W przypadku traktowania roślin endogennymi roztworami fitohormonów, rośliny z danego rodzaju oprysku zostawały oddzielone fizyczną barierą od pozostałych roślin eksperymentalnych i roślin kontrolnych, a następnie spryskane roztworem 0,1 mM fitohormonu (IAA, ABA, JA-Me, GA3 oraz PCIB – związkami działającymi antagonistycznie do IAA) z dodatkiem 0.05% Tween20 w objętości 150 ml na około 70 roślin. Rośliny kontrolne zostały spryskane wodą z dodatkiem 0.05% Tween20. Liście z roślin poddanych opryskom były zbierane w odstępie jednej, dwóch, czterech oraz sześciu godzin od oprysków. Liście z roślin kontrolnych zbierano w identycznych odstępach czasowych, oraz dodatkowo bezpośrednio przed opryskiem. Wszystkie liście, zarówno z kontroli jak i oprysków zostały następnie poddane identycznym zabiegom przechowywania i izolacji RNA co inne typy tkanek (strąki, nasiona oraz ściany strąków).

2.1.3. Zbiór i przechowywanie materiału

Rośliny z których pobierano materiał były usuwane z doniczek i wrywkowo fotografowane w celach dokumentacji. Następnie, strąki w określonych stadiach rozwojowych i/lub z określonych w danym eksperymencie pięt kwiatostanu były ścinane w obrębie szypułki powyżej strefy odcięcia (AZ, ang. abscission zone) przy użyciu czystych ostrzy skalpelowych, umieszczane w stosownie opisanych aluminiowych kopertach i w całości mrożone w ciekłym azocie.

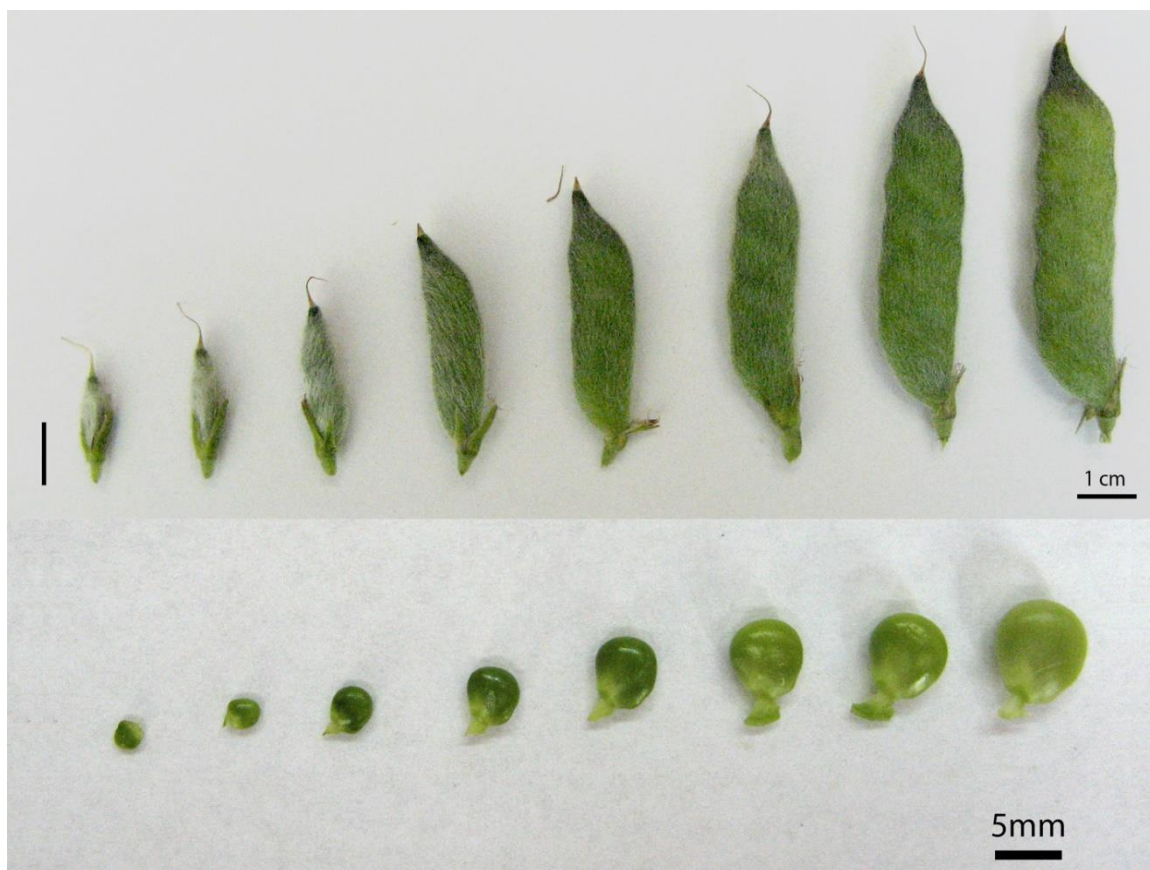
Część strąków poddawana była dysekcji polegającej na rozcięciu owocni wzdłuż szwu przy użyciu skalpela i wyłuskaniu z nich nasion. Tak podzielony materiał zostawał analogicznie mrożony w ciekłym azocie z podziałem na nasiona i owocnie, które w dalszej części pracy określane będą jako ściany strąków zgodnie z terminologią stosowaną w artykułach anglojęzycznych. Etap ten wykonywany był niezwłocznie po zebraniu strąków. W przypadku zbiorów materiału z pola eksperymentalnego ten etap był wykonywany na miejscu. W każdym z przypadków na poszczególne warianty badawcze składał się materiał z minimum trzech do pięciu roślin (co odpowiada średnio 15-25 strąkom i 45-70 nasionom). Opisane koperty były następnie przechowywane w zamrażarce niskotemperaturowej Ultra Low Temperature Freezer U535 (New Brunswick Scientific, Enfield, CT, USA) w temperaturze minus 78-80 stopni Celsjusza aż do dalszego wykorzystania.

Rozwój strąków podzielony został na 8 etapów określonych na podstawie ich wielkości oraz morfologii. Strąki we wczesnych etapach rozwoju (stadia 1-3) charakteryzowały się eliptycznym pokrojem, obecnością charakterystycznych białych włosków oraz średnią wielkością w przedziale 1,7 cm (s1), 2 cm (s2) i 2,8 cm (s3). Strąki w środkowym etapie wzrostu (stadia 4-6) zyskiwały znacząco zarówno na grubości jak i długości, ich pokrój przybierał charakterystyczny ostro zakończony kształt, a ich średnia wielkość zawierała się w granicach 4cm (s4), 4,8 cm (s5), 5,5 cm (s6). Strąki w końcowych stadiach rozwoju (stadia 7-8) ulegały ostatecznemu wydłużeniu, a ich powierzchnia stawała się wyraźnie żebrowana, co umożliwiało określenie gołym okiem przestrzeni w których znajdowały się nasiona. Ich wielkość wahała się w okolicach 6cm (s7) do 6,8 cm (s8). Wszystkie opisane powyżej stadia rozwojowe przedstawiono na rycinie 11. Wszystkie strąki zbierane do eksperymentów rozwojowych oraz badań wpływu stresu suszy pochodziły wyłącznie z pierwszego okółka (położonego najniżej na kwiatostanie).

Strąki pobrane do eksperymentów mających na celu sprawdzenie ich kondycji w obrębie różnych okółków zbierane były w ogólnie określonych odstępach czasowych, nie zaś na podstawie ich wielkości. Próby te otrzymywały oznaczenia oznaczające ich względny rozmiar w stosunku do pozostałych strąków z danego okółka (np.: „małe” oraz „duże”).

Dodatkowo zbierano również strąki odpadające, które wykazywały kilka charakterystycznych cech morfologicznych umożliwiających ich identyfikację. Strąki te charakteryzowały się cieńszą oraz jaśniejszą szypułką, widocznie zmniejszoną objętością nasion w strąku, wpływając na „spłaszczony” wygląd strąków, zmniejszonym turgorem oraz wielkością w stosunku do strąków sąsiadujących (van Steveninck, 1957). Niejednokrotnie strąki te odpadały od kwiatostanu pod wpływem lekkiego dotyku, co jednoznacznie wskazywało na aktywną strefę odcięcia. W niektórych przypadkach materiał ten również podlegał podziałowi na „nasiona odpadające” oraz „ściany strąków odpadających” zgodnie z opisem zamieszczonym w drugim akapicie niniejszego rozdziału.

Wielkość nasion w obrębie strąków wahała się w przedziale od 2 do 8mm i była liniowo skorelowana z wielkością strąków. Istotnym elementem selekcyjnym przy doborze materiału do badań było zachowanie jednorodnej wielkości nasion w obrębie strąków, jak również prawidłowej morfologii strąków i ilości obecnych w nich nasion (wynoszącej zazwyczaj 4-5 sztuk). Wyjątek od tej reguły stanowiły strąki odpadające, które wykazywały wiele aberracji w obrębie ilości, pokroju oraz jednorodności nasion. W przypadku tych prób wszystkie nasiona zostawały wykorzystane.



Rycina 11. Górna część zdjęcia: Wszystkie 8 stadiów rozwojowych strąków łubinu żółtego ułożone od lewej do prawej. Dolna część zdjęcia: Stadia rozwoju 1-8 (od lewej do prawej) nasion łubinu żółtego.
Źródło: fotografia oraz opracowanie: Wojciech Glinkowski.

W przypadku eksperymentów stresu suszy oraz traktowania roślin egzogennymi fitohormonami, zbiorowi podlegały również liście, które ucinane były tuż pod blaszką liściową. Analogicznie jak w przypadku strąków, na poszczególne warianty badawcze składały się liście z minimum trzech do pięciu roślin.

2.2. Homogenizacja materiału roślinnego

Zamrożony po zbiorach materiał roślinny był ucierany ręcznie w ceramicznych moździerzach w parach ciekłego azotu aż do uzyskania formy homogennego, drobnoziarnistego pyłu (Gouveia i in., 2002). Tak przygotowany proszek był następnie dzielony na naważki po 100 ± 5 mg w uprzednio opisanych i wymrożonych 2 ml próbkówkach typu Eppendorf z zachowaniem możliwie jak największej sterylności i dokładności. Proces ten odbywał się ze szczególnym naciskiem na uniknięcie rozmrożenia materiału, co skutkowałoby degradacją RNA. Przygotowane w ten sposób naważki oraz pozostały

nadmiar materiału w próbkach zbiorczych (zawierających między 40 a 2000 mg utartego materiału) umieszczane były w ciekłym azocie, a następnie przechowywane w zamrażarce niskotemperaturowej w temperaturze ok. minus 80 °C do momentu rozpoczęcia dalszych analiz.

W niektórych przypadkach specyfika poszczególnych wariantów uniemożliwiła uzyskanie 100 mg naważek do dalszych badań. Sytuacje te miały miejsce w szczególności w przypadku nasion ze strąków we wczesnych stadiach rozwoju oraz nasion w strąkach odpadających. W tego typu sytuacjach naważki niejednokrotnie wynosiły 50-70 mg co zostawało stosownie uwzględniane przy analizach, w szczególności podczas badania poziomu endogennych fitohormonów.

2.3. Izolacja całkowitego RNA

W początkowych etapach badań przetestowanych zostało kilka sposobów izolacji całkowitego RNA zawierającego pełen zakres wielkości cząsteczek RNA (zarówno wysoko- jak i niskocząsteczkowych) z tkanek pochodzących z łubinu żółtego. Wśród wszystkich wypróbowanych metod znajdowały się procedury ekstrakcji fenolowo-chloroformowej (tzw. Tri-reagent) z wykorzystaniem Renozol TRI RNA Extraction Reagent (GenoPlast Biotech S.A. Rokocin, Polska) i izolacje przy użyciu zestawów kolumnkowych mirVana miRNA Isolation Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) i miRNeasy Mini Kit (50) (Qiagen, Venlo, Holandia). Izolacja zestawem firmy Qiagen z zastosowaniem dodatkowego DNAzowania okazała się przynosić najlepsze efekty i stosowana była z powodzeniem w całym okresie trwania badań (Głazinska i in., 2019).

Izolacje całkowitego RNA zostały wykonane przy użyciu zestawu miRNeasy Mini Kit (50) (Qiagen) przy użyciu zmodyfikowanej procedury producenta (Protocol: Purification of Total RNA, Including Small RNAs, from Animal Tissue, Qiagen) oraz z dodatkowym zastosowaniem trawienia DNA przy użyciu RNase-Free DNase Set (50) (Qiagen) na kolumnie podczas trwania izolacji. Niniejsza procedura miała następujący przebieg:

- 1) Do zmrożonych próbek z utartym materiałem roślinnym dodanych zostaje 750 µl buforu lizującego QIAzol, próbki zostają energicznie wytrząśnięte aż do kompletnego zawieszenia materiału i pozostawione na około 5 minut w temp. pokojowej.

- 2) Do próbek dodanych zostaje 140 μ l chloroformu, próbki zostają energicznie wytrząśnięte i pozostawione na około 2-3 minut w temp. pokojowej.
- 3) Próbki zostają zwirowane w temp. 4 °C przez 15 minut przy 12 000 x g.
- 4) Po odwirowaniu, górna faza wodna zostaje ostrożnie przeniesiona do nowych, czystych próbek przy jednoczesnym zmierzeniu przeniesionej objętości supernatantu.
- 5) Do próbek dodany zostaje alkohol absolutny (99,8% alkohol etylowy cz. d. a) w objętości równej 1,5x przeniesionego uprzednio supernatantu. Całość zostaje wymieszana poprzez wielokrotne pipetowanie.
- 6) Przygotowany roztwór zostaje naniesiony na kolumny RNeasy MinElute w maksymalnej objętości 700 μ l a następnie zwirowany w temp. pokojowej przez 15 sekund w 12 000 x g. Przesącz zostaje odrzucony i krok 6) powtarza się aż do wykorzystania całej objętości mieszaniny, zazwyczaj dwukrotnie.
- 7) Kolumnienki zostają przepłukane 350 μ l buforu płuczącego RWT sporządzonego na bazie izopropanolu (99,5% 2-Propanol, cz. d. a) i zwirowane przez 15 sekund w 12 000 x g.
- 8) Na membranę naniesiony zostaje przygotowany tuż przed użyciem roztwór DNAzy w buforze RDD (z zestawu RNase-Free DNase Set) w objętości około 80 μ l, kolumnienki pozostawia się na czas 15 minut w temp. pokojowej w celu eliminacji zanieczyszczeń DNA.
- 9) Na kolumny nanosi się ponownie 350 μ l buforu RWT i wiruje przez 15 sekund z szybkością równą 12 000 x g.
- 10) Wykonana zostaje tzw. re-elucja, podczas której powstały przesącz nanosi się ponownie na kolumnę i wiruje w warunkach identycznych jak w punkcie 9).
- 11) Kolumnienki zostają dwukrotnie przepłukane 500 μ l buforu płuczącego RPE (sporządzonego na bazie etanolu) i zwirowane przez 15 sekund oraz 2 minuty (przy drugim płukaniu) w 12 000x g.
- 12) Kolumnienki zostają umieszczone w nowych próbkach odbierających i zwirowane na sucho przez 1 minutę z maksymalną prędkością (około 25 000 x g).
- 13) Kolumnienki zostają umieszczone w nowych, docelowych próbkach odbierających, bezpośrednio na membranę zostaje dodanych 30 μ l wody wolnej od RNAz.

14) Po upływie 2-3 minut inkubacji próbówki zostają zwirowane przez 1 min w 12 000 x g. Etap ten zostaje powtórzony (re-elucja) w celu odzyskania jak największej ilości RNA.

15) Wyizolowany RNA jest przechowywany w minus 20 stopniach Celsjusza do dalszych analiz.

Istotnymi wprowadzonymi w procedurze zmianami w stosunku do protokołu producenta było wykorzystanie nadmiaru buforu (Qiazol), ponowna re-elucja po DNazowaniu (etap 10) oraz ostateczna re-elucja RNA (etap 15). Zmiany te zostały wprowadzone w celu maksymalizacji ilości pozyskanego całkowitego RNA.

2.4. Walidacja wyizolowanego RNA

W celu sprawdzenia ilości oraz czystości całkowitego RNA uzyskanego podczas izolacji, konieczne było wykonanie kilku analiz sprawdzających wyżej wymienione parametry. W tym celu zastosowano trzy techniki diagnostyczne: analizę spektrofotometryczną, elektroforezę poziomą w żelu agarozowym, oraz w przypadku prób przeznaczonych do sekwencjonowania, elektroforezę kapilarną.

2.4.1 Spektrofotometryczne określenie stężenia oraz czystości RNA

Etapem mającym na celu sprawdzenie jakości oraz ilości wyizolowanego RNA było zmierzenie absorbancji izolatu w zakresie fal o długości 230-320 nanometrów przy użyciu spektrofotometru Nanodrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific). Przy zastosowaniu tej techniki możliwe było określenie zarówno stężenia wyizolowanego RNA jak również stopnia zanieczyszczeń organicznych i nieorganicznych w preparacie (Die i in., 2012), w niewielkiej objętości próbki, zazwyczaj 1-1,5 μ l. Czystość można było zweryfikować na podstawie stosunku A260/A280. A260/A280 >1,8 i maksymalizacja A260/A230 i A260/A320 są zwykle uważane za dopuszczalne wskaźniki dobrej jakości RNA. Na potrzeby niniejszych badań założono jednak bardziej restrykcyjne kryteria, które zakładały, że jakość i ilość RNA jest satysfakcjonująca jeżeli:

- a) Stężenie RNA w próbce powinno być wyższe niż 150 ng/ μ l;
- b) A260/A280 powinien zawierać się w przedziale 2,0-2,2;

c) A260/A230 powinien zawierać się w przedziale 2,0-2,2;

d) Wykres spektrum absorbancji nie powinien wykazywać żadnych abnormalności mogących sugerować zanieczyszczenie próbki.

Dzięki uzyskanym informacjom możliwe było przeprowadzenie kolejnych etapów walidacji jak również dalszych analiz w przypadku spełnienia przez próby kryteriów jakościowych.

2.4.2. Elektroforeza RNA

Elektroforeza RNA została przeprowadzona w aparacie do elektroforezy poziomej SUB13 Midi Submarine Gel Electrophoresis Unit (Hoefer Inc., San Francisco, CA, USA). Ze względu na rozdział RNA zastosowano niskonapięciowy prąd w zakresie 55-70 V (napięcie 55 V stosowano przez pierwsze 15 minut elektroforezy, później było ono zwiększane) przy natężeniu około 30 mA przez okres około 35-45 minut, co stanowiło zmodyfikowaną procedurę (Rio i in., 2010). Aparat oraz wszystkie elementy mające bezpośredni kontakt z buforem i żelem przed przeprowadzeniem każdego rozdziału były sterylizowane przy użyciu 3% roztworu nadtlenku wodoru przez minimum 12 godzin. Jednostką dostarczającą prąd o zadanym napięciu i natężeniu był aparat Consort Electrophoresis Power Supply, 800 Series (Sigma Aldrich, Darmstadt, Niemcy) oraz PowerEase® 90W Power Supply (Thermo Fisher Scientific).

Jako medium do elektroforezy wykorzystano standardowy bufor 0,5x TBE (Tris-Boran-EDTA) przygotowany na bazie wolnej od RNAz wody oraz buforu roboczego 5x TBE Molecular Biology Grade Nuclease Free (EURx Sp. z o.o., Gdańsk, Polska). Żel agarozowy użyty do naniesienia prób został przygotowany na bazie opisanego powyżej buforu oraz agarozy w proszku Agarose Bio Standard (ABO Sp. z o.o., Gdańsk, Polska) w końcowym stężeniu 1,2%. W celu wizualizacji kwasów nukleinowych w żelu, zastosowano barwnik Midori Green Advance (NIPPON Genetics Europe, Japonia) w objętości 2 µl na 100 ml żelu. Przed naniesieniem na żel próby zostały rozcieńczone do stężenia 500-1000 ng/µl i połączone z buforem obciążającym 6x Loading Buffer BLUE (EURx Sp. z o.o., Gdańsk, Polska) do końcowej objętości 6 µl. Jako markery rozdziału kwasów nukleinowych wykorzystane zostały Perfect™ 100 bp DNA Ladder (EURx

Sp. z o.o., Gdańsk, Polska) oraz DNA Marker DraMix (A&A Biotechnology, Gdynia, Polska). Wszystkie odczynniki użyte do powyższych analiz były wolne od RNAz.

Do wykonania zdjęć żeli posłużył aparat Biorad Gel Doc EQ Imaging System (Marshall Scientific, Hampton, NH, USA) z wykorzystaniem oprogramowania QuantityOne (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Wszystkie zdjęcia zostały cyfrowo opisane oraz zarchiwizowane.

2.4.3. Elektroforeza kapilarna

W celu określenia wartości RIN (RNA Integrity Number) określającej poziom integralności RNA w próbkach przeznaczonych do RNA-seq, wykorzystano elektroforezę kapilarną przy użyciu zestawu Agilent RNA 6000 Nano Kit (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) oraz aparat 2100 Bio-analyzera (Agilent Technologies) wraz z oprogramowaniem The Agilent 2100 expert B.02.02 Software (Agilent Technologies). Elektroforeza kapilarna na jednorazowych płytkach mikroprzepływowych pozwala na dokładną ocenę stężenia RNA, stopnia jego zdegradowania, jak również obecności zanieczyszczeń (podobnie jak w przypadku analizy spektrofotometrycznej) i stosunku wielkości prążków 18S/28S rRNA (Lightfoot, 2002). Wszystkie etapy procedury zostały wykonane zgodnie z instrukcjami producenta bazując na protokole Agilent RNA 6000 Nano Kit Quick Start Guide (Agilent Technologies), a wyniki udokumentowano w formie cyfrowej oraz analogowej. Za minimalny próg jakości wyizolowanego RNA uznane zostały parametry $RIN \geq 8$ oraz $18S/28S \geq 1,5$, które charakteryzują RNA o dobrej integralności oraz czystości, wymaganej do pomyślnego i skutecznego sekwencjonowania.

2.5. Sekwencjonowanie RNA

Jako materiał do sekwencjonowania posłużyły wyselekcjonowane próby izolowanego całkowitego RNA pochodzące z łubinu żółtego (*L. luteus*) odmiany Taper. Biblioteki do sekwencjonowania transkryptomów zostały przygotowywane zestawem NEBNext Ultra Directional RNA Library Prep Kit for Illumina (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA), sekwencjonowanie wykonano na platformie HiSeq4000 (Illumina, San Diego, CA, USA) w trybie 100PE.

Biblioteki do sekwencjonowania małych RNA zostały przygotowywane zestawem NEBNext Multiplex Small RNA Library Prep Set for Illumina (New England Biolabs), sekwencjonowanie wykonano na platformie HiSeq4000 (Illumina) w trybie 50SE.

Biblioteki do sekwencjonowania degradomów zostały przygotowane według procedury obejmującej izolację mRNA opartą na separacji poli(A)-mRNA przy użyciu kulek magnetycznych opłaszczonych poli(T)-oligonukleotydami, syntezę cDNA wraz z 5' adapterami, oczyszczenie produktów przez elektroforezę w żelu na bazie TAE-agarozy oraz kilku rund amplifikacji PCR (Zhou i in., 2010). Sekwencjonowanie przeprowadzono następnie na platformie HiSeq4000 w trybie 50SE. Kontrola jakości bibliotek została przeprowadzona na urządzeniu 2100 Bio-analyzer (Agilent Technologies) oraz przy wykorzystaniu ABI StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Powyższe analizy zostały wykonane jako zlecenie zewnętrzne przez firmę Genomed S. A. (Polska) oraz BGI (Shenzhen, Chiny). Szczegółowy opis znaleźć można w publikacji (Glazinska i in., 2019).

Surowe dane z eksperymentów RNA-Seq, small RNA-Seq oraz sekwencjonowania degradomu zostały zdeponowane w bazie SRA NCBI i są dostępne pod nazwą BioProject ID PRJNA419564 oraz Submission ID SUB3230840. Dane dostępne są online pod adresem <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/419564/>.

2.5.1. Opracowanie wyników sekwencjonowania

Opracowanie wstępnych wyników sekwencjonowania wymagało wielu zabiegów bioinformatycznych i różniło się w zasadniczy sposób pomiędzy każdym typem uzyskanych bibliotek (transkryptomów, bibliotek sRNA oraz degradomów, opisane dokładniej w kolejnych podrozdziałach). Analizy zostały wykonane przez firmę Ideas4biology Sp. z o.o.. Ostatecznie otrzymane wyniki zostały zdeponowane w publicznie dostępnej bazie danych (Glazińska i in., 2020) dostępnej pod adresem <http://luluseqdb.umk.pl/basic/web/>.

2.5.2. Składanie transkryptomu *de novo* i anotacja

Składanie transkryptomu *de novo* z danych RNA-Seq zostało wykonane przy użyciu oprogramowania Trinity v2.4.0 z zastosowaniem standardowych parametrów za wyjątkiem `--SS_lib_type RF` dla odosobnionych wyników. Anotacja transkryptomów została wykonana przy użyciu programu Trinotate v3.0.2 w kilkietapowym procesie obejmującym ocenę otwartych ramek odczytu, przeszukiwanie rekordów pod kątem danych z bazy Swiss-Prot proteins i Pfam database z wykorzystaniem BLASTN, BLASTX, BLASTP oraz oprogramowania TransDecoder v5.0.1 (Haas i in., 2013). Wyniki zostały następnie przeanalizowane, aby uzyskać tylko najlepsze wyniki dla danego transkryptu w oparciu o dopasowanie i jej wartość punktową (Glazinska i in., 2017).

2.5.3. Degradomy

Sekwencjonowanie degradomów zostało wykonane w celu identyfikacji sekwencji docelowych dla zidentyfikowanych miRNA i ulegających przecięciu w obrębie sekwencji wiązanej przez miRNA (Candar-Cakir i in., 2016). Degradomy zostały wykonane przez firmę zewnętrzną Genomed S. A. oraz BGI (Shenzhen, Chiny) zgodnie z procedurą opisaną w podrozdziale 2.5. Jako materiał wykorzystano 200µg RNA pozyskanego ze ścian strąków oraz nasion w trzecim stadium rozwojowym (odpowiednio S3 i N3).

2.5.4. Identyfikacja sekwencji docelowych dla zidentyfikowanych miRNA

W celu określenia sekwencji docelowych dla sRNA z wykorzystaniem degradomów, odczyty zostały przefiltrowane przy użyciu `fastq_quality_filter` z pakietu Fastx-Toolkit (http://hannonlab.cshl.edu/fastx_toolkit/) z co najmniej 95% nukleotydami wykazującymi jakość ≥ 20 (Phred Quality Score) z `-p 95` i `-q 20`. Przefiltrowane dane Degradome-seq, sekwencje dojrzałego miRNA/siRNA i złożone transkryptomy zostały przetworzone za pomocą pakietu CleaveLand4 (Addo-Quaye i in., 2009) w celu określenia miejsc cięcia dla sRNA przy użyciu domyślnych ustawień programu. Ostateczne wyniki filtrowano na podstawie wartości $p < 0,05$. Degradomy zostały przygotowane na bazie połączonych prób N3 i S3, dlatego w celu odnalezienia sekwencji docelowych, które mogły występować poza tymi próbami, wykonano dodatkowe analizy *in silico* z wykorzystaniem narzędzia

psRNA Target z wykorzystaniem transkryptomów z domyślnym Schema V2 (wydanie 2017) i wynikiem oczekiwania do maksymalnej wartości 4 (Glazinska et al., 2019).

2.6. Analiza ekspresji wybranych genów i miRNA

W celu potwierdzenia ekspresji wybranych miRNA oraz ich genów docelowych, a także walidacji uzyskanych wyników sekwencjonowania i bioinformatycznej analizy ekspresji transkryptów i miRNA przeprowadzone zostały reakcje RT-qPCR.

Wszystkie te reakcje musiały jednak zostać poprzedzone reakcjami odwrotnej transkrypcji (ang., Reverse Transcription, RT), gdzie dla genów docelowych wykorzystane zostały startery typu Oligo(dT)20. W przypadku sekwencji miRNA reakcje odwrotnej transkrypcji zostały wykonane z zastosowaniem specyficznych starterów typu SL (ang., Stem-Loop, pętla macierzysta). Startery tego typu umożliwiają syntezę cDNA w reakcji RT dla specyficznych dojrzałych cząsteczek miRNA generując dodatkowo miejsce wiązania dla zaprojektowanego uniwersalnego startera do qPCR oraz miejsce wiązania sondy hydrolizującej TaqMan typu UPL (Universal Probe Library) firmy Roche (Roche Molecular Systems, Inc. Pleasanton, CA, USA).

Tabela 1. Wykaz starterów wykorzystanych do reakcji odwrotnej transkrypcji, w tym starterów typu stem-loop oraz starterów wykorzystanych do reakcji RT-qPCR. W tabeli zestawiono również startery wykorzystane do walidacji bibliotek sRNA oraz transkryptomów.

Nazwa	Typ startera	Sekwencja (5'-3')	nr sondy UPL
Universal	reverse	CCAGTGCAGGGTCCGAGGTA	-
Ll-miR9	stem-loop RT	GTCATCACCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCG CACTGGTGTGACGGCGCT	9
	forward	CACGCAAAGCTCAGGAGGGATAGC	
Ll-miR281	stem-loop RT	GTCATCACCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCG CACTGGTGTGACTCAGAT	9
	forward	CACGCATGAAGCTGCCAGCATGA	
Ll-miR53	stem-loop RT	GTCATCACCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCG CACTGGTGTGACAATCCA	9
	forward	CACGCAATCATGCTATCCCTTTGGAT	
Ll-miR457	stem-loop RT	GTCATCACCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCG CACTGGTGTGACTAGGCA	9

	forward	CACACATTGCCAATTCCACCCATG	
Ll-miR60	stem-loop RT	GTCATCACCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCCG CACTGGTGATGACGCCAGG	9
	forward	CACTCAATGCACTGCCTCTTCCCT	
Ll-miR155	stem-loop RT	GTCATCACCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCCG CACTGGTGATGACTCTCCC	9
	forward	CACGCAGCTCAAGAAAGCTGTGG	
Ll-miRn486	stem-loop RT	GTCATCACCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCCG CACTGGTGATGACACAGAG	9
	forward	CACGCATTTCGTTTGTGTGCAGACT	
Ll-siR254	stem-loop RT	GTCATCACCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCCG CACTGGTGATGACTGCACG	9
	forward	CACGCATGGAGAAGCAGGGCACG	
Ll-siR2	stem-loop RT	GTCATCACCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCCG CACTGGTGATGACGACTAC	9
	forward	CACACAGTCCTGACGGCTCATGTA	
Ll-miR380/miR396	stem-loop RT	GTCATCACCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCCG CACTGGTGATGACCTTCCCA	9
	forward	CACGCAGTTCAATAAAGCTGTG	
Ll-miR276/miR167	stem-loop RT	GTCATCACCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCCG CACTGGTGATGACTAGATC	9
	forward	CACGCATGAAGCTGCCAGCATGA	
Ll-miR446/miR159	stem-loop RT	GTCATCACCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCCG CACTGGTGATGACTAGAGC	9
	forward	CACGCATTTGGACTGAAGGGAG	
Ll-miR329/miR160	stem-loop RT	GTCATCACCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCCG CACTGGTGATGACTGGCAT	9
	forward	CACGCATGCCTGGCTCCCTGA	
Ll-miR428	stem-loop RT	GTCATCACCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCCG CACTGGTGATGACAAGAGG	9
	forward	CAATCATTGGACTGAAGGGG	
<i>LlActin4</i>	forward	TGGACGTACTACAGGTATTGTGC	9
	reverse	ATGGGCACTGTATGGCTCAC	
<i>LIPPA2</i>	forward	TCTTTGAGCCTTAAACTTGGACA	9
	reverse	TCCAATGAGGATGAGAAGAGGT	
<i>LlMIR169</i>	forward	AGCTTCATGTCTATGGTACCTTATTG	145
	reverse	AAATTGGATTTTCCCTCTCAAAG	
<i>LlACA13</i>	forward	GGTATACTCCAGCCGAACCA	55
	reverse	CTCGGGCGTGTAGTTTCG	

<i>LIDC2.15</i>	forward	GCCTATGCACTGCCCTAAAA	105
	reverse	GAAGCAAGCTAAGTGAGATTGGA	
<i>LIARF4</i>	forward	AATTTTCGTCATATTTATAGAGGTCAGC	20
	reverse	GAAATAAGATTCTTTTCGGCTAACAA	
<i>LIARF6</i>	forward	TACTGGAACTGCCACCCATT	9
	reverse	TTGGGTCAGATTCGGGATT	
<i>LIMYB33</i>	forward	CCGACATTTTGCTTGATG	67
	reverse	ATGGTTTGGTTCTTGCCATT	
<i>LIYUCA3</i>	forward	GGTGGTCAGAAGCTCAGTTCA	145
	reverse	AAGCTCAAAAGTTGATTTTCCAA	
LIGAMYB	forward	CCGACATTTTGCTTGATG	67
	reverse	ATGGTTTGGTTCTTGCCATT	
LIARF17	forward	GGATGGGGATGTGGAGAAG	134
	reverse	CTTCCCGTTCCTTGAAAACC	
LIGRF9	forward	CAGGTAACGGAAGTAGCCAAA	21
	reverse	ACCGACGTTGTAGCCGATA	
LITCP2	forward	TCAAGGCCTGAGATTTGTGTC	103
	reverse	TTCTTTCTCTTTATCCTTTGTTGCT	
LITCP4	forward	GCACCATGTAGAACAACACGA	55
	reverse	AAAGGTTGAGTCTTGGTTTTGG	

2.6.1. Reakcja odwrotnej transkrypcji

Reakcja odwrotnej transkrypcji miała na celu przepisanie całkowitego RNA uzyskanego w procesie izolacji RNA na cDNA (komplementarne DNA, ang., complementary DNA). Reakcja ta była przeprowadzana przy użyciu zestawu NG dART RT kit (EURx Sp. z o.o.) z wykorzystaniem termostabilnej odwrotnej transkryptazy (Stahlberg i in., 2004) oraz starterów typu Oligo(dT)₂₀, zgodnie z procedurą producenta. Reakcje te wykorzystane zostały do analizy ekspresji genów kodujących wysokocząsteczkowe RNA, jak na przykład geny docelowe dla miRNA oraz geny referencyjne np.: aktyne. Przebieg i profil termiczny reakcji przebiegał następująco:

- reakcja właściwa: 55 minut w temperaturze 55 °C
- terminacja reakcji poprzez denaturację enzymu: 5 minut w temperaturze 85 °C
- rozcieńczenie cDNA do stężenia niezbędnego do przeprowadzenia reakcji RT-qPCR

Do reakcji wykorzystywano jeden, dwa lub cztery mikrogramy RNA w końcowej objętości reakcyjnej 20 lub 40 μ l, w zależności od zapotrzebowania, zaś sama reakcja przeprowadzana była w termocyklerze MJ Mini Personal Thermal Cycler (Bio-Rad).

2.6.2. Reakcja odwrotnej transkrypcji z wykorzystaniem starterów stem-loop

Reakcja odwrotnej transkrypcji dla specyficznych starterów typu stem-loop (Kramer, 2011) została wykonana przy użyciu SuperScript III Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific). Dodatkowo, użyty został również inhibitor RNAz (EURx Sp. z o.o.). MiRNA mają długość od 17 do 24 nukleotydów. Standardowe, ilościowe metody PCR wymagają matrycy, która jest co najmniej dwukrotnie dłuższa od każdego ze swoistych starterów o długości około 20 nt, zatem docelowa minimalna długość wynosi około 40 nt, co sprawia, że miRNA są zbyt krótkie dla standardowych metod RT-qPCR. Starter typu SL zawiera wysoce stabilną strukturę dwuniciową, która wydłuża docelowy cDNA. Starter forward PCR zapewnia dodatkową długość z nukleotydami, które optymalizują jego temperaturę topnienia (T_m) i zwiększają specyficzność reakcji. Ponadto, zaprojektowanie sondy, która jest komplementarna do fragmentu sekwencji w obrębie startera typu SL dodatkowo zwiększa specyficzność późniejszej reakcji RT-qPCR. Startery zostały zaprojektowane na podstawie (Varkonyi-Gasic i in., 2007) z modyfikacją polegającą na zamianie sekwencji komplementarnej do sondy UPL 21 na UPL 9.

Do reakcji użyto 200-800 nanogramów RNA (w zależności od ilości przewidywanych reakcji qPCR wykonywanych na danej matrycy cDNA) w końcowej objętości reakcyjnej 20 μ l, zaś sama reakcja przeprowadzana była w trybie pulsacyjnym (Varkonyi-Gasic, 2017) w termocyklerze MJ Mini Personal Thermal Cycler (Bio-Rad) w następujących warunkach:

- 30 minut pre-inkubacji w temperaturze 16 °C,
- 60 cykli reakcji w temperaturze 30 °C przez 30 s, 42 °C przez 30s and 50 °C przez 1 s,
- terminacja reakcji poprzez denaturację enzymu: 5 minut w temperaturze 85°C.
- rozcieńczenie cDNA do stężenia niezbędnego do przeprowadzenia reakcji RT-qPCR

Dodatkowo, w przeciwieństwie do reakcji odwrotnej transkrypcji ze standardowymi starterami, startery typu SL wymagały dodatkowego przygotowania przez przeprowadzeniem ostatecznej reakcji. Procedura polegała na rozcieńczeniu startera

do stężenia 1µM oraz jego wstępnej denaturacji (podgrzaniu w temp. 65 °C przez 5 minut), po której zostawał on poddany schłodzeniu na lodzie przez dwie minuty, a następnie zostawał wytrząśnięty i zwirowany przez kilka sekund. Po ww. procedurach starter pozostawał w stanie schłodzenia (na lodzie) aż do momentu dodania go do mieszaniny reakcyjnej.

Wszystkie startery wykorzystane do reakcji odwrotnej transkrypcji z wykorzystaniem specyficznych starterów typu SL (oznaczone jako stem-loop RT), jak również startery standardowe (oznaczone jako forward i reverse) wykorzystane do reakcji RT-qPCR (rozdział 2.6.3.) zostały podane w tabeli 1.

2.6.3. Reakcja RT-qPCR

Reakcje RT-qPCR oraz SL-RT-qPCR (ang., Stem-Loop Reverse Transcription quantitative Polymerase Chain Reaction) były przygotowane w warunkach sterylnych w komorze UVP UV PCR Workstation (Thermo Fisher Scientific) każdorazowo po minimum 30-minutowej sterylizacji lampami UV. Do reakcji wykorzystywano 96-dółkowe jednorazowe płytki plastikowe (NEST Biotechnology CO., Jiangsu, Chiny) wraz z folią zabezpieczającą PCR Sealing Film (NEST Biotechnology CO). Mieszanina reakcyjna zawierała: 5,2µl buforu bazowego LightCycler® 480 Probes Master (Roche Molecular Systems, Inc. Pleasanton, CA, USA) lub SensiFAST Probe No-ROX kit (Bioline meridian bioscience Cincinnati, OH, USA) 0,04 µl startera w stężeniu 100µM (forward i reverse), 0,1µl światłoczułych sond hydrolizujących typu TaqMan UPL (Universal Probe Library, Roche Molecular Systems, Inc. Pleasanton, CA, USA). Poniższa tabela (tabela 2) ilustruje objętości oraz stężenia początkowe i końcowe wszystkich reagentów wykorzystywanych w reakcjach odwrotnej transkrypcji oraz RT-qPCR, dla reakcji ze standardowymi starterami oraz starterami stem-loop.

Tabela 2. Dokładne dane dotyczące składu wszystkich reakcji odwrotnej transkrypcji (z udziałem starterów standardowych oraz starterów typu stem-loop) oraz reakcji RT-qPCR.

RT dla genów docelowych			
NG dART RT kit:	Stężenia wyjściowe/ilość	objętość w reakcji	stężenie/ilość w reakcji
Oligo(dT)20	50 µM	1 µl	2,5 µM
5x bufor	5x	4 µl	1x

NG dART RT mix	20x	1 μ l	1x
matryca	1/2/4 μ g	-	1/2/4 μ g
końcowa objętość reakcji	20 μ l (6 μ l mix + 14 μ l matryca z H ₂ O)		
RT dla miRNA			
Invitrogen:	Stężenia wyjściowe/iłość	objętość w reakcji	stężenie/iłość w reakcji
DNTP mix	10 mM	0,25 μ l	0,25 mM
5x b μ for	5x	2 μ l	1x
DTT	0,1M	1 μ l	0,01 M
Inhibitor RNaz	50 μ / μ l	0,04 μ l	0,2 μ
Superscript	200 μ / μ l	0,125 μ l	2,5 μ
starter (100 μ M 40x rozc.)	2,5 μ M	0,5 μ l	0,125 μ M
matryca	100 ng	-	250 ng
końcowa objętość reakcji	10 μ l (3,8 μ l mix + 6,2 matryca z H ₂ O)		
RT-qPCR			
Master mix	Stężenia wyjściowe/iłość	objętość w reakcji	stężenie/iłość w reakcji
SensiFAST/480 Probes Master	2x wszystkie	5,2 μ l	1x
startery			
forward	100 μ M	0,04 μ l	0,38 μ M
reverse	100 μ M	0,04 μ l	0,38 μ M
UPL	10 μ M	0,1 μ l	0,1 μ M
5x rozc. cDNA	-	5 μ l	100ng dla genów docelowych i 50ng dla miRNA
końcowa objętość reakcji	10,4 μ l (5,4 μ l mix + 5 μ l matryca z H ₂ O)		

Reakcja RT-qPCR wykonywana była przy użyciu urządzenia LightCycler® 480 System (Roche Molecular Systems). Analizy zostały przeprowadzone w trybie FRET (ang., fluorescence resonance energy transfer, fluorescencja energii transferu) przy długości fali wzbudzenia równej 465nm i długości fali detekcji równej 510nm w trybie pojedynczej detekcji. W przypadku każdego z analizowanych genów oraz mikroRNA, stosowano krzywą kalibracyjną będącą połączeniem dwóch lub czterech matryc, wykonaną z prób o odmiennym rodowodzie. Przykładowo, połączeniu poddawane były próby z nasion i ścian strąków lub próby z strąków w różnym wieku. Tak przygotowana „uśredniona” matryca rozcieńczana była następnie w stosunku objętościowym 1x, 2x, 5x, 10x, 20x oraz 50x, dając sześć punktów na krzywej kalibracyjnej o stężeniach odpowiednio 1x, 0,5x, 0,2x, 0,1x, 0,05x i 0,02x stężenia początkowego. Dokładny profil termiczny reakcji obejmował: 10 minutową inkubację w temperaturze 95 °C przez 10 minut, oraz 45 cykli w warunkach: 95 °C przez 10 s, 59 °C przez 30 s, oraz 72 °C przez jedną sekundę.

Każdy eksperyment został wykonany w dwóch powtórzeniach biologicznych i trzech powtórzeniach technicznych. Względne poziomy ekspresji obliczono metodą $2^{-\Delta\Delta Ct}$, a dane znormalizowano do wartości CT dla genu referencyjnego aktyny (LIActin4) zgodnie z metodyką zawartą w pracy Glazinska i in., 2017. Analizy statystyczne wykonano w programie Excell.

2.6.4. Analizy *in silico* wybranych genów oraz miRNA

Wybrane sekwencje miRNA do analiz zostały pobrane z bazy LuluDB. Do przetłumaczenia sekwencji genów docelowych na sekwencje białkowe, znalezienia sekwencji otwartych ramek odczytu (ORF), uporządkowania sekwencji oraz porównań sekwencji białkowej z sekwencją nukleotydową wykorzystano narzędzia z pakietu Vector NTI (Thermo Fisher Scientific).

Do weryfikacji oraz wykonania innych porównań (przykładowo, do sprawdzenia dopasowania miRNA z prekursorem lub genem docelowym) wykorzystano narzędzie clustal omega dostępny na stronie <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/> z wykorzystaniem standardowych parametrów. Konserwowane domeny białkowe oraz sekwencje pokrewne dla genów docelowych zostały znalezione przy użyciu programu blastp suite z wykorzystaniem standardowych parametrów.

Struktury drugorzędowe zostały opracowane przy użyciu pakietu RNAstructure <https://rna.urmc.rochester.edu/RNAstructureWeb/Servers/Predict1/Predict1.html> dla prekursorów miRNA z zastosowaniem standardowych parametrów. Uzyskane w ten sposób struktury zostały poddane obróbce graficznej w programie Inkscape w celu uwidocznienia miejsca zawierającego strukturę hairpin oraz miRNA.

2.7. Badanie poziomu wybranych fitohormonów

Analiza zawartości wybranych fitohormonów została wykonana bazując na metodzie QuEChERS (akronim od quick, easy, cheap, effective, rugged and safe – szybka, łatwa, tania, efektywna, surowa i bezpieczna) z wykorzystaniem deuterowanych standardów wewnętrznych. Metoda ta działa w oparciu o separację faz z wykorzystaniem acetonitrylu oraz ekstrakcji fitohormonów na kolumnkach ze złożem SPE, mającym na celu selektywne

wiązanie a następnie dysocjację pożądaných związków (González-Curbelo i in., 2015). Detekcja przeprowadzona została zastosowaniu wysokowydajnej chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektroskopią mas (UHPLC-MS/MS) z użyciem aparatu Shimadzu Nexera XR UHPLC system (Shimadzu, Kyoto, Japonia) z detektorem triple quadrupole mass spectrometer (LCMS-8045, Shimadzu).

2.7.1. Przygotowanie próbek do analizy

Procedura przygotowania materiału roślinnego oparta była na protokole wykorzystanym w eksperymencie Pu i in., 2018 z zastosowaniem potrzebnych modyfikacji.

Do próbek zawierających utarty oraz dokładnie odważony wcześniej materiał roślinny (rozdział 2.2.) dodano mieszaninę zawierającą 80% acetonitrylu (CH_3CN), 5% kwasu mrówkowego (HCOOH) oraz 1 mM roztworu BHT (butylohydroksytoluen, 2,6-di-tert-butylo-p-krezol) w ilości 1,6 ml na próbę oraz mix deuterowanych standardów. Lista oraz zastosowane ilości standardów umieszczono w tabeli 3. Przygotowane w ten sposób próby wytrząsano w temp. 4 °C przez okres 12 h.

Po inkubacji do próbek dodano 80 mg przygotowanej wcześniej mieszaniny soli siarczanu magnezu (MgSO_4) i chlorku sodu (NaCl) w stosunku wagowym 3:1, następnie próbki intensywnie wytrząsano przez 1 min i wirowano przez 8 min w 14 000 x g w temperaturze pokojowej.

Po odwirowaniu górną fazą acetonitrylową przeniesiono do nowych próbek. Do roztworu dodano następnie 80 mg bezwodnego siarczanu sodu (Na_2SO_4) w celu ostatecznej dehydratacji roztworu. Próbki energicznie wytrząsano przez dwie minuty i wirowano przez 5 min w 14 000 x g w temperaturze pokojowej. Otrzymany supernatant przeniesiono do nowych próbek i umieszczano w termobloku w temperaturze 40 °C w strumieniu azotu w celu zagęszczenia roztworu do objętości 30-50 μl .

Do próbek dodano następnie 1 ml 1M kwasu mrówkowego, po czym energicznie wytrząsano je przez jedną minutę i wirowano przez 3 min w 14 000 x g. Supernatant poddawano następnie oczyszczaniu z użyciem jednorazowych plastikowych kolumn wypełnionych złożem C18 SPE Bakerbond (AVANTOR Performance Materials) o pojemności 1 ml z wykorzystaniem aparatu typu pułapka próżniowa Processor column SPE-12G Bakerbond (AVANTOR Performance Materials) połączonego z pompą

próżniową. Przed naniesieniem prób na kolumnienki, zostały one aktywowane przy użyciu 1ml czystego (99,8%) metanolu oraz zrównoważone 2 ml 1M kwasu mrówkowego. Po naniesieniu prób kolumnienki przemywano dwukrotnie 1 ml 1M kwasu mrówkowego. Elucja do 1,5 ml próbek typu eppendorfa została wykonana z użyciem 0,6 ml 80% wodnego roztworu metanolu.

Otrzymany roztwór suszono w wyparce próżniowej CentriVap Vacuum Concentrator (Labconco Corporation, Kansas City, KS, USA) w temperaturze około 30 °C przy ciśnieniu 15 hPa, do momentu kompletnego osuszenia próbek. Następnie do próbek dodano 80 µl roztworu 35% metanolu z 0,1% kwasem mrówkowym, wytrząsano przez jedną minutę oraz zwirowano przez 5 min w 14 000 x g. Ostatni etap stanowiło przeniesienie supernatantu do szklanych kapilar osadzonych w buteleczkach, które następnie umieszczono w autosamplerze aparatu Shimadzu Nexera XR UHPLC system (Shimadzu).

Tabela 3. Lista deuterowanych standardów fitohormonów wykorzystanych podczas analizowania ilości wybranych endogennych fitohormonów w tkankach łubinu.

Nazwa standardu	Nazwa hormonu	grupa	Ilość w przeliczeniu na próbę [ng]
d2-IAA	kwas indolilo-3-octowy	auksyny	5
d5-IAA-Ala	kwas indolilo-3-octowy-L-Alanina	auksyny	5
d5-IAA-Me	kwas indolilo-3-octowy-L-Metionina	auksyny	2
d2-IAA-PhE	kwas indolilo-3-octowy-L-Fenylalanina	auksyny	5
d2-IAA-Leu	kwas indolilo-3-octowy-L-Leucyna	auksyny	5
d2-IBA	kwas indolilo-3-masłowy	auksyny	5
d5-JA	kwas jasmonowy	jasmoniany	5
d2-JA-me	jasmonian metylu	jasmoniany	5
d4-SA	kwas salicylowy	n/d	10
d5-ABA	kwas abscysynowy	n/d	5
d2-ACC	kwas 1-aminocyklopropano-1-karboksylowy	etylen	5
d2-GA1	giberelina A1	gibereliny	1,5
d2-GA3	kwas giberelinowy	gibereliny	5
d2-GA4	giberelina A4	gibereliny	0,5
d2-2GA7	giberelina A7	gibereliny	0,5
d5-tZ	Zeatina	cytokininy	5
d5-2iP	2-izopentyloadenina	cytokininy	5

2.7.2. Ocena ilościowa i jakościowa fitohormonów w próbach

Analizy wszystkich prób zostały wykonane w trzech powtórzeniach biologicznych i dwóch technicznych przy użyciu aparatu Shimadzu Nexera XR UHPLC system (Shimadzu) z detektorem triple quadrupole ion trap mass spectrometer (LCMS-8045, Shimadzu). Analizy wykonano z użyciem kolumny Ascentis® Express C18, 10 x 2,1 mm, 2,7 µm (Supelco, Sigma-Aldrich). Stosowano analizę gradientową w 30-80% metanolu z dodatkiem 0,1% kwasu mrówkowego. Poszczególne fitohormony identyfikowano w oparciu rozpadu wybranych jonów bazując na czułym oraz selektywnym trybie analizy ilościowej - obserwowaniu wybranych reakcji fragmentacji (MRM – ang. multiple reaction monitoring). Zapis wartości MRM dla poszczególnych hormonów w pozytywnej (+) lub negatywnej (-) jonizacji przedstawiono w tabeli numer 4.

Tabela 4. Wartości MRM oraz jonizacja pozytywna (+) i negatywna (-) wykorzystana przy analizie fitohormonów oraz deuterowanych standardów.

Nazwa fitohormonu	Wartości MRM oraz jonizacja	
	fitohormon endogenny	deuterowany standard
kwas indolilo-3-octowy	IAA(+) 176→130	d2-IAA(+) 178→132
kwas indolilo-3-octowy-L-Alanina	IA-Ala(+) 247→130	d5,15N-IA-Ala(+) 252→134
kwas indolilo-3-octowy-L-Metionina	IA-Leu(+) 294→134	d2-IA-Leu(+) 294→134
kwas indolilo-3-octowy-L-Fenylalanina	IA-Phe(+) 362→130	d2-IA-Phe(+) 328→134
kwas indolilo-3-octowy-L-Leucyna	IAMe(+) 190→130	d5-IAMe(+) 194→134
kwas indolilo-3-masłowy	IBA(+) 204→130	d2-IBA(+) 206→131
kwas jasmonowy	JA(+) 211→133	d5-JA(+) 214→134
jasmonian metylu	JAMe(+) 225→151	d2-JAMe(+) 227→153
kwas salicylowy	SA(-) 137→93	d4-SA (-) 141→97
kwas abscysynowy	ABA(-) 263→153	d5-ABA(-) 269→159
kwas 1-aminocyklopropano-1-karboksylowy	ACC(+) 102→58	d2-ACC(+) 106→60
giberelina A1	GA1(-) 347→259	d2-GA1(-) 349→261
kwas giberelinowy	GA3(-) 345→239	d2-GA3(-) 347→241
giberelina A4	GA4(-) 331→287	d2-GA4(-) 333→259
giberelina A7	GA7(-) 329→223	d2GA7(-) 331→225
Zeatina	tZ(+) 220→202	d5-tZ(+) 225→137
2-izopentyloadenina	2iP(+) 204→148	d5-2iP(+) 210→137

Otrzymane dane analizowano przy pomocy oprogramowania LabSolutions software 5.8 (Shimadzu). Powierzchnia pików poszczególnych odczytów standardów wewnętrznych oraz fitohormonów endogennych została następnie zliczona, porównana

i wykorzystana do obliczenia zawartości endogennego fitohormonu w tkance przy użyciu równania:

$$\text{masa} \left[\frac{\text{ng}}{\text{g}} \text{tkanki} \right] = \frac{\left(\frac{\text{endo}}{\text{std}} \right)}{\text{masa próbki [g]}} \times \text{ilość standardu [ng]} \times \text{współczynnik}$$

Gdzie: endo – powierzchnia pików endogennego fitohormonu, std – powierzchnia pików deuterowanego standardu wewnętrznego, współczynnik – współczynnik właściwy dla poszczególnych fitohormonów.

Współczynniki określające stosunek powierzchni pików deuterowanych fitohormonów do ich naturalnych odpowiedników zostały określone poprzez wykorzystanie ustandaryzowanych prób obu związków z danej pary i przeprowadzenie ich rozdziału w warunkach identycznych z tymi, w których testowane były próby badane. Zastosowanie tego współczynnika w toku obliczeń pomogło na zminimalizowanie błędów wynikających z przesunięcia widm i powierzchni ich pików w związkach deuterowanych i naturalnych.

2.7.3. Analiza statystyczna i interpretacja otrzymanych wyników analizy poziomu hormonów

Wszystkie uzyskane wartości przygotowano w sposób umożliwiający ich poprawną interpretację przez skrypty stworzone w środowisku R (Allaire, 2012) wykorzystując oprogramowanie RStudio v1.4.1717. Skrypty te oparte zostały na teście Tukey'a, który stanowi jednoetapową procedurę wielokrotnych porównań i test statystyczny. Kolejna część skryptu pozwoliła na wykreślenie wykresów słupkowych ilustrujących poziom danego fitohormonu w poszczególnych próbkach oraz wyodrębnienie grup wyników, które statystycznie różnią się od siebie. Kolejny skrypt pozwolił na skalowanie danych do wartości w zakresie 0-100 oraz graficzną interpretację wyników w postaci map gorąca, co pozwoliło na łatwiejszą interpretację graficzną uzyskanych wyników.

2.8. Badanie tolerancji roślin na stres suszy

Badanie wpływu suszy na proces zawiązywania kwiatów i strąków u łubinu żółtego miało na celu sprawdzenie odporności i reakcji roślin na warunki stresu niedoboru wody

oraz na efekty jakie ten proces wywiera na poziomie ekspresji wybranych genów, jak również na zmianach jakie wywoła w poziomie fitohormonów.

2.8.1. Metoda oznaczania ilości wody w liściach

W celu określenia w jakim stopniu łubin żółty został dotknięty niedoborem wody w glebie, wykorzystano metodę pomiaru relatywnego poziomu wody (RWC, ang. relative water content) w liściach. Ze względu na naturalne obumieranie dolnych liści związane ze wzrostem roślin, do pomiarów wykorzystywano piąty a następnie ósmy liść z każdej rośliny. Zmiana następowała w momencie, gdy liście numer 5 na roślinach kontrolnych zaczęły wykazywać drastyczne objawy utraty turgoru.

Metoda pomiaru RWC polega na mierzeniu wagi świeżo zebranych liści, wagi liści przesyconych wodą oraz wagi suchych liści. Saturację liści wodą osiągnięto poprzez umieszczenie liści w wodzie destylowanej w ciemności przez 24 godzin, a następnie dokładne osuszenie powierzchni liści bezpośrednio przed pomiarem. Wagę suchą uzyskano umieszczając liście w temperaturze około 80°C przez 48 godzin (Darko i in., 2015). Relatywny poziom wody określono się następnie według wzoru:

$$RWC \% = \frac{(FW - DW)}{(SW - DW)} \times 100$$

Gdzie: FW – waga świeżych liści, SW – waga liści przesyconych wodą, DW – waga suchych liści

Równolegle prowadzone były pomiary wilgotności gleby (podrozdział 1.2.) mające na celu sprawdzenie zależności pomiędzy zawartością wody w glebie a jego wpływem na stan roślin.

Liście oraz strąki z roślin poddanych stresowi suszy oraz roślin kontrolnych zostały zebrane oraz opracowane zgodnie z metodami opisanymi we wcześniejszych rozdziałach (podrozdział 2.1.3.) i wykorzystane do określenia zmian w obrębie ekspresji genów biorących potencjalny udział w regulacji odpowiedzi na stres abiotyczny.

3. Wyniki

3.1. Zbiór materiału

Materiał roślinny (całe strąki, nasiona, oraz ściany strąków) pozyskiwany był z upraw polowych w latach 2016, 2017, 2018 oraz 2020. Fala upałów latem 2019 roku uniemożliwiła zebranie materiału ze względu na zniszczenie całości plonów. Dodatkowo, materiał pozyskiwany był również z upraw fitotronowych w latach 2017-2021 wg klucza zamieszczony w rozdziale 2.1.3. Zebrany materiał został wykorzystany do wszystkich eksperymentów przeprowadzonych w ramach niniejszej pracy doktorskiej, zaś dokładny wykaz poszczególnych wariantów badawczych, ich nazw skróconych oraz lat zbioru i zadań badawczych do których został wykorzystany, znajduje się w tabelach 5-12. W przypadku eksperymentów tolerancji roślin na niedobór wody, jak również w eksperymencie z wykorzystaniem egzogennych fitohormonów (Tabele 10-12), zbiorowi podlegały również liście. Podczas eksperymentów tolerancji roślin na suszę, liście zostawały wykorzystane wyłącznie do oznaczeń relatywnego poziomu wody (RWC, rozdział 2.8.1.) i nie zostały ujęte w poniższych tabelach.

Tabela 5. Materiał pozyskany z upraw polowych w roku 2016 (całe strąki, N - nasiona, S - ściany strąków). Nazwa próby określa typ tkanki oraz stadium rozwojowe. ODP – strąki odpadające, NODP – strąki nieodpadające.

Nazwa	Nazwa skrócona (ID próbek)	Zadania badawcze
Strąki nieodpadające	STR NODP	smallRNA-seq, RNA-seq, RT-qPCR, analizy hormonów
Strąki odpadające	STR ODP	smallRNA-seq, RNA-seq, RT-qPCR, analizy hormonów
Strąki ściana stadium 1	SŚ ST1	smallRNA-seq, RNA-seq, RT-qPCR
Strąki ściana stadium 2	SŚ ST2	smallRNA-seq, RNA-seq, RT-qPCR
Strąki ściana stadium 3	SŚ ST3	smallRNA-seq, RNA-seq, degradome-seq, RT-qPCR
Strąki ściana stadium 4	SŚ ST4	smallRNA-seq, RNA-seq, RT-qPCR
Strąki ściana stadium 5	SŚ ST5	smallRNA-seq, RNA-seq, RT-qPCR
Strąki ściana stadium 6	SŚ ST6	smallRNA-seq, RNA-seq, RT-qPCR
Strąki ściana stadium 7	SŚ ST7	smallRNA-seq, RNA-seq, RT-qPCR
Strąki ściana stadium 8	SŚ ST8	smallRNA-seq, RNA-seq, RT-qPCR
Nasiona stadium 1	N ST1	smallRNA-seq, RNA-seq, RT-qPCR
Nasiona stadium 2	N ST2	smallRNA-seq, RNA-seq, RT-qPCR
Nasiona stadium 3	N ST3	smallRNA-seq, RNA-seq, degradome-seq, RT-qPCR
Nasiona stadium 4	N ST4	smallRNA-seq, RNA-seq, RT-qPCR
Nasiona stadium 5	N ST5	smallRNA-seq, RNA-seq, RT-qPCR
Nasiona stadium 6	N ST6	smallRNA-seq, RNA-seq, RT-qPCR
Nasiona stadium 7	N ST7	smallRNA-seq, RNA-seq, RT-qPCR
Nasiona stadium 8	N ST8	smallRNA-seq, RNA-seq, RT-qPCR

Tabela 6. Materiał pozyskany z upraw polowych w roku 2017 (całe strąki). Nazwa próby określa typ eskperymentu (DAB – rozwój strąków na poszczególnych okółkach – rozdział 2.1.1.), dzień zbioru, numer okółka (liczone od nasady kwiatostanu) oraz relatywną wielkość strąków. ODP – strąki odpadające.

Nazwa	Nazwa skrócona (ID próbówek)	Zadania badawcze
DAB 6d okółek 1	N22 01	RT-qPCR
DAB 6d okółek 2	N22 02	RT-qPCR
DAB 14d okółek 1	N30 01	RT-qPCR
DAB 14d okółek 2	N30 02	RT-qPCR
DAB 21d okółek 1	N07 01	RT-qPCR
DAB 21d okółek 1	N07 02	RT-qPCR
DAB 28d okółek 1 małe	N14 01M	RT-qPCR
DAB 28d okółek 1 duże	N14 01D	RT-qPCR
DAB 28d okółek 1 odp	N14 01Z	RT-qPCR
DAB 6d okółek 1	Z30 01	RT-qPCR
DAB 6d okółek 2	Z30 ok2	RT-qPCR
DAB 20d okółek 1	Z14 01	RT-qPCR
DAB 6d okółek 3	DAB 6d ok3	RT-qPCR
DAB 13d okółek 1 małe	Z07 01M	RT-qPCR
DAB 13d okółek 1 duże	Z07 01D	RT-qPCR
DAB 13d okółek 2 małe	Z07 02M	RT-qPCR
DAB 13d okółek 2 duże	Z07 02D	RT-qPCR
DAB 20d okółek 2 małe	Z14 02M	RT-qPCR
DAB 20d okółek 2 duże	Z14 02D	RT-qPCR
DAB 8d okółek 3	ZZ 30 03	RT-qPCR

Tabela 7. Materiał pozyskany z upraw polowych w roku 2018 (całe strąki). Nazwa próby określa typ eskperymentu (DAB – rozwój strąków na poszczególnych okółkach – rozdział 2.1.1.), dzień zbioru, numer okółka (liczone od nasady kwiatostanu) oraz wielkość strąków. ODP – strąki odpadające.

Nazwa	Nazwa skrócona (ID próbówek)	Zadania badawcze
DAB ok1 04.06 Duże 5d	DAB 1 04.06 D	RT-qPCR
DAB ok1 04.06 Małe 5d	DAB 1 04.06 M	RT-qPCR
DAB ok1 09.06 Duże 10d	DAB 1 09.06 D	RT-qPCR
DAB ok1 09.06 Małe 10d	DAB 1 09.06 M	RT-qPCR
DAB ok1 09.06 Śred 10d	DAB 1 09.06 Ś	RT-qPCR
DAB ok1 14.06 Duże 15d	DAB 1 14.06 D	RT-qPCR
DAB ok1 14.06 Odp 15d	DAB 1 14.06 Odp	RT-qPCR
DAB ok1 14.06 Śred 15d	DAB 1 14.06 Ś	RT-qPCR
DAB ok1 19.06 B.Duże 20d	DAB 1 19.06 B.D	RT-qPCR
DAB ok1 19.06 Duże 20d	DAB 1 19.06 D	RT-qPCR
DAB ok1 19.06 Odp 20d	DAB 1 19.06 Odp	RT-qPCR
DAB ok2 06.06 Duże 5d	DAB 2 06.06 D	RT-qPCR
DAB ok2 06.06 Małe 5d	DAB 2 06.06 M	RT-qPCR
DAB ok2 11.06 Duże 10d	DAB 2 11.06 D	RT-qPCR
DAB ok2 11.06 Małe 10d	DAB 2 11.06 M	RT-qPCR
DAB ok2 16.06 Duże 15d	DAB 2 16.06 D	RT-qPCR
DAB ok2 16.06 Odp 15d	DAB 2 16.06 Odp	RT-qPCR
DAB ok2 16.06 Śred 15d	DAB 2 16.06 Ś	RT-qPCR
DAB ok2 21.06 Duże 20d	DAB 2 21.06 D	RT-qPCR
DAB ok2 21.06 Odp 20d	DAB 2 21.06 Odp	RT-qPCR
DAB ok2 21.06 Śred 20d	DAB 2 21.06 Ś	RT-qPCR

DAB ok3 08.06 Duże 5d	DAB 3 08.06 D	RT-qPCR
DAB ok3 08.06 Małe 5d	DAB 3 08.06 M	RT-qPCR
DAB ok3 08.06 Odp 5d	DAB 3 08.06 Odp	RT-qPCR
DAB ok3 13.06 Odp 10d	DAB 3 13.06 Odp	RT-qPCR
DAB ok4 11.06 Duże 5d	DAB 4 11.06 D	RT-qPCR
DAB ok4 11.06 Małe 5d	DAB 4 11.06 M	RT-qPCR
DAB ok4 16.06 Duże 10d	DAB 4 16.06 D	RT-qPCR
DAB ok4 16.06 Odp 10d	DAB 4 16.06 Odp	RT-qPCR

Tabela 8. Materiał pozyskany z upraw polowych w roku 2020 (całe strąki, N - nasiona, S - ściany strąków, ODP – tkanki odpadające). Nazwa próby określa typ tkanki oraz stadium rozwojowe.

Nazwa	Nazwa skrócona (ID próbek)	Zadania badawcze
Nasiona strąków odpadających	STR ODP MIX N 23.06	RT-qPCR, analizy hormonów
Ściany strąków odpadających	STR ODP MIX S 23.06	RT-qPCR, analizy hormonów
Strąki odpadające	STR ODP MIX całe 23.06	RT-qPCR, analizy hormonów
Strąki ściana stadium 1	S1 19.06	RT-qPCR, analizy hormonów
Strąki ściana stadium 2	S2 19.06	RT-qPCR, analizy hormonów
Strąki ściana stadium 3	S3 19.06	RT-qPCR, analizy hormonów
Strąki ściana stadium 4	S4 19.06	RT-qPCR, analizy hormonów
Strąki ściana stadium 5	S5 19.06	RT-qPCR
Strąki ściana stadium 5	S5 23.06	RT-qPCR, analizy hormonów
Strąki ściana stadium 6	S6 23.06	RT-qPCR, analizy hormonów
Strąki ściana stadium 7	S7 23.06	RT-qPCR, analizy hormonów
Strąki ściana stadium 7	S7 29.06	RT-qPCR, analizy hormonów
Strąki ściana stadium 8	S8 29.06	RT-qPCR, analizy hormonów
Nasiona stadium 1	N1 19.06	RT-qPCR
Nasiona stadium 2	N2 19.06	RT-qPCR, analizy hormonów
Nasiona stadium 3	N3 19.06	RT-qPCR, analizy hormonów
Nasiona stadium 4	N4 19.06	RT-qPCR, analizy hormonów
Nasiona stadium 5	N5 19.06	RT-qPCR
Nasiona stadium 5	N5 23.06	RT-qPCR, analizy hormonów
Nasiona stadium 6	N6 23.06	RT-qPCR, analizy hormonów
Nasiona stadium 7	N7 23.06	RT-qPCR, analizy hormonów
Nasiona stadium 7	N7 29.06	RT-qPCR
Nasiona stadium 8	N8 29.06	RT-qPCR, analizy hormonów

Tabela 9. Materiał pozyskany z upraw polowych w roku 2020. Nazwa próby określa typ eksperymentu (DAB – rozwój strąków na poszczególnych okółkach – rozdział 2.1.1.), dzień zbioru, numer okółka (liczone od nasady kwiatostanu) rodzaj tkanki (N – nasiona, S – ściany strąków, ODP – tkanki odpadające) oraz relatywną wielkość strąków.

Nazwa	Nazwa skrócona (ID próbek)	Zadania badawcze
DAB ok1 N duże 15.06 4d	DAB 1 N duże 15.06	RT-qPCR, analizy hormonów
DAB ok1 S duże 15.06 4d	DAB 1 S duże 15.06	RT-qPCR, analizy hormonów
DAB ok1 N małe 15.06 4d	DAB 1 N małe 15.06	RT-qPCR
DAB ok1 S małe 15.06 4d	DAB 1 S małe 15.06	RT-qPCR, analizy hormonów
DAB ok2 N duże 15.06 4d	DAB 2 N duże 15.06	RT-qPCR
DAB ok2 S duże 15.06 4d	DAB 2 S duże 15.06	RT-qPCR, analizy hormonów
DAB ok2 N małe 15.06 4d	DAB 2 N małe 15.06	RT-qPCR

DAB ok2 S małe 15.06 4d	DAB 2 S małe 15.06	RT-qPCR, analizy hormonów
DAB ok3 N 15.06 4d	DAB 3 N 15.06	RT-qPCR, analizy hormonów
DAB ok3 S 15.06 4d	DAB 3 S 15.06	RT-qPCR, analizy hormonów
DAB ok1 N małe 19.06 8d	DAB 1 N małe 19.06	RT-qPCR
DAB ok1 S małe 19.06 8d	DAB 1 S małe 19.06	RT-qPCR, analizy hormonów
DAB ok1 N średnie 19.06 8d	DAB 1 N średnie 19.06	RT-qPCR
DAB ok1 S średnie 19.06 8d	DAB 1 S średnie 19.06	RT-qPCR
DAB ok1 N duże 19.06 8d	DAB 1 N duże 19.06	RT-qPCR, analizy hormonów
DAB ok1 S duże 19.06 8d	DAB 1 S duże 19.06	RT-qPCR, analizy hormonów
DAB ok2 N duże 19.06 8d	DAB 2 N duże 19.06	RT-qPCR, analizy hormonów
DAB ok2 S duże 19.06 8d	DAB 2 S duże 19.06	RT-qPCR, analizy hormonów
DAB ok2 N małe 19.06 8d	DAB 2 N małe 19.06	RT-qPCR
DAB ok2 S małe 19.06 8d	DAB 2 S małe 19.06	RT-qPCR
DAB ok3 N małe 19.06 8d	DAB 3 N małe 19.06	RT-qPCR
DAB ok3 S małe 19.06 8d	DAB3 S małe 19.06	RT-qPCR, analizy hormonów
DAB ok3 N duże 19.06 8d	DAB 3 N duże 19.06	RT-qPCR, analizy hormonów
DAB ok3 S duże 19.06 8d	DAB 3 S duże 19.06	RT-qPCR, analizy hormonów
DAB ok3 N ODP 19.06 8d	DAB 3 N ODP 19.06	RT-qPCR
DAB ok3 S ODP 19.06 8d	DAB 3 S ODP 19.06	RT-qPCR, analizy hormonów
DAB ok1 N (duże) 23.06 12d	DAB 1 N (duże) 23.06	RT-qPCR, analizy hormonów
DAB ok1 S (duże) 23.06 12d	DAB 1 S (duże) 23.06	RT-qPCR, analizy hormonów
DAB ok1 N średnie 23.06 12d	DAB 1 N średnie 23.06	RT-qPCR
DAB ok1 S średnie 23.06 12d	DAB 1 S średnie 23.06	RT-qPCR
DAB ok1 N ODP 23.06 12d	DAB 1 N ODP 23.06	RT-qPCR
DAB ok1 S ODP 23.06 12d	DAB 1 S ODP 23.06	RT-qPCR, analizy hormonów
DAB ok2 N duże 23.06 12d	DAB 2 N duże 23.06	RT-qPCR, analizy hormonów
DAB ok2 S duże 23.06 12d	DAB 2 S duże 23.06	RT-qPCR, analizy hormonów
DAB ok2 N średnie 23.06 12d	DAB 2 N średnie 23.06	RT-qPCR
DAB ok2 S średnie 23.06 12d	DAB 2 S średnie 23.06	RT-qPCR
DAB ok2 N małe 23.06 12d	DAB 2 N małe 23.06	RT-qPCR, analizy hormonów
DAB ok2 S małe 23.06 12d	DAB 2 S małe 23.06	RT-qPCR, analizy hormonów
DAB ok2 S ODP 23.06 12d	DAB 2 S ODP 23.06	RT-qPCR, analizy hormonów
DAB ok2 N ODP 23.06 12d	DAB 2 N ODP 23.06	RT-qPCR
DAB ok3 S ODP 23.06 12d	DAB 3 S ODP 23.06	RT-qPCR, analizy hormonów
DAB ok3 N ODP 23.06 12d	DAB 3 N ODP 23.06	RT-qPCR
DAB ok3 S NODP 23.06 12d	DAB 3 S NODP 23.06	RT-qPCR
DAB ok3 N NODP 23.06 12d	DAB 3 N NODP 23.06	RT-qPCR
DAB ok1 N duże 29.06 18d	DAB 1 N duże 29.06	RT-qPCR, analizy hormonów
DAB ok1 S duże 29.06 18d	DAB 1 S duże 29.06	RT-qPCR, analizy hormonów
DAB ok1 N średnie 29.06 18d	DAB 1 N średnie 29.06	RT-qPCR
DAB ok1 S średnie 29.06 18d	DAB 1 S średnie 29.06	RT-qPCR
DAB ok1 N ODP 29.06 18d	DAB 1 N ODP 29.06	RT-qPCR
DAB ok1 S ODP 29.06 18d	DAB 1 S ODP 29.06	RT-qPCR
DAB ok2 N duże 29.06 18d	DAB 2 N duże 29.06	RT-qPCR, analizy hormonów
DAB ok2 S duże 29.06 18d	DAB 2 S duże 29.06	RT-qPCR, analizy hormonów
DAB ok2 N średnie 29.06 18d	DAB 2 N średnie 29.06	RT-qPCR
DAB ok2 S średnie 29.06 18d	DAB 2 S średnie 29.06	RT-qPCR
DAB ok2 N ODP 29.06 18d	DAB 2 N ODP 29.06	RT-qPCR
DAB ok2 S ODP 29.06 18d	DAB 2 S ODP 29.06	RT-qPCR

Tabela 10. Materiał pozyskany z upraw fitotronowych w eksperymencie krótkotrwałej suszy w roku 2020. (N - nasiona, S - ściany strąków, ODP – tkanki odpadające). Nazwa próby określa typ tkanki, stadium rozwojowe (S1 – S4) oraz podział prób na kontrolne (kontrola) i próby badane (susza).

Nazwa	Nazwa skrócona (ID próbek)	Zadania badawcze
S1 kontrola N	n/d	RT-qPCR, analizy hormonów
S1 kontrola S	n/d	RT-qPCR, analizy hormonów
S2 kontrola N	n/d	RT-qPCR, analizy hormonów
S2 kontrola S	n/d	RT-qPCR, analizy hormonów
S1 susza N	n/d	RT-qPCR, analizy hormonów
S1 susza S	n/d	RT-qPCR, analizy hormonów
S2 susza N	n/d	RT-qPCR, analizy hormonów
S2 susza S	n/d	RT-qPCR, analizy hormonów
S3 kontrola N	n/d	RT-qPCR, analizy hormonów
S3 kontrola S	n/d	RT-qPCR, analizy hormonów
S4 kontrola N	n/d	RT-qPCR, analizy hormonów
S4 kontrola S	n/d	RT-qPCR, analizy hormonów
N ODP	n/d	RT-qPCR, analizy hormonów
S ODP	n/d	RT-qPCR, analizy hormonów
S3 susza N	n/d	RT-qPCR, analizy hormonów
S3 susza S	n/d	RT-qPCR, analizy hormonów
S4 susza N	n/d	RT-qPCR, analizy hormonów
S4 susza S	n/d	RT-qPCR, analizy hormonów

Tabela 11. Materiał pozyskany z upraw fitotronowych w eksperymencie długotrwałej suszy w roku 2020. (N - nasiona, S - ściany strąków). Nazwa próby określa typ tkanki, datę zbioru, stadium rozwojowe (S1 – S4) oraz próby badane (susza) i kontrolne.

Nazwa	Nazwa skrócona (ID próbek)	Zadania badawcze
S1 S susza 29.03	S1 S susza	RT-qPCR, analizy hormonów
S1 N susza 29.03	S1 N susza	RT-qPCR, analizy hormonów
S susza 05.04	S susza	RT-qPCR, analizy hormonów
N susza 05.04	N susza	RT-qPCR, analizy hormonów
S1 S kontrola 22.03	S1 S kontrola	RT-qPCR, analizy hormonów
S1 N kontrola 22.03	S1 N kontrola	RT-qPCR, analizy hormonów
S2 S kontrola 22.03	S2 S kontrola	RT-qPCR, analizy hormonów
S2 N kontrola 22.03	S2 N kontrola	RT-qPCR, analizy hormonów
S3 S kontrola 29.03	S3 S kontrola	RT-qPCR, analizy hormonów
S3 N kontrola 29.03	S3 N kontrola	RT-qPCR, analizy hormonów
S4 S kontrola 29.03	S4 S kontrola	RT-qPCR, analizy hormonów
S4 N kontrola 29.03	S4 N kontrola	RT-qPCR, analizy hormonów

Tabela 12. Materiał pozyskany z upraw fitotronowych w roku 2021 (liście, eksperyment z zastosowaniem egzogennych fitohormonów – rozdział 2.1.2.). Nazwa próby zawiera stosowany związek oraz godzinę zbioru liczoną od momentu jego aplikacji.

Nazwa i czas zbioru	Zadania badawcze	Nazwa i czas zbioru	Zadania badawcze
PCIB 1h	RT-qPCR	JAME 6h	RT-qPCR
PCIB 2h	RT-qPCR	IAA 1h	RT-qPCR
PCIB 4h	RT-qPCR	IAA 2h	RT-qPCR
PCIB 6h	RT-qPCR	IAA 4h	RT-qPCR
GA3 1h	RT-qPCR	IAA 6h	RT-qPCR

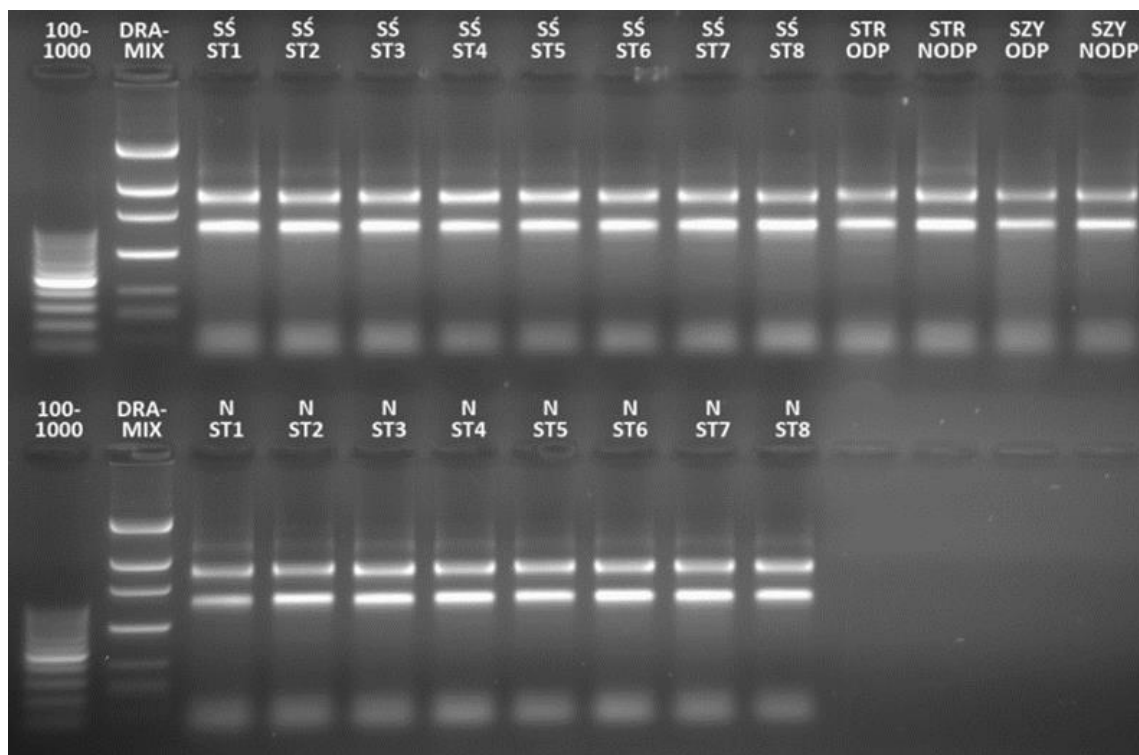
GA3 2h	RT-qPCR	SA 1h	RT-qPCR
GA3 4h	RT-qPCR	SA 2h	RT-qPCR
GA3 6h	RT-qPCR	SA 4h	RT-qPCR
ABA 1h	RT-qPCR	SA 6h	RT-qPCR
ABA 2h	RT-qPCR	H ₂ O 0h	RT-qPCR
ABA 4h	RT-qPCR	H ₂ O 1h	RT-qPCR
ABA 6h	RT-qPCR	H ₂ O 2h	RT-qPCR
JaMe 1h	RT-qPCR	H ₂ O 4h	RT-qPCR
JaMe 2h	RT-qPCR	H ₂ O 6h	RT-qPCR
JaMe 4h	RT-qPCR	-	-

3.2. Izolacja oraz walidacja RNA

Izolacje RNA zostały przeprowadzone według protokołu przedstawionego w podrozdziale 2.3. Wyizolowane RNA poddawane było analizie czystości i jakości. Do badań wybrano tylko te próbki RNA, w których stosunek 260/208 i 280/260 nm był nie mniejszy niż 1,8. Jakość sprawdzano, wykonując elektroforezę w żelu agarozowym (podrozdział 2.4.2). Ze względu na dużą ilość danych, jak również wysoką i potwierdzoną eksperymentalnie powtarzalność metody izolacji w tabelach 13-15 przedstawione zostały tylko przykładowe wyniki oraz przykładowe zdjęcia żeli agarozowych (ryciny 12-14). Pozostałe wyniki zestawiono w suplemencie 1 (Tabele S1-S3).

Tabela 13. Przykładowe wyniki pomiarów stężenia i czystości całkowitego RNA wyizolowanego z prób zebranych z upraw polowych z 2016 roku.

Nazwa	Nazwa skrócona (ID próbek)	Stężenie [ng/μl]	260/280	260/230	Data izolacji
Strąki nieodpadające	STR NODP	3446	1,85	2	19.01.2017
Strąki odpadające	STR ODP	593,2	2,1	2,15	19.01.2017
Strąki ściana stadium 1	SŚ ST1	3012,8	1,99	1,98	17.01.2017
Strąki ściana stadium 2	SŚ ST2	2196,8	2,09	2,03	17.01.2017
Strąki ściana stadium 3	SŚ ST3	1573,1	2,1	1,89	17.01.2017
Strąki ściana stadium 4	SŚ ST4	1343,2	2,11	2,21	18.01.2017
Strąki ściana stadium 5	SŚ ST5	917,1	2,12	2,23	18.01.2017
Strąki ściana stadium 6	SŚ ST6	725,2	2,11	2,13	18.01.2017
Strąki ściana stadium 7	SŚ ST7	827,5	2,14	2,16	18.01.2017
Strąki ściana stadium 8	SŚ ST8	434,1	2,05	2,01	19.01.2017
Nasiona stadium 1	N ST1	3508,7	1,8	1,97	19.01.2017
Nasiona stadium 2	N ST2	3365,7	1,87	2,09	19.01.2017
Nasiona stadium 3	N ST3	2772,8	2,02	2,08	17.01.2017
Nasiona stadium 4	N ST4	2642,5	2,04	1,96	17.01.2017
Nasiona stadium 5	N ST5	3290,5	1,92	2,06	18.01.2017
Nasiona stadium 6	N ST6	3065,5	1,98	2,17	18.01.2017
Nasiona stadium 7	N ST7	2899,3	2,02	2,11	18.01.2017
Nasiona stadium 8	N ST8	2427,6	2,08	2,14	18.01.2017

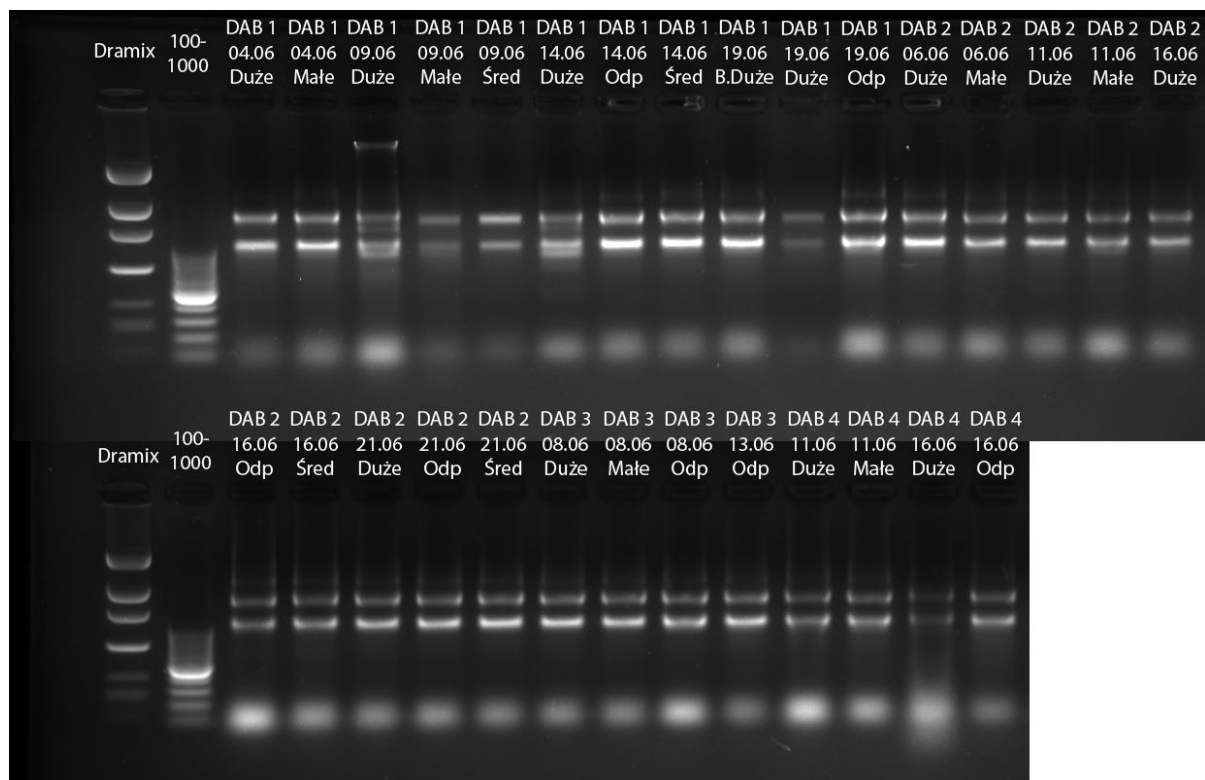


Rycina 12. Zdjęcie rozdziału elektroforetycznego wyizolowanego całkowitego RNA z prób zebranych z upraw polowych w 2016 roku. ST1 – ST8: stadia rozwojowe 1-8, SŚ – Strąki ściana, N – Nasiona, STR ODP/NODP – strąki odpadające i nieodpadające.

Tabela 14. Wyniki pomiarów stężenia i czystości całkowitego RNA wyizolowanego z prób zebranych z upraw polowych z 2018 roku.

Nazwa i data zbioru	Nazwa skrócona (ID próbek)	Stężenie [ng/μl]	260/280	260/230	Data izolacji
DAB ok1 04.06 Duże 5d	DAB 1 04.06 D	3191,7	1,97	2,06	23.07.2018
DAB ok1 04.06 Małe 5d	DAB 1 04.06 M	3426,1	1,86	1,95	23.07.2018
DAB ok1 09.06 Duże 10d	DAB 1 09.06 D	1098,4	2,12	2,25	23.07.2018
DAB ok1 09.06 Małe 10d	DAB 1 09.06 M	1821,3	2,12	2,23	23.07.2018
DAB ok1 09.06 Śred 10d	DAB 1 09.06 Ś	1338,3	2,14	2,18	23.07.2018
DAB ok1 14.06 Duże 15d	DAB 1 14.06 D	970,4	2,12	2,26	24.07.2018
DAB ok1 14.06 Odp 15d	DAB 1 14.06 Odp	1031,8	2,13	2,19	24.07.2018
DAB ok1 14.06 Śred 15d	DAB 1 14.06 Ś	1407	2,13	2,25	25.07.2018
DAB ok1 19.06 B.Duże 20d	DAB 1 19.06 B.D	1949,5	2,12	2,27	24.07.2018
DAB ok1 19.06 Duże 20d	DAB 1 19.06 D	1087,1	2,13	1,84	24.07.2018
DAB ok1 19.06 Odp 20d	DAB 1 19.06 Odp	119,2	2,08	1,69	24.07.2018
DAB ok2 06.06 Duże 5d	DAB 2 06.06 D	3406,6	1,88	2,06	23.07.2018
DAB ok2 06.06 Małe 5d	DAB 2 06.06 M	3272,3	1,94	2,15	23.07.2018
DAB ok2 11.06 Duże 10d	DAB 2 11.06 D	1670,9	2,13	2,3	24.07.2018
DAB ok2 11.06 Małe 10d	DAB 2 11.06 M	1717,7	2,13	2,33	24.07.2018
DAB ok2 16.06 Duże 15d	DAB 2 16.06 D	1237,1	2,13	2,22	24.07.2018
DAB ok2 16.06 Odp 15d	DAB 2 16.06 Odp	637,7	2,11	1,78	23.07.2018
DAB ok2 16.06 Śred 15d	DAB 2 16.06 Ś	1085	2,12	2,26	24.07.2018
DAB ok2 21.06 Duże 20d	DAB 2 21.06 D	1578,9	2,12	2,16	23.07.2018
DAB ok2 21.06 Odp 20d	DAB 2 21.06 Odp	185,5	2,07	1,42	24.07.2018
DAB ok2 21.06 Śred 20d	DAB 2 21.06 Ś	1442,6	2,13	2,26	24.07.2018
DAB ok3 08.06 Duże 5d	DAB 3 08.06 D	3258,3	1,94	2,11	23.07.2018

DAB ok3 08.06 Małe 5d	DAB 3 08.06 M	3047,9	2,01	2,17	23.07.2018
DAB ok3 08.06 Odp 5d	DAB 3 08.06 Odp	1975,3	2,13	2,13	23.07.2018
DAB ok3 13.06 Odp 10d	DAB 3 13.06 Odp	771,1	2,12	2,11	24.07.2018
DAB ok4 11.06 Duże 5d	DAB 4 11.06 D	3376,4	1,88	2,03	23.07.2018
DAB ok4 11.06 Małe 5d	DAB 4 11.06 M	2747,6	2,04	2,19	23.07.2018
DAB ok4 16.06 Duże 10d	DAB 4 16.06 D	1477	2,13	1,99	24.07.2018
DAB ok4 16.06 Odp 10d	DAB 4 16.06 Odp	1543	2,13	2,26	24.07.2018

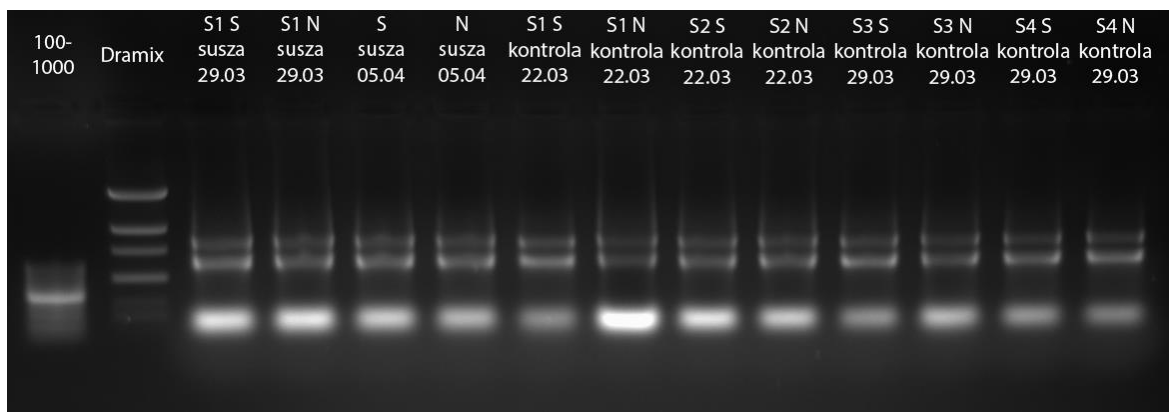


Rycina 13. Zdjęcie rozdziału elektroforetycznego wyizolowanego całkowitego RNA z prób zebranych z upraw polowych w 2018 roku.

Tabela 15. Wyniki pomiarów stężenia i czystości całkowitego RNA wyizolowanego z prób zebranych z upraw fitotronowych z 2020 roku.

Nazwa	Nazwa skrócona (ID próbek)	Stężenie [ng/μl]	260/280	260/230	Data izolacji
S1 kontrola N	n/d	3097,4	2,08	1,99	05.01.2021
S1 kontrola S	n/d	3028,4	2,09	2,28	05.01.2021
S2 kontrola N	n/d	3350,1	2,08	2,23	05.01.2021
S2 kontrola S	n/d	2172,2	2,12	2,27	05.01.2021
S1 susza N	n/d	3185,7	2,08	2,23	05.01.2021
S1 susza S	n/d	2642,6	2,1	2,06	05.01.2021
S2 susza N	n/d	3186,2	2,08	1,79	05.01.2021
S2 susza S	n/d	2642,6	2,1	2,06	05.01.2021
S3 kontrola N	n/d	2647,6	2,12	2,14	05.01.2021
S3 kontrola S	n/d	1493,2	2,11	2,19	05.01.2021
S4 kontrola N	n/d	2744,8	2,13	2,22	05.01.2021

S4 kontrola S	n/d	814,2	2,08	2,2	05.01.2021
N ODP	n/d	661,7	2,07	2,02	05.01.2021
S ODP	n/d	282,4	2,08	1,43	05.01.2021
S3 susza N	n/d	2660,9	2,11	2,25	05.01.2021
S3 susza S	n/d	1537,9	2,11	2,27	05.01.2021
S4 susza N	n/d	2360,5	2,11	2,19	05.01.2021
S4 susza S	n/d	946,2	2,11	2,17	05.01.2021



Rycina 14. Zdjęcie rozdziału elektroforetycznego wyizolowanego całkowitego RNA z prób zebranych z upraw fitotronowych w 2021 roku, eksperyment długotrwałej suszy.

3.2.1. Elektroforeza kapilarna

W przypadku prób RNA wykorzystanych do sekwencjonowania w oparciu NGS, w celu tworzenia bibliotek (Rozdział 2.5.) zastosowano dodatkowy etap weryfikacji jakości polegający na określeniu parametru RIN (RNA Integrity Number) oraz 18S/28S przy zastosowaniu elektroforezy kapilarnej (rozdział 2.4.3.). Wyniki pomiaru RIN przedstawiono w tabeli 19. Pierwszy etap sprawdzenia obejmował weryfikację wyizolowanego materiału, a drugi etap weryfikację prób przygotowanych do sekwencjonowania. Wszystkie analizy wykonano na płytках mikroprzepływowych dedykowanych dla RNA.

Tabela 16. Wyniki pomiaru współczynnika RIN dla prób całkowitego RNA po elektroforezie kapilarnej.

Nazwa	Nazwa skrócona (ID próbek)	RIN	Data elektroforezy
Strąki nieodpadające	STR NODP	10,0	01.02.2017
Strąki odpadające	STR ODP	9,7	02.02.2017
Strąki ściana stadium 1	SŚ ST1	9,5	02.02.2017
Strąki ściana stadium 2	SŚ ST2	9,5	02.02.2017
Strąki ściana stadium 3	SŚ ST3	9,6	02.02.2017
Strąki ściana stadium 4	SŚ ST4	9,8	02.02.2017

Strąki ściana stadium 5	SŚ ST5	9,8	02.02.2017
Strąki ściana stadium 6	SŚ ST6	9,7	02.02.2017
Strąki ściana stadium 7	SŚ ST7	9,6	02.02.2017
Strąki ściana stadium 8	SŚ ST8	9,4	02.02.2017
Nasiona stadium 1	N ST1	10,0	06.02.2017
Nasiona stadium 2	N ST2	9,7	06.02.2017
Nasiona stadium 3	N ST3	9,8	02.02.2017
Nasiona stadium 4	N ST4	10,0	02.02.2017
Nasiona stadium 5	N ST5	10,0	06.02.2017
Nasiona stadium 6	N ST6	9,9	06.02.2017
Nasiona stadium 7	N ST7	9,6	02.02.2017
Nasiona stadium 8	N ST8	9,5	02.02.2017

W celu przygotowania materiału potrzebnego do sekwencjonowania bibliotek RNA połączono warianty nasion oraz ścian strąków w 3 grupy obejmujące stadia rozwojowe 1-3 (grupa 1), 4-6 (grupa 2) oraz 7-8 (grupa 3). Uzyskane w ten sposób próby zostały również poddane analizie RIN osiągając wartości od 8.9 do 9.7, co stanowiło dobry wynik, gdyż były wyższe niż 7.5 dla współczynnika RIN oraz >1,5 dla 18S/28S. Wysłany do sekwencjonowania materiał spełniał również inne wymagania jakościowe jak np.: brak obecności soli, alkoholu lub fenolu (wartości parametrów 260/280 >1,8 oraz 260/230 >1,8) i ilościowe (5µg RNA o stężeniu co najmniej 200 ng/µl). Ostateczne wyniki przedstawiono w tabeli poniżej.

Tabela 17. Ostateczne parametry prób użytych do sekwencjonowania.

Pełna nazwa próby	Etykieta	Stężenie [ng/µl]	RIN	260/280	260/230	28S/18S
Strąki odpadające	PAB	593	9,7	2,1	2,15	1,87
Strąki nieodpadające	PNAB	3446	10,0	1,85	2	2,08
Nasiona stadium 1-3	PW1	2108	8,9	2,1	1,89	1,52
Nasiona stadium 4-6	PW2	933	9,5	2,11	2,13	1,7
Nasiona stadium 7-8	PW3	531	8,9	2,05	2,01	1,64
Strąki ściana stadium 1-3	PS1	3459	9,6	1,8	1,94	2,02
Strąki ściana stadium 4-6	PS2	2976	9,6	1,98	2,17	2,2
Strąki ściana stadium 4-6	PS3	2642	9,7	2,11	2,14	2,4



Rycina 15. Przykładowe elektroforogramy cyfrowe.

3.3. Sekwencjonowanie RNA

Sekwencjonowanie RNA (RNA-Seq) z podziałem na biblioteki transkryptów (transkryptomy), biblioteki małych RNA (sRNA) oraz biblioteki produktów ciecicia transkryptów (degradomy) zostało wykonane przez firmę Genomed S. A. Na potrzeby niniejszej pracy doktorskiej wykonano analizy ośmiu transkryptomów, 16 bibliotek małych RNA oraz jednego degradomu.

Biblioteki RNA strąków skonstruowano oddzielnie z nasion i ścian strąków zebranych w ośmiu punktach czasowych, które następnie połączono w trzy warianty, z których pierwszy obejmował wczesne stadia rozwojowe charakteryzujące się intensywnym wzrostem (PS1/PW1), drugi charakteryzował się okresem w którym nastąpiło wypełnienie nasion (PS2/PW2) i trzeci, w którym napelnianie się zakończyło, a strąki zaczęły dojrzewać i wysychać (PS3/PW3). Dodatkowo wykonano również

sekwencjonowanie bibliotek ze całych owoców (strąków) przejawiających cechy odpadania (PAB – ang. Pods Abcissing), oraz strąków nieodpadających w tym samym wieku (PNAB – ang. Pods Non-Abcissing). Degradom został wykonany z połączonego RNA izolowanego z nasion (N) oraz ścian strąków (Ś) w 3 stadium rozwoju (N ST3/Ś ST3).

Sekwencjonowanie na platformie HiSeq 2000 (Illumina) wygenerowało od 56 784 288 do 46 619 042 nieprzetworzonych odczytów w każdej bibliotece, co odpowiadało średnio niecałym 7 Gb nieprzetworzonych danych dla każdego analizowanego wariantu. Około 98% z tych odczytów było wysokiej jakości, a po przetworzeniu danych w programie Trimmomatic około 80% z nich zostało ostatecznie użytych do składania transkryptów. Po przeprowadzeniu sekwencjonowania i wstępnej analizie, dane dotyczące sekwencji zidentyfikowanych kodujących RNA i ncRNA zostały w pierwszej kolejności zdeponowane w postaci wstępnych danych w bazie NCBI SRA (BioProject ID PRJNA419564 oraz Submission ID SUB3230840), a następnie dane gotowe do analizy zostały umieszczone w ogólnodostępnej bazie LuluDB pod adresem <http://luluseqdb.umk.pl/basic/web/>.

3.3.1. Transkryptomy

Składanie transkryptów *de novo* z danych uzyskanych metodą RNA-Seq zostało wykonane przy użyciu oprogramowania Trinity v 2.4.0. Referencyjne zestawienie transkryptów uzyskano przez połączenie poszczególnych odczytów w sekwencje konsensusowe, po czym zgrupowano podobne kontygi w klastry przy użyciu wykresów de Bruijna (Li i in., 2012) Na ich podstawie uzyskano tzw. unigeny, czyli unikatowe transkrypty i ich izoformy (pojedyncze lub wielokrotne). Spośród 219 514 uzyskanych sekwencji referencyjnych (o średniej długości 418 pz) uzyskano 166 477 unigenów. Każdej izoformie nadano numer identyfikacyjny składający się z numeru klastra (c), liczby genów w danym klastrze (g) oraz numeru izoformy (i). Na przykład c10_g3_i1 jest pierwszą izoformą trzeciego genu w dziesiątym klastrze. Po złożeniu transkryptomu *de novo* uzyskano 219 514 sekwencji transkryptów o minimalnej długości 201 pz, w tym 166 473 różnych unigenów. Ostateczne wyniki zostały zindeksowane z zastosowaniem skryptów w środowisku R. Statystyki tego procesu zestawiono w tabeli 18.

Tabela 18. Statystyki składania transkryptomu z nasion oraz strąków.

Łączna liczba unikatowych transkryptów z Trinity	105 112
Łączna liczba transkryptów z Trinity	258 516
Procent par GC	38,16
Statystyki z wszystkich kontigów w transkrypcji	
Kontig N10	4 445
Kontig N20	3 567
Kontig N30	3 019
Kontig N40	2 587
Kontig N50	2 211
Mediana długości kontigu	903
Średnia długość kontigu	1322,48
Łączna liczba złożonych par zasad	341 882 042
Statystyki bazujące tylko na najdłuższych izoformach unikatowych transkryptów	
Kontig N10	4 222
Kontig N20	3 315
Kontig N30	2 731
Kontig N40	2 231
Kontig N50	1 746
Mediana długości kontigu	407
Średnia długość kontigu	856
Łączna liczba złożonych par zasad	89 975 650

3.3.2 Biblioteki sRNA

Sekwencjonowanie oraz analizy bioinformatyczne bibliotek sRNA przeprowadzono zgodnie z opisem zawartym w rozdziale materiały i metody, podrozdział 2.5. Mikro RNA (miRNA) zostały zidentyfikowane na podstawie podobieństwa z rekordami z baz danych miRBase (<https://www.mirbase.org>), RFAM (<https://rfam.xfam.org>) oraz przy użyciu programowania ShortStack. Tabele nr 19 i 20 przedstawiają statystyki tych analiz.

Tabela 19. Statystyki ilości odczytów i anotacji danych z bibliotek sRNA ze strąków odpadających (PAB-1/2), nieodpadających (PNAB-1/2) oraz ścian strąków (PW1-3 powtórzenia 1/2) i nasion (PS1-3 powtórzenia 1/2) w stadiach rozwojowych 1-8 podzielonych na 3 grupy, zgodnie z opisem z rozdziału 3.2.1. Unikatowe – unikatowe odczyty, Powtarzalne – Powtórzone odczyty, miRBase – ilość odczytów pokrywająca się z danymi z bazy miRBase, Hairpin – ilość odczytów sekwencji tworzących struktury „szpilki do włosów”, Rfam – ilość odczytów pokrywających się z danymi z bazy Rfam.

Nazwa biblioteki	PAB-1	PAB-2	PNAB-1	PNAB-2	PS1-1	PS1-2	PW1-1	PW1-2
Wszystkie odczyty								
Unikatowe	7056515	6884936	6822635	7234771	7055114	7375928	6964602	7296949
Powtarzalne	14951454	13923379	14734755	15462753	15366182	15533866	15194864	15438372

Adnotacja								
Unikatowe odczyty								
miRBase	567	280	502	288	380	195	471	255
Hairpin	1828	1415	1594	1634	1576	1264	1845	1459
Rfam	38200	35973	28881	31122	23439	25696	28342	28786
Niezidentyfikowane	7015920	6847268	6791658	7201727	7029719	7348773	6933944	7266449

Wszystkie odczyty								
miRBase	180530	236069	115463	366425	207414	178181	341983	353527
Hairpin	169922	132752	89453	166004	126878	94051	270784	216141
Rfam	521324	444263	449653	347575	254892	258701	318922	300902
Niezidentyfikowane	14079678	13110295	14080186	14582749	14776998	15002933	14263175	14567802

Nazwa biblioteki	PS2-1	PS2-2	PW2-1	PW2-2	PS3-1	PS3-2	PW3-1	PW3-2
Wszystkie odczyty								
Unikatowe	7593009	7986262	6499361	6911400	7164352	7588082	4250425	4564868
Powtarzalne	15013583	15595096	15069593	15357548	15363936	15377692	15275221	15196078

Adnotacja								
Unikatowe odczyty								
miRBase	359	200	514	272	384	288	522	284
Hairpin	1442	1182	1967	1673	1571	1490	1988	1648
Rfam	16503	22693	29374	31994	19298	18431	21725	26493
Niezidentyfikowane	7574705	7962187	6467506	6877461	7143099	7567873	4226190	4536443

Wszystkie odczyty								
miRBase	204879	221137	500031	509447	236553	256683	462424	460804
Hairpin	115894	110191	380927	373377	142566	154260	359329	329870
Rfam	103395	134528	324511	314545	171122	151797	173144	201900
Niezidentyfikowane	14589415	15129240	13864124	14160179	14813695	14814952	14280324	14203504

Tabela 20. Ilość miRNA zidentyfikowanych w poszczególnych bibliotekach, na podstawie danych z obydwu powtórzeń.

Nazwa próbki	Opis	Nazwa skrócona	Ilość miRNA
Pod walls stage 1	Ściany strąków we wczesnym stadium rozwoju	PW1	258
Pod walls stage 2	ściany strąków w środkowym stadium rozwoju	PW2	291
Pod walls stage 3	ściany strąków w późnym stadium rozwoju	PW3	301

Pod seeds stage 1	Nasiona we wczesnym stadium rozwoju	PS1	220
Pod seeds stage 2	Nasiona w środkowym stadium rozwoju	PS2	224
Pod seeds stage 3	Nasiona w późnym stadium rozwoju	PS3	251
Pods non-abscised	Strąki nieodpadające	PNAB	257
Pods abscised	Strąki odpadające	PAB	268

3.3.3. Degradom

Aby dokładnie oszacować funkcję biologiczną miRNA, ich geny docelowe powinny zostać zidentyfikowane. Aby to osiągnąć, skonstruowano biblioteki przeciętych (wolny koniec 5') transkryptów z połączonych próbek nasion oraz strąków w stadium 3 wzrostu (rozdział 3.3.). Sekwencjonując biblioteki degradomu uzyskano 21 839 956 odczytów (Tabela 25). Po filtrowaniu jakościowym dane dotyczące degradomu zostały dopasowane do transkryptomu referencyjnego oraz sekwencji zidentyfikowanych miRNA za pomoc programu CleaveLand4 (Addo-Quaye i in., 2009).

Tabela 21. Statystyki sekwencjonowania degradomu.

Nazwa	Długość	łączna ilość odczytów	łączna ilość par zasad	Q20(%)	Q30(%)
PW3-PS3	47	21 839 956	2 052 955 864	99,06	97,08

3.4. Analizy różnicowych miRNA

Biblioteki sRNA zostały przeszukane pod kątem różnicowej ekspresji miRNA. Porównania zostały wykonane w parach dla strąków odpadających oraz nieodpadających, różnych stadiów rozwojowych nasion i owocni, jak również par nasiona-owocnie w obrębie tego samego stadium rozwojowego. Za próg graniczny przyjęto różnicę wartości \log_2FC w obrębie dwóch porównań >2 lub <-2 . Dla wszystkich porównań wartości pvalue oraz padj wynosiły <0.05 .

Sekwencje miRNA zidentyfikowane wyłącznie dla łubinu żółtego (sekwencje 457-488 z bazy LuluDB) oznaczono literą „n” w swojej nazwie, np.: Ll-miRn488. Wartości ujemne i dodatnie parametru \log_2FC oznaczają odpowiednio podwyższoną ekspresję w jednej lub drugiej bibliotece. Przykładowo, w porównaniach PAB vs PNAB wartość ujemna oznacza, że dana sekwencja występuje częściej w bibliotece PNAB, zaś wartość dodatnia oznacza, że dana sekwencja występuje częściej w bibliotece PAB. (Tabele 22-29).

Tabela 22. Zestawienie miRNA podlegających różnicowej ekspresji pomiędzy strąkami odpadającymi i nieodpadającymi (PAB vs PNAB) wraz z opisami zidentyfikowanych genów docelowych za pomocą analizy degradomów lub analiz wykonanych przez program psRNATarget. ND – sekwencja docelowa niezidentyfikowana, NA – sekwencja docelowa nie anotowana.

LuluDB ID	anotacja w miRBase	log ₂ FC	pvalue	Opis sekwencji docelowej z degradomu/psRNATarget
Ll-miR174	mtr-miR166e-5p	-6,385	4,16E-21	F-box/kelch-repeat protein
Ll-miR179	aly-miR166g-5p	-4,149	1,12E-07	Probably inactive leucine-rich repeat receptor-like protein
Ll-miRn488	ND	-3,978	1,30E-07	ND
Ll-miR102	bra-miR390-3p	-3,529	1,80E-08	TAS3
Ll-miR170	ata-miR166c-5p	-3,521	1,34E-04	ND
Ll-miRn487	ND	-3,485	9,36E-05	ND
Ll-miRn483	ND	-3,446	1,16E-08	ND
Ll-miR94	gma-miR171k-5p	-3,317	1,56E-07	Clathrin interactor EPSIN 2
Ll-miR177	aly-miR166a-5p	-3,269	6,85E-07	Granule-bound starch synthase 1
Ll-miRn459	ND	-3,150	1,11E-04	Elicitor-responsive protein
Ll-miR155	gma-miR396b-3p	-2,772	7,03E-09	Lysine-specific demethylase JMJ25
Ll-miR99	gma-miR390a-3p	-2,552	6,98E-03	TAS3
Ll-miR200	aly-miR396a-3p	-2,480	7,63E-05	growth-regulating factor 9
Ll-miR198	osa-miR396a-3p	-2,459	2,15E-03	NA
Ll-miR178	ata-miR166d-5p	-2,203	4,19E-03	Probably inactive leucine-rich repeat receptor-like protein
Ll-miR9	aly-miR390a-5p	-2,194	1,78E-05	TAS3
Ll-miR199	ata-miR396e-3p	-2,116	3,82E-03	NA
Ll-miR119	sly-miR395a	-2,105	5,33E-08	ATP sulfurylase 1
Ll-miR5	gma-miR396d	-2,054	4,48E-03	NA
Ll-miR277	aly-miR167a-5p	2,090	3,65E-03	Auxin response factor 8
Ll-miR366	aqc-miR398b	2,145	1,05E-04	Plastocyanin
Ll-miR348	aly-miR164c-5p	2,244	1,16E-02	NAC domain-containing protein 100
Ll-miR193	gma-miR6300	2,376	4,81E-03	none
Ll-miR282	ata-miR167f-5p	3,587	2,20E-05	Auxin response factor 6
Ll-miR283	aly-miR167d-5p	4,289	5,20E-07	Auxin response factor 6
Ll-miR280	atr-miR167	4,643	1,58E-14	Auxin response factor 6
Ll-miR281	ata-miR167b-5p	4,965	1,22E-19	Auxin response factor 6

Tabela 23. Zestawienie miRNA podlegających różnicowej ekspresji pomiędzy ścianami strąków w stadium wczesnego i środkowego rozwoju (PW2 vs PW1) wraz z opisami zidentyfikowanych genów docelowych za pomocą analizy degradomów lub analiz wykonanych przez program psRNATarget. ND – sekwencja docelowa niezidentyfikowana.

LuluDB ID	anotacja w miRBase	log ₂ FC	pvalue	Opis sekwencji docelowej z degradomu/psRNATarget
Ll-miRn468	ND	4,954	1,15E-43	ND
Ll-miRn466	ND	3,732	4,82E-75	CBL-interacting serine/threonine-protein kinase 6
Ll-miR283	aly-miR167d-5p	2,373	1,11E-05	ND
Ll-miR53	gma-miR393c-3p	2,094	7,54E-11	L-ascorbate peroxidase S
Ll-miR285	mdm-miR167h	-2,377	1,91E-14	Auxin response factor 6
Ll-miR284	ahy-miR167-5p	-2,613	5,74E-12	Auxin response factor 6
Ll-miRn483	ND	-3,648	1,69E-29	ND

Tabela 24. Zestawienie miRNA podlegających różnicowej ekspresji pomiędzy ścianami strąków w stadium środkowego i późnego rozwoju (PW3 vs PW2) wraz z opisami zidentyfikowanych genów docelowych za pomocą analizy degradomów lub analiz wykonanych przez program psRNATarget. ND – sekwencja docelowa niezidentyfikowana, NA – sekwencja docelowa nie anotowana.

LuluDB ID	anotacja w miRBase	log2FC	pvalue	Opis sekwencji docelowej z degradomu/psRNATarget
Ll-miR318	cca-miR408	3,628	2,11E-19	Basic blue protein
Ll-miR66	bdi-miR397b-5p	3,318	1,62E-13	Laccase
Ll-miRn466	ND	3,314	0,00E+00	CBL-interacting serine/threonine-protein kinase 6
Ll-miR481	ND	3,100	2,75E-12	ND
Ll-miR438	stu-miR398b-3p	2,882	3,69E-42	Probable nucleoredoxin 1
Ll-miR364	aly-miR398a-3p	2,653	1,38E-10	Superoxide dismutase [Cu-Zn]
Ll-miR399	ahy-miR156c	2,383	1,31E-09	Squamosa promoter-binding-like protein
Ll-miR53	gma-miR393c-3p	2,310	7,07E-55	L-ascorbate peroxidase S
Ll-miR5	gma-miR396d	-2,056	3,25E-06	NA
Ll-miR428	gma-miR319f	-2,166	1,89E-06	Transcription factor TCP2, 3 and 4

Tabela 25. Zestawienie miRNA podlegających różnicowej ekspresji pomiędzy nasionami w stadium wczesnego i środkowego rozwoju (PS2 vs PS1) wraz z opisami zidentyfikowanych genów docelowych za pomocą analizy degradomów lub analiz wykonanych przez program psRNATarget. ND – sekwencja docelowa niezidentyfikowana.

LuluDB ID	anotacja w miRBase	log2FC	pvalue	Opis sekwencji docelowej z degradomu/psRNATarget
Ll-miR403	ahy-miR156b-5p	2,776	3,26E-11	Squamosa promoter-binding-like protein
Ll-miR168	stu-miR156d-3p	2,426	1,77E-04	Cysteine desulfurase
Ll-miR402	hbr-miR156	2,312	4,14E-06	Squamosa promoter-binding-like protein 16
Ll-miRn481	ND	2,309	5,02E-05	ND
Ll-miR425	cme-miR319c	2,153	1,90E-09	Transcription factor TCP2
Ll-miR115	ppe-miR858	2,142	5,64E-05	Transcription repressor MYB5
Ll-miR445	atr-miR319b	2,130	1,12E-32	Transcription factor MYB65 and TCP4
Ll-miR167	aly-miR157d-3p	2,048	1,28E-03	Membrin-11
Ll-miR438	stu-miR398b-3p	-2,082	1,16E-12	Probable nucleoredoxin 1
Ll-miRn461	ND	-2,361	1,63E-10	ND

Tabela 26. Zestawienie miRNA podlegających różnicowej ekspresji pomiędzy nasionami w stadium środkowego i późnego rozwoju (PS3 vs PS2) wraz z opisami zidentyfikowanych genów docelowych za pomocą analizy degradomów lub analiz wykonanych przez program psRNATarget. NA – sekwencja docelowa nie anotowana.

LuluDB ID	anotacja w miRBase	log2FC	pvalue	Opis sekwencji docelowej z degradomu/psRNATarget
Ll-miR73	sly-miR164b-3p	3,046	1,77E-13	UDP-glucuronic acid decarboxylase 4
Ll-miR399	ahy-miR156c	2,692	3,28E-08	Squamosa promoter-binding-like protein
Ll-miR281	ata-miR167b-5p	2,282	6,47E-17	NA

Tabela 27. Zestawienie miRNA podlegających różnicowej ekspresji pomiędzy ścianami strąków i nasionami we wczesnym etapie rozwoju (PS1 vs PW1) wraz z opisami zidentyfikowanych genów docelowych za pomocą analizy degradomów lub analiz wykonanych przez program psRNATarget. NA – sekwencja docelowa nie anotowana. ND – sekwencja docelowa niezidentyfikowana.

LuluDB ID	anotacja w miRBase	log ₂ FC	pvalue	Opis sekwencji docelowej z degradomu/psRNATarget
Ll-miR285	mdm-miR167h	5,949	1,14E-145	Auxin response factor 6
Ll-miR284	ahy-miR167-5p	5,417	1,22E-78	Auxin response factor 6
Ll-miR445	atr-miR319b	5,025	1,38E-132	Transcription factor MYB65 and TCP4
Ll-miR276/miR167	bna-miR167d	4,718	1,82E-27	Auxin response factor 6
Ll-miR279	lus-miR167a	4,465	6,74E-10	Auxin response factor 6
Ll-miR438	stu-miR398b-3p	4,418	2,82E-25	Probable nucleoredoxin 1
Ll-miRn483	ND	4,095	1,17E-26	ND
Ll-miR364	aly-miR398a-3p	4,032	4,15E-11	Superoxide dismutase [Cu-Zn]
Ll-miR102	bra-miR390-3p	3,485	4,61E-32	TAS3
Ll-miRn487	ND	3,066	3,99E-04	ND
Ll-miR39	ahy-miR167-3p	3,056	1,67E-08	ND
Ll-miRn486	ND	3,046	2,59E-32	Endoribonuclease Dicer homolog 2 and Nucleolar protein
Ll-miR366	aqc-miR398b	2,836	8,85E-28	Plastocyanin
Ll-miR456	gma-miR319p	2,557	1,89E-13	Transcription factor GAMYB
Ll-miR277	aly-miR167a-5p	2,522	4,24E-07	Auxin response factor 8
Ll-miRn470	ND	2,058	1,36E-03	ND
Ll-miR421	pta-miR319	-2,124	5,84E-03	Transcription factor TCP2, 3 and 4
Ll-miRn459	ND	-2,240	3,48E-03	Elicitor-responsive protein
Ll-miR341	gma-miR319q	-2,289	1,02E-06	Transcription factor TCP2
Ll-miR9	aly-miR390a-5p	-2,455	1,58E-06	TAS3
Ll-miRn460	ND	-2,465	8,46E-03	NA
Ll-miR425	cme-miR319c	-2,551	2,42E-13	Transcription factor TCP2
Ll-miR427	gma-miR319g	-2,584	4,10E-102	NA
Ll-miR43	gma-miR390e	-2,739	7,53E-05	TAS3
Ll-miR423	mtr-miR319c-3p	-2,749	3,87E-04	Transcription factor GAMYB and TCP4
Ll-miRn458	ND	-3,317	2,75E-06	Transcription factor MYB113
Ll-miR424	aaU-miR319	-4,001	6,61E-11	Transcription factor GAMYB and TCP4
Ll-miR428	gma-miR319f	-4,476	8,77E-11	Transcription factor TCP2, 3 and 4
Ll-miR130	ppt-miR319c	-4,552	6,98E-15	Transcription factor GAMYB and TCP4
Ll-miR422	atr-miR319a	-4,642	4,16E-30	Transcription factor GAMYB and TCP5

Tabela 28. Zestawienie miRNA podlegających różnicowej ekspresji pomiędzy ścianami strąków i nasionami w środkowym etapie rozwoju (PS2 vs PW2) wraz z opisami zidentyfikowanych genów docelowych za pomocą analizy degradomów lub analiz wykonanych przez program psRNATarget. NA – sekwencja docelowa nie anotowana. ND – sekwencja docelowa niezidentyfikowana.

LuluDB ID	anotacja w miRBase	log ₂ FC	pvalue	Opis sekwencji docelowej z degradomu/psRNATarget
Ll-miR285	mdm-miR167h	8,516	7,68E-267	Auxin response factor 6
Ll-miR284	ahy-miR167-5p	8,094	8,56E-128	Auxin response factor 6
Ll-miR279	lus-miR167a	7,111	1,22E-44	Auxin response factor 6
Ll-miR445	atr-miR319b	6,799	2,08E-267	Transcription factor MYB65 and TCP4
Ll-miRn483	ND	5,980	2,13E-32	ND
Ll-miR39	ahy-miR167-3p	5,195	1,71E-23	ND
Ll-miR456	gma-miR319p	4,967	1,07E-37	Transcription factor GAMYB
Ll-miR73	sly-miR164b-3p	3,583	8,19E-05	UDP-glucuronic acid decarboxylase 4
Ll-miR102	bra-miR390-3p	3,356	1,89E-63	TAS3
Ll-miR412	gma-miR171n	3,107	8,13E-04	Scarecrow-like protein 6

Ll-miRn486	ND	2,908	1,03E-46	Endoribonuclease Dicer homolog 2 and Nucleolar protein
Ll-miR277	aly-miR167a-5p	2,689	4,38E-05	Auxin response factor 8
Ll-miR409	gma-miR171m	2,619	2,06E-08	Scarecrow-like protein 6
Ll-miR276/miR167	bna-miR167d	2,561	2,88E-09	Auxin response factor 6
Ll-miR403	ahy-miR156b-5p	2,317	7,98E-07	Squamosa promoter-binding-like protein
Ll-miR168	stu-miR156d-3p	2,089	1,17E-02	Cysteine desulfurase
Ll-miRn470	ND	2,037	4,32E-05	ND
Ll-miR451	ahy-miR159	-2,006	2,17E-39	Transcription factor GAMYB
Ll-miR427	gma-miR319g	-2,111	2,99E-28	NA
Ll-miR53	gma-miR393c-3p	-2,123	8,18E-09	L-ascorbate peroxidase S
Ll-miR446/miR159	aqc-miR159	-2,149	2,61E-21	Transcription factor GAMYB
Ll-miR196	zma-miR396g-3p	-2,177	2,16E-02	Growth-regulating factor 5
Ll-miR452	lus-miR159b	-2,257	1,90E-19	Transcription factor GAMYB
Ll-miR454	aly-miR159b-3p	-2,260	7,91E-69	Transcription factor GAMYB
Ll-miR341	gma-miR319q	-2,354	8,86E-27	Transcription factor TCP2
Ll-miR224	aly-miR393a-5p	-2,368	7,12E-03	Protein TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE 1
Ll-miRn458	ND	-2,385	2,35E-03	Transcription factor MYB113
Ll-miR431	pta-miR159a	-2,477	3,47E-03	Transcription factor GAMYB
Ll-miR422	atr-miR319a	-2,660	3,17E-24	Transcription factor GAMYB and TCP4
Ll-miR30	aly-miR172a-3p	-2,743	1,46E-03	Floral homeotic protein APETALA 2
Ll-miR44	mtr-miR4414a-5p	-2,751	3,05E-03	ND
Ll-miR283	aly-miR167d-5p	-2,846	9,33E-05	NA
Ll-miR100	aly-miR390a-3p	-2,871	2,82E-09	TAS3
Ll-miRn466	ND	-2,922	7,34E-50	CBL-interacting serine/threonine-protein kinase 6
Ll-miR130	ppt-miR319c	-3,192	2,63E-13	Transcription factor GAMYB and TCP4
Ll-miRn460	ND	-3,292	2,81E-04	NA
Ll-miR43	gma-miR390e	-3,354	1,36E-05	TAS3
Ll-miR99	gma-miR390a-3p	-3,748	2,14E-06	TAS3
Ll-miRn459	ND	-3,856	1,78E-10	Elicitor-responsive protein
Ll-miR428	gma-miR319f	-4,092	1,82E-06	Transcription factor TCP2, 3 and 4
Ll-miRn478	ND	-7,354	3,41E-25	ND

Tabela 29. Zestawienie miRNA podlegających różnicowej ekspresji pomiędzy ścianami strąków i nasionami w późnym etapie rozwoju (PS3 vs PW1) wraz z opisami zidentyfikowanych genów docelowych za pomocą analizy degradomów lub analiz wykonanych przez program psRNA Target. NA – sekwencja docelowa nie anotowana. ND – sekwencja docelowa niezidentyfikowana.

LuluDB ID	anotacja w miRBase	log ₂ FC	pvalue	Opis sekwencji docelowej z degradomu/psRNA Target
Ll-miR73	sly-miR164b-3p	7,597	9,79E-21	UDP-glucuronic acid decarboxylase 4
Ll-miR284	ahy-miR167-5p	7,331	4,51E-185	Auxin response factor 6
Ll-miR285	mdm-miR167h	7,227	1,49E-94	Auxin response factor 6
Ll-miRn483	ND	6,511	4,25E-49	ND
Ll-miR279	lus-miR167a	5,954	1,47E-39	Auxin response factor 6
Ll-miR445	atr-miR319b	5,139	2,03E-27	Transcription factor MYB65 and TCP4
Ll-miR39	ahy-miR167-3p	4,992	6,30E-138	ND
Ll-miR456	gma-miR319p	3,775	1,06E-48	Transcription factor GAMYB
Ll-miR305	aly-miR157d-5p	3,390	1,19E-03	Squamosa promoter-binding-like protein
Ll-miR281	ata-miR167b-5p	3,104	4,54E-66	NA
Ll-miR403	ahy-miR156b-5p	3,090	1,88E-31	Squamosa promoter-binding-like protein
Ll-miR271	gma-miR166u	2,992	1,24E-03	NA
Ll-miR303	hci-miR156a	2,940	6,06E-03	Squamosa promoter-binding-like protein
Ll-miR168	stu-miR156d-3p	2,690	1,51E-06	Cysteine desulfurase

Ll-miR412	gma-miR171n	2,672	1,36E-02	Scarecrow-like protein 6
Ll-miR306	vvi-miR156e	2,626	8,75E-04	NA
Ll-miR91	aly-miR156g-5p	2,559	5,71E-03	Squamosa promoter-binding-like protein
Ll-miR251	ata-miR5168-3p	2,531	2,00E-02	Homeobox-leucine zipper protein REVOLUTA
Ll-miR301	gma-miR156q	2,474	3,48E-13	Squamosa promoter-binding-like protein
Ll-miR272	atr-miR166b	2,443	2,33E-10	NA
Ll-miR402	hbr-miR156	2,388	6,60E-09	Squamosa promoter-binding-like protein 16
Ll-miR299	aly-miR156a-5p	2,257	3,62E-89	Squamosa promoter-binding-like protein
Ll-miR300	bna-miR156a	2,236	1,37E-04	Squamosa promoter-binding-like protein
Ll-miR277	aly-miR167a-5p	2,176	2,09E-05	Auxin response factor 8
Ll-miRn479	ND	2,033	1,34E-04	Dicer-like protein 4
Ll-miR60	ahy-miR408-3p	-2,075	2,71E-19	Basic blue protein
Ll-miR379	ppe-miR396a	-2,095	1,01E-05	Growth-regulating factor
Ll-miR128	ahy-miR408-5p	-2,268	2,14E-02	NA
Ll-miR99	gma-miR390a-3p	-2,321	4,74E-03	TAS3
Ll-miR265	ata-miR166c-3p	-2,440	1,18E-20	Homeobox-leucine zipper protein ATHB
Ll-miR223	bdi-miR393a	-2,507	1,99E-02	Protein TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE
Ll-miR43	gma-miR390e	-2,548	1,09E-03	TAS3
Ll-miR227	gma-miR396h	-2,664	5,51E-03	Magnesium-protoporphyrin IX monomethyl ester cyclase
Ll-miRn462	ND	-2,740	3,30E-13	ND
Ll-miR108	ppe-miR398b	-3,069	1,02E-19	Plastocyanin
Ll-miR9	aly-miR390a-5p	-3,166	9,18E-34	TAS3
Ll-miR30	aly-miR172a-3p	-3,470	7,15E-04	Floral homeotic protein APETALA 2
Ll-miR283	aly-miR167d-5p	-3,612	1,42E-32	NA
Ll-miR130	ppt-miR319c	-3,659	4,84E-15	Transcription factor GAMYB and TCP4
Ll-miR53	gma-miR393c-3p	-3,688	4,23E-59	L-ascorbate peroxidase S
Ll-miR393	gma-miR396g	-3,803	1,50E-04	NA
Ll-miRn460	ND	-3,918	8,24E-05	NA
Ll-miR366	aqc-miR398b	-3,994	2,31E-20	Plastocyanin
Ll-miR224	aly-miR393a-5p	-4,211	2,41E-06	Protein TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE
Ll-miR100	aly-miR390a-3p	-4,282	1,85E-21	TAS3
Ll-miRn459	ND	-4,285	1,49E-31	Elicitor-responsive protein
Ll-miR44	mtr-miR4414a-5p	-4,354	7,01E-06	ND
Ll-miR318	cca-miR408	-4,709	1,77E-15	Basic blue protein
Ll-miRn466	ND	-5,406	2,28E-231	CBL-interacting serine/threonine-protein kinase
Ll-miR66	bdi-miR397b-5p	-5,703	1,43E-10	Laccase
Ll-miRn468	ND	-6,569	1,82E-65	ND

3.5. Analizy wybranych par miRNA- gen docelowy

Spośród wszystkich różnicowych miRNA wybrano pięć par sekwencji miRNA i ich genów docelowych charakteryzujących się potencjalnie istotnym wpływem na wzrost oraz rozwój strąków łubinu żółtego, jak również prawdopodobną rolę w regulacji homeostazy hormonalnej i odpowiedzi roślin na stres. Są to: (i) Ll-miR380/miR396 i *LIGRF9*, (ii) Ll-miR276/miR167/miR167 i *LIARF6*, (iii) Ll-miR329/miR160/miR160 i *LIARF17*, (iv) Ll-miR169 i *LINF-YA5*, (v) Ll-miR446/miR159/miR159 i *LIGAMYB*. Wybór został dokonany na podstawie danych literaturowych (Hewezi i in., 2012; Kinoshita i in., 2012;

Ulmasov i in., 1997; Warpeha i in., 2007; Alonso-Peral i in., 2010) oraz stopnia zróżnicowania ekspresji pomiędzy poszczególnymi porównaniami. Każdy z miRNA został sprawdzony pod kątem występowaniem potwierdzonej analizami degradomu ciętej, określonej sekwencji docelowej. Zidentyfikowane docelowe transkrypty zostały następnie poddane szczegółowym analizom, których wyniki znajdują się w następujących podrozdziałach.

Należy nadmienić tutaj, iż nazwy typu “Ll-miR276/miR167/miR167” oznaczają sekwencję miR276 pochodzącą z analiz przeprowadzonych na łubinie żółtym (*Lupinus luteus*), a miR167 korespondujący z nim miRNA z miRBase. Podobne przykłady znaleźć można w tabelach 25-32. Podobnie identyfikator sekwencji (np.: ID276) odnosi się do Ll-miR276/miR167. Analogiczne nazewnictwo ma zastosowanie we wszystkich dalszych podrozdziałach.

Sekwencje nukleotydowe miRNA, jego prekursora i genu docelowego do poniższych analiz zostały pobrane z bazy danych LuluDB. Do porównań z sekwencją docelową, sekwencja miRNA została odwrócona, porównanie zostało wykonane przy użyciu oprogramowania VECTOR NTI. Przy użyciu tego oprogramowania dokonano również tłumaczenia sekwencji genu docelowego na sekwencję białkową, w której następnie przy użyciu blastp wyszukane zostały konserwowane domeny białkowe oraz określono stopień ich podobieństwa do innych sekwencji aminokwasowych z roślin takich jak *Lupinus angustifolius*, *Lupinus albus*, *Cicer arietinum* i *Glycine max*. Dane zaczerpnięte z blastp posłużyły również do identyfikacji konserwowanych domen białkowych. Otwarte ramki odczytu (ORF, ang. Open Reading Frame) znalezione zostały również przy użyciu programu Vector NTI a miejsce cięcia genu docelowego przez miRNA zidentyfikowano za pomocą clustalOmega oraz analizy degradomu. Ponadto, graficzne reprezentacje wszystkich sekwencji zostały skrócone do niezbędnego minimum, zaś pełne sekwencje znajdują się w suplemencie niniejszej pracy (suplement 2).

3.5.1. Analiza Ll-miR380/miR396 i jego genu docelowego *LIGRF9*

Growth-regulating Factor 9 (GRF9) jest czynnikiem transkrypcyjnym pełniącym głównie funkcję aktywatora transkrypcji, i odgrywa istotną rolę w regulacji rozwoju liści oraz liścieni, pomimo iż występuje we wszystkich tkankach, w szczególności w młodych i intensywnie rozwijających się częściach roślin. Istnieją również doniesienia

o tym, iż czynniki transkrypcyjne z rodziny GRF wykazują wrażliwość na zmiany poziomu giberelin (Omidbakhshfard i in., 2015).

a) Sekwencja miRNA (5'→3')

TTCCACAGCTTTCTTGAACT

b) Sekwencja prekursora miRNA (5'→3')

TRINITY_DN47273_c3_g2_i3 wraz z zaznaczoną (niebieski) sekwencją dojrzałego miRNA:

```

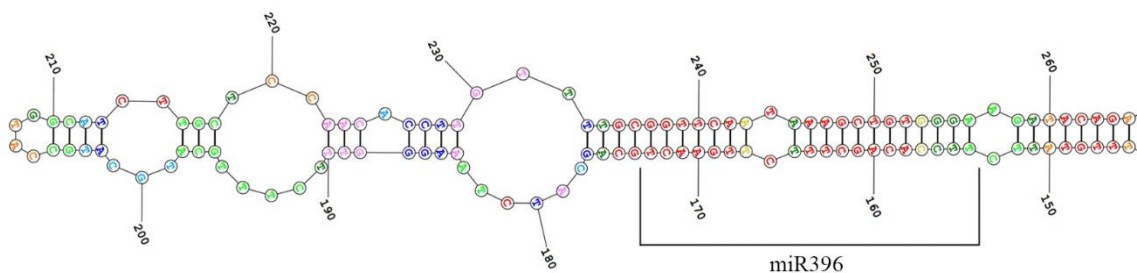
1 CTTTCTTAGC CTCTCCTATT CTACACATCT TTCTCTTAGT TCTTGATTAG
51 GGTTCTGATT TTTTCAGAAG TTTCATGACC TTATTCTTAT TATTAGATGG
101 TTCTGTCGTG GGGCATCTTC AGTTTTCTAT ACATCATGGC CCTCTTTGTA
151 TTCTTCCACA GCTTTCTTGA ACTGCAGCAT CTAAAGGGTT TCTTTGCATG
201 CATGCCATGG CATCTTGCTC CAACACCTTG TTTTGCGGTT CAATAAAGCT
  
```

c) Dopasowanie sekwencji prekursora oraz dojrzałego miRNA

```

Prekursor  AGTTTTCTATACATCATGGCCCTCTTTGTATTCTTCCACAGCTTTCTTGAACTGCAGCAT
miR        -----TTCCACAGCTTTCTTGAACT-----
                *****
  
```

d) Struktura spinki do włosów w sekwencji prekursora



Rycina 16. Charakterystyczna struktura spinki do włosów (ang. hairpin) prekursora LI-miR380/miR396 wraz z zaznaczoną lokalizacją sekwencji dojrzałego miRNA.

e) Sekwencja genu docelowego Growth-regulating factor 9 (5'→3')

TRINITY_DN48353_c0_g4_i6 wraz z zaznaczonym początkiem ORF (kolor zielony) oraz miejscem cięcia transkryptu przez miRNA (kolor czerwony). Powyżej sekwencji nukleotydowej znajduje się sekwencja aminokwasowa.

```

                M E A K P L R S V P S S
                ~~~~~
1  CCACCAAGACAAAAATAAAATAAAAAAACTCATGTGAATGTGACCATGGAAGCAAAGCCTCTTAGAAGTGTCCCTCTTC
   · H N T I Y G E G S G P Y K K K S V V V V G V G D D E
   ·
81 ACACAACACTATCTATGGTGAAGGAAGTGGACCCTATAAGAAGAAGAAAAGTGTGTTGTTGTTGGTGTGGTGATGATG
  
```



```

· E K K R V L D F V V N G A I N N N T L I Q T P C Y Y
~~~~~
161 AAGAGAAAAAAGGGTTCTTGATTTGTGGTGAATGGTGCATAAAATAACAACACTTTGATCAAAACACCATGTTATTAC
  N K C C L F S E T Q R G Y R S Q S F D F G S M M D P E
·
~~~~~
241 AACAGTGCCTGCTTTTGTAGTGAGACTCAAAGGGGATACAGAAGCCAGAGTTTGTATTCGGGAGCATGATGGATCCGGA
· P R R C R R T D G K K W R C S R N V V P D Q K Y C E R
·
~~~~~
321 ACCTCGTAGATGCCGAAGAACTGATGGAAAGAAATGGAGGTGCAGTAGAAATGTAGTGCCTGATCAGAAGTACTGTGAAA
· H M H R G C N R S R K H V E A S Q V N S Q L T T K P
·
~~~~~
401 GGCACATGCATAGAGGTTGTAACCGTTCAAGAAGGCATGTGGAAGCATCTCAAGTTAACTCTCAATTGACAACCTAAGCCT
  S S E K I Q T K L T S S N I E S S V S N P N L L G T Q
·
~~~~~
481 TCTCCGAAAAGATACAAACCAAACCTCAACATAGAATCTTCGGTTTCAAATCCGAACCTTTTAGGCACTCA

```

f) Sekwencja białka GRF9

```

1 MEAKPLRSVP SSHNTIYGEG SGPYKKKKS SVVVGVDDEE KKRVLDFVNV
51 GAINNNTLIQ TPCYYNKCC L FSETQRGYRS QSFDFGSMMD PEPPRCRRTD
101 GKKWRCSRNV VPDQKYCERH MHRGCNRSRK HVEASQVNSQ LTTKPSSEKI
151 QTKLTSSNIE SSVSNPNLLG TQPFDRSAFT LSMSECVVNT SSANTRLKNI
201 ISSADYRGSF STATAKAPKA TSFSNTTLVA SGNGSSQNIC KKDNQSQSCI
251 GYNVGVKSGA KASINCDDNS ISTGIGFSPR SVLQVSGCNN SYLNDRNNVD
301 LESGRCRRTD GKKWRCKSAV VPGQKYMHRG SKRRFAEQKP DATDSAVTIA
351 QLPCSTAATN IPKAYCSIAN TNLSMPIPAS TAPLIKCNEK SPCSSDTETT
401 ITDTMNEYSY ASS

```

Sekwencja wykazuje 83% podobieństwa z sekwencją GRF9 izoformy 3X z *Lupinus angustifolius* (356/429 AA), 81% podobieństwa z sekwencją domniemanej sekwencji C3H-WRC/GRF *Lupinus albus* (289/356 AA) oraz 50% podobieństwa z sekwencją GRF9 z *Glycine max* (236/472 AA).

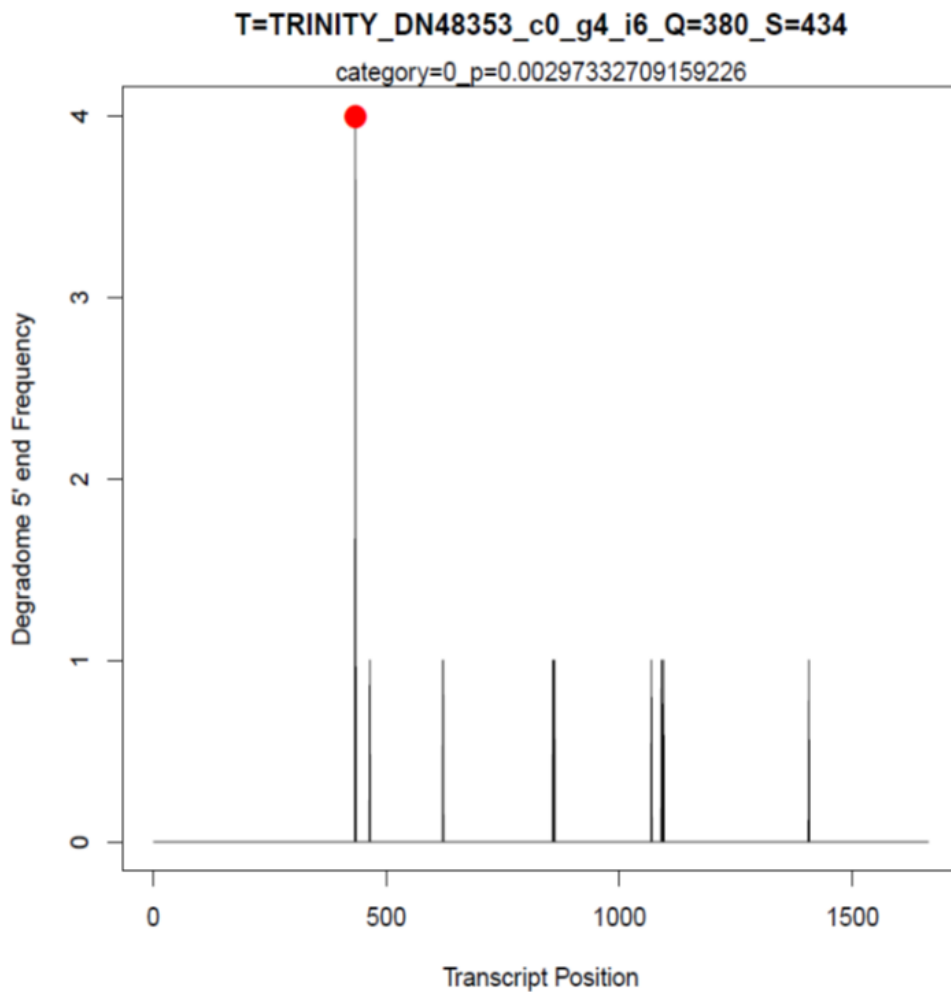
Domeny białkowe:

- Domena **WRC**, pozycja :91-132, E-value: 4.31e-20
- Domena **WRC**, pozycja: 302-334, E-value: 1.24e-11

Kolor domen odpowiada ich pozycji w sekwencji białka znajdującej się powyżej.

Domena WRC, nazwana na cześć konserwatywnego motywu Trp-Arg-Cys, zawiera dwie charakterystyczne cechy, przypuszczalny sygnał lokalizacji jądrowej i motyw palca cynkowego (C3H). Sugeruje się, że domena WRC działa w wiązaniu DNA.

g) Analiza miejsca cięcia transkryptu *LIGRF9* przez miRNA w degradacji



Rycina 17. Miejsce cięcia transkryptu *LIGRF9* przez LI-miR380/miR396, na podstawie danych z degradomu. Pozycja cięcia została zaznaczona na czerwono i wypada za 434 nukleotydem.

h) Porównanie sekwencji miRNA i transkryptu docelowego w miejscu cięcia transkryptu

	418		451
id380miR396	(1)	-----AGTTCAAGAAAGC-TGTGGAA-----	
TRINITYDN48353c0g4i6	(418)	TGTAACC GTTCAAGAAAGCATGTGGAAAGCATCTC	

3.5.2. Analiza LI-miR276/miR167 i jego genu docelowego *LIARF6*

Czynniki odpowiedzi na auksynę (ARF, w tym ARF6) to czynniki transkrypcyjne, które wiążą się specyficznie z sekwencją DNA 5'-TGTCTC-3' znajdującą się w elementach promotora reagującego na auksynę (AuxRE). ARF6 wydaje się działać jako aktywator

transkrypcji. Tworzy heterodimery z białkami *Aux/IAA* co może zmieniać ich zdolność do modulowania ekspresji genów wczesnej odpowiedzi na auksynę (Chandler 2016).

a) Sekwencja miRNA (5'→3')

TGAAGCTGCCAGCATGATCT

b) Sekwencja prekursora miRNA (5'→3')

TRINITY_DN52336_c2_g2_i3 wraz z zaznaczoną (niebieski) sekwencją dojrzałego miRNA:

```

1  GAAAAAGGAA  GAGAGAAAAT  GATCCATCTT  AGTGATATGA  GACAAAAAAA
51 AAATGACAAT  AGAAACAACA  AAAC TAGCCT  TGTGAAAACC  AGAGATGGTC
101 CAAATGTAGC  CTGATAAATG  AAACGTACAA  AAGAGGGAGA  CCAAAAACCTT
151 AAACGGAACC  ATATACCTTT  ATTATGCCTT  TTCTAGCTAT  ACGTTTGCAA
201 TCTTCCAATA  ACTCTTATTC  TTATCTGTTT  GCAACGCTTA  CTTCAAAAGA
251 AGAGGTAGAA  AGTGTAGATG  TCAAGATATG  TGTATTATAT  TATATATTAT
301 ATATATATAT  ACACACCCAT  AGTCATAGCC  ATGAAGTCAA  AGAATTAATA
351 GTGATCGAGG  ATGTAGATTA  TAAGCTCTAG  AAGTGAGGGA  GAGAAGGCTC
401 ATATGTATAG  TCTGATTTCT  TATCTTGCCC  TTGAAATAGT  TGAAGCTGCC
451 AGCATGATCT  GATGTTACCT  TGTATTAGGG  TAAGAATAGA  TCATGTGGCA
501 GTTTCACCTG  TTGAATGGAA  GCATATAAAC  CCTAATTTGC  TTTCTGATCC

```

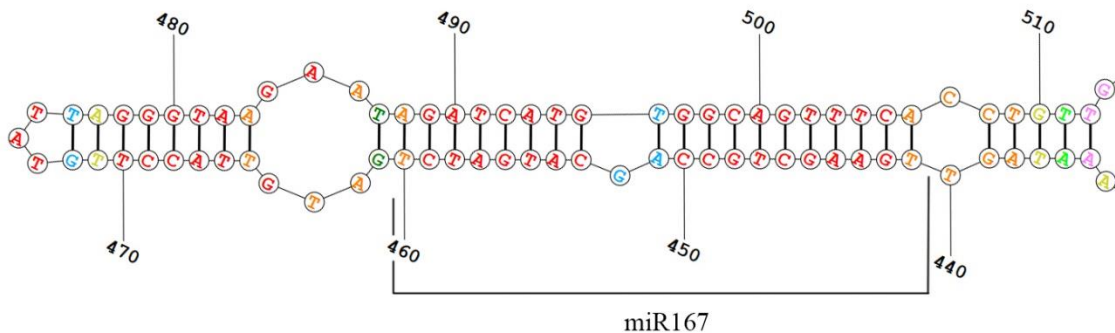
c) Dopasowanie sekwencji prekursora oraz dojrzałego miRNA

```

Prekursor  ATGAAGAGTTAAAGAGAGTACATT TGAGCCGAGGATGACTTGCTGGC AAAAGAAGAATTC
miR        -----
                                     TGAGCCGAGGATGACTTGCTGGC
                                     *****

```

d) Struktura spinki do włosów w sekwencji prekursora



Rycina 18. Charakterystyczna struktura spinki do włosów (ang. hairpin) prekursora L1-miR276/miR167 wraz z zaznaczoną lokalizacją sekwencji dojrzałego miRNA.

e) Sekwencja genu docelowego Auxin Response Factor 6 (5'→3')

TRINITY_DN50857_c0_g1_i10 wraz z zaznaczonym początkiem ORF (kolor zielony) oraz miejscem cięcia transkryptu przez miRNA (kolor czerwony). Powyżej sekwencji nukleotydowej znajduje się sekwencja aminokwasowa.

1521 TCTATTTAATTGCTACTGTAGTATTTATGTTCTTTTTTCTTCTGTTAGAAAGTCCTTATTTTTTATCAATGGTGGCCAAA
N K C T F L L R C L N L V S F Y A G Q P K R H L L T T
1601 AACAAAGTACTTTTCTTTTACGATGCTTGAACCTGGTGTCTTTTTTATGCAGGCCAGCCCAAAGGCATCTACTTACAAC
G W S V F V S A K R L V A G D S V L F I W N E K G Q L
1681 GGGTGGAGTGTCTTTGTGAGTGCTAAAAGACTTGTGCTGGTGATTCAGTGCTGTTTATCTGGAATGAAAAGGGTCAAT
L L G I R H A N R S Q P V M P S S V L S S D S M H L
1761 TGCTTCTGGCATTCCGCATGCTAATCGGTCAACAACCTGTGATGCCTTCGTGGTGTGCAAGTGATAGTATGCACTTG
G L L A A A A H A A A T N S R F T I F Y N P R A S Q S
1841 GGCCTTCTGCTGCTGCAGCTCATGCAGCTGCAACAAATAGTCGTTTTTACCATTTTCTACAACCCACGTGCTAGCCAATC
E F V T P L A K Y V K A V Y H T R V S V G M R F R M L
1921 AGAATTCGTCACACCTTTAGCAAAGTATGTTAAAGCTGTCTATCATACTCGAGTTTTCAGTAGGCATGCGCTTCAGGATGT
F E T E E S S V R Y M G T I T G I S D L D P A R W
2001 TGTTTGAACAGAAAGTCTAGTGTGCGGCGATACATGGGCACAATAACAGGCATTAGTGACTTGGATCTGCTCGGTGG
P N S H W R S V K V G W D E S I A G E R Q P R V S L W
2081 CCAAATTCACATTGGCGCTCAGTCAAGTTGGCTGGGATGAATCCATAGCCGGTGAGAGGCAACCTCGAGTGTCTCTATG
E I E P L T T F P M Y P S P F P L R L K R P W P L G L
2161 GGAAATTGAGCCGTTAACAACGTTTCCAATGTACCCATCTCCTTTCCCCCTCAGGCTTAAAAGACCGTGGCCTCTAGGAC
P S Y H G M R D N D F G M N S S L L G F Q S L D F Q
2241 TGCTTACATACCATGGCATGAGGATAATGATTTTGGCATGAATTTCTTCACTATTGGGGTTTTCAGTCTCTCGATTTTCAG
G I G I N P W M Q P R L D P S M V N F Q N D M Y Q S M
2321 GGAAATTGGTATTAATCCTTGGATGCAACCAAGGCTTGATCCGTCATGGTGAATTTTCAAATGATATGTACCAATCCAT
A A A A L Q D M R T S D P S K Q H P A S S L Q F Q Q P
2401 GGCTGCTGCTGCCTTTCAGGATATGAGGACTTTCAGATCCTTCCAAACAGCATCCTGCTTCTTCACTTCAATTTTCAGCAAC
Q N F P N T T P I L M Q T Q M L Q Q S Q P Q Q V F P
2481 CACAGAACTTCCCAACAGGACTCCCATTTTAAATGCAGACACAGATGTTGCAGCAGTCTCAACCTCAGCAGGTTTTTCCG
N N Q E N Q H S S P S Q F Q N Q A H L Q Q H L Q H Q H
2561 AATAATCAAGAAAATCAGCATTCTCCATCTCAATTTCAAACCAAGCGCATCTTCAGCAGCATCTGCAGCATCAGCA
S F N N H N H H Q Q Q R Q Q Q Q Q Q M V D H Q Q T
2641 CTCATTTAATAATCATAATCATCATCAGCAACAACGACAACAACAGCAGCAACAACAGCAAATGGTAGATCATCAGCAGA
S S S V S Q F V S I P Q S Q S S R M Q A I S S L C Q
2721 CTCAAGTTCTGTCTCTCAGTTTGTTCGATACCTCAATCTCAATCATCGCGCATGCAAGCTATCTTCTCGCTGTGCCAA
Q R S F S D S S G N P A A T A T A S R L H N M M G S F
2801 CAGCGAAGTTTTTCTGATTCAGTGGGAACCCTGCGGCTACTGCTACTGCTTCTCGCCTGCACATATGATGGGTTTCATT
P Q V E T S H L V N L P R T S F W M P V Q H S T A W P
2881 TCCCCAGGTTGAAACATCCACCTTGTCAACCTTCCGAGAACAAGTTTTTGGATGCCTGTCAACACTCAACTGCATGGC
P S K R V A V D P L L S Y G G S L C Q V E Q I G Q P
2961 CTCCTTCCAAGCGTGTGCCGTGGACCCACTCCTTTTATATGGAGGATCTCTATGTCAAGTGGAGCAGATAGGGCAGCCA
Q I T M S E N A V T L P P F P G R E C A V E G S T D P
3041 CAAATAACCATGTCTGAAAATGCTGTTACGTTGCCACCCTTCTCGGTAGGGAATGCGCCGTAGAAGGGAGCACTGATCC
Q N N I L F G V N I D P S S L L V N N G M S S L K G V
3121 ACAAACAATATTTTGTGGTGAATATAGATCCCTTCTCACTTCTAGTCAATAATGGGATGTCAAGTCTTAAAGGGG

```

· S V N R H S S S M P F Q H S S Y L N A T G T D T S L
~
3201 TCAGCGTCAATCGTCACTCATCATCCATGCCTTTTCAACATCTAGTTACCTGAATGCCACAGGCACTGATACTTCACTA
N P G M T H S I D E S D F L H T P E N G G R G N S P I
·
~
3281 AATCCCGAATGACACACAGCATTGATGAATCGGACTTCCACATACTCCAGAAAATGGGGGCCGAGGAAACTCGCCAAT
· K T F V K V Y K S G T F G R S L D I S K F T N Y H E L
·
~
3361 CAAAACCTTTGTGAAGGTTTACAAATCAGGACCTTTGGGAGATCATTGGATATCTCAAAATTCACTAACTACCATGAGC
· R S E L A R M F G L G S E L E D P V R S G W Q L V F
·
~
3441 TGCGCAGTGAGCTTGCTCGCATGTTGGCCTTGAAGTGAGTTGGAGGATCCTGTAAGATCAGGCTCGCAGCTTGTTATTC
V D R E N D V L L L G D G P W P D F V N S V W C I K I
·
~
3521 GTTGACCGAGAGAATGATGTTCTGCTCCTCGGTGATGGTCTTGGCCGACTTTGTAAATAGCGTATGGTGCATCAAGAT

```

f) Sekwencja białka ARF6

1	MGAKNKCTFL	LRCLNLVSEFY	AGQPKRHLLT	TCWSVVFVSAK	RLVAGDSVLF
51	IWNEKGQLLL	GIRHANRSQP	VMPSSVLSSD	SMHLGLLAAA	AHAAATNSRF
101	TIFYNPRASQ	SEFVTPLAKY	VKAVYHTRVS	VGMRFRMLFE	TEESSVRRYM
151	GTITGISDLLD	PARWPNSHWR	SVKVGWDESI	AGERQPRVSL	WEIEPLTTFP
201	MYPSPFPLRL	KRPWPLGLPS	YHGMRDNDFG	MNSSLLGFQS	LDFQIGINP
251	WMQPRLDPSM	VNFQNDMYQS	MAAAALQDMR	TSDPSKQHPA	SSLQFQQPQN

Sekwencja wykazuje 94% podobieństwa do sekwencji izofomy X3 ARF6 z *Lupinus angustifolius* (307/327 AA), 89% podobieństwa do sekwencji domniemanego czynnika ARF z *Lupinus albus* (635/712 AA) oraz 77% podobieństwa do izoformy X2 ARF6 z *Glycine max* (550/715 AA).

Domeny białkowe:

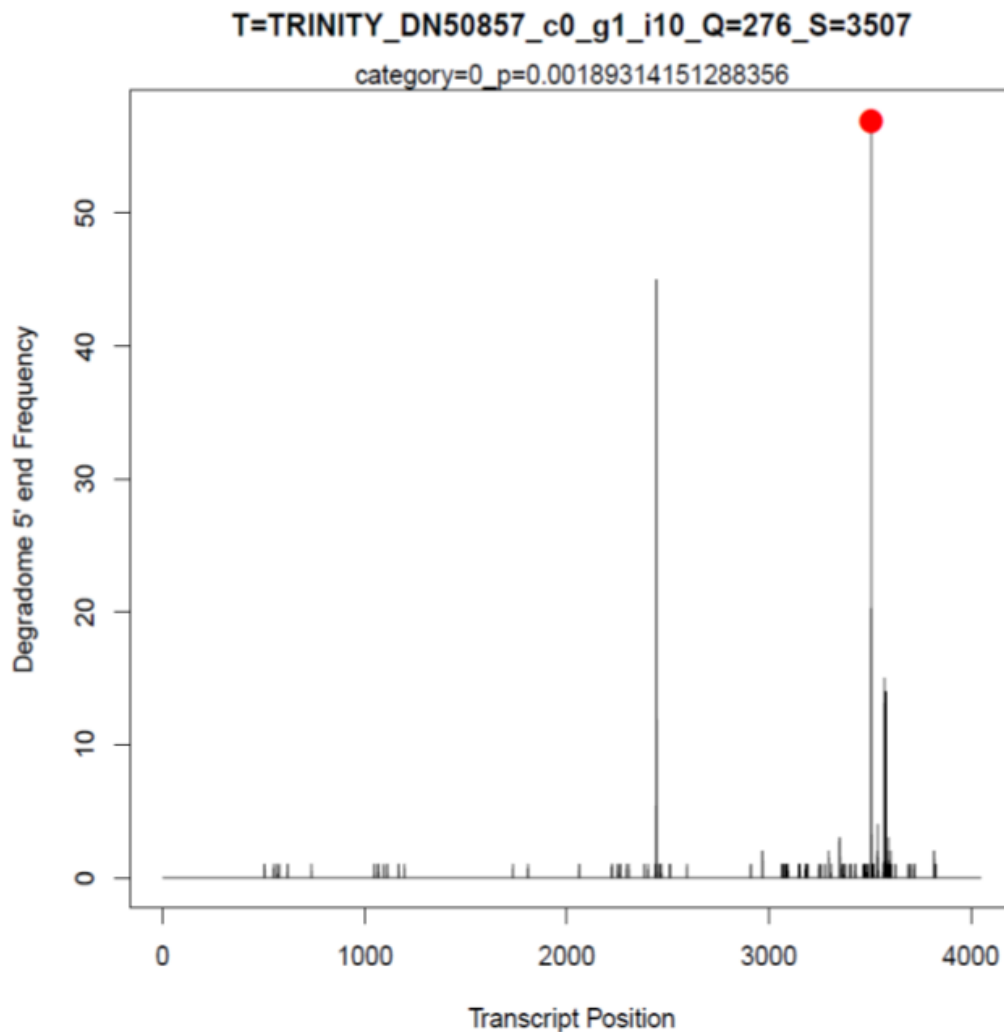
- Domena **B3_DNA**, pozycja : 22-63, E-value: 1.22e-04
- Domena **Auxin_resp**, pozycja : 96-173, E-value: 2.13e-41

Kolor domen odpowiada ich pozycji w sekwencji białka znajdującej się powyżej.

Domena wiążąca DNA_B3 należy do rodziny roślinnych czynników transkrypcyjnych pełniących różne role w rozwoju, występując również w czynniku odpowiedzi na auksynę (ARF).

Domena Auxin_resp stanowi wysoce konserwowaną domenę obecną wśród czynników transkrypcyjnych reagujących na auksynę.

g) Analiza miejsca cięcia transkryptu *LIARF6* przez miRNA w degradacji



Rycina 19. Miejsce cięcia transkryptu *LIARF6* przez miR276, na podstawie danych z degradomu. Pozycja cięcia została zaznaczona na czerwono i wypada za 3507 nukleotydem.

h) Porównanie sekwencji miRNA i transkryptu docelowego w miejscu cięcia transkryptu

		3492		3520
id276mir167	(1)	-----	AGATCATGCTGGCAGCTT	CA-----
TRINITYDN50857c0g1i10ARF (3492)		CTGTA	AGATCAGGCTGGCAGCTT	GTATTC

3.5.3. Analiza Ll-miR329/miR160 i jego genu docelowego *LIARF17*

Auxin Response Factor 17 (ARF17) jest jednym z licznych przedstawicieli rodziny czynników transkrypcyjnych reagujących na auksynę. Działanie to ma miejsce dzięki

tworzeniu heterodimerów z białkami Aux/IAA, co zmienia ich zdolność do modulowania ekspresji genów wczesnej odpowiedzi na auksynę (Chandler, 2016).

a) Sekwencja miRNA (5'→3')

TGCCTGGCTCCCTGAATGCCA

b) Sekwencja prekursora miRNA (5'→3')

TRINITY_DN46311_c0_g1_i4 i3 wraz z zaznaczoną (niebieski) sekwencją dojrzałego miRNA:

```

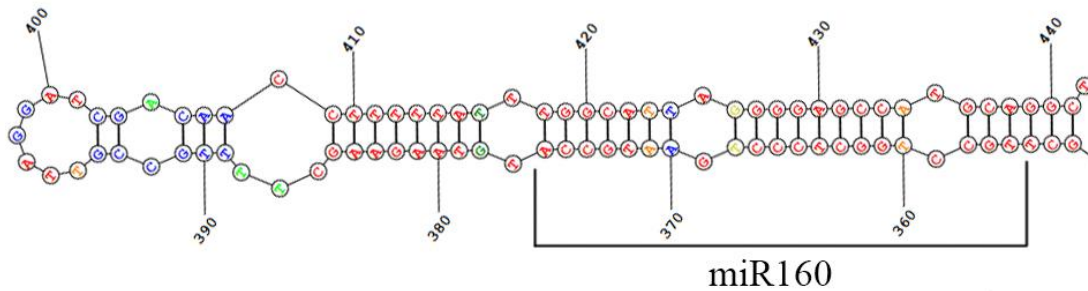
1 AAAATGTGAT GTGAAATATT GAAAAGAGAG TTCTGAGTTG GTGTAGGGTG
51 GGTCTGGGGG GTCACCTTTT CCAAGGAAAAG AAAATCCAAA AAAAGACTCA
101 CACCTAAACC CAGTGAGCTT TGGCTCTATC TATTGCTCAC TATTGCTTAC
151 AAATAACCCCT TTTGGATTTC TCTTCACTTC ACCCTTCATG CTTTTTCTCT
201 TATCTCTCCC CTCTCTCTAT ATCTCCCATATA CCTATTCTCT TACCTCCAAA
251 AGAAGAATCT ACTTCTATA TCTATATATA TATATATATA AAGATTTTGG
301 AGTGGTGAAG ATAGCTCGGG CTAATTAGTA GGGCGGATAT CCGAAATGAT
351 GTGCTTGCCT GGCTCCCTGA ATGCCA TGTA AGAAGCTTTT GCCGTTAGGA
401 TCGACAACCT TTTTATTTGG CATTAGGGGA GCCATGCAGG CTCTTCATCA
  
```

c) Dopasowanie sekwencji prekursora oraz dojrzałego miRNA

```

Prekursor   TAGGGCGGATATCCGAAATGATGTGCTTGCCTGGCTCCCTGAATGCCATGTAAGAAGCTT
miR          -----
                TGCCTGGCTCCCTGAATGCCA
                *****
  
```

d) Struktura spinki do włosów w sekwencji prekursora



Rycina 20. Charakterystyczna struktura spinki do włosów (ang. hairpin) prekursora LI-miR329/miR160 wraz z zaznaczoną lokalizacją sekwencji dojrzałego miRNA.

e) Sekwencja genu docelowego Auxin Response Factor 17 (5'→3')

TRINITY_DN48234_c1_g4_i1 wraz z zaznaczonym początkiem ORF (kolor zielony) oraz miejscem cięcia transkryptu przez miRNA (kolor czerwony). Powyżej sekwencji nukleotydowej znajduje się sekwencja aminokwasowa.

M R R P P P S V P

```

161  CACTCTCTTCATTACAATTTCTCTCTCTTTTTCTCTTCCAATTTCAATTCATC~ATGCGGCGTCCACCGCGTCCGGTTCC
· P P P P L I P S Q P S R I D S S I W R A C A G A S V Q
.
~~~~~
241  TCCTCCTCCGCCGTTGATTCCGTCGCAACCGTCGCGTATCGACTCCAGCATTGGCGTGCTGTGCCGGAGCTCCGTTCC
· I P V V N S R V Y Y F P Q G H L D Q A S S P P E Q L
.
~~~~~
321  AAATTCGGTGTCAATTTCTAGGTTTACTATTTCCCTCAAGGTCACCTTGATCAAGCTTCATCACCTCCTGAACAATTG
· S S N V Y S N P C V L C R I V D V Q F L A D H K T D E
.
~~~~~
401  TCTAGTAATGTTTATTCCAATCCTTGCGTTCTTTGTCGCATTGTTGATGTTCAATTTCTGGCTGATCATAAAACCGATGA
· V F V K L V L H P I N R N S D F Q N Y L S D T P P P T
.
~~~~~
481  GGTTCGTTAAACTCGTTCTTACCCTATCAACCGTAACTCTGATTTTCAGAATTATCTCTCTGATACTCCTCCTCCGA
· P A V A G D G G S G S S N N T S S G D G D E N A V V
.
~~~~~
561  CACCGGCTGTAGCCGGTGTGGTGGTAGTGGTAGTAATAATACTAGTTCGGTGACGGTGTGAAAATGCTGTGGTT
· S F A K I L T P S D A N N G G G F S V P R F C A D S I
.
~~~~~
641  TCGTTCGTAAGATTTTACTCCGTTCTGATGCTAATAATGGTGGTGGTTCTCTGTTCCGAGGTTCTGTGCTGATTCGAT
· F P P L N F N D D P P F Q N L M I A D M H G N V W E Y
.
~~~~~
721  TTTCCCGCCGCTGAATTTCAATGATGATCCGCCGTTTCAGAATTTGATGATCGCTGATATGCATGAAAATGTGTGGGAGT
· R H I Y R G T P R R H L L T T G W S K F V N F K K I
.
~~~~~
801  ATCGCCACATTTACCGTGGGACGCCGCGCGGCACTTGCTCACTACTGGCTGGAGTAAGTTCGTCAACTTCAAGAAGATC
· V A G D S V V F M K N A K G E L F S G I R R A K R T S
.
~~~~~
881  GTCGCCGGTATTTCGGTTGTTTTCATGAAGAACCGGAAAGGGGAGTTGTTTTCTGGAATTCGCCGAGCAAAAAGACTTC
· T R S G G R G V S G T D W S A T M L A I G G T R K R D
.
~~~~~
961  CACTAGGAGTGGCGGCAGAGGAGTCAAGTGGCACTGATTGGAGTGCACGATGCTTGCTATTGGTGGTACAAGGAAGAGGG
· G D V E K K K E D N V V M E G F S R N G K G K L A P
.
~~~~~
1041 ATGGGGATGTGGAGAAGAAGAAGGAGGATAATGTTGTGATGGAGGGGTTTCAAGGAACGGGAAGGGGAAATTTGGCGCCG
· E K V A E A V E L A A Q G M P F E A V Y Y P S A G W S
.
~~~~~
1121 GAGAAGGTTGCTGAGGCTGTGGAACCTGGCAGCGCAAGGAATGCCATTTGAGGCTGTGTATTATCCAAGTCTGGGTGGTC
· D F V V Q A E I V D S A M M I I W S P G M R V K M A V
.
~~~~~
1201 AGATTTTGTGGTGCAGGCAGAGATTGTGGATTACGCGATGATGATAATTTGGAGCCCTGGAATGAGAGTGAAGATGGCTG
· E T E D S S R T S W F Q G A V S A A C V P E N G L W
.
~~~~~
1281 TGGAGACTGAGGATTCGTTCTAGGACGAGCTGGTTTCAGGGCGCGGTGCTGCTGCGTGTGTTCCCTGAGAATGGGCTGTGG
· R G S P W H R I Q V A W D E P E L M Q H A K F V S P W
.
~~~~~
1361 CGAGGTTCTCCTTGGCATAGGATTCAGGTTGCATGGGATGAACCTGAACCTCATGCAGCATGCAAAGTTTGTGAGCCCTTG
· Q V E P L S V T S T F H T A V P L A K R F R A A Q D S
.
~~~~~
1441 GCAGGTTGAACCTTTATCTGTACATCTACATTTACACAGCAGTCCCCTTAGCCAAAAGGTTTAGAGCTGCTCAGGATT
· V G L T D G K G D P F F P M T G Y T N S T M G Q L N
.
~~~~~
1521 CTGTGGGTTAACTGATGAAAGGGGACCCCTTCTTTCTATGACAGGATACCTAATCAACAATGGGACAGCTTAAT
· Q T L S S Y S T F P A G M Q G A R H N L F S T T A F V
.
~~~~~
1601 CAAACATTGTCGAGTTATAGTACATTTCTGCTGGCATGCA~GAGCCAGGCATAATCTATTTTCTACAAGTCTTTTGT
· K F S S D M N H L C L G N S F G N N T A P S S K I L S
.
~~~~~
1681 CAAATTTTCTAGTGATATGAATCATCTGTGTTGGTAATTCCTTTGGAAACAACACAGCACCAAGTTCGAAAATTTTGT

```


f) Sekwencja białka ARF17

```
1 MRRPPPSVPP PPPLIPSQPS RIDSSIWRAC AGASVQIPVV NSRVYYPFQG
51 HLDQASSPPE QLSSNVYSNP CVLCRIVDVQ FLADHKTDEV FVKLVLHPIN
101 RNSDFQNYLS DTPPPTPAVA GDGSGSSNN TSSGDGDENA VVSFAKILTP
151 SDANNGGGFS VPRFCADSI F PPLNFNDPP FQNLMIADMH GNVWEYRHIY
201 RGTPRRHLLT TGWSKRVNFK KIVAGDSVVF MKNAKGELFS GIRRAKRTST
251 RSGGRGVSGT DWSATMLAIG GTRKRDGDVE KKKEDNVVME GFSRNGKGKL
301 APEKVAEAVE LAAQGMPEFA VYYPGAGWSD FVVQAEIVDS AMMIIWSPGM
351 RVKMAVETED SSRTSWFQGA VSAACVPENG LWRGSPWHRI QVAWDEPELM
401 QHAKFVSPWQ VEPLSVTSTF HTAVPLAKRF RAAQDSVGLT DGKGDFFFPM
451 TGYTNSTMGQ LNQTLSSYST FPAGMQGARH NLFSTTAFVK FSSDMNHLCL
501 GNSFGNNTAP SSKILSTELN IGSSQSDNLS PDSQCSSLHSF GTECVRTHNC
551 NSTKPVRSR SIQLFGTTIETK QPVKSGFHLLT GCIGNDSCKC HDEIEGLTLE
601 LSLAYSKMLN SLDGLDDGRH YL
```

Sekwencja posiada 81% podobieństwa do sekwencji ARF17-like z *Lupinus angustifolius* (491/603 AA), 80% podobieństwa do sekwencji rodziny domniemanych czynników ARF z *Lupinus albus* (484/604 AA) oraz 60% podobieństwa do sekwencji ARF17 z *Cicer arietinum* (361/599 AA).

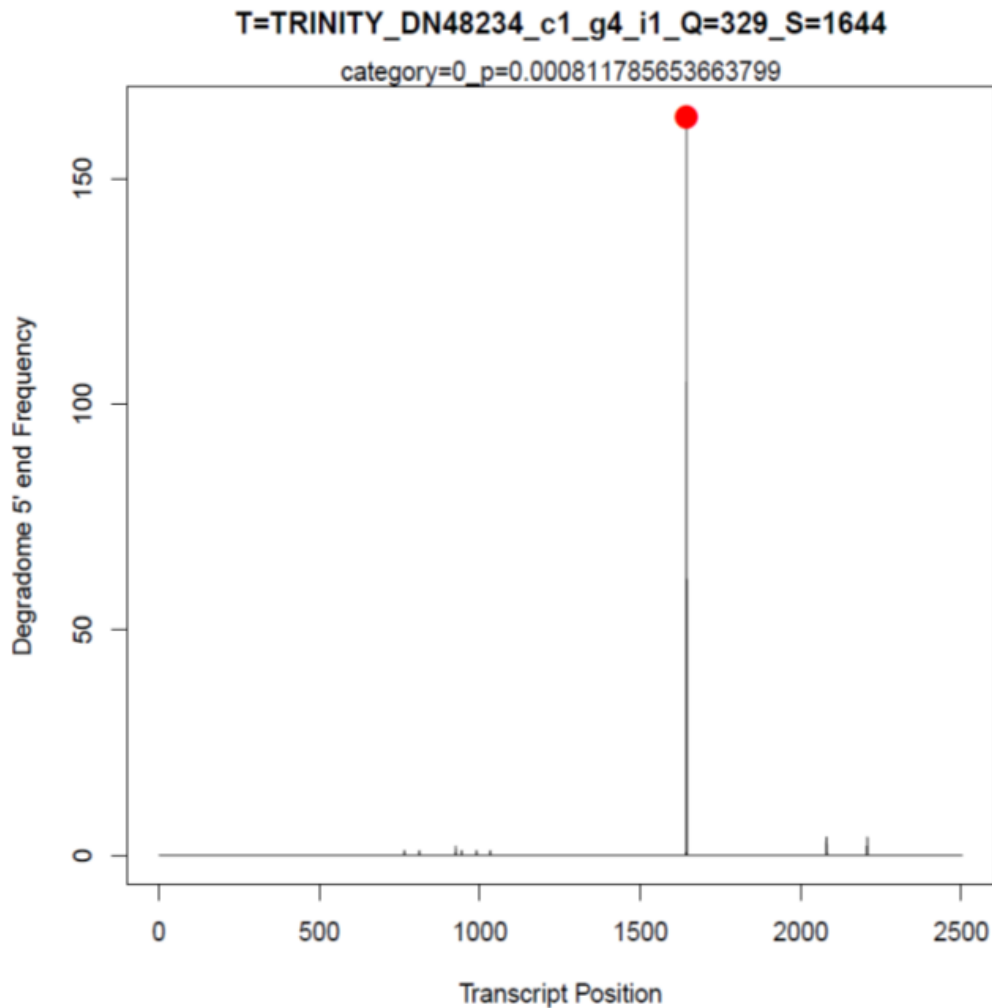
Domeny białkowe:

- Domena **B3_DNA**, pozycja : 144-245 , E-value: 4.88e-22
- Domena **Auxin_resp**, pozycja : 308-391 , E-value: 1.78e-29

Kolor domen odpowiada ich pozycji w sekwencji białka znajdującej się powyżej.

Domeny te są identyczne w stosunku do domen dla *LIARF6* opisanych w podpunkcie g) podrozdziału 3.5.2.

g) Analiza miejsca cięcia transkryptu *LIARF17* przez miRNA w degradomie



Rycina 21. Miejsce cięcia transkryptu *LIARF17* przez miR329, na podstawie danych z degradomu. Pozycja cięcia została zaznaczona na czerwono i wypada za 1644 nukleotydem.

h) Porównanie sekwencji miRNA i transkryptu docelowego w miejscu cięcia transkryptu

```

                _id329mir160      (1)  -----TGGCATTCAGGGAGCCAGGCA-----
TRINITY_DN48234_c1_g4_i1  (1624) ATTTCTCTGCTGGCATGCAGGGAGCCAGGCA TAATCTATT
    
```

3.5.4. Analiza l-miR169 i jego genu docelowego *LINF-YA5*

Czynnik transkrypcyjny NF-YA5 (Nuclear transcription factor Y subunit A5) stanowi składnik kompleksu NF-Y/HAP, który stymuluje transkrypcję różnych genów

poprzez rozpoznawanie i wiązanie motywu CCAAT w promotorach. Odgrywa on rolę w regulacji embriogenezy oraz jest zaangażowany w szlak sygnałowy kwasu abscysynowego.

a) Sekwencja miRNA (5'→3')

TGAGCCGAGGATGACTTGCTGGC

b) Sekwencja prekursora miRNA (5'→3')

TRINITY_DN38047_c0_g1_i1 i3 wraz z zaznaczoną (niebieski) sekwencją dojrzałego miRNA:

```

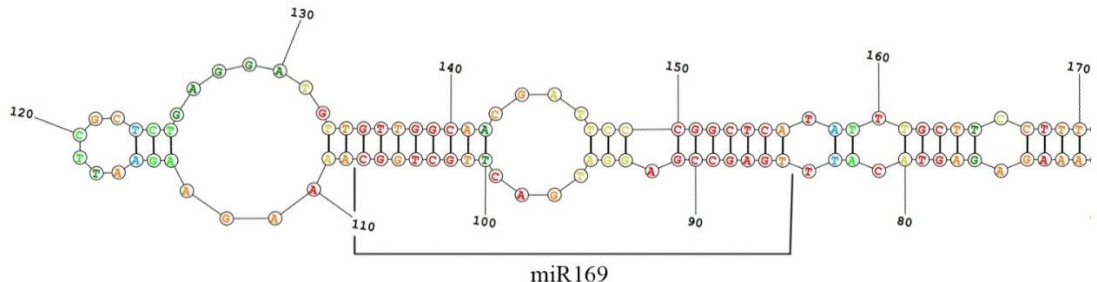
1  CAGTTTTAGA CTGAGTTTGT TTTTGGATGT TCAATAATGT TGTTTGCTCA
51 AATGTCTTGC ATGAAGAGTT AAAGAGAGTA CATT TGAGCC GAGGATGACT
101 TGCTGGC AAA AGAAGAATTC GCTCTGAGGA TGTTGTTGGC AACGATTCCC
151 GGCTCATATT TGCTTCCTTT ACCCTCATAT GAGACATGGA AAAGAGCTTG
201 AAAGCTTCAT GTCTATGGTA CCTTATTGAA ATATGTCATA TTTGCTATTC
  
```

c) Dopasowanie sekwencji prekursora oraz dojrzałego miRNA

```

Prekursor      ATGAAGAGTTAAAGAGAGTACATT TGAGCCGAGGATGACTTGCTGGC AAAAGAAGAATTC
miR            ----- TGAGCCGAGGATGACTTGCTGGC -----
                *****
  
```

d) Struktura spinki do włosów w sekwencji prekursora



Rycina 22. Charakterystyczna struktura spinki do włosów (ang. hairpin) prekursora Ll-miR169 wraz z zaznaczoną lokalizacją sekwencji dojrzałego miRNA.

e) Sekwencja genu docelowego Nuclear transcription factor Y subunit A5 (5'→3')

TRINITY_DN48523_c1_g2_i5 wraz z zaznaczonym początkiem ORF (kolor zielony) oraz miejscem cięcia transkryptu przez miRNA (kolor czerwony). Powyżej sekwencji nukleotydowej znajduje się sekwencja aminokwasowa.

```

                                                M F L L L N H T
241 AAACCATTCTATCAGATCAAGAACTAAATAATGGATATGTGGATGGTTTATTGAAGATGTTTCCTCTTGTTGAATCATACT
    D T A F N C S H V D C S H S M A Y A P Y P Y D G D P S
    .
    ~~~~~
321 GATACGGCATTCAATTGTTTCACACGTCGATTCGAGTCACTCAATGGCTTATGCTCCTTATCCTTATGATGGTGATCCTTC
    . C G G S L V A Y G A H A I N Q S Q M F P Q M L G L G L
    .
    ~~~~~
401 TTGTGGTGGTTCATTAGTTGCTTATGGAGCACATGCTATTAATCAATCCCAAATGTTTCCCAAATGCTGGGCTGGGAT
  
```

```

· A S T R I A L P P D F A E D G P I Y V N A K Q Y H G
481 TAGCATCCACTAGAATTGCGTTACACCTGATTTGCAGAAGATGGGCCATTATGTCAACGAAAACAATACCATGGT
  I L R R R Q S R A K L E A Q N K L I K S R K P Y L H E
·
561 ATACTGAGAAGGCGACAGTCGCGAGCAAACCTTGAGGCTCAAACAAACTCATCAAAGTCGTAAGCCATATCTTCACGA
  S R H R H A L N R V R G T G G R F L S A K Q L Q Q S H
·
641 GTCTCGGCATCGCCATGCTTTGAATCGGGTTCGGGGAAGTGGCGGACGCTTTCTTAGCGCTAAACAGCTGCAACAGTCTC
  A E V V S G A H S V S D P V N L Y Q N K D A P E V E
·
721 ATGCAGAAGTTGTCTCTGGTGCTCATTCACTATCAGACCCTGTGAACTTATATCAAATAAAGATGCACCTGAGGTGGAA
  S H S S R M G G N A E L T T L S S N S V I F R Q H E L
·
801 AGCCATTCTCCAGAATGGGAGGAAATGCTGAACTAACAACCTTTGTCCAGTAACAGTGTGCATATTTGGGCAGCATGAACT
  Q F L G N S P N I G L G A S Q C S R G F T F G G S G T
·
881 ACAATTCTTAGGTAACCTCCCAAATATAGGTCTAGGAGCATCACAATGCAGCAGGGGATTCACCTTCGGCGGCAGCGGAA
  E R N
·
961 CGGAGCGAAATTAATCTCACCGTCAAGCAAATCATCCTTGGCTTAGTCACTAACTTTATGTTACAGAAATGTTGTCT
1041 TTTGAGAGACTCTGCATTACCCCTCATACCTATGCCACTTCTTAGACATGTATTTTATAGTTGTTATTGTTCCATTGGT

```

f) Sekwencja białka NF-YA5

```

1 MFLLLNHTDT AFNC SHVDCS HSMAYAPYPY DGD PSCGGS L VAYGAHAINQ
51 SQMFPQMLGL GLASTRIALP PDF AED GPIY VNAKQYHGII RRRQSRAKLE
101 AQNKLIKSRK PYLHESRHRH ALNRVRGTGG RFLSAKQLQQ SHAEVVSGAH
151 SVSDPVNLYQ NKDAPEVESHS SRMGGNAEL TTLSSNSVIF RQHELQFLGN
201 SPNIGLGASQ CSRGFTFGGS GTERN

```

Sekwencja wykazuje 91% podobieństwo do sekwencji jądrowego czynnika transkrypcyjnego Y podjednostki A-7 u *Lupinus angustifolius* (205/225 AA), 72% podobieństwo do sekwencji domnianego czynnika transkrypcyjnego Hap2/NF-YA z *Lupinus albus* (160/223 AA) oraz 71% podobieństwo do sekwencji jądrowego czynnika transkrypcyjnego Y podjednostki 12 u *Glycine max* (160/225 AA).

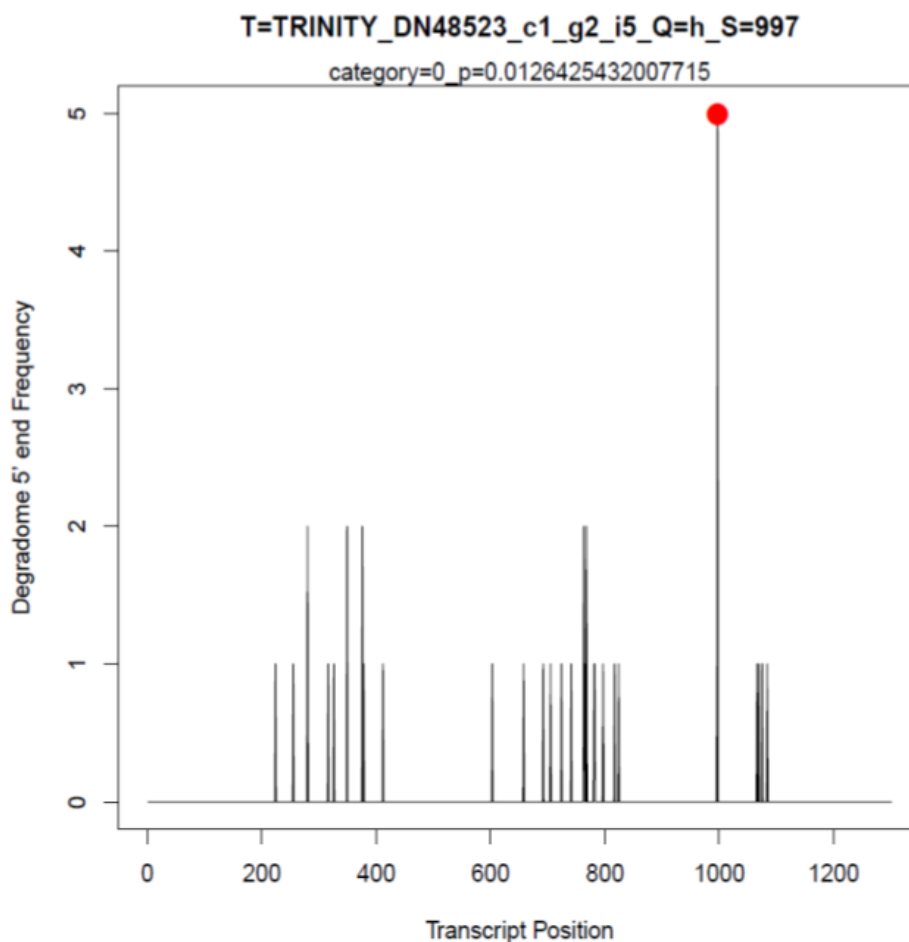
Domeny białkowe:

- Domena **CBFB_NFYA**, pozycja: 77-132: , E-value: 4.00e-35

Kolor domeny odpowiada jej pozycji w sekwencji białka znajdującej się powyżej.

Domena CBFB_NFYA stanowi czynnik transkrypcyjny wiążący sekwencję 5'-CCAAT-3' znajdujący się w promotorach jego genów docelowych. Jest składnikiem specyficznego heterotrimerycznego czynnika transkrypcyjnego (CBF-B/NF-YA).

g) Analiza miejsca cięcia transkryptu *LINF-YA5* przez miRNA w degradacji



Rycina 23. Miejsce cięcia transkryptu *LINF-AY5* przez Ll-miR169, na podstawie danych z degradomu. Pozycja cięcia została zaznaczona na czerwono i wypada ona za 997 nukleotydem.

h) Porównanie sekwencji miRNA i transkryptu docelowego w miejscu cięcia transkryptu

```

                977                                1008
      _mir169      (1) -----GCCAG-CAAGTCATCCTCGGCTCA--
TRINITYDN48523c1g2i5 (977) TCACCGTCAGGCAAATCATCCTTGGCTTAGT

```

3.5.5. Analiza Ll-miR446/miR159 i jego genu docelowego *LIGAMYB*

GAMYB jest transkrypcyjnym aktywatorem ekspresji alfa-amylazy zależnej od gibereliny w komórkach aleuronowych. Zaangażowany w rozwój pyłków i organów kwiatowych. Może wiązać się z blokiem 5'-TAACAAA-3' promotora alfa-amylazy.

W tkankach wegetatywnych hamuje wzrost poprzez zmniejszenie proliferacji komórek. Promuje ekspresję genów związanych z aleuronem (np. CP1, CP, GASA1, BXL1 i BXL2) w nasionach. U *A. thaliana*, geny podobne do *GAMYB*, *MYB65* i *MYB101* promują programowaną śmierć komórki (PCD, ang., Programmed Cell Death) i wakuolizację wakuoli magazynujących białka (Alonso-Peral i in., 2010).

a) Sekwencja miRNA (5'→3')

TTTGGACTGAAGGGAGCTCTA

b) Sekwencja prekursora miRNA

W analizanych transkryptomach nie zidentyfikowano prekursora dla Ll-miR159.

c) Sekwencja genu docelowego GAMYB (5'→3')

TRINITY_DN52683_c1_g2_i3 wraz z zaznaczonym początkiem ORF (kolor zielony) oraz miejscem cięcia transkryptu przez miRNA (kolor czerwony). Powyżej sekwencji nukleotydowej znajduje się sekwencja aminokwasowa.

```

                                     M R R M K N E I E D E M L
                                     ~~~~~
321  GATTTTAGCGTTGTGTCCTATTCAGAACTGTATGATAAAAGATGAGACGGATGAAGAACGAGATTGAAGATGAGATGCT
      · P N N M T E S Q L N D E G N G G S G S I V V L K K G P
                                     ~~~~~
401  CCCCACAATATGACAGAATCACAGTTGAATGATGAGGGTAATGGAGGAAGTGGCAGCATAGTTGTTCTGAAGAAAGGTC
      · W T S A E D A I L V D Y V K K H G E G N W N A V Q K
                                     ~~~~~
481  CATGGACATCTGCTGAAGATGCGATTTTTGGTTGATTATGTCAAGAAGCATGGGGAGGGGAAGTGAATGCTGTTGTTGAG
      H A G L S R C G K S C R L R W A N H L R P N L K K G A
                                     ~~~~~
561  CATGCAGCCTGTGCGTTGCGGAAAAAGTTGCCGATTGCGGTGGGCCAATCACCTAAGGCCAAATTTAAAGAAAGGGGC
      · F T A Q E E R L I T E L H A K M G N K W A R M S A H L
                                     ~~~~~
641  GTTTACTGCACAAGAGGAGCGCTTAATTACTGAACTTCACGCAAAAATGGGAAACAAGTGGGCACGCATGTCAGCACATT
      · P G R T D N E I K N Y W N T R A K R R Q R A G L P L
                                     ~~~~~
721  TGCCTGGTCGCACAGATAATGAGATAAAGAACTACTGGAACACCCGAGCCAAGAGGCGTCAACGGGCTGGCTTGCCACTT
      Y S P E V C S P A V Q E S H Q S Q S T D G V N G G N K
                                     ~~~~~
801  TATTCTCCTGAAGTGTGTTCCGACGAGTCCAAGAGAGCCATCAAAGCCAAAGCACTGATGGAGTTAATGGTGGCAATAA
      · V H H D L L N S Y E I H D A I I D S V K D N Q G I S P
                                     ~~~~~
881  AGTGCATCATGATTTGTTGAACAGTTATGAGATAACATGATGCAATAATTGACAGTGTGAAGGATAACCAGGGAATCTCAC
      · Y V P E P P D I S D Y N N M L K G L D S S Q Y C N F
                                     ~~~~~
961  CTTATGTTCTCTGAGCCTCTGATATTTCTGATTATAACAATATGCTGAAAGGCCTTGATCTCTCAGTACTGTAACCTTT
      T S S T S P N H K R L R E S T M P F F G S S C M S T N
                                     ~~~~~
1041 ACATCATCAACATCACCTAACCATAGCGTCTTCGAGAGTCAACAATGCCATTTTTTGGTTCCAGTTGTATGAGACAAA
      · L F Y P F D H I R A N T S D K I A Q S F G M Q S P L D
                                     ~~~~~

```

```

1121 TTTGTTTTATCCATTTGATCATATTCGGGCTAACACCTCTGATAAGATTGCACAATCATTGGAATGCAATCACCCCTTG
· H G P S L H S S M C Y S H S L S N G N S S T S K P T
~~~~~
1201 ATCATGGCCCCTCCTTACACAGCTCAATGTGTTACAGCCATTCACTTTCAAATGGCAATTCCTCTACTTCTAAGCCAACT
S E A V K L E L P S L Q Y P E I D L G S W G T S P P L
·
~~~~~
1281 TCTGAGGCTGTGAAGCTAGAGCTCC TCACTCCAATATCCAGAAATTGATTTAGGTAGCTGGGGTACATCTCCCCACT
· P L L D S V D D F I K Y P T P I S T M E S D C S S P Q
·
~~~~~
1361 TCCTTGCTTGATTGCGTTGATGATTTTCATTAAGTATCCTACACCAATTAGTACAATGGAGTCAGATTGTTCTTCCCCAC

```

d) Sekwencja białka GAMYB

```

1 MRRMKNEIED EMLPNNMTES QLNDEGNNGS GSIVVLKKGP WTSAEDAILV
51 DYVKKHGEGN WNAVQKHAGL SRCGKSCRLR WANHLRPNLK KGAFTAQEER
101 LITELHAKMG NKWARMSAHL PGRTDNEIKN YWNTRAKRRQ RAGLPLYSPE
151 VCSPAVQESH QSQSTDGVNG GNKVHHDLLN SYEIHDAIID SVKDNQGISP
201 YVPEPPDISD YNNMLKGLDS SQYCNFTSST SPNHKRLRES TMPFFGSSCM
251 STNLFYFPFDH IRANTSDKIA QSFQMQSPLD HGPSLHSSMC YSHSLSNNGNS

```

Sekwencja wykazuje podobieństwo w 91% do sekwencji czynnika transkrypcyjnego GAMYB-like z *Lupinus angustifolius* (496/547 AA), 78% podobieństwo do sekwencji czynnika transkrypcyjnego MYB-HB-like z *Lupinus albus* (430/551 AA) oraz 74% podobieństwa do sekwencji czynnika transkrypcyjnego MYB33 z *Cajanus cajan* (406/546 AA).

Domeny białkowe:

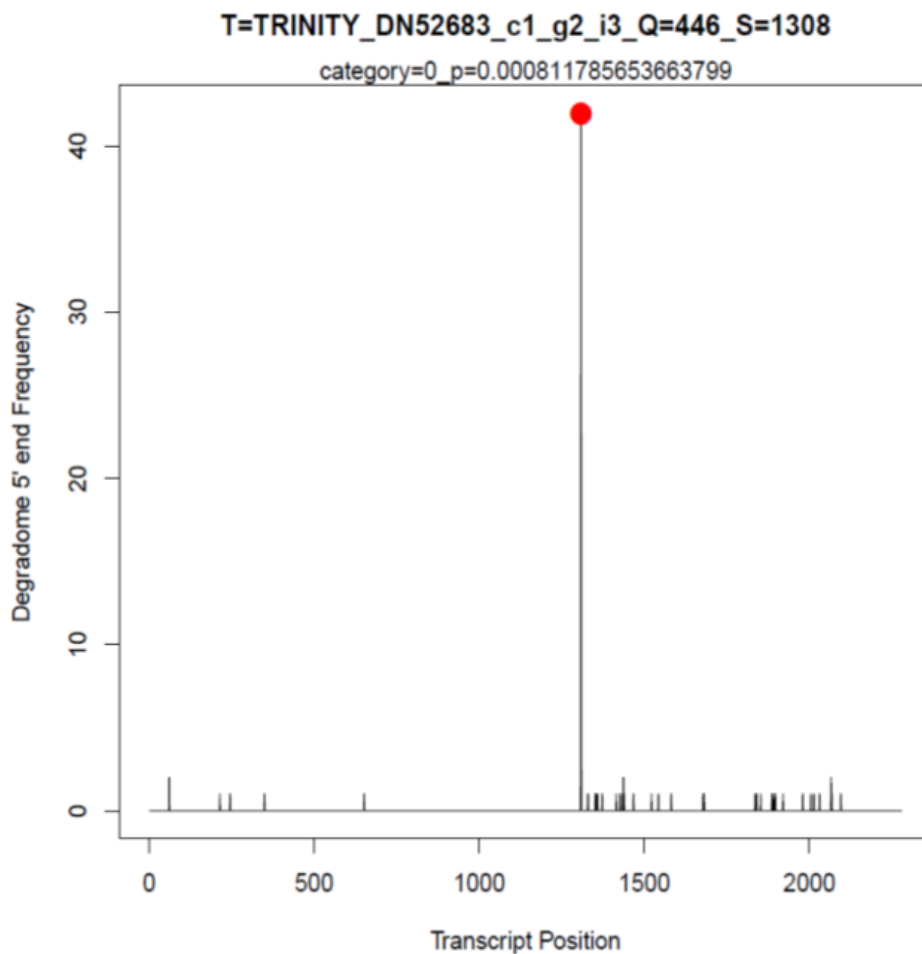
- Domena **SANT**, pozycja : 38-87, E-value: 2.33e-13
- Domena **Myb_DNA-binding**, pozycja: 91-134, E-value: 8.60e-15

Kolor domen odpowiada ich pozycji w sekwencji białka znajdującej się powyżej.

Domena Myb_DNA-binding - domena wiążąca DNA podobna do domeny MYB.

Domena SANT, obok SWI3, ADA2, N-CoR i TFIIB” stanowi jedną z domen wiążących DNA.

e) Analiza miejsca cięcia transkryptu *LIGAMYB* przez miRNA w degradacji



Rycina 24. Miejsce cięcia transkryptu *LIGAMYB* przez L1-miR446/miR159, na podstawie danych z degradacji. Pozycja cięcia została zaznaczona na czerwono i wypada za 1308 nukleotydem.

f) Porównanie sekwencji miRNA i transkryptu docelowego w miejscu cięcia transkryptu

		1289		1325
<u>id446miR159</u>	(1)	-----TAGAGCTCCCTTCA	GTCCAAA-----	
TRINITYDN52683c1g2i3gamyb	(1289)	TGTGAAGCTAGAGCTCCCTTCA	CTCCAAATATCCAGAA	

3.6. Wyniki reakcji RT-qPCR

W celu potwierdzenia wyników ekspresji miRNA i unigenów otrzymanych na drodze bioinformatycznej (sekwencjonowanie oraz opracowanie otrzymanych danych), wykonano analizy ekspresji 12 wybranych sekwencji za pomocą techniki RT-qPCR. Wyniki tej walidacji oraz otrzymane dane zostały umieszczone w publikacji Glazińska i in., 2017.

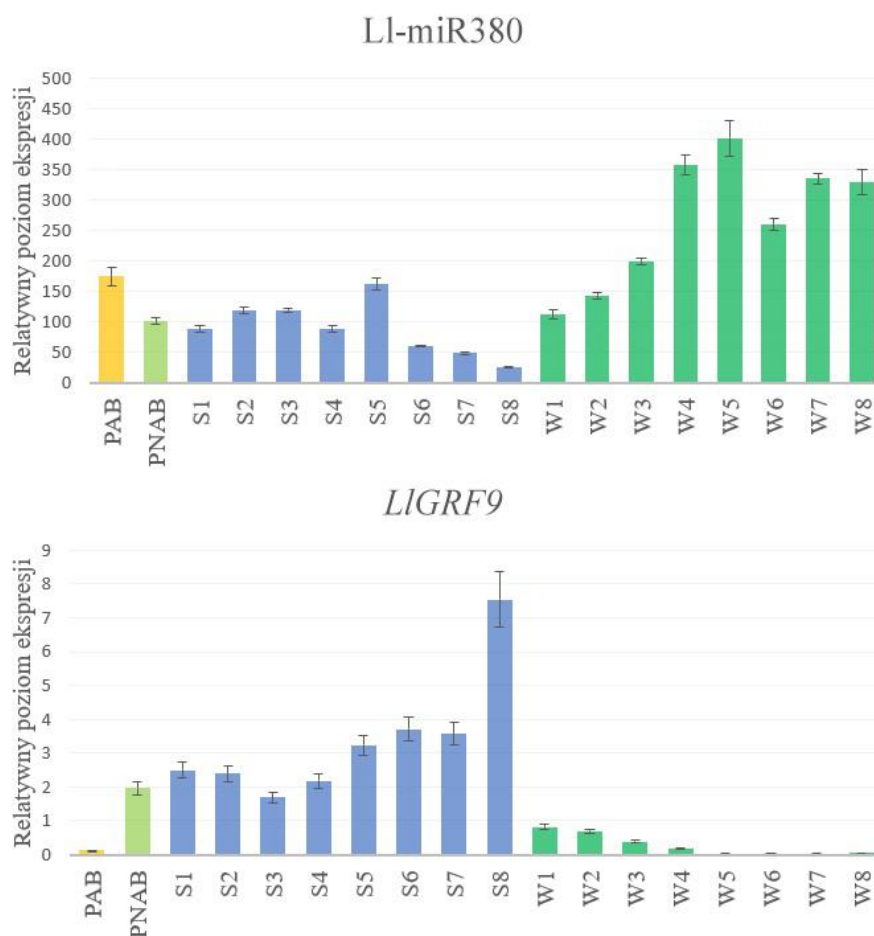
W poniższych podrozdziałach prezentowane są wyniki akumulacji wybranych par miRNA-gen docelowy podczas wzrostu i rozwoju strąków (podrozdział 3.6.1), rozwoju strąków w obrębie poszczególnych pięter kwiatostanu (podrozdziały 3.6.2. i 3.6.3.), rozwoju strąków w warunkach stresu suszy (podrozdziały 3.6.4 i 3.6.5.) oraz w odpowiedzi na traktowanie roślin fitohormonami w liściach (podrozdział 3.6.6.).

Osie Y każdego z wykresów wyrażają relatywny poziom ekspresji ustalony w stosunku do poziomów ekspresji genu referencyjnego, aktywny.

3.6.1. Analiza ekspresji reprezentatywnych par miRNA -gen docelowy w rozwoju strąków

Analizy przeprowadzone zostały na całych strąkach, nasionach oraz ścianach strąków łubinu żółtego rozwijających się w warunkach polowych. Skrótami oznaczono następująco: strąki odpadające (PAB, kolor żółty), strąki nieodpadające (PNAB, kolor jasnozielony) (oba warianty zbierane w całości), stadia rozwojowe nasion (S1-8, kolor niebieski) oraz ścian strąków (W1-8, kolor zielony). Strąki odpadające oraz nieodpadające odpowiadają wczesnym stadiom rozwojowym strąków (stadia 1-2).

a) L1-miR380/miR396 i jego gen docelowy *LIGRF9*



Wykres 1. Ekspresja L1-miR380/miR396 oraz jego genu docelowego, *LIGRF9* w rozwoju strąków. PAB – strąki odpadające, PNAB - strąki nieodpadające, S1-8 - stadia rozwojowe nasion, W1-8 stadia rozwojowe ścian strąków.

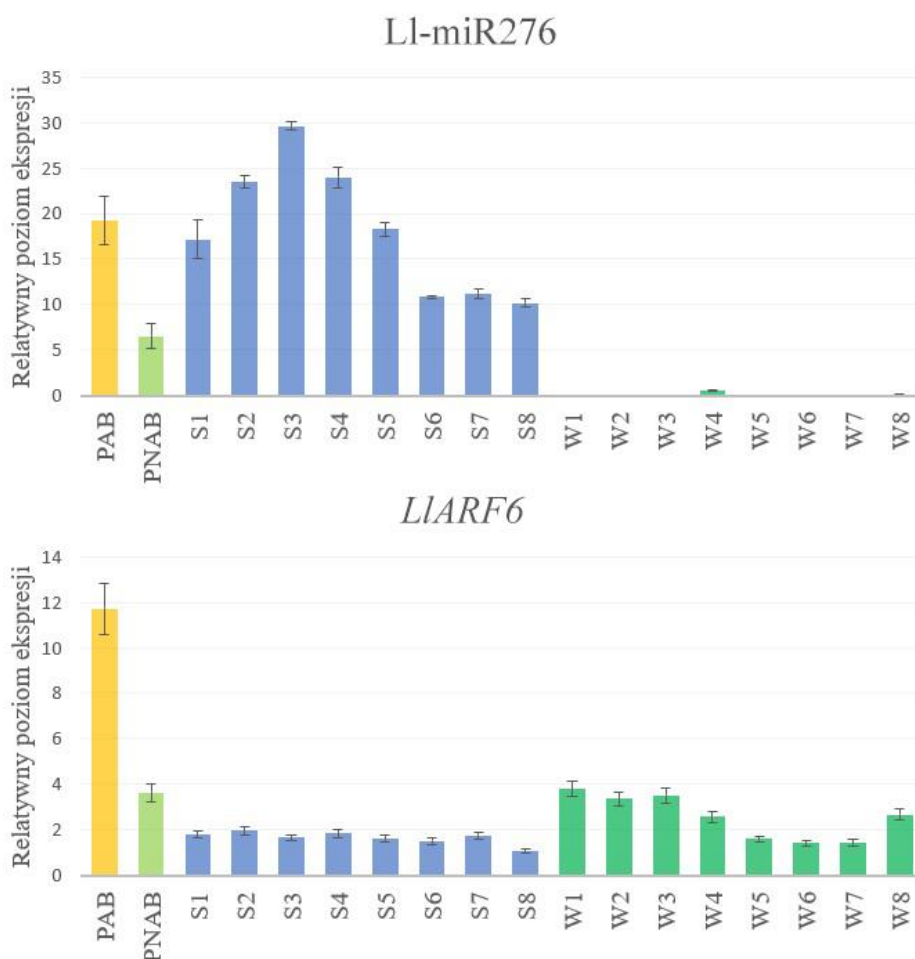
Akumulacja L1-miR380/miR396 w ścianach strąków osiągała dużo wyższy poziom niż w nasionach i jest ona co najmniej 2 razy wyższa w późniejszych fazach rozwoju (od W4-W8). Zaobserwować można również dość znaczną fluktuację ilości miRNA. Zarówno w przypadku ścian strąków jak i nasion najwyższy poziom zanotowano w 5 fazie rozwoju. W przypadku strąków odpadających poziom jest zawyżony zarówno w porównaniu z nasionami, jak i ścianami strąków na początkowych etapach rozwoju.

Poziom transkryptu genu *LIGRF9* utrzymuje się na wysokim, stałym poziomie podczas rozwoju nasion, z wyraźną tendencją zwyżkową w końcowej fazie wzrostu, osiągając najwyższy poziom w fazie S8, w której jest on dwukrotnie wyższy niż w pozostałych fazach. W ścianach strąków natomiast, poziom transkryptu jest na bardzo niskim poziomie z wyraźną tendencją spadkową w trakcie jej rozwoju. Najwyższy poziom

występuje w fazach W1 i W2 ale jest on i tak 3-krotnie niższy od wartości notowanych dla nasion w analogicznym stadium rozwoju. Nie zanotowano obecności transkryptu w fazach od W5-W8. Znaczne obniżenie ekspresji można zaobserwować również w strąkach odpadających.

Analizując zależność ekspresji L1-miR380/miR396 oraz *LIGRF9* można zaobserwować wyraźną tendencję regulacji poziomu genu docelowego przez miRNA. W przypadku ścian strąków zależność tą (wysoki poziom L1-miR380/miR396 skutkujący hamowaniem ekspresji *LIGRF9*) widoczna jest we wszystkich stadiach rozwojowych, natomiast w przypadku nasion trend ten uwidoczni się dopiero w późniejszych etapach rozwoju.

b) L1-miR276/miR167 i jego gen docelowy *LIARF6*



Wykres 2. Ekspresja L1-miR276/miR167 oraz jego genu docelowego, *LIARF6* w rozwoju strąków. PAB – strąki odpadające, PNAB - strąki nieodpadające, S1-8 - stadia rozwojowe nasion, W1-8 stadia rozwojowe ścian strąków.

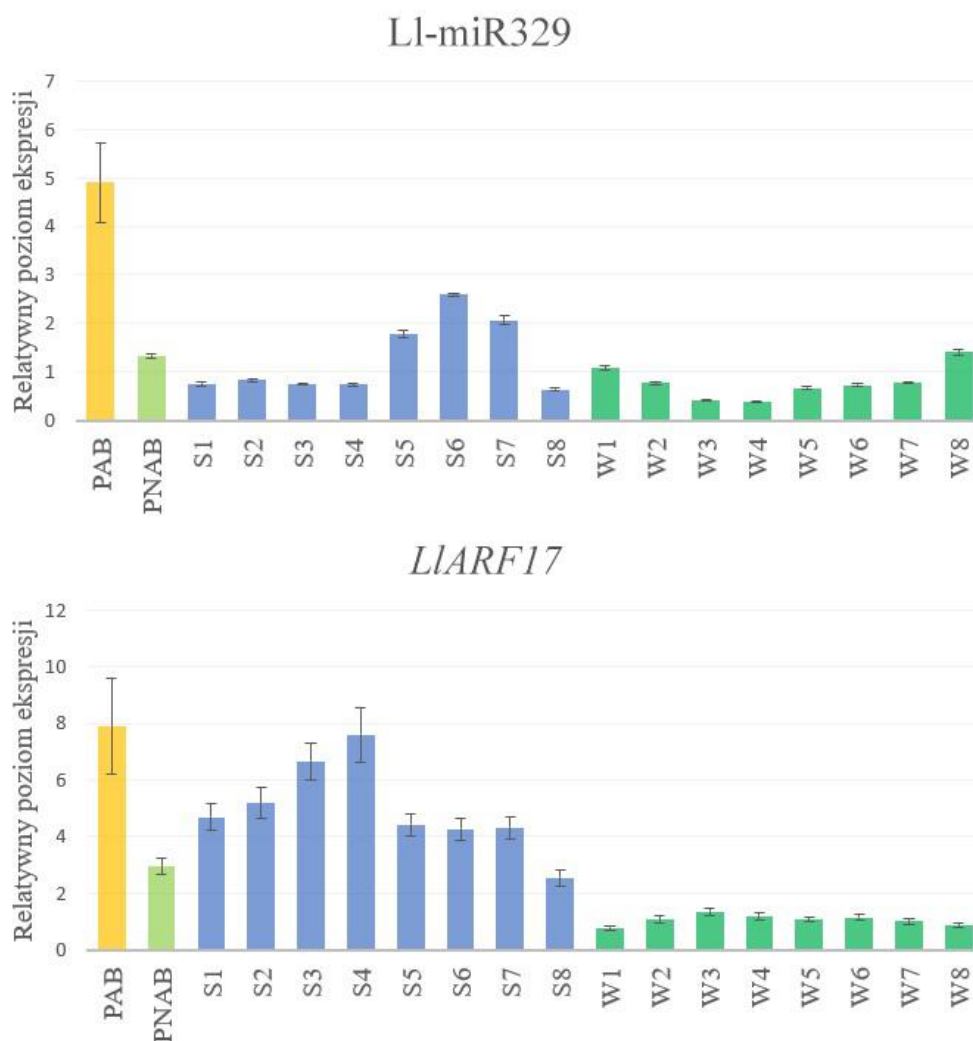
Akumulacja L1-miR276/miR167 praktycznie nie występuje w ścianach strąków (wyjątek stanowią stadia 4 i 8 z minimalnym poziomem akumulacji), podczas gdy w nasionach jest on akumulowany na wysokim poziomie, szczególnie w ich pierwszych fazach wzrostu (S1-S3).

Osiąga on najwyższą akumulację w fazie S3, po czym zaczyna nieznacznie spadać. W strąkach odpadających występuje wyraźnie podwyższony (4-krotnie) poziom akumulacji miRNA w stosunku do strąków nieodpadających.

Ekspresja genu *LIARF6* utrzymuje się na stosunkowo stałym, niskim poziomie w obrębie wszystkich stadiów rozwojowych nasion. W przypadku ścian strąków ekspresja jest wyższa niż w nasionach, oraz 2-krotnie wyższa w początkowych stadiach wzrostowych (W1-W4) w stosunku do stadiów późniejszych (W5-W7). Na szczególną uwagę zasługuje również niezwykle podwyższony poziom ekspresji w strąkach odpadających.

Powyższe dane wskazują na to, że poziom L1-miR276/miR167 ma istotne znaczenie w regulowaniu poziomu transkryptu *LIARF6* w przypadku rozwoju nasion, a jego rola w przypadku rozwoju ścian strąków jest znikoma. Wzrost poziomów zarówno miRNA i jego genu docelowego w odpadających strąkach może wskazywać na specyficzne dla tego fizjologicznego stanu zmiany ekspresji genów w stosunku do prawidłowo rozwijających się strąków.

c) L1-miR329/miR160 i jego gen docelowy *LIARF17*



Wykres 3. Ekspresja L1-miR329/miR160 oraz jego genu docelowego, *LIARF17* w rozwoju strąków. PAB – strąki odpadające, PNAB - strąki nieodpadające, S1-8 - stadia rozwojowe nasion, W1-8 stadia rozwojowe ścian strąków.

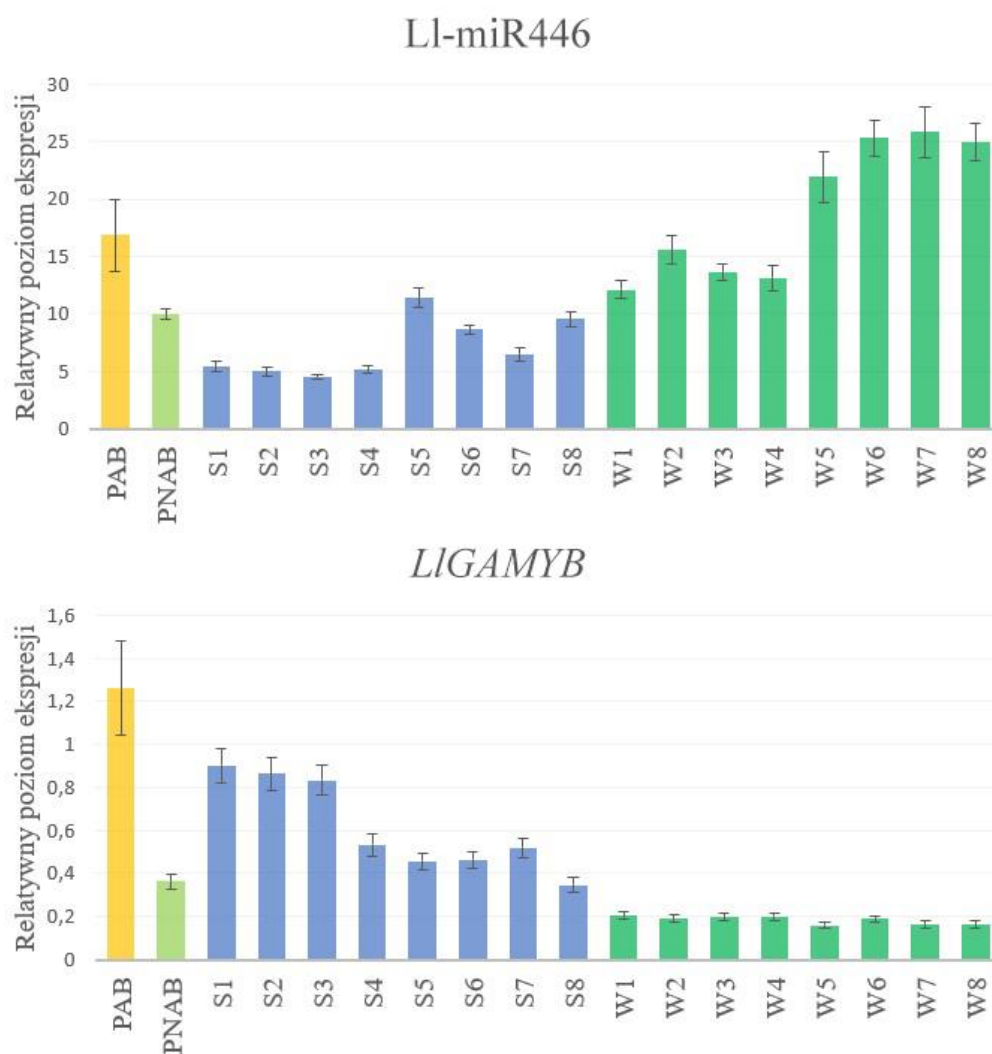
Poziom akumulacji L1-miR329/miR160 jest na względnie stałym poziomie we wczesnych stadiach rozwojowych nasion (S1-S4), wykazując tendencję do zwiększonej akumulacji w drugiej fazie rozwoju, osiągając w fazach S5-S7 2-3 krotny wzrost. W ścianach strąków podwyższony poziom miRNA obserwować można w fazie W1 i W8. Również ilość tego miRNA w strąkach odpadających jest niemal czterokrotnie wyższa niż w strąkach nieodpadających.

Ekspresja genu *LIARF17* wykazuje tendencję rosnącą w pierwszych czterech stadiach rozwojowych nasion (S1-S4), po czym można zaobserwować spadek ekspresji w stadiach S5-S7 i maksymalne obniżenie ekspresji w ostatnim stadium, S8. Ekspresja

w ścianach straków utrzymuje się na stałym, 3-4 krotnie niższym poziomie niż w nasionach. W przypadku straków odpadających (PAB) ekspresja jest wyraźnie podwyższona i jest dwukrotnie wyższa niż w przypadku straków nieodpadających (PNAB).

Korelację współdziałania mechanizmu regulacyjnego miRNA-gen docelowy można zaobserwować głównie w przypadku nasion gdzie występują wyraźne antagonistyczne tendencje wzrostowo/spadkowe. Podobnie jak w przypadku L1-miR276/miR167 i *LIARF6*, w strakach odpadających poziom ekspresji obu tych sekwencji jest wyraźnie podwyższony, co może sugerować istotne znaczenie zmian ekspresji tych genów w tym typie tkanek.

d) L1-miR446/miR159 i jego gen docelowy *LIGAMYB*



Wykres 4. Ekspresja L1-miR446/miR159 oraz jego genu docelowego, *LIGAMYB* w rozwoju straków. PAB – strąki odpadające, PNAB - strąki nieodpadające, S1-8 - stadia rozwojowe nasion, W1-8 stadia rozwojowe ścian straków.

Wzorzec akumulacji Ll-miR446/miR159 można podzielić zasadniczo na dwa etapy, w stadiach rozwojowych 1-4 zarówno w nasionach jak i ścianach strąków obserwowano względnie niższą ekspresję niż w stadiach 5-8, gdzie jest ona 2-krotnie wyższa. Strąki odpadając również charakteryzowały się podwyższoną ekspresją w stosunku do strąków nieopadających.

Poziom ekspresji genu *LIGAMYB* w ścianach strąków nie wykazuje zmian w poziomie ekspresji i utrzymuje się na stałym, niskim poziomie we wszystkich stadiach rozwojowych. Natomiast w nasionach wykazuje szczególnie wysoki poziom podczas początkowych stadiów rozwoju, po czym jego ekspresja ulega lekkiemu obniżeniu w całym obserwowalnym okresie rozwoju. Poziom transkrypcji w odpadających strąkach jest 4-krotnie wyższy w stosunku do strąków nieopadających.

Zależności pomiędzy ekspresją Ll-miR446/miR159 a *LIGAMYB* zaobserwować można w szczególności w nasionach, gdzie widoczna jest klasyczna odwrotna tendencja w akumulacji miRNA względem genu docelowego. W przypadku ścian strąków podwyższenie poziomu miRNA nie koreluje ze spadkiem ekspresji transkrypcji *LIGAMYB*.

3.6.2. Analiza ekspresji wybranych par miRNA-gen docelowy w rozwoju strąków w zależności od położenia na okółkach kwiatostanu

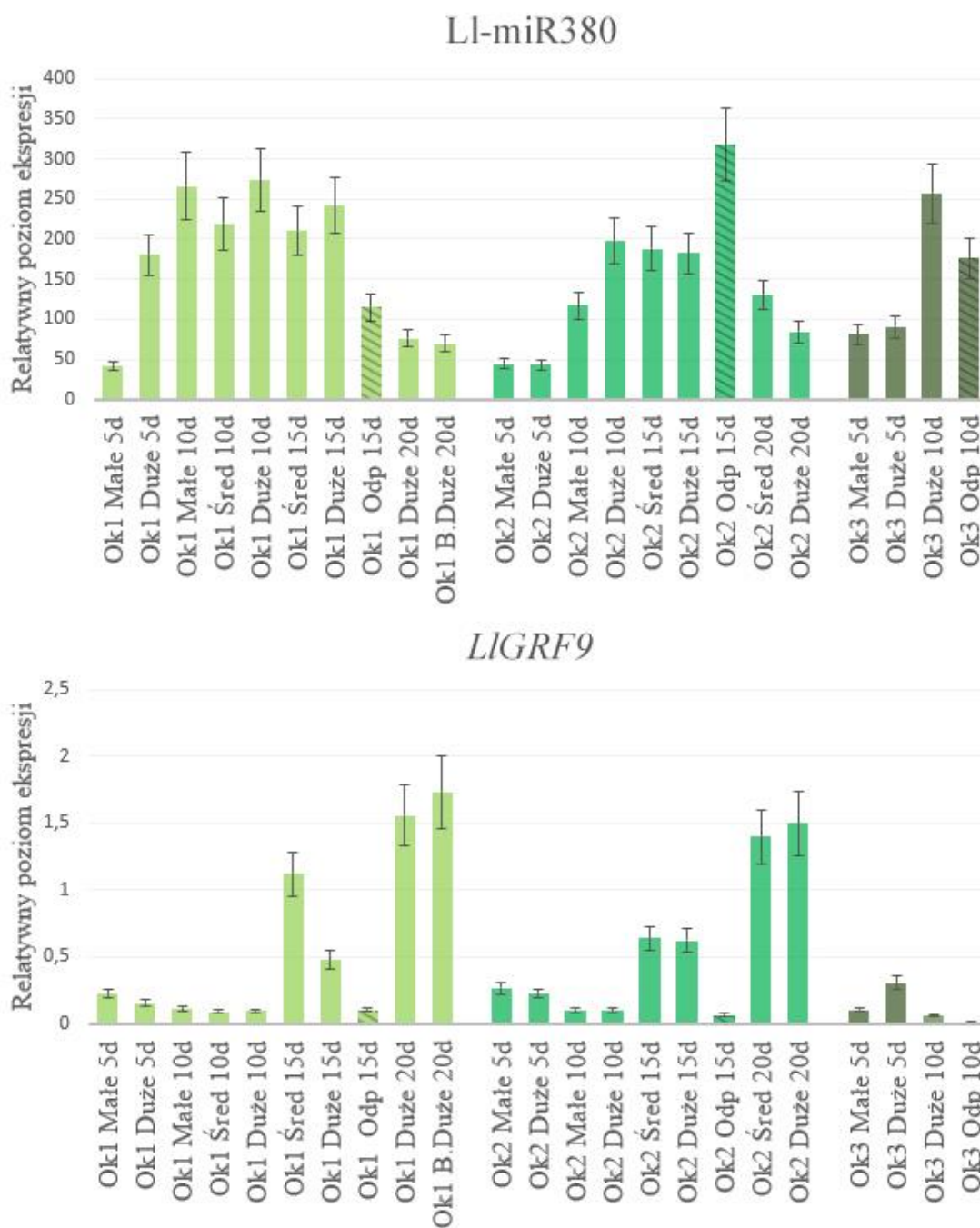
Lokalizacja rozwijających się w obrębie kwiatostanu strąków jest ściśle skorelowana z prawdopodobieństwem osiągnięcia przez nie pełnego rozwoju. Strąki zawiązane na wyższych (młodszych) piętrach kwiatostanu wykazują często cechy zahamowanego wzrostu i są bardziej podatne na odpadanie w stosunku do strąków rosnących na niższych (starszych) okółkach. Celem niniejszych analiz było zbadanie, czy zmiany ekspresji wybranych par miRNA-gen docelowy różnią się w strąkach pomiędzy poszczególnymi piętrami kwiatostanu oraz sprawdzenie, czy podwyższone ryzyko odpadania strąków koreluje ze zmianami wzorców tej ekspresji.

Wszystkie poniższe analizy RT-qPCR przeprowadzone zostały na całych strąkach zebranych z różnych okółków kwiatostanu, po upływie określonej ilości dni (5, 10, 15 lub 20) od rozkwitu (DAB, ang. Days After Blooming). Rośliny wyselekcjonowano do badań tak, aby na każdym okołku (będącym jednocześnie wariantem badawczym,

odpowiednio Ok1, Ok2 i Ok3) kwiaty znajdowały się w 3 stadium rozwojowym charakteryzującym się otwartym kwiatem oznaczającym zapylenie i zapłodnienie (Glazińska i in., 2019; Glazińska i in., 2020). Należy tutaj zaznaczyć, iż z każdej grupy roślin zbierane były strąki wyłącznie z oznaczonego okółka. Dzień oznaczenia roślin był dniem zero, od którego odliczano odpowiednio 5, 10, 15 oraz 20 dni, po których zbierano strąki do analiz.

Zbiorze podlegały strąki z trzech okółków (oznaczone na wykresach Ok1-Ok3, gdzie okółek 1, będący najstarszym zaznaczono na kolor jasnozielony, okółek 2 – zielony, okółek 3 - oliwkowy) po upływie 5, 10, 15 oraz 20 dni od zakwitnięcia (oznaczone na wykresach odpowiednio 5d, 10d, 15d oraz 20d). Dodatkowo, ze względu na pokrój strąków przy każdorazowym zbiorze zostały one sklasyfikowane jako małe, średnie (Śred), duże lub bardzo duże (B Duże). Dodatkowo, strąki wykazujące cechy odpadania zostały zbierane jako odrębny wariant (Odp – strąki odpadające, zaznaczone dodatkowo liniami w obrębie każdego okółka). Ze względu na zróżnicowane tempo rozwoju strąków pomiędzy okółkami, warianty wielkościowe mogą się różnić w obrębie poszczególnych dni.

a) L1-miR380/miR396 i jego gen docelowy *LIGRF9*



Wykres 5. Ekspresja L1-miR380/miR396 oraz jego genu docelowego, *LIGRF9* w rozwoju strąków na różnych okółkach kwiatostanu. Ok1 – okółek pierwszy, Ok2 – okółek drugi, Ok3 – okółek trzeci, Odp – strąki odpadające. Rozmiar strąków: B. duże (bardzo duże), Duże, Śred – średnie, Małe. 5d, 10d, 15d, 20d – ilość dni od zakwitnięcia.

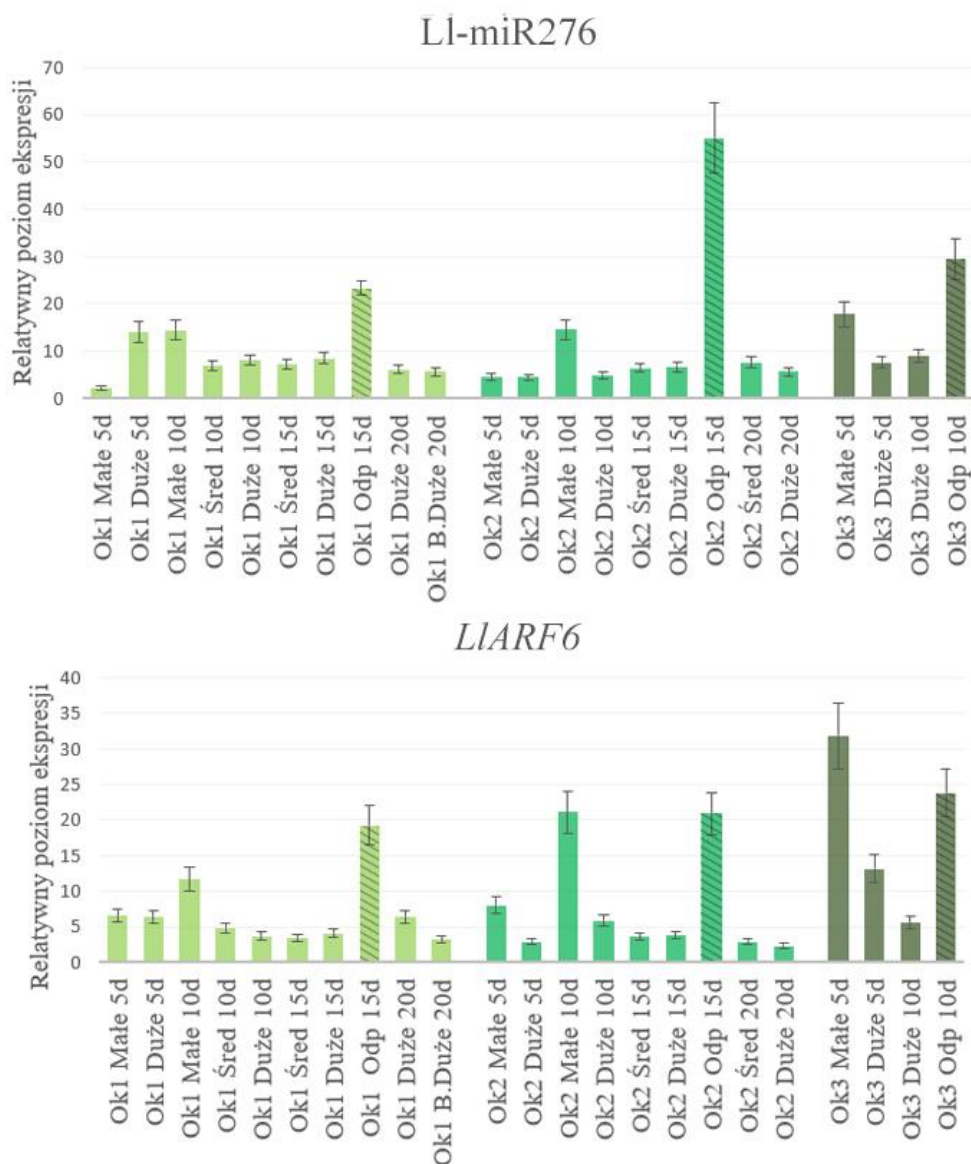
W przypadku wszystkich okółków profil ekspresji L1-miR380/miR396 zachowuje ten sam wzór. W niewielkich młodych strąkach (5 dni) jest on niski, po czym następuje jego wzrost w okresie od 10 do 15 dni, a ostatecznie akumulacja miRNA zaczyna spadać. Strąki

odpadające nie wykazują wyraźnych tendencji, w przypadku okółka pierwszego poziom miRNA jest wyższy niż w prawidłowo rozwijających się strąkach, natomiast w drugim okółku ma miejsce odwrotna sytuacja. Godnym uwagi jest to, że w okółku trzecim tendencja jest taka sama jak w okółku pierwszym, jednak z widocznie mniejszą różnicą w poziomie akumulacji transkryptu.

Ekspresja *LIGRF9* posiada odmienny wzorzec ekspresji, cechujący się akumulacją tego transkryptu głównie w późniejszych fazach wzrostu strąków (głównie 15 oraz 20 dni). Widoczna jest wyraźna tendencja do spadku akumulacji tego transkryptu w strąkach odpadających, oraz strąkach w obrębie trzeciego okółka.

W przypadku okółka pierwszego, zaobserwować można wyraźne działanie LI-miR380/miR396 powodującego zmniejszenie ekspresji *LIGRF9* we wczesnych stadiach rozwoju strąków. Trend ten jest jednak najbardziej uwidoczniiony w przypadku strąków odpadających z drugiego oraz trzeciego okółka. Ponadto, w okółku pierwszym i drugim widoczna jest tendencja do spadku poziomu miRNA skorelowana z nagłym wzrostem poziomu *LIGRF9* szczególnie w dużych strąkach podczas 20 dnia eksperymentu.

b) L1-miR276/miR167 i jego gen docelowy *LIARF6*



Wykres 6. Ekspresja L1-miR276/miR167 oraz jego genu docelowego, *LIARF6* w rozwoju strąków na różnych okółkach kwiatostanu. Ok1 – okółek pierwszy, Ok2 – okółek drugi, Ok3 – okółek trzeci, Odp – strąki odpadające. Rozmiar strąków: B. duże (bardzo duże), Duże, Śred – średnie, Małe. 5d, 10d, 15d, 20d – ilość dni od zakwitnięcia.

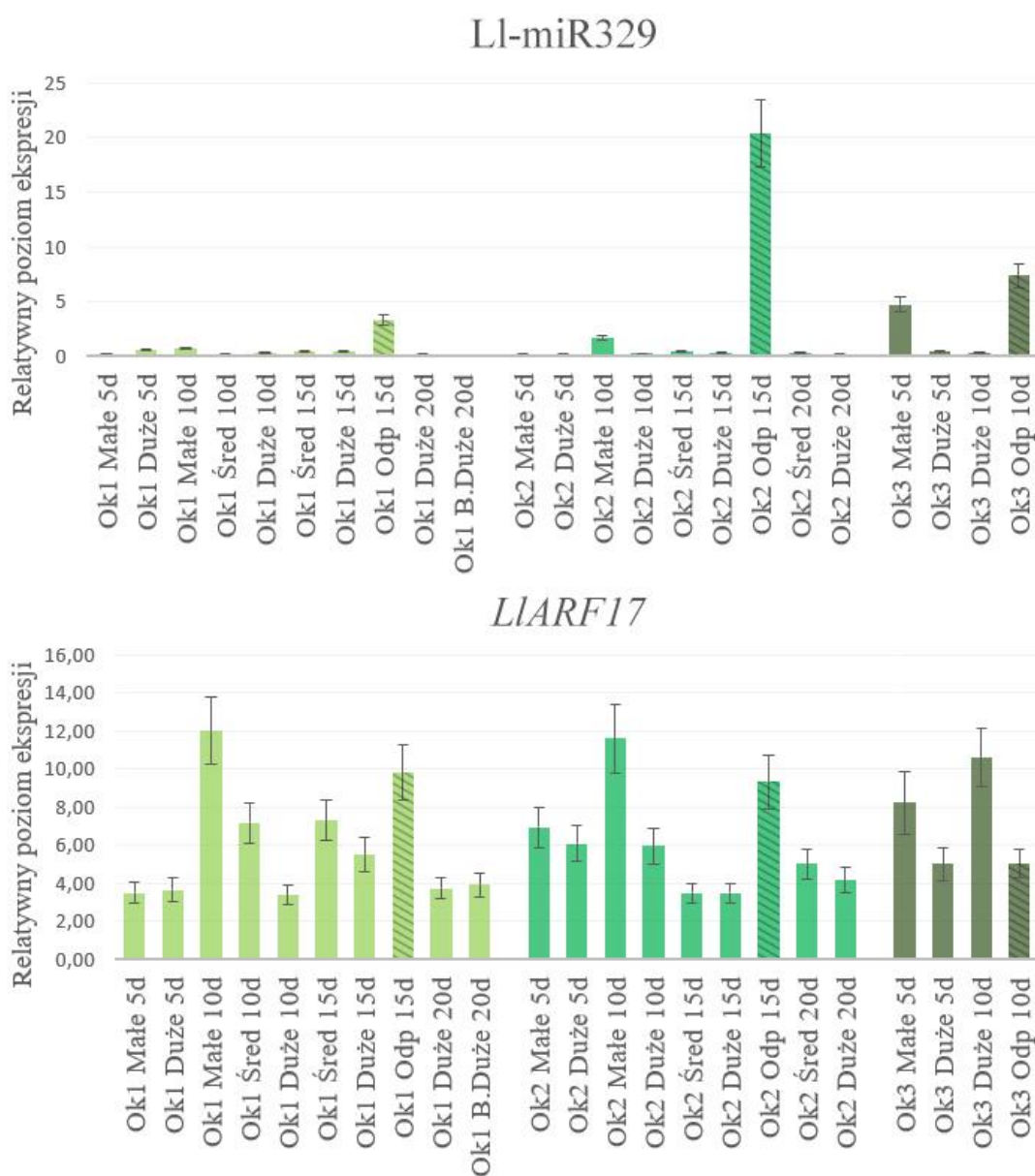
Poziom akumulacji L1-miR276/miR167 utrzymuje się na niskim poziomie, z wyjątkiem strąków odpadających oraz małych strąków w obrębie drugiego oraz trzeciego okółka. Podwyższony poziom można zaobserwować również w dużych młodych (5 dni) strąkach na pierwszym okółku, co stanowi swoisty wyjątek od obserwowanej reguły.

W przypadku akumulacji transkryptu *LIARF6*, rozkład wzorca ekspresji jest zaskakująco podobny do miRNA, cechując się podwyższonym poziomem przede wszystkim

w strąkach odpadających, oraz małych młodych strąkach (5-10 dni) w obrębie wszystkich okółków.

Powyższe obserwacje nie pozwalają na stwierdzenie istotnych zależności pomiędzy poziomem L1- miR276/miR167 a *LIARF6* w żadnym z okółków. Podwyższony poziom ekspresji obu tych genów (a w szczególności miRNA) w strąkach odpadających może natomiast sugerować istotne zmiany w obrębie procesów komórkowych zachodzących w tych tkankach.

c) L1-miR329/miR160 i jego gen docelowy *LIARF17*



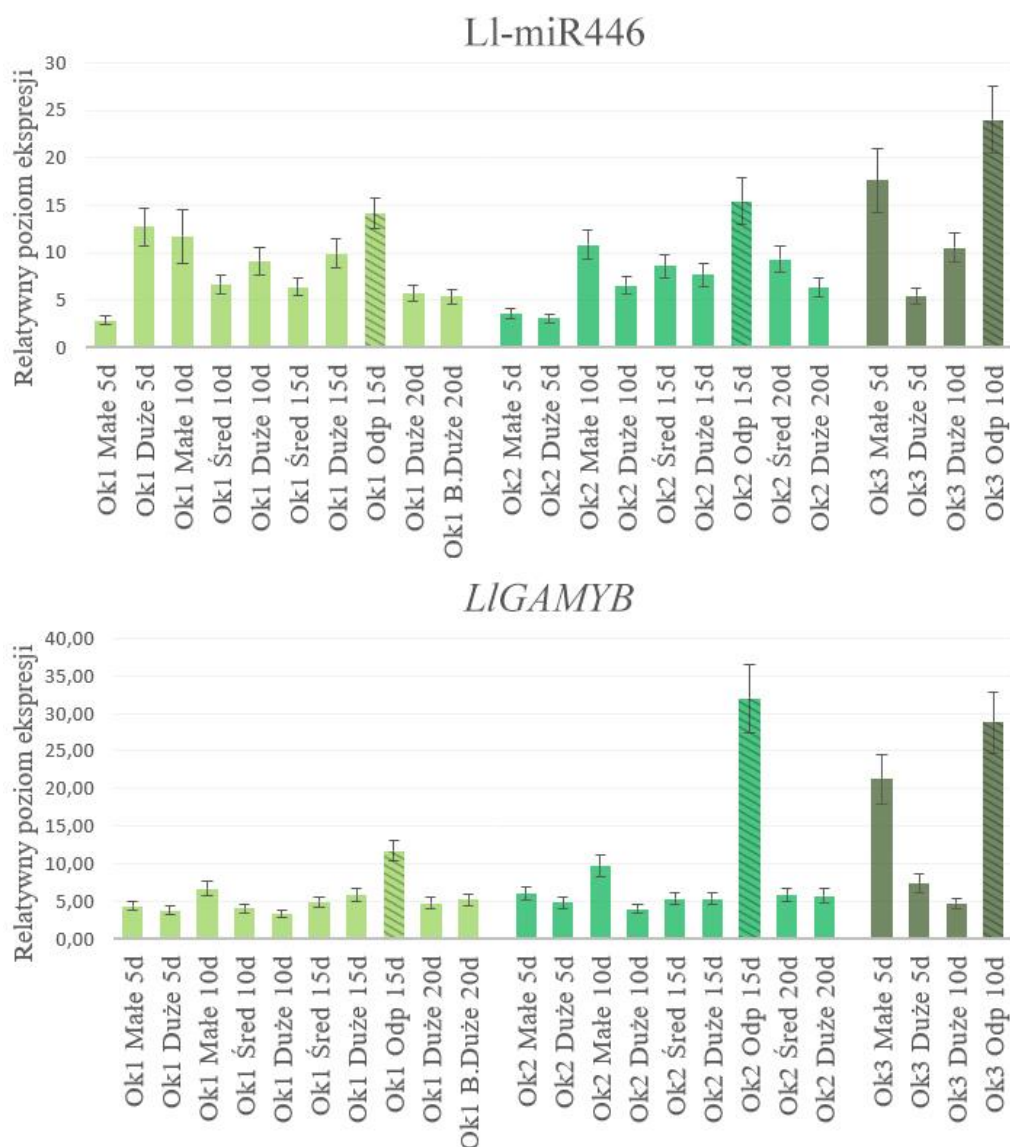
Wykres 7. Ekspresja L1-miR329/miR160 oraz jego genu docelowego, *LIARF17* w rozwoju strąków na różnych okółkach kwiatostanu. Ok1 – okółek pierwszy, Ok2 – okółek drugi, Ok3 – okółek trzeci, Odp – strąki odpadające. Rozmiar strąków: B. duże (bardzo duże), Duże, Śred – średnie, Małe. 5d, 10d, 15d, 20d – ilość dni od zakwitnięcia.

Akumulacja L1-miR329/miR160 ma miejsce tylko w strąkach odpadających oraz małych strąkach z drugiego oraz trzeciego okółka. W pozostałych próbach ekspresja jest na bardzo niskim, niemal niewykrywalnym poziomie.

Poziom ekspresji genu *LIARF17* ma dynamiczny charakter w obrębie wszystkich trzech okółków. Cechami wspólnymi prób z wszystkich trzech pięter kwiatostanu jest podwyższona ekspresja w małych strąkach (10 dni) w przypadku okółka pierwszego i drugiego oraz dużych strąkach (10 dni) z okółka trzeciego, spadek poziomu ekspresji w starszych tkankach, jak również podwyższony poziom w strąkach odpadających. W ostatnim przypadku tendencja ta nie jest jednak zachowana w obrębie okółka trzeciego.

Ze względu na obecność transkryptów L1-miR329/miR160 niemal wyłącznie w strąkach odpadających, trudno jest wskazać korelację jego ekspresji z *LIARF17*, którego poziom jest podwyższony zarówno w strąkach odpadających, jak i strąkach w których miRNA jest niemal nieobecny, jak np.: małe oraz duże 10-dniowe strąki z pierwszego i drugiego okółka.

d) Ll-miR446/miR159 i jego gen docelowy *LIGAMYB*



Wykres 8. Ekspresja Ll-miR446/miR159 oraz jego genu docelowego, *LIGAMYB* w rozwoju strąków na różnych okółkach kwiatostanu. Ok1 – okółek pierwszy, Ok2 – okółek drugi, Ok3 – okółek trzeci, Odp – strąki odpadające. Rozmiar strąków: B. duże (bardzo duże), Duże, Śred – średnie, Małe. 5d, 10d, 15d, 20d – ilość dni od zakwitnięcia.

W przypadku Ll-miR446/miR159, trudno jest jednoznacznie określić specyficzny wzorzec akumulacji zarówno pomiędzy okółkami, jak również podczas poszczególnych etapów rozwoju. Na pierwszy plan wysuwa się podwyższona ekspresja w strąkach odpadających, zwłaszcza w obrębie drugiego i trzeciego okółka, jednak różnice te są często niewielkie w stosunku do strąków rozwijających się prawidłowo.

Ekspresja genu *LIGAMYB* utrzymuje się na stałym poziomie w obrębie wszystkich okółków, nie zmieniając się również w istotny sposób wraz ze wzrostem strąków. Podwyższony poziom ekspresji zaobserwować można jedynie w strąkach odpadających oraz małych strąkach (5 dni) pochodzących z trzeciego okółka, co biorąc pod uwagę ich zmniejszone szanse na ukończenie wzrostu, może sugerować ich potencjalną tendencję do odpadnięcia.

Określenie wpływu L1-miR446/miR159 na regulację poziomu transkryptu *LIGAMYB* jest trudne ze względu na fakt, iż poziom jego ekspresji jest niezwykle stabilny, pomimo zmiennego profilu ekspresji miRNA. Warte podkreślenia jest to, że jest to sytuacja odwrotna w stosunku do opisanych wcześniej L1-miR329/miR160 i *LIARF17*.

3.6.3. Analiza ekspresji wybranych par miRNA-gen docelowy podczas rozwoju strąków w różnych okółkach kwiatostanu z podziałem na nasiona i ściany strąków

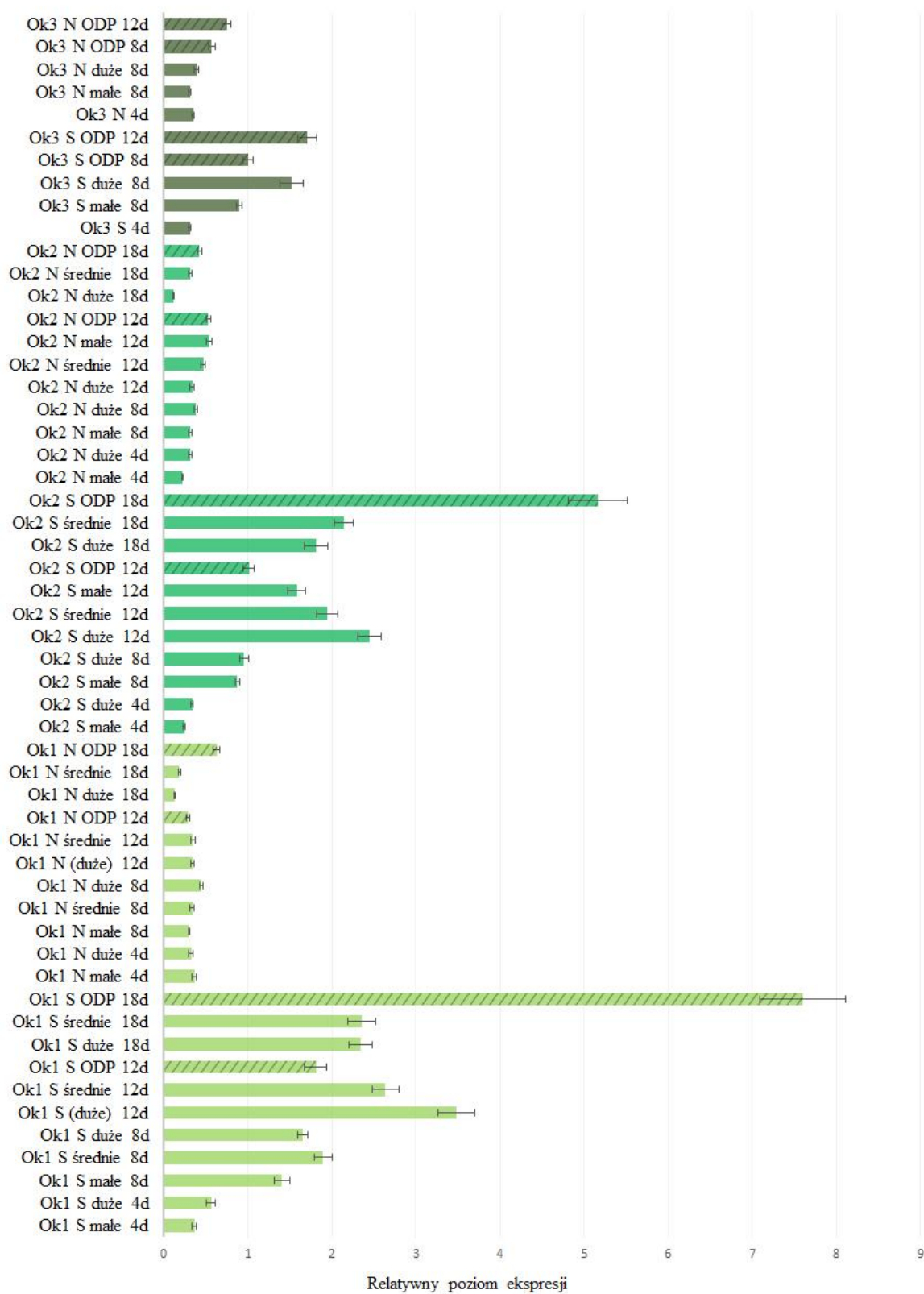
Wykonane analizy RT-qPCR ekspresji wybranych par miRNA – gen docelowy pokazały występowanie odmiennych tendencji w akumulacji zarówno miRNA jak i genów docelowych w obrębie poszczególnych pięter kwiatostanu łubinu żółtego. Jednakże wiedząc, że ekspresja tych genów może również znacząco różnić się pomiędzy poszczególnymi tkankami, postanowiono wykonać dodatkowe doświadczenie wydzielając ze strąków nasiona i poddając je osobnym analizom, równoległe ze ścianami strąków.

Analizy przeprowadzone zostały na strąkach zebranych z upraw polowych pochodzących z 2020 roku. Rośliny z których pobierano materiał wytypowano identycznie jak w przypadku poprzedniego eksperymentu tego typu (rozdział 3.6.2.). Jednakże, okres pomiędzy zbiorami poszczególnych strąków został skrócony z pięciodniowych do czterodniowych odstępów pomiędzy trzema pierwszymi zbiorami i 6-dniowego odstępu pomiędzy zbiorem trzecim i czwartym. Zmiana ta, obok podziału strąków na nasiona i ściany strąków, miała na celu lepsze uwidocznienie zmian zachodzących w pierwszych etapach rozwoju strąków. Do analiz wykorzystano dwie „pary” analizowanych poprzednio sekwencji, L1-miR380/miR396 – *LIGRF9* oraz L1-miR329/miR160 – *LIARF17* oraz L1-miR169 – *LI-NF-YA5*. Poszczególne okółki oznaczono na wykresie odpowiednimi kolorami (analogicznie do wykresów w podrozdziale 3.6.2.): okółek 1 (jasnozielony), okółek 2 (zielony), okółek 3 (oliwkowy). Nazwy prób zawierają numer okółka, typ tkanki:

nasiona (N), ściany strąków (S), względną wielkość strąków (małe, duże, średnie). Nasiona oraz ściany strąków pochodzące ze strąków odpadających (ODP) zostały dodatkowo wyróżnione liniami poprzecznymi.

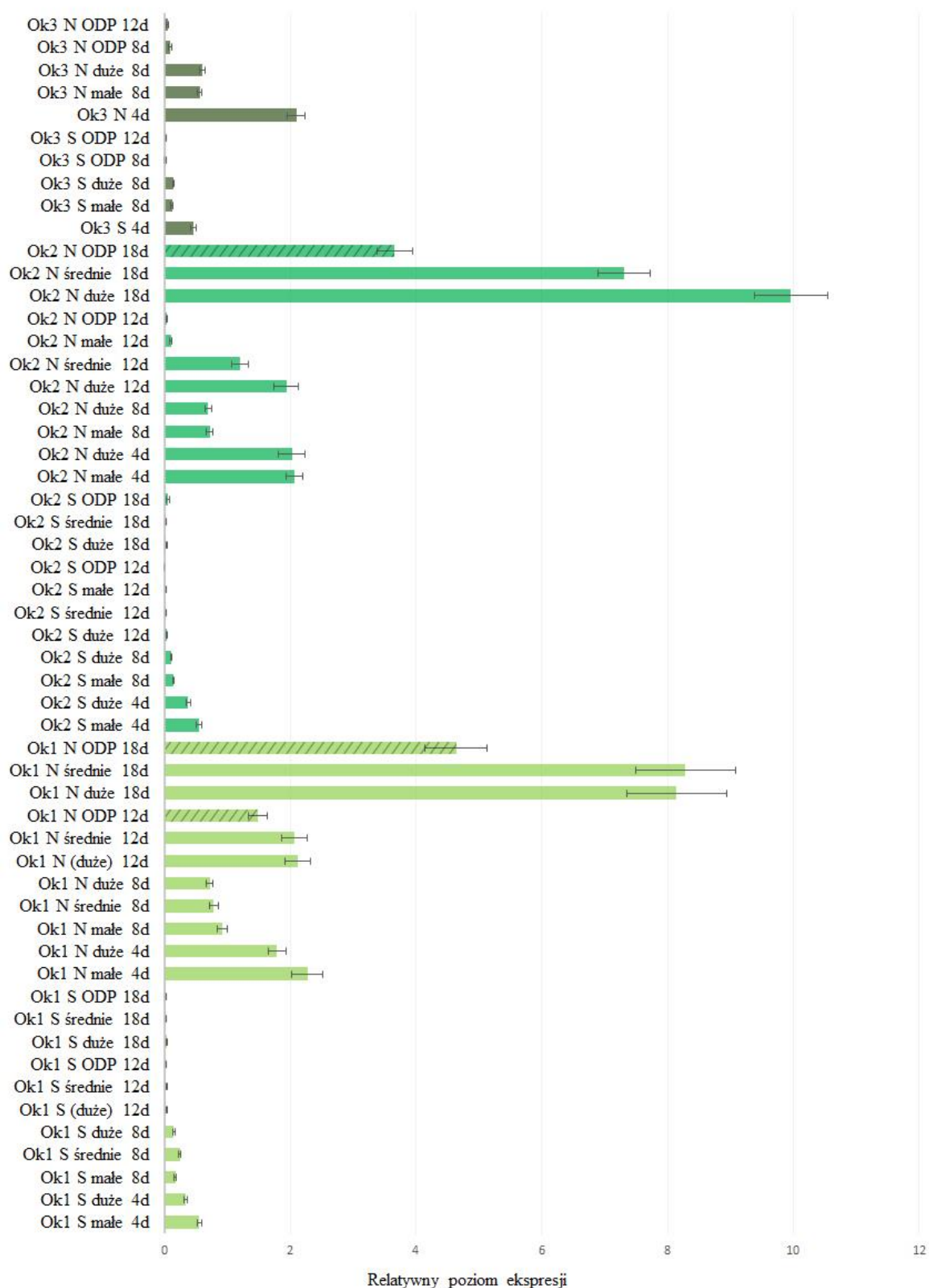
a) L1-miR380/miR396 i jego gen docelowy *LIGRF9*

L1-miR380



Wykres 9. Ekspresja L1-miR380/miR396 w ścianach strąków oraz nasionach na poszczególnych okółkach kwiatostanu. Ok1 – okółek pierwszy, Ok2 – okółek drugi, Ok3 – okółek trzeci, N – nasiona, S – ściany strąków ODP – strąki opadające. Rozmiar strąków: duże, średnie, małe. 4d, 8d, 12d, 18d – ilość dni od zakwitnięcia.

LIGRF9



Wykres 10. Ekspresja genu *LIGRF9* w ścianach strąków oraz nasionach na poszczególnych okółkach kwiatostanu. Ok1 – okółek pierwszy, Ok2 – okółek drugi, Ok3 – okółek trzeci, N – nasiona, S – ściany strąków ODP – strąki odpadające. Rozmiar strąków: duże, średnie, małe. 4d, 8d, 12d, 18d – ilość dni od zakwitnięcia.

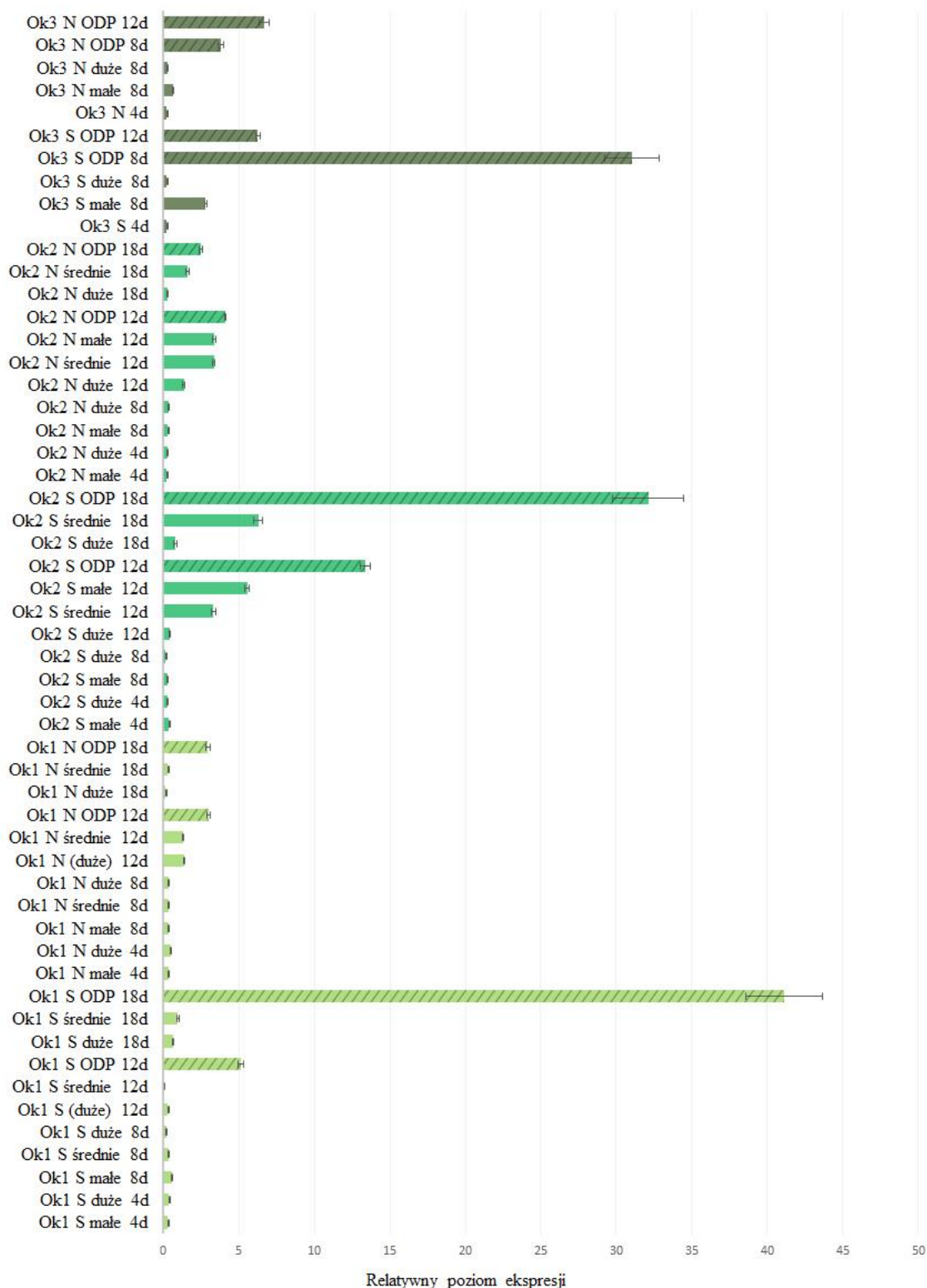
W przypadku ekspresji L1-miR380/miR396 (wykres 9) zaobserwować można wyraźną tendencję do akumulacji tego miRNA w ścianach strąków, ze szczególnym uwzględnieniem prób, które pochodzą ze strąków odpadających, gdzie poziom ekspresji jest kilkukrotnie wyższy w stosunku do strąków rozwijających się prawidłowo. Interesująco, ogólny poziom ekspresji L1-miR380 maleje wraz ze zwiększaniem się wysokości próbek w obrębie kwiatostanu, zachowując jednak identyczne tendencje w obrębie każdego z okółków.

Gen *LIGRF9* wykazuje ekspresję głównie w nasionach (wykres 10), szczególnie w dużych w obrębie zarówno pierwszego jak i drugiego okółka. Ekspresja w ścianach strąków jest o wiele niższa, ponadto wraz ze wzrostem strąków spada do zera. W okółku pierwszym oraz drugim kwiatostanu poziom *LIGRF9* jest wysoki w nasionach strąków odpadających nie osiąga on jednak poziomu zbliżonego do tego obserwowanego w prawidłowo rozwijających się nasionach. Natomiast odwrotna tendencja ma miejsce w okółku trzecim, gdzie ekspresja w nasionach strąków odpadających jest niższa niż ta obserwowana w nasionach strąków nieodpadających.

Tendencje te pokrywają się z tymi obserwowanymi w całych strąkach, gdzie poziom akumulacji zarówno *LIGRF9* jak i L1-miR380/miR396 wzrastał wraz z dojrzewaniem strąków. W obecnych analizach widać jednak, że poziom akumulacji L1- miR380/miR396 jest zdecydowanie większy w ścianach strąków, podczas gdy jego gen docelowy jest akumulowany głównie w nasionach. Obserwacje te znajdują również odzwierciedlenie w wynikach badań ekspresji w rozwoju strąków.

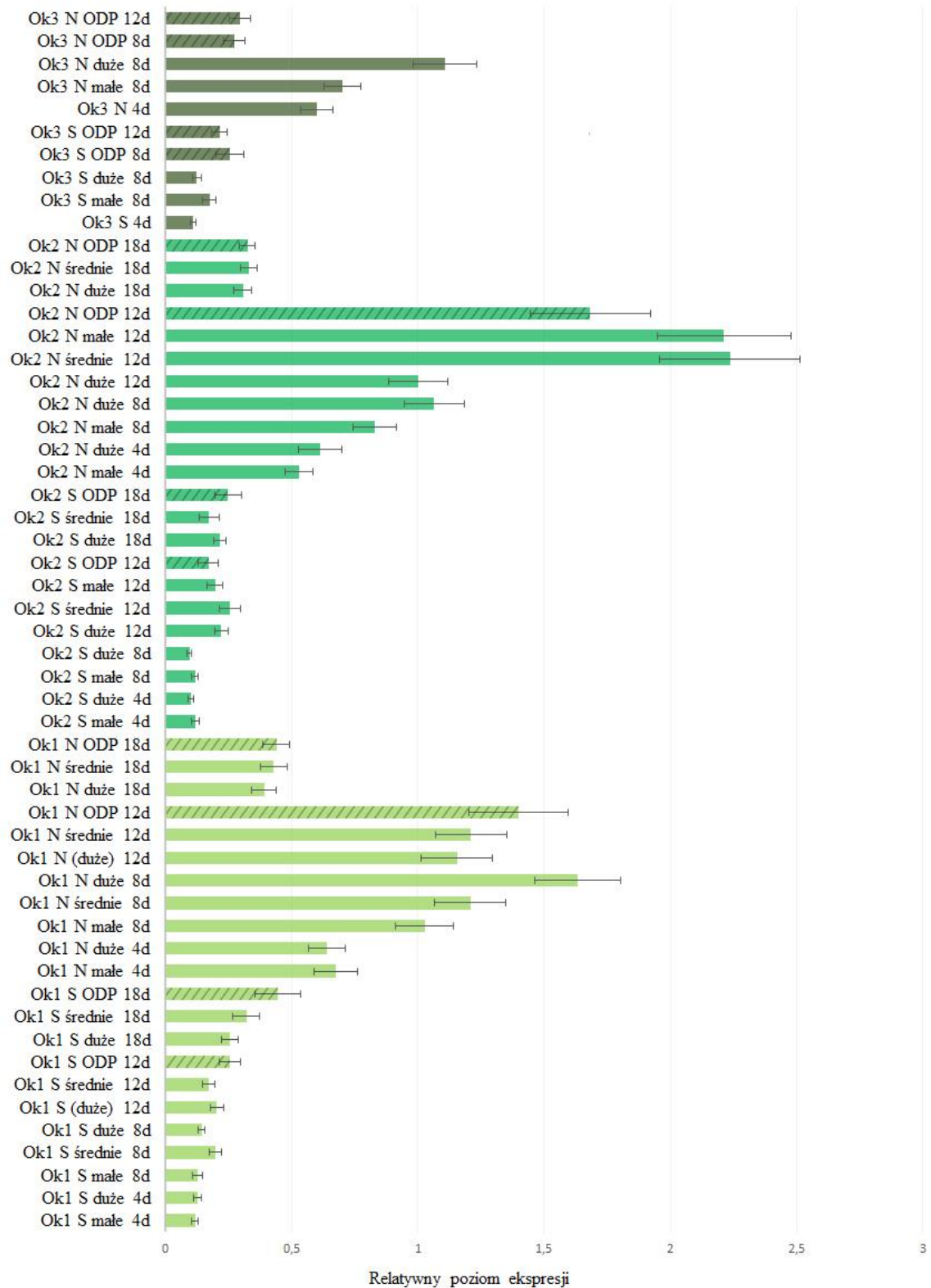
b) Ll-miR329/miR160 i jego gen docelowy *LIARF17*

Ll-miR329



Wykres 11. Ekspresja Ll-miR329/miR160 w ścianach strąków oraz nasionach na poszczególnych okółkach kwiatostanu. Ok1 – okółek pierwszy, Ok2 – okółek drugi, Ok3 – okółek trzeci, N – nasiona, S – ściany strąków ODP – strąki odpadające. Rozmiar strąków: duże, średnie, małe. 4d, 8d, 12d, 18d – ilość dni od zakwitnięcia.

LIARF17



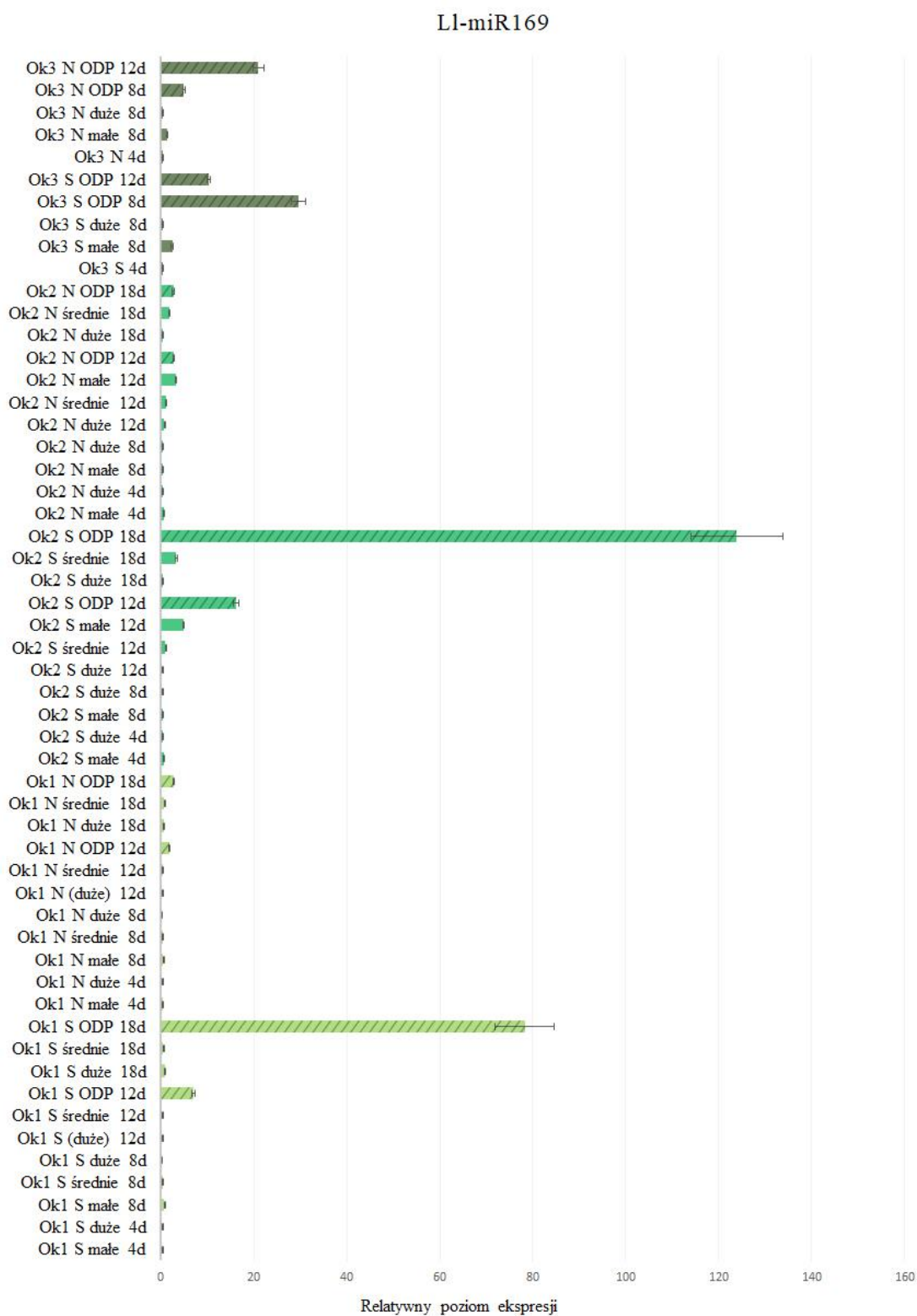
Wykres 12. Ekspresja genu *LIARF17* w ścianach strąków oraz nasionach na poszczególnych okółkach kwiatostanu. Ok1 – okółek pierwszy, Ok2 – okółek drugi, Ok3 – okółek trzeci, N – nasiona, S – ściany strąków ODP – strąki odpadające. Rozmiar strąków: duże, średnie, małe. 4d, 8d, 12d, 18d – ilość dni od zakwitnięcia.

Akumulację L1-miR329/miR160 (wykres 11) można zaobserwować praktycznie tylko w ścianach strąków odpadających. Niewielkie poziom ekspresji można też zaobserwować w nasionach strąków odpadających oraz w późniejszych etapach rozwoju zarówno nasion jak i ścian strąków, są to jednak wartości nieznaczne. Obserwacje te pokrywają się z wynikami uzyskanymi z całych strąków, nową informację stanowi jednak tutaj specyficzność tkankowa ekspresji tego miRNA.

Ekspresja transkryptu *L1ARF17* (wykres 12) w ścianach strąków jest na relatywnie na niskim i stabilnym poziomie zarówno pomiędzy okółkami, jak i w podczas całego rozwoju strąków. W przypadku nasion ekspresja wzrasta z wiekiem osiągając maksimum w 12 dniu, a następnie, spada w najstarszych nasionach. W trzecim okółku poziom ekspresji w nasionach strąków odpadających jest wyraźnie obniżony w stosunku do nasion strąków prawidłowo rozwijających się. Należy zwrócić uwagę że, ogólny poziom ekspresji zdaje się być lekko podwyższony w okółku drugim w stosunku do okółka pierwszego, natomiast w okółku trzecim obserwować można wyraźny spadek ekspresji.

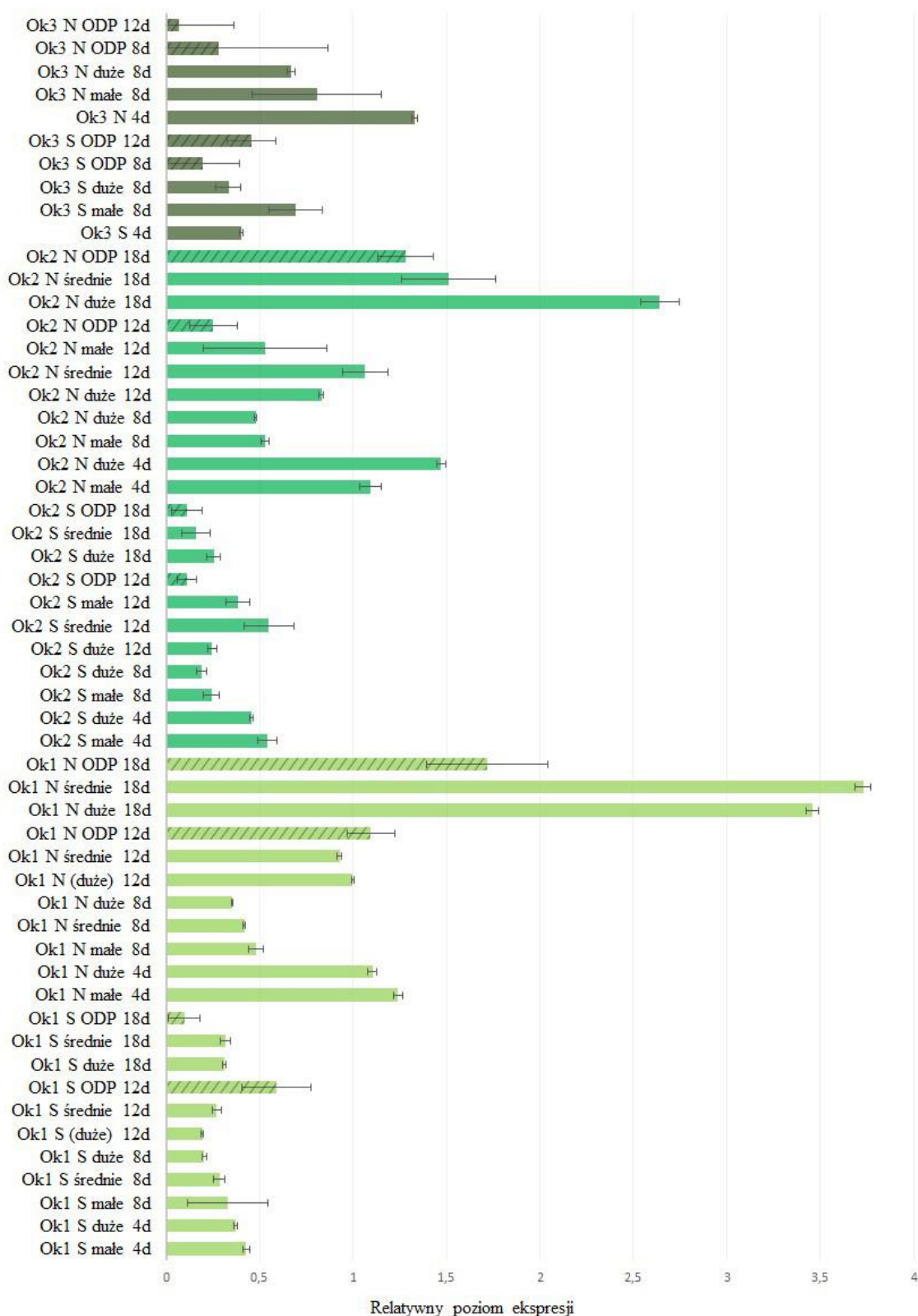
Identyczne zmiany we wzorcach ekspresji zarówno L1-miR329/miR160 jak i jego genu docelowego obserwować można w poprzednim eksperymencie (podrozdział 3.6.2., wykres 7), jednak rozdział próbna nasiona oraz ściany strąków pozwolił na uzyskanie dodatkowych informacji. pokazujących, iż L1-miR329/miR160 ulega akumulacji głównie w tkankach owocni, natomiast *L1ARF17* w nasionach.

c) L1-miR169 oraz jego gen docelowy *LINF-YA5*



Wykres 13. Ekspresja L1-miR169 w ścianach strąków oraz nasionach na poszczególnych okółkach kwiatostanu. Ok1 – okółek pierwszy, Ok2 – okółek drugi, Ok3 – okółek trzeci, N – nasiona, S – ściany strąków ODP – strąki odpadające. Rozmiar strąków: duże, średnie, małe. 4d, 8d, 12d, 18d – ilość dni od zakwitnięcia.

LINF-YA5



Wykres 14. Ekspresja genu *LINF-YA5* w ścianach strąków oraz nasionach na poszczególnych okółkach kwiatostanu. Ok1 – okółek pierwszy, Ok2 – okółek drugi, Ok3 – okółek trzeci, N – nasiona, S – ściany strąków ODP – strąki odpadające. Rozmiar strąków: duże, średnie, małe. 4d, 8d, 12d, 18d – ilość dni od zakwitnięcia.

Akumulacja Ll-miR169 (wykres 13) wskazuje wyraźnie na jego rolę w odcinaniu organów generatywnych, gdyż otrzymane wartości są kilkudziesięciokrotnie większe w tkankach strąków odpadających (głównie ścian strąków) w porównaniu z prawidłowo rozwijającymi się owocami. Poziom akumulacji jest również nieznacznie podwyższony w obrębie małych strąków w okółkach drugim i trzecim, co w zestawieniu z niemal całkowitym brakiem tego miRNA w prawidłowo rozwijających się tkankach może sugerować prawdopodobną tendencję od ich odpadania.

W przypadku genu docelowego dla Ll-miR169, czynnika transkrypcyjnego *LINF-YA5* wzorzec ekspresji jest zdecydowanie bardziej skomplikowany (wykres 14). W przypadku pierwszego okółka kwiatostanu łubinu żółtego ekspresja genu *LINF-YA5* jest wyższa w nasionach, zwłaszcza w nasionach młodych (4 oraz 12 dni). W przypadku nasion ze strąków odpadających zebranych w 12 dniu po zakwitnięciu, poziom, transkryptu nie ulega zmianie w stosunku do nasion strąków rozwijających się w sposób prawidłowy, natomiast w 18 dniu jego poziom w nasionach ze strąków odpadających jest już zdecydowanie niski. W przypadku ścian strąków ekspresja utrzymuje się na stabilnym poziomie. Okółek drugi charakteryzuje się podobną dynamiką ekspresji co okółek pierwszy, natomiast w przypadku okółka trzeciego ogólny poziom ekspresji jest już wyraźnie zaniżony, co sugeruje spadek aktywności transkrypcyjnej w badanych tkankach.

Nieobecność transkryptów Ll-miR169 w prawidłowo rozwijających się tkankach może sugerować jego istotną rolę w regulacji *LINF-YA5*, który charakteryzuje się dynamiczną i zmienną ekspresją. Obserwacja ta znajduje swoje odzwiedlenie w wyraźnie podwyższonym poziomie tego miRNA przy jednoczesnym spadku poziomu jego genu docelowego w strąkach ulegających odcinaniu.

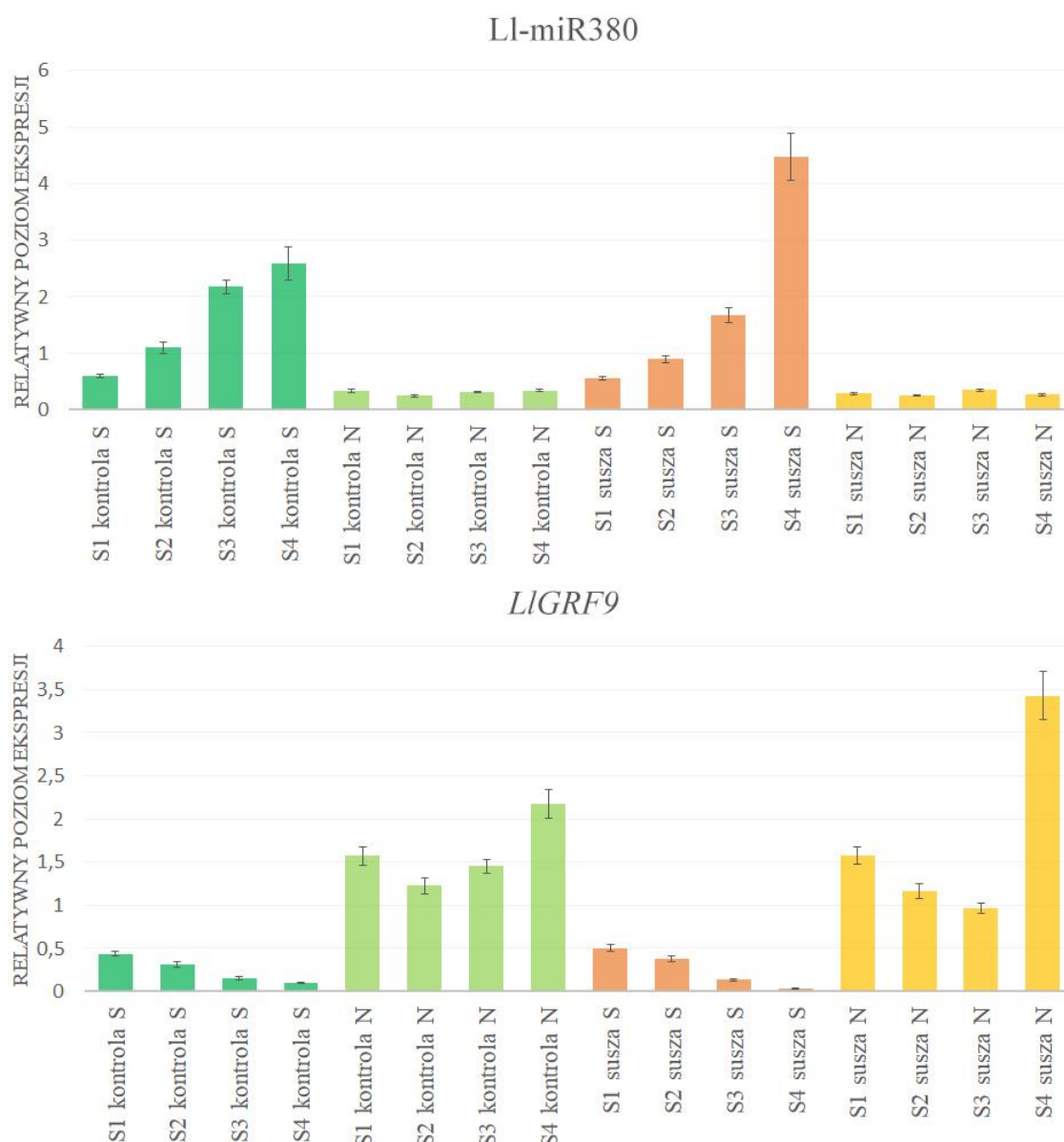
3.6.4. Analiza ekspresji wybranych par miRNA -gen docelowy w odpowiedzi na stres suszy krótkotrwałej

Podczas eksperymentu strąki oraz nasiona do analiz zostały zebrane 19 dnia trwania stresu suszy (krótkotrwałej), w momencie w którym względna wilgotność gleby wynosiła 11,4 – 11,5%. Wartość ta została wyznaczona w oparciu o metodę opisaną w rozdziale 2.1.2. Próg względnej wilgotności gleby konieczny dla uzyskania określonych efektów fizjologicznych związanych z niedoborem wody u łubinu żółtego został dokładniej opisany w rozdziałach 3.7.1. – 3.7.4. Pomimo jednego terminu siewu, rośliny rozwijały się w różnym

tempie i w związku z tym podczas zbioru zebrano strąki w czterech pierwszych stadiach rozwojowych (z ośmiu ustalonych w porównaniu z analizami rozwoju podczas upraw polowych, rozdział 2.1.3.), tylko z pierwszego okółka kwiatostanu. Analizy wykonano dla następujących par miRNA-gen docelowy: Ll-miR380/miR396 i *LIGRF9*, Ll-miR329/miR160 i *LIARF17*, Ll-miR169 i *LINF-YA5* oraz czterech genów będących homologami genów opisywanych w literaturze, jako powiązanych ze stresem suszy i mogących być swoistymi wskaźnikami suszy w różnych gatunkach roślin, a mianowicie *HEX3* (ang., Hexose Carrier 3), *PYL10* (ang., Abscissic acid receptor PYL10), *PROT1* i *PROT2* (ang., Proline Transporter 1/2).

Spośród tych czterech genów, trzy z nich, *HEX3*, *PROT1*, *PROT2* stanowią transbłonowe transportery cukrów prostych (glukozy) oraz aminokwasów (proliny). Funkcja tych transporterów jest powiązana ze stresem suszy i zwiększonego zasolenia, a ich ekspresja w *Arabidopsis* jest podwyższona w wyżej wymienionych warunkach stresowych (Taylor 1996; Delrot i in., 2000). Natomiast *PYL10* stanowi receptor kwasu abscysynowego, hormonu, który jest związany ze stresem suszy i wysokiego zasolenia (Verma i in., 2019). Wyniki analiz przedstawiono na wykresach 15 – 19, gdzie: ściany strąków z roślin kontrolnych (ciemnozielony), nasiona z roślin kontrolnych (jasnozielony), ściany strąków z roślin poddanych suszy (pomarańczowy). Nasiona z roślin poddanych suszy (jasnopomarańczowy). Stadia rozwojowe zostały podane na początku nazw próbek (od S1 do S4).

a) L1-miR380/miR396 i jego gen docelowy *LIGRF9*



Wykres 15. Ekspresja L1-miR380/miR396 oraz jego genu docelowego, *LIGRF9* w eksperymencie krótkotrwałej suszy. S1-S4 – stadia rozwojowe, kontrola – rośliny kontrolne, susza – rośliny poddane stresowi suszy, S – ściany strąków, N – nasiona.

Akumulacja L1-miR380/miR396 w nasionach utrzymuje się na stałym, relatywnie niskimi poziomie zarówno w nasionach zebranych z roślin poddanych suszy, jak i roślin kontrolnych. W przypadku ścian strąków obserwowano wyraźną tendencję wzrostową zarówno w owocniach roślin kontrolnych jak i poddanych suszy, ze szczytem ekspresji w stadium S4, przy czym wartość w tym punkcie roślin stresowanych jest dwukrotnie wyższa niż korespondujący poziom w roślinach kontrolnych.

Odwrotną tendencję zanotowano w przypadku ekspresji *LIGRF9*. W ścianach strąków poziom był relatywnie niski i spadał wraz rozwojem w obu wariantach doświadczalnych. W nasionach wzorec ekspresji był dynamiczny z najwyższym poziomem ekspresji w stadium S4, zarówno w roślinach poddanych stresowi suszy, jak i roślinach kontrolnych.

Wyniki ukazują wyraźną zależność regulacyjną L1-miR380/miR396 na ekspresję genu *LIGRF9* - wraz z jego wzrostem poziom genu docelowego spadał. Istotny jest również fakt, iż poziom ekspresji L1-miR380/miR396 w ścianach strąków oraz poziom *LIGRF9* był wyraźnie podwyższony w stadium S4 w roślinach poddanych stresowi suszy, w porównaniu do roślin kontrolnych.

b) L1-miR329/miR160 i jego gen docelowy *LIARF17*



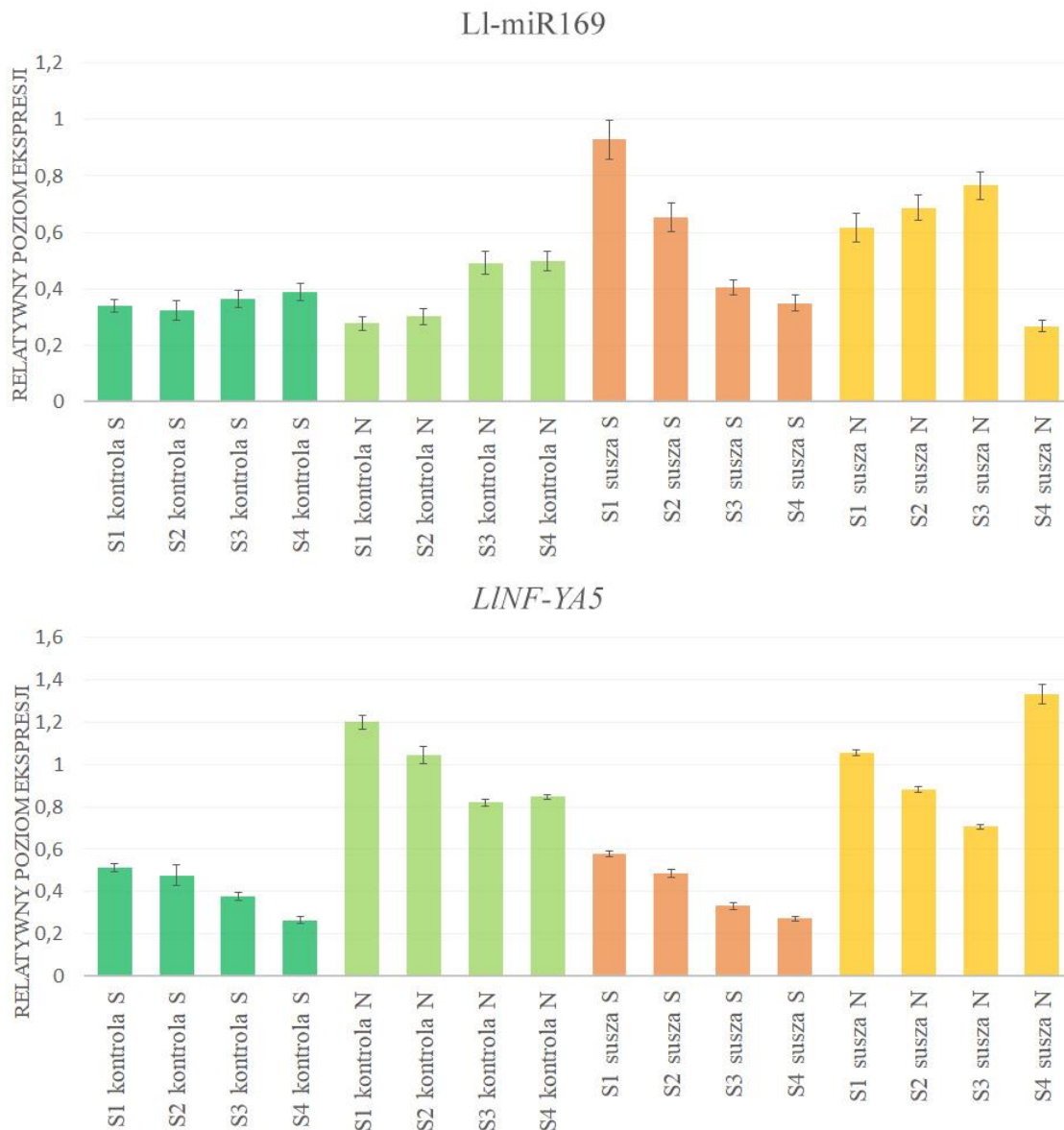
Wykres 16. Ekspresja L1-miR329/miR160 oraz jego genu docelowego, *LIARF17* w eksperymencie krótkotrwałej suszy. S1-S4 – stadia rozwojowe, kontrola – rośliny kontrolne, susza – rośliny poddane stresowi suszy, S – ściany strąków, N – nasiona.

Akumulacja L1-miR329/miR160 wykazuje tendencję wzrostową w nasionach podczas ich rozwoju, podczas gdy pozostaje na relatywnie niskim i stałym poziomie w ścianach strąków. Pomiędzy roślinami kontrolnymi oraz roślinami badanymi nie można zaobserwować istotnych różnic.

Poziom ekspresji genu *L1ARF17* w ścianach strąków utrzymuje się zarówno w próbach z roślin poddanych stresowi suszy jak i prób kontrolnych na relatywnie stałym i niskim poziomie. W przypadku nasion zaobserwować można tendencję do wzrostu poziomu ekspresji w stadiach 1-3, ze szczytem ekspresji w stadium S3, a następnie delikatny jej spadek. W przypadku roślin poddawanych suszy najwyższy poziom również występuje w S3, jest jednak niemal dwukrotnie wyższy w stosunku do roślin kontrolnych.

Ze względu na brak wyraźnych tendencji oraz zależności pomiędzy obserwowanymi poziomami ekspresji L1-miR329/miR160 oraz jego genu docelowego nie można wyciągnąć jednoznacznych wniosków dotyczących ich roli w regulacji odpowiedzi na stres u łubinu.

c) L1-miR169 i jego gen docelowy *LINF-YA5*



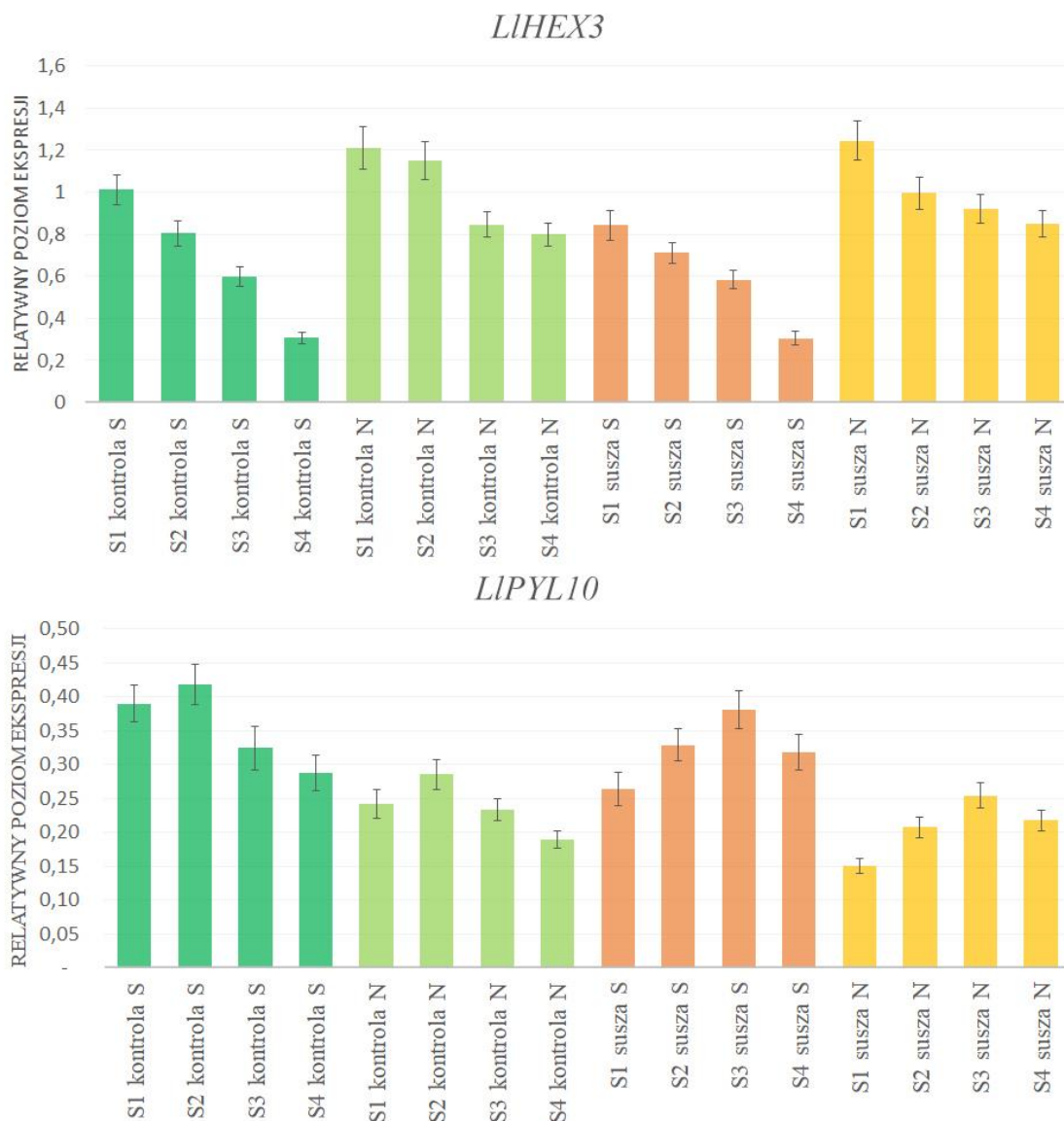
Wykres 17. Ekspresja L1-miR169 oraz jego genu docelowego, *LINF-YA5* w eksperymencie krótkotrwałej suszy. S1-S4 – stadia rozwojowe, kontrola – rośliny kontrolne, susza – rośliny poddane stresowi suszy, S – ściany strąków, N – nasiona.

Ekspresja transkrypty *LINF-YA5* wykazuje tendencję spadkową zarówno w nasionach jak i strąkach wraz z ich rozwojem, przy czym w przypadku nasion ogólny poziom transkrypty jest dwukrotnie wyższy. W przypadku nasion w stadium S4 z roślin poddanych suszy ekspresja wyraźnie jest podwyższona w stosunku do innych wariantów badawczych.

Otrzymane wyniki wskazują na to, że zwiększenie akumulacji L1-miR169 może następować w młodych strąkach w odpowiedzi na stres suszy, natomiast zwiększenie poziomu ekspresji jego genu docelowego następuje głównie w nasionach na późniejszych

etapach rozwoju. Wskazuje to na typowy przykład interakcji polegającej na hamującym działaniu miRNA na ekspresję jego genu docelowego.

d) *LIHEX3* i *LIPYL10*

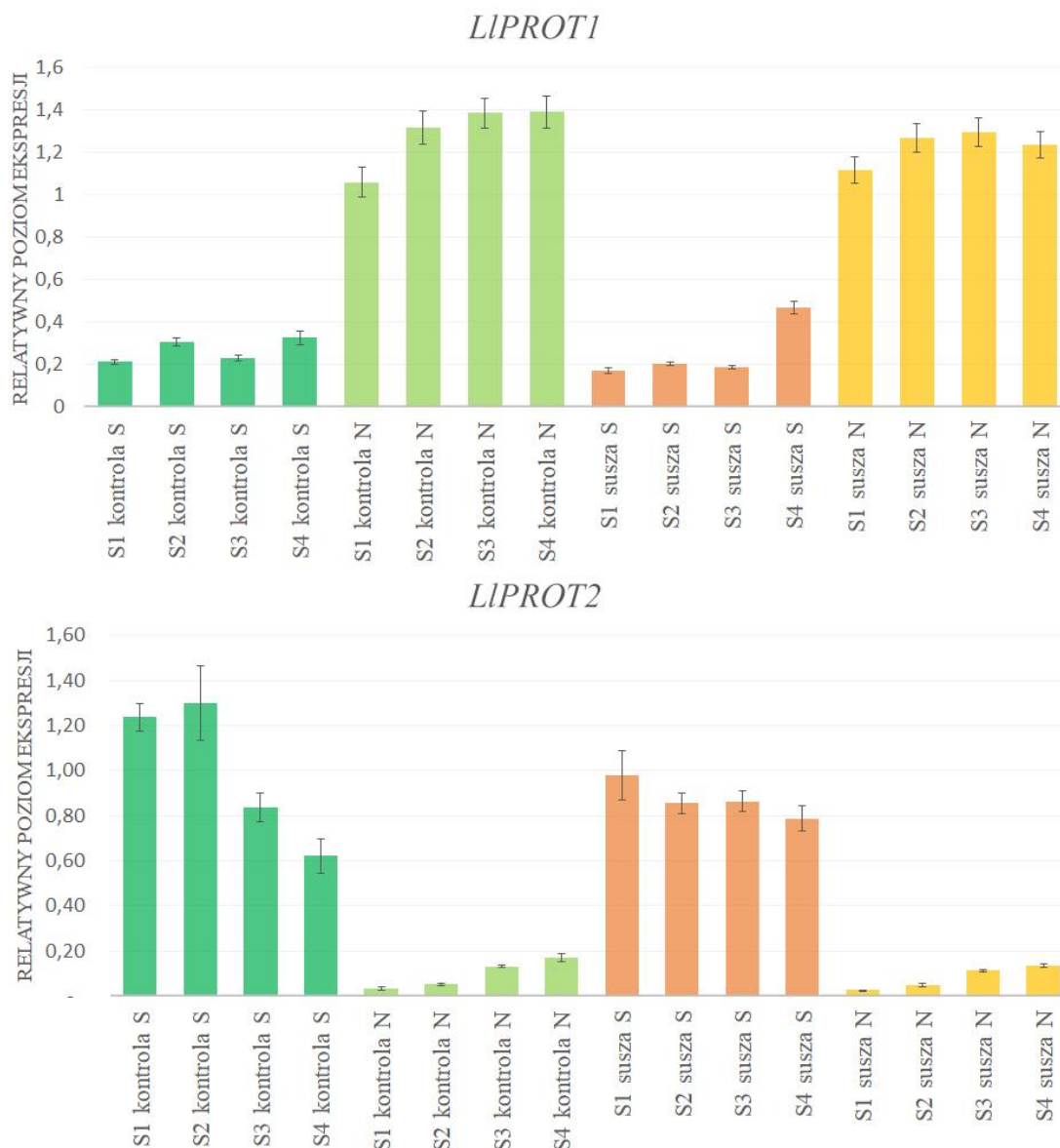


Wykres 18. Ekspresja genów *LIHEX3* i *LIPYL10* w eksperymencie krótkotrwałej suszy. S1-S4 – stadia rozwojowe, kontrola – rośliny kontrolne, susza – rośliny poddane stresowi suszy, S – ściany strąków, N – nasiona.

Poziom akumulacji transkryptu genu *LIHEX3* nie różni się istotnie pomiędzy roślinami kontrolnymi i próbą badawczą. W przypadku obu parametrów (rozwój i susza) zaobserwować można spadek poziomu ekspresji wraz z rozwojem strąków.

Podobna sytuacja ma miejsce w przypadku analiz ekspresji genu *LIPYL10*, nie można zaobserwować tutaj wyraźnych różnic poziomie w ekspresji genu, pomiędzy materiałem z roślin poddawanych stresowi suszy i roślin kontrolnych.

e) *LIPROT1* i *LIPROT2*



Wykres 19. Ekspresja genów *LIPROT1* i *LIPROT2* w eksperymencie krótkotrwałej suszy. S1-S4 – stadia rozwojowe, kontrola – rośliny kontrolne, susza – rośliny poddane stresowi suszy, S – ściany strąków, N – nasiona.

Ekspresja transkryptu *LIPROT1* jest wyraźnie, 6-krotnie wyższa w nasionach niż w ścianach strąków, zarówno w roślinach kontrolnych jak i poddanych stresowi suszy. Specyficzność tkankowa jest jednak niemal identyczna pomiędzy próbkami pochodzącymi

z roślin poddanych suszy jak i roślin kontrolnych, gdzie jedyny wyjątek od tej reguły mogą stanowić ściany strąków ze stadium S4 z roślin poddanych stresowi.

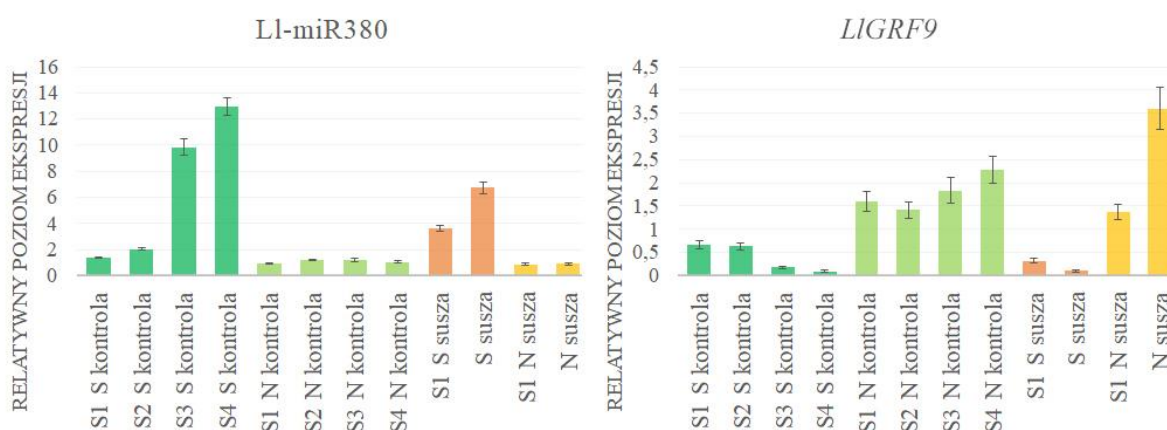
Poziom akumulacji transkryptu *LIPROT2* podobnie jak w przypadku *LIPROT1* zdaje się być niezależny od warunków w jakich wzrastały rośliny, jednakże tendencje do akumulacji w obrębie tkanek są odwrócone. Transkrypt ten jest akumulowany głównie w ścianach strąków, podczas gdy jego obecność w nasionach jest niewielka, z delikatną tendencją wzrostową wraz z ich rozwojem.

3.6.5. Analiza ekspresji wybranych par miRNA -gen docelowy w odpowiedzi na stres suszy długotrwałej

Podczas eksperymentu długotrwałej suszy, strąki oraz nasiona do analiz zostały zebrane 23 dnia od momentu jej wystąpienia, gdzie względna wilgotność gleby wynosiła zaledwie 5,5%. Aby osiągnąć niższy poziom wilgotności gleby podczas kwitnienia i zawiązywania strąków, podlewania zaprzestano o 4 dni wcześniej niż w przypadku poprzedniego eksperymentu (zbiór w 19 dniu).

Okres długoterminowej suszy spowodował, że do analiz zebrano jedynie stadia pierwsze (S1) i drugie (S2). Analogicznie jak w eksperymencie krótkotrwałej suszy, analizie zostały poddane następujące pary miRNA-gen docelowy: L1-miR380/miR396 i *LIGRF9*, L1-miR329/miR160 i *LIARF17*, L1-miR169 i *LINF-YA5* oraz transkrypty genów *LIHEX3*, *LIPYL10*, *LIPROT1* i *LIPROT2*. Podobnie jak w przypadku poprzednich analiz rośliny oznaczono odpowiednio: S - ściany strąków (kolor ciemnozielony w przypadku roślin kontrolnych, kolor pomarańczowy w przypadku roślin poddanych suszy), N – nasiona (kolor jasnozielony w przypadku roślin kontrolnych, kolor jasnopomarańczowy w przypadku roślin poddanych suszy). Rośliny poddane stresowi suszy w stadium S2 opisane są jako „S”.

a) L1-miR380/miR396 i jego gen docelowy *LIGRF9*



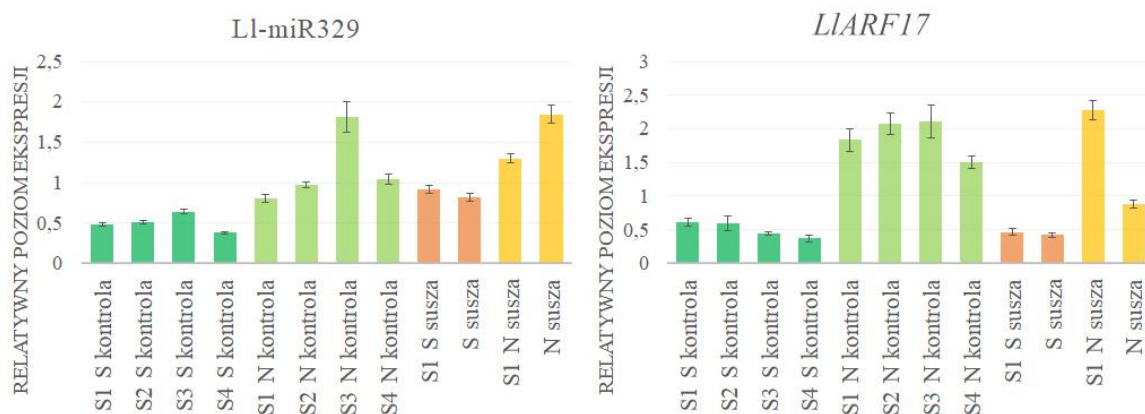
Wykres 20. Ekspresja L1-miR380/miR396 oraz jego genu docelowego, *LIGRF9* w eksperymencie długotrwałej suszy. S1-S4 – stadia rozwojowe, kontrola – rośliny kontrolne, susza – rośliny poddane stresowi suszy, S – ściany strąków, N – nasiona.

Poziom akumulacji L1-miR380/miR396 w nasionach utrzymywał się na stałym, relatywnie niskim poziomie zarówno w roślinach poddanych stresowi długotrwałej suszy, jak i w roślinach kontrolnych. Ilość miRNA w ścianach strąków jest jednak wyższa w suszy na wczesnych stadiach rozwojowych (S1 i S) w stosunku do roślin kontrolnych.

Poziom ekspresji genu *LIGRF9* w ścianach strąków jest znacząco niższy w roślinach poddanych stresowi suszy w stosunku do roślin kontrolnych, natomiast w przypadku nasion w roślinach poddanych suszy można zaobserwować wyraźny wzrost poziomu transkryptu w stadium S2.

Podobnie jak w przypadku wcześniejszych analiz, zaobserwować można było wyraźną zależność regulacyjną L1-miR380/miR396 na ekspresję genu *LIGRF9* oraz specyficzność tkankową ich ekspresji. Długotrwała susza wpływa jednak jedynie na zwiększenie ekspresji *LIGRF9* w nasionach roślin poddanych suszy w stadium S2 w porównaniu z nasionami z roślin kontrolnych, oraz na spadek ekspresji miRNA w ścianach strąków w roślinach poddanych stresowi.

b) L1-miR329/miR160 i jego gen docelowy *LIARF17*



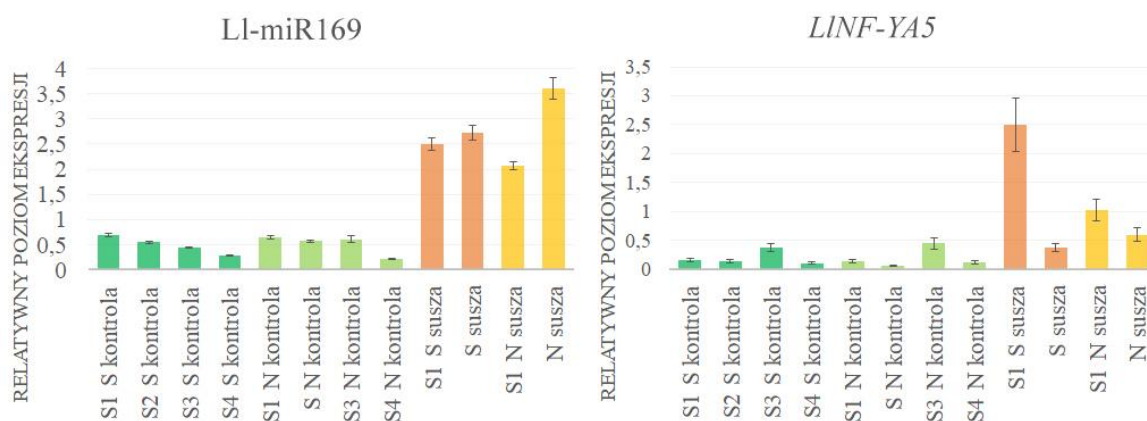
Wykres 21. Ekspresja L1-miR329/miR160 oraz jego genu docelowego, *LIARF17* w eksperymencie długotrwałej suszy. S1-S4 – stadia rozwojowe, kontrola – rośliny kontrolne, susza – rośliny poddane stresowi suszy, S – ściany strąków, N – nasiona.

Poziom akumulacji L1-miR329/miR160 w nasionach pobranych z roślin kontrolnych utrzymuje się na relatywnie podobnym poziomie wzrastając dopiero w S3 i ponownie zmniejszając się w S4. W przypadku ścian strąków zaobserwować można również stabilny ale niższy poziom ekspresji, z zachowaniem podobnej tendencji. Różnica pomiędzy roślinami kontrolnymi i poddanych stresowi suszy leży natomiast w ogólnym poziomie transkryptu, który w przypadku stresu suszy jest niemal 2-krotnie wyższy w każdym z porównań.

Ekspresja genu *LIARF17* w ścianach strąków pozostaje na niskim, stałym poziomie w obu wariantach badawczych, niezależnie od stadium wzrostu. W przypadku nasion, można zaobserwować nieznaczne podwyższenie ekspresji w stadium S1 w przypadku suszy oraz gwałtowny spadek w stadium S2, co odróżnia te warianty od roślin kontrolnych, w których poziom ekspresji w nasionach utrzymuje się na relatywnie stabilnym poziomie.

Z powyższych obserwacji można wnioskować, że długotrwała susza, w przeciwieństwie do suszy krótkotrwałej, stanowiła odpowiedni bodziec do zmiany wzorców ekspresji zarówno L1-miR329/miR160 jak i jego genu docelowego.

c) L1-miR169 i jego gen docelowy *LINF-YA5*



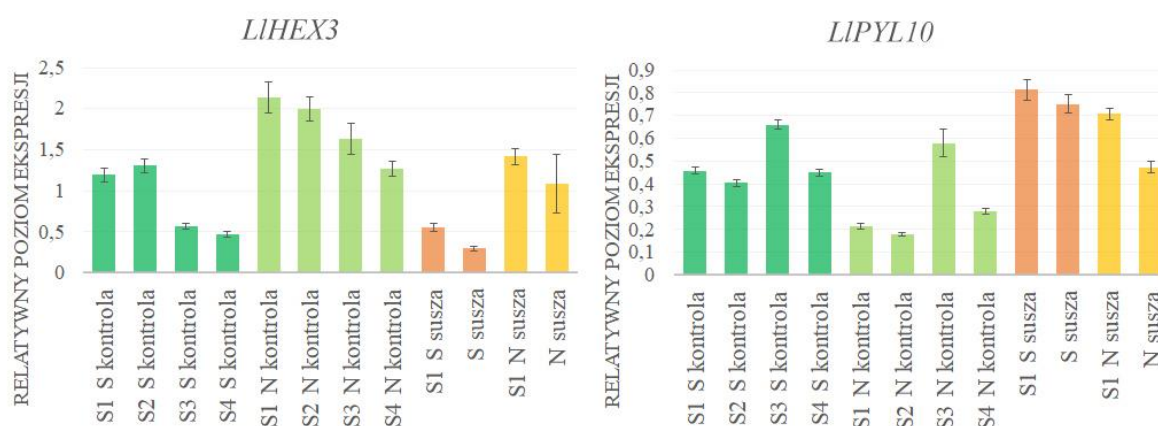
Wykres 22. Ekspresja miR169 oraz jego genu docelowego, *LINF-YA5* w eksperymencie długotrwałej suszy. S1-S4 – stadia rozwojowe, kontrola – rośliny kontrolne, susza – rośliny poddane stresowi suszy, S – ściany strąków, N – nasiona.

Poziom akumulacji L1-miR169 jest wyraźnie podwyższony zarówno w nasionach jak i ścianach strąków podczas stresu suszy w porównaniu z roślinami kontrolnymi.

W przypadku roślin poddanych suszy ekspresja genu *LINF-YA5* jest wyraźnie podwyższona zarówno w nasionach, jak i ścianach strąków. W przypadku roślin kontrolnych ogólny poziom ekspresji tego transkryptu jest znikomy.

Tendencje te mogą świadczyć o istotnym wpływie modulacji ekspresji zarówno L1-miR169 jak i jego genu docelowego jako reakcji na stres suszy u łubinu żółtego.

d) *LIHEX3* i *LIPYL10*



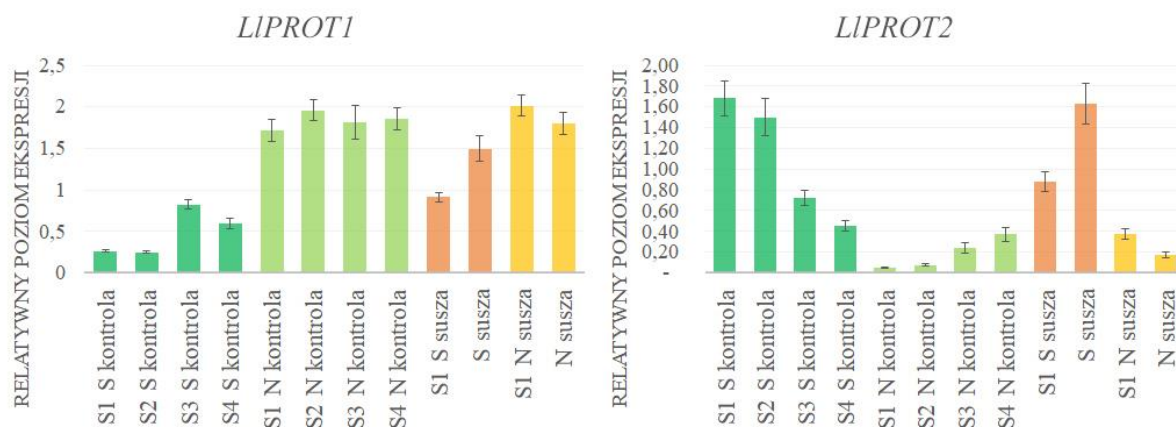
Wykres 23. Ekspresja genów *LIHEX3* i *LIPYL10* w eksperymencie długotrwałej suszy. S1-S4 – stadia rozwojowe, kontrola – rośliny kontrolne, susza – rośliny poddane stresowi suszy, S – ściany strąków, N – nasiona.

Poziom ekspresji genu *LIHEX3* w roślinach poddanych suszy jest wyraźnie obniżony w stosunku do roślin kontrolnych, szczególnie w przypadku nasion. Obserwowano tendencję spadkową w obu analizowanych wariantach wraz rozwojem.

Poziom transkryptu *LIPYL10* jest podwyższony w roślinach poddanych stresowi suszy w stosunku do roślin kontrolnych zarówno w ścianach strąków jak i nasionach w stadiach S1 i S2. W przypadku ścian strąków poziom ten pozostaje dużo wyższy nawet w stosunku do późniejszych okresów rozwojowych w roślinach kontrolnych.

W porównaniu z eksperymentem suszy krótkotrwałej, obserwowane tendencje są dużo wyraźniejsze, co może świadczyć o tym iż jedynie odpowiednio duże natężenie czynnika stresowego może wpływać na zmiany w ekspresji powyższych genów.

e) *LIPROT1* i *LIPROT2*



Wykres 24. Ekspresja genów *LIPROT1* i *LIPROT2* w eksperymencie długotrwałej suszy. S1-S4 – stadia rozwojowe, kontrola – rośliny kontrolne, susza – rośliny poddane stresowi suszy, S – ściany strąków, N – nasiona.

W przypadku roślin kontrolnych poziom transkryptu *LIPROT1* w nasionach jest 3-krotnie wyższy w stosunku do ścian strąków i tendencja ta jest zachowana również w przypadku roślin poddanych stresowi suszy, jednak z mniejszym natężeniem (różnica 2-krotna).

Ekspresja *LIPROT2* w nasionach w obu wariantach doświadczalnych jest dużo niższa niż w przypadku ścian strąków, zaobserwować można również tendencję spadkową w poziomie transkryptu w ścianach strąków roślin kontrolnych wraz z wiekiem.

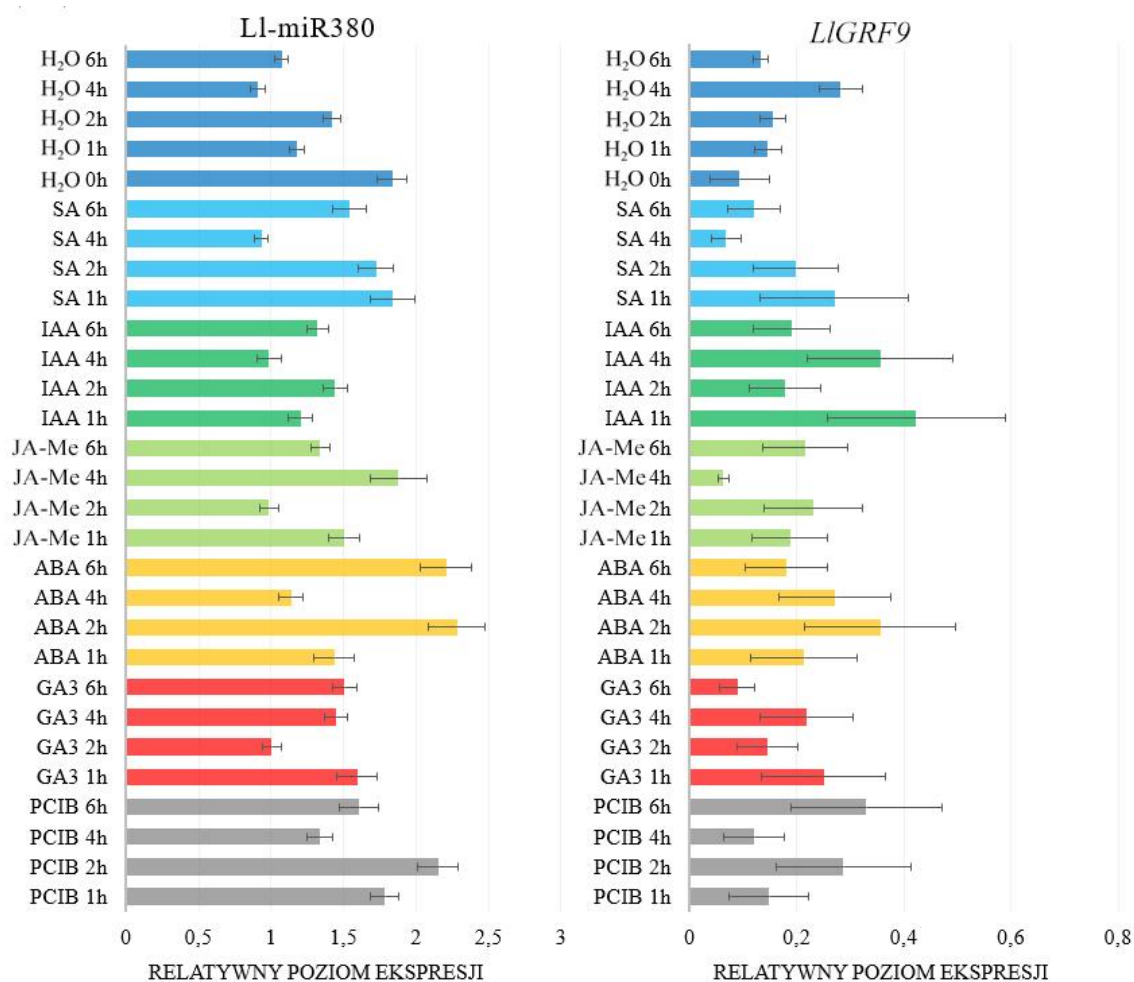
Oprócz specyficzności tkankowej nie można zaobserwować wyraźnych tendencji w ekspresji badanego genu w odpowiedzi na stres suszy.

3.6.6. Analiza ekspresji wybranych par miRNA- gen docelowy po egzogennej aplikacji fitohormonów

Fitohormony wpływają na rozwój roślin poprzez regulację i modulowanie szeregu procesów fizjologicznych i morfologicznych. Dane literaturowe dotyczące innych gatunków roślin, wskazują, iż wiele modułów miRNA- gen docelowych jest ściśle powiązana z homeostazą hormonalną (Ulmasov i in., 1997; Zhao i in., 2017; Salopek-Sondi i in., 2013), co stanowi solidną podstawę do założenia, iż podobne interakcje występują u łubinu żółtego. W związku z powyższym postanowiono zweryfikować, czy zmiany poziomu wybranych fitohormonów aplikowanych egzogenne mogą wpłynąć na zmiany poziomu ekspresji miRNA i ich genów docelowych.

Ze względu na trudności w otrzymaniu wystarczającej ilości jednorodnego materiału (pod względem fazy rozwojowej) ze strąków oraz ich morfologię (pokrycie włoskami, które mogłyby istotnie utrudniać wnikanie hormonu) postanowiono jako materiał do badań wykorzystać liście z roślin poddawanych opryskom SA, IAA, JA-Me, ABA GA3 oraz PCIB (inhibitor działania IAA) oraz roślin kontrolnych. Badanie zostało przeprowadzone zgodnie z jego szczegółowym opisem znajdującym się w rozdziale 2.1.3. Zależności przedstawiono na wykresach 25-29, gdzie odpowiednimi kolorami oznaczono aplikowane związki: woda (kontrola, kolor ciemnoniebieski), SA (kolor niebieski), IAA (kolor ciemnozielony), JA-Me (kolor zielony), ABA (kolor pomarańczowy), GA3 (kolor czerwony), PCIB (kolor szary) oraz czas który upłynął od podania danego związku (jedna, dwie, cztery oraz sześć godzin) oraz natychmiast po oprysku (0h) w przypadku zastosowania wody.

a) L1-miR380/miR396 i jego gen docelowy *LIGRF9*

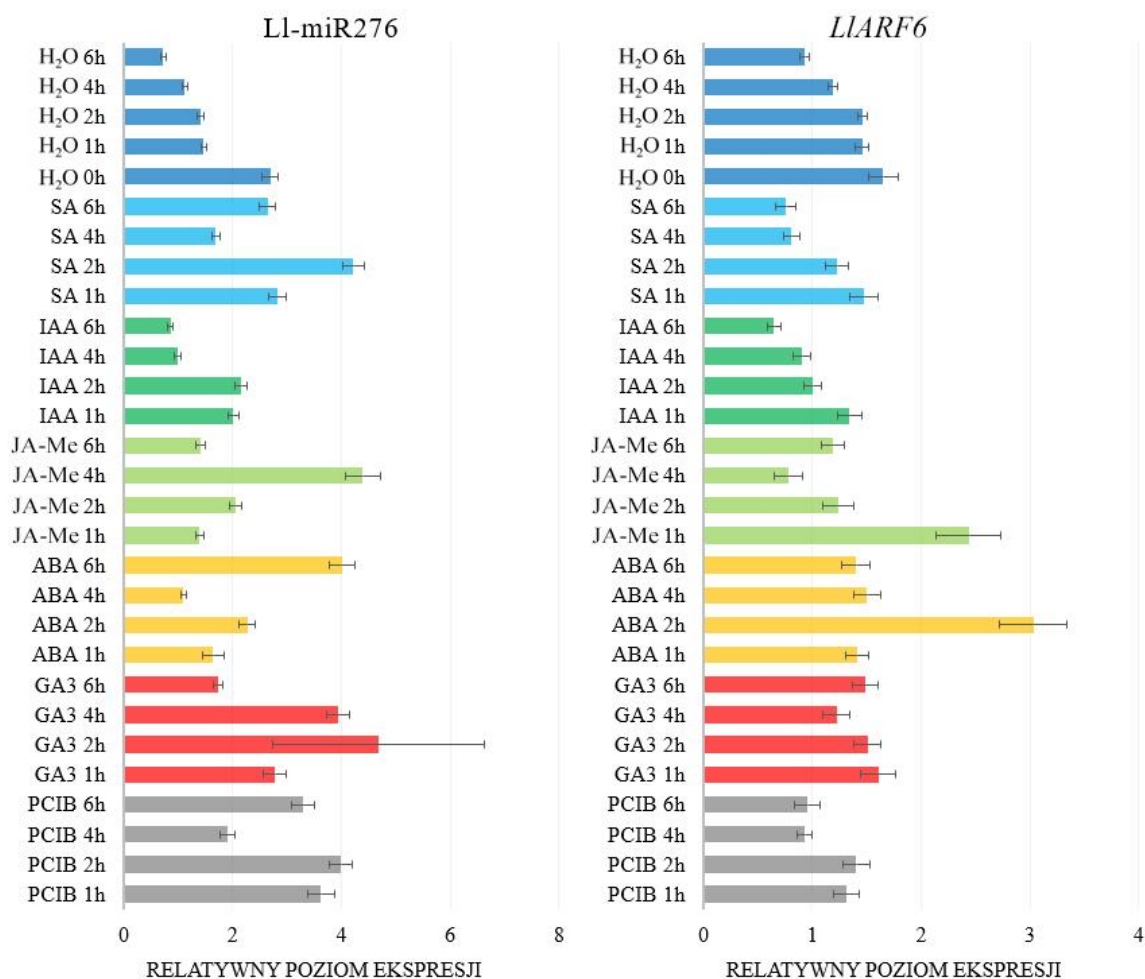


Wykres 25. Ekspresja L1-miR380/miR396 oraz jego genu docelowego, *LIGRF9* po egzogennym podaniu fitohormonów. H₂O – ciemnoniebieski, SA – niebieski, IAA – ciemnozielony, JA-Me – zielony, ABA – pomarańczowy, GA3 – czerwony, PCIB – szary), 0h, 1h, 2h, 4h, 6h – czas od aplikacji związku.

Podwyższony poziom ekspresji L1-miR380/miR396 można zaobserwować po traktowaniu roślin roztworem PCIB, zwłaszcza po upływie dwóch godzin oraz traktowaniu ABA po dwóch i sześciu godzinach. W pozostałych przypadkach próby nie odbiegają w znaczący sposób od kontroli.

Ekspresja transkryptu *LIGRF9* nie wykazuje istotnych różnic zarówno w żadnym z traktowań jak i w roślinach kontrolnych. Wynika to z dużych błędów jakimi obarczone są wyniki.

b) L1-miR276/miR167 i jego gen docelowy *LIARF6*

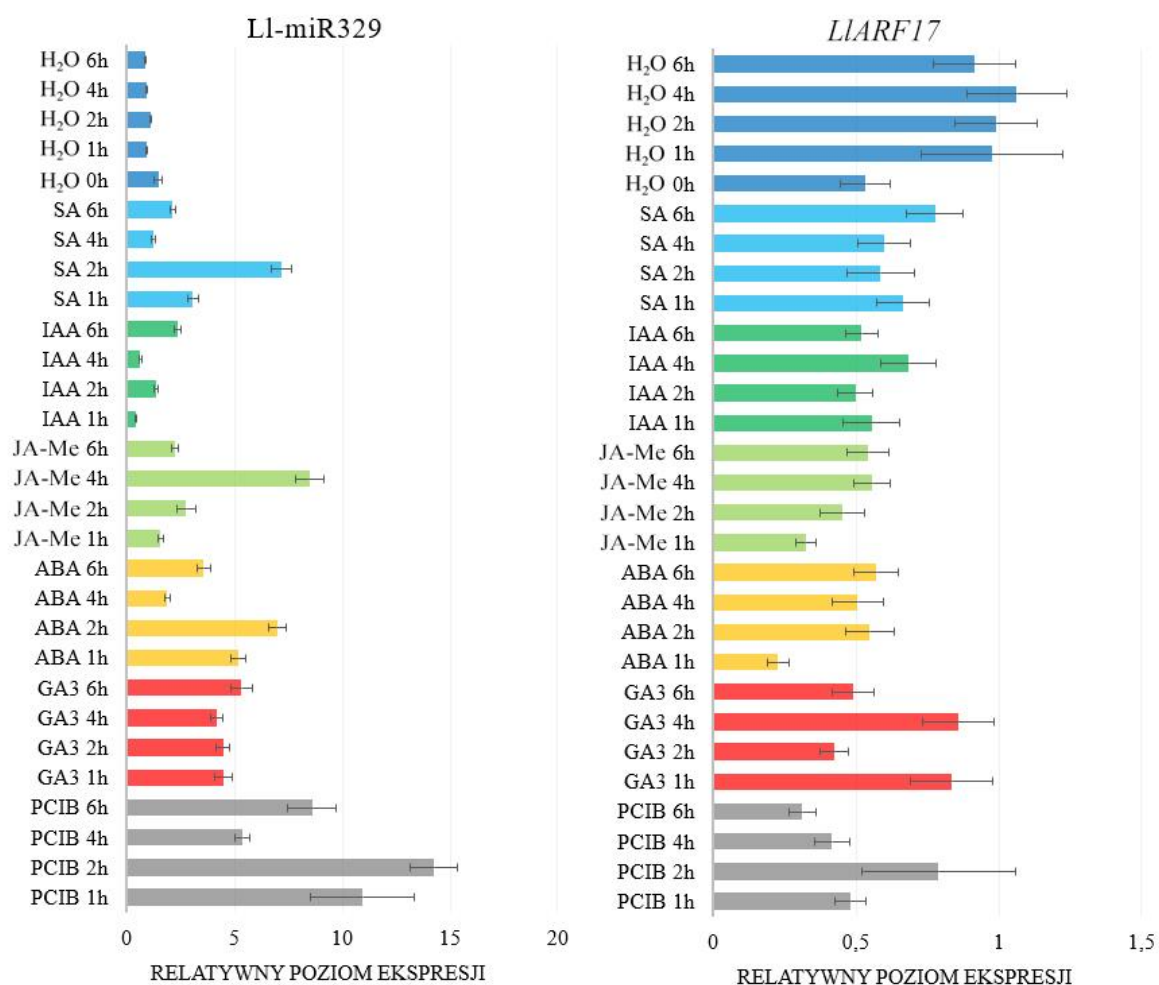


Wykres 26. Ekspresja L1-miR276/miR167 oraz jego genu docelowego, *LIARF6* po egzogennym podaniu fitohormonów. H₂O – ciemnoniebieski, SA – niebieski, IAA – ciemnozielony, JA-Me – zielony, ABA – pomarańczowy, GA3 – czerwony, PCIB – szary), 0h, 1h, 2h, 4h, 6h – czas od aplikacji związku.

Ogólny, podwyższony poziom akumulacji L1-miR276/miR167 można zaobserwować w odpowiedzi na PCIB oraz GA. W pozostałych przypadkach poziom badanego miRNA był na niższym poziomie z wyjątkiem pojedynczych przypadków godzinowych.

Poziom ekspresji *LIARF6* zdaje się być podwyższony w okresie drugiej godziny po traktowaniu ABA oraz jednej godziny po traktowaniu JA-Me. Poziom ten ulega następnie unormowaniu do wartości porównywalnych z kontrolą. Nie zaobserwowano znaczących zmian ekspresji w przypadku pozostałych traktowań.

c) L1-miR329/miR160 i jego gen docelowy *LIARF17*

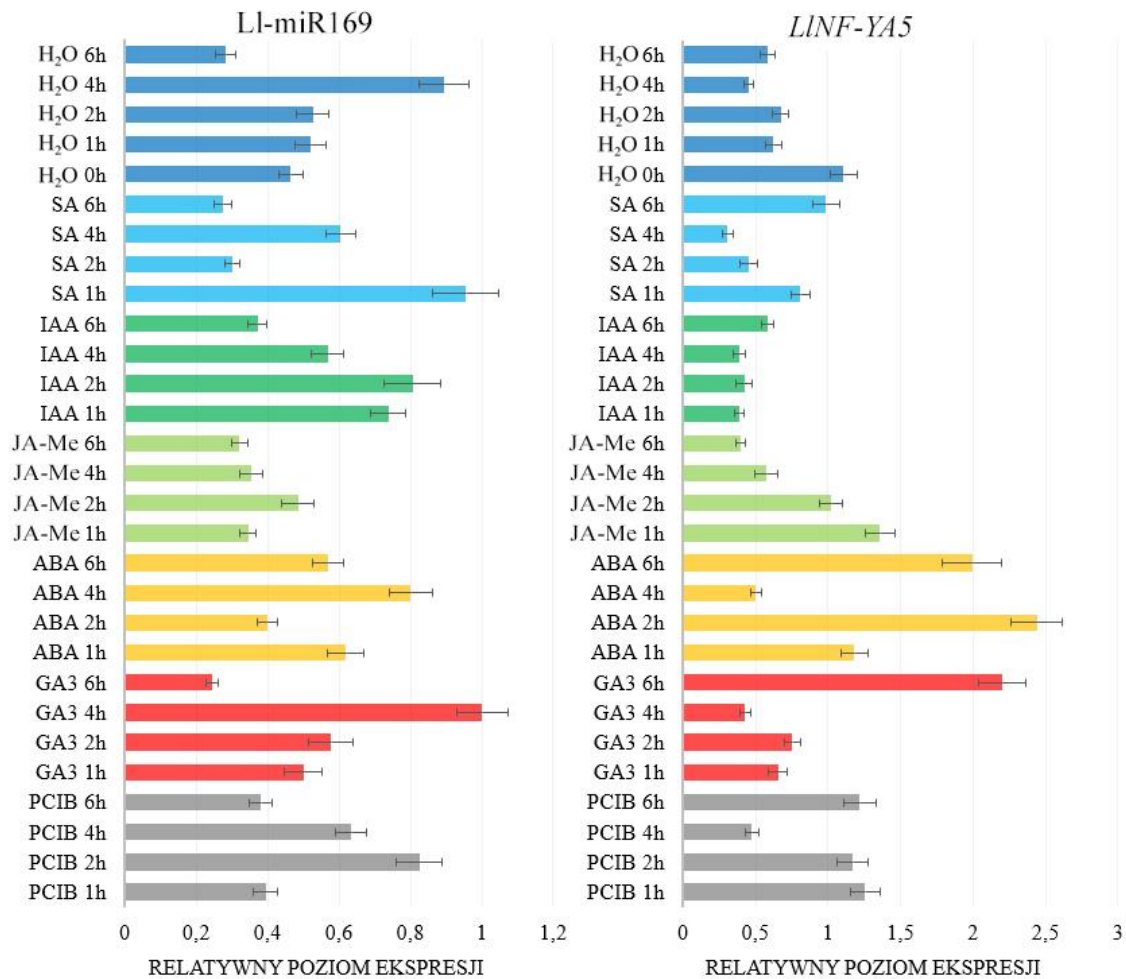


Wykres 27. Ekspresja L1-miR329/miR160 oraz jego genu docelowego, *LIARF17* po egzogennym podaniu fitohormonów. H₂O – ciemnoniebieski, SA – niebieski, IAA – ciemnozielony, JA-Me – zielony, ABA – pomarańczowy, GA3 – czerwony, PCIB – szary), 0h, 1h, 2h, 4h, 6h – czas od aplikacji związku.

Generalnie, za wyjątkiem IAA wszystkie podawane fitohormony podnosiły poziom akumulacji L1-miR329/miR160. W przypadku PCIB, ilość miRNA jest zdecydowanie wyższa niż w przypadku hormonów oraz traktowania kontrolnego.

Poziom ekspresji *LIARF17* jest znacząco niższy w stosunku do kontroli w przypadku wszystkich hormonów. Na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić, że fitohormony promują działanie modułu L1-miR329/miR160-*ARF17* powodując wzrost poziomu miRNA przy jednoczesnym obniżeniu poziomu jego genu docelowego.

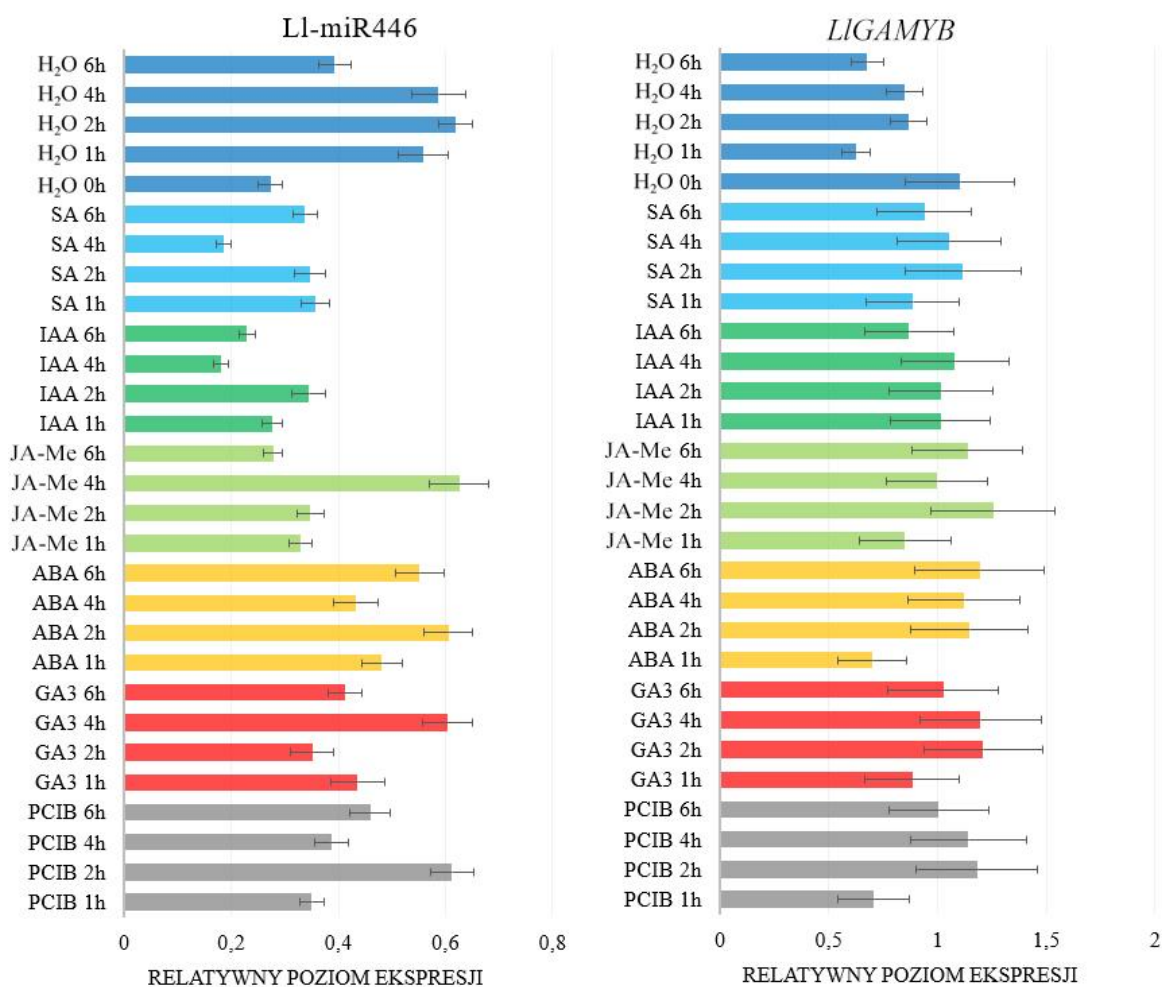
d) L1-miR169 oraz jego gen docelowy *LINF-YA5*



Wykres 28. Ekspresja miR169 oraz jego genu docelowego, *LINF-YA5* po egzogennym podaniu fitohormonów. H₂O – ciemnoniebieski, SA – niebieski, IAA – ciemnozielony, JA-Me – zielony, ABA – pomarańczowy, GA3 – czerwony, PCIB – szary), 0h, 1h, 2h, 4h, 6h – czas od aplikacji związku.

Nie można zaobserwować istotnych zmian ekspresji L1-miR169 dla któregośkolwiek z traktowań, natomiast w przypadku transkryptu *LINF-YA5* poziom jego ekspresji ulega znacznemu podwyższeniu sześć godzin po traktowaniu GA3, oraz dwie i sześć godzin po traktowaniu ABA. W pozostałych przypadkach poziom ekspresji nie odbiega w sposób znaczący od kontroli.

e) L1-miR446/miR159 i jego gen docelowy *LIGAMYB*



Wykres 29. Ekspresja L1-miR446/miR159 oraz jego genu docelowego, *LIGAMYB* po egzogennym podaniu fitohormonów. H₂O – ciemnoniebieski, SA – niebieski, IAA – ciemnozielony, JA-Me – zielony, ABA – pomarańczowy, GA3 – czerwony, PCIB – szary), 0h, 1h, 2h, 4h, 6h – czas od aplikacji związku.

Poziom akumulacji L1-miR446/miR159 jest obniżony w traktowaniu roślin roztworem SA i IAA w stosunku do roślin kontrolnych. W przypadku pozostałych związków wzorzec akumulacji miRNA nie różni się zasadniczo od roślin kontrolnych.

Niestety, ze względu na wysoki współczynnik odchylenia standardowego nie można zaobserwować żadnych różnic w ekspresji genu *LIGAMYB* pomiędzy poszczególnymi traktowaniami.

3.7. Analiza nasycenia gleby wodą

Badanie tempa ubytku wody z gleby oraz kondycji roślin rosnących w wysychającej oraz suchej glebie były konieczne do ustalenia warunków niezbędnych dla wygenerowania kontrolowanego i powtarzalnego środowiska doświadczalnego dla łąbinu żółtego. Szczegóły przeprowadzenia wszystkich eksperymentów związanych z tolerancją roślin na stres suszy oraz jej wpływu na rozwój strąków zostały dokładniej omówione w rozdziale Materiały i metody (rozdział 2.1.2. oraz 2.8. i 2.8.1.). Analizy te poprzedzały oraz były prowadzone równoległe z eksperymentami wpływu krótkotrwałej oraz długotrwałej suszy (rozdziały 3.6.4., 3.6.5.) w celu potwierdzenia, iż rośliny łąbinu żółtego znajdowały się w stanie adekwatnego stresu suszy.

Rośliny badane charakteryzowały się wyraźnymi cechami fizjologicznymi charakterystycznymi dla odmiennych warunków. Były one dużo niższe od roślin kontrolnych, często zakwitały szybciej lecz produkowały ograniczoną liczbę kwiatów i strąków, oraz cechowały się szybszym wędnięciem i usychaniem liści w dolnych piętrach rośliny. Cechy te ilustrują ryciny 25 i 26.



Rycina 25. Porównanie pokroju roślin kontrolnych (lewa strona) oraz roślin poddanych stresowi suszy (prawa strona).

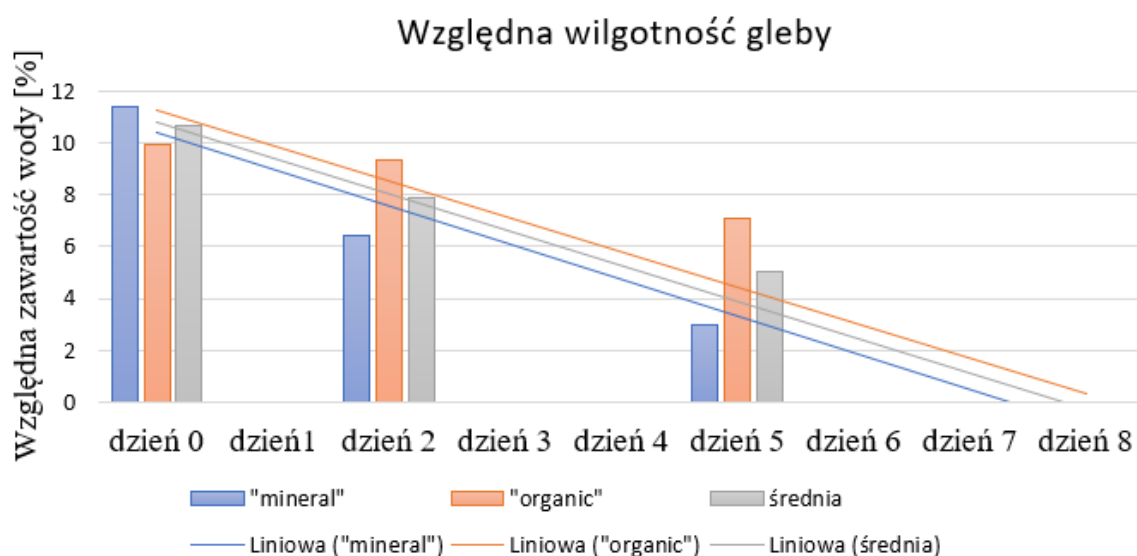


Rycina 26. Porównanie pokroju roślin kontrolnych (lewa strona) oraz roślin poddanych stresowi suszy (prawa strona).

3.7.1. Pomiary wilgotności gleby

Początkowe pomiary wilgotności gleby zostały wykonane dla podłoża pobranego wprost z worków, w celu określenia jego początkowego poziomu nawodnienia oraz tempa utraty wody. Badanie przeprowadzone zostało w 200 ml szklanych zlewkach. Wykorzystano

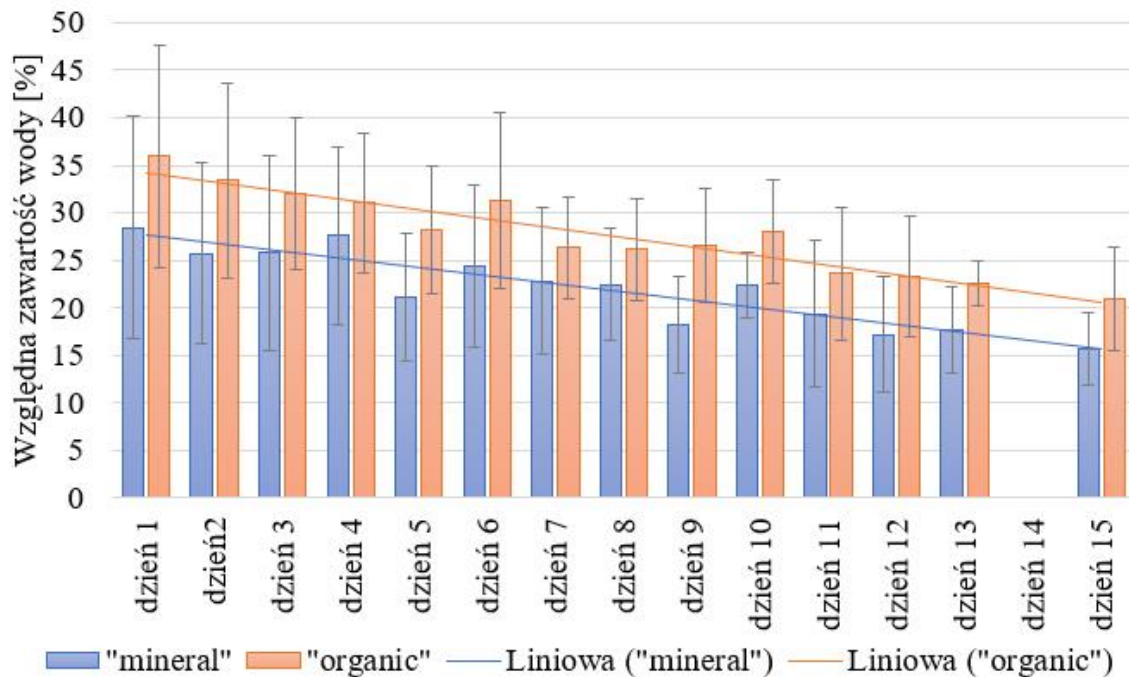
dwa tryby pomiarowe urządzenia SM150 soil Moisture sensor, zakładające dwa odrębne typy gleby – glebę bogatą w substancje organiczne (tryb organic), oraz glebę ubogą w ww. związki (tryb mineral).



Wykres 30. Pomiar wilgotności gleby. Wytyczone linie trendu pozwalają na estymację średniego tempa utraty wody.

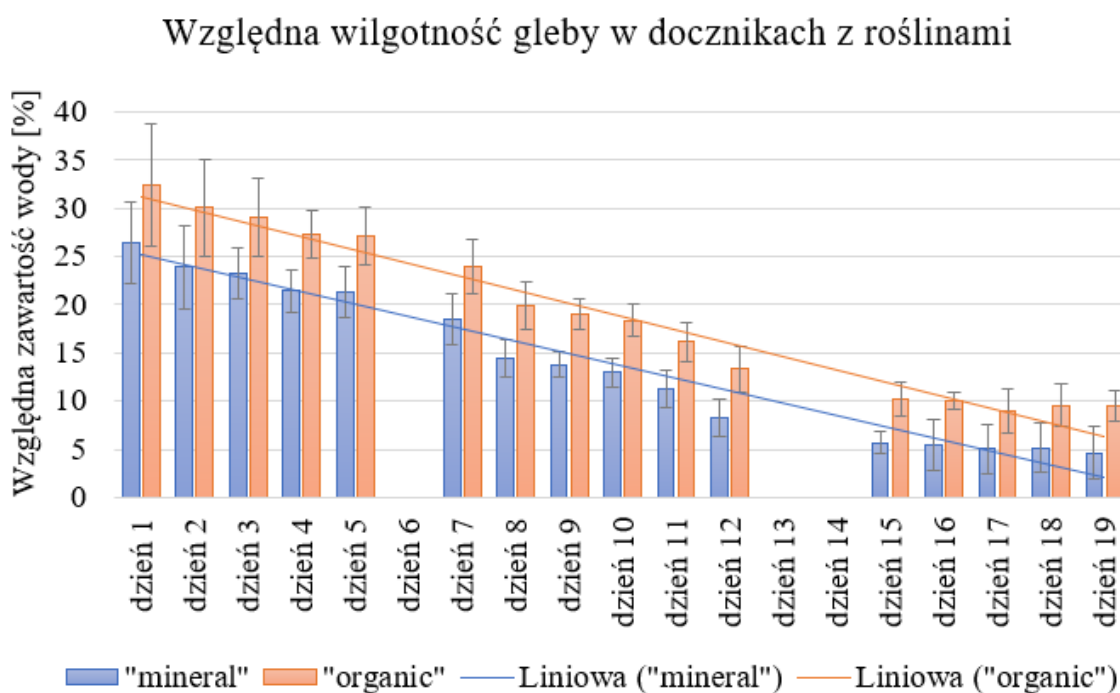
Wyniki tego badania wskazują, że podłoże w workach jest stosunkowo suche (względna zawartość wody na poziomie ok 11%) i teoretycznie ulegałoby całkowitemu wyschnięciu po upływie około ośmiu dni. Wyniki te nie były jednak odzwierciedleniem tego, jak gleba zachowywałaby się w doniczkach, charakteryzujących się większą objętością oraz wysokością. W tym celu przeprowadzono kolejne doświadczenie, którego celem było ustalenie tempa wysychania w pełni podlanych (poziom względnej wilgotności wynoszący około 35-36%) bez obecności roślin. Pozwoliło to na ustalenie, w jakim tempie gleba traci wilgotność w wyniku parowania, oraz umożliwiło określenie tempa poboru wody przez rośliny w kolejnych doświadczeniach.

Względna wilgotność gleby w doniczkach



Wykres 31. Tempo wysychania podłoża w doniczkach, tryb pomiaru „organic” oraz „mineral”. Wytyczone linie trendu pozwalają na estymację średniego tempa wysychania.

Uzyskane dane pokazały nie tylko bardziej liniowy charakter pomiarów w trybie „organic”, lecz również większą powtarzalność wyników, a co za tym idzie mniejsze wartości odchyłek standardowych w uzyskanych pomiarach. Ponadto, jako maksimum poziomu względnej wilgotności gleby przyjęto wartość w granicach 35-36%, zaś tempo utraty wody poprzez parowanie wynosiło 1% dziennie. Ostatnim testem przeprowadzonym przed przystąpieniem do właściwych badań było określenie, w jakim tempie rośliny pobierają wodę z gleby, oraz po jakim czasie efekty suszy staną się obserwowalne jako zmiany fizjologiczne w obrębie pokroju i kondycji roślin.

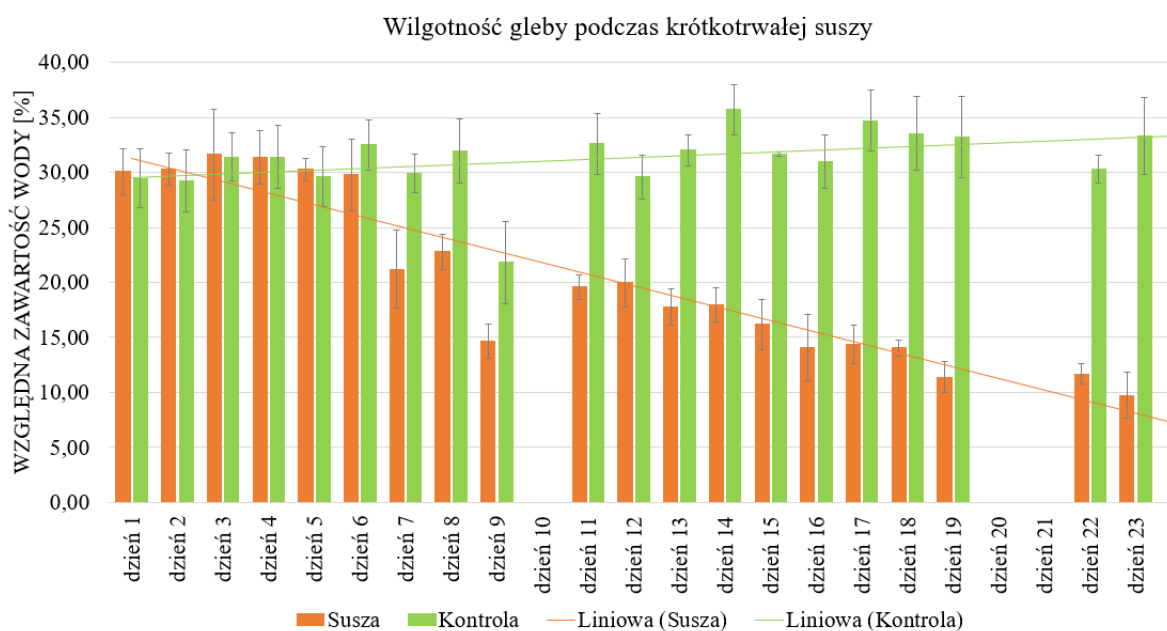


Wykres 32. Tempo utraty wody doniczek z roślinami, tryb pomiaru „organic” oraz „mineral”.

Poczynione obserwacje wskazały, że podłoże z roślinami wysycha (traci wodę) szybciej niż podłoże bez roślin (1,2%/dzień vs 1%/dzień). Objawy suszy u roślin można zaobserwować już w okolicach <10% poziomu wilgotności gleby, czyli po około 15-16 dniach bez podlewania.

3.7.2. Pomiary wilgotności gleby podczas eksperymentu krótkotrwałej suszy

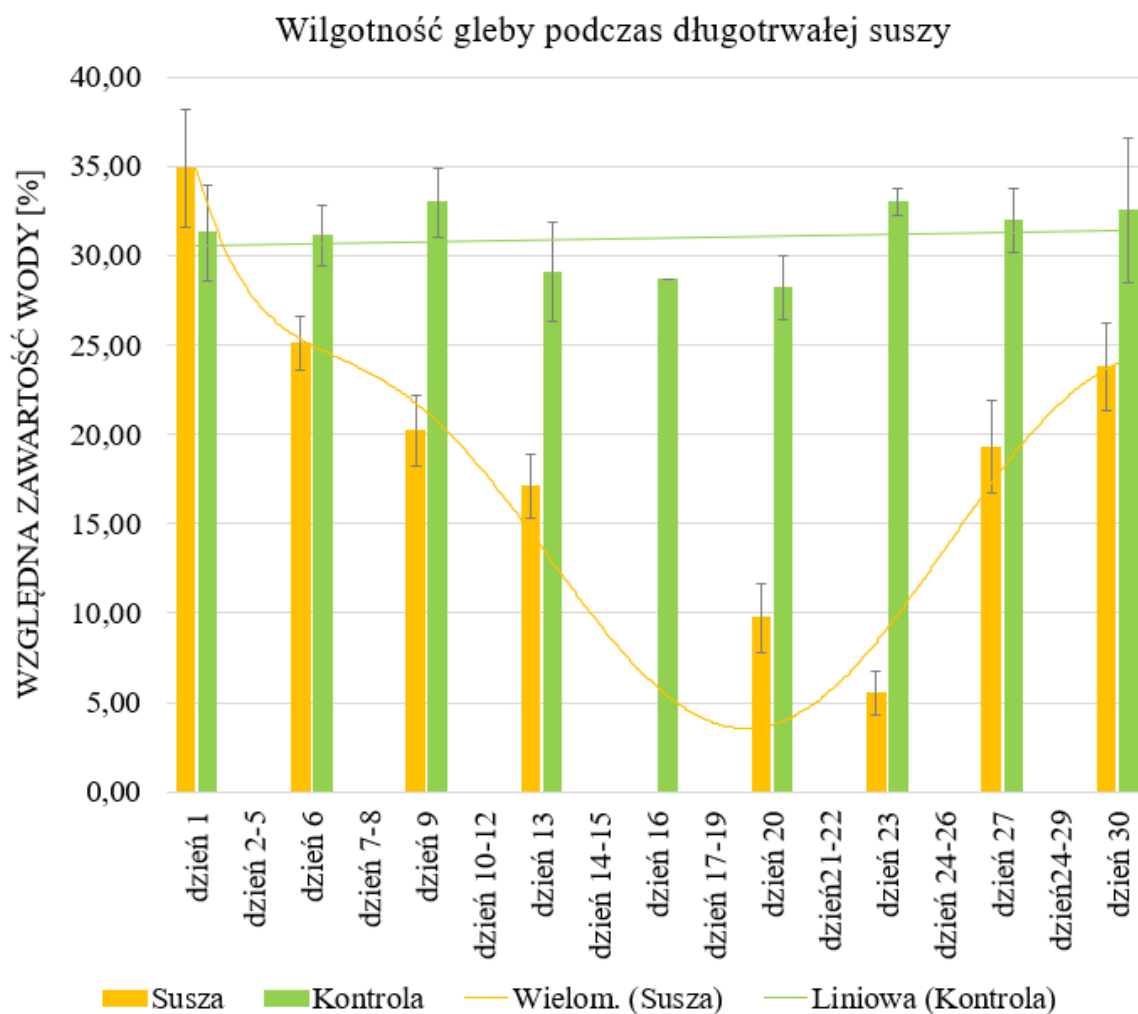
Pomiary wilgotności gleby wykonywane były codziennie z wyjątkiem 10, 20 i 21 dnia trwania eksperymentu. Brak pomiaru w dniu 10 spowodowany był przyczynami losowymi, natomiast pomiary po dwudniowej przerwie miały charakter inspekcyjny, gdyż miały one miejsce po zbiorze materiału roślinnego. Zbiór materiału do analiz RT-qPCR i UHPLC-MS/MS miał miejsce 19 dnia trwania eksperymentu, gdy wartość względnej wilgotności gleby w doniczkach z roślinami badanymi wyniósł około 11%. Siedemnastego oraz 19 dnia zebrane zostały również liście w celu oznaczenia wartości RWC (ang. Relative Water Content).



Wykres 33. Wykres ilustrujący zmiany względnej wilgotności gleby w roślinach badanych oraz kontrolnych podczas eksperymentu krótkotrwałej suszy.

3.7.3. Pomiary wilgotności gleby podczas eksperymentu długotrwałej suszy

Ze względu na znajomość dynamiki wysychania gleby w warunkach doświadczalnych, zdobytą w poprzednich doświadczeniach, pomiary w tym badaniu wykonywane były co 3-4 dni. Rośliny zebrane zostały 23 dnia trwania eksperymentu, gdy średnia wartość względnej wilgotności gleby wynosiła około 5,5%. Po zebraniu materiału pozostałe rośliny poddawane stresowi suszy zostały podlane w celu sprawdzenia, czy będą w stanie zregenerować się po stresie abiotycznym o tak dużym nasileniu. Niestety, niemal wszystkie rośliny nie były w stanie zregenerować się pomimo dostarczenia wody.



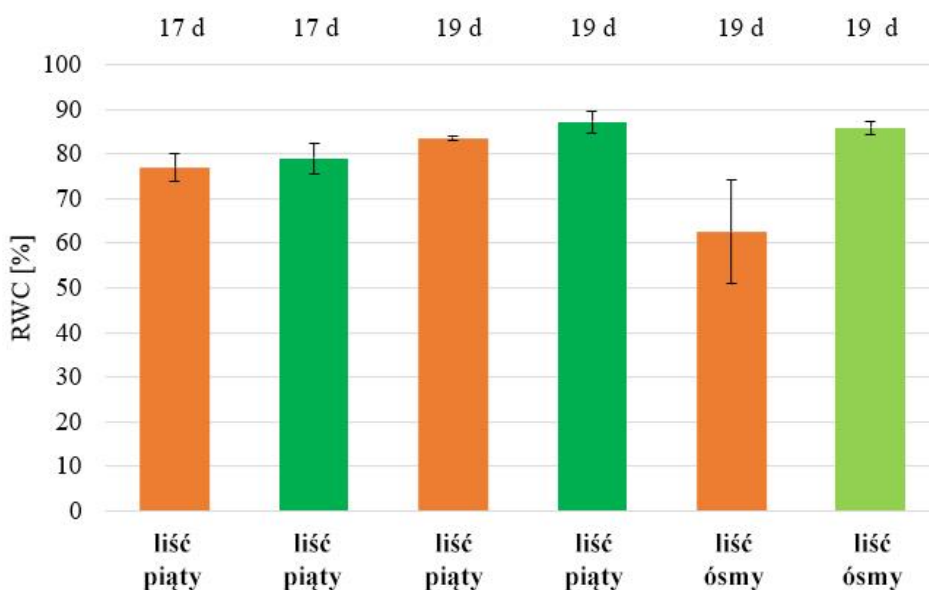
Wykres 34. Wykres ilustrujący zmiany względnej wilgotności gleby w doniczkach z roślinami kontrolnymi oraz roślinami poddawanych stresowi długotrwałej suszy.

3.7.4. Pomiary względnego poziomu wody w liściach

Pomiary względnego poziomu wody w liściach (RWC) zostały wykonane w celu zbadania korelacji między ilością wody w glebie a faktycznym fizjologicznym stanem roślin. Z każdej rośliny wybierano piąty oraz ósmy liść i przeprowadzono pomiary zgodnie z opisem zawartym w rozdziale Materiały i metody (rozdział 2.8.1.). W eksperymencie kontrolnym liście zostały poddawane ocenie w dniu rozpoczęcia suszy oraz po upływie 8, 15 oraz 23 dni. Liście oznaczone jako „młode” oznaczają 8 liść pojawiający się na roślinie, liście te zostały zbadane ze względu na ogólnie pogarszającą się kondycję starszych liści wraz z naturalnym wzrostem i rozwojem łubinu żółtego. Test ten pozwolił zaobserwować,

iz starsze liście (5 liść na roślinie) zaczynają wykazywać objawy usychania 15 dnia trwania suszy, natomiast liście młodsze utrzymują turgor znacznie dłużej, zaczynając wykazywać objawy usychania dopiero 23 dnia.

W przypadku krótkotrwałej suszy wykonano dwa zbiory liści w celu oznaczenia wartości RWC: pierwszy zbiór miał miejsce 17 dnia trwania eksperymentu i obejmował jedynie 5 liść, drugi zbiór miał miejsce 19 dnia trwania suszy i obejmował zarówno 5 jak i 8 liść pojawiający się na roślinie. Wyniki tych analiz ilustruje wykres 35.



Wykres 35. Wartości RWC liści pochodzących z roślin kontrolnych (kolor zielony) oraz roślin poddanych stresowi suszy (kolor pomarańczowy). Dzień zbioru (17d i 19d) oraz rodzaj zebranych liści (liście 5 oraz liście 8).

Przy zbiorze piątych liści z roślin w 17 dniu suszy różnice są praktycznie niewidoczne i wynoszą 2,18%, mniej niż odchylenie standardowe. Sytuacja wygląda podobnie przy kolejnym zbiorze gdzie różnica wynosi 3,57% (dzień 19).

Stan liści ulega widocznej zmianie przy porównaniu młodszych liści (8 liść) z obu prób w drugim zbiorze (19 dzień). Różnice wynoszą wówczas ponad 23% i są dane istotne ze statystycznego punktu widzenia.

Podczas eksperymentu długotrwałej suszy liście do badania parametru RWC zostały pobrane tylko raz, w dniu zbioru ogółu materiału roślinnego, czyli 23 dnia trwania suszy. Do pomiarów wybrano jedynie młodsze liście (liść numer 8) z 10 roślin kontrolnych oraz 10 roślin stresowanych. Wartość RWC dla roślin kontrolnych wyniosła $88,11 \pm 2,68\%$,

natomiast dla roślin poddanych suszy $59,08 \pm 12,25\%$. Różnica w wartości RWC wynosiła ponad 29%, o niemal 6% więcej niż w przypadku zbiorów w suszy krótkotrwałej.

3.8. Analizy ilości wybranych fitohormonów w nasionach i ścianach strąków łubinu żółtego

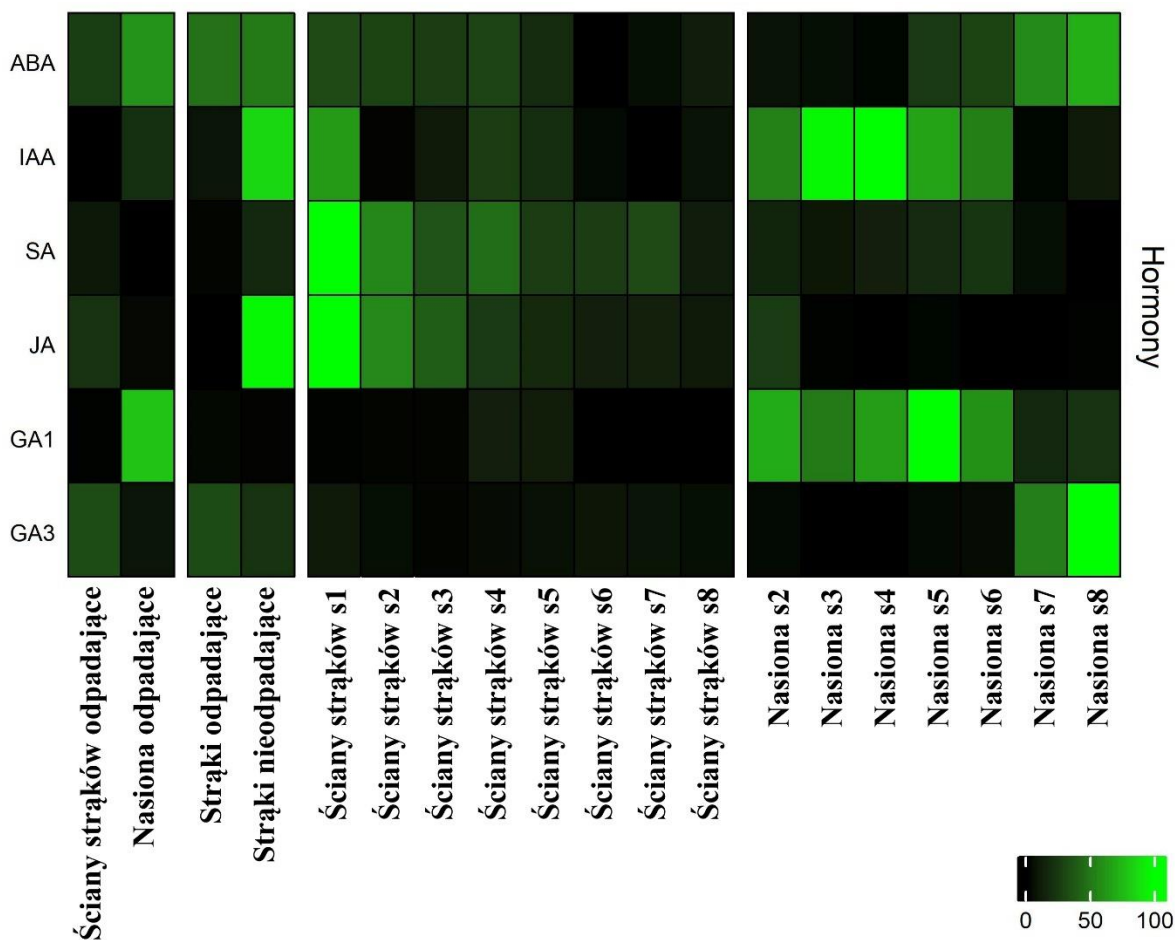
Odpowiednia homeostaza fitohormonów jest istotna zwłaszcza dla rozwoju nasion oraz strąków, a ich poziom wpływa również na akumulację miRNA i poziom ekspresji ich genów docelowych. Aby sprawdzić obecność i poziom tych interakcji u łubinu żółtego, analizy poziomu endogennych fitohormonów zostały wykonane na tkankach, które zostały wykorzystane również w poprzednich badaniach, tzn. w rozwoju nasion oraz strąków, rozwoju nasion i strąkach na poszczególnych piętrach kwiatostanu, oraz podczas rozwoju roślin w warunkach stresu suszy.

Spośród wszystkich 17 wykonanych analiz fitohormonów (Tabela 3 z rozdziału 2.7.1.) po przejściu wstępnego filtrowania mającego na celu odrzucenie wyników, w których jakość zebranych odczytów pozostawiała wątpliwości co do efektywności procesu izolacji, wytypowanych zostało 6 hormonów. Wybranymi hormonami, których ilość w odczytach sugerowała poprawny przebieg procesu izolacji były IAA, ABA, JA, SA, GA1 oraz GA3. W przypadku pozostałych standardów, zwłaszcza aminokwasowych pochodnych kwasu indolilo-3-octowego takich jak IAA-Ala lub IAA-Leu zastosowana metoda izolacji na kolumnkach typu SPE okazała się nieskuteczna. Następstwem tego, wyniki były niejednoznaczne, obarczone zbyt dużymi błędami, lub też stężenia danych fitohormonów były skrajnie małe, co nie pozwalało na wyciągnięcie rzetelnych wniosków.

Wstępne dane dane zostały opracowane zgodnie z informacjami zawartymi w rozdziale Materiały i metody (rozdział 2.7.3.). Pierwotnie otrzymane wykresy zawierające pełną informację o statystycznej istotności uzyskanej za pomocą testu Tukeya, ze względu na swoją znaczną objętość (łącznie 24 wykresy), sześć z nich - dla fitohormonów w rozwoju strąków - znajduje się w suplemencie (suplement 3, rycina s1) zostały jednak wtórnie przeskalowane do wartości w przedziale 0-100 i zaprezentowane w formie map gorąca (ang. heatmap) dla każdego z eksperymentów w celu bardziej przejrzystej wizualnej interpretacji wyników.

3.8.1 Fitohormony w rozwoju strąków

Analizy poziomu fitohormonów w rozwijających się strakach zostały wykonane na próbach pochodzących z upraw polowych z 2020 roku. Niestety, w przypadku najmłodszych nasion, jak również nasion i owocni pochodzących ze strąków nieodpadających, ilość tkanki jaka pozostała z całego zbioru okazała się niewystarczająca do przeprowadzenia niniejszej analizy. Pozostałe wyniki przedstawia wykres 36.



Wykres 36. Heatmapa poziomu fitohormonów zawartych w przeliczeniu na 1g tkanki z określonych stadiów rozwojowych (s1-s8) i tkanek (nasiona, ściany strąków oraz całe strąki – odpadające oraz nieodpadające) w obrębie rozwoju strąków. Wartości przeskalowane dla następujących zakresów: ABA: 100-1200ng/g, IAA: 20-160ng/g, SA: 50-350ng/g, JA: 0-1750 ng/g, GA1: 0-6000ng/g, GA3: 0-1800ng/g.

Poziom kwasu abscysynowego w ścianach strąków spada wraz z ich rozwojem, w przeciwieństwie do nasion, gdzie akumulacja ABA jest zauważalna dopiero w końcowych stadiach wzrostu. Strąki odpadające cechują się abnormalnie wysokim poziomem ABA w stosunku do ich morfologicznych odpowiedników - stadiów rozwojowych s1-s2. Warte

podkreślenia jest to, że wysoki poziom ABA wynika również z jego obecności w odpadających nasionach.

Poziom akumulacji auksyny jest podwyższony w nasionach w środkowych etapach wzrostu (szczególnie s3-s6), oraz wyraźnie podwyższony w strąkach nieodpadających. Niższy poziom IAA w tkankach podlegających odcinaniu (zarówno nasionach jak i ścianach strąków) może stanowić ważny indykator zahamowania procesów wzrostowych, biorąc pod uwagę ogólną rolę auksyny.

Poziom kwasu salicylowego jest istotnie wyższy w ścianach młodych strąków, w późniejszych etapach rozwoju spada i zrównuje się z relatywnie stałym poziomem SA obserwowanym w nasionach. W przypadku strąków odpadających poziom SA jest wyraźnie niższy w stosunku do prawidłowo rozwijających się tkanek.

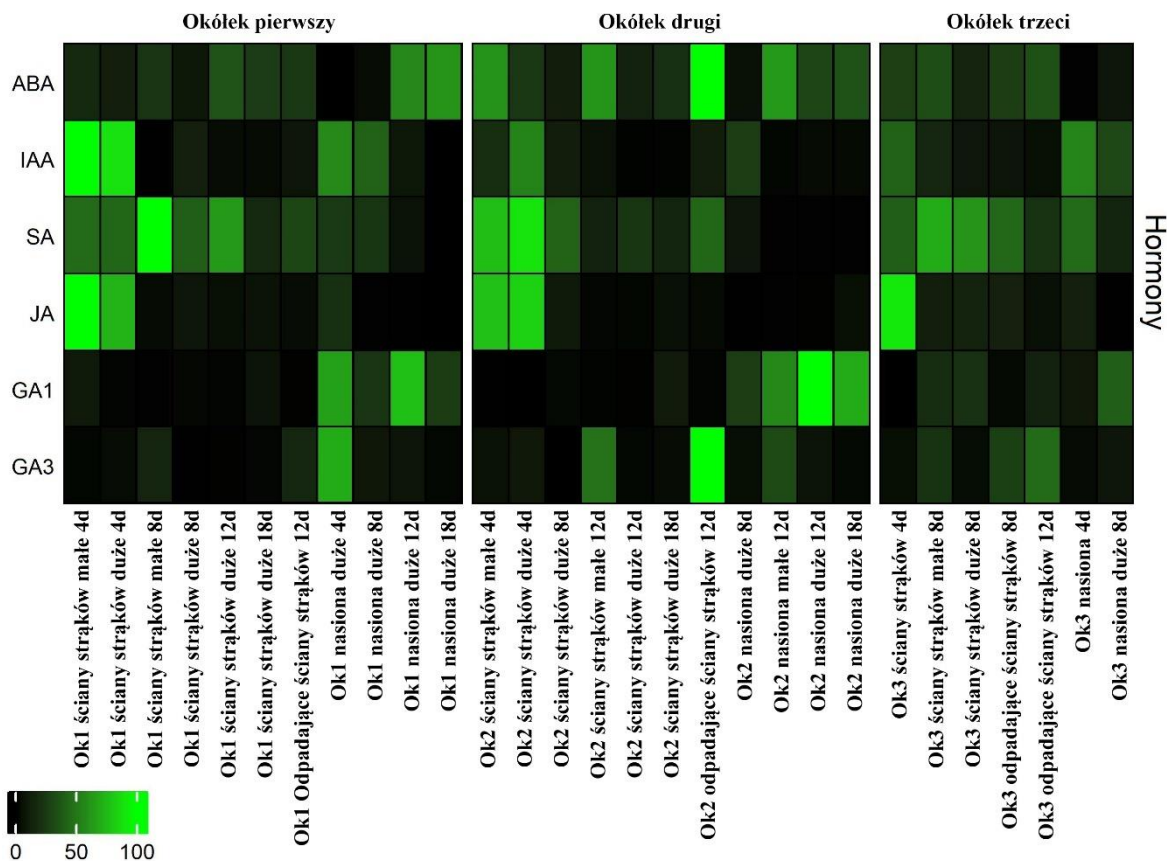
Kwas jasmonowy jest praktycznie nieobecny w nasionach, zaś w przypadku ścian strąków jego poziom spada dość gwałtownie wraz z rozwojem tych tkanek. Poziom JA w ścianach młodych strąków i ścianach strąków nieodpadających jest podobny, podczas gdy w ścianach strąków odpadających jego poziom jest znikomy.

Giberelina GA1 jest obecna niemal wyłącznie w nasionach, na wszystkich etapach rozwoju, wliczając w to nasiona ze strąków odpadających. Poziom tego fitohormonu w ścianach strąków jest prawie niezauważalny. Natomiast giberelina GA3 zaczyna się pojawiać dopiero w ostatnich etapach rozwoju nasion, obecna jest natomiast w zwiększonym stężeniu w strąkach odpadających. Godny uwagi jest fakt, iż GA1 oraz GA3 wydają się być negatywnie skorelowane ze sobą w obrębie wszystkich analizowanych próbek.

3.8.2. Fitohormony w rozwoju strąków rozwijających się na różnych okółkach kwiatostanu

Następnym etapem w analizach poziomu endogennych fitohormonów było sprawdzenie, jaki wpływ na ich akumulację ma wzrost strąków na poszczególnych okółkach kwiatostanu. Badanie to miało również na celu sprawdzenie, czy poziomy fitohormonów w strąkach zahamowanych w rozwoju (strąki na wyższych poziomach kwiatostanu) odbiegają od tych obecnych w strąkach rozwijających się prawidłowo. Uzyskane wyniki zostały przedstawione w formie heatmapy z podziałem na poszczególne okółki oraz dokładnym opisem prób. Jako materiał do badań wykorzystane zostały strąki z upraw polowych z 2020, jednak ze względu na niezwykle dużą ilość wariantów badawczych z tego

zbioru, do niniejszych analiz wytypowano jedynie niektóre najbardziej reprezentatywne próbki z pierwszego, drugiego oraz trzeciego piętra kwiatostanu, biorąc jednocześnie pod uwagę braki materiału z niektórych wariantów badawczych.



Wykres 37. Heatmapa poziomu fitohormonów zawartych w przeliczeniu na 1g tkanki z określonych okresów rozwojowych (4, 8, 12 oraz 18 dni od zapylenia kwiatów) i tkanek (nasiona oraz ściany strąków) w obrębie rozwoju strąków na poszczególnych okółkach (Ok1, Ok2 oraz Ok3). Na wykresie wyróżniono również tkanki odpadające (Odpadające ściany strąków) Wartości przeskalowane dla następujących zakresów: ABA: 50-1200ng/g, IAA: 10-170ng/g, SA: 30-220ng/g, JA: 200-6000ng/g, GA1: 0-5000ng/g, GA3: 10-170ng/g.

Poziomy endogennego kwasu abscysynowego wykazują szerokie spektrum wartości w zależności od typu tkanki oraz piętra kwiatostanu, z którego pobrano strąki. Najwyższy poziom ABA można obserwować w strąkach odpadających pochodzących z 2 okółka. W przypadku wczesnych stadiów rozwojowych strąków można zaobserwować tendencję do większej akumulacji w ścianach strąków niż nasionach, gdzie ABA pojawia się w znacznej ilości dopiero na późniejszych etapach rozwoju.

Poziom auksyny jest podwyższony w ścianach młodych strąków, jednakże przy średniej zawartości IAA w tkankach na poziomie 0-170ng/g różnice te nie są wyraźnie

widoczne. Ponadto brakuje istotnych korelacji w obrębie faz rozwojowych, miejsca na okółku oraz zmienności tkankowej.

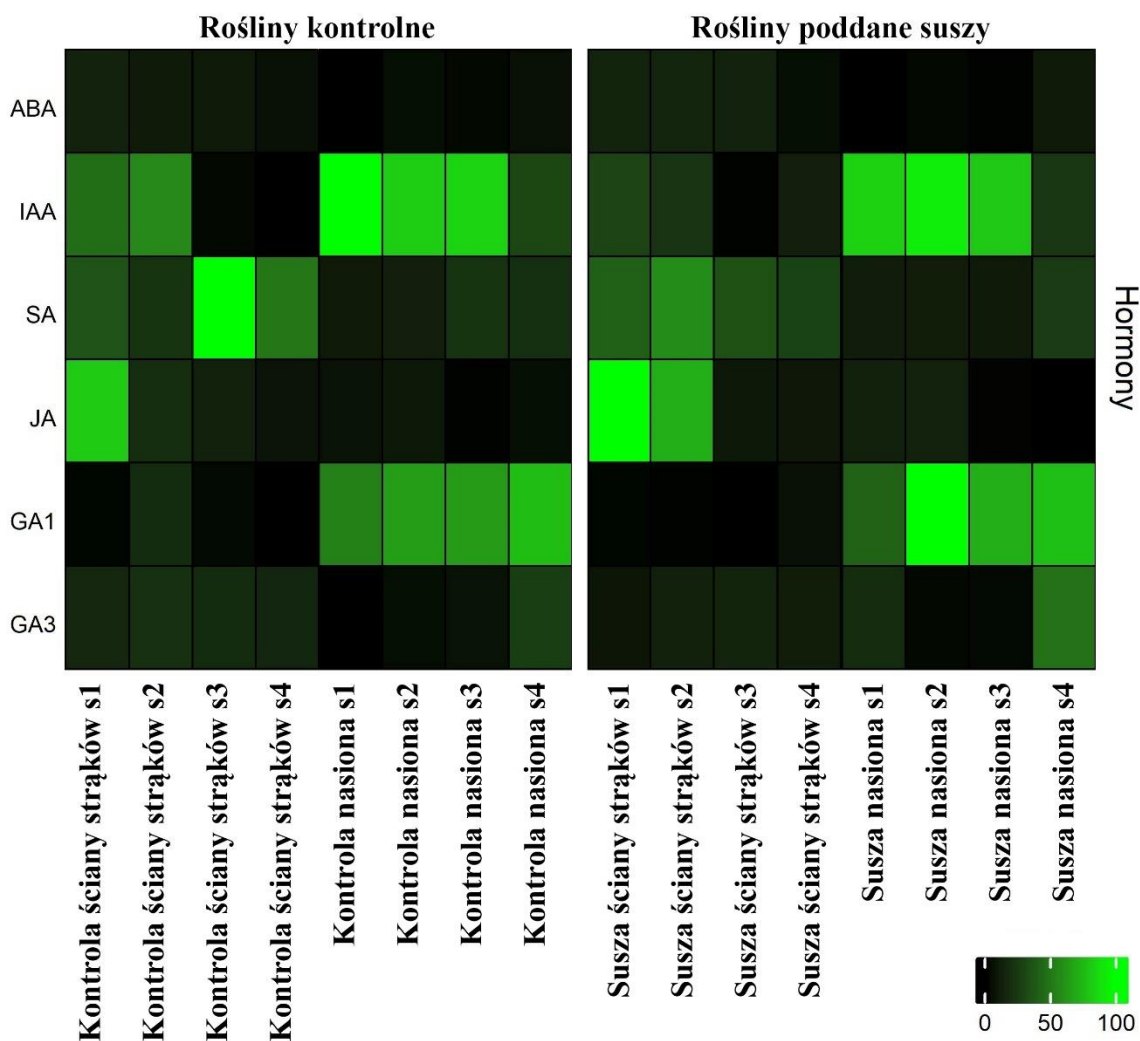
W przypadku kwasu salicylowego, obserwowana jest pewna korelacja związana ze zwiększonym poziomem tego fitohormony w ścianach strąków w stosunku do nasion. Szczególnie dużą akumulację SA można zaobserwować w ścianach dużych, młodych strąków w obrębie wszystkich trzech okółków, jak również w strąkach odpadających.

Kwas jasmonowy występuje w dużym stężeniu w ścianach młodych strąków, po czym jego poziom gwałtownie spada. Podwyższenia poziomu JA nie obserwuje się w tkankach odpadających (zarówno nasionach jak i ścianach strąków), które są odpowiednikami wczesnych stadiów rozwojowych prawidłowo rozwijających się strąków.

Giberelina GA1 jest wyraźnie podwyższona w nasionach w stosunku do ścian strąków we wszystkich trzech okółkach i niemal we wszystkich przypadkach, gdzie wyjątkiem są nasiona pochodzące z trzeciego okółka. Natomiast GA3 wykazuje podwyższony poziom w młodych nasionach z okółków pierwszego i drugiego, oraz w ścianach strąków odpadających.

3.8.3 Fitohormony w w odpowiedzi na stres krótkotrwałej suszy

Analizy poziomu fitohormonów w strąkach zebranych z roślin poddanych stresowi suszy oraz roślin kontrolnych zostały wykonane na pierwszych czterech stadiach rozwojowych strąków (ścian strąków oraz nasion) łubinu żółtego. Analiza ta miała na celu sprawdzenie i weryfikację hipotez związanych ze specyficznymi zmianami hormonów roślinnych w obliczu stresu abiotycznego, oraz porównanie uzyskanych wyników z danymi pochodzącymi z eksperymentów RT-qPCR.



Wykres 38. Heatmapa poziomu fitohormonów zawartych w przeliczeniu na 1g tkanki z określonych stadiów rozwojowych (s1-s4) i tkanek (nasiona oraz ściany strąków) w obrębie rozwoju strąków podczas krótkotrwałej suszy. Kontrola – rośliny kontrolne, susza – rośliny poddane stresowi suszy. Wartości przeskalowane dla następujących zakresów: ABA: 100-2200ng/g, IAA: 25-95ng/g, SA: 50-170ng/g, JA: 50-1200ng/g, GA1: 0-7000ng/g, GA3: 50-850ng/g.

W ogólnym ujęciu nie można zaobserwować istotnych różnic pomiędzy obserwowanym poziomem endogennych fitohormonów pomiędzy roślinami badanymi a roślinami kontrolnymi. Ogólny wzorzec akumulacji pozostaje niezmienny, można zaobserwować jednak kilka interesujących różnic.

Poziom ABA jest praktycznie identyczny (niemal niewykrywalny) w obu wariantach, jednak w przypadku IAA można zaobserwować obniżenie poziomu jego akumulacji w młodych ścianach strąków, które zostały poddane stresowi suszy. Poziom auksyny w młodych nasionach jest również zaniżony w roślinach badanych w stosunku do roślin kontrolnych.

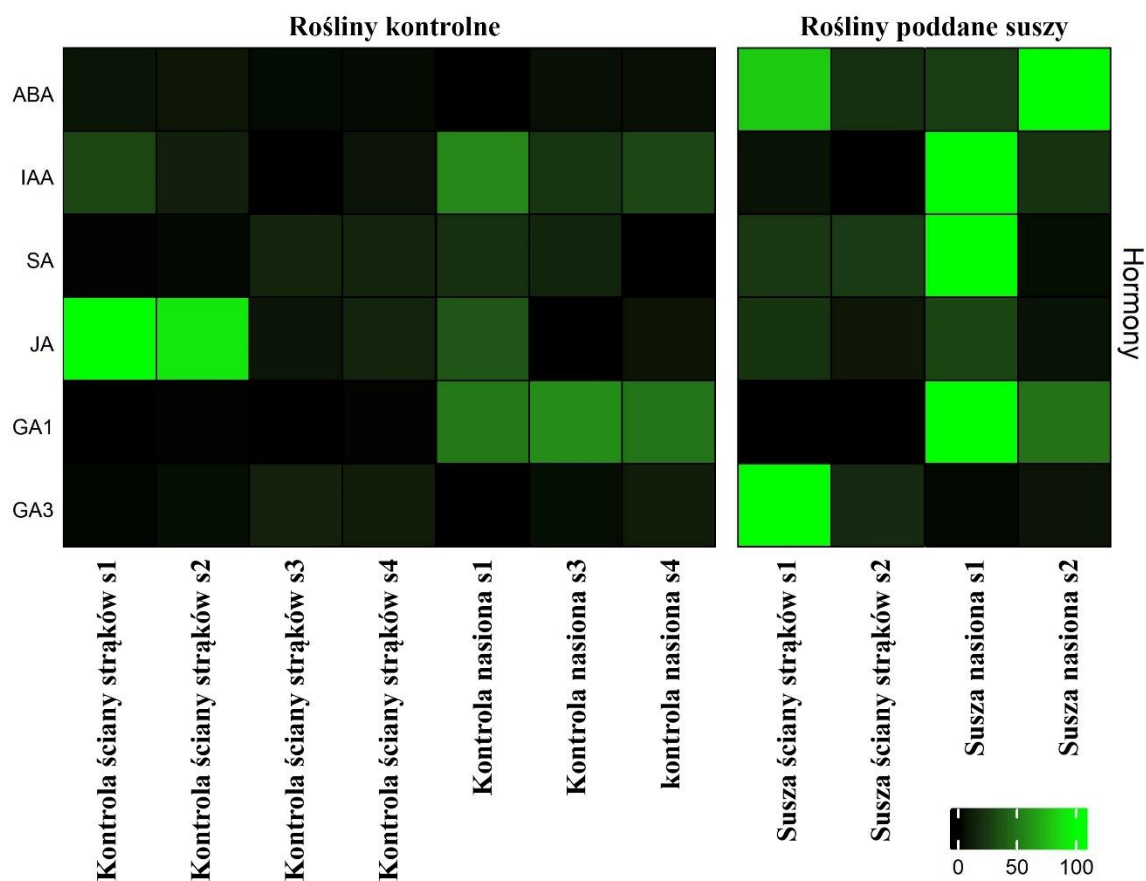
Kwas salicylowy jest wyraźnie akumulowany w stadium s3 ścian strąków roślin kontrolnych, jest to tendencja której nie obserwuje się w roślinach poddanych stresowi, gdzie szczyt kumulacji wypada na stadium s2 i jest o wiele niższy.

Kwas jasmonowy wykazuje podwyższoną akumulację w młodych ścianach strąków, szczególnie podczas suszy, co więcej, jego wysoki poziom zdaje się utrzymywać dłużej, również w stadium s2. Z wiekiem jego poziom jednak spada zarówno w próbach badanych, jak i kontrolnych.

Poziom GA1 jest wyraźnie wyższy w nasionach w stosunku do ścian strąków, niezależnie od warunków w jakich wzrastały rośliny, ponadto, jego poziom jest wyraźnie podwyższony w nasionach s2 roślin poddanych stresowi suszy. Natomiast akumulacja GA3 na niskim poziomie ma miejsce we wszystkich ścianach strąków, jednak wyraźną akumulację można zaobserwować również w nasionach stadium s4. Trend ten ponadto jest dużo bardziej wyraźny w przypadku roślin poddanych stresowi suszy.

3.8.4. Fitohormony w odpowiedzi na stres długotrwałej suszy

Eksperyment długotrwałej suszy stanowił powtórzenie poprzedniego eksperymentu badającego stres suszy (rozdział 3.8.3.), jednak w tym przypadku poziom zastosowanego czynnika stresowego był znacznie wyższy. Nasilenie to spowodowało niestety utratę części materiału badawczego (późniejszych stadiów rozwojowych strąków), pozwoliło jednak na bardziej jednoznaczne uwidocznienie różnic pomiędzy próbą badaną i próbą kontrolną.



Wykres 39. Heatmapa poziomu fitohormonów zawartych w przeliczeniu na 1g tkanki z określonych stadiów rozwojowych (s1-s4) i tkanek (nasiona oraz ściany strąków) w obrębie rozwoju strąków podczas krótkotrwałej suszy. Kontrola – rośliny kontrolne, susza – rośliny poddane stresowi suszy. Wartości przeskalowane dla następujących zakresów: ABA: 50-3100ng/g, IAA: 10-80ng/g, SA: 50-320ng/g, JA: 50-620ng/g, GA1: 200-10000ng/g, GA3: 50-2200ng/g.

Poziom kwasu abscysynowego jest wyraźnie podwyższony w roślinach poddanych stresowi suszy w stosunku do roślin kontrolnych, w szczególności w młodych ścianach strąków (s1) oraz tarszych nasionach (s2). Zaobserwować można również znacznie większe nasilenie tej tendencji niż w przypadku suszy krótkotrwałej.

Poziom IAA jest wyraźnie podwyższony w młodych nasionach z roślin poddanych suszy w stosunku do nasion z roślin kontrolnych, zaś w przypadku ścian strąków sytuacja jest odwrotna, gdyż wyższy poziom akumulacji IAA obserwuje się w ścianach strąków roślin kontrolnych.

Kwas salicylowy wykazuje tendencję do zwiększonej akumulacji w tkankach pochodzących z roślin poddanych stresowi suszy, zwłaszcza w młodych nasionach.

Kwas jasmonowy, natomiast, jest akumulowany znacznie mocniej w ścianach strąków roślin kontrolnych, w stosunku do roślin poddanych suszy. W przypadku nasion nie ma wyraźnych różnic pomiędzy porównaniami.

Akumulację gibereliny GA1 można zaobserwować wyłącznie w nasionach, z wyraźnie podwyższonym poziomem w nasionach w fazie S1 w warunkach suszy, w pozostałych przypadkach poziom jest niemal identyczny, bez statystycznie istotnych różnic. W przypadku GA3 różnica jest tym większa, iż jej obecność jest wyraźnie podwyższona tylko i wyłącznie w nasionach S1 w suszy.

4. Dyskusja

W toku wszystkich badań przeprowadzonych w ramach realizacji niniejszej pracy doktorskiej, udało się uzyskać wiele interesujących wyników rzucających nowe światło na molekularne mechanizmy regulujące rozwój strąków u łubinu żółtego.

Podobnie jak w przypadku wielu innych roślin, procesy odpowiedzialne za wzrost i rozwój, w tym modyfikacje tych procesów pozwalające organizmom na przetrwanie w niekorzystnych warunkach, podlegają skomplikowanej i wielopoziomowej regulacji. Percepcja, interpretacja i odpowiednie zmiany na poziomie zarówno fizjologicznym, aż po zmiany regulacyjne metabolizmu czy transkrypcji genów, umożliwiają dostosowanie się roślin do zmiennych warunków środowiskowych (Kohli i in., 2013; Popko i in., 2010; Fragniere i in. 2011). Wiele doniesień wskazuje, iż szlaki odpowiedzialne za kontrolę rozwoju, w tym również rozwoju owoców, będącego kluczowym procesem w cyklu życiowym roślin, krzyżują się niejednokrotnie ze szlakami sygnałowania regulującymi reakcje roślin na stresy biotyczne i abiotyczne (Alonso-Ramírez i in., 2009; Creelman i in., 1995; Karlovai in., 2013). Sytuacja ta nie jest odosobnieniem również w przypadku łubinu żółtego.

Na podstawie przeprowadzonych analiz *in silico* ustalono, iż wiele mikroRNA obecnych w łubinie żółtym wykazuje różnicową ekspresję w obrębie całych owoców, ścian strąków czy nasion. Ponadto spora grupa miRNA posiada geny docelowe, które są kluczowymi czynnikami transkrypcyjnymi w wielu procesach fizjologicznych roślin (np. *ARF6*, *ARF8*, *TCP4*), co pozwoliło postawić tezę, iż zmiany w obrębie poziomu

akumulacji tych miRNA mogą mieć również kluczowe znaczenie dla programowanego wzrostu i rozwoju owoców, co udało się potwierdzić eksperymentalnie.

4.1. Interpretacja uzyskanych wyników

Badania obejmujące analizy ekspresji *in silico* różnicowych miRNA, analizy RT-qPCR poziomu ekspresji i akumulacji wybranych miRNA i ich genów docelowych oraz badania ilości endogennych fitohormonów w obrębie wielu wariantów eksperymentalnych dostarczyły wiele cennych danych. Wszystkie zebrane dane eksperymentalne po połączeniu w całość pozwoliły na lepsze zrozumienie mechanizmów kontrolno-regulacyjnych w rozwoju strąków łubinu żółtego.

W ujęciu ogólnym model zakładający równoległe współdziałanie zmian w poziomie fitohormonów oraz akumulacji wybranych miRNA i ich genów docelowych w obrębie strąków rozwijających się na różnych piętach kwiatostanu oraz w warunkach stresu suszy okazał się prawidłowy. Uzyskane dane uwidocznily również specyficzne zmiany, które zachodząc w strąkach odpadających stanowią elementy ciągu przyczynowo skutkowego prowadzącego do przedwczesnego wysychania, starzenia się i utraty tych organów. Należy tu nadmienić, iż zmiany te mają zasadniczo inny charakter w przypadku roślin, które zmagają się ze stresem suszy.

4.2. Zmiany ekspresji badanych genów

Regulacja zmian ekspresji genów na poziomie post-transkrypcyjnym stanowi jeden z obecnie coraz lepiej zbadanych i niejednokrotnie kluczowych mechanizmów regulacyjnych u roślin. W niniejszych badaniach, szczególny nacisk został położony na analizy profili ekspresji reprezentatywnych mikro RNA: miRNA159 (Ll-miRNA446), miRNA160 (Ll-miRNA329), Ll-miRNA169, miRNA167 (Ll-miRNA276), oraz miRNA396 (Ll-miRNA380) oraz ich genów docelowych, stanowiących czynniki transkrypcyjne: *LIARF6*, *LIARF17*, *LIGRF9*, *LIGAMYB* oraz *LINF-YA5*.

W każdym z rozpatrywanych przypadków należy zwrócić uwagę na cztery korelacje ekspresji wymienionych powyżej genów i miRNA, a mianowicie: (i) różnice w poziomie

ekspresji pomiędzy ścianami strąków i nasionami, (ii) różnice w poziomie ekspresji w strąkach na różnych piętrach kwiatostanu, (iii) różnice w poziomie ekspresji dla roślin poddanych stresowi suszy oraz (iv) specyficzne zmiany ekspresji w obrębie strąków odpadających. Dodatkowo, uwzględniono element powiązania pomiędzy poziomem ekspresji badanych transkryptów a ilością i reakcją na zmienne poziomy endogennych fitohormonów.

4.2.1. Ll-miR380/miR396 i *LIGRF9*

Ll-miR380/miR396 wykazuje znacznie wyższy poziom akumulacji w prawidłowo rozwijających się ścianach strąków, w stosunku do korespondujących im stadiów rozwojowych nasion. Ponadto, zaobserwowano znacząco wyższą akumulację tego miRNA w strąkach odpadających. Te same tendencje obserwowano w strąkach rozwijających się na różnych piętrach kwiatostanu, tzn. wyższy poziom akumulacji w ścianach strąków w stosunku do nasion oraz podwyższoną ilość w ścianach strąków odpadających. Ogólny poziom akumulacji Ll-miR380/miR396 w obrębie poszczególnych okółków obniżał się jednak wraz z kolejnymi piętrami kwiatostanu. W przypadku stresu krótkotrwałej suszy, akumulacja jest zwiększona dopiero w późniejszych stadiach rozwojowych w obrębie ścian strąków, bez widocznych zmian w nasionach. Długotrwała susza skutkowała jednak obniżeniem ilości tego miRNA w ścianach strąków. Ponadto wzorzec akumulacji, odpowiednika miR396 w łubinie żółtym pozostawał niewrażliwy na zastosowanie egzogennych fitohormonów, z wyjątkiem traktowań PCIB oraz ABA.

Pierwszą rzeczą, którą można zaobserwować w profilach ekspresji *LIGRF9* jest niemal idealnie odwrotny stosunek względnej ilości tego transkryptu do Ll-miRNA380/miR396, zwłaszcza w ścianach strąków. Sytuacja ta możliwa jest do zaobserwowania we wszystkich przeprowadzonych analizach, wliczając w to stresy krótkotrwałej oraz długotrwałej suszy, gdzie *LIGRF9* jest bardziej ekspresyjny w nasionach roślin poddanych stresowi. Poziom ekspresji *LIGRF9* w nasionach ma dynamiczny charakter, z wyraźnym maksimum akumulacji w późniejszych fazach wzrostu i dojrzewania nasion, tendencja ta ulega jedynie przełamaniu w nasionach zebranych ze strąków pochodzących z trzeciego piętra kwiatostanu, gdzie poziom ekspresji jest dysproporcjonalnie niski. Wyniki te pozwalają stwierdzić, że, *LIGRF9* można nazwać

"ujemnym" markerem odpadania strąków, gdyż poziom jego ekspresji w tego typu tkankach jest w każdym z analizowanych wariantów badawczych prawie nie wykrywalny.

Podsumowując, w strąkach łubinu żółtego można zaobserwować wyraźne wyciszenie genu *LIGRF9* poprzez L1-miR380/miR396 w ścianach strąków, natomiast w nasionach, gdzie poziom ekspresji miRNA jest niski, zaobserwować można wyraźne zmiany (wzrost ekspresji) w poziomie jego genu docelowego. Trzeci okółek wykazuje ogólny spadek poziomu ekspresji zarówno *LIGRF9* jak i L1-miR380/miR396, co może być efektem ogólnego spadku aktywności metabolicznej i zamierania strąków na wyższych piętrach kwiatostanu. Związek pomiędzy aktywnością metaboliczną, regulacją transkrypcji oraz zdolnością rośliny do wytworzenia owoców został dobrze zbadany w szczególności na pomidorze (*S. lycopersicum*) (D'Aous i in., 1999; Carrari i in., 2006). Ponadto, reakcją roślin na stres suszy jest zwiększenie poziomu ekspresji *LIGRF9* w nasionach, a w przypadku L1-miR380/miR396 fluktuacje tego miRNA w ścianach strąków zależne są od nasilenia czynnika stresogennego, co może mieć również odzwierciedlenie w fakcie, iż ekspresja tego miRNA jest podatna na wpływ poziomu ABA.

Źródła literaturowe wskazują na istotny wpływ czynnika *GRF9* na regulację procesów takich jak kwitnienie, wzrost i rozwój systemu korzeniowego (Liu i in., 2008; Zhang i in., 2018). Podobne funkcje, jak również regulację *GRF9* przez miR396 obserwuje się również w przypadku łubinu żółtego, jak i u innych roślin, takich jak *Arabidopsis* lub pomidor (*S. lycopersicum*), co może świadczyć o istotności tego modułu regulacyjnego w obrębie różnych gatunków (Hewezi i in., 2012; Karlova i in., 2013).

Szczególne znaczenie może mieć fakt niemal kompletnego zahamowania ekspresji *LIGRF9* w strąkach odpadających, mogą sugerować, iż nadekspresja *LIGRF9* lub zahamowanie działania L1-miR380/miR396 mogłyby przyczynić się do zwiększenia przeżywalności strąków predestynowanych do odpadnięcia (Zhang i in., 2018).

4.2.2. L1-miR276/miR167 i *LIARF6*

Akumulacja L1-miR276/miR167 podczas prawidłowego rozwoju strąków jest niemal niewykrywalna w ścianach strąków, natomiast w przypadku nasion jej wzór jest dynamiczny, z maksimum wypadającym na stadium S3. Strąki odpadające, w szczególności w obrębie różnych okółków kwiatostanu charakteryzują się również wysoką ekspresją tego miRNA. Poziom jego ekspresji jest również dość silnie modyfikowany poprzez zmiany

poziomu fitohormonów, gdzie jego wzrost następuje po egzogennej aplikacji PCIB, ABA, JA-me oraz SA.

Ekspresja *LlARF6* wykazuje stabilność w niemal wszystkich stadiach wzrostowych podczas prawidłowego rozwoju strąków łubinu żółtego, z poziomem ekspresji nieco wyższym w ścianach strąków niż w nasionach. Sytuacja ta jest porównywalna do wyników otrzymanych w przypadku rozwoju strąków na różnych okólkach. Gwałtowny wzrost poziomu ekspresji *LlARF6* zaobserwować można w strąkach odpadających, co może czynić z niego swoisty "marker" odpadania strąków, a jego ekspresja ulega podwyższeniu również w odpowiedzi na podwyższony poziom ABA i JA-Me stosowanych egzogenicznie.

Podsumowując, poziomy ekspresji zarówno Ll- miR276/miR167 jak i *LlARF6*, ulegają znacznemu podwyższeniu w strąkach odpadających, co jest zwłaszcza intrygujące w przypadku miRNA, który w warunkach standardowych jest praktycznie nieobecny w ścianach strąków. Godnym podkreślenia spostrzeżeniem jest fakt, iż ekspresja obu genów zmienia się w przypadku zastosowania egzogennej ABA oraz JA-Me, natomiast pozostaje ona niewrażliwa na traktowanie IAA (Li i in., 2016).

Rodzina czynników transkrypcyjnych *ARF* stanowi niezwykle istotny element regulatorowy konieczny dla prawidłowego wzrostu oraz rozwoju wielu tkanek roślinnych oraz element biorący udział w szlaku percepcji sygnału auksyn (Ulmasov i in., 1997; Gutierrez i in., 2009; Liu i in., 2014). Rolą *ARF6* obok *ARF8* jest między innymi kontrolowanie rozwoju kwiatów (Wu i in., 2006). W przypadku łubinu żółtego korelacja ekspresji w poszczególnych organach wskazuje głównie na akumulację *LlARF6* w ścianach strąków, podczas gdy przewaga Ll-miR276/miR167 obserwowana jest w nasionach. Wyniki te nasuwają wniosek, że Ll-miR276/miR167 może mieć też inne geny docelowe (jak np.: *ARF8*), które w przypadku strąków są intensywniej wyciszane, lub też lokalizacja obu RNA jest bardziej specyficzna w konkretnych grupach komórek badanych organów. Aby zweryfikować te hipotezy, konieczne jednak były by dodatkowe badania.

4.2.3 Ll-miR329/miR160 i *LlARF17*

Ll-miRNA329/miR160 charakteryzuje się stabilną ekspresją podczas prawidłowego rozwoju strąków, z wyraźnymi wzrostami poziomu akumulacji podczas późniejszych stadiów rozwojowych nasion i ścian strąków. Rozmieszczenie strąków na różnych piętach

kwiatostanu nie wpływa na zaobserwowaną ilość tego miRNA, ale jego podwyższenie jest szczególnie wysokie w przypadku strąków odpadających w każdym z eksperymentów. Ponadto, występuje dodatni związek pomiędzy ekspresją L1-miR329/miR160 a egzogenną aplikacją fitohormonami, z wyjątkiem IAA.

L1ARF17 posiada wzorzec ekspresji podobny do omawianego powyżej L1-miR329/miR160, charakteryzujący się stabilnym wzorem pomiędzy poszczególnymi piętrami kwiatostanu, charakterystycznie zwiększonym poziomem akumulacji mRNA w strąkach odpadających, oraz przewagą poziomu ekspresji w nasionach w stosunku do ścian strąków. W wyniku stresu suszy akumulacja transkryptu *L1ARF17* w nasionach jest wyższa w stosunku do nasion z roślin kontrolnych, choć różnica ta ma miejsce jedynie w przypadku krótkotrwałej suszy. W przypadku suszy długotrwałej natomiast zachodzi zjawisko odwrotne, gdzie akumulacja mRNA *L1ARF17* ulega obniżeniu w nasionach roślin poddanych stresowi. Fitohormony obniżają poziom ekspresji tego genu, zwłaszcza w przypadku ABA i JA-Me. Oba te hormony mogą mieć istotny związek z faktem, iż są mediatorami stresu suszy u roślin (Popko i in., 2010; Kim i in., 2004; Wasternack i in., 2013) w związku z czym reakcja roślin na aplikacje tych fitohormonów egzogennie jak również ich endogennie podwyższony poziom związany z suszą mają wpływ na ekspresję *L1ARF17*.

Interakcje L1-miR329/miR160 i *L1ARF17* mogą, podobnie jak w przypadku omawianej wcześniej pary L1-miR276 i *L1ARF6* wskazywać te geny jako potencjalne markery odcinania organów generatywnych u łubinu żółtego. W wyniku spowodowanej warunkami stresu abiotycznego. zwiększonej ekspresji miR160 i miR167, dochodzi do obniżenia poziomu ekspresji *ARF6*, *ARF8*, *ARF10*, *ARF16* i *ARF17*, które są powiązane z regulacją wzrostu i rozwoju. Podwyższony poziom miR160, a co za tym idzie obniżony poziom *ARF17* prowadzi do zwiększenia poziomu białka GH3, co z kolei może obniżać poziom bioaktywnej IAA. Fakt ten może stanowić powiązanie regulacji miR160/*ARF17* i homeostazy auksyny w warunkach stresu abiotycznego (Sunkar i in., 2012).

4.2.4. L1-miR446/miR159 i *L1GAMYB*

L1-miR446/miR159 podczas prawidłowego rozwoju strąków wykazuje akumulację głównie w ścianach strąków, ze szczególnie wysokim poziomem w drugiej fazie rozwoju

(stadium S5-S8). Ilość tego miRNA w obrębie poszczególnych piętér kwiatostanu wydaje się być stabilna, tzn. nie wykazuje zmian pomiędzy poszczególnymi okólkami, a zaobserwować można jedynie wyraźne podwyższenie akumulacji w strąkach odpadających, co ma również miejsce w przypadku analizy rozwoju strąków. Wpływ zastosowania egzogennych fitohormonów przejawia się obniżeniem poziomu ekspresji po traktowaniu IAA oraz SA.

Profil ekspresji *LIGAMYB* w prawidłowym rozwoju strąków jest podobny do analizowanych i opisywanych wcześniej genów docelowych i charakteryzuje się stałą, niemal niezmienną ekspresją w ścianach strąków i podwyższonym poziomem akumulacji w strąkach odpadających. W nasionach, jego poziom jest najwyższy w początkowych stadiach rozwoju (s1-s3). Poziom ekspresji w strąkach, obrębie poszczególnych okólków nie wykazuje wyraźnych fluktuacji, nie ulega on również zmianom w odpowiedzi na traktowanie egzogennymi fitohormonami.

Podsumowując, scharakteryzowana powyżej para L1-miR446/miR159 – *LIGAMYB* charakteryzuje się specyficzną podwyższoną ekspresją w przypadku strąków odpadających, przy jednoczesnym braku zmian w profilu ekspresji zarówno podczas prawidłowego rozwoju strąków, jak i ich rozwoju w obrębie różnych okólków. Niestety, brak danych eksperymentalnych z badań nad stresem suszy nie pozwala na określenie poziomu akumulacji tego miRNA oraz *LIGAMYB* z całą pewnością, można jednak domniemać, iż podwyższony poziom ABA (zwłaszcza w suszy długotrwałej) wywołuje efekty zahamowania wzrostu związany ze zwiększoną akumulacją miR159 (L1-miR446) i spadek aktywności jego genów docelowych. Chociaż egzogenna aplikacja ABA nie wpłynęła na zmianę poziomu ekspresji L1-miR446/miR159 i *LIGAMYB*, wykazano, że ABA indukuje akumulację miR159 u *Arabidopsis*, co ma szczególne znaczenie w wielu procesach rozwojowych takich jak morfogeneza liści oraz kwiatów czy odpowiedzi na stres suszy (Alonso-Peral i in., 2010; Reyes i in., 2007).

4.2.5. L1-miR169 i *LINF-YA5*

Ze względu na fakt, iż ekspresja L1-miR169 została przeanalizowana jedynie w przypadku strąków pochodzących z różnych piętér kwiatostanu oraz w roślinach poddanych stresowi suszy, ciężko jest omówić jego akumulację w prawidłowym,

niezaburzonym rozwoju strąków. Można jednak założyć (bazując na wynikach otrzymanych dla innych miRNA i ich genów docelowych), że ekspresja Ll-miR169 i *LINF-YA5* w strąkach roślin kontrolnych podczas eksperymentów stresu suszy jest podobna do tej, która zostałaby zaobserwowana podczas prawidłowego rozwoju strąków. Akumulacja Ll-miR169 w nasionach oraz ścianach strąków utrzymuje się na stałym, relatywnie podobnym do siebie poziomie. Wyraźne podwyższenie ekspresji można zaobserwować jedynie w przypadku strąków odpadających. Podobnie jak w niemal wszystkich rozpatrywanych do tej pory przypadkach, poziom ekspresji w obrębie tkanek pochodzących z trzeciego okółka jest wyraźnie obniżony, co może sugerować spadek ogólnej aktywności metabolicznej (Fernandes i in., 2004)

W warunkach stresu krótkotrwałej suszy występuje wyraźny wzrost akumulacji Ll-miR169 zarówno we wczesnych stadiach rozwojowych ścian strąków (s1-s2) oraz nasion (s1-s3) w roślinach stresowanych w porównaniu z roślinami kontrolnymi, zaś w przypadku długotrwałej suszy różnice te są jedynie jeszcze bardziej widoczne. Podobne tendencje do gwałtownego wzrostu ekspresji *MIR169* zaobserwowano w przypadku ekspozycji na stres suszy korzeni ryżu (*Z. mays*), chociaż poziom ekspresji jego genu docelowego nie ulegał wówczas zmianie (Luan i in., 2015)

Wzorce ekspresji *LINF-YA5* w obrębie różnych pięt kwiatostanu również kształtują się podobnie, gdyż podwyższoną akumulację mRNA *LINF-YA5* obserwować można niemal wyłącznie w strąkach odpadających. Krótkotrwała susza nie ma istotnego wpływu na zwiększenie poziomu transkrypcji tego genu, z wyjątkiem nasion w stadium s4, natomiast w przypadku długotrwałej suszy ekspresja *LINF-YA5* jest znacznie podwyższona, zwłaszcza w najmłodszych nasionach i owocniach z roślin poddanych stresowi.

Podczas gdy po traktowaniu roślin roztworami fitohormonów nie zaobserwowano żadnych istotnych zmian w poziomie akumulacji Ll-miR169, poziom ekspresji genu *LINF-YA5* uległ podwyższeniu po traktowaniu GA3 oraz ABA, co znajduje odzwierciedlenie w danych literaturowych (Luan i in., 2015).

Podsumowując, opisana powyżej para miRNA-gen docelowy może stanowić zarówno indyktor wyznakowania strąków do odcięcia, jak również wyznacznik stopnia stresu suszy jakiego poddane zostały rośliny, z których zebrano strąki. Wnioski te znajdują swoje potwierdzenie w danych literaturowych, gdyż nie tylko *NF-YA5*, ale również inni członkowie rodziny czynników transkrypcyjnych *NFY*, tacy jak *-A2*, *-A3*, *-A7* czy *-A10*

są powiązani z redukcją utraty wody poprzez liście i zwiększanie tolerancji roślin na stres u *Arabidopsis* (Li et al., 2008; Warpeha i in., 2007). Znajduje to potwierdzenie również w podwyższonym poziomie akumulacji *LINF-YA5* u łubinu żółtego podczas długotrwałej suszy.

4.2.6. *LIHEX3*, *LIPYL10*, *LIPROT1* oraz *LIPROT2*

Powyższe cztery geny zostały poddane analizie jedynie w eksperymentach krótkotrwałej oraz długotrwałej suszy jako hipotetyczne markery odpowiedzi na ten rodzaj stresu.

W przypadku *LIHEX3* krótkotrwała susza nie przyniosła żadnych istotnych zmian w profilu ekspresji, natomiast susza długotrwała powodowała obniżenie poziomu transkryptu. Ciężko jest stwierdzić, czy spadek ten jest spowodowany jako bezpośrednia reakcja na stres suszy, czy raczej efekt zahamowania metabolicznego w obliczu skrajnie niekorzystnych warunków środowiskowych.

W suszy krótkotrwałej ekspresja genu *LIPYL10* nie różni się pomiędzy próbkami pochodzącymi z roślin badanych względem roślin kontrolnych, natomiast w suszy długotrwałej, poziom ekspresji tego genu jest zdecydowanie podwyższony, zarówno w nasionach, jak i ścianach strąków. Dane te pozwalają z umiarkowaną pewnością ocenić gen *LIPYL10* jako dobry marker dla stresu suszy u łubinu żółtego, pod warunkiem, iż stres ten ma odpowiednio długi czas trwania i/lub natężenie.

LIPROT1 wykazuje wyraźną tendencję do akumulacji w nasionach w porównaniu ze ścianami strąków, jednak w przypadku krótkotrwałej suszy różnice w poziomie tej akumulacji są znikome. Sytuacja zmienia się natomiast w przypadku suszy długotrwałej, gdzie poziom ekspresji tego genu rośnie w ścianach strąków, podczas gdy poziom ekspresji w obrębie nasion pozostaje niemal identyczny jak w przypadku suszy krótkotrwałej.

LIPROT2 przejawia odwrotny wzorzec specyficzności tkankowej w stosunku do *LIPROT1*, gdyż podlega akumulacji głównie w ścianach strąków, z nieznaczną ekspresją w obrębie nasion. W przypadku suszy krótkotrwałej jak i długotrwałej nie obserwuje się istotnych zmian.

Podsumowując, spośród czterech opisanych powyżej transkryptów, jedynie *LIPYL10* oraz *LIPROTI* mogą być z umiarkowaną pewnością określone jako markery stresu suszy dla łubinu żółtego. Pokrywa się to również z danymi literaturowymi, w których geny te odpowiedzialne są za percepcję ABA, jednego z kluczowych fitohormonów w odpowiedzi na stres suszy, oraz gospodarkę wodną roślin (Taylor 1996; Verma i in., 2019).

Analizy tych wskaźników wykazały, że sam pomiar wilgotności gleby a nawet pomiar ilości wody w liściach nie jest w stanie w pełni odzwierciedlić tego, jak "zestresowana" jest cała roślina. Dopiero długotrwała susza wyraźnie wpłynęła na ekspresję genów wskaźnikowych, poziom hormonów i ekspresję pozostałych genów. Badanie to zdaje się wskazywać, iż łubin żółty bardzo chroni owoce przed stresem suszy. Wzorec ekspresji badanych miRNA i ich genów docelowych wskazują, że jego strategią przetrwania w ekstremalnej suszy jest przyspieszenie zakończenia rozwoju nasion.

4.3. Zmiany poziomu transkryptów i fitohormonów w rozwoju strąków

Badanie ilości endogennych fitohormonów w poszczególnych tkankach i na różnych etapach rozwojowych strąków łubinu żółtego, jak również w warunkach stresu suszy, pozwoliło na lepsze zrozumienie wzorców ekspresji powiązanych z nimi genów. Naturalna akumulacja kwasu abscysynowego ma miejsce podczas końcowych stadiów rozwoju nasion, choć jego obecność jest również wykrywalna podczas wczesnych stadiów rozwojowych w ścianach strąków. Podwyższony poziom ABA jest również skorelowany z odpadaniem strąków oraz z reakcją roślin na stres, w przypadku której poziom ABA jest również podwyższony.

Auksyna jako naturalny stymulator wzrostu jest silnie akumulowana w młodych, intensywnie rozwijających owocach i jej poziom spada wraz z wiekiem. Stres suszy nie wpływa znacząco na ilość endogennej auksyny, natomiast tkanki predysponowane do odpadania wykazują zmniejszoną ilość tego hormonu.

Kwas jasmonowy ulega akumulacji zasadniczo jedynie w młodych ścianach strąków, gdzie jego stężenie spada w liniowy sposób wraz z wiekiem. Jego niewielka ilość obecna jest również w młodych nasionach. Kompletny brak JA wykazują natomiast strąki odpadające.

Gibereliny GA1 i GA3 wykazują odmienny wzorzec akumulacji, pomimo faktu, iż ich struktura chemiczna i funkcja biologiczna są do siebie podobne. GA1 jest obecna głównie w nasionach, zwłaszcza w środkowych etapach ich wzrostu, przy czym warunki stresu abiotycznego zwiększają jej poziom. GA3 natomiast jest obecna głównie w końcowych etapach rozwoju nasion, jak również w strąkach odpadających (w szczególności w ścianach tych strąków).

Porównanie zaobserwowanych zmian akumulacji hormonów można częściowo skorelować z profilem ekspresji wybranych do analiz miRNA oraz ich genów docelowych. Ekspresja Ll-miR276/miR167 wykazuje podobny profil jak wzorzec akumulacji IAA oraz GA1, co może wskazywać, że jego ekspresja może być stymulowana przez auksynę podobnie jak u ryżu (Liu i in., 2009). Dodatkowo auksyna razem z Ll-miR329/miR160 moduluje akumulację mRNA *LlARF17*. Inną tendencje ekspresji niż powyższe geny wykazuje *LlGRF9*. Akumulacja jego mRNA wzrasta wraz z wiekiem nasion i jest najwyższa w stadium S8. Z kolei poziom transkryptu tego genu jest znacznie niższy w ścianach strąków i spada wraz z wiekiem. Wydaje się, że na taki obraz składa się stymulujący wpływ na ekspresję *LlGRF9* hormonu ABA w nasionach oraz hamujący wpływ Ll-miR380/miR396 (Zhang i in., 2018).

Tego typu korelacji między ekspresją genów a poziomem hormonów trudno się doszukiwać w próbach ze strąków odpadających i nieodpadających. Jest to najprawdopodobniej związane z faktem, że: (i) Próby to całe strąki zawierające zarówno ściany jak i nasiona. Biorąc pod uwagę na tkankową specyficzność akumulacji zarówno hormonów i transkryptów, może to powodować uśrednienie wyniku analizy i brak wyraźnych tendencji. (ii) Spadek ogólnego poziomu metabolizmu i poziomów ekspresji genów nie pozwala na określenie wiarygodnych interakcji pomiędzy poziomem fitohormonów (który też jest anormalny w stosunku do prawidłowo rozwijających się tkanek) a ekspresji tych genów.

W przypadku kiełkujących nasion *A. thaliana* poziom ekspresji miR159 wzrastał w sadzonkach traktowanych ABA. MiR159 pośredniczył w spadku transkryptów MYB101 i MYB33 i sprawiał, że rośliny były mniej wrażliwe na ABA. Jednocześnie rośliny transgeniczne w których dochodziło do ekspresji odpornych na degradację przez miR159 form MYB33 i MYB101 wykazywały nadwrażliwość na ABA (Reyes i in., 2007).

Również miR167 i miR413 podlegają kontroli przez ABA w ryżu (*O. sativa*) co może sugerować ich zaangażowanie w regulację ekspresji genów odpowiadających

za odpowiedź i adaptację do warunków stresu (Liu i in., 2009a). Ekspresja miR167 ulega obniżeniu przez ABA, podczas gdy ekspresja miR413 ulega podwyższeniu. Obniżenie poziomu miR167 przyczyniało się do wzrostu ilości transkryptu *ARF8*, co z kolei może stanowić powiązanie regulacji szlaków ABA oraz IAA (Ru i in., 2006). W przypadku *Arabidopsis*, miR167 który kontroluje poziom ekspresji *ARF6* i *ARF8*, jest również podatny na działanie auksyny (Wu i in., 2006). Badania wykazały, że traktowanie *O. sativa* IAA powodowało podwyższenie poziomu miR167, co w efekcie powodowało spadek ilości transkryptów *ARF8* oraz *OsGH3-2*, genu kodującego enzym koniugujący aminokwasy, który również podlegał regulacji przez *ARF8* (Yang i in., 2006).

Proponowany szlak transdukcji sygnału auksyny, IAA-miR167-ARF8-OsGH3-2, może być ważnym elementem określającym poziom biodostępnej wolnej IAA w komórkach roślinnych (Yang i in., 2006). Badania wskazują ponadto na rolę miR159 w regulacji sygnalizacji GA w aspekcie rozwoju kwiatów (Achard i in., 2004). MiR159 kieruje cięciem mRNA kodującego białka z rodziny GAMYB, czynników transkrypcyjnych zaangażowanych w promowaną przez GA aktywację genu tożsamości merystemu kwiatowego *LEAFY* oraz w regulację rozwoju pylników. Podwyższony poziom miR159 wywołany przez GA może obniżyć aktywność *LEAFY* przyczyniającą się do zaburzenia rozwoju pylników (Achard i in., 2004). MiR319 natomiast bierze pośredni udział w syntezie kwasu jasmonowego poprzez wyciszanie czynników transkrypcyjnych z rodziny TCP, które odpowiadają za kontrolę biosyntezy JA (Schommer i in. 2008).

Na podstawie przeprowadzonych badań i danych literaturowych skonstruowany został schemat występujących u łubinu żółtego interakcji między poziomem hormonów, miRNA oraz ich genów docelowych (Rycina 27), Natomiast zestawienie wszystkich danych uzyskanych w toku przeprowadzonych badań znajduje się w tabelach 30-31.

Tabela 30. Zestawienie danych eksperymentalnych z wszystkich wykonanych analiz RT-qPCR. Strzałka w górę oznacza rosnący poziom ekspresji, strzałka w dół oznacza malejący poziom ekspresji, pozioma linia oznacza ekspresję na stałym, niezmiennym poziomie, strzałki skierowane w górę i dół oznaczają skomplikowany wzorzec ekspresji. Wyniki oznaczone * oznaczają dane ze stadiów rozwojowych 1-4 na podstawie eksperymentów suszy krótkotrwałej i długotrwałej, natomiast „x” oznacza brak danych eksperymentalnych.

	Podczas rozwoju nasion	Podczas rozwoju ścian strąków	W strąkach odpadających	Wraz ze wzrostem pięter kwiatostanu	W krótkotrwałym stresie suszy	W długotrwałym stresie suszy
Ll-miR380/miR396	—	↑	↑	↓	↑	↓
LIGRF9	↑	—	↓↓	↓↑	↑	↓↑
Ll-miR276/miR167	↑	—	↑↑	↓	x	x
LIARF6	—	—	↑↑	↓↑	x	x
Ll-miR329/miR160	—	—	↑↑	↓	—	—
LIARF17	↑	—	↑↑	↓↑	—	↓↑
Ll-miR446/miR159	—	↑↑	↑↑	—	x	x
LIGAMYB	↓	—	↑↑	↑	x	x
miR169	— *	— *	↑↑	↓↑	—	↑↑
LINF-YA5	↓ *	↓ *	↓↓	↓↓	—	↑↑
LIHEX3	↓ *	↓ *	x	x	—	↓
LIPYL10	↓ *	— *	x	x	—	↑
LIPROT1	↑ *	— *	x	x	—	↑
LIPROT2	— *	↓↑ *	x	x	—	↓↑

Tabela 31. Zestawienie danych eksperymentalnych z wszystkich wykonanych analiz ilości endogennych fitohormonów. Strzałka w górę oznacza rosnący poziom akumulacji, strzałka w dół oznacza malejący poziom akumulacji, pozioma linia oznacza akumulację na stałym, niezmiennym poziomie, strzałki skierowane w górę i dół oznaczają skomplikowany wzorzec akumulacji.

	Podczas rozwoju nasion	Podczas rozwoju ścian strąków	W strąkach odpadających	Wraz ze wzrostem pięter kwiatostanu	W krótkotrwałym stresie suszy	W długotrwałym stresie suszy
ABA	↑	↓	—	—	—	↑↑
IAA	↓↑	↓	↓	↓	—	↑
SA	↓↑	↓	—	↓↑	↓	↑
JA	↓	↓	↓↓	↓	↓↑	↓
GA1	↓↑	—	↑	↓↑	↓↑	↑
GA3	↑	—	↑	↓↑	—	↑

4.4. Podsumowanie

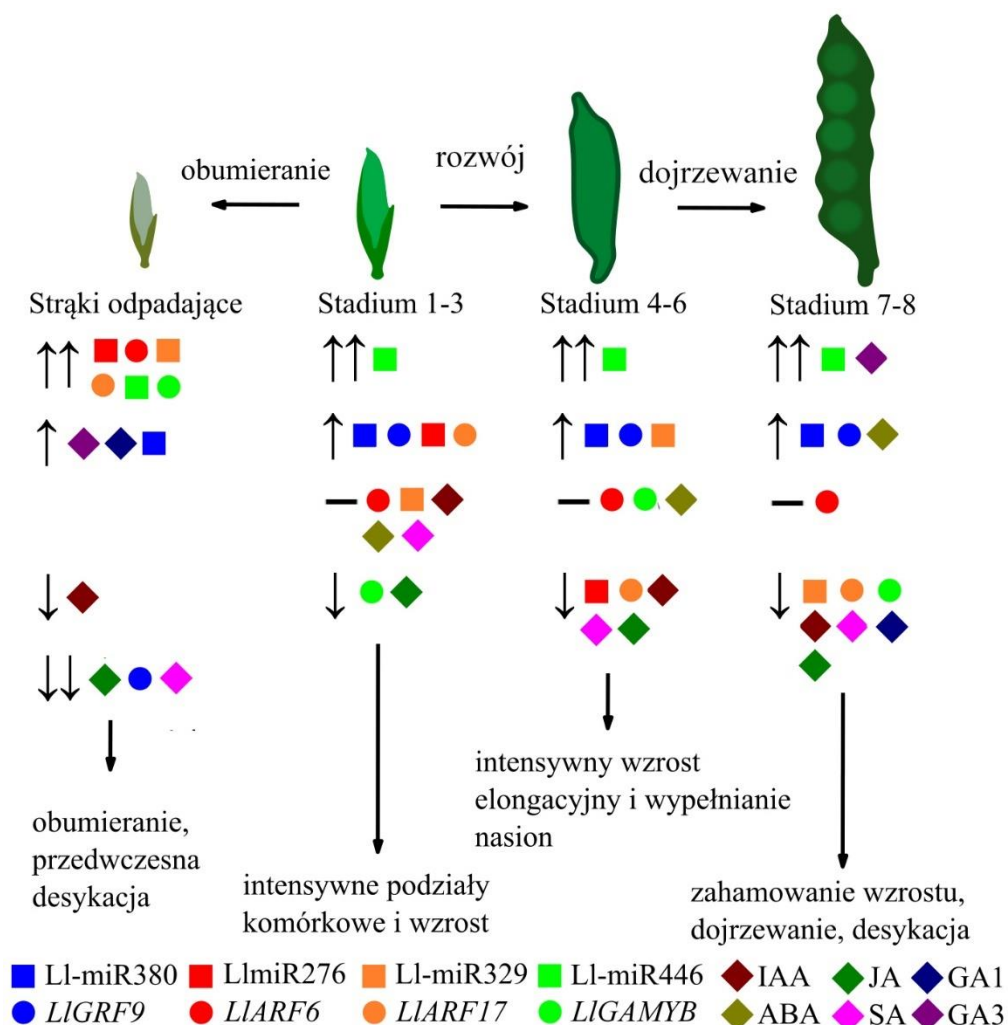
Rozwój generatywny stanowi kluczowy element cyklu rozwojowego wszystkich roślin, w związku z czym fakt, iż proces ten podlega dokładnej i skomplikowanej regulacji nie powinien być zaskoczeniem. Wytworzenie w pełni wykształconych i dobrze zaopatrzonych w składniki zapasowe nasion stanowi podstawę do zapewnienia trwania gatunku. W toku niniejszej pracy udało się ustalić, iż prawidłowa ekspresja wielu czynników transkrypcyjnych, stanowiących niejednokrotnie element regulacyjny wielu szlaków sygnałowych związanych również z hormonami, jest konieczny i niezbędny do prawidłowego wzrostu strąków u *Lupinus luteus*. Proces ten przebiega podobnie w przypadku wielu roślin strączkowych, w tym również innych łubinów takich jak łubin biały czy wąskolistny (DeBoer i in., 2019, Singh i in., 2020), co wynika z wysokiego pokrewieństwa pomiędzy tymi roślinami.

Przeprowadzone badania w sposób znaczący poszerzyły ogólny stan wiedzy na temat występujących u łubinu żółtego interakcji pomiędzy mikro RNA i ich genami docelowymi, a ponadto pozwoliły na powiązanie tych informacji z aspektami takimi jak rozwój strąków, odporność na stres suszy oraz odpadanie organów generatywnych. Lepsze poznanie mechanizmów kontrolujących wzrost i rozwój roślin użytkowych, do których zaliczyć można *L. luteus*, jest istotnym krokiem w obliczu nasilających się zmian klimatu, w wyniku którego rosnące temperatury i zmienne warunki uprawne mogą w znaczący sposób wpływać na przeżywalność i plonowanie roślin.

Zjawisko odpadania strąków jest istotnym i jednym z głównych problemów związanym z plonowaniem łubinu żółtego. Strąki odpadające przejawiają szereg specyficznych cech morfologicznych, takich jak zmniejszony rozmiar w stosunku do swoich nieodpadających sąsiadów, karłowate i niewykształcone nasiona, brak turgoru i wiele innych. Desykacja strąków po ukończeniu przez nie dojrzewania jest naturalnym i programowanym procesem rozwojowym, jednak w przypadku strąków odpadających, proces ten zdaje się być wykorzystany przedwcześnie, w celu eliminacji ich nadmiaru. Nawet w optymalnych warunkach łubin żółty wytwarza znacznie więcej kwiatów i strąków, niż byłby w stanie realnie podtrzymać i zapewnić im prawidłowy wzrost, zaś selekcja ta staje się jeszcze bardziej widoczna w warunkach stresów biotycznych i abiotycznych. Nie można jednoznacznie stwierdzić, który z czynników powoduje przedwczesne odpadanie owoców, gdyż obserwowany w nich szereg zmian zarówno w stężeniu fitohormonów jak

i zmianach w ekspresji niektórych genów może jednocześnie stanowić przyczynę jak i efekt towarzyszący omawianego zjawiska. Nie można również zapomnieć o kwestii niedoboru wody oraz potencjalnego niedostatku składników odżywczych docierających do tkanek, które również potencjalnie mogą stanowić wyzwalacz dla uruchomienia mechanizmów odpadania strąków.

Badania nad łubinem żółtym dostarczyły wyników pozwalających stwierdzić, że proces dojrzewania i odpadania owoców jest wielopoziomowy i wieloskładnikowy, co przedstawiono na schemacie występujących u łubinu żółtego interakcji między poziomem hormonów, miRNA oraz ich genów docelowych, przedstawionego na rycinie 27.



Rycina 27. Udział mikro RNA, ich genów docelowych oraz fitohormonów w rozwoju strąków łubinu żółtego w optymalnych warunkach. Strzałki określają przyrost lub spadek akumulacji danego miRNA, genu docelowego lub fitohormonu, natomiast linia „-” brak zmian pomiędzy poszczególnymi stadiami rozwojowymi.

5. Wnioski

Na podstawie uzyskanych wyników można wyciągnąć następujące wnioski:

1. Rozwijające się strąki charakteryzują się wysoką dynamiką ekspresji specyficznych miRNA i ich genów docelowych, wskazując na obecność precyzyjnych mechanizmów regulacyjnych, które są sekwencyjnie „włączane” lub „wyłączane” w obrębie poszczególnych tkanek dla zapewnienia ich prawidłowego wzrostu. Łubin żółty posiada conajmniej kilka miRNA, które aktywnie biorą udział w rozwoju owoców a ich aktywność jest ściśle powiązana ze szlakami regulacyjnymi jednego lub więcej fitohormonów.
2. Rozwój owoców (stąków) łubinu żółtego jest uwarunkowany ułożeniem w kwiatostanie.
3. Umiarkowany oraz długotrwały stres suszy wpływają w różny sposób na strategię przeżyciową owoców. Stres umiarkowany nie skutkuje zmianą tempa rozwoju i ilość wytwarzanych owoców, podczas gdy skrajnie intensywne susza, prowadzi do szybkiego wykształcenia strąków i dojrzewania nasion, choć w mocno zredukowanej liczbie.
4. Przedwcześnie opadające, niedojrzałe, strąki charakteryzują się specyficznym, swoistym wzorcem akumulacji zarówno transkryptów miRNA i ich genów docelowych, jak również zmiennym poziomem endogennych fitohormonów, w porównaniu do prawidłowo rozwijających się owoców jak i strąków tych, predestynowanych do odpadnięcia w wyniku działania stresu suszy
5. Pary Ll-miR380/miR396 - *LIGRF9* oraz Ll-miR169 - *LINF-YA5* mogą być wykorzystane jako molekularne markery zarówno prawidłowego wzrostu, jak i wskazujące na odpadanie owoców u łubinu żółtego.

Bibliografía

1. Achard, P., Herr, A., Baulcombe, D. C., Harberd, N. P. (2004) Modulation of floral development by a gibberellin-regulated microRNA. *Development* 131, 3357–3365
2. Achard, P., Cheng, H., De Grauwe, L., Decat, J., Schoutteten, H., Moritz, T., Van Der Straeten, D., Peng, J., Harberd, N. P. (2006). Integration of plant responses to environmentally activated phytohormonal signals. *Science*, 311(5757), 91-94.
3. Addo-Quaye, C., Miller, W., Axtell, M. J. (2009). CleaveLand: a pipeline for using degradome data to find cleaved small RNA targets. *Bioinformatics*, 25(1), 130-131.
4. Allaire, J. (2012). RStudio: integrated development environment for R. *Boston, MA*, 770(394), 165-171.
5. Allen, E., Xie, Z., Gustafson, A. M., Carrington, J. C. (2005). microRNA-directed phasing during trans-acting siRNA biogenesis in plants. *Cell*, 121(2), 207-221.
6. Alonso-Peral, M. M., Li, J., Li, Y., Allen, R. S., Schnippenkoetter, W., Ohms, S., White R. G., Millar, A. A. (2010). The microRNA159-regulated GAMYB-like genes inhibit growth and promote programmed cell death in Arabidopsis. *Plant physiology*, 154(2), 757-771.
7. Alonso-Ramírez, A., Rodríguez, D., Reyes, D., Jiménez, J. A., Nicolás, G., López-Climent, M., Gómez-Cadenas, A., Nicolás, C. (2009). Evidence for a role of gibberellins in salicylic acid-modulated early plant responses to abiotic stress in Arabidopsis seeds. *Plant Physiology*, 150(3), 1335-1344.
8. Ananieva, E. A., Alexieva, V. S., Popova, L. P. (2002). Treatment with salicylic acid decreases the effects of paraquat on photosynthesis. *Journal of Plant Physiology*, 159(7), 685-693.
9. Arbona, V., Gómez-Cadenas, A. (2008). Hormonal modulation of citrus responses to flooding. *Journal of Plant Growth Regulation*, 27(3), 241-250.
10. Arbona, V., Argamasilla, R., Gómez-Cadenas, A. (2010). Common and divergent physiological, hormonal and metabolic responses of Arabidopsis thaliana and Thellungiella halophila to water and salt stress. *Journal of plant physiology*, 167(16), 1342-1350.
11. Bailey-Serres, J., Voeselek, L. A. (2010). Life in the balance: a signaling network controlling survival of flooding. *Current opinion in plant biology*, 13(5), 489-494.
12. Bandurska, H., Pietrowska-Borek, M., Cieślak, M. (2012). Response of barley seedlings to water deficit and enhanced UV-B irradiation acting alone and in combination. *Acta Physiologiae Plantarum*, 34(1), 161-171.
13. Baumberger, N., Baulcombe, D. C. (2005). Arabidopsis ARGONAUTE1 is an RNA Slicer that selectively recruits microRNAs and short interfering RNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(33), 11928-11933.
14. Bazzini, A. A., Lee, M. T., Giraldez, A. J. (2012). Ribosome profiling shows that miR-430 reduces translation before causing mRNA decay in zebrafish. *Science*, 336(6078), 233-237.
15. Bi, F., Meng, X., Ma, C., Yi, G. (2015). Identification of miRNAs involved in fruit ripening in Cavendish bananas by deep sequencing. *BMC Genomics*, 16(1), 1–15.
16. Borsani, O., Valpuesta, V., Botella, M. A. (2001). Evidence for a role of salicylic acid in the oxidative damage generated by NaCl and osmotic stress in Arabidopsis seedlings. *Plant physiology*, 126(3), 1024-1030.
17. Boukid, F., Pasqualone, A. (2022). Lupine (*Lupinus* spp.) proteins: characteristics, safety and food applications. *Eur Food Res Technol* 248, 345–356
18. Bowling, S. A., Clarke, J. D., Liu, Y., Klessig, D. F., Dong, X. (1997). The cpr5 mutant of Arabidopsis expresses both NPR1-dependent and NPR1-independent resistance. *The plant cell*, 9(9), 1573-1584.

19. Browse, J. (2009). Jasmonate passes muster: a receptor and targets for the defense hormone. *Annual Review of Plant Biology*, 60, 183-205.
20. Buxdorf, K., Hendelman, A., Stav, R., Lapidot, M., Ori, N., Arazi, T. (2010). Identification and characterization of a novel miR159 target not related to MYB in tomato. *Planta*, 232(5), 1009-1022.
21. Byszewski, W. (1969). Wyniki badań nad biologią kwitnienia *Lupinus luteus* L. *Wiadomości Botaniczne*, 13(3).
22. Cabrera, J., Barcala, M., García, A., Rio-Machín, A., Medina, C., Jaubert-Possamai, S., Favery, B., Maizel, A., Ruiz-Ferrer, V., Fenoll, C., Escobar, C. (2016). Differentially expressed small RNA s in *Arabidopsis* galls formed by *Meloidogyne javanica*: a functional role for miR390 and its TAS 3-derived tasi RNA s. *New Phytologist*, 209(4), 1625-1640.
23. Candar-Cakir, B., Arican, E., Zhang, B. (2016). Small RNA and degradome deep sequencing reveals drought-and tissue-specific micrnas and their important roles in drought-sensitive and drought-tolerant tomato genotypes. *Plant biotechnology journal*, 14(8), 1727-1746.
24. Carrari, F., Baxter, C., Usadel, B., Urbanczyk-Wochniak, E., Zanol, M. I., Nunes-Nesi, A., Nikiforova, V., Centero, D., Ratzka, A., Pauly, M., Sweetlowe, L. J., Fernie, A. R. (2006). Integrated analysis of metabolite and transcript levels reveals the metabolic shifts that underlie tomato fruit development and highlight regulatory aspects of metabolic network behavior. *Plant Physiology*, 142(4), 1380-1396.
25. Chen, H., Chen, X., Chen, D., Li, J., Zhang, Y., & Wang, A. (2015). A comparison of the low temperature transcriptomes of two tomato genotypes that differ in freezing tolerance: *Solanum lycopersicum* and *Solanum habrochaites*. *BMC plant biology*, 15(1), 1-16.
26. Chini, A., Grant, J. J., Seki, M., Shinozaki, K., Loake, G. J. (2004). Drought tolerance established by enhanced expression of the CC-NBS-LRR gene, *ADR1*, requires salicylic acid, *EDS1* and *ABI1*. *The Plant Journal*, 38(5), 810-822.
27. Chini, A., Fonseca, S. G. D. C., Fernandez, G., Adie, B., Chico, J. M., Lorenzo, O., García-Casado, G., López-Vidriero, I., Lozano, F. M., Ponce, M. R., Micol, J. L., Solano, R. (2007). The JAZ family of repressors is the missing link in jasmonate signalling. *Nature*, 448(7154), 666-671.
28. Chung, H. S., Niu, Y., Browse, J., Howe, G. A. (2009). Top hits in contemporary JAZ: an update on jasmonate signaling. *Phytochemistry*, 70(13-14), 1547-1559.
29. Clarke, S. M., Mur, L. A., Wood, J. E., Scott, I. M. (2004). Salicylic acid dependent signaling promotes basal thermotolerance but is not essential for acquired thermotolerance in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 38(3), 432-447.
30. Colebrook, E. H., Thomas, S. G., Phillips, A. L., Hedden, P. (2014). The role of gibberellin signalling in plant responses to abiotic stress. *Journal of experimental biology*, 217(1), 67-75.
31. Cooke, T. J., Poli, D., Szein, A., Cohen, J. D. (2002). Evolutionary patterns in auxin action. *Auxin molecular biology*, 319-338.
32. Cowling, W. (2001). *Lupins (Lupinus L.)*. In *Plant Genetic Resources of Legumes in the Mediterranean* (pp. 191-206). Springer, Dordrecht.
33. Creelman, R. A., Mullet, J. E. (1995). Jasmonic acid distribution and action in plants: regulation during development and response to biotic and abiotic stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(10), 4114-4119.
34. Cutler, S. R., Rodriguez, P. L., Finkelstein, R. R., Abrams, S. R. (2010). Abscisic acid: emergence of a core signaling network. *Annual review of plant biology*, 61, 651-679.
35. D'Aoust, M. A., Yelle, S., Nguyen-Quoc, B. (1999). Antisense inhibition of tomato fruit sucrose synthase decreases fruit setting and the sucrose unloading capacity of young fruit. *The Plant Cell*, 11(12), 2407-2418.
36. Darko, E., Janda, T., Majláth, I., Szopkó, D., Dulai, S., Molnár, I., Türkösi, E., Molnár-Láng, M. (2015). Salt stress response of wheat–barley addition lines carrying chromosomes from the winter barley “Manas”. *Euphytica*, 203(3), 491-504.

37. Dat, J. F., Lopez-Delgado, H., Foyer, C. H., Scott, I. M. (1998). Parallel changes in H₂O₂ and catalase during thermotolerance induced by salicylic acid or heat acclimation in mustard seedlings. *Plant Physiology*, 116(4), 1351-1357.
38. De Ronde, J. A., Laurie, R. N., Caetano, T., Greyling, M. M., & Kerepesi, I. (2004). Comparative study between transgenic and non-transgenic soybean lines proved transgenic lines to be more drought tolerant. *Euphytica*, 138(2), 123-132.
39. De Smet, I., Lau, S., Voß, U., Vanneste, S., Benjamins, R., Rademacher, E. H., Schlereth, A., De Rybel, B., Vassileva, V., Grunewald, W., Naudts, M., Levesque, M. P., Ehrismann, J. S., Inzé, D., Luschnig, C., Benfey, P. N., Weijers, D., Van Montagu, M. C. C., Bennet, M. J., Jürgens, G., Beeckman, T. (2010). Bimodular auxin response controls organogenesis in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(6), 2705-2710.
40. DeBoer, K., Melser, S., Sperschneider, J., Kamphuis, L. G., Garg, G., Gao, L. L., Fick, K., Singh, K. B. (2019). Identification and profiling of narrow-leaved lupin (*Lupinus angustifolius*) microRNAs during seed development. *BMC genomics*, 20(1), 1-16.
41. Dempsey, D. M. A., Vlot, A. C., Wildermuth, M. C., Klessig, D. F. (2011). Salicylic acid biosynthesis and metabolism. *The Arabidopsis book/American Society of Plant Biologists*, 9.
42. Die, J. V., Román, B. (2012). RNA quality assessment: a view from plant qPCR studies. *Journal of experimental botany*, 63(17), 6069-6077.
43. Djuranovic, S., Nahvi, A., Green, R. (2012). miRNA-mediated gene silencing by translational repression followed by mRNA deadenylation and decay. *Science*, 336(6078), 237-240.
44. Du, H., Liu, H., Xiong, L. (2013). Endogenous auxin and jasmonic acid levels are differentially modulated by abiotic stresses in rice. *Frontiers in plant science*, 4, 397.
45. Du, Z., Chen, A., Chen, W., Westwood, J. H., Baulcombe, D. C., & Carr, J. P. (2014). Using a viral vector to reveal the role of microRNA159 in disease symptom induction by a severe strain of Cucumber mosaic virus. *Plant Physiology*, 164(3), 1378-1388.
46. Faligowska, A., Panasiewicz, K., Szymańska, G., Bartos-Spychała, M. (2013). The seeds quality of yellow lupine depending on selected agrotechnical factors Jakość siewna nasion łubinu żółtego w zależności od wybranych czynników agrotechnicznych. *Progress in Plant Protection*, 53(2), 293-296.
47. Fernandes, F. M., Arrabaca, M. C., & Carvalho, L. M. M. (2004). Sucrose metabolism in *Lupinus albus* L. under salt stress. *Biologia plantarum*, 48(2), 317-319.
48. Finkelstein, R. (2013). Abscisic acid synthesis and response. *The Arabidopsis book/American Society of Plant Biologists*, 11.
49. Fragnière, C., Serrano, M., Abou-Mansour, E., Métraux, J. P., L'Haridon, F. (2011). Salicylic acid and its location in response to biotic and abiotic stress. *FEBS letters*, 585(12), 1847-1852.
50. Franklin, K. A. (2008). Shade avoidance. *New Phytologist*, 179(4), 930-944.
51. Fujita, Y., Fujita, M., Satoh, R., Maruyama, K., Parvez, M. M., Seki, M., Hiratsu, K., Ohme-Takagi, M., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. (2005). AREB1 is a transcription activator of novel ABRE-dependent ABA signaling that enhances drought stress tolerance in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 17(12), 3470-3488.
52. Gao, Z., Nie, J., & Wang, H. (2021). MicroRNA biogenesis in plant. *Plant Growth Regulation*, 93(1), 1-12.
53. Gatel, F. (1994). Protein quality of legume seeds for non-ruminant animals: a literature review. *Animal Feed Science and Technology*, 45(3-4), 317-348.
54. Glazinska, P., Wojciechowski, W., Kulasek, M., Glinkowski, W., Marciniak, K., Klajn, N., Kęsy, 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. *Front. Plant Sci.* 8:641.

55. Glazinska, P., Kulasek, M., Glinkowski, W., Wojciechowski, W., Kosinski, J. (2019). Integrated analysis of small RNA, transcriptome and degradome sequencing provides new insights into floral development and abscission in yellow lupine (*Lupinus luteus* L.). *Int. J. Mol. Sci.* 20:E5122.
56. Glazińska P., Kulasek M., Glinkowski W., Wysocka M., Kosiński J. (2020) LuluDB—The Database Created Based on Small RNA, Transcriptome, and Degradome Sequencing Shows the Wide Landscape of Non-coding and Coding RNA in Yellow Lupine (*Lupinus luteus* L.) Flowers and Pods. *Front. Genet.* 11:455.
57. González-Curbelo, M. Á., Socas-Rodríguez, B., Herrera-Herrera, A. V., González-Sálamo, J., Hernández-Borges, J., Rodríguez-Delgado, M. Á. (2015). Evolution and applications of the QuEChERS method. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 71, 169-185.
58. Gouveia, S. T., Lopes, G. S., Fatibello-Filho, O., Nogueira, A. R. A., Nóbrega, J. A. (2002). Homogenization of breakfast cereals using cryogenic grinding. *Journal of food engineering*, 51(1), 59-63.
59. Guo, H. S., Xie, Q., Fei, J. F., Chua, N. H. (2005). MicroRNA directs mRNA cleavage of the transcription factor NAC1 to downregulate auxin signals for Arabidopsis lateral root development. *The Plant Cell*, 17(5), 1376-1386.
60. Gutierrez, L., Bussell, J. D., Pacurar, D. I., Schwambach, J., Pacurar, M., Bellini, C. (2009). Phenotypic plasticity of adventitious rooting in Arabidopsis is controlled by complex regulation of AUXIN RESPONSE FACTOR transcripts and microRNA abundance. *The Plant Cell*, 21(10), 3119-3132.
61. Haas, B. J., Papanicolaou, A., Yassour, M., Grabherr, M., Blood, P. D., Bowden, J., Couger, M. B., Eccles, D., Li, B., Lieber, M., MacManes, M. D., Ott, M., Orvis, J., Pochet, N., Strozzi, F., Weeks, N., Westerman, R., William, T., Dewey, C. N., Henschel, R., LeDuc, R. D., Friedman, N., Regev, A. (2013). De novo transcript sequence reconstruction from RNA-seq using the Trinity platform for reference generation and analysis. *Nature protocols*, 8(8), 1494-1512.
62. Hayat, Q., Hayat, S., Irfan, M., Ahmad, A. (2010). Effect of exogenous salicylic acid under changing environment: a review. *Environmental and experimental botany*, 68(1), 14-25.
63. Heckman, N. L., Horst, G. L., Gaussoin, R. E., Tavener, B. T. (2002). Trinexapac-ethyl influence on cell membrane thermostability of Kentucky bluegrass leaf tissue. *Scientia Horticulturae*, 92(2), 183-186.
64. Hewezi, T., Maier, T. R., Nettleton, D., Baum, T. J. (2012). The Arabidopsis microRNA396-GRF1/GRF3 regulatory module acts as a developmental regulator in the reprogramming of root cells during cyst nematode infection. *Plant physiology*, 159(1), 321-335
65. Hooley, R., Beale, M. H., Smith, S. J., Walker, R. P., Rushton, P. J., Whitford, P. N., Lazarus, C. M. (1992). Gibberellin perception and the *Avena fatua* aleurone: do our molecular keys fit the correct locks?. *Biochemical Society Transactions*, 20(1), 85-89.
66. Horváth, E., Szalai, G., Janda, T. (2007). Induction of abiotic stress tolerance by salicylic acid signaling. *Journal of Plant Growth Regulation*, 26(3), 290-300.
67. Huang, D., Koh, C., Feurtado, J. A., Tsang, E. W., Cutler, A. J. (2013). MicroRNAs and their putative targets in Brassica napus seed maturation. *BMC genomics*, 14(1), 1-25.
68. Ikeda, A., Ueguchi-Tanaka, M., Sonoda, Y., Kitano, H., Koshioka, M., Futsuhara, Y., Matsuoka, M., Yamaguchi, J. (2001). slender rice, a constitutive gibberellin response mutant, is caused by a null mutation of the SLR1 gene, an ortholog of the height-regulating gene GAI/RGA/RHT/D8. *The Plant Cell*, 13(5), 999-1010.
69. Jiang, Y., Yu, D. (2015). WRKY transcription factors: links between phytohormones and plant processes. *Science China. Life Sciences*, 58(5), 501.
70. Kaczmarek, S. A., Hejdysz, M., Kubis, M., Kasprówicz-Potocka, M., Rutkowski, A. (2016). The nutritional value of yellow lupin (*Lupinus luteus* L.) for broilers. *Animal Feed Science and Technology*, 222, 43–53.

71. Kalandyk, A., Dubert, F., Maciejewski, M., Płażek, A. (2012). Wpływ suszy glebowej i zasolenia na procesy zachodzące w trakcie fazy generatywnej grochu i łubinu. *Episteme*, 15, 121-129.
72. Kamphuis, L. G., Garg, G., Foley, R., & Singh, K. B. (2021). Genomic resources for lupins are coming of age. *Legume Science*, 3(3), e77.
73. Karlova, R., van Haarst, J. C., Maliepaard, C., van de Geest, H., Bovy, A. G., Lammers, M., Angenent G. C., de Maagd R. A.. (2013). Identification of microRNA targets in tomato fruit development using high-throughput sequencing and degradome analysis. *Journal of experimental botany*, 64(7), 1863-1878.
74. Katsir, L., Schillmiller, A. L., Staswick, P. E., He, S. Y., Howe, G. A. (2008). COI1 is a critical component of a receptor for jasmonate and the bacterial virulence factor coronatine. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(19), 7100-7105.
75. Kim, J. H., Woo, H. R., Kim, J., Lim, P. O., Lee, I. C., Choi, S. H., Hwang, D., Nam, H. G. (2009). Trifurcate feed-forward regulation of age-dependent cell death involving miR164 in *Arabidopsis*. *Science*, 323(5917), 1053-1057.
76. Kim, S., Kang, J. Y., Cho, D. I., Park, J. H., Kim, S. Y. (2004). ABF2, an ABRE-binding bZIP factor, is an essential component of glucose signaling and its overexpression affects multiple stress tolerance. *The Plant Journal*, 40(1), 75-87.
77. Kinoshita, N., Wang, H., Kasahara, H., Liu, J., MacPherson, C., Machida, Y., Kamiya, Y., Hannah, M. A., Chua, N. H. (2012). IAA-Ala Resistant3, an evolutionarily conserved target of miR167, mediates *Arabidopsis* root architecture changes during high osmotic stress. *The Plant Cell*, 24(9), 3590-3602.
78. Ko, C. B., Woo, Y. M., Lee, D. J., Lee, M. C., Kim, C. S. (2007). Enhanced tolerance to heat stress in transgenic plants expressing the GASA4 gene. *Plant Physiology and Biochemistry*, 45(9), 722-728.
79. Kohli, A., Sreenivasulu, N., Lakshmanan, P., Kumar, P. P. (2013). The phytohormone crosstalk paradigm takes center stage in understanding how plants respond to abiotic stresses. *Plant Cell Reports*, 32(7), 945-957.
80. Kong, X., Lv, W., Jiang, S., Zhang, D., Cai, G., Pan, J., Li, D. (2013) Genome-wide identification and expression analysis of calcium-dependent protein kinase in maize. *BMC Genom* 14, 433.
81. Korasick, D. A., Enders, T. A., Strader, L. C. (2013). Auxin biosynthesis and storage forms. *Journal of experimental botany*, 64(9), 2541-2555.
82. Kozomara, A., Griffiths-Jones, S. (2014). miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucleic acids research*, 42(D1), D68-D73.
83. Kozomara, A., Birgaoanu, M., & Griffiths-Jones, S. (2019). miRBase: from microRNA sequences to function. *Nucleic acids research*, 47(D1), D155-D162.
84. Kramer, M. F. (2011). Stem-loop RT-qPCR for miRNAs. *Current protocols in molecular biology*, 95(1), 15-10.
85. Krasensky, J., Jonak, C. (2012). Drought, salt, and temperature stress-induced metabolic rearrangements and regulatory networks. *Journal of experimental botany*, 63(4), 1593-1608.
86. Książek, D. (1962) Badania nad degeneracją nasiennego łubinu żółtego w różnych rejonach klimatycznych Polski [Investigations on degeneration of seed yellow lupine in different climatic districts in Poland]. *Acta Agrobotanica*, 23(1), 183-218.
87. Larkindale, J., Vierling, E. (2008). Core genome responses involved in acclimation to high temperature. *Plant physiology*, 146(2), 748.
88. Laufs, P., Peaucelle, A., Morin, H., & Traas, J. (2004). MicroRNA regulation of the CUC genes is required for boundary size control in *Arabidopsis* meristems. *Development* 131:4311–4322
89. Li, H., Wylie, S. J., Jones, M. G. K. (2000). Transgenic yellow lupin (*Lupinus luteus*). *Plant Cell Reports*, 19(6), 634–637.

90. Li, H., Deng, Y., Wu, T., Subramanian, S., Yu, O. (2010). Misexpression of miR482, miR1512, and miR1515 increases soybean nodulation. *Plant physiology*, 153(4), 1759-1770.
91. Li, S. B., Xie, Z. Z., Hu, C. G., Zhang, J. Z. (2016). A review of auxin response factors (ARFs) in plants. *Frontiers in plant science*, 7, 47.
92. Li, Z., Chen, Y., Mu, D., Yuan, J., Shi, Y., Zhang, H., Gan, J., Li, N., Hu, X., Yang, B., Fan, W. (2012). Comparison of the two major classes of assembly algorithms: overlap–layout–consensus and de-bruijn-graph. *Briefings in functional genomics*, 11(1), 25-37.
93. Liang, G., He, H., Yu, D. (2012). Identification of nitrogen starvation-responsive microRNAs in *Arabidopsis thaliana*. *PloS one*, 7(11).
94. Lightfoot, S. (2002). Quantitation comparison of total RNA using the Agilent 2100 bioanalyzer, ribogreen analysis, and UV spectrometry. Agilent Application Note, Publication number, 5988-7650.
95. Liu, H. H., Tian, X., Li, Y. J., Wu, C. A., Zheng, C. C. (2008). Microarray-based analysis of stress-regulated microRNAs in *Arabidopsis thaliana*. *Rna*, 14(5), 836-843.
96. Liu, H., Qin, C., Chen, Z., Zuo, T., Yang, X., Zhou, H., Xu, M., Cao, S., Shen, Y., Lin, H., He, X., Zhang, Y., Li, L., Ding, H., Lübberstedt, T., Zhang, Z., Pan, G. (2014). Identification of miRNAs and their target genes in developing maize ears by combined small RNA and degradome sequencing. *BMC Genomics* 15, 25 (2014).
97. Liu, Q., Chen, Y. Q. (2009). Insights into the mechanism of plant development: interactions of miRNAs pathway with phytohormone response. *Biochemical and biophysical research communications*, 384(1), 1-5.
98. Liu, Q., Zhang, Y. C., Wang, C. Y., Luo, Y. C., Huang, Q. J., Chen, S. Y., Zhou, H., Qu, L. H., Chen, Y. Q. (2009a). Expression analysis of phytohormone-regulated microRNAs in rice, implying their regulation roles in plant hormone signaling. *FEBS letters*, 583(4), 723-728.
99. Lu, Y., Li, C., Wang, H., Chen, H., Berg, H., Xia, Y. (2011). AtPPR2, an *Arabidopsis* pentatricopeptide repeat protein, binds to plastid 23S rRNA and plays an important role in the first mitotic division during gametogenesis and in cell proliferation during embryogenesis. *The Plant Journal*, 67(1), 13-25.
100. Luan, M., Xu, M., Lu, Y., Zhang, Q., Zhang, L., Zhang, C., Yunliu, F., Lang, Z., Wang, L. (2014). Family-wide survey of miR169s and NF-YAs and their expression profiles response to abiotic stress in maize roots. *PloS one*, 9(3), e91369.
101. Luan, M., Xu, M., Lu, Y., Zhang, L., Fan, Y., Wang, L. (2015). Expression of zma-miR169 miRNAs and their target ZmNF-YA genes in response to abiotic stress in maize leaves. *Gene*, 555(2), 178-185.
102. Luciński, R., Polcyn, W., Ratajczak, L. (2002). Nitrate reduction and nitrogen fixation in symbiotic association *Rhizobium* - Legumes. *Acta Biochimica Polonica*, 49(2), 537–546.
103. Ma, X., Zhang, X., Zhao, K., Li, F., Li, K., Ning, L., He, J., Xin, Z., Yin, D. (2018). Small RNA and degradome deep sequencing reveals the roles of microRNAs in seed expansion in peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Frontiers in Plant Science*, 9, 349.
104. Mackerness, A. H., Surplus, S., Blake, S. L., John, P., Buchanan-Wollaston, C. F., Jordan, V., Thomas, B. R., (1999). Ultraviolet-B-induced stress and changes in gene expression in *Arabidopsis thaliana*: role of signalling pathways controlled by jasmonic acid, ethylene and reactive oxygen species. *Plant, Cell & Environment*, 22(11), 1413-1423.
105. Macovei, A., Tuteja, N. (2012). microRNAs targeting DEAD-box helicases are involved in salinity stress response in rice (*Oryza sativa* L.). *BMC Plant Biology*, 12(1), 1-12.
106. Mahouachi, J., Arbona, V., Gómez-Cadenas, A. (2007). Hormonal changes in papaya seedlings subjected to progressive water stress and re-watering. *Plant Growth Regulation*, 53(1), 43-51.
107. Marcinek, J., Komisarek, J., Bednarek, R., Mocek, A., Skiba, S., Wiatrowska, K. (2011). Systematyka gleb Polski. *Roczniki gleboznawcze*, 62(3).

108. Marciniak, K., Przedniczek, K. (2020). Gibberellin Signaling Repressor LIDELLA1 Controls the flower and pod development of yellow lupine (*Lupinus luteus* L.). *International journal of molecular sciences*, 21(5), 1815.
109. Martin, G. E., Rousseau-Gueutin, M., Cordonnier, S., Lima, O., Michon-Coudouel, S., Naquin, D., De Carvalho, J. F., 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(7), 1197–1210.
110. Matsui, T., Soejima, Y., Eguchi, H. (1974). Control of artificial light for plants I. measurement and control of light. *Environment Control in Biology*, 12(2), 53-68.
111. Miura, K., Okamoto, H., Okuma, E., Shiba, H., Kamada, H., Hasegawa, P. M., Murata, Y. (2013). SIZ1 deficiency causes reduced stomatal aperture and enhanced drought tolerance via controlling salicylic acid-induced accumulation of reactive oxygen species in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 73(1), 91-104.
112. Moons, A., Prinsen, E., Bauw, G., Van Montagu, M. (1997). Antagonistic effects of abscisic acid and jasmonates on salt stress-inducible transcripts in rice roots. *The Plant Cell*, 9(12), 2243-2259.
113. Moore, T. C., Coolbaugh, R. C. (1991). Correlations between apparent rates of ent-kaurene biosynthesis and parameters of growth and development in *Pisum sativum*. In *Gibberellins* (pp. 188-198). Springer, New York, NY.
114. Munne-Bosch, S., Penuelas, J. (2003). Photo- and antioxidative protection, and a role for salicylic acid during drought and recovery in field-grown *Phillyrea angustifolia* plants. *Planta*, 217(5), 758-766.
115. Musco, N., Cuttrignelli, M. I., Calabrò, S., Tudisco, R., Infascelli, F., Grazioli, R., Lo Presti, V., Gresta, F., Chiofalo, B. (2017). Comparison of nutritional and antinutritional traits among different species (*Lupinus albus* L., *Lupinus luteus* L., *Lupinus angustifolius* L.) and varieties of lupin seeds. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 101(6), 1227–1241.
116. Nag, A., King, S., Jack, T. (2009). miR319a targeting of TCP4 is critical for petal growth and development in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(52), 22534-22539.
117. Naganowska, B., Wolko, B., ŚLIWIŃSKA, E., Kaczmarek, Z. (2003). Nuclear DNA content variation and species relationships in the genus *Lupinus* (Fabaceae). *Annals of Botany*, 92(3), 349-355.
118. Navarro, L., Dunoyer, P., Jay, F., Arnold, B., Dharmasiri, N., Estelle, M., Voinnet, O., Jones, J. D. (2006). A plant miRNA contributes to antibacterial resistance by repressing auxin signaling. *Science*, 312(5772), 436-439.
119. Ni, Z., Hu, Z., Jiang, Q., Zhang, H. (2013). GmNFYA3, a target gene of miR169, is a positive regulator of plant tolerance to drought stress. *Plant molecular biology*, 82(1), 113-129.
120. Nodine, M. D., Bartel, D. P. (2010). MicroRNAs prevent precocious gene expression and enable pattern formation during plant embryogenesis. *Genes & development*, 24(23), 2678-2692.
121. Novák, O., Hényková, E., Sairanen, I., Kowalczyk, M., Pospíšil, T., Ljung, K. (2012). Tissue-specific profiling of the *Arabidopsis thaliana* auxin metabolome. *The Plant Journal*, 72(3), 523-536.
122. Okuma, E., Nozawa, R., Murata, Y., Miura, K. (2014). Accumulation of endogenous salicylic acid confers drought tolerance to *Arabidopsis*. *Plant signaling & behavior*, 9(3), e28085.
123. Palatnik, J. F., Allen, E., Wu, X., Schommer, C., Schwab, R., Carrington, J. C., & Weigel, D. (2003). Control of leaf morphogenesis by microRNAs. *Nature*, 425(6955), 257-263.
124. Palatnik, J. F., Wollmann, H., Schommer, C., Schwab, R., Boisbouvier, J., Rodriguez, R., Warthmann, N., Allen, E., Dezulian, T., Houson, D., Carrington C.J., Weigel, D. (2007). Sequence and expression differences underlie functional specialization of *Arabidopsis* microRNAs miR159 and miR319. *Developmental cell*, 13(1), 115-125.
125. Palmgren, M. G. (2001). Plant plasma membrane H⁺-ATPases: powerhouses for nutrient uptake. *Annual review of plant biology*, 52(1), 817-845.

126. Pan, Q., Zhan, J., Liu, H., Zhang, J., Chen, J., Wen, P., Huang, W. (2006). Salicylic acid synthesized by benzoic acid 2-hydroxylase participates in the development of thermotolerance in pea plants. *Plant Science*, 171(2), 226-233.
127. Parra-Gonzalez, L. B., Aravena-Abarzua, G. A., Navarro-Navarro, C. S., Udall, J., Maughan, J., Peterson, L. M., Salvo-Garrido, H. E., Maureira-Butler, I. J. (2012). Yellow lupin (*Lupinus luteus* L.) transcriptome sequencing: molecular marker development and comparative studies. *BMC Genomics*, 13(1), 425.
128. Pauwels, L., Goossens, A. (2011). The JAZ proteins: a crucial interface in the jasmonate signaling cascade. *The Plant Cell*, 23(9), 3089-3100.
129. Pieterse, C. M., Van der Does, D., Zamioudis, C., Leon-Reyes, A., Van Wees, S. C. (2012). Hormonal modulation of plant immunity. *Annual review of cell and developmental biology*, 28, 489-521.
130. Pietrzykowski, M., Gruba, P., Sproull, G. (2017). The effectiveness of Yellow lupine (*Lupinus luteus* L.) green manure cropping in sand mine cast reclamation. *Ecological Engineering*, 102, 72–79.
131. 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.
132. Podlesny, J., Podlesna, A. (2008). Wpływ temperatury w początkowym okresie wzrostu na plonowanie termo- i nietermoneutralnych odmian łubinu żółtego. *Acta Agrophysica*, 12(2 [162]).
133. Poonam, S., Kaur, H., Geetika, S. (2013). Effect of jasmonic acid on photosynthetic pigments and stress markers in *Cajanus cajan* (L.) Millsp. seedlings under copper stress.
134. Popko, J., Hänsch, R., Mendel, R. R., Polle, A., Teichmann, T. (2010). The role of abscisic acid and auxin in the response of poplar to abiotic stress. *Plant biology*, 12(2), 242-258.
135. Prasad, K., Dhonukshe, P. (2013). Polar auxin transport: cell polarity to patterning. In *Polar auxin transport* (pp. 25-44). Springer, Berlin, Heidelberg.
136. Prusiński, J. (1997a). Rola kompleksu glebowego, terminu siewu, rozstawy rzędów i obsady roślin w kształtowaniu plenności łubinu żółtego (*Lupinus luteus* L.). *Zesz. Probl. Post. Nauk Rol*, 446, 253-259.
137. Prusinski, J. (1997b). Żywotność i wigor nasion roślin strączkowych w warunkach stresu chłodnowodnego. *Fragmenta Agronomica*, 14(4), 77-93.
138. Prusinski, J. (2007). Postęp biologiczny w łubinie (*Lupinus* sp.)-rys historyczny i stan aktualny. *Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych*, (522).
139. Pu, C. H., Lin, S. K., Chuang, W. C., Shyu, T. H. (2018). Modified QuEChERS method for 24 plant growth regulators in grapes using LC-MS/MS. *Journal of food and drug analysis*, 26(2), 637-648.
140. Qi, Y., Denli, A. M., Hannon, G. J. (2005). Biochemical specialization within Arabidopsis RNA silencing pathways. *Molecular cell*, 19(3), 421-428.
141. Raghavendra, A. S., Gonugunta, V. K., Christmann, A., Grill, E. (2010). ABA perception and signalling. *Trends in plant science*, 15(7), 395-401.
142. Rahman, A. (2013). Auxin: a regulator of cold stress response. *Physiologia plantarum*, 147(1), 28-35.
143. Rahman, A. H. M. M., Parvin, M. I. A. (2014). Study of medicinal uses on Fabaceae family at Rajshahi, Bangladesh. *Research in Plant Sciences*, 2(1), 6-8.
144. Rajjou, L., Belghazi, M., Huguet, R., Robin, C., Moreau, A., Job, C., Job, D. (2006). Proteomic investigation of the effect of salicylic acid on Arabidopsis seed germination and establishment of early defense mechanisms. *Plant physiology*, 141(3), 910-923.
145. Ray, S., Agarwal, P., Arora, R., Kapoor, S., Tyagi, A.K. (2007) Expression analysis of calcium-dependent protein kinase gene family during reproductive development and abiotic stress conditions in rice (*Oryza sativa* L. ssp. indica). *Mol Genet Genomics* 278, 493–505.

146. Reyes, J. L., Chua, N. H. (2007). ABA induction of miR159 controls transcript levels of two MYB factors during Arabidopsis seed germination. *The Plant Journal*, 49(4), 592-606.
147. Rhoades, M. W., Reinhart, B. J., Lim, L. P., Burge, C. B., Bartel, B., Bartel, D. P. (2002). Prediction of plant microRNA targets. *cell*, 110(4), 513-520.
148. Rio, D. C., Ares, M., Hannon, G. J., Nilsen, T. W. (2010). Nondenaturing agarose gel electrophoresis of RNA. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2010(6), pdb-prot5445.
149. Romeis T, Herde M (2014) From local to global: CDPKs in systemic defense signaling upon microbial and herbivore attack. *Curr Opin Plant Biol* 20:1–10
150. Rosas-Cárdenas, F. D. F., Caballero-Pérez, J., Gutiérrez-Ramos, X., Marsch-Martínez, N., Cruz-Hernández, A., de Folter, S. (2015). miRNA expression during prickly pear cactus fruit development. *Planta*, 241(2), 435-448.
151. Saab, I. N., Sharp, R. E., Pritchard, J., Voetberg, G. S. (1990). Increased endogenous abscisic acid maintains primary root growth and inhibits shoot growth of maize seedlings at low water potentials. *Plant physiology*, 93(4), 1329-1336.
152. Salopek-Sondi, B., Šamec, D., Mihaljević, S., Smolko, A., Pavlović, I., Janković, I., Ludwig-Müller, J. (2013). Influence of stress hormones on the auxin homeostasis in Brassica rapa seedlings. *Plant cell reports*, 32(7), 1031-1042.
153. Saminathan, T., Bodunrin, A., Singh, N. V., Devarajan, R., Nimmakayala, P., Jeff, M., Aradhya, M., Reddy, U. K. (2016). Genome-wide identification of microRNAs in pomegranate (*Punica granatum L.*) by high-throughput sequencing. *BMC plant biology*, 16(1), 1-16.
154. Sanders, D., Pelloux, J., Brownlee, C., Harper, J.F. (2002). Calcium at the crossroads of signaling. *Plant Cell* 14(suppl.):S401–S417
155. Schulz, P., Herde, M., Romeis, T. (2013). Calcium-dependent protein kinases: hubs in plant stress signaling and development. *Plant Physiol* 163, 523–530.
156. Seo, P. J., Park, C. M. (2010). MYB96-mediated abscisic acid signals induce pathogen resistance response by promoting salicylic acid biosynthesis in Arabidopsis. *New Phytologist*, 186(2), 471-483.
157. Seskar, M., Shulaev, V., Raskin, I. (1998). Endogenous methyl salicylate in pathogen-inoculated tobacco plants. *Plant physiology*, 116(1), 387-392.
158. Shah, J. (2003). The salicylic acid loop in plant defense. *Current opinion in plant biology*, 6(4), 365-371.
159. Shamimuzzaman, M., Vodkin, L. (2012). Identification of soybean seed developmental stage-specific and tissue-specific miRNA targets by degradome sequencing. *BMC genomics*, 13(1), 1-14.
160. Sharma, E., Sharma, R., Borah, P., Jain, M., Khurana, J. P. (2015). Emerging roles of auxin in abiotic stress responses. In *Elucidation of abiotic stress signaling in plants* (pp. 299-328). Springer, New York, NY.
161. Shi, H., Chen, L., Ye, T., Liu, X., Ding, K., Chan, Z. (2014). Modulation of auxin content in Arabidopsis confers improved drought stress resistance. *Plant Physiology and Biochemistry*, 82, 209-217.
162. Si-Ammour, A., Windels, D., Arn-Boulidoires, E., Kutter, C., Ailhas, J., Meins Jr, F., Vazquez, F. (2011). miR393 and secondary siRNAs regulate expression of the TIR1/AFB2 auxin receptor clade and auxin-related development of Arabidopsis leaves. *Plant physiology*, 157(2), 683-691.
163. Sikorski, L., Baciak, M., Bes, A., Piotrowicz-Cieslak, A. I., Adomas, B. (2015). Fitotoksyczność glifosatu wobec siewek łubinu żółtego (*Lupinus luteus L.*). *Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych*, 582, 53–61.
164. Silva G., Silva E., Silva-Azevedo M., Guivin M., Ramiro D., Figueiredo C., Carrer H., Peres L., Nogueira F. (2014). MicroRNA 156-targeted SPL/SBP box transcription factors regulated tomato ovary and fruit development. *Plant J*, 78(4):604–618.

165. Silverstone, A. L., Mak, P. Y. A., Martinez, E. C., Sun, T. P. (1997). The new RGA locus encodes a negative regulator of gibberellin response in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics*, 146(3), 1087-1099.
166. Silverstone, A. L., Ciampaglio, C. N., Sun, T. P. (1998). The *Arabidopsis* RGA gene encodes a transcriptional regulator repressing the gibberellin signal transduction pathway. *The Plant Cell*, 10(2), 155-169.
167. Simon, S., Petrášek, J. (2011). Why plants need more than one type of auxin. *Plant Science*, 180(3), 454-460.
168. Singh, K. B., Foley, R. C., Garg, G., Kamphuis, L. G. (2020). Overview of genomic resources available for lupins with a focus on narrow-leafed lupin (*Lupinus angustifolius*). In *The Lupin Genome* (pp. 31-43). Springer, Cham.
169. Skirycz, A., Inzé, D. (2010). More from less: plant growth under limited water. *Current Opinion in Biotechnology*, 21(2), 197-203.
170. Solberg, S. Ø., Yndgaard, F., Andreassen, C., Von Bothmer, R., Loskutov, I. G., Asdal, Å. (2020). Long-term storage and longevity of orthodox seeds: A systematic review. *Frontiers in Plant Science*, 1007.
171. Stahlberg, A., Hakansson, J., Xian, X., Semb, H., Kubista, M. (2004). Properties of the reverse transcription reaction in mRNA quantification. *Clinical chemistry*, 50(3), 509-515.
172. Strobel, N. E., Kuc, J. A. (1995). Chemical and biological inducers of systemic resistance to pathogens protect cucumber and tobacco plants from damage caused by paraquat and cupric chloride. *Phytopathology (USA)*.
173. Sujak, A., Kotlarz, A., Strobel, W. (2006). Compositional and nutritional evaluation of several lupin seeds. *Food chemistry*, 98(4), 711-719.
174. Sun, T. P. (2010). Gibberellin-GID1-DELLA: a pivotal regulatory module for plant growth and development. *Plant physiology*, 154(2), 567-570.
175. Sunkar, R., Chinnusamy, V., Zhu, J., Zhu, J. K. (2007). Small RNAs as big players in plant abiotic stress responses and nutrient deprivation. *Trends in plant science*, 12(7), 301-309.
176. Swarbreck, D., Wilks, C., Lamesch, P., Berardini, T. Z., 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(SUPPL. 1), 1009–1014.
177. Szajko, K., Yin, Z., Marczewski, W. (2019). Accumulation of miRNA and mRNA targets in potato leaves displaying temperature-dependent responses to Potato Virus Y. *Potato Research*, 62(4), 379-392.
178. Świącicki, W., Rybczyński, J., Świącicki, W. K. (2000). Domestication and genetics of the yellow lupin (*Lupinus luteus* L.) and the biotechnological improvement of lupins. *Journal of Applied Genetics*, 41(1), 11–34.
179. Tani, T., Sobajima, H., Okada, K., Chujo, T., Arimura, S. I., Tsutsumi, N., Nishimura, N., Seto, H., Nojiri, H., Yamane, H. (2008). Identification of the OsOPR7 gene encoding 12-oxophytodienoate reductase involved in the biosynthesis of jasmonic acid in rice. *Planta*, 227(3), 517-526.
180. Taylor C. B. (1996). Proline and Water Deficit: Ups, Downs, Ins, and Outs. *The Plant Cell*, 8(8), 1221–1224.
181. Thines, B., Katsir, L., Melotto, M., Niu, Y., Mandaokar, A., Liu, G., Nomura, K., He, S. Y., Howe, G. A., Browse, J. (2007). JAZ repressor proteins are targets of the SCFCO11 complex during jasmonate signalling. *Nature*, 448(7154), 661-665.
182. Tivendale, N. D., Ross, J. J., Cohen, J. D. (2014). The shifting paradigms of auxin biosynthesis. *Trends in plant science*, 19(1), 44-51.

183. Tsonev, T. D., Lazova, G. N., Stoinova, Z. G., Popova, L. P. (1998). A possible role for jasmonic acid in adaptation of barley seedlings to salinity stress. *Journal of Plant Growth Regulation*, 17(3), 153-159.
184. Turner, B. L. (1994). Species of *Lupinus* (Fabaceae) occurring in northeastern Mexico (Nuevo Leon and closely adjacent states). *Phytologia*, 76(4), 290-302.
185. Tuteja, N. (2003). Plant DNA helicases: the long unwinding road. *Journal of experimental botany*, 54(391), 2201-2214.
186. Tvorogova, V. Y., Osipova, M. A., Doduyeva, I. Y., Lutova, L. A. (2013). Interactions between transcription factors and phytohormones in the regulation of plant meristem activity. *Russian Journal of Genetics: Applied Research*, 3(5), 325-337.
187. Ueguchi-Tanaka, M., Ashikari, M., Nakajima, M., Itoh, H., Katoh, E., Kobayashi, M., Chow, T. Y., Hsing, Y. C., Kitano, H., Yamaguchi, I., Matsuoka, M. (2005). GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF1 encodes a soluble receptor for gibberellin. *Nature*, 437(7059), 693-698.
188. Ulmasov, T., Hagen, G., Guilfoyle, T. J. (1997). ARF1, a transcription factor that binds to auxin response elements. *Science*, 276(5320), 1865-1868.
189. Van Steveninck, R. F. M. (1958). Factors affecting the abscission of reproductive organs in yellow lupins (*Lupinus luteus* L.): II. The effects of growth substances, defoliation, and removal of lateral growth. *Journal of Experimental Botany*, 9(3), 372-383.
190. Varkonyi-Gasic, E., Wu, R., Wood, M., Walton, E. F., Hellens, R. P. (2007). Protocol: a highly sensitive RT-PCR method for detection and quantification of microRNAs. *Plant methods*, 3(1), 1-12.
191. Varkonyi-Gasic, E. (2017). Stem-loop qRT-PCR for the detection of plant microRNAs. In *Plant Epigenetics* (pp. 163-175). Humana Press, Boston, MA.
192. Vazquez, F., Gascioli, V., Cr  t  , P., Vaucheret, H. (2004). The nuclear dsRNA binding protein HYL1 is required for microRNA accumulation and plant development, but not posttranscriptional transgene silencing. *Current Biology*, 14(4), 346-351.
193. Vidal, E. A., Araus, V., Lu, C., Parry, G., Green, P. J., Coruzzi, G. M., Gutiérrez, R. A. (2010). Nitrate-responsive miR393/AFB3 regulatory module controls root system architecture in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(9), 4477-4482.
194. Vlot, A. C., Dempsey, D. M. A., Klessig, D. F. (2009). Salicylic acid, a multifaceted hormone to combat disease. *Annual review of phytopathology*, 47, 177-206.
195. Wager, A., Browse, J. (2012). Social network: JAZ protein interactions expand our knowledge of jasmonate signaling. *Frontiers in plant science*, 3, 41.
196. Wang, Y., Mopper, S., Hasenstein, K. H. (2001). Effects of salinity on endogenous ABA, IAA, JA, and SA in *Iris hexagona*. *Journal of chemical ecology*, 27(2), 327-342.
197. Warpeha K. M., Upadhyay S., Yeh J., Adamiak J., Hawkins S. I., Lapik Y. R., et al. (2007). The GCR1 GPA1 PRN1 NF-Y signal chain mediates both blue light and abscisic acid responses in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 143 1590-1600.
198. Wasternack, C., Hause, B. (2013). Jasmonates: biosynthesis, perception, signal transduction and action in plant stress response, growth and development. An update to the 2007 review in *Annals of Botany*. *Annals of botany*, 111(6), 1021-1058.
199. Weig, A., Franz, J., Sauer, N., Komor, E. (1994). Isolation of a family of cDNA clones from *Ricinus communis* L. with close homology to the hexose carriers. *Journal of Plant Physiology*, 143(2), 178-183.
200. Wigoda, N., Ben-Nissan, G., Granot, D., Schwartz, A., Weiss, D. (2006). The gibberellin-induced, cysteine-rich protein GIP2 from *Petunia hybrida* exhibits in planta antioxidant activity. *The Plant Journal*, 48(5), 796-805.
201. Wilcox, J. R. (2001). Sixty years of improvement in publicly developed elite soybean lines. *Crop Science*, 41(6), 1711-1716.

202. Wilen, R. W., Ewan, B. E., Gusta, L. V. (1994). Interaction of abscisic acid and jasmonic acid on the inhibition of seed germination and the induction of freezing tolerance. *Canadian journal of botany*, 72(7), 1009-1017.
203. Wilmowicz, E., Frankowski, K., Kućko, A., Świdziński, M., de Dios Alché, J., Nowakowska, A., Kopcewicz, J. (2016). The influence of abscisic acid on the ethylene biosynthesis pathway in the functioning of the flower abscission zone in *Lupinus luteus*. *Journal of Plant Physiology*, 206, 49–58.
204. Wilmowicz, E., Kućko, A., Marciniak, K., Gadzikowska, A., Przedniczek, K., & Kopcewicz, J. (2017). Obecny stan wiedzy na temat regulacji powstawania oraz funkcjonowania strefy odcinania kwiatów *Lupinus luteus*. *Biuletyn Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin*, (281), 85-90.
205. Wilson, A. K., Pickett, F. B., Turner, J. C., Estelle, M. (1990). A dominant mutation in *Arabidopsis* confers resistance to auxin, ethylene and abscisic acid. *Molecular and General Genetics MGG*, 222(2), 377-383.
206. 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
207. Wójcik, A. M., Gaj, M. D. (2016). miR393 contributes to the embryogenic transition induced in vitro in *Arabidopsis* via the modification of the tissue sensitivity to auxin treatment. *Planta*, 244(1), 231-243.
208. Wu, G., Poethig, R. S. (2006). Temporal regulation of shoot development in *Arabidopsis thaliana* by miR156 and its target SPL3. *Development* 133, 3539–3547.
209. Wu, G., Park, M., Conway, S., Wang, J., Weigel, D., Poethig, R. (2009). The sequential action of miR156 and miR172 regulates developmental timing in *Arabidopsis*. *Cell*;138(4):750–759.
210. Wu, H., Wu, X., Li, Z., Duan, L., Zhang, M. (2012). Physiological evaluation of drought stress tolerance and recovery in cauliflower (*Brassica oleracea* L.) seedlings treated with methyl jasmonate and coronatine. *Journal of Plant Growth Regulation*, 31(1), 113-123.
211. Wu, X., Xu, S., Zhao, P., Zhang, X., Yao, X., Sun, Y., Fang, R., & Ye, J. (2019). The Orthotospovirus nonstructural protein NSs suppresses plant MYC-regulated jasmonate signaling leading to enhanced vector attraction and performance. *PLoS Pathogens*, 15(6), e1007897.
212. Xie, D. X., Feys, B. F., James, S., Nieto-Rostro, M., Turner, J. G. (1998). COI1: an *Arabidopsis* gene required for jasmonate-regulated defense and fertility. *Science*, 280(5366), 1091-1094.
213. Xie, K., Wu, C., Xiong, L. (2006). Genomic organization, differential expression, and interaction of SQUAMOSA promoter-binding-like transcription factors and microRNA156 in rice. *Plant physiology*, 142(1), 280-293.
214. Xie, Z., Kasschau, K. D., Carrington, J. C. (2003). Negative feedback regulation of Dicer-Like1 in *Arabidopsis* by microRNA-guided mRNA degradation. *Current Biology* 13, 784–789.
215. Xie, Z., Allen, E., Fahlgren, N., Calamar, A., Givan, S. A., Carrington, J. C. (2005). Expression of *Arabidopsis* MIRNA genes. *Plant physiology*, 138(4), 2145-2154.
216. Xin, C., Liu, W., Lin, Q., Zhang, X., Cui, P., Li, F., Zhang, G., Pan, L., Al-Amer, A., Mei, H., Al-Mssallem, S., Hu, S., Al-Johi, H. A., Yu, J. (2015). Profiling microRNA expression during multi-staged date palm (*Phoenix dactylifera* L.) fruit development. *Genomics*, 105(4), 242-251.
217. Yamaguchi, S., Kamiya, Y., Sun, T. P. (2001). Distinct cell-specific expression patterns of early and late gibberellin biosynthetic genes during *Arabidopsis* seed germination. *The Plant Journal*, 28(4), 443-453.
218. Yamaguchi, S. (2008). Gibberellin metabolism and its regulation. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 59, 225-251.
219. Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K. (2006). Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses. *Annual Review of Plant Biology* 57:781–803.

220. Yan, J., Zhang, C., Gu, M., Bai, Z., Zhang, W., Qi, T., Cheng, Z., Peng, W., Luo, H., Nan, F., Wang, Z., Xie, D. (2009). The Arabidopsis CORONATINE INSENSITIVE1 protein is a jasmonate receptor. *The Plant Cell*, 21(8), 2220-2236.
221. Yan, Y., Stolz, S., Chételat, A., Reymond, P., Pagni, M., Dubugnon, L., Farmer, E. E. (2007). A downstream mediator in the growth repression limb of the jasmonate pathway. *The Plant Cell*, 19(8), 2470-2483.
222. Yang, C., Liu, J., Dong, X., Cai, Z., Tian, W., Wang, X. (2014). Short-term and continuing stresses differentially interplay with multiple hormones to regulate plant survival and growth. *Molecular Plant*, 7(5), 841-855.
223. Yang, L., Liu, Z., Lu, F., Dong, A. and Huang, H. (2006). SERRATE is a novel nuclear regulator in primary microRNA processing in Arabidopsis. *The Plant Journal*, 47: 841-850.
224. Yu, B., Yang, Z., Li, J., Minakhina, S., Yang, M., Padgett, R. W., Steward R., Chen, X. (2005). Methylation as a crucial step in plant microRNA biogenesis. *Science*, 307(5711), 932-935.
225. Yuan, S., Lin, H. H. (2008). Minireview: role of salicylic acid in plant abiotic stress. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 63(5-6), 313-320.
226. Zentella, R., Zhang, Z. L., Park, M., Thomas, S. G., Endo, A., Murase, K., Fleet, C. M., Jikumaru, Y., Nambara, E., Kamiya, Y., Sun, T. P. (2007). Global analysis of DELLA direct targets in early gibberellin signaling in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 19(10), 3037-3057.
227. Zhai, J., Jeong, D. H., De Paoli, E., Park, S., Rosen, B. D., Li, Y., González, A. H., Yan, Z., Kitto, L. S., Gursak, M. A., Jackson, S. A. Stacey, G., Cook, D. R., Green, P. J., Sherrier, D. J. Meyers, B. C. (2011). MicroRNAs as master regulators of the plant NB-LRR defense gene family via the production of phased, trans-acting siRNAs. *Genes & development*, 25(23), 2540-2553.
228. Zhang, B., Pan, X., Cannon, C. H., Cobb, G. P., Anderson, T. A. (2006). Conservation and divergence of plant microRNA genes. *Plant Journal*, 46(2), 243-259.
229. Zhang, H., Liu, W.Z., Zhang, Y., Deng, M., Niu, F., Yang, B., Wang, X., Wang, B., Liang, W., Deyholos, M.K., Yuan-Qing, J. (2014). Identification, expression and interaction analyses of calcium-dependent protein kinase (CPK) genes in canola (*Brassica napus* L.). *BMC Genom* 15, 211.
230. Zhang, L., Li, G., Li, Y., Min, J., Kronzucker, H. J., Shi, W. (2018). Tomato plants ectopically expressing Arabidopsis GRF9 show enhanced resistance to phosphate deficiency and improved fruit production in the field. *Journal of plant physiology*, 226, 31-39.
231. Zhang, T., Li, C., Li, D., Liu, Y., Yang, X. (2020). Roles of YABBY transcription factors in the modulation of morphogenesis, development, and phytohormone and stress responses in plants. *Journal of Plant Research*, 133(6), 751-763.
232. Zhang, X. L., Jiang, L., Xin, Q., Liu, Y., Tan, J. X., Chen, Z. Z. (2015). Structural basis and functions of abscisic acid receptors PYLs. *Frontiers in Plant Science*, 6, 88.
233. Zhao, H., Wu, D., Kong, F., Lin, K., Zhang, H., Li, G. (2017). The Arabidopsis thaliana Nuclear Factor Y Transcription Factors. *Frontiers in plant science*, 7, 2045.
234. Zhao, R., Sun, H.L., Mei, C., Wang, X.J., Yan, L., Liu, R., Zhang, X.F., Wang, X.F., Zhang, D.P. (2011). The Arabidopsis Ca²⁺-dependent protein kinase CPK12 negatively regulates abscisic acid signaling in seed germination and post-germination growth. *New Phytol* 192, 61-73.
235. Zhou, M., Gu, L., Li, P., Song, X., Wei, L., CHen, Z., Cao, X. (2010). Degradome sequencing reveals endogenous small RNA targets in rice (*Oryza sativa* L. ssp. indica). *Frontiers in biology*, 5(1), 67-90.
236. Zhu, S.Y., Yu, X.C., Wang, X.J., Zhao, R., Li, Y., Fan, R.C., Shang, Y., Du, S.Y., Wang, X.F., Wu, F.Q. (2007). Two calcium-dependent protein kinases, CPK4 and CPK11, regulate abscisic acid signal transduction in Arabidopsis. *Plant Cell* 19, 3019-3036.
237. Zou, J.J., Wei, F.J., Wang, C., Wu, J.J., Ratnasekera, D., Liu, W.X., Wu, W.H. (2010). Arabidopsis calcium-dependent protein kinase CPK10 functions in abscisic acid- and Ca²⁺-mediated stomatal regulation in response to drought stress. *Plant Physiol* 154, 1232-1243.

238. Zuo, R., Hu, R., Chai, G., Xu, M., Qi, G., Kong, Y., Zhou, G. (2013). Genome-wide identification, classification, and expression analysis of CDPK and its closely related gene families in poplar (*Populus trichocarpa*). *Mol Biol Rep* 40, 2645–2662.

Suplement

1. Kompletnie dane dotyczące izolacji całkowitego RNA (Rozdział 3.2.).

Tabela S1. Wyniki pomiarów stężenia i czystości całkowitego RNA wyizolowanego z prób zebranych z upraw polowych z 2017 roku.

Nazwa	Nazwa skrócona (ID próbek)	Stężenie [ng/μl]	260/280	260/230	Data izolacji
DAB 6d okółek 1	N22 01	3286,8	2,11	1,92	23.08.2017
DAB 6d okółek 2	N22 02	3504,2	2,01	1,84	23.08.2017
DAB 14d okółek 1	N30 01	1114,4	2,13	2,14	23.08.2017
DAB 14d okółek 2	N30 02	1245,2	2,28	2,13	23.08.2017
DAB 21d okółek 1	N07 01	1348,6	2,14	2,13	23.08.2017
DAB 21d okółek 1	N07 02	1065,3	2,25	2,13	23.08.2017
DAB 28d okółek 1 małe	N14 01M	1102,4	2,12	2,13	23.08.2017
DAB 28d okółek 1 duże	N14 01D	1186,9	1,9	2,12	23.08.2017
DAB 28d okółek 1 odp	N14 01Z	210,4	1,81	2,1	23.08.2017
DAB 6d okółek 1	Z30 01	1558,6	2,3	2,13	23.08.2017
DAB 6d okółek 2	Z30 ok2	2483,3	2,27	2,07	23.08.2017
DAB 20d okółek 1	Z14 01	804,4	1,96	2,08	23.08.2017
DAB 6d okółek 3	DAB 6d ok3	3205,7	1,97	1,98	24.08.2017
DAB 13d okółek 1 małe	Z07 01M	1768,7	2,11	2,21	24.08.2017
DAB 13d okółek 1 duże	Z07 01D	1235,2	2,13	2,17	24.08.2017
DAB 13d okółek 2 małe	Z07 02M	1057,9	2,13	2,1	24.08.2017
DAB 13d okółek 2 duże	Z07 02D	1734,9	2,12	2,25	24.08.2017
DAB 20d okółek 2 małe	Z14 02M	162,2	2,07	1,71	24.08.2017
DAB 20d okółek 2 duże	Z14 02D	661,8	2,11	2,17	24.08.2017
DAB 8d okółek 3	ZZ 30 03	2442,2	2,09	2,11	24.08.2017

Tabela S2. Wyniki pomiarów stężenia i czystości całkowitego RNA wyizolowanego z prób zebranych z upraw polowych z 2018 roku.

Nazwa	Nazwa skrócona (ID próbek) i data zbioru	Stężenie [ng/μl]	260/280	260/230	Data izolacji
Nasiona strąków odpadających	STR ODP MIX N 23.06	635,6	2,07	2,07	30.07.2020
Ściany strąków odpadających	STR ODP MIX S 23.06	1420,2	2,07	2,18	30.07.2020
Strąki odpadające	STR ODP MIX całe 23.06	969,6	2,08	2,15	30.07.2020
Strąki ściana stadium 1	S1 19.06	2481,7	2,03	2,26	30.07.2020
Strąki ściana stadium 2	S2 19.06	1296,9	2,08	2,33	30.07.2020
Strąki ściana stadium 3	S3 19.06	2585,8	2,02	2,24	30.07.2020
Strąki ściana stadium 4	S4 19.06	854,4	2,08	2,32	30.07.2020
Strąki ściana stadium 5	S5 19.06	1829,5	2,06	2,13	30.07.2020
Strąki ściana stadium 5	S5 23.06	3060,5	1,95	2,17	30.07.2020
Strąki ściana stadium 6	S6 23.06	1142,3	2,07	1,92	30.07.2020
Strąki ściana stadium 7	S7 23.06	2822,3	2	2,21	30.07.2020
Strąki ściana stadium 7	S7 29.06	854,9	2,07	2,1	30.07.2020
Strąki ściana stadium 8	S8 29.06	2804,2	1,99	2,22	30.07.2020
Nasiona stadium 1	N1 19.06	1073,1	2,08	2,23	30.07.2020
Nasiona stadium 2	N2 19.06	3059,1	1,95	2,14	30.07.2020

Nasiona stadium 3	N3 19.06	975	2,07	2,14	30.07.2020
Nasiona stadium 4	N4 19.06	1946,9	2,07	2,27	30.07.2020
Nasiona stadium 5	N5 19.06	918,4	2,07	1,96	30.07.2020
Nasiona stadium 5	N5 23.06	2794	2	2,06	30.07.2020
Nasiona stadium 6	N6 23.06	608,9	2,07	2,11	30.07.2020
Nasiona stadium 7	N7 23.06	2183,6	2,06	2,19	30.07.2020
Nasiona stadium 7	N7 29.06	654	2,04	2	30.07.2020
Nasiona stadium 8	N8 29.06	1753	2,08	2,21	30.07.2020
DAB ok1 N duże 15.06 4d	DAB 1 N duże 15.06	8796,3	2,1	2,3	05.01.2021
DAB ok1 S duże 15.06 4d	DAB 1 S duże 15.06	2435,6	2,1	2,3	05.01.2021
DAB ok1 N małe 15.06 4d	DAB 1 N małe 15.06	9000,1	2,1	2,2	05.01.2021
DAB ok1 S małe 15.06 4d	DAB 1 S małe 15.06	2776,5	2,1	2,3	05.01.2021
DAB ok2 N duże 15.06 4d	DAB 2 N duże 15.06	9299,6	2,1	2,2	06.01.2021
DAB ok2 S duże 15.06 4d	DAB 2 S duże 15.06	2983,4	2,1	2,1	06.01.2021
DAB ok2 N małe 15.06 4d	DAB 2 N małe 15.06	3709	2,1	2,2	06.01.2021
DAB ok2 S małe 15.06 4d	DAB 2 S małe 15.06	2840,1	2,1	2,3	06.01.2021
DAB ok3 N 15.06 4d	DAB 3 N 15.06	3760,4	2	2,2	06.01.2021
DAB ok3 S 15.06 4d	DAB 3 S 15.06	3090,9	2,1	2,1	06.01.2021
DAB ok1 N małe 19.06 8d	DAB 1 N małe 19.06	2695,2	2,1	2,3	06.01.2021
DAB ok1 S małe 19.06 8d	DAB 1 S małe 19.06	2376,1	2,1	2,1	06.01.2021
DAB ok1 N średnie 19.06 8d	DAB 1 N średnie 19.06	3272,4	2,1	2,2	06.01.2021
DAB ok1 S średnie 19.06 8d	DAB 1 S średnie 19.06	1735,8	2,1	2,2	06.01.2021
DAB ok1 N duże 19.06 8d	DAB 1 N duże 19.06	2611,3	2,1	2,2	06.01.2021
DAB ok1 S duże 19.06 8d	DAB 1 S duże 19.06	1266,8	2,1	2,1	06.01.2021
DAB ok2 N duże 19.06 8d	DAB 2 N duże 19.06	2579,1	2,1	2,2	06.01.2021
DAB ok2 S duże 19.06 8d	DAB 2 S duże 19.06	1699,5	2,1	2,2	06.01.2021
DAB ok2 N małe 19.06 8d	DAB 2 N małe 19.06	2990,4	2,1	2,3	06.01.2021
DAB ok2 S małe 19.06 8d	DAB 2 S małe 19.06	3633,7	2,1	2	06.01.2021
DAB ok3 N małe 19.06 8d	DAB 3 N małe 19.06	1710,6	2,1	2,3	06.01.2021
DAB ok3 S małe 19.06 8d	DAB3 S małe 19.06	1607,9	2,1	2,2	06.01.2021
DAB ok3 N duże 19.06 8d	DAB 3 N duże 19.06	3225,6	2,1	2,2	06.01.2021
DAB ok3 S duże 19.06 8d	DAB 3 S duże 19.06	1717,4	2,1	2,3	06.01.2021
DAB ok3 N ODP 19.06 8d	DAB 3 N ODP 19.06	347,5	2,1	1,9	07.01.2021
DAB ok3 S ODP 19.06 8d	DAB 3 S ODP 19.06	811	2,1	2	07.01.2021
DAB ok1 N (duże) 23.06 12d	DAB 1 N (duże) 23.06	2219,1	2,13	2,19	07.01.2021
DAB ok1 S (duże) 23.06 12d	DAB 1 S (duże) 23.06	905,7	2,09	1,67	07.01.2021
DAB ok1 N średnie 23.06 12d	DAB 1 N średnie 23.06	2424,7	2,1	2,27	07.01.2021
DAB ok1 S średnie 23.06 12d	DAB 1 S średnie 23.06	824,3	2,08	1,69	07.01.2021
DAB ok1 N ODP 23.06 12d	DAB 1 N ODP 23.06	1770,8	2,09	2,15	07.01.2021
DAB ok1 S ODP 23.06 12d	DAB 1 S ODP 23.06	1060,6	2,09	1,96	07.01.2021
DAB ok2 N duże 23.06 12d	DAB 2 N duże 23.06	2392	2,11	2,22	07.01.2021
DAB ok2 S duże 23.06 12d	DAB 2 S duże 23.06	1040,9	2,1	1,92	07.01.2021
DAB ok2 N średnie 23.06 12d	DAB 2 N średnie 23.06	2346,2	2,11	2,23	07.01.2021
DAB ok2 S średnie 23.06 12d	DAB 2 S średnie 23.06	745,1	2,09	2,17	07.01.2021
DAB ok2 N małe 23.06 12d	DAB 2 N małe 23.06	1375,6	2,1	2,25	07.01.2021
DAB ok2 S małe 23.06 12d	DAB 2 S małe 23.06	1066	2,1	1,3	07.01.2021
DAB ok2 S ODP 23.06 12d	DAB 2 S ODP 23.06	562,1	2,06	1,74	07.01.2021
DAB ok2 N ODP 23.06 12d	DAB 2 N ODP 23.06	519,7	2,06	1,95	07.01.2021
DAB ok3 S ODP 23.06 12d	DAB 3 S ODP 23.06	798,7	2,08	2,11	07.01.2021
DAB ok3 N ODP 23.06 12d	DAB 3 N ODP 23.06	255,7	2,07	1,79	07.01.2021
DAB ok3 S NODP 23.06 12d	DAB 3 S NODP 23.06	-	-	-	07.01.2021
DAB ok3 N NODP 23.06 12d	DAB 3 N NODP 23.06	1758,5	2,12	2,28	07.01.2021
DAB ok1 N duże 29.06 18d	DAB 1 N duże 29.06	1789,4	2,06	1,67	07.01.2021
DAB ok1 S duże 29.06 18d	DAB 1 S duże 29.06	568,5	2,07	2,12	07.01.2021
DAB ok1 N średnie 29.06 18d	DAB 1 N średnie 29.06	2202,5	2,09	1,91	07.01.2021
DAB ok1 S średnie 29.06 18d	DAB 1 S średnie 29.06	652,7	2,04	1,22	07.01.2021

DAB ok1 N ODP 29.06 18d	DAB 1 N ODP 29.06	508,8	2,07	1,15	08.01.2021
DAB ok1 S ODP 29.06 18d	DAB 1 S ODP 29.06	142,4	2,03	1,61	08.01.2021
DAB ok2 N duże 29.06 18d	DAB 2 N duże 29.06	1844,7	2,06	1,97	08.01.2021
DAB ok2 S duże 29.06 18d	DAB 2 S duże 29.06	646,3	2,06	1,99	08.01.2021
DAB ok2 N średnie 29.06 18d	DAB 2 N średnie 29.06	1287,4	2,1	2,21	08.01.2021
DAB ok2 S średnie 29.06 18d	DAB 2 S średnie 29.06	326,7	2,07	1,97	08.01.2021
DAB ok2 N ODP 29.06 18d	DAB 2 N ODP 29.06	725,7	2,07	2,03	08.01.2021
DAB ok2 S ODP 29.06 18d	DAB 2 S ODP 29.06	189,4	2,05	1,61	08.01.2021

Tabela S3. Wyniki pomiarów stężenia i czystości całkowitego RNA wyizolowanego z prób zebranych z upraw fitotronowych z 2020 roku.

Nazwa	Nazwa skrócona (ID próbek)	Stężenie [ng/μl]	260/280	260/230	Data izolacji
PCIB 1h	n/d	484,9	2,05	1,2	12.03.2021
PCIB 2h	n/d	473,6	2,02	1,06	12.03.2021
PCIB 4h	n/d	724,1	2,04	1,23	12.03.2021
PCIB 6h	n/d	465,5	2,08	1,79	12.03.2021
GA3 1h	n/d	812	2,08	1,77	12.03.2021
GA3 2h	n/d	785,6	2,08	0,83	12.03.2021
GA3 4h	n/d	946	2,08	1,59	12.03.2021
GA3 6h	n/d	476,8	2,08	1,5	12.03.2021
ABA 1h	n/d	586	2,06	1,22	12.03.2021
ABA 2h	n/d	552,7	2,08	2,06	12.03.2021
ABA 4h	n/d	929,5	2,08	1,03	12.03.2021
ABA 6h	n/d	483,6	2,08	1,02	12.03.2021
JAME 1h	n/d	575,4	2,08	2,19	12.03.2021
JAME 2h	n/d	978,9	2,08	2,2	12.03.2021
JAME 4h	n/d	501,4	2,05	1,88	12.03.2021
JAME 6h	n/d	1200,8	2,08	2,18	12.03.2021
IAA 1h	n/d	1292,8	2,1	2,24	12.03.2021
IAA 2h	n/d	1220,6	2,09	2,2	12.03.2021
IAA 4h	n/d	1907,9	2,04	2,17	12.03.2021
IAA 6h	n/d	979,4	2,08	2,09	12.03.2021
SA 1h	n/d	969,6	2,07	2,03	12.03.2021
SA 2h	n/d	807,7	2,07	2,07	12.03.2021
SA 4h	n/d	911,8	2,07	1,99	12.03.2021
SA 6h	n/d	554,7	2,05	1,97	12.03.2021
H2O 0h	n/d	527	2,03	2,05	12.03.2021
H2O 1h	n/d	697,3	2,03	2,1	12.03.2021
H2O 2h	n/d	553,4	2,09	1,9	12.03.2021
H2O 4h	n/d	750,1	2,07	1,93	12.03.2021
H2O 6h	n/d	570,1	2,06	1,89	12.03.2021
S1 S susza 29.03	S1 S susza	1525,6	2,08	2,17	12.05.2021
S1 N susza 29.03	S1 N susza	2639,3	2,08	2,3	12.05.2021
S susza 05.04	S susza	753,9	2,05	2,04	12.05.2021
N susza 05.04	N susza	1040,1	2,07	2,04	12.05.2021
S1 S kontrola 22.03	S1 S kontrola	1979,1	2,06	2,16	12.05.2021
S1 N kontrola 22.03	S1 N kontrola	3214,1	2,06	2,14	12.05.2021
S2 S kontrola 22.03	S2 S kontrola	1899,4	2,05	2,35	12.05.2021
S2 N kontrola 22.03	S2 N kontrola	2470,3	2,08	2,27	12.05.2021
S3 S kontrola 29.03	S3 S kontrola	859,4	2,07	1,97	12.05.2021
S3 N kontrola 29.03	S3 N kontrola	2527,4	2,08	2,31	12.05.2021
S4 S kontrola 29.03	S4 S kontrola	793,9	2,06	2,16	12.05.2021
S4 N kontrola 29.03	S4 N kontrola	3021,2	2,07	2,23	12.05.2021

2. Kompletne sekwencje wszystkich prekursorów miRNA oraz genów docelowych i białek (Rozdziały 3.5.1. – 3.5.5.).

(3.5.1.) Kompletna sekwencja prekursora miRNA (5'→3')

TRINITY_DN47273_c3_g2_i3:

```
1 CTTTCTTAGC CTCTCCTATT CTACACATCT TTCTCTTAGT TCTTGATTAG
51 GGTTCGATT TTTTCAGAAG TTTCATGACC TTATTCTTAT TATTAGATGG
101 TTCTGTCGTG GGGCATCTTC AGTTTTCTAT ACATCATGGC CCTCTTTGTA
151 TTCTTCCACA GCTTTCCTGA ACTGCAGCAT CTAAAGGGTT TCTTTGCATG
201 CATGCCATGG CATCTTGCTC CAACACCTTG TTTTGCGGTT CAATAAAGCT
251 GTGGGAAGAT ACAGATAGGG TCAACCACAA TTTCTATCTT TCAACACTGG
301 ATTATTCTCT AAAGTCTGGT ATCCAATTAT TGCAATTTAA TTATTATTTT
351 CTTTCTAATT TTTTGTGTTG TGATGCTATT TTGATATAAT TCATATCATT
401 TCGTTGACTT TTGAGATAGT ATCTGATCAG AATTCTCAGA TGCATAGTCA
451 AAGATTGAAC TCTACAGAA TATGATGGCG GCGATGATGT ATGATTCCAC
501 AAGCAAATCG CCTTGCCTTA TGGACTGATC AGGCAAAAGT TAAAACTTAA
551 TTGCAGCGGA TCAAATTCAA ATGTCACCAT TGAGATTTCT ATATAGCATA
601 TTTGTGCGAC TAAATTCATT AGTTCCTTGA TCTGAACTTG TACCAGCCTG
651 CAGATTTCGGC GTATAAACTA AACATCATAG AGTCTATTAT AAATAATCAT
701 AATTACTAAA TGATTAATTA TTTGCAAGAT AGTAACAATT ATACCTCTCT
751 TATCTTACTT AACACAACAA AAAATTTAAAG GGTACGATAT CTAGATCCAT
801 CCTACCTGTC GCTACATCAA AATATTTTAT TCACAATGCA AAGACTTTGT
851 GTTGGATGCA ATGAACCTGT TTCTTAGAAT GCATCCACAG TCACAATTGC
901 AACAGTAGTA TTATATTGTG TTTTTTGAAG TCTCCACAAT AATATCACAG
951 TTACATCTTT TTATATATTT TCGCACCATT CTTTGGAAAT TCGGTAACGA
1001 CAATTTAACT GCGATCATAA TTTAAAACAC TAACATGAAC TAATTAGAAG
1051 GAACAATTTG AGTTACAGAG ATTGCTAGAC AATGGACCAC AGAGGGGGTG
1101 ACCATACTAC CTTTATATCT TGTTTTGAGC TTCCAACAAC TTATGCAAGC
1151 TTTTAAAAGC ATTGGTTGGT GACCCCTAGT ATGATGTTAG GTGAAGCTTT
1201 TATCGGAAAA GATTAACCGT ATGGATCCCC CCTCCCCCA AATAATTTAA
1251 AATTATTCCA GAGATTTACT GCTGTGATTT TTTCCACAGA AGATAGAAAG
1301 ATACCTAATA TCAATGCAGA GGCATGTGTG TGAAGGATAC TAGGGTTTTA
1351 CTTTTTCCCA ATTAAGTTAG AGACAACCAT GTTGCAAGAA ATGGGAGTTT
1401 TAGACCACCT GCTAGTACAA ATGCTTTTCT TTACATTTCT AGCGTGTGA
1451 ATATGCAGCT TGAATCAGTC TCCTATTTTG TTTATCCTGA AAGCATAGGA
1501 AATTTGAAAA CAGTAAAAGC ATATTTTTTT GCACCAAGGG TATCACACTT
1551 ACCCCACCAC CAAATACTAA TCCCTTTTTG AGATATAAAA TTACATAAGT
1601 GATTCTTGCC TCTACTAACA TATCATTTTG CATACATACA ATAAAGATTT
1651 CACCAATGAC ATAATATCTA AGACTCGGTC ATCCACCAA TGCATTGGAC
1701 TCCACTATCA ATAACATTCC AGATTGGTGT TTTTCTTCAT TTTATTTTAT
1751 ATGAAGATTA GATCTGACAG AATGGTGAGT TTTCTGCTCA ATCAACTTTA
1801 CAAGGTCTTT CAAATGGTGC ATTCACGGGC ATTTTTATTT TTTGAAAAGA
1851 TAAGGCAAAA GCCTTATGAG CATGCTACTT TATTTGCATA GAACAATATC
1901 CTAATCCTAC TGTAACCCAC TGATCTAACA TGTTCTTGTT TGTTCCTCAT
1951 TTTATGGCCT TGTTTTAATT TTGCCCTTGT TGCTATGAAT GCTTCAAAAT
2001 TGATTGAGCC TGATGTTCCCT GCTTTTCCTT GTTTTGGATC TATTATCTCT
2051 TTATTATATT CACTATCTTG ATTACAACCC TTCTTTACTT TAAAAGTGTG
2101 TGTCACACAT TGCTATGATT TGTTTTAAAT GAATTAATTG TGCTGTACTT
2151 GATGGTGGAT GCATTGTACA TTGTAGTAAA AAATGTAGAC GGTGTGATTT
2201 CTTAATCTGA TTTAAGGGTA TTTTCAGTAG TTTGTTTTGC TATGGAGAAA
2251 GGGGGAACCT AAAAGTTAGA TTTTCTTGTG CTATGTGATG TATGCGCAAG
2301 AGTCTAAGAT TGGTGA AAAAGTACAG CAAGAGACA ATAAATTTTT
2351 AGAAAATCCT CTCAACCTTG CTGTCTTACC ATGACATCTT GTCTTGTGGC
2401 TACAACATATG AAATTA AAAATTTT GTACCTATTG ATGAGCTTTT
2451 AGCTTATGGA ATTGCATTGA TCGATCTAGT TCTCTTGAAG AGTGTTTCTA
2501 TATTAAATTT TTTTATTTTT ACATATGTAT CACCGCACTG GAGGCAAAGC
2551 CAGTAGCCTT CACATGCATG TAAGACTAAA TCTCTTAGCT AACATTTTTT
2601 TATCTACAAT ACTCAAAACT GGAACCTTAT TTAAGGAGAA TTAACATGTT
```

```

2651 AATAAAAAGA TACGATGAAA AGCGTATTGC ACAATCTCTA TGTTTCCAGT
2701 ATTTATTAAT TGTGTATATA CTTTTCTGCT TTTATAGCCG GTTACTATCA
2751 ATCTATCTTC CACTCTATAT TCTATTCCCTA TTTTTTTAAT TAAAAGATAA
2801 CACAAATAAG CTCTAAATTT TAG

```

(3.5.2.) Kompletna sekwencja prekursora miRNA (5'→3')

TRINITY_DN52336_c2_g2_i3:

```

1  GAAAAAGGAA GAGAGAAAAT GATCCATCTT AGTGATATGA GACAAAAAAA
51  AAATGACAAT AGAAACAACA AAAC TAGCCT TGTGAAAACC AGAGATGGTC
101 CAAATGTAGC CTGATAAATG AAACGTACAA AAGAGGGAGA CAAAAAACTT
151 AAACGGAACC ATATACCTTT ATTATGCCTT TTCTAGCTAT ACGTTTGCAA
201 TCTTCCAATA ACTCTTATTC TTATCTGTTT GCAACGCTTA CTTCAAAAAGA
251 AGAGGTAGAA AGTGTAGATG TCAAGATATG TGTATTATAT TATATATTAT
301 ATATATATAT ACACACCCAT AGTCATAGCC ATGAAGTCAA AGAATTAAAA
351 GTGATCGAGG ATGTAGATTA TAAGCTCTAG AAGTGAGGGA GAGAAGGCTC
401 ATATGTATAG TCTGATTTCT TATCTTGCCC TTGAAATAGT TGAAGCTGCC
451 AGCATGATCT GATGTTACCT TGTATTAGGG TAAGAATAGA TCATGTGGCA
501 GTTTCACCTG TTGAATGGAA GCATATAAAC CCTAATTTGC TTTCTGATCC
551 ACTACCAGAA TTTCAATCAG TGTCGCTGTA AGTTTTCTTC AATTCTCCCG
601 TTGGCTTTGT AGTTTTGCAT CTATATGATA TTTACTTGTA TATACAGTTA
651 CTATTTTATT GTATTTCTCC CTATGAATAT ATGCATGTTT TTATAGATGG
701 CTGAATTAAT GTGTTCTTCT ATGTTGGCTA AATCTGAAGA TTATATTTAA
751 ATCCGAATTC AAAAAGAAAG AAGCAGCAGA TGGTAGCATA TAGGTTGGAT
801 TCAAGCGACA GTAACGCGTT TAGGTGAATC GTCACATAAT TGCTTGTCTG
851 TATTTTTATG TTTCAATTTT CATATGAACC TCATGAATGA TGATGGAAATC
901 CCAATTACCA GATCTGCAGA AATTAGAGAT TGGATTGATT GATTGTTCTT
951 CCTCATCTCT GGTCTTCTGT GTATCTACCT CATATGCTAT TTAATTACCC
1001 ACTTTGAATC CACCAATTAA CACAGATCCT ATATTGGTTT CAGTCGTAAG
1051 TCTAATATTA ATATGTGCAA TTATAAGGCT TAGTGTAGCT GCCAGTGGGA
1101 CAAACAAATA TCTTTTTCAT TGATGAAGAG AAAAATGATT GTTTTTCCCT
1151 ATATTTTTAA TGACAAAAC ATAATTTTAT GATGAATAAA AGGTTAAAAA
1201 TATCATGTAT GTGTTATTGT GTGACATTTT ACTCTTCACT ACGTACTCCT
1251 CCTGGTGTA TAGGTTTGGG TACCCTTGTA TACTCATCAT AATATTGTTT
1301 GGCTTATTTA AAATAAAAAC GACCCTCATT TTAGAGATGC ATTTATATTT
1351 TAAATTATTA TGTTAGCTTT CTATAGACTT GATTATATTA TGAAAATCAT
1401 TACTGCGGCA ATATTTAAGA TTTGCATATT CATCACCCAT GATGTGCAGA
1451 GAAGGTTAAT TATAAATCAG AGTTTTATTA TTTGTACCAC TAATCTAAAC
1501 ACTCACGCGG TATTTTTATA CATCGACCTA TTTATTTATG TGTTTTTTAA
1551 ATCCTTCTAT CAAATCAATG GAAAGAAAAG GTAGATATAC CATATGCTGG
1601 ATATCGGACT ATCATTTCTT CAACAGTTAA GTCCTAACTA ATGTATAATT
1651 TGCATTATCT TCGATAAATT TGTAATTATA TATACCTTAT ACTCTACTGA
1701 CTAAATTTGA TGTAATTAT CTGGAATCCT TCCGGAGTTC TGGAAAAGGAA
1751 ATGAGGCCAT AGAGAAAAAA ATGACAAAAG GAAAAAAGTT GAAAAATCGG
1801 TTATCTATGA GTGTATGTAT TATCAAGTTA TCTCGTTCTT AAATTCCTT
1851 AAATACTCAA TATTGTTTTT CAAAAATATA AGCTATCCTT CTTCAATTTG
1901 AAAATTTGAA ACTCTAGAGT TGATAAAGAA TAATAATGAA AGAAAGGCAC
1951 TTAGATCTGG TCTTAGGTGG GTAGCTACGT ATTAGGAGTT TCACATTGAA
2001 TAAATAATA ATTTAATATG GTATTTAAGT CATAATGTTG CGTATTCTT
2051 CCTAATAGAT TATTACAGTT GGATTAAGTT ATATTATATG GGATTATGGA
2101 CAATTTTAGA AAAATGGCCA CAGTTTGGCA CTGGCTAACT ATATAGAAGT
2151 GCTACATGAG TTTAGAGATC AAAAGTTATT TGATCTGGAA ATTAATAATTA
2201 CGTGGTTTAG ATTTGATTAA TTAATTTATC AAATCCAAAT TAAAAAACTA
2251 CTTCTACCTT CGCTCAGTTA GTATTTTAAAT TATTTAATTT TCTATTTAAA
2301 TAAAACTAA TACTATGTAT GTGTTTATGT ATTGAAGTCA TATTTTAAAT
2351 GGGAAAAGTA TACTATGGTA TATTGTTTAA TATTAAAAAC AATATATTGA
2401 AAGGGATCAA TCAATAATAT ATAATCAATA ATTCAGCATT CAGGATGTTC
2451 CTTACAAAT ACATCACACA AGAAGCATTG TATGTGTATT GACTTATATA
2501 ACTTTAGTAC TTTTTTAGCC CAACCTTTGT TGGGTAATTA TTGACATGCA
2551 TTTCTTCTAA GAGTCTGAAA TTTTTTGCTT TCATTGTTTC TGTAACGCCC

```

2601 CGAAAAATAC ATCTCAAAA CATTGCGGAA AAATAGGTAA ATTT

(3.5.3.) Kompletna sekwencja prekursora miRNA (5'→3')

TRINITY_DN46311_c0_g1_i4:

```
1 AAAATGTGAT GTGAAATATT GAAAAGAGAG TTCTGAGTTG GTGTAGGGTG
51 GGTCGTGGGG GTCACCTTTT CCAAGGAAAAG AAAATCCAAA AAAAGACTCA
101 CACCTAAACC CAGTGAGCTT TGGCTCTATC TATTGCTCAC TATTGCTTAC
151 AAATAACCCCT TTTGGATTTC TCTTCACTTC ACCCTTCATG CTTTTTCTCT
201 TATCTCTCCC CTCTCTCTAT ATCTCCCATC CCTATTCTCT TACCTCCAAA
251 AGAAGAATCT ACTTCTATA TCTATATATA TATATATATA AAGATTTTGG
301 AGTGGTGAAG ATAGCTCGGG CTAATTAGTA GGGCGGATAT CCGAAATGAT
351 GTGCTTGCCCT GGCTCCCTGA ATGCCATGTA AGAAGCTTTT GCCGTTAGGA
401 TCGACAACCT TTTTATTTGG CATTAGGGGA GCCATGCAGG CTCTTCATCA
451 ATTATACATA GTTATTATCA TAAATTTTTTC GACTCGACAC CCAACAAGAA
501 CAACTTTCAA TCAAGATTAT GATCATGCCC TTATCCTAAG TTGAGTGATA
551 ATTTGATTAA TTTCTTAGAA ATTTGCTTTT TAGTTATTAT GATGCTTATT
601 TCAGGTATTA TTTTCTTTGT TTGGAGAAAA TTTCCCTGAA CCATTTCAAA
651 TATCTTGATA CCATATATTT GGGAAAGATAA TGTACACTAG GAAAATTAAT
701 GCAGATTCTA CTATACCACA GAGAATTATT AGGCAAGAGA AGATGTATGG
751 TAGCAGAAGA ATTCAAATGC AGCCAAATAA ATTTAATCAT GGAGTTTTTT
801 TAATATGTGG CTGTGAAATA CTCCTAACAT TGTATCAAGA TTTGATATAT
851 AAATTTATAC AGTGGCTAGT GCTTTTTGCA ATGTGTGTAG TCACAATCTT
901 ATTGTCTATA TGATTATATA TAAGGTTCTT TGATTTTATG TAAACATGGT
951 CCTAATCTAA TTAACAACAT GGCTTAATAA TTGAAAATAT GTAGTGTATG
1001 AGTTTTAAAA
```

(3.5.4.) Kompletna sekwencja prekursora miRNA (5'→3') TRINITY_DN38047_c0_g1_i1:

```
1 CAGTTTTAGA CTGAGTTTGT TTTTGGATGT TCAATAATGT TGTTTGCTCA
51 AATGTCTTGC ATGAAGAGTT AAAGAGAGTA CATTGAGCC GAGGATGACT
101 TGCTGGCAAA AGAAGAATTC GCTCTGAGGA TGTTGTTGGC AACGATTCCC
151 GGCTCATATT TGCTTCCTTT ACCCTCATAT GAGACATGGA AAAGAGCTTG
201 AAAGCTTCAT GTCTATGGTA CCTTATTGAA ATATGTCATA TTTGCTATTC
251 GAATGTGGCA ACACACTTAT ACTTTGAGAG GGAAAATCCA ATTTTTCTTC
301 CTTTTTAAGG GTGCATAATC CTTTTGCTTT AACTTATTAC TAGGGCAAAT
351 AACTTGACGA GTTGGCACAT GATCTTTGAG CTTGACAGC TCAGAAATAA
401 GTTAAGCTCA TAAATTATAA TTATAAGCTT ATAAAATGAG CCTGGGTTAA
451 AAATTTAGAC TAGTTTCTGC TTCATGTAAG ATCATATGTT GATGTTTTTA
501 ATATTTAACA TTATTAATAA AGAAATTATT TAAATTAATA
```

(3.5.1.) Kompletna sekwencja genu docelowego Growth-regulating factor 9 (5'→3')

TRINITYDN48353_c0_g4_i6:

```

M E A K P L R S V P S S
.
1 CCACCAAGACAAAAATAAAAATAAAAAACTCATGTGAATGTGACCATGGAAGCAAAGCCTCTAGAGTGTCCCTCTTC
. H N T I Y G E G S G P Y K K K K S V V V V G V G D D E
.
81 ACACAACACTATCTATGGTGAAGGAAGTGGACCTATAAGAAGAAGAAAAGTGTGTTGTTGTTGGTGTGGTGATGATG
. E K K R V L D F V V N G A I N N N T L I Q T P C Y Y
.
161 AAGAGAAAAAAGGGTCTTGTGATTTTGTGGTGAATGGTGCATAAATAACAACACTTTGATTCAAACACCATGTTATTAC
N K C C L F S E T Q R G Y R S Q S F D F G S M M D P E
.
241 AACAGTGTCTGCTTTTTAGTGAGACTCAAAGGGGATACAGAAGCCAGAGTTTTGATTTCCGGAGCATGATGGATCCGGA
```

```

· P R R C R R T D G K K W R C S R N V V P D Q K Y C E R
·
~~~~~
321 ACCTCGTAGATGCCGAAGAACTGATGGAAGAAATGGAGGTGCAGTAGAAATGTAGTGCCTGATCAGAAGTACTGTGAAA
· H M H R G C N R S R K H V E A S Q V N S Q L T T K P
~~~~~
401 GGCACATGCATAGAGGTTGTAACCGTTCAAGAAAGCATGTGGAAGCATCTCAAGTTAACTCTCAATTGACAACCTAAGCCT
· S S E K I Q T K L T S S N I E S S V S N P N L L G T Q
~~~~~
481 TCTCCGAAAAGATACAAACCAACTAACCTCATCAAACATAGAATCTTCGGTTTCAAATCCGAACCTTTTAGGCACTCA
· P F D R S A F T L S M S E C V V N T S S A N T R L K N
~~~~~
561 ACCATTTGACAGATCTGCATTTACCTCTCAATGAGCGAATGTGTTGTTAATACCTCTTCGGCTAATACTAGATTGAAGA
· I I S S A D Y R G S F S T A T A K A P K A T S F S N
~~~~~
641 ATATCATAAGTTCGCTGATTACCGTGGCTCTTTTCTACTGCCACTGCAAAAGCCCCTAAGGCGACCTCTTTCAGTAAC
· T T L V A S G N G S S Q N I C K K D N Q S Q S C I G Y
~~~~~
721 ACGACTTAGTTGCTTCAGGTAACGGAAGTAGCCAAAATATATGCAAGAAAGATAACCGAGCCAGAGCTGTATCGGCTA
· N V G V K S G A K A S I N C D D N S I S T G I G F S P
~~~~~
801 CAACGTCGGTGTAAAGAGTGGTGCAGAAAGCAAGCATCAACTGTGATGATAATAGCATCTCTACTGGAATAGGCTTCTCGC
· R S V L Q V S G C N N S Y L N D R N N V D L E S G R
~~~~~
881 CTAGGAGTGTCTTCAGGTTTCGGGTTGCAATAATTCGTACCTCAATGACAGAAACAATGTGGACCTTGAATCAGGTAGA
· C R R T D G K K W R C K S A V V P G Q K Y M H R G S K
~~~~~
961 TGTGGAAGAACAGATGGTAAGAAGTGGCGGTGCAAGAGTGTCTGTTGTTCTGGCCAGAAATATATGCACAGAGGTTCTAA
· R R F A E Q K P D A T D S A V T I A Q L P C S T A A T
~~~~~
1041 AAGCGATTTGCCGAACAAAACAGACGCAACTGATTCTGCTGTACCATTTGCTCAGTTGCCTTGCTCTACAGCCGCTA
· N I P K A Y C S I A N T N L S M P I P A S T A P L I
~~~~~
1121 CCAACATCCCAGAAAGCGTATTGTTCAATTGCGAATACAAATCTGTCCATGCCAATCCCAGCAAGTACAGCACCCCTTGATA
· K C N E K S P C S S D T E T T I T D T M N E Y S Y A S
~~~~~
1201 AAATGTAATGAGAAAAGTCCCTTGACGACGCGACACGGAAACCACCATCACCGACACCATGAATGAATATAGCTATGCTTC
· S
~~~~~
1281 TTCATAAGAAGATTTTTTCATTTCTTGAACATGTTTGATGTTAATGAAACAAGTTAGCTTCTAAGTTTTTTTTAGATCA
1361 GCTTTGTGTAAATTTGAACAATGCCCTCTATGAAGAAAACACTATTTAGCCCTTCTAAGTTTTGAACATTTGGTCTTCACA
1441 ATATGTTGTGTTCAATTCATATCGTCTACCGCAGTTGAGATTAAGACTTGATTGTTGTTGGCAGATTGACCTGTATTATG
1521 TCCGGGGGAAAATGGATTTGACCAAATTTAACCAGGAGACTTTTCGTTGGGGCTAGATTGATAGATACGAAGTTTTTTTT
1601 TTACTATACGGGACATCAATGTTTTGTTAATGAACATGATTGATCCACGT

```

(3.5.2.) Kompletna sekwencja genu docelowego Auxin Response Factor 6 (5'→3')

TRINITYDN50857_c0_g1_i10:

```

1 AAATTTATTATCAAGTACAAAAACACACTCTCCTCTTAAAATCACACACCCCAAGAAACAATGGCGGTTCTGTCTTCAT
81 CCATTGAAGCACACACAGAAAAGGAGAGAAACAGTTAAAGCAACAAAACCTAGTACAACGGCCACCGCCGCCCACT
161 ACTGGAAGTCCACCCATTTCCCATCACCATTTAATAACCAATCCCGAATCTGACCCAACCCCTTTACTTTTTCAACAAT
241 AAAAAATAAAAAATAAATCTTTTTAGTCACACACTGTTTTCTGTCCCTACTTGGAAGAAAGCAAGTAAAGCAGTTTT
321 CTTACACTGTTCCGTTTTTTCCGTTACAACCTTTTGCCTTCAGTTTTTCAGCTCTGGCTTGAGTTGTTCACTCTGATTGCTATG
401 CCCATTTGCTCTTTATCCTTGTGTTGCTTCGGTCTGTCGTGAGATTGCTGCTTTTTCTCGGATTCCTTGCTCTTTGCTA
481 AGATCTGTTGGTTTTGAAGATTCTTCAGTTGTTGGTTTCTGGGTAGTACTTGGTTTTTATGTTGTTCCAAATTTGG
561 TAACTTTTGCAGAATGAAGTGTGTTTATGAAGATTGCAACTTGGGTTGGTTTTGGTTAAGGAGGGTTGAAGGGAATGA
641 AGGGTGAAGTCAAAAACTTGTCTTTTGTAGTGAACCTGGTTTTGGTTGAGGATTGAAAAGGGTGTGGAATATTTCTGAGC
721 TTCTTAGCGTTTTATCTTTGATGGGTGAGAAAATCTGTAACCTGGGTGTTGAGTTTTGTTGAGGTTTAAATGGGTTTTT
801 GGTAGTAAAGATATGAAGAATGATATTATGTAGTGAGAAGAAAGATATGAAGAATTGATCCACTAAGATTTAAGAGTGT
881 GTGTTTGAACCTTGAATCATGACTGTGATCTCAATCCAAGTTTGAATTTCTGAAATGAAGCTCTCTTCAGCTGGT
961 TTTAGTCCCTCCACTGAGGAAGGAGAAAAGCGAGTTTTGAGTTGAGGATTGAACTTGGCATGCATGTGCTCCCTTTGTTT
1041 TTTACCAGCTGTTGGAAGCCGTGTTGATACTTTCCACAAGGTACAGTGAACATGTTGCTGCATCAACCAACAGGGAAG
1121 TGATGGCCATATGCCTAATATCCAAGCTTACCTCCCAACTTATGTGTCAACTTCATAATTTGACTATGCATGCAGAT
1201 CCTGAGACTGACGAAGTATATGCACAGATGACCTTGAACCTCTGAGTCTGAAGAACAAAAGGAGGCATACTTTCCAGC
1281 AGATTTGGGCACCTCCGAATAATCAGCCAACAACTACTTTTGCAAAAACCTTACTGCTCCAGTGACACAAGCACTCATGGG
1361 GGTTTTCAGTTCCCTGCTCGGGCAGCTGAGAAAGTGTGTTTCTCCATTGGACTTCTCCCAACAGCCCTCTTGTCAAGAGTTG
1441 ATTGCAAGGGGATTGTCATGGTCAATGAATGGAAATCCGACATATCTTCCGGGGTGATATATAAAGCAGAGATTGTTTACT

```


1521 TCTATTTAATGCTACTGTAGTATTTATGTCTTTTTTTCCTCCTGTTAGAGTCCTTATTTTTATCAATGGGTGCCAAA
 N K C T F L L R C L N L V S F Y A G Q P K R H L L T T

1601 AACAAAGTGTACTTTTCCTTTTACGATGCTTGAACCTTGGTGTCTTTTTATGCAGGCCAGCCAAAAGGCATCTACTTACAAC
 G W S V F V S A K R L V A G D S V L F I W N E K G Q L

1681 GGGTGGAGTGTCTTTGTGAGTGCATAAAGACTTGTGCTGGTGATTCAGTGCTGTTTATCTGGAATGAAAAGGGTCAAT
 L L G I R H A N R S Q P V M P S S V L S S D S M H L

1761 TGCTTCTTGGCATTCCGGCATGCTAATCGGTCACAACCTGTGATGCCTTCGTCGGTGTGTCAAGTGATAGTATGCACTTG
 G L L A A A A H A A A T N S R F T I F Y N P R A S Q S

1841 GGCCTTCTTGCTGCTGCAGCTCATGCAGCTGCAACAAATAGTCGTTTTACCATTTTCTACAACCCACGTGCTAGCCAATC
 E F V T P L A K Y V K A V Y H T R V S V G M R F R M L

1921 AGAATTCGTCACACCTTTAGCAAAGTATGTTAAAGCTGTCTATCATACTCGAGTTTCAGTAGGCATGCGCTTCAGGATGT
 F E T E E S S V R R Y M G T I T G I S D L D P A R W

2001 TGTTTGAGACAGAAGAATCTAGTGTGCGGCATACATGGGCACAATAACAGGCATTAGTGACTTGGATCCTGCTCGGTGG
 P N S H W R S V K V G W D E S I A G E R Q P R V S L W

2081 CCAAATTCACATTGGCGCTCAGTCAAGGTTGGCTGGGATGAATCCATAGCCGGTGAGAGGCAACCTCGAGTGTCTCTATG
 E I E P L T T F P M Y P S P F P L R L K R P W P L G L

2161 GGAAATTGAGCCGTTAACAACGTTTCCAATGTACCCATCTCCTTTCCCCCTCAGGCTTAAAAGACCGTGGCCTCTAGGAC
 P S Y H G M R D N D F G M N S S L L G F Q S L D F Q

2241 TGCCTTCATACCATGGCATGAGGGATAATGATTTTGGCATGAATTTCTACTATTGGGGTTTCAGTCTCTCGATTTTCAG
 G I G I N P W M Q P R L D P S M V N F Q N D M Y Q S M

2321 GGAATGGTATTAATCCTTGGATGCAACCAAGGCTTGATCCGTCATGGTGAATTTTCAAAATGATATGTACCAATCCAT
 A A A A L Q D M R T S D P S K Q H P A S S L Q F Q Q P

2401 GGCTGCTGCTGCACTTCAGGATATGAGGACTTCAGATCCTTCCAACAGCATCCTGCTTCTTCACTTCAATTTTCAGCAAC
 Q N F P N T T P I L M Q T Q M L Q Q S Q P Q Q V F P

2481 CACAGAACTTCCCAACACGACTCCCATTTTAAATGCAGACACAGATGTTGCAGCAGTCTCAACCTCAGCAGGTTTTTCCG
 N N Q E N Q H S S P S Q F Q N Q A H L Q Q H L Q H Q H

2561 AATAATCAAGAAAATCAGCATTCTCCATCTCAATTTCAAACCAAGCGCATCTTCAGCAGCATCTGCAGCATCAGCA
 S F N N H N H H Q Q Q R Q Q Q Q Q Q M V D H Q Q T

2641 CTCATTTAATAATCATAATCATCATCAGCAACAACGACAACAACAGCAGCAACAACAGCAAATGGTAGATCATCAGCAGA
 S S S V S Q F V S I P Q S Q S S R M Q A I S S L C Q

2721 CTTCAAGTTCTGTCTCTCAGTTTGTTCGATACCTCAATCTCAATCATCGCGCATGCAAGCTATCTCTTCGCTGTGCCAA
 Q R S F S D S S G N P A A T A T A S R L H N M M G S F

2801 CAGCGAAGTTTTTCTGATTCAAGTGGGAACCTGCGGCTACTGCTACTGCTTCTCGCTGCACAATATGATGGGTTTCATT
 P Q V E T S H L V N L P R T S F W M P V Q H S T A W P

2881 TCCCCAGGTTGAAACATCCCACCTTGTCAACCTTCCGAGAACAAGTTTTTGGATGCCTGTTCAACACTCAACTGCATGGC
 P S K R V A V D P L L S Y G G S L C Q V E Q I G Q P

2961 CTCCTTCAAAGCGTGTGGCGTGGACCCACTCCTTTCATATGGAGGATCTCTATGTCAAGTGGAGCAGATAGGGCAGCCA
 Q I T M S E N A V T L P P F P G R E C A V E G S T D P

3041 CAAATAACCATGTCTGAAAATGCTGTTACGTTGCCACCCTTTCTGGTAGGGAATGCGCCGTAGAAGGGAGCACTGATCC
 Q N N I L F G V N I D P S S L L V N N G M S S L K G V

3121 ACAAAAACAATATTTTGTGGTGTAAATATAGATCCCTCTTCACTTCTAGTCAATAATGGGATGTCAAGTCTTAAAGGGG

· S V N R H S S S M P F Q H S S Y L N A T G T D T S L
 ~~~~~  
 3201 TCAGCGTCAATCGTCACTCATCATCCATGCCTTTTCAACATTCTAGTTACCTGAATGCCACAGGCACTGATACTTCACTA  
 N P G M T H S I D E S D F L H T P E N G G R G N S P I  
 ·  
 ~~~~~  
 3281 AATCCCGAATGACACACAGCATTGATGAATCGGACTTCTACATACTCCAGAAAATGGGGCCGAGGAACTCGCCAAT
 · K T F V K V Y K S G T F G R S L D I S K F T N Y H E L
 ·
 ~~~~~  
 3361 CAAAACCTTTGTGAAGGTTTACAAATCAGGGACCTTTGGGAGATCATTGGATATCTCAAATTCCTAACTAACCATGAGC  
 · R S E L A R M F G L G S E L E D P V R S G W Q L V F  
 ·  
 ~~~~~  
 3441 TGCGCAGTGAGCTTGCTCGCATGTTTGGCCTTGGAAAGTGAGTTGGAGGATCCTGTAAGATCAGGCTGGCAGCTTGTATTC
 V D R E N D V L L L G D G P W P D F V N S V W C I K I
 ·
 ~~~~~  
 3521 GTTGACCGAGAGAATGATGTTCTGCTCCTCGGTGATGGTCCTTGGCCGGACTTGTAAATAGCGTATGGTGCATCAAGAT  
 · L S P H E V Q Q M G N N S L E L L N S V P I Q R L S N  
 ·  
 ~~~~~  
 3601 ACTTTCCCGCATGAAGTGCAACAAATGGGCAACAATAGCCTGGAGCTTCTGAACTCAGTTCCAATTCAGAGGCTCTCCA
 · G I C D D Y T G R D D Q R N L S N G I T T L E Y
 ·
 ~~~~~  
 3681 ATGGCATCTGCGATGACTACACCGCCGAGACGACAAAGAACTTAAGCAATGGAATAACCACCTTAGAGTACTGAATG  
 3761 ATGTTTACTACTCAATACTTTAAAGTCCCTTCTCCTTGATTATTACCCTTGCTTCTCAACATTAGGGTTGGGAAGTGCTAC  
 3841 TTAATGTAGTTTGTAGACTACTATATAGCCTTTTATTTTCATGTTTCACTACTTAGGACCTTTTATAAACTAAAACA  
 3921 ATGTAATATATGGCATCTTGTCACTGTACTTATCTATATACAATATATGTTTACTAAATCTATTAGGAAGTCAATGTG  
 4001 TAAAGATGTTCTCTTCTCTCTGATATATTGATGATTTTCTCTCTTA

### (3.5.3.) Kompletna sekwencja genu docelowego Auxin Response Factor 17 (5'→3')

TRINITY\_DN48234\_c1\_g4\_i1:

1 CGATAACATACATAATCCAAATTAATCGATTACAGTTACACTATTTGATAAAGATTATGCATTTTCGTTCTTAGTATTTCAA  
 81 ATTTGAACCCAGACATAACAACTCTCACACTCTACTTATAATGTTTCAACTTTGAACCTTGAACCTTAAATCAACCCCT  
 M R R P P P S V P  
 ·  
 ~~~~~  
 161 CACTCTCTCATTACAATCTCTCTCTCTTTTTTCTCTTCCAATTTCAATTCATCATGCGGCGTCCACCGCGTTCGGTTCC
 · P P P P L I P S Q P S R I D S S I W R A C A G A S V Q
 ·
 ~~~~~  
 241 TCCTCCTCCGCGTTGATTCCGTCGCAACCGTCGCGTATCGACTCCAGCATTGCGGTGCTTGTGCCGAGCTTCCGTTCC  
 · I P V V N S R V Y Y F P Q G H L D Q A S S P P E Q L  
 ·  
 ~~~~~  
 321 AAATTCGCGTTGCAATTTCTAGGTTTACTATTTCCCTCAAGGTCACCTTGATCAAGCTTCACTACCTCTGAACAATTG
 S S N V Y S N P C V L C R I V D V Q F L A D H K T D E
 ·
 ~~~~~  
 401 TCTAGTAATGTTTATTCGAATCCTTGCCTTCTTGTGCGATTGTTGATGTTCAATTTCTGGCTGATCATAAAACCGATGA  
 · V F V K L V L H P I N R N S D F Q N Y L S D T P P P T  
 ·  
 ~~~~~  
 481 GGTTTTCGTTAAACTCGTTCTTACCCTATCAACCGTAACTCTGATTTTCAGAATTATCTCTCTGATACTCCTCCTCCGA
 · P A V A G D G G S G S S N N T S S G D G D E N A V V
 ·
 ~~~~~  
 561 CACCGGCTGTAGCCGGTATGGTGGTAGTGGTAGTAATAATACTAGTTCCGGTGACGGTATGAAAATGCTGTGGTT  
 S F A K I L T P S D A N N G G G F S V P R F C A D S I  
 ·  
 ~~~~~  
 641 TCGTTCGTAAGATTTTACTCCGTTCTGATGCTAATAATGGTGGTGGTTTCTCTGTTCCGAGGTTCTGTGCTGATTTCGAT
 · F P P L N F N D D P P F Q N L M I A D M H G N V W E Y
 ·
 ~~~~~  
 721 TTTCCCGCGCTGAATTTCAATGATGATCCGCCGTTTTCAGAAATTTGATGATCGCTGATATGCATGAAAATGTGTGGGAGT  
 · R H I Y R G T P R R H L L T T G W S K F V N F K K I  
 ·  
 ~~~~~  
 801 ATGCCACATTTACCGTGGGACGCCGCGGCACTTGTCTCACTACTGGCTGGAGTAAGTTTCGTTCAACTCAAGAAGATC
 V A G D S V V F M K N A K G E L F S G I R R A K R T S
 ·
 ~~~~~  
 881 GTCGCCGTGATTCGGTTGTTTTCATGAAGAACCAGAAAGGGGAGTTGTTTTCTGGAATTCGCCGAGCAAAAAGGACTTC  
 · T R S G G R G V S G T D W S A T M L A I G G T R K R D  
 ·

```

961  CACTAGGAGTGGCCGGCAGAGGAGTCAAGTGGCACTGATTGGAGTGGCAGCATGCTTGTATTGGTGGTACAAGGAAGAGGG
· G D V E K K K E D N V V M E G F S R N G K G K L A P
1041  ATGGGGATGTGGAGAAGAAGAAGGAGGATAATGTTGTGATGGAGGGGTTTTCAAGGAACGGGAAGGGAAATTTGGCCCG
· E K V A E A V E L A A Q G M P F E A V Y Y P S A G W S
1121  GAGAAGGTTGCTGAGGCTGTGGAACGGCAGCGCAAGGAATGCCATTTGAGGCTGTGTATTATCCAAGTGCCTGGGTGGTC
· D F V V Q A E I V D S A M M I I W S P G M R V K M A V
1201  AGATTTTGTGGTGCAGGCAGAGATTGTGGATTTCAGCGATGATGATAATTTGGAGCCCTGGAATGAGAGTGAAGATGGCTG
· E T E D S S R T S W F Q G A V S A A C V P E N G L W
1281  TGGAGACTGAGGATTCGTCTAGGACGAGCTGGTTTCAGGGCGGGTGTCTGCTGCGTGTGTTCTGAGAATGGGCTGTGG
· R G S P W H R I Q V A W D E P E L M Q H A K F V S P W
1361  CGAGGTTCTCCTTGGCATAGGATTCAGGTTGCATGGGATGAACCTGAACTCATGCAGCATGCAAAGTTTGTGAGCCCTTG
· Q V E P L S V T S T F H T A V P L A K R F R A A Q D S
1441  GCAGGTTGAACCTTTATCTGTACATCTACATTTACACAGCAGTCCCCTTAGCCAAAAGGTTTAGAGCTGCTCAGGATT
· V G L T D G K G D P F F P M T G Y T N S T M G Q L N
1521  CTGTGGGTTTAACTGATGGAAGGGGGACCCTTTCTTTCCTATGACAGGATACACTAATTAACAATGGGACAGCTTAAT
· Q T L S S Y S T F P A G M Q G A R H N L F S T T A F V
1601  CAAACATTGTCGAGTTATAGTACATTTCCCTGCTGGCATGCAGGGAGCCAGGCATAATCTATTTTCTACAACCTGCTTTTGT
· K F S S D M N H L C L G N S F G N N T A P S S K I L S
1681  CAAATTTTCTAGTGATATGAATCATCTGTGTTTGGGTAATCCTTTGGAACAACACAGCACCAAGTTCGAAAATTTTGT
· T E L N I G S S Q S D N L S P D S Q C S L H S F G T
1761  CAACAGAGCTAAATATTGGCAGTTCTCAATCTGACAACTTGTACCAGATAGCCAGTGTAGTTTGCATTCTTTGGTACA
· E C V R T H N C N S T K P V S R S I Q L F G T T I E T
1841  GAATGTGTTCCGACCACAACCTGTAATTCACGAACCTGTGTCTCGTTCATTCAGCTATTCGGTACCACCATTGAAAC
· K Q P V K S G F H L T G C I G N D S C K C H D E I E G
1921  AAAACAGCCTGTTAAAAGCGGTTTTTCATCTTACCGGTTGCATAGGAAATGATAGCTGTAAGTGCACGACGAAATGAAAG
· L T L E L S L A Y S K M L N S L D G L D D G R H Y L
2001  GACTTACCCTGGAATATCTTTGGCTTACTCAAAAATGCTGAACAGCCTTGATGGCCTTGATGATGGCAGACATTATTTG
2081  TGAAACCAAGTAGATAAGTAGTAAACAGGTGCTGCAGCAGCTGGGCTGCAGGAAGCTGATTCCTTCTGGCGTTTGCAG
2161  TAATGAACACTAATAACGATGTGCTAGTTTCTTTTGTATTACATTGAACTTGGAACAGCGAAACTAATTTCCCGAAA
2241  TTTCGTTTAAAGTGTGTGTCGATGTTTCGACAACTTTCTAAGATTTCTGGACAAGTTTTATTACTTGTTTTTTCTGTTTCT
2321  CTGGTCTTGGCTTGTGATTTGGATTTAATATGCCCCTTGGTAGGGTTAATGCATATTTTTTAGTCTAATTTGTCT
2401  TAAATTTTTTACATCACTCAACCCTTACATTTGGTTACAATTTCTGCACAAGAAAGTGTGTAGATAGTGAATAAAG
2481  TGTTCAACTGTTGGCATTAGCA

```

(3.5.4.) Kompletna sekwencja genu docelowego Nuclear transcription factor Y subunit A5 (5'→3') TRINITYDN48523\_c1\_g2\_i5:

```

1  TATGACTAAACCAAATAGCCATAGGGTAGTAGTGGAAAGTGA AAAAGAAGTAAACAAGTGTAGAGTGA AAAACAAAGTGTAT
81  AACCTTCAACAAATGAGACATGCCCATGTTGAACCCGGCATCTATATCATCTAAAGGTGTAATGAAGTTTTGAAAAC
161  TAAGGCTGCAATACTGTTAAGTTCTCCTGGAGTGGTATTTGATAATCCTTATCTTACTTCACTCTTAACCAAGTGGCACA
· M F L L L N H T
241  AAACCATTCTATCAGATCAAGAACTAAATAATGGATATGTGGATGGTTTATTGAAGATGTTCTCTTGTGTAATCATACT
· D T A F N C S H V D C S H S M A Y A P Y P Y D G D P S
321  GATACGGCATTCAATTTGTTACACGTCGATTGCAGTCACTCAATGGCTTATGCTCCTTATCCTTATGATGGTATCCTTC
· C G G S L V A Y G A H A I N Q S Q M F P Q M L G L G L
401  TTGTGGTGGTTTCATTAGTTGCTTATGGAGCACATGCTATTAATCAATCCCAATGTTTCCCAAATGCTGGGCTGGGAT
· A S T R I A L P P D F A E D G P I Y V N A K Q Y H G

```

```

481 TAGCATCCACTAGAAATTGCGTTACCACCTGATTTTGCAGAAGATGGGCCATTTATGTCAACGCAAAACAATACCATGGT
  I L R R R Q S R A K L E A Q N K L I K S R K P Y L H E
.
561 ATACTGAGAAGGCGACAGTCCGCGAGCAAACTTGAGGCTCAAAACAAACTCATCAAAGTCGTAAGCCATATCTTCACGA
  S R H R H A L N R V R G T G G R F L S A K Q L Q Q S H
.
641 GTCTCGGCATCGCCATGCTTTGAATCGGGTTCGGGGAACGGCGGACGCTTTCTTAGCGCTAAACAGCTGCAACAGTCTC
  A E V V S G A H S V S D P V N L Y Q N K D A P E V E
.
721 ATGCAGAAGTTGCTCTGCTGCTCATTGCTCAGTATCAGACCTGTGAACCTATATCAAATAAAGATGCACCTGAGGTGGAA
  S H S S R M G G N A E L T T L S S N S V I F R Q H E L
.
801 AGCCATTCTCCAGAATGGGAGAAATGCTGAACCTAACAACTTTGCCAGTAACAGTGTATATTTCCGGCAGCATGAACT
  Q F L G N S P N I G L G A S Q C S R G F T F G G S G T
.
881 ACAATTCTTAGGTAACCTCCCAATATAGGTCTAGGAGCATACAATGCAGCAGGGGATTCACCTTCGGGCGCAGCGGAA
  E R N
.
961 CGGAGCGAAATTAATCTCACCAGGTCAGGCAATCATCCTTGGCTTAGTCACTAAACTTTATGTTTACAGAAATGTTGTCT
1041 TTTGAGAGACTCTGCATTACCCCTCATACCTATGCCACTTCTTAGACATGTATTTATAGTTGTTATTGTTCCATTGGT
1121 GTGTTTTATTTTTTAACTGGATTGGAGAGGTTTGTACTTGAATTTAACTTATCCATACTTTATTGACCGGAACTACC
1201 AAACCTTTCACCTATATAAATCGGGCGGGTGATGTATACTATGATAGAACATGAGTTTTATATGTTGTTACCGCATCTT
1281 TCATATTAATCATTCAAAG

```

**(3.5.5.) Kompletna sekwencja genu docelowego GAMYB (5'→3')**

TRINITY\_DN52683\_c1\_g2\_i3:

```

1 AAGATGATGAATCTGTGAAAGAACATTGAAATGACATTTCCATTCCACATTTCTCTCTTTCCCTTTTTCTTCTC
81 TTCCCTTTCCCATCCATCATTTTCACTTTCACTTCTCTCCCTTCTCTCTCTAAAACCTTCTTCTTACTTTCTCTCTCTA
161 AAACCTTTCATGAAATTAATTTCTTCAATGTTCTGTTCCCTTCTTCCCTTCTCGTATCTTCCCTTCCGAGAACTC
241 CGGAACGCGGTTCTCACTGTTTTCGTTCAGTTTTCTAGCTTAATTGAGCTTGATCCTCTGCGCGCAAAACGAGTCGTTTTTG
      M R R M K N E I E D E M L
.
321 GATTTTAGCGTTGTGTCTTATTCAGAACTGTATGATAAAAGATGAGACGGATGAAGAACGAGATTGAAGATGAGATGCT
  P N N M T E S Q L N D E G N G G S G S I V V L K K G P
.
401 CCCCACAATATGACAGAATCACAGTTGAATGATGAGGGTAATGGAGGAAGTGGCAGCATAGTTGTTCTGAAGAAAGGTC
  W T S A E D A I L V D Y V K K H G E G N W N A V Q K
.
481 CATGGACATCTGCTGAAGATGCGATTTTGGTTGATTATGTCAAGAAGCATGGGGAGGGGAAGTGAATGCTGTTCAGAAG
  H A G L S R C G K S C R L R W A N H L R P N L K K G A
.
561 CATGCAGGCTGTGCGTTGCGGAAAAAGTTGCCGATTGCGGTGGGCCAATCACCTAAGGCCAAATTTAAAGAAAGGGGC
  F T A Q E E R L I T E L H A K M G N K W A R M S A H L
.
641 GTTTACTGCACAAGAGGAGCGCTTAATTACTGAACTTCCAGCAAAATGGGAAACAAGTGGGCACGCATGTCAGCACATT
  P G R T D N E I K N Y W N T R A K R R Q R A G L P L
.
721 TGCTTGGTCGCACAGATAATGAGATAAAGAAGTACTGGAACACCCGAGCCAAGAGGCGTCAACGGGCTGGCTTGGCACTT
  Y S P E V C S P A V Q E S H Q S Q S T D G V N G G N K
.
801 TATTCTCTGAAGTGTGTTCGCCAGCAGTCCAAGAGAGCCATCAAAGCCAAGCACTGATGGAGTTAATGGTGGCAATAA
  V H H D L L N S Y E I H D A I I D S V K D N Q G I S P
.
881 AGTGCATCATGATTTGTTGAACAGTTATGAGATACATGATGCAATAATTGACAGTGTGAAGGATAACCAGGGAATCTCAC
  Y V P E P P D I S D Y N N M L K G L D S S Q Y C N F
.
961 CTTATGTTCTGAGCCTCTGATATTTCTGATTATAACAATATGCTGAAAGGCCTTGATTCTTCTCAGTACTGTTAACTTT
  T S S T S P N H K R L R E S T M P F F G S S C M S T N
.
1041 ACATCATCAACATCACCTAACCTAAGCGTCTTCGAGAGTCAACAATGCCATTTTTTGGTTCCAGTTGTATGAGCACAAA

```

```

· L F Y P F D H I R A N T S D K I A Q S F G M Q S P L D
·
~~~~~
1121 TTTGTTTTATCCATTTGATCATATTCGGGCTAACACCTCTGATAAGATTGCACAATCATTGGAATGCAATCACCCCTTG
· H G P S L H S S M C Y S H S L S N G N S S T S K P T
~~~~~
1201 ATCATGGCCCTCCTTACACAGCTCAATGTGTTACAGCCATTCACTTCAATGGCAATTCTCTACTTCTAAGCCAACT
· S E A V K L E L P S L Q Y P E I D L G S W G T S P P L
·
~~~~~
1281 TCTGAGGCTGTGAAGCTAGAGCTCCCTTCACTCCAATATCCAGAAAATTGATTTAGGTAGCTGGGTACATCTCCCCACT
· P L L D S V D D F I K Y P T P I S T M E S D C S S P Q
·
~~~~~
1361 TCCTTTGCTTGATTGCGTTGATGATTCATTAAGTATCCTACACCAATTAGTACAATGGAGTCAGATTGTTCTTCCCAC
· N N G L L D A L V Y Q A K T M S S S K K H Y S D E I
~~~~~
1441 AGAATAATGGCCTTCTGGATGCTTTAGTTTATCAGGCAAAGACTATGAGCAGTTCCAAGAAACATTATTCTGATGAGATT
· S N S S T A I P G H R A D S S T L N M Y E T E L E D Y
·
~~~~~
1521 TCAAACATCTACTGCAATTCCTGGTCACAGAGCGGACAGCTCCACATTGAACATGTACGAGACAGAATTGGAAGACTA
· A D P V S P F G A T S I L N E C P V I A N A N S L D E
·
~~~~~
1601 TGCTGACCCTGTATCTCCGTTTGGTGCAACTTCAATATTGAATGAATGCCCTGTTATTGCCAATGCAAATTCATTGGATG
· T P L D Q T F N G N S E N Q T M S V L N I T W P D I
~~~~~
1681 AAACCCACTCGATCAGACCTTCAATGGTAACAGTGAAAACCAAACCATGTCTGTGTTAAATATTACTTGGCCGGACATT
· L L D E D W L Q Q D S G N G K N Q T I T T D A M S T L
·
~~~~~
1761 TTGCTTGATGAAGATTGGCTCCAGCAGGATCTGGTAATGGCAAGAACCAACCATCACAACATGATGCTATGCAACCTT
· F G D D L A T D Y K H M T D G T S K S S Q V W G F G S
·
~~~~~
1841 TTTCCGAGATGATTTAGCCACTGACTACAAGCATATGACTGATGGAACCTTCTAAGTCTAGTCAGGTATGGGCTTTGGTT
· C A R N H S A F C L S G V
~~~~~
1921 CTTGCGCACGAACACAGTGCCTTCTGTCTGTGTCAGGTGTCTGATCCCGATTGCGAAAAAGGTGAGATGTGTGGTTTGAA
2001 ACATTTTCATAATTGTAATCACGTTTGATTTTAAACATGGTAGCCAGGAGTAAATATCTCGTGGGCTGAAAGATTTTATA
2081 TTGGTGTGATTTATAGTACCAAATACTTAGTCTGAGACTGGTGTTTTCTTGTAGCTTTATCAATTTTTTCTTTTGGTGT
2161 TGAGTGTGTATACCAGCATGAATCTGTGTCCACAGTCTGCTTTTGAAGGTTTTTATTATTGTGTAGAATAACATTA
2241 CATTTTTAAATGGAATAAAACTTGCTTATTAATAAAACAAA

```

**(3.5.2.) Kompletna sekwencja białka ARF6:**

```

1 MGAKNKCTFL LRCLNLVSFY AGQPKRHLLT TGWSVVFSAK RLVAGDSVLF
51 IWNEKGQLLL GIRHANRSQP VMPSSVLSSD SMHLGLLAAA AHAAATNSRF
101 TIFYNPRASQ SEFVTPLAKY VKAVYHTRVS VGMRFRLFE TEESSVRRYM
151 GTITGISDLD PARWPNSHWR SVKVGWDESI AGERQPRVSL WEIEPLTTFP
201 MYPSPFPLRL KRPWPLGLPS YHGMRDNDGF MNSSLLGFQS LDFQIGINP
251 WMQPRLDPSM VNFQNDMYQS MAAAALQDMR TSDPSKQHPA SSLQFQQPQN
301 FPNTTPILMQ TQMLQOSQPQ QVFPNNQENQ HSSPSQFQNO AHLQQLHQHQ
351 HSFNNHNNHQ QQRQQQQQQQ QMVDHQQTSS SVSQFVSIPO SQSSRMQAIS
401 SLCQQRSFSD SSGNPAATAT ASRLHNMMGS FPQVETSHLV NLPRTSFWMP
451 VQHSTAWPPS KRVAVDPLLS YGSLCQVEQ IGQPQITMSE NAVTLPPFPG
501 RECAVEGSTD PQNNILFGVN IDPSSLLVNN GMSSLKGVSV NRHSSSMPFQ
551 HSSYLNATGT DTSLNPGMTH SIDESDFLHT PENGGRGNSP IKTFVKVYKS
601 GTFGRSLDIS KFTNYHELRS ELARMFGLGS ELEDPVRSWG QLVFVDREND
651 VLLLGDPWP DFNVSVCIK ILSPEVQQM GNNSLELLNS VPIQRLSNGI
701 CDDYTGRDDQ RNLSNGITTL EY

```

**(3.5.5.) Kompletna sekwencja białka GAMYB:**

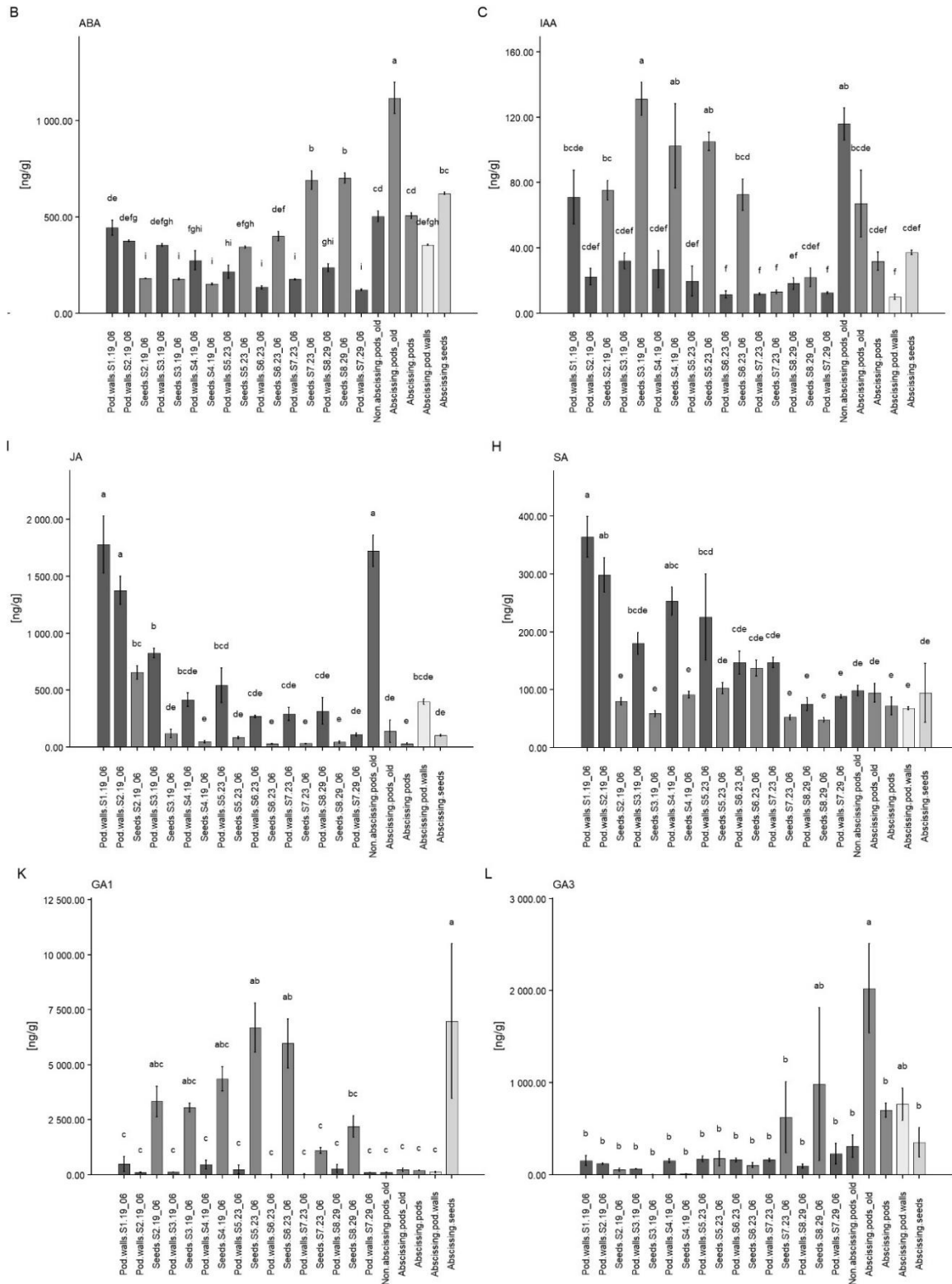
```

1 MRRMKNEIED EMLPNMTEs QLNDEGNGGS GSIVVLKKG WTS AEDAILV
51 DYVKKHGE GGN WNAVQKHAGL SRCGKSCRLR WANHLRPNLK KGAF TAQEER

```

101 LITELHAKMG NKWARMSAHL PGRTDNEIKN YWNTRAKRRQ RAGLPLYSPE  
151 VCSPAQQESH QSQSTDGVNG GNKVHDDLN SYEIHDAIID SVKDNQGISP  
201 YVPEPPDISD YNNMLKGLDS SQYCNFTSST SPNHKRLRES TMPFFGSSCM  
251 STNLFYFPDH IRANTSDKIA QSFQMSPDL HGPSLHSSMC YSHSLSNNGS  
301 STSKPTSEAV KLELPSLQYP EIDLGSWGTS PPLPLDSDV DFIKYPTPIS  
351 TMESDCSSPQ NNGLLDALVY QAKTMSSSKK HYSDEISNSS TAIPGHRADS  
401 STLNMYETEL EDYADPVSPF GATSILNECP VIANANSLDE TPLDQTFNGN  
451 SENQTM SVLN ITWPDILLDE DWLQQDSGNG KNQTITTDAM STLFGDDLAT  
501 DYKHMTDGTS KSSQVWGFGS CARNHSAFCL SGV

3. Przykładowe wstępne wyniki analizy statystycznej zawartości endogennych fitohormonów w próbkach (Rozdział 3.8).



**Rycina s1.** Wyniki wstępnych analiz zawartości endogennych fitohormonów w nasionach i ścianach strąków łąbiny żółtego.