

Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu  
Wydział Nauk Biologicznych i Weterynaryjnych



mgr Milena Kulasek

Nr albumu 502165

Rozprawa doktorska  
na kierunku Biologia

Udział genów kodujących elementy szlaku transdukcji  
sygnału auksyn, regulowanych przez mikro RNA  
w kontroli rozwoju kwiatów łubinu żółtego

Promotor: dr hab. Jacek Kęsy, prof. UMK  
Promotor pomocniczy: dr Paulina Glazińska  
Katedra Fizjologii Roślin i Biotechnologii

Toruń 2022

**Z całego serca pragnę podziękować za pomoc w realizacji niniejszej pracy:**

*dr hab. Jackowi Kęsemu, prof. UMK  
za opiekę merytoryczną, motywację, wsparcie, życzliwość, wyrozumiałość i cierpliwość.*

*dr Paulinie Głazińskiej  
za opiekę merytoryczną, ogrom wsparcia i chwile spędzone na odkrywaniu tajemnic łubinu.*

*dr hab. Grażynie Dąbrowskiej, prof. UMK  
za nieocenione wsparcie i wyrozumiałość.*

*prof. dr hab. Stanisławowi Karpińskiemu  
za opiekę podczas zdobywania pierwszych naukowych doświadczeń i pokazanie, jak ważna w nauce jest  
wyobraźnia.*

*dr hab. Katarzynie Niedojadło, prof. UMK  
prof. dr hab. Krzysztofowi Szpili  
dr hab. Michałowi Wojciechowskiemu, prof. UMK  
mgr Michałowi Świdzińskiemu  
Pracownikom Interdyscyplinarnego Centrum Nowoczesnych Technologii UMK  
Za życzliwość i udzielenie dostępu do aparatury naukowej.*

*Mojej rodzinie  
Za wyrozumiałość, troskę i przypominanie o tym, co jest w życiu najważniejsze.*

*Dziękuję pracownikom i doktorantom Wydziału Nauk Biologicznych i Weterynaryjnych, w szczególności  
dr Waldemarowi Wojciechowskiemu, mgr Wojciechowi Glinkowskiemu i mgr Natalii Klajn, którzy swoją  
życzliwością i pomocą przyczynili się do powstania tej pracy*

*Dziękuję również pracownikom administracji Wydziału Nauk Biologicznych i Weterynaryjnych, w szczególności  
mgr Barbarze Banieckiej i mgr Małgorzacie Urban, za nieocenioną życzliwość, wsparcie i wyrozumiałość*

*Nie bywam usatysfakcjonowana rozumieniem czegokolwiek, ponieważ wiem, że moja zdolność pojmowania może być jedynie nieskończenie małym ułamkiem tego, co chciałabym zrozumieć*

- Ada Lovelace

*Nauka jest czymś więcej niż zbiorem wiedzy, jest ona sposobem myślenia.*

- Carl Sagan

# Streszczenie

## Problem badawczy

W czasach intensywnego przyrostu światowej populacji, dążenia do sprostania celom klimatycznym oraz coraz wyraźniejszego trendu odwrócenia od diety mięsnej w kierunku wegetarianizmu i weganizmu, obserwowany jest stały wzrost zapotrzebowania na białko roślinne. Łubin żółty (*Lupinus luteus* L.) jest rośliną użytkową z rodziny bobowatych, a ze względu na dużą zawartość białka w nasionach (ponad 40%) oraz jego europejskie pochodzenie, ma on duży potencjał stać, by się jedną z głównych roślin strączkowych, zapewniających bezpieczeństwo żywieniowe w Europie. Roślina ta została udomowiona dopiero niecałe sto lat temu, co związane było nie tylko z uzyskaniem odmian słodkich, ale również ze spadkiem plonowania spowodowanym nadmiernym odcinaniem kwiatów – w optymalnych warunkach jedynie z około 40% kwiatów rozwija się strąki, co przyczynia się do znacznych strat w plonie tej rośliny.

Auksyna jest wielozadaniowym fitohormonem, biorącym udział w niemalże wszystkich procesach biologicznych zachodzących w roślinach, w tym także w rozwoju kwiatów i ich odcinaniu. Percepcja i transdukcja sygnału auksynowego prowadzące do reprogramowania transkrypcyjnego komórki ma miejsce za pośrednictwem białek z trzech rodzin: TIR1/AFB (TAAR), Aux/IAA i ARF. Wielopoziomowa regulacja elementów tego szlaku oraz istnienie licznych pętli zwrotnych zapewniają niezwykle precyzyjne działanie auksyny w ściśle określonym miejscu i czasie. W przeciągu ostatnich kilkunastu lat nastąpił dynamiczny rozwój wiedzy na temat roli mikro RNA w regulacji tego szlaku. Wyodrębniono cztery główne, silnie konserwowane u roślin lądowych moduły regulacyjne: miR393/TAAR, miR160/ARF10,16,17(18), miR167/ARF6,8 oraz bardziej złożony: miR390/TAS3/tasiARF/ARF2,3,4.

## Cel pracy

U łubinu żółtego prawdopodobieństwo odcięcia kwiatu jest proporcjonalne do jego wertykalnej pozycji na kwiatostanie – na im wyższym okółku kwiat się rozwija, tym wyższe prawdopodobieństwo jego zrzucenia. Celem niniejszej pracy jest weryfikacja hipotezy, że różnice w funkcjonowaniu szlaku transdukcji sygnału auksyn podczas rozwoju kwiatów z górnych i dolnych okółków są częścią mechanizmów molekularnych będących u podstaw decyzji o utrzymaniu lub odcięciu kwiatu. Ze względu na ogromną złożoność badanego szlaku, w pracy skupiono się na regulacyjnej roli mikro RNA.

## Uzyskane wyniki

Na podstawie danych pochodzących z sekwencjonowania bibliotek mRNA, sRNA i degradomowych w kwiatkach łubinu żółtego zidentyfikowano geny kodujące elementy szlaku transdukcji sygnału auksynowego oraz określono, które z nich są celami dla miRNA. Porównano także ekspresję wymienionych cząsteczek w rozwijających się kwiatkach z dolnych i górnych okółków. Następnie, na podstawie wzorca ekspresji w warunkach niestresowych, wytypowano moduły miRNA/mRNA do dalszej analizy ekspresji w kwiatkach podczas stresu suszy. Wyniki wskazują przede wszystkim na rolę AFB3, ARF6, miR160/ARF18 i ARF9

w rozwoju i odcinaniu kwiatów oraz miR393/*AFB3*, miR160/*ARF18* i miR167/*ARF6* w stresie suszy. Uzyskane rezultaty mogą być podstawą do stworzenia nowych linii łubinu żółtego, cechujących się ograniczonym procesem odcinania kwiatów zarówno w warunkach kontrolnych, jak i w stresie suszy.

# Abstract

## Research problem

The intensively growing world population, the pursuit of meeting climate goals, and the transition from an animal-based diet to vegetarianism and veganism create an increasing demand for plant-based protein. Yellow lupine (*Lupinus luteus* L.) is a valuable plant from the legume family. Due to its high protein content (over 40%) and its European origin, it has excellent potential to become one of the main legumes ensuring food safety in Europe. This plant was domesticated only a hundred years ago, which resulted not only in sweet varieties but also incidentally in a yield decrease caused by excessive flower abscission. Under optimal conditions, only about 40% of flowers develop pods, which contributes to significant losses in crop yields in this plant.

Auxin is a multi-purpose phytohormone that takes part in almost all biological processes in plants, including flower development and abscission. The perception and transduction of the auxin signal, leading to the transcriptional reprogramming of the cell, is mediated by proteins belonging to three families: TIR1/AFB (TAAR), Aux/IAA and ARF. The multi-level regulation of the elements of this pathway and the existence of numerous feedback loops ensure extremely precise auxin operation at a specific place and time. Within the last dozen years, there has been a dynamic development of knowledge about the role of micro RNA in regulating this pathway. In terrestrial plants, four main highly conserved regulatory modules were identified: miRNA393/TAAR, miRNA160/ARF10,16,17(18), miRNA167/ARF6/8, and a more complex one: miR390/TAS3/ta-siARF/ARF2,3,4.

## Objectives

In yellow lupine, the probability of the flower abscission is proportional to its vertical position on the inflorescence - the higher the bud position, the higher the likelihood of this phenomenon to occur. The aim of this study is to verify the hypothesis that differences in the functioning of the auxin signal transduction pathway during the development of flowers from the upper and lower whorls are part of the molecular mechanisms underlying the establishment of the flower fate. Due to the enormous complexity of the studied pathway, this thesis focuses on the regulatory role of micro RNA.

## Results

Based on the data obtained from the sequencing of mRNA, sRNA and degradome libraries, genes encoding components of the auxin signal transduction pathway were identified in yellow lupine flowers, and it was determined which of them are miRNA targets. The expression of all of these molecules in buds developing at lower and upper whorls was also compared. Then, based on the expression pattern under non-stress conditions, miRNA/mRNA modules were selected for further expression analysis in flowers during drought stress. The results mainly indicate the role of AFB3, ARF6, miR160/ARF18 and ARF9 in flower development and abscission, and miR393/AFB3, miR160/ARF18 and miR167/ARF6 in drought stress. The obtained results may be the basis for the creation of new yellow lupine lines, characterized with limited flower falling, both under control conditions and drought stress.

## Spis treści

Streszczenie .....	4
Problem badawczy .....	4
Cel pracy .....	4
Uzyskane wyniki .....	4
Abstract .....	6
Research problem .....	6
Objectives .....	6
Results .....	6
Finansowanie .....	11
Wykaz używanych skrótów .....	12
Wstęp .....	13
Charakterystyka i znaczenie łubinów w rolnictwie .....	13
Historia łubinów .....	13
Znaczenie łubinu żółtego w rolnictwie .....	14
Odcinanie kwiatów .....	16
Przyczyny zrzucania kwiatów .....	16
Czynniki regulujące proces odcinania kwiatów .....	18
Rola auksyny w rozwoju i odcinaniu kwiatów .....	18
Dynamika dystrybucji auksyny podczas rozwoju kwiatów <i>Arabidopsis</i> .....	20
Interpretacja i egzekucja sygnału auksyny .....	21
Szlak transdukcji sygnału auksyn .....	21
Auksyna a status odżywczy rośliny .....	33
Cel pracy .....	35
Materiały i metody .....	36
Materiał roślinny .....	36
Przygotowanie nasion .....	36
Warunki upraw .....	37
Etapy rozwoju kwiatów łubinu żółtego poddawane analizie .....	40
Spis odczynników .....	42
Kiełkowanie pyłku <i>in vitro</i> .....	43
Immunolokalizacja IAA .....	43
Immunolokalizacja w całych organach kwiatowych .....	43
Immunolokalizacja na skrawkach parafinowych załączków .....	44

Analiza danych pochodzących z sekwencjonowania RNA-Seq mRNA, sRNA i degradomu .....	45
Wstępne filtrowanie danych .....	45
Alternatywne ramki odczytu .....	45
Analizy msa .....	46
Analizy filogenetyczne .....	46
Analiza strukturalna przewidywanych jądrowych receptorów auksyny TIR1/AFB3 .....	46
Dokowanie molekularne TIR1/AFB-ligand .....	46
Analiza domen białek z rodzin Aux/IAA i ARF .....	47
Ekspresja genów na podstawie danych pochodzących z sekwencjonowania transkryptomów .....	47
Analiza danych dotyczących identyfikacji genów docelowych dla miRNA .....	48
Analiza ekspresji genów metodą real-time qPCR .....	48
Homogenizacja tkanki .....	48
Zestawy użyte do izolacji RNA, odwrotnej transkrypcji i qPCR .....	48
Izolacja całkowitego RNA .....	49
Sprawdzenie jakości i ilości RNA .....	49
Reakcja odwrotnej transkrypcji .....	49
Reakcja <i>real-time</i> qPCR .....	52
Oznaczanie ilości proliny w kwiatach .....	57
Badania termograficzne roślin .....	57
Wyniki .....	59
Cechy morfologiczne kwiatów pochodzących z okółków górnych i dolnych kwiatostanu .....	59
Wielkość załączni łubinu żółtego v. Taper .....	59
Funkcjonalność pyłku łubinu żółtego v. Taper .....	59
Ekspresja genów związanych z homeostazą auksyny w tkankach .....	61
Tkankowa lokalizacja IAA w kwiatach łubinu żółtego .....	62
Identyfikacja elementów szlaku transdukcji sygnału auksyn w kwiatach łubinu żółtego .....	66
Identyfikacja receptorów auksyny z rodziny TAAR ulegających ekspresji w kwiatach łubinu żółtego .....	66
Identyfikacja koreceptorów auksyny z rodziny Aux/IAA ulegających ekspresji w kwiatach łubinu żółtego .....	70
Identyfikacja czynników transkrypcyjnych z rodziny ARF ulegających ekspresji w kwiatach łubinu żółtego .....	77
Identyfikacja transkryptów kodujących białka TOPLESS, ulegającego ekspresji w kwiatach łubinu żółtego .....	86



Identyfikacja mikro RNA regulujących ekspresję genów z rodzin TAAR, AUX/IAA i ARF u łubinu żółtego .....	87
Identyfikacja mikro RNA regulujących ekspresję genów na podstawie sekwencjonowania degradomu .....	87
Identyfikacja mikro RNA regulujących ekspresję genów na podstawie psRNA target ....	88
Ekspresja genów kodujących elementy szlaku transdukcji sygnału auksyn w kwiatach łubinu żółtego .....	89
Wstępna analiza ekspresji genów z rodzin TAAR, AUX/IAA i ARF wykonana przed sekwencjonowaniem transkryptomów, sRNA i degradomu łubinu żółtego.....	89
Analiza ekspresji genów z rodzin TAAR, AUX/IAA i ARF oraz akumulacji regulujących je miRNA wykonana na podstawie wyników sekwencjonowania transkryptomów, sRNA i degradomu .....	90
Ekspresja wybranych modułów miRNA/TAAR i miRNA/ARF w kwiatach łubinu żółtego po usunięciu niższych okółków. ....	94
Wpływ stresu suszy na kwiaty łubinu żółtego .....	97
Potwierdzenie stresu suszy w badanych roślinach .....	97
Ekspresja genów kodujących elementy modułów regulacyjnych miR393/TAAR, miR160/ARF18 i miR167/ARF6 w kwiatach łubinu żółtego podczas stresu suszy .....	99
Kielkowanie pyłku podczas stresu suszy .....	102
Dyskusja.....	103
Morfologia i funkcjonalność kwiatu .....	103
Ekspresja genów regulujących ilość wolnej auksyny .....	103
Lokalizacja auksyny IAA w rozwijających się kwiatach łubinu żółtego .....	104
Identyfikacja funkcjonalnych elementów szlaku transdukcji sygnału auksyn w kwiatach łubinu żółtego.....	105
Receptory auksyny z rodziny TAAR.....	106
Koreceptory auksyny z rodziny Aux/IAA .....	107
Czynniki transkrypcyjne z rodziny ARF .....	109
Identyfikacja białek TOPLESS w kwiatach łubinu żółtego.....	111
Identyfikacja miRNA regulujących elementy szlaku transdukcji sygnału auksyn w kwiatach łubinu żółtego.....	112
Ekspresja elementów szlaku transdukcji sygnału auksyn w warunkach kontrolnych oraz ich regulacja przez miRNA.....	112
Rola modułów regulacyjnych miRNA/TAAR/ARF w determinacji losu kwiatu oraz reakcji na stres suszy .....	117
Rola modułów regulacyjnych miRNA/TAAR/ARF w determinacji losu kwiatu .....	119
Rola modułów regulacyjnych miRNA/TAAR/ARF w odpowiedzi na stres suszy .....	119
Podsumowanie .....	124

Wykaz rycin.....	126
Wykaz tabel .....	130
Literatura.....	131

## Finansowanie

Niniejsza praca powstała przy finansowym udziale:

1. Narodowego Centrum Nauki
  - a. grant Preludium 13 2017/25/N/NZ3/00524, przyznany dla autora rozprawy;
  - b. grant Sonata 10 2015/19/D/NZ9/03601, przyznany promotorowi pomocniczemu dr Paulinie Glazińskiej (współwykonawstwo autora rozprawy).
2. Ministerstwa Rolnictwa i Rozwoju Wsi – wieloletni program MRiRW Nr. 149/2011, na podstawie Uchwały Rady Ministrów (RM-111-222-15) i we współpracy z Instytutem Genetyki Roślin PAN (współwykonawstwo autora rozprawy).
3. Wydziału Nauk Biologicznych i Weterynaryjnych (granty badawcze UMK dla młodych naukowców oraz uczestników studiów doktoranckich, przyznanych dla autora rozprawy w latach 2015 i 2016).

## Wykaz używanych skrótów

ABI4 - ABA-INSENSITIVE 4

AFB – Auxin Signaling F-box

ARF – Auxin Response Factor

Aux/IAA - Auxin/indole-3-acetic acid protein

DBD – DNA binding domain

GH – Gretchen Hagen

IAA – kwas indolo-3-octowy

IAM - amid indolo-3-octowy

IAOx - aldoksym indolo-3-octowy

IPyA - kwas indolo-3-pirogronowy

MD/MR – middle domain/region

miRNA – mikro RNA

msa – Multiple Sequence Alignment

OPCA – motyw OPR/PC/AID

PB1 – domena Phox and Bem1

RISC – RNA-induced silencing complex

RuBisCO - karboksylaza/oksygenaza rybulozo-1,5-bisfosforanu, ang. ribulose-1,5-bisphosphate carboxylse/oxygenase

SCF - SKP-Cullin-F box

SCF<sup>TIR1/AFB</sup> – kompleks SCF związany z receptorem auksyny TIR1/AFB

sRNA – small RNA

siRNA – small interfering RNA

TAAR - TIR1/AFB Auxin Receptor

TIR1 – Transport Inhibitor Resistant 1

## Wstęp

Rosnąca populacja ludzi na świecie, dążenie do sprostania celom klimatycznym i coraz wyraźniejszy trend w kierunku wegetarianizmu i weganizmu powodują stały wzrost zapotrzebowania na białko roślinne. W 2021 roku Unia Europejska importowała 5,8 mln ton soi, z czego większość pochodziła z oceanu (z Brazylii, Stanów Zjednoczonych, Kanady), a tylko niecałe 105 tysięcy ton importowano z Ukrainy. Przedstawiona zależność proteinowa Europy od dostaw soi, a także inne czynniki takie jak: znaczne ryzyko rozwoju alergii i wysoki poziom inhibitora tripsyny obniżającego wartość odżywczą tej rośliny strączkowej są impulsem do poszukiwania nowych europejskich roślin wysokobiałkowych. Nie bez znaczenia jest również nieprzychylność społeczeństwa do tego warzywa, spowodowana nieufnością wobec żywności modyfikowanej genetycznie, z którą bardzo często kojarzona jest soja.

## Charakterystyka i znaczenie łubinów w rolnictwie

Rodzaj *Lupinus* należy do roślin bobowatych i liczy aż 300 gatunków, z których tylko nieliczne są użyteczne rolniczo. Ich liście są 5–12 listkowo dłoniasto złożone, skrętoległe. Kwiaty są pachnące, ale nie miododajne, i są zebrane w długie grona złożone z piętrowo ułożonych pięciokwiatowych okółków. Kwiaty mają charakterystyczną budowę motylkową: kielich jest dwuwargowy, złożony z pięciu zrosniętych działek. Płatki mogą być barwy białej, żółtej, niebieskiej lub czerwonej, w zależności od gatunku. Górny płatek ma postać żagielka, dwa boczne skrzydełka okrywają łódeczkę zawierającą pojedynczy słupek i dwa okółki po pięć pręcików i słupek. Wytwarzane po zapłodnieniu strąki są zwykle zdrewniałe i zawierają liczne nasiona. Cechą szczególnie ważną dla rolnictwa jest symbioza łubinów z bakteriami brodawkowymi *Rhizobium lupini*, które wiążą azot atmosferyczny i w formie przyswajalnej dostarczają go roślinom, otrzymując w zamian związki węgla.

## Historia łubinów

Przeważająca większość łubinów pochodzi z obszarów Basenu Morza Śródziemnego i Półwyspu Iberyjskiego, wyjątkiem jest *Lupinus mutabilis*, rosnący w Andach nawet na wysokości 3000 m n.p.m [1]. Najwcześniej udomowionymi gatunkami łubinu były łubin biały (*L. albus*) uprawiany już w starożytności w Grecji i Dolinie Nilu, oraz *L. mutabilis* uprawiany w czasach prekolumbijskich na terenie Ameryki Środkowej. W XVIII wieku za sprawą Fryderyka Wielkiego zainteresowanie uprawą łubinu w Europie wzrosło, a łubin biały był wówczas uprawiany głównie jako zielony nawóz. Kilka dekad później na Starym Kontynencie nastąpiła wielka ekspansja upraw łubinu żółtego, jako lepszego materiału do zielonego nawozu oraz pokarmu dla owiec. W XX wieku, wraz z redukcją uprawy owiec i pojawieniem się nawozów mineralnych, nastąpiła znaczna regresja upraw łubinów w Europie. Ponieważ wciąż jeszcze obserwowano znaczne zapotrzebowanie na ziarna tej rośliny, zaczęto pracować nad selekcją odmian słodkich, pozbawionych alkaloidów. Zimą 1927/28 udało się wytworzyć pierwszą odmianę słodką łubinu i był to łubin żółty. Kilka lat później, w 1935 roku, uzyskano nową odmianę tej rośliny, w której nie następowało samoistne wyrzucanie nasion ze strąków (ang. pod shattering) i ten rok można uznać za moment, w którym łubin żółty uzyskał status rośliny żywieniowej. Dalszy proces udomawiania łubinu wiązał się również z jego przyspieszonym cyklem fenologicznym, gwarantującym ukończenie całego cyklu rozwojowego przed jesiennymi chłodami i przez to umożliwiającym uprawę tej rośliny na innych szerokościach geograficznych. W tym czasie Polska stała się największym hodowcą

i producentem łubinu żółtego i wąskolistnego, podczas gdy w Europie Południowej dominowały uprawy łubinu białego. Po drugiej wojnie światowej nastąpiła duża ekspansja obszarów upraw łubinów w celu produkcji żywności na terenach Nowej Zelandii, Australii Zachodniej i w Afryce Południowej. Niestety, odmiany słodkie łubinów jednocześnie dawały mniejszy plon i problem ten pozostał mimo licznych prób stworzenia mutantów, które byłyby jednocześnie pozbawione alkaloidów i wysokopienne [1].

#### Znaczenie łubinu żółtego w rolnictwie

Ojczyzną łubinu żółtego (*Lupinus luteus* L.) jest Półwysep Pirenejski [2]. Udomowienie tego gatunku ma stosunkowo krótką, nieco ponad stuletnią historię, i wiązało się ze zmianami w kontrolowanych jednogenowo: indukcji kwitnienia przez wernalizację, kolorze kwiatów i nasion, a także zawartości alkaloidów oraz regulowanych dwugenowo procesów związanych z otwieraniem strąków, przepuszczalnością łupiny nasiennej dla wody (tzw. „twardością” nasion) i pokrojem rośliny [3].

Polska ma długą tradycję upraw roślin strączkowych. Dziś na karmę dla zwierząt uprawia się głównie łubiny, groch, fasolę, wykę pospolitą oraz soję, a z przeznaczeniem na pożywienie dla człowieka głównie groszek, fasolę i bób. W 2019 roku areal upraw łubinów na terenie naszego kraju wyniósł 117 426 ha, z czego największy areal przypadł na województwa mazowieckie i zachodniopomorskie. W omawianym roku zebrano 148,5 tysięcy ton biomasy, z czego eksportowano 26 902 ton (głównie do Holandii i Niemiec), a importowano 8 029 ton (głównie z Niemiec) [4].

Ze względu na wysoką zawartość białka i istnienie odmian słodkich, cechujących się niską zawartością alkaloidów, łubin żółty może być doskonałą alternatywą dla soi, nie tylko jako pasza i zielony nawóz, ale także jako pożywienie dla człowieka. Według Centralnego Ośrodka Badania Odmian Roślin Uprawnych (COBORU), w Polsce zarejestrowanych jest 11 odmian łubinu żółtego (stan na kwiecień 2022), w tym 2 odmiany samokończące (Taper i Perkoz) oraz 9 niesamokończących [5]. Wciąż trwają prace nad wyprowadzaniem nowych odmian tej rośliny, trzy kolejne odmiany: WTD 3518 (Jantar), WTD 3920 (samokończąca) i WTD 4221 (niesamokończąca) są w trakcie procedury zgłaszania do Krajowego Rejestru przez Poznańską Hodowlę Roślin sp. z o.o. (Tulice) [6]. Odmiany samokończące wytwarzają tylko jeden kwiatostan, przez co dojrzewają bardziej równomiernie i o kilka dni wcześniej, a także wykazują nieco wyższą odporność na antrakozę łubinu. Z drugiej strony jednak cechują się niższym plonowaniem (Tabela 1).

Tabela 1. Porównanie uprawianych w Polsce odmian łubinu żółtego pod względem wybranych cech wg. COBORU [5]. Szarym kolorem oznaczono zacieniowano dane dotyczące odmian samokończących. \* Odmiana Dukat nie była badana w latach 2017-2021.

Odmiana	Plon nasion 2021 (wz.=15,3 dt z ha) (% wzorca)	Plon nasion 2017 (wz.=18,3 dt z ha) (% wzorca)	Plon białka 2017 (wz.=666 kg z ha) (% wzorca)	Zawartość białka ogólnego (% s.m.)	Zawartość tłuszczu surowego (% s.m.)	Zawartość włókna surowego (% s.m.)	Sumaryczna zawartość alkaloidów (% s.m.)	Liczba dni od siewu do początku kwitnienia	Liczba dni od siewu do dojrzałości technicznej	Długość fazy kwitnienia (liczba dni)	Równomierność dojrzewania (skala 9 st.)	Fuzaryjne władnięcie łubinu (skala 9 st.)	Antraknoza (skala 9 st.)	Masa 1000 nasion (g)	Udział w nasiennictwie 2020 (ha)	Udział w nasiennictwie 2017 (ha)
Puma	111	109	108	43,1	6,5	15	0,011	67	109	14	7,7	5,7	7	142	61	8
Mister	108	104	105	43,3				65	108	14	8,1	5,6	7,3	134	273	523
Diament	106	114	115	44,1	6,2	14,7	0,011	64	108	14	8,1		7,4	137	1	
Goldeneye	102	112	114	43,1	6,1	15,5	0,009	65	108	14	8		7,3	135	3	
Salut	102			43,9	6	15,1	0,009	66	108	14	7,8		7,3	136	3	
Lord	100	101	102	43,3	6	14,7	0,011	66	108	14	7,8	4,7	7,2	129	41	47
Baryt	93	105	106	44,1	6	14,7	0,01	66	108	14	7,9	5,1	7,5	127	218	782
Perkoz	90	95	88	40,3	7,2	15,2	0,012	64	106	11	8,3	6	6,5	137	8	92
Bursztyn		105	110	45				66	108	14	8	5,4	7,4	134	4	281
Taper		83	82	42,6				63	105	12	8,5	5,8	7,3	133	20	5
Dukat *																

## Odcinanie kwiatów

Odmiany słodkie łubinu żółtego ze względu na wysoką zawartość dobrej jakości białka (od 40-45%) i niską zawartość alkaloidów (Tabela 1), mogłyby być przełomowym elementem na rynku białka roślinnego. Niestety, nadmierne zrzucanie tych organów prowadzi do redukcji otrzymywanego plonu, a zbyt szybkie odcinanie dojrzałych owoców znacznie utrudnia ich zbiór. Zatem ograniczenie procesu odcinania organów generatywnych u roślin jest jednym z centralnych zadań hodowców roślin.

Odcinanie organów (abscyzja) jest definiowane jako regulowany proces zrzucania organów u roślin w odpowiedzi na bodźce rozwojowe i stresowe [7,8]. Zjawisko to może dotyczyć liści, pąków, łodygi, kwiatów, okwiatu, owoców i dojrzałych nasion. Miejsce, w którym ma nastąpić separacja, jest zdeterminowane przez strefę odcinania (AZ, ang. abscission zone), powstającą już we wczesnych etapach morfogenezy organów [8]. Ilość oraz rozmieszczenie stref odcinania poszczególnych organów jest cechą specyficzną gatunkowo. Dla przykładu, u *Arabidopsis* AZ wytwarzana w celu odcinania całych kwiatów, owoców i liści jest zlokalizowana w obrębie szypułki, a AZ w obrębie okwiatu znajduje się na styku dna kwiatowego i płatków, działek kielicha oraz pylników [9]. Odcięcie owocu brzoskwini jest związane z aktywacją trzech stref odcinania znajdujących się między gałęzią a szypułką, na granicy szypułki i dna kwiatowego oraz u podstawy owocu tuż przed dnem kwiatowym [10]. Natomiast aborcja całych kwiatów łubinu żółtego wymaga aktywacji pojedynczej AZ znajdującej się w części dystalnej szypułki [7,11]. W obrębie AZ zachodzą zmiany obejmujące między innymi dystrybucję przestrzenną hormonów, głównie etylenu, auksyny i kwasu abscysynowego oraz przeprogramowania transkrypcyjnego, w wyniku których dochodzi do rozluźnienia ściany komórkowej i fizycznej separacji dwóch części szypułki. Tak jak rozwój kwiatów, zrzucanie tych organów jest częścią realizacji genetycznego planu rozwoju roślin, choć skala tego zjawiska może być modyfikowana przez bodźce stresowe.

### Przyczyny zrzucania kwiatów

Przyczyny odcinania kwiatów męskich po wypyleniu u roślin o kwiatach jednopłciowych, na przykład gruszy, są raczej oczywiste – organ spełnił już swoją funkcję, w związku z czym roślina nie angażuje dalej swoich zasobów w jego utrzymanie. Bardzo często zrzucane są również kwiaty obupłciowe lub żeńskie niezapylone [12]. Według wnikliwej analizy Stephensona [13], wytwarzanie „nadwyżkowych” kwiatów jest częścią procesów adaptacyjnych polegających na: (i) zwiększeniu prawdopodobieństwa zapylenia przez powiększenie całego kwiatostanu, a tym samym lepszą widoczność i atrakcyjność dla owadów zapyłających, (ii) roli dodatkowych kwiatów jako producentów pyłku przeznaczonego do zapłodnienia newsobnego, (iii) jeśli zwierzę żerujące na danej roślinie zje wszystkie zawiązane owoce, to „nadwyżkowe” kwiaty dają możliwość wytworzenia nowych owoców, (iv) w przypadku wyjątkowo dobrych warunków do rozwoju w danym sezonie wegetacyjnym, roślina ma możliwość wytworzenia większej ilości owoców.

Obok braku zapylenia i zapłodnienia kwiatu, najczęściej przytaczaną przyczyną zrzucania tego organu jest konkurencja o zasoby energetyczne w obrębie rośliny. Już ponad sto lat temu John Kendall wykazał, że u *Solanaceae* podczas odcinania kwiatów w obrębie szypułki zmniejsza się zawartość cukrów [14]. Substancje odżywcze są w roślinie preferencyjnie translokowane do rozwijających się owoców, w związku z czym młodsze kwiaty są odżywiane tylko w sytuacji energetycznych nadwyżek. Jest to szczególnie dobrze widoczne u roślin strączkowych



wytwarzających kwiatostany z kwiatami zebranymi w piętra, takich jak łubin żółty, u których najczęściej odcinane są kwiaty z najwyższych okółków [7] (Rycina 1). Wiele gatunków roślin (w tym łubiny) z tym wzorem aborcji kwiatów i owoców mają kwiatostany, które rozwijają się akropetalnie (od podstawy do szczytu). Owoce wytwarzane z kwiatów z dolnych okółków mają czasowo-przestrzenną przewagę, polegającą na tym, że asymilaty z liści i korzenia mogą być przekazane do młodszych (wyższych) części kwiatostanu tylko po ich ominięciu [13].



Rycina 1. Obserwacje rozwoju części generatywnej łubinu żółtego rosnącego na polu w Piwnicach koło Torunia. Zdjęcia: Milena Kulasek.

Należy nadmienić, że zrzucane mogą być również kwiaty zapłodnione, tak jak na przykład u *Glycine max* (gdzie zapłodnione kwiaty stanowią większość wśród zrzucanych kwiatów) [15], czy *Vicia faba* [16]. Jest to mechanizm dostosowania plonu do możliwości odżywczych rośliny. U wielu roślin, takich jak na przykład *Gossypium* spp., *Solanum esculentum*, *Glycine max*, *Phaseolus vulgaris*, *Lupinus luteus*, *Asclepias tuberosa*, pierwszy otwarty kwiat ma największe szanse na zawiązanie owocu, a prawdopodobieństwo tego zdarzenia zmniejsza się z czasem otwarcia kolejnych kwiatów [13].

### Czynniki regulujące proces odcinania kwiatów

Abscyzja kwiatów jest procesem złożonym, angażującym wiele szlaków molekularnych w różnym czasie i miejscu, który ma swój finał w strefie odcinania. Ważna część badań nad zjawiskiem aborcji kwiatów skupiona jest na inicjacji i rozwoju AZ (np. [17,18]), w czym duży udział mają zajmujący się łubinem żółtym pracownicy Wydziału Nauk Biologicznych i Weterynaryjnych UMK w Toruniu, gdzie realizowana była niniejsza praca (np. [19–24]). Jednak szerzej zakrojone badania obejmujące nie tylko samą strefę odcinania, ale także sam kwiat łubinu wykazały, że zdarzenia molekularne, prowadzące do odcięcia tego organu, mają miejsce wcześniej w kwiecie, a nie samej szypułce [11].

Dla wielu roślin wykazano, że tuż przez odcięciem kwiatu, w obrębie tego organu następował przejściowy wzrost zawartości etylenu oraz wrażliwości na ten hormon [25]. Fakt zaangażowania tego hormonu potwierdzają nie tylko badania immunocytochemiczne i genetyczne, ale także obserwacje, w świetle których odcinanie większości organów można sztucznie zaindukować przez egzogenne podanie etylenu (np. [26–28]). Co ciekawe, zjawisko zrzucania kwiatów żeńskich przez orzech włoski może być spowodowane zbyt dużą ilością pyłku na znamieniu, co skutkuje wysoką produkcją etylenu [29].

Najczęściej opisywany ciąg zdarzeń, prowadzący do odcięcia kwiatu, obejmuje relację między auksyną i etylenem, których zmianom dystrybucji towarzyszy reprogramowanie transkrypcyjne w określonych tkankach. W zapłodnionych załączniach generowana jest fala auksynowa, która sięga aż szypułki i strefy odcinania. Obecność auksyny powoduje obniżenie wrażliwości tkanki na etylen, co w konsekwencji zapobiega aktywacji AZ. Jeśli fala auksynowa nie jest w krytycznym momencie wytwarzana, tkanka utrzymuje wrażliwość na etylen na niezmiennym poziomie, strefa odcinania zostaje aktywowana przez etylen i organ zostaje zrzucony.

Niniejsza praca obejmuje tylko część tych niezwykle złożonych zjawisk, jakimi są rozwój i odcinanie kwiatu. Skupiono się w niej na roli auksyny w wymienionych procesach, opisując rolę elementów transdukcji sygnału auksyn i ich potranskrypcyjnej regulacji przez miRNA, jednocześnie mając na uwadze cały kontekst molekularny, tworzący skomplikowaną, wieloelementową i wielopoziomową sieć interakcji z innymi cząsteczkami regulatorowymi.

### Rola auksyny w rozwoju i odcinaniu kwiatów

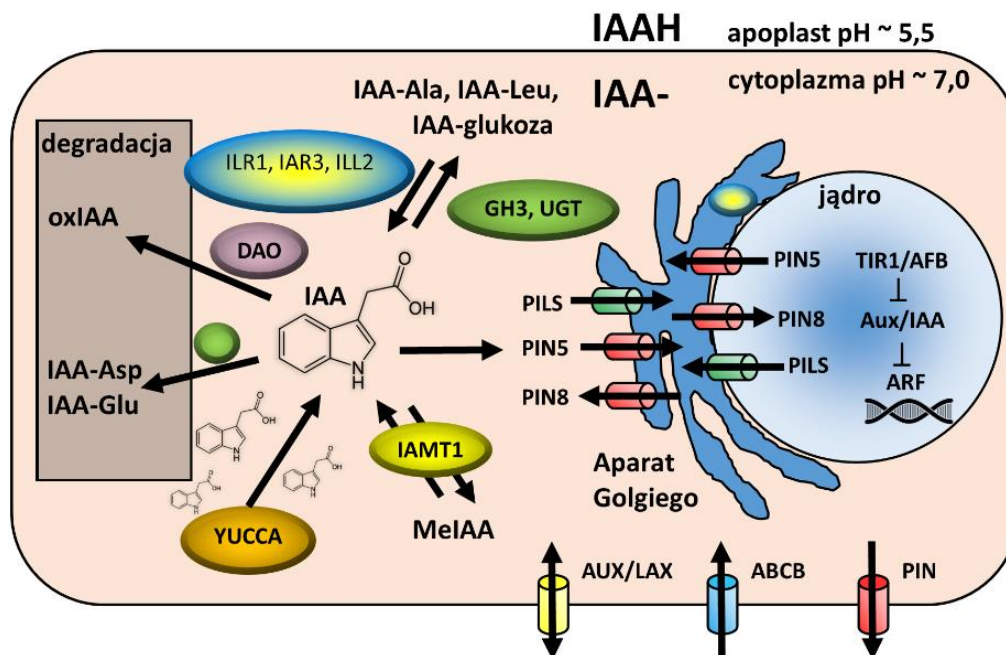
Auksyny to grupa związków posiadających aromatyczny pierścień i resztę kwasu karboksylowego. Najczęściej występującą w naturze auksyną jest kwas indolilo-3-octowy (IAA), który bierze udział w niemalże wszystkich procesach rozwojowych u roślin na każdym etapie ontogenezy [30]. IAA uczestniczy również w licznych procesach adaptacji zarówno do czynników abiotycznych, w tym do suszy (np. [23,31,32]), jak i biotycznych (np. [33]).

Lokalne stężenie auksyny jest połączonym wynikiem biosyntezy i transportu tego fitohormonu, a dostępność aktywnej formy jest regulowana przez dodatkowe czynniki (ogólny schemat homeostazy auksyny w komórce przedstawia Rycina 2). Tworzenie oraz modulacja maksimów i gradientów stężenia auksyny w organach, jej degradacja, koniugacja i transport stanowią podstawowy poziom regulacji rozwoju, a różne czynniki środowiskowe mogą wpływać na rozwój poprzez redystrybucję tego fitohormonu (temat szerzej opracowany w [34]). Dla przykładu, zjawisku halotropizmu towarzyszy zmiana dystrybucji auksyny, spowodowana internalizacją transportera auksyny PIN-formed 2 (PIN2) po stronie kontaktu korzenia

z wyższym stężeniem soli. Dotychczas tworząca maksimum w obrębie wierzchołka tego organu auksyna kumuluje się po stronie korzenia przeciwnej do działania stresu, co powoduje „unikające” zgięcie korzenia [35].

IAA syntetyzowany jest za pomocą czterech alternatywnych szlaków, trzech zależnych od tryptofanu i jednego niezależnego od tryptofanu (temat omówiony w [36]). L-tryptofan jest syntetyzowany w chloroplastach i po transporcie do cytoplazmy może zostać przekształcony do IAA za pośrednictwem aldoksymu indolo-3-octowego (IAOx), amidu indolo-3-octowego (IAM), lub kwasu indolo-3-pirogronowego (IPyA). Mimo istnienia alternatywnych ścieżek biosyntezy IAA, mutanty rzodkiewnika pospolitego, kukurydzy zwyczajnej i porostnicy wielokształtnej, pozbawione TAA (TRYPTOPHAN AMINOTRANSFERASE OF ARABIDOPSIS) i YUCCA, biorących udział w ostatnim wymienionym szlaku, wykazują znacznie obniżony poziom IAA oraz silne defekty rozwojowe, co sugeruje, że ścieżka IPyA ma kluczowe znaczenie w biosyntezie omawianego fitohormonu (opracowane w [36]).

Różnicową dystrybucję auksyny uzyskuje się głównie dzięki polarnemu systemowi transportu między komórkami (PAT, ang. polar auxin transport). W warunkach niskiego pH, np. w ścianach komórkowych, auksyna jest w formie protonowanej (IAAH), dzięki czemu może albo biernie wchodzić do komórek, albo może być do nich wpompowywana przez transporter z rodziny AUX/LAX [37]. Ponieważ cytozol wykazuje wyższe pH, znajdująca się w nim auksyna jest w formie anionu IAA<sup>-</sup> i nie może swobodnie dyfundować przez błonę. Wyprowadzenie IAA z komórek odbywa się zatem wyłącznie za pomocą aktywnego transportu, w który zaangażowane są białka z rodzin: PIN-FORMED (PIN) (opracowane w: [38]) i ATP BINDING CASSETTE SUBFAMILY B/MULTIDRUG RESISTANCE/P-GLYCOPROTEINS (ABCB/MDR/PGP) (opracowane w: [39]).



Rycina 2. Uproszczony schemat przedstawiający mechanizmy biorące udział w regulacji stężenia aktywnej formy IAA w komórce. Opracowane na podstawie [40,41].

Ostatnim ważnym elementem regulacji stężenia wolnej auksyny w tkankach jest inaktywacja auksyny osiągnięta na dwa sposoby: nieodwracalnej degradacji i odwracalnej koniugacji. Częsteczką IAA może zostać nieodwracalnie usunięta z puli aktywnych hormonów poprzez utlenienie do kwasu 2-oksindolo-3-oxoowego (oxIAA) z udziałem enzymu DIOXYGENASE FOR AUXIN OXIDATION (DAO). Auksyna może być również magazynowana w komórce w formach nieaktywnych, jako koniugaty estrowe, amidowe i metylowe. Najlepiej poznany jest proces koniugacji IAA do aminokwasów i wytwarzanie IAA-Asp i IAA-Glu, za który odpowiadają konserwowane ewolucyjnie syntetazy amidowe Gretchen Hagen 3 (GH3), katalizujące tworzenie wiązania amidowego pomiędzy grupą karboksylową hormonów a grupą aminową aminokwasu. Tu należy nadmienić, że u *Arabidopsis thaliana* niektóre ich izoformy (GH3.3, 3.5 i 3.6) wykazują aktywność wobec innych fitohormonów, takich jak kwasy salicylowy i jasmonowy (opracowane w [36]).

#### Dynamika dystrybucji auksyny podczas rozwoju kwiatów *Arabidopsis*

Johann Wolfgang von Goethe w swoim traktacie „Metamorfoza roślin” [42] wysunął hipotezę, że części kwiatów są zmodyfikowanymi liśćmi. Wypracowany na podstawie współczesnych badań genetycznych model ABC rozwoju kwiatów, opisujący następujące po sobie działanie produktów homeotycznych genów klasyfikowanych do grup A, B i C, potwierdza tę hipotezę. W modelu ABC geny A ulegają wysokiej ekspresji w tkankach rozwijających się w działki kielicha, koekspresja genów A i B determinuje powstanie płatków, geny B i C ustalają tożsamość pylników, a rozwój słupka jest związany wyłącznie z aktywnością genów z grupy C [43]. U mutantów *A. thaliana* pozbawionych funkcjonalnych genów ABC (potrójnego *ap2 ap3/pi ag* pozbawionego *APETALA2*, *PISTILLATA* i *AGAMOUS1* [44] oraz poczwórnego *ap1 ap2 ap3/pi ag*) wszystkie organy kwiatowe rozwijają się w liście [45].

Zakładając, że podobnie jak w liściach [46] również w każdym organie kwiatowym produkcja wolnej auksyny zaczyna się na jego szczycie, części kwiatu rozwijają się bazypetalnie, zwłaszcza najbardziej podobne do liści działki kielicha. Zlokalizowane w drugim okółku płatki charakteryzują się szybkim wzrostem dopiero na późniejszych etapach rozwoju [47]. Dwa najbardziej wewnętrzne okółki, pręcików i słupków, tworzą najsilniej zmodyfikowane organy kwiatowe, a ich rozwój wymaga bardziej złożonych procesów regulacji. Trzeci okółek stanowią pręciki, w obrębie których pylniki są producentami wolnego IAA. Czwartym okółkiem jest zalążnia, która produkuje niezwiązaną, aktywną auksynę w znamieniu. Niezapłodnione zalążki produkują IAA na bardzo niskim poziomie, a po zapłodnieniu biosynteza wolnej auksyny ulega stopniowej intensyfikacji wraz z rozwojem zarodka [48].

Rozwój poszczególnych okółków kwiatu musi być zsynchronizowany, co zapewnia syntetyzowana i transportowana auksyna, która ma dwojakie działanie: powoduje wzrost i rozwój organu kwiatowego, w którym jest produkowana, oraz zahamowanie rozwoju w miejscach, do których jest bazypetalnie transportowana. We wczesnym etapie rozwoju kwiatu *Arabidopsis thaliana* IAA jest obecny w formie skoniugowanej (nieaktywnej) na szczycie działek kielicha. Następnie końce działek kielicha oraz pylniki zaczynają produkować wolną formę IAA. Na tym etapie pylniki są głównym miejscem akumulacji dużych ilości wolnej auksyny, przez co synchronizują rozwój innych części kwiatu, opóźniając rozwój płatków i aktywność gruczołów nektarnikowych. Komórki tapetum młodych pylników zawierają wolny IAA, który gromadzi się w ziarnach pyłku, co sugeruje, że auksyna może brać

udział we wzroście łagiewki pyłkowej w kierunku załączków. Gdy po osiągnięciu etapu 9 produkcja auksyny w pylnikach spada, na końcach działek okwiatu oraz w narządach nektarowych proces ten ulega nagłej intensyfikacji, dzięki czemu płatki zaczynają szybko się wydłużać. Równocześnie wolny IAA zaczyna być produkowany w górnej części nitki pylnika, co zapewnia elongację tego elementu dopiero po osiągnięciu przez pylnik dojrzałości. Dzięki temu w momencie pełnego otwarcia kwiatu płatki mają najwyższą długość, produkowany jest nektar, a pylniki są otwarte. Synchronizacja tych procesów ma kluczowe znaczenie dla roślin zapylanych przez owady. W kolejnym etapie rozwojowym załączki i znamię słupka zaczynają syntetyzować auksynę, która prawdopodobnie jest transportowana ze znamienia do sznureczka (*funiculus*), blokując połączenie wiązki naczyń do łożyska. Następnie synteza IAA przenosi się na obszar tuż pod znamieniem, indukując rozwój ksylemu bezpośrednio pod nim [48]. Podczas kiełkowania pyłku na znamieniu zawarte w ziarnach koniugaty auksynowe ulegają enzymatycznej hydrolizie do wolnego IAA, gdzie stymuluje wzrost łagiewki pyłkowej (np. [49,50]). Po zapłodnieniu komórki centralnej, osłonki załączka zaczynają produkować auksynę, co jest niezbędne w rozwoju embrionu. Również rozwijające się zarodki i nasiona wykazują podwyższone stężenie auksyny, odpowiadającej za ich osiową polarność [48,51].

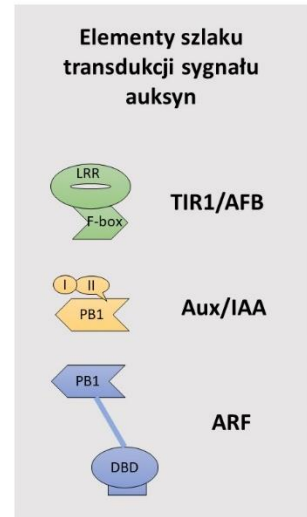
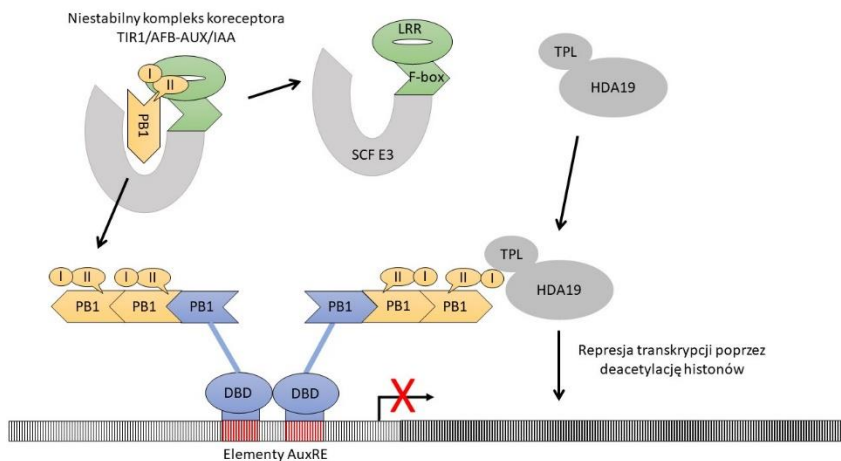
#### Interpretacja i egzekucja sygnału auksyny

Skuteczna koordynacja tak wielu procesów w różnym czasie oraz miejscu wymaga wysokiej specyficzności odpowiedzi, które zapewniają dwie ścieżki sygnałowe: pozajądrowa i jądrowa. W pierwszej ścieżce receptor ABP1 (ang. Auxin Binding Protein 1) po związaniu auksyny ulega bezpośredniej lub pośredniej interakcji z białkami błonowymi, np. transmembrane kinase (TMK), lub SPIKE1 (SPK1), co prowadzi do transdukcji sygnału na białko ROP (ang. Rho of plants), które z kolei oddziałuje z efektorami, takimi jak np. RIC (ang. ROP interactive CRIB motif-containing protein), regulującym proces endo- i egzocytozy transporterów auksyny z rodziny PIN-FORMED (PIN). Co ciekawe, receptor ABP1 jest głównie zlokalizowany w błonie retikulum endoplazmatycznego [52], natomiast w apoplacie występuje w mniejszych ilościach, co sugeruje, że jego podstawową funkcją jest regulacja transportu auksyny do tego organelum poprzez regulację endo- i egzocytozy białka PIN5 [53]. Apoplastycznie zlokalizowany ABP1 reguluje wzrost elongacyjny komórki. Po transferze auksyny do jądra uruchamiana jest druga ścieżka, angażująca kompleks receptorowy SCF<sup>TIR1/AFB</sup>, koreceptory/represory z rodziny Aux/IAA oraz czynniki transkrypcyjne ARF (ang. Auxin Response Factor). W efekcie transdukcji sygnału auksyny szlakiem jądrowym dochodzi do przeprogramowania transkrypcyjnego komórki. Niniejsza praca dotyczy drugiego z wymienionych szlaków, dlatego zostanie on opisany bardziej szczegółowo.

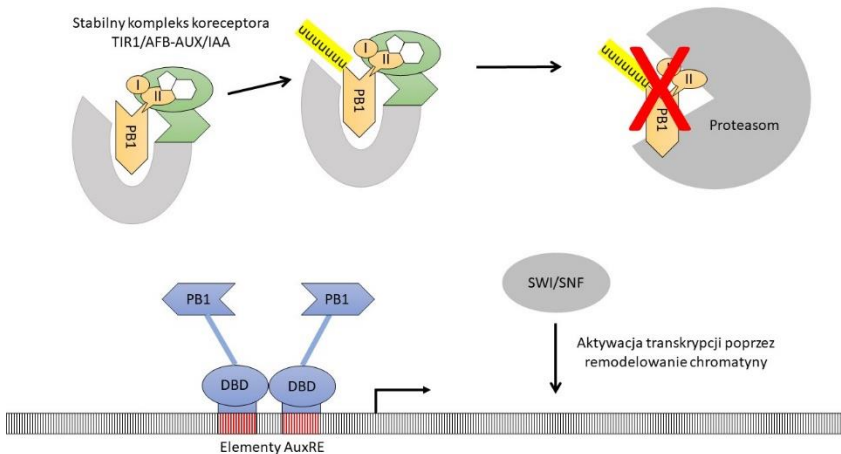
#### Szlak transdukcji sygnału auksyn

Uznaje się, że uzyskanie zdolności do modyfikacji ekspresji genów w odpowiedzi na auksynę było jednym z kamieni milowych prowadzących do wykształcenia roślin lądowych około 450 milionów lat temu [54]. Możliwość przeprogramowania transkrypcyjnego komórki w obecności auksyny umożliwiło zachodzenie procesów kluczowych dla osiągnięcia sukcesu na lądzie, między innymi trójwymiarowego wzrostu tkanek, modulacji morfogenezy i regulacji ontogenezy przez czynniki zewnętrzne, oraz uściślenie relacji z bakteriami glebowymi.

### Niski poziom auksyny



### Wysoki poziom auksyny



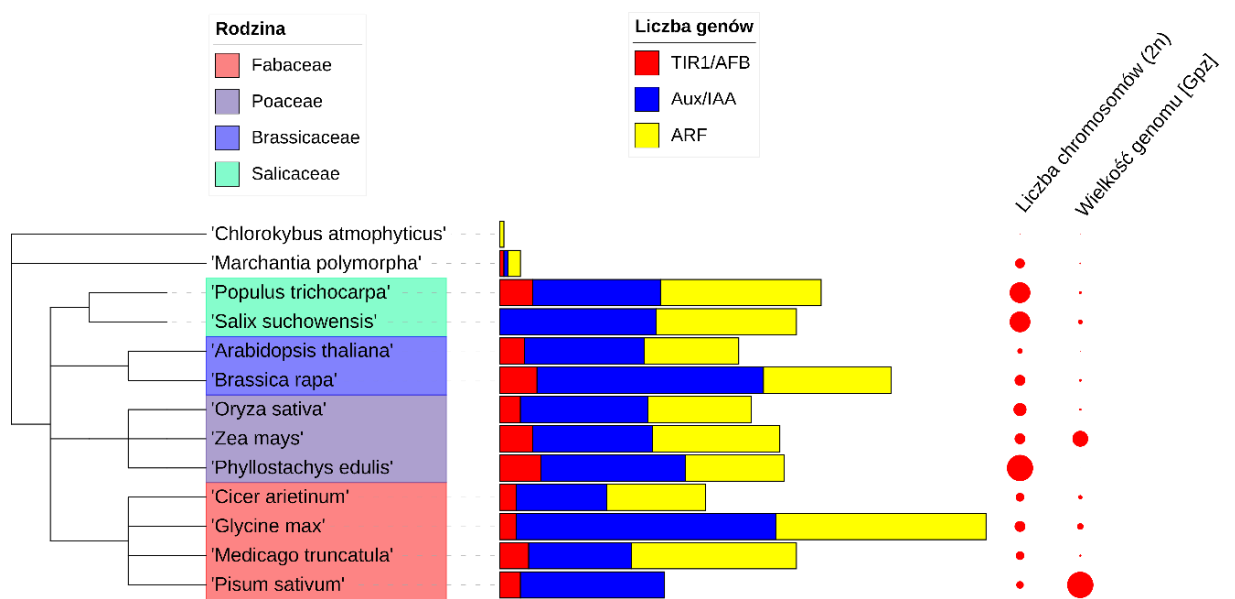
Rycina 3. Elementy szlaku transdukcji sygnału auksyny. Białka represorowe odpowiedzi na auksynę (Aux/IAA) wiążą się przez domeny PB1 do czynników transkrypcyjnych ARF i hamują ich działanie. Przy wyższym stężeniu auksyny w jądrze receptor auksyny TIR1/AFB tworzy stabilny kompleks koreceptorowy z Aux/IAA, co powoduje jego ubikwitynację, kierując go do degradacji proteasomalnej. W rezultacie czynniki ARF są uwolnione z represji i mogą pełnić rolę regulatorów transkrypcji w genach docelowych. Schemat opracowany na podstawie [55–59].

Czynniki transkrypcyjne ARF w formie dimerów wiążą się do elementów odpowiedzi na auksynę (AuxRE, Auxin Response Elements) w obrębie promotora, 5'UTR i/lub intronów. Gdy w jądrze komórkowym poziom auksyny jest podprogowy, do tych dimerów za pośrednictwem C-terminalnej domeny PB1 (ang. Phox and Bem1) wiążą się spolimeryzowane białka Aux/IAA [59], które przez aktywację szlaku zależnego od białka TOPLESS (TPL) hamują transkrypcję genów docelowych ARF [55]. W sytuacji, gdy poziom omawianego fitohormonu ulega podwyższaniu, jądrowe receptory auksyny należące do rodziny TIR1/AFB wiążą go do kieszeni zlokalizowanej w obrębie pierścienia zbudowanego z powtarzających się motywów bogatych w leucynę (LRR, ang. Leucin Rich Repeats). Związana auksyna działa jak „molekularny klej” umożliwiający stabilne wiązanie białka Aux/IAA, a następnie jego ubikwitynację i skierowanie do proteomicznej degradacji. Uwolnione

z represji białka ARF mogą spełniać swoje funkcje i regulować aktywność genów docelowych [56] poprzez rekrutację czynników remodelujących chromatynę SWI/SNF [57,58] (Rycina 3).

Na podstawie wnikliwych badań filogenetycznych, obejmujących 224 białka ARF, zidentyfikowanych u wielu gatunków roślin lądowych, podzielono białka ARF na trzy klasy: klasę A aktywatorów transkrypcji oraz klasy B i C represorów transkrypcji, z których klasa C jest uważana za najstarszą [60]. Za najwcześniejszą formę ARF uważa się proto-C-ARF u charofita z gatunku *Chlorokybus atmophyticus* (CaARF), który, tak jak współczesne formy ARF, w formie dimerów są zdolne do wiązania elementów AuxRE, oligomeryzacji oraz prawdopodobnie również bezpośredniej interakcji z korepresorem TOPLESS [61], co wykazują również niektóre ARF zidentyfikowane u roślin wyższych [62]. Jednakże ze względu na brak białek z rodzin TAAR oraz Aux/IAA sugeruje się, że mimo obecności domeny PB1, białko to jest niezależne od auksyny. Najstarsze funkcjonalne białka ARF zidentyfikowano u mszaka z gatunku *Marchantia polymorpha*, a dwa z trzech tych białek zawierają zarówno domenę wiążącą DNA (DBD), jak i C-terminalną domenę oligomeryzacji PB1. Nie ma zgodności co do tego, kiedy nastąpiło wyodrębnienie klas C i A/B ARF. W świetle ostatnich badań sugeruje się, że ARF A/B wyodrębnił się z proto-ARF C u przodka charofitów, prawdopodobnie przez duplikację i utratę domeny nieuporządkowanej (ang. disordered region) w obrębie DBD, co w konsekwencji doprowadziło do bardziej restrykcyjnej selekcji wiązanych elementów AuxRE. Warto nadmienić, że wyodrębnienie klas ARF A i B zbiegło się w czasie z pojawieniem się pozostałych elementów szlaku transdukcji sygnału auksyn, receptora auksyny z rodziny TAAR, oraz koreceptorów/represorów Aux/IAA i miało miejsce u pierwszych roślin lądowych. Wraz z tym wydarzeniem auksyna zyskała możliwość reprogramowania transkrypcyjnego komórek, co stanowi jedno z donioślejszych wydarzeń przyczyniających się do sukcesu roślin na lądzie [61].

Podczas 450 milionów lat ewolucji roślin lądowych miały miejsce procesy rearanżacji genomów obejmujące nie tylko duplikacje, delecje, skracanie i pseudogenizacje genów, ale także wielokrotne zdarzenia duplikacji i triplikacji całych genomów. Na podstawie analiz porównawczych 40 genomów roślinnych dowiedziono, że w omawianym okresie miało miejsce co najmniej 21 procesów paleopoliploidyzacji całych genomów, w tym trzy triplikacje i 18 duplikacji [63]. Te wydarzenia skutkowały obserwowaną dziś ogromną różnorodnością rodzin genowych w liczebności i składzie, w tym również rodzin genów kodujących elementy szlaku transdukcji sygnału auksyn (Rycina 4, Tabela 2). Największą liczbą genów z tego szlaku w analizowanych genomach roślin wykazują się *Glycine max* i *Brassica rapa*, co prawdopodobnie jest związane z zajściem, odpowiednio, dodatkowych duplikacji i triplikacji całych genomów u bezpośrednich przodków tych roślin [63].



Rycina 4. Analiza porównawcza wielkości rodzin genów *TIR1/AFB*, *Aux/IAA* i *ARF* u wybranych gatunków roślin. Drzewo życia zostało sporządzone na podstawie danych taksonomicznych z bazy NCBI Taxonomy. Dane zwizualizowano za pomocą narzędzia iTOL (<https://itol.embl.de/login.cgi>). Brak danych dla rodzin: *TIR1/AFB* u *S. suchowensis* i *ARF* u *Pisum sativum*. Dane liczbowe zawiera

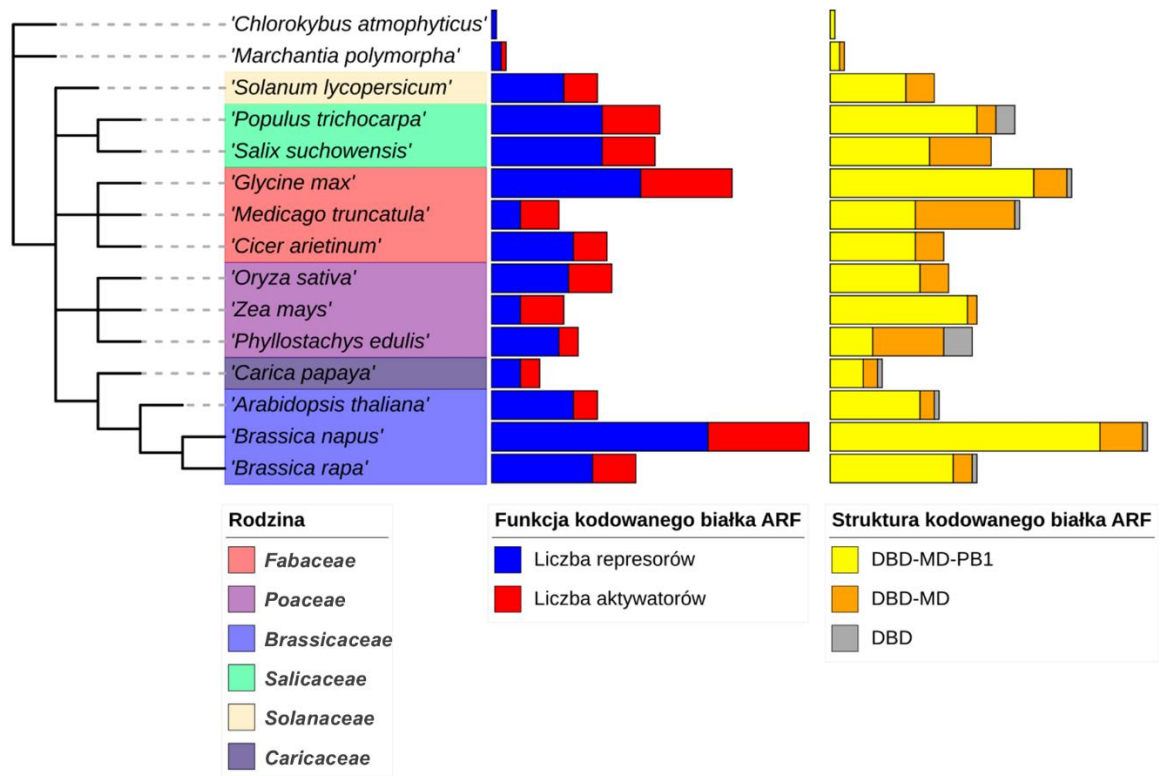


Tabela 2. Podsumowanie analizy ilości genów należących do rodzin: *TIR1/AFB*, *Aux/IAA*, *ARF* w wybranych genomach roślin. B.d. brak danych;\* Podana w nawiasie wartość dotyczy *P. heterocykla*.

Gatunek	Ilość genów należących do rodzin			Źródło			Wielkość genomu (mld pz)	Ilość chromosomów (2n)
	<i>TIR1/AFB</i>	<i>Aux/IAA</i>	<i>ARF</i>	<i>TIR1/AFB</i>	<i>Aux/IAA</i>	<i>ARF</i>		
<i>Arabidopsis thaliana</i> (L.) Heynh.	6	29	23	[64–66]	[67]	[67,68]	0,135	10
<i>Brassica rapa</i> L.	9	55	31	[69]	[70]	[71]	0,485	20
<i>Chlorokybus atmophyticus</i>	0	0	1	[61]	[61]	[61]	0,085	1
<i>Cicer arietinum</i> L.	4	22	24	NCBI Gene: LOC101503837, LOC101489568, LOC101505746, LOC101502260	[72]	[73,74]	0,738	16
<i>Glycine max</i> L.	4	63	51	[75]	[72]	[76]	1,115	20
<i>Marchantia polymorpha</i> L.	1	1	3	[77]	[77]	[77]	0,290	18
<i>Medicago truncatula</i>	7	25	40	NCBI Gene: LOC11435177, LOC25502078, LOC25484780, LOC11430500, LOC11433686, LOC11429111	[78]	[78]	0,384	16
<i>Oryza sativa</i> L.	5	31	25	[79]	[80]	[81]	0,420	24
<i>Phyllostachys edulis</i>	b.d. (10)*	35	24	[82]	[83]	[83]	0,080	48
<i>Pisum sativum</i> L.	5	35	b.d.	[84]	[84]		4,450	14
<i>Populus trichocarpa</i>	8	31	39	[85]	[86]	[87]	0,500	38
<i>Salix suchowensis</i> L.	b.d.	38	34		[88]	[88]	0,804	38
<i>Zea mays</i> L.	8	29	31	[79]	[67]	[89]	2,7	20

Omawiane procesy ewolucyjne mają szczególne znaczenie w budowaniu różnorodności czynników transkrypcyjnych, dzięki czemu możliwa była ich zarówno funkcyjna, jak i tkankowa specjalizacja, skutkująca bardziej precyzyjną regulacją transkryptomu danej komórki w kontekście miejsca, czasu i warunków zewnętrznych. Również rodzina białek ARF wykazuje duże zróżnicowanie w lokalizacji i poziomie ekspresji (np. [79]) oraz funkcji i składzie domen (Rycina 5, Tabela 3). Białka ARF można zaliczyć do aktywatorów lub represorów transkrypcji albo poprzez jego analizę funkcjonalną (np. [90–92]), albo przez analizę składu aminokwasowego regionu środkowego (MR, ang. Middle Region, nazywany też MD, ang. Middle Domain) [90,91]. Liczba genów kodujących represory transkrypcji (klasa B/C) zwykle przeważa nad liczbą genów kodujących aktywatory transkrypcji (klasa A). Procentowy udział genów klasy A wśród w pełni funkcjonalnych ARF mieści się między 16,7% u bambusa Moso (*Phyllostachys edulis*), a 40,0% u melonowca właściwego (*Carica papaya* L.) (Tabela 3), a w skrajnych przypadkach nawet 60%, jak u kukurydzy (*Zea mays* L.). Należy nadmienić, że w ostatnim przypadku nie wszystkim białkom ZmARF posiadającym domenę MD przypisano funkcję (Tabela 3) [89].

Białka ARF mogą się różnić również składem domen: mogą występować w formie pełnej, kanonicznej i zawierać wszystkie trzy główne domeny (DBD-MD-PB1) lub niekanonicznej, skróconej na końcu C o domenę PB1 (DBD-MD). ARF3/ETTIN wyróżnia się wśród białek ARF swoją całkowicie odmienną strukturą. Nie zawiera on domeny PB1, w związku z czym nie ulega interakcji z Aux/IAA. Jednak nie jest to białko, które po prostu uległo skróceniu od końca C. Region znajdujący się za domeną DBD wykazuje inną budowę niż typowy region środkowy, który nazwano domeną ES (ang. ETT-specific domain), umożliwiającą bezpośrednią interakcję z auksyną [93]. Wśród funkcjonalnych form ARF kodowanych w genomach wymienia się również białka ARF skrócone do domeny DBD [60]. Ich ewentualna rola w szlaku transdukcji sygnału auksyn zostanie omówiona w dziale Dyskusja.



Rycina 5. Analiza porównawcza funkcji i struktury białek kodowanych przez geny *ARF* u wybranych gatunków roślin. Drzewo życia zostało sporządzone na podstawie danych taksonomicznych z bazy NCBI Taxonomy. Dane zwizualizowano za pomocą narzędzia iTOL (<https://itol.embl.de/login.cgi>). DBD – domena wiążąca DNA, MD – domena środkowa, PB1 – domena oligomeryzacji; Szczegóły zawiera Tabela 3.

Tabela 3 Podsumowanie głębokiej analizy genów należących do rodziny *ARF* w wybranych genomach roślin. \* W całkowitą ilość aktywatorów i receptorów nie są wliczone formy pomocnicze; \*\* jako formy kanoniczne uznaje ARF posiadające domeny DBD i MD; \*\*\* jako niekanoniczne uznaje ARF skrócone o domenę PB1; \*\*\*\* jako formy pomocnicze uznaje ARF zawierające wyłącznie domenę DBD; \*\*\*\*\* funkcja pozostałych białek ARF jest niejednoznaczna (nieokreślona przez autorów).

Gatunek	Całkowita ilość genów <i>ARF</i>	Represory transkrypcji	Aktywatory transkrypcji	Procentowa ilość genów kodujących aktywatory*	Formy kanoniczne**	Formy niekanoniczne** *	Formy pomocnicze ****	Źródło
<i>Arabidopsis thaliana</i> (L.) Heynh.	23	<i>AtARF1-4,9-18,20-22</i>	<i>AtARF5,6,7,8,19</i>	22,7%	<i>AtARF1,2,4-12,14-16,18-22</i>	<i>AtARF3,13,17</i>	<i>AtARF23</i> (pseudogen)	[67,68]
<i>Brassica napus</i> L.	67	<i>BnARF1-3,5,6,8-11,14-16,18,19,24-26,28,30-39,41-43,47,49-53,57-61,63,65,67</i>	<i>BnARF4,7,12,13,17,20-23,27,29,40,44-46,48,54-56,62,66</i>	31,8%	<i>BnARF1-7,9,12,13,15-18,20-46,48,51-63,66,67</i>	<i>BnARF8,10,11,14,19,47,49,50,65</i>	<i>BnARF64</i>	[94]
<i>Brassica rapa</i> L.	31	<i>BrARF1 do 4,9-1 do 18-2,20-27</i>	<i>BrARF5-1,5-2,6,7-1,7-2,8-1,8-2,19-1,19-2</i>	30,0%	<i>BrARF1,2-1,2-2,2-3,5-1,5-2,6,7-1,7-2,8-1,8-2,9-1,9-2,10,11,16-1,16-2,18-1,18-2,19-1,19-2,24,25,26,27,</i>	<i>BrARF3-1,3-2,17-1,17-2</i>	<i>BrARF5-3</i>	[71]
<i>Carica papaya</i> L.	11	<i>CpARF1,2,3,4,11,17</i>	<i>CpARF5,7,9,16</i>	40,0%	<i>CpARF1,4,5,7,9,11,16</i>	<i>CpARF2,3,17</i>	<i>CpARF6</i>	[95]
<i>Chlorokybus atmophyticus</i>	1	<i>CaARF</i>			<i>CaARF</i>			[61]
<i>Cicer arietinum</i> L.	24	<i>CaARF1,2,4,5,8-11,14,16-19,21-24</i>	<i>CaARF3,6,7,12,13,15,20,</i>	29,2%	<i>CaARF1,3-7,9-15,17-20,22</i>	<i>CaARF2,8,16,21,23,24</i>		[73,74]
<i>Glycine max</i> L.	51	<i>GmARF02,05-08,11-13,15-18,21-23,25-30,32,34-36,38,41,44,45,49,50</i>	<i>GmARF01,03,04,09,10,14,19,20,24,31,33,37,39,40,42,43,46,47,48</i>	38,0%	<i>GmARF01-07,09-15,17-29,31,33,35-37,39,40,42-50</i>	<i>GmARF08,16,30,32,34,38,41</i>	<i>GmARF51</i>	[76]

Gatunek	Całkowita ilość genów ARF	Represory transkrypcji	Aktywatory transkrypcji	Procentowa ilość genów kodujących aktywatory*	Formy kanoniczne**	Formy niekanoniczne** *	Formy pomocnicze ****	Źródło
<i>Marchantia polymorpha</i> L.	3	MpARF2, 3	MpARF1	33,3%	MpARF1,2	MpARF3		[77]
<i>Medicago truncatula</i>	40	MtARF5,16,33,36,38,40 *****	MtARF1,9,11,14,20,30,37,39 *****	57,1%	MtARF1,5,9,11,12,14,16,18,20,30,33,36,37,38,39	MtARF2,3,4,10,13,15,17,19,21-28,31,32,34,35,40	MtARF29	[78]
<i>Oryza sativa</i> L.	25	OsARF1-4,7-10,13-15,18,20,22-24	OsARF5, 6, 11, 12, 16, 17, 19, 21, 25	36,0%	OsARF1, 4-12, 16-19, 21-25	OsARF2, 3, 13, 14, 15, 20		[81]
<i>Phyllostachys edulis</i>	24	PeARF2,3-10,12,13,15-20,22-24	PeARF1,11,14,21	16,7%	PeARF7,9,10,13,17,22	PeARF3,4,6,15 (Brak PBI), PeARF2,8,14,19,20 (PBI typu II), PeARF1,5,12,16,18,21 (PBI typu I)	Skrócone od końca N: PeARF1,4,,8,11,19,23	[83]
<i>Populus trichocarpa</i>	39	PoptrARF1.1,1.2,2.1,2.2,2.3,2.4,2.5,2.6,3.1,3.2,4,9.1,9.2,9.3,9.4,10.1,10.2,16.1,16.2,16.3,16.4,16.5,17.1,17.2	PoptrARF6.1,6.2,6.4,6.5,8.1,8.2,7.1,7.2,7.3,7.4,5.1,5.2	33,3%	PoptrARF1.1-2.6,4,6.1,6.2,6.4-16.5	PoptrARF3.1,3.2,17.1 (PBI typu II),17.2 (PBI typu II),	PoptrARF16.5 (niepełna DBD, PBI typu II), 3.3,6.3,16.6 (pseudogeny)	[87]
<i>Salix suchowensis</i> L.	34	SuARF1.1-4,9.1-17.2	SuARF5.1, 5.2, 7.1, 7.2, 7.3, 8.1, 8.2, 6.1, 6.2, 6.3, 6.4	32,4%	SuARF1.1,1.2,2.2,2.3,2.4,2.5,4,5.1,5.2,6.1,6.2,6.3,6.4,7.2,8.1,8.2,9.1,9.2,9.3,9.4,10.1,	SuARF2.1,2.6,3.1,3.2,7.1,7.3,10.2,16.1,16.2,16.3,16.4,17.1,17.2,		[88]
<i>Solanum lycopersicum</i>	22	Sl-ARF1, 2A, 2B, 3, 4, 9A, 9B, 10A, 10B, 16A, 16B, 17, 18, 24	Sl-ARF5, 6A, 7A, 7B, 8A, 8B, 19	33,3%	Sl-ARF2A, 2B, 4, 5, 7A, 7B, 8A, 8B, 9, 9B, 10A, 10B, 16A, 18, 19	Sl-ARF1, 3, 6B, 16B, 17, 24,		[92]
<i>Zea mays</i> L.	31	ZmARF6, 10, 13, 14, 25, 28 *****	ZmARF1, 3, 9, 16, 18, 19, 22, 27, 30 *****	60,0%	ZmARF1-4,6-30	ZmARF5,31		[89]

### ***Geny wczesnej odpowiedzi na auksynę***

Do genów wczesnej odpowiedzi na auksynę, indukowanych w ciągu kilku minut od aplikacji egzogennej IAA, zalicza się *Aux/IAA*, *GH3* i *SAUR* (*small auxin up-regulated RNAs*) (temat opracowany w [96]). *Aux/IAA* były pierwszymi genami opisanymi jako szybko indukowane przez auksynę [97], a poziom ich ekspresji wzrasta w przeciągu kilkunastu minut od traktowania tym hormonem roślinnym [98]. W przypadku genów *GH3* i *SAUR* indukcja akumulacji ich mRNA w reakcji na aplikację auksyny następuje dużo szybciej, już w przeciągu kilku minut [98]. U *Arabidopsis* regiony regulatorowe genów *Aux/IAA* [96], *GH3* [99] i *SAUR* [100,101] zawierają powtarzające się elementy AuxRE.

We współczesnych analizach w roli indykatorów odpowiedzi transkrypcyjnej na auksynę stosuje się głównie geny *SAUR*, dokonując albo analizy akumulacji ich transkryptów (np. [102]), albo wykorzystując geny markerowe pod promotorem wybranego genu *SAUR* (np. [102]). Geny z rodziny *SAUR* kodują wysoce niestabilne mRNA [103,104] i funkcjonują jako regulatory elongacji komórek [105], które poprzez inhibicję fosfataz PP2C.D, aktywują błonowe H<sup>+</sup>-ATPaz i w ten sposób promują ekspansję komórek [106]. Ekspresja genów *SAUR* jest “papierkiem lakmusowym” odpowiedzi na auksynę, jako że jej poziom silnie koreluje ze stężeniem auksyny [107,108], a redystrybucja tego fitohormonu pociąga za sobą szybką i dynamiczną redystrybucję transkryptów kodujących SAUR [103].

### ***Regulacja szlaku transdukcji sygnału auksyn***

Mała ilość elementów jądrowego szlaku transdukcji sygnału auksyn gwarantuje szybkie reprogramowanie transkrypcyjne komórki w odpowiedzi na sygnały endo- i egzogenne. Jednocześnie konstrukcja tego szlaku musi zapewniać precyzję odpowiedzi w zależności od kontekstu tkankowego, rozwojowego i środowiskowego. Ta specyficzność uzyskiwana jest za pomocą ściśle, wielopoziomowej i niezwykle zapętłonej regulacji.

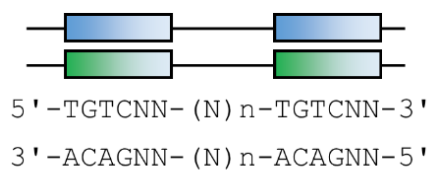
Możliwości modyfikacji tego szlaku na poziomie białkowym są ogromne. Dla przykładu, u *Arabidopsis* zidentyfikowano 6 genów kodujących białka z rodziny TIR1/AFB, 29 z rodziny Aux/IAA i 23 z rodziny ARF (w tym 1 przypuszczalny pseudogen). Wiązanie auksyn do kieszeni w obrębie białka TIR1/AFB jest kontrolowane przez obecność odpowiednich reszt aminokwasowych, które decydują o selektywności wiązania ligandu. Odmienne receptory mogą preferencyjnie wiązać różne auksyny i orientować je w nieco inny sposób, co wraz z dywersyfikacją miejsc wiązania Aux/IAA prowadzi do zróżnicowanego powinowactwa TIR1/AFB-Aux/IAA, a w konsekwencji innej szybkości degradacji represora w odpowiedzi na auksynę. Za specyficzność odpowiedzi transkrypcyjnej na auksynę odpowiada obecność w jądrze komórkowym odpowiednich białek ARF. Ze względu na różną budowę aminokwasową N-terminalnej domeny odpowiedzialnej za homodimeryzację i wiązanie DNA (DBD), rozstaw powierzchni rozpoznających i wiążących AuxRE w dimerach ARF jest różny dla różnych typów tych białek. W konsekwencji rozstaw i orientacja AuxRE w obrębie genów odpowiedzi na auksynę decyduje o tym, który z czynników ARF będzie potencjalnie kontrolował ich ekspresję. Zatem od tego, jaki zestaw białek ARF ulega ekspresji w danej komórce, zależy to, jaki zestaw genów odpowie zmianami w transkrypcji na sygnał auksynowy [109].

Nie tylko rozstaw elementów AuxRE ma znaczenie dla finalnego efektu działania szlaku transdukcji sygnału auksyn, lecz również sekwencja i rodzaj powtórzeń tych elementów. Najwcześniej zidentyfikowaną sekwencją AuxRE było TGTCTC [110], które było podstawą

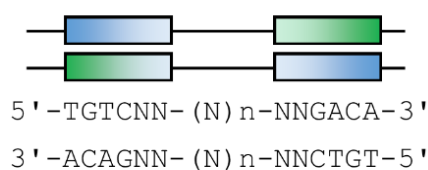
do stworzenia sztucznego promotora DR5, indukowanego auksyną i składającego się z 11 bezpośrednio powtórzonych (DR, zobacz Rycina 6) sekwencji TGTCTC [111]. Badania obejmujące analizy z użyciem mikromacierzy dowiodły, że u *Arabidopsis* wiele białek ARF wykazuje wyższe powinowactwo do innej sekwencji AuxRE, a mianowicie TGTCGG [109]. Na tej podstawie stworzono DR5v2, w którym sekwencje TGTCTC zamieniono na TGTCGG, co pozwoliło na uchwycenie nie tylko maksimum auksynowych, ale także gradientowy rozkład tego hormonu w tkankach [112].

Liczne elementy AuxRE, obecne w promotorze danego genu, działają raczej kooperatywnie niż uzupełniająco, co potwierdziły badania nad ekspresją genów *IAA11* i *TMO5* u *Arabidopsis thaliana*. Mutacja tylko w jednym z tych elementów powodowała spadek poziomu ekspresji danego genu aż o ponad 50% [113]. Należy również nadmienić, że w tej roślinie ARF19 najprawdopodobniej może wiązać się do pojedynczego elementu AuxRE i skutecznie aktywować transkrypcję [114]. Co więcej, jak wykazano dla AtARF1 i AtARF5, prawdopodobnie AuxRE w powtórzeniach bezpośrednich są preferencyjnie wiązane przez aktywatory transkrypcji, natomiast w powtórzeniach odwróconych (IR) i wywróconych (ER) zarówno aktywatory, jak i represory, przy czym związanie ARF do ER wywołuje zdecydowanie słabszy efekt [113].

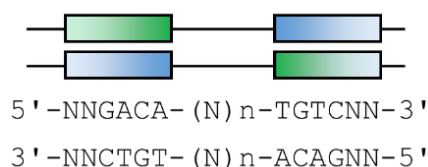
Powtórzenia **bezpośrednie** AuxRE (DR):



Powtórzenia **odwrócone** AuxRE (IR):



Powtórzenia **wywrócone** AuxRE (ER):



Rycina 6. Orientacja powtórzeń elementów AuxRE względem siebie. Schematy opracowane na podstawie [113].

Całość jeszcze bardziej komplikuje fakt, że żaden czynnik transkrypcyjny nie działa sam, a transkrypcja genów jest regulowana za pomocą wielobiałkowych kompleksów. Po pierwsze, białka ARF mogą homo- i heterodimeryzować z innymi białkami ARF za pomocą C-terminalnej domeny PB1, tworząc superkompleks regulacyjny [115]. Po drugie, inne czynniki transkrypcyjne, nie wchodzące w skład rodziny ARF, mogą w danych tkankach i na odrębnych etapach ontogenezy współpracować z różnymi czynnikami odpowiedzi na auksynę, wywołując odmienne efekty. Na przykład u *Arabidopsis*, we wczesnych etapach rozwoju kwiatu, AtARF8 współpracuje z AtARF6 i promuje wzrost organów kwiatowych poprzez inhibicję genu *KNOX* [116]. Natomiast na późniejszych etapach rozwoju kwiatów, gdy organy te osiągnęły już docelową wielkość, AtARF8 ulega interakcji z czynnikiem transkrypcyjnym bHLH BIGPETALp, ograniczając podziały mitotyczne w obrębie płatków i tym samym hamując ich elongację [117].

### ***Regulacja elementów szlaku transdukcji sygnału auksyn przez miRNA***

W ciągu ostatnich dwóch dekad, które minęły od zidentyfikowania pierwszego mikro RNA (miRNA) u roślin wykazano, że cząsteczki te są krytycznymi regulatorami w niemalże wszystkich aspektach wzrostu i rozwoju roślin.

Mikro RNA są klasą małych RNA (sRNA), generowaną z prekursorów otrzymywanych w wyniku transkrypcji genów *MIR* przeprowadzanej z udziałem zależnej od DNA polimerazy RNA II. Jako kanoniczne produkty Polimerazy II, bezpośrednie transkrypty genów *MIR* są zakończone na 5', poliadenylowane na 3' i/lub poddane splicingowi [118] i stanowią prekursor pierwszego rzędu pri-miRNA (primary miRNA). Dupleks miRNA przewodniego i towarzyszącego (miRNA/miRNA\*) jest wieloetapowo wycinany z tworzonych w obrębie pri-miRNA struktur niedoskonałych spinek do włosów [119]. Ten etap wymaga udziału tak zwanego kompleksu mikroprocesora [120], złożonego z białka DCL1 (DICER-LIKE 1) i licznych białek pomocniczych. W odróżnieniu od biogenezy miRNA u zwierząt, u roślin występuje dodatkowy etap, w którym ryboza ostatniego nukleotydu jest metylowana przez metylotransferazę HUA Enhancer 1 (HEN1) [121]. Przewodni miRNA ulega aktywacji przez degradację nici sensownej, a następnie jest włączany do kompleksu RISC (ang. RNA-induced silencing complex), gdzie umożliwia rozpoznanie i związanie komplementarnego mRNA [122]. Powstały w opisany sposób miRNA jest komplementarny do części sekwencji genu docelowego, co umożliwia jego precyzyjne wyciszenie [123] przez represję translacji [124,125], cięcie transkryptu [126,127], lub inhibicję transkrypcji [128].

Wyniki badań, obejmujących zarówno rośliny modelowe, jak i użytkowe, wskazują na konserwowane role modułów regulacyjnych miRNA/gen docelowy: miRNA393/*TIR1/AFB*, miRNA160/*ARF10,16,17* [129,130], miRNA167/*ARF6,8* [131,132] oraz bardziej złożonego systemu miRNA390/*TAS3/ta-siARF/ARF2,3,4* [133–135]. Dodatkowo, wraz z procesem poznawania innych roślin na poziomie transkryptomów i miRNAtomów, liczba takich regulatorowych modułów wciąż się zwiększa (np. [136,137]). Należy tu nadmienić, że regulacja za pośrednictwem niskocząsteczkowych RNA jest możliwa również w przypadku rodziny *Aux/IAA* - wykazano, że u *A. thaliana* transkrypt genu *IAA28* może ulegać degradacji kierowanej przez miR847 podczas rozwoju liści, kwiatów i korzeni bocznych lub po egzogennej aplikacji NAA [138].

Potranskrypcyjna represja mRNA genów *TIR1/AFB* kodujących receptory auksyny przez miR393 oraz siTAAR generowane w wyniku cięcia wspomnianych transkryptów, hamują



ekspresję genów *TAAR* podczas regulacji rozwoju liści [139] i korzeni [140], a także odpowiedzi na stresy biotyczne [141] i abiotyczne [142] u *Arabidopsis thaliana*. Z kolei moduł regulatorowy miRNA167/*ARF6,8* ma ogromne znaczenie z rozwoju kwiatu [131,132] oraz obronie przeciw patogenom [143]. *ARF10/16/17* są genami docelowymi dla miR160 i u pomidora moduł ten jest aktywny w rozwoju zalążni, odcinaniu organów kwiatowych i wzroście blaszki liścia [144]. Dodatkowo, para miR160/*ARF10* jest istotna w rozwoju kwiatów i liści złożonych tej rośliny [145], a miR160/*ARF17* poprzez zmianę poziomu białka GH3 pełni istotną rolę w rozwoju embrionu i korzenia, morfogenezie liści oraz kwitnieniu [146]. U *Arabidopsis* moduł miR160/*ARF10/16/17* bierze udział w adaptacji do stresu ciepła [147], a para miR160/*ARF10* jest istotna podczas kiełkowania nasion [129]. *ARF2/3/4* są genami docelowymi dla ta-siRNA (ang. trans-acting siRNAs), generowanych na drodze cięcia transkryptu genu *TAS3* inicjowanego przez miR390 [148,149]. Moduł ten odgrywa istotną rolę we wzroście korzeni bocznych [150]. U rzodkiewnika i pomidora regulacja *ARF2* przez ta-siRNA jest związana z kontrolą starzenia liści i odcinania organów kwiatowych [151]. Z kolei moduł miR390/*TAS3/ARF3,4* zdaje się być istotny w embriogenezie [133,152]. Temat roli małych RNA w regulacji elementów szlaku transdukcji sygnału auksyn został szczegółowo opisany w pracy przeglądowej [153].

Należy nadmienić, że możliwe są odwrotne zależności regulacyjne, w których to elementy szlaku transdukcji sygnału auksyn regulują ekspresję genów *MIR*. Dobrym przykładem jest tu białko AtIAA14, które podczas stresu zimna reguluje w korzeniu rzodkiewnika akumulację miRNA, biorących udział w adaptacji do obniżonej temperatury, szczególnie modułu miR169/*NF-YA* [154].

Obecnie we wielu ośrodkach badawczych wyprowadzane są nowe linie transgenicznych roślin, bazujące na: zmianie ekspresji miRNA, zastosowaniu sztucznego miRNA (amiRNA) lub modyfikacji ich genów docelowych, polegającej na pozbawieniu ich wrażliwości na miRNA [155]. Wykazano na przykład, że transgeniczne *A. thaliana* i pomidor, ekspresyjny zmodyfikowany gen *ARF8*, którego transkrypt jest niewrażliwy na miR167, wytwarzają owoce partenokarpiczne [156]. W świetle globalnego spadku liczby i różnorodności populacji zapylaczy, podobna modyfikacja roślin obcopylnych, takich jak na przykład ogórek czy kakaowiec, może się okazać kluczowa dla zachowania bezpieczeństwa żywnościowego na świecie.

#### Auksyna a status odżywczy rośliny

Chociaż intensywność wzrostu rośliny, tempo osiągania kolejnych etapów rozwojowych i funkcje rozrodcze są realizacją genetycznego planu, to jednak procesy te mogą być do pewnego stopnia modulowane przez czynniki endo- i egzogenne. Stopień odżywienia rośliny jest jednym z najważniejszych czynników, które mają wpływ na wszystkie wymienione procesy, a jednym z najważniejszych endogennych cząsteczek sygnałowych, informujących o statusie energetycznym rośliny jest trehalozo-6-fosforan (T6P) [157,158].

Akumulowany w tkance T6P hamuje aktywność kompleksu SnRK1 (Sucrose Non-Fermenting 1-Related Protein Kinase1) [159], który jest centralnym sensorem, biorącym udział w adaptacji do zmieniających się wymagań energetycznych rośliny [160]. Inhibicja SnRK1 powoduje spadek poziomu sacharozy i T6P, co z kolei powoduje uwolnienie wspomnianego kompleksu kinaz z represji i indukcję genów związanych z fotosyntezą [161]. Wykazano, że związek ten jest kluczowym i niezastępowalnym związkiem regulującym wykorzystanie węglowodanów

w roślinie [162] poprzez modulację genów kodujących podjednostki RuBisCO (karboksylaza/oksygenaza rybulozo-1,5-bisfosforanu, ang. ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase) za pośrednictwem ABI4 (ABA-INSENSITIVE 4) [163] oraz indukuje syntezę skrobi w chloroplastach przez zwiększenie aktywności fosforylasy ADP-glukozowej (AGF) [164].

Wykazano, że T6P jest istotny w rozwoju embrionu [165] oraz rozwoju wegetatywnym i ewokacji kwitnienia [166], najprawdopodobniej za pośrednictwem kwasu abscysynowego (ABA) i metabolizmu cukrów [167]. Jedną z najważniejszych cząsteczek sygnałowych, biorących udział w wymienionych procesach jest zdecydowanie auksyna, której ścieżki sygnałowe wykazują interakcję z cukrami. Po pierwsze, transgeniczne linie *Arabidopsis* akumulujące wysokie ilości T6P wykazują obniżony poziom transkryptów kodujących Aux/IAA [168]. Po drugie, wykazano, że SnRK1 ulega interakcji z domeną Skp1 kompleksu SCF, prawdopodobnie fosforylując substraty TIR1-SCF [169], w tym prawdopodobnie Aux/IAA. Po trzecie, auksyna hamuje aktywność trehalazy, będącej hydrolazą glikozydową, dzięki czemu trehaloza nie jest rozkładana do glukozy i w konsekwencji hamowana jest również synteza skrobi [170]. Co ważne, u roślin trehalaza wykazuje najwyższą aktywność głównie na znamieniu słupek, w pylnikach [171] oraz brodawkach korzeniowych roślin bobowatych [172].

## Cel pracy

Ze względu na wysoką zawartość białka w nasionach oraz śródziemnomorskie pochodzenie, łubin żółty może w przyszłości stać się jedną z roślin zapewniających bezpieczeństwo żywnościowe w Europie. Ważnym problemem zniechęcającym do upraw tej rośliny, jest zjawisko nadmiernego odcinania organów generatywnych, przy czym im wyższa pozycja kwiatu lub strąku na osi kwiatostanu, tym wyższe prawdopodobieństwo ich odcięcia. Poznanie procesów leżących u podstaw rozwoju kwiatów może być podstawą do stworzenia nowych, bardziej plennych odmian lub takiej modyfikacji zabiegów rolnych, aby jeszcze bardziej zwiększyć ilość uzyskanego plonu.

Auksyna jest jednym z najważniejszych fitohormonów, regulującym niemalże każdy proces rozwojowy i adaptacyjny w roślinach. Mikro RNA są klasą kodowanych endogennie regulatorowych cząsteczek RNA o długości 20-24 nt. Zaangażowane są one w proces potranskrypcyjnego wyciszania ekspresji genów poprzez indukcję ich cięcia, hamowania translacji lub modyfikacji chromatyny. Ich odkrycie w 1993 roku znacznie wzbogaciło naszą wiedzę, dokładając kolejny poziom regulacji ekspresji genów. U roślin lądowych odpowiedź na auksynę może być regulowana m.in. za pomocą konserwowanych ewolucyjnie modułów: miRNA393/TAAR, miRNA160/ARF10,16,17, oraz miR390/TAS3/ta-siRNA/ARF2,3,4.

W pracy skupiono się na regulowanych przez mikro RNA elementach szlaku transdukcji sygnału auksyn. Celem założonych badań była odpowiedź na następujące pytania badawcze:

1. Czy odcinanie kwiatów ze szczytowych okółków jest spowodowane morfologicznymi lub funkcjonalnymi różnicami w ich rozwoju na dolnych i górnych okółkach?
2. Czy w tkankach kwiatów górnych i dolnych wzorec lokalizacji IAA jest różny?
3. Czy w kwiatach łubinu żółtego ulegają ekspresji wszystkie elementy szlaku transdukcji sygnału auksyn? Czy są one funkcjonalne i regulowane przez miRNA?
4. Czy w kwiatach z górnych okółków regulacja rozwoju przez szlak transdukcji sygnału auksyn przebiega inaczej niż w kwiatach dolnych? Czy ewentualne różnice mogą być wyjaśnione potranskrypcyjną regulacją przez miRNA?
5. Jeśli usunięte zostaną wszystkie kwiaty, oprócz tych znajdujących się na szczytowym okółku, kwiaty te nie zostają odcięte i zawiązują owoce. Czy zmiana predestynacji kwiatów jest w tym przypadku spowodowana zmianą ekspresji genów kodujących elementy szlaku transdukcji sygnału auksyn? Czy ewentualne różnice mogą być wyjaśnione potranskrypcyjną regulacją przez miRNA?
6. Czy szlak transdukcji sygnału auksyn w kwiatach łubinu żółtego jest elementem odpowiedzi na stres suszy? Czy ewentualne różnice mogą być wyjaśnione potranskrypcyjną regulacją przez miRNA? Czy w efekcie stres suszy zmienia się kiełkowania pyłku?

## Materiały i metody

### Materiał roślinny

#### Przygotowanie nasion

Materiał roślinny stanowił łubin żółty odmiany Taper, którego nasiona każdego roku kupowano od Stacji Hodowli Roślin Wiatrowo (Poznańska Hodowla Roślin Sp. z oo Tulce, Polska). Nasiona zaprawiano 3,5ml/kg roztworem Vitavax 200FS (Chemtura AgroSolutions, Middlebury, Stany Zjednoczone) w celu zapobiegania zakażeniom grzybiczym, a następnie inokulowano kulturami *Bradyrhizobium lupine*, zawartymi w Nitraginie (BIOFOOD s.c., Walcz, Polska) zgodnie z zaleceniami producenta nasion [173] (Rycina 7).



Rycina 7. Nasiona łubinu żółtego przygotowane do wysiewu w fitotronie.

**20.05.2020**



**06.06.2020**



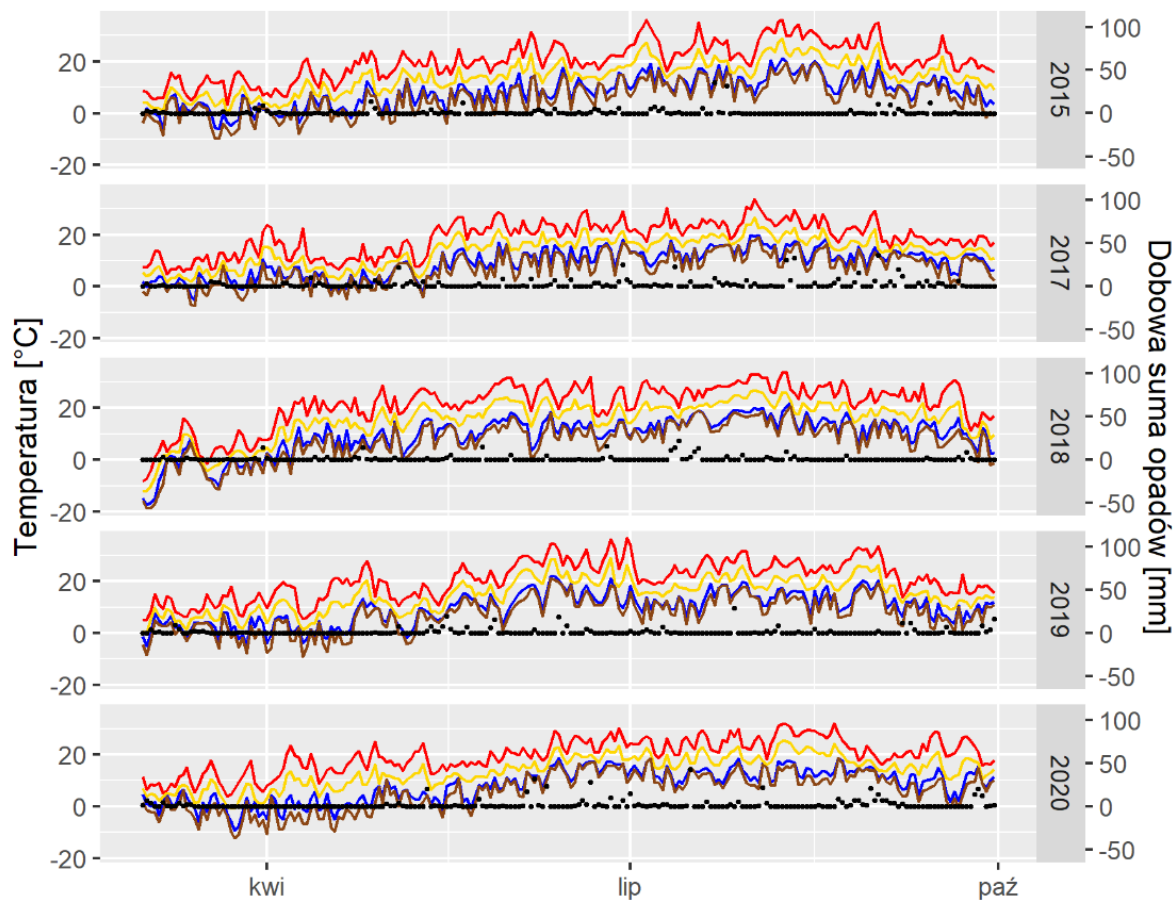
**17.06.2020**



Rycina 8. Przykładowe zdjęcia upraw polowych prowadzonych w roku 2020 na terenie Obserwatorium Astronomicznego UMK w Piwnicach k/Torunia.

### Warunki upraw

Uprawy polowe w roku 2015 prowadzono na polu doświadczalnym w Grubnie, udostępnionym przez Kujawsko-Pomorski Ośrodek Doradztwa Rolniczego w Minikowie k. Chełmna. Uprawy polowe w latach 2017-2021 prowadzono na polu doświadczalnym UMK na terenie Obserwatorium Astronomicznego w Piwnicach k/Torunia (Rycina 8, Tabela 4). Dane pogodowe z warunków polowych dla Torunia, oddalonego w linii prostej od Grubna o około 31 km i od Piwnic o 6 km, otrzymano dzięki uprzejmości Przemysława Wyszyńskiego z Instytutu Meteorologii i Gospodarki Wodnej (Państwowy Instytut Badawczy) (Rycina 9).



Rycina 9. Dane pogodowe dotyczące Torunia. Czerwona linia – maksymalna dobowa temperatura, niebieska linia – minimalna dobowa temperatura, żółta linia – średnia dobowa temperatura, brązowa linia – minimalna temperatura przy gruncie, czarne punkty – dobowa suma opadów.

Rośliny uprawiane w fitotronie znajdującym się w budynku Wydziału Nauk Biologicznych i Weterynaryjnych UMK w Toruniu miały zapewnione stałe warunki: temperaturę 22/18 °C (dzień/noc), fotoperiod 16/8 h (światło/ciemność) i rodzaj światła o intensywności 115-130  $\mu\text{mol fotonów}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  (zmierzone przy użyciu HD2302.0 LightMeter, DELTA OHM, Caselle di Selvazzano, PD, Włochy) (Rycina 10). W latach 2016-2019 oświetlenie zapewniał zestaw świetlówek do uprawy roślin FLUORA® (Osram, Monachium, Niemcy) oraz świetlówek światła białego Cool Daylight (Piła, Piła, Polska) w proporcji 4:6. Od roku 2020 wprowadzone zostały dodatkowo świetlówki typu LED: światła białego LED TUBE T8 (Spectrum LED, Katowice, Polska) oraz LUNO PRO T8 LED TUBE G/P (rgbTechnik, Warszawa, Polska) (Tabela 4).

**Stadium wegetatywne**



**Stadium generatywne**



Rycina 10. Przykładowe zdjęcia upraw prowadzonych w fitotronie.

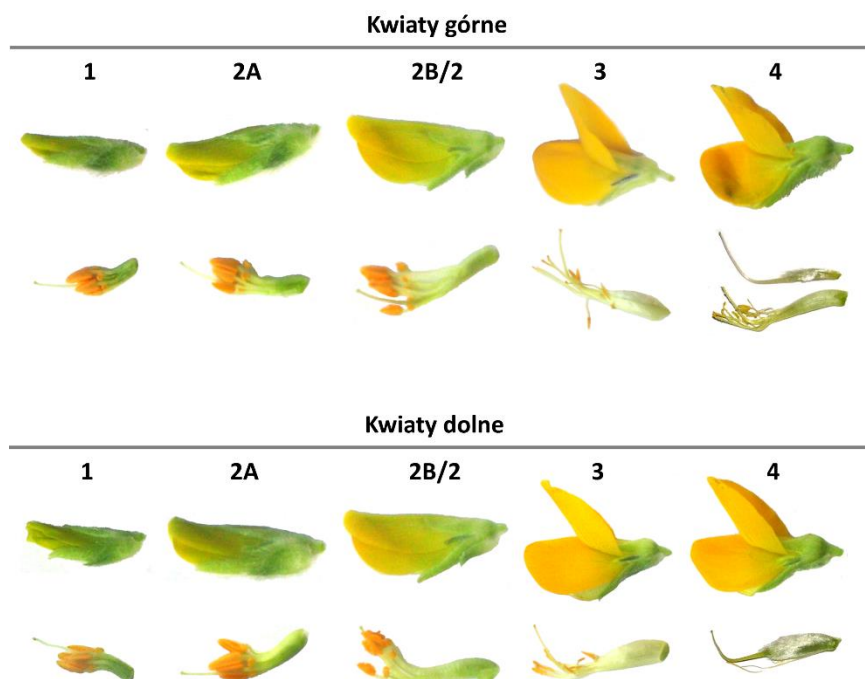
Tabela 4. Podsumowanie warunków upraw roślin wykorzystanych do poszczególnych eksperymentów wykonanych w ramach niniejszej pracy. \* eksperyment wykonany w ramach projektu SONATA 2015/19/D/NZ9/03601, uzyskane dane zostały zdeponowane w bazie LuluDB i opublikowane w [136,174] oraz w realizowanej równolegle pracy doktorskiej mgr Wojciecha Glinkowskiego.

<b>Eksperyment</b>	<b>Miejsce uprawy</b>	<b>Rok uprawy</b>
Ekspresja w kwiatach rozwijających się na dolnych i górnych okólkach	pole doświadczalne w Grubnie udostępnione przez Kujawsko-Pomorskiego Ośrodka Doradztwa Rolniczego w Minikowie k. Chełmna	2015
Sekwencjonowanie transkryptomów, degradomu i sRNAtomów *	pole doświadczalne UMK na terenie Obserwatorium Astronomicznego w Piwnicach k/Torunia	2017
Ekspresja w kwiatach rozwijających się na dolnych i górnych okólkach, oraz rozwijających się na najwyższych okólkach po usunięciu wszystkich pozostałych.	pole doświadczalne UMK na terenie Obserwatorium Astronomicznego w Piwnicach k/Torunia	2018, 2019
Susza	Fitotron	2020
Tkankowa lokalizacja IAA w kwiatach	pole doświadczalne UMK na terenie Obserwatorium Astronomicznego w Piwnicach k/Torunia	2020
Kiełkowanie pyłku <i>in vitro</i>	pole doświadczalne UMK na terenie Obserwatorium Astronomicznego w Piwnicach k/Torunia	2020

#### Etapy rozwoju kwiatów łubinu żółtego poddawane analizie

Do eksperymentów zbierano kwiaty łubinu żółtego, będących na etapach rozwoju od pierwszego do czwartego (1-4), rosnących na najwyższych okólkach kwiatostanu (kwiaty górne, G) oraz na najniższych okólkach (kwiaty dolne, D) (Rycina 11, Tabela 5). Etap 2 rozwoju kwiatów łubinu żółtego w eksperymencie dotyczącym lokalizacji IAA został podzielony na dwa podetapy: 2A i 2B. W pozostałych eksperymentach etap 2 jest równoważny etapowi 2B.





Rycina 11. Etapy rozwojowe kwiatu łubinu żółtego (szczegółowy opis zawiera Tabela 5).

Tabela 5. Charakterystyka etapów rozwoju kwiatów łubinu żółtego badanych w pracy.

<b>Etap rozwoju kwiatu łubinu żółtego wg [136,174]</b>	<b>Etap rozwoju łubinu wg [175]</b>	<b>Charakterystyka stadium</b>
1	3.2	Elongacja wszystkich elementów kwiatu przed otwarciem pylników
2A	3.3	Anteza I okółka pylników, pylniki z okółka II stają się bardziej żółte
2B/2	3.3	Anteza II okółka pylników, znamię staje się receptywne
3	3.4	Otwarty kwiat, zapylenie i zapłodnienie, faza najbardziej wrażliwa na stres
4	3.4 – dolne 3.7 – górne	Dolne kwiaty utrzymywane w stadium 3.4, górne i pośrednie przeznaczone do odcięcia szybko wkraczą na etap 3.7, w którym następuje szybkie starzenie i odcinanie kwiatu

## Spis odczynników

<b>Odczynnik</b>	<b>Firma</b>
Bufor fosforanowy (PBS, tabletki)	VWR
Butanol	Avantor
Cytrynian sodu ( $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ )	Chempur
3,3'-diaminobenzodyna (DAB)	Sigma
Dimetylosulfotlenek (DMSO)	Honeywell
Driselase®	Sigma
Etanol	Avantor
1-etylo-3-(3-dimetyloaminopropyl)karbodiimid (EDAC)	Sigma
Ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid (EGTA)	Sigma
10% Formaldehyd, bez metanolu	Polysciences
Frakcja V albuminy BSA	Carl Roth
IGEPAL	Sigma
Kwas octowy lodowaty	Chempur
85% Kwas ortofosforowy	Chempur
Kwas sulfosalicylowy	Chempur
Ksylen (mieszanka izomerów)	Chempur
Macerosyme R-10®	Duchefa
Metanol	Carl Roth
2-morpholin-4-ylethanesulfonic acid;hydrate (MES)	ICN Biomedicals Inc
Ninhydryna	Chempur
Paraplast Plus	Sigma
Perhydrol (30% $\text{H}_2\text{O}_2$ )	Sigma
Piperazine-N,N'-bis(2-ethanesulfonic acid) (PIPES)	Sigma
Proteinaza K	QIAGEN
Sacharoza	Avantor
Siarczan magnezu ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )	Avantor
Toluen	Avantor
Triton X-100	Sigma
Tween-20	Sigma
Wodorofosforan sodu ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )	Sigma
Wodorotlenek potasu (KOH)	Avantor

## Kiełkowanie pyłku *in vitro*

W teście kiełkowania pyłku *in vitro* na szkiełka podstawowe naniesiono pyłek pochodzący ze świeżo zebranych kwiatów z odpowiednich okółków (2 najniższe zakwalifikowano jako okółki dolne, trzy środkowe jako okółki środkowe, a dwa najwyższe jako okółki górne). Test kiełkowania pyłku wykonano przy użyciu 10% roztworu sacharozy w sterylnej wodzie (m/v), inkubując szkiełka przez 24 godziny odwrócone preparatem do dołu w wilgotnej komorze w temperaturze pokojowej. Kontrolę negatywną stanowiły preparaty inkubowane 5 minut w temp. 95 °C, a następnie inkubowane przez 24 godziny tak, jak próby badane. Za pomocą mikroskopu Olympus SC50 wykonano dokumentację fotograficzną kiełkującego pyłku, tak aby zdjęcia objęły cały preparat. Następnie zliczano ilość pyłku kiełkującego i dzielono na całkowitą ilość pyłku. Wykonano analizy dla 3 powtórzeń biologicznych, które stanowił pyłek pochodzący z kwiatów z odrębnych roślin.

## Immunolokalizacja IAA

### Immunolokalizacja w całych organach kwiatowych

Immunolokalizację IAA w całych organach kwiatowych wykonano na podstawie metody Pasternaka [176] wykorzystując świeżo wyizolowane organy kwiatowe (osobno cały słupek razem z dnem kwiatowym i pylniki). Poważnym problemem, jaki napotkano podczas optymalizacji metody, były trudności z zapewnieniem dobrej penetracji roztworu utrwalającego zarówno w słupkach, jak i główkach pylnikach. Mimo że do utrwalacza dodawano 0,1% Triton X-100 oraz stosowano wydłużony czas infiltracji próżniowej, nie osiągnięto dobrej penetracji tkanek. Dlatego przed wstępnym utrwalaniem załącznia i główki pylników zostały delikatnie nakłute sterylną igłą. Roztwór do wstępnego utrwalania składał się z 4% EDAC (1-etylo-3-(3-dimetyloaminopropyl)karbodiimid) w 1x buforze MTSB (bufor stabilizujący mikrotubule; 50mM PIPES, 5 mM EGTA, 5 mM MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O i 45 mM KOH w wodzie doprowadzone do pH 7.0 za pomocą 10 M KOH). Próby były inkubowane w powyższym roztworze w temp. 37 °C przez 20 minut z wytrząsaniem, a następnie przeniesione do właściwego roztworu utrwalającego, składającego się z 4% EDAC, 2% formaldehyd w 1x MTSB i inkubowane z wytrząsaniem przez 40 minut w 37 °C. Następnie, utrwalone tkanki zostały przeniesione do uprzednio rozgrzanego do 60 °C 0,6 mL 100% metanolu aż do całkowitego odbarwienia (10-30 minut, w zależności od wielkości i rodzaju tkanki). Odbarwione próby stopniowo uwadniano, dodając co 2 minuty po 100-200 µL sterylnej wody, do uzyskania stężenia metanolu 20%. Następnie próby przemyto dwa razy po 5 minut sterylną wodą i przeprowadzono częściowe trawienie za pomocą roztworu celulaz 0,2% Driselase® i 0,15% pektynaz Macerosyme R-10® w 2 mM roztworze MES przez 40 minut z lekkim wytrząsaniem w temp. 37 °C. Po skończonym trawieniu próby przemyto 1x MTSB, 4 minuty, a następnie inkubowano przez 20 minut w temp. 37 °C w roztworze zwiększającym przepuszczalność błon komórkowych (3% IGEPAL CA-630, 10% DMSO w 1x MTSB). Próby przemyto buforem 1x MTSB czterokrotnie po 3 minuty, a następnie, w celu demaskowania epitopów, trawiono proteinazą K w buforze sporządzonym według zaleceń producenta przez 5 (pylniki) lub 10 minut (słupki). Po określonym czasie próby przepłukano dwukrotnie 1x MTSB, a następnie wykonano ponowne utrwalenie w roztworze 4% EDAC, 2% FA w 1x MTSB, przez 15 minut na lodzie z delikatnym wytrząsaniem. Próby trzykrotnie przepłukano w 1x MTSB i przeniesiono do roztworu blokującego (2% frakcja V albuminy BSA w 1 x MTSB), w którym inkubowano przez 40 minut w temp. 37 °C. Po tym

czasie roztwór blokujący zmieniono na roztwór przeciwciał pierwotnych króliczych anti-IAA (Agrisera, nr kat. AS06 193) w proporcji 1:600, sporządzony w roztworze blokującym. W przypadku kontroli negatywnej, próby inkubowano w samym roztworze blokującym. Inkubacja z przeciwciałami była prowadzona w temp. 37 °C z delikatnym wytrząsaniem przez 1 h. Przeciwciała odpłukano 1x MTSB. Ponieważ użyte w niniejszej analizie przeciwciała wtórne były wyznakowane peroksydazą chrzanową (HRP), przed inkubacją z nimi należało dezaktywować endogenne peroksydazy, które mogłyby być źródłem artefaktów. W tym celu zastosowano inkubację w 0,6% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> rozcieńczonym w 1x MTSB, przez 10 minut na lodzie, a następnie próby dwukrotnie przepłukano 1x MTSB. Inkubację z przeciwciałami wtórnymi anti-króliczymi wyznakowanymi HRP (Agrisera, nr kat. AS10 833), rozpuszczonymi w roztworze blokującym w proporcji 1:3000 prowadzono przez 1 godzinę w temp. 37 °C. Po tym czasie próby przepłukano i barwiono za pomocą zestawu DAB substrate (Roche Molecular Systems, Inc., Pleasanton, Stany Zjednoczone) według zaleceń producenta.

#### Immunolokalizacja na skrawkach parafinowych załączków

Z kwiatów łubinu żółtego izolowano całą część płodną, łącznie z dnem, po czym delikatnie nakłuwano sterylną igłą zarówno załącznię, jak i pylniki, a następnie przeniesiono do roztworu do wstępnego utrwalania (4% formaldehyd w 1x PBS). Gdy wszystkie próby były wyizolowane, przeniesiono je do roztworu utrwalającego (2% EDAC, 4% formaldehyd, 1x PBS) i inkubowano przez noc w temp. 4 °C. Następnie próby powolnie odwadniano w serii roztworów etanolu suplementowanego 2% EDAC: 10%, 30%, 50%, każdy po 1 godzinę w temp. 4 °C, a 70% przez noc w temp. 4 °C. Kolejnego dnia kontynuowano odwadnianie: 80%, 96%, 2x 100% każdy po 1 godzinę w temp. 4 °C. Próby przesycały rosnącym stężeniem butanolu poprzez inkubację w mieszaninach etanolu i butanolu w stosunkach: 3:1, 1:1, 1:3 (v:v), zmieniając stężenie co 15 minut, a następnie pozostawiając w 100% butanolu w temperaturze pokojowej. W suchym bloku grzejmym rozgrzano próby do temp. 56 °C i zastępowano butanol mieszaninami butanolu z Paraplastem Plus w następujących proporcjach: 3:1, 1:1, 1:3 po 40 minut. Następnie próby przeniesiono do 100% paraplastu i inkubowano przez noc w temp. 56 °C. Następnego dnia próby przeniesiono do wypełnionej 100% paraplastem foremki i pozostawiono w temperaturze pokojowej do zastygnięcia. Uzyskane bloczki przechowywano w temp. 4 °C do czasu podjęcia kolejnych kroków.

Używając mikrotomu rotacyjnego HM355 S, bloczki pocięto na skrawki o grubości 10 µm i wysuszono w temperaturze 40 °C przez noc. Następnie inkubowano je w temp. 60 °C przez 15 minut i przemywano kolejno różnymi roztworami w celu odparafinowania i nawodnienia: 3 x 100% ksylenu po 10 minut, 100% ksylenu + 100% etanol (1:1) przez 2 minuty, 2 x 100% etanol po 2 minuty, seria wodnych roztworów etanolu po 5 minut - 96%, 85%, 70%, 50%, 30% i ostatecznie woda 2 x po 5 minut. W celu odzyskania antygenu szkiełka inkubowano w rozgrzanym do temp. 95 °C buforze cytrynianowym (10 mM cytrynian sodu, 0,05% Tween-20, pH 6.0) przez 2 minuty, a następnie trzykrotnie płukano w 1x PBS po 5 minut. Preparaty blokowały w 3% frakcji V BSA w 1x PBS w wilgotnej komorze w temp. 4 °C przez 1 godzinę, a następnie inkubowały w temp. 4 °C przez noc w roztworze przeciwciał pierwotnych króliczych anti-IAA (Agrisera, nr kat. AS06 193) w proporcji 1:60, sporządzony w 1% frakcji V BSA, 1x PBS. Następnego dnia próby przepłukano 1x PBS, inkubowały przez 10 minut w 0,3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1x PBS w celu dezaktywacji endogennych peroksydaz i przepłukano dwukrotnie 1x PBS po 5 minut. Na szkiełka nałożono roztwór przeciwciał wtórnych anti-króliczych wyznakowanych HRP (Agrisera, nr kat. AS10 833), sporządzony w 1% frakcji V BSA, 1x PBS

w proporcji 1:150 i inkubowano przez noc w wilgotnej komorze w temp. 4 °C. Po tym czasie próby trzykrotnie przepłukano i wizualizowano za pomocą 0,1% roztworu DAB (w 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> z dodatkiem 0,3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Kontrole ujemne stanowiły próby, w których skrawki były inkubowane w samym roztworze 1% frakcja V BSA, 1x PBS zamiast roztworu przeciwciał pierwotnych.

## Analiza danych pochodzących z sekwencjonowania RNA-Seq mRNA, sRNA i degradomu

Dane wykorzystywane w celu identyfikacji elementów szlaku transdukcji sygnału auksyny oraz sRNA regulujących ich ekspresję pochodzą z sekwencjonowania RNA-Seq mRNA, sRNA i degradomu wykonanego w ramach przyznanego dr Paulinie Glazińskiej projektu SONATA 2015/19/D/NZ9/03601 pt. „Udział niskocząsteczkowych regulatorowych RNA i ich genów docelowych w rozwoju organów generatywnych łubinu żółtego (*Lupinus luteus*)”. Zostały one uzyskane i zwalidowane [136,174] wspólnym wysiłkiem dr Pauliny Glazińskiej (pomysłodawca i koordynator prac), moim oraz mgr. Wojciecha Glinkowskiego (udział w planowaniu i wykonaniu doświadczenia) i zdeponowane w bazie danych LuluDB na stronie <http://luluseqdb.umk.pl/basic/web/> [174]. Szczegóły na temat sekwencjonowania i analiz bioinformatycznych bibliotek mRNA, sRNA i degradomu kwiatów łubinu żółtego można znaleźć w -pracy [136].

### Wstępne filtrowanie danych

Baza LuluDB pozwala na szybki dostęp do danych zarówno na poziomie przeglądarki (funkcje przeglądania „browse” oraz wyszukiwania BLAST), jak i na poziomie programistycznym, dzięki możliwości pobrania na osobisty komputer danych dotyczących m.in. sekwencji, anotacji i ekspresji w formie tabelarycznej. Za pomocą Python 3 pandas dokonano modyfikacji architektury i wstępnego filtrowania danych. Transkrypty anotowane w bazie na podstawie homologii za pomocą BLASTX jako kodujące TIR1/AFB, Aux/IAA, ARF, TOPLESS, SAUR i zawierające kompletne ramki odczytu (zaczynające się kodonem start, kończące się kodonem stop) stanowiły wstępny materiał do dalszej ręcznej rewizji sekwencji. Tak zidentyfikowane białka nazwano, kierując się najbliższym białkiem homologicznym zidentyfikowanym przez BLASTP, dodając przedrostek „L1” i kolejne litery alfabetu na końcu nazwy, licząc od najdłuższego do najkrótszego białka. W nielicznych przypadkach spornych, gdy różne transkrypty zaklasyfikowane do tego samego genu zostały różnie anotowane przez BLASTP, rozstrzygająca była anotacja najdłuższego białka.

Również informacje dotyczące małych regulatorowych RNA (sRNA) pochodzą z bazy LuluDB [174] i obejmują ich sekwencje, anotacje do bazy miRBase, ekspresję oraz potwierdzone przez sekwencjonowanie degradomu transkrypty docelowe. Dodatkowo wykonano analizę potencjalnych genów docelowych za pomocą programu psRNATarget [177] z następującymi parametrami: kara za pary G:U 0,5; kara za inne niedopasowania 1; lokalizacja regionu „seed” między 2 i 13 nukleotydem; dodatkowa waga w regionie „seed” 1,5; liczba niedopasowań akceptowanych w regionie „seed” 2; Kara za otwarcie przerwy 2, a za jej wydłużenie 0,5; minimalna długość sekwencji (HSP size) 19 nukleotydów.

### Alternatywne ramki odczytu

W przypadkach, gdy najdłuższa znaleziona w obrębie transkryptu ramka odczytu koduje prawdopodobnie niefunkcjonalne białko (ARF bez domeny B3), manualnie zrewidowano

sekwencje w poszukiwaniu alternatywnych ramek odczytu za pomocą programu Translate w ExPaSy Tools (<https://web.expasy.org/translate/>).

### Analizy msa

Wszystkie analizy msa (ang. multiple sequence alignment) sekwencji aminokwasowych wykonano za pomocą programu MEGA 11.0.10 [178] przy użyciu algorytmu MUSCLE. Porównania sekwencji zostały zwizualizowane w R za pomocą pakietu ggmsa.

### Analizy filogenetyczne

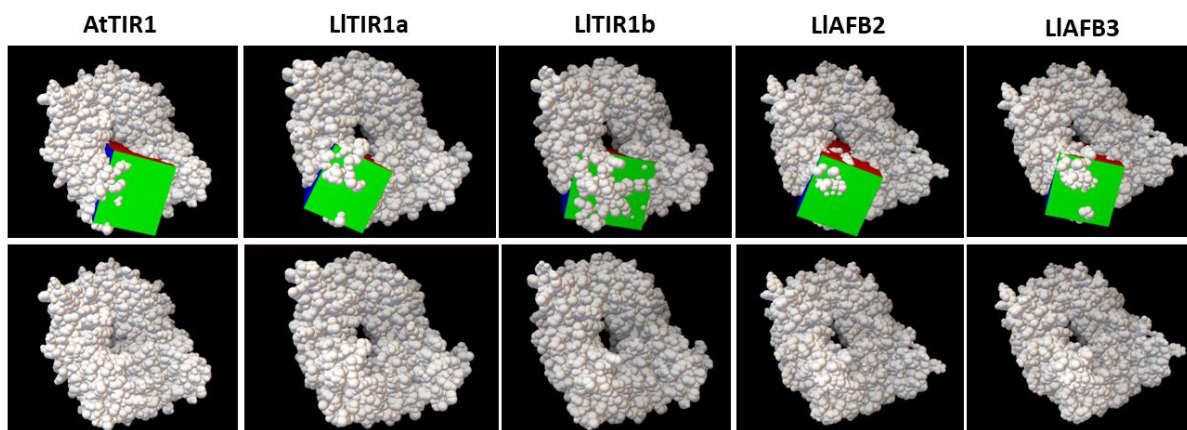
W celu analiz filogenetycznych elementów szlaku transdukcji sygnału auksyn zidentyfikowanych w kwiatach łubinu żółtego z bazy Gene NCBI dostępnej na stronie <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene> uzyskano sekwencje aminokwasowe białek homologicznych zidentyfikowanych u *Arabidopsis thaliana* (rzodkiewnik zwyczajny) [179–183] oraz roślin bobowatych: *Lupinus angustifolius* (łubin wąskolistny) [184], *Glycine max* (soja warzywna) [185], *Cajanus cajan* (nikla indyjska) [186], *Medicago truncatula* (lucerna) [187] i *Vigna angularis* (fasola adzuki) [188]. Na podstawie analiz msa wykonano analizy filogenetyczne, wykorzystując metodę największego prawdopodobieństwa (the maximum likelihood, ML) w modelu JTT ze 100 powtórzeniami (ang. bootstraps), a drzewa filogenetyczne zostały zwizualizowane w programie the Interactive Tree of Life (iTOL) v.5 [189].

### Analiza strukturalna przewidywanych jądrowych receptorów auksyny TIR1/AFB3

Strukturę trzeciorzędową białka AtTIR1 oraz kieszeń wiążącą kwas indoliloctowy zwizualizowano na podstawie danych dostępnych w bazie PDB (rcsb.org, [190]) (identyfikator AtTIR1 z bazy PDB: 2P1P [191]) za pomocą wbudowanego narzędzia NGL viewer [192]. Strukturę trzeciorzędową przypuszczalnych białek z rodziny TAAR modelowano za pomocą narzędzia I-TASSER (<https://zhanggroup.org/I-TASSER/> [193]). najpierw do .pdb za pomocą Pymol 2.5.2, a następnie do .pdbqt. za pomocą AutoDockTools 1.5.7. Struktury trzeciorzędowe omawianych białek zwizualizowano za pomocą programu Chimera 1.15.

### Dokowanie molekularne TIR1/AFB-ligand

Molekularne dokowanie zidentyfikowanych białek z rodziny TAAR wykonano za pomocą narzędzi AutoDockTools 1.5.7 i PyMol 2.5.2. Przed dokowaniem ze struktury białek usunięto cząsteczki wody, dodano wodory polarne oraz dodano ładunki Kolmara, a następnie zapisano w formacie .pdbqt. Struktury trzeciorzędowe kwasu indolilo-3-octowego, kwasu 1-naftyloctowego i pikloramu (CID 802, 6862 i 15965; auksyny), kwasu jasmonowego i tryptofanu (CID 5281166 i 6305; kontrole negatywne) pobrano ze strony Pubchem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>, [194]) w formacie .sdf, a następnie konwertowano plik na .pdb za pomocą PyMol i do .pdbqt przy użyciu OpenBabel 3.1.1, dodając atomy wodoru przy założeniu pH 7,2. Strefę dokowania (ang. grid) ograniczono do obszaru pierścienia LRR (Rycina 12). Dokowanie wykonano za pomocą AutoDock Vina przy parametrach: 50 powtórzeń algorytmu, wielkość populacji 300. Wygenerowano pliki .pdbqt (lokalizacja dokowanego ligandu), oraz .txt z informacją o energii dokowania.



Rycina 12. Strefy dokowania (and. grid) wybrane dla każdego z analizowanych białek z rodziny TAAR. Górne panele pokazują grid nałożony na model białka, dolne panele przedstawiają sam model białka, co umożliwia pełen ogląd na strefę dokowania.

### Analiza domen białek z rodzin Aux/IAA i ARF

Koordinaty domen: DBD i Aux\_resp w przypadku ARF, oraz PB1 u Aux/IAA i ARF zostały uzyskane, bazując na anotacji Pfam, wykonanej w ramach wstępnej, wysokoprzepustowej analizy bioinformatycznej przez firmę Ideas4biology, której wyniki są dostępne w bazie LuluDB [174]. Jako sekwencję domeny środkowej (MD) u ARF traktowano sekwencję zaczynającą się od pierwszego aminokwasu tuż po Aux\_resp, aż do ostatniego, tuż przed początkiem domeny PB1. Jeśli dany ARF był pozbawiony domeny PB1, uznano, że domena MD ciągnie się do końca C białka. Sekwencje domeny ES (ETT-Specific) u ARF3 zostały zidentyfikowane na podstawie danych literaturowych [93]. Domeny I i II w białkach Aux/IAA zidentyfikowano na podstawie obecności kluczowych motywów: EAR (LxLxL) w domenie I i GWPPV w domenie II. Sygnały lokalizacji jądrowej (NLS) zostały zlokalizowane na podstawie danych literaturowych.

Skład aminokwasowy domeny środkowej obliczono używając MEGA 11.0.10 [178] i zwizualizowano za pomocą pakietu R ggplot2.

Domeny PB1 przewidywanych białek LIIAA14a i LIARF6a modelowano za pomocą I-TASSER (<https://zhanggroup.org/I-TASSER/> [193]), w wyniku czego uzyskano ich struktury 3D w formacie .pdb, które następnie zwizualizowano za pomocą programu Chimera 1.15, zaznaczając aminokwasy obdarzone ładunkiem.

### Ekspresja genów na podstawie danych pochodzących z sekwencjonowania transkryptomów

Dane dotyczące zarówno ekspresji wybranych genów, jak i akumulacji dojrzałych cząsteczek miRNA zostały pozyskane z LuluDB [174], a ich architektura została dostosowana do aktualnych potrzeb za pomocą pakietu Pandas dla Python. Akumulacja transkryptów jest wyrażona w jednostkach FPKM (Fragments Per Kilobase Million), co oznacza liczbę zsekwencjonowanych fragmentów przypisanych do danego transkryptu, znormalizowaną na milion odczytów dla całkowitego RNA i na długość transkryptu liczoną w kb. Akumulacja miRNA jest wyrażona w RPM (Reads per Milion), co oznacza liczbę odczytów dla danego miRNA znormalizowaną do miliona odczytów dla wszystkich sRNA (włączając siRNA). Korelacja między ekspresją mRNA i miRNA została określona na podstawie współczynnika

korelacji Pearsona (PCC), obliczonego w arkuszu kalkulacyjnym MS Excel. Dane zostały zwizualizowane za pomocą pakietu dla R ComplexHeatmap.

#### **Analiza danych dotyczących identyfikacji genów docelowych dla miRNA**

Dane z sekwencjonowania degradomu były analizowane przez zewnętrzną firmę Ideas4Biology przy użyciu programu CleaveLand4 [195].

Wykonano również predykcję *in silico* genów docelowych zidentyfikowanych miRNA za pomocą programu psRNATarget [177], który na podstawie wzorca komplementarności badanych par miRNA/mRNA nadaje ich interakcji punkty rankingowe (score). Im jest on niższy, tym wyższe prawdopodobieństwo cięcia cząsteczki docelowej, a wraz z jego wzrostem rośnie prawdopodobieństwo, że miRNA hamuje ekspresję genu na poziomie translacji lub modyfikacji chromatyny. Aby uniknąć zbyt dużej liczby fałszywie pozytywnych wyników, ustalono punkt odcięcia dla "expectation value" = 4,0. Wykorzystując pakiet R circos, sporządzono wykres przedstawiający wielokierunkowość regulacji akumulacji transkryptów kodujących białka LITAAR, LIAux/IAA i LIARF przez miRNA.

#### **Analiza ekspresji genów metodą real-time qPCR**

##### **Homogenizacja tkanki**

Tkanka została mechanicznie zhomogenizowana w mózdzierzu w ciekłym azocie. Utartą tkankę następnie rozdzielano do osobnych probówek po 90-100 mg i w takiej formie używano do dalszych procedur (izolacji RNA lub oznaczania zawartości proliny).

##### **Zestawy użyte do izolacji RNA, odwrotnej transkrypcji i qPCR**

Ze względu na zmieniający się zakres finansowania badań oraz różną ofertę firm zajmujących się dystrybucją odpowiednich zestawów do eksperymentów wykonywanych w ramach pracy doktorskiej, wykorzystano różne zestawy do izolacji RNA, odwrotnej transkrypcji i qPCR (Tabela 6). W obrębie poszczególnego eksperymentu stosowano zawsze ten sam komplet zestawów.



Tabela 6. Zestawienie zestawów używanych do izolacji RNA, syntezy cDNA i qPCR.

Eksperyment	Etap eksperymentu		
	Izolacji RNA	Odwrotnej transkrypcji	qPCR
Rozwój kwiatów z dolnych i górnych okółków	Isolate II RNA Mini Kit (Bioline Ltd., Londyn, Wielka Brytania)	TRANSCRIPTME RNA Kit (Blirt, Gdańsk, Polska)	KAPA Probe Fast qPCR kit Master Mix
Rozwój kwiatów z górnych okółków po usunięciu wszystkich kwiatów z niższych pięter	miRNeasy Mini kit (QIAGEN, Hilden, Niemcy) – wariant procedury z trawieniem DNA na kolumnie	NG dART RT kit (EurX, Gdańsk, Polska)	LightCycler 480 Probes Master (Roche Molecular Systems, Inc., Pleasanton, Stany Zjednoczone)
Susza	miRNeasy Mini kit (QIAGEN, Hilden, Niemcy) – wariant procedury z trawieniem DNA na kolumnie	NG dART RT kit (EurX, Gdańsk, Polska)	SensiFAST Probe No-ROX Kit (Bioline Ltd., Londyn, Wielka Brytania)

### Izolacja całkowitego RNA

Całkowite RNA było izolowane metodą kolumnkową za pomocą gotowych zestawów, zgodnie z zaleceniami producenta. W przypadku izolacji za pomocą zestawu miRNeasy Mini kit (QIAGEN, Hilden, Niemcy) stosowano procedurę z dodatkowym trawieniem DNA na minikolumnie.

### Sprawdzenie jakości i ilości RNA

Jakość RNA była każdorazowo sprawdzana za pomocą elektroforezy w żelu agarozowym 1,2%, w buforze 1x TAE. Warunki wolne od RNaz uzyskiwano poprzez całonocną inkubację aparatu do elektroforezy oraz saneczek i grzebieni w 3% roztworze nadtlenu wodoru. Stężenie RNA i parametry jakości:  $A_{260}/A_{280}$  i  $A_{260}/A_{230}$  mierzono przy użyciu NanoDrop 1000 (Thermo Scientific, Wilmington, Delaware USA). Do dalszych analiz brano wyłącznie RNA, które nie wykazywało oznak degradacji ani zanieczyszczenia DNA genomowym, a ich parametry czystości  $A_{260}/A_{280}$  i  $A_{230}/A_{280}$  znajdowały się w zakresie 1,8-2,2.

### Reakcja odwrotnej transkrypcji

RNA wyizolowane z określonych wariantów eksperymentalnych zostało poddane dalszym procedurom. Każde doświadczenie było przeprowadzane w jednolitych warunkach, z wykorzystaniem tych samych procedur.

### Reakcja odwrotnej transkrypcji do analizy mRNA

Reakcję odwrotnej transkrypcji przeprowadzono za pomocą zestawu TRANSCRIPTME RNA Kit (Blirt, Gdańsk, Polska), lub NG dART RT (EurX, Gdańsk, Polska) zgodnie z zaleceniami producenta. Szczegóły dotyczące składu mieszanin zawierają Tabela 7 i Tabela 8.

Tabela 7. Skład mieszaniny reakcyjnej zestawu do odwrotnej transkrypcji TRANSCRIPTME RNA Kit (Blirt, Gdańsk, Polska).

<b>Składnik</b>	<b>Objętość na 20 <math>\mu</math>l</b>
2x RT Master Mix	10 $\mu$ l
TRANSCRIPTME Enzyme Mix	2 $\mu$ l
RNA	$\leq 5 \mu$ g
Woda wolna od nukleaz	do 20 $\mu$ l

Tabela 8. Skład mieszaniny reakcyjnej zestawu do odwrotnej transkrypcji NG dART RT kit (EurX, Gdańsk, Polska).

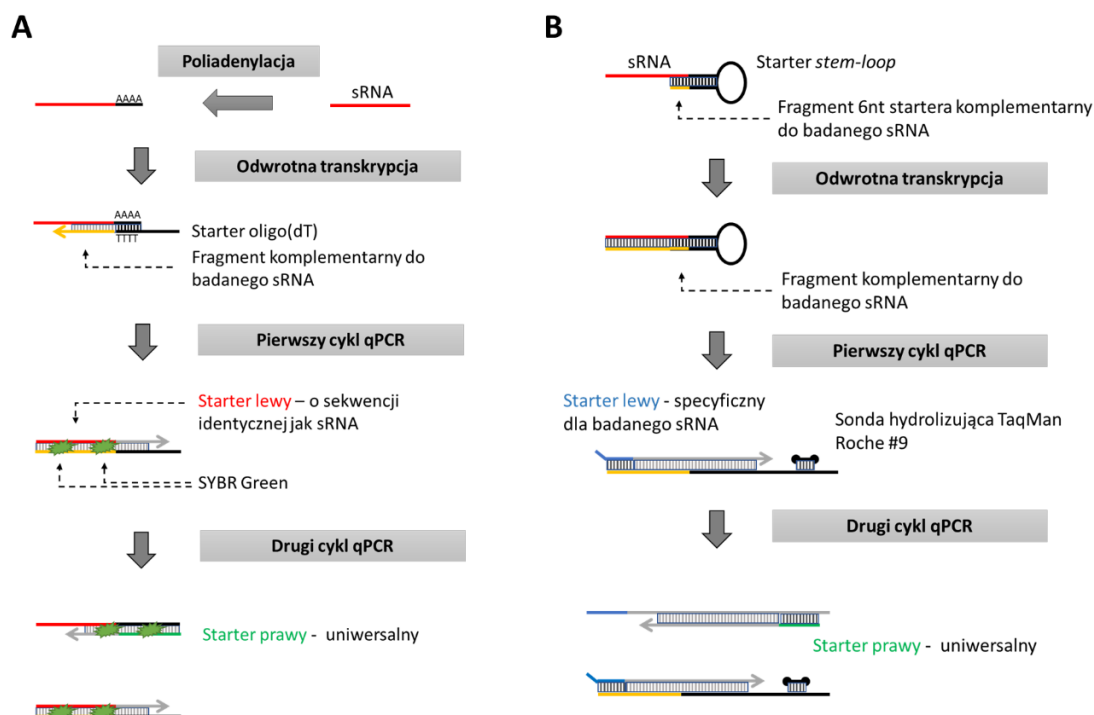
<b>Składnik</b>	<b>Objętość na 20 <math>\mu</math>l</b>
NG dART RT Mix	1 $\mu$ l
50 $\mu$ M oligo(dT)	1 $\mu$ l
5X NG cDNA buffer	4 $\mu$ l
RNA	$\leq 5 \mu$ g
Woda wolna od nukleaz	do 20 $\mu$ l

#### **Reakcja odwrotnej transkrypcji do analizy miRNA**

W celu uzyskania jak najwyższej specyficzności do analizy ekspresji miRNA zastosowano metodę ze starterami o strukturze spinki do włosów, opracowaną przez Kramera i wsp. [196] i zmodyfikowaną przez Varkonyi-Gasic i wsp. [197] i naszą grupę tak, aby w reakcji qPCR stosować sondę UPL #9 zamiast #21 [136]. Przewagę takiej metody analizy ekspresji miRNA względem klasycznego podejścia przedstawia Rycina 13. Listę starterów użytych do odwrotnej transkrypcji przedstawia Tabela 9.

Tabela 9. Lista starterów typu stem-loop użytych do reakcji odwrotnej transkrypcji, przeprowadzonej w celu analizy akumulacji mikro RNA.

<b>Mikro RNA (ID z LuluDB/anotacja)</b>	<b>Sekwencja startera użytego do odwrotnej transkrypcji</b>
L1-miR224/miR393	GTCATCACCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCG CACTGGTGATGACGGATCA
L1-miR333/miR160	GTCATCACCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCG CACTGGTGATGACTGGCAT
L1-miR281/miR167	GTCATCACCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCG CACTGGTGATGACTCAGAT



Rycina 13. Zasada analizy ekspresji miRNA za pomocą: **A.** klasycznego podejścia z poliadenylacją i starterem oligo(dT), oraz **B.** metody z użyciem startera typu stem-loop.

Mieszanina reakcyjna zawierała: elementy zestawu SuperScript III Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, Stany Zjednoczone), inhibitor RNaz RNase inhibitor (EURx Sp. z o.o., Gdańsk, Polska) i mieszanina nukleotydów (EURx Sp. z o.o., Gdańsk, Polska), szczegóły zawiera Tabela 10. Przed dodaniem do mieszaniny reakcyjnej, starter typu stem-loop wymagał wstępnej denaturacji, która polegała na inkubacji w temp. 65 °C przez 5 minut, następnie inkubację na lodzie przez 2 minuty. Tak przygotowany starter wymieszano i zwirowano, a następnie trzymano w lodzie do momentu złożenia mieszaniny.

Reakcja przeprowadzana była w trybie pulsacyjnym według [197] w termocyklerze MJ Mini Personal Thermal Cycler (Bio-Rad, Hercules, CA, Stany Zjednoczone). Opis użytego programu przedstawia Tabela 11.

Tabela 10. Skład mieszaniny reakcyjnej użytej do syntezy cDNA na matrycy miRNA. \* Użyty starter był projektowany indywidualnie dla każdego miRNA.

Składnik	Ilość na 1 próbę	Stężenie końcowe
5x first-strand buffer	2 µL	1x
10 mM dNTP mix	0,25 µL	0,25 mM
0,1 M DTT	1 µL	10 mM
7,5 U/µL Inhibitor RNaz	0,04 µL	0,3 U
2,5 mM stem-loop primer*	0,385 µL	0,09 mM
200 U/µL SuperScript III RT	0,125 µL	25 U
RNA	440 ng	44 ng/µL
woda	Do 10 µL	-

Tabela 11. Warunki reakcji odwrotnej transkrypcji zastosowane do syntezy cDNA na matrycy miRNA.

<b>Etap</b>	<b>Temperatura [°C]</b>	<b>Czas trwania</b>	<b>Liczba cykli</b>
Inkubacja wstępna	16	30 minut	1
Odwrotna transkrypcja	30	30 sekund	60
	42	30 sekund	
	50	1 sekunda	
Terminacja	85	5 minut	1

### Reakcja *real-time* qPCR

Do reakcji PCR użyto różnych zestawów w zależności od aktualnej oferty na rynku. Każde doświadczenie było przeprowadzane w jednakowych warunkach.

Do analiz ekspresji genów przed zsekwencjonowaniem transkryptomów kwiatów łubinu żółtego, używano elementów (starterów i sond UPL, Tabela 12) zaprojektowanych na podstawie sekwencji genów zidentyfikowanych klasycznymi metodami (amplifikacja za pomocą zdegenerowanych starterów i sekwencjonowanie produktu PCR i RACE-PCR) (prace magisterskie: mgr Magdy Dunajskiej (Toruń, 2013), mgr Magdaleny Ogrodzińskiej (Toruń, 2013 i mgra Jakuba Kopy (Toruń, 2014)). W pracy przedstawiono analizy dotyczące tylko tych transkryptów, u których potwierdzono kompletność kodowanych białek.

Po uzyskaniu danych z sekwencjonowania transkryptomów i identyfikacji transkryptów kodujących funkcjonalne elementy transdukcji sygnału auksyn, zaprojektowano nowy zestaw starterów i sond do analizy ekspresji wybranych genów (Tabela 13).

Dzięki zastosowaniu startera typu stem-loop do reakcji odwrotnej transkrypcji dla sRNA, do analizy ekspresji mRNA i miRNA można było stosować te same odczynniki i te same warunki reakcji. Zestaw starterów do analizy akumulacji dojrzałych miRNA prezentuje Tabela 14. Zestawy do reakcji qPCR używano zgodnie z zaleceniami producenta, a skład mieszanin dla poszczególnych zestawów przedstawiają Tabela 15 i Tabela 16. Warunki reakcji przedstawia natomiast Tabela 17.

Tabela 12. Dane dotyczące projektowania reakcji qPCR wykonywanych przed zsekwencjonowaniem transkryptomów. W późniejszym czasie zweryfikowano, które transkrypty były namnażane w przeprowadzonych reakcjach i przypisano im ID z bazy LuluDB.

<b>Gen</b>	<b>Identyfikator genu z LuluDB</b>	<b>Sekwencja startera lewego</b>	<b>Sekwencja startera prawego</b>	<b># Sondy UPL (Roche)</b>	<b>Sekwencja amplikonu</b>
<i>LIACT4</i>	FTRINITY_D N57887_c0_g 2 (i5,i17,i19)	TGGACGTACTACAGG TATTGTGC	ATGGGCACTGTATGGC TCAC	#9	TGGACGTACTACAGGTATTGTGCTCGATTCTGGTGATGGTG TGAGCCACACAGTGCCCAT
<i>LIAFB3</i>	FTRINITY_D N49353_c0_g 1 (i1-i4)	ATGCTGAGCAGCTTG AAATG	TCTTGCATCCGTTCAA AACA	#67	ATGCTGAGCAGCTTGAAATGTTGTCTATTGCCTTTGCTGGA GAGAGTGACAAGGGAATGCTCTATGTTTTGAACGGATGCA AGA
<i>LIIAA14</i>	FTRINITY_D N57862_c1_g 1 (i1-i6)	CTGAGGTGGAAACTC CAAGG	TCAGATCAACAGTCTC AGAGAACC	#103	CTGAGGTGGAAACTCCAAGGGCCAATGGGAAGAGAGGGT TCTCTGAGACTGTTGATCTGA
<i>LIARF4</i>	FTRINITY_D N58929_c1_g 3 (i4,i6-i10)	AATTTTCGTCATATTT ATAGAGGTCAGC	GAAATAAGATTCTTTC GGCTAACAA	#20	AATTTTCGTCATATTTATAGAGGTCAGCCAGGCGGCATCTG CTCACTACTGGCTGGAGTATTTTTGTTAGCCGAAAGAATCT TATTTTC
<i>LIARF6</i>	FTRINITY_D N57891_c1_g 1 (i1,i6,i9,i11)	GCTGTGCTGTTTATC TGGAATG	TCACAGTTTGTGGTCG ATTTG	#142	GCTGTGCTGTTTATCTGGAATGAGAAGAACCAATTGCTTCT TGGCATTTCGGCGGGCAAATCGACCACAAACTGTGA

Tabela 13. Dane dotyczące projektowania reakcji qPCR wykonywanych po zsekwencjonowaniu transkryptomów.

Gen	Identyfikator genu z LuluDB	Sekwencja startera forward	Sekwencja startera reverse	# Sondy UPL (Roche)	Sekwencja amplikonu
<i>LIACT4</i>	FTRINITY_DN57887_c0_g2 (i5,i17,i19)	TGGACGTACTACAGGTA TTGTGC	ATGGGCACTGTATGGCTC AC	#9	TGGACGTACTACAGGTATTGTGCTCGATTCTGGTGATGGTGTGAGC CACACAGTGCCCAT
<i>LICER1</i>	FTRINITY_DN49804_c0_g2_i2	GCCAGTGGAGTTTATTT ACTATTGG	GGTGAGAATGGTAACGAG AGTAGAG	#9	GCCAGTGGAGTTTATTTACTATTGGTTACACAGAGCACTTCATCAC CATTTTCTCTACTCTCGTTACCATTCTCACC
<i>LILAC2</i>	FTRINITY_DN53401_c3_g3_i7	GGCCTCGAGTTGTTGCT AGA	GAACATGATTAACCACCC TAACAAT	#94	GGCCTCGAGTTGTTGCTAGAGAAGGAGACAGATTAATTGTTAGGGT GGTTAATCATGTTC
<i>LIVOZ1</i>	FTRINITY_DN56786_c2_g2_i1	TTCAGACCTGCTCAAGG GTTA	TCGCCAAAAGTTTGTGAC C	#145	TTCAGACCTGCTCAAGGGTTAACATGTTGCCAGGACTATTGTAGCA GTGGTCACAACTTTTGCCGA
<i>LIPROT2</i>	FTRINITY_DN58589_c4_g2_i,13,12,10,9,7,4,2	TGGCCTCACTTCTGCTC ATA	GCTTGTCCACCAACAACAA CC	#145	TGGCCTCACTTCTGCTCATACTATTGACCACGATTCGTGGCAAC AAGTTGGGTTGTTGTTGGTGACAAGC
<i>LINF-YA5</i>	FTRINITY_DN53072_c5_g1_i1	AATTTTAGGCAGACGGA GCA	GTTCCACCAAAGGTGAGT CC	#55	AATTTTAGGCAGACGGAGCACATGTTCCCTGGGGAACCTCTACAAA CATAGGAGAGGATCACAGTGCTAGTGGACTCACCTTGGTGGAA C
<i>LIAFB3</i>	FTRINITY_DN49353_c0_g1 (i1-i4)	ATGCTGAGCAGCTTGAA ATG	TCTTGCATCCGTTCAAAA CA	#67	ATGCTGAGCAGCTTGAAATGTTGTCTATTGCCTTTGCTGGAGAGAG TGACAAGGGAATGCTCTATGTTTTGAACGGATGCAAGA
<i>LIARF6A</i>	FTRINITY_DN57891_c1_g1_i1	GGCAGCTTGTATTTGTT GACC	TTACGAACTCCGCCAAG	#9	GGCAGCTTGTATTTGTTGACCGAGAGAATGACGTTCTTCTCCTTGG TGATGGCCCTTGCCGGAGTTCGTAA
<i>LIARF6A</i>	FTRINITY_DN57891_c1_g1_i10	CCATGCTGAATATGCAA ACAG	GGATCTACAGTCCTCATA TCTTGGAG	#5	CCATGCTGAATATGCAAACAGATATGTATCAAGCTGTGGCTGCTGC TGCGCTCCAAGATATGAGGACTGTAGATCC

<b>Gen</b>	<b>Identyfikat or genu z LuluDB</b>	<b>Sekwencja startera forward</b>	<b>Sekwencja startera reverse</b>	<b># Sondy UPL (Roche)</b>	<b>Sekwencja amplikonu</b>
<b><i>LIARF18A</i></b>	FTRINITY_ DN53543_c 0_g1_i17	TGGCATCTGGGTTTGGA TA	CAAGTCTAGGGTCCTTCC AACAA	#94	TGGCATCTGGGTTTGGATACTACTGGTCATTGTAAGGTTTTTCATGG AGACAGAAGATGTTGGAAGGACCCCTAGACTTG
<b><i>LIARF18B</i></b>	FTRINITY_ DN53543_c 0_g2_i4	TGCCCCAAACTTTAACT CAATCTG	TCTGCACAATACCTTGGA ACAG	#138	TCGGGGTGTTTTCCAACATAACATTCAGCAGCTCAATTTGCATGCTGC CGGGATTTTGAATGGCAACGTG
<b><i>LIARF18C</i></b>	FTRINITY_ DN56991_c 0_g1_i8	GCAAATTTTCTGATGGT AATGGA	TTCACAAAAGGAGCATTC CTG	#9	GCAAATTTTCTGATGGTAATGGATCAACTCGTCATCACCACGGCCT ACAGGAATGCTCCTTTTGTGAA

Tabela 14. Lista starterów użytych do reakcji qPCR, przeprowadzonej w celu analizy akumulacji mikro RNA. W każdej z tego typu reakcji użyto sondy UPL #9.

Mikro RNA (ID z LuluDB/anotacja)	Typ startera	Sekwencja startera
L1-miR224/miR393	lewy	CACGCATCCAAAGGGATCGCATT
L1-miR333/miR160	lewy	CAATCATGCCTGGCTCCCTGTAT
L1-miR281/miR167	lewy	CACGCATGAAGCTGCCAGCATGA
uniwersalny	prawy	CCAGTGCAGGGTCCGAGGTA

Dla każdego z trzech powtórzeń biologicznych wykonano po trzy powtórzenia techniczne. Dane eksportowano do arkusza kalkulacyjnego MS Excel, obliczono wartość  $2^{-\Delta C_p}$  i przeprowadzono analizę statystyczną ANOVA i test *post-hoc* Tukeya. Gen referencyjny stanowiła *LICT4*, tak jak w [136,174].

Tabela 15. Skład mieszaniny reakcyjnej zestawu KAPA PROBE FAST qPCR Master Mix.

Składnik	Objętość na 1 reakcję
KAPA PROBE FAST qPCR Master Mix (2X) - Universal	5,5 $\mu$ L
Starter lewy (100 $\mu$ M)	0,2 $\mu$ L
Starter prawy (100 $\mu$ M)	0,2 $\mu$ L
UPL	0,1 $\mu$ L
Matryca (cDNA)	5 $\mu$ L

Tabela 16. Skład mieszaniny reakcyjnej zestawu LightCycler 480 Probes Master (ROCHE) i SensiFAST Probe No-ROX Kit (Bioline).

Składnik	Objętość na 1 reakcję
LightCycler 480 Probes Master, 2x conc. lub SensiFAST Probe No-ROX Master Mix (2X)	5,2 $\mu$ L
Starter lewy (100 $\mu$ M)	0,05 $\mu$ L
Starter prawy (100 $\mu$ M)	0,05 $\mu$ L
UPL	0,1 $\mu$ L
Matryca (cDNA)	5 $\mu$ L



Tabela 17. Warunki reakcji real-time qPCR.

Etap	Temperatura [°C]	Czas	Liczba cykli	Detekcja sygnału
Denaturacja wstępna	95	10 minut	1	nie
Denaturacja	95	10 sekund	45	nie
Przyłączanie starterów	58 dla mRNA 59 dla miRNA	30 sekund		nie
Wydłużanie	72	1 sekunda		465/510nm (exc/em)
Ochładzanie	Do 40	30 sekund	1	nie

### Oznaczanie ilości proliny w kwiatach

W celu oznaczenia ilości proliny w kwiatach zastosowano metodę biochemiczną polegającą na pomiarze spektrofotometrycznym barwnego produktu reakcji kwaśnej ninhydryny z proliną wg [198]. Przed przystąpieniem do procedury przygotowano roztwór kwaśnej ninhydryny. Do naczynia zawierającego 1,25 g ninhydryny dodano 30 mL lodowatego kwasu octowego i 20 mL 6M kwasu ortofosforowego, a następnie mieszano z jednoczesnym podgrzewaniem do temp. 50 °C do całkowitego rozpuszczenia ninhydryny. Sporządzono także roztwory referencyjne L-proliny w stężeniach: 0, 10, 25, 50, 100 i 200 µg/ml w 3% kwasie sulfosalicylowym. Do odpowiedniej ilości zmrożonej i utartej w ciekłym azocie tkanki (16-63 mg) dodano 250 µL roztworu 3% kwasu sulfosalicylowego (m/v) i wytrząsano za pomocą homogenizatora kulkowego TissueLyser (QIAGEN, Hilden, Niemcy) przez 5 minut z maksymalną mocą (30 Hz). Próby wirowano przez 5 minut w 13 400 rpm w temperaturze pokojowej. Do nowych probówek zawierających po 50 µL 3% kwasu sulfosalicylowego, 100 µL lodowatego kwasu octowego i 100 µL kwaśnej ninhydryny dodano 50 µL ekstraktu lub roztworu kalibracyjnego. Rozżarzoną igłą preparacyjną nakłuto probówki i inkubowano przez 60 minut w łaźni wodnej nastawionej na 96 °C. Reakcję proliny z ninhydryną zatrzymano, kładąc próby na lodzie. Czerwony produkt tej reakcji ekstrahowano dodając 0,6 mL toluenu, wytrząsając przez 20 sekund i inkubując w temperaturze pokojowej przez 5 minut w celu rozdzielenia się faz. Górną fazę (toluenową) przenoszono do nowej probówki. Za pomocą spektrofotometru Shimadzu SPD-M20A mierzono absorbancję przy długości fali 520 nm, używając toluenu jako roztworu odniesienia. Na podstawie danych uzyskanych dla roztworów referencyjnych wykonano krzywą kalibracyjną i ustalono wzór krzywej dopasowanej metodą najmniejszych kwadratów. Każdy porównywany wariant został wykonany w trzech niezależnych powtórzeniach biologicznych.

### Badania termograficzne roślin

Za pomocą kamery termowizyjnej FLIR T560 wykonano termogramy przy parametrach odpowiednich do analizy termograficznej roślin [199]. Po ścięciu rośliny z wariantu kontrolnego i wariantu suszy układano w miejscu o zminimalizowanych wartościach temperatury odbitej. Dla każdej takiej pary wykonywano zdjęcia w dwóch ustawieniach, zamieniając rośliny miejscami, aby mieć pewność, że różnice w pomiarach temperatur nie

wynikają z miejsca, w którym się te rośliny znajdują. W nielicznych przypadkach, w których nie wykazywały one wyraźnych różnic w temperaturze, wariant suszowy zostawał odrzucony.

## Wyniki

### Cechy morfologiczne kwiatów pochodzących z okółków górnych i dolnych kwiatostanu

#### Wielkość załązni łubinu żółtego v. Taper

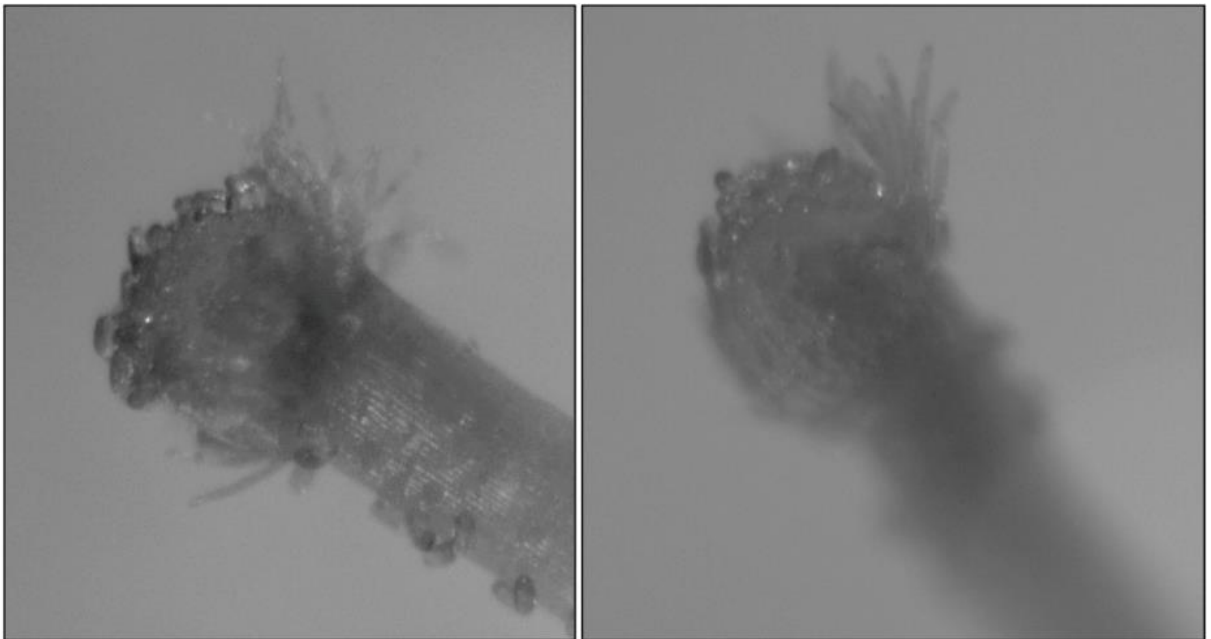
Kwiaty z okółków dolnych i górnych wykazują różnicową morfologię dopiero w stadium 4, który następuje po pełnym otwarciu i zapyleniu kwiatu (np. Rycina 11, Rycina 1). Wówczas załąznia kwiatów dolnych ulega powiększeniu, a w kwiatach górnych pozostaje taka sama jak w stadium 3.

#### Funkcjonalność pyłku łubinu żółtego v. Taper

W celu zweryfikowania hipotezy, wedle której odcinanie kwiatów z górnych okółków jest spowodowane niefunkcyjnym pyłkiem, niezdolnym do retencji na znamieniu i kiełkowania, wykonano obserwacje mikroskopowe znamion otwartych kwiatów będących w pełnej antezie oraz analizę zdolności kiełkowania pyłku *in vitro*.

#### Obecność pyłku na znamieniu

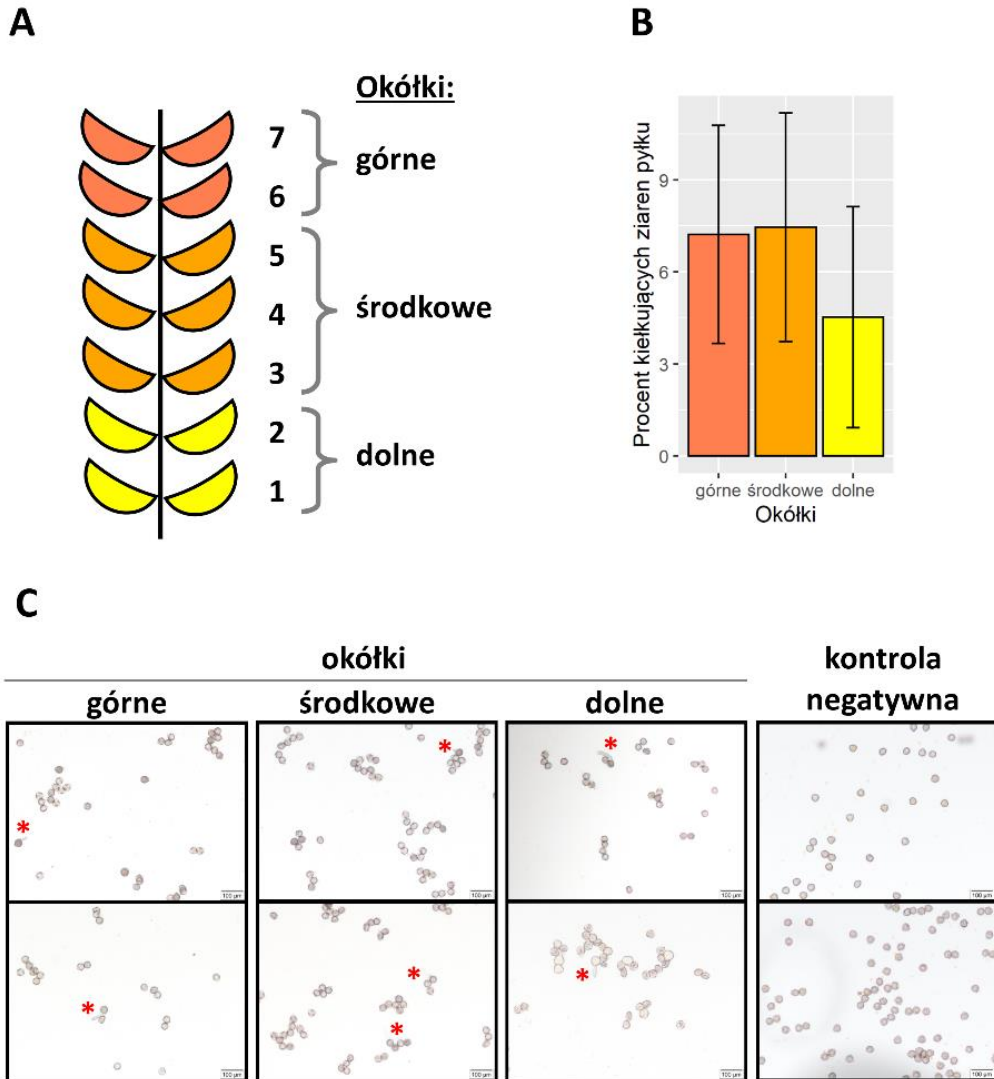
Analiza mikroskopowa znamion kwiatów pochodzących ze skrajnych okółków (Rycina 14) wykazała, że pyłek ulega retencji niezależnie od pozycji kwiatu na osi kwiatostanu.



Rycina 14. Zdjęcia znamion słupków wyizolowanych z kwiatów rozwijających się na szczytowych (po lewej stronie) i najniższych (po prawej stronie) okółkach kwiatostanu.

### Kiełkowanie pyłku *in vitro*

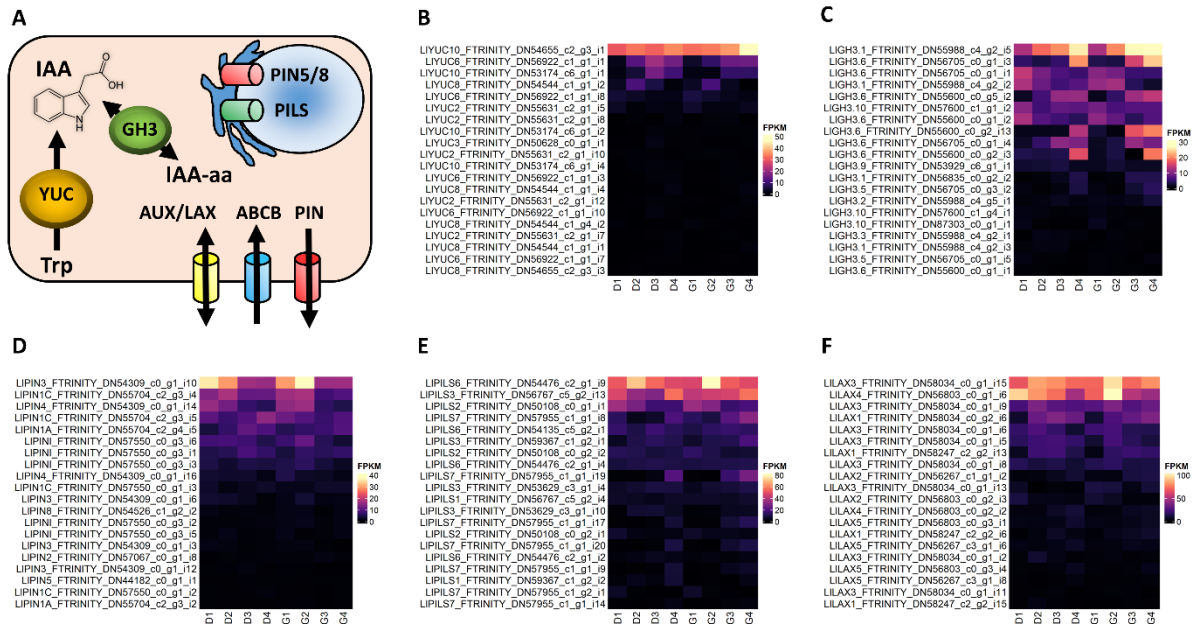
Wykonana analiza *in vitro* kiełkowania pyłku pobranego z roślin rosnących w warunkach polowych wykazała brak statystycznie istotnych różnic między preparatami sporządzonymi z materiału pochodzącego z różnych okółków łubinu żółtego (Rycina 15). Daje się jednak zauważyć, że średni procent kiełkujących ziaren pyłku pochodzącego z wyższych okółków jest dwa razy wyższa niż w przypadku niższych okółków.



Rycina 15. Zdolność kiełkowania pyłku pobranego z kwiatów zlokalizowanych na różnych piętrach na osi kwiatostanu. A. Schematyczne przedstawienie wariantów eksperymentalnych. Półksiężyce symbolizują kwiaty znajdujące się na etapie 2B rozwoju, liczby oznaczają numer okółka. B. Procentowa zawartość pyłku, który wytworzył łagiewkę w ciągu 24 godzin. Różnice nie są statystycznie istotne (ANOVA i test *post-hoc* Tukeya, poziom ufności 0,95). C. Po dwa reprezentatywne zdjęcia obrazów mikroskopowych dla każdego z wariantów eksperymentalnych. Gwiazdkami zaznaczono widoczne łagiewki pyłkowe. Kontrolę negatywną stanowił termicznie zabity pyłek.

## Ekspresja genów związanych z homeostazą auksyny w tkankach

Na podstawie danych uzyskanych za pomocą sekwencjonowania transkryptomów kwiatów łubinu żółtego, dokonano analizy wzorca ekspresji genów kodujących białka zaangażowane w utrzymanie homeostazy auksyny (należących do rodzin: *YUCCA*, *PIN*, *PILS*, *Aux/LAX* i *GH3*, znaczenie poszczególnych rodzin przedstawia Rycina 16A).



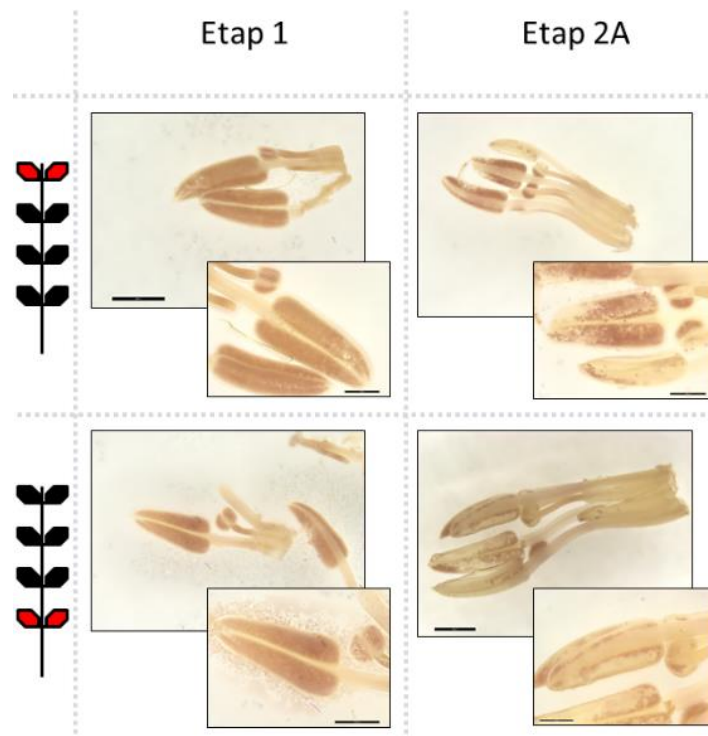
Rycina 16. Akumulacja transkryptów kodujących białka zaangażowane w homeostazę auksyny w kwiatach łubinu żółtego zebranych z okółków dolnych (D1-4) i górnych (G1-4). A. Schemat przedstawiające uproszczone procesy utrzymujące ilość aktywnego IAA na odpowiednim poziomie. B. Wzorec ekspresji 20 najsilniej ekspresjonowanych genów kodujących białka z rodziny YUCCA. C. Wzorec ekspresji 20 najsilniej ekspresjonowanych genów kodujących białka z rodziny GH3. D. Wzorec ekspresji 20 najsilniej ekspresjonowanych genów kodujących transmembranowe transportery wypływu auksyny z rodziny PIN. E. Wzorec ekspresji 20 najsilniej ekspresjonowanych genów kodujących transmembranowe transportery wypływu auksyny z rodzin PILS. F. Wzorec ekspresji 20 najsilniej ekspresjonowanych genów kodujących transmembranowe transportery wypływu auksyny z rodziny Aux/LAX.

W obrębie rodziny genów *YUCCA*, kodujących monooksygenazy flawinowe i biorących udział w biosyntezie IAA, największe znaczenie w rozwoju kwiatów łubinu żółtego wydają się mieć homologi *YUC10* i *YUC8*. Transkrypt *FTRINITY\_DN54655\_c2\_g3\_i1* ulega najsilniejszej ekspresji w kwiatach górnych będących na ostatnim etapie rozwoju, natomiast kodujące odpowiednio *YUC8* i *YUC10* *FTRINITY\_DN56922\_c1\_g1\_i1* i *FTRINITY\_DN53174\_c6\_g1\_i1* wydają się mieć największe znaczenie w kwiatach dolnych etapu trzeciego (Rycina 16B). Transkrypty kodujące białka GH3.1 i GH3.6 wydają się mieć największe znaczenie w regulacji ilości wolnej auksyny, a dwa najsilniej ekspresjonowane transkrypty, *FTRINITY\_DN55988\_c4\_g2\_i5* i *FTRINITY\_DN56705\_c0\_g1\_i3* są charakterystyczne dla późniejszych etapów rozwoju (Rycina 16C). Ekspresja genów kodujących homologi transporterów auksyny, zarówno tych odpowiadających za wypływ (PIN) jak i napływ auksyny do komórki (Aux/LAX), ulega niezwykle dynamicznym zmianom,

zwłaszcza w okolicy 2. etapu rozwoju (Rycina 16D i F). Na szczególną uwagę zasługuje ekspresja genów *LIPILS*, które odpowiadają głównie za transport auksyny na linii cytoplazma-retikulum endoplazmatyczne-jądro komórkowe, których wzrost ekspresji jest charakterystyczny dla drugiego etapu rozwoju kwiatów łubinu żółtego (Rycina 16E).

### Tkankowa lokalizacja IAA w kwiatach łubinu żółtego

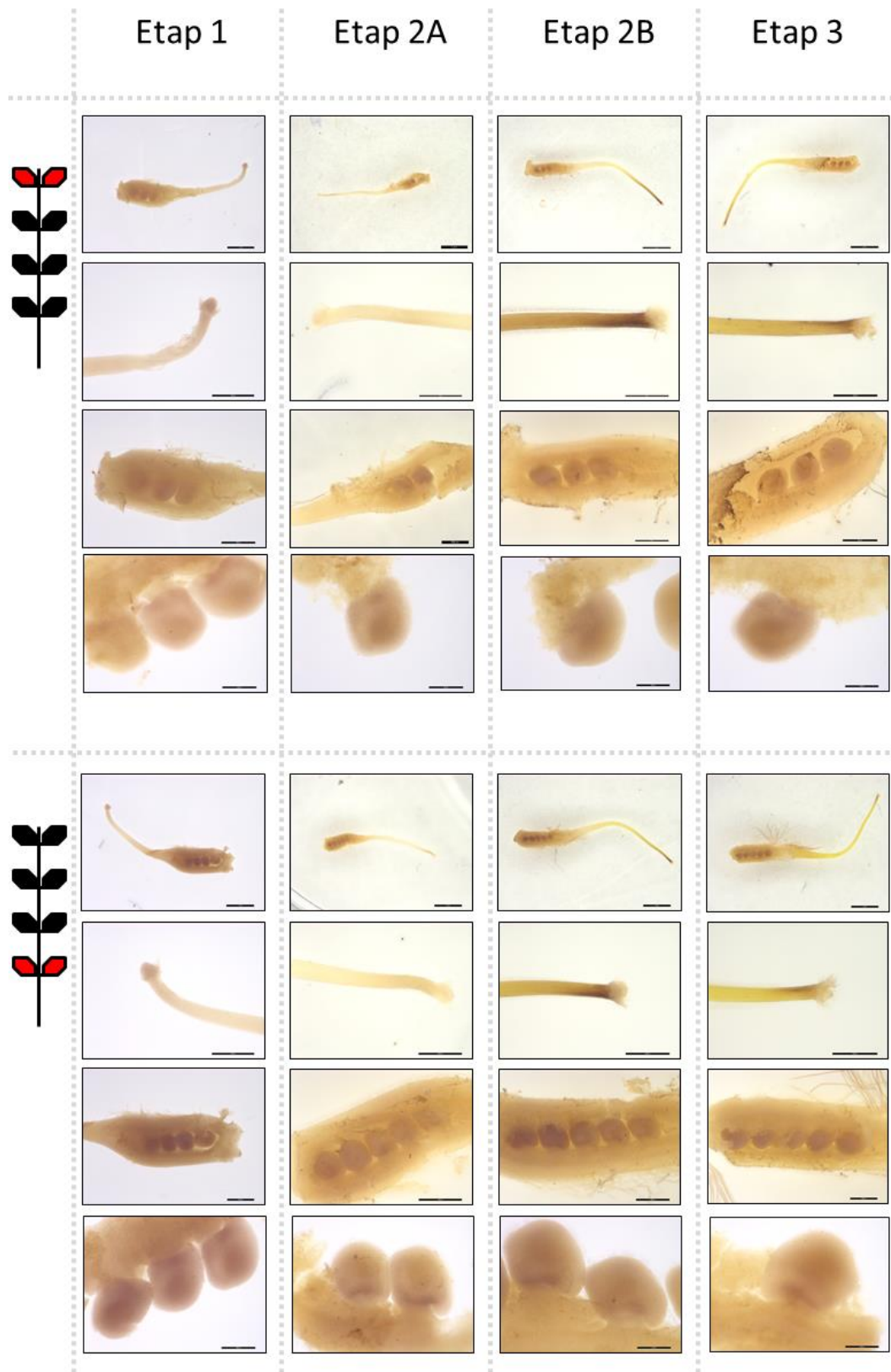
W celu weryfikacji danych dotyczących ekspresji genów związanych z akumulacją i homeostazą auksyny w całych kwiatkach oraz aby mieć możliwość bardziej dogłębnej interpretacji danych, przeprowadzono eksperyment lokalizacji IAA przy użyciu technik immunohistochemicznych. Wykonano immunolokalizację IAA zarówno całościową (w całych pręcikach i całych słupkach), jak i na skrawkach parafinowych (w zalążkach). Do analizy użyto pierwotnych przeciwciał króliczych specyficznych do IAA, wtórnych poliklonalnych przeciwciał antykróliczych wyznakowanych peroksydazą chrzanową. Jako substratu do wizualizacji wyniku użyto 3,3'-diaminobenzydyny (DAB), której utlenianie do nierozpuszczalnego brązowego formazanu jest katalizowane przez peroksydazę chrzanową w obecności nadtlenu wodoru. Brązowy sygnał świadczy o obecności auksyny.



Rycina 17. Lokalizacja IAA w całych pręcikach rozwijających się kwiatów łubinu żółtego. Brązowy kolor świadczy o akumulacji IAA. Czarny pasek na zdjęciach wskazuje długość 2 mm.

Wzdłuż rosnących na długość nitek pylników izolowanych z kwiatów będących na etapie rozwoju 2A wyraźnie widać sygnał świadczący o podwyższonym stężeniu IAA w porównaniu do nitek pylników, których elongacja jest wolniejsza. Widać również bardzo wyraźny sygnał pochodzący z ziaren pyłku (Rycina 17). Pylniki kwiatów będących na etapie 2B rozwoju, są w pełni otwarte i w większości przypadków już wypylone, dlatego zbadanie lokalizacji IAA dla tego etapu zostało uznane za nieistotne.

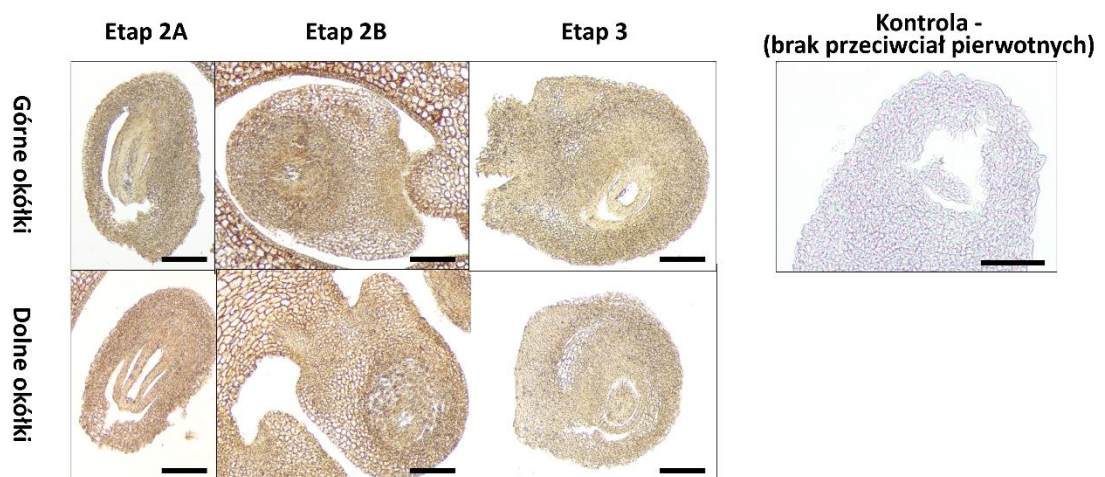
Również dla całych zalążni kwiatów łubinu żółtego wykonano analizę całościowej lokalizacji IAA (Rycina 18). Zarówno w kwiatach pochodzących z górnych, jak i dolnych okółków na etapie 2B tuż pod linią znamienia zaczyna być widoczny charakterystyczny sygnał, który gradientowo zanika w kierunku zalążni. W badanych wariantach widać, że IAA lokalizuje się u podstawy i we wnętrzu zalążków, jednakże zastosowany typ analizy nie pozwala na ustalenie wzorca lokalizacji badanego fitohormonu w tkankach tej części kwiatu (Rycina 18).



Rycina 18. Lokalizacja IAA w słupkach rozwijających się kwiatów łubinu żółtego. Brązowy kolor świadczy o akumulacji IAA. Czarne paski oznaczają rzeczywiste długości: 2 mm w przypadku całych słupków, 1 mm w przypadku znamion słupków oraz zalążni, 0,3 mm w przypadku zalążków.



W celu ustalenia bardziej szczegółowego wzorca lokalizacji IAA w zalążkach wykonano preparaty 10 µm skrawków parafinowych i poddano je analizie immunolokalizacji z użyciem tych samych przeciwciał i tej samej metody wizualizacji, jak w przypadku immunolokalizacji całościowej. Brązowa barwa świadczy o obecności badanej auksyny w danej tkance (Rycina 19). Zastosowana analiza pozwoliła na potwierdzenie wyników z lokalizacji całościowej. Niezależnie od pozycji kwiatu na osi kwiatostanu IAA ulega najsilniejszej akumulacji w obrębie wewnętrznych osłonek (ang. integuments) oraz u podstawy zalążka. Niezmiernie interesujący jest fakt, że IAA jest obecny nie tylko w samych jądrach komórkowych, gdzie indukuje szlak transdukcji sygnału auksyn, ale także w cytoplazmie, gdzie prawdopodobnie jest transportowany do innych tkanek lub organów. Inną przyczyną retencji tego fitohormonu w cytoplazmie może być obniżenie wydajności transportu IAA do jądra. W przypadku etapu 2B, w zalążkach izolowanych z kwiatów górnych, widoczny jest znacznie wyraźniejszy i bardziej rozległy sygnał z cytoplazmy w tkankach okalających woreczek zalążkowy (Rycina 19).



Rycina 19. Lokalizacja IAA w skrawkach parafinowych zatopionych zalążków izolowanych z rozwijających się kwiatów łubinu żółtego. Górne zdjęcia przedstawiają wyniki dotyczące kwiatów rosnących na najwyższym okółku, dolne dotyczą kwiatów rosnących na najniższych okółkach kwiatostanu. Brązowy kolor świadczy o akumulacji IAA. Czarny pasek odpowiada długości 0,2 mm.

## Identyfikacja elementów szlaku transdukcji sygnału auksyn w kwiatach łubinu żółtego

Procesy związane z auksyną nie są regulowane wyłącznie za pośrednictwem zmian w lokalizacji i stężeniu tego fitohormonu. Sygnał musi jeszcze zostać wychwycony za pośrednictwem receptorów, a następnie ulec transdukcji do ostatecznych efektorów. W efekcie indukcji szlaku transdukcji sygnału auksyn następuje reprogramowanie transkrypcyjne komórki.

### Identyfikacja receptorów auksyny z rodziny TAAR ulegających ekspresji w kwiatach łubinu żółtego

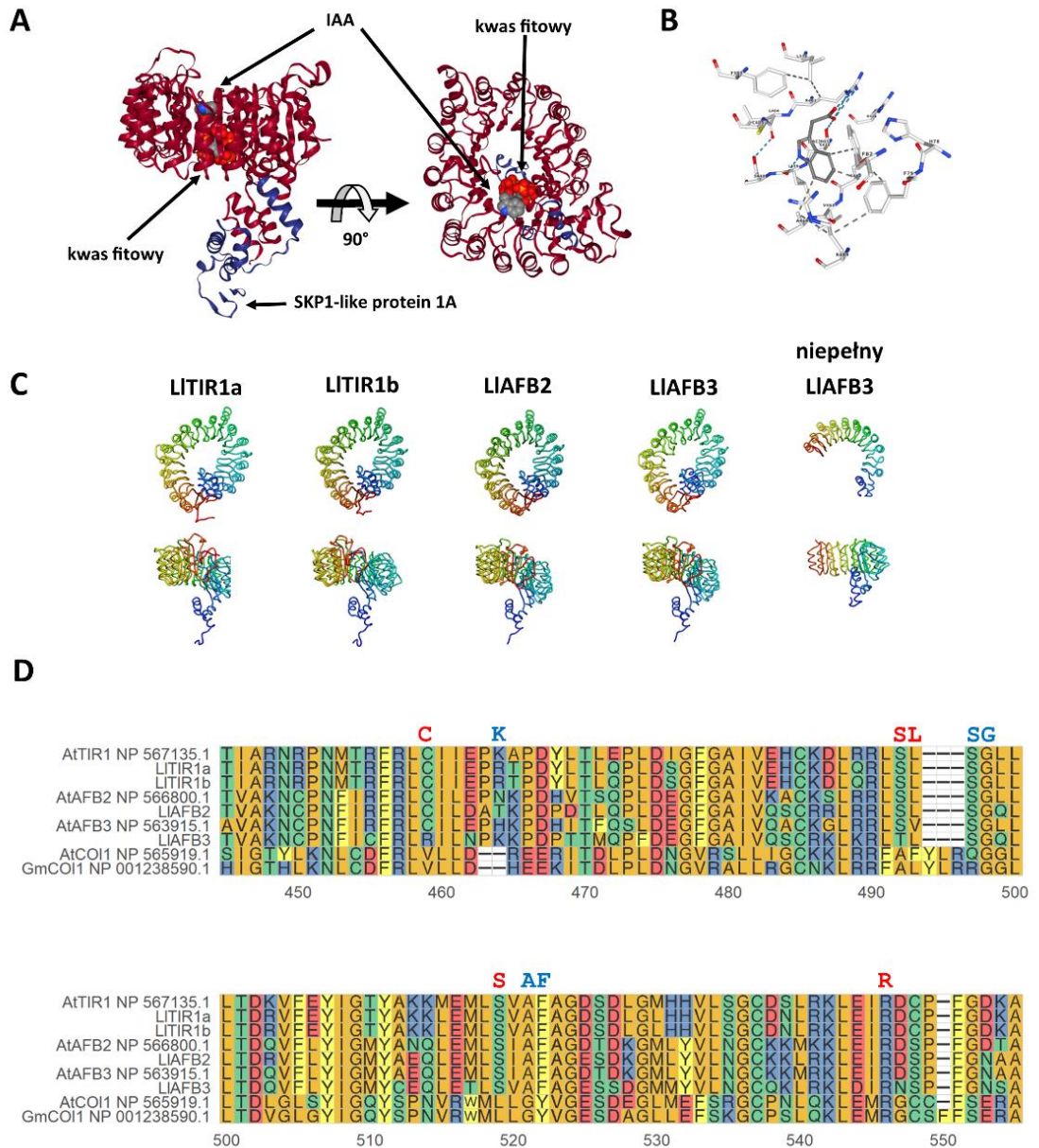
Wstępna filtracja danych uzyskanych z bazy LuluDB pozwoliła na identyfikację transkryptów anotowanych jako kodujące receptory auksyny: LITIR1a (FTRINITY\_DN58419\_c0\_g1\_i3), LITIR1b (FTRINITY\_DN58419\_c0\_g1\_i4), i LIAFB3 (FTRINITY\_DN49353\_c0\_g1\_i2, FTRINITY\_DN49353\_c0\_g1\_i3, FTRINITY\_DN49353\_c0\_g1\_i4, FTRINITY\_DN58214\_c1\_g2\_i2). Określenie, czy zidentyfikowane transkrypty kodują pełne białka receptorów nie jest możliwe jedynie na podstawie analizy obecności domeny F-box i powtarzających się motywów LRR. Należy jeszcze określić, czy białko to tworzy zamknięty pierścień oraz czy obecna jest w jego obrębie kieszeń wiążąca auksynę. W celu głębszej analizy przypuszczalnych białek z rodziny TAAR, obecnych w kwiatach łubinu żółtego, przeprowadzono dodatkowe analizy strukturalne, obejmujące zarówno badanie struktury 3D, jak i dokowanie *in silico* ligandów.

W bazie PDB dostępne są wysokiej jakości struktury TIR1 *Arabidopsis thaliana* pochodzące z analiz krystalograficznych (Rycina 20A i B). Możliwe było zatem wykonanie wnikliwych porównawczych analiz strukturalnych zidentyfikowanych białek. Wykazano, że transkrypt FTRINITY\_DN49353\_c0\_g1\_i4 koduje białko niepełnej długości, w którym powtarzające się motywy LRR nie tworzą zamkniętego pierścienia, zawierającego kieszeń dokującą auksynę (Rycina 20C), dlatego został on wykluczony z dalszej analizy. Natomiast pozostałe zidentyfikowane receptory cechowały się kompletną strukturą trójwymiarową (Rycina 20C).

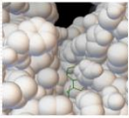
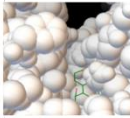
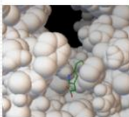
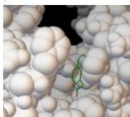
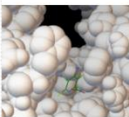
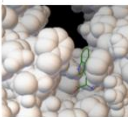
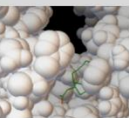
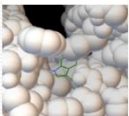
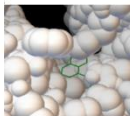
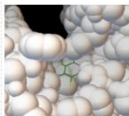
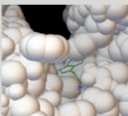
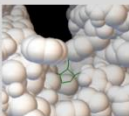
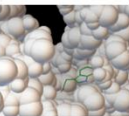
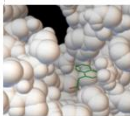
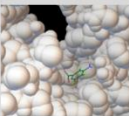
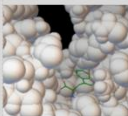
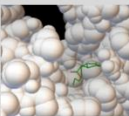
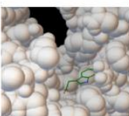
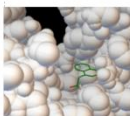
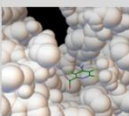
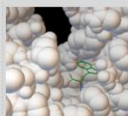
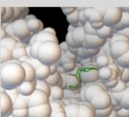
Następnym krokiem było wykonanie wielokrotnego dopasowania sekwencji (msa, *multiple sequence alignment*) jądrowych receptorów auksyny, występujących u *Arabidopsis thaliana*, aby zweryfikować, czy w obrębie przewidywanych białek na kluczowych pozycjach znajdują się odpowiednie aminokwasy, tworzące funkcjonalną kieszeń wiążącą IAA (Rycina 20D). Analiza wykazała, że LITIR1a, LITIR1b i LIAFB2 zawierają ewolucyjnie konserwowane aminokwasy, biorące udział w interakcji z kwasem indolilo-3-octowym. Jedynie sekwencja LIAFB3 wykazywała różnice w tym regionie, a problem ten postanowiono dalej eksplorować poprzez eksperyment dokowania *in silico* ligand-białko.

Eksperyment dokowania wykonano dla wszystkich przypuszczalnych receptorów auksyny u łubinu żółtego oraz dla AtTIR1, który stanowił standard dla przeprowadzonych analiz. Jako ligandy wybrano endogenną auksynę: IAA, oraz sztuczne auksyny NAA i pikloram. Kontrole negatywne stanowiły: prekursor IAA tryptofan, oraz kwas jasmonowy (JA). W analizie wyników zwracano uwagę na trzy rzeczy: (i) czy dany związek jest zdolny do przyłączenia się w obrębie kieszeni wiążącej auksynę, (ii) jaka jest teoretyczna energia wiązania, oraz (iii) czy konformacja przestrzenna, bądź układ ładunków związanego ligandu, nie stanowi przeszkody dla związania białka Aux/IAA. Oba paralogi, LITIR1a i b, są prawdopodobnie zdolne do związania wszystkich zbadanych auksyn: IAA, NAA i pikloramu w sposób nie

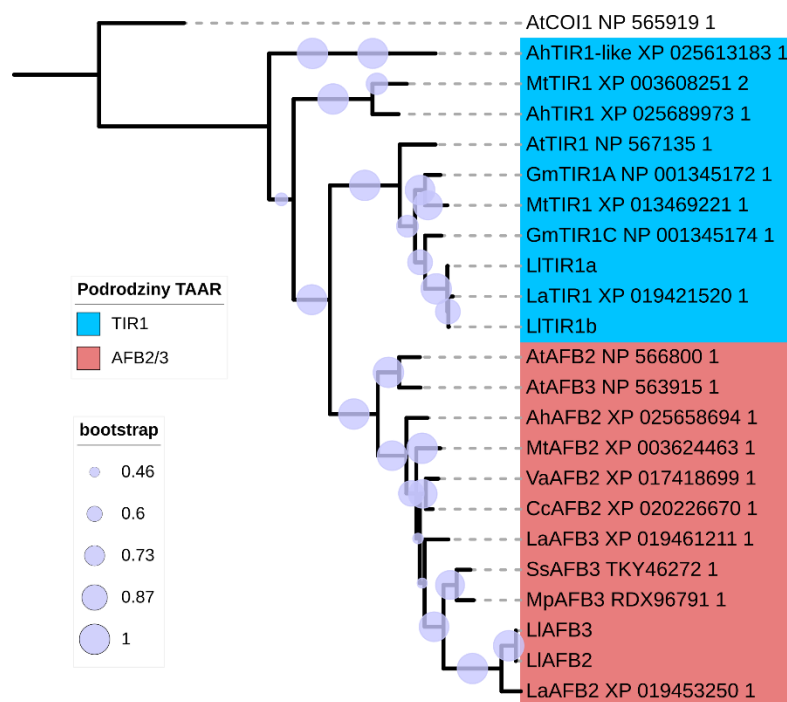
wykluczający interakcji z Aux/IAA i transdukcji sygnału. Najniższą selektywność wobec ligandu zdaje się wykazywać LITIR1a, który jest prawdopodobnie zdolny stabilnie związać nawet tryptofan, o ile związek ten znajdzie się w jądrze komórkowym. Białka LIAFB2 i 3 wykazują większą restrykcyjność we wiązaniu ligandu, przy czym we wszystkich przypadkach teoretyczne powinowactwo dla NAA jest wyższe, niż dla IAA (Rycina 21).



Rycina 20. Analiza struktury pierwszo- i trzeciorzędowej białek z rodziny TAAR zidentyfikowanych w kwiatach łubinu żółtego. A) Struktura AtTIR1 u *Arabidopsis thaliana* i prawdopodobna pozycja jego ligandów: kwasu fitowego i kwasu indoliloctowego (IAA), zobrazowana na podstawie danych uzyskanych z bazy PDB (2P1P [191]) za pomocą wbudowanego narzędzia NGL viewer [192]. B) Kieszka wiążąca IAA u AtTIR1 zwizualizowana za pomocą NGL viewer [192]. C) Modele strukturalne białek z rodziny TIR1/AFB zidentyfikowanych u łubinu żółtego uzyskane przy użyciu I-TASSER i zwizualizowane za pomocą programu Chimera 1.15. D) Analiza msa sekwencji aminokwasowych białek z rodziny TIR1/AFB zidentyfikowanych u łubinu żółtego oraz ich homologów u *A. thaliana* (At). Sekwencje receptora kwasu jasmonowego (COI1) stanowiły grupę zewnętrzną dla wykonanych analiz. Aminokwasy wypisane nad porównaniem tworzą kieszeń wiążącą IAA, w tym zaznaczone na czerwono są krytyczne dla selektywności AtTIR1.

Białko	Ligand									
	IAA		NAA		Pikloram		Trp		JA	
	E [kcal/mol]	Model 3D	E [kcal/mol]	Model 3D	E [kcal/mol]	Model 3D	E [kcal/mol]	Model 3D	E [kcal/mol]	Model 3D
AtTIR1	-6,2		-6,1		Brak dokowania do kieszeni wiążącej auksynę					
LITIR1a	-5,7		-6,6		-5,2		-6,0		-5,7	
LITIR1b	-6,1		-6,2		-5,8		-6,2		-5,7	
LIAFB2	-6,3		-6,9		-5,5		-6,4		-5,8	
LIAFB3	-6,2		-6,9		-5,4		-6,3		-5,7	

Rycina 21. Wynik dokowania *in silico* potencjalnych ligandów receptorów auksyn: IAA, NAA i pikloramu. Tryptofan (Trp) i kwas jasmonowy (JA) stanowiły kontrole negatywne. Na szaro zacięniowano przypadki, w których przyłączony ligand stanowi przeszkodę przestrzenną lub elektrostatyczną, uniemożliwiającą przyłączenie się białka Aux/IAA i transdukcję sygnału.



Rycina 22. Drzewo filogenetyczne zbudowane na podstawie sekwencji aminokwasowych białek z rodziny TAAR zidentyfikowanych w kwiatach łubinu żółtego oraz ich homologów u *Arabidopsis thaliana* (At), *Lupinus angustifolius* (La), *Arachis hypogaea* (Ah), *Glycine max* (Gm), *Medicago truncatula* (Mt), *Mucuna pruriens* (Mp), *Vigna angularis* (Va), *Cajanus cajan* (Cc), *Spatholobus suberectus* (Ss). Grupę zewnętrzną stanowiła sekwencja AtCOI1, umożliwiając zakorzenienie drzewa. Identyfikatory z bazy NCBI są podane w etykietach liści

Analiza filogenetyczna sekwencji białek z rodziny TAAR, zidentyfikowanych w kwiatach łubinu żółtego oraz ich homologów u innych roślin strączkowych *Lupinus angustifolius* (La), *Arachis hypogaea* (Ah), *Glycine max* (Gm), *Medicago truncatula* (Mt), *Mucuna pruriens* (Mp), *Vigna angularis* (Va), *Cajanus cajan* (Cc), *Spatholobus suberectus* (Ss), oraz u *Arabidopsis thaliana* wykazała, że receptory LITIR1a i b oraz LIAFB2 i 3 są najbardziej podobne do ich ortologów u łubinu wąskolistnego (Rycina 22). Należy nadmienić, że gałęzie otrzymanego drzewa nie rozdzielały się wyraźnie na trzy, zawierające TIR1, AFB2 i AFB3. Szczególnie białka AFB tworzyły mieszaną gałąź AFB2/3. Dwa białka kodowane przez transkrypty: FTRINITY\_DN49353\_c0\_g1\_i2, FTRINITY\_DN49353\_c0\_g1\_i3, FTRINITY\_DN49353\_c0\_g1\_i4, FTRINITY\_DN58214\_c1\_g2\_i2, zostały wstępnie anotowane w wysokoprzepustowych analizach BLASTx i BLASTp jako homologi AFB3. Jednak ponieważ gałąź drzewa filogenetycznego, zawierająca białka AFB, nie jest wyraźnie rozdzielona na dwie mniejsze, a AFB2 i AFB3 innych organizmów nie grupują się na homologi, tylko raczej paralogi, jeden z genów (FTRINITY\_DN58214\_c1\_g2) został przemianowany na AFB2 (Rycina 22).

Tabela 18 stanowi podsumowanie zidentyfikowanych genów kodujących białka z rodziny TAAR u łubinu żółtego, które są aktywne transkrypcyjnie w kwiatach tej rośliny. Są to trzy geny, kodujące funkcjonalne białka o przewidywanej długości 573-585 aa.

Tabela 18. Lista genów i transkryptów kodujących białka należące do rodziny TIR1/AFB, zidentyfikowanych w kwiatach łubinu żółtego.

Identyfikator genu z bazy LuluDB	Nazwa genu	Identyfikator transkryptu z bazy LuluDB	Ramka odczytu [nt]	Nazwa białka	długość przewidywanego białka [aa]
FTRINITY_DN58419_c0_g1	LITIR1	FTRINITY_DN58419_c0_g1_i3	115-1869	LITIR1a	585
		FTRINITY_DN58419_c0_g1_i4	115-1869	LITIR1b	585
FTRINITY_DN58214_c1_g2	LIAFB2 (wcześniej LIAFB3)	FTRINITY_DN58214_c1_g2_i2	138-1859	LIAFB2	574
FTRINITY_DN49353_c0_g1	LIAFB3	FTRINITY_DN49353_c0_g1_i2	335-2053	LIAFB3	573
		FTRINITY_DN49353_c0_g1_i3	889-2607		
		FTRINITY_DN49353_c0_g1_i4	889-1857	białko niefunkcjonalne	323

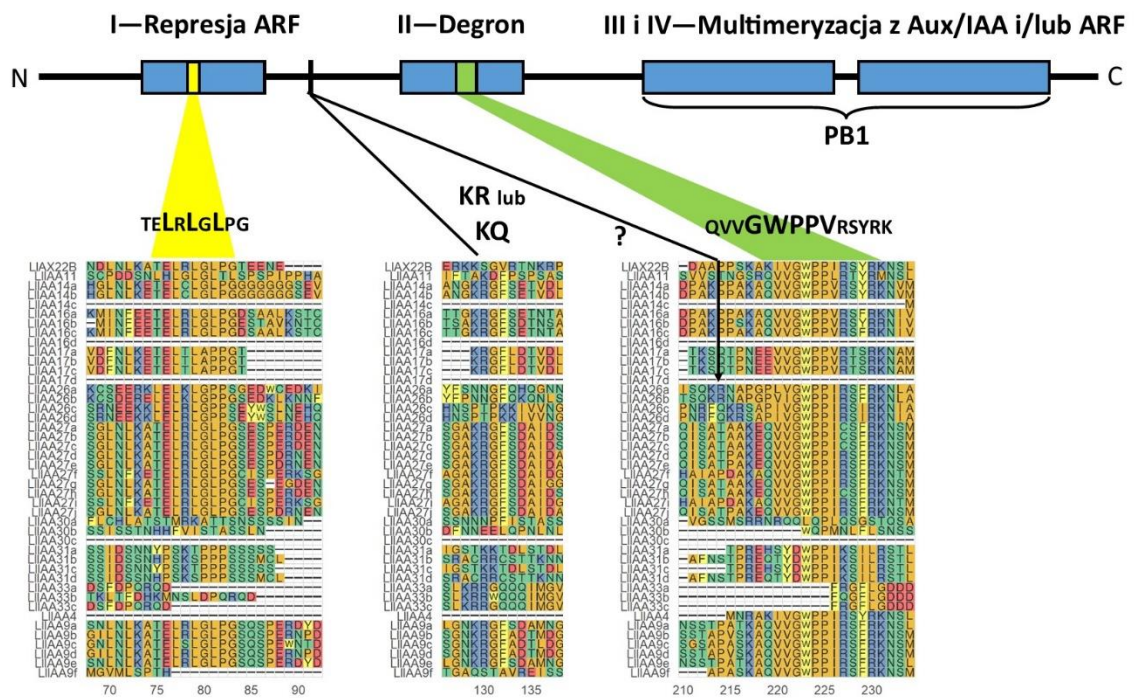
#### Identyfikacja koreceptorów auksyny z rodziny Aux/IAA ulegających ekspresji w kwiatach łubinu żółtego

Na podstawie informacji o sekwencji oraz anotacji BLASTx, BLASTp oraz Pfam, dostępnych w bazie LuluDB [174], wstępnie zidentyfikowano 18 genów kodujących 44 przypuszczalne białka z rodziny Aux/IAA, wykazujące aktywność transkrypcyjną w kwiatach łubinu żółtego. Aby określić, czy przewidywane białka mogą być funkcjonalne, dokonano wnikliwej analizy ich kluczowych domen: (i) domeny I, zawierającej kluczowy motyw EAR (LxLxL), odpowiedzialny za rekrutację białka TOPLESS, (ii) motywu KR/KQ pomiędzy domenami I i II, który wpływa na szybkość degradacji omawianego białka, (iii) domeny II, zawierającej motyw o rdzeniu GWPPV, kluczowy dla proteasomowej degradacji tego białka, oraz (iv) domenę PB1, odpowiedzialną za multimeryzację z innymi białkami z rodziny Aux/IAA, lub interakcję z czynnikami transkrypcyjnymi ARF. Sprawdzono również, czy badane białka zawierają sygnał lokalizacji jądrowej (NLS), który u tej rodziny zwykle występuje w dwóch miejscach: jeden złożony, obejmujący wspomniany motyw KR/KQ pomiędzy domenami I, II i aminokwasy polarne za motywem GWPPV, oraz jeden prosty w na końcu C domeny PB1.

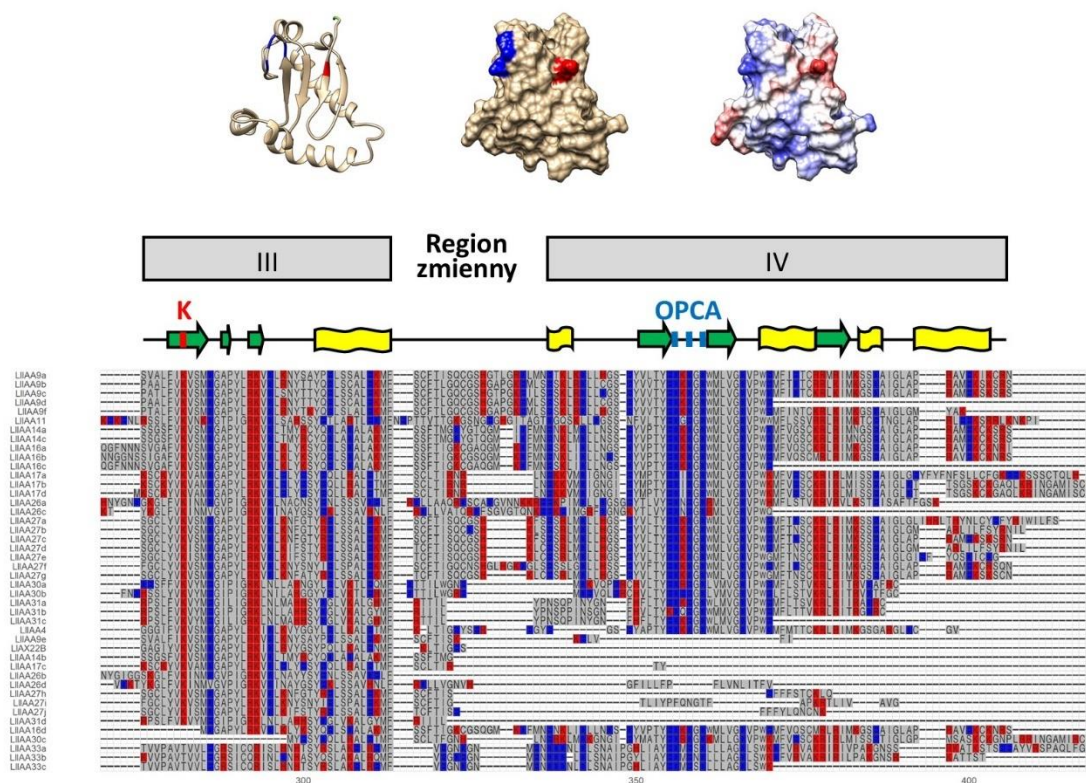
Spośród 44 zidentyfikowanych białek, aż 18 było pozbawionych motywu LxLxL, tylko 8 zawierało klasyczny motyw GWPPV, aż 22 motyw GWPPI, 1 GWPPL, a 13 nie zawierało nawet podobnego motywu (Rycina 23). Motyw KR/KQ, znajdujący się pomiędzy domenami I i II, był obecny w konserwowanym miejscu w 27 badanych sekwencjach aminokwasowych, przy czym tylko w jednym z nich był to motyw KQ (Rycina 23). Warto zauważyć, że w przypadku LIIAA26a-d motyw KR jest obecny tuż przed motywem GWPPI, jednakże najprawdopodobniej jest on raczej związany z sekwencją NLS.

Analizując domenę PB1, brano pod uwagę obecność lizyny w konserwowanym miejscu w obrębie domeny III [200] i motywu OPCA (Dx(D/E)GDx8[E/D] [200]) w domenie IV

(Rycina 24). Na podstawie tych informacji, zaklasyfikowano domenę PB1 jako typ I/II (obecne oba motywy), typ I (obecny motyw OPCA, brak K), lub typ II (obecna K, brak motywu OPCA). NLS u białek z rodziny Aux/IAA zwykle znajduje się przed i w obrębie domeny II oraz w domenie IV. Obecność poszczególnych motywów w obrębie przewidywanych białek LIAux/IAA podsumowuje Tabela 19.



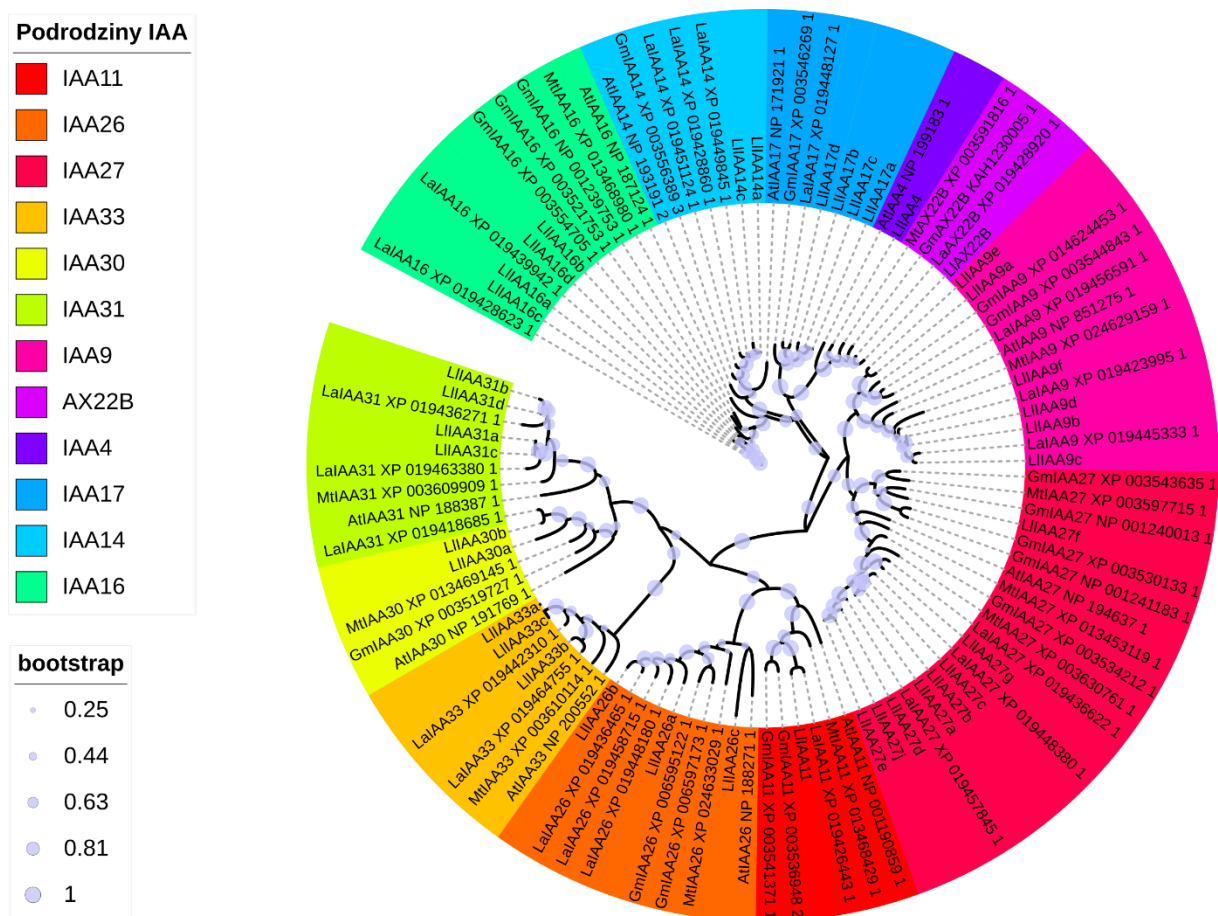
Rycina 23. Analiza sekwencji N-terminalnych domen I i II w białkach Aux/IAA zidentyfikowanych w kwiatkach łubinu żółtego. Motywy wypisane powyżej porównań sekwencji aminokwasowych to najważniejsze elementy białek Aux/IAA, a większe litery oznaczają aminokwasy kluczowe dla funkcjonowania danej domeny.



Rycina 24. Analiza C-terminalnych domen PBI w przewidywanych białkach z rodziny Aux/IAA zidentyfikowanych u łubinu żółtego. Góra: wizualizacja trójwymiarowego modelu domeny PBI LIIAA14a; góra lewo i środek: na czerwono zaznaczono konserwowaną lizynę w domenie III, na niebiesko motyw OPCA (DxD/ExD); góra prawo: kolorami czerwonym i niebieskim zaznaczono powierzchniowe ładunki, odpowiednio dodatnie i ujemne. Na podstawie widocznego poniżej porównania sekwencji określono, które białka IAA zawierają motywy kluczowe dla części III i IV i na tej podstawie zakwalifikowano je do określonego typu I/II. Widoczne nad porównaniem kształty określają przewidywaną strukturę drugorzędową białka LIIAA14a. Na żółto zaznaczono alfa helisy, na zielono beta harmonijki.

W celu wykonania analizy filogenetycznej zidentyfikowanych białek z rodziny Aux/IAA z bazy NCBI pobrano sekwencje aminokwasowe homologów tych białek, obecnych u wybranych roślin strączkowych (*Lupinus angustifolius*, *Glycine max* i *Medicago truncatula*) oraz *Arabidopsis thaliana*. Ponieważ białkowy produkt genu FTRINITY\_DN54618\_c4\_g1 wykazuje największe podobieństwo do IAA17, a nie IAA30, dlatego zmieniono jego anotację (Rycina 25). W większości przypadków przewidywane białka LIIAA wykazywały największą homologię do białek pochodzących z najbliższej spokrewnionej *L. angustifolius*. Wyjątkami były: sekwencja LIIAA4 była najbardziej podobna do AtIAA4, LIIAA9a i b do GmIAA9, LIIAA27f do GmIAA27, LIIAA26c do GmIAA26. LIIAA30a i b wykazują duże podobieństwo do sekwencji LaIAA31, jednakże omawiane białko pochodzące z łubinu wąskolistnego wyraźnie grupuje się z klastrem IAA30, co najprawdopodobniej świadczy o jego nieprawidłowej anotacji. Na końcu należy nadmienić, że AtIAA17 wykazywał większą homologię do strączkowych białek IAA14, niż IAA17 (Rycina 25).





Rycina 25. Drzewo filogenetyczne skonstruowane na podstawie sekwencji aminokwasowych białek Aux/IAA zidentyfikowanych w kwiatach łubinu żółtego i białek homologicznych u *Arabidopsis thaliana* (At), *Lupinus angustifolius* (La), *Glycine max* (Gm) i *Medicago truncatula* (Mt). Identyfikatory z bazy NCBI są podane w etykietach liści.

Na podstawie przedstawionych analiz, dotyczących przewidywanych białek Aux/IAA u łubinu żółtego, sporządzono tabelę, podsumowującą obecność kluczowych motywów i domen w obrębie sekwencji badanych białek (Tabela 19). Szarym kolorem zacięniowano przypadki, w których brakuje kluczowych elementów, dlatego zostały uznane za нефункционалне. Brak domeny I (motywu LxLxL) i elementu KR/KQ uznano za akceptowalny. Osiemnaście aktywnych transkrypcyjnie w kwiatach genów LIIAA koduje 30 funkcjonalnych białek, zawierających co najmniej jedną sekwencję sygnału lokalizacji jądrowej.

Tabela 19. Lista genów i transkryptów kodujących geny należące do rodziny Aux/IAA zidentyfikowanych w kwiatach łubinu żółtego. Nazwy genów ustalono na podstawie anotacji w bazie LuluDB i analizy filogenetycznej sekwencji aminokwasowych. Szarym kolorem zaciemniowano informacje dotyczące białek, które są prawdopodobnie нефункционалне. \* oznaczono obecność motywów GWPPI i GWPLL; \*\* w pole wpisano typ PB1, o ile domena ta jest obecna; \*\*\* obecność motywu złożonego w obrębie domeny II/obecność motywu prostego w obrębie domeny IV; \*\*\*\* obecność motywu KR tuż przed motywem GWPPI.

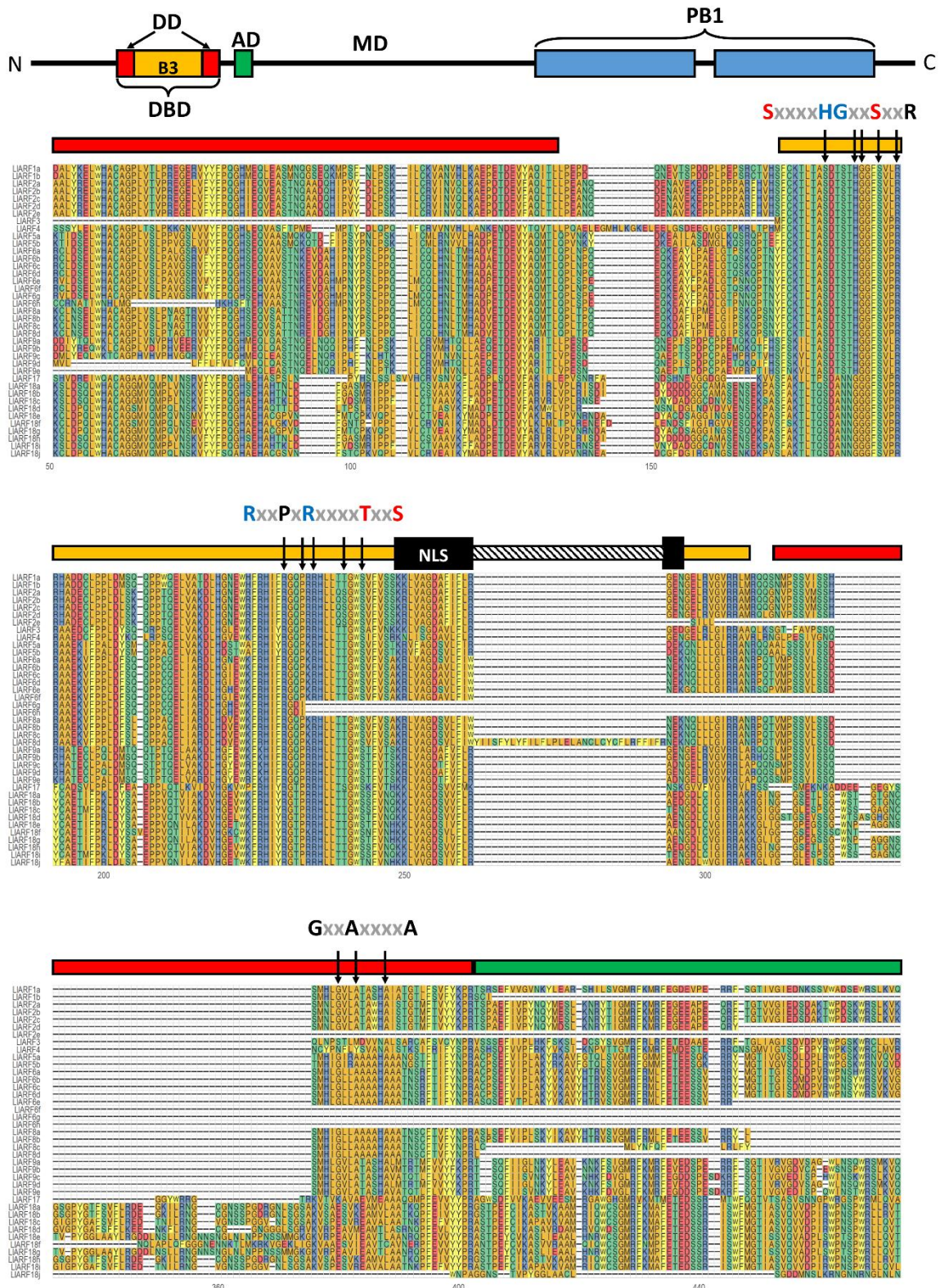
Identyfikator genu z bazy LuluDB	Nazwa genu	Identyfikator transkryptu z bazy LuluDB	Ramka odczytu [nt]	Nazwa białka	długość przewidywanego białka [aa]	Obecność kluczowych motywów				
						LxLx L	KR/K Q	GWP PV*	PB1 **	NLS ***
FTRINITY_DN52250_c0_g1	<i>LIAX22B</i>	FTRINITY_DN52250_c0_g1_i31	341-748	LIAX22B	136	+	KR	*	II	+/-
		FTRINITY_DN52250_c0_g1_i4	341-748							
		FTRINITY_DN52250_c0_g1_i7	341-748							
FTRINITY_DN53304_c4_g1	<i>LIIAA11</i>	FTRINITY_DN53304_c4_g1_i3	330-1196	LIIAA11	289	+	KQ	*	I/II	-/+
FTRINITY_DN57862_c1_g1	<i>LIIAA14</i>	FTRINITY_DN57862_c1_g1_i2	35-745	LIIAA14a	237	+	KR	+	I/II	+/+
		FTRINITY_DN57862_c1_g1_i1	35-514	LIIAA14b	160	+	KR	+	II	+/-
		FTRINITY_DN57862_c1_g1_i3	35-514							
		FTRINITY_DN57862_c1_g1_i5	711-1121	LIIAA14c	137	-	-	-	I/II	-/+
FTRINITY_DN56238_c2_g2	<i>LIIAA16</i>	FTRINITY_DN56238_c2_g2_i7	377-1180	LIIAA16a	268	+	KR	+	I/II	+/+
		FTRINITY_DN56238_c2_g2_i5	321-1082	LIIAA16b	254	+	KR	+	I/II	+/+
		FTRINITY_DN56238_c2_g2_i3	377-1084	LIIAA16c	236	+	KR	+	I/II	+/-
		FTRINITY_DN56238_c2_g2_i2	1450-1788	LIIAA16d	113	-	-	-	I	-/+
		FTRINITY_DN56238_c2_g2_i4	998-1336							
FTRINITY_DN55431_c1_g2	<i>LIIAA17A</i> (wcześniej <i>LIIAA30</i> )	FTRINITY_DN55431_c1_g2_i1	113-751	LIIAA17a	213	-	KR	+	I/II	+/+
		FTRINITY_DN55431_c1_g2_i4	113-742	LIIAA17b	210	-	KR	+	I/II	+/+
		FTRINITY_DN55431_c1_g2_i3	113-508	LIIAA17c	132	-	KR	+	II	+/-
FTRINITY_DN54618_c4_g1	<i>LIIAA17B</i>	FTRINITY_DN54618_c4_g1_i1	3-311	LIIAA17d	103	-	-	-	I/II	-/+
FTRINITY_DN53275_c1_g3	<i>LIIAA26A</i>	FTRINITY_DN53275_c1_g3_i1	1351-2268	LIIAA26a	306	+	****	*	I/II	+/+
		FTRINITY_DN53275_c1_g3_i8	1363-2280							
		FTRINITY_DN53275_c1_g2_i2	300-1037	LIIAA26b	246	+	****	*	II	+/-
		FTRINITY_DN53275_c1_g2_i3	318-1055							
FTRINITY_DN58295_c2_g1	<i>LIIAA26B</i>	FTRINITY_DN58295_c2_g1_i2	187-876	LIIAA26c	230	+	****	*	I/II	+/-

Identyfikator genu z bazy LuluDB	Nazwa genu	Identyfikator transkryptu z bazy LuluDB	Ramka odczytu [nt]	Nazwa białka	długość przewidywanego białka [aa]	Obecność kluczowych motywów				
						LxLx L	KR/K Q	GWP PV*	PB1 **	NLS ***
		FTRINITY_DN58295_c2_g1_i1	187-789	LIIAA26d	201	+	****	*	II	+/-
FTRINITY_DN56198_c0_g1	LIIAA27A	FTRINITY_DN56198_c0_g1_i4	364-1335	LIIAA27a	324	+	KR	*	I/II	+/+
		FTRINITY_DN56198_c0_g1_i8	364-1308	LIIAA27b	315	+	KR	*	I/II	+/+
		FTRINITY_DN56198_c0_g1_i18	364-1302	LIIAA27c	313	+	KR	*	I/II	+/+
		FTRINITY_DN56198_c0_g1_i14	225-1136	LIIAA27d	304	+	KR	*	I/II	+/+
		FTRINITY_DN56198_c0_g1_i13	225-1130	LIIAA27e	302	+	KR	*	I/II	+/+
		FTRINITY_DN56198_c0_g1_i27	310-1212	LIIAA27g	301	+	KR	*	I/II	+/+
		FTRINITY_DN56198_c0_g1_i11	364-1113	LIIAA27i	250	+	KR	*	II	+/-
		FTRINITY_DN56198_c0_g1_i9	225-944	LIIAA27j	240	+	KR	*	II	+/-
FTRINITY_DN56668_c1_g4	LIIAA27B	FTRINITY_DN56668_c1_g4_i2	401-1303	LIIAA27f	301	+	KR	*	I/II	+/+
FTRINITY_DN51398_c0_g1	LIIAA30A	FTRINITY_DN51398_c0_g1_i11	105-704	LIIAA30a	200	-	-	-	I/II	-/+
		FTRINITY_DN51398_c0_g1_i10	80-610	LIIAA30b	177	-	-	-	I/II	-/+
FTRINITY_DN54618_c4_g1	LIIAA30B	FTRINITY_DN54618_c4_g1_i1	3-311	LIIAA30c	103	-	-	-	I	-/+
FTRINITY_DN54928_c1_g1	LIIAA31	FTRINITY_DN54928_c1_g1_i17	275-874	LIIAA31a	200	-	-	-	I/II	-/+
		FTRINITY_DN54928_c1_g1_i19	40-633	LIIAA31b	198	-	-	-	I/II	-/+
		FTRINITY_DN54928_c1_g1_i18	275-823	LIIAA31c	183	-	-	-	I/II	-/-
		FTRINITY_DN54928_c1_g1_i25	40-483	LIIAA31d	148	-	-	-	II	-/-
FTRINITY_DN56188_c3_g1	LIIAA33A	FTRINITY_DN56188_c3_g1_i4	263-802	LIIAA33a	180	-	KR	-	I	-/+
		FTRINITY_DN56188_c3_g1_i2	263-682	LIIAA33c	140	-	KR	-	I	-/+
FTRINITY_DN56188_c3_g2	LIIAA33B	FTRINITY_DN56188_c3_g2_i2	176-715	LIIAA33b	180	-	KR	-	I	-/+
FTRINITY_DN52250_c0_g1	LIIAA4	FTRINITY_DN52250_c0_g1_i10	958-1332	LIIAA4	125	-	-	*	I/II	-/+
FTRINITY_DN52977_c4_g1	LIIAA9A	FTRINITY_DN52977_c4_g1_i10	776-1873	LIIAA9a	366	+	KR	*	I/II	+/+
		FTRINITY_DN52977_c4_g1_i1	787-1884							
		FTRINITY_DN52977_c4_g1_i5	993-2090							
		FTRINITY_DN52977_c4_g1_i6	194-1291							
		FTRINITY_DN52977_c4_g1_i7	194-1075	LIIAA9e	294	+	KR	*	II	+/-
		FTRINITY_DN52977_c4_g1_i8	787-1668							

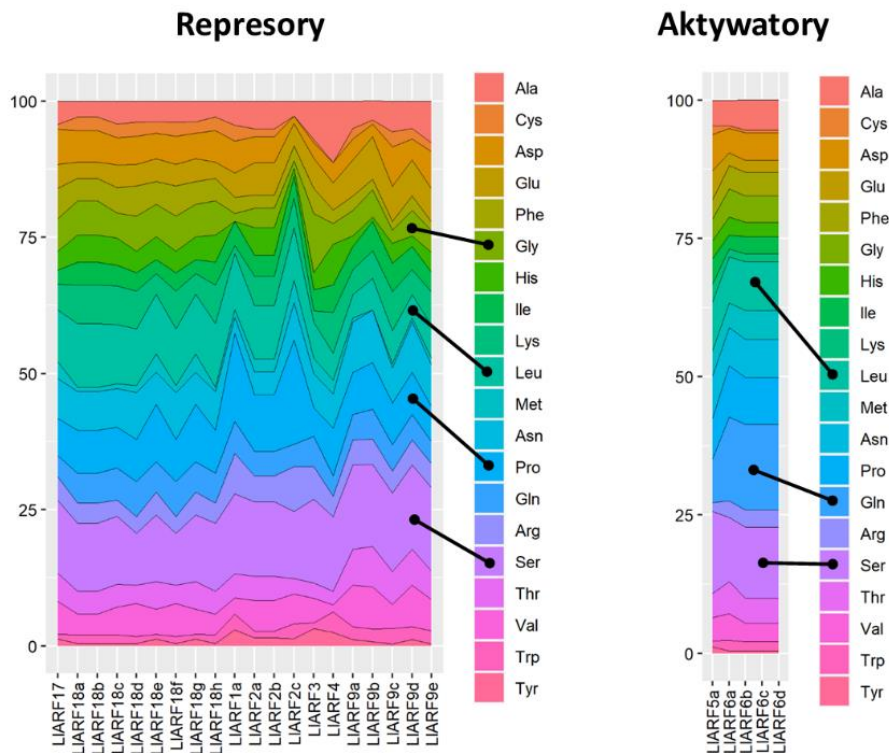
Identyfikator genu z bazy LuluDB	Nazwa genu	Identyfikator transkryptu z bazy LuluDB	Ramka odczytu [nt]	Nazwa białka	długość przewidywanego białka [aa]	Obecność kluczowych motywów				
						LxLx L	KR/K Q	GWP PV*	PB1 **	NLS ***
		FTRINITY_DN52977_c4_g1_i4	776-1657							
FTRINITY_DN56945_c1_g1	<i>LIIAA9B</i>	FTRINITY_DN56945_c1_g1_i5	399-1448	LIIAA9b	350	+	KR	*	I/II	+/+
		FTRINITY_DN56945_c1_g1_i21	349-1398	LIIAA9c	350	+	KR	*	I/II	+/+
		FTRINITY_DN56945_c1_g1_i11	399-1352	LIIAA9d	318	+	KR	*	I/II	+/-
		FTRINITY_DN56945_c1_g1_i8	762-1385	LIIAA9f	208	-	-	*	I/II	-/+

## Identyfikacja czynników transkrypcyjnych z rodziny ARF ulegających ekspresji w kwiatach tubinu żółtego

Filtracja danych z bazy LuluDB [174] pozwoliła wstępnie zidentyfikować 69 transkryptów, pochodzących od 16 genów LIARF. Porównanie sekwencji aminokwasowych na końcu N białek pozwoliło na weryfikację, które z badanych czynników transkrypcyjnych zawierają pełnej długości domenę DBD, składającą się ze środkowej domeny wiążącej DNA (DB3) i flankujących ją dwóch części domeny DD odpowiedzialnej za dimeryzację białek ARF. Wszystkie kluczowe aminokwasy ulegające interakcji z DNA, lub odpowiedzialne za selektywność względem elementu AuxRE były obecne u większości wstępnie wyselekcjonowanych białek. Dużej części domeny DB3, wraz ze znajdującym się w jej obrębie NLS, brakuje u LIARF6g i h, a LIARF6e zawiera niepełny NLS. Białka LIARF2e, LIARF3, LIARF6f-h, oraz LIARF9e, pozbawione są jednej części DD, przez co prawdopodobnie homodimeryzacja jest albo utrudniona, albo wręcz niemożliwa. Histydyna w motywie SxxxxHGxxSxxR, biorąca udział w rozpoznawaniu sekwencji TGTCNN, jest we wszystkich izoformach LIARF18 zastąpiona glicyną, co sugeruje, że białka te mogą wykazywać odmienne właściwości (selektywność i/lub powinowactwo) względem AuxRE (Rycina 26).



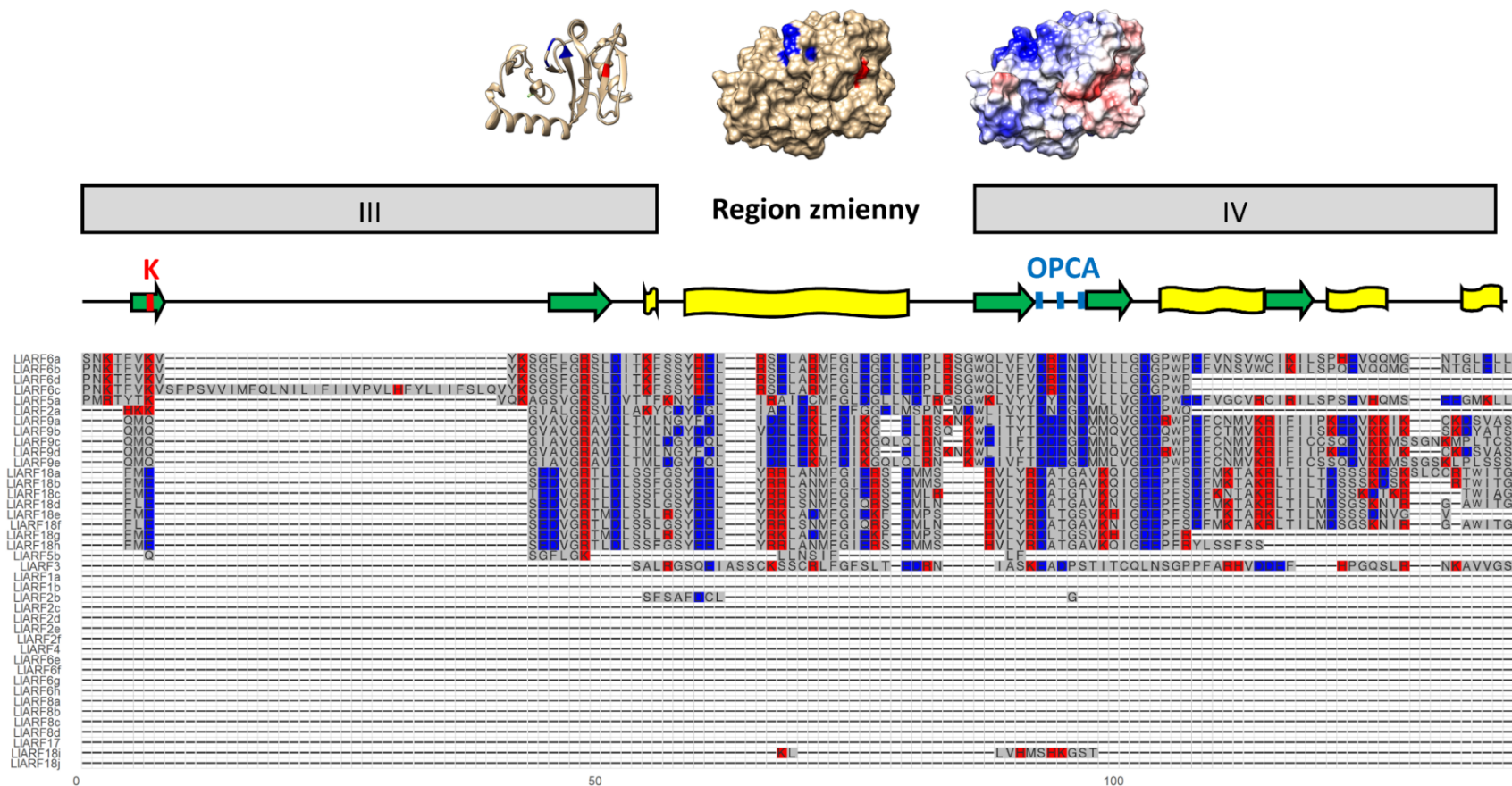
Rycina 26. Analiza sekwencji N-terminalnej domeny DBD w białkach ARF zidentyfikowanych w kwiatach łubinu żółtego. Sekwencje wypisane powyżej porównań sekwencji aminokwasowych to motywy kluczowe dla ich funkcjonowania, przy czym na czerwono zaznaczono reszty aminokwasowe, które ulegają interakcji ze szkieletem DNA, a na niebiesko te, które są odpowiedzialne za rozpoznawanie sekwencji AuxRE TGTCNN. Na podstawie [109].



Rycina 27. Analiza składu aminokwasowego domen środkowych białek LIARF zidentyfikowanych w kwiatach łubinu żółtego.

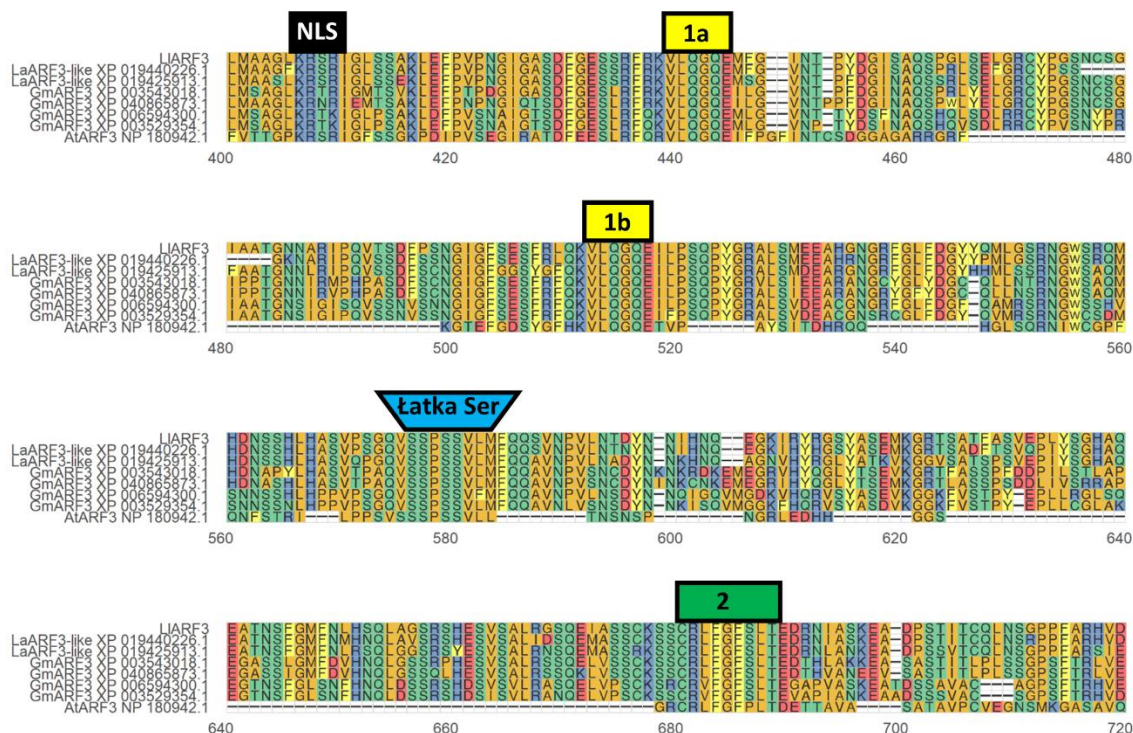
Sekwencje aminokwasowe domeny środkowej białek ARF decydują o funkcji tego czynnika transkrypcyjnego. ARF, bogate w tym regionie w glicynę (Gly), leucynę (Leu) i/lub serynę (Ser) i/lub prolinę (Pro), zalicza się do represorów transkrypcji, a bogate w serynę (Ser), glutaminę (Gln) i leucynę (Leu) do aktywatorów transkrypcji. Skład omawianej domeny u zidentyfikowanych białek ARF potwierdził rolę przypisaną na podstawie wstępnej anotacji: LIARF1, LIARF2, LIARF3, LIARF4, LIARF9, LIARF17 i LIARF18 zostały zaliczone do represorów, a LIARF5 i LIARF6 do aktywatorów transkrypcji (Rycina 27).

Tak jak w przypadku domeny PB1 w białkach Aux/IAA, podczas analizy domeny PB1 w obrębie ARF brano pod uwagę obecność lizyny w konserwowanym miejscu [200] i motywu OPCA (Dx(D/E)GDx8[E/D] [200]). Domenę PB1 typu I/II zawierają białka LIARF2a, LIARF5a, LIARF6a-d, PB1 typu I zawierają: LIARF9a-e, a pozostałe białka są pozbawione funkcjonalnej domeny PB1 (Rycina 28).



Rycina 28. Analiza C-terminalnych domen PB1 w przewidywanych białkach z rodziny ARF zidentyfikowanych u łubinu żółtego. Góra: wizualizacja trójwymiarowego modelu domeny PB1 LIARF6a; góra lewo i środek: na czerwono zaznaczono konserwowaną lizynę w domenie III, na niebiesko motyw OPCA (DxD/ExD); góra prawo: kolorami czerwonym i niebieskim zaznaczono powierzchniowe ładunki, odpowiednio dodatnie i ujemne. Na podstawie widocznego poniżej porównania sekwencji określono, które białka IAA zawierają motywy kluczowe dla części III i IV i na tej podstawie zakwalifikowano je do określonego typu I/II. Widoczne nad porównaniem kształty określają przewidywaną strukturę drugorzędową białka LIARF6a. Na żółto zaznaczono  $\alpha$ -helisy, na zielono  $\beta$ -harmonijki.

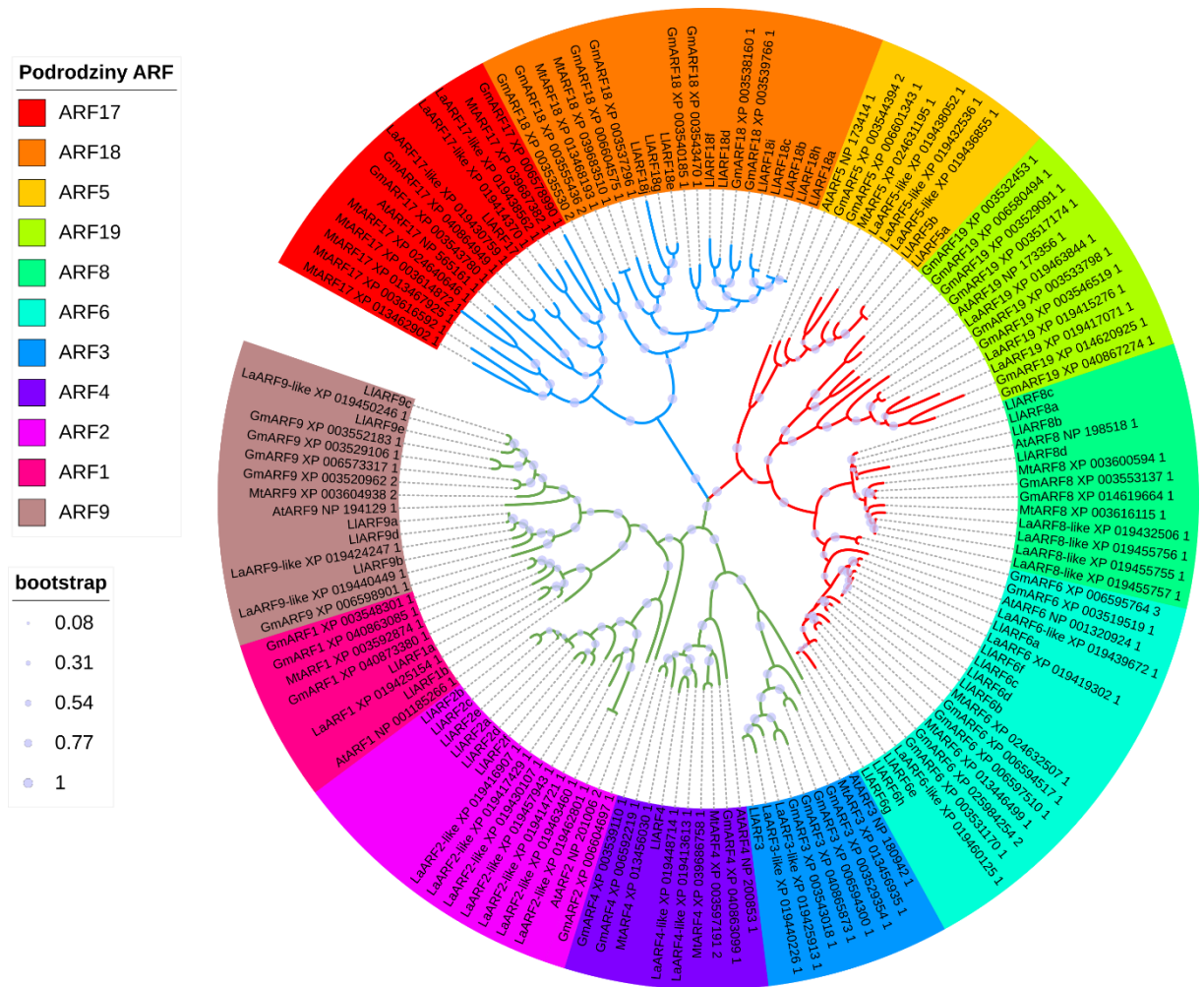




Rycina 29. Analiza konserwowanych motywów w obrębie domeny ES białek ARF3. NLS jest sygnałem lokalizacji jądrowej; łatka serynowa to miejsce, w którym może nastąpić przeniesienie grupy fosforanowej przez kinazę; motywy 1a, 1b i 2 pełnią nieznaną funkcję. Motywy zostały zidentyfikowane na podstawie [93].

Większość ze skróconych C-terminalnie białek ARF jest uważana za niewrażliwą na auksynę, ponieważ jest niezdolna do oligomeryzacji z Aux/IAA, a tym samym nie podlega represji, z której byłyby uwalniane dopiero w obecności auksyny. Jedynym znanym wyjątkiem jest ARF3/ETTIN, który odbiera sygnał auksynowy w sposób niekanoniczny. Zawiera on C-terminalną domenę ES (ETT-Specific domain) [93], którą u łubinu zidentyfikowano poprzez manualną rewizję sekwencji aminokwasowej anotowanej jako ARF3. Rzeczywiście, ekspresjonowany w kwiatach łubinu żółtego *LIARF3* zawiera wszystkie motywy niezbędne do bezpośredniej percepcji auksyny (Rycina 29).

Niektóre białka ARF o funkcji represorów, takie jak na przykład ARF2 u rzodkiewnika zwyczajnego, który jest pozbawiony domeny PB1, mogą działać poprzez motyw EAR (LxLxL), znajdujący się w ich domenie środkowej, bezpośrednio rekrutując białko TOPLESS [62]. Jednakże w obrębie żadnej z sekwencji środkowych zidentyfikowanych białek ARF taki motyw nie występuje.



Rycina 30. Drzewo filogenetyczne skonstruowane na podstawie sekwencji aminokwasowych białek ARF zidentyfikowanych w kwiatach łubinu żółtego i białek homologicznych zidentyfikowanych u *Arabidopsis thaliana* (At), *Lupinus angustifolius* (La), *Glycine max* (Gm) i *Medicago truncatula* (Mt). Identyfikatory z bazy NCBI są podane w etykietach liści.

Na podstawie sekwencji aminokwasowych białek ARF zidentyfikowanych w kwiatach łubinu żółtego i białek homologicznych występujących u rzodkiewnika pospolitego, łubinu wąskolistnego, soi warzywnej i lucerny *Medicago truncatula* sporządzono drzewo filogenetyczne. Zgodnie z przewidywaniami, analizowane sekwencje dzieliły się na trzy główne klady, odpowiadające: (i) klasie A aktywatorów transkrypcji, w skład której weszły podrodziny ARF5, 6, 8 i 19 (Rycina 30, czerwone gałęzie), (ii) klasie B względnie nowych represorów transkrypcji z podrodzin ARF2, 3, 4, 9 (Rycina 30, zielone gałęzie), oraz (iii) najstarszej ewolucyjnie klasie C represorów transkrypcji z podrodzin ARF17 i ARF18 (Rycina 30, niebieskie gałęzie) [61]. Większość białek ARF zidentyfikowanych u łubinu żółtego wykazuje największe podobieństwo do homologów obecnych u łubinu wąskolistnego, za wyjątkiem ARF8 i ARF18. Białka LIARF8 wykazują największe podobieństwo do AtARF8, jednak nie jest ono wysokie, zapewne ze względu na silnie skróconą sekwencję białek z łubinu żółtego. U *L. angustifolius* nie znaleziono genów anotowanych jako *ARF18*, a LIARF18 są najbardziej podobne do GmARF18 (Rycina 30). Tabela 20 stanowi podsumowanie analiz przedstawionych w niniejszym podrozdziale.

Tabela 20. Lista genów i transkryptów kodujących geny należące do rodziny ARF zidentyfikowanych w kwiatach łubinu żółtego.

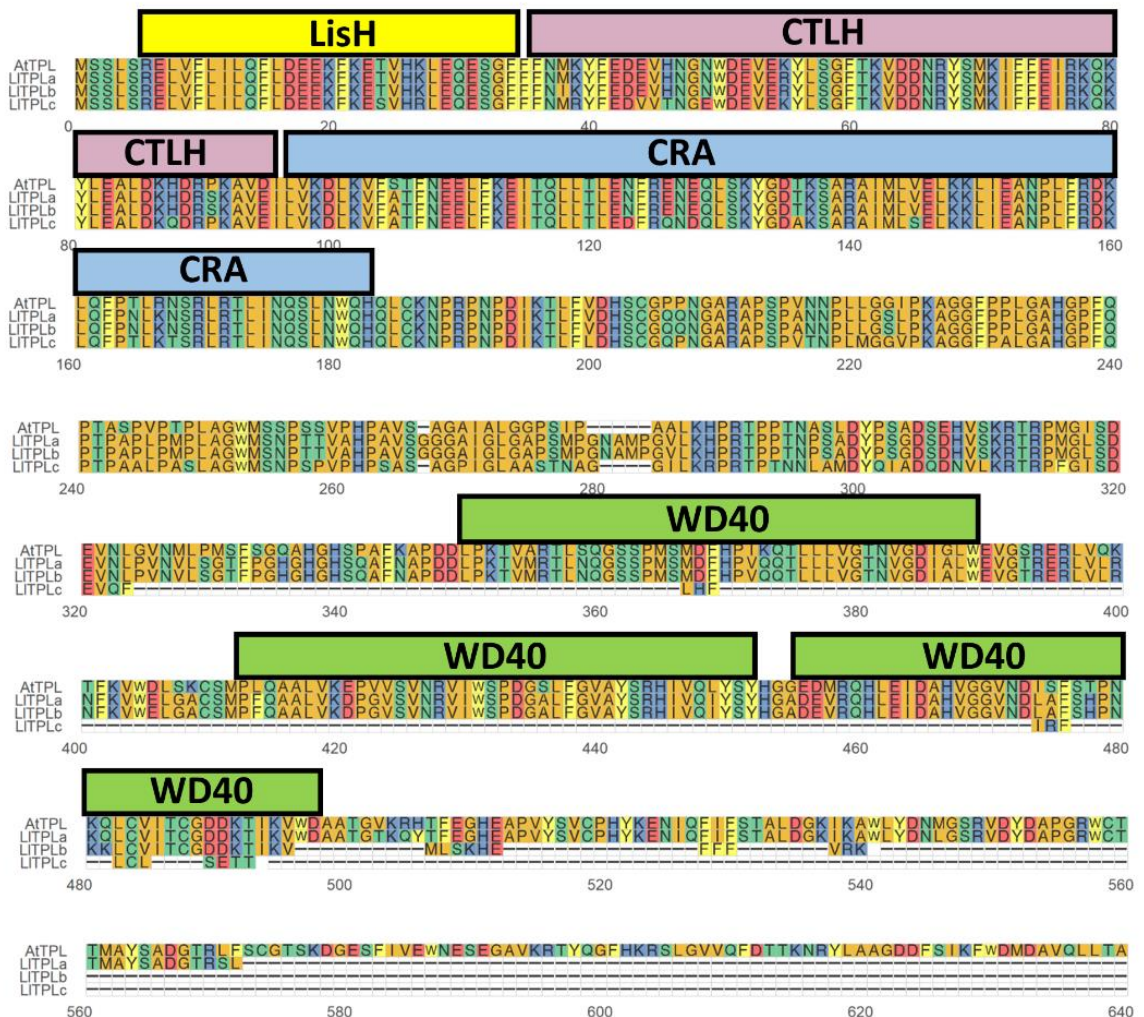
Identyfikator genu z bazy LuluDB	Nazwa genu	Identyfikator transkryptu z bazy LuluDB	Ramka odczytu [nt]	Nazwa białka	długość przewidywanego białka [aa]	B3	Auxin resp	PB1
FTRINITY_DN54942_c2_g2	<i>LIARF1</i>	FTRINITY_DN54942_c2_g2_i2	266-1465	LIARF1a	400	+	+	-
		FTRINITY_DN54942_c2_g2_i8	214-1413					
		FTRINITY_DN54942_c2_g2_i9	214-1413					
		FTRINITY_DN54942_c2_g2_i1	71-871	LIARF1b	267	+	-	-
		FTRINITY_DN54942_c2_g2_i10	88-888					
		FTRINITY_DN54942_c2_g2_i4	71-871					
		FTRINITY_DN54942_c2_g2_i6	88-888					
		FTRINITY_DN54942_c2_g2_i1	1338-2477					
		FTRINITY_DN54942_c2_g2_i10	1390-2361					
		FTRINITY_DN54942_c2_g2_i4	1338-2309	-	380	-	+	+
		FTRINITY_DN54942_c2_g2_i5	173-1510	-	324	-	+	+
		FTRINITY_DN54942_c2_g2_i6	1390-2529	-	324	-	+	+
FTRINITY_DN54942_c2_g2_i6	1390-2529	-	446	-	+	+		
FTRINITY_DN54942_c2_g2_i6	1390-2529	-	380	-	+	+		
FTRINITY_DN58056_c0_g2	<i>LIARF2A</i>	FTRINITY_DN58056_c0_g2_i13	484-2760	LIARF2a	759	+	+	I/II
		FTRINITY_DN58056_c0_g2_i1	484-2598	LIARF2b	705	+	+	-
		FTRINITY_DN58056_c0_g2_i2	484-1782	LIARF2c	433	+	+	-
		FTRINITY_DN58056_c0_g2_i9	484-1485	LIARF2d	334	+	+	-
		FTRINITY_DN58056_c0_g2_i18	484-1209	LIARF2e	242	+/-	-	-
		FTRINITY_DN58056_c0_g2_i17	1169-1742	LIARF2f	193	+	+	-
FTRINITY_DN58929_c2_g1	<i>LIARF2B</i>	FTRINITY_DN58929_c2_g1_i1	185-511	-	109	-	-	+
		FTRINITY_DN58929_c2_g1_i10	1-696	-	232	-	-	+
		FTRINITY_DN58929_c2_g1_i18	1-492	-	164	-	-	+
		FTRINITY_DN58929_c2_g1_i21	834-1928	-	365	-	+	+
		FTRINITY_DN58929_c2_g1_i22	53-460	-	136	-	-	+
		FTRINITY_DN58929_c2_g1_i23	53-460	-	136	-	-	+
		FTRINITY_DN58929_c2_g1_i24	838-1949	-	372	-	+	+
		FTRINITY_DN58929_c2_g1_i3	1-696	-	232	-	-	+

Identyfikator genu z bazy LuluDB	Nazwa genu	Identyfikator transkryptu z bazy LuluDB	Ramka odczytu [nt]	Nazwa białka	długość przewidywanego białka [aa]	B3	Auxin resp	PB1
		FTRINITY_DN58929_c2_g1_i6	53-550	-	166	-	-	+
		FTRINITY_DN58929_c2_g1_i9	1-492	-	164	-	-	+
FTRINITY_DN54558_c0_g1	<i>LIARF3</i>	FTRINITY_DN54558_c0_g1_i3	236-1972	LIARF3	579	+	+	-
FTRINITY_DN58929_c1_g3	<i>LIARF4</i>	FTRINITY_DN58929_c1_g3_i8	481-1821	LIARF4	447	+	+	-
FTRINITY_DN58410_c0_g1	<i>LIARF5</i>	FTRINITY_DN58410_c0_g1_i8	525-3197	LIARF5a	891	+	+	I/II
		FTRINITY_DN58410_c0_g1_i1	525-1700	LIARF5b	392	+	+	-
FTRINITY_DN57891_c1_g1	<i>LIARF6A</i>	FTRINITY_DN57891_c1_g1_i10	963-3710	LIARF6a	916	+	+	I/II
		FTRINITY_DN57891_c1_g1_i1	801-3518	LIARF6b	906	+	+	I/II
		FTRINITY_DN57891_c1_g1_i9	801-3422	LIARF6c	874	+	+	I/II
		FTRINITY_DN57891_c1_g1_i6	801-3323	LIARF6d	841	+	+	I/II
		FTRINITY_DN57891_c1_g1_i7	266-910	LIARF6f	215	+/-	-	-
		FTRINITY_DN57891_c1_g1_i7	1836-3851	-	672	-	+	+
FTRINITY_DN57891_c1_g2	<i>LIARF6B</i>	FTRINITY_DN57891_c1_g2_i2	684-1619	LIARF6e	312	+	+	-
		FTRINITY_DN57891_c1_g2_i10	949-1512	LIARF6g	188	+/-	-	-
		FTRINITY_DN57891_c1_g2_i11	949-1512					
		FTRINITY_DN57891_c1_g2_i6	684-1247					
		FTRINITY_DN57891_c1_g2_i7	61-540	LIARF6h	160	+/-	-	-
FTRINITY_DN52647_c1_g1	<i>LIARF6C</i>	FTRINITY_DN52647_c1_g1_i3	81-1649	-	523	-	-	+
FTRINITY_DN59213_c2_g2	<i>LIARF8</i>	FTRINITY_DN59213_c2_g2_i11	159-1163	LIARF8a	335	+	+	-
		FTRINITY_DN59213_c2_g2_i25	159-1163					
		FTRINITY_DN59213_c2_g2_i29	159-1163					
		FTRINITY_DN59213_c2_g2_i21	525-1469	LIARF8b	315	+	+	-
		FTRINITY_DN59213_c2_g2_i19	159-1076	LIARF8c	306	+	-	-
		FTRINITY_DN59213_c2_g2_i8	525-1439	LIARF8d	305	+	-	-
		FTRINITY_DN59213_c2_g2_i11	2012-3604	-	531	-	+	+
		FTRINITY_DN59213_c2_g2_i19	2447-3730	-	428	-	-	+
		FTRINITY_DN59213_c2_g2_i25	2365-3648	-	428	-	-	+

Identyfikator genu z bazy LuluDB	Nazwa genu	Identyfikator transkryptu z bazy LuluDB	Ramka odczytu [nt]	Nazwa białka	długość przewidywanego białka [aa]	B3	Auxin resp	PB1
		FTRINITY_DN59213_c2_g2_i29	2365-3648	-	428	-	-	+
FTRINITY_DN54558_c0_g2	LIARF9A	FTRINITY_DN54558_c0_g2_i3	509-2590	LIARF9a	694	+	+	
		FTRINITY_DN54558_c0_g2_i5	384-2456	LIARF9b	691	+	+	
		FTRINITY_DN54558_c0_g2_i9	23-1999	LIARF9d	659	+	+	
		FTRINITY_DN54558_c0_g2_i2	886-1194	-	103	-	-	+
FTRINITY_DN53647_c0_g1	LIARF9B	FTRINITY_DN53647_c0_g1_i1	238-2295	LIARF9c	686	+	+	
		FTRINITY_DN53647_c0_g2_i3	89-2011	LIARF9e	641	+	+	
FTRINITY_DN58095_c1_g6	LIARF17	FTRINITY_DN58095_c1_g6_i2	198-1916	LIARF17	573	+	+	-
FTRINITY_DN53543_c0_g1	LIARF18A	FTRINITY_DN53543_c0_g1_i21	738-2897	LIARF18a	720	+	+	-
		FTRINITY_DN53543_c0_g1_i16	738-2885	LIARF18b	716	+	+	-
		FTRINITY_DN53543_c0_g1_i14	291-2426	LIARF18c	712	+	+	-
		FTRINITY_DN53543_c0_g1_i17	206-2341					
		FTRINITY_DN53543_c0_g1_i1	177-2201	LIARF18h	675	+	+	-
		FTRINITY_DN53543_c0_g1_i19	207-1376	LIARF18i	390	+	+	-
FTRINITY_DN53543_c0_g2	LIARF18B	FTRINITY_DN53543_c0_g2_i1	503-2614	LIARF18d	704	+	+	-
		FTRINITY_DN53543_c0_g2_i4	347-2458					
		FTRINITY_DN53543_c0_g2_i8	290-2401					
		FTRINITY_DN53543_c0_g2_i6	208-2301	LIARF18f	698	+	+	-
FTRINITY_DN56991_c0_g1	LIARF18C	FTRINITY_DN56991_c0_g1_i1	1073-3169	LIARF18e	699	+	+	-
		FTRINITY_DN56991_c0_g1_i10	825-2921					
		FTRINITY_DN56991_c0_g1_i8	387-2483					
		FTRINITY_DN56991_c0_g1_i3	1126-3222					
		FTRINITY_DN56991_c0_g1_i14	1073-3103					
		FTRINITY_DN56991_c0_g1_i4	1126-3156					
		FTRINITY_DN56991_c0_g1_i7	362-1288	LIARF18j	309	+	-	-

## Identyfikacja transkryptów kodujących białka TOPLESS, ulegającego ekspresji w kwiatach łubinu żółtego

Wyselekcjonowano trzy transkrypty, anutowanych jako homologi białka TOPLESS i akumulowane w kwiatach łubinu żółtego: FTRINITY\_DN54539\_c0\_g1\_i3, FTRINITY\_DN54539\_c0\_g1\_i9 i FTRINITY\_DN59239\_c1\_g2\_i7, kodujące białka o długości, odpowiednio, 603 (TPLa), 509 (TPLb) i 333 aminokwasów (TPLc). Bardziej szczegółowa analiza sekwencji aminokwasowych pozwoliła jednoznacznie potwierdzić funkcjonalność wymienionych białek, ze względu na obecność pełnej domeny TOPLESS (składającą się z LisH, CTLH, CRA), odpowiedzialnej za interakcję z motywem EAR, znajdującym się m.in. w obrębie białek Aux/IAA.

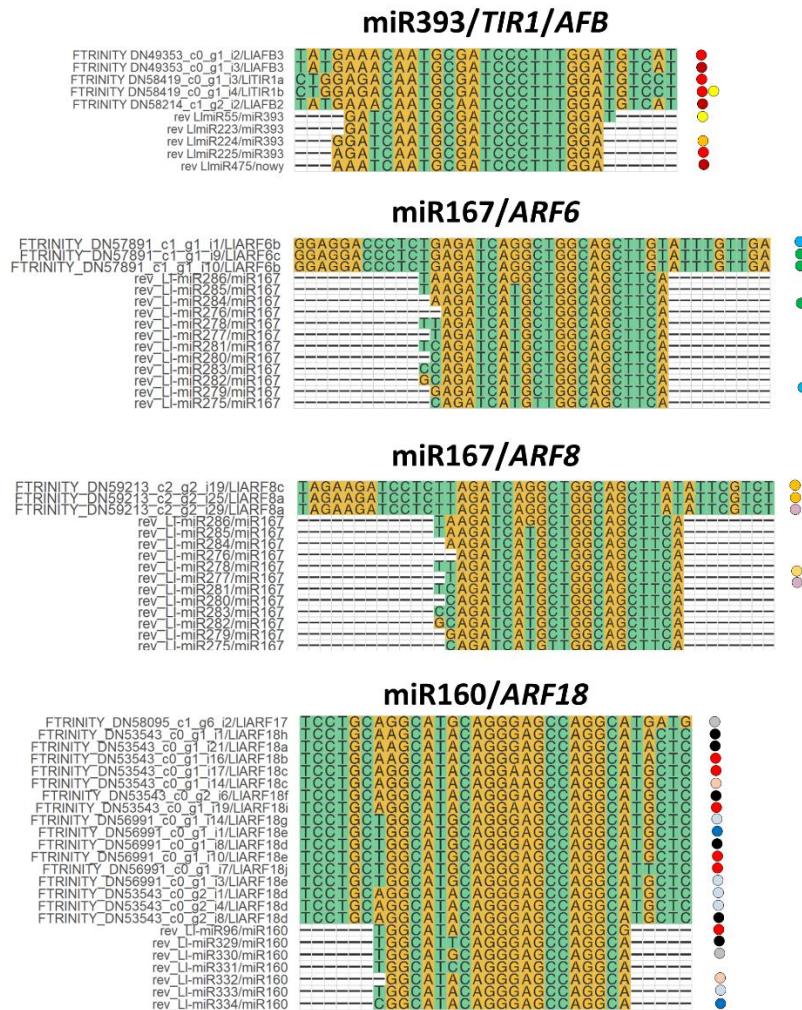


Rycina 31. Porównanie sekwencji aminokwasowych białek TOPLESS u *A. thaliana* i u łubinu żółtego.

## Identyfikacja mikro RNA regulujących ekspresję genów z rodzin TAAR, AUX/IAA i ARF u łubinu żółtego

### Identyfikacja mikro RNA regulujących ekspresję genów na podstawie sekwencjonowania degradomu

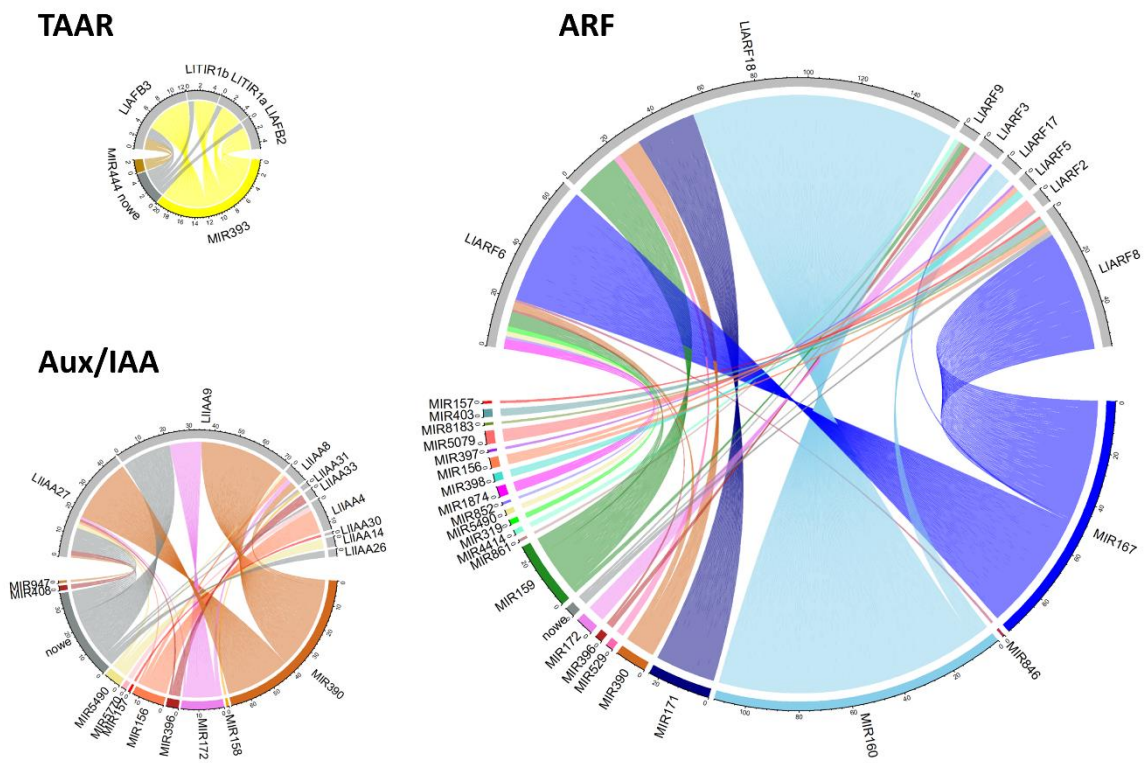
Zintegrowana analiza wyników sekwencjonowań transkryptomów, sRNA i degradomu pozwoliła zidentyfikować moduły regulatorowe miRNA/*TIR1/AFB* oraz miRNA/*ARF*. W kwiatach łubinu żółtego wszystkie transkrypty kodujące pełnej długości białka TIR1/AFB są genami docelowymi dla miRNA z rodziny MIR393, po trzy transkrypty kodujące ARF6 i ARF8 są regulowane przez różne izoformy miR167, a najliczniejszą grupę w niniejszej analizie stanowią transkrypty kodujące ARF18, z których aż 18 jest celem dla rodziny sRNA MIR160 (Rycina 32). Należy tu zaznaczyć, że materiał do sekwencjonowania degradomu pochodził wyłącznie ze spulowanych kwiatów będących na 3. etapie rozwoju, zbieranych ze szczytowych i najniższych okółków (warianty G3 i D3).



Rycina 32. Porównanie sekwencji docelowych i odwróconych komplementarnych sekwencji miRNA zidentyfikowanych na podstawie sekwencjonowania degradomu w kwiatach łubinu żółtego. Cieniowanie kół po prawej stronie porównań wskazuje, które miRNA zostało uznane za cząsteczkę regulatorową dla białek z rodziny TAAR lub ARF na podstawie analizy degradomu za pomocą programu CleaveLand4 [195].

### Identyfikacja mikro RNA regulujących ekspresję genów na podstawie psRNAtarget

Rycina 33 przedstawia potencjalne interakcje między miRNA i transkryptami z rodziny TAAR, Aux/IAA oraz ARF w kwiatach łubinu żółtego, które zostały przewidziane na podstawie analizy *in silico*. Oprócz znacznie większej liczby zidentyfikowanych par regulatorowych uwagę zwraca możliwość wyciszania ekspresji *Aux/IAA*, gdzie szczególny udział mogą mieć miRNA z rodziny MIR390.



Rycina 33. Wielokierunkowość potencjalnych interakcji między miRNA i transkryptami z rodziny TAAR, Aux/IAA oraz ARF w kwiatach łubinu żółtego. Analizę potencjalnych celów dla miRNA wykonano za pomocą psRNAtarget i zwizualizowano przy użyciu paczki R circos.

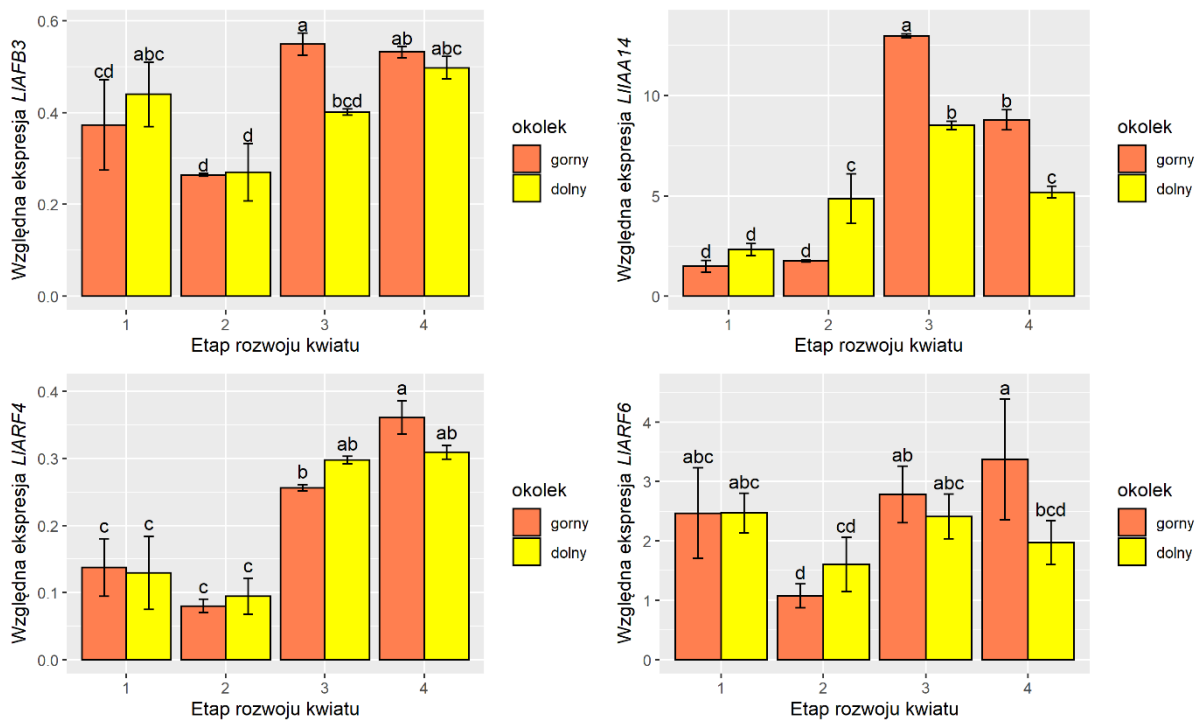


## Ekspresja genów kodujących elementy szlaku transdukcji sygnału auksyn w kwiatach łubinu żółtego

Wstępna analiza ekspresji genów z rodzin TAAR, AUX/IAA i ARF wykonana przed sekwencjonowaniem transkryptomów, sRNA i degradomu łubinu żółtego

Na początku realizacji planu pracy doktorskiej dysponowano sekwencjami transkryptów genów: *LIAFB3*, *LIIAA14*, *LIARF4* i *LIARF6*, zidentyfikowanymi w ramach następujących prac magisterskich, realizowanych w Katedrze Fizjologii Roślin i Biotechnologii UMK: mgr Magdy Dunajskiej, mgr Magdaleny Ogrodzińskiej i mgra Jakuba Kopery. Wykonano wstępną analizę ekspresji tych genów w kwiatach łubinu żółtego, rozwijających się na górnych lub dolnych okółkach kwiatostanu, przy czym badane były cztery etapy rozwojowe, bez podziału etapu 2. na 2A i 2B.

W najmłodszych analizowanych kwiatach nie zaobserwowano istotnych różnic w ekspresji analizowanych genów. Kwiaty będące na drugim etapie rozwoju, zebrane z dolnych okółków, wykazywały ponad dwukrotnie wyższy poziom ekspresji transkryptu kodującego *LIIAA14*, względem kwiatów zebranych z górnych okółków. Transkrypty kodujące receptor auksyny *LIAFB3*, jak i białko represorowe *LIIAA14*, akumulowały się w mniejszym stopniu w kwiatach zebranych z najniższego okółka, będących na trzecim etapie rozwoju. W przypadku kwiatów na ostatnim rozważanym etapie rozwoju, zebranych z najniższych okółków, obserwowano istotnie niższy poziom ekspresji prawie wszystkich analizowanych genów, za wyjątkiem *LIAFB2* i *LIARF4* (Rycina 34).

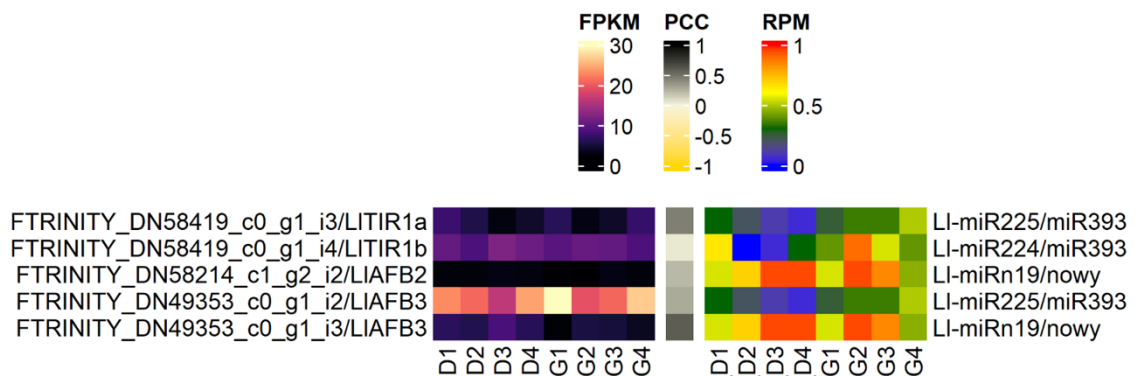


Rycina 34. Ekspresja genów kodujących elementy szlaku transdukcji sygnału auksyn w kwiatach zebranych z okółków dolnych (D1-4) i górnych (G1-4). Różne litery nad słupkami błędów oznaczają różnice istotne statystycznie na poziomie  $p < 0,05$  (testy ANOVA i *post-hoc* Tukeya).

Analiza ekspresji genów z rodzin TAAR, AUX/IAA i ARF oraz akumulacji regulujących je miRNA wykonana na podstawie wyników sekwencjonowania transkryptomów, sRNA i degradomu. Zsekwencjonowanie transkryptomów, sRNA i degradomu dało możliwość nie tylko identyfikacji samych genów docelowych dla miRNA, ale także analizy korelacji ich ekspresji.

#### Transkrypty kodujące białka z rodziny TAAR

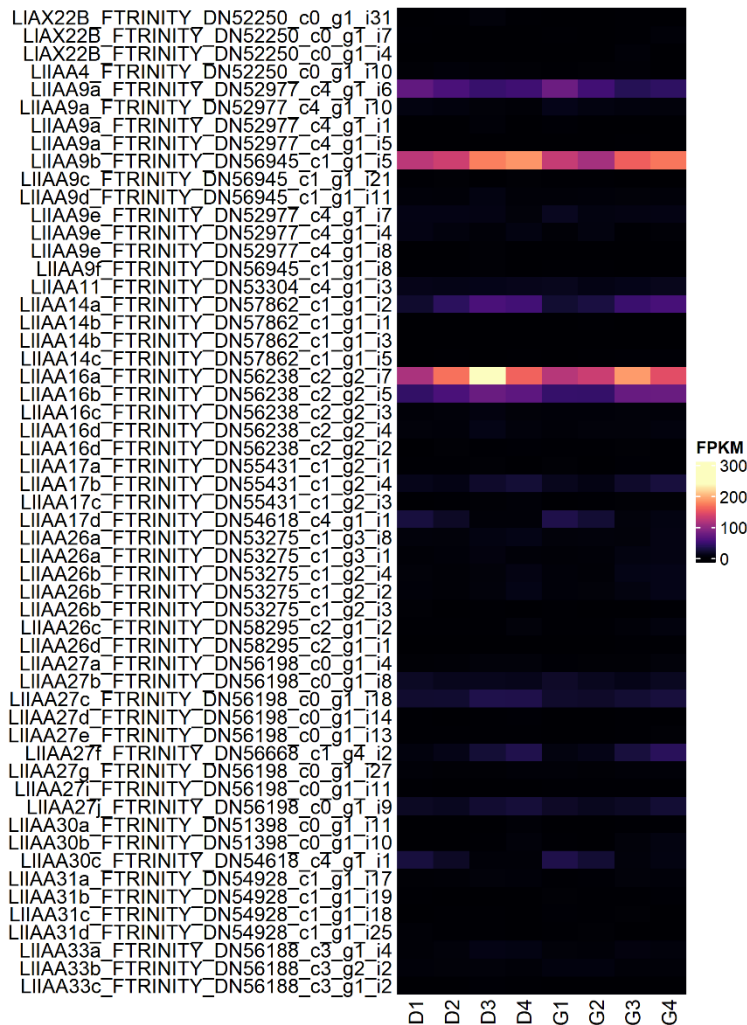
W kwiatach łubinu żółtego, będących na ostatnich etapach rozwoju, najsilniej ekspresjonowanym transkryptem kodującym receptor auksyny jest FTRINITY\_DN49353\_c0\_g1\_i2 (kodujący LIAFB3). We wszystkich analizowanych w niniejszej sekcji parach miRNA/mRNA obserwuje się dodatni współczynnik PCC, świadczący o dodatniej korelacji między ekspresją miRNA i ich genów docelowych z rodziny TAAR (Rycina 35).



Rycina 35. Ekspresja genów kodujących receptory auksyny z rodziny TAAR w kwiatach łubinu żółtego zebranych z okółków dolnych (D1-4) i górnych (G1-4), oraz akumulacja sRNA, których udział w regulacji potranskrypcyjnej tych genów został udowodniony w sekwencjonowaniu degradomu. PCC (ang. Pearson Correlation Coefficient) jest miarą korelacji między dwoma parametrami. Im jej wartość jest bliższa 0, tym niższa korelacja; jej dodatnia wartość wskazuje na pozytywną korelację, a ujemna na negatywną.

#### Koreceptory z rodziny Aux/IAA

W kwiatach łubinu żółtego najwyżej ekspresjonowanymi genami z rodziny Aux/IAA są *LIIAA16* (FTRINITY\_DN56238\_c2\_g2) i *LIIAA9* (FTRINITY\_DN56945\_c1\_g1). Względnie wysoki poziom akumulacji wykazują również transkrypty: FTRINITY\_DN52977\_c4\_g1\_i6, kodujący *LIIAA9b* i FTRINITY\_DN57862\_c1\_g1\_i2, kodujący *LIIAA14a* (Rycina 36). Na podstawie analizy danych degradomowych nie zidentyfikowano ani jednego miRNA, który mógłby być potranskrypcyjnym regulatorem ekspresji genów z rodziny Aux/IAA.

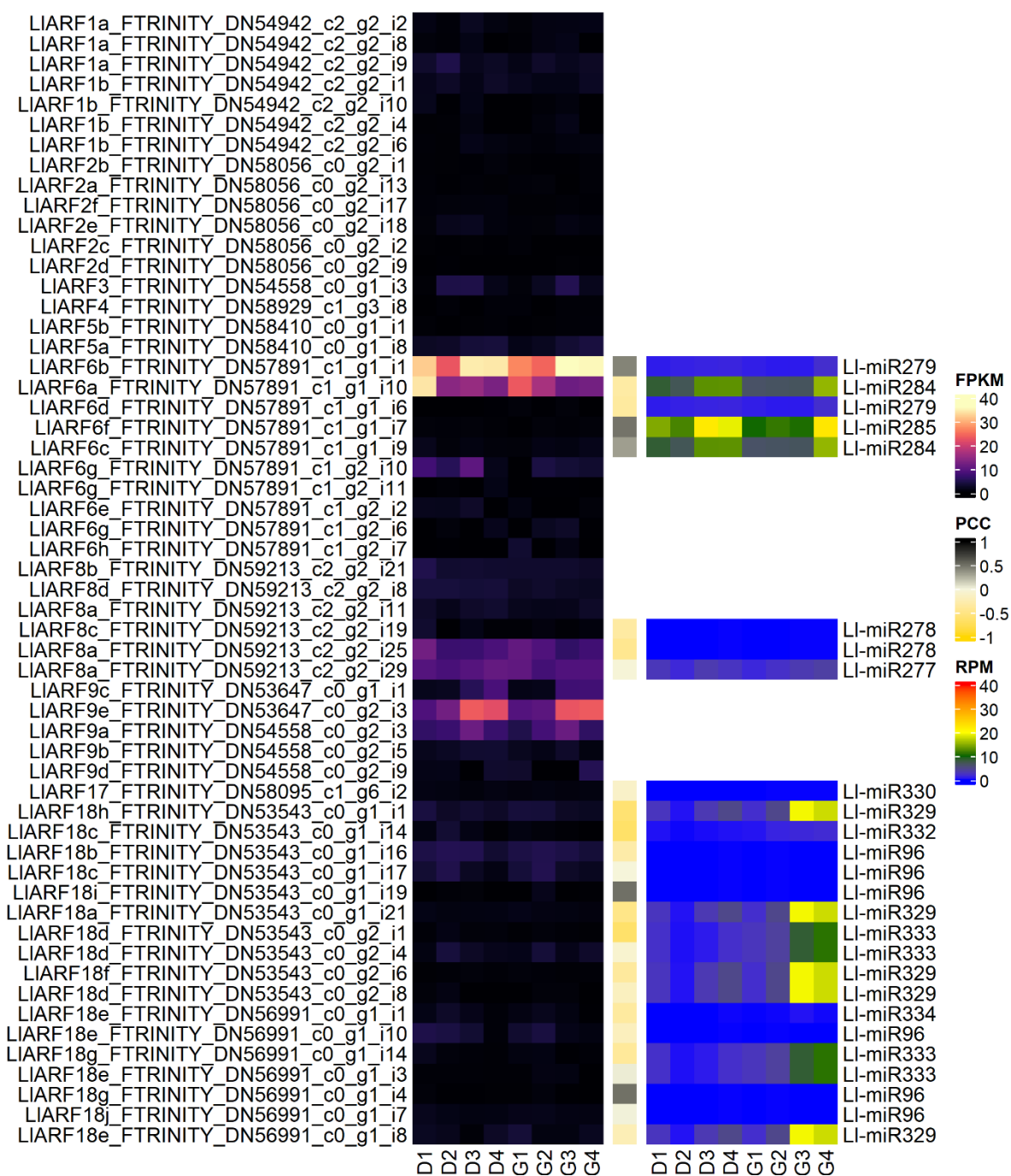


Rycina 36. Ekspresja genów kodujących białka z rodziny Aux/IAA w kwiatach łubinu żółtego zebranych z okółków dolnych (D1-4) i górnych (G1-4).

#### **Czynniki transkrypcyjne z rodziny ARF**

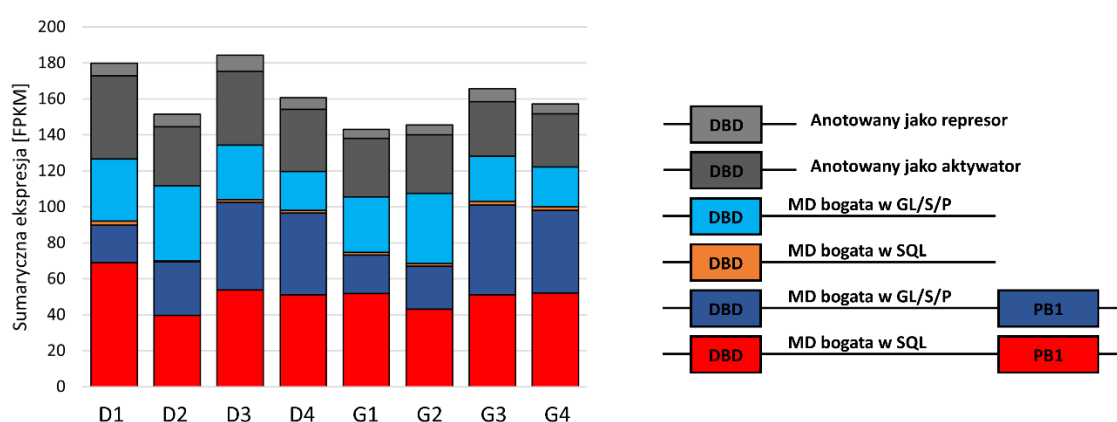
Wśród mRNA kodujących aktywatory transkrypcji, najsilniejszej akumulacji ulegają: FTRINITY\_DN57891\_c1\_g1\_i1, FTRINITY\_DN57891\_c1\_g1\_i10, kodujące odpowiednio: LIARF6b i a, oraz FTRINITY\_DN59213\_c2\_g2\_i25 i FTRINITY\_DN59213\_c2\_g2\_29, kodujące LIARF8a. Wszystkie wymienione transkrypty są celami dla miRNA z rodziny MIR167 (Rycina 37). Najbardziej akumulowanymi mRNA kodującymi represory transkrypcji są FTRINITY\_DN53647\_c0\_g2\_i3 i FTRINITY\_DN54558\_c0\_g2\_i3 (kodujące LIARF9e i a). Analiza degradomu wskazuje na to, że prawdopodobnie nie są one celami dla żadnych miRNA zidentyfikowanych w kwiatach łubinu żółtego (Rycina 37), jednak wyniki analiz *in silico* sugerują, że taka regulacja jest możliwa (Rycina 33).

Ponad połowa (61,5%) zidentyfikowanych par miRNA/ARF wykazuje negatywną korelację w ekspresji, o czym świadczy ujemny współczynnik korelacji Pearsona (PCC).



Rycina 37. Ekspresja genów kodujących czynniki transkrypcyjne z rodziny ARF w kwiatach łubinu żółtego zebranych z okółków dolnych (D1-4) i górnych (G1-4), oraz akumulacja sRNA, których udział w regulacji potranskrypcyjnej tych genów została udowodniona w sekwencjonowaniu degradomu. PCC (ang. Pearson Correlation Coefficient) jest miarą korelacji między dwoma parametrami. Im jej wartość jest bliższa 0, tym niższa korelacja; jej dodatnia wartość wskazuje na pozytywną korelację, a ujemna na negatywną.

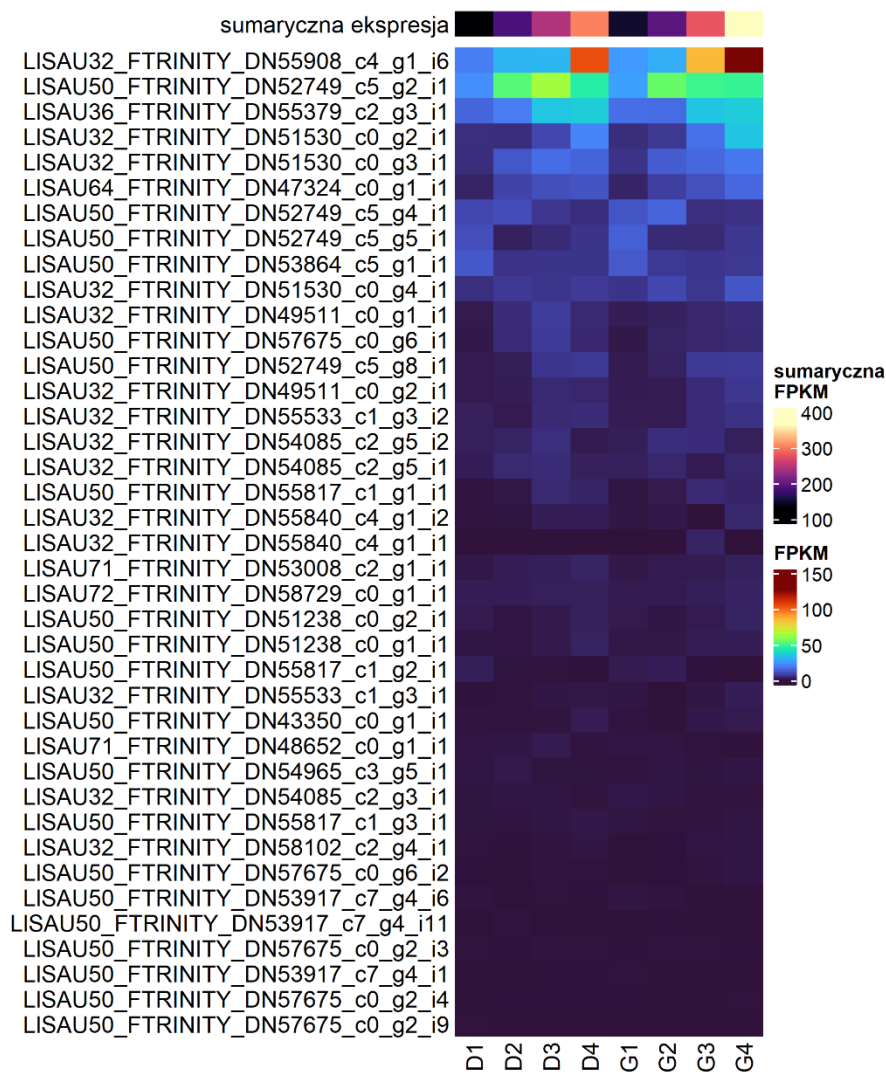
Geny *LIARF* wykazują najwyższą aktywność w kwiatach zebranych z dolnych okółków, będących na 1. i 3. etapie rozwoju. W większości przypadków (za wyjątkiem kwiatów D1 i G1) represory transkrypcji były silniej eksprymowane niż aktywatory. Zaskakująco wysoki udział w całkowitej ekspresji *LIARF* mają również geny kodujące białka skrócone do C-terminalnej domeny PB1 (Rycina 38).



Rycina 38. Sumaryczna ekspresja genów, kodujących białka ARF z podziałem na ich aktywność jako czynniki transkrypcyjne w kwiatach łubinu żółtego zebranych z okółków dolnych (D1-4) i górnych (G1-4).

### Analiza ekspresji genów z rodziny SAUR

Wynikiem działania ścieżki transdukcji sygnału auksyn jest reprogramowanie transkrypcyjne komórek. Najczęściej stosowanymi indykatorami funkcjonowania omawianego szlaku jest ekspresja genów szybkiej odpowiedzi na auksynę z rodziny SAUR. Sumaryczna ekspresja homologów tych genów rosła wraz z postępowaniem rozwoju kwiatu, przy czym w kwiatach rosnących na szczytowych okółkach była ona finalnie najwyższa. Największy udział w budowaniu takiego wzorca sumarycznej ekspresji mają transkrypty kodujące LISAU32, LISAU50, LISAU36 i LISAU64 (Rycina 39).

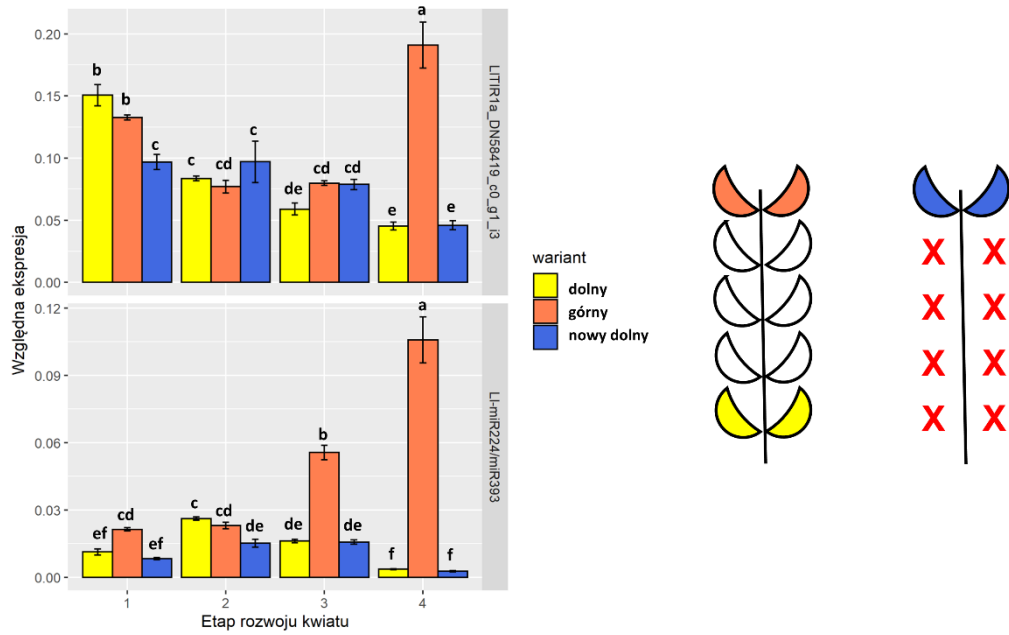


Rycina 39. Ekspresja genów kodujących czynniki transkrypcyjne z rodziny SAUR w kwiatach łubinu żółtego zebranych z okółków dolnych (D1-4) i górnych (G1-4).

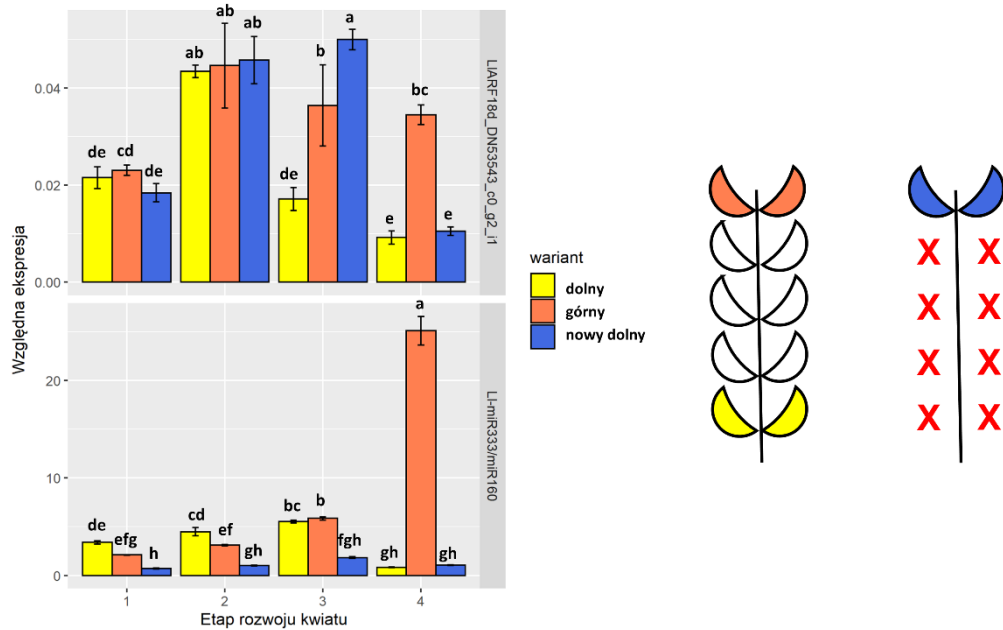
### Ekspresja wybranych modułów miRNA/TAAR i miRNA/ARF w kwiatach łubinu żółtego po usunięciu niższych okółków.

Usunięcie kwiatów z wszystkich okółków poza rosnącymi na ostatnim piętrze kwiatami będącymi na 1 lub 2 etapie rozwoju, skutkuje utrzymaniem tych ostatnich na roślinie i zawiązaniem strąków. W kolejnym etapie realizacji pracy doktorskiej zbadano, czy ekspresja wybranych elementów modułów mRNA/miRNA w kwiatach po usunięciu niższych okółków będzie wykazywała wzorzec podobny do ekspresji w kwiatach pochodzących z dolnych okółków, a jeśli tak, to czy będzie on uzyskiwany za pośrednictwem miRNA.

Transkrypt kodujący receptor LITIR1 wykazuje podobny wzorzec ekspresji w kwiatach etapów 1-3 niezależnie od ich pozycji na kwiatostanie, natomiast w ostatnim etapie ulega blisko czterokrotnie obniżonej ekspresji w kwiatach z wariantu dolnego i nowego dolnego, względem ekspresji w wariantcie górnym. Opisany wzorzec ekspresji nie jest negatywnie skorelowany z akumulacją LmiR224/miR393, którego jest genem docelowym (Rycina 40).



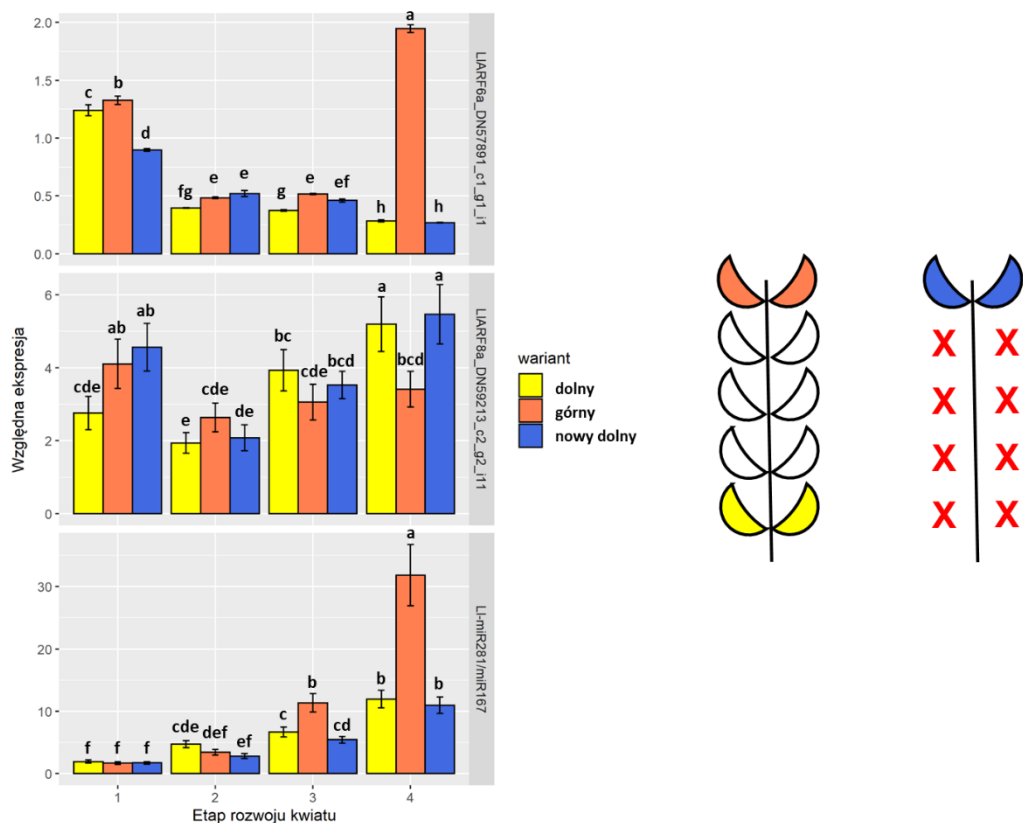
Rycina 40. Ekspresja *LITR1*, będącego jednym z genów docelowych dla L1-miR224/miR393 w kwiatach łubinu żółtego po usunięciu niższych okółków. Analiza statystyczna: ANOVA i test *post-hoc* Tukeya.



Rycina 41. Ekspresja *LIARF18*, będącego jednym z genów docelowych dla L1-miR333/miR160 w kwiatach łubinu żółtego po usunięciu niższych okółków. Analiza statystyczna: ANOVA i test *post-hoc* Tukeya.

Kwiaty na dwóch najwcześniejszych etapach rozwoju nie wykazują różnicowej akumulacji transkryptu kodującego *LIARF18d*. Różnice są widoczne dopiero na trzecim etapie, gdzie akumulacja omawianego mRNA jest najniższa w kwiatach dolnych, wyższa w kwiatach górnych i najwyższa w kwiatach nowych dolnych. Można tu zauważyć negatywną korelację z L1-miR333/miR160, obniżenie poziomu akumulacji tego miRNA w kwiatach z wariantu nowego dolnego prawdopodobnie powoduje wyższą retencję transkryptu *FTRINITY\_DN53543\_c0\_g2\_i1*. W kolejnym etapie rozwoju zarówno ekspresja omawianego transkryptu, jak i miRNA były na bardzo niskim poziomie w kwiatach dolnych i nowych dolnych w porównaniu do kwiatów górnych (Rycina 41).

Akumulacja zarówno *FTRINITY\_DN57891\_c1\_g1\_i1*, kodującego *LIARF6a*, jak i *FTRINITY\_DN59213\_c2\_g2\_i11*, kodującego *LIARF8a*, wraz z rozwojem kwiatów osiąga podobny poziom w wariantach nowym dolnym i dolnym względem wariantu górnego. Uwagę zwraca fakt, że *FTRINITY\_DN59213\_c2\_g2\_i11* wykazuje negatywną korelację z L1-miR281/miR167 w ostatnim etapie rozwoju kwiatów (Rycina 42).



Rycina 42. Ekspresja *LIARF6* i *LIARF8*, będących genami docelowymi dla L1-miR281/miR167 w kwiatach łubinu żółtego po usunięciu niższych okółków. Analiza statystyczna: ANOVA i test *post-hoc* Tukeya.



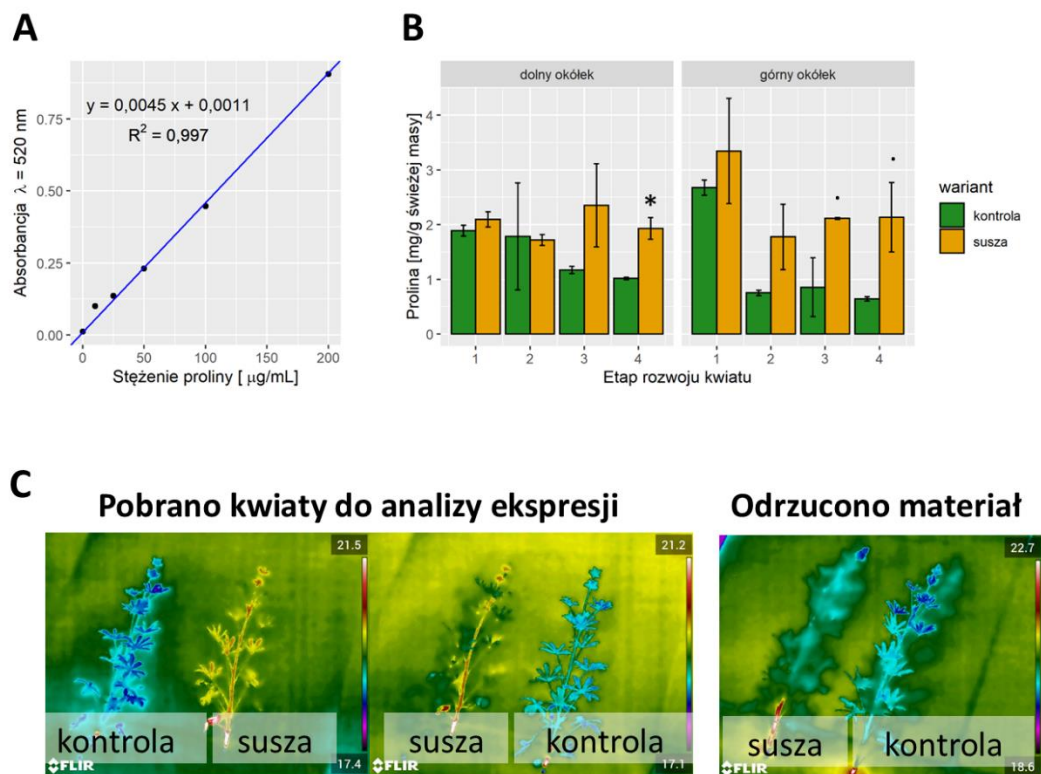
## Wpływ stresu suszy na kwiaty łubinu żółtego

W kolejnym etapie realizacji pracy doktorskiej sprawdzono, czy miRNA reguluje ekspresję wybranych genów kodujących szlak transdukcji sygnału auksyn w kwiatkach podczas suszy.

### Potwierdzenie stresu suszy w badanych roślinach

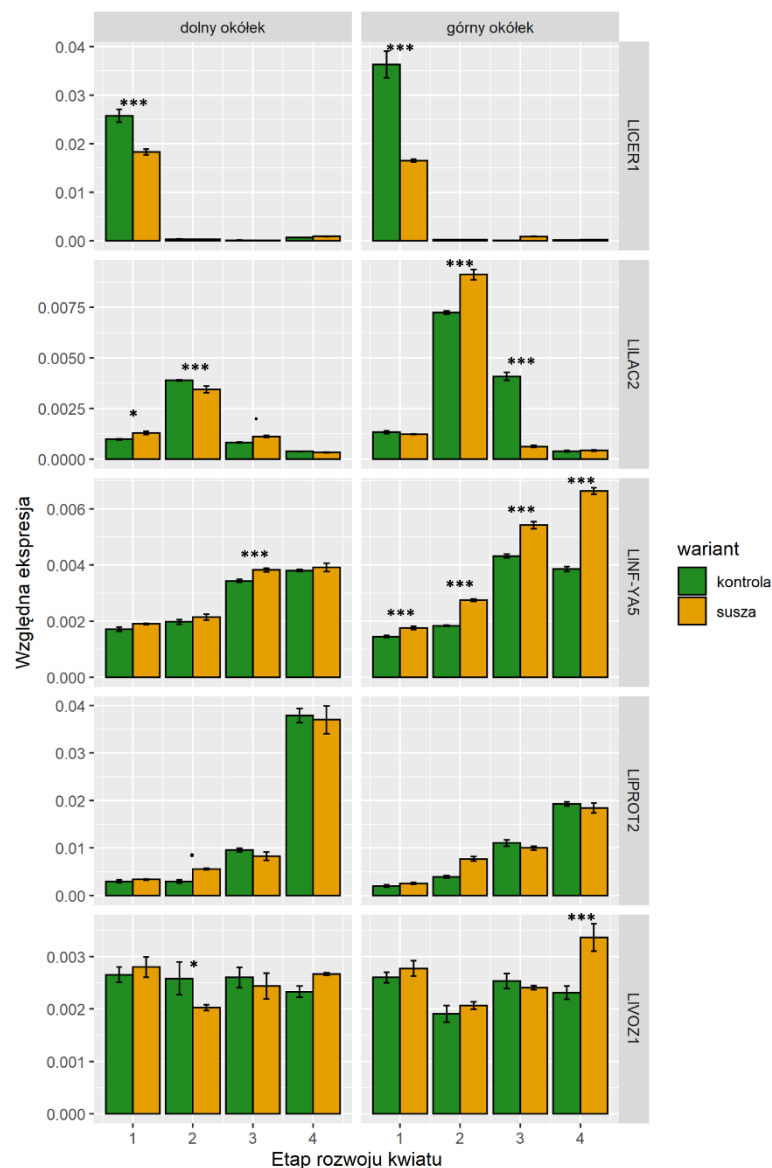
W celu upewnienia się, że pobrany do analiz materiał pochodzi z roślin, które doświadczają stresu suszy, oznaczono zawartość proliny w kwiatkach (Rycina 43A i B), wykonano badanie termograficzne (Rycina 43C) oraz zbadano aktywność transkrypcyjną wybranych genów związanych z suszą (Rycina 44).

Dopiero w kwiatkach znajdujących się na dwóch ostatnich etapach rozwoju zauważono podwyższony poziom proliny w wariancie suszy, a różnica ta była istotna statystycznie tylko w kwiatkach D4. Dodatkowo, na szczególną uwagę zasługuje wysoki poziom proliny w kwiatkach G1, względem D1, przy czym omawiana różnica jest istotna statystycznie na poziomie  $p < 0,005$  (\*\*\*) (Rycina 43B). Rośliny w czasie suszy miały podwyższoną temperaturę ze względu na niższą zawartość wody w ich tkankach. Jeśli dana roślina nie wykazywała różnicy w rozkładzie temperatury względem kontroli, zostawała odrzucana z dalszych analiz (Rycina 43C).



Rycina 43. Kontrola stresu suszy u roślin łubinu żółtego. A i B. Oznaczenie ilości proliny w kwiatkach metodą kolorymetryczną z kwasną ninhydryną. A. Krzywa kalibracyjna. B. Ilość proliny w kwiatkach. Wykonano test t dla prób o różnych wariacjach: \*  $p < 0,05$ , .  $p < 0,1$ . C. Termogramy wykonane dla roślin doświadczających suszy i kontrolnych. Dwa pierwsze zdjęcia od lewej strony – przykładowe termogramy ściętych roślin w stresie suszy i kontrolnych, uwzględnionych w analizie; rośliny zawsze były parami układane w dwóch pozycjach, aby wykluczyć wpływ temperatury odbitej na temperaturę roślin. Zdjęcie po prawej stronie - przykładowy termogram ściętych roślin w stresie suszy i kontrolnych, odrzuconych z analizy z powodu niedostatecznego odwodnienia części nadziemnej.

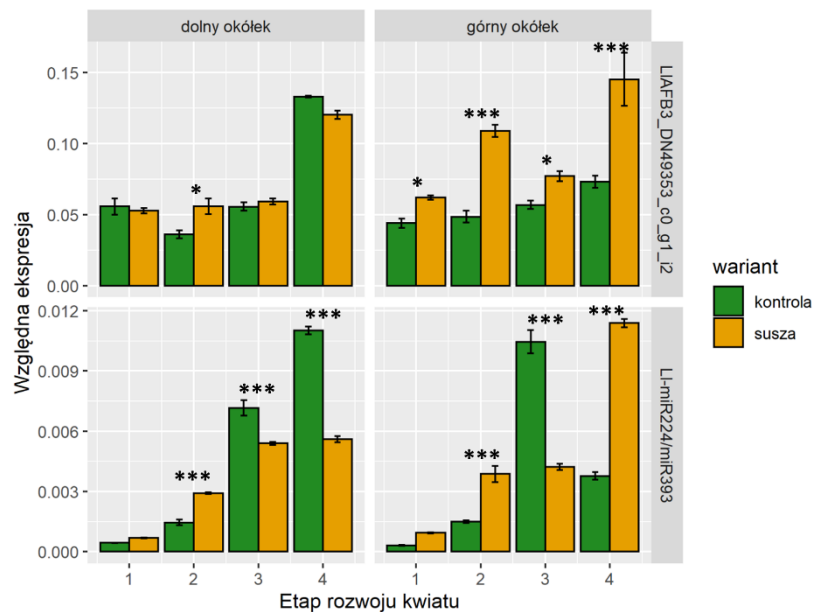
Geny wybrane jako markery suszy wykazywały zróżnicowaną odpowiedź na stres. *LICER1* ulegał obniżonej ekspresji w czasie suszy na etapie pierwszym rozwoju kwiatów. W kolejnym etapie transkrypt *LILAC2* był bardziej akumulowany względem kontroli w kwiatach górnych. Dla kwiatów rosnących na okółkach górnych charakterystyczne było obniżenie ekspresji *LILAC2* i podwyższenie poziomu akumulacji mRNA *LINF-YA5*. W ostatnim etapie rozwoju kwiaty z górnych okółków wykazywały w czasie suszy wyższą ekspresję *LINF-YA5* i *LIVOZI* (Rycina 44).



Rycina 44. Ekspresja potencjalnych markerów genetycznych stresu suszy w kwiatach łubinu żółtego. Analiza statystyczna: ANOVA i test *post-hoc* Tukeya . Gwiazdki na skraju wariantów kontrolnego i suszy oznaczają istotność statystyczną: .  $p < 0,1$ , \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,005$ .

**Ekspresja genów kodujących elementy modułów regulacyjnych miR393/TAAR, miR160/ARF18 i miR167/ARF6 w kwiatach łubinu żółtego podczas stresu suszy**

Kolejnym etapem eksperymentu było sprawdzenie, czy ekspresja wybranych genów kodujących elementy szlaku transdukcji sygnału auksyn zmienia się podczas stresu suszy oraz czy wykazuje odwrotną korelację do akumulacji miRNA, których są one genami docelowymi.



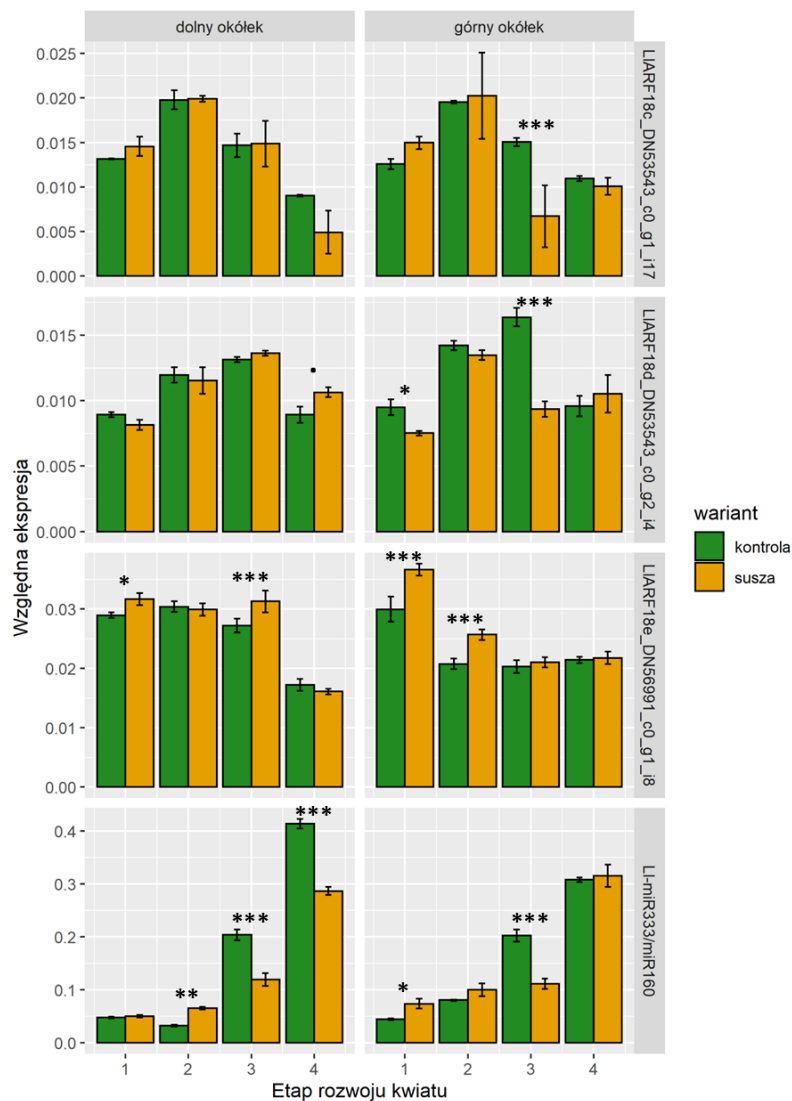
Rycina 45. Ekspresja wybranych elementów modułu miRNA/TAAR w kwiatach łubinu żółtego podczas stresu suszy. Analiza statystyczna: ANOVA i test *post-hoc* Tukeya. Gwiazdki na skraju wariantów kontrolnego i suszy oznaczają istotność statystyczną: .  $p < 0,1$ , \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,005$ .

Spośród zidentyfikowanych transkryptów kodujących funkcjonalne receptory auksyny z rodziny TAAR, do dalszych badań dotyczących suszy wybrano FTRINITY\_DN49353\_c0\_g1\_i2 kodujący AFB3, który jest celem dla L1-miR224/miR393. W kwiatach dolnych etapu 2. oraz we wszystkich etapach kwiatów górnych, ekspresja *LIAFB3* wykazuje istotnie podwyższony poziom w wariantach suszowych. Można zauważyć negatywną korelację między ekspresją L1-miR224/miR393 i badanego mRNA w kwiatach górnych, będących na 3. etapie rozwoju: wyższa ekspresja *LIAFB3* koreluje z obniżoną akumulacją L1-miR224/miR393 (Rycina 45).

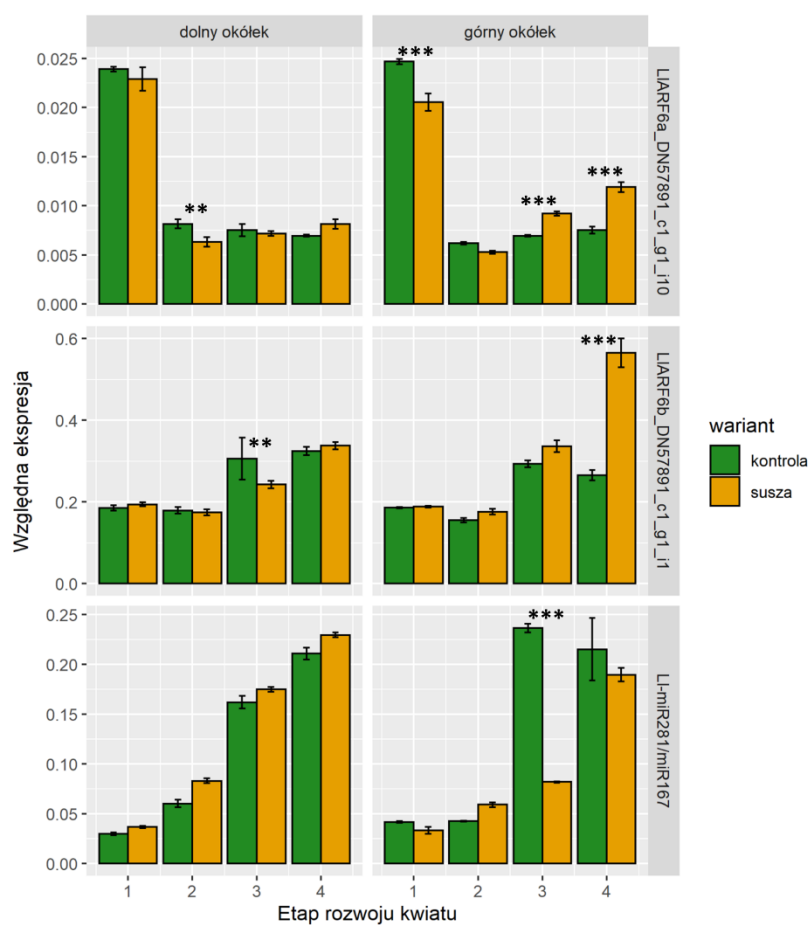
Ze względu na dużą ilość genów kodujących ARF18 u łubinu żółtego (*LIARF18A-C*, Tabela 20), zbadano ekspresję każdego z nich, wybierając po jednym najwyżej ekspresywanym transkrypcie. Geny te wykazywały zbliżoną ekspresję w warunkach kontrolnych i w stresie suszy, z nielicznymi wyjątkami. Podczas suszy obniżeniu uległ poziom akumulacji transkryptu FTRINITY\_DN53543\_c0\_g1\_i17 w wariantach górnych etapu 3, FTRINITY\_DN53543\_c0\_g2\_i4 w wariantach G1 i G3, a podwyższeniu FTRINITY\_DN56991\_c0\_g1\_i8 w wariantach D1, D3 oraz G1 i G2.

W kwiatach pochodzących z okółków dolnych, będących na trzecim etapie rozwoju LmiR333/miR160 ulega niższej akumulacji w trakcie suszy, a ilość FTRINITY\_DN56991\_c0\_g1\_i8 kodującego LIARF18e jest wyższa. Natomiast kwiaty z okółków górnych na etapie 1 wykazują nieco podwyższoną ilość LI-miR333 w warunkach badanego stresu względem warunków kontrolnych, a akumulacja FTRINITY\_DN53543\_c0\_g2\_i4, kodującego ARF18d wykazuje odwrotny trend (Rycina 46).

Transkrypt kodujący LIARF6a w najmłodszych badanych kwiatach z okółka górnego wykazuje w warunkach suszy obniżony poziom ekspresji, ale wraz z rozwojem kwiatu ten stosunek się odwraca. Natomiast transkrypt pochodzący z tego samego genu, lecz kodujący inne białko (ARF6b) wykazuje najwyższą akumulację w doświadczających stresu suszy kwiatach górnych ostatniego etapu rozwoju. Obniżony w warunkach stresowych poziom akumulacji LI-miR281/miR167 w kwiatach górnych etapu 3 koreluje z podwyższoną ilością FTRINITY\_DN57891\_c1\_g1\_i10 w tym wariantcie (Rycina 47).



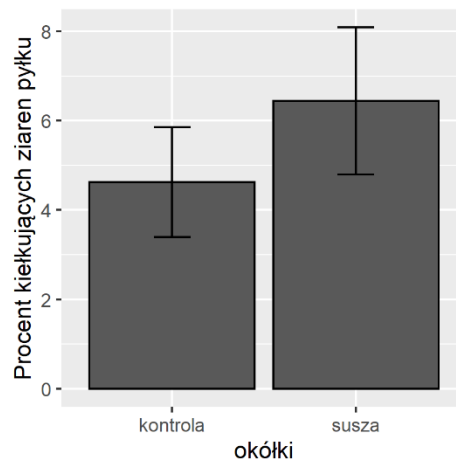
Rycina 46. Ekspresja wybranych elementów modułu ARF18/miR160 w kwiatach łubinu żółtego podczas stresu suszy. Analiza statystyczna: ANOVA i test *post-hoc* Tukeya. Gwiazdki na skraju wariantów kontrolnego i suszy oznaczają istotność statystyczną: .  $p < 0,1$ ; \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,005$ .



Rycina 47. Ekspresja wybranych elementów modułu ARF6/miR167 w kwiatach łubinu żółtego podczas stresu suszy. Analiza statystyczna: ANOVA i test *post-hoc* Tukeya. Gwiazdki na skraju wariantów kontrolnego i suszy oznaczają istotność statystyczną: .  $p < 0,1$ , \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,005$ .

### Kielkowanie pyłku podczas stresu suszy

W związku z tym, że podczas suszy odcinanych jest więcej kwiatów [24] postanowiono jeszcze sprawdzić, czy to zjawisko może być spowodowane spadkiem jakości pyłku. Ze względu na to, że analiza siły kiełkowania pyłku w roślinach niestresowanych nie wykazała istotnych różnic między preparatami sporządzonymi z pyłku pochodzącego z różnych pięter kwiatostanu, test kiełkowania pyłku *in vitro* wykonano tylko dla dolnego piętra. W tym przypadku również nie wykazano istotnych różnic między wariantem kontrolnym i suszą (Rycina 48).



Rycina 48. Wyniki analizy zdolności do kiełkowania pyłku pobranego ze skrajnych okółków w warunkach fitotronowych i podczas suszy. W wariantcie z suszą pyłek był pobrany wyłącznie z kwiatów zlokalizowanych na najniższych okółkach.

## Dyskusja

### Morfologia i funkcjonalność kwiatu

Rozwijające się na skrajnych piętrach kwiaty łubinu żółtego nie wykazują różnic morfologicznych, dopiero je widać po pełnej antezie, gdy zalążnie kwiatów z dolnych pięter ulegają powiększeniu, a z górnych nie (Rycina 11). Jedną z przyczyn odcinania kwiatów może być niezdolność pyłku do pozostawiania na znamieniu, zakłócony proces jego kiełkowania i w konsekwencji brak zapłodnienia zalążka w kwiatach z górnych okółków. Aby zweryfikować, czy tak jest w przypadku górnych okółków kwiatostanu łubinu żółtego, sprawdzono, czy pyłek ulega retencji na znamieniu i wykonano test jego kiełkowania. Zarówno w kwiatach szczytowych, jak i najniższych, pyłek znajdował się na znamieniu (Rycina 14). Co ciekawe, zdolność kiełkowania pyłku nie wykazywała odwrotnej korelacji z prawdopodobieństwem odcięcia kwiatu, ale wręcz przeciwnie, pyłek pochodzący z kwiatów rosnących na górnych okółkach kiełkował nieco lepiej, choć różnice te nie były istotne statystycznie (Rycina 15).

### Ekspresja genów regulujących ilość wolnej auksyny

Jeśli odcinanie kwiatów pochodzących z górnych okółków nie jest spowodowane niefunkcjonalnością pyłku, to może być ono spowodowane na przykład nieprawidłowym funkcjonowaniem innych części kwiatu, lub brakiem synchronizacji procesów rozwojowych w pylnikach i słupkach. Najbardziej poznanym integratorem rozwoju i funkcjonowania kwiatu jest auksyna, która steruje między innymi koordynacją wzrostu elongacyjnego nitek pylników i receptywności znamienia (opracowane w: [201]).

Na tej podstawie postawiono hipotezę, że w kwiatach kierowanych na drogę odcinania, może następować deregulacja procesów związanych z ustaleniem wzorca lokalizacji auksyny, co prowadziło do dysfunkcji któregoś z elementów odpowiedzialnych za płodność kwiatu. Pierwszym krokiem w kierunku weryfikacji tego stwierdzenia było zbadanie, czy geny biorące udział w biosyntezie, koniugacji i transporcie auksyny, ulegają zmianom w całych kwiatach. W tym celu z danych, pochodzących z sekwencjonowania transkryptomów, zidentyfikowano po 20 najsilniej eksprymowanych transkryptów, anotowanych jako produkty genów z pięciu rodzin: *YUCCA*, *GH3*, *PIN*, *PILS* i *AUX/LAX* (Rycina 16).

Kwiaty łubinu, wraz z osiągnięciem kolejnych etapów rozwojowych, wykazywały dużą dynamikę ekspresji omawianych genów. Co ważne, w kwiatach rozwijających się na skrajnych okółkach kwiatostanu ekspresja niektórych genów zmieniała się w przeciwstawnych kierunkach. Najbardziej jest to widoczne w przypadku transkryptów kodujących *LIPIN3* (FTRINITY\_DN54309\_c0\_g1\_i10) oraz *LILAX4* (FTRINITY\_DN56803\_c0\_g1\_i6), których ekspresja w kwiatach dolnych spada wraz z ich rozwojem, a w kwiatach górnych etapu 2. osiąga maksimum, by następnie ulec obniżeniu (Rycina 16). Uzyskane wyniki sugerują, że w kwiatach rosnących na skrajnych okółkach, auksyna wykazuje zróżnicowany profil lokalizacji, spowodowany różnicami w polarnym transporcie. Aby upewnić się w słuszności tego wniosku, wykonano analizę lokalizacji IAA w pręcikach i słupkach kwiatu łubinu.

## Lokalizacja auksyny IAA w rozwijających się kwiatach łubinu żółtego

Badania nad lokalizacją IAA w organach generatywnych skupiają się głównie na: wczesnych etapach kwitnienia [202,203], embriogenezie [204] (w tym somatycznej [205] i z mikrospor [206]), strefie odcinania kwiatu [21,23,207] oraz w owocach [208]. Lokalizowane są również elementy odpowiedzialne za syntezę [209,210], transport [210], percepcję [209,210] i tworzenie koniugatów auksynowych [210]. W doniesieniach na temat czasowo-przestrzennego wzorca lokalizacji IAA w kwiatach znajdujących się w późniejszych etapach rozwoju, bada się raczej efekt transdukcji sygnału auksyn, niż samą jej lokalizację, poprzez analizę indukcji sztucznych promotorów DR5 lub DR5v2, zawierających tandemowo powtórzone elementy AuxRE (np. [112,209]). Takie analizy mimo swej niewątpliwej wartości poznawczej, nie pozwalają uzyskać pełnej informacji, ani o stężeniu, ani o lokalizacji IAA. Indukcja tych promotorów zależna jest od stężenia IAA w jądrze komórkowym oraz od aktywności czynników transkrypcyjnych ARF. Niemożliwe jest, na przykład, uzyskanie w ten sposób informacji na temat obecności auksyny w cytoplazmie, lub, jeśli w komórce będzie przewaga represorów transkrypcji ARF, istnieje możliwość błędnej interpretacji braku sygnału jako braku auksyny. Jedynie nieliczne doniesienia literaturowe opierają się na wykorzystaniu metod immunolokalizacyjnych w organach kwiatów na ich ostatnich etapach rozwoju [50,202,211].

W badaniach obejmujących lokalizację IAA w pylnikach łubinu żółtego zaobserwowano niezwykle silną lokalizację IAA w ziarnach pyłku, oraz wyraźnie intensywniejszy sygnał w szybko rosnących nitkach pylników (Rycina 17). Ta obserwacja jest spójna z wynikami otrzymanymi przez innych badaczy. U *Arabidopsis thaliana* pylniki są głównymi producentami auksyny, a w stadiach 10. i 11., odpowiadającym etapom 1. i 2A u łubinu, proces ten zachodzi głównie w ziarnach pyłku i prokambium górnej części filamentu [209], a transport auksyny wzdłuż nitki pylnika jest wymagany do wzrostu elongacyjnego tej struktury [212]. U orzecha włoskiego we wczesnych etapach rozwoju pylnika IAA akumulowany jest nie tylko w ziarnach pyłku, ale i tapetum [202]. Tapetum jest tkanką, której funkcją jest odżywianie rozwijającego się pyłku i która zanika po osiągnięciu przez niego dojrzałości [213]. W późnych stadiach rozwojowych kwiatów łubinu żółtego ta struktura uległa degradacji. W badaniach nad jęczmieniem odkryto, że intensywnie produkowana w ziarnach pyłku auksyna stymuluje szlaki związane z wytwarzaniem i przemianą energii, wspomagając w ten sposób dojrzewanie pyłku [214]. Brak różnic między lokalizacją auksyny w pylnikach izolowanych z dolnych i górnych okółków jest spójny z wcześniejszymi obserwacjami, dotyczącymi retencji na znamieniu (Rycina 14) i zdolności kiełkowania pyłku (Rycina 15).

Również w słupkach kwiatów łubinu żółtego wykryto sygnał świadczący o obecności i dynamicznych zmianach stężenia IAA. Zaobserwowano przejściowy wzrost stężenia IAA tuż pod znamieniem, który gradientowo zanika w kierunku bazypetalnym i osiąga swoje maksimum w kwiatach etapu 2B zarówno w kwiatach dolnych, jak i górnych. Sygnał ten zanika w stadium 3. (Rycina 18). Etap 2B rozwoju kwiatu łubinu charakteryzuje się między innymi tym, że, otwarte główki pylników zrównują się ze znamieniem i to wtedy następuje zapylenie. Nasze obserwacje nie do końca pokrywają się z obserwacjami poczynionymi w badaniach na innych roślinach. Tym niemniej w słupkach tytoniu w czasie zapylenia i wzrostu łagiewki pyłkowej, również obserwowane są bardzo dynamiczne zmiany w obrębie znamienia: przed zapyleniem ilość IAA jest na średnim poziomie, w czasie zapylenia jest bardzo niska, a po zapyleniu znowu wzrasta i po 45 minutach osiąga maksymalne stężenie. Jednak u tej



rośliny sygnał auksynowy obserwowany jest bezpośrednio na znamieniu, a nie pod nim [50]. W przypadku *A. thaliana*, wolna auksyna obecna jest również w obrębie znamienia, ale po otwarciu pąku i zapyleniu przestaje być wykrywana w tej części kwiatu. Sygnał zaczyna być widoczny tuż pod znamieniem i gradientowo zanika w kierunku bazypetalnym [48]. Lokalizacja IAA w obrębie części apikalnej słupka może być swoista gatunkowo i zależeć na przykład od budowy kwiatu lub typu zapylenia.

Najsilniejsza akumulacja IAA w zalążniach kwiatów łubinu żółtego występuje w obrębie wewnętrznych osłonek, oraz u podstawy zalążka. Warto zaznaczyć, że IAA jest obecny nie tylko w samych jądrach komórkowych, ale także w cytoplazmie, gdzie prawdopodobnie ma charakter tranzytowy. Różnice w lokalizacji IAA między kwiatami górnymi i dolnymi są widoczne w wariacie 2B. W zalążkach izolowanych z kwiatów górnych widoczny jest znacznie wyraźniejszy i bardziej rozległy sygnał z cytoplazmy w tkankach okalających woreczek zalążkowy (Rycina 19). Na etapie 2B przestaje być możliwe odwrócenie determinacji kwiatów górnych, na przykład poprzez oberwanie wszystkich kwiatów z niższych okółków, jest zatem niezwykle prawdopodobne, że auksyna pojawiająca się w cytoplazmie grubej warstwy komórek okalających woreczek zalążkowy jest częścią szlaku sygnałowego, kierującego kwiat na ścieżkę odcinania. Uzyskane rezultaty lokalizacji IAA są spójne z wynikami ekspresji genów związanych z biosyntezą, transportem i koniugacją auksyn (Rycina 16).

Dynamiczne zmiany w homeostazie auksyny obserwowane były również w zalążniach *A. thaliana* [210]. Autorzy pokazali, że przed zapłodnieniem wpływ auksyny z zalążków jest ograniczony, a po zapłodnieniu obserwowana jest wzmożona biosynteza auksyny oraz obniżona koniugacja i transport, co skutkuje większą aktywnością transkrypcyjną genów regulowanych przez auksynę. Jednak ze względu na to, że autorzy nie wykonywali bezpośredniej lokalizacji IAA, trudno jest porównać uzyskane przez nich wyniki z naszymi. Detekcję IAA w tkankach zalążków wykonano dla bawełny, badając rolę tego fitohormonu podczas inicjacji wytwarzania włókien bawełny, mające miejsce w dniu otwarcia kwiatu. W tym czasie w komórkach epidermy zalążka, z których te włókna powstaną, obserwowany jest wzrost stężenia IAA [211]. Proces ten jest jednak charakterystyczny dla bawełny i nie zachodzi w łubinie, dlatego interpretacja naszych wyników w kontekście wyżej przytoczonych rezultatów może się jedynie ograniczać do faktu, że czasowo-przestrzenna dynamika IAA w okolicach czasu antezi wydaje się być powszechnie obserwowanym zjawiskiem.

### **Identyfikacja funkcjonalnych elementów szlaku transdukcji sygnału auksyn w kwiatach łubinu żółtego**

W rozwijających się kwiatach łubinu żółtego zidentyfikowano wszystkie elementy szlaku transdukcji sygnału auksyn. W obrębie rodzin białkowych, do których należą, białka te różnią się właściwościami decydującymi o dynamice, specyficzności i kierunku (represji/aktywacji) wywoływanych zmian. Podsumowanie tej analizy prezentuje Rycina 49.

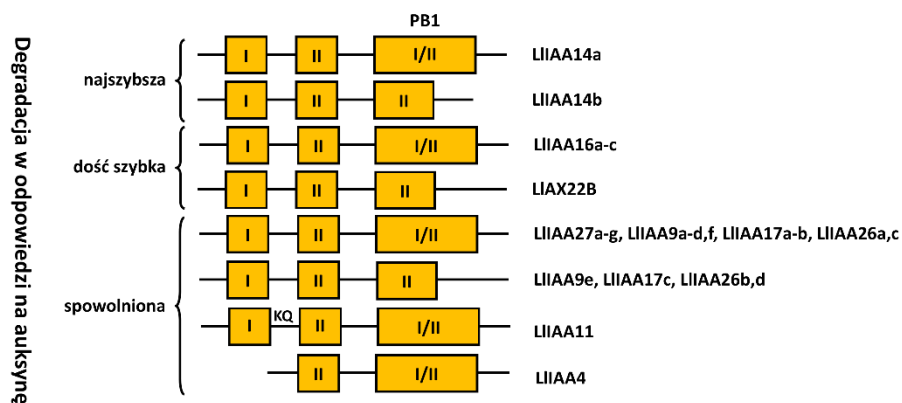
## TAAR



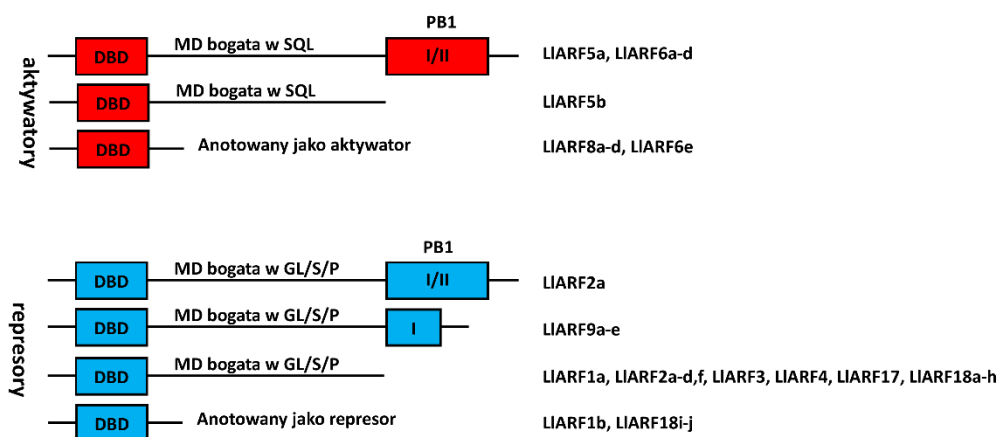
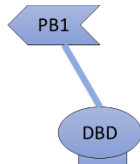
## Selektywność

AtTIR1 > LIAFB2 = LIAFB3 > LITIR1b > LITIR1b

## Aux/IAA



## ARF



Rycina 49. Podsumowanie analizy białek z rodzin TAAR, Aux/IAA i ARF zidentyfikowanych w kwiatach łubinu żółtego.

## Receptory auksyny z rodziny TAAR

Transdukcja sygnału auksyny w jądrze komórkowym rozpoczyna się od związania auksyny przez receptor należący do rodziny białek TAAR do kieszeni utworzonej przez pętle LRR 2, 12 i 14, będące częścią zamkniętego pierścienia na szczycie receptora. Umożliwia to stabilne związanie koreceptora z rodziny Aux/IAA i tak powstały kompleks za pomocą domeny F-box obecnej w białku TAAR wiąże się do białek Skp i Cullin, tworząc aktywny kompleks ligazy E3 SCF (ang. Skp, Cullin, F-box). W rezultacie następuje ubiquitynacja Aux/IAA i skierowanie go na drogę proteasomalnej degradacji.

W kwiatach łubinu żółtego zidentyfikowano cztery w pełni funkcjonalne białka należące do rodziny TAAR, kodowane przez trzy geny: *LITIR1*, *LIAFB2*, *LIAFB3* (Tabela 18, Rycina 20C), które wykazywały największe podobieństwo do homologów obecnych u najbliższej spokrewnionej spośród analizowanych gatunków, *L. angustifolius* (Rycina 22). Ponieważ nie jest jeszcze dostępna sekwencja genomu badanej rośliny, nie możemy stwierdzić, czy prezentują one kompletny zestaw receptorów auksyny u *L. luteus*. Sięgając jednak do danych literaturowych, można przypuszczać, że prawdopodobnie istnieją jeszcze inne geny *LITAAR*, które są aktywne w innych organach *L. luteus*, jako że u innych roślin bobowatych liczba tych genów w genomach waha się od 4 u *G. max* i *C. arietinum* do 7 u *M. truncatula* (Tabela 2, Rycina 4).

Z uwagi na niezwykle duże podobieństwo receptorów auksyny do receptora kwasu jasmonowego COI1 wykonano dalsze analizy *in silico* potwierdzające możliwość wiązania IAA do odpowiedniego miejsca. Brak takiej zdolności bądź ektopowe wiązanie IAA skutkowałoby niestabilnym wiązaniem Aux/IAA i brakiem transdukcji sygnału. W tym celu wykonano analizę struktury pierwszorzędowej jądrowych receptorów auksyny zidentyfikowanych w kwiatach łubinu żółtego oraz ich dobrze poznanych homologów u *Arabidopsis thaliana* (rzodkiewnik zwyczajny). Kontrolę negatywną analizy stanowiły sekwencje dwu receptorów kwasu jasmonowego AtCOI1 i GmCOI1, które mają bardzo podobną strukturę do jądrowych receptorów auksyny, ale wiążą inny ligand.

Na podstawie badań krystalograficznych AtTIR1 naukowcy brytyjscy ustalili, jakie aminokwasy tworzą kieszeń wiążącą auksynę i które z nich są kluczowe dla selektywności tego receptora: nisza zaangażowana w odpowiednie zorientowanie ligandu jest zbudowana z Lys-410, Ser-440, Gly-441, Ala-464 and Phe-465, natomiast za selekcję ligandu odpowiadają aminokwasy Cys-405, Ser-438, Leu-439, Ser-440, Ser-462 i Arg-489 [215]. W obrębie trzech receptorów auksyny zidentyfikowanych u łubinu żółtego wykazano obecność kluczowych aminokwasów, tworzących kieszeń wiążącą auksynę, jedynie LIAFB3 odbiegał od tego modelu (Rycina 20D). Wyniki wskazują na to, że ta izoforma będzie wykazywała inną selektywność względem auksyn niż AtTIR1, prawdopodobnie spektrum ligandów będzie szersze.

Powyższe rezultaty były impulsem do wykonania dokowania molekularnego białko-ligand dla zidentyfikowanych białek LITAAR, gdzie ligandami były auksyny (IAA, NAA, pikloram) oraz tryptofan i kwas jasmonowy jako kontrole negatywne. Ze względu na fakt, że posiadamy dość rozległą wiedzę na temat wiązania ligandów przez AtTIR1 [215] (Rycina 20A i B), dokowanie przeprowadzone dla tego białka stanowiło wzorzec dla prawidłowego, funkcjonalnego wiązania IAA. Uzyskano zaskakujące rezultaty, sugerujące, że to LITIR1a i LITIR1b wykazują szersze spektrum wiązania ligandów niż LIAFB2 i LIAFB3 (Rycina 21). Dodatkowo uwagę zwraca wartości energii obliczone dla wiązania IAA i NAA do każdego z analizowanych białek, które sugerują, że NAA jest preferencyjnie wiązany przez LITIR1a (Rycina 21). Aby zweryfikować uzyskane wyniki, należałoby przeprowadzić analizę EMSA (ang. electrophoretic mobility shift assay), ponieważ jednak nie był to główny temat niniejszej rozprawy doktorskiej, takiego doświadczenia nie przeprowadzono.

#### Koreceptory auksyny z rodziny Aux/IAA

Kolejnym etapem transdukcji sygnału auksyn po odpowiednim, stabilnym związaniu auksyny do kieszeni receptora, jest stabilne wiązanie białka Aux/IAA do powstałego kompleksu, jego ubikwitynacja i proteasomowa degradacja. W kwiatach łubinu żółtego zidentyfikowano 12

genów *LIAux/IAA*, kodujących 30 funkcjonalnych białek (Tabela 19), z których przeważająca większość wykazuje podobieństwo do homologów obecnych u *L. angustifolius* (Rycina 25).

W tworzeniu kompleksu TAAR-IAA-Aux/IAA kluczowa jest domena II, zawierająca 13-aminokwasowy motyw degronu, z kluczową sekwencją rdzenia GWPPV. Im bardziej motyw ten jest podobny do sekwencji konsensusu QVVGWPPVRSYRK, tym szybsza jest degradacja białka Aux/IAA, a co za tym idzie, szybsza transdukcja sygnału [216]. Na podstawie analizy podobieństw omawianej sekwencji, można zatem uszeregować zidentyfikowane białka od teoretycznie najszybciej do najwolniej degradowanych: LIIAA14a i b (100% zgodności), LIIAA16a-c (1 różnica), LIAX22B (1 różnica w sekwencji rdzenia), LIIAA27d-g, i, j, LIIAA9a-f (2 różnice, w tym w sekwencji rdzenia), LIIAA11, LIIAA17a-c (3 różnice), LIIAA27a-c i h, LIIAA4 (3 różnice, w tym w sekwencji rdzenia), LIIAA26a-d (4 różnice, w tym w sekwencji rdzenia). Niepodatne na degradację, a tym samym niewrażliwe na auksynę, wydają się być: LIIAA31a-d (8 różnic w tym 2 w okolicy rdzenia), LIIAA30a-b, LIIAA33a-c (całkowicie inna), LIIAA14c, LIIAA16d, LIIAA17d, LIIAA30c (brak) (Rycina 23). Tu należy nadmienić, że ze względu na niepełną budowę białek, ograniczoną do domeny PB1, wszystkie wymienione Aux/IAA niewrażliwe na auksynę zostały uznane za нефункционалне. Dodatkowym elementem, który wpływa na szybkość degradacji Aux/IAA jest obecność sekwencji KR lub KQ pomiędzy domenami I i II, które wpływają na wydajność ubikwitynacji Aux/IAA po jego związaniu do kompleksu TAAR-auksyna [217]. Ze względu na obecność motywu KQ zamiast KR, tempo degradacji LIIAA11 jest najprawdopodobniej wolniejsze, niż LIIAA17a-c mimo tej samej liczby różnic w motywie degronu. Ponieważ motyw KR raczej przyspiesza, ale nie jest wymagany w procesie ubikwitynacji, jego brak u LIAX22B i LIIAA26a-d spowolni, ale nie uniemożliwi degradację tych białek w odpowiedzi na sygnał auksynowy [217] (Rycina 23).

W szlaku transdukcji sygnału auksyn białka Aux/IAA pełnią rolę nie tylko koreceptorów auksyny, ale przede wszystkim represorów czynników transkrypcyjnych ARF. Aby pełnić tę funkcję, muszą posiadać zarówno domenę represji ARF (domena I), jak i domenę, za pomocą której ulegają interakcji z ARF, oraz multimeryzacji z innymi Aux/IAA (domena PB1). Represja transkrypcji odbywa się za pośrednictwem białek TOPLESS, które są rekrutowane przez Aux/IAA [55] za pomocą motywu EAR (LxLxL), a zamiana którejkolwiek z lizyn w tym miejscu na inny aminokwas skutkuje utratą omawianej funkcji [218,219]. W sytuacji niskiego poziomu auksyny, Aux/IAA wiążą się do ARF przez domenę PB1 w postaci helikalnych homo- i heterooligomerów [219], przy czym siła oddziaływań między różnymi Aux/IAA jest większa, niż między takimi samymi, i zależy od rozkładu ładunków na powierzchniach interakcji PB1 [220]. Obecność izoformy pozbawionej motywu EAR (tak jak w przypadku LIIAA17a-c, LIIAA4 i LIIAA9f, Rycina 23, Tabela 19) w obrębie przyłączonego do ARF oligomeru, będzie najprawdopodobniej skutkowało osłabieniem interakcji z tetramerem TPL, którego każdy człon może ulegać interakcji z partnerem [221].

Badania krystalograficzne domen PB1 u *AtARF1*, *AtARF5* [115], *AtARF7* oraz *AtIAA17* wraz z analizami dwuhybryd drożdżowych [219], spektroskopii NMR oraz analiz ITC ARF17-ARF5 [220] doprowadziły do rozszyfrowania strukturalnych podstaw interakcji ARF-Aux/IAA. Miejsca („łatki”) dodatnio i ujemnie naładowanych reszt aminokwasowych w obrębie domeny PB1 tworzą + i – płaszczyzny interakcji („faces”), a interakcja odbywa się na zasadzie przyciągania ładunków odwrotnych. Części zasadowa i kwaśna zawierają charakterystyczne motywy: niezmienną lizynę (K) w płaszczyźnie „+”, oraz OPCA (DxD/ExD) w płaszczyźnie „-“.

Na podstawie powyższych faktów można stwierdzić, że zlokalizowana C-terminalnie domena PB1 jest prerekwizytem funkcjonalności Aux/IAA. Omawiane białka całkowicie pozbawione tej domeny zostały wykluczone z dalszych analiz, ponieważ nie są one zdolne ani do tworzenia kompleksów z ARF, ani oligomeryzacji z innymi Aux/IAA. Natomiast domena PB1 typu I lub II, posiadająca tylko jedną powierzchnię interakcji, będzie uniemożliwiać dołączanie kolejnych elementów, stanowiąc terminalny człon oligomeru, osłabiając w ten sposób interakcję z TPL.

#### Czynniki transkrypcyjne z rodziny ARF

Białka ARF są czynnikami transkrypcyjnymi, zatem aby spełniać swoją funkcję, muszą zawierać co najmniej dwie domeny: odpowiedzialną za rozpoznawanie odpowiednich elementów w promotorach lub innych częściach regulacyjnych genu (DBD), a także domenę aktywacji lub inhibicji transkrypcji (MD/MR). Dodatkowo, kanoniczne białko ARF posiada także domenę PB1, umożliwiającą mu interakcję z białkiem Aux/IAA, dzięki czemu są zdolne do odbierania jądrowego sygnału auksynowego. Celem szczegółowej analizy domen białek ARF zidentyfikowanych u łubinu żółtego było zaklasyfikowanie ich do następujących grup: kanonicznych aktywatorów lub represorów, niekanonicznych (pozbawionych domeny PB1) aktywatorów lub represorów, oraz skróconych białek ARF o nieokreślonej funkcji. Ponadto, potwierdzono obecność sygnału lokalizacji jądrowej w funkcjonalnych białkach.

Geny kodujące czynniki transkrypcyjne ARF są najwcześniej ukształtowanym elementem szlaku transdukcji sygnału auksyn. Jeden gen *CaARF* jest obecny już u zielonej algi *Chlorokybus atmophyticus* [61], a inne geny z tej rodziny można znaleźć we wszystkich poznanych dotąd genomach roślin lądowych (Tabela 3, Rycina 4). Obecność licznych wersji tych białek umożliwia sterowanie specyficznością odpowiedzi na auksynę, poprzez odpowiedni dobór zestawów czynników transkrypcyjnych w danym kontekście tkankowym i fizjologicznym.

W transkryptomach kwiatów łubinu żółtego zidentyfikowano 16 aktywnych transkrypcyjnie genów ARF, z czego 2 kodują białka o nieokreślonej funkcjonalności (*LIARF2B* i *LIARF6C*), a 4 kodowały aktywatory transkrypcji, stanowiąc 26,7% wszystkich ARF (Tabela 20). Liczba genów w genomach innych poznanych roślin bobowatych waha się między 24 u *Cicer arietinum* L., a 51 u *Glycine max* L., przy czym liczba genów kodujących represory jest zwykle większa, niż aktywatorów. Wyjątkiem jest *Medicago truncatula*, u której aktywatory stanowią aż 57,1% genów ARF (Tabela 3).

Jedną z najważniejszych cech, jakie musi posiadać czynnik transkrypcyjny, jest zdolność do wiązania DNA o określonej sekwencji. Badania krystalograficzne nad domenami wiążącymi DNA (DBD) ARF1 i ARF5 u *Arabidopsis thaliana* wykazały, że są one złożone z trzech odrębnych funkcjonalnie poddomen: B3, DD (ang. dimerization domain) i AD (ang. ancillary domain). B3 ma strukturę otwartej beta-beczki wiążącej DNA, DD jest złożona z dwu flankujących B3 odcinków i tworzy bardzo zakrzywioną strukturę beta-kartki, natomiast AD znajduje się za nimi i stanowi małą, pięcionicową beta-beczkę, która silnie oddziałuje z DD [109] (Rycina 26). Białka ARF formują dimery za pośrednictwem domeny DD [109], a następnie w takiej formie za pomocą B3 kooperatywnie wiążą się do elementów AuxRE (ang. Auxin Response Elements) [222,223], znajdujących się głównie w obrębie promotorów i obszarów 5'UTR w genach docelowych [224]. Brak dimeryzacji przez domeny DD skutkuje niższym powinowactwem B3 do AuxRE [109] lub wręcz brakiem wiązania do DNA, jak wykazano dla ARF18 u *Brassica napus* skróconego o 55 aminokwasów w domenie DD

i niezdolnego do dimeryzacji [225]. System ten działa na zasadzie molekularnej suwmiarki: każda para ARF-ARF ma różny przestrzenny rozstaw domen B3 (wiązących DNA), zatem przestrzenny rozstaw domen B3 definiuje preferencje danej pary ARF do wiązania z AuxRE o odpowiedniej odległości tych elementów względem siebie [109,226]. Należy tu nadmienić, że odcinki łączące domeny DD i B3 są elastyczne, co sprawia, że mogą one dostosowywać swoją konformację odległości między docelowymi AuxRE, ale tylko do pewnego do pewnego zakresu określonego przez długość pętli łączącej obie części DD i flankowany przez nie B3 [109]. Analiza porównawcza sekwencji aminokwasowych ARF zidentyfikowanych w kwiatach łubinu żółtego wykazała, że białka kodowane przez *LIARF4*, *LIARF17* oraz *LIARF18A* i *B* zawierają dłuższe regiony między DD i B3 (Rycina 26), co sugeruje, że ich dimery mogą się przyłączać do szerzej rozstawionych elementów AuxRE.

Nie tylko odległości między parami elementów AuxRE decydują o specyficzności ich wiązania przez ARF, a przez to odpowiedzi transkrypcyjnej na auksynę, ale także ich sekwencja. Różnice w kluczowych aminokwasach domeny B3 obserwowane u różnych ARF co prawda nie wpływają na jakościowe rozróżnienie między elementami AuxRE, ale decydują o sile wiązania do poszczególnych AuxRE, przy czym TGTCGG okazuje się być preferowane względem TGTCTC [109,226,227]. Przeprowadzone przez Zemlyanskayę i wsp. analizy bioinformatyczne wskazują na istnienie jeszcze innych motywów AuxRE, a prawdopodobnie cztery motywy TGTCNN (TGTCTC, TGTCCC, TGTCGG, i TGTCTG) są związane ze zwiększeniem aktywności genów odpowiedzi na auksynę, a dwa inne (TGTCGG, TGTCAT) ze zmniejszeniem tej aktywności [228]. Dodatkowo, poszczególne motywy wydają się być charakterystyczne dla genów pełniących określone funkcje [228,229]. Histydyna w motywie SxxxxHGxxSxxR, biorąca udział w rozpoznawaniu sekwencji TGTCNN, jest w *LIARF17* i we wszystkich izoformach *LIARF18* zastąpiona glicyną, co sugeruje, że białka te mogą wykazywać odmienne właściwości (selektywność i/lub powinowactwo) względem AuxRE (Rycina 26). Ekspresja tych genów w komórce będzie się najprawdopodobniej wiązała z regulacją odrębnej puli genów.

Aby potwierdzić wynikającą z podobieństwa anotację danego ARF do represorów lub aktywatorów transkrypcji, wykonano analizę składu aminokwasowego sekwencji MD zlokalizowanej pomiędzy Aux\_resp i PB1. Zidentyfikowane w kwiatach łubinu homologi represorów transkrypcji, *LIARF1a*, *LIARF2a-c*, *LIARF3*, *LIARF4*, *LIARF9a-e*, *LIARF17*, *LIARF18a-h*, zawierały w obrębie domeny środkowej ponadprzeciętną zawartość seryny (Ser), leucyny (Leu), proliny (Pro) i glicyny (Gly), podobnie jak u represorów *AtARF* u *A. thaliana* [90,223] (Rycina 27, lewa strona). Homologi aktywatorów transkrypcji, *LIARF5a* i *LIARF6a-d*, były w MD wzbogacone w glutaminę (Gln), serynę (Ser), i leucynę (Leu) (Rycina 27, prawa strona). W białkach ARF *Arabidopsis* MR o takiej budowie funkcjonuje jako domena aktywacji transkrypcji [90,223]. Nie ujęte w analizie białka były pozbawione omawianej domeny, a ich przypuszczalna funkcja zostanie omówiana w dalszej części pracy.

W następnym etapie analizy sekwencji aminokwasowych ARF sprawdzono zawartość i kompletność domeny PB1. Posiada ona bardzo podobne właściwości i funkcjonuje w ten sam sposób, jak PB1 w białkach Aux/IAA. Zaskakujące było to, że tylko sześć analizowanych białek zawierało PB1 typu I/II i były to wyłącznie aktywatory transkrypcji, a pięć zawierało PB1 typu I i były to represory. ARF zawierające PB1 typu I będą wykazywały słabszą interakcję ARF-ARF [219]. Wszystkie pozostałe ARF były pozbawione PB1 (Rycina 28, Tabela 20), co w większości przypadków wiąże się z niewrażliwością na auksynę. Wyjątkiem jest tu

homolog ARF3/ETTIN, który bezpośrednio odbiera sygnał tego fitohormonu, bez udziału TAAR/Aux/IAA. Obecność takich form ARF nie jest niczym niezwykłym, występują one w każdej dotychczas poznanej roślinie wyższej (Tabela 3).

Zidentyfikowane białko LIARF3, tak jak jego homologi w innych roślinach, zawiera konserwowaną C-terminalną domenę ES (ETT-Specific) [93] (Rycina 29), co potwierdza, że jest on zdolny do odbioru sygnału auksyn drogą niekanoniczną, tzn. poprzez bezpośrednie związanie fitohormonu, co prowadzi do dysocjacji kompleksu TPL/TPR-HDA19 i derepresję regulowanych przez niego genów [230]. Podobnie pozbawiony PB1 homolog ARF2 u *Arabidopsis* prawdopodobnie działa niezależnie od Aux/IAA poprzez obecny w jego sekwencji motyw EAR (LxLxL) w obrębie MD i rekrutację TPL/TPR [62]. Obecne w kwiatach łubinu LIARF2c,d,e zawierają EAR, sugerując podobny sposób funkcjonowania.

Na szczególną uwagę zasługuje obecność zaskakująco wielu C-terminalnie skróconych białek ARF, zawierających wyłącznie domenę DBD (Tabela 20). Wiele przesłanek wskazuje na to, że takie białka mogą być funkcjonalne. (i) Wykazano, że domeny konstytuujące ARF: DBD, MD i PB1 mogą funkcjonować samodzielnie [90,109], i niewykluczone, że jest możliwe wiązanie pojedynczego elementu AuxRE, z zastrzeżeniem, że obecność pozostałych domen w pełnych ARF mogą wpływać na powinowactwo do AuxRE [109]. (ii) W procesie ewolucji białka ARF powstały z Charofitów, z połączenia samodzielnie funkcjonujących domen DBD, MD i PB1 [60,231]. (iii) U melonowca właściwego (*Carica papaya*) gen *CpARF6*, kodujący białko zawierające wyłącznie domenę DBD, ulega podwyższonej ekspresji podczas późnego rozwoju kwiatu i utrzymuje się na wysokim poziomie podczas zawiązywania owocu oraz w pierwszych etapach jego rozwoju [95]. U *Medicago truncatula* skrócony w ten sam sposób *MtARF29* ulega umiarkowanej ekspresji w różnych trankach tej rośliny, w tym w kwiatach [78]. Powyższe fakty sugerują, że takie formy ARF również mogą być funkcjonalne i działają albo poprzez stabilizację związanego pojedynczo ARF pełnej długości, albo maskując miejsca AuxRE w promotorach i w ten sposób negatywnie regulując ekspresję genów kontrolowanych przez auksynę.

Przeprowadzone analizy filogenetyczne, obejmujące sekwencje aminokwasowe homologów LIARF z *Arabidopsis thaliana*, *Glycine max* i *Lupinus angustifolius*, potwierdziły ich podobieństwo do reprezentantów odpowiednich podrodzin ARF. Zgodnie z oczekiwaniami, sekwencje grupowały się w trzy główne kłady: A, B i C [60]: kład A zawierał aktywatory transkrypcji ARF5/6/8/19, kład B większość represorów transkrypcji ARF1/2/3/4/18, a kład C LIARF17 (Rycina 30).

### Identyfikacja białek TOPLESS w kwiatach łubinu żółtego

Białko TOPLESS nie jest elementem szlaku transdukcji sygnału auksyn, jednakże jego obecność jest niezbędna do wyjściowej represji białek ARF przez Aux/IAA przy niskim stężeniu auksyn [55,232]. U łubinu żółtego zidentyfikowano 3 transkrypty, kodujące 3 białka LITPLa-c i potwierdzono *in silico* ich funkcjonalność. LITPLc nie zawiera ani jednej domeny WD40, ale dane literaturowe dowodzą, że nie są one istotne w transdukcji sygnału auksynowego [233], stąd zaklasyfikowano to białko jako funkcjonalne (Rycina 31).

## Identyfikacja miRNA regulujących elementy szlaku transdukcji sygnału auksyn w kwiatach łubinu żółtego

W celu identyfikacji modułów miRNA/*TAAR/Aux/IAA/ARF*, została przeprowadzona zintegrowana analiza wyników sekwencjonowania degradomu, sRNA i transkryptomów kwiatów łubinu żółtego, rozwijających się na skrajnych okółkach kwiatostanu. Na tej podstawie udało się ustalić, że w kwiatach aktywne są następujące moduły regulacyjne: miR393/*TIR1*, /*AFB3*, miR167/*ARF6*, miR167/*ARF8*, miR160/*ARF18* oraz nowy miRNA L1-miR475/*AFB2* (Rycina 32). Na uwagę zasługuje fakt, że podrodzina *L1ARF18* jest najliczniej reprezentowana w przedstawionej analizie, a ponadto wszystkie transkrypty kodujące funkcjonalne białka *L1ARF18* są regulowane przez miRNA z rodziny *MIR160* (Rycina 37). Pary miRNA/sekwencja docelowa zostały wyodrębnione przy użyciu dedykowanego dla danych degradomowych programu *CleaveLand4*, którego działanie opiera się na założeniu, że kierowane przez miRNA cięcie następuje między 10 i 11 nukleotydem regionu najwyższej komplementarności między miRNA i transkryptem docelowym, licząc w kierunku 5'→3' na miRNA [195]. Manualna analiza komplementarności sekwencji docelowych i miRNA z całej rodziny cząsteczki wskazanej przez omawiany program pozwala stwierdzić, że tak naprawdę większość z nich może kierować cięciem danego transkryptu (Rycina 32).

*CleaveLand4* jest niezwykle pomocnym narzędziem w wysokoprzepustowym poszukiwaniu modułów regulatorowych sRNA/mRNA, na podstawie przytłaczającej ilości danych, jaką generuje sekwencjonowanie nowej generacji. Jednak wyniki, jakie się dzięki niemu uzyskuje, wymagają dalszej, manualnej weryfikacji.

Zintegrowana analiza wyników sekwencjonowań transkryptomów, sRNA i degradomu daje najpewniejsze rezultaty dotyczące potranskrypcyjnej regulacji przez mikro RNA. Ponieważ jednak: (i) dane degradomowe zostały uzyskane wyłącznie dla kwiatów znajdujących się na 3. etapie rozwoju, (ii) efektem rozpoznania sekwencji docelowej przez miRNA nie musi być konieczne cięcie transkryptu, a na przykład inhibicja translacji lub remodelowanie chromatyny, istnieje możliwość, że nie wszystkie pary miRNA-docelowe mRNA zostały zidentyfikowane w analizie degradomu. Dlatego, aby dopełnić krajobraz potranskrypcyjnej regulacji przez miRNA, postanowiono wykonać predykcję *in silico* za pomocą programu *psRNATarget* [177]. Zgodnie z oczekiwaniami, otrzymano o wiele więcej przewidywanych par miRNA-mRNA (Rycina 33). Analiza ta, mimo że nie daje tak pewnych wyników, jak analiza degradomu, pozwala na poszerzenie gamy potencjalnych elementów, wchodzących w skład skomplikowanej sieci regulacyjnej i wyznacza kierunek dalszych badań. Na przykład, warto by zweryfikować możliwość potranskrypcyjnej regulacji transkryptów kodujących białka z rodziny *Aux/IAA* przez miRNA z rodzin *MIR390*, *MIR172* i *MIR156* zwłaszcza, że nieliczne doniesienia literaturowe wskazują na możliwość regulacji tych genów przez miRNA [154].

## Ekspresja elementów szlaku transdukcji sygnału auksyn w warunkach kontrolnych oraz ich regulacja przez miRNA

Na podstawie omówionych już wyników badań możemy między innymi stwierdzić, że podczas rozwoju kwiatu łubinu żółtego mają miejsce dynamiczne zmiany lokalizacji *IAA*, oraz są obecne elementy szlaku transdukcji sygnału auksyn. Dalsza część zaplanowanych w pracy eksperymentów polegała na zbadaniu ekspresji genów kodujących omawiane elementy.



Przed zsekwencjonowaniem transkryptomów reakcje qPCR planowano w oparciu o sekwencje uzyskane za pomocą amplifikacji za pomocą zdegenerowanych starterów i sekwencjonowania produktu PCR oraz RACE-PCR. Po uzyskaniu danych pochodzących z sekwencjonowania transkryptomów zweryfikowano, jakim rekordom w transkrypcji odpowiadają badane do tego czasu mRNA i porównano wyniki dotyczące ekspresji. W kilku przypadkach (na przykład *LIARF3*) zaobserwowano różnice między wynikami uzyskanymi za pomocą qPCR i sekwencjonowania transkryptomów (Rycina 34, Rycina 35, Rycina 36, Rycina 37), co może mieć dwie przyczyny. Po pierwsze, analizowane próby pochodziły z różnych sezonów i miejsc (odpowiednio: pole w Grubnie w 2015 i Piwnicach k. Torunia w 2017). Po drugie, wyniki qPCR są normalizowane do ekspresji genu referencyjnego (*LIACT4*), a analizy RNA-Seq do długości badanego transkryptu i miliona odczytów w danej bibliotece.

Spośród wszystkich pełnej długości białek z rodziny TAAR, *LIAFB3* jest dominującym receptorem w kwiatach, ze względu na to, że wykazuje on najwyższą ekspresję względem innych genów z tej rodziny (Rycina 35). Ekspresja *LIAFB3* zależy zarówno od etapu rozwojowego kwiatów, jak i pozycji kwiatu na kwiatostanie (Rycina 34). Przejściowy spadek akumulacji transkryptu kodującego *LIAFB3* w kwiatach łubinu żółtego na drugim etapie rozwoju, pociąga za sobą przejściowe obniżenie wrażliwości na auksynę. Możliwe, że taka dynamika ekspresji podczas rozwoju kwiatu jest niezbędna do synchronizacji procesu rozwoju pylnika z rozwojem słupka. W pąkach kwiatowych etapu 10 i 11, *A. thaliana*, odpowiadających etapom 1 i 2 w łubinie żółtym, *AtAFB3* ulega ekspresji w pylnikach, gdzie bierze udział w regulacji rozwoju pyłku. Następnie, gdy kwiat jest całkowicie otwarty (odpowiednik etapu 3), gen ten jest indukowany również w płatkach i szyjce słupka. Co ciekawe, *AtAFB3* jest również aktywny w ziarnach pyłku, które zostały wysypane na słupek. Może to stanowić element mechanizmu synchronizującego dojrzewanie pyłku, wydłużanie nitki pylników, oraz otwieranie pylników z dojrzewaniem znamienia [209], zapewniające sukces własnego zapylenia. U łubinu kwiaty wariantów D3 wykazują istotnie niższą ekspresję *LIAFB3* w porównaniu do G3 (Rycina 34), co sugeruje, że jednym z elementów determinacji losu kwiatu jest zmiana wrażliwości na auksynę po zapyleniu.

Jak wykazały nasze analizy związane z sekwencjonowaniem degradomu, wszystkie transkrypty, kodujące funkcjonalne receptory auksyny z rodziny TAAR, są celami dla miRNA, jednak nie można jednoznacznie określić, który miRNA z rodziny MIR393 kieruje potranskrypcyjną regulacją danego genu. Wyodrębnione przez program CleaveLand4 pary miRNA/TAAR nie wykazują negatywnej korelacji ( $PCC > 0$ ), co spowodowane jest albo tym, że regulacja ta jest lokalna, albo faktem, że nie jest to jedyny sposób, w jaki aktywność TAAR może być regulowana. Dodatkowo, miRNA działają zwykle wielokierunkowo, regulując ekspresję wielu różnych genów.

Białka Aux/IAA odpowiadają za kopercepcję IAA i represję czynników ARF. Zmniejszona ekspresja kodujących je genów skutkuje niższą represją ARF, a w konsekwencji wyższą aktywnością genów regulowanych przez auksynę. Przykładowo mutant *A. thaliana iaa16-1* wykazuje fenotyp rośliny o znacznie obniżonej wrażliwości na auksynę, dotyczący wszystkie organy rośliny, w tym kwiaty [234].

Wśród członków tej rodziny genów najwyższą ekspresję w kwiatach wykazuje transkrypt kodujący *LIIAA16a*, która osiąga wartość maksymalną w etapie 3 (Rycina 36). U lilii wodnej bierze on udział w otwieraniu kwiatu [235], a w kwiatach róży (*Rosa chinensis*) obniżenie

poziomu ekspresji *IAA16* w strefie odcinania po otwarciu kwiatów prowadzi do odcięcia płatków [18]. Prawdopodobnie zatem rolą *LIIAA16* jest najpierw regulacja otwarcia kwiatu, a następnie indukcja albo odcinania płatków w kwiatach dolnych, albo odcinania całych kwiatów górnych.

Innym ważnym genem z omawianej rodziny, biorącym udział w rozwoju i funkcjonowaniu kwiatu, jest *IAA14*. U róży (*Rosa hybrida*) *RhIAA14* jest jednym z kluczowych elementów regulacji ekspansji komórek płatków, i ulega represji pod wpływem etylenu. Towarzyszący otwarciu pąka wzrost stężenia etylenu, będzie powodował jednocześnie represję *IAA14* i zahamowanie elongacji płatków [236]. Transkrypt kodujący *LIIAA14* w kwiatach łubinu wykazuje podobny trend w ekspresji. Zarówno w kwiatach okółków górnych, jak i dolnych, do etapu 3, gdy cały organ intensywnie rośnie, obserwowany jest wzrost poziomu akumulacji tego mRNA, a spadek w etapie 4, gdy kwiaty osiągnęły już swoją wielkość docelową. Dodatkowo, u lilii wodnej *IAA14* jest jednym z genów zaangażowanych w otwieranie pąka i osiąga on szczytową ekspresję w kwiatach całkowicie otwartych [235], co jest zgodne z naszymi obserwacjami (Rycina 34). Kwiaty górne nie różnią się od dolnych długością, jednak obserwowane są istotne statystycznie różnice w ekspresji *LIIAA14* między tymi wariantami (Rycina 34). Zatem te różnice wynikają raczej z procesów nie związanych ze wzrostem organów kwiatowych, ale raczej z dojrzewaniem i funkcjonowaniem kwiatu. Na przykład, w etapach 2 i 3 rozwoju kwiatu znamię jest prawdopodobnie receptywne, aby umożliwić zarówno wsobne, jak i niewsobne zapylenie. Proces ten u goździka jest związany ze wzrostem stężenia etylenu [237]. Jeśli podobnie jest u łubinu, wyższa ekspresja w wariantach D2 względem G2 i w G3 względem D3 może świadczyć o tym, że w dolnych kwiatach znamię staje się receptywne już w zamkniętym pąku, natomiast w górnych dopiero w otwartym kwiecie. Jeśli tak jest, to oznaczałoby, że dolne pąki są zapylane głównie wsobnie, zapewniając roślinie bezpieczeństwo w przypadku braku dostępu do owadów zapyłających, a górne, w momencie gotowości słupka zapewniają równy dostęp pyłkowi swojemu i obcemu. Jest to niezwykle interesująca wskazówka do przeprowadzenia dalszych badań, na przykład testu kiełkowania obcego i swojego pyłku na znamieniu. Jednakże zaprojektowanie tego doświadczenia w warunkach najbardziej zbliżonych do warunków naturalnych jest praktycznie niemożliwe, jako że emaskulacja pylników musiałaby się odbyć najpóźniej w pąkach etapu 1. Wiązałoby się to nie tylko z poważnym uszkodzeniem kwiatu, ale także z pozbawieniem kwiatu niezwykle ważnego źródła hormonów, jakim są pylniki. Doświadczenie to musiałoby się zatem odbyć w kulturach *in vitro* słupków. Jednak także w tym przypadku byłibyśmy uprawnieni do wysunięcia jedynie fragmentarycznych wniosków, ponieważ w takich kulturach odcinamy możliwość różnicowej regulacji badanej części kwiatu przez inne organy kwiatowe.

Na podstawie danych degradacyjnych można przypuszczać, że *LIIAA* prawdopodobnie nie są regulowane przez miRNA. Jednak wyniki analizy *in silico* za pomocą programu psRNATarget [177] sugerują, że, istnieje możliwość wyciszania ekspresji *Aux/IAA*, gdzie szczególny udział mogą mieć miRNA z rodziny MIR390 (Rycina 33). Być może regulacja *LIIAA* nie polega na potranskrypcyjnym cięciu, ale na przykład na hamowaniu translacji lub remodelowaniu chromatyny. Potwierdzenie tych interesujących wyników wymaga dalszych badań.

Gen *LJARF4* ulega bardzo niskiej ekspresji w analizowanych wariantach (Rycina 37), co oznacza, że albo ma marginalne znaczenie w późnych etapach rozwoju i funkcjonowania kwiatu, albo jego ekspresja jest ograniczona do małych, ale kluczowych obszarów. Za tą drugą hipotezą przemawia fakt, że podczas późnego rozwoju kwiatów *A. thaliana*, homolog tego genu

ulega ekspresji w synergidach i wieszadelku załączka [238]. W kwiatach łubinu transkrypt kodujący *LlARF4* wykazuje istotnie wyższą akumulację po otwarciu kwiatu zarówno w kwiatach górnych, jak i dolnych (Rycina 34). Może mieć to związek na przykład z gotowością woreczka załączkowego do zapłodnienia, bądź też procesami zachodzącymi bezpośrednio po zapłodnieniu.

Najlepiej poznanymi białkami z rodziny ARF, biorącymi udział w późnym rozwoju kwiatu, są zdecydowanie *ARF6* i jego paralog *ARF8*. U *Arabidopsis thaliana* geny te regulują dojrzewanie zarówno słupków, jak i pręcików. Kwiaty podwójnego mutantu *arf6 arf8* są niezdolne do otwarcia i cechują się krótkimi płatkami, skróconymi nitkami pylników, nieotwartymi pylnikami i niedojrzałymi załącznikami [239], aberracjami w układzie wiązek przewodzących i niezróżnicowanymi komórkami płatków [116]. Co ważne, natężenie tych cech było zależne od kumulatywnej ilości funkcjonalnych genów *ARF6/8*, a pojedyncze mutanty *arf6* i *arf8* wykazywały podobne fenotypy [239]. Świadczy to o tym, że u rzodkiewnika *ARF6* i *ARF8* pełnią te same funkcje i są przez siebie zastępowalne, i prawdopodobnie są w stanie wiązać się do tych samych elementów AuxRE. Wniosek ten jest niezwykle ważny w świetle rezultatów analizy przypuszczalnych białek *ARF8* u łubinu żółtego, zawierających wyłącznie domenę DBD (Tabela 20). Jeśli również w tej roślinie domeny DBD *LlARF6* i *LlARF8* wiążą się do tych samych par AuxRE, funkcją *LlARF8* może być hamowanie aktywności *LlARF6* poprzez maskowanie jego docelowych miejsc wiązania.

Transkrypt kodujący *LlARF6a* wykazuje dużą dynamikę podczas rozwoju kwiatu, co zapewne ma związek z jego wielofunkcyjnością. W kwiatach będących na etapie 1 białko to przypuszczalnie bierze udział w koordynacji wydłużania nitek pylników i wzrostu elongacyjnego płatków, a spadek jego ekspresji w kolejnym etapie może być związany ze spadkiem intensywności tego wzrostu. W 3. etapie ekspresja *LlARF6* osiąga wyjściową wartość i utrzymuje się w ostatnim etapie na tym samym poziomie (Rycina 34). W tych ostatnich etapach *LlARF6* prawdopodobnie pełni taką samą rolę, jak *ARF8* u rzodkiewnika i pomidora, hamując zawiązywanie owocu aż do momentu zapłodnienia [156]. Za taką rolę przemawia fakt, że w dolnych kwiatach, które są utrzymywane na kwiatostanie i rozwijają się w strąki, ekspresja *LlARF6* jest istotnie niższa, niż w górnych, które są kierowane na drogę odcinania (Rycina 34). Niezwykle interesujący jest fakt, że ekspresja *LlARF8* jest najwyższa w najmłodszych analizowanych kwiatach oraz najstarszych, rosnących na dolnych okółkach (Rycina 37). Ponieważ jednak gen ten wykazuje znacznie niższą ekspresję w porównaniu do *LlARF6*, prawdopodobnie miejsca akumulacji badanych transkryptów nie będą się całkowicie pokrywać. W ściśle określonych, bardzo ograniczonych miejscach *ARF8* być może kompetycyjnie hamuje działanie *ARF6*, dodając kolejną warstwę regulacji.

Całość komplikuje dodatkowo fakt, że ekspresja zarówno *LlARF6* jak i *LlARF8* jest negatywnie regulowana przez miRNA z rodziny *MIR167*. Za pomocą analizy degradomu przy użyciu programu *CleaveLand4* wyodrębniono 8 par *miR167/ARF6/8*, a wzorce ich ekspresji były w większości przypadków negatywnie skorelowane. Wysoko ekspresjonowane *Ll-miR284/miR167* i *Ll-miR285/miR167* wykazywały najwyższą akumulację w kwiatach D3, D4 i G4. Możliwe, że kierowane przez *Ll-miR284/miR167* cięcie *FTRINITY\_DN57891\_c1\_g1\_i10* w wariacie D3 ma bardzo lokalny charakter i ogranicza się na przykład do załączni i pylników, jak ma to miejsce u *Arabidopsis thaliana* [131,240]. W pylnikach rzodkiewnika mediowane przez *miR167* cięcie *ARF6* i *ARF8* jest wymagane do zatrzymania wzrostu pylnika i jego otwarcia [241]. Ponieważ jednak u łubinu nie obserwuje

się zauważalnych różnic morfologicznych między pręcikami kwiatów z górnych i dolnych okółków kwiatostanu, a pylniki otwierają się w tym samym czasie, różnice w ekspresji miR167 dotyczą raczej zalążni. W słupkach *Arabidopsis* miR167 kontroluje przestrzenny wzorzec ekspresji *ARF6* i *ARF8*, zapobiegając ektopowej ekspresji tych genów. Wprowadzenie do rośliny genów *ARF6* i *ARF8* o tak zmutowanym miejscu docelowym dla miR167, aby były niewrażliwe na regulację tego miRNA, powoduje zatrzymanie rozwoju zalążka [131]. Jednak zalążki izolowane z kwiatów dolnych i górnych łubinu mają podobną wielkość i morfologię. Inną możliwością jest regulacja ekspresji *LIARF6* i *LIARF8* w obrębie szlaku transmisyjnego, tak jak u rzodkiewnika [131]. Jeśli tak jest, oznaczałoby to, że szlak ten byłby dłużej aktywny w kwiatach górnych, pozwalając na przykład na wzrost łagiewek pyłkowych obcego, przyniesionego przez owady zapylające pyłku w otwartym kwiecie.

Innym wysoko ekspresjonowanym transkryptem w kwiatach łubinu żółtego, jest FTRINITY\_DN53647\_c0\_g2\_i3, kodujący *LIARF9e*. Wykazuje on najwyższą ekspresję w kwiatach najstarszych: G3-4 i D3-4 (Rycina 37). W badaniach nad pomidorem wykazano, że *SIARF9* jest negatywnym regulatorem podziałów komórkowych we wczesnym rozwoju owocu [242]. Możliwe, że początkowa niska ekspresja *LIARF9* w kwiatach łubinu jest związana z intensywnymi podziałami komórkowymi podczas rozwoju kwiatu. Gdy wszystkie części kwiatu osiągają wielkość docelową, ekspresja tego genu wzrasta, nie pozwalając na dalsze powiększanie zalążni, dopóki nie nastąpi zapłodnienie i zawiązanie owocu. W kolejnych, nie badanych w pracy etapach, gdy zalążnie kwiatów na dolnych okółkach zaczynają się powiększać, prawdopodobnie ekspresja *LIARF9* ulega ponownemu obniżeniu.

Na uwagę zasługują także transkrypty kodujące białka z podrodziny ARF18. Mimo że są one akumulowane w bardzo małej ilości w kwiatach badanego organizmu, wszystkie są regulowane przez miRNA z rodziny MIR160. Ll-miR333/miR160 ulega najsilniejszej akumulacji w dwu ostatnich etapach rozwojowych kwiatów górnych i wykazuje negatywną korelację z transkryptami docelowymi (Rycina 37). W ostatnich latach pojawiło się wiele doniesień na temat miR160/ARF18 w regulacji rozwoju organów generatywnych roślin wskazując na konserwatywny charakter tego modułu. W sosnie nadmorskiej (*Pinus pinaster*) i świerku pospolitym (*P. abies*) moduł miR160/ARF18 jest aktywnym regulatorem somatycznej embriogenezy, podczas której akumulacja miR160 rośnie wraz z dojrzewaniem embrionu, a ekspresja jego genu docelowego *ARF18* ulega obniżeniu [243]. W ryżu *OsARF18* także jest negatywnie regulowany przez miR160, a podczas rozwoju kwiatostanu jego ekspresja ulega zwiększeniu. Transgeniczny ryż z wprowadzonym genem *mOsARF18*, w którym zmieniono miejsce docelowe dla miR160, wykazuje szereg nieprawidłowości, między innymi mniejsze płatki kwiatów i mniejsze nasiona o nieregularnym kształcie [244]. Możliwe, że w kwiatach górnych łubinu procesy te uległy rozregulowaniu poprzez nadmierną aktywność miR160.

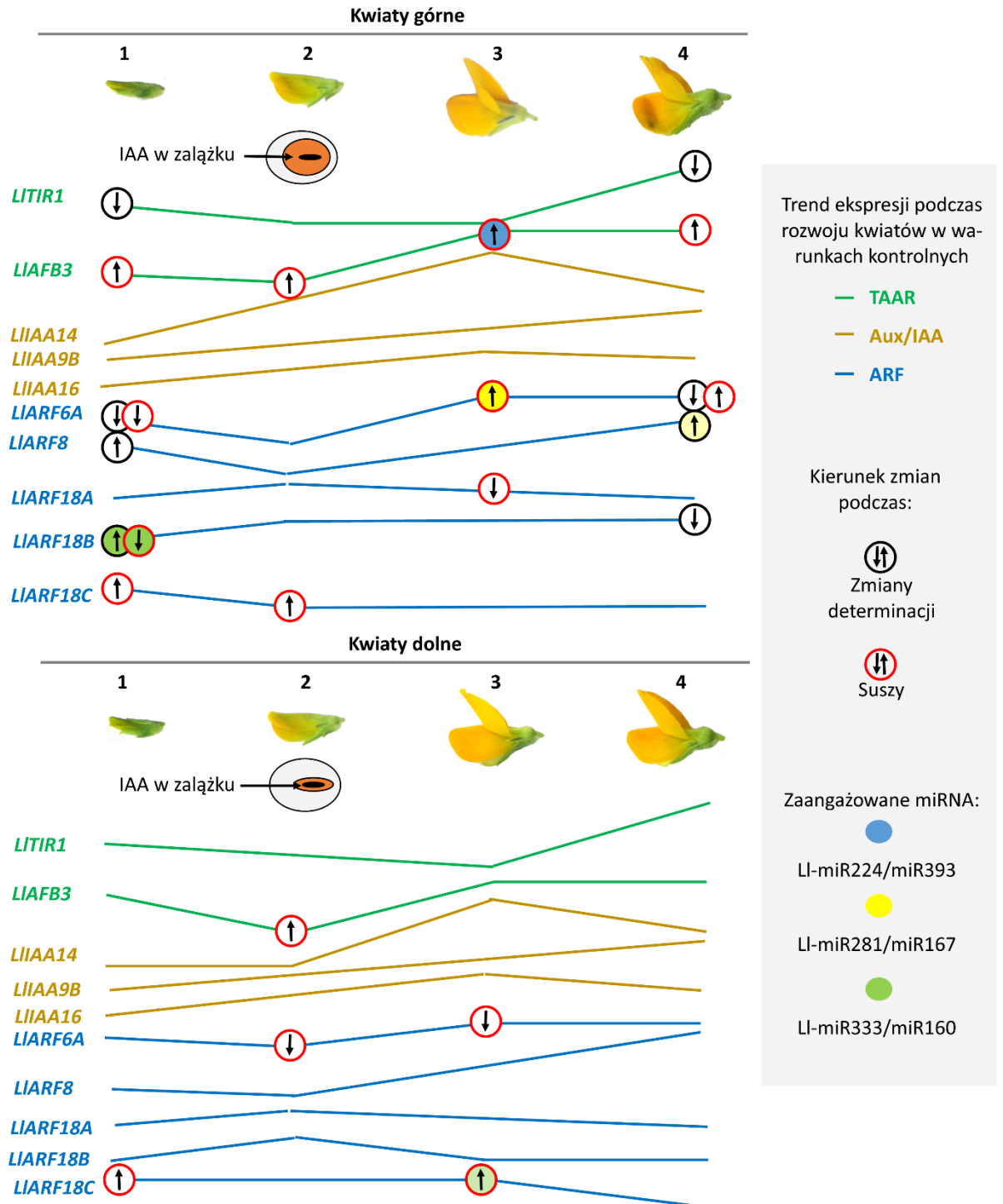
Aby uzyskać globalny obraz zależnego od auksyny reprogramowania transkrypcji podczas rozwoju kwiatów łubinu żółtego, wykonano analizę sumarycznej ekspresji *LIARF* (Rycina 38), oraz *LISAUR* (Rycina 39), będących „papierkiem lakmusowym” działania szlaku transdukcji sygnału auksyn.

Sumaryczna ekspresja *LISAUR* zwiększała się wraz z rozwojem kwiatu, przy czym w wariacie G4 była ona znacznie wyższa niż w D4 (Rycina 39). Te wartości nie korelują z sumaryczną ekspresją aktywatorów i represorów transkrypcji ARF, co może wynikać z kilku faktów:

- Ekspresja genów, które zawierają w promotorach wielokrotnie powtórzone AuxRE nie jest prostą wypadkową działania przyłączonych do tych elementów represorów i aktywatorów. Trudno przewidzieć ostateczny wynik przyłączenia różnych ARF pełniących odmienne role do jednego promotora.
- Ekspresja genów SAUR u innych roślin jest regulowana też przez hormony inne niż auksyna [102,245–249], czynnik transkrypcyjny PIF3 (PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR 3) i PIF4 [247,250], czynnik odpowiedzi na brazinazol BZR1 (BRASSINAZOLE RESISTANT 1) [247] oraz czynnik transkrypcyjny FUL (FRUITFUL) [250].
- Kwiaty są skomplikowanymi organami, zbudowanymi z wielu tkanek, a regulacja transkrypcji przez ARF może wyglądać odmiennie w różnych jego częściach.

### **Rola modułów regulacyjnych miRNA/TAAR/ARF w determinacji losu kwiatu oraz reakcji na stres suszy**

Wykonano dalsze eksperymenty w celu zbadania roli wybranych modułów regulacyjnych miRNA/TAAR/ARF zidentyfikowanych w kwiatach łubinu żółtego w determinacji losu kwiatu i reakcji na stres suszy. Wyniki podsumowuje Rycina 50.



Rycina 50. Podsumowanie badań dotyczących roli modułów regulacyjnych miRNA/TAAR/ARF w determinacji losu kwiatu oraz reakcji na stres suszy. Jaśniej zacieniowane koła oznaczają sytuację, gdy para miRNA/transkrypt wykazują odwrotną korelację, jednak ich działanie nie zostało potwierdzone w analizie degradomu, a jedynie za pomocą psRNATarget.

### Rola modułów regulacyjnych miRNA/TAAR/ARF w determinacji losu kwiatu

Determinacja kwiatu łubinu żółtego do odcięcia lub rozwoju w strąk zależy od jego wertykalnej pozycji na kwiatostanie. Kwiaty rosnące na najniższych okółkach prawie zawsze zawiązują strąki, a te rozwijające się na szczytowym okółku niemalże zawsze są zrzucane. Determinację kwiatów górnych można jednak odwrócić poprzez usunięcie wszystkich kwiatów, znajdujących się na niższych piętrach [136]. Kolejnym etapem realizacji pracy doktorskiej była weryfikacja hipotezy, że odwróceniu losu kwiatów po usunięciu wszystkich niższych okółków (pozostawione kwiaty górne określono jako nowe dolne, ND), będzie związana z dostosowaniem ekspresji elementów szlaku transdukcji sygnału auksyn do tych obserwowanych w kwiatach dolnych oraz że zmiany te są regulowane przez miRNA. Do tego eksperymentu wybrano moduły regulatorowe L1-miR224/miR393/*LITIR1*, L1-miR333/miR160/*LIARF18* oraz L1-miR281/miR167/*LIARF6/8*.

W przypadku modułu L1-miR224/miR393/*LITIR1*, w kwiatach etapu 4 nowe dolne kwiaty wykazują podobny poziom ekspresji *LITIR1*, jak kwiaty dolne, co sugeruje, że utrzymanie kwiatu wymaga obniżenia jego wrażliwości na auksynę. To obniżenie wydaje się nie być spowodowane aktywnością miR393 (Rycina 40).

W kwiatach etapu 3 obserwowana jest całkowicie odmienna od oczekiwanej zależność między ekspresją genu kodującego *LIARF18d* i losem kwiatu: w nowych okółkach dolnych akumulacja omawianego transkryptu jest jeszcze wyższa, niż w górnych i ta różnica wydaje się być powodowana przez aktywność miR333/miR160. Ekspresja omawianych RNA w kwiatach etapu 4 wykazuje podobny trend, jak w przypadku modułu L1-miR224/miR393/*LITIR1* w tych samych wariantach (Rycina 41). Jeśli, jak omówiono w poprzednim podrozdziale, *LIARF18* reguluje procesy embriogenezy i wzrostu nasion na objętość, obniżony poziom ekspresji tego genu w kwiatach etapu 4 może być związany z rozwojem embrionu. Nie jest jasne, jaką rolę mógłby pełnić ten moduł w kwiatach etapu 3.

Również moduł L1-miR281/miR167/*LIARF6/8* odgrywa ważną rolę w determinacji losu kwiatu. W przypadku *LIARF6* w kwiatach etapu 1 zaobserwowano spadek ekspresji w kwiatach nowych dolnych, co może mieć jakiś związek ze wzrostem elongacyjnym nitki pylników, lub dojrzewaniem pyłku. Natomiast kwiaty dolne i nowe dolne etapu 4 wykazywały obniżoną ekspresję omawianego transkryptu względem kwiatów górnych i nie był to wynik aktywności miR167. Co zaskakujące, to ekspresja *LIARF8* w etapie 4 wydaje się być potranskrypcyjnie regulowana przez omawiany miR167. Obniżenie akumulacji miRNA w wariantach dolnym i nowym dolnym pociąga za sobą wzrost poziomu akumulacji transkryptu kodującego *LIARF8a* (Rycina 47). Jak spekulowano w poprzednim podrozdziale, rolą *LIARF6* w ostatnich etapach rozwoju kwiatu jest prawdopodobnie hamowanie rozwoju owocu, a obniżenie poziomu ekspresji kodującego go genu po zapłodnieniu jest ważnym elementem procesu zawiązywania owocu i indukcji wzrostu załąźni. Natomiast *LIARF8* może funkcjonować jako inhibitor kompetytywny dla *LIARF6*, a większa jego ilość w wariantach dolnym i nowym dolnym etapu 4 (Rycina 47) będzie powodowała hamowanie jego aktywności na poziomie białkowym.

### Rola modułów regulacyjnych miRNA/TAAR/ARF w odpowiedzi na stres suszy

Prolina, oprócz bycia aminokwasem biogennym, pełni niezwykle ważną rolę w adaptacji roślin do różnego rodzaju stresów, między innymi w odpowiedzi na stres suszy [251,252]. W warunkach niedoboru wody, aminokwas ten pełni funkcję osmolitu, czyli niskocząsteczkowej substancji, która zapewnia prawidłową objętość komórki i integralność

blon komórkowych [253]. Rośliny akumulują prolinę w czasie suszy (np. [251,252]), jednak nadmierne jej gromadzenie może prowadzić do znacznego zahamowania wzrostu [254].

Dwa tygodnie po zakończeniu podlewania rosnącego w komorze hodowlanej łubinu żółtego, kwiaty tej rośliny wykazywały w większości wariantów podwyższony poziom proliny względem wariantu kontrolnego, przy czym tylko w przypadku kwiatów dolnych ostatniego badanego etapu rozwoju różnica ta była istotna statystycznie (Rycina 43B). Może być to związane z tym, że młodsze organy cechuje niezwykle dynamiczny rozwój i wzrost, stąd w wariantach młodszych wolna prolina jest prawdopodobnie bardziej wydajnie zużywana do syntezy białek, niż jest to w kwiatach starszych. Zatem to starsze kwiaty mają nadwyżki proliny, które mogą wykorzystać do obrony przed stresem. Jest to dość prosty mechanizm, prowadzący do ochrony starszych kwiatów, w które roślina niejako „zainwestowała” już dużą część swoich zasobów, w związku z czym to młodsze kwiaty w pierwszej kolejności zostaną skierowane na drogę odcięcia. Uwagę zwraca również fakt, że kwiaty G1 w warunkach kontrolnych akumulują więcej proliny, niż D1 (Rycina 43B). Prolina pełni również ważne funkcje w rozwoju kwiatu. Jej synteza w rozwijających się mikrosporach jest niezbędna do wytworzenia płodnego pyłku [255]. Najprawdopodobniej pełni ona rolę osmolitu podczas desykcji pyłku, a następnie zużywana jest w procesie wzrostu łagiewki pyłkowej. Dodatkowo sugeruje się, że może stanowić rodzaj nagrody dla owadów, jako że tylko mała część przenieszonego przez nie pyłku trafia na znamię innej rośliny [256]. Warto zauważyć, że podwyższony poziom proliny w G1 względem D1 (Rycina 43B) koreluje z nieznacznie wyższą siłą kiełkowania pyłku w kwiatach górnych (Rycina 15).

W celu weryfikacji, czy rośliny doświadczają stresu niedoboru wody, wykonano ich analizę termograficzną. Jest to metoda powszechnie stosowana w celu badania uwodnienia roślin [257]. Woda posiada wysoką pojemność cieplną, co oznacza, że pochłaniając tę samą ilość energii, bardziej uwodnione tkanki będą się nagrzewały wolniej, niż tkanki z mniejszą zawartością wody. Zatem rośliny doświadczające stresu niedoboru wody będą cieplejsze, niż rośliny kontrolne (Rycina 43C). Z dalszej analizy wykluczono rośliny, które nie wykazywały widocznych różnic w temperaturze względem kontroli.

Jako markery genetyczne stresu suszy wybrano pięć genów: *Eceriferum 1 (LICER1)*, *Laccase 2 (LILAC2)*, *Nuclear Factor YA 5 (LINF-YA5)*, *Transporter proliny 2 (ProT2)* i *VOZ1*. Większość z nich najwyższą dynamikę podczas suszy wykazywała w kwiatach zebranych ze szczytowych okółków (G1-4) (Rycina 44).

Rodzina genów *CER* koduje białka zaangażowane w elongację niezwykle długich łańcuchów kwasów tłuszczowych, które wchodzi w skład epikutykularnych wosków. Gen *CER1* został wybrany jako marker niedoboru wody ze względu na to, że u *Arabidopsis thaliana* pełni niezwykle ważną funkcję w biosyntezie alkanów o bardzo długich łańcuchach wchodzących w skład kutykuli i udowodniono jego udział w adaptacji do stresu suszy. W sześciotygodniowych roślinach (w fazie generatywnej), ekspresja *AtCER1* była obserwowana głównie w epidermie łodygi kwiatowej, oraz działkach kielicha i słupkach młodych pąków. W starszych kwiatach akumulacja omawianego transkryptu skupiała się głównie w wydłużających się nitkach pylników i płatkach. Rośliny transgeniczne, o podwyższonym poziomie tego genu, wykazują się niższą przepuszczalnością kutykuli dla wody i większą odpornością na stres suszy [258]. Obecny u łubinu żółtego homolog omawianego genu, *LICER1*, ulega preferencyjnej ekspresji w najmłodszych z badanych



kwiatów, przy czym w kwiatach górnych jego ekspresja jest istotnie wyższa. Co niezwykle zaskakujące, jego aktywność podczas suszy spadła zarówno w kwiatach górnych, jak i dolnych (Rycina 44). Należy tu jednak zwrócić uwagę na fakt, że literatura dotycząca podwyższenia ekspresji genu *CERI* w odpowiedzi na stres suszy dotyczy liści, a nie organów generatywnych, mimo że to właśnie tam ulega ilościowo najwyższej ekspresji [258,259]. W organach kwiatowych obniżenie syntezy wosków wchodzących w skład kutykuli może mieć fundamentalne znaczenie dla utrzymania płodności w czasie suszy. Obserwowana zmiana może na przykład dotyczyć obniżenia poziomu syntezy składników wosków wchodzących w skład ściany ziarna pyłku, przez co pyłek ulega szybszej rehydracji na znamieniu i bardziej efektywnie kiełkuje.

Drugim z analizowanych genów markerowych suszy był *LILAC2*, kodujący lakazę, wielomiedziową oksydazę katalizującą utlenianie związków fenolowych. U roślin główną rolą tych enzymów jest udział w syntezie długich polimerów fenolowych, na przykład ligniny podczas tworzenia wiązek przewodzących [260]. Nadekspresja genu *PeuLAC2* z topoli eufrackiej (*Populus euphratica*) u *A. thaliana* skutkuje zwiększoną odpornością na stres suszy, a w roślinach tych obserwowano względem roślin dzikich grubsze wtórne ściany ksylemu, co znacznie poprawia wydajność długodystansowego transportu wody [261]. Interesujące jest to, że w kwiatach będących na 2. etapie rozwoju, rosnących na okółku górnym kwiatostanu *L. luteus*, obserwowana jest wyższa ekspresja *LILAC2*, która ulega znacznemu zwiększeniu podczas suszy, a w następnym etapie dużemu obniżeniu (Rycina 44). Świadczy to prawdopodobnie o niezwykle dynamicznych zmianach w budowie ścian komórkowych podczas suszy w wariantach G2 i G3. Mimo że u cytrusów obserwuje się pozytywną korelację między akumulacją ligniny i aktywacją strefy odcinania [262], obserwowany w kwiatach łąbinu wzrost aktywności *LILAC2* nie ma bezpośredniego związku z odcinaniem całego kwiatu, jako że w skład badanych prób nie wchodziła część szypułki zawierająca AZ.

Kolejnym wytypowanym markerem suszy był gen *Nuclear factor YA 5 (LINF-YA5)*, kodujący czynnik transkrypcyjny, indukowany za pośrednictwem ABA podczas suszy. Jego homolog u *A. thaliana* ulega ekspresji w komórkach wiązek przewodzących i aparatów szparkowych, a jej poziom podwyższa się podczas adaptacji do stresu suszy [263]. U łąbinu żółtego, rosnącego w warunkach kontrolnych, obserwuje się związany z rozwojem kwiatu wzrost akumulacji transkryptu *LINF-YA5*. Natomiast podczas suszy wzrost ten jest wyraźnie większy w kwiatach rozwijających się na szczytowych okółkach (Rycina 44). Gdy kwiaty ze szczytowych okółków osiągają etap 3 i 4 rozwoju, na okółkach dolnych zawiązane są już owoce. Opisany wzrost aktywności *LINF-YA5* w kwiatach górnych w czasie suszy będzie prawdopodobnie skutkować większym rozwarciem aparatów szparkowych w częściach tych kwiatów (słupku i działkach kielicha), a co za tym idzie, szybszą utratą wody w omawianych wariantach. Dzięki temu prostemu mechanizmowi woda może być nadal pobierana, młode strąki są chronione przed jej niedoborem i mogą się dalej rozwijać.

Kolejny badany marker suszy *Proline transporter 2 (ProT2)* koduje ekspresjonowany we wiązkach przewodzących transporter proliny, który u pomidora podczas stresu suszy zwiększa aktywność transkrypcyjną [264]. W kwiatach łąbinu żółtego *LIProT2* zdaje się mieć funkcję bardziej związaną z rozwojem tego organu niż niedoborem wody, co jest zaskakujące, zważywszy na to, że obserwowano różnice w zawartości proliny w kwiatach. Prawdopodobnie ilość tego aminokwasu jest w omawianych organach warunkowana raczej przez jego syntezę, a nie transport.

Ostatnim analizowanym genem markerowym suszy był *Vascular Plant One-Zinc Finger 1* (*VOZ1*), kodujący czynnik transkrypcyjny o udowodnionej roli w rozwoju kwiatów i odpowiedzi na stres u soi [265] i pomidora [266]. U pomidora podczas suszy ABA indukuje fosforylację *SIVOZ1*, co znacznie podwyższa jego stabilność i wzmacnia aktywację genów docelowych, odpowiedzialnych między innymi za kwitnienie [266]. Homolog tego genu u łubinu żółtego wydaje się mieć rolę w adaptacji do suszy dopiero w ostatnim etapie rozwoju kwiatów górnych (Rycina 44).

W celu scharakteryzowania potranskrypcyjnej regulacji elementów szlaku transdukcji sygnału auksyn w odpowiedzi na stres suszy, do analizy qPCR wybrano następujące moduły regulacyjne: L1-miR224/miR393/*LIAFB3*, L1-miR333/miR160/*LIARF18c-e*, L1-miR281/miR167/*LIARF6a-b*.

Zmniejszenie wrażliwości na auksynę poprzez obniżenie poziomu ekspresji receptorów tego fitohormonu w wyniku działania miR393 jest konserwowanym mechanizmem, regulującym odpowiedź roślin na stres suszy. W korzeniach bocznych *A. thaliana* ABA i induktor stresu suszy PEG (glikol polietylenowy) powodują zwiększenie akumulacji miR393 i wyciszenie *AtTIR1* oraz *AtAFB2*, co w konsekwencji prowadzi do zmiany architektury korzenia [142]. Również w całych dwutygodniowych siewkach rzodkiewnika miR393 ulega intensywniejszej akumulacji [267,268]. Transgeniczny ryż z nadekspresją *MIR393* wykazuje obniżony poziom miRNA, kodującego *OsTIR1* i *OsAFB2*, co z jednej strony skutkuje jego szybszym kwitnieniem i bardziej rozgałęzionym pokrojem, ale z drugiej strony niższą tolerancją na stesy suszy i solny [269]. Tolerancja jęczmienia na stres suszy może być podwyższona poprzez wyciszenie genu *MIR393*, natomiast transgeniczny jęczmień nadmiernie akumulujący miR393, ma gęściej rozmieszczone aparaty szparkowe i wykazuje niższą tolerancję na suszę [270]. Zatem obniżenie poziomu miR393 w częściach nadziemnych rośliny jest prawdopodobnie konserwowanym ewolucyjnie mechanizmem adaptacji do stresu suszy.

Podczas suszy w kwiatach łubinu żółtego, rosnących na szczytowych okółkach kwiatostanu, zaobserwowano istotny wzrost ekspresji *LIAFB3*. Tylko w przypadku wariantu G3 można zaobserwować wyraźną negatywną korelację ilości transkryptu tego genu z akumulacją miR224/miR393 (Rycina 45). Kwiaty z okółków górnych będą podczas suszy prawdopodobnie bardziej wrażliwe na auksynę, co będzie miało swoje odbicie w ekspresji genów, mających w promotorach funkcjonalne elementy AuxRE. Takim genem może być na przykład homolog *AtSAUR32*, który u *A. thaliana* ulega ekspresji w korzeniu i pełni kluczową rolę w adaptacji na stres niedoboru wody, poprzez zwiększenie wrażliwości na ABA [271].

Jednym z najczęściej eksplorowanych modułów miRNA-mRNA w kontekście suszy u pszenicy durum jest miR160/ARF8/18 [272]. W odmianach wykazujących wysoką tolerancję na stres deficytu wody, podczas suszy w liściach flagowych obserwowano obniżenie poziomu akumulacji miR160a, a u odmian wrażliwych nieznaczne podwyższenie [272]. Genami docelowymi dla miR160 w pszenicy są *ARF8* i *ARF18*. W roślinach o wysokiej tolerancji na suszę następowała indukcja *ARF8*, a w odmianach podatnych redukcja [273] i wydaje się, że ta niekanoniczna para odgrywa ważną rolę w adaptacji do suszy. Wiecha natomiast nie wykazuje odwrotnego trendu w ekspresji miR160 i *ARF18* [273]. Tak jak wiecha pszenicy, kwiaty łubinu żółtego nie wykazują globalnego odwrotnego trendu w ekspresji miR160 i *ARF18* pod wpływem stresu. Widać go jedynie w dwóch przypadkach: L1-miR333/miR160/*ARF18e* w wariacie D3 i L1-miR333/miR160/*ARF18d* w wariacie G1.

W pierwszym przypadku w czasie suszy obniżeniu poziomu akumulacji miR160 towarzyszy podwyższenie ekspresji *ARF18*, w drugim trend ten jest odwrotny (Rycina 46). Jest to wzorzec zmian ekspresji obserwowany u odmian pszenicy odpornej na suszę, prawdopodobnie zatem u łubinu żółtego jest to część mechanizmu chroniącego przed stresem kwiaty znajdujące się na dolnych okółkach.

Udowodnioną rolę w regulacji odpowiedzi na stres suszy mają również miRNA z rodziny MIR167, a kierunek zmiany ich ekspresji zależy od gatunku i organu. W warunkach niedoboru wody w całych dwutygodniowych siewkach *A. thaliana* [267] i jednodniowych siewkach *O. sativa* [274] miR167 ulega wyższej akumulacji. Podobnie w liściach flagowych odpornych na suszę odmian pszenicy durum, miR167 wykazywał podwyższony poziom akumulacji, a u odmian wrażliwych obniżony [272]. Co ciekawe, w odmianach o wysokiej tolerancji na suszę następowała indukcja jego genu docelowego *ARF8*, a w odmianach podatnych redukcja, jednakże, jak już wspomniano wcześniej, gen ten jest dodatkowo regulowany w tej roślinie przez miR160 i to właśnie ten moduł wydaje się być w pszenicy funkcjonalny w omawianym stresie [273]. Odwrotny trend obserwowany jest w korzeniu ryżu, gdzie rolą omawianego miRNA jest modyfikacja architektury korzenia. Podczas suszy akumulacja *Os-miR167* jest w tym organie hamowana, co prowadzi do zwiększenia ilości mRNA jego genu docelowego *ARF8*, który z kolei pozytywnie reguluje ekspresję *GH3* [275]. Ten ciąg zdarzeń prowadzi do zmniejszenia ilości aktywnej formy IAA i modyfikacji architektury korzenia [276]. Również u *Arabidopsis* geny docelowe miR167 (*ARF6* i *ARF8*) promują tworzenie korzeni przybyszowych [277].

W kwiatach łubinu żółtego rozwijających się na okółkach szczytowych kwiatostanu, będących na dwóch ostatnich etapach rozwoju (G3 i G4), podczas stresu niedoboru wody zaobserwowano wzmoczoną akumulację dwóch transkryptów kodujących *ARF6a* i *ARF6b* (Rycina 47). Jedynie w przypadku wariantu G3 podwyższona ilość *FTRINITY\_DN57891\_c1\_g1\_i10* może być wyjaśniona obniżonym poziomem akumulacji *L1-miR281/miR167*. Być może w pozostałych wariantach inna izoforma miR167 reguluje ekspresję *ARF6*, albo wzrost ekspresji tego genu jest spowodowany innymi czynnikami, na przykład ABA.

Brak wyraźnej, globalnej korelacji między ekspresją miRNA i jego genu docelowego niekoniecznie musi wynikać z braku interakcji między nimi. Sieć regulacji ekspresji obu cząsteczek ma niezwykle skomplikowany charakter, a jej elementami mogą być na przykład szlaki sygnałowe innych hormonów. To zjawisko można wytłumaczyć wielokierunkowością regulacji genów przez małe regulatorowe RNA, co oznacza, że dany miRNA może wyciszać ekspresję innych genów docelowych. Dodatkowo, czasie suszy badane geny mogą być również regulowane na innym poziomie, na przykład transkrypcyjnym przez szlak transdukcji sygnału ABA.

## Podsumowanie

Na podstawie przedstawionych w niniejszej pracy wyników badań, można wysunąć wnioski, pozwalające na pełniejsze zrozumienie roli auksyny w rozwoju i odcinaniu kwiatów łubinu żółtego.

- Determinacja kwiatów do odcięcia w okółkach górnych kwiatostanu nie jest spowodowana ani aberracjami w budowie kwiatu, ani obniżeniem funkcjonalności pyłku.
- Podczas rozwoju kwiatów auksyna wykazuje niezwykle dynamikę i dotyczy to zarówno jej tkankowej lokalizacji, jak i dostępności jej aktywnej formy. W kwiatach górnych etapu 2B, gdy przestaje być możliwa zmiana ich determinacji do odcięcia, następuje ekspansja IAA na szerszy obszar wokół woreczka zalążkowego. Procesy stojące u podstaw opisanych różnic są prawdopodobnie jednymi z ważniejszych ogniw prowadzących do odcięcia kwiatu.
- Kwiaty łubinu żółtego są wyposażone w pełny zestaw funkcjonalnych elementów szlaku transdukcji sygnału auksyn, umożliwiającą reprogramowanie transkrypcyjne pod wpływem obecnej w jądrze komórkowym auksyny. Białka będące członkami rodzin TAAR, Aux/IAA i ARF wykazują zróżnicowanie, pozwalające na modyfikację szybkości i specyficzności działania omawianego szlaku. Ponadto istnieje możliwość dodatkowego poziomu regulacji badanego szlaku, poprzez maskowanie elementów AuxRE przez związane z nimi białka ARF<sup>DBD</sup>. To spostrzeżenie wskazuje interesujący kierunek dla dalszych badań.
- W kwiatach łubinu żółtego akumulowane są mikro RNA, których cząsteczkami docelowymi są między innymi transkrypty kodujące białka z rodzin TAAR i ARF. Analizy *in silico* wskazują również na możliwość tego typu regulacji genów *Aux/IAA*. W przyszłości warto zweryfikować doświadczalnie ten wynik.
- Kwiaty rozwijające się na różnych okółkach kwiatostanu, a tym samym o odmiennie zdeterminowanym przeznaczeniu, wykazują różnice w ekspresji genów kodujących elementy szlaku transdukcji sygnału auksyn, w tym *LITIR1*, *LIAFB3*, *LIIAA14*, *LIARF6A*, *LIARF8*, *LIARF9*, *LIARF18A-C*. Transkrypty większości z wymienionych genów podlegają regulacji przez konserwowane moduły miRNA/mRNA.
- Odwróceniu determinacji kwiatów do odcięcia (pochodzących z górnych okółków) towarzyszą zmiany w poziomie akumulacji wielu z badanych transkryptów. W większości przypadków prowadzą one do upodobnienia wzorca ekspresji do wzorca obserwowanego w kwiatach zdeterminowanych do zawiązania strąków (pochodzących z dolnych okółków). Niektóre z tych zmian są prawdopodobnie związane z działaniem modułów L1-miR333/miR160/*LIARF18B* oraz L1-miR281/miR167/*ARF8*.
- Badane elementy szlaku transdukcji sygnału auksyn odgrywają również rolę w reakcji rośliny na stres suszy. Podczas badanego stresu istotnym zmianom ulega ekspresja wszystkich zbadanych genów, a różnice są najczęściej obserwowane w kwiatach pochodzących z górnych okółków. Niektóre z tych zmian są prawdopodobnie związane z działaniem modułów: L1-miR224/miR393/*LIAFB3*, L1-miR333/miR160/*LIARF18B* oraz L1-miR281/miR167/*ARF8*.
- Uzyskane rezultaty dotyczą globalnej ekspresji genów kodujących elementy szlaku transdukcji sygnału auksyn. Kwiat jest niezwykle złożonym organem, zbudowanym

z różnych tkanek pełniących odmienne funkcje. Uzyskane wyniki nie pozwalają na bardziej szczegółowe wnioski, jednak wskazują na zaangażowanie omówionych modułów regulatorowych w rozwój, determinację kwiatu do odcięcia lub zawiązania strąku oraz reakcję na stres suszy. Z całą pewnością niezwykle owocnym kierunkiem badań byłaby lokalizacja *in situ* badanych transkryptów i miRNA w częściach kwiatu.

- W przyszłości należałoby również eksperymentalnie zweryfikować wnioski wyciągniętych na podstawie analiz *in silico* przewidywanych białek z rodzin TAAR, Aux/IAA i ARF. Można by na przykład wykonać analizę EMSA w celu ustalenia spektrum ligandów dla receptorów auksyn. Inny eksperyment z zastosowaniem dwuhybrydowego systemu drożdżowego pozwoliłaby zbadać interakcje TAAR-Aux/IAA, i Aux/IAA-ARF.
- Uzyskane rezultaty mogą być podstawą do stworzenia nowych linii łubinu żółtego, cechujących się ograniczonym procesem odcinania kwiatów zarówno w warunkach kontrolnych, jak i w stresie suszy.

## Wykaz rycin

Rycina 1. Obserwacje rozwoju części generatywnej łubinu żółtego rosnącego na polu w Piwnicach koło Torunia. Zdjęcia: Milena Kulasek. _____	17
Rycina 2. Uproszczony schemat przedstawiający mechanizmy biorące udział w regulacji stężenia aktywnej formy IAA w komórce. Opracowane na podstawie [40,41]. _____	19
Rycina 3. Elementy szlaku transdukcji sygnału auksyny. Białka represorowe odpowiedzi na auksynę (Aux/IAA) wiążą się przez domeny PB1 do czynników transkrypcyjnych ARF i hamują ich działanie. Przy wyższym stężeniu auksyny w jądrze receptor auksyny TIR1/AFB tworzy stabilny kompleks koreceptorowy z Aux/IAA, co powoduje jego ubikwitynację, kierując go do degradacji proteasomalnej. W rezultacie czynniki ARF są uwolnione z represji i mogą pełnić rolę regulatorów transkrypcji w genach docelowych. Schemat opracowany na podstawie [55–59]. _____	22
Rycina 4. Analiza porównawcza wielkości rodzin genów TIR1/AFB, Aux/IAA i ARF u wybranych gatunków roślin. Drzewo życia zostało sporządzone na podstawie danych taksonomicznych z bazy NCBI Taxonomy. Dane zwizualizowano za pomocą narzędzia iTOL ( <a href="https://itol.embl.de/login.cgi">https://itol.embl.de/login.cgi</a> ). Brak danych dla rodzin: TIR1/AFB u <i>S. suchowensis</i> i ARF u <i>Pisum sativum</i> . Dane liczbowe zawiera Tabela 2. _____	24
Rycina 5. Analiza porównawcza funkcji i struktury białek kodowanych przez geny ARF u wybranych gatunków roślin. Drzewo życia zostało sporządzone na podstawie danych taksonomicznych z bazy NCBI Taxonomy. Dane zwizualizowano za pomocą narzędzia iTOL ( <a href="https://itol.embl.de/login.cgi">https://itol.embl.de/login.cgi</a> ). DBD – domena wiążąca DNA, MD – domena środkowa, PB1 – domena oligomeryzacji; Szczegóły zawiera Tabela 3. _____	27
Rycina 6. Orientacja powtórzeń elementów AuxRE względem siebie. Schematy opracowane na podstawie [113]. _____	31
Rycina 7. Nasiona łubinu żółtego przygotowane do wysiewu w fitotronie. _____	36
Rycina 8. Przykładowe zdjęcia upraw polowych prowadzonych w roku 2020 na terenie Obserwatorium Astronomicznego UMK w Piwnicach k/Torunia. _____	37
Rycina 9. Dane pogodowe dotyczące Torunia. Czerwona linia – maksymalna dobowa temperatura, niebieska linia – minimalna dobowa temperatura, żółta linia – średnia dobowa temperatura, brązowa linia – minimalna temperatura przy gruncie, czarne punkty – dobowa suma opadów. _____	38
Rycina 10. Przykładowe zdjęcia upraw prowadzonych w fitotronie. _____	39
Rycina 11. Etapy rozwojowe kwiatu łubinu żółtego (szczegółowy opis zawiera Tabela 5). _____	41
Rycina 12. Strefy dokowania (and. grid) wybrane dla każdego z analizowanych białek z rodziny TAAR. Górne panele pokazują grid nałożony na model białka, dolne panele przedstawiają sam model białka, co umożliwia pełen ogląd na strefę dokowania. _____	47
Rycina 13. Zasada analizy ekspresji miRNA za pomocą: A. klasycznego podejścia z poliadenylacją i starterem oligo(dT), oraz B. metody z użyciem startera typu stem-loop. _____	51
Rycina 14. Zdjęcia znamion słupków wyizolowanych z kwiatów rozwijających się na szczytowych (po lewej stronie) i najniższych (po prawej stronie) okółkach kwiatostanu. _____	59
Rycina 15. Zdolność kiełkowania pyłku pobranego z kwiatów zlokalizowanych na różnych piętrach na osi kwiatostanu. A. Schematyczne przedstawienie wariantów eksperymentalnych. Półksiężycy symbolizują kwiaty znajdujące się na etapie 2B rozwoju, liczby oznaczają numer okółka. B. Procentowa zawartość pyłku, który wytworzył łagiewkę w ciągu 24 godzin. Różnice nie są statystycznie istotne (ANOVA i test post-hoc Tukeya, poziom ufności 0,95). C. Po dwa reprezentatywne zdjęcia obrazów mikroskopowych dla każdego z wariantów eksperymentalnych. Gwiazdkami zaznaczono widoczne łagiewki pyłkowe. Kontrolę negatywną stanowił termicznie zabity pyłek. _____	60
Rycina 16. Akumulacja transkryptów kodujących białka zaangażowane w homeostazę auksyny w kwiatkach łubinu żółtego zebranych z okółków dolnych (D1-4) i górnych (G1-4). A. Schemat przedstawiające uproszczone procesy utrzymujące ilość aktywnego IAA na odpowiednim poziomie. B. Wzorzec ekspresji 20 najsilniej ekspresjonowanych genów kodujących białka z rodziny YUCCA. C. Wzorzec ekspresji 20 najsilniej ekspresjonowanych genów kodujących białka z rodziny GH3. D. Wzorzec ekspresji	

- 20 najsilniej ekspresjonowanych genów kodujących transmembranowe transportery wypływowe auksyny z rodziny PIN. E. Wzorzec ekspresji 20 najsilniej ekspresjonowanych genów kodujących transmembranowe transportery wypływowe auksyny z rodzin PILS. F. Wzorzec ekspresji 20 najsilniej ekspresjonowanych genów kodujących transmembranowe transportery wpływowe auksyny z rodziny Aux/LAX. \_\_\_\_\_ 61
- Rycina 17. Lokalizacja IAA w całych pręcikach rozwijających się kwiatów łubinu żółtego. Brązowy kolor świadczy o akumulacji IAA. Czarny pasek na zdjęciach wskazuje długość 2 mm. \_\_\_\_\_ 62
- Rycina 18. Lokalizacja IAA w słupkach rozwijających się kwiatów łubinu żółtego. Brązowy kolor świadczy o akumulacji IAA. Czarne paski oznaczają rzeczywiste długości: 2 mm w przypadku całych słupków, 1 mm w przypadku znamion słupków oraz zalążni, 0,3 mm w przypadku zalążków. \_\_\_\_\_ 64
- Rycina 19. Lokalizacja IAA w skrawkach parafinowych zatopionych zalążków izolowanych z rozwijających się kwiatów łubinu żółtego. Górne zdjęcia przedstawiają wyniki dotyczące kwiatów rosnących na najwyższym okółku, dolne dotyczą kwiatów rosnących na najniższych okółkach kwiatostanu. Brązowy kolor świadczy o akumulacji IAA. Czarny pasek odpowiada długości 0,2 mm. \_\_\_\_\_ 65
- Rycina 20. Analiza struktury pierwszo- i trzeciorzędowej białek z rodziny TAAR zidentyfikowanych w kwiatach łubinu żółtego. A) Struktura AtTIR1 u *Arabidopsis thaliana* i prawdopodobna pozycja jego ligandów: kwasu fitowego i kwasu indoliloctowego (IAA), zobrazowana na podstawie danych uzyskanych z bazy PDB (2P1P [191]) za pomocą wbudowanego narzędzia NGL viewer [192]. B) Kieszeń wiążąca IAA u AtTIR1 zwizualizowana za pomocą NGL viewer [192]. C) Modele strukturalne białek z rodziny TIR1/AFB zidentyfikowanych u łubinu żółtego uzyskane przy użyciu I-TASSER i zwizualizowane za pomocą programu Chimera 1.15. D) Analiza msa sekwencji aminokwasowych białek z rodziny TIR1/AFB zidentyfikowanych u łubinu żółtego oraz ich homologów u *A. thaliana* (At). Sekwencje receptora kwasu jasmonowego (COI1) stanowiły grupę zewnętrzną dla wykonanych analiz. Aminokwasy wypisane nad porównaniem tworzą kieszeń wiążącą IAA, w tym zaznaczone na czerwono są krytyczne dla selektywności AtTIR1. \_\_\_\_\_ 67
- Rycina 21. Wynik dokowania *in silico* potencjalnych ligandów receptorów auksyn: IAA, NAA i pikloramu. Tryptofan (Trp) i kwas jasmonowy (JA) stanowiły kontrole negatywne. Na szaro zacieniowano przypadki, w których przyłączony ligand stanowi przeszkodę przestrzenną lub elektrostatyczną, uniemożliwiającą przyłączenie się białka Aux/IAA i transdukcję sygnału. \_\_\_\_\_ 68
- Rycina 22. Drzewo filogenetyczne zbudowane na podstawie sekwencji aminokwasowych białek z rodziny TAAR zidentyfikowanych w kwiatach łubinu żółtego oraz ich homologów u *Arabidopsis thaliana* (At), *Lupinus angustifolius* (La), *Arachis hypogaea* (Ah), *Glycine max* (Gm), *Medicago truncatula* (Mt), *Mucuna pruriens* (Mp) *Vigna angularis* (Va), *Cajanus cajan* (Cc), *Spatholobus suberectus* (Ss). Grupę zewnętrzną stanowiła sekwencja AtCOI1, umożliwiając zakorzenie drzewa. Identyfikatory z bazy NCBI są podane w etykietach liści \_\_\_\_\_ 69
- Rycina 23. Analiza sekwencji N-terminalnych domen I i II w białkach Aux/IAA zidentyfikowanych w kwiatach łubinu żółtego. Motywy wypisane powyżej porównań sekwencji aminokwasowych to najważniejsze elementy białek Aux/IAA, a większe litery oznaczają aminokwasy kluczowe dla funkcjonowania danej domeny. \_\_\_\_\_ 71
- Rycina 24. Analiza C-terminalnych domen PB1 w przewidywanych białkach z rodziny Aux/IAA zidentyfikowanych u łubinu żółtego. Góra: wizualizacja trójwymiarowego modelu domeny PB1 LIIAA14a; góra lewo i środek: na czerwono zaznaczono konserwowaną lizynę w domenie III, na niebiesko motyw OPCA (DxD/ExD); góra prawo: kolorami czerwonym i niebieskim zaznaczono powierzchniowe ładunki, odpowiednio dodatnie i ujemne. Na podstawie widocznego poniżej porównania sekwencji określono, które białka IAA zawierają motywy kluczowe dla części III i IV i na tej podstawie zakwalifikowano je do określonego typu I/II. Widoczne nad porównaniem kształty określają przewidywaną strukturę drugorzędową białka LIIAA14a. Na żółto zaznaczono alfa helisy, na zielono beta harmonijki. \_\_\_\_\_ 72
- Rycina 25. Drzewo filogenetyczne skonstruowane na podstawie sekwencji aminokwasowych białek Aux/IAA zidentyfikowanych w kwiatach łubinu żółtego i białek homologicznych u *Arabidopsis thaliana* (At), *Lupinus angustifolius* (La), *Glycine max* (Gm) i *Medicago truncatula* (Mt). Identyfikatory z bazy NCBI są podane w etykietach liści. \_\_\_\_\_ 73
- Rycina 26. Analiza sekwencji N-terminalnej domeny DBD w białkach ARF zidentyfikowanych w kwiatach łubinu żółtego. Sekwencje wypisane powyżej porównań sekwencji aminokwasowych to motywy kluczowe

	dla ich funkcjonowania, przy czym na czerwono zaznaczono reszty aminokwasowe, które ulegają interakcji ze szkieletem DNA, a na niebiesko te, które są odpowiedzialne za rozpoznawanie sekwencji AuxRE TGTCNN. Na podstawie [109]. _____	78
Rycina 27.	Analiza składu aminokwasowego domen środkowych białek LIARF zidentyfikowanych w kwiatach łubinu żółtego. _____	79
Rycina 28.	Analiza C-terminalnych domen PB1 w przewidywanych białkach z rodziny ARF zidentyfikowanych u łubinu żółtego. Góra: wizualizacja trójwymiarowego modelu domeny PB1 LIIARF6a; góra lewo i środek: na czerwono zaznaczono konserwowaną lizynę w domenie III, na niebiesko motyw OPCA (DxD/ExD); góra prawo: kolorami czerwonym i niebieskim zaznaczono powierzchniowe ładunki, odpowiednio dodatnie i ujemne. Na podstawie widocznego poniżej porównania sekwencji określono, które białka IAA zawierają motywy kluczowe dla części III i IV i na tej podstawie zakwalifikowano je do określonego typu I/II. Widoczne nad porównaniem kształty określają przewidywaną strukturę drugorzędową białka LIIARF6a. Na żółto zaznaczono $\alpha$ -helisy, na zielono $\beta$ -harmonijki. _____	80
Rycina 29.	Analiza konserwowanych motywów w obrębie domeny ES białek ARF3. NLS jest sygnałem lokalizacji jądrowej; łątka serynowa to miejsce, w którym może nastąpić przeniesienie grupy fosforanowej przez kinazę; motywy 1a, 1b i 2 pełnią nieznaną funkcję. Motywy zostały zidentyfikowane na podstawie [93]. _____	81
Rycina 30.	Drzewo filogenetyczne skonstruowane na podstawie sekwencji aminokwasowych białek ARF zidentyfikowanych w kwiatach łubinu żółtego i białek homologicznych zidentyfikowanych u <i>Arabidopsis thaliana</i> (At), <i>Lupinus angustifolius</i> (La), <i>Glycine max</i> (Gm) i <i>Medicago truncatula</i> (Mt). Identyfikatory z bazy NCBI są podane w etykietach liści. _____	82
Rycina 31.	Porównanie sekwencji aminokwasowych białek TOPLESS u <i>A. thaliana</i> i u łubinu żółtego. _____	86
Rycina 32.	Porównanie sekwencji docelowych i odwróconych komplementarnych sekwencji miRNA zidentyfikowanych na podstawie sekwencjonowania degradomu w kwiatach łubinu żółtego. Cieniowanie kół po prawej stronie porównań wskazują, które miRNA zostało uznane za cząsteczkę regulatorową dla białek z rodziny TAAR lub ARF na podstawie analizy degradomu za pomocą programu CleaveLand4 [195]. _____	87
Rycina 33.	Wielokierunkowość potencjalnych interakcji między miRNA i transkryptami z rodziny TAAR, Aux/IAA oraz ARF w kwiatach łubinu żółtego. Analizę potencjalnych celów dla miRNA wykonano za pomocą psRNATarget i zwizualizowano przy użyciu paczki R circos. _____	88
Rycina 34.	Ekspresja genów kodujących elementy szlaku transdukcji sygnału auksyn w kwiatach zebranych z okółków dolnych (D1-4) i górnych (G1-4). Różne litery nad słupkami błędu oznaczają różnice istotne statystycznie na poziomie $p < 0,05$ (testy ANOVA i post-hoc Tukeya). _____	89
Rycina 35.	Ekspresja genów kodujących receptory auksyny z rodziny TAAR w kwiatach łubinu żółtego zebranych z okółków dolnych (D1-4) i górnych (G1-4), oraz akumulacja sRNA, których udział w regulacji potranskrypcyjnej tych genów został udowodniony w sekwencjonowaniu degradomu. PCC (ang. Pearson Correlation Coefficient) jest miarą korelacji między dwoma parametrami. Im jej wartość jest bliższa 0, tym niższa korelacja; jej dodatnia wartość wskazuje na pozytywną korelację, a ujemna na negatywną. _____	90
Rycina 36.	Ekspresja genów kodujących białka z rodziny Aux/IAA w kwiatach łubinu żółtego zebranych z okółków dolnych (D1-4) i górnych (G1-4). _____	91
Rycina 37.	Ekspresja genów kodujących czynniki transkrypcyjne z rodziny ARF w kwiatach łubinu żółtego zebranych z okółków dolnych (D1-4) i górnych (G1-4), oraz akumulacja sRNA, których udział w regulacji potranskrypcyjnej tych genów została udowodniona w sekwencjonowaniu degradomu. PCC (ang. Pearson Correlation Coefficient) jest miarą korelacji między dwoma parametrami. Im jej wartość jest bliższa 0, tym niższa korelacja; jej dodatnia wartość wskazuje na pozytywną korelację, a ujemna na negatywną. _____	92
Rycina 38.	Summaryczna ekspresja genów, kodujących białka ARF z podziałem na ich aktywność jako czynniki transkrypcyjne w kwiatach łubinu żółtego zebranych z okółków dolnych (D1-4) i górnych (G1-4). _____	93
Rycina 39.	Ekspresja genów kodujących czynniki transkrypcyjne z rodziny SAUR w kwiatach łubinu żółtego zebranych z okółków dolnych (D1-4) i górnych (G1-4). _____	94
Rycina 40.	Ekspresja LITIR1, będącego jednym z genów docelowych dla LI-miR224/miR393 w kwiatach łubinu żółtego po usunięciu niższych okółków. Analiza statystyczna: ANOVA i test post-hoc Tukeya. _____	95



Rycina 41. Ekspresja LIARF18, będącego jednym z genów docelowych dla LI-miR333/miR160 w kwiatach łubinu żółtego po usunięciu niższych okółków. Analiza statystyczna: ANOVA i test post-hoc Tukeya. _____	95
Rycina 42. Ekspresja LIARF6 i LIARF8, będących genami docelowymi dla LI-miR281/miR167 w kwiatach łubinu żółtego po usunięciu niższych okółków. Analiza statystyczna: ANOVA i test post-hoc Tukeya. _____	96
Rycina 43. Kontrola stresu suszy u roślin łubinu żółtego. A i B. Oznaczenie ilości proliny w kwiatach metodą kolorymetryczną z kwaśną ninhydryną. A. Krzywa kalibracyjna. B. Ilość proliny w kwiatach. Wykonano test t dla prób o różnych wariancjach: * $p < 0,05$ , . $p < 0,1$ . C. Termogramy wykonane dla roślin doświadczających suszy i kontrolnych. Dwa pierwsze zdjęcia od lewej strony – przykładowe termogramy ściętych roślin w stresie suszy i kontrolnych, uwzględnionych w analizie; rośliny zawsze były parami układane w dwóch pozycjach, aby wykluczyć wpływ temperatury odbitej na temperaturę roślin. Zdjęcie po prawej stronie - przykładowy termogram ściętych roślin w stresie suszy i kontrolnych, odrzuconych z analizy z powodu niedostatecznego odwodnienia części nadziemnej. __	97
Rycina 44. Ekspresja potencjalnych markerów genetycznych stresu suszy w kwiatach łubinu żółtego. Analiza statystyczna: ANOVA i test post-hoc Tukeya . Gwiazdki na skraju wariantów kontrolnego i suszy oznaczają istotność statystyczną: . $p < 0,1$ , * $p < 0,05$ ; ** $p < 0,01$ ; *** $p < 0,005$ . _____	98
Rycina 45. Ekspresja wybranych elementów modułu miRNA/TAAR w kwiatach łubinu żółtego podczas stresu suszy. Analiza statystyczna: ANOVA i test post-hoc Tukeya . Gwiazdki na skraju wariantów kontrolnego i suszy oznaczają istotność statystyczną: . $p < 0,1$ , * $p < 0,05$ ; ** $p < 0,01$ ; *** $p < 0,005$ . __	99
Rycina 46. Ekspresja wybranych elementów modułu ARF18/miR160 w kwiatach łubinu żółtego podczas stresu suszy. Analiza statystyczna: ANOVA i test post-hoc Tukeya. Gwiazdki na skraju wariantów kontrolnego i suszy oznaczają istotność statystyczną: . $p < 0,1$ , * $p < 0,05$ ; ** $p < 0,01$ ; *** $p < 0,005$ . _	100
Rycina 47. Ekspresja wybranych elementów modułu ARF6/miR167 w kwiatach łubinu żółtego podczas stresu suszy. Analiza statystyczna: ANOVA i test post-hoc Tukeya. Gwiazdki na skraju wariantów kontrolnego i suszy oznaczają istotność statystyczną: . $p < 0,1$ , * $p < 0,05$ ; ** $p < 0,01$ ; *** $p < 0,005$ . _	101
Rycina 48. Wyniki analizy zdolności do kiełkowania pyłku pobranego ze skrajnych okółków w warunkach fitotronowych i podczas suszy. W wariancie z suszą pyłek był pobrany wyłącznie z kwiatów zlokalizowanych na najniższych okółkach. _____	102
Rycina 49. Podsumowanie analizy białek z rodzin TAAR, Aux/IAA i ARF zidentyfikowanych w kwiatach łubinu żółtego. _____	106
Rycina 50. Podsumowanie badań dotyczących roli modułów regulacyjnych miRNA/TAAR/ARF w determinacji losu kwiatu oraz reakcji na stres suszy. Jaśniej zacieniowane koła oznaczają sytuację, gdy para miRNA/transkrypt wykazują odwrotną korelację, jednak ich działanie nie zostało potwierdzone w analizie degradomu, a jedynie za pomocą psRNATarget. _____	118

## Wykaz tabel

Tabela 1. Porównanie uprawianych w Polsce odmian łubinu żółtego pod względem wybranych cech wg. COBORU [5]. Szarym kolorem oznaczono zaciemniono dane dotyczące odmian samokończących. * Odmiana Dukat nie była badana w latach 2017-2021. _____	15
Tabela 2. Podsumowanie analizy ilości genów należących do rodzin: TIR1/AFB, Aux/IAA, ARF w wybranych genomach roślin. B.d. brak danych;* Podana w nawiasie wartość dotyczy P. heterocykla. _____	25
Tabela 3 Podsumowanie głębokiej analizy genów należących do rodziny ARF w wybranych genomach roślin. * W całkowitą ilość aktywatorów i receptorów nie są wliczone formy pomocnicze; ** jako formy kanoniczne uznają ARF posiadające domeny DBD i MD; *** jako niekanoniczne uznają ARF skrócone o domenę PB1; **** jako formy pomocnicze uznają ARF zawierające wyłącznie domenę DBD; ***** funkcja pozostałych białek ARF jest niejednoznaczna (nieokreślona przez autorów). _____	28
Tabela 4. Podsumowanie warunków upraw roślin wykorzystanych do poszczególnych eksperymentów wykonanych w ramach niniejszej pracy. * eksperyment wykonany w ramach projektu SONATA 2015/19/D/NZ9/03601, uzyskane dane zostały zdeponowane w bazie LuluDB i opublikowane w [136,174] oraz w realizowanej równolegle pracy doktorskiej mgr Wojciecha Glinkowskiego. _____	40
Tabela 5. Charakterystyka etapów rozwoju kwiatów łubinu żółtego badanych w pracy. _____	41
Tabela 6. Zestawienie zestawów używanych do izolacji RNA, syntezy cDNA i qPCR. _____	49
Tabela 7. Skład mieszaniny reakcyjnej zestawu do odwrotnej transkrypcji TRANSCRIPTME RNA Kit (Blirt, Gdańsk, Polska). _____	50
Tabela 8. Skład mieszaniny reakcyjnej zestawu do odwrotnej transkrypcji NG dART RT kit (EurX, Gdańsk, Polska). _____	50
Tabela 9. Lista starterów typu stem-loop użytych do reakcji odwrotnej transkrypcji, przeprowadzonej w celu analizy akumulacji mikro RNA. _____	50
Tabela 10. Skład mieszaniny reakcyjnej użytej do syntezy cDNA na matrycy miRNA. * Użyty starter był projektowany indywidualnie dla każdego miRNA. _____	51
Tabela 11. Warunki reakcji odwrotnej transkrypcji zastosowane do syntezy cDNA na matrycy miRNA. _____	52
Tabela 12. Dane dotyczące projektowania reakcji qPCR wykonywanych przed zsekwencjonowaniem transkryptomów. W późniejszym czasie zweryfikowano, które transkrypty były namnażane w przeprowadzonych reakcjach i przypisano im ID z bazy LuluDB. _____	53
Tabela 13. Dane dotyczące projektowania reakcji qPCR wykonywanych po zsekwencjonowaniu transkryptomów. _____	54
Tabela 14. Lista starterów użytych do reakcji qPCR, przeprowadzonej w celu analizy akumulacji mikro RNA. W każdej z tego typu reakcji użyto sondy UPL #9. _____	56
Tabela 15. Skład mieszaniny reakcyjnej zestawu KAPA PROBE FAST qPCR Master Mix. _____	56
Tabela 16. Skład mieszaniny reakcyjnej zestawu LightCycler 480 Probes Master (ROCHE) i SensiFAST Probe No-ROX Kit (Bioline). _____	56
Tabela 17. Warunki reakcji real-time qPCR. _____	57
Tabela 18. Lista genów i transkryptów kodujących białka należące do rodziny TIR1/AFB. zidentyfikowanych w kwiatach łubinu żółtego. _____	70
Tabela 19. Lista genów i transkryptów kodujących geny należące do rodziny Aux/IAA zidentyfikowanych w kwiatach łubinu żółtego. Nazwy genów ustalono na podstawie anotacji w bazie LuluDB i analizy filogenetycznej sekwencji aminokwasowych. Szarym kolorem zaciemniono informacje dotyczące białek, które są prawdopodobnie niefunkcjonalne. * oznaczono obecność motywów GWPPI i GWPLL; ** w pole wpisano typ PB1, o ile domena ta jest obecna; *** obecność motywu złożonego w obrębie domeny II/obecność motywu prostego w obrębie domeny IV; **** obecność motywu KR tuż przed motywem GWPPI. _____	74
Tabela 20. Lista genów i transkryptów kodujących geny należące do rodziny ARF zidentyfikowanych w kwiatach łubinu żółtego. _____	83

## Literatura

1. Hondelmann, W. The lupin - ancient and modern crop plant. *Theor. Appl. Genet.* **1984**, *68*, 1–9, doi:10.1007/BF00252301.
2. Klinkowski, M. Das iberisch-nordafrikanische Heimatgebiet von *Lupinus luteus* L., *Lupinus angustifolius* L., *Lupinus hirsutus* L., *Lupinus hispanicus* Boiss. et Reut. und *Lupinus Rothmaleri* Klink. *Der Züchter Zeitschrift für Theor. und Angew. Genet.* **1938**, *10*, 113–126, doi:10.1007/BF01812588.
3. Iqbal, M.M.; Erskine, W.; Berger, J.D.; Nelson, M.N. Phenotypic characterisation and linkage mapping of domestication syndrome traits in yellow lupin (*Lupinus luteus* L.). *Theor. Appl. Genet.* **2020**, *133*, 2975–2987, doi:10.1007/S00122-020-03650-9.
4. Protein crop market in Poland. Dostęp online [https://www.agroberichtenbuitenland.nl/binaries/agroberichtenbuitenland/documenten/rapporten/2021/03/02/protein-crop-market-in-poland/21-02+PROTEIN+CROP+MARKET+in+POLAND\\_with+refrences.pdf](https://www.agroberichtenbuitenland.nl/binaries/agroberichtenbuitenland/documenten/rapporten/2021/03/02/protein-crop-market-in-poland/21-02+PROTEIN+CROP+MARKET+in+POLAND_with+refrences.pdf) (dostęp 16.03.2022).
5. COBORU Porównanie odmian pod względem wybranych cech. Dostęp online: <https://coboru.gov.pl/pdo/porownanieodmian> (20.06.2022).
6. Krajowy Rejestr - odmiany w badaniach. Dostęp online: [http://www.coboru.gov.pl/pl/kr/kr\\_bad\\_odm?kodgatunku=LZS](http://www.coboru.gov.pl/pl/kr/kr_bad_odm?kodgatunku=LZS) (21.04.2022).
7. Van Steveninck, R.F.M. Factors affecting the abscission of reproductive organs in yellow lupins (*Lupinus luteus* L.) I. The effect of different patterns of flower removal. *J. Exp. Bot.* **1957**, *8*, 373–381, doi:10.1093/JXB/8.3.373.
8. Roberts, J. Cell separation and adhesion processes in plants. In *Plant Cell Separation and Adhesion*; Roberts, J., Gonzales-Carranza, Z., Eds.; Blackwell Publishing Ltd: Oxford, 2007; pp. 1–7 ISBN 978-14051-3892-5.
9. McKim, S.M.; Stenvik, G.E.; Butenko, M.A.; Kristiansen, W.; Cho, S.K.; Hepworth, S.R.; Aalen, R.B.; Haughn, G.W. The *BLADE-ON-PETIOLE* genes are essential for abscission zone formation in *Arabidopsis*. *Development* **2008**, *135*, 1537–1546, doi:10.1242/DEV.012807.
10. Rascio, N.; Casadoro, G.; Ramina, A.; Masia, A. Structural and biochemical aspects of peach fruit abscission (*Prunus persica* L. Batsch). *Planta 1985 1641* **1985**, *164*, 1–11, doi:10.1007/BF00391019.
11. Glazinska, P.; Wojciechowski, W.; Kulasek, M.; Glinkowski, W.; Marciniak, K.; Klajn, N.; Kesy, J.; Kopcewicz, J. *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.* **2017**, *8*, 641, doi:10.3389/FPLS.2017.00641/BIBTEX.
12. von Gärtner, C.F.; von Gärtner, C.F., *Beiträge zur Kenntniss der Befruchtung der vollkommeneren Gewächse*; E. Schweizerbart: Stuttgart, 1844.
13. Stephenson, A.G. Flower and fruit abortion: proximate causes and ultimate functions. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* **2003**, *12*, 253–279, doi:10.1146/ANNUREV.ES.12.110181.001345.

14. Kendall, J.N.; Kendall, J.N. *Abscission of flowers and fruits in the Solanaceae, with special reference to Nicotiana*; [s.n.]: Berkeley, 1918;
15. Abernethy, R.H.; Palmer, R.G.; Shibles, R.; Anderson, I.C. Histological observations on abscising and retained soybean flowers. *Can. J. Plant Sci.* **2011**, *57*, 713–716, doi:10.4141/CJPS77-104.
16. Kambal, A.E. Flower drop and fruit set in field beans, *Vicia faba* L. *J. Agric. Sci.* **1969**, *72*, 131–138, doi:10.1017/S0021859600020499.
17. Sundaresan, S.; Philosoph-Hadas, S.; Riov, J.; Belausov, E.; Kochanek, B.; Tucker, M.L.; Meir, S. Abscission of flowers and floral organs is closely associated with alkalization of the cytosol in abscission zone cells. *J. Exp. Bot.* **2015**, *66*, 1355, doi:10.1093/JXB/ERU483.
18. Gao, Y.; Liu, C.; Li, X.; Xu, H.; Liang, Y.; Ma, N.; Fei, Z.; Gao, J.; Jiang, C.Z.; Ma, C. Transcriptome profiling of petal abscission zone and functional analysis of an Aux/IAA family gene *RhiAA16* involved in petal shedding in rose. *Front. Plant Sci.* **2016**, *7*, 1375, doi:10.3389/FPLS.2016.01375/BIBTEX.
19. Wilmowicz, E.; Kućko, A.; Pokora, W.; Kapusta, M.; Jasieniecka-Gazarkiewicz, K.; Tranbarger, T.J.; Wolska, M.; Panek, K. EPIP-evoked modifications of redox, lipid, and pectin homeostasis in the abscission zone of lupine flowers. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 1–21, doi:10.3390/IJMS22063001.
20. Kućko, A.; Smoliński, D.; Wilmowicz, E.; Florkiewicz, A.; de Dios Alché, J. Spatio-temporal localization of *LIBOP* following early events of floral abscission in yellow lupine. *Protoplasma* **2019**, *256*, 1173–1183, doi:10.1007/S00709-019-01365-3.
21. Kućko, A.; Wilmowicz, E.; Ostrowski, M. Spatio-temporal IAA gradient is determined by interactions with ET and governs flower abscission. *J. Plant Physiol.* **2019**, *236*, 51–60, doi:10.1016/J.JPLPH.2019.02.014.
22. Marciniak, K.; Kućko, A.; Wilmowicz, E.; Świdziński, M.; Przedniczek, K.; Kopcewicz, J. Gibberellic acid affects the functioning of the flower abscission zone in *Lupinus luteus* via cooperation with the ethylene precursor independently of abscisic acid. *J. Plant Physiol.* **2018**, *229*, 170–174, doi:10.1016/J.JPLPH.2018.07.014.
23. Florkiewicz, A.B.; Kućko, A.; Kapusta, M.; Burchardt, S.; Przywieczerski, T.; Czeszewska-Rosiak, G.; Wilmowicz, E. Drought disrupts auxin localization in abscission zone and modifies cell wall structure leading to flower separation in yellow lupine. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *Vol. 21, Page 6848* **2020**, *21*, 6848, doi:10.3390/IJMS21186848.
24. Wilmowicz, E.; Kućko, A.; Burchardt, S.; Przywieczerski, T. Molecular and hormonal aspects of drought-triggered flower shedding in yellow lupine. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, doi:10.3390/IJMS20153731.
25. In, B.C.; Strable, J.; Binder, B.M.; Falbel, T.G.; Patterson, S.E. Morphological and molecular characterization of ethylene binding inhibition in carnations. *Postharvest Biol. Technol.* **2013**, *86*, 272–279, doi:10.1016/J.POSTHARVBIO.2013.07.007.
26. Frankowski, K.; Kućko, A.; Zienkiewicz, A.; Zienkiewicz, K.; De Dios Alché, J.; Kopcewicz, J.; Wilmowicz, E. Ethylene-dependent effects on generative organ abscission of *Lupinus*

- luteus*. *Acta Soc. Bot. Pol.* **2017**, *86*, doi:10.5586/asbp.3540.
27. Brown, K.M. Ethylene and abscission. *Physiol. Plant.* **1997**, *100*, 567–576, doi:10.1111/J.1399-3054.1997.TB03062.X.
  28. Morgan, P.W.; Durham, J.I. Leaf age and ethylene-induced abscission. *Plant Physiol.* **1973**, *52*, 667, doi:10.1104/PP.52.6.667.
  29. McGranahan, G.H.; Voyiatzis, D.G.; Catlin, P.B.; Polito, V.S. High pollen loads can cause pistillate flower abscission in walnut. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* **1994**, *119*, 505–509, doi:10.21273/JASHS.119.3.505.
  30. Vanneste, S.; Friml, J. Auxin: a trigger for change in plant development. *Cell* **2009**, *136*, 1005–1016, doi:10.1016/J.CELL.2009.03.001.
  31. Zhang, Y.; Li, Y.; Hassan, M.J.; Li, Z.; Peng, Y. Indole-3-acetic acid improves drought tolerance of white clover *via* activating auxin, abscisic acid and jasmonic acid related genes and inhibiting senescence genes. *BMC Plant Biol.* **2020**, *20*, 1–12, doi:10.1186/S12870-020-02354-Y.
  32. Sadok, W.; Schoppach, R. Potential involvement of root auxins in drought tolerance by modulating nocturnal and daytime water use in wheat. *Ann. Bot.* **2019**, *124*, 969–978, doi:10.1093/AOB/MCZ023.
  33. Machado, R.A.R.; Robert, C.A.M.; Arce, C.C.M.; Ferrieri, A.P.; Xu, S.; Jimenez-Aleman, G.H.; Baldwin, I.T.; Erb, M. Auxin is rapidly induced by herbivore attack and regulates a subset of systemic, jasmonate-dependent defenses. *Plant Physiol.* **2016**, *172*, 521–532, doi:10.1104/PP.16.00940.
  34. Korver, R.A.; Koevoets, I.T.; Testerink, C. Out of shape during stress: a key role for auxin. *Trends Plant Sci.* **2018**, *23*, 783–793, doi:10.1016/J.TPLANTS.2018.05.011.
  35. Galvan-Ampudia, C.S.; Julkowska, M.M.; Darwish, E.; Gandullo, J.; Korver, R.A.; Brunoud, G.; Haring, M.A.; Munnik, T.; Vernoux, T.; Testerink, C. Halotropism is a response of plant roots to avoid a saline environment. *Curr. Biol.* **2013**, *23*, 2044–2050, doi:10.1016/J.CUB.2013.08.042.
  36. Casanova-Sáez, R.; Mateo-Bonmatí, E.; Ljung, K. Auxin metabolism in plants. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2021**, *13*, a039867, doi:10.1101/CSHPERSPECT.A039867.
  37. Swarup, R.; Péret, B. AUX/LAX family of auxin influx carriers-An overview. *Front. Plant Sci.* **2012**, *3*, 225, doi:10.3389/FPLS.2012.00225/BIBTEX.
  38. Zhou, J.J.; Luo, J. The PIN-FORMED auxin efflux carriers in plants. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, doi:10.3390/IJMS19092759.
  39. Geisler, M.; Aryal, B.; Di Donato, M.; Hao, P. A Critical View on ABC Transporters and Their Interacting Partners in Auxin Transport. *Plant Cell Physiol.* **2017**, *58*, 1601–1614, doi:10.1093/PCP/PCX104.
  40. Včelařová, L.; Skalický, V.; Chamrád, I.; Lenobel, R.; Kubeš, M.F.; Pěňčík, A.; Novák, O. Auxin metabolome profiling in the Arabidopsis endoplasmic reticulum using an optimised organelle isolation protocol. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, doi:10.3390/IJMS22179370.

41. Chandler, J.W. Local auxin production: a small contribution to a big field. *BioEssays* **2009**, *31*, 60–70, doi:10.1002/BIES.080146.
42. v. Goethe, J.W. The metamorphosis of plants. **2009**, 156.
43. Thomson, B.; Wellmer, F. Molecular regulation of flower development. *Curr. Top. Dev. Biol.* **2019**, *131*, 185–210, doi:10.1016/BS.CTDB.2018.11.007.
44. Bowman, J.L.; Smyth, D.R.; Meyerowitz, E.M. Genetic interactions among floral homeotic genes of *Arabidopsis*. *Development* **1991**, *112*, 1–20, doi:10.1242/DEV.112.1.1.
45. Goto, K.; Kyojuka, J.; Bowman, J.L. Turning floral organs into leaves, leaves into floral organs. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **2001**, *11*, 449–456, doi:10.1016/S0959-437X(00)00216-1.
46. Aloni, R.; Schwalm, K.; Langhans, M.; Ullrich, C.I. Gradual shifts in sites of free-auxin production during leaf-primordium development and their role in vascular differentiation and leaf morphogenesis in *Arabidopsis*. *Planta* **2003**, *216*, 841–853, doi:10.1007/S00425-002-0937-8.
47. Bowman, J.L.; Smyth, D.R.; Meyerowitz, E.M. Genes directing flower development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **1989**, *1*, 37–52, doi:10.1105/TPC.1.1.37.
48. Aloni, R.; Aloni, E.; Langhans, M.; Ullrich, C.I. Role of auxin in regulating *Arabidopsis* flower development. *Plant Cell* **2005**, *17*, 315–328, doi:10.1007/S00425-005-0088-9.
49. Wu, J.Z.; Lin, Y.; Zhang, X.L.; Pang, D.W.; Zhao, J. IAA stimulates pollen tube growth and mediates the modification of its wall composition and structure in *Torenia fournieri*. *J. Exp. Bot.* **2008**, *59*, 2529–2543, doi:10.1093/JXB/ERN119.
50. Chen, D.; Zhao, J. Free IAA in stigmas and styles during pollen germination and pollen tube growth of *Nicotiana tabacum*. *Physiol. Plant.* **2008**, *134*, 202–215, doi:10.1111/J.1399-3054.2008.01125.X.
51. Cucinotta, M.; Cavalleri, A.; Chandler, J.W.; Colombo, L. Auxin and flower development: a blossoming field. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2013**, *3*, a039974, doi:10.1101/CSHPERSPECT.A039974.
52. Jones, A.M.; Herman, E.M. KDEL-containing auxin-binding protein is secreted to the plasma membrane and cell wall. *Plant Physiol.* **1993**, *101*, 595, doi:10.1104/PP.101.2.595.
53. Mravec, J.; Skůpa, P.; Bailly, A.; Hoyerová, K.; Křeček, P.; Bielach, A.; Petrášek, J.; Zhang, J.; Gaykova, V.; Stierhof, Y.D.; et al. Subcellular homeostasis of phytohormone auxin is mediated by the ER-localized PIN5 transporter. *Nat. 2009 4597250* **2009**, *459*, 1136–1140, doi:10.1038/nature08066.
54. Bowman, J.L.; Kohchi, T.; Yamato, K.T.; Jenkins, J.; Shu, S.; Ishizaki, K.; Yamaoka, S.; Nishihama, R.; Nakamura, Y.; Berger, F.; et al. Insights into land plant evolution garnered from the *Marchantia polymorpha* genome. *Cell* **2017**, *171*, 287–304.e15, doi:10.1016/J.CELL.2017.09.030.
55. Szemenyei, H.; Hannon, M.; Long, J.A. TOPLESS mediates auxin-dependent

- transcriptional repression during *Arabidopsis* embryogenesis. *Science* **2008**, *319*, 1384–1386, doi:10.1126/SCIENCE.1151461.
56. Dinesh, D.C.; Villalobos, L.I.A.C.; Abel, S. Structural biology of nuclear auxin action. *Trends Plant Sci.* **2016**, *21*, 302–316, doi:10.1016/J.TPLANTS.2015.10.019.
  57. Wu, M.F.; Yamaguchi, N.; Xiao, J.; Bargmann, B.; Estelle, M.; Sang, Y.; Wagner, D. Auxin-regulated chromatin switch directs acquisition of flower primordium founder fate. *Elife* **2015**, *4*, doi:10.7554/ELIFE.09269.
  58. Weijers, D.; Wagner, D. Transcriptional responses to the auxin hormone. *Annu. Rev. Plant Biol.* **2016**, *67*, 539–574, doi:10.1146/ANNUREV-ARPLANT-043015-112122.
  59. Guilfoyle, T.J. The PB1 domain in auxin response factor and Aux/IAA proteins: a versatile protein interaction module in the auxin response. *Plant Cell* **2015**, *27*, 33–43, doi:10.1105/TPC.114.132753.
  60. Finet, C.; Berne-Dedieu, A.; Scutt, C.P.; Marlétaz, F. Evolution of the ARF gene family in land plants: old domains, new tricks. *Mol. Biol. Evol.* **2013**, *30*, 45–56, doi:10.1093/MOLBEV/MSS220.
  61. Martin-Arevalillo, R.; Thévenon, E.; Jégu, F.; Vinos-Poyo, T.; Vernoux, T.; Parcy, F.; Dumas, R. Evolution of the Auxin Response Factors from charophyte ancestors. *PLoS Genet.* **2019**, *15*, doi:10.1371/JOURNAL.PGEN.1008400.
  62. Choi, H.S.; Seo, M.; Cho, H.T. Two TPL-binding motifs of ARF2 are involved in repression of auxin responses. *Front. Plant Sci.* **2018**, *9*, 372, doi:10.3389/FPLS.2018.00372/BIBTEX.
  63. Panchy, N.; Lehti-Shiu, M.; Shiu, S.H. Evolution of gene duplication in plants. *Plant Physiol.* **2016**, *171*, 2294–2316, doi:10.1104/PP.16.00523.
  64. Dharmasiri, N.; Dharmasiri, S.; Weijers, D.; Lechner, E.; Yamada, M.; Hobbie, L.; Ehrismann, J.S.; Jürgens, G.; Estelle, M. Plant development is regulated by a family of auxin receptor F Box proteins. *Dev. Cell* **2005**, *9*, 109–119, doi:10.1016/J.DEVCEL.2005.05.014.
  65. Ruegger, M.; Dewey, E.; Gray, W.M.; Hobbie, L.; Turner, J.; Estelle, M. The TIR1 protein of *Arabidopsis* functions in auxin response and is related to human SKP2 and yeast grr1p. *Genes Dev.* **1998**, *12*, 198–207, doi:10.1101/GAD.12.2.198.
  66. Prigge, M.J.; Greenham, K.; Zhang, Y.; Santner, A.; Castillejo, C.; Mutka, A.M.; O'Malley, R.C.; Ecker, J.R.; Kunkel, B.N.; Estelle, M. The *Arabidopsis* auxin receptor F-Box proteins AFB4 and AFB5 are required for response to the synthetic auxin picloram. *G3 (Bethesda)*. **2016**, *6*, 1383–1390, doi:10.1534/G3.115.025585.
  67. Liscum, E.; Reed, J.W. Genetics of Aux/IAA and ARF action in plant growth and development. *Plant Mol. Biol.* **2002**, *49*, 387–400, doi:10.1023/A:1015255030047.
  68. Guilfoyle, T.J.; Hagen, G. Auxin response factors. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2007**, *10*, 453–460, doi:10.1016/J.PBI.2007.08.014.
  69. Cai, Z.; Zeng, D.E.; Liao, J.; Cheng, C.; Sahito, Z.A.; Xiang, M.; Fu, M.; Chen, Y.; Wang, D. Genome-wide analysis of auxin receptor family genes in *Brassica juncea* var. *tumida*.

- Genes (Basel)*. **2019**, *10*, doi:10.3390/GENES10020165.
70. Paul, P.; Dhandapani, V.; Rameneni, J.J.; Li, X.; Sivanandhan, G.; Choi, S.R.; Pang, W.; Im, S.; Lim, Y.P. Genome-wide analysis and characterization of *Aux/IAA* family genes in *Brassica rapa*. *PLoS One* **2016**, *11*, e0151522, doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0151522.
  71. Mun, J.H.; Yu, H.J.; Shin, J.Y.; Oh, M.; Hwang, H.J.; Chung, H. Auxin response factor gene family in *Brassica rapa*: genomic organization, divergence, expression, and evolution. *Mol. Genet. Genomics* **2012**, *287*, 765, doi:10.1007/S00438-012-0718-4.
  72. Singh, V.K.; Jain, M. Genome-wide survey and comprehensive expression profiling of *Aux/IAA* gene family in chickpea and soybean. *Front. Plant Sci.* **2015**, *6*, 918, doi:10.3389/FPLS.2015.00918/BIBTEX.
  73. Die, J. V.; Elmassry, M.M.; LeBlanc, K.H.; Awe, O.I.; Dillman, A.; Busby, B. GeneHummus: an R package to define gene families and their expression in legumes and beyond. *BMC Genomics* **2019**, *20*, 1–9, doi:10.1186/S12864-019-5952-2.
  74. Die, J. V.; Gil, J.; Millan, T. Genome-wide identification of the auxin response factor gene family in *Cicer arietinum*. *BMC Genomics* **2018**, *19*, 1–15, doi:10.1186/S12864-018-4695-9.
  75. Cai, Z.; Wang, Y.; Zhu, L.; Tian, Y.; Chen, L.; Sun, Z.; Ullah, I.; Li, X. GmTIR1/GmAFB3-based auxin perception regulated by miR393 modulates soybean nodulation. *New Phytol.* **2017**, *215*, 672–686, doi:10.1111/nph.14632.
  76. Van Ha, C.; Le, D.T.; Nishiyama, R.; Watanabe, Y.; Sulieman, S.; Tran, U.T.; Mochida, K.; Van Dong, N.; Yamaguchi-Shinozaki, K.; Shinozaki, K.; et al. The Auxin Response Factor transcription factor family in soybean: genome-wide identification and expression analyses during development and water stress. *DNA Res. An Int. J. Rapid Publ. Reports Genes Genomes* **2013**, *20*, 511, doi:10.1093/DNARES/DST027.
  77. Flores-Sandoval, E.; Eklund, D.M.; Bowman, J.L. A simple auxin transcriptional response system regulates multiple morphogenetic processes in the liverwort *Marchantia polymorpha*. *PLOS Genet.* **2015**, *11*, e1005207, doi:10.1371/JOURNAL.PGEN.1005207.
  78. Liu, R.; Guo, Z.; Lu, S. Genome-wide identification and expression analysis of the *Aux/IAA* and *Auxin Response Factor* gene family in *Medicago truncatula*. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *Vol. 22, Page 10494* **2021**, *22*, 10494, doi:10.3390/IJMS221910494.
  79. Matthes, M.S.; Best, N.B.; Robil, J.M.; Malcomber, S.; Gallavotti, A.; McSteen, P. Auxin EvoDevo: conservation and diversification of genes regulating auxin biosynthesis, transport, and signaling. *Mol. Plant* **2019**, *12*, 298–320, doi:10.1016/J.MOLP.2018.12.012.
  80. Jain, M.; Kaur, N.; Garg, R.; Thakur, J.K.; Tyagi, A.K.; Khurana, J.P. Structure and expression analysis of early auxin-responsive *Aux/IAA* gene family in rice (*Oryza sativa*). *Funct. Integr. Genomics* **2006**, *6*, 47–59, doi:10.1007/S10142-005-0005-0.
  81. Shen, C.; Wang, S.; Bai, Y.; Wu, Y.; Zhang, S.; Chen, M.; Guilfoyle, T.J.; Wu, P.; Qi, Y. Functional analysis of the structural domain of ARF proteins in rice (*Oryza sativa* L.). **2010**, *61*, doi:10.1093/JXB/ERQ208.



82. Wang, W.; Gu, L.; Ye, S.; Zhang, H.; Cai, C.; Xiang, M.; Gao, Y.; Wang, Q.; Lin, C.; Zhu, Q. Genome-wide analysis and transcriptomic profiling of the auxin biosynthesis, transport and signaling family genes in moso bamboo (*Phyllostachys heterocycla*). *BMC Genomics* **2017**, *18*, doi:10.1186/S12864-017-4250-0.
83. Li, F.; Wu, M.; Liu, H.; Gao, Y.; Xiang, Y. Systematic identification and expression pattern analysis of the *Aux/IAA* and *ARF* gene families in moso bamboo (*Phyllostachys edulis*). *Plant Physiol. Biochem. PPB* **2018**, *130*, 431–444, doi:10.1016/J.PLAPHY.2018.07.033.
84. Jayasinghege, C.P.A.; Ozga, J.A.; Nadeau, C.D.; Kaur, H.; Reinecke, D.M. TIR1 auxin receptors are implicated in the differential response to 4-Cl-IAA and IAA in developing pea fruit. *J. Exp. Bot.* **2019**, *70*, 1239, doi:10.1093/JXB/ERY456.
85. Shu, W.; Liu, Y.; Guo, Y.; Zhou, H.; Zhang, J.; Zhao, S.; Lu, M. A *Populus TIR1* gene family survey reveals differential expression patterns and responses to 1-naphthaleneacetic acid and stress treatments. *Front. Plant Sci.* **2015**, *6*, doi:10.3389/FPLS.2015.00719.
86. Wang, Y.; Deng, D.; Bian, Y.; Lv, Y.; Xie, Q. Genome-wide analysis of primary auxin-responsive *Aux/IAA* gene family in maize (*Zea mays* L.). *Mol. Biol. Rep.* **2010**, *37*, 3991–4001, doi:10.1007/S11033-010-0058-6.
87. Kalluri, U.C.; Difazio, S.P.; Brunner, A.M.; Tuskan, G.A. Genome-wide analysis of *Aux/IAA* and *ARF* gene families in *Populus trichocarpa*. *BMC Plant Biol.* **2007**, *7*, 1–14, doi:10.1186/1471-2229-7-59.
88. Wei, S.; Chen, Y.; Hou, J.; Yang, Y.; Yin, T. *Aux/IAA* and *ARF* gene families in *Salix suchowensis*: identification, evolution, and dynamic transcriptome profiling during the plant growth process. *Front. Plant Sci.* **2021**, *12*, 769, doi:10.3389/FPLS.2021.666310/BIBTEX.
89. Xing, H.; Pudake, R.N.; Guo, G.; Xing, G.; Hu, Z.; Zhang, Y.; Sun, Q.; Ni, Z. Genome-wide identification and expression profiling of auxin response factor (*ARF*) gene family in maize. *BMC Genomics* **2011**, *12*, 1–13, doi:10.1186/1471-2164-12-178.
90. Tiwari, S.B.; Hagen, G.; Guilfoyle, T. The roles of auxin response factor domains in auxin-responsive transcription. *Plant Cell* **2003**, *15*, 533–543, doi:10.1105/TPC.008417.
91. Ulmasov, T.; Hagen, G.; Guilfoyle, T.J. Activation and repression of transcription by auxin-response factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1999**, *96*, 5844–5849, doi:10.1073/PNAS.96.10.5844.
92. Zouine, M.; Fu, Y.; Chateigner-Boutin, A.L.; Mila, I.; Frasse, P.; Wang, H.; Audran, C.; Roustan, J.P.; Bouzayen, M. Characterization of the tomato *ARF* gene family uncovers a multi-levels post-transcriptional regulation including alternative splicing. **2014**, *9*, e84203, doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0084203.
93. Simonini, S.; Mas, P.J.; Mas, C.M.V.S.; Østergaard, L.; Hart, D.J. Auxin sensing is a property of an unstructured domain in the Auxin Response Factor ETTIN of *Arabidopsis thaliana*. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, doi:10.1038/S41598-018-31634-9.
94. Wen, J.; Guo, P.; Ke, Y.; Liu, M.; Li, P.; Wu, Y.; Ran, F.; Wang, M.; Li, J.; Du, H. The auxin response factor gene family in allopolyploid *Brassica napus*. *PLoS One* **2019**, *14*, e0214885, doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0214885.

95. Liu, K.; Yuan, C.; Li, H.; Lin, W.; Yang, Y.; Shen, C.; Zheng, X. Genome-wide identification and characterization of auxin response factor (ARF) family genes related to flower and fruit development in papaya (*Carica papaya* L.). **2015**, *16*, 1–12.
96. Hagen, G.; Guilfoyle, T. Auxin-responsive gene expression: genes, promoters and regulatory factors. *Plant Mol. Biol.* **2002**, *49*, 373–385, doi:10.1023/A:1015207114117.
97. Ainley, W.M.; Walker, J.C.; Nagao, R.T.; Key, J.L. Sequence and characterization of two auxin-regulated genes from soybean. *J. Biol. Chem.* **1988**, *263*, 10658–10666, doi:10.1016/S0021-9258(18)38022-0.
98. Abel, S.; Theologis, A. Early genes and auxin action. *Plant Physiol.* **1996**, *111*, 9, doi:10.1104/PP.111.1.9.
99. Weiste, C.; Dröge-Laser, W. The *Arabidopsis* transcription factor bZIP11 activates auxin-mediated transcription by recruiting the histone acetylation machinery. *Nat. Commun.* **2014**, *5*, 1–12, doi:10.1038/ncomms4883.
100. Li, Y.; Liu, Z. Bin; Shi, X.; Hagen, G.; Guilfoyle, T.J. An auxin-inducible element in soybean *SAUR* promoters. *Plant Physiol.* **1994**, *106*, 37–43, doi:10.1104/PP.106.1.37.
101. Wang, X.; Yu, R.; Wang, J.; Lin, Z.; Han, X.; Deng, Z.; Fan, L.; He, H.; Deng, X.W.; Chen, H. The asymmetric expression of *SAUR* genes mediated by ARF7/19 promotes the gravitropism and phototropism of plant hypocotyls. *Cell Rep.* **2020**, *31*, doi:10.1016/J.CELREP.2020.107529.
102. Walcher, C.L.; Nemhauser, J.L. Bipartite promoter element required for auxin response. *Plant Physiol.* **2012**, *158*, 273–282, doi:10.1104/PP.111.187559.
103. McClure, B.A.; Guilfoyle, T. Rapid redistribution of auxin-regulated RNAs during gravitropism. *Science* **1989**, *243*, 91–93, doi:10.1126/SCIENCE.11540631.
104. Francost, A.R.; Geell, M.A.; Guilfoylesii, T.J. Induction and superinduction of auxin-responsive mRNAs with auxin and protein synthesis inhibitors. *J. OP Biol. Chem.* **1990**, *265*, 15845–15849, doi:10.1016/S0021-9258(18)55475-2.
105. Knauss, S.; Rohrmeier, T.; Lehle, L. The auxin-induced maize gene *ZmSAUR2* encodes a short-lived nuclear protein expressed in elongating tissues. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 23936–23943, doi:10.1074/JBC.M212585200.
106. Ren, H.; Gray, W.M. SAUR proteins as effectors of hormonal and environmental signals in plant growth. *Mol. Plant* **2015**, *8*, 1153, doi:10.1016/J.MOLP.2015.05.003.
107. McClure, B.A.; Guilfoyle, T. Characterization of a class of small auxin-inducible soybean polyadenylated RNAs. *Plant Mol. Biol.* **1987**, *9*, 611–623, doi:10.1007/BF00020537.
108. Gil, P.; Liu, Y.; Orbović, V.; Verkamp, E.; Poff, K.L.; Green, P.J. characterization of the auxin-inducible *SAUR-AC1* gene for use as a molecular genetic tool in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **1994**, *104*, 777–784, doi:10.1104/PP.104.2.777.
109. Boer, D.R.; Freire-Rios, A.; Van Den Berg, W.A.M.; Saaki, T.; Manfield, I.W.; Kepinski, S.; López-Vidriero, I.; Franco-Zorrilla, J.M.; De Vries, S.C.; Solano, R.; et al. Structural basis for DNA binding specificity by the auxin-dependent ARF transcription factors. *Cell* **2014**, *156*, 577–589, doi:10.1016/J.CELL.2013.12.027.

110. Liu, Z.-B.; Ulmasov, T.; Shi, X.; Hagen, G.; Guilfoyle, T.J. Soybean GH3 promoter contains multiple auxin-inducible elements. *Plant Cell* **1994**, *6*, 645, doi:10.1105/TPC.6.5.645.
111. Ulmasov, T.; Murfett, J.; Hagen, G.; Guilfoyle, T.J. Aux/IAA proteins repress expression of reporter genes containing natural and highly active synthetic auxin response elements. *Plant Cell* **1997**, *9*, 1963, doi:10.1105/TPC.9.11.1963.
112. Liao, C.Y.; Smet, W.; Brunoud, G.; Yoshida, S.; Vernoux, T.; Weijers, D. Reporters for sensitive and quantitative measurement of auxin response. *Nat. Methods* **2015**, *12*, 207–210, doi:10.1038/nmeth.3279.
113. Freire-Rios, A.; Tanaka, K.; Crespo, I.; Van der Wijk, E.; Sizentsova, Y.; Levitsky, V.; Lindhoud, S.; Fontana, M.; Hohlbein, J.; Roeland Boer, D.; et al. Architecture of DNA elements mediating ARF transcription factor binding and auxin-responsive gene expression in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2020**, *117*, 24557–24566, doi:10.1073/PNAS.2009554117/SUPPL\_FILE/PNAS.2009554117.SD03.XLSX.
114. Lanctot, A.; Taylor-Teeple, M.; Oki, E.A.; Nemhauser, J.L. Specificity in auxin responses is not explained by the promoter preferences of activator ARFs. *Plant Physiol.* **2020**, *182*, 1533–1536, doi:10.1104/PP.19.01474.
115. Nanao, M.H.; Vinos-Poyo, T.; Brunoud, G.; Thévenon, E.; Mazzoleni, M.; Mast, D.; Lainé, S.; Wang, S.; Hagen, G.; Li, H.; et al. Structural basis for oligomerization of auxin transcriptional regulators. *Nat. Commun.* **2014**, *5*, 1–8, doi:10.1038/ncomms4617.
116. Tabata, R.; Ikezaki, M.; Fujibe, T.; Aida, M.; Tian, C.E.; Ueno, Y.; Yamamoto, K.T.; Machida, Y.; Nakamura, K.; Ishiguro, S. *Arabidopsis* Auxin Response Factor6 and 8 regulate jasmonic acid biosynthesis and floral organ development *via* repression of class 1 *KNOX* genes. *Plant Cell Physiol.* **2010**, *51*, 164–175, doi:10.1093/PCP/PCP176.
117. Varaud, E.; Brioudes, F.; Szécsi, J.; Leroux, J.; Brown, S.; Perrot-Rechenmann, C.; Bendahmane, M. AUXIN RESPONSE FACTOR8 regulates *Arabidopsis* petal growth by interacting with the bHLH transcription factor BIGPETALp. *Plant Cell* **2011**, *23*, 973, doi:10.1105/TPC.110.081653.
118. Xie, Z.; Allen, E.; Fahlgren, N.; Calamar, A.; Givan, S.A.; Carrington, J.C. Expression of *Arabidopsis* MIRNA genes. *Plant Physiol.* **2005**, *138*, 2145–2154, doi:10.1104/PP.105.062943.
119. Song, L.; Axtell, M.J.; Fedoroff, N. V. RNA secondary structural determinants of miRNA precursor processing in *Arabidopsis*. *Curr. Biol.* **2010**, *20*, 37–41, doi:10.1016/J.CUB.2009.10.076.
120. Denli, A.M.; Tops, B.B.J.; Plasterk, R.H.A.; Ketting, R.F.; Hannon, G.J. Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nat.* **2004**, *432*, 231–235, doi:10.1038/nature03049.
121. Yang, Z.; Ebright, Y.W.; Yu, B.; Chen, X. HEN1 recognizes 21–24 nt small RNA duplexes and deposits a methyl group onto the 2' OH of the 3' terminal nucleotide. *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34*, 667, doi:10.1093/NAR/GKJ474.
122. Rogers, K.; Chen, X. Biogenesis, turnover, and mode of action of plant MicroRNAs. *Plant*

- Cell* **2013**, *25*, 2383–2399, doi:10.1105/TPC.113.113159.
123. Vaucheret, H. Post-transcriptional small RNA pathways in plants: mechanisms and regulations. *Genes Dev.* **2006**, *20*, 759–771, doi:10.1101/GAD.1410506.
  124. Aukerman, M.J.; Sakai, H. Regulation of flowering time and floral organ identity by a microRNA and its *APETALA2-like* target genes. *Plant Cell* **2003**, *15*, 2730–2741, doi:10.1105/TPC.016238.
  125. Eckardt, N.A. Investigating translational repression by microRNAs in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **2009**, *21*, 1624, doi:10.1105/TPC.109.210613.
  126. Llave, C.; Xie, Z.; Kasschau, K.D.; Carrington, J.C. Cleavage of Scarecrow-like mRNA targets directed by a class of *Arabidopsis* miRNA. *Science* **2002**, *297*, 2053–2056, doi:10.1126/SCIENCE.1076311.
  127. Xie, Z.; Kasschau, K.D.; Carrington, J.C. Negative feedback regulation of Dicer-Like1 in *Arabidopsis* by microRNA-guided mRNA degradation. *Curr. Biol.* **2003**, *13*, 784–789, doi:10.1016/S0960-9822(03)00281-1.
  128. Bao, N.; Lye, K.W.; Barton, M.K. MicroRNA binding sites in *Arabidopsis* class III HD-ZIP mRNAs are required for methylation of the template chromosome. *Dev. Cell* **2004**, *7*, 653–662, doi:10.1016/J.DEVCEL.2004.10.003.
  129. Liu, P.P.; Montgomery, T.A.; Fahlgren, N.; Kasschau, K.D.; Nonogaki, H.; Carrington, J.C. Repression of *AUXIN RESPONSE FACTOR10* by microRNA160 is critical for seed germination and post-germination stages. *Plant J.* **2007**, *52*, 133–146, doi:10.1111/J.1365-313X.2007.03218.X.
  130. Liu, X.; Huang, J.; Wang, Y.; Khanna, K.; Xie, Z.; Owen, H.A.; Zhao, D. The role of floral organs in carpels, an *Arabidopsis* loss-of-function mutation in *MicroRNA160a*, in organogenesis and the mechanism regulating its expression. *Plant J.* **2010**, *62*, 416–428, doi:10.1111/J.1365-313X.2010.04164.X.
  131. Wu, M.F.; Tian, Q.; Reed, J.W. *Arabidopsis* microRNA167 controls patterns of *ARF6* and *ARF8* expression, and regulates both female and male reproduction. *Development* **2006**, *133*, 4211–4218, doi:10.1242/DEV.02602.
  132. Liu, N.; Wu, S.; Houten, J. Van; Wang, Y.; Ding, B.; Fei, Z.; Clarke, T.H.; Reed, J.W.; Van Der Knaap, E. Down-regulation of *AUXIN RESPONSE FACTORS 6* and *8* by microRNA 167 leads to floral development defects and female sterility in tomato. *J. Exp. Bot.* **2014**, *65*, 2507, doi:10.1093/JXB/ERU141.
  133. Lin, Y.; Lin, L.; Lai, R.; Liu, W.; Chen, Y.; Zhang, Z.; XuHan, X.; Lai, Z. MicroRNA390-directed *TAS3* cleavage leads to the production of tasiRNA-*ARF3/4* during somatic embryogenesis in *Dimocarpus longan* Lour. *Front. Plant Sci.* **2015**, *6*, 1119, doi:10.3389/FPLS.2015.01119/BIBTEX.
  134. Fahlgren, N.; Montgomery, T.A.; Howell, M.D.; Allen, E.; Dvorak, S.K.; Alexander, A.L.; Carrington, J.C. Regulation of *AUXIN RESPONSE FACTOR3* by *TAS3* ta-siRNA affects developmental timing and patterning in *Arabidopsis*. *Curr. Biol.* **2006**, *16*, 939–944, doi:10.1016/J.CUB.2006.03.065.

135. Xia, R.; Xu, J.; Meyers, B.C. The emergence, evolution, and diversification of the miR390-*TAS3-ARF* pathway in land plants. *Plant Cell* **2017**, *29*, 1232–1247, doi:10.1105/TPC.17.00185.
136. Glazińska, P.; Kulasek, M.; Glinkowski, W.; Wojciechowski, W.; Kosiński, J. Integrated analysis of small RNA, transcriptome and degradome sequencing provides new insights into floral development and abscission in yellow lupine (*Lupinus luteus* L.). **2019**, *20*.
137. Zhang, Y.; Zeng, Z.; Chen, C.; Li, C.; Xia, R.; Li, J. Genome-wide characterization of the auxin response factor (*ARF*) gene family of litchi (*Litchi chinensis* Sonn.): phylogenetic analysis, miRNA regulation and expression changes during fruit abscission. *PeerJ* **2019**, *7*, doi:10.7717/PEERJ.6677.
138. Wang, J.J.; Guo, H.S. Cleavage of *INDOLE-3-ACETIC ACID INDUCIBLE28* mRNA by MicroRNA847 upregulates auxin signaling to modulate cell proliferation and lateral organ growth in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **2015**, *27*, 574, doi:10.1105/TPC.15.00101.
139. Si-Ammour, A.; Windels, D.; Arn-Boulidoires, E.; Kutter, C.; Ailhas, J.; Meins, F.; Vazquez, F. miR393 and secondary siRNAs regulate expression of the TIR1/AFB2 Auxin Receptor clade and auxin-related development of *Arabidopsis* leaves. *Plant Physiol.* **2011**, *157*, 683–691, doi:10.1104/PP.111.180083.
140. Parry, G.; Calderon-Villalobos, L.I.; Prigge, M.; Peret, B.; Dharmasiri, S.; Itoh, H.; Lechner, E.; Gray, W.M.; Bennett, M.; Estelle, M. Complex regulation of the TIR1/AFB family of auxin receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2009**, *106*, 22540, doi:10.1073/PNAS.0911967106.
141. Navarro, L.; Dunoyer, P.; Jay, F.; Arnold, B.; Dharmasiri, N.; Estelle, M.; Voinnet, O.; Jones, J.D.G. A plant miRNA contributes to antibacterial resistance by repressing auxin signaling. *Science* **2006**, *312*, 436–439, doi:10.1126/SCIENCE.1126088.
142. Chen, H.; Li, Z.; Xiong, L. A plant microRNA regulates the adaptation of roots to drought stress. *FEBS Lett.* **2012**, *586*, 1742–1747, doi:10.1016/J.FEBSLET.2012.05.013.
143. Caruana, J.C.; Dhar, N.; Raina, R. Overexpression of *Arabidopsis* microRNA167 induces salicylic acid-dependent defense against *Pseudomonas syringae* through the regulation of its targets *ARF6* and *ARF8*. *Plant Direct* **2020**, *4*, doi:10.1002/PLD3.270.
144. Damodharan, S.; Zhao, D.; Arazi, T. A common miRNA160-based mechanism regulates ovary patterning, floral organ abscission and lamina outgrowth in tomato. *Plant J.* **2016**, *86*, 458–471, doi:10.1111/TPJ.13127.
145. Damodharan, S.; Corem, S.; Gupta, S.K.; Arazi, T. Tuning of *SIARF10A* dosage by sly-miR160a is critical for auxin-mediated compound leaf and flower development. *Plant J.* **2018**, *96*, 855–868, doi:10.1111/TPJ.14073.
146. Mallory, A.C.; Bartel, D.P.; Bartel, B. MicroRNA-directed regulation of *Arabidopsis* *AUXIN RESPONSE FACTOR17* is essential for proper development and modulates expression of early auxin response genes. *Plant Cell* **2005**, *17*, 1360–1375, doi:10.1105/TPC.105.031716.
147. Lin, J.S.; Kuo, C.C.; Yang, I.C.; Tsai, W.A.; Shen, Y.H.; Lin, C.C.; Liang, Y.C.; Li, Y.C.; Kuo, Y.W.; King, Y.C.; et al. MicroRNA160 modulates plant development and heat shock

- protein gene expression to mediate heat tolerance in *Arabidopsis*. *Front. Plant Sci.* **2018**, *9*, doi:10.3389/FPLS.2018.00068.
148. Allen, E.; Xie, Z.; Gustafson, A.M.; Carrington, J.C. microRNA-directed phasing during trans-acting siRNA biogenesis in plants. *Cell* **2005**, *121*, 207–221, doi:10.1016/J.CELL.2005.04.004.
  149. Axtell, M.J.; Jan, C.; Rajagopalan, R.; Bartel, D.P. A two-hit trigger for siRNA biogenesis in Plants. *Cell* **2006**, *127*, 565–577, doi:10.1016/J.CELL.2006.09.032.
  150. Marin, E.; Jouannet, V.; Herz, A.; Lokerse, A.S.; Weijers, D.; Vaucheret, H.; Nussaume, L.; Crespi, M.D.; Maizel, A. miR390, *Arabidopsis TAS3* tasiRNAs, and their *AUXIN RESPONSE FACTOR* targets define an autoregulatory network quantitatively regulating lateral root growth. *Plant Cell* **2010**, *22*, 1104, doi:10.1105/TPC.109.072553.
  151. Ellis, C.M.; Nagpal, P.; Young, J.C.; Hagen, G.; Guilfoyle, T.J.; Reed, J.W. *Auxin Response Factor1* and *AUXIN RESPONSE FACTOR2* regulate senescence and floral organ abscission in *Arabidopsis thaliana*. *Development* **2005**, *132*, 4563–4574, doi:10.1242/DEV.02012.
  152. Zhang, J.; Zhang, S.; Han, S.; Wu, T.; Li, X.; Li, W.; Qi, L. Genome-wide identification of microRNAs in larch and stage-specific modulation of 11 conserved microRNAs and their targets during somatic embryogenesis. *Planta* **2012**, *236*, 647–657, doi:10.1007/S00425-012-1643-9.
  153. Glazińska, P.; Kulasek, M.; Grzeca, M.; Wojciechowski, W.; Marciniak, K.; Wilmowicz, E.; Kopcewicz, J. Udział niskocząsteczkowych regulatorowych RNA (siRNA i miRNA) w regulacji szlaku transdukcji sygnału auksyn. *KOSMOS* **2016**, *65*, 399–410.
  154. Aslam, M.; Sugita, K.; Qin, Y.; Rahman, A. Aux/IAA14 regulates microRNA-mediated Cold stress response in *Arabidopsis* roots. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, 1–25, doi:10.3390/IJMS21228441.
  155. Kulasek, M.; Glazińska, P.; Kęsy, J. miRNA narzędziem do optymalizacji plonowania roślin uprawnych. *KOSMOS* **2019**, *68*, 167–183.
  156. Goetz, M.; Hooper, L.C.; Johnson, S.D.; Rodrigues, J.C.M.; Vivian-Smith, A.; Koltunow, A.M. Expression of aberrant forms of *AUXIN RESPONSE FACTOR8* stimulates parthenocarpy in *Arabidopsis* and tomato. *Plant Physiol.* **2007**, *145*, 351–366, doi:10.1104/PP.107.104174.
  157. Paul, M. Trehalose 6-phosphate. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2007**, *10*, 303–309, doi:10.1016/J.PBI.2007.04.001.
  158. Eveland, A.L.; Jackson, D.P. Sugars, signalling, and plant development. *J. Exp. Bot.* **2012**, *63*, 3367–3377, doi:10.1093/JXB/ERR379.
  159. Zhang, Y.; Primavesi, L.F.; Jhurreea, D.; Andralojc, P.J.; Mitchell, R.A.C.; Powers, S.J.; Schluempmann, H.; Delatte, T.; Wingler, A.; Paul, M.J. Inhibition of SNF1-Related Protein Kinase1 activity and regulation of metabolic pathways by trehalose-6-phosphate. *Plant Physiol.* **2009**, *149*, 1860–1871, doi:10.1104/PP.108.133934.
  160. Polge, C.; Thomas, M. SNF1/AMPK/SnRK1 kinases, global regulators at the heart of energy control? *Trends Plant Sci.* **2007**, *12*, 20–28, doi:10.1016/J.TPLANTS.2006.11.005.

161. Delatte, T.L.; Sedijani, P.; Kondou, Y.; Matsui, M.; de Jong, G.J.; Somsen, G.W.; Wiese-Klinkenberg, A.; Primavesi, L.F.; Paul, M.J.; Schluepmann, H. Growth arrest by trehalose-6-phosphate: an astonishing case of primary metabolite control over growth by way of the SnRK1 signaling pathway. *Plant Physiol.* **2011**, *157*, 160–174, doi:10.1104/PP.111.180422.
162. Schluepmann, H.; Pellny, T.; Van Dijken, A.; Smeekens, S.; Paul, M. Trehalose 6-phosphate is indispensable for carbohydrate utilization and growth in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2003**, *100*, 6849–6854, doi:10.1073/PNAS.1132018100.
163. Acevedo-Hernández, G.J.; León, P.; Herrera-Estrella, L.R. Sugar and ABA responsiveness of a minimal RBCS light-responsive unit is mediated by direct binding of ABI4. *Plant J.* **2005**, *43*, 506–519, doi:10.1111/J.1365-313X.2005.02468.X.
164. Kolbe, A.; Tiessen, A.; Schluepmann, H.; Paul, M.; Ulrich, S.; Geigenberger, P. Trehalose 6-phosphate regulates starch synthesis *via* posttranslational redox activation of ADP-glucose pyrophosphorylase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2005**, *102*, 11118–11123, doi:10.1073/PNAS.0503410102.
165. Gómez, L.D.; Baud, S.; Gilday, A.; Li, Y.; Graham, I.A. Delayed embryo development in the *Arabidopsis* *TREHALOSE-6-PHOSPHATE SYNTHASE 1* mutant is associated with altered cell wall structure, decreased cell division and starch accumulation. *Plant J.* **2006**, *46*, 69–84, doi:10.1111/J.1365-313X.2006.02662.X.
166. Van Dijken, A.J.H.; Schluepmann, H.; Smeekens, S.C.M. *Arabidopsis* trehalose-6-phosphate synthase 1 is essential for normal vegetative growth and transition to flowering. *Plant Physiol.* **2004**, *135*, 969–977, doi:10.1104/PP.104.039743.
167. Gómez, L.D.; Gilday, A.; Feil, R.; Lunn, J.E.; Graham, I.A. AtTPS1-mediated trehalose 6-phosphate synthesis is essential for embryogenic and vegetative growth and responsiveness to ABA in germinating seeds and stomatal guard cells. *Plant J.* **2010**, *64*, 1–13, doi:10.1111/J.1365-313X.2010.04312.X.
168. Paul, M.J.; Jhurrea, D.; Zhang, Y.; Primavesi, L.F.; Delatte, T.; Schluepmann, H.; Wingler, A. Upregulation of biosynthetic processes associated with growth by trehalose 6-phosphate. *Plant Signal. Behav.* **2010**, *5*, 386, doi:10.4161/PSB.5.4.10792.
169. Farrás, R.; Ferrando, A.; Jásik, J.; Kleinow, T.; Ökrész, L.; Tiburcio, A.; Salchert, K.; Del Pozo, C.; Schell, J.; Koncz, C. SKP1–SnRK protein kinase interactions mediate proteasomal binding of a plant SCF ubiquitin ligase. *EMBO J.* **2001**, *20*, 2742, doi:10.1093/EMBOJ/20.11.2742.
170. Müller, J.; Boller, T.; Wiemken, A. Trehalose and trehalase in plants: recent developments. *Plant Sci.* **1995**, *112*, 1–9, doi:10.1016/0168-9452(95)04218-J.
171. Müller, J.; Aeschbacher, R.A.; Wingler, A.; Boller, T.; Wiemken, A. Trehalose and trehalase in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **2001**, *125*, 1086, doi:10.1104/PP.125.2.1086.
172. López, M.; Tejera, N.A.; Iribarne, C.; Lluch, C.; Herrera-Cervera, J.A. Trehalose and trehalase in root nodules of *Medicago truncatula* and *Phaseolus vulgaris* in response to salt stress. *Physiol. Plant.* **2008**, *134*, 575–582, doi:10.1111/J.1399-3054.2008.01162.X.

173. Poznańska Hodowla Roślin Sp. z oo Informacja na temat łubinu żółtego odmiany Taper. Dostęp online: <http://phr.pl/wp-content/uploads/2017/07/Taper.pdf> (dostęp 15.04.2022).
174. Glazinska, P.; Kulasek, M.; Glinkowski, W.; Wysocka, M.; Kosiński, J.G. 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.* **2020**, *11*, 455.
175. Walker, J.; Hertel, K.; Parker, P.; Edwards, J. *Lupin growth and development*; Edwards, J., Walker, J., McIntosh, G., Eds.; Industry & Investment NSW: New South Wales, Australia, 2011; ISBN 978 1 74256 059 5.
176. Pasternak, T.; Tietz, O.; Rapp, K.; Begheldo, M.; Nitschke, R.; Ruperti, B.; Palme, K. Protocol: an improved and universal procedure for whole-mount immunolocalization in plants. **2015**, *11*, 1–10.
177. Dai, X.; Zhuang, Z.; Zhao, P.X. psRNATarget: a plant small RNA target analysis server (2017 release). *Nucleic Acids Res.* **2018**, *46*, W49–W54, doi:10.1093/NAR/GKY316.
178. Tamura, K.; Stecher, G.; Kumar, S. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Mol. Biol. Evol.* **2021**, *38*, 3022–3027, doi:10.1093/MOLBEV/MSAB120.
179. Theologis, A.; Ecker, J.R.; Palm, C.J.; Federspiel, N.A.; Kaul, S.; White, O.; Alonso, J.; Altafi, H.; Araujo, R.; Bowman, C.L.; et al. Sequence and analysis of chromosome 1 of the plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **2000**, *408*, 816–820, doi:10.1038/35048500.
180. Lin, X.; Kaul, S.; Rounsley, S.; Shea, T.P.; Benito, M.I.; Town, C.D.; Fujii, C.Y.; Mason, T.; Bowman, C.L.; Barnstead, M.; et al. Sequence and analysis of chromosome 2 of the plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **1999**, *402*, 761–765, doi:10.1038/45471.
181. Salanoubat, M.; Lemcke, K.; Rieger, M.; Ansorge, W.; Unseld, M.; Fartmann, B.; Valle, G.; Blöcker, H.; Perez-Alonso, M.; Obermaier, B.; et al. Sequence and analysis of chromosome 3 of the plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **2000**, *408*, 820–822, doi:10.1038/35048706.
182. Correction Mayer, K.; Schüller, C.; Wambutt, R.; Murphy, G.; Volckaert, G.; Pohl, T.; Düsterhöft, A.; Stiekema, W.; Entian, K.D.; Terry, N.; et al. Sequence and analysis of chromosome 4 of the plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **1999**, *402*, 769–777, doi:10.1038/47134.
183. Tabata, S.; Kaneko, T.; Nakamura, Y.; Kotani, H.; Kato, T.; Asamizu, E.; Miyajima, N.; Sasamoto, S.; Kimura, T.; Hosouchi, T.; et al. Sequence and analysis of chromosome 5 of the plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **2000**, *408*, 823–826, doi:10.1038/35048507.
184. Kamphuis, L.G.; Hane, J.K.; Nelson, M.N.; Gao, L.; Atkins, C.A.; Singh, K.B. Transcriptome sequencing of different narrow-leafed lupin tissue types provides a comprehensive uni-gene assembly and extensive gene-based molecular markers. *Plant Biotechnol. J.* **2015**, *13*, 14–25, doi:10.1111/PBI.12229.
185. Schmutz, J.; Cannon, S.B.; Schlueter, J.; Ma, J.; Mitros, T.; Nelson, W.; Hyten, D.L.; Song, Q.; Thelen, J.J.; Cheng, J.; et al. Genome sequence of the palaeopolyploid soybean. *Nature* **2010**, *463*, 178–183, doi:10.1038/NATURE08670.



186. Dutta, S.; Kumawat, G.; Singh, B.P.; Gupta, D.K.; Singh, S.; Dogra, V.; Gaikwad, K.; Sharma, T.R.; Raje, R.S.; Bandhopadhyaya, T.K.; et al. Development of genic-SSR markers by deep transcriptome sequencing in pigeonpea [*Cajanus cajan* (L.) Millspaugh]. *BMC Plant Biol.* **2011**, *11*, doi:10.1186/1471-2229-11-17.
187. Pecrix, Y.; Staton, S.E.; Sallet, E.; Lelandais-Brière, C.; Moreau, S.; Carrère, S.; Blein, T.; Jardinaud, M.F.; Latrasse, D.; Zouine, M.; et al. Whole-genome landscape of *Medicago truncatula* symbiotic genes. *Nat. plants* **2018**, *4*, 1017–1025, doi:10.1038/S41477-018-0286-7.
188. Yang, K.; Tian, Z.; Chen, C.; Luo, L.; Zhao, B.; Wang, Z.; Yu, L.; Li, Y.; Sun, Y.; Li, W.; et al. Genome sequencing of adzuki bean (*Vigna angularis*) provides insight into high starch and low fat accumulation and domestication. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2015**, *112*, 13213–13218, doi:10.1073/PNAS.1420949112.
189. Letunic, I.; Bork, P. Interactive Tree Of Life (iTOL) v5: an online tool for phylogenetic tree display and annotation. *Nucleic Acids Res.* **2021**, *49*, W293–W296, doi:10.1093/NAR/GKAB301.
190. Burley, S.K.; Bhikadiya, C.; Bi, C.; Bittrich, S.; Chen, L.; Crichlow, G. V.; Christie, C.H.; Dalenberg, K.; Di Costanzo, L.; Duarte, J.M.; et al. RCSB Protein Data Bank: powerful new tools for exploring 3D structures of biological macromolecules for basic and applied research and education in fundamental biology, biomedicine, biotechnology, bioengineering and energy sciences. *Nucleic Acids Res.* **2021**, *49*, D437–D451, doi:10.1093/NAR/GKAA1038.
191. Tan, X.; Calderon-Villalobos, L.I.A.; Sharon, M.; Zheng, C.; Robinson, C. V.; Estelle, M.; Zheng, N. Mechanism of auxin perception by the TIR1 ubiquitin ligase. *Nature* **2007**, *446*, 640–645, doi:10.1038/NATURE05731.
192. Rose, A.S.; Bradley, A.R.; Valasatava, Y.; Duarte, J.M.; Prlic, A.; Rose, P.W. NGL viewer: web-based molecular graphics for large complexes. *Bioinformatics* **2018**, *34*, 3755–3758, doi:10.1093/BIOINFORMATICS/BTY419.
193. Yang, J.; Yan, R.; Roy, A.; Xu, D.; Poisson, J.; Zhang, Y. The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction. *Nat. Methods* **2015**, *12*, 7–8, doi:10.1038/NMETH.3213.
194. PubChem Compound Summary for CID 802, Indole-3-acetic acid. Dostęp online: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Indole-3-acetic-acid> (dostęp 30.01.2022).
195. Addo-Quaye, C.; Miller, W.; Axtell, M.J. CleaveLand: a pipeline for using degradome data to find cleaved small RNA targets. *Bioinformatics* **2009**, *25*, 130–131, doi:10.1093/BIOINFORMATICS/BTN604.
196. Kramer, M.F. Stem-loop RT-qPCR for miRNAs. *Curr. Protoc. Mol. Biol.* **2011**, *Chapter 15*, doi:10.1002/0471142727.MB1510S95.
197. Varkonyi-Gasic, E.; Wu, R.; Wood, M.; Walton, E.F.; Hellens, R.P. Protocol: A highly sensitive RT-PCR method for detection and quantification of microRNAs. *Plant Methods* **2007**, *3*, 1–12, doi:10.1186/1746-4811-3-12.

198. Abrahám, E.; Hourton-Cabassa, C.; Erdei, L.; Szabados, L. Methods for determination of proline in plants. *Methods Mol. Biol.* **2010**, *639*, 317–331, doi:10.1007/978-1-60761-702-0\_20.
199. Kulasek, M.; Bernacki, M.J.; Ciszak, K.; Witoń, D.; Karpiński, S. Contribution of PsbS function and stomatal conductance to foliar temperature in higher plants. *Plant Cell Physiol.* **2016**, *57*, 1495–1509, doi:10.1093/PCP/PCW083.
200. Guilfoyle, T.J.; Hagen, G. Getting a grasp on domain III/IV responsible for Auxin Response Factor-IAA protein interactions. *Plant Sci.* **2012**, *190*, 82–88, doi:10.1016/J.PLANTSCI.2012.04.003.
201. Sundberg, E.; Østergaard, L. Distinct and dynamic auxin activities during reproductive development. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2009**, *1*, doi:10.1101/CSHPERSPECT.A001628.
202. Gao, Y.; Liu, H.; Pei, D. Morphological characteristics and *in situ* auxin production during the histogenesis of staminate flowers in precocious walnut. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* **2014**, *139*, 185–190, doi:10.21273/JASHS.139.2.185.
203. Gao, Y.; Liu, H.; Dong, N.; Pei, D. Temporal and spatial pattern of indole-3-acetic acid occurrence during walnut pistillate flower bud differentiation as revealed by immunohistochemistry. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* **2012**, *137*, 283–289, doi:10.21273/JASHS.137.5.283.
204. Chen, D.; Ren, Y.; Deng, Y.; Zhao, J. Auxin polar transport is essential for the development of zygote and embryo in *Nicotiana tabacum* L. and correlated with ABP1 and PM H<sup>+</sup>-ATPase activities. *J. Exp. Bot.* **2010**, *61*, 1853–1867, doi:10.1093/JXB/ERQ056.
205. Márquez-López, R.E.; Pérez-Hernández, C.; Ku-González, Á.; Galaz-Ávalos, R.M.; Loyola-Vargas, V.M. Localization and transport of indole-3-acetic acid during somatic embryogenesis in *Coffea canephora*. *Protoplasma* **2018**, *255*, 695–708, doi:10.1007/S00709-017-1181-1.
206. Pérez-Pérez, Y.; El-Tantawy, A.A.; Solís, M.T.; Risueño, M.C.; Testillano, P.S. Stress-induced microspore embryogenesis requires endogenous auxin synthesis and polar transport in barley. *Front. Plant Sci.* **2019**, *10*, 1200, doi:10.3389/FPLS.2019.01200/BIBTEX.
207. Kućko, A.; Wilmowicz, E.; Pokora, W.; De Dios Alché, J. Disruption of the auxin gradient in the abscission zone area evokes asymmetrical changes leading to flower separation in yellow lupine. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, doi:10.3390/IJMS21113815.
208. Huang, Z.; Bao, K.; Jing, Z.; Wang, Q.; Duan, H.; Zhu, Y.; Zhang, S.; Wu, Q. Small Auxin Up RNAs influence the distribution of indole-3-acetic acid and play a potential role in increasing seed size in *Euryale ferox* Salisb. *BMC Plant Biol.* **2020**, *20*, doi:10.1186/S12870-020-02504-2.
209. Cecchetti, V.; Altamura, M.M.; Falasca, G.; Costantino, P.; Cardarelli, M. Auxin regulates arabidopsis anther dehiscence, pollen maturation, and filament elongation. *Plant Cell* **2008**, *20*, 1760, doi:10.1105/TPC.107.057570.

210. Larsson, E.; Vivian-Smith, A.; Offringa, R.; Sundberg, E. Auxin homeostasis in *Arabidopsis* ovules is anther-dependent at maturation and changes dynamically upon fertilization. *Front. Plant Sci.* **2017**, *8*, 1735, doi:10.3389/FPLS.2017.01735/BIBTEX.
211. Zhang, M.; Zheng, X.; Song, S.; Zeng, Q.; Hou, L.; Li, D.; Zhao, J.; Wei, Y.; Li, X.; Luo, M.; et al. Spatiotemporal manipulation of auxin biosynthesis in cotton ovule epidermal cells enhances fiber yield and quality. *Nat. Biotechnol.* **2011**, *29*, 453–458, doi:10.1038/nbt.1843.
212. Feng, X.L.; Ni, W.M.; Elge, S.; Mueller-Roeber, B.; Xu, Z.H.; Xue, H.W. Auxin flow in anther filaments is critical for pollen grain development through regulating pollen mitosis. *Plant Mol. Biol.* **2006**, *61*, 215–226, doi:10.1007/S11103-006-0005-Z.
213. Papini, A.; Mosti, S.; Brighigna, L. Programmed-cell-death events during tapetum development of angiosperms. *Protoplasma* **1999**, *207*, 213–221, doi:10.1007/BF01283002.
214. Amanda, D.; Frey, F.P.; Neumann, U.; Przybyl, M.; Šimura, J.; Zhang, Y.; Chen, Z.; Gallavotti, A.; Fernie, A.R.; Ljung, K.; et al. Auxin boosts energy generation pathways to fuel pollen maturation in barley. *Curr. Biol.* **2022**, *32*, 1798–1811.e8, doi:10.1016/J.CUB.2022.02.073.
215. Uzunova, V. V.; Quareshy, M.; Del Genio, C.I.; Napier, R.M. Tomographic docking suggests the mechanism of auxin receptor TIR1 selectivity. *Open Biol.* **2016**, *6*, doi:10.1098/RSOB.160139.
216. Ramos, J.A.; Zenser, N.; Leyser, O.; Callis, J. Rapid degradation of Auxin/Indoleacetic Acid proteins requires conserved amino acids of domain II and is proteasome dependent. *Plant Cell* **2001**, *13*, 2349, doi:10.1105/TPC.010244.
217. Moss, B.L.; Mao, H.; Guseman, J.M.; Hinds, T.R.; Hellmuth, A.; Kovenock, M.; Noorassa, A.; Lanctot, A.; Calderón Villalobos, L.I.A.; Zheng, N.; et al. Rate motifs tune Auxin/Indole-3-Acetic Acid degradation dynamics. *Plant Physiol.* **2015**, *169*, 803, doi:10.1104/PP.15.00587.
218. Tiwari, S.B.; Hagen, G.; Guilfoyle, T.J. Aux/IAA Proteins contain a potent transcriptional repression domain. *Plant Cell* **2004**, *16*, 533, doi:10.1105/TPC.017384.
219. Korasick, D.A.; Westfall, C.S.; Lee, S.G.; Nanao, M.H.; Dumas, R.; Hagen, G.; Guilfoyle, T.J.; Jez, J.M.; Strader, L.C. Molecular basis for AUXIN RESPONSE FACTOR protein interaction and the control of auxin response repression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2014**, *111*, 5427–5432, doi:10.1073/PNAS.1400074111.
220. Han, M.; Park, Y.; Kim, I.; Kim, E.H.; Yu, T.K.; Rhee, S.; Suh, J.Y. Structural basis for the auxin-induced transcriptional regulation by Aux/IAA17. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2014**, *111*, 18613–18618, doi:10.1073/PNAS.1419525112.
221. Ke, J.; Ma, H.; Gu, X.; Thelen, A.; Brunzelle, J.S.; Li, J.; Xu, H.E.; Melcher, K. Structural basis for recognition of diverse transcriptional repressors by the TOPLESS family of corepressors. *Sci. Adv.* **2015**, *1*, doi:10.1126/SCIADV.1500107.
222. Ulmasov, T.; Liu, Z.-B.; Hagen, G.; Guilfoyle, T.J. Composite structure of auxin response elements. *Plant Cell* **1995**, *7*, 1611–1623, doi:10.1105/TPC.7.10.1611.

223. Ulmasov, T.; Hagen, G.; Guilfoyle, T.J. Dimerization and DNA binding of auxin response factors. *Plant J.* **1999**, *19*, 309–319, doi:10.1046/j.1365-313X.1999.00538.x.
224. Mironova, V. V.; Omelyanchuk, N.A.; Wiebe, D.S.; Levitsky, V.G. Computational analysis of auxin responsive elements in the *Arabidopsis thaliana* L. genome. *BMC Genomics* **2014**, *15*.
225. Liu, J.; Hua, W.; Hu, Z.; Yang, H.; Zhang, L.; Li, R.; Deng, L.; Sun, X.; Wang, X.; Wang, H. Natural variation in *ARF18* gene simultaneously affects seed weight and silique length in polyploid rapeseed. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2015**, *112*, E5123–E5132, doi:10.1073/PNAS.1502160112.
226. O'Malley, R.C.; Huang, S.S.C.; Song, L.; Lewsey, M.G.; Bartlett, A.; Nery, J.R.; Galli, M.; Gallavotti, A.; Ecker, J.R. Cistrome and epicistrome features shape the regulatory DNA landscape. *Cell* **2016**, *165*, 1280–1292.
227. Franco-Zorrilla, J.M.; López-Vidriero, I.; Carrasco, J.L.; Godoy, M.; Vera, P.; Solano, R. DNA-binding specificities of plant transcription factors and their potential to define target genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2014**, *111*, 2367–2372, doi:10.1073/PNAS.1316278111.
228. Zemlyanskaya, E. V.; Wiebe, D.S.; Omelyanchuk, N.A.; Levitsky, V.G.; Mironova, V. V. Meta-analysis of transcriptome data identified TGTCNN motif variants associated with the response to plant hormone auxin in *Arabidopsis thaliana* L. *J. Bioinform. Comput. Biol.* **2016**, *14*, doi:10.1142/S0219720016410092.
229. Bargmann, B.O.R.; Vanneste, S.; Krouk, G.; Nawy, T.; Efroni, I.; Shani, E.; Choe, G.; Friml, J.; Bergmann, D.C.; Estelle, M.; et al. A map of cell type-specific auxin responses. *Mol. Syst. Biol.* **2013**, *9*, 688, doi:10.1038/MSB.2013.40.
230. Kuhn, A.; Harborough, S.R.; McLaughlin, H.M.; Natarajan, B.; Verstraeten, I.; Friml, J.; Kepinski, S.; Østergaard, L. Direct ETTIN-auxin interaction controls chromatin states in gynoecium development. *Elife* **2020**, *9*, doi:10.7554/ELIFE.51787.
231. Mutte, S.K.; Kato, H.; Rothfels, C.; Melkonian, M.; Wong, G.K.S.; Weijers, D. Origin and evolution of the nuclear auxin response system. *Elife* **2018**, *7*, doi:10.7554/ELIFE.33399.
232. Long, J.A.; Ohno, C.; Smith, Z.R.; Meyerowitz, E.M. TOPLESS regulates apical embryonic fate in *Arabidopsis*. **2006**, *312*, 1520–1523.
233. Martin-Arevalillo, R.; Nanao, M.H.; Larrieu, A.; Vinos-Poyo, T.; Mast, D.; Galvan-Ampudia, C.; Brunoud, G.; Vernoux, T.; Dumas, R.; Parcy, F. Structure of the *Arabidopsis* TOPLESS corepressor provides insight into the evolution of transcriptional repression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2017**, *114*, 8107–8112, doi:10.1073/PNAS.1703054114.
234. Rinaldi, M.A.; Liu, J.; Enders, T.A.; Bartel, B.; Strader, L.C. A gain-of-function mutation in *IAA16* confers reduced responses to auxin and abscisic acid and impedes plant growth and fertility. *Plant Mol. Biol.* **2012**, *79*, 359, doi:10.1007/S11103-012-9917-Y.
235. Ke, M.; Gao, Z.; Chen, J.; Qiu, Y.; Zhang, L.; Chen, X. Auxin controls circadian flower opening and closure in the waterlily. *BMC Plant Biol.* **2018**, *18*, doi:10.1186/S12870-018-1357-7.

236. Jia, Y.; Chen, C.; Gong, F.; Jin, W.; Zhang, H.; Qu, S.; Ma, N.; Jiang, Y.; Gao, J.; Sun, X. An Aux/IAA family member, RhIAA14, involved in ethylene-inhibited petal expansion in rose (*Rosa hybrida*). *Genes* **2022**, *Vol. 13*, Page 1041 **2022**, *13*, 1041, doi:10.3390/GENES13061041.
237. Jones, M.L. Ethylene responsiveness in carnation styles is associated with stigma receptivity. *Sex. Plant Reprod.* **2002**, *15*, 107–112, doi:10.1007/S00497-002-0146-4.
238. Liu, Z.; Miao, L.; Huo, R.; Song, X.; Johnson, C.; Kong, L.; Sundaresan, V.; Yu, X. ARF2–ARF4 and ARF5 are essential for female and male gametophyte development in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol.* **2018**, *59*, 179–189, doi:10.1093/PCP/PCX174.
239. Nagpal, P.; Ellis, C.M.; Weber, H.; Ploense, S.E.; Barkawi, L.S.; Guilfoyle, T.J.; Hagen, G.; Alonso, J.M.; Cohen, J.D.; Farmer, E.E.; et al. Auxin response factors ARF6 and ARF8 promote jasmonic acid production and flower maturation. *Development* **2005**, *132*, 4107–4118, doi:10.1242/DEV.01955.
240. Rubio-Somoza, I.; Weigel, D. Coordination of flower maturation by a regulatory circuit of three MicroRNAs. *PLOS Genet.* **2013**, *9*, e1003374, doi:10.1371/JOURNAL.PGEN.1003374.
241. Zheng, L.; Nagpal, P.; Villarino, G.; Trinidad, B.; Bird, L.; Huang, Y.; Reed, J.W. miR167 limits anther growth to potentiate anther dehiscence. *Development* **2019**, *146*, doi:10.1242/DEV.174375.
242. De Jong, M.; Wolters-Arts, M.; Schimmel, B.C.J.; Stultiens, C.L.M.; De Groot, P.F.M.; Powers, S.J.; Tikunov, Y.M.; Bovy, A.G.; Mariani, C.; Vriezen, W.H.; et al. *Solanum lycopersicum* AUXIN RESPONSE FACTOR 9 regulates cell division activity during early tomato fruit development. *J. Exp. Bot.* **2015**, *66*, 3405–3416, doi:10.1093/JXB/ERV152.
243. Alves, A.; Confraria, A.; Lopes, S.; Costa, B.; Perdiguero, P.; Milhinhos, A.; Baena-González, E.; Correia, S.; Miguel, C.M. miR160 interacts *in vivo* with *Pinus pinaster* AUXIN RESPONSE FACTOR 18 target site and negatively regulates its expression during conifer somatic embryo development. *Front. Plant Sci.* **2022**, *13*, 646, doi:10.3389/FPLS.2022.857611/BIBTEX.
244. Huang, J.; Li, Z.; Zhao, D. Deregulation of the OsmiR160 Target Gene *OsARF18* causes growth and developmental defects with an alteration of auxin signaling in rice. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, doi:10.1038/SREP29938.
245. Stamm, P.; Kumar, P.P. Auxin and gibberellin responsive *Arabidopsis* SMALL AUXIN UP RNA36 regulates hypocotyl elongation in the light. *Plant Cell Reports* **2013**, *32*, 759–769, doi:10.1007/S00299-013-1406-5.
246. Kodaira, K.S.; Qin, F.; Tran, L.S.P.; Maruyama, K.; Kidokoro, S.; Fujita, Y.; Shinozaki, K.; Yamaguchi-Shinozaki, K. *Arabidopsis* Cys2/His2 zinc-finger proteins AZF1 and AZF2 negatively regulate abscisic acid-repressive and auxin-inducible genes under abiotic stress conditions. *Plant Physiol.* **2011**, *157*, 742–756, doi:10.1104/PP.111.182683.
247. Oh, E.; Zhu, J.Y.; Bai, M.Y.; Arenhart, R.A.; Sun, Y.; Wang, Z.Y. Cell elongation is regulated through a central circuit of interacting transcription factors in the *Arabidopsis*

- hypocotyl. *Elife* **2014**, *3*, 3031, doi:10.7554/ELIFE.03031.
248. Li, Z.G.; Chen, H.W.; Li, Q.T.; Tao, J.J.; Bian, X.H.; Ma, B.; Zhang, W.K.; Chen, S.Y.; Zhang, J.S. Three SAUR proteins SAUR76, SAUR77 and SAUR78 promote plant growth in *Arabidopsis*. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, doi:10.1038/SREP12477.
  249. Favero, D.S.; Le, K.N.; Neff, M.M. Brassinosteroid signaling converges with SUPPRESSOR OF PHYTOCHROME B4-#3 to influence the expression of *SMALL AUXIN UP RNA* genes and hypocotyl growth. *Plant J.* **2017**, *89*, 1133–1145, doi:10.1111/TPJ.13451.
  250. Sun, N.; Wang, J.; Gao, Z.; Dong, J.; He, H.; Terzaghi, W.; Wei, N.; Wang, X.; Chen, H. *Arabidopsis* SAURs are critical for differential light regulation of the development of various organs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2016**, *113*, 6071–6076, doi:10.1073/PNAS.1604782113.
  251. Choudhary, N.L.; Sairam, R.K.; Tyagi, A. Expression of delta1-pyrroline-5-carboxylate synthetase gene during drought in rice (*Oryza sativa* L.). *Indian J. Biochem. Biophys.* **2005**, *42*, 366–370.
  252. Furlan, A.L.; Bianucci, E.; Giordano, W.; Castro, S.; Becker, D.F. Proline metabolic dynamics and implications in drought tolerance of peanut plants. *Plant Physiol. Biochem.* **2020**, *151*, 566–578, doi:10.1016/J.PLAPHY.2020.04.010.
  253. Yancey, P.H. Organic osmolytes as compatible, metabolic and counteracting cytoprotectants in high osmolarity and other stresses. *J. Exp. Biol.* **2005**, *208*, 2819–2830, doi:10.1242/JEB.01730.
  254. Arteaga, S.; Yabor, L.; Díez, M.J.; Prohens, J.; Boscaiu, M.; Vicente, O. The use of proline in screening for tolerance to drought and salinity in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Genotypes. *Agron.* **2020**, *Vol. 10*, Page 817 **2020**, *10*, 817, doi:10.3390/AGRONOMY10060817.
  255. Mattioli, R.; Biancucci, M.; Shall, A.; Mosca, L.; Costantino, P.; Funck, D.; Trovato, M. Proline synthesis in developing microspores is required for pollen development and fertility. *BMC Plant Biol.* **2018**, *18*, doi:10.1186/S12870-018-1571-3.
  256. Rotsch, A.H.; Kopka, J.; Feussner, I.; Ischebeck, T. Central metabolite and sterol profiling divides tobacco male gametophyte development and pollen tube growth into eight metabolic phases. *Plant J.* **2017**, *92*, 129–146, doi:10.1111/TPJ.13633.
  257. Jones, H.G. Application of Thermal Imaging and Infrared Sensing in Plant Physiology and Ecophysiology. *Adv. Bot. Res.* **2004**, *41*, 107–163, doi:10.1016/S0065-2296(04)41003-9.
  258. Bourdenx, B.; Bernard, A.; Domergue, F.; Pascal, S.; Léger, A.; Roby, D.; Pervent, M.; Vile, D.; Haslam, R.P.; Napier, J.A.; et al. Overexpression of *Arabidopsis ECERIFERUM1* promotes wax very-long-chain alkane biosynthesis and influences plant response to biotic and abiotic stresses. *Plant Physiol.* **2011**, *156*, 29–45, doi:10.1104/PP.111.172320.
  259. Pascal, S.; Bernard, A.; Deslous, P.; Gronnier, J.; Fournier-Goss, A.; Domergue, F.; Rowland, O.; Joubès, J. *Arabidopsis* CER1-LIKE1 functions in a cuticular very-long-chain alkane-forming complex. *Plant Physiol.* **2019**, *179*, 415, doi:10.1104/PP.18.01075.

260. Zhao, Q.; Nakashima, J.; Chen, F.; Yin, Y.; Fu, C.; Yun, J.; Shao, H.; Wang, X.; Wang, Z.Y.; Dixon, R.A. Laccase is necessary and nonredundant with peroxidase for lignin polymerization during vascular development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **2013**, *25*, 3976–3987, doi:10.1105/TPC.113.117770.
261. Niu, Z.; Li, G.; Hu, H.; Lv, J.; Zheng, Q.; Liu, J.; Wan, D. A gene that underwent adaptive evolution, *LAC2 (LACCASE)*, in *Populus euphratica* improves drought tolerance by improving water transport capacity. *Hortic. Res.* **2021**, *8*, 1–17, doi:10.1038/s41438-021-00518-x.
262. Merelo, P.; Agustí, J.; Arbona, V.; Costa, M.L.; Estornell, L.H.; Gómez-Cadenas, A.; Coimbra, S.; Gómez, M.D.; Pérez-Amador, M.A.; Domingo, C.; et al. Cell wall remodeling in abscission zone cells during ethylene-promoted fruit abscission in citrus. *Front. Plant Sci.* **2017**, *8*, 126, doi:10.3389/FPLS.2017.00126/BIBTEX.
263. Li, W.X.; Oono, Y.; Zhu, J.; He, X.J.; Wu, J.M.; Iida, K.; Lu, X.Y.; Cui, X.; Jin, H.; Zhu, J.K. The *Arabidopsis* NFYA5 transcription factor is regulated transcriptionally and posttranscriptionally to promote drought resistance. *Plant Cell* **2008**, *20*, 2238, doi:10.1105/TPC.108.059444.
264. Akbudak, M.A.; Filiz, E. Genome-wide investigation of proline transporter (*ProT*) gene family in tomato: Bioinformatics and expression analyses in response to drought stress. *Plant Physiol. Biochem.* **2020**, *157*, 13–22, doi:10.1016/J.PLAPHY.2020.10.004.
265. Li, B.; Zheng, J.C.; Wang, T.T.; Min, D.H.; Wei, W.L.; Chen, J.; Zhou, Y. Bin; Chen, M.; Xu, Z.S.; Ma, Y.Z. Expression analyses of soybean *VOZ* transcription factors and the role of *GmVOZ1G* in drought and salt stress tolerance. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *Vol. 21*, Page 2177 **2020**, *21*, 2177, doi:10.3390/IJMS21062177.
266. Chong, L.; Xu, R.; Huang, P.; Guo, P.; Zhu, M.; Du, H.; Sun, X.; Ku, L.; Zhu, J.K.; Zhu, Y. The tomato *OST1–VOZ1* module regulates drought-mediated flowering. *Plant Cell* **2022**, *34*, 2001–2018, doi:10.1093/PLCELL/KOAC026.
267. Liu, H.H.; Tian, X.; Li, Y.J.; Wu, C.A.; Zheng, C.C. Microarray-based analysis of stress-regulated microRNAs in *Arabidopsis thaliana*. *RNA* **2008**, *14*, 836–843, doi:10.1261/RNA.895308.
268. Sunkar, R.; Zhu, J.K. Novel and stress-regulated microRNAs and other small RNAs from *Arabidopsis*. *Plant Cell* **2004**, *16*, 2001–2019, doi:10.1105/TPC.104.022830.
269. Xia, K.; Wang, R.; Ou, X.; Fang, Z.; Tian, C.; Duan, J.; Wang, Y.; Zhang, M. *OstIR1* and *OsAFB2* downregulation via *OsmiR393* overexpression leads to more tillers, early flowering and less tolerance to salt and drought in rice. *PLoS One* **2012**, *7*, e30039, doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0030039.
270. Yuan, W.; Suo, J.; Shi, B.; Zhou, C.; Bai, B.; Bian, H.; Zhu, M.; Han, N. The barley miR393 has multiple roles in regulation of seedling growth, stomatal density, and drought stress tolerance. *Plant Physiol. Biochem.* **2019**, *142*, 303–311, doi:10.1016/J.PLAPHY.2019.07.021.
271. He, Y.; Liu, Y.; Li, M.; Lamin-Samu, A.T.; Yang, D.; Yu, X.; Izhar, M.; Jan, I.; Ali, M.; Lu, G. The *Arabidopsis* SMALL AUXIN UP RNA32 protein regulates ABA-mediated responses to

- drought stress. *Front. Plant Sci.* **2021**, *12*, 259, doi:10.3389/FPLS.2021.625493/BIBTEX.
272. Liu, H.; Able, A.J.; Able, J.A. Water-deficit stress-responsive microRNAs and their targets in four durum wheat genotypes. *Funct. Integr. Genomics* **2016**, *17*, 237–251, doi:10.1007/S10142-016-0515-Y.
273. Liu, H.; Able, A.J.; Able, J.A.; Liu, H.; Able, A.J.; Able, J.A. Genotypic water-deficit stress responses in durum wheat: association between physiological traits, microRNA regulatory modules and yield components. *Funct. Plant Biol.* **2017**, *44*, 538–551, doi:10.1071/FP16294.
274. 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. Expression analysis of phytohormone-regulated microRNAs in rice, implying their regulation roles in plant hormone signaling. *FEBS Lett.* **2009**, *583*, 723–728, doi:10.1016/J.FEBSLET.2009.01.020.
275. Yang, J.H.; Han, S.J.; Yoon, E.K.; Lee, W.S. Evidence of an auxin signal pathway, microRNA167-ARF8-GH3, and its response to exogenous auxin in cultured rice cells. *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34*, 1892, doi:10.1093/NAR/GKL118.
276. Sreevidya, V.S.; Hernandez-Oane, R.J.; Gyaneshwar, P.; Lara-Flores, M.; Ladha, J.K.; Reddy, P.M. Changes in auxin distribution patterns during lateral root development in rice. *Plant Sci.* **2010**, *178*, 531–538, doi:10.1016/J.PLANTSCI.2010.03.004.
277. Gutierrez, L.; Bussell, J.D.; Păcurar, D.I.; Schwambach, J.; Păcurar, M.; Bellini, C. Phenotypic plasticity of adventitious rooting in *Arabidopsis* is controlled by complex regulation of *AUXIN RESPONSE FACTOR* transcripts and microRNA abundance. *Plant Cell* **2009**, *21*, 3119, doi:10.1105/TPC.108.064758.