

**Uniwersytet Mikołaja Kopernika**  
**Wydział Nauk Biologicznych i Weterynaryjnych**  
Katedra Fizjologii Roślin i Biotechnologii



UNIWERSYTET  
MIKOŁAJA KOPERNIKA  
W TORUNIU

mgr Natalia Klajn

ROZPRAWA DOKTORSKA

**Zmiany ekspresji genów regulatorowych oraz genów kodujących  
białka zapasowe w kontroli rozwoju nasion łubinu żółtego  
(*Lupinus luteus* L.) pod wpływem działania giberelin, kwasu  
abscysynowego oraz suszy**

Promotor pracy: dr hab. Jacek Kęsy, prof. UMK  
Promotor pomocniczy: dr Waldemar Wojciechowski

Toruń, 2022







*Składam serdeczne podziękowania mojemu promotorowi, Panu dr. hab. Jackowi Kęsemu, prof. UMK za wszystkie cenne uwagi oraz pomoc, zarówno w pisaniu niniejszej pracy, jak i realizacji badań.*

*Dziękuję także mojemu promotorowi pomocniczemu, dr. Waldemarowi Wojciechowskiemu za wieloletnią współpracę, merytoryczne wsparcie, motywację oraz dużą cierpliwość i pomoc w realizacji badań oraz pisaniu niniejszej pracy.*

*Serdecznie dziękuję także dr Paulinie Glazińskiej za wieloletnią współpracę oraz wszystkie cenne uwagi przekazane w trakcie realizacji badań.*

*Dziękuję również wszystkim Pracownikom i Doktorantom Katedry Fizjologii Roślin i Biotechnologii za miłą atmosferę pracy oraz okazaną życzliwość.*

*Chciałabym podziękować także Rodzicom za wsparcie przez wszystkie lata mojej edukacji oraz umożliwienie mi realizacji moich celów.*

*Dziękuję również Przyjaciółom za motywację do działania, wszelką pomoc oraz wsparcie w chwilach zwątpienia.*



## Finansowanie

Prezentowane w niniejszej pracy doktorskiej badania realizowano w ramach poniższych projektów:

„Udział giberelin i kwasu abscysynowego w kontroli mechanizmów gromadzenia białek zapasowych (SSP) w nasionach łubinu żółtego (*Lupinus luteus* L.)” – PRELUDIUM 14, Narodowe Centrum Nauki, nr grantu 2017/27/N/NZ9/00310 (kierownik: Natalia Klajn)

„Zwiększenie wykorzystania krajowego białka paszowego dla produkcji wysokiej jakości produktów zwierzęcych w warunkach zrównoważonego rozwoju.” Zadanie 2.2. „Identyfikacja genów warunkujących zawartość alkaloidów oraz zawiązywanie i utrzymywanie organów generatywnych u łubinów” – wieloletni program MRiRW, nr 149/2011 (wykonawca: Natalia Klajn)

„Identyfikacja genów kodujących białka zapasowe u łubinu żółtego (*Lupinus luteus*)” – grant Indywidualny WBiOŚ, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu (kierownik: Natalia Klajn)

„Identyfikacja sekwencji kodującej genu *PICKLE* w nasionach łubinu żółtego (*Lupinus luteus*)” – grant Indywidualny WBiOŚ, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu (kierownik: Natalia Klajn)

„Identyfikacja sekwencji kodującej genu *FUSCA3* oraz wzorzec jego ekspresji w warunkach suszy w czasie rozwoju nasion u łubinu żółtego (*Lupinus luteus*)” – grant Indywidualny WBiOŚ, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu (kierownik: Natalia Klajn)





## Spis treści

Streszczenie.....	9
Abstract.....	11
Wykaz skrótów.....	13
<b>1. Wstęp.....</b>	<b>17</b>
<b>1.1. Rozwój generatywny roślin .....</b>	<b>17</b>
<b>1.2. Rozwój nasion okrytozalążkowych.....</b>	<b>19</b>
<b>1.3. Poziomy kontroli rozwoju nasion .....</b>	<b>21</b>
<b>1.3.1. Hormonalna kontrola rozwoju nasion.....</b>	<b>21</b>
<b>1.3.1.1. Kwas abscynowy (ABA) .....</b>	<b>22</b>
1.3.1.1.1. Biosynteza ABA.....	22
1.3.1.1.2. Regulacja poziomu ABA .....	23
1.3.1.1.3. Udział ABA w rozwoju nasion .....	25
<b>1.3.1.2. Kwas giberelinowy (GA) .....</b>	<b>26</b>
1.3.1.2.1. Biosynteza GA .....	26
1.3.1.2.2. Regulacja poziomu GA .....	28
1.3.1.2.3. Udział GA w rozwoju nasion.....	32
<b>1.3.1.3. Auksyny (IAA) .....</b>	<b>34</b>
1.3.1.3.1. Biosynteza IAA.....	34
1.3.1.3.2. Regulacja poziomu IAA.....	35
1.3.1.3.3. Udział IAA w rozwoju nasion.....	37
<b>1.3.1.4. Pozostałe fitohormony .....</b>	<b>38</b>
1.3.1.5. Współdziałanie hormonów podczas rozwoju nasion.....	39
<b>1.3.2. Molekularna kontrola dojrzewania nasion .....</b>	<b>43</b>
1.3.2.1. Molekularna kontrola procesu gromadzenia białek zapasowych .....	44
<b>1.4. Czynniki środowiskowe wpływające na rozwój nasion .....</b>	<b>49</b>
1.4.1. Susza – wpływ na gospodarkę hormonalną i rozwój nasion.....	50
<b>1.5. Łubin – charakterystyka badanej rośliny.....</b>	<b>53</b>
1.5.1. Białka zapasowe u łubinu żółtego .....	56
<b>2. Cel pracy .....</b>	<b>58</b>
<b>3. Materiały.....</b>	<b>59</b>
3.1. Odczynniki chemiczne i zestawy do izolacji RNA.....	59
3.2. Bufory i zestawy do izolacji białek.....	59

3.3. Odczynniki chemiczne, bufory do oceny jakościowej RNA, separacji kwasów nukleinowych i białek .....	59
3.4. Zestawy odczynników do reakcji PCR, RT-PCR, RT-qPCR .....	60
3.5. Odczynniki chemiczne, bufory i zestawy do chromatografii nanoLC-MS/MS.....	60
3.6. Odczynniki chemiczne, bufory do izolacji fitohormonów i chromatografii LC-MS/MS .....	60
3.7. Środki chemiczne do uprawy roślin oraz hormony roślinne.....	61
3.8. Specjalistyczne oprogramowanie komputerowe.....	61
<b>3.9. Materiał badawczy .....</b>	<b>62</b>
3.9.1. Materiał badawczy wykorzystywany w doświadczeniach RNA-seq.....	62
3.9.2. Materiał badawczy wykorzystywany w doświadczeniach wpływu aplikacji ABA i GA .....	62
3.9.3. Materiał badawczy wykorzystywany w doświadczeniach wpływu suszy .....	64
<b>4. Metody .....</b>	<b>66</b>
<b>4.1. Identyfikacja oraz ekspresja wybranych genów w nasionach łubinu żółtego .....</b>	<b>66</b>
<b>4.1.1. Izolacja całkowitego RNA.....</b>	<b>66</b>
<b>4.1.2. Walidacja całkowitego RNA.....</b>	<b>66</b>
4.1.2.1. Analiza spektrofotometryczna .....	66
4.1.2.2. Określenie współczynnika integralności RNA .....	67
4.1.2.3. Elektroforeza horyzontalna w żelu agarozowym .....	67
<b>4.1.3. Sekwencjonowanie NGS transkryptomów .....</b>	<b>68</b>
4.1.3.1. Identyfikacja wybranych genów .....	68
4.1.3.2. Określenie poziomu ekspresji wybranych genów .....	69
<b>4.2. Określenie ekspresji wybranych genów pod wpływem aplikacji fitohormonów oraz suszy .....</b>	<b>69</b>
4.2.1. Reakcja odwrotnej transkrypcji (qPCR).....	69
4.2.2. Reakcja Real Time PCR (RT-qPCR) .....	69
<b>4.3. Profilowanie białek w nasionach łubinu żółtego .....</b>	<b>73</b>
4.3.1. Izolacja oraz oznaczenia ilości białek .....	73
4.3.2. Przygotowanie próbek do analizy nanoLC-MS/MS .....	73
4.3.3. Rozdział chromatograficzny białek metodą nanoLC-MS/MS .....	76
4.3.4. Identyfikacja i kwantyfikacja białek .....	76
<b>4.4. Określenie ilości wybranych fitohormonów w nasionach łubinu żółtego .....</b>	<b>77</b>
4.4.1. Izolacja wybranych fitohormonów z nasion łubinu żółtego .....	77
4.4.2. Analiza LC-MS/MS .....	78
<b>4.5. Analiza statystyczna.....</b>	<b>80</b>

4.5.1. Analiza statystyczna danych RNA-seq .....	80
4.5.2. Analiza statystyczna dla wyników z RT-qPCR.....	80
4.5.3. Analiza statystyczna dla wyników z nanoLC-MS/MS.....	80
4.5.4. Analiza statystyczna dla wyników z LC-MS/MS .....	81
<b>5. Wyniki.....</b>	<b>82</b>
<b>5.1. Sekwencjonowanie bibliotek cDNA.....</b>	<b>82</b>
5.1.1. Walidacja RNA .....	82
5.1.2. Identyfikacja homologów genów związanych z rozwojem nasion i gromadzeniem białek zapasowych.....	82
<b>5.1.3. Aktywność transkrypcyjna wybranych genów.....</b>	<b>83</b>
5.1.3.1. Aktywność transkrypcyjna <i>LIPKL</i> ( <i>LIPICKLE</i> ).....	84
5.1.3.2. Aktywność transkrypcyjna <i>LILEC2</i> ( <i>LILEAFY COTYLEDON2</i> ).....	85
5.1.3.3. Aktywność transkrypcyjna <i>LIABI3</i> ( <i>LIABA INSENSITIV3</i> ).....	86
5.1.3.4. Aktywność transkrypcyjna <i>LIFUS3</i> ( <i>LIFUSCA3</i> ) .....	87
5.1.3.5. Aktywność transkrypcyjna <i>LIVAL1</i> ( <i>LIVP1/ABI3-like</i> ) .....	88
5.1.3.6. Aktywność transkrypcyjna <i>LIBETA</i> .....	89
5.1.3.7. Aktywność transkrypcyjna <i>LIDELTA2</i> .....	90
<b>5.2. Aktywność transkrypcyjna wybranych genów uzyskana metodą Real-Time PCR pod wpływem aplikacji ABA i GA.....</b>	<b>91</b>
<b>5.2.1. Aktywność transkrypcyjna genu <i>LIPKL</i> .....</b>	<b>92</b>
5.2.1.1. Różnice ekspresji <i>LIPKL</i> w kolejnych dniach rozwoju nasion w wariantach K/ABA/GA .....	93
5.2.1.2. Różnice ekspresji <i>LIPKL</i> w godzinach 0h/4h/8h w analizowanych wariantach .....	93
5.2.1.3. Różnice ekspresji <i>LIPKL</i> w warunkach kontrolnych oraz pod wpływem działania hormonów.....	94
<b>5.2.2. Aktywność transkrypcyjna genu <i>LILEC2</i> .....</b>	<b>95</b>
<b>5.2.3. Aktywność transkrypcyjna genu <i>LIABI3</i> .....</b>	<b>96</b>
5.2.3.1. Różnice ekspresji <i>LIABI3</i> w kolejnych dniach rozwoju nasion w wariantach K/ABA/GA .....	97
5.2.3.2. Różnice ekspresji <i>LIABI3</i> w godzinach 0h/4h/8h w analizowanych wariantach .....	97
5.2.3.3. Różnice ekspresji <i>LIABI3</i> w warunkach kontrolnych oraz pod wpływem działania hormonów.....	98
<b>5.2.4. Aktywność transkrypcyjna genu <i>LIFUS3</i> .....</b>	<b>99</b>
5.2.4.1. Różnice ekspresji <i>LIFUS3</i> w kolejnych dniach rozwoju nasion w wariantach K/ABA/GA .....	100

5.2.4.2. Różnice ekspresji <i>LIFUS3</i> w godzinach 0h/4h/8h w analizowanych wariantach .....	101
5.2.4.3 Różnice ekspresji <i>LIFUS3</i> w warunkach kontrolnych oraz pod wpływem działania hormonów.....	102
<b>5.2.5. Aktywność transkrypcyjna genu <i>LIVAL1</i> .....</b>	<b>102</b>
5.2.5.1. Różnice ekspresji <i>LIVAL1</i> w kolejnych dniach rozwoju nasion w wariantach K/ABA/GA .....	103
5.2.5.2. Różnice ekspresji <i>LIVAL1</i> w godzinach 0h/4h/8h w analizowanych wariantach .....	104
5.2.5.3 Różnice ekspresji <i>LIVAL1</i> w warunkach kontrolnych oraz pod wpływem działania hormonów.....	105
<b>5.2.6. Aktywność transkrypcyjna genu <i>LIBETA</i> .....</b>	<b>106</b>
5.2.6.1. Różnice ekspresji <i>LIBETA</i> w kolejnych dniach rozwoju nasion w wariantach K/ABA/GA .....	107
5.2.6.2. Różnice ekspresji <i>LIBETA</i> w godzinach 0h/4h/8h w analizowanych wariantach .....	107
5.2.6.3. Różnice ekspresji <i>LIBETA</i> w warunkach kontrolnych oraz pod wpływem działania hormonów.....	108
<b>5.2.7. Aktywność transkrypcyjna genu <i>LIDELTA2</i>.....</b>	<b>109</b>
5.2.7.1. Różnice ekspresji <i>LIDELTA2</i> w kolejnych dniach rozwoju nasion w wariantach K/ABA/GA.....	110
5.2.7.2. Różnice ekspresji <i>LIDELTA2</i> w godzinach 0h/4h/8h w analizowanych wariantach.....	110
5.2.7.3. Różnice ekspresji <i>LIDELTA2</i> w warunkach kontrolnych oraz pod wpływem działania hormonów.....	111
<b>5.3. Aktywność transkrypcyjna wybranych genów w warunkach suszy .....</b>	<b>112</b>
5.3.1. Wpływ suszy na ekspresję wybranych genów .....	112
<b>5.4. Wzorzec akumulacji białek w nasionach lubinu żółtego odmiany Taper.....</b>	<b>116</b>
<b>5.5. Poziom akumulacji wybranych białek .....</b>	<b>120</b>
<b>5.5.1. Akumulacja konglutyn.....</b>	<b>120</b>
5.5.1.1. Różnice w ilości konglutyn w kolejnych dniach rozwoju nasion w wariantach K/ABA/GA .....	121
5.5.1.2. Różnice w ilościach konglutyn w godzinach 0h/4h/8h w analizowanych wariantach.....	121
5.5.1.3. Różnice w ilościach konglutyn w warunkach kontrolnych oraz pod wpływem działania hormonów.....	121
<b>5.5.2. Akumulacja <math>\beta</math>-konglutyn .....</b>	<b>122</b>
<b>5.5.3. Akumulacja <math>\delta</math>-konglutyn .....</b>	<b>123</b>
<b>5.6. Analiza endogennego poziomu wybranych fitohormonów .....</b>	<b>124</b>

<b>5.6.1. Endogenny poziom ABA .....</b>	<b>125</b>
5.6.1.1. Różnice w ilości endogennego ABA w kolejnych dniach rozwoju nasion w wariantach K/ABA/GA.....	125
5.6.1.2. Różnice w ilości endogennego ABA w godzinach 0h/4h/8h w analizowanych wariantach .....	126
5.6.1.3. Różnice w ilości endogennego ABA w warunkach kontrolnych oraz pod wpływem działania hormonów .....	127
<b>5.6.2. Endogenny poziom GA<sub>1</sub> .....</b>	<b>128</b>
5.6.2.1. Różnice w ilości endogennego GA <sub>1</sub> w kolejnych dniach rozwoju nasion w wariantach K/ABA/GA.....	128
5.6.2.2. Różnice w ilości endogennego GA <sub>1</sub> konglutyn w godzinach 0h/4h/8h w analizowanych wariantach .....	129
5.6.2.3. Różnice w ilości endogennego GA <sub>1</sub> w warunkach kontrolnych oraz pod wpływem działania hormonów .....	130
<b>5.6.3. Endogenny poziom GA<sub>3</sub> .....</b>	<b>131</b>
5.6.3.1. Różnice w ilości endogennego GA <sub>3</sub> w kolejnych dniach rozwoju nasion w wariantach K/ABA/GA.....	131
5.6.3.2. Różnice w ilości endogennego GA <sub>3</sub> w godzinach 0h/4h/8h w analizowanych wariantach .....	132
5.6.3.3. Różnice w ilości endogennego GA <sub>3</sub> w warunkach kontrolnych oraz pod wpływem działania hormonów .....	132
<b>5.6.4. Endogenny poziom GA<sub>4</sub> .....</b>	<b>133</b>
5.6.4.1. Różnice w ilości endogennego GA <sub>4</sub> w kolejnych dniach rozwoju nasion w wariantach K/ABA/GA.....	133
5.6.4.2. Różnice w ilości endogennego GA <sub>4</sub> w godzinach 0h/4h/8h w analizowanych wariantach .....	134
5.6.4.3. Różnice w ilości endogennego GA <sub>4</sub> w warunkach kontrolnych oraz pod wpływem działania hormonów .....	134
<b>5.6.5. Endogenny poziom GA<sub>7</sub> .....</b>	<b>135</b>
5.6.5.1. Różnice w ilości endogennego GA <sub>7</sub> w kolejnych dniach rozwoju nasion w wariantach K/ABA/GA.....	136
5.6.5.2. Różnice w ilości endogennego GA <sub>7</sub> w godzinach 0h/4h/8h w analizowanych wariantach .....	136
5.6.5.3. Różnice w ilości endogennego GA <sub>7</sub> w warunkach kontrolnych oraz pod wpływem działania hormonów .....	137
<b>5.6.6. Endogenny poziom IAA .....</b>	<b>138</b>
5.6.6.1. Różnice w ilości endogennego IAA w kolejnych dniach rozwoju nasion w wariantach K/ABA/GA.....	139
5.6.6.2. Różnice w ilości endogennego IAA w godzinach 0h/4h/8h w analizowanych wariantach .....	140

5.6.6.3. Różnice w ilości endogennego IAA w warunkach kontrolnych oraz pod wpływem działania hormonów .....	140
<b>6. Dyskusja.....</b>	<b>142</b>
<b>6.1. Identyfikacja homologów genów związanych z rozwojem nasion i gromadzeniem materiałów zapasowych.....</b>	<b>145</b>
<b>6.2. Analiza ekspresji wybranych genów związanych z rozwojem nasion i gromadzeniem materiałów zapasowych .....</b>	<b>146</b>
6.2.1. <i>LIPKL (LIPICKLE)</i> .....	146
6.2.2. <i>LILEC2 (LILEAFY COTYLEDON2)</i> oraz <i>LIFUS3 (LIFUSCA3)</i> .....	147
6.2.3. <i>LIAB13 (LIABA INSENSITIV3)</i> .....	149
6.2.4. <i>LIVAL1 (LIVP1/ABI3-like)</i> .....	151
6.2.5. Geny kodujące konglutyny.....	152
<b>6.3. Rola GA i ABA w kontroli procesów wypełniania nasion.....</b>	<b>153</b>
6.3.1. Wpływ GA <sub>3</sub> na ekspresję zidentyfikowanych genów .....	154
6.3.2. Wpływ ABA na ekspresję zidentyfikowanych genów .....	157
<b>6.6. Endogenne poziomy fitohormonów.....</b>	<b>158</b>
<b>6.7. Wpływ suszy na ekspresję wybranych genów .....</b>	<b>163</b>
<b>Podsumowanie.....</b>	<b>164</b>
<b>7. Wnioski .....</b>	<b>166</b>
<b>8. Literatura .....</b>	<b>167</b>

## Streszczenie

Rozwój nasion jest procesem szczególnie ważnym dla rośliny ze względu na trwanie gatunku, ale także dla populacji ludzkiej ze względów żywieniowych oraz ekonomicznych. Kontrola tego procesu wymaga ścisłej koordynacji wielu czynników, na różnych poziomach organizacji komórkowej i złożoności mechanizmów regulacji a do najważniejszych zalicza się aktywność transkrypcyjną genów oraz homeostazę hormonalną. Z punktu widzenia żywieniowego kluczowymi w rozwoju nasion są możliwości zgromadzenia w nich dużych ilości białek o różnej strukturze i właściwościach. Deficyt żywności na świecie dotyczy głównie niedoborów białka. Biorąc pod uwagę także perspektywy zmian środowiskowych zachodzących na Ziemi, konieczne staje się poszukiwanie możliwości pozyskiwania dużych ilości białka pochodzenia roślinnego, przy zachowaniu różnorodności jego pochodzenia. Jednym z rodzimych gatunków roślin gromadzących w nasionach duże ilości tego składnika jest łubin żółty. Wykorzystując nowoczesne techniki biologii molekularnej, w tym RNA-seq, techniki chromatograficzne oraz analizy z wykorzystaniem ilościowego PCR ustalono kluczowe zmiany zachodzące w rozwijających się nasionach łubinu żółtego odmiany Taper.

Celem niniejszej pracy było: zidentyfikowanie oraz oznaczenie ekspresji genów zaangażowanych w proces gromadzenia białek zapasowych, zbadanie wpływu aplikacji egzogennych fitohormonów oraz suszy na aktywność transkrypcyjną wytypowanych genów, ilość akumulowanych białek oraz endogenne poziomy fitohormonów w różnych etapach rozwoju nasionach łubinu żółtego odmiany Taper.

Przeprowadzone badania wykazały funkcjonowanie w procesie dojrzewania nasion łubinu żółtego genów takich jak: *LIPKL*, *LILEC2*, *LIABI3*, *LIFUS3*, *LIVAL1*. Zidentyfikowane geny wykazują wysoki stopień podobieństwa do swoich odpowiedników występujących u innych gatunków roślin strączkowych, w tym *L. angustifolius*, *L. albus*, *Glycine max*. W wyniku ich aktywności dochodzi do akumulacji białek zapasowych (konglutyn), co determinowane jest także spadkiem ilości endogennego ABA a także bioaktywnych GA<sub>1</sub> i GA<sub>3</sub> w kolejnych dniach rozwoju nasion oraz wzrostem poziomu akumulacji GA<sub>4</sub> i GA<sub>7</sub>. Na podstawie tych doświadczeń można zasugerować odmienną funkcję tych dwóch klas giberelin w regulacji procesów związanych z rozwojem nasion. Egzogenna aplikacja fitohormonów GA<sub>3</sub> oraz ABA w warunkach naturalnych nie przynosi oczekiwanych zmian poziomu transkrypcji czy akumulacji białek zapasowych, za wyjątkiem stosowania GA<sub>3</sub> i poziomem ekspresji konglutyn w nasionach najstarszych. Wykazano także, że przedłużający się okres suszy wywołuje spadek poziomu ekspresji wszystkich badanych

genów w porównaniu do wariantów kontrolnych. W kontekście zmieniających się warunków klimatycznych oraz pogłębiającego się deficytu żywieniowego, szczególnie istotne jest, że spadek ten dotyczy białek zapasowych. Przeprowadzone badania z wykorzystaniem zróżnicowanej metodyki badawczej pozwoliły po raz pierwszy u łubinu żółtego zbadać zarówno ekspresję genów, endogenny poziom fitohormonów jak i wpływ na nie suszy i egzogennej aplikacji ABA i GA w rozwijających się nasionach. Pokazują one także jak wiele czynników i zmiennych warunkuje prawidłowy przebieg procesów dojrzewania nasion, wskazując jednocześnie na konieczność kontynuacji badań i uszczegółowienia wielu aspektów poruszonych w niniejszej pracy.



## Abstract

The development of seeds is a process of particular importance both for the plant itself – it assures the survival of the species, and for the human population – for nutritional and economic reasons. Controlling this process requires a strict coordination of many factors at different levels of cellular organization and complexity of regulatory mechanisms, the most important of which are gene transcriptional activity and hormonal homeostasis. From the nutritional point of view, the key to seed development is the ability of seeds to accumulate large amounts of proteins with different structures and properties. The world's food deficit is mainly related to shortages of protein and taking into consideration the environmental changes occurring on Earth, it is becoming necessary to search for a way to obtain large amounts of plant-derived protein, while maintaining the diversity of its origin. Yellow lupine is one of the native plant species that accumulate large amounts of this nutrient in their seeds. Using modern molecular biology techniques, including RNA-seq, chromatographic techniques and quantitative PCR analysis, key changes in developing yellow lupine seeds of the Taper variety were determined.

The aim of this study was to identify and determine the expression of genes involved in the process of accumulating storage proteins, to investigate the effect of the application of exogenous phytohormones and drought on the transcriptional activity of selected genes, the amount of accumulated proteins and the endogenous level of phytohormones at various stages of development of yellow lupine seeds of the Taper variety.

The conducted research showed the functioning of the following genes in the process of yellow lupine seed maturation: *LIPKL*, *LILEC2*, *LIABI3*, *LIFUS3*, *LIVAL1*. The identified genes show a high degree of similarity to their counterparts found in other legume species, including *L. angustifolius*, *L. albus*, *Glycine max*. As a result of their activity, there is an accumulation of reserve proteins (conglutins), which is also determined by a decrease in the amount of endogenous ABA as well as bioactive GA<sub>1</sub> and GA<sub>3</sub> in the following days of seed development, and an increase in the level of GA<sub>4</sub> and GA<sub>7</sub> accumulation. It can be suggested that these two classes of gibberellins play a different role in regulating the processes related to seed development. Exogenous application of GA<sub>3</sub> and ABA phytohormones in natural conditions does not bring the expected changes in the level of transcription or accumulation of storage proteins, except for the use of GA<sub>3</sub> and the level of conglutin expression in the oldest seeds. It was also shown that a prolonged period of drought causes a decrease in the expression level of all tested genes in comparison to

the control variants. In the context of changing climatic conditions and the increasing nutritional deficit, the fact that this decrease applies to reserve proteins is particularly concerning. The research carried out with the use of various research methodologies allowed, for the first time, to study the expression of genes, endogenous levels of phytohormones and the influence of drought and exogenous application of ABA and GA in developing seeds of yellow lupine. The study also shows many factors and variables which determine the correct course of seed maturation processes, and at the same time indicates the need to continue the research and cover many aspects discussed in this paper in more detail.

## Wykaz skrótów

- 2ODD – dioksygenaza zależna od 2-oksoglutaranu (ang. 2-oxoglutarate dependent oxygenases)
- 2ODDs – dioksygenazy zależne od 2-oksoglutaranu (ang. 2-oxoglutarate dependent dioxygenases)
- 4-Cl-IAA – kwas 4-chloroindolo-3-octowy (ang. 4-chloroindole-3-acetic acid)
- AAO – oksydaza aldehydu abscysynowego (ang. abscisic aldehyde oxidase)
- ABA – kwas abscysynowy
- ABC – transportery kasetowe wiążące ATP (ang. ATP-binding cassette transporter)
- ABFs – ABRE binding factors
- ABI1/ABI2 – ABA-INSENSITIVE 1/ ABA-INSENSITIVE 2
- ABI3 – ABA INSENSITIVE 3
- ABI4 – ABA INSENSITIVE 4
- ABI5 – ABCISIC ACID INSENSITIVE 5
- ABP1 – AUXIN BINDING PROTEIN 1
- ABRE – ABSCISIC ACID RESPONSIVE ELEMENT
- AG – AGAMOUS
- AHG3 – ABA-HYPERSENSITIVE GERMINATION3
- AREB1 – ABF2/ABA-RESPONSIVE ELEMENT BINDING PROTEIN1
- ARF – Auxin Response Factor
- AUX1 – AUXIN1
- AuxRE – Auxin Response Element
- BR – brasinosteroidy
- BZR1 – BRASSINAZOLE RESISTANT1
- C20GA2ox – oksydaza GA2 hydroksylująca gibereliny dwudziestowęglowe
- CDP-ME – 4-difosfo-cytydylo-2-metylerytritol (ang. 4-Diphosphocytidyl-2-C-methyl-D-erythritol)
- CDP-MEP – 2-fosforan 4-difosfo-cytydylo-2-metylerytritolu (ang. 4-diphosphocytidyl-2C methylerythritol 2-phosphate)
- CK – cytokininy
- CLE25 – CLAVATA3/EMBRYO-SURROUNDING REGION-RELATED 25
- CLV1, CLV2, CLV3 – CLAVATA 1/2/3
- CPS – syntaza ent-kopalilodifosforanu (ang. ent-copalyl diphosphate synthase)
- CYP714D1/ CYP707A – monooksygenaza cytochromu P450
- DAA – Day After Anthesis
- DAO – dioxygenase for auxin oxidation
- DBD – DNA-binding domain
- DCL1 – DICER-LIKE 1

DMAPP – pirofosforan dimetyloallilu (ang. dimethylallyl diphosphate)

DXP – 5-fosforan 1-D-oksyksylulozy (ang. 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate)

DXR – reduktoizomeraza DXP (ang. DXP reductoisomerase)

DXS – syntaza DXP (ang. DXP synthase)

EEL – ENHANCED EM LEVEL

ent-CPD – ent-kopalil (ang. ent-copalil)

EUI – ELONGATED UPPERMOST INTERNODE

F – wartość testu ANOVA

FAO – Organizacja Narodów Zjednoczonych ds. Wyżywienia i Rolnictwa (ang. Food and Agriculture Organization)

FASP – przygotowanie próbek wspomagane filtrami

FUS3 – FUSCA3

G3P – aldehyd 3-fosfoglicerynowy (ang. glyceraldehyde 3-phosphate)

GA20ox – 20-oksydaza GA

GA3ox – 3-oksydaza GA

GAMT1, GAMT2 – metylotransferaza GA 1/2 (ang. GA methyl transferase 1, 2)

GD1 – GERMINATION DEFECTIVE 1

GGPP – pirofosforan geranylo-geranylu (ang. geranylgeranyl pyrophosphate)

GH3 – GRETCHEN HAGEN 3

GID1 – GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF1

GID2 – GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF2

H3K27me3 – trimetylacja histonu H3 lizyny 27

HMBPP – 4-pirofosforan hydroksymetylbutenyli (ang. hydroxymethylbutenyl 4 diphosphate)

HSFA9 – HEAT SHOCK TRANSCRIPTION FACTOR A9

HSI2 – HIGH-LEVEL EXPRESSION OF SUGAR-INDUCIBLE GENE 2

HSL1 – HSI2-LIKE1

IAA – kwas indolilo-3-octowy (indole-3-acetic acid)

IAM – indolo-3-acetamid (indole-3-acetamide)

IAOx – indolo-3-acetaldoksym (indole-3-acetaldoxime)

IBA – kwas indolo-3-masłowy (ang. Indole-3-butyric acid)

IGF-I, IGF-II – insulin-like growth factor

IPP – pirofosforan izopentenyli (ang. isopentenyl pyrophosphate)

IPyA – kwas indolo-3-pirogronowy (indole-3-pyruvic acid)

JA – kwas jasmonowy

JA-Ile – koniugat kwasu jasmonowego z izoleucyną

KAO – oksydaza kwasu ent-kaurenowego (ang. ent-kaurenoic acid oxidase)

KO – oksydaza ent-kaurenowa (ang. ent-kaurene oxidase)

KS – syntaza ent-kaurenu (ang. ent-kaurene synthase)  
L1L – LEC1like  
LAX – LIKE AUXIN1  
LC – chromatografia cieczowa  
LD – Long Day  
LEC2 – LEAFY COTYLEDON2  
LFY – LEAFY  
ME-cPP – 2,4-cyklodifosforan metylerytrytolu (ang. ME 2,4-cyclodiphosphate)  
MEP – fosforan metyloerytroli (ang. methylerythritol phosphate)  
Met – metionina  
MS – spektrometria mas  
MS/MS - tandemowa spektrometria mas  
MVA – kwas mewalonowy (ang. mevalonic acid)  
MWCO - odcięcie przy określonej masie cząsteczkowej (Mass Weight Cut-Off)  
nanoLC – chromatografia cieczowa w przepływach nanolitrowych  
NCED – dioksygenaza 9-cis-epoksykarotenoidowej (ang. 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenases)  
NPF – nitrate transporter 1/peptide transporter family  
OPDA – kwas 12-oksofitodienowy (ang. 12-oxo phytodienoic acid)  
p – istotność statystyczna testu  
P450s – monooksygenazy cytochromu P450  
PAA – kwas fenylactowy (ang. Phenylacetic acid)  
PCA – analiza głównych składowych (ang. Principal Component Analysis)  
PDS – desaturaza fitoenu (ang. phytoene desaturase)  
PIF – PHYTOCHROME-INTERACTING FACTOR  
PIN – PIN-FORMED  
PKL – PICKLE  
PP2C – fosfataza białkowa typu 2C (ang. Protein phosphatase 2C)  
PSY – syntaza fitoenu (ang. phytoene synthase)  
Ref – próbka referencyjna / próbka odniesienia  
ROM1 – Repressor Of Maturation gene1  
ROS – reaktywne formy tlenu  
SCF – Skp1-Cullin-F-box  
SDRA – short-chain dehydrogenase/reductase  
SL – strigolaktony  
SLY1 – SLEEPY1  
SnRK2s – SUCROSE NONFERMENTING 1-RELATED PROTEIN KINASE 2s  
SWEET – Sugars Will Eventually be Exported Transporter

TAA – TRYPTOFAN AMINOTRANSFERASE OF ARABIDOPSIS

TAM – tryptamina

TAXI-1 – Triticum aestivum Xylanase Inhibitor

TE – Transposable element

TIR1/AFB – TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE1/AUXIN SIGNALING F-BOX

TMT – Tandem Mass Tag

TPS – syntaza terpenowa (ang. Terpene synthase)

Trp – tryptofan

VAL1 – VP1/ABI3-like

VAS1 – aminotransferaza zależna od fosforylacji pirydoksalu (ang. pyridoxal-phosphate-dependent aminotransferase)

WAT1 – WALLS ARE THIN1

WUS – WUSCHEL

XEGIP – białka inhibitorów endoglukanazy specyficzne dla ksyloglukanu (ang. Xyloglucan-specific endoglucanase inhibitor proteins)

YUC – YUCCA

ZEP – epoksydaza zeaksantyny (ang. zeaxanthin epoxidase)

$\eta^2$  – procent wyjaśnionej wariancji przez czynniki wprowadzone do modelu

# 1. Wstęp

## 1.1. Rozwój generatywny roślin

Na przestrzeni tysięcy lat rośliny współczesne wykształciły wiele sposobów rozmnażania płciowego. Począwszy od prostych ruchliwych zarodników u roślin niekwitających, po najróżniejsze formy kwitnące i wydające niezwykle zróżnicowane nasiona u roślin telomowych. Warunkiem koniecznym do wejścia rośliny w fazę rozwoju generatywnego jest osiągnięcie gotowości do wytwarzania, jak i percepcji sygnałów indukujących kwitnienie. Roślina, odbierając fale świetlne determinowane zmianami fotoperiodu a także w odpowiedzi na temperaturę otoczenia, swój wiek czy zmiany poziomu fitohormonów, wybiera najkorzystniejszy czas inicjacji rozwoju generatywnego. Wówczas w merystemie wierzchołkowym pędu następuje szereg molekularnych zmian prowadzących do jego przekształcenia w merystem kwiatostanowy, który dalej przechodzi w merystem kwiatowy, wytwarzając pąk kwiatowy. Proces ten wymaga aktywacji genów tożsamości merystemu kwiatowego m.in. *AGAMOUS (AG)*, *LEAFY (LFY)*, *WUSCHEL (WUS)* i *CLAVATA (CLV1, CLV2 i CLV3)*, których ekspresja ogranicza tworzenie komórek merystemu wegetatywnego, determinując w ten sposób architekturę i wzorzec rozwojowy organów kwiatowych. Merystemy generatywne (kwiatostanowe) nie różnią się zasadniczo od merystemów wegetatywnych pod względem organizacji strukturalnej i ogólnej funkcji organogenicznej, ale wytwarzają inne rodzaje organów bocznych. W przeciwieństwie do wegetatywnego, merystem kwiatowy jest odpowiedzialny za determinację wzrostu kwiatu o określonym kształcie i wielkości, wytwarzając cztery rodzaje organów bocznych – działki kielicha, płatki, pręciki i słupki o mniej lub bardziej złożonej strukturze. Rozwój pąka kwiatowego wyczerpuje potencjał komórek macierzystych merystemu wierzchołkowego tak, że dalszy rozwój pędu nie jest możliwy. Nowe pędy i liście mogą się tworzyć jedynie z pąków bocznych (Brukhin i Morozova, 2011; Srikanth i Schmid, 2011).

Kiedy dojdzie do zapylenia i zapłodnienia, rozpoczyna się rozwój nasion. Dowiedziono, że tworzenie gamet i wczesny rozwój nasion u roślin jednoliściennych, jak i dwuliściennych znajdują się pod kontrolą epigenetyczną. Największe znaczenie mają zmiany kowalencyjne podstawowych składników chromatyny, tzn. DNA oraz białek histonowych. Zapewniają one trwałość i uniwersalność dziedziczenia mechanizmu

epigenetycznej regulacji ekspresji genów, który jest niezbędny dla funkcjonowania i przetrwania gatunku. Chromatyna może występować w czterech różnych stanach charakterystycznych dla: rejonów aktywnych lub represjonowanych genów, elementów transpozycyjnych (TE) i regionów międzygenowych. Różnią się one od siebie rodzajem modyfikacji histonów, metylacji DNA oraz współdziałaniem białek o różnej aktywności, co powoduje odmienną strukturę oraz aktywność wymienionych regionów chromatyny (Roudier i in., 2011; Bleckmann i in., 2014).

Dojrzały i funkcjonalny zarodek, z którego po wykiełkowaniu wyrośnie niezależna roślina, powstaje podczas embriogenezy. Proces ten można podzielić na trzy główne fazy. We wczesnej fazie następują asymetryczne podziały komórek, które mają na celu ustanowienie biegunowości wierzchołkowo – podstawnej. W fazie pośredniej dochodzi do inicjacji głównych organów i primordiów, które podczas ostatniej fazy rozwijają się w dojrzały embrion (Quint i in., 2012; Han i in., 2019). W trakcie przejścia od wczesnej embriogenezy do dojrzewania, nasiona przechodzą zasadnicze zmiany. Obejmują one aktywność komórkową oraz metaboliczną, począwszy od podziałów i różnicowania komórek, przez metabolizm pierwotnych i wtórnych metabolitów, wytwarzanie czynników regulatorowych, na syntezie materiałów zapasowych skończywszy (An i in. 2017). Etap ten jest kluczowy dla otrzymania nasion o dobrej jakości, co z perspektywy roślin uprawnych przekłada się także na wydajność i jakość plonowania (Han i in., 2019). Szczegółowy opis molekularnych przemian zachodzących podczas rozwoju nasion roślin okrytozalążkowych został przedstawiony w kolejnych rozdziałach.



## 1.2. Rozwój nasion okrytozalążkowych

Rozwój nasion jest jednym z kluczowych procesów podczas ontogenezy roślin okrytozalążkowych. Zazwyczaj dzielony jest na trzy następujące po sobie fazy. Początek stanowi etap wczesnej embriogenezy, podczas której następują intensywne podziały komórkowe i różnicowanie tkanek w zarodku oraz otaczających go strukturach. Ustalana jest struktura zarodka: determinowane zostają liścienie, oś apikalno–bazalna, tworzone są osłonki nasiona oraz bielmo (Srivastava, 2002).

Wczesna embriogeneza charakteryzuje się tworzeniem struktury zarodka, tzn. określeniem liścieni, osi apikalno – bazalnej, wierzchołków korzenia i pędu oraz wyodrębnieniem tkanek pierwotnych: protodermy, merystemu nadziemnego i tkanek okołonaczyniowych lub prokambium. Charakteryzuje się także podziałami jądrowymi i tworzeniem ściany w tym, co było komórką centralną woreczka zarodkowego, prowadząc do wykształcenia bielma. Wyjątkiem są rośliny bezbielmowe, u których zarodek rozwija się w gametoficie żeńskim, będącym tkanką macierzystą (Srivastava, 2002).

W drugiej fazie, najczęściej zwanej wypełnianiem nasion, podziały komórkowe zmniejszają swoją częstotliwość i w końcu ustają. Jednakże zarodek nadal rośnie przez powiększanie się komórek i gromadzenie materiałów zapasowych w tkankach spichrzowych. Następuje wówczas duży wzrost suchej masy nasion. Kiedy procesy magazynowania substancji odżywczych spowalniają aż do całkowitego zaniku, wówczas rozpoczyna się ostatni etap, w którym nasiona osiągają swoją dojrzałą formę. Okrywa nasienna twardnieje, a jej zewnętrzne warstwy pokrywają się kutyną, która u niektórych gatunków może być impregnowana woskami. W celu ochrony przed patogenami i roślinożercami, niektóre nasiona mogą gromadzić w swoich komórkach także fenole i substancje toksyczne. W tej fazie połączenia naczyniowe poprzez *funiculus* (sznureczek) pomiędzy nasionami a rośliną macierzystą stają się нефunkcjonalne lub zostają przerwane. W rezultacie nasiona tracą wodę i nabywają tolerancji na wysychanie. Proces ten może zachodzić zarówno, gdy nasiona są jeszcze na roślinie macierzystej, jak i po ich zrzuceniu. Wejście nasion w stan spoczynku charakteryzuje się zahamowaniem aktywności metabolicznej oraz syntezy RNA i białek. Dzięki temu nasiona nie tylko mogą zachować dłuższą żywotność, nawet w ekstremalnych warunkach środowiskowych, ale także są chronione przed atakiem bakterii i grzybów. Nasiona, które przechodzą fazę desykcji oraz spoczynku nazywane są „ortodoksyjnymi”. Istnieje jednak wiele gatunków, których nasiona są „nieortodoksyjne”, pozostają uwodnione

po osiągnięciu dojrzałości i nie wykształcają tolerancji na wysychanie (Bewley i Nonogaki, 2017; Liu i Hou, 2018).

Należy jednak mieć na uwadze, że etapy te nie są wyraźnie rozgraniczone, a częściowo zazębiają się i powinny być raczej postrzegane jako kontinuum z następującymi po sobie głównymi aktywnościami (Srivastava, 2002). Sekwencje zdarzeń prowadzących do dojrzewania i rozwoju nasion są przez to niezwykle złożone. Niejednokrotnie wymagają one wielu tygodni lub miesięcy przemian, czy też wystąpienia określonych warunków środowiskowych. Z tego powodu ich skoordynowana regulacja i kontrola odbywa się na kilku poziomach (Bewley i Nonogaki, 2017).

### **1.3. Poziomy kontroli rozwoju nasion**

#### **1.3.1. Hormonalna kontrola rozwoju nasion**

Organizacja i integracja rozmieszczenia komórek o specyficznych wzorcach proliferacji i różnicowania w tkankach lub narządach rozwijających się nasion wymaga precyzyjnej koordynacji przestrzennej i czasowej. Komórki są zdolne do kontrolowania tych działań poprzez wytwarzanie i percepcję sygnałów. Ciągła wymiana tych sygnałów jest ważna nie tylko pomiędzy przedziałami nasion z i do tkanek macierzystych oraz pomiędzy zarodkiem i bielmem, ale także w obrębie tego samego przedziału, aby kontrolować postęp procesu rozwojowego. Jednym z kluczowych sygnałów są fitohormony, będące endogennymi cząsteczkami występującymi naturalnie w roślinach w bardzo niskich stężeniach. Nie pełnią one funkcji odżywczej, natomiast działają jako związki sygnalizacyjne, promując wzrost i regulując rozwój oraz fizjologię roślin. Do tej pory scharakteryzowano fitohormony, takie jak: auksyny, cytokininy, kwas abscysynowy, gibereliny, brasinosteroidy, etylen, kwas salicylowy, jasmoniany oraz strigolaktyny. Podczas rozwoju nasion niezwykle ważna jest nie tylko ich bezwzględna ilość na danym etapie rozwoju nasion, ale przede wszystkim współdziałanie i wzajemna równowaga (Sauer i in., 2013; Locascio i in., 2014).

W odróżnieniu od zwierząt, rośliny nie mają specyficznych organów (gruczołów) produkujących i wydzielających hormony. Auksyny, cytokininy i gibereliny uważane są za najbardziej stymulujące wzrost i rozwój, z kolei kwas abscysynowy i etylen pełnią rolę inhibitorów lub supresorów wzrostu (Brukhin i Morozova, 2011).

### 1.3.1.1. Kwas abscycynowy (ABA)

Kwas abscycynowy (ABA) bierze udział w procesach rozwojowych, w tym w dojrzewaniu nasion, ich spoczynku i kiełkowaniu, wzroście korzeni pierwotnych i kontroli czasu kwitnienia, a także w odpowiedzi na niekorzystne czynniki środowiskowe. Transportowany jest albo z rośliny macierzystej przez łyko, albo syntetyzowany jest *de novo* w zarodku i okrywie nasiennej podczas embriogenezy, przez co gromadzony jest we wszystkich tkankach nasion. Zwiększoną ilość tego hormonu obserwowano także podczas ich dojrzewania, co związane jest z późnymi procesami tej fazy, syntezą białek zapasowych, zapobieganiu aborcji nasion i indukowaniu pierwotnego uśpienia (Nambara i Marion-Poll, 2003; Smýkal i in., 2014; Ali i in., 2022). Kontrola tych procesów uzależniona jest od poziomu aktywnego ABA, który podlega modulacji przez tempo syntezy z prekursorów, reakcje kataboliczne lub jego translokacje pod wpływem pH z lub do innych miejsc (Nambara i Marion-Poll, 2003).

#### 1.3.1.1.1. Biosynteza ABA

Bezpośrednie prekursory syntezy ABA mogą powstawać w wyniku aktywności dwóch niezależnych szlaków. Pierwszy z nich określany mianem MEP (ang. methylerythritol phosphate pathway) opisany został u roślin niższych i bakterii. Istotą jego działania jest w szeregu przemian doprowadzić do biosyntezy pirofosforanu izopentenylu (IPP – isopentenyl pyrophosphate). Drugi ze szlaków biosyntezy kwasu abscycynowego, MVA (kwas mewalonowy ang. mevalonic acid), funkcjonuje równolegle z powyżej wspomnianym u roślin telomowych. W obu przypadkach elementy odpowiedzialne za syntezę kolejnych intermediatów zostały dokładnie zidentyfikowane i udokumentowane (Zhao i in., 2013), jednakże ze względu na jej znaczenie w pracy opisana zostanie druga ze wspomnianych dróg.

Szlak MEP rozpoczyna się od biosyntezy 5-fosforanu 1-D-oksyksylulozy (DXP, ang. 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate), który powstaje w wyniku kondensacji pirogronianu i aldehydu 3-fosfoglicerynowego (G3P, ang. glyceraldehyde 3-phosphate) przy udziale syntazy DXP (DXS, ang. DXP synthase). W kolejnym etapie, DXP jest przekształcany w 4-fosforan 2-metylerytritolu (MEP, ang. 2-methylerythritol 4-phosphate) przez enzym reduktoizomerazę DXP (DXR, ang. DXP reductoisomerase). Następnie w trzech kolejnych etapach, obejmujących fosforylację i cyklizację, MEP jest przekształcany w 2,4-cyklodifosforan metylerytritolu (ME-cPP, ang. ME 2,4-cyclodiphosphate) przez

4-difosfo-cytydylo-2-metylerytritol (CDP-ME) i 2-fosforan 4-difosfo-cytydylo-2-metylerytritolu (CDP-MEP). Otwarcie pierścienia ME-cPP powoduje powstanie 4-pirofosforan hydroksymetylbutenyłu (HMBPP, ang. hydroxymethylbutenyl 4-diphosphate), który może zostać przekształcony w pirofosforan izopentenylu (IPP) lub jego izomer, pirofosforan dimetyloallilu (DMAPP, ang. dimethylallyl diphosphate). Połączenie cząsteczki DMAPP z trzema cząsteczkami IPP prowadzi do powstania pirofosforanu geranylo-geranyłu (GGPP, ang. geranylgeranylo pyrophosphate). Połączenie dwóch cząsteczek GGPP w reakcji katalizowanej przez syntazę fitoenu (PSY, ang. phytoene synthase) prowadzi do powstania 40-węglowego związku (C40) fitoenu. Następnie fitoen w obecności desaturazy fitoenu (PDS, ang. phytoene desaturase) tworzy  $\zeta$ -karoten, który w dalszych etapach jest przekształcany odpowiednio w likopen,  $\beta$ -karoten i zeaksantynę, będącą bezpośrednim prekursorem ABA (Ruiz-Sola i Rodríguez-Concepción, 2012; Marciniak i in., 2014; Wilmowicz i in., 2016; Wang i in., 2019).

Biosynteza kwasu abscysynowego rozpoczyna się w chloroplastach, gdzie zeaksantyna przekształcana jest dzięki aktywności katalitycznej epoksydazy zeaksantyny (ZEP) do cis-izomerów wiolaksantyny i neoksantyny. Związki te są następnie przekształcane przy udziale dioksygenazy 9-cis-epoksykarotenoidowej (NCED, ang. 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenases) w cis-ksantoksynę, która transportowana jest do cytoplazmy i tam ulega konwersji do aldehydu abscysynowego. Intermediat ten utleniany jest do bioaktywnego ABA przez dehydrogenazę/reduktazę alkoholową (SDRA, ang. short-chain dehydrogenase/reductase) oraz oksydazę aldehydu abscysynowego (AAO, ang. abscisic aldehyde oxidase). Z kolei dezaktywacja ABA zachodzi przy udziale enzymów należących do nadrodziny monooksygenazy cytochromu P450 (CYP707A) (Cutler i in., 2010; Hu i in., 2017; Ali i in., 2022).

#### **1.3.1.1.2. Regulacja poziomu ABA**

Choć badania nad mechanizmami działania kwasu abscysynowego trwają od dziesiątek lat i przez wiele nie udało się opisać ich szczegółowo na poziomie molekularnym, to ostatecznie zaproponowano model funkcjonowania, który sukcesywnie uzupełniano go o kolejne elementy. Dzięki tym odkryciom wiadomo, że kwas abscysynowy działa poprzez złożoną sieć sygnalizacyjną. Docelowo poprzez szereg elementów pośrednich aktywując geny sygnałowe inicjuje odpowiedź komórki. Do receptorów ABA, które funkcjonują w nasionach należą białka z rodziny PYR/PYL/RCAR. W obecności ABA wiążą się one zarówno z ABA, jak i białkami, takimi jak SUCROSE NONFERMENTING 1-RELATED PROTEIN KINASE

2s (SnRK2s) oraz PP2C jak np. ABA-INSENSITIVE 1/2 (ABI1/2) i ABA-HYPERSENSITIVE GERMINATION3 (AHG3), aby zatrzymać aktywność fosfatazy białkowej typu 2C (PP2C). W rezultacie uwolnione zostają białka SnRK2s oraz dalsze czynniki transkrypcyjne, jak np. ABI3 (ABA INSENSITIV3) (Ali i in., 2022). Na podstawie badań prowadzonych na *A. thaliana*, trzy geny *SnRK2s* (*SnRK2.2*, *SnRK2.3* i *SnRK2.6*) uznano za pozytywne regulatory sieci sygnalizacyjnej ABA. Są one zaangażowane m.in. w proces zazieleniania nasion, akumulacji materiałów zapasowych, czy nabywania tolerancji na suszę oraz kiełkowanie (Ali i in., 2022). Wykazano, że docelowymi dla aktywności SnRK2s są białka z rodziny czynników transkrypcyjnych ABFs (ABRE binding factors), wiążące elementy regulatorowe ABRE (ABSCISIC ACID RESPONSIVE ELEMENT). W jej skład wchodzi dziewięć członków *ABF1*, *ABF2/ABA-RESPONSIVE ELEMENT BINDING PROTEIN1 (AREB1)*, *ABF3*, *ABF4/AREB2*, *AREB3*, *ABI5*, *bZIP15*, *bZIP67*, oraz *EEL (ENHANCED EM LEVEL)* z podrodziny *bZIP*, których główną funkcją jest regulacja transkrypcji z udziałem ABA. Dobrze opisanym w literaturze jest mechanizm aktywacji transkrypcji *ABI5* przez SnRK2s. Białko regulatorowe wiąże się z elementem typu *cis ABRE* w promotorze *ABI5*, co prowadzi w późnej fazie dojrzewania i podczas imbibicji nasion *Arabidopsis* do inicjacji aktywności transkrypcyjnej stymulowanej przez ABA (Ali i in., 2022).

Jednym z lepiej poznanych mechanizmów determinujących aktywność i trwałość ABA w komórce jest jego udział w odpowiedzi na stres abiotyczny. Rośliny poddane działaniu stresu abiotycznego szybko uruchamiają kaskadę sygnalizacyjną ABA, co prowadzi do aktywacji czynników transkrypcyjnych reagujących na ten hormon i indukcji genów odpowiedzi na ABA. Jednak po osiągnięciu tolerancji na stres konieczne jest przerwanie lub wyłączenie szlaku transdukcji sygnału ABA. Odbywa się to wyznakowanie odpowiednich białek tego szlaku ubikwityną, przez kompleks ligazy E3. Następnie takie białko degradowane jest w proteasomie 26S. Alternatywnym sposobem regulacji ilości białek szlaku transdukcji sygnału ABA jest proces autofagii (degradacji w autofagosomach). Polega on na specyficznym wykształceniu dwubłonowych pęcherzyków otaczających białko, które ulegać ma degradacji. W taki sposób jest ono transportowane do wakuoli. Dzięki fuzji zewnętrznej błony autofagosomu z tonoplastem, przenoszona cząsteczka przedostaje się do wakuoli. Kontrola identyfikacji białek, czy całych kompleksów białkowych odbywa się dzięki obecności swoistych receptorów zlokalizowanych na powierzchni autofagosomów (Ali i in., 2022; Sirko i in., 2021).

### 1.3.1.1.3. Udział ABA w rozwoju nasion

W badaniach prowadzonych na *Arabidopsis thaliana* zaobserwowano dwa wyraźne szczyty akumulacji ABA w nasionach, które odpowiadają początkowi oraz końcowi fazy dojrzewania (Nonogaki, 2019). Pierwszy szczyt pokrywa się z ekspresją genów ograniczających tempo biosyntezy ABA – NCED6 i NCED9 w połowie okresu rozwoju nasion. Natomiast geny NCED2 i NCED3 ulegają ekspresji w okolicach drugiego ze szczytów. Badania na mutantach tych genów wykazały, że nasiona z podwójną mutacją *nced6* i *nced9* cechują się upośledzeniem zdolności do wejścia w fazę spoczynku. Sugeruje to, że ich ekspresja i obecność funkcjonalnych białek jest krytyczna dla mechanizmów kontrolujących ten proces. Podobny efekt w postaci utraty zdolności nasion do spoczynku występował u potrójnych mutantów *nced5*, *nced6* i *nced9*, co świadczy o jeszcze bardziej skomplikowanych zależnościach i wspólnym działaniu wymienionych genów NCED w kontroli tego etapu rozwoju (Nonogaki, 2019).

Wspomniany powyżej ABI5 oddziałuje także z innym kluczowym dla rozwoju nasion czynnikiem – ABA INSENSITIV3 (ABI3), promując transkrypcję pozostałych genów zależnych od ABA, zaangażowanych w rozwój nasion. Należą do nich *LEAFY COTYLEDON* (*LEC1/2*) oraz *FUSCA3* (*FUS3*). Jak wykazały szczegółowe badania nie jest to jedyna rola wspomnianych genów związana z funkcjonowaniem ABA w tych ważnych dla rozwoju generatywnego procesach. ABI3 wraz z *LEC1*, *LEC2* i *FUS3* pośredniczy w biosyntezie ABA w tkankach rozwijających się nasion. Badania prowadzone na mutantach *abi3*, *lec1*, *lec2* i *fus3* wykazały, że defekty w którymkolwiek z wymienionych genów powodowały silne zaburzenia w dojrzewających nasionach, ujawniając także pewne wspólne fenotypy, jak np. ograniczenie zdolności do wejścia w stan spoczynku, czy redukcja ekspresji genów kodujących białka zapasowe. Jednakże obserwowano również specyficzne fenotypy, takie jak brak degradacji chlorofilu w suchych nasionach (*abi3*), zmniejszona wrażliwość na ABA (*abi3* i w mniejszym stopniu *lec1*), akumulacja antocyjanów (*fus3*, *lec1* i w mniejszym stopniu *lec2*), nietolerancja na wysychanie (*abi3*, *fus3* i *lec1*) czy defekty w tożsamości liścieni (*lec1*, *fus3* i *lec2*) (Holdsworth i in., 2008). Doniesienia te potwierdzają istnienie pozytywnej korelacji pomiędzy omawianymi czynnikami transkrypcyjnymi a zawartością ABA i transdukcją sygnałów inicjowanych obecnością tego ważnego fitohormonu (Gazzarrini i in., 2004).

Sposoby regulacji biosyntezy oraz działania ABA zmieniają się zależnie od procesu i przemian, w których uczestniczy ten hormon. Przedstawione powyżej zależności

najdobitniej pokazują, jaki udział w dojrzwaniu i wypełnianiu nasion mogą mieć kolejne składowe sieci zależnej od ABA.

### **1.3.1.2. Kwas giberelinowy (GA)**

Mimo, że do tej pory zidentyfikowano u roślin ponad 130 różnych giberelin (<http://www.plant-hormones.info/gibberellins.html>), tylko niektóre z nich są bioaktywne. Pozostałe natomiast pozostają biologicznie nieaktywne i funkcjonują jako półprodukty i prekursorzy w biosyntezie lub degradacji tych pierwszych. Tylko kilka giberelin, jak GA<sub>1</sub>, GA<sub>3</sub>, GA<sub>4</sub> i GA<sub>7</sub> wykazuje aktywność biologiczną w różnych etapach wzrostu i rozwoju podczas całej ontogenezy roślin. W przemianach takich, jak kiełkowanie nasion, wydłużanie łodyg i rozwój liści, indukcja kwitnienia, dojrzwanie pyłków, rozwój owoców i nasion pełnią one swoiste funkcje i kontrolują cały szereg procesów wzrostu i rozwoju (Ogawa i in., 2003; Davière i Achard, 2013; Gao i in., 2017).

Zważywszy na dużą liczbę giberelin i wiele ról pełnionych przez ten rodzaj hormonów w rozwoju roślin, regulacja ich poziomu jest dość skomplikowana. Wiele etapów szlaku metabolizmu GA podlega kontroli przez enzymy należące do małych wielogenowych rodzin, gdzie każdy członek posiada specyficzny wzór ekspresji (Achard i Genschik, 2009).

#### **1.3.1.2.1. Biosynteza GA**

Biosynteza GA wymaga udziału zestawu kilkunastu klas enzymów, w tym syntaz terpenowych (TPS), monooksygenaz cytochromu P450 (P450s) i dioksygenaz zależnych od 2-oksoglutaranu (2ODDs). Zarówno reakcje enzymatyczne, jak i produkcja bioaktywnych giberelin podlegają precyzyjnej kontroli ze względu na czas oraz subkomórkową lokalizację na poziomie tkanek i organów. Biosyntezę tego fitohormonu można zatem podzielić na trzy etapy, funkcjonujące w trzech przedziałach subkomórkowych: plastydach, retikulum endoplazmatycznym i cytozolu (Gao i in., 2017).

Synteza związków prekursorowych giberelin rozpoczyna się od przekształceń difosforanu geranylo-geranylu (GGDP) i powstania difosforanu izopentenylu (IPP). Związek ten wytwarzany jest w tkankach zielonych większości roślin przez dwie drogi: szlak kwasu mewalonowego (MVA) w cytoplazmie oraz w plastydach przez szlak fosforanu metyloerytroli (MEP) (Salazar-Cerezo i in., 2018).

U roślin wyższych GA powstają głównie na drodze MEP, gdzie GGDP za pomocą enzymu syntazy *ent*-kopalilodifosforanu (CPS) ulega konwersji do *ent*-kopalilu (*ent*-CPD).



Następnie przy udziale syntazy kaurenu (KS) ent-CPD zostaje przekształcany w *ent*-kauren, który w etapie drugim ulega przemianie jest do GA<sub>12</sub>, uważanego za wspólny bezpośredni prekursor wszystkich giberelin w roślinach. Proces ten wymaga sześciu etapów utleniania, które katalizowane są przez dwie monooksygenazy: oksydazę *ent*-kaurenową (KO) i oksydazę kwasu *ent*-kaurenowego (KAO). Enzymy te zlokalizowane są w retikulum endoplazmatycznym i w otoczce plastydów. Utlenianie kwasu *ent*-kaurenowego do GA<sub>12</sub> katalizowane przez KAO zachodzi w trzech etapach, w których jako produkty pośrednie powstają kwas *ent*-7 $\alpha$ -hydroksykaurenowy i aldehyd GA<sub>12</sub>. U roślin wyższych GA<sub>12</sub> stanowi punkt rozgałęzienia szlaku biosyntezy tego hormonu. W kolejnym etapie biosyntezy aldehyd GA<sub>12</sub> przekształcany jest do cząsteczki kwasu giberelinowego, w której do węgla trzynastego (C13) nie jest przyłączona grupa hydroksylowa (-OH). Natomiast w wyniku przyłączenia grupy -OH do trzynastego atomu węgla, GA<sub>12</sub> zostaje przekształcony do GA<sub>53</sub>. GA<sub>12</sub> i GA<sub>53</sub> są prekursorami odpowiednio dla szlaków giberelin niehydroksylowanych w pozycji C13 oraz grupy giberelin z przyłączoną grupą hydroksylową w pozycji 13. Dalsze reakcje utleniania GA<sub>12</sub> i GA<sub>53</sub> prowadzą do powstania GA<sub>9</sub> i GA<sub>20</sub>. Reakcje te katalizowane są przez 20-oksydazę GA (GA20ox) i 3-oksydazę GA (GA3ox). Ostatnim etapem powstawania bioaktywnych GA w roślinach jest 3 $\beta$ -hydroksylacja GA<sub>9</sub> i GA<sub>20</sub>, w wyniku której powstają odpowiednio GA<sub>4</sub> i GA<sub>1</sub> (Salazar-Cerezo i in., 2018).

Precyzyjne określenie miejsca syntezy i przestrzennej organizacji szlaku biosyntezy giberelin jest utrudnione z uwagi na złożoność i wieloetapowość tego procesu. Badania z wykorzystaniem genu reporterowego *GUS* dla różnych enzymów biosyntezy GA ujawniły kilka spostrzeżeń. Po pierwsze, ekspresja genów biosyntezy giberelin jest zróżnicowana w zależności od rodzaju tkanki, typu komórek czy stadium rozwoju. Po drugie, kilka enzymów rodziny GA3ox katalizujących ostatni etap syntezy bioaktywnych GA ulega ekspresji w rosnących i wydłużających się pędach oraz narządach korzeni. Po trzecie, pomimo, że wyróżnia się kilka rodzajów tkanek o wspólnej lokalizacji ekspresji genów zarówno biosyntezy, jak i percepcji GA (przykładem jest merystem kwiatostanu i rozwijające się liście), to istnieją także miejsca, w których te dwie grupy nie nakładają się (np. w komórkach aleuronowych bielma, geny sygnalizacji GA są wyraźnie ekspresjonowane, ale geny biosyntezy GA już nie). Zróżnicowane rozmieszczenie przestrzenne między genami zaangażowanymi w biosyntezę i percepcję giberelin wymaga więc przemieszczania się cząsteczek aktywnych lub intermediów. Wydaje się to w pełni zasadne, wzięwszy pod uwagę jak wiele procesów i przemian kontrolowanych jest przez te hormony oraz w jak niewielkich

zakresach ilościowych i wrażliwości komórkowej na ich obecność one reagują (Binenbaum i in., 2018).

Transport giberelin odbywa się zarówno w kierunku akro- jak i bazypetalnym, chociaż w przypadku tego pierwszego zachodzi efektywniej. Wiele badań potwierdziło hipotezę mówiącą o mobilności tego hormonu, a także o konieczności jego przemieszczania się ze względu na pełnienie nadrzędnej roli w procesach niezbędnych do wzrostu i rozwoju roślin (Binenbaum i in., 2018). Wydaje się, że przemieszczanie się GA na duże odległości jest w większości ograniczone do jego nieaktywnych prekursorów, a nie jak podejrzewano wcześniej do funkcjonalnych form aktywnych. Gibereliny podobnie do auksyn podlegają mechanizmowi pułapki jonowej, co ogranicza ich zdolność do wychodzenia z komórek. Przypuszcza się, że istnieją transportery, a jednocześnie kontrolery wypływu GA, aby cząsteczki tego hormonu mogły skutecznie przemieszczać się lokalnie w obrębie tkanek i komórek. Jednakże, jak dotąd, nie zostały one odkryte i jednoznacznie opisane. Kilka lat temu u *Arabidopsis* zidentyfikowano natomiast pewną liczbę transporterów napływu GA, które odpowiedzialne są m.in. za transport GA *in planta*. Są to białka z rodzin NPF (nitrate transporter 1/peptide transporter family) oraz SWEET (Sugars Will Eventually be Exported Transporter) (Tal i in., 2016; Binenbaum i in., 2018).

#### 1.3.1.2.2. Regulacja poziomu GA

Dla prawidłowego wzrostu i rozwoju rośliny niezbędne jest precyzyjne regulowanie poziomu bioaktywnych hormonów i możliwość szybkiej zmiany ich ilości w odpowiedzi na bodźce środowiskowe, czy endogenne. Mechanizm inaktywacji giberelin pozwala roślinom utrzymywać homeostazę i w razie potrzeby szybko obniżać stężenie aktywnych GA. Najczęściej badaną ścieżką dezaktywacji tego fitohormonu jest 2 $\beta$ -hydroksylacja, którą katalizują enzymy 2-oksydazy GA (GA2ox) zależne od 2-oksoglutaranu (2ODDs). Na podstawie zależności filogenetycznych rodzinę GA2ox podzielono na trzy klasy. Enzymy należące do klasy I i II katabolizują gibereliny dziewiętnastowęglowe (C19 GA), natomiast enzymy zaliczane do klasy III mogą jedynie hydrolizować gibereliny o dwudziestu atomach węgla (C20). Enzym C19GA2ox może hydroksylować węgiel w pozycji drugiej bioaktywnych C19-GA (GA<sub>1</sub> i GA<sub>4</sub>), jak również prekursory C19-GA, jak GA<sub>9</sub> i GA<sub>20</sub>, aby wytworzyć katabolity, odpowiednio GA<sub>8</sub>, GA<sub>34</sub>, GA<sub>29</sub> i GA<sub>51</sub>. Podgrupa enzymów oksydazy GA2 hydroksylująca gibereliny dwudziestowęglowe (C20GA2ox) działa wyłącznie na prekursory C20-GA, takie jak GA<sub>12</sub> i GA<sub>53</sub>, tworząc GA<sub>110</sub> i GA<sub>97</sub>, ale nie na dziewiętnastowęglowe GA. Enzymy C20GA2ox zawierają trzy unikatowe konserwowane

ewolucyjnie motywy, które są ważne dla aktywności tej klasy GA2ox, ale są nieobecne w klasie C19GA2ox. Oksydacja dziewiętnastowęglowych GA2ox ogranicza ilość bioaktywnych giberelin, co przekłada się na regulacje rozwoju roślin podczas całej ontogenezy. Enzymy te uczestniczą również w głównym szlaku inaktywacji giberelin, który ogranicza zawartość bioaktywnych form tego fitohormonu oraz reguluje wzrost i rozwój roślin. Jak wykazały szczegółowe badania zapobiegają one kiełkowaniu nasion, opóźniają przemiany faz wegetatywnych i generatywnych, ograniczają liczebność kwiatów wytwarzanych w kwiatostanie a także hamują wydłużanie słupka przed zapłodnieniem (Yamaguchi, 2008; Hedden i Thomas, 2012; Gao i in., 2017).

Prowadzone przez wiele lat badania wykazały, że istnieje także inny mechanizm dezaktywacji GA. W doświadczeniach prowadzonych na ryżu wykazano, że monooksygenaza cytochromu P450 (CYP714D1) kodowana przez *ELONGATED UPPERMOST INTERNODE (EUI)* przekształca *in vitro* GA w 16 $\alpha$ ,17-epoksy-GA. Enzymy te katalizują 16 $\alpha$ ,17-epoksydację GA jedynie w szlaku swoistym dla giberelin bez grupy -OH przy trzynastym atomie węgla (GA<sub>12</sub>, GA<sub>9</sub> i GA<sub>4</sub>). Nie wykazano podobnych zależności w przypadku giberelin powstających w drugim z opisanych wcześniej szlaków syntezy, czyli dla GA (GA<sub>53</sub>, GA<sub>20</sub> i GA<sub>1</sub>). Mutanty *eui* w ryżu wykazywały ekstremalnie wysoki poziom akumulacji GA<sub>4</sub>, z kolei ektopowa ekspresja *EUI* pod kontrolą promotora 35S lub promotorów genów biosyntezy GA *OsGA3ox2* i *OsGA20ox2* wyraźnie obniżała poziom GA oraz powodowała skrajną karłowatość roślin. Wyniki te wskazują na rolę *EUI* jako głównego enzymu dezaktywującego gibereliny u ryżu, a 16 $\alpha$ ,17-epoksydacja GA może być ogólnym mechanizmem dezaktywacji tego fitohormonu (Gao i in., 2017). U *Arabidopsis* wykazano także obecność specyficznych dla giberelin dwóch metylotransferaz grupy SABATH, nazywanych *GAMT1* i *GAMT2* (GA methyl transferase). Enzymy te poprzez metylację grupy 6-karboksyłowej C19-GA znosiły aktywność biologiczną, dlatego też ektopowa nadekspresja *GAMT1* lub *GAMT2* powodowała karłowatość roślin i niedobór GA. Nasiona pozbawione funkcji tych genów kumulowały GA, co wskazuje na pełnienie przez nie roli regulatorów zawartości giberelin w rozwijających się nasionach (Varbanova i in., 2007).

Metylacja giberelin jest więc częścią mechanizmu regulującego poziom aktywnych GA w roślinach. Szlak metabolizmu GA, który obejmuje biosyntezę i katabolizm GA, jest złożonym procesem regulowanym przez wiele genów w całym cyklu życiowym wzrostu i rozwoju roślin. Za utrzymanie homeostazy giberelin odpowiedzialne są zarówno procesy ich syntezy, jak i rozkładu a także transport. Poziom bioaktywnych GA jest utrzymywany przez mechanizm sprzężenia zwrotnego metabolizmu GA oraz jego regulację. Odbywa się to

głównie na poziomie kontroli transkrypcji. Badania prowadzone na mutantach biosyntezy i odpowiedzi na GA u kilku gatunków roślin wykazały, że regulacja poziomu GA poprzez mechanizm syntezy mRNA dotyczy specyficznych ODD (dioksygenaz zależnych od 2-oksoglutaranu: *GA20ox*, *GA3ox*, *GA2ox*) (Hedden i Thomas, 2012). U mutantów z niedoborem produkcji bioaktywnych GA lub upośledzoną sygnalizacją GA, poziomy transkrypcji genów biosyntezy tego hormonu (*GA20ox* i *GA3ox*) były wysokie, podczas gdy ekspresja genów katabolicznych (*GA2ox*) była obniżona. Odwrotną sytuację odnotowano z kolei u mutantów z podwyższonymi poziomami GA lub wzmocnioną sygnalizacją GA (Zentella i in., 2007).

Dodatkowy sposób utrzymania i regulacji homeostazy GA obejmuje sprzężenie zwrotne odnotowane w kontroli ekspresji genów *GA2ox*. Wykazano, że wielu członków genów *GA2ox* zarówno klasy C19, jak i C20 podlega regulacji na poziomie transkrypcji w odpowiedzi na zwiększoną sygnalizację GA. Efektem zmian transkrypcyjnych genów ODD wywołanych przez GA są zmiany na poziomie kodowanych przez nie enzymów metabolicznych, co w konsekwencji przekłada się na zmiany poziomu bioaktywnych giberelin (Hedden i Thomas, 2012).

W regulacji homeostazy giberelin ważną rolę odgrywają także centralne komponenty szlaku przekazywania sygnału tego hormonu: receptor *GID1*, białka *DELLA* oraz białka *F-box SLY1* (*SLEEPY1*). Białka *DELLA* są kluczowymi regulatorami szlaku transdukcji sygnału GA, zlokalizowanymi w jądrze, gdzie pełnią funkcje represorów wzrostu. Zadaniem GA jest zatem przezwyciężenie hamującego działania białek *DELLA* i promowanie wzrostu oraz rozwoju roślin. Wzrost ilości aktywnych GA odbierany jest przez rozpuszczalne białko receptorowe *GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF1* (*GID1*). Receptor po związaniu giberelin ulega zmianie konformacyjnej, umożliwiając w ten sposób tworzenie kompleksu *GA-GID-DELLA* i bezpośrednie oddziaływanie z ubikwityno-zależnym kompleksem ligazy *E3 Skp1-Cullin-F-box* (*SCF*). Do wiązania dochodzi za pośrednictwem białka *F-box* (*SLY1*) u rzodkiewnika pospolitego i *GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF2* (*GID2*) u ryżu. Dzięki takiej interakcji, *DELLA* są znakowane przez reszty ubikwitynowe i kierowane do proteasomu 26S, gdzie ulegają degradacji (Gao i in., 2017).

W badaniach nad regulacją ogólnej puli giberelin wykazano, że zmiany w poziomie białek *DELLA* wywoływały zmiany ekspresji genów regulowanych przez sprzężenie zwrotne *GA20ox2* i *GA3ox1* (Zentella i in., 2007). U mutantów pozbawionych podstawowych składników szlaku transdukcji sygnału GA, w tym *GID1*, *GID2/SLY1* odnotowano wysoki poziom ekspresji genów biosyntezy GA, które regulowane są poprzez funkcjonowanie

mechanizmu sprzężenia zwrotnego. Podwyższona ilość transkryptów utrzymywała się nawet pomimo egzogennej aplikacji GA, przez co rośliny te gromadziły bardzo wysokie poziomy bioaktywnych giberelin (Hedden i Thomas, 2012). Funkcja białek DELLA w kontrolowaniu odpowiedzi zwrotnej okazała się także niezbędna u mutantów z utratą funkcji tych białek jak i u tych z wzmocnioną funkcją DELLA, w których białka te są odporne na degradację zależną od GA. Wykazano, że regulacja transkrypcji na zasadzie sprzężenia zwrotnego była zaburzona w obu klasach mutantów DELLA, przy czym poziom transkrypcji był bardzo niski u roślin pozbawionych DELLA, a bardzo wysoki u tych, które zawierały stabilizowane formy tych białek (Hedden i Thomas, 2012).

W kolejnych doświadczeniach potwierdzono opisany schemat kontroli DELLA. Jednocześnie oznaczone poziomy transkrypcji okazały się być niskie u tych, w których brak DELLA, ale bardzo podwyższone u tych zawierających stabilizowane formy. Większość z tych badań skupiała się na roli DELLA w regulacji sprzężenia zwrotnego GA20ox i GA3ox. Jednak ostatnie badanie mutantu utraty funkcji DELLA u grochu (*la cry*) wykazało, że regulacja PsGA2ox1 i PsGA2ox2 za pośrednictwem GA jest również kontrolowana przez białka należące do rodziny DELLA (Weston i in., 2008).

Metabolizm giberelin regulowany jest również przez sygnały środowiskowe takie jak światło, temperatura, czy dostępność wody i składników pokarmowych, ale także przez bodźce stresowe zarówno abiotyczne, jak i biotyczne. Na podstawie wielu badań wykazano, że zmiany w zawartości GA powodowane są głównie przez światło i stres abiotyczny. Zmiany w ilości oraz jakości światła lub długości trwania fazy jasnej (fotoperiodu) mogą skutkować zwiększoną lub zmniejszoną ilością giberelin w komórkach. Przykładem są siewki we wczesnym etapie rozwoju, kiedy aktywność GA hamuje fotomorfogenezę, a ekspozycja na światło siewek rosnących w ciemności (deetiologia) powoduje szybkie zmniejszenie zawartości GA. W procesie tym uczestniczą receptory światła: fitochromy oraz kryptochromy. Aktywacja fitochromów swoistą długością fali świetlnej powoduje wzrost ekspresji genów *GA2ox*, zaś działanie światła niebieskiego, odbieranego przez drugi z wspomnianych fotoreceptorów, wywołuje spadek ekspresji genów *GA20ox* i *GA3ox* (Reid i in., 2002; Zhao i in., 2007).

Również zegar okołodobowy bezpośrednio wpływa na biosyntezę i sygnalizację GA. Gibereliny promują kwitnienie u gatunków dnia długiego (Long Day – LD), u których ekspozycja na długi dzień zwiększa produkcję GA, głównie przez regulację genów *GA20ox*. W związku z tym wydłużanie łodyg w warunkach dnia długiego jest efektem zwiększonej ekspresji *GA20ox* w odpowiedzi na odpowiedni fotoperiod. Z kolei u roślin dnia krótkiego

przy braku aktywności szlaku zależnego od CONSTANS, gibereliny mogą całkowicie przejąć rolę czynników indukujących kwitnienie (Hedden i Thomas, 2012; Gao i in., 2017).

Poziom giberelin zmienia się także pod wpływem zimna. W procesie tym uczestniczą enzymy szlaku biosyntezy oraz dezaktywacji GA. W badaniach prowadzonych na *Arabidopsis* wykazano, że niska temperatura aktywuje biosyntezę GA podczas imbibicji nasion, wówczas dochodzi do indukcji genów *AtGA3ox1* i *AtGA20ox2*, a w konsekwencji do zwiększenia stężenia GA. Z kolei mutacja genu *AtGA3ox1* powodowała zaburzenia w gromadzeniu GA<sub>4</sub> oraz anomalie w przebiegu kiełkowania nasion (Yamauchi i in., 2004).

Rośliny w odpowiedzi na stres wykształciły wiele strategii obronnych. Jedną z nich jest ograniczanie wzrostu, które pozwala skoncentrować zasoby w celu adaptacji do niekorzystnych warunków. W tym czasie dochodzi do gromadzenia się białek DELLA w odpowiedzi na zmniejszający się poziom aktywnych giberelin w komórce. Proces ten wywołany jest rosnącą ekspresją genu *GA2ox*. Przykładem funkcjonowania takiego mechanizmu obronnego jest akumulacja białek DDF1 (DWARF AND DELAYED FLOWERING 1) w odpowiedzi na stres solny. Białka te wiążąc się do promotora genu *AtGA2ox7* aktywując jego ekspresję co w konsekwencji prowadzi do obniżenia zawartości GA (Magome i in., 2008).

### 1.3.1.2.3. Udział GA w rozwoju nasion

Podobne sposoby regulacji poziomów aktywnych giberelin funkcjonują w mechanizmach i procesach związanych z wypełnianiem nasion i gromadzeniem materiałów zapasowych. Także i w tych przemianach wykazano jednoznacznie udział czynników transkrypcyjnych należących do LEAFY COTYLEDON2 (LEC2) i FUSCA3 (FUS3) w kontrolowaniu poziomu ekspresji genu *GA3ox2*. Funkcja wspomnianych powyżej czynników transkrypcyjnych jest niezwykle istotna a wzajemne zależności pomiędzy nimi a poziomem endogennych GA są kluczowe w przemianach warunkujących optymalny rozwój i przebieg embriogenezy nasion (Curaba i in., 2004).

Szczegółowe badania wykazały, że w wyniku aktywacji białka FUS3 następuje szybki spadek aktywności transkrypcyjnej *AtGA3ox1*. Dochodzi do tego dzięki oddziaływaniu czynnika transkrypcyjnego z elementami RY (CATGCATG) zlokalizowanymi w promotorze genu *AtGA3ox2*. Efektem wiązania jest spadek ekspresji genu w epidermie rozwijającego się zarodka (Gazzarrini i in., 2004).

Warto nadmienić, że zwiększona ilość białka FUS3 wiąże się także ze wzrostem zawartości ABA w komórce. To w konsekwencji przekłada się na hamowanie ekspresji

dwóch genów biosyntezy giberelin *AtGA3ox1* i *AtGA20ox1*. Z tego powodu FUS3 pełni zarazem funkcje pozytywnego, jak i negatywnego regulatora zawartości odpowiednio ABA i GA (Curaba i in., 2004; Gazzarrini i in., 2004). Jednakże w badaniach prowadzonych na mutancie *fus3* wykazano, że negatywny wpływ na poziom giberelin poprzez wzrost aktywności *GA3ox2* może nie wynikać bezpośrednio z funkcji FUS3, a może być związany ze szczególną rolą giberelin na wczesnych etapach rozwoju zarodka (Yamamoto i in., 2010).

Reasumując, aktywność giberelin przejawia się w regulacji całego szeregu procesów i przemian zachodzących w czasie całej ontogenezy roślin. W znacznej większości tych procesów gibereliny pełnią rolę nadrzędną. Dla tak krytycznie ważnego czynnika musi istnieć wiele poziomów regulacji, konieczne jest także funkcjonowanie skomplikowanej sieci zależności kontrolującej homeostazę giberelin na wielu poziomach, zarówno biosyntezy, degradacji, transportu, jak i akumulacji. W dalszym ciągu odkrywane są nowe zależności, opisywane są szczegółowe przypadki regulacji funkcjonowania giberelin przez różnego rodzaju białka będące czynnikami transkrypcyjnymi, białkami receptorowymi, czy też białkami regulatorowymi. Są one zaangażowane w przebieg wielu procesów metabolicznych oraz przemian wzrostowych i rozwojowych u roślin wyższych.

### 1.3.1.3. Auksyny (IAA)

Auksyny są cząsteczkami występującymi u wielu gatunków organizmów, od bakterii po eukarionty. Definiowane są jako kwasy organiczne o małej masie cząsteczkowej, które zawierają pierścień aromatyczny i grupę karboksylową. Auksyny są wszechobecne w czasie całej ontogenezy roślin. Na poziomie komórkowym zaangażowane są w kontrolę podziałów komórkowych np. regulują tworzenie merystemów, dając początek nowym organom takim jak korzenie boczne i przybyszowe. Zmieniając plastyczność ściany komórkowej odpowiadają także za wzrost komórek. Co więcej, auksyny promują ustanowienie i utrzymanie polaryzacji, dominacji wierzchołkowej oraz reakcji na foto- i grawitropizm. Pośredniczą także w kontroli starzenia, odpowiedzi na patogeny czy stres abiotyczny, regulują tworzenie owoców i odcinanie liści (Sauer i in., 2013).

#### 1.3.1.3.1. Biosynteza IAA

Endogenną auksyną występującą w największej ilości w komórkach roślin jest kwas indolilo-3-octowy (IAA). Podobną aktywność wykazują także trzy inne naturalnie występujące związki: kwas indolo-3-masłowy (IBA), kwas 4-chloroindolo-3-octowy (4-Cl-IAA) oraz kwas fenylooctowy (PAA) (Sauer i in., 2013). Jak dowiodły szczegółowe badania nad działaniem tej grupy regulatorów, mimo że IBA strukturą i funkcją podczas wzrostu i rozwoju roślin przypomina IAA, to jest jednak tylko jego prekursorem. Efekty fizjologiczne, sygnalizację i odpowiedź auksynową może wywoływać dopiero po przekształceniu w IAA (Cao i in., 2019). Synteza IAA u *Arabidopsis thaliana* może zachodzić w sposób zależny jak i niezależny od tryptofanu (Trp). Do tej pory nie opisano szczegółowo molekularnych składników szlaku niezależnego od tego aminokwasu. Zaś szlak zależny od niego obejmuje cztery ścieżki, wykorzystujące różne substraty pochodzące z metabolizmu tryptofanu, a mianowicie: indolo-3-acetaldoksym (IAOx), indolo-3-acetamid (IAM), kwas indolo-3-pirogronowy (IPyA) i tryptaminę (TAM). Jak dotąd, szczegółowo poznany i opisany został jedynie szlak IPyA. Dochodzi w nim do dwuetapowej reakcji przekształcenia Trp w IAA. Najpierw, podczas odwracalnej reakcji przeniesienia aminokwasów za pomocą aminotransferazy tryptofanu (TAA, ang. TRYPTOFAN AMINOTRANSFERASE OF ARABIDOPSIS) IAA przekształcany jest w IPyA. Ponieważ IPyA może być przekształcany z powrotem do Trp przez aminotransferazę zależną od fosforylacji pirydoksalu (VAS1) przy użyciu metioniny (Met) jako donora aminowego, stężenie IPyA utrzymywane jest w sposób ciągły na stałym poziomie.



Następnie monooksygenazy flawinowe (FMO) typu YUCCA (YUC) katalizują reakcję dekarboksylacji oksydacyjnej I<sub>PyA</sub>, w wyniku której powstaje IAA. Utworzony IAA może zostać połączony z aminokwasami przez rodzinę syntaz amidowych (GH3, ang. GRETCHEN HAGEN 3) lub ulegać nieodwracalnemu utlenieniu przez dioksygenazę (DAO) w celu degradacji (Cao i in., 2019).

Do wytworzenia i utrzymania lokalnego stężenia auksyny niezbędny jest jej międzykomórkowy transport, który regulowany jest przez różne transportery, m.in. transportery PIN-FORMED (PIN), transportery kasetowe wiążące ATP (ABC), a także importery AUXIN1 (AUX1)/LIKE AUXIN1 (LAX). Niektóre z transporterów auksyn mają wewnątrzkomórkową lokalizację, jak np. zlokalizowane w retikulum endoplazmatycznym PIN-LIKES (PILS), czy związane z tonoplastem WALLS ARE THIN1 (WAT1), które prawdopodobnie uczestniczą w subkomórkowej kompartmentalizacji tego hormonu (Tan i in., 2021).

#### **1.3.1.3.2. Regulacja poziomu IAA**

Nośniki wypływu PIN są kluczowe do utrzymania homeostazy auksyn, a w warunkach regulacji procesów morfogenetycznych także odpowiedniego gradientu tych hormonów. Odgrywają one również istotną funkcję w zjawiskach tropizmu i różnicowania się organów. Biosynteza białek PIN regulowana jest na różnych poziomach organizacji komórkowej czy tkankowej, zależnej od stadium rozwoju i miejsca ich występowania. Często ich aktywność podlega potranslacyjnym regulacjom, przez wiele hormonów, w tym cytokininy, gibereliny, kwas jasmonowy, kwas salicylowy, kwas abscysynowy, brasinosteroidy, strigolaktony, a także same auksyny. Pozwala to twierdzić, że kierunkowy transport auksyny zależny od PIN funkcjonuje jako główny węzeł skupiający i integrujący wiele sygnałów, zarówno endogennych, jak i środowiskowych (Tan i in., 2021).

Liczne przemiany zachodzące w roślinach pod wpływem auksyn wynikają ze zmian ekspresji genów reagujących na ten hormon. Jako kanoniczny szlak sygnałowy auksyn uznawany jest szlak, w obrębie którego funkcjonują takie białka jak TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE1/AUXIN SIGNALING F-BOX (TIR1/AFB). W ścieżce tej, odpowiedź na IAA kontrolowana jest przez czynniki transkrypcyjne odpowiedzi na auksynę Auxin Response Factor (ARF). Istotną rolę odgrywają także białka Aux/IAA, które są centralnymi represorami tego szlaku. Oddziałują one nie tylko z TIR1/AFB, ale także z czynnikami ARF oraz ich aktywatorami. Aktywatory ARF indukują transkrypcję genów reagujących na auksynę poprzez domenę wiążącą DNA (DBD) zlokalizowaną na końcu

aminowym, która wiąże się z elementami odpowiedzi na auksynę AuxRE (Auxin Response Element) w promotorach genów docelowych. Kiedy stężenie auksyn jest niskie, białka Aux/IAA hamują aktywność czynników transkrypcyjnych ARF. Gdy dochodzi do wzrostu poziomu IAA w komórce, białka F-box TIR1/AFB oraz Aux/IAA łączą się, tworząc rdzeń receptora auksyny i bezpośrednio wiążą ten hormon. Wspomniane białko F-box TIR1/AFB wchodząc w skład kompleksu ligazy ubikwitynowej E3 Skp1-Cullin-F-box (SCF) poliubikwityluje białko represorowe Aux/IAA. W ten sposób ostatni z wymienionych czynników kierowany jest do degradacji przez proteasom 26S. W konsekwencji ARF zostają uwolnione i możliwa jest transkrypcja genów reagującego na auksynę. Dzięki takiej interakcji receptor-ligand, łańcuch transdukcji sygnału jest bardzo krótki co ułatwia szybkie odpowiedzi transkrypcyjne na auksynę (Enders i Strader, 2015; Wu i in., 2021; Li i in., 2017a). Wydaje się, że opisywana powyżej ścieżka sygnalizacji auksyn pośredniczy w większości scharakteryzowanych reakcji na ten hormon, jednakże niektóre aspekty odpowiedzi na auksynę wciąż nie są poznane. Jak widać odpowiedź komórkowa na poziomie mechanizmów molekularnych dwóch podstawowych dla funkcjonowania roślin fitohormonów angażuje podobne przemiany związane z funkcją receptorów, transmitterów i czynników efektorowych.

Mimo funkcjonowania wspomnianego krótkiego łańcucha transdukcji sygnału, odpowiedź transkrypcyjna uważana jest za stosunkowo powolną. Przez słabo poznane szlaki brak jest precyzyjnych wyników dokumentujących przekazywanie sygnału auksynowego w mechanizmach szybszych odpowiedzi hormonalnych (Tan i in., 2021). Przykładem może być AUXIN BINDING PROTEIN 1 (ABP1), który jak nazwa wskazuje, jest zdolny do wiązania auksyny. Większość tych białek znajduje się w retikulum endoplazmatycznym, a tylko niewielki ich procent zlokalizowany jest poza komórką, stanowiąc aktywną pulę. Badania prowadzone w ostatnich latach wykazały, że ABP1 działa jako koreceptor hormonów w kompleksie ABP1-TMK1, regulując dynamikę GTPazy ROP i cytoszkieletu w komórkach naskórka. Jednakże mimo wielu biologicznych reakcji komórek, które uznano za zależne od ABP1, nie zbadano szczegółowo powiązanych z nimi fenotypów na poziomie całej rośliny. Obserwowano jedynie niewielkie zmiany pomimo silnych efektów odnotowanych na poziomie komórkowym (Leyser, 2018; Tan i in., 2021).

Wszystkie procesy zachodzące podczas biosyntezy, transportu, transdukcji sygnału czy metabolizmu auksyn regulują przestrzenno – czasowy rozkład aktywnej puli tego hormonu. Jest to niezbędne do utrzymania optymalnego poziomu IAA podczas rozwoju całej rośliny, także etapów szczególnie traktowanych w ramach niniejszej pracy.

### 1.3.1.3.3. Udział IAA w rozwoju nasion

Auksyna jest jedną z najważniejszych cząstek sygnałowych biorących udział w komunikacji między tkankami nasiona, głównie zarodkiem i bielmem. Odgrywa kluczową rolę w pierwszych etapach rozwoju nasion oraz określaniu struktury i wielkości zarodka. Współdziałając z innymi hormonami, bierze także udział w spoczynku oraz kiełkowaniu. Jej akumulacja i dystrybucja zmienia się w trakcie rozwoju nasion. Badania prowadzone na *A. thaliana* wykazały, że największa ilość IAA gromadzona jest w zarodkach, a dokładniej w wierzchołku korzenia, na końcach liścieni i w hipofizie. Z kolei u kukurydzy, poziom auksyny jest najwyższy na początku endoreduplikacji i utrzymywany jest na wysokim poziomie przez cały okres rozwoju (Locascio i in., 2014).

Z kolei badania z udziałem mutantów z upośledzonym szlakiem biosyntezy lub sygnalizacji auksyny u różnych gatunków roślin wykazały, że obniżenie poziomu auksyny ma znaczący wpływ na tempo proliferacji czy endoreduplikacje bielma. Obserwacje te potwierdziły rolę IAA jako czynnika determinującego regulację rozwoju bielma, nawet pomimo jego różnej funkcji u różnych gatunków roślin. Przypuszcza się także, że sygnałami inicjacji tworzenia okrywy nasiennej mogą być cząsteczki hormonów, a w szczególności auksyny. Potwierdziły to badania, w których zainicjowanie autonomicznego rozwoju okrywy nasiennej następowało po egzogennym podaniu auksyny lub jej ektopowej produkcji w komórkach centralnych niezapłodnionych zalążków *Arabidopsis*. Ograniczenie biosyntezy IAA w bielmie znacząco wpływa także na rozwój okrywy nasiennej, co potwierdza niezbędną rolę auksyny w wykształcaniu tej struktury (Figueiredo i Köhler, 2018). Coraz większą uwagę poświęca się także badaniu roli białek PIN podczas rozwoju nasion. Wyniki przeprowadzonych badań potwierdziły, że polarny transport auksyny jest powiązany z różnicowaniem zarodków. Równocześnie za rozwój nasion odpowiada zależny od funkcjonowania białek PIN wpływ IAA, co potwierdziły nie tylko wyniki wzorców ekspresji, ale także analiz morfologicznych. Zastosowanie syntetycznego promotora reagującego na auksynę DR5 ujawniło także, że podczas rozwoju zarodków działają podstawowe elementy ścieżki transdukcji sygnału auksyny. Akumulacja i odpowiedź auksyny staje się wykrywalna bezpośrednio po podziale zygot w komórce wierzchołkowej, a następnie wzrasta w rozwijającym się przedzarodku, przy słabym sygnale w suspensorze (Cao i in., 2020). Niektóre składniki sygnalizacji auksyn bądź geny podlegające regulacji przez ten szlak mogą zmieniać wielkość i masę nasion. Przykładem są ARF6 i ARF8, częściowo

kontrolowane przez miRNA167, wydają się niezbędne dla wielkości nasion u *Camelina* (Cao i in., 2020).

#### **1.3.1.4. Pozostałe fitohormony**

Choć główne hormonalne regulatory rozwoju nasion zostały już opisane, warto także wspomnieć o niebagatelnej roli pozostałych fitohormonów w kontroli przemian fizjologicznych i morfologicznych w rozwijających się nasionach.

Główną rolę cytokinin (CK) u roślin jest regulacja proliferacji i różnicowania komórek. We wczesnych stadiach rozwoju bielma i różnicowania zarodków odnotowano w nasionach względnie wysoki poziom tego hormonu. Badania poziomu transkrypcji genów kodujących enzymy zaangażowane w syntezę cytokinin wykazały, że do ich ekspresji dochodzi głównie w bielmie, szypułce i zarodku krótko po zapyleeniu (Locascio i in., 2014).

Z kolei brasinosteroidy (BR) regulują liczbę zalążków oraz wielkość i kształt nasion, uzupełniając funkcje cytokininy i auksyny. Kontrolują rozwój zarodka i bielma, a następnie nasiona poprzez regulację ekspresji genów zaangażowanych w rozwój bielma poprzez bezpośrednie lub pośrednie działanie białka BRASSINAZOLE RESISTANT1 (BZR1). Uczestniczą również w regulacji kiełkowania nasion, współdziałając z giberelinami, przeciwstawnie do ABA (Locascio i in., 2014).

Etylen natomiast, uczestniczy głównie w regulacji kiełkowania i regulacji stanu spoczynku nasion wielu gatunków roślin poprzez złożoną sieć sygnalizacji hormonalnej i współdziałania z innymi hormonami. W zasadniczych aspektach, działanie to jest na poziomie molekularnym podobne do tych opisanych w wielu innych procesach rozwojowych. Egzogenne podanie tego hormonu, lub etefonu - związku uwalniającego etylen, stymuluje kiełkowanie nieuśpionych nasion, inkubowanych w nieoptymalnych warunkach środowiskowych. Może także przerwać pierwotny i wtórny stan uśpienia. Etylen oddziałuje także z ABA i GA, a hormony te są także niezbędnymi regulatorami kiełkowania i spoczynku nasion (Corbineau i in., 2014).

Rola kwasu jasmonowego w rozwoju nasion, jak dotąd, została słabo opisana. Istnieją doniesienia mówiące o gromadzeniu się kwasu jasmonowego (JA) w tkankach podczas rozwoju kwiatów i nasion. Jego akumulacji towarzyszy także ekspresja genów indukowanych przez jasmoniany. Profil związków jasmonianowych w kwiatkach i nasionach obejmuje aktywne cząsteczki sygnalizacyjne, takie jak JA, jego prekursor kwas 12-oksofitodienowy (OPDA), który u pomidora bierze udział w rozwoju zarodka. W dużej ilości znajdowano także koniugaty aminokwasów JA, jak np. JA-Ile (koniugat kwasu

jasmonowego z izoleucyną), czy cząsteczki sygnalizacyjne jak 12-hydrokso-JA oraz jego siarczanowa pochodna (Wasternack i in., 2013).

Ostatnie z fitohormonów, strigolaktyny (SL), zostały odkryte jako związki szkodliwe dla roślin ze względu na ich rolę jako stymulatorów kiełkowania nasion pasożytniczych. Jednakże później odkryto ich bardziej korzystne znaczenie we wzroście i rozwoju roślin (Pandey i in., 2016). Do chwili obecnej jest mało doniesień opisujących rolę SL podczas rozwoju nasion. Częściej spotkać można ogólne stwierdzenia o ich udziale w kiełkowaniu np. u *Arabidopsis thaliana* (Mishra i in., 2017) lub rozwoju nasion u ryżu (Yamada i in., 2019).

#### **1.3.1.5. Współdziałanie hormonów podczas rozwoju nasion**

Liczne badania wykazały oddziaływania pomiędzy różnymi fitohormonami o charakterze antagonistycznym i/lub synergistycznym, tworzące skomplikowane sieci w regulacji rozwoju nasion. Przykładem takiego działania są kwas giberelinowy i kwas abscysynowy, które w większości odgrywają antagonistyczne role w procesach rozwojowych i reakcjach na bodźce środowiskowe. Różne sygnały, tak wewnętrzne jak i zewnętrzne, regulują w odwrotny sposób biosyntezę i katabolizm tych hormonów, co bezpośrednio i pośrednio przekłada się na ich szlaki sygnałowe i późniejsze odpowiedzi (Liu i Hou, 2018).

Z tego powodu równowaga między katabolizmem a syntezą ABA/GA, na którą wpływają szlaki sygnałowe, stabilizuje równowagę między kiełkowaniem a spoczynkiem nasion, np. podczas fotoodwracalnego kiełkowania nasion *Arabidopsis*. Wówczas, kiedy szlak fitochromowy pozytywnie reguluje biosyntezę GA za pośrednictwem światła, aktywowana zostaje transkrypcja genów biosyntezy *GA3ox1* i *GA3ox2*, a zahamowaniu podlega transkrypcja genu biosyntezy *GA2ox2* odpowiedzialnej za dezaktywację giberelin. W konsekwencji prowadzi to do gromadzenia się aktywnego GA niezbędnego w procesie kiełkowania. W tym samym czasie, biosynteza i dezaktywacja ABA również podlega regulacji przez fitochrom, poprzez hamowanie aktywności genu biosyntezy ABA *NCED6* i aktywację genu dezaktywacji tego hormonu *CYP707A2*, co powoduje odwrotny skutek dla przebiegu metabolizmu i działania, jak wskazano to w przypadku GA. Obserwowano także wysoki poziom giberelin w mutantach z niedoborem ABA. Pozwala to twierdzić, że ABA bierze udział w supresji genów metabolizmu GA (*GA3ox1/2* i *GA3ox1/2/3*) w czasie kiełkowania nasion. Z kolei w nasionach mutantów z niedoborem GA, synteza ABA

jest zwiększona na skutek promowania genów biosyntezy tego hormonu (*ABA1*, *NCED6* i *NCED9*) i represję genu katabolizmu ABA (*CYP707A2*) (Liu i Hou, 2018).

Oprócz kiełkowania nasion pod wpływem światła, ekspresja genów metabolizmu ABA i GA podczas spoczynku nasion, regulowana jest przez temperaturę. Wykazano, że podczas wydłużonego okresu spoczynku nasion *A. thaliana*, który spowodowany był niską temperaturą w zimie, następuje wzrost ekspresji genów syntezy ABA (*NCED6*) i katabolizmu GA (*GA2ox2*). Odwrotne zależności występują wiosną i latem, kiedy pod wpływem wysokiej temperatury nasiona wychodzą ze stanu spoczynku, a wzrasta aktywność genów katabolizmu ABA (*CYP707A2*) i syntezy GA (*GA3ox1*) (Footitt i in., 2011). Potencjalnym mediatorem pomiędzy ABA i genami metabolizmu GA jest czynnik transkrypcyjny ABA-INSENSITIVE 4 (*ABI4*). Działając jako bezpośredni inhibitor genów inaktywacji ABA (*CYP707A* i *CYP707A2*) oraz genów metabolizmu GA, promuje spoczynek nasion *Arabidopsis*. Wykazano ponadto, że regulacja stanu spoczynku poprzez ABA i metabolizm GA zachodzi z udziałem *MYB96*. Ten czynnik transkrypcyjny w sposób bezpośredni aktywuje geny biosyntezy ABA (*NCED2* i *NCED6*), a hamuje aktywność genów biosyntezy giberelin *GA3ox1* i *GA20ox1* (Liu i Hou, 2018).

Innym przykładem przeciwstawnej roli ABA i GA jest regulacja wczesnej embriogenezy oraz jej późniejsze fazy, które są kontrolowane m.in. przez czynniki transkrypcyjne takie jak: *LEAFY COTYLEDON2* (*LEC2*) i *FUSCA3* (*FUS3*). W procesie tym, dochodzi do hamowania aktywności genu syntezy GA (*GA3ox2*) i promowania syntezy ABA poprzez zależną od światła stymulację białek *DELLA* i aktywność *ABI3* (Curaba i in., 2004; Gazzarrini i in., 2004). W badaniach prowadzonych na ryżu wykazano, że inny czynnik transkrypcyjny *GERMINATION DEFECTIVE 1* (*GD1*) bezpośrednio lub pośrednio przyczynia się do utrzymania homeostazy GA poprzez hamowanie genów podobnych do *LEC2/FUS3*, a następnie reguluje ekspresję genów metabolizmu GA zaangażowanych w dojrzewanie nasion, kiełkowanie i rozwój siewek (Guo i in., 2013; Liu i Hou, 2018). Zatem to czy nasiona pozostaną w stanie uśpienia, czy rozpoczną kiełkowanie, determinowane jest głównie względną zawartością ABA i GA oraz ich wzajemnymi stosunkami ilościowymi.

Do podobnych interakcji dochodzi pomiędzy ABA i auksyną. Doświadczenia prowadzone na mutantach z defektem transportu auksyny wykazały, że niedobory w ścieżce sygnałowej auksyny powodują zmodyfikowaną wrażliwość na ABA podczas kiełkowania nasion. Potwierdzono także, że w nasionach po okresie dojrzewania maleje ich wrażliwość na auksynę. Co więcej, szlak sygnalizacji tego hormonu jest aktywowany równoległe z wejściem

nasion w stan spoczynku. Istnieją także dowody sugerujące udział auksyn w utrzymaniu stanu uśpienia, jednak molekularny mechanizm, za pomocą którego hormony te kontrolowałyby uśpienie nasion nie został jeszcze wyjaśniony. Wiadomo natomiast, że hamowanie kiełkowania nasion za pośrednictwem ABA wymaga niezakłóconej biosyntezy, transportu i sygnalizacji auksyny. Hormon ten aktywuje ABI3, który jest niezbędny do wejścia w stan spoczynku, podobnie jak ABI4 i ABI5. Badania na nasionach mutantów *abi4* i *abi5* u rzodkiewnika pospolitego wykazały brak ich wrażliwości na działanie auksyny podczas kiełkowania, co wskazuje że ABI4 oraz ABI5 są ważnymi regulatorami hamowania kiełkowania za pośrednictwem IAA. W mechanizmach, które hamują kiełkowanie nasion uczestniczą IAA i ABA, które działają synergistycznie w tym procesie i wzajemnie kontrolują swoją własną aktywność. Oznacza to, że u *Arabidopsis* istnieje połączenie molekularne, przez które auksyna aktywuje sygnalizację ABA w celu zahamowania kiełkowania nasion. W regulację sprzężenia IAA-ABA zaangażowany jest także miR160. Ten rodzaj małego RNA regulatorowego negatywnie wpływa na biosyntezę ARF10 i ARF16. Kiedy poziom auksyny wzrasta, transkrypty będące celem miR160, kodujące ARF10 i ARF16, są degradowane i w ten sposób pośrednio promują transkrypcję ABI3. W konsekwencji prowadzi to do utrzymania stanu spoczynku i hamowania kiełkowania (Matilla, 2020).

Wydaje się także, że oba fitohormony regulują ekspresję wielu genów zaangażowanych w biosyntezę skrobi w bielmie kukurydzy oraz akumulację białek w liścieniach *Arabidopsis*. Może to wskazywać, że działają one na wszystkich etapach rozwoju nasion, począwszy od embriogenezy po dojrzewanie, a ich działania są zbieżne (Locascio i in., 2014).

W badaniach przeprowadzonych na rzodkiewniku pospolitym wykazano istnienie dodatnich korelacji pomiędzy ABA a zeatyną i GA. Wynikać to może jednak z antagonistycznego działania dwóch ostatnich wspomnianych hormonów na aktywność kwasu abscysynowego. Według teorii hormonalnej regulacji kiełkowania, cytokinina znosi negatywny efekt ABA na ten proces, odblokowując biosyntezę GA. Wcześniejsze analizy wykazały, że ABA i GA na poziomie molekularnym kontrolują swój własny metabolizm, co zostało już opisane w poprzednich rozdziałach. W tych samych badaniach wykazano, że podwyższony poziom zeatyny hamuje działanie IAA przez co zablockowaniu ulegają reakcje zależne od ABA a to prowadzi do odblokowania biosyntezy i działania GA (Ge i in., 2020).

Jak pokazują wyniki badań przeprowadzonych w ostatnich trzech dziesięcioleciach, pomiędzy wszystkimi opisanymi u roślin hormonami zachodzą bardzo ścisłe zależności.

Dotyczą one nie tylko wzajemnych regulacji metabolizmu, ale także synergistycznych, addytywnych bądź antagonistycznych zależności w kontroli molekularnych przemian leżących u podstaw nie tylko rozwoju nasion, ale i całej ontogenezy roślin telomowych.



### 1.3.2. Molekularna kontrola dojrzewania nasion

Faza dojrzewania nasion u roślin uprawnych, w tym zbóż, roślin strączkowych czy oleistych ma kluczowe znaczenie z punktu widzenia ekonomii i produkcji żywności na świecie. Dojrzewanie nasion rozpoczyna się od zwiększenia liczby chloroplastów i akumulacji chlorofilu, a następnie syntetyzowane są i gromadzone materiały zapasowe. W późniejszych etapach dojrzewania, zarodek zaczyna tracić wodę i chlorofil jednocześnie nabywając tolerancję na przesuszenie, po czym przechodzi w stan uśpienia. U rośliny modelowej *A. thaliana*, jak i u wielu innych gatunków, proces dojrzewania nasion kontrolowany jest przez czynniki transkrypcyjne, hormony, czy stężenie metabolitów (Verdier i Thompson, 2008; Verma i in., 2022).

Organizmy eukariotyczne wykorzystują zróżnicowane mechanizmy regulacji ekspresji i aktywności genów, takie jak kondensacja i dekondukcja chromatyny, zmiany epigenetyczne DNA i histonów, regulacja transkrypcji, alternatywne składanie RNA, stabilność mRNA, kontrola translacji, modyfikacje potranslacyjne, czy degradacja białek. Regulacja aktywności transkrypcyjnej genów u roślin na poziomie syntezy mRNA ma fundamentalne znaczenie w przebiegu wszystkich procesów rozwojowych, regulacji cyklu komórkowego, utrzymaniu homeostazy hormonalnej, czy odpowiedzi na stres. Czynniki transkrypcyjne kodowane są przez ok. 6% wszystkich genów w genomie *Arabidopsis thaliana*, chociaż tylko 10% z nich scharakteryzowano genetycznie i funkcjonalnie (Verdier i Thompson, 2008). Są to kluczowe białka regulatorowe, które działają z innymi w sposób kombinatoryczny, aby kontrolować transkrypcję swoistych genów. Ich działanie oparte jest na wiązaniu się ze specyficznymi sekwencjami DNA (sekwencjami regulatorowymi typu *cis*), które zlokalizowane są w promotorach genów docelowych. Białka regulatorowe podlegają także regulacji przez inne czynniki transkrypcyjne, miRNA, czy hormony, przez co tworzona jest wielowarstwowa, wieloskładnikowa, skomplikowana sieć regulacyjna, której celem jest kontrola danego aspektu rozwojowego (Verma i in., 2022).

W nasionach *Arabidopsis* wyróżniono co najmniej osiem głównych czynników transkrypcyjnych zaangażowanych w ich rozwój: LEC1, LEC2, ABI3 i FUS3, a ponadto EEL, ABI5, PEI1 i HSFA9 (HEAT SHOCK TRANSCRIPTION FACTOR A9) (Verdier i Thompson, 2008).

### 1.3.2.1. Molekularna kontrola procesu gromadzenia białek zapasowych

Istnieje łącznie kilkaset genów, które podczas różnych faz rozwoju nasion, tj. embriogenezy, dojrzewania, nabywania tolerancji na desykcję oraz spoczynku, charakteryzują się wzmożoną aktywnością transkrypcyjną. Prowadzi to w konsekwencji do właściwego formowania się nasion. Geny *LAF1*, a mianowicie wspomniane już *LEC1*, *ABI3*, *FUS3* i *LEC2*, kodują główne regulatory transkrypcji, które inicjują i determinują wymienione fazy rozwoju nasion, regulują gromadzenie materiałów zapasowych a także hamują przedwczesne kiełkowanie i wzrost wegetatywny (Jia i in., 2014; Lepiniec i in., 2018).

*LEC2*, *ABI3* i *FUS3* należą do rodziny czynników transkrypcyjnych B3-AFL, dla której charakterystyczną cechą jest obecność czterech zachowywanych ewolucyjnie domen oznaczanych jako A, B1, B2 i B3. Pierwsza z nich, domena A, jest funkcjonalną domeną aktywacyjną o charakterze kwasowym znajdującą się na N-końcu. W skład B1 wchodzi około 30 aminokwasów, które biorą udział w fizycznej interakcji z czynnikami typu b-ZIP, jak np. *ABI5* (ABCISIC ACID INSENSITIVE 5). Domenę B2 buduje ok. 15 aminokwasów i jest ona niezbędna w interakcji z elementami odpowiedzi na kwas abscysynowy (ABRE). Ostatnia, domena B3 złożona jest z około 100 aminokwasów i zaangażowana jest w wiązanie się do elementów typu *cis* DNA (CATG), który nazywany jest motywem RY. Motyw ten może mieć zmienne sekwencje flankujące, takie jak CGCATGCG dla *FUS3* i GCATGC dla *LEC2* i *ABI3*. Wykazano, że *ABI3* zawiera cztery domeny rodziny AFL, z kolei *FUS3* domenę A, B2 i B3, a *LEC2* jedynie dwie (B2 i B3) (Han i in., 2017; Boulard i in., 2018).

*LEC1* jest członkiem rodziny białek NF-YB, które oddziałując z podjednostkami NF-YC i NF-YA, tworzą czynnik transkrypcyjny NF-Y. Dzięki temu może wiązać sekwencje DNA, tworząc kompleks wiążący element *cis* (CCAAT) uczestniczący w inicjacji transkrypcji (Boulard i in., 2018). *LEC1* oraz jego najbliższy paralog *LEC1like* (*L1L*), posiadają specyficzne reszty aminokwasowe, poprzez które mogą oddziaływać z innymi czynnikami transkrypcyjnymi, np. typu bZIP. W ten sposób mogą one modyfikować dostępność chromatyny i wprowadzać aktywujące modyfikacje histonów (Boulard i in., 2018; Verma i in., 2022).

Białko kodowane przez *LEC1* jest kluczowym czynnikiem kontrolującym rozwój zarodkowy. Podczas późnej embriogenezy dochodzi do hamowania jego ekspresji przez aktywność PICKLE (*PKL*) (Ryc.1. A). Peptyd ten należy do rodziny czynników *CHD3*

odpowiedzialnych za remodelowanie chromatyny. W wielu procesach rozwojowych biorą one udział w koaktywacji transkrypcji u *Arabidopsis*, jednakże PKL wykazuje aktywność remodelującą nukleosom, prowadząc do trimetylacji histonu H3 lizyny 27 (H3K27me3) (Verdier i Thompson, 2008; Yang i in., 2019).

W tym czasie nie dochodzi do gromadzenia się białek zapasowych. Jest to spowodowane zahamowaniem ekspresji kodujących je genów przez czynnik transkrypcyjny typu bZIP ROM1 (Repressor Of Maturation gene1). Wiąże się on do elementów regulatorowych RY w G-box zlokalizowanych w promotorach genów kodujących białka zapasowe (Ryc. 1. A). Efektem takich interakcji jest uniemożliwienie oddziaływania z promotorami tych genów innym białkom regulatorowym (Verdier i Thompson, 2008). Spośród kilku czynników inicjujących fazę wypełniania nasion, kluczową rolę odgrywają: wzrost ilości cukrów, dostępność metabolitów oraz stosunek sacharozy do heksoz. To między innymi one powodują inicjację mechanizmów odblokowujących ekspresję *LEC1* (Ryc. 1. B). Najważniejszym zdarzeniem na tym etapie jest spadek ilości białka PKL, wynikający z zahamowania transkrypcji genu kodującego ten peptyd. Brak czynnika remodelującego chromatynę w obrębie locus *LEC1* powoduje, że staje się on aktywny transkrypcyjnie. Pojawienie się funkcjonalnego białka LEC1 umożliwia aktywację pozostałych trzech, ważnych dla prawidłowego przebiegu tego etapu rozwoju nasienia, genów *LEC2*, *FUS3* oraz *ABI3*. Pomiędzy genami *LEC1* i *LEC2* istnieje pętla pozytywnego sprzężenia zwrotnego, dzięki czemu, jeśli tylko nie ma w komórce białka PKL ulegają one ciągłej ekspresji. *ABI3*, *FUS3* i *LEC2* za pośrednictwem domeny B3 wiążą się do motywów RY w promotorach genów kodujących białka zapasowe, co prowadzi do aktywacji ich ekspresji (Ryc. 1. B) (Verdier i Thompson, 2008).

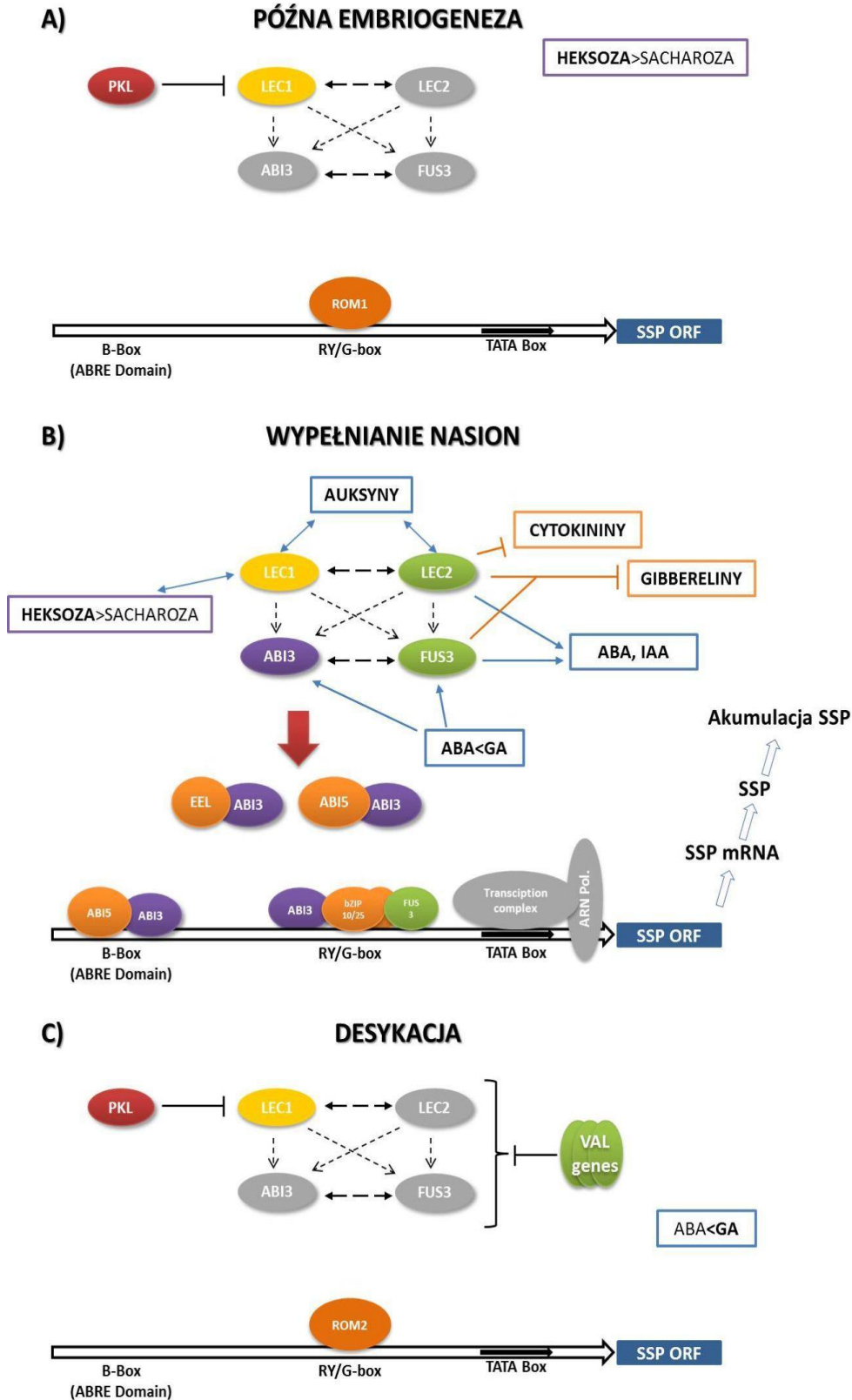
Wszystkie wspomniane czynniki transkrypcyjne są niezwykle istotne dla prawidłowego przebiegu dojrzewania nasion, a tym samym wypełniania ich materiałami zapasowymi. Pomiędzy nimi a innymi regulatorami tego procesu zachodzi cały szereg istotnych zależności. Kluczową i nadrzędną względem nich rolę wydaje się pełnić kwas abscysynowy. Dowodem na to są doświadczenia pokazujące wpływ wysokiego endogennego poziomu tego hormonu na aktywność transkrypcyjną *ABI3* i *FUS3*. Ekspresja ostatniego z wymienionych genów regulowana jest także pozytywnie przez auksyny. Co ważne, jego białkowy produkt jest z kolei negatywnym regulatorem szlaków biosyntezy giberelin. W innych prowadzonych doświadczeniach wykazano, że poziom enzymów biosyntezy auksyn oraz aktywność transkrypcyjna genów odpowiedzi na ten hormon regulowana jest przez *LEC2*. Jednocześnie wspomniany czynnik transkrypcyjny powoduje obniżenie

aktywności genów wrażliwych na cytokininy. Opisane oddziaływania wskazują jednoznacznie na istnienie skomplikowanej sieci zależności pomiędzy fitohormonami a genami kluczowymi dla wzrostu i rozwoju nasion w tym oczywiście dla gromadzenia w nich materiałów zapasowych (Finkelstein i Gibson, 2002; Gazzarrini i in., 2004; Verdier i Thompson, 2008).

Koniec fazy wypełniania nasion charakteryzuje się obniżeniem ilości mRNA genów charakterystycznych dla wcześniejszych przemian. Dotyczy to zwłaszcza opisywanych powyżej czynników transkrypcyjnych. Przypuszcza się, że przyczyniają się do tego główne dwa mechanizmy negatywnej regulacji transkrypcji. W pierwszym, opisanym u *Phaseolus*, udział biorą czynniki bezpośrednio hamujące określone geny dojrzewania. Podstawą tego mechanizmu jest wiązanie się czynnika transkrypcyjnego ROM2 do elementu regulatorowego RY w G-box w promotorze faseoliny, białka zapasowego występującego u tego gatunku. Wymieniony czynnik transkrypcyjny należy do rodziny białek bZIP, a wiążąc się do elementu regulatorowego typu *cis* powoduje zahamowanie transkrypcji genu docelowego. Równocześnie wzrost aktywności ROM2 w wiązaniu się do DNA jest skorelowany z represją specyficznych genów dojrzałości w czasie fazy odwadniania nasion (Ryc. 1. C). U podstaw funkcjonowania drugiego z mechanizmów leży funkcja białka VAL1 (VP1/ABI3-like). Peptyd ten jest identyczny z HSI2 (HIGH-LEVEL EXPRESSION OF SUGAR-INDUCIBLE GENE 2) i HSL1 (HSI2-LIKE1), które współdziałając z sygnalizacją cukrową, hamują ektopową ekspresję genów dojrzewania nasion oraz są niezbędne do przejścia od dojrzewania nasion do wzrostu wegetatywnego. Zarówno VAL1 jak i HSI2 i HSL1 zawierają domenę B3 co daje im zdolność wiązania się do regulatorowych elementów Sph oraz powtórzeń RY zlokalizowanych w promotorach genów kodujących białka kluczowe w procesie rozwoju nasion. Podobieństwo strukturalne domeny wiążącej DNA do wcześniej opisanych w białkach ABI3/FUS3/LEC2 powoduje, że białka VAL konkurują o miejsce wiązania, a tym samym ograniczają aktywność genów efektorowych swoistych dla tej fazy rozwoju nasion (Chern i in., 1996; Tsukagoshi i in., 2005, 2007; Suzuki i in., 2007).

W wyniku działania opisanych powyżej mechanizmów dochodzi do inicjacji ostatniego z etapów rozwoju nasion. Zakończenie fazy wypełniania nasion wiąże się ze spadkiem aktywności transkrypcyjnej genów *LEC1* i *LEC2* do czego przyczynia się częściowo obecność białka VAL1 i wiązanie się go do tych samych elementów regulatorowych co inne białka regulatorowe. Równocześnie dochodzi do ponownego wzrostu ilości PKL (Ryc. 1. C). Jego obecność powoduje ponowne zmiany struktury chromatyny, a jej remodelowanie skutkuje zahamowaniem transkrypcji *LEC1*. Wspomniany już wcześniej

mechanizm wzajemnej kontroli transkrypcji opisywanych genów prowadzi ostatecznie do obniżenia ilości białek regulatorowych grupy LAFL, a co za tym idzie braku możliwości dalszej syntezy białek zapasowych (Suzuki i in., 2007; Verdier i Thompson, 2008).



**Rycina 1.** Schemat oddziaływań zachodzących podczas regulacji syntezy białek zapasowych. Rozwój nasion podzielony został na trzy fazy: A) późna embriogeneza, B) wypełnianie nasion, C) desykacja. Strzałki i T-bars oznaczają odpowiednio pozytywny i negatywny efekt. Kluczowe geny regulatorowe (*LEC1*, *LEC2*, *ABI3*, *FUS3*) zostały oznaczone szarym kolorem, kiedy są nieaktywne w wyniku remodelowania chromatyny *LEC1* przez PKL. W niebieskich i fioletowych ramkach wskazano stosunek ilości metabolitów charakterystycznych dla każdej fazy. Niebieskie strzałki oznaczają pozytywny efekt a pomarańczowe T-bars oznaczają negatywny efekt. Każda rodzina czynników transkrypcyjnych została oznaczona kolorem: żółty – CBF, zielony – domena B3, pomarańczowy – typ bZIP i fioletowy – czynniki VP1/ABI3. W promotorach białek zapasowych (SSP) wskazano elementy regulatorowe DNA typu *cis*: B-box, RY/G z motywem RY (CATGCA) i G-box (CACGTG). A) Podczas embriogenezy ekspresja *LEC1* jest hamowana przez PKL, a ekspresja SSP jest hamowana przez ROM1, który wiąże motywy G-box. Stężenie heksozy jest wyższe niż stężenie sacharozy. B) Podczas wypełniania nasion stężenie sacharozy staje się wyższe niż stężenie heksozy. *LEC1* nie jest hamowany przez PKL, co pozwala na aktywację czterech głównych genów rozwoju nasion i transkrypcję genów SSP. C) Podczas desykacji główne geny regulatorowe są hamowane przez PKL i trzy geny *VAL*, wzrasta stężenie GA. Transkrypcja SSP jest hamowana przez ROM2, który wiąże motyw G-box. Skróty: ABRE – element odpowiedzi ABA; RNA pol – polimeraza RNA; SSP – białko zapasowe nasion; SSP ORF – otwarta ramka odczytu białka zapasowego; Geny *VAL* – geny *VP1/ABI3-LIKE* (na podstawie Verdier i Thompson, 2008, zmienione).

#### 1.4. Czynniki środowiskowe wpływające na rozwój nasion

Już ponad sto lat temu dowiedziono, że na właściwości nasion jak np. wielkość, spoczynek czy kiełkowanie znaczący wpływ ma roślina macierzysta. Czynniki takie jak wiek rośliny, położenie nasion w owocu, kwiatostanie lub baldachimie mają istotne znaczenie u wielu gatunków. Zazwyczaj w przeszłości efekty środowiskowe określane były jako wpływ „środowiska matecznego” na właściwości nasion, co odnosiło się ogólnie do warunków środowiskowych podczas produkcji nasion. Jednakże możliwości dzisiejszej biologii molekularnej pozwalają nam precyzyjniej określić, które efekty pochodzą od rośliny macierzystej, a które są po prostu bezpośrednim wpływem zmienności środowiska na rozwijającą się zygotę. „Środowisko mateczne”, jest więc definiowane jako wpływ środowiska odbierany bezpośrednio przez tkanki rośliny matecznej i za pośrednictwem genomu lub epigenomu matki wpływa na rozwój nasion. Zazwyczaj obejmuje to modyfikację tkanek owocu i/lub okrywy nasiennej, wytwarzanie sygnałów od matki do dojrzewającej zygoty lub dziedziczenie stanów epigenetycznych po matce poprzez mejozę do zarodka lub bielma (Roach i Wulff, 1987; Penfield i MacGregor, 2017).

Natomiast „środowisko zygotyczne” odnosi się do efektów środowiskowych polegających na bezpośredniej percepcji sygnałów środowiskowych przez tkanki zygoty podczas rozwoju i dojrzewania nasion, a genetycznie pozostające pod wpływem genomu lub epigenomu zarodka i/lub bielma (Roach i Wulff, 1987; Penfield i MacGregor, 2017).

Określenie wpływu warunków środowiskowych na różne aspekty związane z rozwojem nasion ma istotne znaczenie dla uzyskania nasion dobrej jakości. Na dobrą jakość składa się masa nasion, możliwość ich przechowywania, a także wigor i zdolność kiełkowania. Cechy te bezpośrednio determinują ich przydatność w aspektach praktycznych, ekonomicznych, rolniczych czy gospodarczych. Wśród czynników wpływających na rozwój nasion wyróżnia się temperaturę, długość dnia oraz jakość i ilość światła, wiatr oraz nawodnienie (Li i in., 2017b).

W sytuacji powszechnie zachodzących zmian klimatycznych wydaje się, że decydujące dla produktywności upraw rolniczych będą warunki termiczne oraz wodne następujące w wyniku globalnego ocieplenia. Mimo prób odwrócenia niekorzystnych tendencji, jakiegokolwiek pozytywne zmiany wymagają wielu lat działań. Dlatego tak ważne jest, aby w miarę możliwości dostosować warunki uprawy całego szeregu roślin o znaczeniu gospodarczym tak, aby mogły one zachować swój potencjał i jeszcze w kolejnych latach mogły posłużyć człowiekowi.

### **1.4.1. Susza – wpływ na gospodarkę hormonalną i rozwój nasion**

Globalne zmiany klimatu powodują m.in. wzrost temperatury na świecie i zmianę rozkładu opadów, a w konsekwencji suszę. Susza definiowana jest jako długotrwały niedobór wody, zarówno w warunkach atmosferycznych (poniżej średniej wielkości opadów), rolniczych (poniżej średniej wielkości nawadniania), glebowych (niedobór wody powierzchniowej i gruntowej), jak i fizjologicznych (transpiracja jest większa niż pobór wody) (Wilhite i Glantz, 1985). Jak podaje Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa, w samym 2021 roku susza w uprawach roślin strączkowych dotyczyła 10,42% gmin w Polsce, a punkt procentowy zwiększył się o 0,6 w stosunku do poprzedniego okresu raportowania (Doroszewski i in., 2021). Nastęstwem tych zmian będzie zmniejszenie wydajności upraw nie tylko na terenie Polski, ale i całego świata.

Okresowe niedobory wody w różnych fazach wzrostu roślin zakłócają ich prawidłowe funkcjonowanie, przez co zmniejsza się ich końcowy plon. Aby sprostać tym niekorzystnym warunkom, rośliny przyjmują różne fizjologiczne, biochemiczne oraz molekularne strategie, jednakże nie zawsze są one wystarczające. Skala skutków, jakie powoduje susza różni się w zależności od rodzaju uprawy, stadium w którym występuje, czy lokalnych warunków środowiskowych, ale także częstotliwości jej występowania i czasu trwania (Saha i in., 2022). W reakcji na stres suszy rośliny wytwarzają reaktywne formy tlenu (ROS), produkują hormony stresu, jak etylen i ABA, zmieniają także morfologię korzeni i pędów. Dzięki tym mechanizmom, możliwe jest wywołanie u roślin krótko- i długoterminowych reakcji. Gdy okres stresu trwa bardzo krótko, rośliny ograniczają utratę wody przez np. zmniejszenie asymilacji węgla, zamykanie aparatów szparkowych, regulację osmotyczną, zahamowanie wzrostu, zmiany turgoru, transdukcję sygnału wewnątrzkomórkowego związanego z percepcją i odpowiedzią na suszę. Reakcje te zwykle nie powodują większych szkód w roślinach, pod warunkiem, że wkrótce warunki powrócą do normy. Długie okresy stresu mogą prowadzić do bardziej niebezpiecznych i trwałych uszkodzeń, a nawet śmierci roślin. Wówczas następuje zahamowanie wzrostu pędów, przystosowanie metabolizmu, ograniczenie powierzchni transpiracji, a także obumieranie nasion i starzenie się (Ahluwalia i in., 2021).

Rośliny w przeciwieństwie do zwierząt, nie posiadają ośrodkowego układu nerwowego. Ich układ naczyniowy łączy korzenie i pędy, dzięki czemu możliwa jest integracja bodźców stresowych zarówno z części podziemnych jak i nadziemnych. Wspomniany kwas abscysynowy ze względu na swój udział w takich mechanizmach jak regulacja ekspresji genów reagujących na stres oraz zamykanie aparatów szparkowych



jest kluczowym fitohormonem pośredniczącym w odpowiedzi na stres i odporności na suszę. Zmiany zawartości wody w glebie są odpowiednio rozpoznawane przez roślinę. Bodziec ten jest następnie przekazywany z korzeni do liści, aby przystosować się do warunków stresu suszy poprzez akumulację ABA. Hormon ten gromadzi się głównie w tkankach przewodzących liści, ze względu na aktywność transkrypcyjną genów kodujących enzymy jego biosyntezy. Dlatego może przemieszczać się z komórek naczyniowych do sąsiednich, w tym komórek aparatów szparkowych (Takahashi i in., 2020).

Istnieją także systemy regulacyjne niezależne od ABA. Wśród nich wyróżnia się sygnały wodne (zmiany turgoru), prądy elektryczne, fale wapniowe, reaktywne formy tlenu, mRNA i ruchy fitohormonów. Ostatnie badania wykazały, że w odpowiedzi na stres suszy jako cząsteczki sygnałowe uczestniczą także nowe peptydy podobne do hormonów, jak np. CLAVATA3/EMBRYO-SURROUNDING REGION-RELATED 25 (CLE25). Peptydy sygnałowe odpowiedzialne są za przenoszenie informacji i przekazywanie jej na duże odległości do części efektorowej, dzięki czemu mogą pełnić rolę łączników integrujących sygnały stresu z odpowiedzią na poziomie całej rośliny (Takahashi i in., 2018, 2020).

Kluczowym czynnikiem kontrolującym rozwój nasion, ich wypełnienie oraz aktywność metaboliczną jest wilgotność. Od stanu nawodnienia komórek spichrzowych w dużym stopniu uzależnione są procesy związane z syntezą i akumulacją różnych materiałów zapasowych. Występowanie niedoborów wody osłabia także przyswajanie minerałów oraz drastycznie zmniejsza wiązanie azotu, przez co produkcja asymilatów i mobilizacja do rozwoju nasion jest zmniejszona (Awasthi i in., 2014).

Rośliny w trakcie rozwoju generatywnego są znacznie bardziej wrażliwe na suszę niż podczas fazy wegetatywnej. Skutkuje to na tym etapie mniejszą liczbą kwiatów, słabym zawiązywaniem strąków i owoców, a co za tym idzie zmniejszoną liczbą nasion. Powszechnym objawem występowania deficytu wody w fazie reprodukcji jest sterylność pyłku, co ogranicza jego kiełkowanie a także hamuje wzrost łagiewki pyłkowej. Wówczas proces zapłodnienia jest utrudniony, a konsekwencją tych zdarzeń jest zmniejszony plon. Stres związany z ograniczonym dostępem do wody powoduje także niedobór węglowodanów, podwyższony poziom endogennego ABA oraz zmniejszoną zdolność komórek rozrodczych do wykorzystania sacharozy i skrobi. Metabolizm tych cukrów w liściach i nasionach ma kluczowe znaczenie dla etapu wypełniania nasion, głównie przez utrzymywanie równowagi heksozy i sacharozy, która jest niezbędna do regulacji tej fazy rozwoju. Niedobór wody w tkankach zmniejsza także aktywność inwertazy kwaśnej w nasionach, czego skutkiem jest zahamowanie importu cukru (Awasthi i in., 2014; Sehgal i in., 2018).

Stres suszy upośledza również wiązanie azotu atmosferycznego przez bakterie symbiotyczne poprzez wzrost odporności na dyfuzję tlenu do korzeni. Skutkuje to zmniejszoną aktywnością nitrogenazy, która obniża dostępność azotu do biosyntezy białka, stanowiącego podstawową rezerwę w nasionach roślin strączkowych, a tym samym zmniejsza plon nasion. Jakość białka nasion w dużej mierze zależy od genotypu, ale nie bez znaczenia pozostają stropy środowiskowe. Wykazano, że zmiany w składzie frakcji białkowej spowodowane suszą i stresem cieplnym wynikają przede wszystkim ze zmian ilości azotu całkowitego zgromadzonego podczas wypełniania nasion. Badania prowadzone na roślinach strączkowych wykazały także, że deficyt wody ogranicza gromadzenie się składników mineralnych (Sehgal i in., 2018). Np. u fasoli zwyczajnej (*Phaseolus vulgaris* L.) stres suszy spowodował obniżenie stężenia Fe, Zn, P i N, co przełożyło się na spadek zawartości białka ogólnego (Ghanbari i in., 2013). U ciecierzycy na skutek utraty dostępu do wody podczas wypełniania nasion obserwowano wyraźne zmniejszenie zawartości skrobi, białka i aminokwasów (Nayyar i in., 2006). Z kolei w nasionach wspięgi wężowatej (*Vigna unguiculata* L.) narażonych na suszę, pula wolnych aminokwasów wzrosła, ale frakcja białkowo-aminokwasowa zmniejszyła się, a włączanie aminokwasów do łańcucha białkowego zostało zahamowane (Labanauskas i in., 1981).

## 1.5. Łubin – charakterystyka badanej rośliny

Rozwój społeczny, rosnąca liczba ludności, a także świadomość konsekwencji globalnego ocieplenia przyczynia się do wzrostu zapotrzebowania na białko pokarmowe, które nie może być dłużej zaspokajane głównie przez produkty zwierzęce. Koniecznym stało się poszukiwanie alternatywnych źródeł białka, które w krajach Europejskich w większości zaspokajane jest przez import soi. Znakomitą alternatywę dla soi stanowią rodzime europejskie gatunki roślin strączkowych takie jak łubin żółty (*Lupinus luteus* L.), wąskolistny (*L. angustifolius* L.) oraz biały (*L. albus* L.) (Lucas i in., 2015).

Łubiny występują w Europie, Afryce i obu Amerykach, gdzie łatwo przystosowały się do panujących tam klimatów. Ze względu na występowanie rodzaju *Lupinus* w tak szerokim zakresie klimatycznym, podzielono go na gatunki śródziemnomorskie i północnoafrykańskie „Starego Świata” oraz gatunki amerykańskie „Nowego Świata”. Spośród 400 znanych gatunków, jedynie 12 stanowią łubiny Starego Świata. Dodatkowo zostały one podzielone na dwie grupy, ze względu na strukturę okrywy nasiennej: Scabrispermae — o nasionach szorstkich oraz Malacospermae — o nasionach gładkich. Grupa Scabrispermae obejmuje siedem gatunków: *L. pilosus*, *L. cosentinii*, *L. digitatus*, *L. princei*, *L. palaestinus*, *L. atlanticus* i *L. somaliensis*, które głównie występują w Afryce Północnej i wschodniej części basenu Morza Śródziemnego, a ich liczba chromosomów waha się od  $2n = 32$  do 42. Natomiast u grupy Malacospermae liczba ta jest także zmienna od  $2n = 40$  do 52. W jej skład wchodzi pięć gatunków, które rozmieszczone są w rejonie Morza Śródziemnego: *L. angustifolius*, *L. albus*, *L. luteus*, *L. hispanicus* i *L. micranthus* (Naganowska i in., 2003; Wolko i in., 2011).

Pierwsze doniesienia o udomowionych nasionach łubinu pochodzą z egipskich grobowców z XXII w. p.n.e., natomiast dowody na występowanie tej rośliny w Nowym Świecie datowane były na VI lub VII w. p.n.e. (Knecht i in., 2020). W Polsce znaczenie gospodarcze, oprócz łubinu żółtego mają także: łubin biały (*L. albus* L.) oraz łubin wąskolistny (*L. angustifolius* L.) (Krawczyk i in., 2012).

Łubin żółty reprezentują tylko odmiany słodkie – tradycyjne (rozgałęziające się) i samokończące (nierozgałęziające się, syn. epigonalne). Przykładem odmiany epigonalnej jest Taper, będący przedmiotem badań opisanych w niniejszej rozprawie. Rośliny o takiej formie wzrostu często nie tworzą rozgałęzień bocznych, ograniczając się do pojedynczego pędu głównego. Zaletą tej odmiany jest bardzo równomierne dojrzewanie, dobre

wykształcenie nasion, które znajdują się tylko na pędzie głównym, co ułatwia zbiór (Gacek i in., 2012).

Cechą wyróżniającą nasiona łubinu spośród nasion innych roślin strączkowych jest ilość białka sięgająca do 44% (Lucas i in., 2015). Dodatkowo ich skład aminokwasowy jest wyjątkowo korzystny ze względu na występowanie argininy, lizyny, leucyny i fenyloalaniny oraz niską zawartość metioniny i cysteiny. Kolejną zaletą jest niewielka ilość szkodliwych, antyżywniowych substancji jak np. alkaloidy, inhibitory proteaz, a także niska zawartość skrobi (Van Barneveld, 1999). Ważnym składnikiem odżywczym nasion łubinu jest także błonnik. Posiada on niezwykle wysoką zdolność wiązania wody i lepkość w porównaniu z innymi błonnikami nierozpuszczalnymi. Właściwości te wskazują na możliwość wywoływania efektów fizjologicznych charakterystycznych dla błonników rozpuszczalnych, takich jak np. obniżanie glikemii. Dzięki tym cechom, nasiona łubinu stosowane są głównie jako składnik pasz dla zwierząt, jednakże od czasów starożytnych był on również wykorzystywany jako pokarm dla ludzi. Rozwój nauk żywieniowych oraz przemysłu spożywczego spowodował rozpowszechnienie dodawania łubinu do różnych produktów spożywczych (Islam i Ma, 2016). Coraz częściej wykorzystuje się składniki pochodzenia roślinnego w zamiennikach produktów mlecznych i mięsnych. Dodatek mąki z łubinu w ilości do 10% poprawia wiązanie wody, teksturę, trwałość, aromat, a co najważniejsze wartość odżywczą. Z tego powodu łubin wzbudza coraz większe zainteresowanie na całym świecie jako potencjalny wysokobiałkowy składnik żywności nadający się do spożycia przez ludzi (Martínez-Villaluenga i in., 2006).

Inną istotną cechą łubinu żółtego jest silnie rozwinięty system korzeniowy, dzięki któremu roślina może pobierać wodę i składniki mineralne z głębszych warstw gleby, ale co ważne, poprawia przy tym strukturę gleby oraz jej stosunki wodno - powierzchniowe. Z tego względu gatunek ten ma niskie wymagania glebowe i może być uprawiany nawet w glebach ubogich (Dymerska i Grabowska, 2014). Jednym z najważniejszych czynników wpływających na wzrost i plonowanie omawianej rośliny są bakterie symbiotyczne z grupy *Rhizobium*, które indukują powstawanie brodawek korzeniowych. Struktury te odpowiedzialne są za proces redukcji azotu atmosferycznego do formy amonowej, która jest łatwo przyswajalna dla roślin (Fernández-Pascual i in., 2007). Nie wymagają więc dodatkowego nawożenia azotem, a dodatkowo zostawiają jego dużą ilość w glebie dla roślin następczych (Gacek i in., 2012; Podlesny i Brzoska, 2010). Wobec tych właściwości łubin bardzo dobrze sprawdza się w zmianowaniu pól uprawnych, przerywając częste następstwo zbóż. Stanowi także doskonały przedplon dla gatunków ozimych pozostawiając po zbiorach

w glebie, oprócz azotu, substancje organiczne w postaci resztek poźniwnych bogatych w makro- i mikroelementy. Może więc z powodzeniem być stosowany jako zielony nawóz (Dymerska i Grabowska, 2014).

Warto także zaznaczyć, że kolejną cechą na korzyść łubinu są wymagania uprawy, które w porównaniu do soi są znacznie mniejsze. Soja jest wrażliwa na przymrozki, wymaga także gleb żyznych o wysokiej kulturze, zaliczanych do kompleksu pszennego. Łubin natomiast dobrze znosi spadki temperatury nawet poniżej  $-9^{\circ}\text{C}$  i może być uprawiany na glebach ubogich, najlepiej kompleksu żytniego. Jednakże u obu tych gatunków obserwuje się wrażliwość na niedobór wody podczas kiełkowania, kwitnienia i zawiązywania strąków (Augustyńska i Bębenista, 2019). Czynniki te bezpośrednio wpływają na niskie plonowanie, a to z kolei przekłada się na niewielkie zainteresowanie rolników uprawą roślin strączkowych.

Areał upraw łubinu w Polsce jest wciąż na niskim poziomie. Produkcja nasion odmian łubinu żółtego w ostatnich kilku latach spada. W 2020 roku nasiona kwalifikowane wyprodukowano na areale sięgającym zaledwie 632 ha. Natomiast jeszcze kilka lat temu, w 2015 roku, kwalifikowany materiał siewny łubinu żółtego pozyskano z powierzchni 3,5 tys. ha, co wskazuje, że obecny areał jest niemal sześciokrotnie mniejszy (Binkowski i in., 2021). Łubin wykazuje dużą wrażliwość na warunki atmosferyczne w okresie wegetacji. Powoduje to niestabilność plonowania, przez co zmniejsza się zainteresowanie jego uprawą oraz maleje popyt tego surowca na rynku paszowym. W warunkach produkcyjnych znacząco utrudnia to możliwość oferowania na rynku jednorodnych pod względem jakości partii surowca (Bojarszczuk i Księżak, 2014). Niezwykle ważne są także czynniki związane z produkcją i dostępnością innych komponentów paszowych takich jak rodzima produkcja np. rzepaku lub dostępność na rynku importowanej śruty sojowej. Równie istotne, biorąc pod uwagę plonowanie, jest niedostateczne wypełnienie nasion materiałami zapasowymi gromadzonymi w owocach. Zależy ono od wielu czynników uprawy, takich jak nawodnienie, dostępność substancji odżywczych, prawidłowa ontogeneza ze szczególnym uwzględnieniem homeostazy hormonalnej. Ilości gromadzonych białek zależą w sposób bezpośredni lub pośredni od wszystkich tych czynników. Komplet czynników niekorzystnie wpływających na plonowanie łubinu powoduje spadek zainteresowania uprawą tego gatunku.

### 1.5.1. Białka zapasowe u łubinu żółtego

Gatunki łubinu o słodkich nasionach (jak łubin żółty, wąskolistny czy biały) coraz częściej wykorzystywane są w przemyśle spożywczym, jako źródło białka roślinnego. Liczne badania nad składem ich nasion wykazały, że oprócz wysokiej zawartości białka, mają one także liczne właściwości nutraceutyczne, a także niską zawartość składników antyodżywczych. Żywność uzupełniona nasionami łubinu zapewnia korzyści zdrowotne, jak np. zwiększone uczucie sytości przy zmniejszonym spożyciu energii, obniżanie ciśnienia krwi i poziomu glukozy, a także poziomu cholesterolu i trójglicerydów oraz w zwalczaniu chorób układu sercowo–naczyniowego (Jimenez-Lopez, 2020).

Głównymi frakcjami białek zapasowych nasion łubinu są albuminy i globuliny. Nazwano je konglutynami i podzielono na cztery grupy:  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  i  $\delta$ . Pierwszy rodzaj,  $\alpha$ -konglutyny należą do rodziny 11S globulin (białka podobne do legumin, ang. legumin-like), ich masa mieści się w przedziale 330-430 kDa. Występują one głównie w wakuolach komórek magazynujących liścieni. Podczas kiełkowania nasion są proteolitycznie degradowane, co potwierdza ich rolę. Drugą klasą białek zapasowych są  $\beta$ -konglutyny, zaklasyfikowane do 7S globulin (inna nazwa to białka wicyliny), o masie 143-260 kDa. Stanowią one główną składową białek u łubinu wąskolistnego. W badaniach prowadzonych na fasoli wykazano, że jego homolog (fazeolina) jest rozkładany podczas kiełkowania w sposób zależny od fosforylacji.  $\beta$ -konglutyny występują w ciałach białkowych liścieni i podobnie jak  $\alpha$ -konglutyny, również ulegają całkowitej proteolizie w czasie kiełkowania. Struktura  $\beta$ -konglutyn wykazuje podobieństwo do alergenów innych roślin strączkowych, jak orzeszek ziemny lub soczewica, przez co uważa się ją za potencjalny czynnik alergizujący. Do 7S globulin zalicza się także  $\gamma$ -konglutyny, które gromadzone są w ciałach białkowych dojrzewających nasion oraz zewnątrzkomórkowej części apoplastu kiełkujących liścieni, a ich masa wynosi 200 kDa (Duranti i in., 2008; Foley i in., 2011, 2015). Wykazano, że  $\gamma$ -konglutyna jest strukturalnie podobna do białek inhibitorów endoglukanazy specyficznych dla ksyloglukanu (XEGIP) oraz inhibitora ksyłanazy *Triticum aestivum* (TAXI-1) i jest zdolna do wiązania hormonu insuliny i insulinopodobnego czynnika wzrostu, IGF-1 i IGF-II. Dzięki temu wywierają one działanie hipoglikemizujące oraz pozytywnie modyfikujące białka biorące udział w homeostazie glukozy. Potencjalnie mogą znaleźć zastosowanie w leczeniu pacjentów z upośledzonym metabolizmem glukozy, jednakże muszą zostać dokładniej przebadane (Foley i in., 2011; González-Santiago i in., 2017).

Ostania z klas konglutyn,  $\delta$ -konglutyny to małe białka o masie ok. 13 kDa, bogate w siarkę, należące do 2S albumin. Ich lokalizacja i biologiczne znaczenie nie zostało jak dotąd dokładnie poznane, ale przypisuje się im funkcje zapasowe. Wszystkie te rodziny konglutyn przyczyniają się do korzyści odżywczych nasion łubinu. W badaniach przeprowadzonych z wykorzystaniem łubinu wąskolistnego wykazano, że wymienione białka kodowane są przez niewielkie rodziny genów odpowiednio: *ALPHA1-3*, *BETA1-7*, *GAMMA1-2* i *DELTA1-4* (Duranti i in., 2008; Foley i in., 2011, 2015).

Analizy RNA-seq prowadzone na ośmiu gatunkach łubinu (Foley i in., 2015) umożliwiły porównanie łącznej ekspresji genów kodujących konglutyny. Wykazano, że u łubinu żółtego odmiany Pootalong najwyższy poziom ekspresji wykazuje  $\delta$ -konglutyna, stanowiąc ponad 60% całkowitej puli transkryptów genów kodujących ten rodzaj peptydów. Końcowa ilość białek gromadzonych w nasionach jest wypadkową regulacji i przebiegu wielu przemian prowadzących do jego powstania (transkrypcja, translacja, obróbka potranslacyjna). Biorąc pod uwagę wpływ wielu czynników, konieczne było zbadanie korelacji pomiędzy ilością transkryptów konglutyn, a całkowitą zawartością zgromadzonych białek zapasowych. Wyniki badań potwierdziły istnienie pozytywnej zależności u łubinu białego, wąskolistnego oraz odmiany Pootalong łubinu żółtego. Na podstawie przeprowadzonych badań, dowiedziono także organowo specyficzną ekspresję wszystkich badanych rodzin konglutyn. Aktywność transkrypcyjną genów kodujących te rodzaje białek zapasowych zidentyfikowano jedynie w nasionach (Foley i in., 2015).

## 2. Cel pracy

Znając ogólny model gromadzenia materiałów zapasowych w nasionach, który został opisany głównie u rośliny modelowej *Arabidopsis thaliana*, można wyodrębnić kilka kluczowych czynników, bez których proces ten nie mógłby zachodzić. Mając także świadomość problemów wynikających ze zmian klimatycznych, które pośrednio oddziałują na każdego z nas, a w szczególności na rolnictwo, niezwykle ważne jest poznanie molekularnych przemian leżących u podstaw procesu gromadzenia białek zapasowych w nasionach łubinu żółtego. Niemniej istotne jest także opisanie mechanizmów wzajemnych zależności pomiędzy poszczególnymi składnikami procesu wypełniania nasion oraz sprawdzenie ich wydajności, kiedy na danym etapie rozwoju nasion występuje susza oraz możliwości regulowania tego procesu poprzez aplikacje fitohormonów.

Dlatego pierwszy celem prowadzonych badań była identyfikacja homologów genów występujących u łubinu żółtego, które w rozwoju nasion pełnią funkcje regulatorowe oraz genów kodujących konglutyny – białka zapasowe badanego gatunku, będące efektorami w tym procesie. Drugim celem było określenie poziomu ekspresji zidentyfikowanych genów w kolejnych dniach rozwoju nasion łubinu żółtego.

Z uwagi na kluczowe znaczenie ABA i GA podczas rozwoju nasion, jako trzeci cel, postanowiono zbadać zmiany ekspresji zarówno genów regulatorowych oraz genów kodujących konglutyny w trakcie rozwoju nasion, pod wpływem egzogennej aplikacji tych fitohormonów.

Problem globalnie występujących zmian klimatycznych był powodem podjęcia kolejnych badań, mających na celu ustalenie w jaki sposób okresowe niedobory wody mogą w danym stadium rozwoju nasion wpłynąć na poziom ekspresji genów regulatorowych oraz genów kodujących białka zapasowe. Rozpatrywane zagadnienie jest także pochodną danych dotyczących wrażliwości łubinu na niedobory wody, zwłaszcza na etapie rozwoju generatywnego od zawiązania kwiatów, na wypełnianiu nasion skończywszy.

Zakres badań poszerzono także o dane odpowiadające dwóm kolejnym postawionym celom. Pierwszym było ustalenie czy pod wpływem aplikowanych ABA i GA zmieniły się także endogenne poziomy fitohormonów kontrolujących rozwój nasion. Drugim i ostatnim z postawionych celów, było wyznaczenie zmian akumulacji białek w trakcie rozwoju nasion łubinu żółtego oraz ustalenie czy podanie fitohormonów znacząco wpływa na poziom gromadzonych białek zapasowych, a także białek regulatorowych.



### **3. Materiały**

#### **3.1. Odczynniki chemiczne i zestawy do izolacji RNA**

Quick-RNA MiniPrep (Zymo Research)  
E.Z.N.A.® Plant RNA Kit (Omega Bio-tek)  
β-merkaptoetanol (ICN Biomedicals)

#### **3.2. Bufory i zestawy do izolacji białek**

E.Z.N.A.® Plant RNA Kit (Omega Bio-tek, USA)  
Bufor HEPES (bufor kwasu 4-(2-hydroksyetylo)-1-piperazynoetanosulfonowego), (pH 8,5)  
(Thermo Fisher Scientific)

#### **3.3. Odczynniki chemiczne, bufory do oceny jakościowej RNA, separacji kwasów nukleinowych i białek**

Agarozabio STANDARD (Prona)  
HyperLadder™ 100 bp (Bioline)  
Perfect™ 100 bp DNA ladder (EURx)  
GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific)  
Lambda DNA/Eco130I Marker (Thermo Fisher Scientific)  
6X LoadingDye R0611 (Thermo Fisher Scientific)  
TBE 5X GPB-Tris-Borate-EDTA buffer 5X (GenoPlast Biochemicals)  
Midori Green Advance (NIPPON Genetics Europe)  
Bufor TE (Tris-EDTA) pH 8,0 (GenoPlast Biochemicals)  
Etylowy alkohol bezwodny 99,8% (POCH)  
Bufor Tris (Thermo Fisher Scientific)  
Bioanalyzer RNA kits (Agilent)

### **3.4. Zestawy odczynników do reakcji PCR, RT-PCR, RT-qPCR**

SensiMix™ II Probe Kit (Bioline)

NG dART RT kit (EURx)

Sondy UPL do Real Time PCR (Roche)

startery specyficzne do sond UPL (Genomed)

startery flankujące (Genomed)

### **3.5. Odczynniki chemiczne, bufony i zestawy do chromatografii nanoLC-MS/MS**

TMTsixplex™ Isobaric Label Reagent Set (Thermo Fisher Scientific)

1M wodorowęglan trietyloaminy (TEAB) (Thermo Fisher Scientific)

Hydroksyloamina 50% (Thermo Fisher Scientific)

Trypsyna z trzustki wołowej, traktowana TPCK, liofilizat (Sigma-Aldrich)

Jodoacetamid, czystość  $\geq 98\%$  (HPLC) (Sigma-Aldrich)

Tris (2-carboksyetylo)fosfiny chlorowodorek (TCEP), czystość  $\geq 98\%$  (Sigma-Aldrich)

Filtry MWCO 3kDa, (VWR)

membrana PES (VWR)

### **3.6. Odczynniki chemiczne, bufony do izolacji fitohormonów i chromatografii LC-MS/MS**

MeOH (LCMS grade) (Sigma-Aldrich)

BHT (butylowany hydroksytoluen) (Sigma-Aldrich)

Znakowane wzorce fitohormonów:  $d_2GA_1$ ,  $d_2GA_3$ ,  $d_2GA_4$ ,  $d_2GA_7$ ,  $d_6ABA$ ,  $d_2IAA$   
(OlChemIm)

Octan etylu (Sigma-Aldrich)

Kolumnienki ekstrakcyjne C18-SPE Bakerbond (Baker)

Bufor octanowy (1mM pH 7-8) (Sigma-Aldrich)

Kwas mrówkowy (LCMS grade) (Sigma-Aldrich)

### **3.7. Środki chemiczne do uprawy roślin oraz hormony roślinne**

Giberelina GA<sub>3</sub> Tokyo Chemical Industry (TCI) CO., LTD.

Kwas abscysynowy (Fluorochem Ltd)

Nitragina szczepionka bakteryjna dla łubinu (Zakład Przetwórczo –  
Usługowo Handlowy „BIOFOOD s.c.”)

VITAVAX200FS (Chemtura Netherlands B.V.)

Tween ® 20 (SERVA Electrophoresis GmbH)

### **3.8. Specjalistyczne oprogramowanie komputerowe**

Xcalibur 2.1

Protein Scape 3.1

Proteome Discoverer 2.3

Sequest HT

Mascot Server 2.5

LabSolutions 5.93

The Basic Local Alignment Search Tool (BLAST), BLASTN, BLASTP

ClustalX

LightCycler® 480 Software (Roche)

MAFFT version 7

Primer3 (v. 0.4.0)

TranslateTool

Probe Finder (Roche)

QuantityOne (Bio-Rad)

EdgeR 3.12.1

Samtools idxstats 1.3.1

IBM SPSS Statistics 27

Agilent Expert Software 2100 (Agilent)

Bowtie2

SwissProt

Trinity 2.5.1

### **3.9. Materiał badawczy**

#### **3.9.1. Materiał badawczy wykorzystywany w doświadczeniach RNA-seq**

Uprawę łubinu żółtego odmiany Taper prowadzono w warunkach polowych na poletkach na poletkach doświadczalnych Centrum Astronomii UMK w Piwnicach k. Torunia (53°05'42.0 "N 18°33'24.6 "E) zgodnie z zaleceniami producenta nasion (Poznańska Hodowla Roślin Sp. z o.o. Informacje o łubinie żółtym odmiany Taper. Dostęp online: <http://phr.pl/wp-content/uploads/2017/07/Taper.pdf>). Nasiona pochodziły z Poznańskiej Hodowli Roślin sp. z o.o. oddział Wiatrowo. Przed wysiewem mechanicznym zaprawiano preparatem VITAVAX 200 FS oraz inokulowano je kulturami *Bradyrhizobium lupine* obecnymi w zaprawie nasiennej Nitragina (Zakład Przetwórczo – Usługowo – Handlowy "BIOFOOD s.c.") zgodnie z zaleceniami producenta nasion. Uprawy prowadzono w latach 2017 – 2021.

Materiał badawczy wykorzystywany do badań stanowiły nasiona łubinu żółtego odmiany Taper zbierane w kolejnych dniach ich rozwoju. Dla doświadczeń RNA-seq były to 10, 20 i 30 DAA (Day After Anthesis - dzień po wykształceniu kwiatu). Materiał ten zbierany był w roku 2017. Dla każdego etapu rozwoju z różnych stanowisk poletka zbierano nasiona z co najmniej 20 roślin.

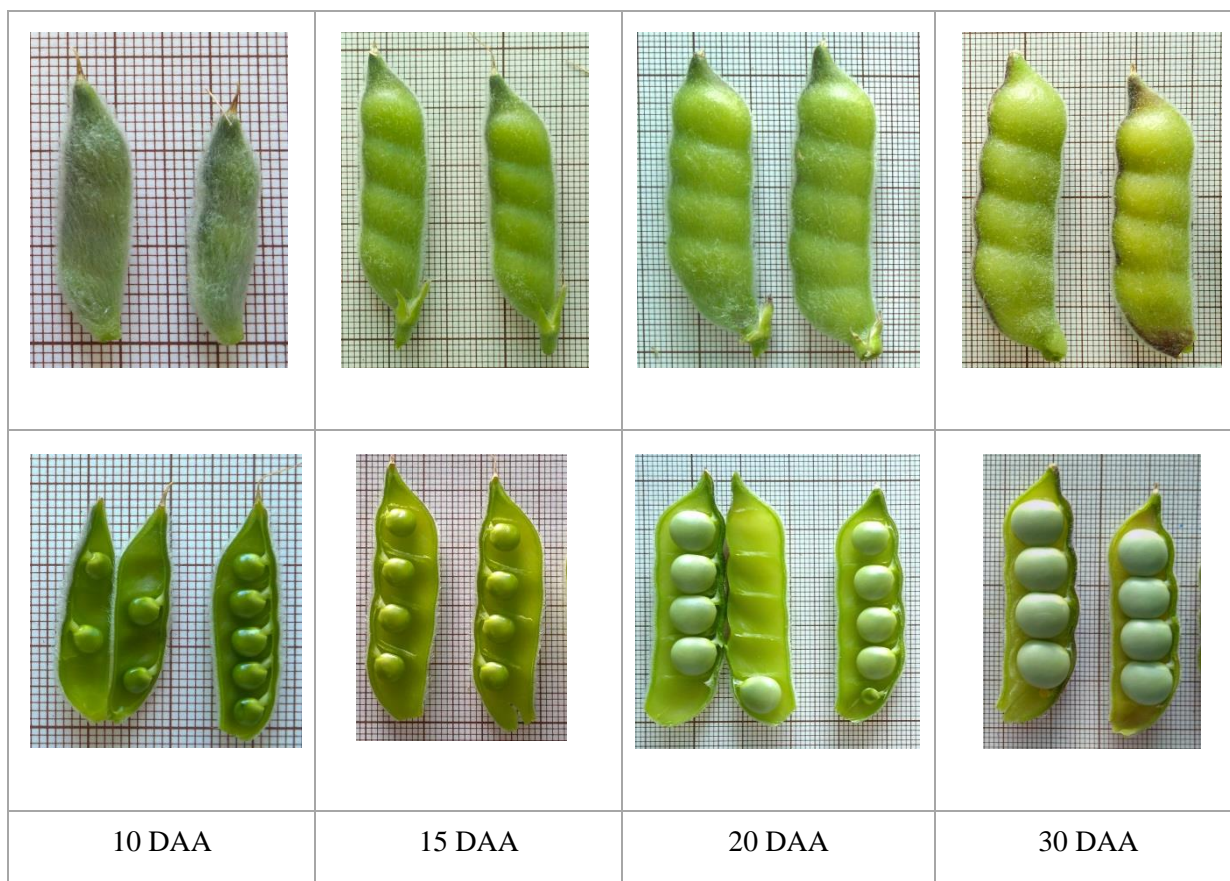
#### **3.9.2. Materiał badawczy wykorzystywany w doświadczeniach wpływu aplikacji ABA i GA**

Dla zbadania wpływu aplikacji fitohormonów (ABA i GA<sub>3</sub>) na ekspresję zidentyfikowanych genów, stopień akumulacji wybranych białek oraz endogenne poziomy fitohormonów, w kolejnym sezonach wegetacyjnych (2018 – 2020) wprowadzono następujące warianty: K – kontrola, ABA – rośliny po aplikacji kwasu abscysynowego, GA – rośliny po podaniu GA<sub>3</sub>. W tym celu wyznaczono dziewięć poletek, tak aby zapewnić możliwość pobrania materiału z trzech niezależnych powtórzeń biologicznych (Ryc. 2).

K	GA	ABA
ABA	K	GA
GA	ABA	K

**Rycina 2.** Schemat rozmieszczenia poletek uprawowych badanych wariantów. Zastosowano skrócone nazwy aplikowanych fitohormonów: GA – kwas giberelinowy (GA<sub>3</sub>), ABA – kwas abscysynowy, K – wariant kontrolny.

Każde z wydzielonych poletek opryskano określonym roztworem fitohormonu (ABA/GA<sub>3</sub>) o stężeniu 0,1 mM z dodatkiem 0.05% Tween20. Na poletka z roślinami kontrolnymi aplikowano 0.05% roztwór Tween20. Na jeden oprysk zużywano ok 2,5L przygotowanego roztworu. Aplikację fitohormonów przeprowadzano w 15 dniu po wykształceniu kwiatu (15 DAA) w godzinie zerowej (0h.). Nasiona zbierano tuż przed opryskami (0h, około godziny 8:00), aby stanowiły próby kontrolne dla prób traktowanych fitohormonami. Kolejne zbiory prowadzono po upływie czterech (4h, około godziny 12:00) i ośmiu godzin (8h, około godziny 16:00) od podania fitohormonu. Nasiona zbierano także w kolejnych dniach ich rozwoju: 20 i 30 dni po wytworzeniu kwiatu w tych samych godzinach. Bezpośrednio po zbiorach, nasiona zamrażano w ciekłym azocie i przechowywano w –80°C do czasu izolacji całkowitego RNA. Przykładowe zdjęcia strąków oraz zbieranych nasion przedstawiono na Rycinie 3.



**Rycina 3.** Przykładowe zdjęcia strąków i nasion łubinu żółtego odmiany Taper, uprawianego w warunkach naturalnych, przedstawiające badane etapy rozwoju nasion: 10, 15, 20, 30 DAA – dzień po wykształceniu kwiatu.

### 3.9.3. Materiał badawczy wykorzystywany w doświadczeniach wpływu suszy

Aby zbadać wpływ suszy na rozwój nasion łubinu żółtego odmiany Taper założono uprawę w warunkach fitotronowych. Gleba do upraw pochodziła z pola uprawnego w miejscowości Szewa w gminie Kowalewo Pomorskie w powiecie golubsko-dobrzyńskim. Materiał siewny stanowiły kwalifikowane nasiona łubinu żółtego odmiany Taper, jak dla upraw polowych. Przed wysiewem nasiona zaprawiano środkiem przeciwwgrzybicznym VITAVAX 200 FS (Chemtura Netherlands B.V.) i pozostawiano do napęcznienia przez ok. 6 godzin. Po tym czasie dodawano Nitraginę (Zakład Przetwórczo - Usługowo - Handlowy "BIOFOOD s.c.") i kontynuowano inkubację przez ok. 30 min. Tak przygotowane nasiona wykładano do doniczek o pojemności 2L (o wymiarach 11x11x21,5 cm), po 4 sztuki na głębokość 3 cm. Rośliny uprawiano w warunkach dnia długiego, preferowanych przez ten gatunek (16h światła i 8h ciemności) w temperaturze około 23°C. W celu zbadania różnych okresów niedoboru wody na różne etapy rozwoju nasion zaplanowano kilka wariantów

doświadczalnych (Tabela 1.). Kontrolą w prowadzonych doświadczeniach stanowiły rośliny podlewane regularnie wodą w trakcie całej ontogenezy, do momentu naturalnego zasychania strąków. Bezpośrednio po zbiorze, nasiona zamrażano w ciekłym azocie i przechowywano w zamrażarce niskotemperaturowej do czasu izolacji RNA.

**Tabela 1.** Opis wariantów eksperymentalnych w doświadczeniu badającym wpływ suszy na rozwój nasion łubinu żółtego odmiany Taper.

<b>Nr wariantu</b>	<b>Wariant</b>	<b>Opis wariantu</b>	<b>Czas zbioru</b>
1.	K	Kontrola, rośliny podlewane przez całą ontogenezę	zbiór w 10 DAA
			zbiór w 15 DAA
			zbiór w 20 DAA
			zbiór w 30 DAA
2.	Susza 0-10d	Rośliny poddane suszy od momentu wytworzenia kwiatów do 10 dnia od zakwitnięcia	zbiór w 10 DAA
			zbiór w 20 DAA
			zbiór w 30 DAA
3.	Susza 0-20d	Rośliny nie podlewane od zakwitnięcia do 20 dnia po wytworzeniu kwiatów	zbiór w 15 DAA
			zbiór w 20 DAA
			zbiór w 30 DAA
4.	Susza 0-30 dni	Rośliny nie podlewane od zakwitnięcia do 30 dnia po wytworzeniu kwiatów	zbiór w 30 DAA
5.	Susza 20-30 dni	Rośliny poddane suszy od 20 dnia po wykształceniu kwiatu do dnia 30	zbiór w 30 DAA

## **4. Metody**

### **4.1. Identyfikacja oraz ekspresja wybranych genów w nasionach łubinu żółtego**

#### **4.1.1. Izolacja całkowitego RNA**

Do przygotowania bibliotek transkryptomowych wykorzystywano całkowity RNA izolowany z nasion łubinu żółtego odmiany Taper, zbieranych w 10, 20 i 30 DAA (w okresie czerwiec – lipiec 2017 roku). Jak opisano w poprzednim rozdziale, po zebraniu materiału roślinnego zamrażano go w ciekłym azocie i przechowywano w zamrażarce niskotemperaturowej  $-80^{\circ}\text{C}$  do momentu ekstrakcji RNA. Zebrane nasiona homogenizowano w ciekłym azocie w porcelanowych moździerzach. Rozdrobnione organy roślinne porcjowano, odważając po ok. 100 mg tkanki do probówki typu Eppendorff. Z uzyskanych w ten sposób naważek prowadzono izolację całkowitego RNA z użyciem zestawu Quick-RNA MiniPrep (Zymo Research) według instrukcji producenta. Elucję wyizolowanego RNA prowadzono z użyciem 40  $\mu\text{l}$  wody wolnej od RNaz, dołączonej do zestawu.

W analogiczny sposób postępowano izolując całkowity RNA, który następnie posłużył do przeprowadzenia reakcji odwrotnych transkrypcji. Materiał roślinny stanowiły wówczas nasiona łubinu żółtego odmiany Taper zbierane w 15, 20 i 30 DAA (w latach 2018 – 2020). W przypadku tych izolacji całkowity RNA izolowano z użyciem zestawu E.Z.N.A.® Plant RNA Kit (Omega Bio-tek) zgodnie z procedurą załączoną przez producenta.

#### **4.1.2. Walidacja całkowitego RNA**

##### **4.1.2.1. Analiza spektrofotometryczna**

Analizę ilości oraz jakości uzyskanego RNA wykonywano z użyciem spektrofotometru NanoDrop 1000 (Thermo Scientific). W celu określenia czystości RNA wyznaczano stosunek absorbancji fal świetlnych o długości 260/280 nm, którego wartość dla czystego RNA wynosi ok. 2,0 oraz 260/230 nm, który powinien mieścić się w granicach 1,8 – 2,2. Wartości poniżej wskazanych świadczą o zanieczyszczeniu prób białkami, polifenolami lub polisacharydami.



#### **4.1.2.2. Określenie współczynnika integralności RNA**

Aby potwierdzić dobrą jakość, ilość oraz brak degradacji kwasu rybonukleinowego, przeprowadzono zautomatyzowaną analizę ilościową i jakościową opartą na rozdziale kapilarnym i pomiarze fluorescencyjnym wyznaczającym ilość i stopień integralności rozdzielanego RNA w urządzeniu BioAnalyzer 2100 (Agilent) i programu Agilent Expert Software 2100 (Agilent) przy użyciu zestawu Bioanalyzer RNA (Agilent).

#### **4.1.2.3. Elektroforeza horyzontalna w żelu agarozowym**

Rozdział elektroforetyczny stosowano w kilku etapach prowadzonych badań. Przeprowadzany był zarówno do oceny ilości oraz jakości wyizolowanego RNA, ale także do analizy produktów reakcji PCR. Elektroforezę prowadzono w 1,4% żelu agarozowym w buforze 0,5x TBE przy napięciu 40V dla RNA i. Do studzienek żelu nakładano ok. 400 ng wyizolowanego RNA z dodatkiem buforu obciążającego 6x DNA Loading Dye. Do oceny wielkości rozdzielanego kwasu nukleinowego stosowano markery wielkości: GeneRuler 100bp Ladder, GeneRuler 100 bp Ladder Plus lub HyperLader 100bp Plus (Thermo Fisher Scientific Inc). Do żelu dodawano także Midori Green DNA Stain - związek interkalujący kwasy nukleinowe, który po wzbudzeniu światłem UV umożliwia ich wizualizację. Określenie jakości RNA przeprowadzono porównując intensywność fluorescencji frakcji 28S i 18S rybosomalnego RNA. Wyraźnie wyróżnione frakcje wysokocząsteczkowego rRNA (w stosunku co najmniej 2:1) oraz brak „smużenia” w ścieżce z rozdzielanym kwasem nukleinowym, a także mała ilość szybko migrujących niewielkich fragmentów RNA, świadczy o braku degradacji. W próbach nie zaobserwowano także DNA genomowego.

Do wizualizacji kwasów nukleinowych wykorzystywano transiluminator firmy Biorad, natomiast do archiwizacji oraz analizy elektroforegramów stosowano oprogramowanie QuantityOne.

### 4.1.3. Sekwencjonowanie NGS transkryptomów

Na matrycy zwalidowanego RNA została skonstruowana biblioteka cDNA z wykorzystaniem zestawu TruSeq Stranded Total RNA Ribo-Zero Plant depletion. Zastosowanie na końcach 5' i 3' uzyskanych fragmentów odpowiednich znaczników nukleotydowych pozwoliło na namnożenie i sekwencjonowanie tak utworzonej biblioteki. Następnie w całym szeregu reakcji sekwencjonowania przeprowadzonych na platformie HiSeq 4000 (Illumina Inc.), odczytano sekwencje otrzymanych wcześniej fragmentów cDNA. Dla każdego wariantu badawczego (Nasiona 10 DAA, 20 DAA i 30 DAA) wykonano sekwencjonowanie dla trzech powtórzeń biologicznych.

Do utworzenia genomu referencyjnego użyto 197917268 odczytów (około 9% procent odczytów z każdej próbki), z których odfiltrowano fragmenty o niskiej jakości (narzędzie Trimmomatic). Składanie przygotowanych odczytów w genom referencyjny przeprowadzono przy użyciu narzędzia Trinity 2.5.1. Otrzymano 319392 transkrypty, które zannotowano przy pomocy narzędzia BLAST białkami z bazy SwissProt, oraz transkryptami z bazy danych BLAST - Nucleotide collection - zawierającej sekwencje GenBank + EMBL + DDBJ + PDB + RefSeq. Każdej adnotacji dokonano dwukrotnie: raz na białkach/transkryptach wszystkich organizmów, drugi raz na białkach/transkryptach przefiltrowanych dla *Lupinus luteus*. Zraportowane zostały tylko najlepsze dopasowania, z uwzględnieniem aby wartość e-value była nie mniejsza niż 1e-20. Zebrane odczyty uliniowano do utworzonego genomu referencyjnego przy pomocy narzędzia Bowtie2. Dla każdego powtórzenia biologicznego wykonano analizę w ten sam sposób.

#### 4.1.3.1. Identyfikacja wybranych genów

Identyfikacja genów *LIBETA*, *LIDELTA2*, *LILEC2*, *LIPKL*, *LIABI3*, *LIFUS3*, *LIVALI* została przeprowadzona na podstawie składania i porównania odczytów z transkryptomu zidentyfikowanych jako fragmenty wymienionych genów występujących u gatunków pokrewnych, głównie *Lupinus angustifolius*, dla którego znana jest niemal pełna sekwencja genomu (Singh i in., 2020; Mousavi-Derazmahalleh i in., 2018; Hane i in., 2017).

#### **4.1.3.2. Określenie poziomu ekspresji wybranych genów**

Poziom ekspresji badanych genów został oszacowany zarówno dla każdego pojedynczego genu, jak i izoformy i opisany za pomocą RPKM (Reads Per Kilobase Million). Bezpośrednie porównanie pomiędzy badanymi wariantami pozwoliło ustalić  $\log_2FC$  w nasionach zebranych w kolejnych dniach rozwoju. Przy zastosowaniu narzędzia Samtools idxstats (wersja 1.3.1) określono poziom ekspresji w wybranych transkryptach z nasion łubinu żółtego odmiany Taper w 10, 20 oraz 30 dniu po wykształceniu kwiatu. Analizę różnic w poziomach ekspresji transkryptów przeprowadzono przy pomocy narzędzia edgeR (wersja 3.12.1) (exactTest).

### **4.2. Określenie ekspresji wybranych genów pod wpływem aplikacji fitohormonów oraz suszy**

#### **4.2.1. Reakcja odwrotnej transkrypcji (qPCR)**

Wyizolowane i zwalidowane RNA stanowiło także matrycę do syntezy komplementarnego DNA (cDNA). Reakcję odwrotnej transkrypcji przeprowadzano używając zestawu NG dART RT kit (EURx) zgodnie z zaleceniami producenta. Do każdej reakcji używano 1  $\mu$ g lub 2  $\mu$ g RNA.

#### **4.2.2. Reakcja Real Time PCR (RT-qPCR)**

Aby zweryfikować wyniki uzyskane z RNA-seq oraz zbadać wpływ aplikowanych hormonów na aktywność transkrypcyjną zidentyfikowanych genów, przeprowadzono reakcję Real Time PCR (RT-qPCR). Jako matrycę wykorzystywano uzyskane w reakcji odwrotnej transkrypcji cDNA, które rozcieńczano pięciokrotnie. Do przeprowadzenia reakcji używano zestawu SensiMix™ II Probe Kit (Bioline). Reakcje prowadzono zgodnie z procedurą producenta z temperaturą przyłączania starterów 57°C w termocyklerze Light Cycler 480 Real-Time PCR System (Roche). Mieszanki reakcyjne przygotowywano w 96. dołkowych płytkach a skład mieszaniny zestawiono w Tabeli 2. Dla każdego z zestawu (każdej kolejnej reakcji w multiplówkach) prowadzonych reakcji qPCR każdorazowo powtarzano przynajmniej dwa punkty krzywej kalibracyjnej dla potwierdzenia efektywności reakcji. Dla każdego badanego wariantu wykonano reakcje dla trzech powtórzeń biologicznych w czterech

powtórzeniach technicznych. W badaniach stosowano sondy molekularne Universal ProbeLibrary (UPL) (Roche) oraz specyficzne startery (Tabela 3.), które zostały zaprojektowane w programie ProbeFinder (Roche) na podstawie sekwencji zidentyfikowanych w doświadczeniu RNA-seq. Jako gen referencyjny wykorzystywano *LIACTIN* (*LIACT*), zidentyfikowany wcześniej dla łubinu żółtego. Stanowił on odniesienie dla ekspresji badanych genów: *LIBETA*, *LIDELTA2*, *LIPKL*, *LILEC2*, *LIABI3*, *LIFUS3*, *LIVAL1*.

Dla każdego z badanych genów wyznaczono wydajność reakcji. W tym celu wykonano krzywe kalibracyjne w czterech punktach pomiarowych (1 ng/μl; 0,1 ng/μl; 0,01 ng/μl i 0,001 ng/μl). Matryce do przeprowadzenia reakcji z wyznaczeniem efektywności qPCR wyznaczono przez startery flankujące oddalone od startera właściwego ampliconu używanego w reakcji qPCR o 200 – 300 nt (Tabela 4.). W analogiczny sposób postępowano badając wpływ suszy na ekspresję genów *LIBETA*, *LIDELTA2*, *LIPKL* oraz *LIABI3*.

Wyniki analizowano w programie LightCycler 480 Software dedykowanym do programowania warunków reakcji, deponowania danych oraz analizy otrzymanych wyników. Uzyskane wyniki zestawiono w formie wykresów z uwzględnieniem średniego błędu oraz istotności statystycznej.

**Tabela 2.** Skład mieszaniny reakcyjnej stosowanej w reakcji RT-qPCR.

Nazwa odczynnika	Objętość [μl]
cDNA 5x rozcieńczone	5
Starter prawy (10 μM)	0,2
Starter lewy (10 μM)	0,2
sonda UPL	0,1
SensiMix	5

**Tabela 3.** Wykaz specyficznych starterów oraz rodzajów sond UPL używanych w reakcji RT-qPCR.

<b>Badany gen</b>		<b>Sekwencja 5'→3'</b>	<b>Długość (nt)</b>	<b>Temperatura topnienia (°C)</b>	<b>Numer Sondy UPL</b>
<i>LIBETA</i>	FP	TGGATTTGGCATAAATGCTG	20	47.7	6
	RP	ACATTGTCTTCAGAACCTGCAA	22	51.1	
<i>LIDELTA2</i>	FP	AAGATGATTCAGCAGGAGCAA	21	50.5	69
	RP	TTCCTGCTATGTCCAACAACA	21	50.5	
<i>LIPKL</i>	FP	TCAACCACATCTTGACGATACA	22	51.1	67
	RP	TCCAACAATTGCAACTTACCC	21	50.5	
<i>LIFUS3</i>	FP	CCACCACCTCCACCATTT	18	50.3	69
	RP	TTTACGAGCCGGAGATG	18	50.3	
<i>LIABI3</i>	FP	CTATGGCACAGGTGGTTCCT	20	53.8	138
	RP	CTGGGTTTGCATGGCAGT	18	50.3	
<i>LILEC2</i>	FP	GCCGGATTATTATCCCAAAGA	21	50.5	30
	RP	TTCCTTTTTGCAAAGGGTTG	20	47.7	
<i>LIVAL1</i>	FP	GACTTACATGGGAAGAAGCACA	22	53.0	138
	RP	TGTTACAACATTTGGCTTGACA	22	49.2	
<i>LIACT</i>	FP	TGGACGTACTACAGGTATTGTGC	23	59.0	9
	RP	ATGGGCACTGTATGGCTCAC	20	60.0	

**Tabela 4.** Zestawienie starterów flankujących

Badany gen		Sekwencja 5'→3'	Długość (nt)	Temperatura topnienia (°C)	Numer Sondy UPL
<i>LIBETA</i>	FP	AAAGGCAAACCCTCTGAATCTGGC	24	57.4	6
	RP	GATAGGACCCCTTATTCCACGCCT	21	59.1	
<i>LIDELTA2</i>	FP	ATGCACATGCATTCTTCAGCCTTAC	26	56.4	69
	RP	GAATATCTGCTGCAATGCACGACAC	25	57.7	
<i>LIPKL</i>	FP	CGTGTTGAGTTAAGCAGCAAGCAGA	25	57.7	67
	RP	TGCCCAAGTCGATGAGCTCTAGC	23	58.8	
<i>LIFUS3</i>	FP	CTGTGATTTAAGGGCAGGTGTTGGAG	26	59.5	69
	RP	GCCATGAGTGTTAACGAAGTCTCCAG	26	59.5	
<i>LIAB13</i>	FP	GATTAGGACCATCTGCGACAA	21	52.4	162
	RP	TGTATTCTGGGTTTGCATGGTGGT	24	55.7	
<i>LILEC2</i>	FP	AATCAGCCTAGTCTTGGTGGTTATCCC	27	59.7	30
	RP	TTGCTCTTTGTTGGCAGAAACATACAG	27	56.7	
<i>LIVAL1</i>	FP	GGCATCTCAACGGAGGAAACTGTC	24	59.1	138
	RP	GGCTCATGTTCTTCAATTGACTCGC	25	57.7	
<i>LIACT</i>	FP	GGTTGCAGAAGATGGCTGATGCT	23	62	9
	RP	ATGGGCACTGTATGGCTCACACCA	24	64.8	

### **4.3. Profilowanie białek w nasionach łubinu żółtego**

W celu sprawdzenia ilości białek zapasowych gromadzonych w nasionach łubinu żółtego odmiany Taper oraz zbadania wpływu aplikowanych fitohormonów na stopień ich akumulacji, przeprowadzono izolację białek oraz pomiar ich ilości metodą chromatografii cieczowej w nanoskali połączonej z tandemową spektrometrią mas (nanoLC-MS/MS). Badania te zostały przeprowadzone we współpracy z Laboratorium Spektrometrii Mas i Chromatografii (MS-LAB) Polskiego Ośrodka Rozwoju Technologii we Wrocławiu.

#### **4.3.1. Izolacja oraz oznaczenia ilości białek**

Izolacje białek prowadzono z wykorzystaniem nasion zbieranych w takich samych wariantach jak dla izolacji RNA. Ekstrakcję białek prowadzono także z użyciem zestawu E.Z.N.A.® Plant RNA Kit (Omega Bio-tek), który umożliwia izolację zarówno RNA, jak i białek z jednej próbki. Wyizolowane białka zawieszano w 200 mM buforze HEPES o pH 8,5. Stężenia całkowite białek w próbkach zostały określone poprzez pomiar absorpcji przy długości fali 280 nm używając spektrofotometru Nanodrop ND-1000 (Thermo Scientific). Po izolacji próby przechowywano w temperaturze -80°C. Przed przystąpieniem do analiz nanoLC-MS/MS przeprowadzono ponowny pomiar stężenia białek.

#### **4.3.2. Przygotowanie próbek do analizy nanoLC-MS/MS**

Większość próbek wyizolowanych białek zawierała nierozpuszczalny osad, który zwirowano (2500 x g, 5 min, RT room temp.), a do pomiarów pobierano objętość supernatantu zawierającą 80 µg białka. Jako próbę odniesienia, którą dodawano do każdego pomiaru, wykorzystano zmieszane izolaty z dziewięciu prób (stanowiących mieszaninę wszystkich badanych wariantów) połączonych równowagowo i rozcieńczonych do stężenia 320 µg/ml. Izolaty białek przygotowywano do analizy spektrometrii masowej według strategii bottom-up zgodnie z procedurą FASP (Filter Assisted Sample Preparation) (Wiśniewski i in., 2009), polegającej na wykorzystaniu filtrów MWCO (Mass Weight Cut-Off) 10 kDa. Próby izolatów białka (80 µg) poddano denaturacji, redukcji mostków disulfidowych, alkilacji reszt cysteiny i trawieniu na filtrach wirówkowych z odcięciem masy cząsteczkowej 10 kDa (VWR). Filtry kondycjonowano przez płukanie 500 µl wody MiliQ i 100 µl 100mM buforu TEAB (wodorowęglan trietyloamoniowy, Thermo Scientific) przez wirowanie, każdorazowo

po nałożeniu roztworu (30 minut,  $10\ 000 \times g$ ,  $4^{\circ}C$ ). Próbki zredukowano 10 mM TCEP (tris (2-karboksyetylo) fosfina, Thermo Scientific) przez 1 h w  $55^{\circ}C$ , a następnie alkilowano 17 mM jodoacetamidem (Thermo Scientific) w 100 mM TEAB przez 30 min. w temperaturze pokojowej. Po inkubacji próbki odwirowano (30 minut,  $10\ 000 \times g$ ,  $4^{\circ}C$ ) i trawiono roztworem trypsyny (białko:enzym, 40:1) w 50 mM TEAB (Promega) w  $37^{\circ}C$  przez 18 godzin. Peptydy znakowano zestawem TMTsixplex Label Reagent Set (Thermo Scientific) zgodnie z instrukcją producenta. Analiza z wykorzystaniem TMT 6plex umożliwia jednoczesny pomiar sześciu próbek i określenie względnych relacji pomiędzy intensywnościami pochodzącymi od tych samych peptydów występujących w tych próbkach, w ramach jednego przebiegu LC-MS/MS. Wszystkie odczynniki i rozpuszczalniki były dedykowane do analiz typu LC-MS.

W niniejszym doświadczeniu przeprowadzono 13 pomiarów. W każdym z nich kanał 126 odpowiadał próbce odniesienia (Ref) a kolejne kanały przypisano próbkom (Tabela 5). Pomiarom poddawano 63 próby białkowe, stanowiące 21 wariantów doświadczalnych, każdy w trzech powtórzeniach biologicznych.



**Tabela 5.** Szczegółowa rozpiska prób wraz z przypisanymi kanałami w poszczególnych przebiegach LC-MS/MS. Skróty: Ref - próba odniesienia, 15/20/30 DAA – 15/20/30 dzień po wykształceniu kwiatu, K – wariant kontrolny, ABA – rośliny traktowane ABA, GA – rośliny po aplikacji GA<sub>3</sub>, 0/4/8h – godzina zbioru próby, cyfra na końcu nazwy oznacza numer powtórzenia biologicznego

Nr znakowania (pliku)	Kanały znakowania TMT					
	126	127	128	129	130	131
1	Ref	Nasiona 15DAA K 0h 3	Nasiona 15DAA K 4h 2	Nasiona 15DAA K 8h 1	Nasiona 15DAA ABA 4h 2	Nasiona 15DAA ABA 8h 3
2	Ref	Nasiona 15DAA K 0h 6	Nasiona 15DAA K 4h 4	Nasiona 15DAA K 8h 6	Nasiona 15DAA GA 4h 4	Nasiona 15DAA GA 8h 1
3	Ref	Nasiona 15DAA K 4h 8	Nasiona 15DAA ABA 4h 5	Nasiona 15DAA ABA 4h 6	Nasiona 15DAA GA 4h 5	Nasiona 15DAA GA 4h 6
4	Ref	Nasiona 15DAA K 8h 7	Nasiona 15DAA ABA 8h 4	Nasiona 15DAA ABA 8h 6	Nasiona 15DAA GA 8h 4	Nasiona 15DAA GA 8h 8
5	Ref	Nasiona 20DAA K 0h 8	Nasiona 20DAA K 4h 1	Nasiona 20DAA K 8h 2	Nasiona 20DAA ABA 4h 6	Nasiona 20DAA ABA 8h 5
6	Ref	Nasiona 20DAA K 0h 12	Nasiona 20DAA K 4h 6	Nasiona 20DAA K 8h 8	Nasiona 20DAA GA 4h 1	Nasiona 20DAA GA 8h 3
7	Ref	Nasiona 20DAA K 4h 11	Nasiona 20DAA ABA 4h 7	Nasiona 20DAA ABA 4h 9	Nasiona 20DAA GA 4h 7	Nasiona 20DAA GA 4h 10
8	Ref	Nasiona 20DAA K 8h 9	Nasiona 20DAA ABA 8h 6	Nasiona 20DAA ABA 8h 7	Nasiona 20DAA GA 8h 6	Nasiona 20DAA GA 8h 1
9	Ref	Nasiona 30DAA K 0h 4	Nasiona 30DAA K 4h 8	Nasiona 30DAA K 8h 5	Nasiona 30DAA ABA 4h 5	Nasiona 30DAA ABA 8h 2
10	Ref	Nasiona 30DAA K 0h 9	Nasiona 30DAA K 4h 9	Nasiona 30DAA K 8h 7	Nasiona 30DAA GA 4h 1	Nasiona 30DAA GA 8h 2
11	Ref	Nasiona 30DAA K 4h 10	Nasiona 30DAA ABA 4h 7	Nasiona 30DAA ABA 4h 10	Nasiona 30DAA GA 4h 4	Nasiona 30DAA GA 4h 5
12	Ref	Nasiona 30DAA K 8h 12	Nasiona 30DAA ABA 8h 6	Nasiona 30DAA ABA 8h 7	Nasiona 30DAA GA 8h 3	Nasiona 30DAA GA 8h 4
13	Ref	Nasiona 15DAA K 0h 2	Nasiona 20DAA K 0h 4	Nasiona 30DAA K 0h 3	pusty kanał	pusty kanał

### 4.3.3. Rozdział chromatograficzny białek metodą nanoLC-MS/MS

Pomiary nanoLC-MS/MS przeprowadzono w urządzeniu LTQ Elite Orbitrap ETD (Thermo) połączonym z chromatografem Easy nLC 1000 (Thermo Scientific). Peptydy zostały wychwycone przy użyciu 2 cm kolumny pałkowej Acclaim PepMap C18 (Thermo Scientific), a następnie rozdzielano je na kolumnie Acclaim PepMap C18, 100A, 500 mm × 0,075 mm × 3 μm (Thermo Scientific) w temperaturze otoczenia. Fazą ruchomą A był 0,1% wodny roztwór kwasu mrówkowego, natomiast fazę B stanowił roztwór 0,1% kwasu mrówkowego w acetonitrylu z wodą 90:10 (v/v). Przepływ chromatograficzny ustawiono na 300 nl/min z gradientem 2-55% fazy B w ciągu 150 min. Objętość nastrzyku ustalono na 5 μl. Zastosowano zewnętrzną kalibrację spektrometru mas za pomocą standardu kalibracyjnego LTQ Velos Positive, uzyskując SD < 1 ppm. Pomiary wykonywano w trybie jonów dodatnich w sposób zależny od danych w zakresie MS 110-2000 m/z. Napięcie kapilary ustawiono na 3 kV. Zastosowano fragmentację HCD 10 najlepszych pików, przy znormalizowanej energii zderzenia ustawionej na 35 eV w oknie izolacji 1 m/z z minimalnym stanem ładunku 2+ jonu macierzystego i wykluczeniem dynamicznym przez 30 s po dwóch widmach.

Otrzymane dane poddano kilkustopniowej obróbce i analizie. Surowe dane zaimportowano do oprogramowania Proteome Discoverer 2.3, w którym przeprowadzono identyfikację białek.

### 4.3.4. Identyfikacja i kwantyfikacja białek

Widma masowe przetwarzano za pomocą programu Proteome Discoverer 2.4. Wyodrębnienie i opisanie widm MS/MS wykonano używając wyszukiwarki Sequest HT i Mascot. Do przeszukiwania Mascot użyto bazy danych SwissProt (09.2019) z taksonomią Viridiplantae, enzymem trypsyną (2 pominięte cięcia), maksymalnym błędem prekursora 20 ppm, maksymalnym błędem fragmentu 0,1 Da i TMT 6plex oraz modyfikacjami statycznymi karbamidometylu, a także N-końcową oksydacją acetylu i metioniny, jako modyfikacjami dynamicznymi. Wyszukiwanie Sequest HT przeprowadzono na niestandardowej bazie danych (sekwencje SwissProt i TrEMBL dla taksonomii *Lupinus* wraz z podtaksonomiami) pobranej z UniprotKB w dniu 30.09.2019 r. Modyfikacje zostały wprowadzone w taki sam sposób, jak w przypadku wyszukiwania Mascot. Oznaczenia ilościowe (kwantyfikacje) jonów reporterowych przeprowadzono przy użyciu oprogramowania Proteome Discoverer 2.4.

Widma normalizowano do całkowitej ilości peptydów w próbce i skalowano do kanału próbki referencyjnej (TMT 126). Do oceny ilościowej użyto peptydów unikalnych i typu „razor”, z co najmniej dwoma dopasowanymi peptydami na białko. Współczynnik fałszywego odkrycia był ustawiony na 0,01 (strict) i 0,05 (relaxed). Z wyników kwantyfikacji nie wykluczano peptydów wspólnych, ponieważ wykorzystano je później do szacowania całkowitej ilości określonych grup białek, np. konglutyn.

#### **4.4. Określenie ilości wybranych fitohormonów w nasionach łubinu żółtego**

W celu określenia ilości endogennych fitohormonów w kolejnych fazach rozwoju nasion łubinu żółtego odmiany Taper a także zmian ich akumulacji pod wpływem egzogennie aplikowanych ABA i GA, przeprowadzono izolację wybranych fitohormonów, a następnie pomiar ich ilości metodą LC-MS/MS. Do badań wykorzystano nasiona łubinu żółtego odmiany Taper, zbierane w tych samych wariantach, jak opisano powyżej dla izolacji RNA (w 15, 20 i 30 DAA, poddane działaniu ABA i GA oraz kontrolne).

##### **4.4.1. Izolacja wybranych fitohormonów z nasion łubinu żółtego**

Zamrożone nasiona ucierano w ciekłym azocie w porcelanowym moździerzu i odważano 100-150 mg tkanki w probówce typu Eppendorf. Wszystkie odczynniki i rozpuszczalniki były dedykowane do analiz typu LC-MS. Do każdej próby homogenatu dodawano 1500  $\mu$ l zimnego 80% MeOH (Sigma-Aldrich) i kilkanaście kryształków BHT (butylowany hydroksytoluen) (Sigma-Aldrich-Aldrich). Do tak przygotowanych prób dodawano mieszaninę znakowanych standardów:  $d_2GA_1$ ,  $d_2GA_3$ ,  $d_2GA_4$ ,  $d_2GA_7$ ,  $d_6ABA$ ,  $d_2IAA$  (OlChemIm). Do każdej próby dodawano po 20ng każdego ze znakowanych standardów i wytrząsano w 4°C przez 1h. Następnie próby wirowano (10 min, 12000xg, 4°C), zbierano supernatant, który osuszano w strumieniu azotu. Suchą pozostałość rozpuszczano w 1 ml octanu etylu, po czym próby wytrząsano z użyciem wytrząsarki typu vortex i wirowano (2 min, 12000xg, temperatura pokojowa). W kolejnym kroku octan etylu odparowywano do sucha w strumieniu azotu w temperaturze 45°C, a pozostałość rozpuszczano w 1 ml buforu octanowego 1 mM o pH 7-8 (Sigma-Aldrich). Następnie kolumnienki ekstrakcyjne C18-SPE 100 mg (Baker) aktywowano i kondycjonowano przez dwukrotne przepłukanie 1ml MeOH (Sigma-Aldrich). W kolejnym etapie wykonano dwukrotne płukanie 0,5 ml buforu octanowego (1mM o pH 7-8). Na tak przygotowane

kolumnienki nanoszono próby, po czym dwukrotnie przepłukiwano je 1ml 1M FA (Sigma-Aldrich) i pozostawiano do osuszenia na 20 min. Po tym czasie, prowadzono elucję prób z użyciem 0,5 ml 80% MeOH. W ostatnim etapie wszystkie próby zostały zagęszczone w warunkach próżniowych do objętości ok. 100µl w koncentratorze próżniowym typu SpeedVac.

#### **4.4.2. Analiza LC-MS/MS**

Rozdział chromatograficzny prowadzono wykorzystując technikę chromatografii ciekowej z tandemową spektrometrią mas (Liquid Chromatography (LC) Mass Spectrometry (MS)) przy użyciu zintegrowanych systemów Nexera UHPLC i LCMS-8045 (Shimadzu Corporation). Parametry źródła jonów optymalizowano w trybie dodatnim ESI. Jako fazy ruchomej A używano 100% MeOH, a jako fazę B wykorzystywano 10 mM roztwór kwasu mrówkowego (Sigma-Aldrich). Rozdział prowadzono z użyciem kolumny Ascentis® Express C18 2.7µm (10cm x 2.1mm) (Supelco, Merck). Elucję prowadzono w gradiencie binarnym (program w Tabeli 6.) z szybkością przepływu 0.35 ml/min. Na koniec kolumnę równoważono do warunków początkowych (30:70 A:B, v/v) przez 3 min. Temperatura kolumny wynosiła 40°C, natomiast próbek 4°C. Objętość nastrzyku próby wynosiła 2µl. Całkowity czas rozdziału pojedynczej próby wyznaczono na 7 min. Po każdej serii prób, kolumnę przemywano 100% MeOH. Ustalone czasy zbierania danych specyficznych dla hormonu przedstawiono w Tabeli 7. Poszczególne fitohormony identyfikowano dzięki śledzeniu reakcji rozpadu wybranych jonów (MRM) w pozytywnej (+) lub negatywnej (-) jonizacji, wartości przedstawiono w Tabeli 8. Wszystkie analizy wykonano w trzech powtórzeniach biologicznych oraz trzech powtórzeniach technicznych (dla każdego powtórzenia biologicznego). Wszystkie dane zostały przetworzone przez oprogramowanie LabSolutions dla LCMS-8045 (wersja 5.93). Stężenia związków endogennych w próbce wyliczano na podstawie stosunku nieznakowanego (endogennego) związku do znakowanego wzorca wewnętrznego w przeliczeniu na jednostkę masy.

**Tabela 6.** Dane gradientu binarnego stosowanego w rozdziale fitohormonów metodą LC-MS/MS.

Czas (min)	Faza ruchoma A (%)	Faza fruchoma B (%)
0.01	30	70
6.00	60	40
6.10	60	40
6.11	30	70

**Tabela 7.** Ustalane czasy zbierania danych dla rozdzielanych fitohormonów w nasionach łubinu żółtego odmiany Taper.

Hormon	Czas zbierania danych (min)
IAA/d <sub>2</sub> IAA	0.8 – 2.2
ABA/d <sub>6</sub> ABA	0.8 – 2.2
GA <sub>1</sub> /d <sub>2</sub> GA <sub>1</sub>	0.5 – 1.9
GA <sub>3</sub> /d <sub>2</sub> GA <sub>3</sub>	0.5 – 2.2
GA <sub>4</sub> /d <sub>2</sub> GA <sub>4</sub>	1.2 – 2.7
GA <sub>7</sub> /d <sub>2</sub> GA <sub>7</sub>	1.2 – 2.7

**Tabela 8.** Wartości MRM oraz typ jonizacji dla rozdzielanych fitohormonów w nasionach łubinu żółtego odmiany Taper.

Hormon	Typ jonizacji	Wartości MRM
IAA	(+)	176>130
d <sub>2</sub> IAA	(+)	178>132
ABA	(-)	263>153
d <sub>6</sub> ABA	(-)	269>159
GA <sub>1</sub>	(-)	347>259
d <sub>2</sub> GA <sub>1</sub>	(-)	349>261
GA <sub>3</sub>	(-)	345>239
d <sub>2</sub> GA <sub>3</sub>	(-)	347>241
GA <sub>4</sub>	(-)	331>287
d <sub>2</sub> GA <sub>4</sub>	(-)	333>259
GA <sub>7</sub>	(-)	329>223
d <sub>2</sub> GA <sub>7</sub>	(-)	331>225

## **4.5. Analiza statystyczna**

### **4.5.1. Analiza statystyczna danych RNA-seq**

Analizę różnic w poziomach ekspresji transkryptów przeprowadzono przy użyciu narzędzia edgeR v 3.12.1 (exactTest). Dla każdego typu nasion dokonywano porównań grupowych. Wszystkie grupy porównano ze sobą i otrzymano wyniki analizy.

### **4.5.2. Analiza statystyczna dla wyników z RT-qPCR**

Analizy statystyczne przeprowadzono przy użyciu programu IBM SPSS Statistics 27. W celu weryfikacji różnic w zmianach ekspresji genów przeprowadzono analizę wariancji w modelu mieszanym (3x3x3) (3-ANOVA). Kolejne godziny pobierania próbek biologicznych (0h vs 4h vs 8h) stanowiły zmienną wewnątrzgrupową, natomiast zmiennymi międzygrupowymi były podawany hormon (GA vs ABA vs Kontrola) oraz faza rozwoju nasion (15 DAA vs 20 DAA vs 30 DAA). Próg istotności statystycznej przyjęty w tych badaniach wynosił  $\alpha = 0,05$ .

W przypadku wyników dotyczących badania wpływu suszy na ekspresję wybranych genów zastosowano test *t* Studenta dla prób zależnych oraz jednoczynnikową analizę wariancji przy porównaniach wielokrotnych, gdzie dodatkowo zastosowano poprawkę Bonferroniego na próg istotności. Za wyjściowy próg istotności statystycznej przyjęto  $\alpha = 0,05$ .

### **4.5.3. Analiza statystyczna dla wyników z nanoLC-MS/MS**

W celu określenia istotności zmian poziomu białek zapasowych  $\beta$ - i  $\delta$ -konglutyn w nasionach łubinu żółtego w kolejnych fazach ich rozwoju, pod wpływem egzogennie podawanych fitohormonów oraz w wybranych godzinach cyklu dobowego, wykonano serię testów H Kruskala-Wallisa i Friedmana ANOVA w programie statystycznym IBM SPSS 27. Jako wiążący dla interpretacji wyników istotnych statystycznie przyjęto próg  $\alpha = 0,05$ .

#### **4.5.4. Analiza statystyczna dla wyników z LC-MS/MS**

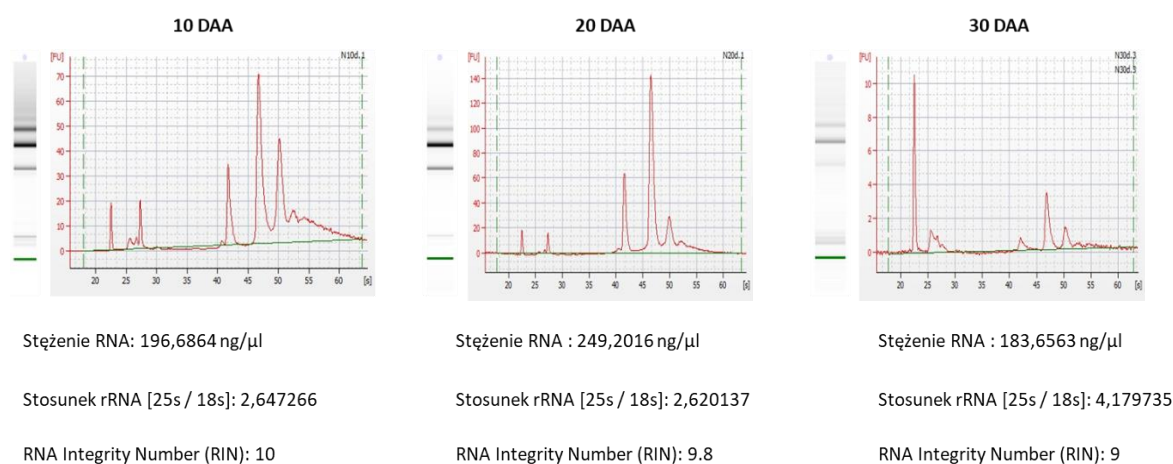
Aby zweryfikować różnice pomiędzy badanymi dniami rozwoju nasion, wykonano analizę wariancji w modelu mieszanym (3x3x3) (3-ANOVA) w programie statystycznym IBM SPSS 27. Zmienną wewnątrzgrupową był czas okołodobowy pomiaru hormonu (0h vs. 4h vs. 8h), natomiast zmienne międzyobiektywne stanowiły odpowiednio: podany hormon (GA vs. ABA vs. Kontrola) oraz stadium rozwoju nasion (dzień 15 vs. 20 vs. 30). Za poziom istotności przyjęto próg  $\alpha = 0,05$ .

## 5. Wyniki

### 5.1. Sekwencjonowanie bibliotek cDNA

#### 5.1.1. Walidacja RNA

Do przygotowania bibliotek cDNA wykorzystano RNA bardzo wysokiej jakości, które w analizach z wykorzystaniem rozdzielania kapilarnego w urządzeniu BioAnalyzer 2100 przyjmowały wartości powyżej 9. Przykładowe wykresy obrazujące jakość oraz ilość kwasu rybonukleinowego zaprezentowano na Rycinie 4.



**Rycina 4.** Przykładowe elektroforegramy rozdzielania kapilarnego przy użyciu BioAnalyzer 2100 stanowiące obraz rozdzielania cząsteczek RNA dla prób nasion w wariantach 10, 20, 30 DAA wraz z uzyskanymi stężeniami RNA [ng/μl], wartościami stosunku powierzchni pików dla frakcji 25s i 18s rRNA oraz otrzymana wartość integralności RNA (RIN).

#### 5.1.2. Identyfikacja homologów genów związanych z rozwojem nasion i gromadzeniem białek zapasowych

Identyfikacje sekwencji homologicznych do wybranych genów związanych z rozwojem nasion i gromadzeniem białek zapasowych wykonano na podstawie sekwencjonowania RNA-seq. Zestawiając ze sobą zsekwencjonowane fragmenty przyporządkowano zidentyfikowane sekwencje do genów występujących u wielu gatunków roślin, zwłaszcza roślin strączkowych. Wszystkie zidentyfikowane sekwencje wykazały homologię wynoszącą ok. 90% identyczności względem genów występujących u *Lupinus angustifolius*. Dla wszystkich zidentyfikowanych genów stwierdzono występowanie domen charakterystycznych dla ich odpowiedników np. domena B3 u *LIAB13*, *LIFUS3*, *LILEC2*.



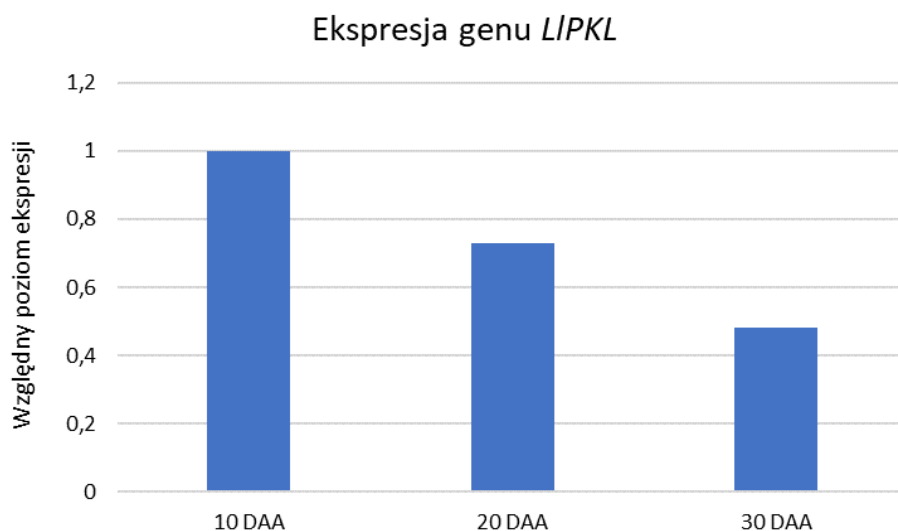
Wszystkie dane zostały zdeponowane w Banku Genów (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) pod numerem akcesyjnym: GSE207091.

### **5.1.3. Aktywność transkrypcyjna wybranych genów**

Zastosowanie sekwencjonowania RNA wysokiej przepustowości pozwoliło określić zmiany poziomu ekspresji genów związanych z rozwojem nasion i gromadzeniem białek zapasowych w nasionach łubinu żółtego odmiany Taper. Ekspresję oznaczono z zastosowaniem wielokrotnego testowania i wyznaczenia  $\log_2FC$ . Dla wszystkich uzyskanych wyników określono istotność statystyczną i tylko w przypadku *LIPKL* była ona nieznacznie większa niż 0,01. W przypadku pozostałych genów każdorazowo uzyskano wynik znacznie niższy od  $p = 0,01$ . Wyniki dla zidentyfikowanych genów zaprezentowano poniżej.

### 5.1.3.1. Aktywność transkrypcyjna *LIPKL* (*LIPICKLE*)

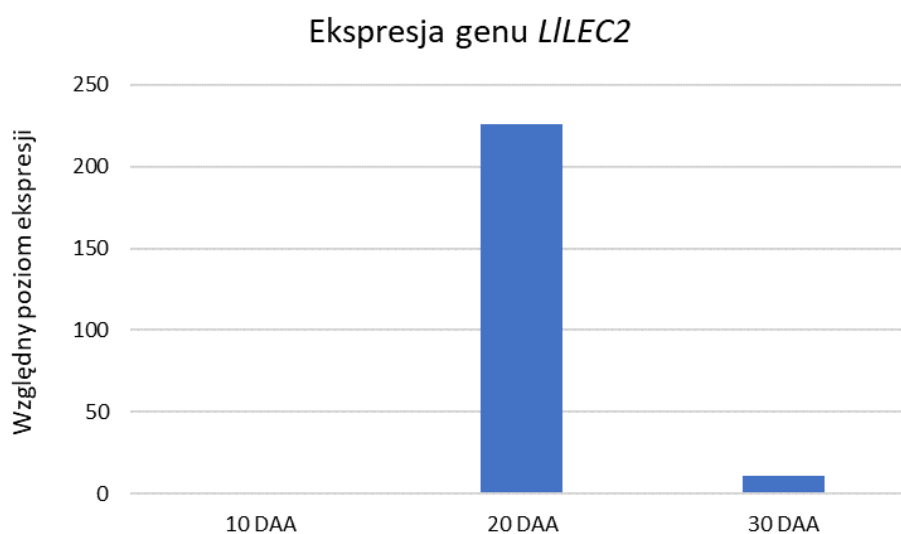
W odniesieniu do wartości obserwowanej w dziesiątym dniu po wykształceniu kwiatu (10 DAA), oznaczono spadek aktywności transkrypcyjnej dla genu *LIPKL* w dwudziestym dniu (20 DAA) do wartości 0,73 ( $p = 0,01$ ). Po kolejnych dziesięciu dniach, względna ilość transkryptów badanego genu spadła do poziomu 0,48 ( $p = 0,0169$ ) w porównaniu do wartości początkowej. Wyniki zaprezentowano na Wykresie 1.



**Wykres 1.** Porównanie zmian poziomu ekspresji genu *LIPKL* pomiędzy przeanalizowanymi bibliotekami cDNA; DAA – dzień po wykształceniu kwiatu (Day After Anthesis)

### 5.1.3.2. Aktywność transkrypcyjna *LILEC2* (*LILEAFY COTYLEDON2*)

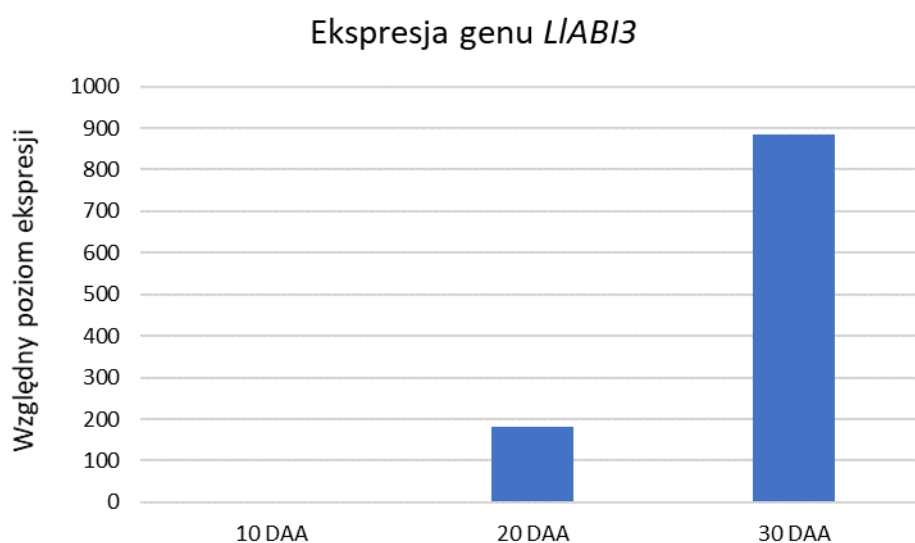
W przypadku genu *LILEC2* zidentyfikowany wzorzec ekspresji wskazuje na wzrost aktywności transkrypcyjnej między dziesiątym a dwudziestym dniem po wykształceniu kwiatu ( $4,79E^{-94}$ ). W ostatnim badanym etapie rozwoju nasion (30 DAA) odnotowano niemal 20 - krotny spadek ekspresji genu *LIPKL* w porównaniu do poprzedniego dnia rozwoju ( $p = 0,00041$ ). Wyniki przedstawiono na Wykresie 2.



**Wykres 2.** Porównanie zmian poziomu ekspresji genu *LILEC2* pomiędzy przeanalizowanymi bibliotekami cDNA; DAA – dzień po wykształceniu kwiatu (Day After Anthesis)

### 5.1.3.3. Aktywność transkrypcyjna *LIABI3* (*LIABA INSENSITIV3*)

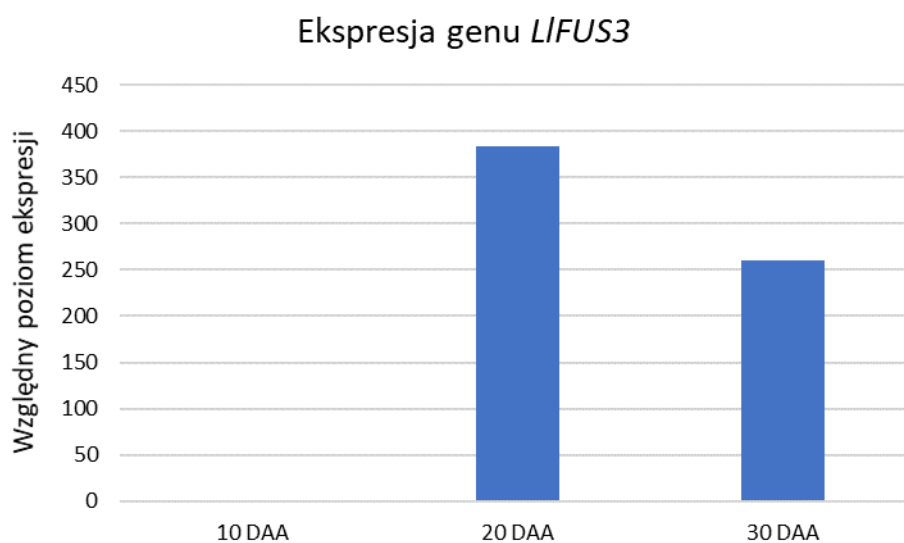
Porównując poziom ekspresji genu *LIABI3* pomiędzy trzema skonstruowanymi bibliotekami cDNA, wykazano wzrost ilości transkryptów badanego genu w kolejnych dniach rozwoju nasion. Aktywność transkrypcyjna genu *LIABI3* w 20 DAA wzrosła niemal 200-krotnie w porównaniu do wartości początkowej ( $p = 5,65E^{-107}$ ). Z kolei w 30 dniu względny poziom ekspresji genu *LIABI3* przyjmował wartość około pięć razy większą w porównaniu do wariantu 20 DAA ( $p = 4,86E^{-150}$ ). Wyniki zaprezentowano na Wykresie 3.



**Wykres 3.** Porównanie zmian poziomu ekspresji genu *LIABI3* pomiędzy przeanalizowanymi bibliotekami cDNA; DAA – dzień po wykształceniu kwiatu (Day After Anthesis)

#### 5.1.3.4. Aktywność transkrypcyjna *LIFUS3* (*LIFUSCA3*)

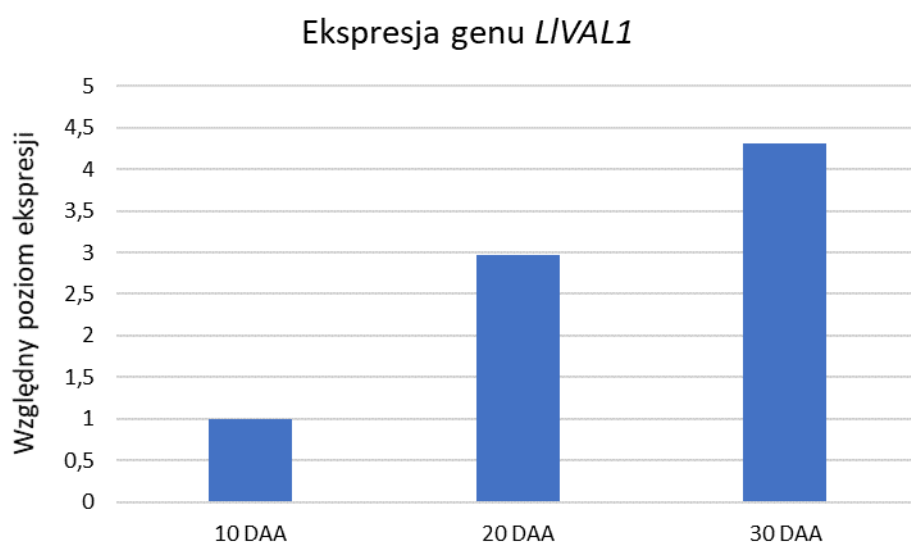
Określona w doświadczeniu RNA-seq aktywność transkrypcyjna genu *LIFUS3* wskazuje na wzrost ilości mRNA badanego genu w dwudziestym dniu po wykształceniu kwiatu (20 DAA) w porównaniu do wartości z dnia dziesiątego ( $p = 3,38E^{-78}$ ). Natomiast po upływie kolejnych dziesięciu dni, odnotowano spadek względnego poziomu ekspresji genu *LIFUS3* w porównaniu do wartości wariantu poprzedniego (20 DAA) ( $p = 7,56667E^{-44}$ ). Wyniki przedstawiono na Wykresie 4.



**Wykres 4.** Porównanie zmian poziomu ekspresji genu *LIFUS3* pomiędzy przeanalizowanymi bibliotekami cDNA; DAA – dzień po wykształceniu kwiatu (Day After Anthesis)

### 5.1.3.5. Aktywność transkrypcyjna *LIVAL1* (*LIVP1/ABI3-like*)

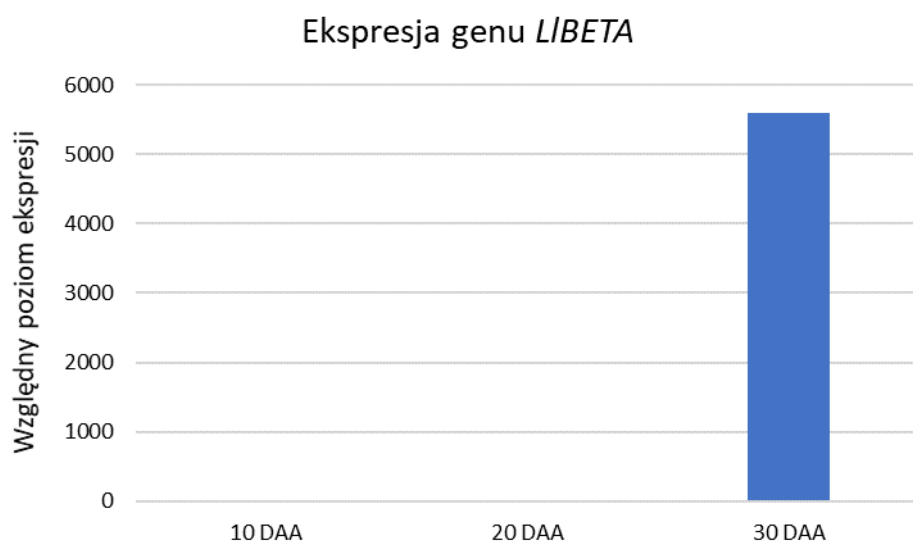
Wzorzec aktywności transkrypcyjnej genu *LIVAL1* wykazuje liniowy wzrost pomiędzy badanymi etapami rozwoju nasion. Odnotowano niemal trzykrotny wzrost względnego poziomu ekspresji genu *LIVAL1* pomiędzy dziesiątym a dwudziestym dniem po wykształceniu kwiatu ( $p = 0,001$ ). Wzrost ilości transkryptów opisywanego genu zaobserwowano także w ostatnim z badanych etapów rozwoju nasion, w porównaniu do wariantu 20 DAA ( $p = 0,001$ ). Wyniki przedstawiono na Wykresie 5.



**Wykres 5.** Porównanie zmian poziomu ekspresji genu *LIVAL1* pomiędzy przeanalizowanymi bibliotekami cDNA; DAA – dzień po wykształceniu kwiatu (Day After Anthesis)

### 5.1.3.6. Aktywność transkrypcyjna *LIBETA*

W przypadku genów kodujących  $\beta$ -konglutyny zidentyfikowany wzorzec ekspresji wskazuje na wzrost aktywności transkrypcyjnej w ostatnim z badanych etapów rozwoju nasion (30 DAA). W 20 DAA względny poziom ekspresji genów *LIBETA* osiągnął wartość trzykrotnie wyższą (3,10) w porównaniu do wariantu 10 DAA ( $p = 0,005$ ). Natomiast w 30 dniu odnotowano niemal 18-tysięczny wzrost ilości transkryptów genów kodujących  $\beta$ -konglutyny ( $5,17E^{-161}$ ). Wyniki zaprezentowano na Wykresie 6.



**Wykres 6.** Porównanie zmian poziomu ekspresji genu *LIBETA* pomiędzy przeanalizowanymi bibliotekami cDNA; DAA – dzień po wykształceniu kwiatu (Day After Anthesis)

### 5.1.3.7. Aktywność transkrypcyjna *LIDELTA2*

Podobnie jak w przypadku genów *LIBETA*, także gen kodujący  $\delta$ -konglutynę wykazywał najwyższy względny poziom ekspresji w 30 dniu po wykształceniu kwiatu. W 20 DAA ilość mRNA badanego genu przyjmowała wartość niemal pięciokrotnie wyższą (4,8) w porównaniu do poprzedniego etapu rozwoju nasion ( $p = 1,55E^{-05}$ ). Natomiast po kolejnych dziesięciu dniach wzrosła niemal 700-krotnie ( $p = 9,7283E^{-107}$ ). Wyniki zobrazowano na Wykresie 7.



**Wykres 7.** Porównanie zmian poziomu ekspresji genu *LIDELTA2* pomiędzy przeanalizowanymi bibliotekami cDNA; DAA – dzień po wykształceniu kwiatu (Day After Anthesis)



## **5.2. Aktywność transkrypcyjna wybranych genów uzyskana metodą Real-Time PCR pod wpływem aplikacji ABA i GA**

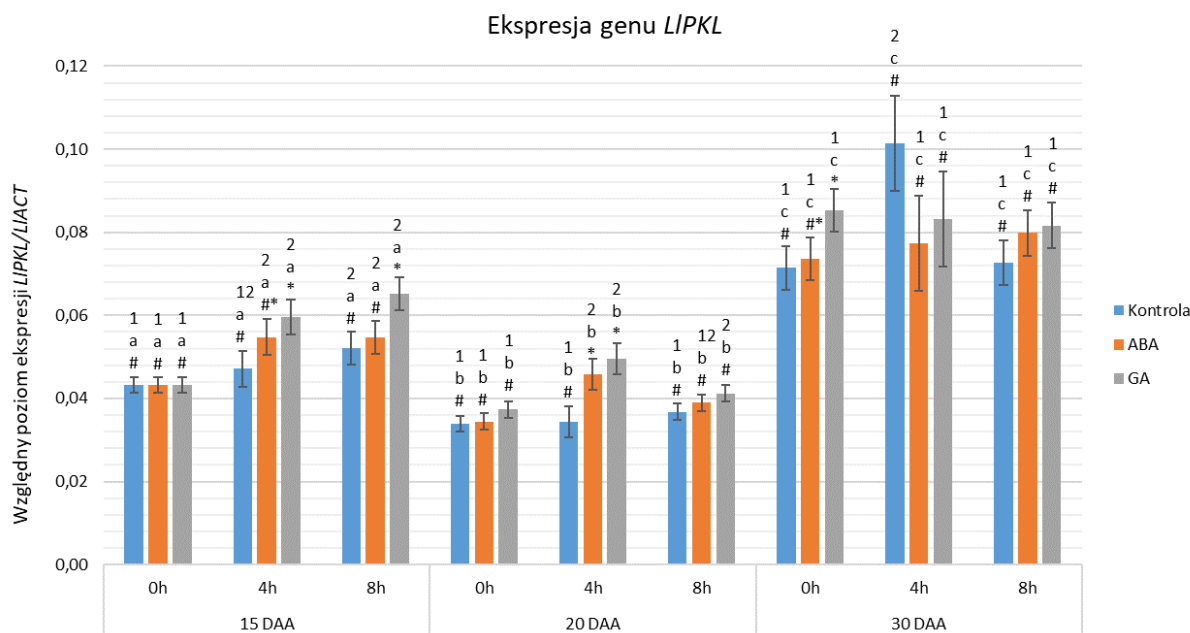
W wyniku przeprowadzonych doświadczeń RT-qPCR ustalono wzorzec ekspresji zidentyfikowanych genów w nasionach łubinu żółtego odmiany Taper w kolejnych dniach ich rozwoju (15, 20, 30 DAA) w warunkach kontrolnych oraz pod wpływem aplikacji ABA lub GA, w wyznaczonych godzinach zbioru materiału (0h, 4h, 8h).

We wszystkich wariantach oznaczany poziom ekspresji wszystkich badanych genów odnoszono do ilości mRNA genu referencyjnego. Dla każdego z wariantów przeprowadzono trzy niezależne powtórzenia biologiczne. W przypadku wszystkich wariantów i powtórzeń biologicznych wykonano po cztery powtórzenia techniczne.

Aby zweryfikować istotność statystyczną wyników przeprowadzonych doświadczeń RT-qPCR, wykonano analizę wariancji w modelu mieszanym (3x3x3). Zmienną wewnątrzgrupową była godzina zbioru materiału (0h vs. 4h vs. 8h), natomiast zmienne międzyobiektywne stanowiły odpowiednio: podawany fitohormon (GA vs. ABA vs. Kontrola) oraz etap rozwoju nasion (dzień 15 vs. 20 vs. 30).

### 5.2.1. Aktywność transkrypcyjna genu *LIPKL*

Analiza różnic aktywności transkrypcyjnej genu *LIPKL* (Wykres 8.) wykazała istotny statystycznie efekt interakcji pomiędzy wszystkimi badanymi czynnikami,  $F(8,24) = 8,04$ ;  $p < 0,001$ ;  $\eta^2 = 0,73$  ( $F$  – wartość testu ANOVA,  $p$  – istotność statystyczna testu,  $\eta^2$  – procent wyjaśnionej wariancji przez czynniki wprowadzone do modelu).



**Wykres 8.** Względna aktywność transkrypcyjna genu *LIPKL* w nasionach łubinu żółtego odmiany Taper w odniesieniu do genu referencyjnego *LIACT* w kolejnych dniach rozwoju po zastosowaniu ABA lub GA w godzinie: 0, 4, i 8. Oznaczenia: DAA – dzień po wykształceniu kwiatu (Day After Anthesis), ABA – nasiona po aplikacji kwasu absycynowego, GA – nasiona po aplikacji gibereliny ( $GA_3$ ). Błędy pomiaru stanowią 95% przedziały ufności dla zebranych danych. Oznaczenia istotności statystycznej:

a, b, c – efekty proste dla różnic między stadiami dla poszczególnych godzin pomiaru

1, 2, 3 – efekty proste dla różnic między godzinami zbioru wewnątrz danego stadium

\*, ^, # – efekty proste dla różnic między wariantami nasion (K/ABA/GA) w ramach określonej godziny zbioru i etapu rozwoju

### **5.2.1.1. Różnice ekspresji *LIPKL* w kolejnych dniach rozwoju nasion w wariantach K/ABA/GA**

Analiza różnic w zakresie zmian aktywności transkrypcyjnej genu *LIPKL* pomiędzy kolejnymi dniami rozwoju nasion, dla poszczególnych godzin zbioru wśród nasion z grupy kontrolnej oraz traktowanej ABA lub GA, wykazała istotne statystycznie efekty, które były identyczne w każdej badanej próbie. Niezależnie od rodzaju podawanego hormonu oraz godziny zbioru, następował istotny statystycznie spadek genu *LIPKL* między 15 a 20 dniem po wykształceniu kwiatu, na poziomach istotności, co najmniej  $p < 0,05$ . Natomiast w 30 DAA następował wzrost ekspresji badanego genu, który był istotnie statystycznie wyższy niż w 20 DAA, na poziomie  $p < 0,01$  oraz wyższy od dnia piętnastego ( $p < 0,05$ ). Wyniki przedstawiono na Wykresie 8.

### **5.2.1.2. Różnice ekspresji *LIPKL* w godzinach 0h/4h/8h w analizowanych wariantach**

Analizując zmiany poziomu mRNA genu *LIPKL* w grupie kontrolnej, potwierdzono występowanie istotnych różnic w 15 i 30 DAA. Oznacza to, że w 20 DAA nie wystąpiły istotne zmiany ekspresji badanego genu pomiędzy poszczególnymi godzinami zbioru. Odnotowano istotny statystycznie wzrost aktywności transkrypcyjnej genu *LIPKL* w 15 DAA pomiędzy godziną zero oraz ósmą ( $p = 0,009$ ). W 30 dniu po wykształceniu kwiatu (30 DAA) stwierdzono wzrost ekspresji genu *LIPKL* pomiędzy godziną zero a czwartą ( $p = 0,027$ ), a następnie istotny spadek do wartości początkowej między godziną czwartą i ósmą ( $p = 0,009$ ) (Wykres 8.).

W przypadku nasion roślin, którym aplikowano ABA, wykazano istotne statystycznie zmiany w 15 DAA. Stwierdzono wzrost aktywności transkrypcyjnej genu *LIPKL* w godzinie czwartej ( $p = 0,003$ ) oraz w godzinie ósmej ( $p = 0,009$ ) w porównaniu do godziny zerowej. W 20 dniu (20 DAA) w nasionach roślin traktowanych ABA, obserwowano wzrost poziomu mRNA genu *LIPKL* jedynie w okresie między godziną zero a czwartą, charakteryzujący się istotnością statystyczną ( $p = 0,007$ ). Natomiast w 30 DAA, nie stwierdzono żadnych istotnych statystycznie zmian w aktywności transkrypcyjnej genu *LIPKL* wśród nasion roślin poddanych działaniu ABA (Wykres 8.).

Badając wpływ aplikacji GA, stwierdzono niemal identyczne zależności jak w przypadku nasion roślin traktowanych ABA. W dniu 15. nastąpił istotny wzrost ekspresji genu *LIPKL* w godzinie czwartej ( $p < 0,001$ ), utrzymujący się również w godzinie ósmej

( $p < 0,001$ ) w porównaniu do godziny zero. W 20 DAA zaobserwowano jedynie istotny wzrost ilości transkryptu opisywanego genu między godziną zero a czwartą, który utrzymał się także w godzinie ósmej, wykazując istotność statystyczną odpowiednio ( $p = 0,005$ ), ( $p = 0,032$ ). Nie stwierdzono natomiast istotnych zmian w ostatnim badanym dniu rozwoju (30 DAA). Wyniki przedstawiono na Wykresie 8.

### **5.2.1.3. Różnice ekspresji *LIPKL* w warunkach kontrolnych oraz pod wpływem działania hormonów**

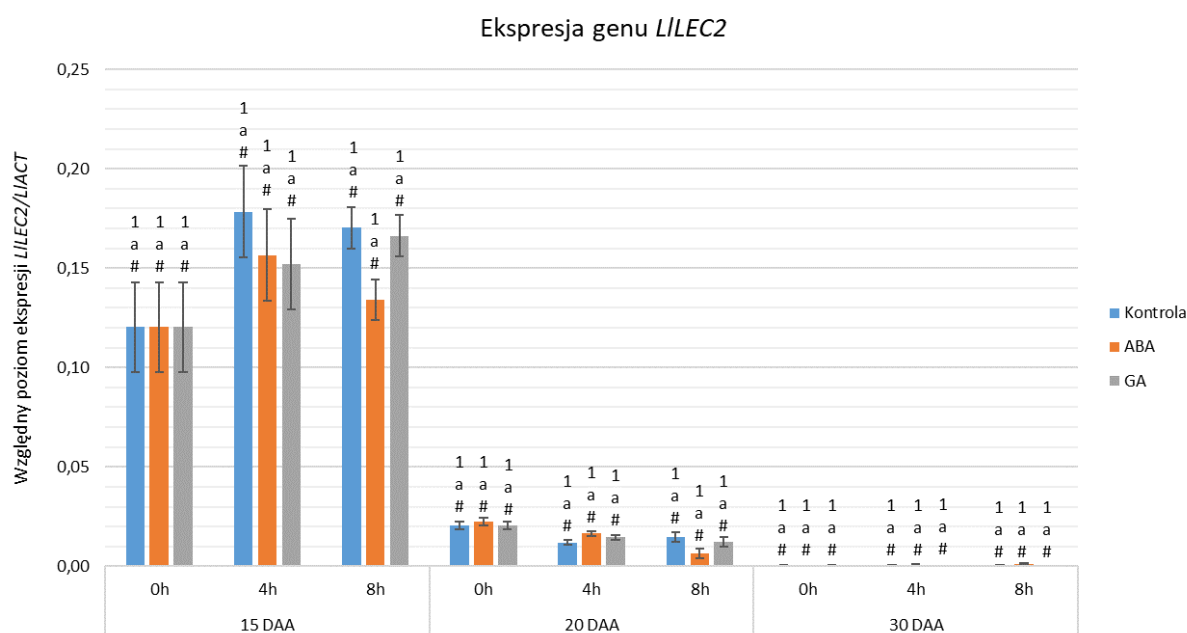
Analiza różnic między grupami nasion w 15 dniu wykazała, że w godzinie czwartej nasiona poddawane działaniu egzogennej aplikacji GA miały istotnie wyższy poziom ekspresji genu *LIPKL* w porównaniu do nasion kontrolnych ( $p = 0,021$ ). Natomiast w ósmej godzinie potwierdzono istotnie wyższy poziom aktywności transkrypcyjnej badanego genu w nasionach roślin traktowanych GA w porównaniu do nasion roślin, którym podawano ABA ( $p = 0,031$ ) oraz kontrolnych ( $p = 0,012$ ) (Wykres 8.).

W 20 dniu po wykształceniu kwiatów nie stwierdzono istotnych różnic w poziomach ekspresji między badanymi wariantami w godzinie zerowej oraz ósmej. Potwierdzono natomiast, że w czwartej godzinie nasiona kontrolne miały istotnie niższy poziom aktywności transkrypcyjnej genu *LIPKL* w porównaniu do nasion roślin poddanych działaniu ABA i GA, wykazujący istotność statystyczną odpowiednio ( $p = 0,017$ ) oraz ( $p = 0,004$ ).

W 30 DAA zaobserwowano jedyną różnicę w godzinie zerowej, w której to nasiona roślin po aplikacji GA miały istotnie statystycznie wyższy poziom ekspresji badanego genu w porównaniu do nasion kontrolnych ( $p = 0,029$ ). Wyniki przedstawiono na Wykresie 8.

## 5.2.2. Aktywność transkrypcyjna genu *LILEC2*

Analiza różnic w poziomie ekspresji genu *LILEC2* (Wykres 9.), wykazała istotny statystycznie efekt główny stadium rozwoju:  $F(2,12) = 1644,97$ ;  $p < 0,001$ ;  $\eta^2 = 0,99$ . Oznacza to, że obniżenie aktywności transkrypcyjnej genu *LILEC2* było niezależne od zastosowanych fitohormonów oraz od godziny, w której zbierano materiał. Natomiast sam etap rozwoju nasion wykazywał, że w kolejnych badanych okresach następował istotny spadek ekspresji genu *LILEC2*. W każdym z opisywanych przypadków poziom istotności był niższy od wartości  $p = 0,05$ .

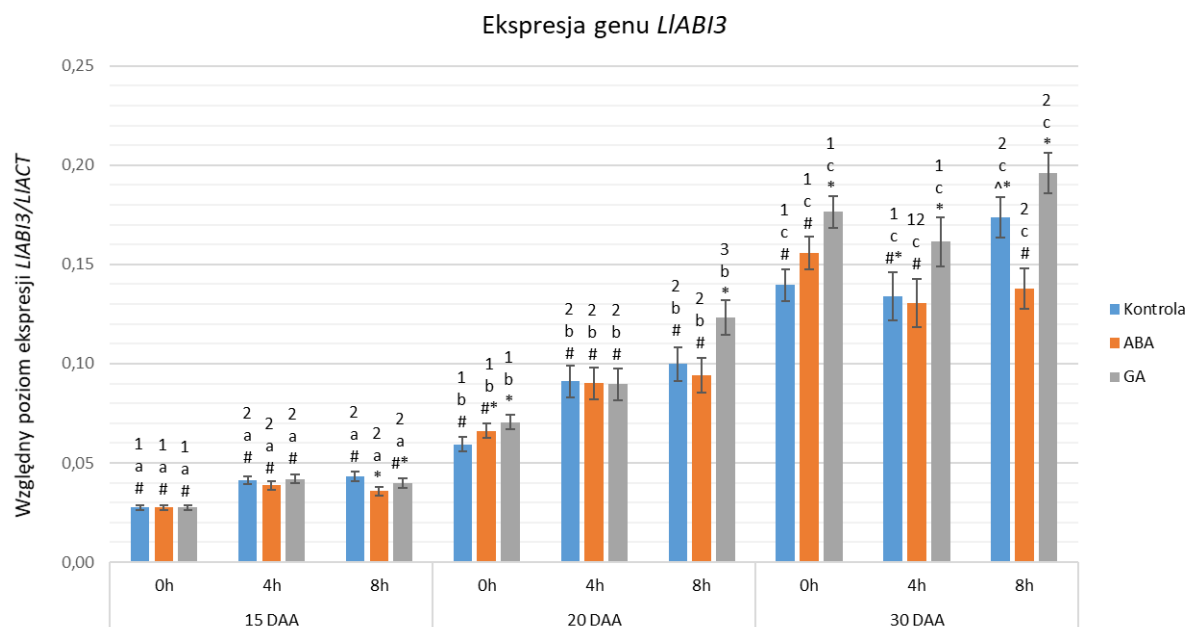


**Wykres 9.** Względna aktywność transkrypcyjna genu *LILEC2* w nasionach łubinu żółtego odmiany Taper w odniesieniu do genu referencyjnego *LIAC2* w kolejnych dniach rozwoju po zastosowaniu ABA lub GA w godzinie: 0, 4, i 8. Oznaczenia: DAA – dzień po wykształceniu kwiatu (Day After Anthesis), ABA – nasiona roślin po aplikacji kwasu absycynowego, GA – nasiona roślin po aplikacji gibereliny ( $GA_3$ ). Błędy pomiaru stanowią 95% przedziały ufności dla zebranych danych. Oznaczenia istotności statystycznej:

a, b, c – efekty proste dla różnic między etapami rozwoju dla poszczególnych godzin zbioru  
 1, 2, 3 – efekty proste dla różnic między godzinami zbioru wewnątrz danego etapu rozwoju  
 \*, ^, # - efekty proste dla różnic między wariantami nasion (K/ABA/GA) w ramach określonej godziny zbioru i etapu rozwoju

### 5.2.3. Aktywność transkrypcyjna genu *LIABI3*

Analiza różnic w poziomie aktywności transkrypcyjnej genu *LIABI3* (Wykres 10.), wykazała istotny statystycznie efekt interakcji pomiędzy wszystkimi czynnikami,  $F(8,24) = 3,30$ ;  $p = 0,011$ ;  $\eta^2 = 0,52$ .



**Wykres 10.** Względna aktywność transkrypcyjna genu *LIABI3* w nasionach łubinu żółtego odmiany Taper w odniesieniu do genu referencyjnego *LIAC* w kolejnych dniach rozwoju po zastosowaniu ABA lub GA w godzinie: 0, 4, i 8. Oznaczenia: DAA – dzień po wykształceniu kwiatu (Day After Anthesis), ABA – nasiona roślin po aplikacji kwasu abscysynowego, GA – nasiona roślin po aplikacji gibereliny ( $GA_3$ ). Błędy pomiaru stanowią 95% przedziały ufności dla zebranych danych. Oznaczenia istotności statystycznej:

a, b, c – efekty proste dla różnic między etapami rozwoju dla poszczególnych godzin zbioru

1, 2, 3 – efekty proste dla różnic między godzinami zbioru wewnątrz danego etapu rozwoju

\*, ^, # - efekty proste dla różnic między wariantami nasion (K/ABA/GA) w ramach określonej godziny zbioru i etapu rozwoju

### **5.2.3.1. Różnice ekspresji *LIABI3* w kolejnych dniach rozwoju nasion w wariantach K/ABA/GA**

Poziom ekspresji genu *LIABI3* wykazywał istotne różnice o charakterze liniowym w każdym kolejnym dniu rozwoju nasion. Wykazano, że jest on niezależny od godziny oraz podawanego fitohormonu. W każdej grupie nasion i każdej godzinie zbioru, stwierdzono wyższy poziom aktywności transkrypcyjnej genu *LIABI3*, a zależności te były istotne statystycznie, przybierając wartość co najmniej  $p < 0,05$ . Wyniki przedstawiono na Wykresie 10.

### **5.2.3.2. Różnice ekspresji *LIABI3* w godzinach 0h/4h/8h w analizowanych wariantach**

Analiza różnic aktywności transkrypcyjnej badanego genu w nasionach kontrolnych wykazała istotny statystycznie wzrost ekspresji genu *LIABI3* w 15 DAA w czwartej ( $p < 0,001$ ) oraz ósmej godzinie zbioru ( $p < 0,001$ ) w porównaniu do wartości początkowej. Podobną zależność zaobserwowano w 20 DAA, w którym poziom mRNA genu *LIABI3* był wyższy w czwartej ( $p < 0,001$ ) i ósmej godzinie ( $p = 0,001$ ) w porównaniu do wartości z godziny zero. W 30 dniu od wykształcenia funkcjonalnego kwiatu, nie stwierdzono istotnych zmian między czwartą i zerową godziną. Jednakże uzyskano istotnie wyższy poziom aktywności transkrypcyjnej badanego genu w godzinie ósmej w porównaniu do godziny zerowej ( $p = 0,001$ ) i czwartej ( $p = 0,026$ ) (Wykres 10.).

Wśród nasion roślin poddanych działaniu egzogenego ABA, w 15 DAA zaobserwowano istotny statystycznie wzrost ekspresji genu *LIABI3* między godziną zerową a czwartą ( $p = 0,001$ ) oraz zerową a ósmą ( $p = 0,005$ ). Podobny efekt uzyskano w 20 DAA, w którym poziom transkryptów badanego genu z godziny czwartej ( $p = 0,002$ ) i ósmej ( $p = 0,005$ ) był wyższy niż w godzinie zerowej. Z kolei w 30 DAA zaobserwowano częściowo odwrotną zależność, która wskazywała na istotny spadek ekspresji genu *LIABI3* w ósmej godzinie ( $p = 0,034$ ) w porównaniu do godziny zerowej. Natomiast w godzinie czwartej nie odnotowano istotnych statystycznie zmian (Wykres 10.).

W nasionach w początkowym etapie rozwoju (15 DAA), poddanych działaniu GA, zauważono istotnie wyższy poziom ekspresji genu *LIABI3* po czterech godzinach od podania fitohormonu ( $p < 0,001$ ) oraz ośmiu godzinach ( $p = 0,001$ ) w porównaniu do godziny zerowej, przed aplikacją GA. W 20 DAA odnotowano liniowy efekt wzrostu aktywności transkrypcyjnej badanego genu. Stwierdzono istotnie wyższy poziom mRNA genu *LIABI3* w godzinie czwartej ( $p = 0,007$ ) oraz ósmej ( $p < 0,001$ ) w porównaniu do wartości z godziny

zero. Potwierdzono także wyższy poziom ekspresji genu *LIABI3* w ósmej godzinie w porównaniu do czwartej ( $p = 0,002$ ). W 30 DAA odnotowano istotny wzrost ilości transkryptów badanego genu w ósmej godzinie w porównaniu do godziny zerowej ( $p = 0,023$ ) i czwartej ( $p = 0,046$ ). Wyniki przedstawiono na Wykresie 10.

### **5.2.3.3. Różnice ekspresji *LIABI3* w warunkach kontrolnych oraz pod wpływem działania hormonów**

Analizując Różnice między badanymi wariantami nasion w 15 DAA (Wykres 10.), stwierdzono jedynie istotny statystycznie spadek ekspresji genu *LIABI3* po ośmiu godzinach od podania ABA w porównaniu do nasion z grupy kontrolnej ( $p = 0,017$ ).

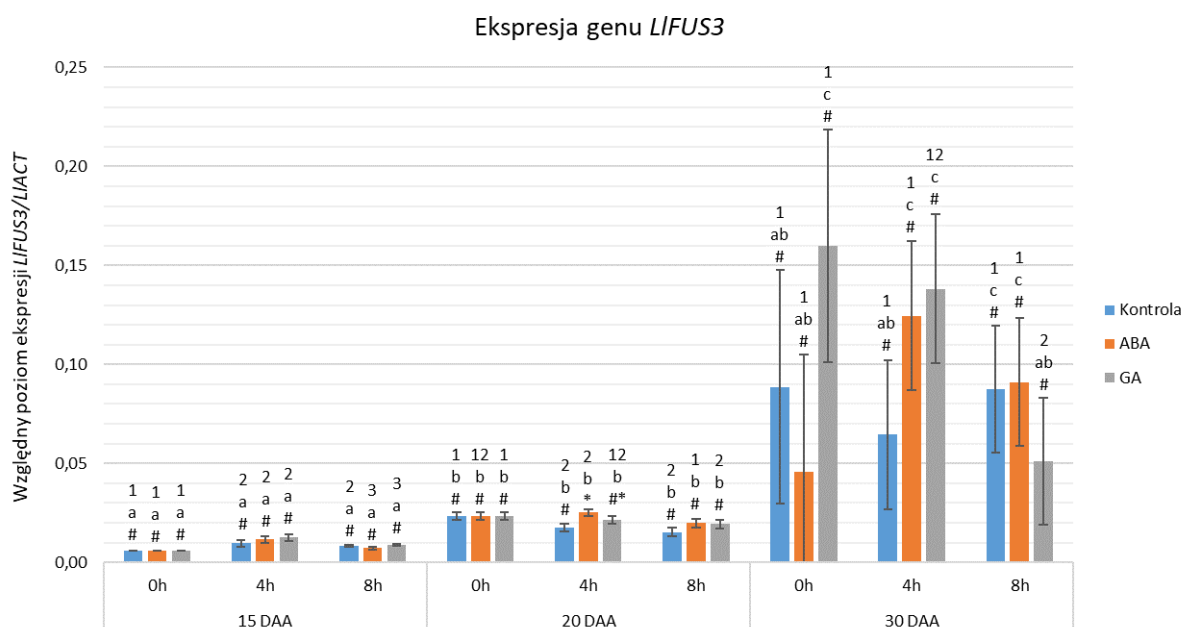
W 20 DAA w godzinie zerowej stwierdzono istotny statystycznie wzrost ekspresji genu *LIABI3* pomiędzy nasionami roślin poddanych działaniu egzogenego GA a kontrolnymi ( $p = 0,017$ ) (Wykres 10.). Dodatkowo, zaobserwowano istotnie wyższy poziom aktywności transkrypcyjnej badanego genu wśród nasion z grupy GA w ósmej godzinie zbioru w porównaniu do nasion roślin traktowanych ABA ( $p = 0,011$ ) i kontrolnych ( $p = 0,029$ ).

W nasionach z dnia 30. w godzinie zero, zaobserwowano istotnie wyższy poziom ekspresji genu *LIABI3* po podaniu GA w porównaniu do nasion roślin po aplikacji ABA ( $p = 0,038$ ) oraz kontrolnych ( $p = 0,002$ ). W czwartej godzinie zbioru, zaobserwowano istotny statystycznie, wyższy poziom transkryptu genu *LIABI3* jedynie w nasionach roślin po aplikacji GA w porównaniu do nasion roślin traktowanych ABA ( $p = 0,040$ ). Podobny efekt odnotowano w ósmej godzinie, w której wyższy poziom ekspresji genu *LIABI3* charakteryzował nasiona roślin po podaniu GA niż po aplikacji ABA ( $p = 0,001$ ). Co więcej, nasiona z grupy ABA miały również niższy poziom mRNA genu *LIABI3* od nasion kontrolnych ( $p = 0,009$ ). Wyniki przedstawiono na Wykresie 10.



### 5.2.4. Aktywność transkrypcyjna genu *LIFUS3*

Analiza różnic poziomów aktywności transkrypcyjnej genu *LIFUS3* (Wykres 11.), wykazała istotny statystycznie efekt interakcji pomiędzy wszystkimi czynnikami,  $F(8,24) = 3,23$ ;  $p = 0,012$ ;  $\eta^2 = 0,52$ .



**Wykres 11.** Względna aktywność transkrypcyjna genu *LIFUS3* w nasionach łubinu żółtego odmiany Taper w odniesieniu do genu referencyjnego *LIACT* w kolejnych dniach rozwoju po zastosowaniu ABA lub GA w godzinie: 0, 4, i 8. Oznaczenia: DAA – dzień po wykształceniu kwiata (Day After Anthesis), ABA – nasiona roślin po aplikacji kwasu abscysynowego, GA – nasiona roślin po aplikacji gibereliny ( $GA_3$ ). Błędy pomiaru stanowią 95% przedziały ufności dla zebranych danych. Oznaczenia istotności statystycznej:

a, b, c – efekty proste dla różnic między etapami rozwoju dla poszczególnych godzin zbioru

1, 2, 3 – efekty proste dla różnic między godzinami zbioru wewnątrz danego etapu rozwoju

\*, ^, # – efekty proste dla różnic między wariantami nasion (K/ABA/GA) w ramach określonej godziny zbioru i etapu rozwoju

#### 5.2.4.1. Różnice ekspresji *LIFUS3* w kolejnych dniach rozwoju nasion w wariantach K/ABA/GA

Wśród nasion kontrolnych w godzinie zerowej, stwierdzono istotny statystycznie wzrost ekspresji genu *LIFUS3* między 15 DAA a 20 DAA ( $p < 0,001$ ), a także w godzinie czwartej ( $p = 0,003$ ) (Wykres 11.). Natomiast w godzinie ósmej nasiona kontrolne wykazywały liniowy wzrost, wraz z kolejnymi dniami rozwoju, gdyż aktywność transkrypcyjna genu *LIFUS3* była wyższa w 30 DAA niż w 20 DAA ( $p = 0,013$ ) i 15 DAA ( $p = 0,009$ ). Nasiona w 20 DAA także wykazywały wyższy poziom mRNA badanego genu niż w początkowym etapie ich rozwoju (15 DAA) ( $p = 0,004$ ).

Nasiona roślin, którym aplikowano ABA, w zerowej godzinie pomiaru wykazywały istotny statystycznie wzrost ilości mRNA genu *LIFUS3* między 15 DAA a 20 DAA ( $p < 0,001$ ) (Wykres 11.). W czwartej oraz ósmej godzinie, zaobserwowano niemal identyczne liniowe efekty wzrostu genu *LIFUS3* pomiędzy badanymi dniami rozwoju, wskazujące na wyższy poziom ekspresji opisywanego genu w 20 DAA w porównaniu do 15 DAA ( $p < 0,01$ ). Podobnie wśród nasion roślin traktowanych ABA, aktywność transkrypcyjna genu *LIFUS3* była wyższa w 30 dniu w czwartej i ósmej godzinie w porównaniu do 15 DAA ( $p < 0,01$ ) oraz 20 DAA ( $p < 0,05$ ).

Wśród nasion roślin poddanych działaniu GA, zaobserwowano identyczne efekty liniowej zależności dodatniej w zerowej i czwartej godzinie. Poziom ekspresji *LIFUS3* był wyższy w wariantach 30 DAA w porównaniu do odnotowanego w dniu 20. ( $p < 0,05$ ) i 15. ( $p < 0,01$ ). Podobną zależność zaobserwowano w przypadku dwóch ostatnich z wymienionych wariantów, w których w pierwszym ilość mRNA badanego genu była wyższa z wartością istotności statystycznej na poziomie ( $p < 0,01$ ). W ósmej godzinie zaobserwowano jedynie wzrost mRNA badanego genu między 15 DAA a 20 DAA ( $p < 0,001$ ). Wyniki przedstawiono na Wykresie 11.

#### 5.2.4.2. Różnice ekspresji *LIFUS3* w godzinach 0h/4h/8h w analizowanych wariantach

W grupie kontrolnej, w wariancie 15 DAA zaobserwowano istotny wzrost aktywności transkrypcyjnej genu *LIFUS3* w godzinie czwartej ( $p = 0,009$ ) oraz ósmej ( $p = 0,001$ ) w porównaniu do godziny zerowej. Z kolei w 20 DAA zaobserwowano odwrócony efekt, w którym poziom ekspresji genu *LIFUS3* był wyższy w godzinie zerowej, niż czwartej ( $p = 0,033$ ) i ósmej ( $p = 0,001$ ). Natomiast w 30 DAA w nasionach z grupy kontrolnej nie stwierdzono istotnych różnic ilości mRNA badanego genu w poszczególnych godzinach prowadzanego badania (Wykres 11.).

W przypadku nasion roślin poddanych działaniu egzogenego ABA potwierdzono, że w 15 DAA w godzinie zerowej poziom ekspresji genu *LIFUS3* był istotnie niższy w porównaniu do godziny czwartej ( $p = 0,001$ ) i ósmej ( $p = 0,010$ ). Co więcej, pomiędzy godziną czwartą i ósmą nastąpił istotny spadek aktywności transkrypcyjnej genu *LIFUS3* ( $p = 0,003$ ). W 20 dniu zaobserwowano istotny spadek ekspresji genu *LIFUS3* między godziną czwartą a ósmą w nasionach roślin poddanych działaniu ABA ( $p = 0,026$ ). W 30 DAA nie odnotowano żadnych istotnych statystycznie różnic (Wykres 11.).

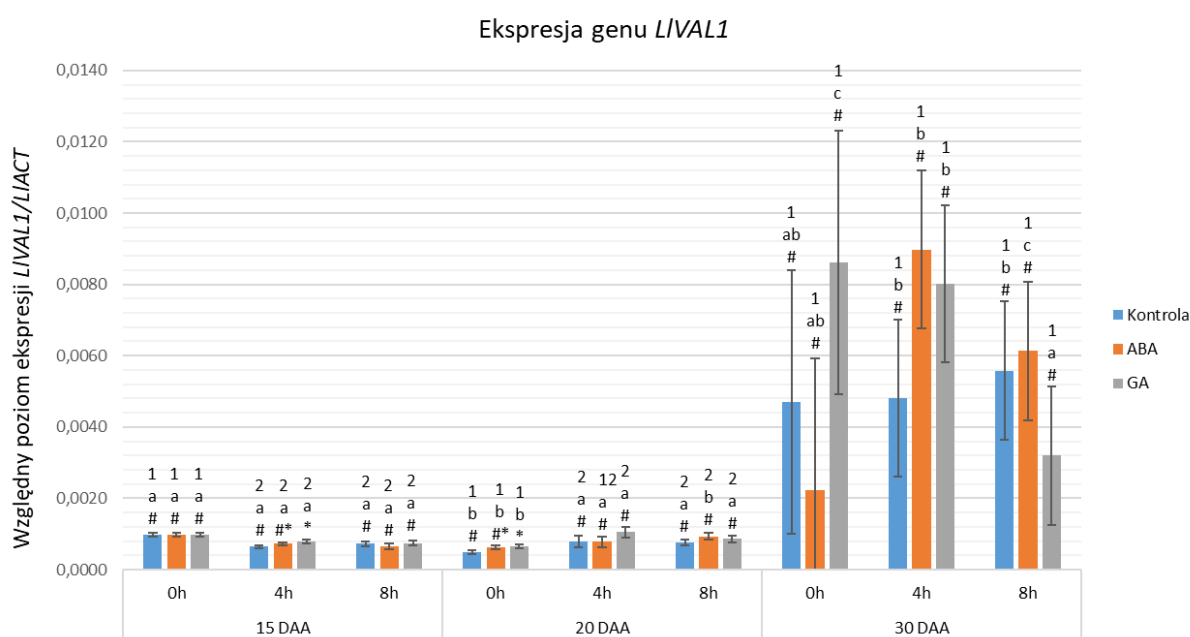
Wśród nasion roślin po aplikacji GA, analizując pomiary z wariantu 15 DAA, również odnotowano istotne statystycznie różnice. Poziom ekspresji genu *LIFUS3* wzrósł w godzinie czwartej ( $p = 0,001$ ) i ósmej ( $p < 0,001$ ) w porównaniu do pomiaru początkowego (0h). Dodatkowo, potwierdzono istotny spadek aktywności transkrypcyjnej genu *LIFUS3* między godziną czwartą a ósmą ( $p = 0,006$ ). Natomiast w nasionach w 20 dniu potwierdzono jedynie istotny spadek mRNA *LIFUS3* między ósmą godziną w porównaniu do początkowej wartości w godzinie zero ( $p = 0,043$ ). Identyczny efekt uzyskano w wariancie 30 DAA, który wskazywał na istotny spadek ilości transkryptów *LIFUS3* w godzinie ósmej w porównaniu do początkowego pomiaru ( $p = 0,047$ ). Wyniki przedstawiono na Wykresie 11.

### 5.2.4.3 Różnice ekspresji *LIFUS3* w warunkach kontrolnych oraz pod wpływem działania hormonów

Analiza różnic między wariantami nasion wykazała, że nie wystąpiły istotne różnice w aktywności transkrypcyjnej genu *LIFUS3* w 15 DAA oraz w 30 DAA. Zaobserwowano natomiast statystycznie istotne efekty w 20 DAA. W czwartej godzinie stwierdzono wyższy poziom ekspresji genu *LIFUS3* wśród nasion roślin poddanych działaniu ABA w porównaniu do grupy kontrolnej ( $p = 0,004$ ). W pozostałych przypadkach nie uzyskano istotnych różnic między grupami. Wyniki przedstawiono na Wykresie 11.

### 5.2.5. Aktywność transkrypcyjna genu *LIVAL1*

Analiza różnic względnych poziomów ekspresji genu *LIVAL1* (Wykres 12.), wykazała istotny statystycznie efekt interakcji pomiędzy wszystkimi czynnikami,  $F(8,24) = 3,59$ ;  $p = 0,007$ ;  $\eta^2 = 0,55$ .



**Wykres 12.** Względna aktywność transkrypcyjna genu *LIVAL1* w nasionach łubinu żółtego odmiany Taper w odniesieniu do genu referencyjnego *LIAC* w kolejnych dniach rozwoju po zastosowaniu ABA lub GA w godzinie: 0, 4, i 8. Oznaczenia: DAA – dzień po wykształceniu kwiatu (Day After Anthesis), ABA – nasiona roślin po aplikacji kwasu absycynowego, GA – nasiona roślin po aplikacji gibereliny ( $GA_3$ ). Błędy pomiaru stanowią 95% przedziały ufności dla zebranych danych. Oznaczenia istotności statystycznej:

a, b, c – efekty proste dla różnic między etapami rozwoju dla poszczególnych godzin zbioru  
1, 2, 3 – efekty proste dla różnic między godzinami zbioru wewnątrz danego etapu rozwoju

\*, ^, # – efekty proste dla różnic między wariantami nasion (K/ABA/GA) w ramach określonej godziny zbioru i etapu rozwoju

### **5.2.5.1. Różnice ekspresji *LIVALI* w kolejnych dniach rozwoju nasion w wariantach K/ABA/GA**

Wśród nasion kontrolnych w zerowej godzinie, zaobserwowano jedynie istotny statystycznie spadek aktywności transkrypcyjnej genu *LIVALI* pomiędzy 15 DAA a 20 DAA ( $p < 0,001$ ) (Wykres 12.). Odnotowano istotnie wyższy poziom ekspresji badanego genu w czwartej godzinie w 30 dniu w porównaniu do wariantów 20 ( $p = 0,039$ ) i 15 DAA ( $p = 0,029$ ). Podobnie w ósmej godzinie, wśród nasion z grupy kontrolnej, poziom mRNA genu *LIVALI* w czwartej godzinie był wyższy w próbie 30 DAA w porównaniu do 20 ( $p = 0,007$ ) i 15 DAA ( $p = 0,008$ ).

W nasionach roślin poddanych traktowaniu egzogenego ABA w godzinie zerowej stwierdzono spadek ekspresji badanego genu między 15 a 20 dniem i oznaczono dla niego wartość istotności statystycznej wynoszącą ( $p < 0,001$ ) (Wykres 12.). Był to jedyny, odnotowany, istotny statystycznie efekt w tej godzinie zbioru. W wariacie 4h, potwierdzono istotny statystycznie wzrost ilości transkryptów genu *LIVALI* w 30 DAA w porównaniu do 15 ( $p = 0,001$ ) i 20 DAA ( $p = 0,001$ ). Z kolei w ósmej godzinie, zaobserwowano liniowy i systematyczny wzrost aktywności transkrypcyjnej genu *LIVALI* w nasionach roślin po aplikacji ABA. Wówczas wyższy poziom ekspresji badanego genu występuje w dniu 20. w porównaniu do 15 DAA ( $p = 0,012$ ) oraz w dniu 30. w porównaniu do 15 DAA ( $p = 0,004$ ) i 20 DAA ( $p = 0,005$ ).

W wariacie obejmującym nasiona zebrane z roślin poddanych działaniu GA, w godzinie zerowej potwierdzono krzywoliniowy efekt między kolejnymi dniami rozwoju. Wykazano spadek ekspresji genu *LIVALI* między 15 DAA a 20 DAA ( $p = 0,001$ ), a następnie istotny statystycznie wzrost w 30 DAA w porównaniu do 15 DAA ( $p = 0,021$ ) i 20 DAA ( $p = 0,017$ ). Z kolei w czwartej godzinie zbioru, odnotowano wzrost aktywności transkrypcyjnej badanego genu jedynie w 30 DAA. Poziom ekspresji genu *LIVALI* był wówczas istotnie wyższy niż w 15 ( $p = 0,002$ ) i 20 DAA ( $p = 0,003$ ). W ósmej godzinie zbioru nasion roślin traktowanych GA, nie zaobserwowano żadnych istotnych statystycznie zmian ilości transkryptów genu *LIVALI* między kolejnymi dniami ich rozwoju (Wykres 12.).

#### 5.2.5.2. Różnice ekspresji *LIVALI* w godzinach 0h/4h/8h w analizowanych wariantach

Analiza zmian aktywności transkrypcyjnej genu *LIVALI* wewnątrz badanych wariantów nasion, w poszczególnych godzinach, wykazała istotne różnice wśród nasion kontrolnych w zależności od godziny zbioru oraz etapu rozwoju. W 15 DAA zaobserwowano spadek ekspresji genu *LIVALI* w godzinie czwartej ( $p < 0,001$ ) oraz ósmej ( $p = 0,009$ ) porównaniu do wartości początkowej. Z kolei w 20 DAA odnotowano odwrotny efekt, w którym poziom transkryptów genu *LIVALI* był wyższy w godzinie czwartej ( $p = 0,006$ ) i ósmej ( $p = 0,006$ ) w porównaniu do godziny zerowej. W 30 DAA nie zaobserwowano istotnych zmian w grupie kontrolnej (Wykres 12.).

W przypadku nasion roślin po aplikacji ABA, w porównaniu do godziny zerowej, stwierdzono istotny statystycznie spadek ilości mRNA genu *LIVALI* w 15 DAA po czterech ( $p < 0,001$ ) oraz ośmiu godzinach od aplikacji fitohormonu ( $p = 0,002$ ). W 20 dniu zaobserwowano wzrost aktywności transkrypcyjnej badanego genu w godzinie ósmej w porównaniu do wartości z godziny zerowej ( $p = 0,003$ ). Natomiast w 30 DAA nie stwierdzono istotnych zmian w poziomie ekspresji genu *LIVALI* (Wykres 12.).

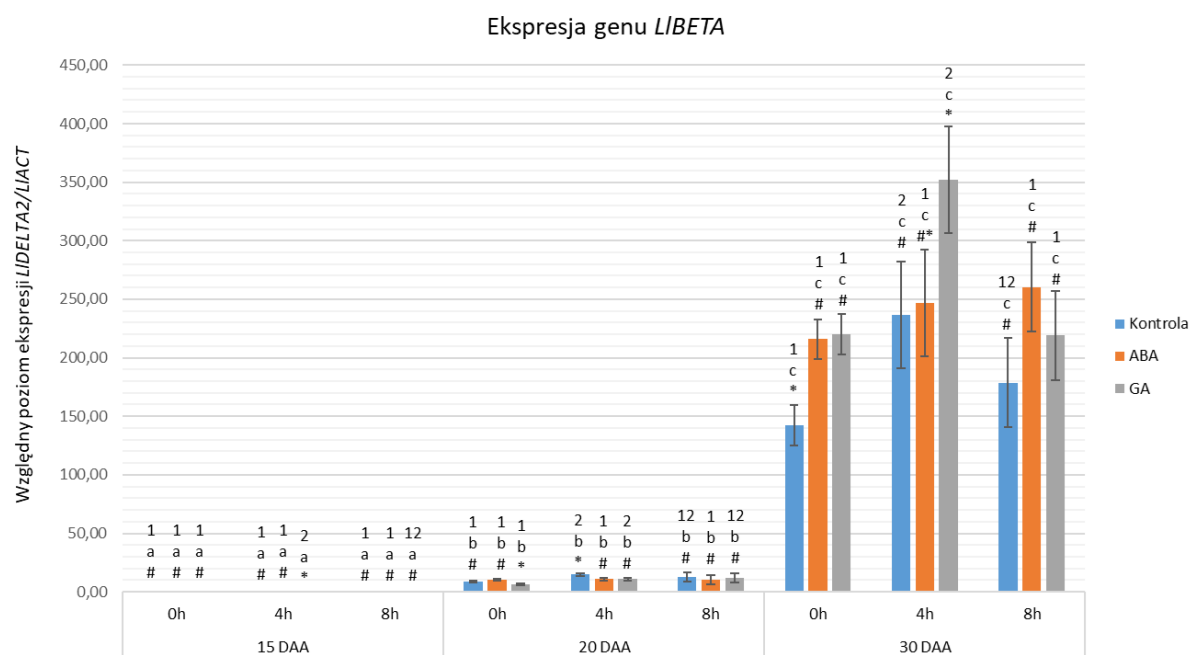
Wśród nasion roślin poddanych działaniu GA, wykazano istotne różnice w 15 DAA. Wskazywały one na wyższy poziom transkrypcji badanego genu w godzinie zerowej w porównaniu do godziny czwartej ( $p = 0,002$ ) i ósmej ( $p = 0,013$ ). Natomiast w 20 dniu zaobserwowano odwrotną zależność: aktywność transkrypcyjna genu *LIVALI* w zerowej godzinie zbiorów była istotnie niższa niż w czwartej ( $p = 0,001$ ) i ósmej ( $p = 0,021$ ). W 30 DAA nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic. Wyniki przedstawiono na Wykresie 12.

### **5.2.5.3 Różnice ekspresji *LIVALI* w warunkach kontrolnych oraz pod wpływem działania hormonów**

Analiza zmian poziomu ekspresji genu *LIVALI* pomiędzy badanymi wariantami nasion, wykazała istotne statystycznie różnice w poszczególnych godzinach i etapach ich rozwoju. W przypadku wariantu 15 DAA, uzyskano zaledwie jedną istotną różnicę po czterech godzinach od aplikacji GA, która wskazywała na wyższy poziom ekspresji genu *LIVALI* w tej grupie nasion w porównaniu do nasion kontrolnych ( $p = 0,008$ ). W próbach 20 DAA jedynie w godzinie zerowej potwierdzono istotnie wyższy poziom aktywności transkrypcyjnej genu *LIVALI* także wśród nasion roślin po podaniu GA w porównaniu do grupy kontrolnej ( $p = 0,025$ ). Z kolei w 30 DAA, nie stwierdzono istotnych różnic pomiędzy poszczególnymi wariantami nasion. Wyniki przedstawiono na Wykresie 12.

## 5.2.6. Aktywność transkrypcyjna genu *LIBETA*

Analiza różnic poziomów ekspresji genu *LIBETA* (Wykres 13.), wykazała istotny statystycznie efekt interakcji pomiędzy wszystkimi czynnikami,  $F(8,24) = 4,73$ ;  $p = 0,001$ ;  $\eta^2 = 0,61$ .



**Wykres 13.** Względna aktywność transkrypcyjna genu *LIBETA* w nasionach łubinu żółtego odmiany Taper w odniesieniu do genu referencyjnego *LI/ACT* w kolejnych dniach rozwoju po zastosowaniu ABA lub GA w godzinie: 0, 4, i 8. Oznaczenia: DAA – dzień po wykształceniu kwiatu (Day After Anthesis), ABA – nasiona roślin po aplikacji kwasu absycynowego, GA – nasiona roślin po aplikacji gibereliny ( $GA_3$ ). Błędy pomiaru stanowią 95% przedziały ufności dla zebranych danych. Oznaczenia istotności statystycznej:

a, b, c – efekty proste dla różnic między etapami rozwoju dla poszczególnych godzin zbioru  
 1, 2, 3 – efekty proste dla różnic między godzinami zbioru wewnątrz danego etapu rozwoju  
 \*, ^, # – efekty proste dla różnic między wariantami nasion (K/ABA/GA) w ramach określonej godziny zbioru i etapu rozwoju



### **5.2.6.1. Różnice ekspresji *LIBETA* w kolejnych dniach rozwoju nasion w wariantach K/ABA/GA**

Poziom aktywności transkrypcyjnej genu *LIBETA* wykazywał istotny statystycznie liniowy efekt w trakcie rozwoju nasion, który był niezależny od podawanego fitohormonu oraz godziny zbioru (Wykres 13.). Wszystkie poziomy ekspresji badanego genu w kolejnych dniach rozwoju nasion były istotnie statystycznie wyższe, co najmniej na poziomie  $p < 0,01$ . Wraz z kolejnymi dniami, ilość transkryptów genu *LIBETA* rosła w poszczególnych zbiorach godzinowych oraz badanych wariantach (GA, ABA, K). Wyniki przedstawiono na Wykresie 13.

### **5.2.6.2. Różnice ekspresji *LIBETA* w godzinach 0h/4h/8h w analizowanych wariantach**

Analiza różnic zmian ilości mRNA *LIBETA* dla nasion z grupy kontrolnej w 15 DAA wykazała brak istotnych statystycznie różnic między poszczególnymi godzinami zbiorów (Wykres 13.). W 20 DAA w czwartej godzinie, odnotowano wzrost ekspresji genu kodującego konglutyny beta w nasionach z grupy kontrolnej w porównaniu do wartości z godziny zerowej ( $p < 0,001$ ). Podobnie w wariacie 30 DAA potwierdzono, że poziom transkryptów genu *LIBETA* wśród nasion kontrolnych w godzinie czwartej był istotnie wyższy niż w godzinie zero ( $p = 0,027$ ).

W przypadku nasion roślin traktowanych ABA nie zaobserwowano żadnych istotnych zmian w poszczególnych dniach rozwoju, co oznacza, że poziom ekspresji genu *LIBETA* był zbliżony we wszystkich godzinach zbiorów (Wykres 13.).

Natomiast w nasionach roślin po aplikacji GA, zaobserwowano wzrost aktywności transkrypcyjnej badanego genu w 15 DAA po czterech godzinach od aplikacji fitohormonu ( $p = 0,005$ ). Taką samą tendencję zaobserwowano porównując wartości ekspresji w wariantach 20 DAA ( $p = 0,002$ ), dla prób zbieranych po 4h. Z kolei w 30 DAA potwierdzono krzywoliniową zależność, która wskazywała na wzrost ekspresji genu *LIBETA* między godziną zero a czwartą ( $p = 0,005$ ), a następnie spadek w godzinie ósmej w porównaniu do godziny czwartej ( $p = 0,007$ ). Wyniki przedstawiono na Wykresie 13.

### 5.2.6.3. Różnice ekspresji *LIBETA* w warunkach kontrolnych oraz pod wpływem działania hormonów

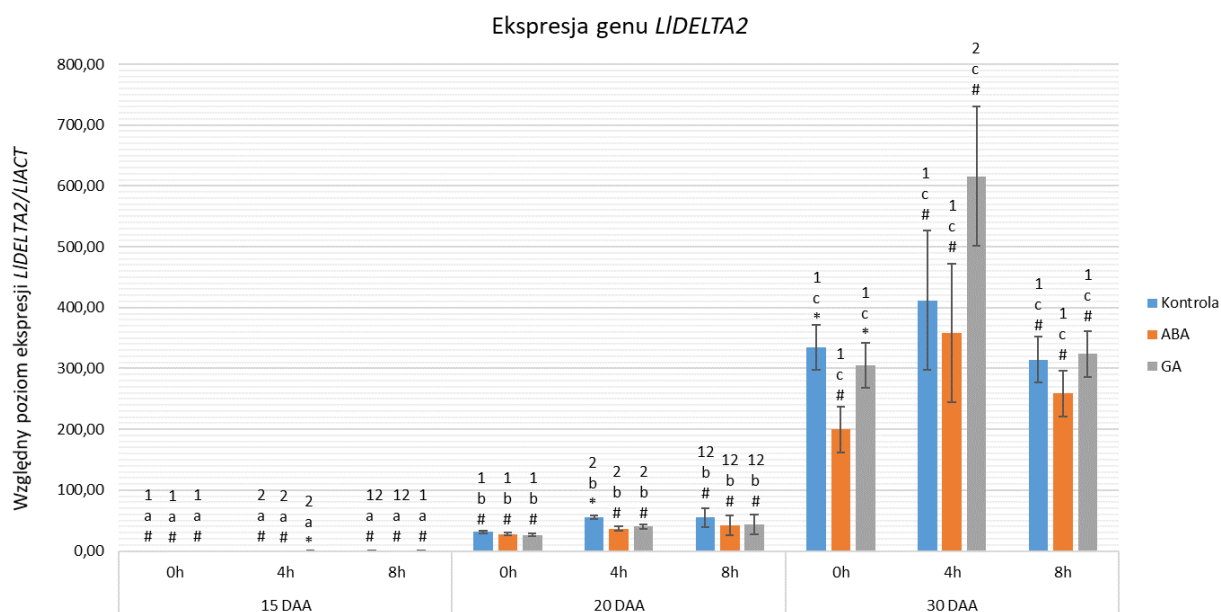
W wariacie 15 DAA w czwartej godzinie zbiorów stwierdzono, że nasiona roślin po podaniu GA miały istotnie wyższy poziom transkryptów genu *LIBETA* w porównaniu do nasion kontrolnych ( $p = 0,002$ ) oraz traktowanych ABA ( $p = 0,001$ ). Nie stwierdzono natomiast różnic między nasionami z różnych grup w ósmej godzinie w 15 DAA (Wykres 13.).

Natomiast w kolejnym z badanych etapów (20 DAA), nasiona roślin poddawanych działaniu GA miały istotnie niższy poziom ekspresji genu *LIBETA* w zerowej godzinie, w porównaniu do nasion roślin z grupy ABA ( $p = 0,001$ ) oraz kontrolnych ( $p = 0,007$ ). W czwartej godzinie zbiorów w 20 DAA potwierdzono, że nasiona kontrolne miały istotnie wyższy poziom mRNA badanego genu niż nasiona roślin po aplikacji GA ( $p = 0,007$ ) i ABA ( $p = 0,008$ ). Nie stwierdzono natomiast różnic między wariantami w ósmej godzinie w próbach z 20. dnia po wykształceniu kwiatu (Wykres 13.).

Z kolei w 30 DAA w nasionach z grupy kontrolnej, zaobserwowano istotny statystycznie, niższy poziom aktywności transkrypcyjnej badanego genu w porównaniu do nasion roślin po podaniu ABA ( $p = 0,003$ ) i GA ( $p = 0,002$ ). W czwartej godzinie zbiorów odnotowano wzrost ekspresji badanego genu jedynie w grupie nasion roślin traktowanych GA w porównaniu do nasion kontrolnych ( $p = 0,037$ ). Natomiast w ósmej godzinie nie stwierdzono istotnych różnic między badanymi wariantami. Wyniki przedstawiono na Wykresie 13.

### 5.2.7. Aktywność transkrypcyjna genu *LIDELTA2*

Analiza różnic względnego poziomu aktywności transkrypcyjnej genu *LIDELTA2* (Wykres 14.), wykazała istotny statystycznie efekt interakcji pomiędzy wszystkimi czynnikami,  $F(8,24) = 3,18$ ;  $p = 0,013$ ;  $\eta^2 = 0,51$ .



**Wykres 14.** Względna aktywność transkrypcyjna genu *LIDELTA2* w nasionach łubinu żółtego odmiany Taper w odniesieniu do genu *referencyjnego LIAC* w kolejnych dniach rozwoju po zastosowaniu ABA lub GA w godzinie: 0, 4, i 8. Oznaczenia: DAA – dzień po wykształceniu kwiatu (Day After Anthesis), ABA – nasiona roślin po aplikacji kwasu abscysynowego, GA – nasiona roślin po aplikacji gibereliny ( $GA_3$ ). Błędy pomiaru stanowią 95% przedziały ufności dla zebranych danych. Oznaczenia istotności statystycznej:

a, b, c – efekty proste dla różnic między etapami rozwoju dla poszczególnych godzin zbioru

1, 2, 3 – efekty proste dla różnic między godzinami zbioru wewnątrz danego etapu rozwoju

\*, ^, # – efekty proste dla różnic między wariantami nasion (K/ABA/GA) w ramach określonej godziny zbioru i etapu rozwoju

### **5.2.7.1. Różnice ekspresji *LIDELTA2* w kolejnych dniach rozwoju nasion w wariantach K/ABA/GA**

Podobnie jak w przypadku genu *LIBETA*, również gen *LIDELTA2* w trakcie rozwoju nasion wykazywał istotny statystycznie liniowy wzrost ekspresji, niezależnie od podawanego fitohormonu oraz godziny zbioru, a istotność statystyczna między badanymi dniami przybierała wartość na poziomie co najmniej  $p < 0,01$ . W kolejnych dniach rozwoju nasion, poziom ekspresji genu *LIDELTA2* był istotnie statystycznie wyższy. Odnotowany wzorzec aktywności transkrypcyjnej opisywanego genu był niezależny od godziny zbioru oraz podawanego hormonu. Wyniki przedstawiono na Wykresie 14.

### **5.2.7.2. Różnice ekspresji *LIDELTA2* w godzinach 0h/4h/8h w analizowanych wariantach**

Wśród nasion grupy kontrolnej w 15 DAA, potwierdzono istotny statystycznie wzrost aktywności transkrypcyjnej genu *LIDELTA2* pomiędzy godziną zerową a czwartą ( $p = 0,006$ ). Podobną różnicę odnotowano w 20 DAA, gdzie ilość mRNA genu *LIDELTA2* była wyższa w czwartej godzinie niż zerowej ( $p < 0,001$ ). Z kolei w 30 DAA nie stwierdzono istotnych różnic między ilością transkryptów badanego genu w poszczególnych godzinach zbiorów dla grupy kontrolnej (Wykres 14.).

W przypadku nasion roślin traktowanych ABA zaobserwowano dwie istotne statystycznie zmiany ekspresji genu *LIDELTA2*. W obu przypadkach dotyczyły one prób z godziny zerowej i czwartej. W tych godzinach stwierdzono wzrost ekspresji badanego genu, zarówno w 15 ( $p = 0,036$ ) jak i 20 DAA ( $p = 0,045$ ). W 30 DAA nie stwierdzono różnic wśród nasion roślin, którym aplikowano ABA (Wykres 14.).

Natomiast podanie GA spowodowało w 15 dniu wzrost aktywności transkrypcyjnej genu *LIDELTA2* między wariantami z godziny zerowej a czwartej ( $p < 0,001$ ), a następnie w godzinie ósmej, spadek do wartości bliskiej początkowej ( $p = 0,030$ ). W 20 DAA, stwierdzono jedynie istotny wzrost ilości mRNA genu *LIDELTA2* między godziną czwartą a zerową ( $p = 0,005$ ). Natomiast w 30 DAA także zaobserwowano wzrost ekspresji badanego genu między godziną zero a czwartą ( $p = 0,008$ ), a następnie spadek w godzinie ósmej w porównaniu do wartości z godziny czwartej ( $p = 0,012$ ). Wyniki przedstawiono na Wykresie 14.

### 5.2.7.3. Różnice ekspresji *LIDELTA2* w warunkach kontrolnych oraz pod wpływem działania hormonów

Analiza różnic między poszczególnymi wariantami nasion w 15 DAA wykazała, że nasion roślin traktowanych GA miały istotnie wyższy poziom genu *LIDELTA2* w czwartej godzinie zbioru w porównaniu do nasion z grupy kontrolnej ( $p = 0,003$ ) oraz nasion roślin, którym podawano egzogennie ABA ( $p = 0,001$ ). W ósmej godzinie zbiorów w 15 DAA nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic pomiędzy grupami nasion (Wykres 14.).

W wariancie 20 DAA, nie zaobserwowano istotnych różnic między badanymi próbkami zbieranymi w godzinie zerowej oraz ósmej, potwierdzono natomiast istotne różnice w godzinie czwartej. Nasiona kontrolne w czwartej godzinie miały istotnie wyższy poziom ekspresji genu *LIDELTA2* w porównaniu do nasion roślin traktowanych ABA ( $p = 0,001$ ) i GA ( $p = 0,002$ ).

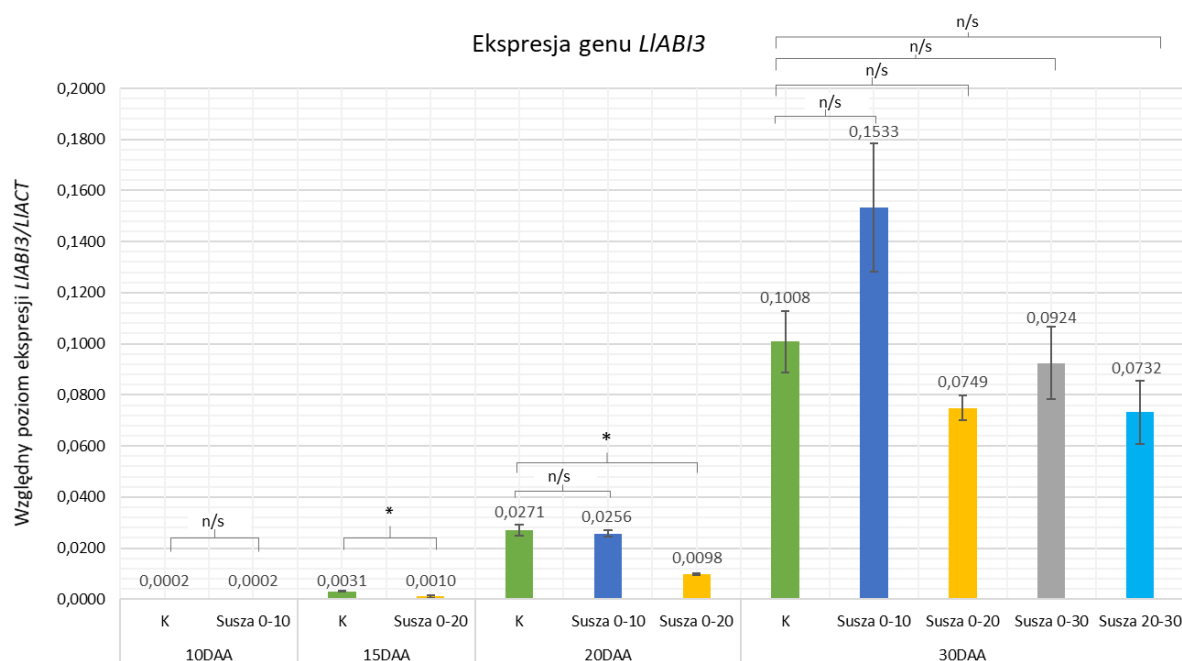
Z w 30 DAA potwierdzono istotne różnice jedynie w przypadku zerowej godziny, w której nasiona roślin po aplikacji ABA miały niższy poziom transkryptów *LIDELTA2* w porównaniu do nasion kontrolnych ( $p = 0,007$ ) i traktowanych GA ( $p = 0,023$ ). Wyniki przedstawiono na Wykresie 14.

### 5.3. Aktywność transkrypcyjna wybranych genów w warunkach suszy

#### 5.3.1. Wpływ suszy na ekspresję wybranych genów

Przeprowadzone reakcje RT-qPCR pozwoliły określić wzorzec aktywności transkrypcyjnej genów kodujących konglutyny beta i delta (*LIBETA* oraz *LIDELTA2*) oraz dwóch genów regulujących proces akumulacji białek zapasowych (*LIPKL* i *LIABI3*) w nasionach łubinu żółtego odmiany Taper, pod wpływem okresowych niedoborów wody. W doświadczeniu tym zbadano jak długi okres niedoboru wody zmienia ekspresję wytypowanych genów w danym etapie rozwoju nasion (10, 15, 20, 30 DAA). Badane warianty szczegółowo opisano w Tabeli 1. w Rozdziale 3. „Materiały”, 3.9.3. „Materiał badawczy wykorzystywany w doświadczeniach wpływu suszy”.

Aby zweryfikować istotność statystyczną uzyskanych wyników, wykonano analizy różnic z wykorzystaniem testu *t* Studenta dla prób zależnych oraz jednoczynnikowej analizy wariancji. Analizy testem *t* przeprowadzono w obrębie nasion z 10 DAA i 15 DAA, natomiast analizy wariancji wykonano dla 20 DAA i 30 DAA z uwagi na wielokrotne pomiary w tych okresach.

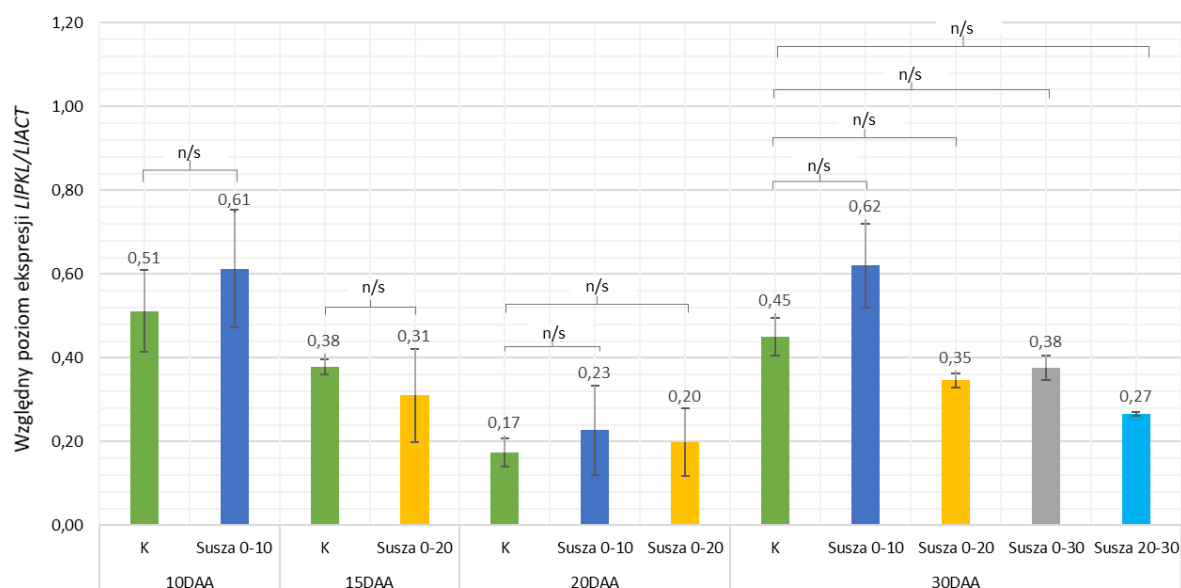


**Wykres 15.** Względna aktywność transkrypcyjna genu *LIABI3* w nasionach łubinu żółtego odmiany Taper w odniesieniu do genu referencyjnego *LIAC* w kolejnych dniach rozwoju w warunkach okresowych niedoborów wody. Oznaczenia: K – Kontrola, DAA – dzień po wykształceniu kwiatu (Day After Anthesis), n/s – brak istotności statystycznej, \* - istotność statystyczna

W przypadku zmian aktywności transkrypcyjnej genu *LIABI3* nie odnotowano istotnych statystycznie różnic w 10 DAA między nasionami z grupy kontrolnej, a nasionami zebranymi w okresie suszy trwającej od zakwitnięcia rośliny do 10 DAA ( $p = 0,341$ ) (Wykres 15.). W 15 DAA zaobserwowano obniżenie ekspresji genu *LIABI3* pod wpływem niedoboru wody w okresie od zakwitnięcia do 15 dni po wytworzeniu kwiatu w porównaniu do nasion podlewanych regularnie ( $p = 0,037$ ). W 20 DAA potwierdzono istotny statystycznie efekt wpływu długości trwania suszy (od zakwitnięcia do 20 DAA),  $F(3,6) = 144,49$ ;  $p = 0,003$ ;  $\eta^2 = 0,99$ . Analiza porównań parami wykazała, że jedynie nasiona poddawane suszy przez okres 0-20 dni wykazywały istotnie niższy poziom ekspresji genu *LIABI3* w porównaniu do nasion kontrolnych ( $p = 0,022$ ). Analiza wariancji dla nasion w 30 DAA wykazała nieistotny statystycznie wpływ działania suszy  $F(5,10) = 3,53$ ;  $p = 0,185$ ;  $\eta^2 = 0,64$ . Oznacza to, że w 30 dniu po wykształceniu kwiatu nie było różnic w poziomach ekspresji badanego genu pomiędzy nasionami z grupy kontrolnej a nasionami, które były poddawane różnym okresom niedoboru wody (Wykres 15.).

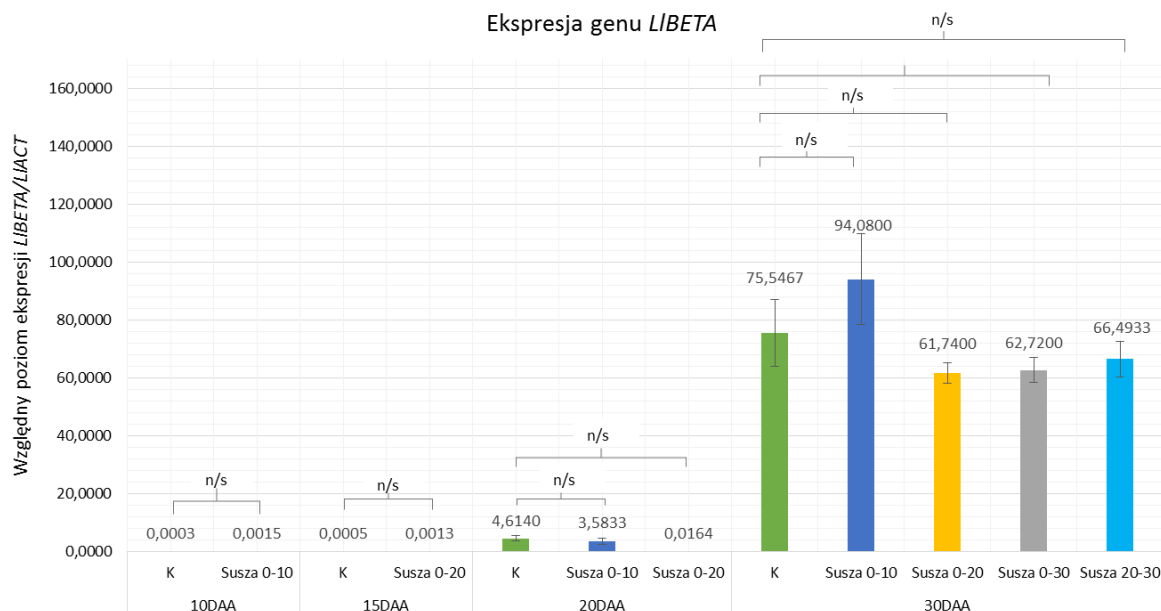
Analiza zmian ilości transkryptów pozostałych genów w porównaniach między nasionami z grupy kontrolnej a nasionami poddanymi suszy w różnych przedziałach czasowych, wykazała nieistotny statystycznie wpływ okresowych niedoborów wody na ekspresję *LIPKL* (Wykres 16.), *LIBETA* (Wykres 17.) oraz *LIDELTA2* (Wykres 18.). Oznacza to, że długość trwania suszy nie miała istotnego wpływu na poziom aktywności transkrypcyjnej wymienionych genów w porównaniu do poziomu ich ekspresji w nasionach kontrolnych.

### Ekspresja genu *LIPKL*



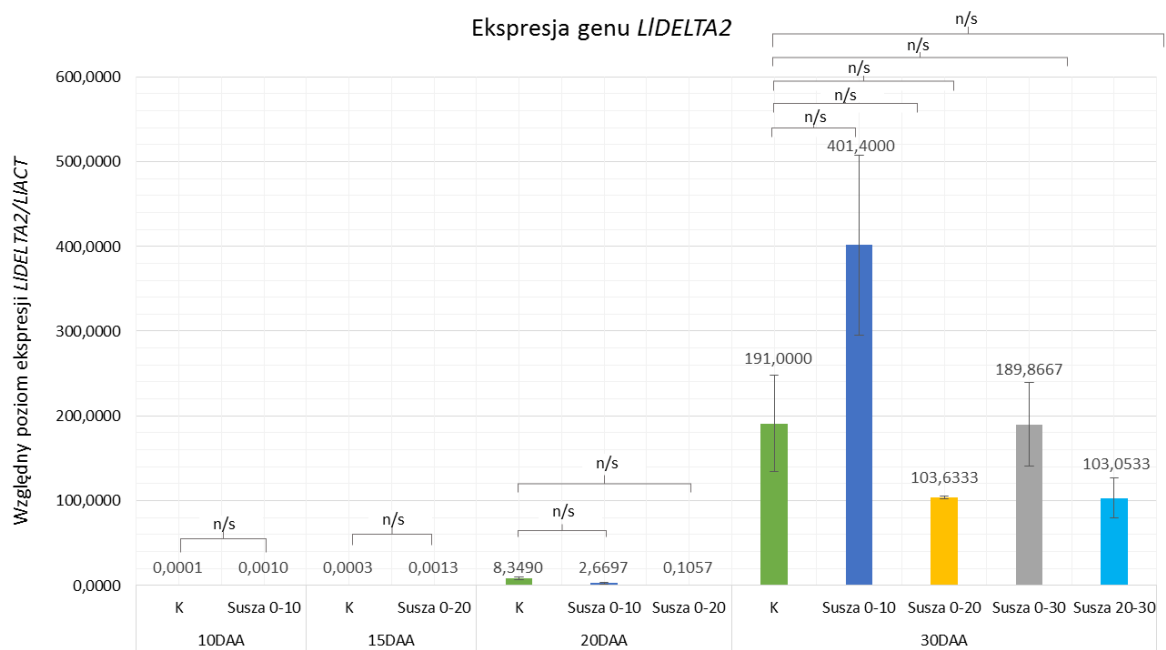
**Wykres 16.** Wpływ suszy na aktywność transkrypcyjną genu *LIPKL* w nasionach łubinu żółtego odmiany Taper w odniesieniu do genu referencyjnego *LIACT* w kolejnych dniach rozwoju w warunkach okresowych niedoborów wody. Oznaczenia: K – Kontrola, DAA – dzień po wykształceniu kwiata (Day After Anthesis), n/s – brak istotności statystycznej, \* – istotność statystyczna

### Ekspresja genu *LIBETA*



**Wykres 17.** Wpływ suszy na aktywność transkrypcyjną genu *LIBETA* w nasionach łubinu żółtego odmiany Taper w odniesieniu do genu referencyjnego *LIACT* w kolejnych dniach rozwoju w warunkach okresowych niedoborów wody. Oznaczenia: K – Kontrola, DAA – dzień po wykształceniu kwiata (Day After Anthesis), n/s – brak istotności statystycznej, \* – istotność statystyczna





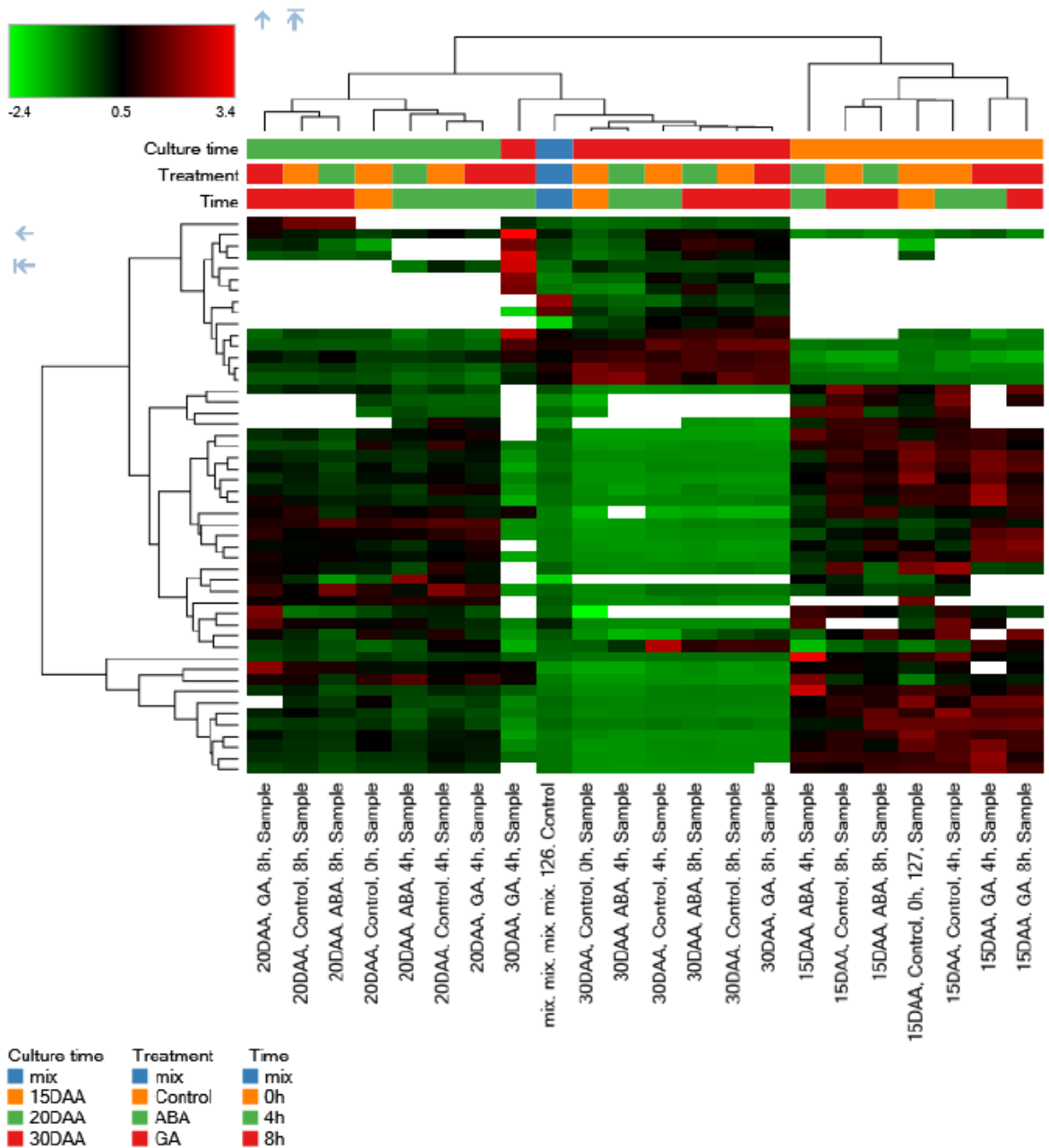
**Wykres 18.** Wpływ suszy na aktywność transkrypcyjną genu *LIDELTA2* w nasionach łubinu żółtego odmiany Taper w odniesieniu do genu referencyjnego *LIACT* w kolejnych dniach rozwoju w warunkach okresowych niedoborów wody. Oznaczenia: K – Kontrola, DAA – dzień po wykształceniu kwiatu (Day After Anthesis), n/s – brak istotności statystycznej, \* – istotność statystyczna

#### **5.4. Wzorzec akumulacji białek w nasionach łubinu żółtego odmiany Taper**

We wszystkich zbadanych próbach wyizolowanych z nasion łubinu w różnych etapach rozwoju, zidentyfikowano 52 białka nadające się do oznaczenia ilościowego. Wszystkie 52 białka zostały zidentyfikowane w grupie prób referencyjnych, stanowiącej mieszaninę 9 próbek poddanych analizie. Świadczy to o doborze odpowiedniej próby odniesienia.

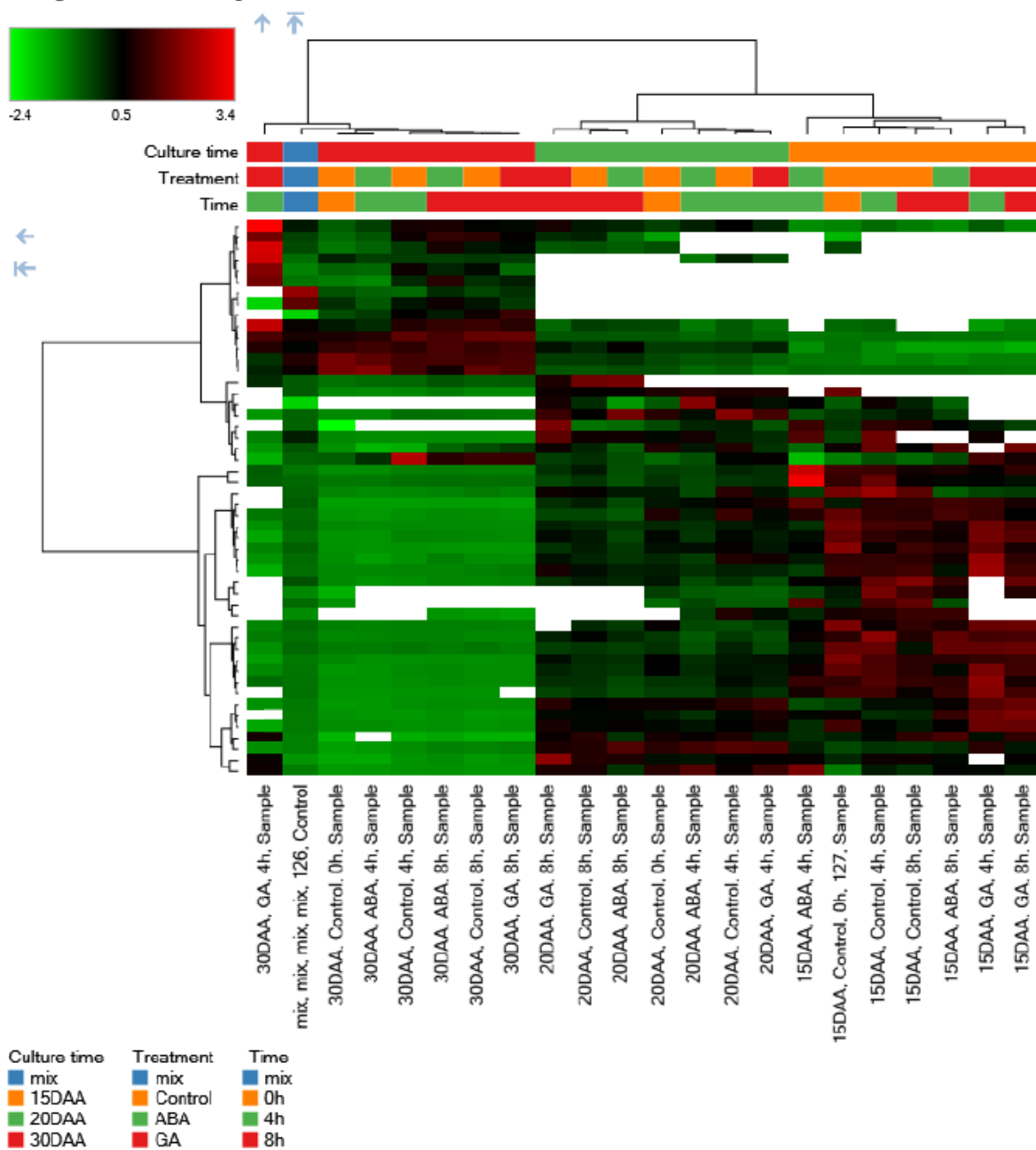
Przedstawione poniżej Ryciny 5. i 6. przedstawiają wyniki klastrowania hierarchicznego przeprowadzonego na zbiorze zidentyfikowanych białek. Poniżej przedstawiono wyniki grupowania przeprowadzonego metodami kompletną (complete) oraz Warda. W obu przypadkach cechą zbioru próbek powodującą najściślejsze grupowanie jest etap rozwoju nasion (15 DAA / 20 DAA / 30 DAA). Czas prowadzenia eksperymentu (0h, 4h, 8h) wydaje się dobrym predyktorem wewnątrz wyżej wymienionych grup (z wyłączeniem grupy 15 DAA). Zebrane dane wskazują jednoznacznie, że podany fitohormon (GA lub ABA) nie wpływa znacząco na klastrowanie próbek, przeprowadzone na bazie zawartości kwantyfikowanych białek. Klastrowanie grup 15 DAA, 20 DAA, 30 DAA z wykorzystaniem dwóch zastosowanych metod daje odmienne pokrewieństwo (w przypadku metody kompletnej najbardziej oddzielona jest grupa 15 DAA, w przypadku metody Warda 20 DAA).

Data Source: Proteins : Abundances (Grouped)  
 Distance Function: Euclidean  
 Linkage Method: Complete  
 Scaling: Scale After Clustering



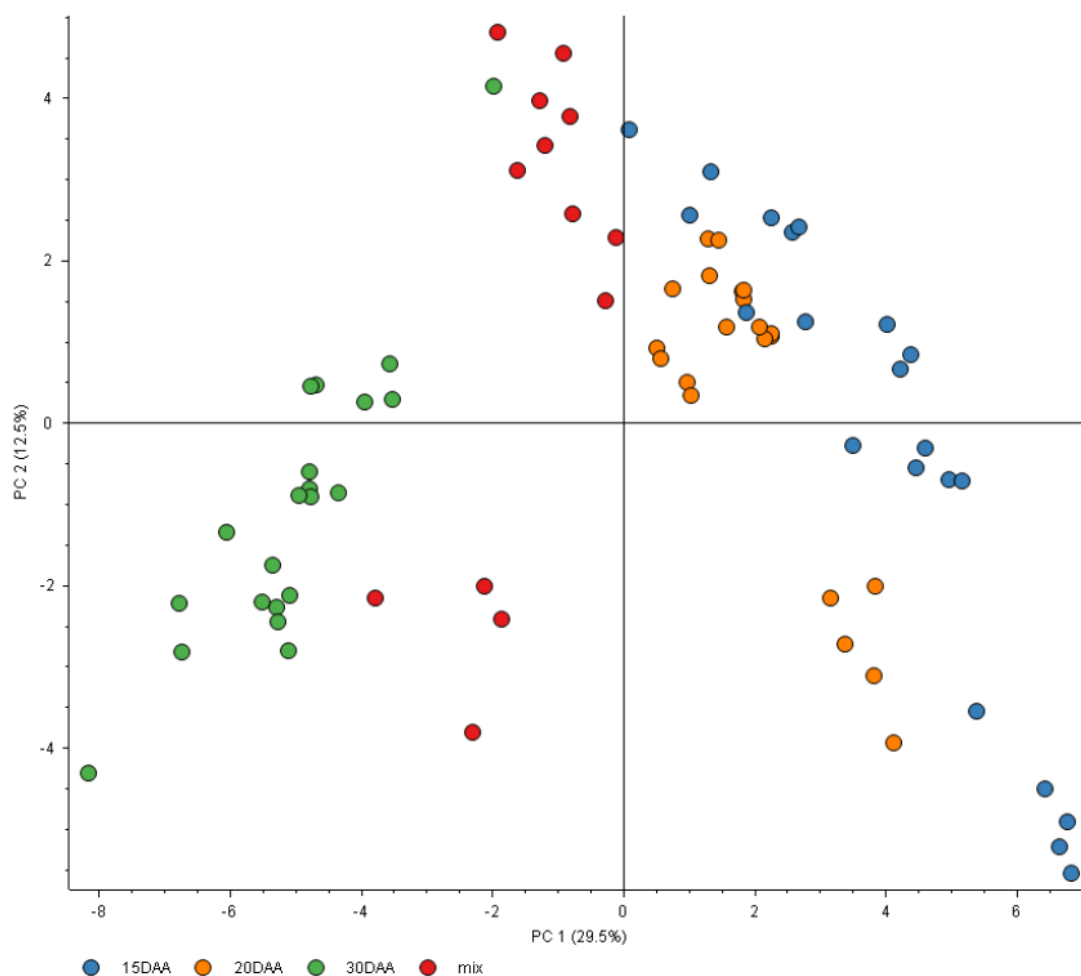
**Rycina 5.** Wyniki klastrowania hierarchicznego przeprowadzonego dla grupy badanych próbek (metoda mieszana). Oznaczenia: Culture time – etap rozwoju nasion, Treatment – rodzaj aplikowanej substancji, Time – godzina zbioru prób, mix – próba referencyjna, DAA – dzień po wykształceniu kwiatu (Day After Anthesis), Control – Kontrola, Sample – próba badana

Data Source: Proteins : Abundances (Grouped)  
 Distance Function: Euclidean  
 Linkage Method: Ward  
 Scaling: Scale After Clustering



**Rycina 6.** Wyniki klastrowania hierarchicznego przeprowadzonego dla grupy badanych próbek (metoda Warda). Oznaczenia: Culture time – etap rozwoju nasion, Treatment – rodzaj aplikowanej substancji, Time – godzina zbioru próbek, mix – próba referencyjna, DAA – dzień po wykształceniu kwiatu (Day After Anthesis), Control – Kontrola, Sample – próba badana

Dla otrzymanych danych przeprowadzono analizę głównych składników (PCA, ang. Principal Component Analysis). Jeden z wyników analizy zaprezentowano na Rycinie 7. Wyniki przeprowadzonych analiz potwierdzają dobre rozróżnienie między grupami 15 DAA, 20 DAA oraz 30 DAA, natomiast nie wykazano innych znaczących statystycznie korelacji. Co ważne, powtórzenia biologiczne także nie wykazują wyraźnego grupowania (Rycina 7.).

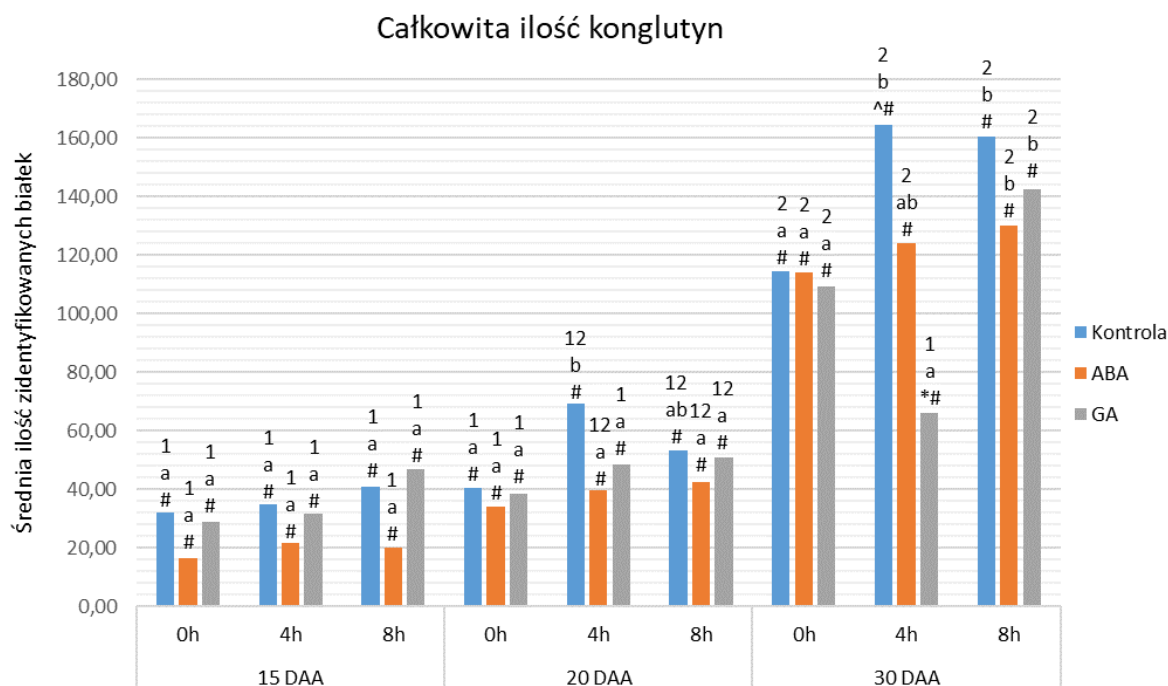


**Rycina. 7.** Wyniki analizy głównych składowych. Grupy próbek oznaczono kolorami odpowiadającymi odmiennym stanom biologicznym. Na czerwono zaznaczono grupę próbek referencyjnych. Oznaczenia: mix – próba referencyjna, DAA – dzień po wykształceniu kwiatu (Day After Anthesis)

## 5.5. Poziom akumulacji wybranych białek

Analizy nanoLC-MS/MS pozwoliły także określić poziom akumulacji zidentyfikowanych białek w nasionach łubinu żółtego odmiany Taper w kolejnych fazach ich rozwoju (15, 20, 30 DAA). Aby zweryfikować różnice pomiędzy poziomami białek w poszczególnych wariantach, wykonano szereg testów H Kruskala-Wallisa oraz ANOVA Friedmana z uwagi na braki danych, co przekładało się na obniżenie liczebności prób. Przyjęto próg  $\alpha = 0,05$  jako wiążący dla interpretacji statystycznie istotnych różnic pomiędzy pomiarami.

### 5.5.1. Akumulacja konglutyn



**Wykres 19.** Poziom akumulacji białek zapasowych (konglutyn) zidentyfikowanych w nasionach łubinu żółtego odmiany Taper w kolejnych dniach ich rozwoju po zastosowaniu ABA lub GA w godzinie: 0, 4, i 8. Oznaczenia istotności statystycznej dla porównań parami:

a, b, c – efekty proste dla różnic między godzinami dla poszczególnych godzin zbioru

1, 2, 3 – efekty proste dla różnic między dniami rozwoju wewnątrz danego etapu rozwoju

\*, ^, # – efekty proste dla różnic między wariantami nasion (K/ABA/GA) w ramach określonej godziny zbioru i etapu rozwoju

#### **5.5.1.1. Różnice w ilości konglutyn w kolejnych dniach rozwoju nasion w wariantach K/ABA/GA**

Analiza różnic wewnątrzgrupowych w zależności od etapu rozwoju nasion (Wykres 19.) wykazała, że ilość konglutyn systematycznie wzrastała w kolejnych dniach rozwoju nasion. W 30 DAA, w godzinie zero odnotowany wzrost poziomu białek zapasowych był istotnie wyższy w porównaniu do analogicznych wariantów z 15 DAA ( $p < 0,01$ ) oraz 20 DAA ( $p < 0,05$ ). Porównując dni rozwoju nasion w godzinie czwartej, stwierdzono wyższy poziom białek zapasowych także w 30 DAA w porównaniu do 15 DAA, zarówno w nasionach roślin po aplikacji ABA ( $p = 0,043$ ) jak i kontrolnych ( $p = 0,014$ ). Natomiast porównanie poziomu konglutyn w ósmej godzinie w poszczególnych etapach rozwoju pozwoliło stwierdzić, że niezależnie od aplikacji fitohormonów, poziom białek zapasowych był zawsze wyższy w 30 DAA w porównaniu do 15 DAA ( $p < 0,05$ ).

#### **5.5.1.2. Różnice w ilościach konglutyn w godzinach 0h/4h/8h w analizowanych wariantach**

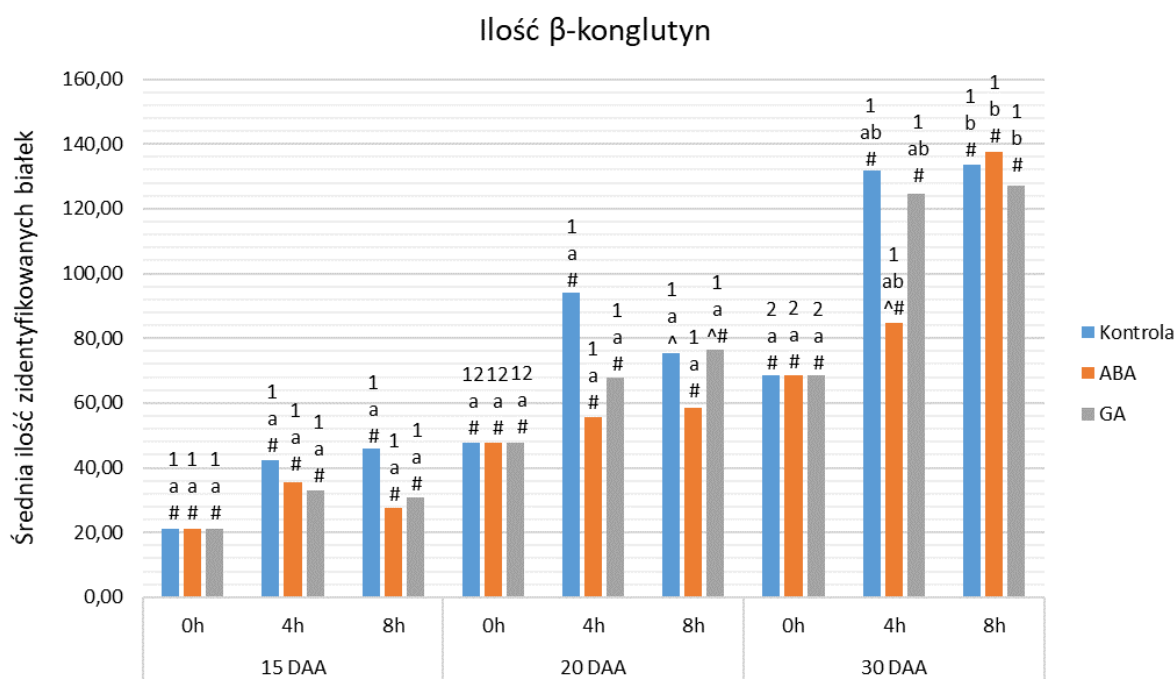
Analiza różnic w ilości zgromadzonych konglutyn nie wykazała istotnych statystycznie różnic w 15 DAA pomiędzy wyznaczonymi godzinami zbiorów (0, 4 i 8h). W 20 DAA odnotowano jedną istotną statystycznie różnicę w ilości białek zapasowych pomiędzy godziną zerową a czwartą w nasionach z grupy kontrolnej ( $p = 0,002$ ). Natomiast w 30 DAA zaobserwowano istotne różnice we wszystkich badanych wariantach. Istotnie wyższy poziom zgromadzonych białek wykazywały nasiona w godzinie ósmej w porównaniu do zerowej, zarówno w grupie kontrolnej ( $p = 0,002$ ), jak i traktowane ABA ( $p = 0,002$ ) oraz GA ( $p = 0,042$ ) (Wykres 19.).

#### **5.5.1.3. Różnice w ilościach konglutyn w warunkach kontrolnych oraz pod wpływem działania hormonów**

Analiza różnic w ilości zgromadzonych białek zapasowych w nasionach łubinu żółtego pomiędzy badanymi wariantami (Wykres 19.), wykazała istotne statystycznie obniżenie poziomu konglutyn w godzinie czwartej w 30 DAA w nasionach roślin poddanych działaniu GA ( $p = 0,015$ ) w porównaniu do nasion z wariantu kontrolnego. W pozostałych wariantach nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic.

### 5.5.2. Akumulacja $\beta$ -konglutyn

Analiza porównań pomiędzy poszczególnymi godzinami w ramach każdego z wariantów w grupie nasion z 15 i 20 DAA nie wykazała istotnych statystycznie różnic (Wykres 20.). Natomiast w 30 DAA potwierdzono, że poziom  $\beta$ -konglutyn był wyższy w godzinie ósmej w porównaniu do godziny zerowej, a efekt ten wystąpił zarówno w nasionach roślin kontrolnych, jak i traktowanych GA i ABA ( $p < 0,05$ ). Podwyższoną akumulację tego białka odnotowano także w godzinie czwartej w nasionach z grupy kontrolnej oraz po aplikacji GA w porównaniu do grupy danych zebranych w godzinie zerowej w najstarszych nasionach, jednak wyniki te nie wykazały istotności statystycznej. Porównanie pomiędzy nasionami wskazuje na wyższy poziom tego rodzaju białek zapasowych w nasionach kontrolnych niż w nasionach roślin traktowanych ABA ( $p = 0,039$ ). Nie stwierdzono innych istotnych statystycznie różnic w zależności od godziny, stadium rozwoju lub aplikowanego fitohormonu.

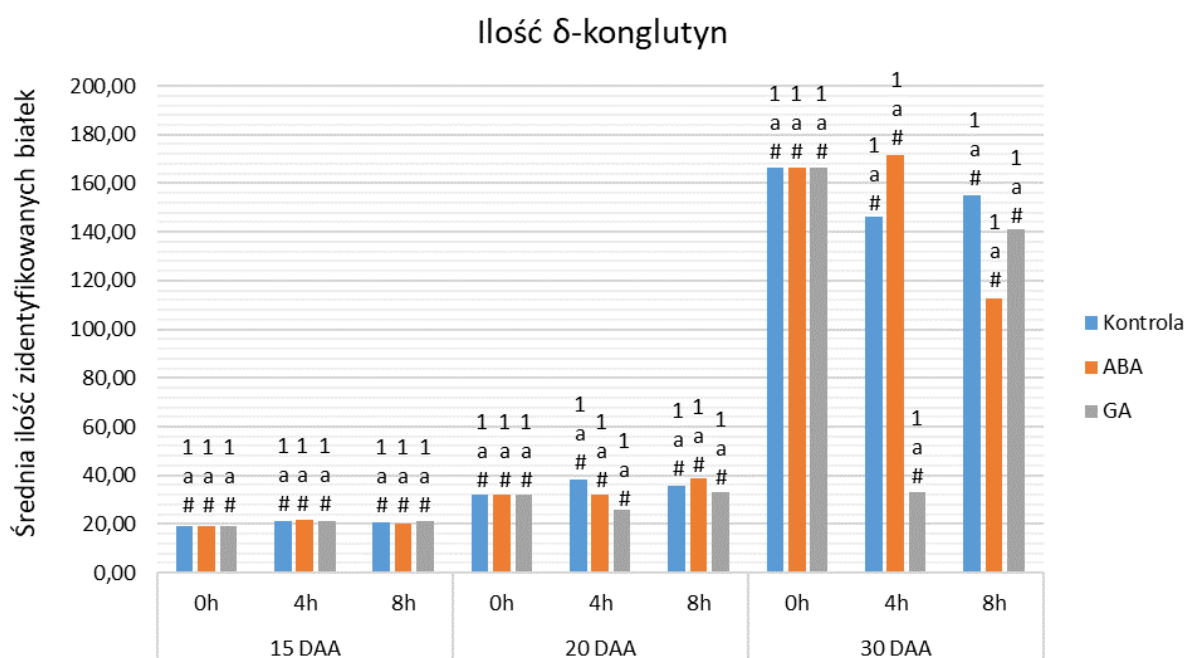


**Wykres 20.** Poziom akumulacji  $\beta$ -konglutyn zidentyfikowanych w nasionach łubinu żółtego odmiany Taper w kolejnych dniach ich rozwoju po zastosowaniu ABA lub GA w godzinie: 0, 4, i 8. Oznaczenia istotności statystycznej dla porównań parami:  
a, b, c – efekty proste dla różnic między godzinami dla poszczególnych godzin zbioru  
1, 2, 3 – efekty proste dla różnic między dniami rozwoju wewnątrz danego etapu rozwoju  
\*, ^, # – efekty proste dla różnic między wariantami nasion (K/ABA/GA) w ramach określonej godziny zbioru i etapu rozwoju



### 5.5.3. Akumulacja $\delta$ -konglutyn

Testy H Kruskala-Wallisa oraz analiza z wykorzystaniem analizy wariancji ANOVA Friedmana dla określenia istotności wyników akumulacji  $\delta$ -konglutyny w nasionach łubinu żółtego (Wykres 21.), nie wykazały żadnych istotnych statystycznie różnic między badanymi wariantami, niezależnie czy testowano efekt godziny, czy też aplikacji fitohormonu. Obserwując średnie ilości  $\delta$ -konglutyny zauważono, że jego akumulacja w 30 DAA była wyższa w próbach z godziny zerowej i ósmej, niezależnie od aplikacji fitohormonu. Natomiast w czwartej godzinie nie wystąpiła znacząca zmiana poziomu  $\delta$ -konglutyny w nasionach roślin traktowanych GA.



**Wykres 21.** Poziom akumulacji  $\delta$ -konglutyn zidentyfikowanych w nasionach łubinu żółtego odmiany Taper w kolejnych dniach ich rozwoju po zastosowaniu ABA lub GA w godzinie: 0, 4, i 8. Oznaczenia istotności statystycznej dla porównań parami:  
a, b, c – efekty proste dla różnic między godzinami dla poszczególnych godzin zbioru  
1, 2, 3 – efekty proste dla różnic między dniami rozwoju wewnątrz danego etapu rozwoju  
\*, ^, # – efekty proste dla różnic między wariantami nasion (K/ABA/GA) w ramach określonej godziny zbioru i etapu rozwoju

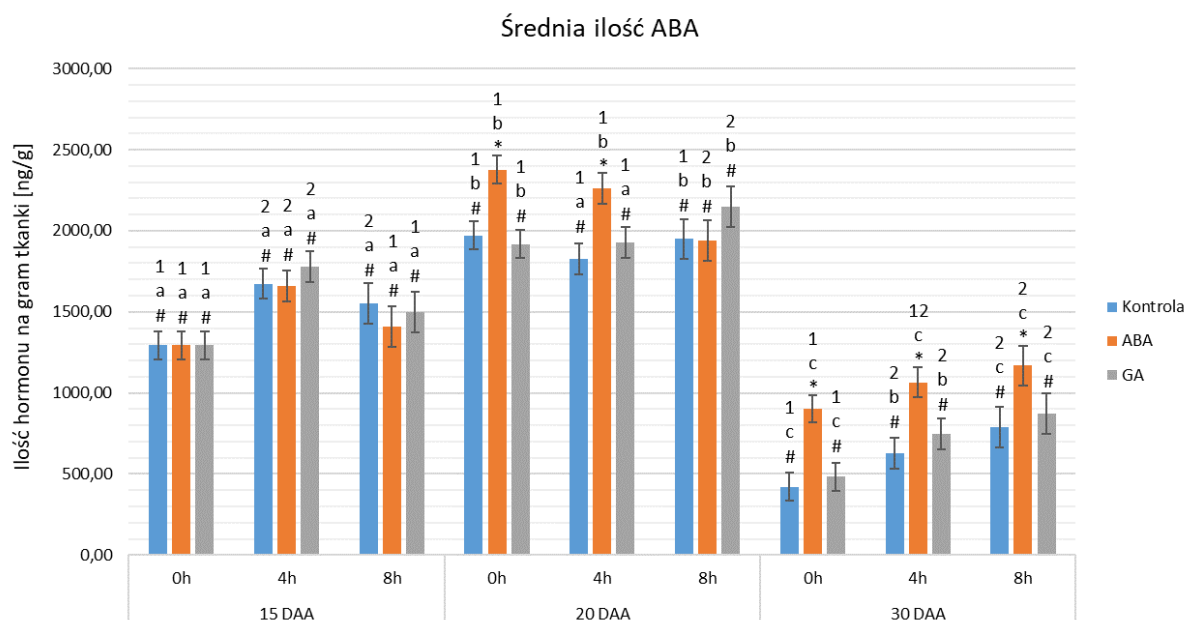
## 5.6. Analiza endogennego poziomu wybranych fitohormonów

Wykonane rozdziały LC-MSMS i analizy ich wyników pozwoliły określić endogenną ilość fitohormonów w nasionach łubinu żółtego odmiany Taper w kolejnych dniach ich rozwoju (15, 20, 30 DAA) zarówno w warunkach kontrolnych, jak i po aplikacji fitohormonów. Badano zawartość ABA, czterech bioaktywnych giberelin: GA<sub>1</sub>, GA<sub>3</sub>, GA<sub>4</sub> i GA<sub>7</sub> oraz IAA.

W celu weryfikacji różnic pomiędzy badanymi wariantami, przeprowadzono analizę wariancji w modelu mieszanym (3x3x3). Zmienną wewnątrzgrupową był czas „okołodobowy” pomiaru hormonu (0h vs. 4h vs. 8h), natomiast zmienne międzyobiektywne stanowiły odpowiednio: podany hormon (GA vs. ABA vs. Kontrola) oraz stadium rozwoju nasion (15 DAA vs. 20 DAA vs. 30 DAA).

### 5.6.1. Endogenny poziom ABA

Analiza różnic w endogennym poziomie ABA w nasionach (Wykres 22.), wykazała istotny statystycznie efekt interakcji pomiędzy wszystkimi czynnikami,  $F(8,36) = 3,12$ ;  $p = 0,009$ ;  $\eta^2 = 0,41$ .



**Wykres 22.** Średnia ilość endogennego ABA w nasionach łubinu żółtego odmiany Taper w kolejnych dniach ich rozwoju oraz pod wpływem aplikacji ABA lub GA. Oznaczenia: DAA – dzień po wykształceniu kwiatu (Day After Anthesis), ABA – nasiona po aplikacji kwasu absycynowego, GA – nasiona po aplikacji gibereliny ( $GA_3$ ). Błędy pomiaru stanowią 95% przedziału ufności dla zebranych danych. Oznaczenia istotności statystycznej:

a, b, c – efekty proste dla różnic między etapami rozwoju dla poszczególnych godzin zbioru

1, 2, 3 – efekty proste dla różnic między godzinami zbioru wewnątrz danego etapu rozwoju

\*, ^, # – efekty proste dla różnic między wariantami nasion (K/ABA/GA) w ramach określonej godziny zbioru i etapu rozwoju

#### 5.6.1.1. Różnice w ilości endogennego ABA w kolejnych dniach rozwoju nasion w wariantach K/ABA/GA

W przypadku nasion roślin po aplikacji ABA, zaobserwowano, krzywoliniowy efekt w przypadku każdej godziny zbioru. Pomiedzy 15 DAA a 20 DAA, w każdej godzinie następował wzrost ilości ABA na poziomie istotności ( $p < 0,001$ ), a następnie spadek w 30 DAA ( $p < 0,001$ ) w porównaniu do 20 DAA (Wykres 22.). Co więcej, zaobserwowano także, że endogenna ilość ABA w nasionach roślin poddawanych działaniu tego fitohormonu w 30 DAA była zawsze niższa w porównaniu do wariantu 15 DAA ( $p < 0,05$ ). Oznacza to, że

najwyższy poziom hormonu ABA występował zawsze w 20 DAA wśród nasion roślin traktowanych ABA.

Niemal identyczne efekty stwierdzono w nasion roślin traktowanych GA, gdzie ilość ABA była istotnie niższa w 15 DAA w godzinie zerowej ( $p < 0,001$ ) oraz ósmej ( $p < 0,001$ ) w porównaniu do 20 DAA. Ponadto w 30 DAA w każdej godzinie poziom hormonu ABA w nasionach roślin, którym aplikowano GA był istotnie niższy niż w 15 DAA ( $p < 0,001$ ) i 20 DAA ( $p < 0,001$ ). Istotnej statystycznie zmiany nie stwierdzono jedynie w godzinie czwartej, pomiędzy wariantami 15 a 20 DAA ( $p = 0,132$ ).

Wśród nasion kontrolnych, potwierdzono identyczne wzorce zależności jak wśród nasion roślin traktowanych GA, gdzie tylko wartość uzyskana w godzinie czwartej w 15 i 20 DAA nie różniły się istotnie statystycznie ( $p = 0,116$ ). Wyniki przedstawiono na Wykresie 22.

#### **5.6.1.2. Różnice w ilości endogenego ABA w godzinach 0h/4h/8h w analizowanych wariantach**

W nasionach roślin, którym aplikowano ABA w 15 DAA stwierdzono istotny statystycznie wzrost ilości ABA po czterech godzinach od podania fitohormonu ( $p < 0,001$ ), a następnie jego spadek w godzinie ósmej ( $p = 0,010$ ) (Wykres 22.). Podobny efekt zaobserwowano także w przypadku nasion roślin traktowanych GA, u których poziom ABA także istotnie wzrósł po czterech godzinach od aplikacji GA ( $p < 0,001$ ), a po ośmiu godzinach obniżył się ( $p = 0,004$ ) w porównaniu do godziny czwartej. Natomiast wśród nasion kontrolnych, potwierdzono jedynie wzrost ilości ABA w godzinie czwartej ( $p < 0,001$ ) i ósmej ( $p = 0,020$ ) w porównaniu do godziny zerowej.

W 20 DAA w nasionach roślin poddanych działaniu egzogenego ABA, zaobserwowano istotny statystycznie spadek endogenego poziomu tego hormonu w ósmej godzinie zbioru w porównaniu do godziny zerowej ( $p < 0,001$ ) i czwartej ( $p = 0,001$ ) (Wykres 22.).

Jednakże w nasionach roślin po aplikacji GA odnotowano odwrotny efekt w akumulacji ABA. Ilość tego fitohormonu była istotnie wyższa w godzinie ósmej w porównaniu do godziny zerowej ( $p = 0,041$ ) i czwartej ( $p = 0,024$ ). W przypadku grupy kontrolnej nie zaobserwowano istotnych zmian w endogennej ilości ABA w kolejnych godzinach zbiorów na tym etapie rozwoju (Wykres 22.).

Z kolei w wariantach 30 DAA potwierdzono, że nasiona roślin po aplikacji ABA wykazywały jedynie istotny statystycznie wzrost endogenego poziomu tego fitohormonu

w ósmej godzinie w porównaniu do godziny zerowej ( $p = 0,016$ ). W przypadku nasion roślin traktowanych GA, zaobserwowano istotny statystycznie wzrost ilości ABA w godzinie czwartej ( $p = 0,004$ ) i ósmej ( $p = 0,001$ ) w porównaniu do godziny zerowej. Identyczny efekt wystąpił w przypadku nasion z grupy kontrolnej, gdzie endogenny poziom omawianego fitohormonu był wyższy w godzinie czwartej ( $p = 0,024$ ) i ósmej ( $p = 0,001$ ) w porównaniu do godziny zerowej. Wyniki przedstawiono na Wykresie 22.

### **5.6.1.3. Różnice w ilości endogennego ABA w warunkach kontrolnych oraz pod wpływem działania hormonów**

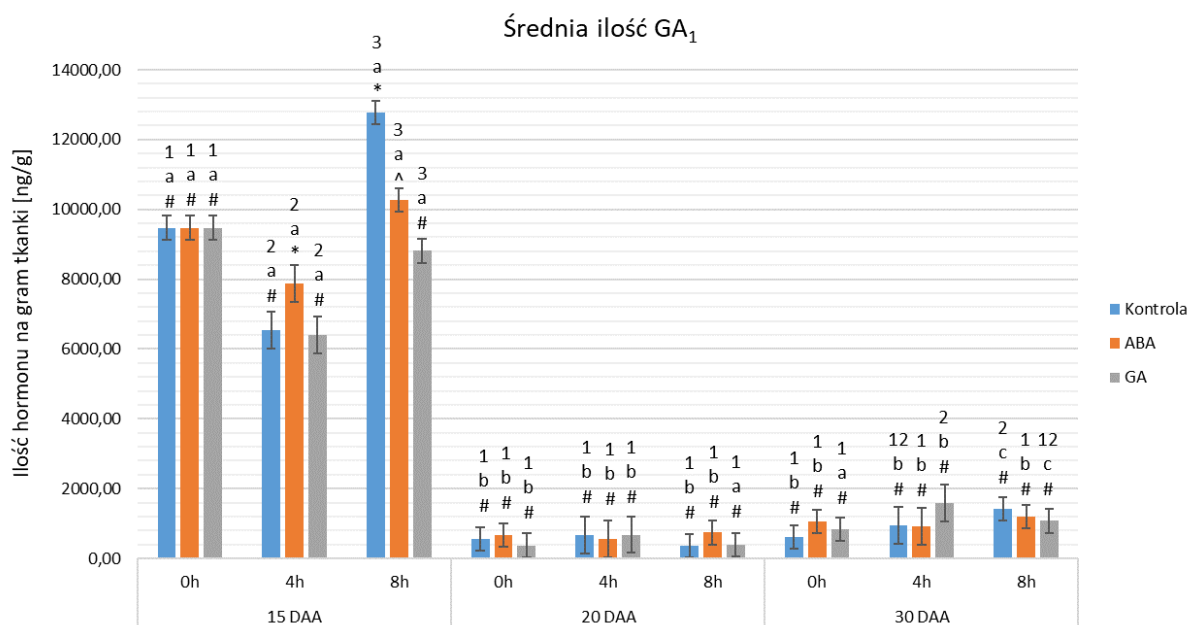
Analiza różnic między poszczególnymi wariantami nasion, wykazała brak istotnych statystycznie różnic w 15 DAA, niezależnie od godziny zbioru. Oznacza to, że endogenny poziom ABA był zbliżony we wszystkich badanych wariantach (ABA, GA, K) w początkowym etapie rozwoju nasion (Wykres 22.).

W nasionach zebranych w 20 dniu po wykształceniu kwiatów zaobserwowano, że po aplikacji ABA wykazują one istotnie statystycznie wyższy poziom akumulacji tego fitohormonu w zerowej oraz czwartej godzinie w porównaniu do nasion kontrolnych ( $p < 0,001$ ) oraz nasion roślin traktowanych GA ( $p < 0,001$ ). W ósmej godzinie odnotowano z kolei wyrównanie ilości hormonu ABA w poszczególnych wariantach, a w efekcie nie stwierdzono istotnych różnic (Wykres 22.).

W ostatnim etapie rozwoju (30 DAA) zaobserwowano istotne statystycznie różnice w każdej godzinie zbioru, co najmniej na poziomie  $p < 0,05$ , pomiędzy nasionami roślin traktowanych ABA w porównaniu do nasion roślin, którym aplikowano GA oraz do nasion kontrolnych. Nasiona roślin poddawane działaniu ABA wykazywały istotnie wyższą ilość hormonu ABA w każdej godzinie zbioru w porównaniu do pozostałych wariantów. Wyniki przedstawiono na Wykresie 22.

## 5.6.2. Endogenny poziom GA<sub>1</sub>

Analiza różnic endogennych poziomów GA<sub>1</sub> (Wykres 23.), wykazała istotny statystycznie efekt interakcji pomiędzy wszystkimi czynnikami,  $F(8,36) = 13,11$ ;  $p < 0,001$ ;  $\eta^2 = 0,75$ .



**Wykres 23.** Średnia ilość endogennego GA<sub>1</sub> w nasionach łubinu żółtego odmiany Taper w kolejnych dniach ich rozwoju oraz pod wpływem aplikacji ABA lub GA. Oznaczenia: DAA – dzień po wykształceniu kwiatu (Day After Anthesis), ABA – nasiona roślin po aplikacji kwasu abscysynowego, GA – nasiona roślin po aplikacji gibereliny (GA<sub>3</sub>). Błędy pomiaru stanowią 95% przedziału ufności dla zebranych danych. Oznaczenia istotności statystycznej:

a, b, c – efekty proste dla różnic między etapami rozwoju dla poszczególnych godzin zbioru  
 1, 2, 3 – efekty proste dla różnic między godzinami zbioru wewnątrz danego etapu rozwoju  
 \*, ^, # – efekty proste dla różnic między wariantami nasion (K/ABA/GA) w ramach określonej godziny zbioru i etapu rozwoju

### 5.6.2.1. Różnice w ilości endogennego GA<sub>1</sub> w kolejnych dniach rozwoju nasion w wariantach K/ABA/GA

W nasionach, które były poddawane działaniu ABA wykazano istotny statystycznie spadek ilości hormonu GA<sub>1</sub> w 20 DAA i 30 DAA w porównaniu do 15 DAA ( $p < 0,001$ ), niezależnie od godziny zbioru. Ilość badanego fitohormonu nie zmieniała się w 20 i 30 DAA, niezależnie od godziny (Wykres 23.).

W nasionach roślin traktowanych GA, również stwierdzono istotnie wyższy poziom hormonu GA<sub>1</sub> w 15 DAA w porównaniu do 20 DAA i 30 DAA ( $p < 0,001$ ), niezależnie od godziny. W przypadku godziny zerowej i czwartej nie stwierdzono istotnych różnic

w 20 DAA i 30 DAA, natomiast w ósmej godzinie pomiaru potwierdzono wyższy poziom hormonu GA<sub>1</sub> w 30 DAA w porównaniu do 20 DAA ( $p = 0,035$ ).

Z kolei nasiona z grupy kontrolnej wykazywały identyczne efekty jak nasiona roślin po aplikacji GA. Istotne różnice również odnotowano w 15 DAA w porównaniu do 20 DAA i 30 DAA ( $p < 0,001$ ). Wyższy poziom badanego fitohormonu zaobserwowano także w ósmej godzinie w 30 DAA w porównaniu do 20 DAA ( $p = 0,001$ ). Wyniki przedstawiono na Wykresie 23.

#### **5.6.2.2. Różnice w ilości endogennego GA<sub>1</sub> konglutyn w godzinach 0h/4h/8h w analizowanych wariantach**

W przypadku nasion roślin traktowanych ABA w 15 DAA zaobserwowano istotny statystycznie spadek ilości GA<sub>1</sub> po czterech godzinach od aplikacji ABA ( $p < 0,001$ ), a następnie wzrost w godzinie ósmej w porównaniu do godziny czwartej ( $p < 0,001$ ). Dodatkowo, poziom GA<sub>1</sub> w ósmej godzinie był wyższy niż w godzinie zerowej ( $p = 0,010$ ) (Wykres 23.). Podobny efekt zaobserwowano także wśród nasion roślin, którym aplikowano GA, u których ilość GA<sub>1</sub> była niższa po czterech godzinach od podania fitohormonu ( $p < 0,001$ ) i ósmej ( $p < 0,001$ ). Jednakże w tym przypadku, poziom GA<sub>1</sub> był niższy także w ósmej godzinie w porównaniu do zerowej ( $p = 0,035$ ). W nasionach z wariantu kontrolnego wykazano identyczną zależność pomiędzy akumulacją badanego hormonu w poszczególnych godzinach, jak w przypadku nasion roślin, którym podawano ABA ( $p < 0,001$ ).

W nasionach 20 DAA w żadnym z badanych wariantów nie zaobserwowano istotnych statystycznie różnic między endogennym poziomem GA<sub>1</sub> w poszczególnych godzinach.

Natomiast w 30 DAA, potwierdzono brak istotnych zmian jedynie wśród nasion roślin traktowanych ABA. Nasiona roślin, którym podawano GA wykazywały istotny statystycznie wzrost ilości GA<sub>1</sub> pomiędzy godziną zerową a czwartą ( $p = 0,038$ ). Z kolei nasiona z grupy kontrolnej wykazywały istotny statystycznie, wyższy poziom hormonu GA<sub>1</sub> w godzinie ósmej w porównaniu do godziny zerowej ( $p = 0,011$ ). Wyniki przedstawiono na Wykresie 23.

### **5.6.2.3. Różnice w ilości endogennego GA<sub>1</sub> w warunkach kontrolnych oraz pod wpływem działania hormonów**

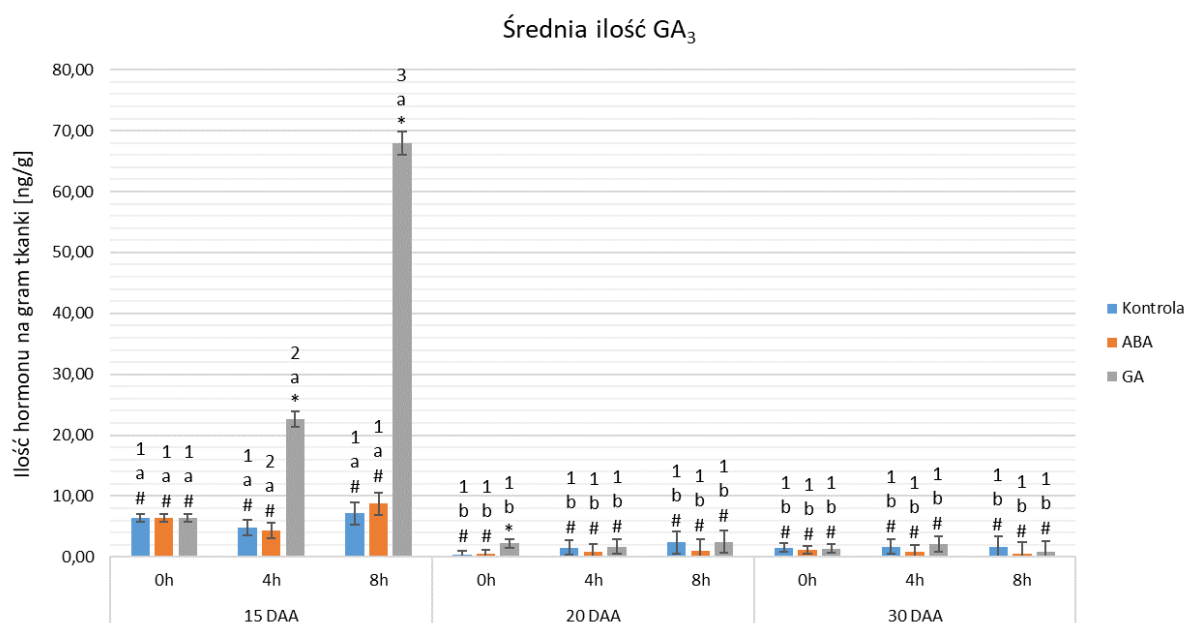
Obserwując różnice pomiędzy badanymi wariantami w poszczególnych godzinach w początkowym etapie rozwoju nasion potwierdzono, że nasiona roślin traktowanych ABA miały istotnie wyższy poziom hormonu GA<sub>1</sub> w czwartej godzinie w porównaniu do kontroli ( $p = 0,007$ ) oraz wariantu GA ( $p = 0,004$ ). Natomiast w ósmej godzinie nasiona z grupy kontrolnej wykazywały wyższy poziom hormonu GA<sub>1</sub> niż nasiona roślin po aplikacji ABA i GA ( $p < 0,001$ ).

W kolejnych etapach rozwoju nasion (20 i 30 DAA) nie zaobserwowano żadnych istotnych różnic między badanymi wariantami. Wyniki przedstawiono na Wykresie 23.



### 5.6.3. Endogenny poziom GA<sub>3</sub>

Analiza różnic endogennej ilości hormonu GA<sub>3</sub> (Wykres 24.) w nasionach łubinu żółtego, wykazała istotny statystycznie efekt interakcji pomiędzy wszystkimi czynnikami,  $F(8,36) = 228,70$ ;  $p < 0,001$ ;  $\eta^2 = 0,98$ .



**Wykres 24.** Średnia ilość endogennego GA<sub>3</sub> w nasionach łubinu żółtego odmiany Taper w kolejnych dniach ich rozwoju oraz pod wpływem aplikacji ABA lub GA. Oznaczenia: DAA – dzień po wykształceniu kwiatu (Day After Anthesis), ABA – nasiona po aplikacji kwasu absycynowego, GA – nasiona po aplikacji gibereliny (GA<sub>3</sub>). Błędy pomiaru stanowią 95% przedziału ufności dla zebranych danych. Oznaczenia istotności statystycznej:

a, b, c – efekty proste dla różnic między etapami rozwoju dla poszczególnych godzin zbioru

1, 2, 3 – efekty proste dla różnic między godzinami zbioru wewnątrz danego etapu rozwoju

\*, ^, # – efekty proste dla różnic między wariantami nasion (K/ABA/GA) w ramach określonej godziny zbioru i etapu rozwoju

#### 5.6.3.1. Różnice w ilości endogennego GA<sub>3</sub> w kolejnych dniach rozwoju nasion w wariantach K/ABA/GA

Niezależnie od badanego wariantu, zaobserwowano istotny statystycznie spadek ilości GA<sub>3</sub> pomiędzy 15 DAA a 20 DAA i 30 DAA w każdej godzinie pomiaru na poziomach istotności  $p < 0,01$ . Nie potwierdzono natomiast istotnych różnic między poziomem hormonu GA<sub>3</sub> w 20 DAA i 30 DAA. Oznacza to, że w we wszystkich wariantach i każdej godzinie zbioru, endogenna ilość badanego hormonu była wyższe w początkowym etapie rozwoju nasion (15 DAA) niż kolejnych dniach. Wyniki przedstawiono na Wykresie 24.

### **5.6.3.2. Różnice w ilości endogennego GA<sub>3</sub> w godzinach 0h/4h/8h w analizowanych wariantach**

W 15 DAA w nasionach roślin poddawanych działaniu GA zaobserwowano prostoliniowy, istotny statystycznie wzrost ilości GA<sub>3</sub> po czterech i ośmiu godzinach od aplikacji fitohormonu ( $p < 0,001$ ) (Wykres 24). Natomiast w nasionach roślin traktowanych ABA odnotowano spadek ilości badanego hormonu między godziną czwartą a zerową ( $p = 0,004$ ), a następnie ponowy wzrost w godzinie ósmej ( $p = 0,006$ ). Z kolei w nasionach z wariantu kontrolnego nie wystąpiły istotne statystycznie zmiany ilości GA<sub>3</sub> w badanych przedziałach godzinowych.

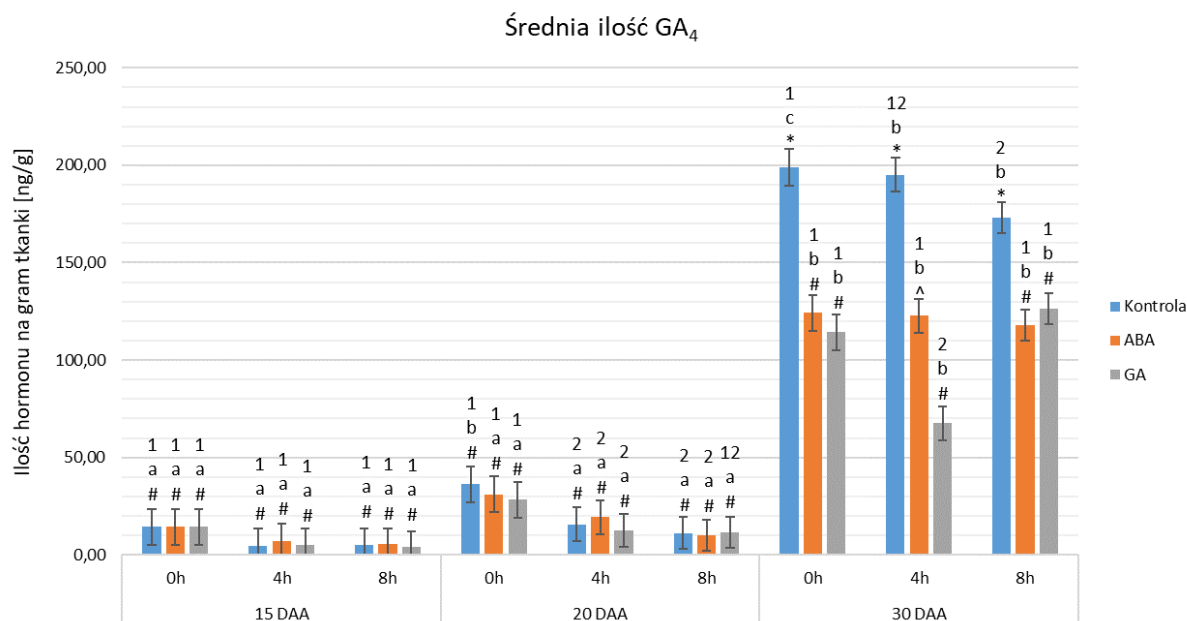
Analizując zmiany endogennych poziomów GA<sub>3</sub> w 20 DAA i 30 DAA, potwierdzono brak istotnych statystycznie różnic we wszystkich badanych wariantach. Oznacza to, że ilość hormonu GA<sub>3</sub> nie zmieniła się w żadnym z wariantów w poszczególnych godzinach zbioru. Wyniki przedstawiono na Wykresie 24.

### **5.6.3.3. Różnice w ilości endogennego GA<sub>3</sub> w warunkach kontrolnych oraz pod wpływem działania hormonów**

W początkowym etapie rozwoju nasion (15 DAA), zarówno w czwartej jak i ósmej godzinie zbiorów, zaobserwowano istotny statystycznie wyższy poziom hormonu GA<sub>3</sub> w nasionach roślin po aplikacji GA w porównaniu do nasion kontrolnych oraz traktowanych ABA, wszystkie różnice były na poziomie  $p < 0,001$ . W 20 dniu od wykształcenia kwiatów, stwierdzono istotne różnice jedynie w godzinie zerowej, gdzie nasiona roślin po podaniu GA miały istotnie wyższy poziom hormonu GA<sub>3</sub> w porównaniu do nasion kontrolnych ( $p = 0,004$ ) i nasion roślin z wariantu ABA ( $p = 0,009$ ). W najstarszych nasionach nie zaobserwowano żadnych istotnych statystycznie różnic między badanymi wariantami. Wyniki przedstawiono na Wykresie 24.

#### 5.6.4. Endogenny poziom GA<sub>4</sub>

Analiza różnic w ilości GA<sub>4</sub> (Wykres 25.) w rozwijających się nasionach łubinu żółtego, wykazała istotny statystycznie efekt interakcji pomiędzy wszystkimi czynnikami,  $F(8,36) = 8,57$ ;  $p < 0,001$ ;  $\eta^2 = 0,66$ .



**Wykres 25.** Średnia ilość endogennego GA<sub>4</sub> w nasionach łubinu żółtego odmiany Taper w kolejnych dniach ich rozwoju oraz pod wpływem aplikacji ABA lub GA. Oznaczenia: DAA – dzień po wykształceniu kwiatu (Day After Anthesis), ABA – nasiona roślin po aplikacji kwasu abscysynowego, GA – nasiona roślin po aplikacji gibereliny (GA<sub>3</sub>). Błędy pomiaru stanowią 95% przedziału ufności dla zebranych danych. Oznaczenia istotności statystycznej:

a, b, c – efekty proste dla różnic między etapami rozwoju dla poszczególnych godzin zbioru

1, 2, 3 – efekty proste dla różnic między godzinami zbioru wewnątrz danego etapu rozwoju

\*, ^, # – efekty proste dla różnic między wariantami nasion (K/ABA/GA) w ramach określonej godziny zbioru i etapu rozwoju

##### 5.6.4.1. Różnice w ilości endogennego GA<sub>4</sub> w kolejnych dniach rozwoju nasion w wariantach K/ABA/GA

W przypadku nasion roślin traktowanych GA i ABA, zaobserwowano istotny statystycznie wzrost ilości hormonu GA<sub>4</sub> w 30 DAA w porównaniu do 15 DAA i 20 DAA ( $p < 0,001$ ) w każdej godzinie zbioru. Nie odnotowano jednak istotnych różnic między 15 DAA a 20 DAA, zarówno dla nasion roślin, którym aplikowano GA jak i ABA. W przypadku nasion kontrolnych, zaobserwowano dodatkowy efekt, który wskazywał na niższy poziom hormonu GA<sub>4</sub> w 15 DAA w porównaniu do 20 DAA w godzinie zerowej ( $p = 0,012$ ). Nie stwierdzono natomiast różnic w tych etapach rozwoju dla godziny czwartej

i ósmej. W końcowym etapie rozwoju nasion (30 DAA) wyższy poziom akumulacji badanego fitohormonu, w porównaniu do poprzednich dni, wykazywały zarówno nasiona z wariantu kontrolnego, jak i traktowane ABA lub GA. Wyniki przedstawiono na Wykresie 25.

#### **5.6.4.2. Różnice w ilości endogennego GA<sub>4</sub> w godzinach 0h/4h/8h w analizowanych wariantach**

W początkowym etapie rozwoju nasion, nie zaobserwowano istotnych statystycznie zmian w poziomach hormonu GA<sub>4</sub> w żadnym z badanych wariantów, co oznacza, że w każdej godzinie zbioru ilość hormonu była podobna (Wykres 25.).

W 20 DAA, wśród nasion roślin traktowanych ABA zaobserwowano istotny statystycznie spadek ilości hormonu GA<sub>4</sub> w godzinie czwartej ( $p = 0,017$ ) i ósmej ( $p = 0,032$ ) w porównaniu do godziny zerowej. W przypadku nasion roślin, którym aplikowano GA, stwierdzono jedynie istotny spadek ilości GA<sub>4</sub> między godziną zero a czwartą ( $p = 0,002$ ). Z kolei wśród nasion kontrolnych, odnotowano efekt identyczny jak wśród nasion roślin po aplikacji ABA, który wykazał, że poziom hormonu GA<sub>4</sub> był niższy w godzinie czwartej ( $p < 0,001$ ) i ósmej ( $p = 0,010$ ) w porównaniu do wartości w godzinie zero (Wykres 25.).

W 30 DAA nie stwierdzono istotnych statystycznie zmian między godzinami zbioru w przypadku nasion roślin traktowanych ABA. W nasionach roślin poddawanych działaniu GA, początkowo odnotowano spadek ilości hormonu GA<sub>4</sub> między godziną zerową a czwartą ( $p < 0,001$ ), a następnie wzrost do wartości bliskiej początkowej w godzinie ósmej ( $p < 0,001$ ). W przypadku nasion z grupy kontrolnej, stwierdzono liniowy negatywny efekt, który potwierdził że poziom hormonu GA<sub>4</sub> w ósmej godzinie był istotnie niższy niż w zerowej ( $p = 0,008$ ) oraz czwartej godzinie zbioru ( $p = 0,005$ ). Wyniki przedstawiono na Wykresie 25.

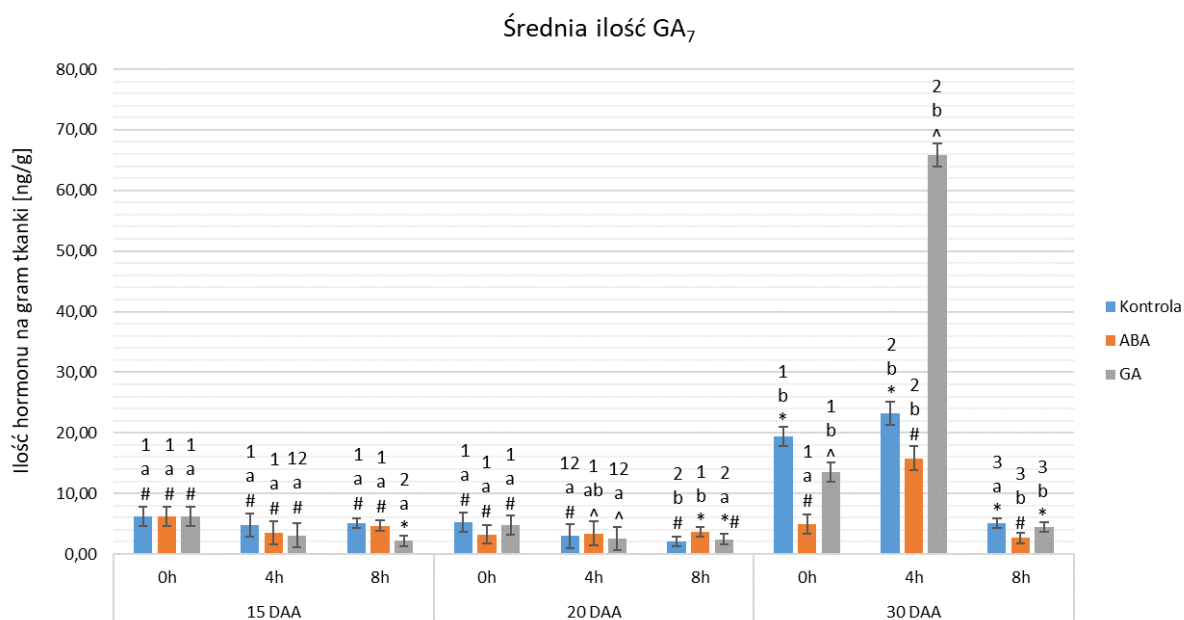
#### **5.6.4.3. Różnice w ilości endogennego GA<sub>4</sub> w warunkach kontrolnych oraz pod wpływem działania hormonów**

Analiza różnic w ilości endogennego poziomu GA<sub>4</sub> pomiędzy badanymi wariantami, wykazała brak istotnych statystycznie efektów w przypadku 15 DAA i 20 DAA (Wykres 24). Oznacza to, że do 20 DAA ilość hormonu GA<sub>4</sub> nie różniła się pomiędzy wariantami w poszczególnych godzinach zbioru. W 30 DAA stwierdzono istotne różnice między poszczególnymi wariantami. W każdej godzinie zbioru, nasiona z grupy kontrolnej miały istotny statystycznie wyższy poziom hormonu GA<sub>4</sub> w porównaniu do nasion roślin

traktowanych GA ( $p < 0,001$ ) oraz ABA ( $p < 0,001$ ). Ponadto potwierdzono, że ilość hormonu GA<sub>4</sub> była wyższa w czwartej godzinie zbioru w przypadku nasion roślin po aplikacji ABA w porównaniu do nasion roślin poddanych działaniu GA ( $p < 0,001$ ). Wyniki przedstawiono na Wykresie 25.

### 5.6.5. Endogenny poziom GA<sub>7</sub>

Analiza różnic w ilościach hormonu GA<sub>7</sub> w rozwijających się nasionach (Wykres 26.), wykazała istotny statystycznie efekt interakcji pomiędzy wszystkimi czynnikami,  $F(8,36) = 135,53$ ;  $p < 0,001$ ;  $\eta^2 = 0,97$ .



**Wykres 26.** Średnia ilość endogennego GA<sub>7</sub> w nasionach łubinu żółtego odmiany Taper w kolejnych dniach ich rozwoju oraz pod wpływem aplikacji ABA lub GA. Oznaczenia: DAA – dzień po wykształceniu kwiatu (Day After Anthesis), ABA – nasiona roślin po aplikacji kwasu abscysynowego, GA – nasiona roślin po aplikacji gibereliny (GA<sub>3</sub>). Błędy pomiaru stanowią 95% przedziału ufności dla zebranych danych. Oznaczenia istotności statystycznej:

a, b, c – efekty proste dla różnic między etapami rozwoju dla poszczególnych godzin zbioru

1, 2, 3 – efekty proste dla różnic między godzinami zbioru wewnątrz danego etapu rozwoju

\*, ^, # – efekty proste dla różnic między wariantami nasion (K/ABA/GA) w ramach określonej godziny zbioru i etapu rozwoju

#### **5.6.5.1. Różnice w ilości endogennego GA<sub>7</sub> w kolejnych dniach rozwoju nasion w wariantach K/ABA/GA**

W nasionach roślin, którym podawano ABA, w godzinie zerowej nie zaobserwowano istotnych statystycznie różnic w poziomie endogennego GA<sub>7</sub> między kolejnymi etapami rozwoju (Wykres 26.). W czwartej godzinie zbioru, ilość hormonu GA<sub>7</sub> w nasionach roślin traktowanych ABA była istotnie wyższa w 30 DAA, niż w 15 DAA ( $p < 0,001$ ) i 20 DAA ( $p < 0,001$ ). Z kolei w ósmej godzinie zbioru, zaobserwowano spadek ilości hormonu GA<sub>7</sub> w nasionach roślin, którym podawano ABA w wariacie 30 DAA w porównaniu do 15 DAA ( $p = 0,008$ ).

W nasionach roślin poddawanych działaniu GA, nie stwierdzono żadnych istotnych różnic między poziomem hormonu GA<sub>7</sub> w 15 DAA i 20 DAA we wszystkich godzinach zbiorów. Natomiast ilość endogennego hormonu GA<sub>7</sub> w nasionach roślin po aplikacji GA była wyższa w 30 DAA w porównaniu do tego odnotowanego w próbach 20 ( $p < 0,05$ ) i 15 DAA ( $p < 0,01$ ) w każdej badanej godzinie (Wykres 26.).

W wariacie nasion kontrolnych nie wykazano żadnych istotnych statystycznie różnic w wariantach 15 DAA i 20 DAA w godzinie zerowej i czwartej, a także w ósmej godzinie pomiędzy początkową (15 DAA) a końcową (30 DAA) fazą rozwoju nasion. Zaobserwowano także, że ilość hormonu GA<sub>7</sub> w nasionach w wariacie kontrolnym był wyższy w 30 DAA w godzinie czwartej i zerowej w porównaniu do wariantów 15 ( $p < 0,001$ ) i 20 DAA ( $p < 0,001$ ). Natomiast w ósmej godzinie zbiorów, wykazano istotnie niższy poziom badanego fitohormonu w 20 DAA w porównaniu do początkowej ( $p < 0,001$ ) i końcowej fazy rozwoju nasion ( $p < 0,001$ ) (Wykres 26.).

#### **5.6.5.2. Różnice w ilości endogennego GA<sub>7</sub> w godzinach 0h/4h/8h w analizowanych wariantach**

Analiza zmian endogennej ilości GA<sub>7</sub> wewnątrz poszczególnych wariantów nasion wykazała, że w 15 DAA wystąpiły istotne zmiany jedynie w przypadku nasion roślin traktowanych GA. Zaobserwowano istotny spadek poziomu oznaczanego hormonu pomiędzy godziną zerową a ósmą ( $p < 0,001$ ). W pozostałych porównywanych próbach nie stwierdzono różnic (Wykres 26.).

W 20 DAA nie zaobserwowano istotnych zmian ilościowych oznaczanego fitohormonu w nasionach roślin, którym aplikowano ABA. Natomiast w próbach po aplikacji

GA oraz kontrolnych, nastąpił istotny statystycznie spadek ilości hormonu GA<sub>7</sub> w godzinie ósmej w porównaniu do wartości z godziny zero ( $p < 0,05$ ) (Wykres 26.).

Największe zróżnicowanie zaobserwowano dopiero w końcowym etapie rozwoju nasion (30 DAA) (Wykres 26.). Wśród nasion roślin, którym aplikowano ABA wystąpił krzywoliniowy efekt, wskazujący na wzrost ilości hormonu GA<sub>7</sub> pomiędzy godziną zerową a czwartą ( $p < 0,001$ ), a następnie spadek w godzinie ósmej ( $p < 0,001$ ). Co więcej poziom badanego hormonu był nieco niższy w ósmej godzinie w porównaniu do zerowej ( $p = 0,036$ ). Podobne zależności odnotowano także w przypadku wariantu, w którym nasiona roślin poddawano działaniu egzogennej GA. Co więcej, różnice te przybierały wartości istotności statystycznej  $p < 0,001$  i były jeszcze wyraźniejsze niż po zastosowaniu ABA. Ilość badanego fitohormonu w godzinie ósmej spadła poniżej wartości w godzinie zero. Z kolei w nasionach z wariantu kontrolnego, stwierdzono istotny statystycznie wzrost ilości hormonu GA<sub>7</sub> pomiędzy godziną zerową a czwartą ( $p = 0,028$ ), a następnie znaczny jej spadek w godzinie ósmej, w której to poziom GA<sub>7</sub> był istotnie niższy niż w godzinie zerowej ( $p < 0,001$ ) i czwartej ( $p < 0,001$ ). Wyniki przedstawiono na Wykresie 26.

### **5.6.5.3. Różnice w ilości endogennej GA<sub>7</sub> w warunkach kontrolnych oraz pod wpływem działania hormonów**

Analizując różnice pomiędzy badanymi wariantami nasion stwierdzono, że w 15 DAA po czterech godzinach od aplikacji fitohormonów nie wystąpiły istotne różnice w endogennym poziomie hormonu GA<sub>7</sub> (Wykres 26.). Jednakże po upływie ośmiu godzin zaobserwowano istotny spadek ilości badanego fitohormonu po aplikacji GA w porównaniu do nasion kontrolnych ( $p < 0,001$ ) oraz traktowanych ABA ( $p = 0,001$ ).

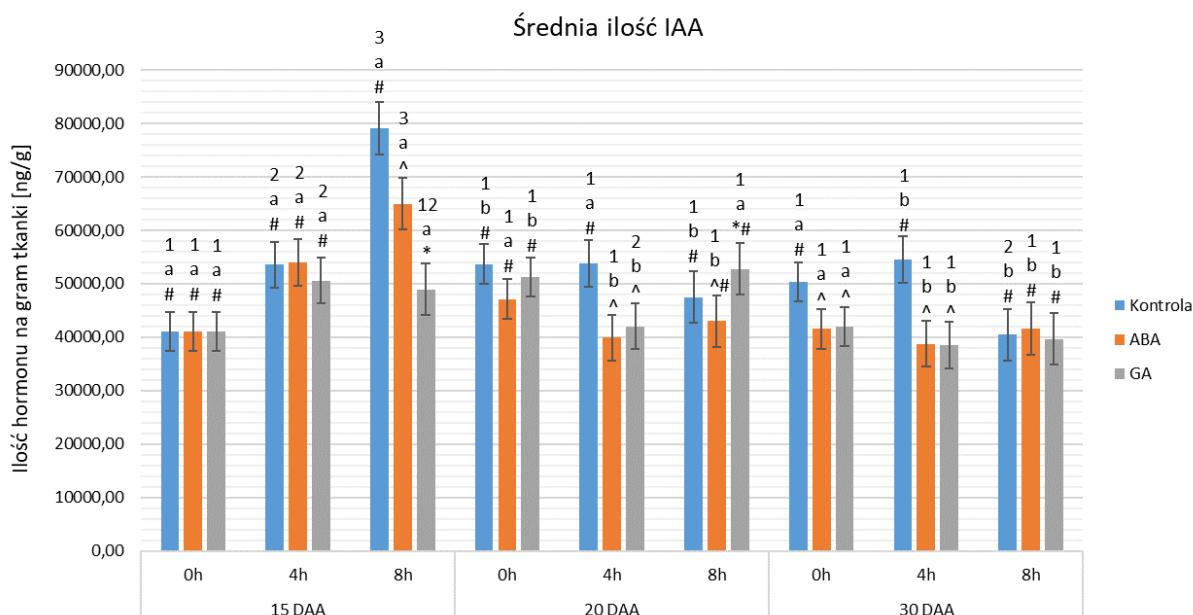
W kolejnym etapie rozwoju nasion (20 DAA) zaobserwowano jedynie istotnie wyższy poziom hormonu GA<sub>7</sub> w ósmej godzinie zbiorów w nasionach roślin traktowanych ABA w porównaniu do grupy kontrolnej ( $p = 0,035$ ).

Najbardziej zróżnicowane efekty pojawiły się w przypadku ostatniego z badanych dni rozwoju nasion (30 DAA). W zerowej godzinie nasiona roślin poddawanych działaniu ABA miały istotnie niższy poziom GA<sub>7</sub> w porównaniu do nasion roślin po aplikacji GA ( $p < 0,001$ ) i kontrolnych ( $p < 0,001$ ). Co więcej, nasiona z wariantu kontrolnego miały wyższy poziom badanego fitohormonu w godzinie zerowej w porównaniu do nasion roślin traktowanych GA ( $p < 0,001$ ). W czwartej godzinie, nasiona roślin po podaniu ABA miały również najniższy poziom hormonu GA<sub>7</sub> w porównaniu do nasion z grupy kontrolnej ( $p < 0,001$ ) oraz nasion

roślin poddawanych działaniu GA ( $p < 0,001$ ). Wykazano także, że nasiona roślin, którym aplikowano GA miały istotnie wyższy poziom badanego hormonu w porównaniu do grupy kontrolnej ( $p < 0,001$ ). W ósmej godzinie zbiorów, ponownie potwierdzono spadek ilości GA<sub>7</sub> w nasionach roślin po aplikacji ABA, które istotnie różniły się od wariantu GA ( $p = 0,021$ ) i kontrolnego ( $p = 0,002$ ). Wyniki przedstawiono na Wykresie 26.

### 5.6.6. Endogenny poziom IAA

Analiza różnic zmian endogennej ilości hormonu IAA (Wykres 27.) w trakcie rozwoju nasion łubinu żółtego, wykazała istotny statystycznie efekt interakcji pomiędzy wszystkimi czynnikami,  $F(8,36) = 10,54$ ;  $p < 0,001$ ;  $\eta^2 = 0,70$ .



**Wykres 27.** Średnia ilość endogennego IAA w nasionach łubinu żółtego odmiany Taper w kolejnych dniach ich rozwoju oraz pod wpływem aplikacji ABA lub GA. Oznaczenia: DAA – dzień po wykształceniu kwiatu (Day After Anthesis), ABA – nasiona roślin po aplikacji kwasu absycynowego, GA – nasiona roślin po aplikacji gibereliny (GA<sub>3</sub>). Błędy pomiaru stanowią 95% przedziału ufności dla zebranych danych. Oznaczenia istotności statystycznej:

a, b, c – efekty proste dla różnic między etapami rozwoju dla poszczególnych godzin zbioru

1, 2, 3 – efekty proste dla różnic między godzinami zbioru wewnątrz danego etapu rozwoju

\*, ^, # – efekty proste dla różnic między wariantami nasion (K/ABA/GA) w ramach określonej godziny zbioru i etapu rozwoju



#### **5.6.6.1. Różnice w ilości endogennego IAA w kolejnych dniach rozwoju nasion w wariantach K/ABA/GA**

Analizując różnice wewnątrz badanych dni rozwoju w godzinie zerowej dla poszczególnych wariantów nasion zaobserwowano, że po aplikacji ABA nie występują istotne statystycznie różnice pomiędzy poziomem IAA w kolejnych dniach rozwoju (Wykres 27.). W czwartej godzinie zbiorów, nasiona roślin traktowanych ABA miały istotnie niższy poziom hormonu IAA w 20 ( $p = 0,001$ ) i 30 DAA ( $p < 0,001$ ) w porównaniu do 15 DAA. Podobny efekt zaobserwowano w ósmej godzinie, gdzie poziom badanego hormonu w nasionach roślin poddawanych działaniu ABA był wyższy w początkowym etapie rozwoju (15 DAA), niż w kolejnych (20 DAA) ( $p < 0,001$ ) oraz końcowym (30 DAA) ( $p < 0,001$ ).

Nasiona roślin po podaniu GA wykazywały wyższy poziom IAA w godzinie zerowej w wariantach 20 DAA w porównaniu do 15 ( $p = 0,004$ ) i 30 DAA ( $p = 0,008$ ) (Wykres 27.). Zaobserwowano także wzrost ilości badanego fitohormonu po czterech godzinach od aplikacji GA w 15 DAA w porównaniu do analogicznej pory zbioru w kolejnych dniach rozwoju nasion: 20 ( $p = 0,040$ ) i 30 DAA ( $p = 0,003$ ). Odnotowano również, że w ósmej godzinie w nasionach roślin traktowanych GA, poziom IAA był istotnie niższy w 30 DAA w porównaniu do wcześniejszych dni rozwoju: 15 ( $p = 0,047$ ) i 20 DAA ( $p = 0,004$ ).

W nasionach roślin kontrolnych nie stwierdzono istotnych różnic między kolejnymi dniami rozwoju w czwartej godzinie zbiorów. Odnotowano natomiast istotnie niższy poziom badanego fitohormonu w godzinie zerowej wariantu 15 DAA niż w próbach 20 ( $p < 0,001$ ) i 30 DAA ( $p = 0,008$ ). Jednak w ósmej godzinie wykazano odwrotny efekt: ilość IAA w nasionach z grupy kontrolnej była wyższa w początkowych dniach ich rozwoju (15 DAA), niż w kolejnych: 20 DAA ( $p < 0,001$ ) i 30 DAA ( $p < 0,001$ ). Wyniki przedstawiono na Wykresie 27.

### **5.6.6.2. Różnice w ilości endogennego IAA w godzinach 0h/4h/8h w analizowanych wariantach**

W nasionach roślin, które były poddawane działaniu ABA w 15 DAA, w badanych godzin zbioru zaobserwowano liniowy wzrost ilości IAA ( $p < 0,01$ ) (Wykres 27.). Oznacza to, że w każdej kolejnej godzinie, w nasionach tego wariantu, wzrastał poziom endogennego kwasu indolilo-3-octowego. Podobny efekt zaobserwowano w przypadku nasion kontrolnych ( $p < 0,01$ ). Natomiast w nasionach roślin po aplikacji GA, stwierdzono istotny statystycznie wzrost ilości badanego fitohormonu jedynie między godziną zerową a czwartą ( $p = 0,010$ ).

W 20 DAA nie stwierdzono istotnych statystycznie zmian w ilości badanego hormonu w nasionach roślin traktowanych ABA oraz w nasionach kontrolnych w poszczególnych godzinach zbioru (Wykres 27.). W nasionach roślin, którym podawano GA, początkowo stwierdzono spadek ilości IAA między godziną zerową a czwartą ( $p = 0,012$ ), a następnie wzrost poziomu badanego fitohormonu do początkowej wartości w godzinie ósmej ( $p = 0,008$ ).

W ostatnim badanym dniu rozwoju (30 DAA), nie stwierdzono istotnych statystycznie zmian w ilości endogennego IAA w nasionach roślin poddawanych działaniu ABA oraz GA, porównując poszczególne godziny zbioru. Natomiast w przypadku nasion kontrolnych, potwierdzono istotny statystycznie spadek poziomu IAA w godzinie ósmej w porównaniu do godziny zerowej ( $p = 0,023$ ) oraz czwartej ( $p = 0,001$ ). Wyniki przedstawiono na Wykresie 27.

### **5.6.6.3. Różnice w ilości endogennego IAA w warunkach kontrolnych oraz pod wpływem działania hormonów**

Analiza różnic pomiędzy poszczególnymi wariantami nasion w określonych godzinach zbioru w zależności od etapu rozwoju nasion wykazała, że nie było istotnych różnic w ilości IAA po czterech godzinach od aplikacji fitohormonów w 15 DAA (Wykres 27.). Jednakże w tym samym dniu rozwoju, po ośmiu godzinach potwierdzono istotnie niższą ilość badanego fitohormonu w nasionach roślin, którym podawano GA w porównaniu do nasion roślin traktowanych ABA ( $p = 0,001$ ) oraz kontrolnych ( $p < 0,001$ ). Ponadto, istotnie wyższy poziom IAA zaobserwowano w nasionach kontrolnych w porównaniu do nasion roślin po aplikacji ABA ( $p = 0,002$ ).

W wariancie 20 DAA nie stwierdzono istotnych różnic między badanymi próbami w godzinie zerowej. W czwartej godzinie zbiorów, odnotowano wyższy poziom IAA w porównaniu do nasion roślin, którym podawano GA ( $p = 0,004$ ) oraz ABA ( $p = 0,001$ ).

W ósmej godzinie zaobserwowano jedynie wyższy poziom kwasu indolilo-3-octowego w nasionach roślin po aplikacji GA w porównaniu do nasion roślin traktowanych ABA ( $p = 0,036$ ) (Wykres 27.).

W ostatnim z badanych etapów rozwoju (30 DAA) zaobserwowano istotną różnicę pomiędzy nasionami z wariantu kontrolnego a nasionami roślin po podaniu GA ( $p = 0,017$ ) oraz ABA ( $p = 0,012$ ). Wykazano w ten sposób, że nasiona kontrolne miały wyższy poziom IAA w 30 DAA w zerowej godzinie zbiorów. Dodatkowo, potwierdzono wyższą ilość badanego fitohormonu w nasionach kontrolnych zbieranych w godzinie czwartej, niż w nasionach roślin po aplikacji GA ( $p < 0,001$ ) i ABA ( $p < 0,001$ ). Wyniki przedstawiono na Wykresie 27.

## 6. Dyskusja

Proces wypełniania nasion materiałami zapasowymi jest, przynajmniej z kilku powodów, niezwykle interesującym etapem rozwoju generatywnego. Jest to końcowe stadium wegetacji roślin okrytozalążkowych, w którym z zalążni powstaje owoc a w nim dochodzi do licznych przemian biochemicznych, molekularnych i hormonalnych, pozwalających na syntezę i gromadzenie węglowodanów, lipidów lub białek. Pierwszym z tych powodów jest oczywiście aspekt związany z zaopatrzeniem zarodka w niezbędne substancje ułatwiające mu samodzielną egzystencję. Dostępność materiałów zapasowych, regulatorów wzrostu czy niezbędnych białek enzymatycznych decyduje o skuteczności przebiegu pierwszych etapów rozwoju począwszy od kiełkowania, aż po zakończenie fazy juwenilnej siewki. Te początkowe przemiany są niezwykle ważne także z punktu widzenia trwałości gatunku i przekazania cech rodzicielskich następnym pokoleniom (Emes i in., 2003; Paula i in., 2016). Prawidłowy ich przebieg umożliwia właściwe wejście w fazę rozwoju generatywnego i wydanie kolejnego pokolenia. Drugim aspektem są mechanizmy jakie kierują tym etapem rozwoju generatywnego. Na przestrzeni kilkudziesięciu lat opisano szereg reakcji, przemian i zależności kontrolujących gromadzenie materiałów zapasowych. Jak się okazuje jest to niezwykle dynamiczny proces o bardzo charakterystycznym przebiegu, angażujący wiele genów, białek, fitohormonów czy metabolitów (Verdier i Thompson, 2008). Niezwykle interesujące jest opisanie zależności pomiędzy tymi wszystkimi czynnikami i wynikające z nich konsekwencje, takie jak wielkość nasion oraz ich wartość odżywcza. Z jednej strony ma to znaczenie czysto poznawcze i zawiera się w zakresie badań podstawowych. Z drugiej zaś, ma określone implikacje praktyczne. Z całą pewnością wartość odżywcza ma decydujące znaczenie dla zarodka i z tego też powodu cecha ta została ewolucyjnie wykształcona i utrwalona. Jednakże z punktu widzenia człowieka i jego potrzeb ma znaczenie ekonomiczne i żywieniowe. Wśród wielu roślin uprawnych, jako podstawową właściwość agronomiczną wymienia się wielkość nasion, ich masę i ostateczny plon. Cechy te zależą bezpośrednio od prawidłowego przebiegu procesu wypełniania nasion i gromadzenia w nich materiałów zapasowych (Sadras i Egli, 2008; Eichenberger i in., 2015). Sam proces wypełniania nasion, poza czynnikami endogennymi, zależny jest od całego szeregu czynników zewnętrznych. Na szczególną uwagę zasługują coraz częstsze niekorzystne zjawiska klimatyczne jakimi są susze czy nadmierna temperatura. Jak wykazały liczne badania, wpływać one mogą na wiele etapów ontogenezy, warunkując m. in. kiełkowanie, rozwój wegetatywny, dojrzewanie organów płciowych czy jakość pyłku a także sam proces zapylenia i zapłodnienia. Te same

czynnikami wpływają niekorzystnie na procesy dojrzewania i wypełniania nasion, co w konsekwencji przekłada się na jakość plonu oraz jego ilość, a także możliwości jego wykorzystania (Britz i in., 2007; Prasad i in., 2011; Muthayya i in., 2014; Sehgal i in., 2017). Mechanizmy gromadzenia materiałów zapasowych badane są już od kilku dziesięcioleci. Z każdym rokiem przybywa danych szczegółowych uzupełniających wiedzę na temat tego procesu. Wynikają one nie tylko z poszerzonej wiedzy dotyczącej funkcjonowania poszczególnych składników szlaków kontroli i efektorów, ale przede wszystkim wzajemnych zależności pomiędzy nimi (Curaba i in., 2004; Gazzarrini i in., 2004; Yamamoto i in., 2010).

Dotychczas opisano co najmniej kilkadziesiąt genów oraz kodowanych przez nie białek, wykazujących aktywność w procesach rozwoju i dojrzewania zarodka, a także gromadzenia materiałów zapasowych. Początkowo założono, że kolejne elementy działają w swoistej kaskadzie zdarzeń, prowadzącej do przemian, których skutkiem jest wykształcenie dojrzałych nasion oraz doprowadzenie ich do stanu spoczynku. Późniejsze badania uzupełniały pierwotny obraz o kolejne elementy, jak np. fitohormony ze szczególnym uwzględnieniem GA, ABA i IAA. W kolejnych latach coraz więcej doniesień wskazywało na bezpośredni związek hormonalnych regulatorów z konkretnymi białkami oraz genami. Poznawszy mechanizmy działania a także szlaki biosyntezy czy degradacji fitohormonów, możliwe stało się dokładniejsze uporządkowanie wskazanych elementów. Wykazano, co zaprezentowano już we wstępie niniejszej pracy, zależności pomiędzy ABA, FUS3 oraz GA (Curaba i in., 2004; Gazzarrini i in., 2004). Oznaczono także wpływ kwasu indolilo-3-octowego zarówno na wspomniane powyżej hormony, jak i na niektóre białka regulatorowe (Gray D. i Thomas T.H., 1982). Choć początkowo wydawało się mało prawdopodobne, że i ten fitohormon reguluje etap wypełniania nasion, to jednak zaawansowane techniki badawcze potwierdziły zależności jakich się początkowo tylko domyślano, analizując np. mutanty biosyntezy czy odpowiedzi na określone białko lub hormon. Sam postęp metodyczny i metodologiczny badań biologicznych pokazał jak wiele jest zależności i jak skomplikowane są to zależności. Jeszcze pod koniec ubiegłego wieku zakładano udział zupełnie innych form giberelin w procesach rozwoju i dojrzewania nasion. Jako gibereliny aktywne typowano związki, o których w tej chwili wiemy, że stanowią jedynie bezpośrednie prekursorzy lub inaktywowaną postać formy aktywnej. Opierając wnioski jedynie na mutantach wskazywano także na inne mechanizmy, co z czasem okazało się dość dalekie od rzeczywistości (Barendse i in., 1991; Zeevaart i in., 1991). Wyniki kolejnych badań ujawniły zaangażowanie w procesy akumulacji materiałów zapasowych także kilku grup związków, w tym np. cukrów czy innych substancji aktywnych gromadzonych w rozwijających się

nasionach. Wiele danych dotyczących współdziałania białek, hormonów, substancji sygnałowych, zapożyczano często z mechanizmów opisywanych w innych zjawiskach, takich jak np. kwitnienie czy kiełkowanie. Analizując sposoby działania hormonów, regulacji ekspresji licznych genów oraz funkcje kodowanych przez nie białek, próbowano podobne zdarzenia przypisać przemianom związanym z wykształceniem nasion, w tym także gromadzeniu materiałów zapasowych (Verdier i Thompson, 2008). Nie wszystkie z nich okazały się być właściwe, m.in. z powodu zaangażowania innych genów czy kombinacji hormonów. Zasadniczy model szlaku kontroli i regulacji gromadzenia substancji zapasowych został już opisany w podrozdziale wstępu niniejszej pracy: 1.3.2.1. „Molekularna kontrola procesu gromadzenia białek zapasowych”.

Badania opisane w niniejszej rozprawie dotyczyły wpływu ABA i GA a także warunków deficytu wody na zmiany przebiegu procesu wypełniania nasion u łubinu żółtego odmiany Taper. Rodzina *Leguminosae* liczy około 650 rodzajów i ponad 18 000 gatunków. Pod względem znaczenia rolniczego i gospodarczego ustępuje jedynie zbożom (Garcia i in., 2006). Poza możliwościami wykorzystywania gatunków uprawnych w produkcji paszy czy żywieniu człowieka, kolosalne znaczenie ma możliwość wiązania azotu atmosferycznego dzięki symbiozie z bakteriami brodawkowymi (Allen i Young, 2013; Voisin i in., 2013; Yu i in., 2014). Wiązanie azotu pozwala nie tylko ograniczyć nawożenie, ale także przyczynia się do zmniejszenia zużycia energii czy emisji gazów cieplarnianych. Chociażby z tego powodu uprawa łubinu ma znaczenie dla zmian ekologicznych czy socjologicznych, które obecnie stają się koniecznością a nie tylko modnym trendem. Proces katalizowany przez bakterie nie tylko umożliwia uprawę łubinu żółtego w glebach bardzo słabej jakości, ale znacząco przyczynia się do poprawy ich właściwości np. poprzez poprawę retencji wody, zaopatrzenie w składniki pokarmowe czy pozostawienie dużej ilości materii organicznej (Atif i in., 2013; Voisin i in., 2013; Branca i in., 2013). Badania prowadzone na ryżu oraz dwóch gatunkach roślin bobowatych, bobie (*Vicia faba* L.) i wyce (*Astragalus sinicus* L.) wykazały, że w płodozmianie poprawiają one zarówno gospodarkę azotową, zmniejszając ilość stosowanych nawozów a ponadto bardzo korzystnie wpływają na mikroflorę strefy korzeniowej oraz pobieranie wody i składników odżywczych (Gianinazzi-Pearson, 1996; Branca i in., 2013; Yu i in., 2014). Stopień zagospodarowania obszarów uprawnych w Polsce roślinami o wymienionych właściwościach jest wciąż niewystarczający. Coraz częściej też sięga się po uprawę soi zamiast korzystać z dobrodziejstw rodzimych gatunków. Mimo niedoskonałości, łubin żółty w dalszym ciągu powinien być traktowany jako roślina o dużym potencjale i wskazane jest, aby ponownie wprowadzony został do regularnego stosowania

w rolnictwie. Znaczenie tego gatunku w bardzo dużym stopniu ogranicza zasięg i wrażliwość na warunki środowiskowe. Dlatego też, tak w badaniach podstawowych, jak i praktyce rolniczej został on zastąpiony i wyparty przez soję, łubin wąskolistny, lucernę czy groch. Ilość danych badawczych zgromadzonych dla wspomnianych gatunków strączkowych jest nieporównywalnie większa z tymi dotyczącymi łubinu żółtego. Niemniej, w świetle wyników prezentowanych w niniejszej pracy wydają się one być równie ciekawe.

Do przygotowania i zebrania prezentowanych wyników wykorzystano kilka nowoczesnych technik biologii molekularnej pozwalających identyfikować funkcjonujące w komórkach roślin kwasy nukleinowe, białka czy hormony (RNA-Seq, RT-qPCR, nanoLC-MS/MS, LC-MS/MS).

### **6.1. Identyfikacja homologów genów związanych z rozwojem nasion i gromadzeniem materiałów zapasowych**

Z wykorzystaniem wysokoprzepustowego sekwencjonowania (NGS), bibliotek cDNA utworzonych na matrycach występujących w komórkach łubinu żółtego cząsteczek mRNA, zidentyfikowano transkrypty oraz oznaczono ekspresję wielu genów aktywnych w nasionach *L. luteus* w 10, 20 oraz 30 dniu po wykształceniu kwiatów (GSE207091). Przeprowadzone eksperymenty potwierdziły występowanie niemal identycznych genów opisanych wcześniej u innych gatunków bobowatych (Foley i in., 2011, 2015; Jones i Vodkin, 2013; Chen i in., 2021). Szczegółowej analizie poddano sekwencje kodujące genów zaangażowanych w mechanizmy regulatorowe związane z wypełnianiem nasion oraz genów kodujących białka zapasowe występujące w łubinach. Zidentyfikowano transkrypty, niemal wszystkich kluczowych elementów, funkcjonujące w ogólnym schemacie kontroli gromadzenia materiałów zapasowych opisanych u innych gatunków roślin. Wyselekcjonowano takie geny jak *LIPKL*, *LILEC2*, *LIABI3*, *LIFUS3*, *LIVAL1*, *LIBETA*, *LIDELTA2*. Wszystkie one znajdują swoje odpowiedniki a największy stopień homologii dla każdego z nich wykazano wobec genów zidentyfikowanych u łubinu wąskolistnego. Jest to gatunek najbardziej zbliżony siedliskowo oraz najbliżej spokrewniony, stąd obserwowane podobieństwa są największe (Foley i in., 2011). Dla wspomnianych powyżej genów stopień homologii wynosił około 95%. Nieznacznie niższe podobieństwo uzyskiwano dla *Medicago truncatula* L., *Phaseolus* L. czy *Vicia* L., w każdym przypadku sięgało ono jednak około 90%. W analizowanych transkryptomach nie opisano *LECI* i  $\gamma$ -konglutyny oraz nie wykazano obecności dwóch form  $\beta$ -konglutyny zidentyfikowanych u *L. anfastifolius*. Występowanie

w postaci cząsteczek ekspresyjnych większości genów, związanych z mechanizmami regulacji oraz samym procesem gromadzenia białek zapasowych, wskazuje jednoznacznie na uniwersalność tych przemian także u łubinu żółtego. Niewielkie różnice mogą wynikać ze specyficzności gatunku, a także z nieco odmiennego schematu końcowej struktury białek zapasowych akumulowanych w nasionach. Jest to jednak raczej pochodną samej ekspresji czy wzorca ekspresji jaki zidentyfikowano w badanych transkryptomach.

## **6.2. Analiza ekspresji wybranych genów związanych z rozwojem nasion i gromadzeniem materiałów zapasowych**

### **6.2.1. *LIPKL (LIPICKLE)***

Porównanie zmian ilościowych w przypadku genu *LIPKL* wykazało wyraźny i systematyczny spadek ekspresji w kolejnych dniach wzrostu nasion (Wykres 1.). Zestawienie danych pomiędzy 10 a 20 DAA oraz 10 i 30 DAA wykazało ograniczenie transkrypcji tego genu. Wykazuje on wysoką aktywność we wczesnych etapach rozwoju nasion, po czym następuje wyraźny spadek, by pod koniec wypełniania nasion ponownie rosnąć (Verdier i Thompson, 2008). Spadek ekspresji badanego genu w nasionach najmłodszych w porównaniu z nasionami zbieranymi w 20 dniu po wykształceniu kwiatów obserwowano także w badaniach przeprowadzonych techniką RT-qPCR (Wykres 8.). Jednak w tym przypadku, w nasionach roślin najstarszych (30 DAA) zaobserwowano wzrost ekspresji badanego genu w porównaniu do poziomu z 15 dnia. Różnica ta wynika prawdopodobnie ze zmienności warunków uprawy, jakie miały miejsce w kolejnych latach, kiedy zbierano materiał do doświadczeń RNA-seq oraz analiz przeprowadzanych techniką ilościowego PCR. Przyczyną takiego stanu rzeczy mogą być wzajemne zależności pomiędzy aktywnością opisywanego genu a aplikowaną gibereliną. Wydaje się, że obydwa czynniki współdziałają ze sobą bezpośrednio w kontroli licznych przemian fizjologicznych. Już ponad 20 lat temu obserwowano zależności pomiędzy mutacją w genie *PICKLE* i efektami stosowania egzogennych GA (Ogas i in., 1997; Park i in., 2017). Wiadomo z licznych doniesień, że synteza i aktywność giberelin w bezpośredni sposób zależy zarówno od warunków fotoperiodycznych, jak i temperaturowych czy wilgotności. Dlatego też, proste przyrównanie wyników z kolejnych lat badań nie może być przeprowadzone. Bardziej jednoznaczne z całą pewnością byłyby badania w układzie upraw w warunkach sztucznych, jednakże nie pokazałyby one tego, co można zaobserwować w wynikach prezentowanych w niniejszej pracy, dzięki uprawom polowym. Wyniki uzyskane w latach 2018 – 20 mogą



wskazywać, że panujące wówczas warunki atmosferyczne przyczyniły się do wcześniejszego zakończenia fazy wypełniania nasion oraz wejścia w etap desykcji, który to charakteryzuje się ponownym wzrostem ilości białka PKL (Verdier i Thompson, 2008). Może być to bardzo cenna informacja, zwłaszcza w kontekście zastosowań praktycznych. Wynika to wprost z funkcji, jakie pełni PICKLE w procesie aktywacji i inaktywacji genów bezpośrednio zaangażowanych w kontrolę gromadzenia substancji zapasowych. Jest to białko odpowiedzialne za remodelowanie chromatyny i poprzez takie działanie, spadek jego ilości w komórkach uwalnia ekspresję genów regulatorowych, takich jak *LEC1* czy *LEC2*, które inicjują kolejne przemiany (Zhang i in., 2012). Taki wzorzec ekspresji genu kodującego czynnik należący do rodziny białek CHD3 oraz zachowawczość ewolucyjna wynika najprawdopodobniej ze znaczenia, jakie *PIKLE* odgrywa w kontrolowaniu wielu przemian i odpowiedzi na warunki środowiskowe, w tym rozwój embrionalny, aktywność merystemów korzeniowych, fotomorfogeneza i termomorfogeneza. Wykazano, że poza gromadzeniem materiałów zapasowych, kontroluje on także takie procesy jak spoczynek nasion, elongację hypokotyli, tworzenie korzeni bocznych czy promowanie kwitnienia (Jing i Lin, 2013; Jing i in., 2019; Zha i in., 2020; Ötvös i in., 2021). Rola, jaką pełni omawiany czynnik remodelujący chromatynę jest nadrzędna wobec całego szeregu genów odpowiedzialnych za kluczowe w ontogenezie zmiany. Wobec tego spodziewane jest, że także w procesie wypełniania nasion łubinu żółtego, gen ten będzie przybierać podobny wzorzec ekspresji i będzie pełnić podobne funkcje. Homolog *PICKLE* został po raz pierwszy zidentyfikowany u łubinu żółtego, podobnie jak pozostałe opisane w niniejszej pracy geny, za wyjątkiem konglutyn.

### **6.2.2. *LILEC2 (LILEAFY COTYLEDON2)* oraz *LIFUS3 (LIFUSCA3)***

Kiedy spada aktywność genu *PKL*, wówczas dochodzi do aktywacji genów regulatorowych grupy *LAFL* działających w swoistej pętli sprzężeń, prowadzących do kontroli rozwoju nasion (Stone i in. 2001). Należą do niej zidentyfikowane *LILEC2* oraz *LIFUS3*. W doświadczeniach RNA-seq wykazano, że ekspresja *LILEC2* zmienia się pomiędzy poszczególnymi wariantami badawczymi (Wykres 2.). W najmłodszych nasionach, 10 dni po wykształceniu kwiatu, ilość jego transkryptu była niemal niewykrywalna by w 20 dniu osiągnąć najwyższy poziom i ponownie zmniejszyć się, blisko 100-krotnie w nasionach z 30 DAA. Nieco inny przebieg obserwowany był w kolejnych doświadczeniach z wykorzystaniem techniki ilościowego PCR. Wyniki zaprezentowane na Wykresie 9.

pokazują systematyczny spadek ilości *LILEC2* do poziomu niemal niewykrywalnego w nasionach zbieranych 30 dnia. Różnice te wynikać mogą ze wspomnianych zmian warunków środowiskowych upraw polowych w latach 2018 – 2020 i nieco innego wzorca ekspresji genu *PKL*. Z danych literaturowych wynika, że mutacja w genie *pk1* powoduje wzrost ekspresji m.in. genu *LEC2* (Dean Rider i in., 2003). Brak jest jednak danych dotyczących aktywności tego ostatniego u łubinów. Na podstawie dostępnej literatury, spodziewać by się można, że wysoki poziom ekspresji genu *LIPKL* będzie powodował zahamowanie ekspresji *LILEC2*. Taki rezultat uzyskano w nasionach zbieranych w 10 DAA. W tym czasie, najwyższy poziom ekspresji genu kodującego białko remodelujące chromatynę przekładał się na niemal zerową aktywność transkrypcyjną zależnego od niego genu *LILEC2*. Wydaje się jednak, że w kolejnych dniach zależności te odbiegają nieco od teorii. Co prawda spadek ekspresji *LIPKL* w 20 dniu powoduje wzrost ekspresji *LILEC2*, jednakże dalsze obniżanie ilości transkryptu *LIPKL* powoduje ograniczenie syntezy mRNA *LILEC2* w 30 dniu. Zależności te trudno wyjaśnić dla łubinów, jednakże z danych literaturowych wynika, że w pewnych specyficznych warunkach lub u niektórych mutantów, wzajemne zależności pomiędzy wspomnianymi czynnikami są bardziej skomplikowane (Lepiniec i in., 2018). Od początku prowadzenia analiz transkryptomów opisywanych w niniejszej pracy, zastanawiającym był brak homologa genu *LEC1* w bibliotekach cDNA uzyskanych z nasion łubinu żółtego. Okazuje się, że dysfunkcja genu *DCLI*, kodującego enzym zaangażowany w dojrzewanie miRNA, u *A. thaliana* powoduje zahamowanie ekspresji *LEC1*, a w zamian za to podwyższona jest ilość transkryptów m.in. *LEC2* czy *FUS3* (Nodine i Bartel, 2010; Willmann i in., 2011). W prezentowanych wynikach obserwowano także bardzo podobny do *LILEC2* wzorec ekspresji homologa *FUS3* (Wykres 4.). Oczywiście nie oznacza to bezpośrednio, że badana odmiana łubinu wykazuje jakiś uszczerbek w biogenezie małych regulatorowych RNA. Może to jednak wskazywać, że zmieniające się warunki środowiskowe także wpływają na funkcjonowanie szlaków zależnych od działania tego rodzaju kwasu nukleinowego. Innymi czynnikami mogącymi modulować poziom aktywności genów *LILEC2* czy *LIFUS3* mogą być hormony. W przypadku obu genów kluczowe wydają się być auksyny, które promują ich ekspresję. Nie bez znaczenia pozostają jednak pozostałe hormony w tym ABA i GA (Finkelstein i Gibson, 2002; Gazzarrini i in., 2004; Slater i in., 2013). Kontrola ekspresji genów syntezy i degradacji GA przez *FUS3* wpływa na homeostazę hormonalną, co może przekładać się na wzorec ekspresji *LEC2* i *FUS3*. Należy pamiętać, że wszystkie wspomniane powyżej geny i hormony działają w swoistych pozytywnych i negatywnych pętlach sprzężeń zwrotnych. Można w związku z tym przypuszczać, że spadek ekspresji

*LIPKL* w 30 dniu (Wykres 1.) oraz obserwowany spadek ekspresji *LILEC2* (Wykres 2.) i *LIFUS3* (Wykres 4.) może wynikać z innych przyczyn niż bezpośrednie zależności pomiędzy nimi. Być może przyczynami relatywnie krótkotrwałego wzrostu ekspresji homologów *LEC2* i *FUS3* mogą być: brak aktywności *LEC1* u łubinu żółtego, zmiany w gospodarce hormonalnej lub zmiany aktywności metabolizmu miRNA u badanej odmiany.

Odmienne wyniki uzyskano w przypadku doświadczeń prowadzonych techniką RT-qPCR. Wzorce ekspresji *LILEC2* (Wykres 9.) oraz *LIFUS3* (Wykres 11.) były przeciwstawne i nie odpowiadały wprost aktywności transkrypcyjnej *LIPKL* (Wykres 8.). Brak jest danych porównawczych, mogących posłużyć jako odniesienie obserwowanych tendencji. Należy jednak założyć, co opisano powyżej, że badane zależności i wzorce ekspresji podlegają dużo większemu stopniowi komplikacji. Ustalona u innych gatunków chronologia zmian ekspresji *PKL*, *LEC2* i *FUS3* ma oczywiście olbrzymie znaczenie także w przypadku zmian ekspresji ich homologów u łubinu żółtego.

Należy jednak wziąć pod uwagę także możliwość istnienia czynników lub zależności dodatkowych, dotychczas nieopisanych. Z taką sytuacją mieliśmy już do czynienia w badaniach opisujących funkcje IAA czy cukrów (sacharoza) w procesie dojrzewania nasion i gromadzenia materiałów zapasowych u innych gatunków roślin. Dopiero zmiana podejścia oraz zastosowanie nowych technik pozwoliło odkryć odmienne mechanizmy kontrolne czy zaangażowanie dodatkowych elementów. W wynikach badań publikowanych w ostatnich latach widać coraz więcej takich składowych (Horstman i in., 2017; Liu i in., 2021).

### **6.2.3. *LIAB13 (LIABA INSENSITIV3)***

Innym elementem sieci zależności i kontroli gromadzenia materiałów zapasowych w nasionach łubinu żółtego jest *LIAB13* należący do rodziny czynników transkrypcyjnych B3. Szczegółowe badania prowadzone nad mechanizmami dojrzewania nasion wykazują, że pełni on swoistą i bardzo charakterystyczną funkcję (Santos-Mendoza i in., 2008). *ABI3* ulega ekspresji na późniejszych etapach rozwoju nasion. Efekty jego działania są znacząco odmienne od tych obserwowanych w wyniku aktywności *LEC1*, *LEC2* czy *FUS3*, niezbędnych na wcześniejszych etapach rozwoju (Lopez-Molina i in., 2002; Finkelstein i in., 2008; Jia i in., 2014). Różnice dotyczą także przestrzennego rozkładu ekspresji genów należących do sieci *LAF1*. Spośród wspomnianych genów jedynie *ABI3* ulega ekspresji w całym zarodku a kodowane przez niego białko, jako jedyne wyposażone jest we wszystkie cztery, charakterystyczne dla tego rodzaju czynników transkrypcyjnych, motywy

regulatorowe i wiążące DNA (Giraudat i in., 1992; To i in., 2006; Santos-Mendoza i in., 2008). Dzięki temu, może on funkcjonować w zmiennych układach i współdziałać z innymi białkami w kontroli ekspresji genów należących do odmiennych rodzin. Coraz częściej pojawiają się informacje o występowaniu różnych wariantów transkrypcyjnych tego genu, np. u grochu siewnego czy pomidora (Gagete i in., 2009; Gao i in., 2013). Badania przeprowadzone na lucernie wykazały, że każda z trzech form transkrypcyjnych różni się od siebie strukturalnie. W zależności od składu kompleksu białkowego, taka kompozycja może wykazywać odmienny sposób działania a przez to kontrolować ekspresję różnych genów (Lalanne i in., 2021). Potwierdzono także, że to właśnie czynnik transkrypcyjny ABI3 ma największy udział w kontroli gromadzenia białek zapasowych. Przeprowadzone badania wskazały, że u *Arabidopsis* aktywność FUS3 ważniejsza jest dla procesu gromadzenia lipidów (Roscoe i in., 2015). Nie oznacza to, że ABI3 jest samodzielnym aktywatorem genów kodujących białka zapasowe, ponieważ jest on pozytywnie kontrolowany zarówno przez LEC2, jak i FUS3. Dodatkowo komplikację w zrozumieniu zależności pomiędzy ABI3 i innymi regulatorami wypełniania nasion wprowadzają wyniki badań struktury elementów regulatorowych. Analiza zidentyfikowanych sekwencji promotorów genów kodujących białka zapasowe u roślin z różnych grup systematycznych wykazała, że poza powszechnie spotykanymi, podobnymi do RY i do ACGT, występują także elementy typu *cis* unikatowe i charakterystyczne tylko dla *Fabaceae* (motyw E2Fb) (Fauteux i Strömvik, 2009). Pokazuje to, jak skomplikowane i trudne do zinterpretowania mogą być zależności oraz jak kłopotliwe, bez pełni wiedzy, może być wnioskowanie o funkcji homologa *ABI3* w konkretnych zdarzeniach w rozwoju nasion.

W badaniach opisanych w niniejszej pracy, obserwowana w nasionach łubinu żółtego ekspresja *LIABI3* wykazywała taką samą tendencję zarówno w wynikach uzyskanych w doświadczeniu RNA-seq (Wykres 3.), jak i ilościowych reakcjach PCR (Wykres 10.). W otrzymanych wynikach obserwowano stopniowy i systematyczny wzrost aktywności transkrypcyjnej badanego genu w kolejnych fazach wzrostu nasion. Porównując otrzymane wyniki ekspresji tego genu do aktywności transkrypcyjnej genów należących do *LILAFL*, opisanych powyżej u łubinu żółtego odmiany Taper, można zauważyć wyraźne przesunięcie w czasie (Wykres 3.). Taki schemat potwierdza udział *LIABI3* w procesach związanych z wypełnianiem nasion na końcowych etapach ich rozwoju po aktywacji przez wcześniejsze elementy takie, jak *LILEC2* czy *LIFUS3*. Ta wzmożona aktywność ma także swoje znaczenie z powodów innych przemian, jakie mogą być kontrolowane przez *LIABI3*. Należą do nich niewątpliwie ustanowienie tolerancji na odwodnienie i trwałość nasion.

#### 6.2.4. *LIVAL1 (LIVP1/ABI3-like)*

Strukturalnie podobnym do opisywanej powyżej rodziny czynników transkrypcyjnych AFL-B3, jest *LIVAL1*. Jednakże *VAL1* wraz z innymi białkami *VAL* tworzy odmienną funkcjonalnie rodzinę *VAL-B3* (Suzuki i in., 2007). Rolą tych białek jest hamowanie ekspresji genów należących do centralnych regulatorów wypełniania nasion. *VAL1* jest odpowiedzialny za stymulację procesów związanych z remodelowaniem chromatyny. Kluczowa jest w tym przypadku trimetylacja lizyny 27 histonu H3. Wyniki badań przeprowadzonych na *A. thaliana* wskazują, że kompleksy katalizujące bezpośrednio taką reakcję rekrutowane są do chromatyny w określonych miejscach, właśnie dzięki aktywności białek należących do *VAL-B3* (Yuan i in., 2021). Zarówno doświadczenia RNA-seq, jak i analizy z wykorzystaniem ilościowej reakcji PCR potwierdziły najwyższy stopień akumulacji mRNA genu *LIVAL1* w nasionach łubinu żółtego zbieranych po 30 dniach po wykształceniu kwiatów (Wykres 5. i 12.). Zestawienie wyników ekspresji *LILEC2* (Wykres 2. i 9.), *LIFUS3* (Wykres 4. i 11.) oraz *LIPKL* (Wykres 1. i 8.) pozwala przypuszczać, że to właśnie na tym etapie rozpoczyna się właściwa faza desykcji i nabywania odporności na suszę oraz determinowanie długowieczności nasion.

Podobieństwo strukturalne czynników transkrypcyjnych AFL-B3 do *VAL-B3* może mieć także inne znaczenie (Luerßen i in., 1998; Stone i in., 2001; Jia i in., 2014; Carbonero i in., 2017). Filogenetycznie *ABI3* i *VAL1* są starsze ewolucyjnie niż *LEC2* i *FUS3*. Wiążą się do tych samych elementów regulatorowych typu *cis*, ale powodują odmienne odpowiedzi. *LEC2* i *FUS3* odpowiadają za inicjację transkrypcji genów związanych z dojrzewaniem nasion, w tym za proces akumulacji materiałów zapasowych (Han i in., 2017). *ABI3* jest swoistym łącznikiem pomiędzy układem hormonalnym a eksprymowanymi wcześniej genami *L AFL*. Zapewnia to jego odmienna struktura i możliwość oddziaływania z większą ilością białek. *VAL1* to białko wiążące element RY, inicjujące remodelowanie chromatyny i blokujące możliwości transkrypcji genów *LEC2*, *ABI3* i *FUS3*. Nie ma jednoznacznych dowodów na bezpośrednie oddziaływanie i współdziałanie w tych przemianach *VAL1* i *PKL* u łubinów. W przypadku *A. thaliana* mutacje zestawu genów *val* (1, 2, 3) oraz genu *pk1* wywołują bardzo często identyczne cechy fenotypowe. Wskazuje to, że *VAL1* pełni podobną funkcję w kontroli analogicznych zdarzeń w tej samej lub w kolejnych fazach rozwoju nasion. Może to także sugerować, że dla pełnej kontroli stanu fizjologicznego, konieczne jest współdziałanie tych dwóch elementów (Suzuki i in. 2007). Porównanie wzorców ekspresji *LIVAL1* (Wykres 5. i 12.), *LIPKL* (Wykres 1. i 8.) oraz genów *LILAFL*

(Wykresy: 2., 3., 4. oraz 9., 10., 11.) potwierdza, że *LIVALI* bierze udział w procesach hamujących ekspresję genów kontrolujących akumulację białek.

### 6.2.5. Geny kodujące konglutyny

Zwieńczeniem omawianych w niniejszej pracy przemian jest zgromadzenie w nasionach odpowiedniej ilości białek zapasowych. W pierwszej kolejności dochodzi do wzrostu ekspresji genów kodujących białka zapasowe. Niewiele jest jednak danych literaturowych dotyczących zmian ekspresji genów konglutyn u łubinu żółtego. Większość badań wykonanych została na łubinie wąskolistnym i białym. U *L. angustifolius* zidentyfikowano 16 genów kodujących cztery podstawowe klasy konglutyn, natomiast z danych dostępnych w bankach genów wynika, że u *L. albus* takich genów jest dziewięć (Foley i in., 2011). Wykonane analizy sekwencjonowania bibliotek cDNA z nasion łubinu żółtego, prezentowane w niniejszej pracy, wykazały istnienie pięciu genów kodujących konglutyny klasy  $\beta$  oraz jednego kodującego  $\delta$ -konglutynę. Nie do końca można jednak przyrównać te wyniki z badaniami prowadzonymi na innych gatunkach łubinu, w których zidentyfikowano białka zapasowe gromadzone w nasionach roślin uprawianych w warunkach sztucznych (Foley i in., 2011). Wzorce ekspresji genów *LIBETA* i *LIDELTA2* wskazują na najwyższą ich aktywność w nasionach najstarszych (Wykres 6. i 7.). W wariancie 30 DAA, ilość mRNA wszystkich zidentyfikowanych konglutyn była wielokrotnie wyższa niż w pozostałych wariantach. W przeprowadzonych doświadczeniach RNA-seq wykazano, że wcześniejszej aktywacji, w porównaniu do *LIDELTA2*, ulegają geny *LIBETA*. Ich niewielki wzrost ekspresji obserwowano w nasionach zbieranych w 20 dniu (Wykres 6.), podczas gdy niewidoczna była jeszcze aktywność genów kodujących  $\delta$ -konglutyny (Wykres 7.). W kolejnych latach, przy zastosowaniu techniki RT-qPCR obserwowano u łubinu żółtego wzrost aktywności transkrypcyjnej obu zidentyfikowanych genów w tym samym wariancie (Wykres 13. i 14.). Najwyższa ilość mRNA genów oznaczanych zarówno techniką RNA-seq, jak i RT-qPCR obserwowana była w nasionach najstarszych (30 DAA). Co ciekawe, u łubinu żółtego większą część białek zapasowych stanowią  $\delta$ -konglutyny. Stosując technikę ilościowego PCR wykazano, że ten podwyższony poziom występuje już w nasionach 20 DAA. Podobną obserwację poczyniono w badaniach Foley i in. 2015, w których wykazano, że nasiona łubinu żółtego, zbierane 20 – 26 dni po wykształceniu kwiatów, charakteryzują się wyższym poziomem ekspresji genów konglutyn klasy  $\delta$  niż  $\beta$ . U innych gatunków łubinów zależności te są odmienne i dla przykładu u łubinu wąskolistnego czy *L.*

*mutabilis*, przeważa klasa  $\beta$  (Foley i in., 2015). Podsumowując, można stwierdzić, że ogólny wzorzec ekspresji genów kodujących białka zapasowe uzyskany dla nasion łubinu żółtego odmiany Taper jest zgodny z danymi literaturowymi, wskazującymi na stopniowy wzrost ilości białek zapasowych i najwyższy ich poziom w nasionach najstarszych.

Potwierdzeniem danych transkryptomicznych oraz uzyskanych techniką ilościowego PCR były doświadczenia z zastosowaniem rozdziału chromatograficznego peptydów identyfikowanych jako konglutyny. W doświadczeniach tych, potwierdzono najwyższy stopień akumulacji białek zapasowych w najstarszych nasionach (Wykres 19.). Szczegółowa analiza potwierdziła także większy udział formy  $\delta$  w łącznej puli białek zapasowych (Wykres 21.). Do oznaczeń poziomu akumulacji białek zapasowych w nasionach łubinu żółtego odmiany Taper zastosowano techniki nanoLC-MS/MS. Tego rodzaju analizy chromatograficzne nie były jak dotąd wykonywane dla białek zapasowych łubinu żółtego. Dzięki zastosowaniu różnych technik analitycznych, uzyskane wyniki stają się bardziej wiarygodne.

### **6.3. Rola GA i ABA w kontroli procesów wypełniania nasion**

Z badań prowadzonych na przestrzeni ostatnich kilku dziesięcioleci wynika, że w kontroli procesów wypełniania nasion, poza swoistymi białkami regulatorowymi, takimi jak LAF1 oraz PKL czy VAL1, niezwykle istotny jest także udział fitohormonów. Najważniejszą rolę przypisuje się wzajemnym zależnościom pomiędzy GA i ABA. Jednakże, jak wykazały liczne badania, zwłaszcza ABA może współdziałać również z etylenem, kwasem jasmonowym czy brasinosteroidami (Finkelstein i in., 2008; Wilson i in., 2014; Wang i in., 2020; Ali i in., 2022). U wielu gatunków roślin wykazano, że fitohormony wpływają na ekspresję genów związanych z regulacją procesu gromadzenia białek zapasowych, dotyczy to zwłaszcza *FUS3* i *ABI3* (DeLisle i Crouch, 1989). Jednak ostatnie badania pokazały, że także białka regulatorowe LAF1 mogą przyczyniać się do wzrostu lub spadku ekspresji genów związanych z biosyntezą lub degradacją fitohormonów (Holdsworth i in., 2008). Wykazano m.in. istnienie pozytywnej korelacji pomiędzy aktywnością *FUS3* i poziomem ABA oraz negatywnej pomiędzy aktywnością *FUS3* i poziomem GA (Gazzarrini i in., 2004). Wymienione hormony działają przeciwstawnie podczas dojrzewania nasion. Może wynikać to z faktu synergistycznego działania GA oraz PKL w hamowaniu aktywności genów regulatorowych i pozytywnych korelacji pomiędzy tymi właśnie czynnikami, a obecnością ABA (Henderson i in., 2004). Wykazano, że jedynie

w obecności ABA możliwa jest aktywacja genów *LAF1*. Dochodzi do tego w wyniku hamowania aktywności fosfatazy PP2C i odblokowania m.in. takich czynników transkrypcyjnych, jak ABI3, dzięki ich fosforylacji (Ali i in., 2022).

### 6.3.1. Wpływ GA<sub>3</sub> na ekspresję zidentyfikowanych genów

W prezentowanych badaniach, łubin żółty odmiany Taper poddawano działaniu GA<sub>3</sub> i ABA na początkowych etapach rozwoju nasion. Aplikacja fitohormonów w żadnym z wariantów nie zmieniła w sposób diametralny wzorca ekspresji badanych genów obserwowanego w wariacie kontrolnym. Tym nie mniej, odnotowano kilka charakterystycznych zmian poziomów aktywności transkrypcyjnej. Na uwagę zasługuje np. pozytywny wpływ GA na ilość mRNA genu *LIPKL*. Szczególnie wyraźne zmiany zaobserwowano w nasionach zbieranych w czwartej i ósmej godzinie od rozpoczęcia zbioru prób, zwłaszcza w 15 i 20 DAA (Wykres 8.). Wzrost ekspresji *LIPKL* po aplikacji GA<sub>3</sub> może wynikać również z faktu regulacji ekspresji genów biosyntezy i szlaków transdukcji sygnału zależnych od GA przez warunki świetlne i termiczne (Cagnola i in., 2018; Park i in., 2020). W nasionach roślin najstarszych (30 DAA) zależności te nie są już tak klarowne, co może być skutkiem zakończenia procesu wypełniania nasion i koniecznością ograniczenia działania GA przed wejściem nasion w stan spoczynku (Kozaki i Aoyanagi, 2022). Jak już wspomniano, wcześniejsze doniesienia wskazywały także na podobne efekty działania PKL oraz giberelin w kontekście wypełniania i regulacji rozwoju nasion. Uzyskane wyniki mogą potwierdzać także u łubinu żółtego, swoisty, równoległy wpływ GA na te przemiany, jednakże wymagają one dalszych analiz.

W przypadku genu *LIABI3* najczęściej obserwowanym efektem podania GA<sub>3</sub> był wzrost aktywności transkrypcyjnej (Wykres 10.). Z danych literaturowych wynika, że zarówno LEC2, jak i ABI3 czy FUS3 są zaangażowane w hamowanie ekspresji genów związanych z biosyntezą GA (Curaba i in., 2004; Gazzarrini i in., 2004). Podanie dodatkowej puli GA<sub>3</sub> może wpływać niekorzystnie na całość przemian zachodzących w nasionach. Może również skutkować wzmożoną ekspresją genów kodujących czynniki hamujące sam proces biosyntezy fitohormonu. Taki mechanizm opisano dla ABI3. Jednak w przypadku FUS3 wydaje się, że jego istotą jest stabilizowanie tego białka w obecności ABA (Gazzarrini i in., 2004). Jak wykazały najnowsze badania, podobny mechanizm stabilizowania białka przez hormon, a w zasadzie hamowania inaktywacji, opisano także dla ABI3 (Ali i in., 2022). Wzorce ekspresji oznaczone dla genu *LIVAL1* wykazują jedynie w nielicznych przypadkach



wzrost ekspresji tego genu pod wpływem GA. W literaturze brak jest danych opisujących działanie *VAL1* czy GA poprzez wspólne mechanizmy lub na podobnych etapach rozwoju nasion. Dlatego też, nie można w sposób jednoznaczny wskazać przyczyny obserwowanych zmian. Znanym jest jednak fakt szerokiego udziału giberelin w regulacji procesów wzrostu i rozwoju. Wykazano także, że gibereliny są związane pośrednio z regulacją procesów remodelowania chromatyny za pośrednictwem grupy receptorów wrażliwych na ten hormon oraz białek DELLA, których stabilność kontrolują (Sarnowska i in., 2016).

Podobnie funkcjonalnie do GA są brasinosteroidy. Prowadzone na *A. thaliana* doświadczenia wykazały, że ten stymulator wzrostu komórkowego działa antagonistycznie w stosunku do ABA, promując kiełkowanie nasion (Xue i in., 2009; Kim i in., 2019). Aktywowane przez brasinosteroidy czynniki transkrypcyjne BZR1/BES1 indukują ekspresję genów biosyntezy giberelin (Unterholzner i in., 2015), co najważniejsze jednak, efekt działania BR jest synergistyczny z tym wywoływanym aktywnością *VAL1*. To zaś powoduje zahamowanie przemian związanych z dojrzewaniem nasion i zainicjowanie stanu spoczynku (Ruan i in., 2021). Co prawda, nie jest to bezpośredni dowód na współdziałanie GA w promowaniu *LIVAL1* w określonych warunkach, to jednak istnieje taka możliwość i wyniki poczynionych obserwacji należy poważnie wziąć pod uwagę, rozpatrując całość przemian związanych z rozwojem nasion łubinu żółtego.

Aplikacja  $GA_3$  nie spowodowała stymulacji ekspresji genów kodujących konglutynę, zwłaszcza na wcześniejszych etapach rozwoju nasion. W większości badanych wariantów łubinu żółtego odmiany Taper, podanie GA wiązało się ze zmniejszeniem ekspresji genów konglutyn. Jedyny pozytywny efekt obserwowano w przypadku nasion najstarszych. W godzinie czwartej odnotowywano wyraźnie wyższy poziom ilości mRNA obu konglutyn a w godzinie zerowej, zidentyfikowano wyższą ekspresję konglutyn klasy  $\beta$  (Wykres 13. i 14.). Bez dokładniejszych badań oraz doświadczeń wykonanych w kontrolowanych warunkach bardzo trudno jest jednak odpowiedzieć na pytanie czy faktycznie obserwowany wzrost ilości konglutyn jest skutkiem podania giberelin. Dane literaturowe, które przytaczano już powyżej (Ruan i in., 2021; Unterholzner i in., 2015; Verdier i Thompson, 2008; Foley i in., 2015) wskazują, że w znakomitej większości przypadków giberelina wpływa negatywnie na funkcjonowanie sieci genów kontrolujących wypełniania nasion, co pośrednio prowadzi do gromadzenia mniejszych ilości białek zapasowych. Negatywny efekt działania egzogennie podawanych GA obserwowano także w doświadczeniach prowadzonych na rzepaku (Huang i in., 2014). W doświadczeniach tych, co prawda, wzrastała sucha masa nasion, zawartość cukrów czy zawartość białek w nasionach

najstarszych, ale spadała jednak masa tysiąca nasion, czy najważniejsza z punktu widzenia wykorzystania tego gatunku, zawartość tłuszczów. W tych samych doświadczeniach wykazano także negatywne działanie giberelin na ekspresję *ABI3* czy *LEC2*, co potwierdza sposób działania tego hormonu w procesie wypełniania nasion. W doświadczeniach przeprowadzonych na łubinie żółtym, których wyniki zaprezentowano w niniejszej pracy, obserwowany wzrost ekspresji genów kodujących konglutyny w określonych wariantach może wynikać także z zależności, jakim podlegają inicjacja ostatnich etapów rozwoju nasion oraz wzajemne zależności pomiędzy hormonami, tak jak opisano to dla innych gatunków roślin.

Nie od dziś wiadomo, że fitohormony działają w układach sprzężeń zwrotnych, często o charakterze negatywnym. Dodatkowymi czynnikami koordynującymi te zależności są fotoperiod lub jednocześnie jakość i ilość światła. Wiadomo, że biosynteza giberelin w dużej mierze zależy od długości dnia i funkcjonowania szlaku fotoperiodycznego. Jednakże z drugiej strony wykazano, że aktywność *GIGANTEA*, jednego z kluczowych genów w kontroli zegara okołodobowego, jest czynnikiem negatywnie wpływającym na przekazywanie sygnałów zależnych od gibereliny. Wywołane jest to poprzez bezpośrednie współdziałanie tego białka z inhibitorami działania GA – białkami DELLA (Park i in., 2020).

Należy także rozważyć kwestię czy wcześniejsze zmiany, spowodowane np. aplikacją egzogennych fitohormonów, wprowadzone w ustanowioną w komórkach homeostazę hormonalną, nie przekładają się na późniejsze obserwowane efekty. Choć podnoszony może być argument, że od podania hormonu do opisywanych zmian mija kilkanaście dni, to jednak w wielu doświadczeniach wykazywano, że nawet sam poziom aplikowanych hormonów może ulegać zmianie i być utrzymywany w komórkach przez okres nawet kilkudziesięciu dni. Zależy to m.in. od warunków środowiskowych w jakich prowadzone są badania oraz od samego stanu metabolicznego komórek. Zwłaszcza w tym kontekście znaczenie mają badania prowadzone na różnych gatunkach roślin, rosnących w warunkach naturalnych (Yang i in., 2006; Kondhare i in., 2014; Ito i in., 2016). Wziąwszy to pod uwagę oraz wyniki opisane w dalszej części dyskusji można wnioskować, że obserwowane efekty są skutkiem działania aplikowanego hormonu na wczesnym etapie rozwoju nasion. Możliwym bowiem jest, że podawana wtedy giberelina zaburza zarówno homeostazę hormonalną, jak również działanie sieci genów *LAF1* oraz innych czynników modulujących proces wypełniania nasion. Może to wynikać ze zmienionej aktywności wspomnianych już białek DELLA, np. RGL3 czy elementów związanych z funkcjonowaniem np. auksyn, takich jak YUCCA-like (Lur i Setter, 1993; Matilla, 2020; Hu i in., 2021). Choć w nasionach najstarszych, w wybranych

wariantach, obserwowano wyraźne zmiany poziomu mRNA konglutyn, nie przekładało się to bezpośrednio na wzrost ilości białek. Może to być spowodowane opóźnieniem pomiędzy procesami transkrypcji i translacji, ale może wynikać także z innych powodów np. braku możliwości syntezy białek zapasowych na tym etapie rozwoju nasion lub inicjacją procesów degradacji transkryptów i rozpoczęcia desykcacji.

### 6.3.2. Wpływ ABA na ekspresję zidentyfikowanych genów

Nie udało się w żadnym z przeprowadzonych badań, prezentowanych w niniejszej rozprawie, zaobserwować pozytywnych, istotnych statystycznie oraz w pełni wiarygodnych zależności pomiędzy aplikacją egzogennego ABA a ekspresją genów *LILAFL*. Pomimo, że wiele danych literaturowych wskazuje na promowanie przez ABA aktywności transkrypcyjnej genów *LEC2*, *ABI3*, czy *FUS3* (Ali i in., 2022), nie obserwowano takich zależności w nasionach łubinu żółtego. Odnotowano jedynie incydentalne wzrosty ilości mRNA *LIFUS3* (Wykres 11.) i *LIABI3* (Wykres 10.) w nasionach zbieranych w godzinie zerowej i czwartej w 20 dniu po wykształceniu kwiatu. Nie wykazywały one jednak jakiegokolwiek tendencji i mimo pewnej powtarzalności nie można powiedzieć, że były to zmiany utrwalone a wynikać mogą raczej z losowych wahań warunków środowiskowych i odpowiedzi roślin na te warunki.

Jakość i ilość światła ma wpływ także na działanie i biosyntezę ABA. Wykazano, że światło dalekiej czerwieni promuje akumulację kwasu abscysynowego. Podobne efekty może wywoływać również temperatura, choć nie jest to działanie bezpośrednie. Zarówno w jednym, jak i drugim mechanizmie uczestniczą białka, należące do klasy czynników transkrypcyjnych PIF (PHYTOCHROME-INTERACTING FACTOR) (De Wit i in., 2016; Yan i Chen, 2020). W przypadku badań opisanych w niniejszej pracy, dotyczących łubinu żółtego, ograniczenie wpływu egzogennie stosowanego ABA może wynikać z funkcji stabilizatora, jakim może być ABA w kontekście funkcjonowania, np. białka *LIFUS3*. W takim przypadku kwas abscysynowy wpływa na trwałość i aktywność czynnika transkrypcyjnego, a nie na ekspresję genu kodującego to białko. Wyniki licznych badań sugerują także, że sama obecność fitohormonu nie jest wystarczająca do zmian, jakim mogą podlegać elementy odpowiedzi na obecność ABA. W takich przypadkach konieczna staje się obecność dodatkowych elementów w postaci aktywności swoistych białek (Parcy i in., 1994; Gazzarrini i in., 2004).

#### 6.4. Endogenny poziom fitohormonów

Działanie hormonów roślinnych w dużej mierze uzależnione jest od ich transportu. W wielu doświadczeniach wykazano, że nie synteza *de novo* a właśnie przemieszczanie hormonów albo ich bezpośrednich prekursorów determinuje określone zmiany. Interesujące są zwłaszcza dane dotyczące roli GA. Jak wiadomo, związki klasyfikowane jako gibereliny tworzą dużą grupę, w której jedynie nieliczne formy są aktywne. Do syntezy tych aktywnych form GA bardzo często dochodzi w komórkach czy tkankach sąsiednich a obserwowany wzrost w miejscach docelowych jest wynikiem transportu. Opisywane są także przypadki, w których transportowane są związki pośrednie i dopiero one podlegają ostatecznej konwersji do postaci aktywnych. Natomiast w takim przypadku, bezpośrednim regulatorem ilości fitohormonu jest efektywność transportu i synteza prekursora a nie biosynteza formy aktywnej (Binenbaum i in., 2018).

Dla lepszego zrozumienia przemian, jakim może podlegać etap gromadzenia materiałów zapasowych u łubinu żółtego, w prezentowanych badaniach oznaczono także endogenne ilości wybranych fitohormonów. Wśród badanych były IAA, ABA oraz cztery aktywne formy giberelin: GA<sub>1</sub>, GA<sub>3</sub>, GA<sub>4</sub> i GA<sub>7</sub>. Analiza ilości akumulowanego kwasu idolilo-3-octowego pokazuje, że poziom tego hormonu zmienia się jedynie w nasionach najmłodszych (15 DAA). Istotnie statystycznie różnice w stężeniu IAA w porównaniu do kontroli z godziny zerowej odnotowywano w nasionach zbieranych zarówno w godzinie czwartej, jak i ósmej (Wykres 27.). W każdym z badanych wariantów, w których aplikowano egzogenną giberelinę lub kwas abscysynowy obserwowano obniżenie ilości IAA lub nie odnotowywano żadnych istotnych zmian. W przeprowadzonych doświadczeniach poziom auksyny był wysoki i nie zmieniał się tak wyraźnie, jak wskazywałyby na to dane literaturowe opisujące inne procesy, w które zaangażowany jest ten hormon. Wyraźny wzrost akumulacji IAA obserwowano m.in. w nasionach kukurydzy od 8 dnia po zapyleniu, natomiast od 20 dnia poziom ten się obniżał (Lur i Setter, 1993; Bernardi i in., 2012; Locascio i in., 2014). Wykazano szczegółowo, że w rozwoju bielma, po początkowo niskich ilościach IAA, jego poziom wzrasta między 9 a 11 dniem po zapyleniu i utrzymuje się aż do dnia 20. (Bernardi i in., 2012). Wobec tego możliwe jest, że w przypadku nasion łubinu żółtego, wybrane warianty począwszy od 15 dnia po wykształceniu kwiatu, są już relatywnie dojrzałymi i ewentualne zmiany mogą nie być zauważalne. Zastanawiający pozostaje skrajnie wysoki poziom oznaczanego hormonu w tych nasionach. W dostępnej literaturze opisującej inne przemiany, w których mierzono poziom IAA, jego ilość bywała nawet o dwa rzędy

wielkości niższa. Trudno przypuszczać żeby tak znaczne ilości auksyny były gromadzone w nasionach, choć komórki nasion zwłaszcza w tych wcześniejszych fazach podlegają nieustannemu wzrostowi. Jednak w intensywnie rosnących komórkach korzeni stężenie auksyny można wyrażać nawet w mikrogramach na gram świeżej masy (Xia i in., 2022). Być może w przypadku nasion łubinu taka obserwacja ma również swoje uzasadnienie.

Uzyskane wyniki oznaczeń ilości endogennego ABA wykazały, że w nasionach łubinu żółtego zbieranych w 30 dniu po wykształceniu kwiatu poziom tego hormonu drastycznie spada. Zaobserwowano także wzrost ilości ABA po jego egzogennej aplikacji, zarówno w nasionach najstarszych, jak i tych po 20 dniach od wykształcenia kwiatów zbieranych w godzinie zerowej i czwartej (Wykres 22.). Początkowo wysoki poziom akumulacji kwasu abscysynowego na wczesnych etapach rozwoju nasion jest zapewne potrzebny do stymulowania ekspresji genów kodujących czynniki transkrypcyjne należące do sieci LAFL (Ali i in., 2022). Wykazano, że egzogennie podawany ABA promuje ekspresję *FUS3* w nasionach *Arabidopsis thaliana* a syntetyzowane białko stymuluje biosyntezę tego fitohormonu (Kagaya i in., 2005). Oznacza to, że zarówno ABA jak i *FUS3* znajdują się w sieci pozytywnego sprzężenia zwrotnego (Braybrook i Harada, 2008). Jednak z zaprezentowanych w niniejszej pracy badań wynika, że w 30 DAA rosnącemu poziomowi ekspresji *LIFUS3* przeciwstawiany jest malejący poziom ABA. Może to być spowodowane warunkami środowiskowymi (temperatura, nasłonecznienie), o których wspomniano w poprzednim podrozdziale lub wynikać z inicjacji kolejnych faz rozwoju nasion (Xiong i Zhu, 2003). Należy pamiętać i podkreślić, że zależności przyczynowo – skutkowe pomiędzy wzrostem ekspresji genów, biosyntezą białek czy regulacją poziomu fitohormonów wymagają czasu. Niektóre trwają minuty, dla innych wymagany jest czas nawet kilku dni. Istotne znaczenie, w przypadku badań opisywanych w niniejszej pracy może mieć fakt, że nadmiar hormonu przyczynia się do zahamowania szlaków jego biosyntezy, czyli działa w negatywnych pętlach sprzężeń zwrotnych (Cutler i Krochko, 1999). Te początkowe obserwacje zostały jednak w wyniku kolejnych badań zakwestionowane i zasugerowano raczej przyspieszenie degradacji, niż zahamowanie biosyntezy (Iuchi i in., 2000; Thompson i in., 2000). Być może w początkowych etapach rozwoju nasion łubinu żółtego, kiedy endogenny poziom opisywanego hormonu jest wysoki, dodatkowa porcja hormonu aplikowana w postaci oprysku roztworem zawierającym 0,1 mM ABA powoduje efekt przeciwny do zakładanego. Wobec tego, w porównaniu do wariantów kontrolnych, nieznaczne podniesienie poziomu kwasu abscysynowego kilka dni po aplikacji (20 DAA) było całkowicie uzasadnione. Przypuszczalnie, także stąd wynikają największe różnice

w ilości ABA w nasionach najstarszych (30 DAA) pomiędzy wariantem kontrolnym a poddanym działaniu egzogennej hormonu. Nie zaobserwowano natomiast istotnych zmian ilości endogennej poziomu ABA pod wpływem stosowania egzogennej  $GA_3$ . Choć w niektórych procesach stężenia obu hormonów podlegają wzajemnej kontroli, takiej zależności nie odnotowywano w przypadku badanych procesów w rozwoju nasion łubinu żółtego. W doświadczeniach prowadzonych na ziarniakach zbóż wykazywano, że już pięciokrotnie mniejsza ilość hormonu, niż ta aplikowana w opisywanych doświadczeniach przeprowadzonych na łubinie żółtym, powodowała kilkukrotny wzrost ilości ABA, który utrzymywał się przez kilkanaście kolejnych dni (Yang i in., 2004). Podobne wyniki uzyskano także w badaniach prowadzonych na ryżu (Yang i in., 2006). Odmienne rezultaty mogą wynikać z kilku faktów, m.in. przynależności badanych roślin do różnych grup taksonomicznych, wrażliwości na hormon, etapu zastosowania ABA i jego endogennej poziomu a także z odmiennej metodyki badawczej. Na przykład w badaniach przeprowadzonych przez Yang i współautorów (2004 i 2006), do oznaczeń fitohormonów wykorzystano techniki immunoenzymatyczne (ELISA). Pokazuje to, jak ważne jest metodyczne podejście do oznaczeń hormonów oraz ich egzogennej aplikacji a także, jak wielu zmiennym czynnikom rezultaty tych badań mogą podlegać. Wobec tego wydaje się konieczne wypracowanie wspólnej metodyki, począwszy od sposobu aplikacji, poprzez ekstrakcje, aż na oznaczeniach ilościowych skończywszy.

Zastosowanie techniki LC-MS/MS pozwoliło skutecznie oznaczyć stężenia także aktywnych giberelin tj.  $GA_1$ ,  $GA_3$ ,  $GA_4$ , i  $GA_7$ . Najwyższe stężenia pierwszej z wymienionych, obserwowano w nasionach najmłodszych (15 DAA) (Wykres 23.), w których może jeszcze dochodzić do wczesnych przemian związanych z rozwojem, na co wskazuje wysoki poziom ekspresji *LIPKL* (Wykres 1. i 8.). W kolejnych dniach rozwoju nasion, ilość tej formy gibereliny spadała kilkukrotnie i utrzymywała się na zbliżonym poziomie w nasionach w 20 i 30 DAA (Wykres 23.). W badaniach prowadzonych na rzodkiewniku pospolitym wykazano, że  $GA_1$  akumulowana jest zwłaszcza we wczesnych etapach rozwoju nasion, po czym jej poziom drastycznie spada w późniejszych fazach (Hu i in., 2008; Kanno i in., 2010; Hu i in., 2018). Bardzo wysoki jednostkowy poziom ilości  $GA_1$  w nasionach jest trudny do wytłumaczenia. Wydaje się jednak, że może to być częściowo wyjaśnione przez analogie i potwierdzone opisanym powyżej poziomem IAA, jaki odnotowywano w opisywanych w niniejszej pracy doświadczeniach. Generalnie, w roślinach gibereliny występują w relatywnie niskich stężeniach wyrażanych ilością od 0,1 do 100 ng na gram świeżej masy tkanki (Hedden i Phillips, 2000). Jednak w intensywnie rosnących,

powiększających się organach i tkankach ich ilość może się zwiększać (Silverstone i in., 1997; Zhu i in., 2006; Hu i in., 2008; Zhang i in., 2008, 2011). Jak przedstawiono to już m.in. w podrozdziale 6.2.2. lub 6.3., GA działają jako negatywne regulatory sieci *LILAFL* oraz ograniczają gromadzenie się białek zapasowych. Dlatego też, efekt obserwowany w starszych nasionach wydaje się w pełni uzasadniony. Niższa ilość  $GA_1$  umożliwia właściwy przebieg gromadzenia materiałów zapasowych i inicjuje wejście nasion w stan spoczynku (Kozaki i Aoyanagi, 2022). Dodatkowo, wytłumaczeniem obserwowanego wzorca akumulacji  $GA_1$  w trakcie rozwoju nasion łubinu żółtego może być fakt aktywności genów *LILAFL*, negatywnie regulujących ekspresję genów biosyntezy giberelin i działania szlaków zależnych od GA oraz pozytywnie stymulujących degradację form aktywnych (patrz Gazzarrini i in., 2004).

Podobnie, jak w przypadku  $GA_1$  również dla  $GA_3$  zaobserwowano spadek ilości hormonu w ciągu kolejnych dni rozwoju nasion. Nie był on jednak aż tak wysoki, jak  $GA_1$ . Pomiar wewnątrzkomórkowego poziomu  $GA_3$  udowodnił jednoznacznie, że egzogenna aplikacja takiej samej gibereliny jest skuteczną formą podawania hormonu mogącego pełnić specyficzne funkcje w komórkach. W wariantach, w których rośliny poddawano działaniu egzogennej fitohormonu, wewnątrzkomórkowa ilość jego endogennej odpowiednika stopniowo rośnie w próbach zbieranych po czterech i ośmiu godzinach od aplikacji  $GA_3$  (Wykres 24.). Widać także dokładnie czas, w jakim od oprysku gibereliny dostaje się do wnętrza tkanek, jednakże efekt ten nie jest utrzymywany w dłuższej perspektywie. W badaniach prowadzonych na gruszy wykazywano, że aplikacja  $GA_3$  może powodować wzrost ilości endogennej formy nawet przez okres do kilku czy kilkudziesięciu dni od aplikacji. Obserwowany przez autorów wzrost stężenia hormonów nie jest efektem prostego sumowania ilości endogennej i egzogennej fitohormonów lecz wynikiem działania skomplikowanej sieci zależności, jakie indukowane są obecnością nadmiarowej puli  $GA_3$  i  $GA_4$ . Dochodzi wtedy m.in. do aktywacji zależnej od 2 $\beta$ -hydroksylacji degradacji form aktywnych oraz zahamowania ekspresji genów kodujących enzymy biosyntezy giberelin (Ito i in., 2016). Możliwe, że stąd wynika ekstremalnie niski poziom endogennej  $GA_3$  w nasionach łubinu żółtego, po zastosowaniu egzogennej formy tego hormonu.

Zgoła odmienne zależności obserwowano dla  $GA_4$  i  $GA_7$ . W przypadku  $GA_4$  w kolejnych dniach rozwoju nasion odnotowywano coraz wyższy stopień akumulacji tego hormonu. Najwyższy poziom tej gibereliny obserwowano w nasionach najstarszych (30 DAA). Wydaje się także, że przypadku tej gibereliny zaznacza się także wyraźny spadek jej ilości w próbach zbieranych w godzinie czwartej i ósmej w porównaniu do godziny

zerowej. Dotyczy to zwłaszcza nasion z 15 i 20 po wykształceniu kwiatów (Wykres 25.). Podwyższona akumulacja aktywnych giberelin w nasionach zbieranych w 30 DAA nie znajduje uzasadnienia w danych literaturowych. Można jednak spróbować wyjaśnić to z punktu widzenia wzajemnych zależności pomiędzy GA i ABA. W prezentowanych w niniejszej pracy badaniach wykazano, że endogenny poziom ABA w nasionach zbieranych 30 dni po wykształceniu kwiatów jest najniższy. Stąd może wynikać wzrost aktywności genów biosyntezy giberelin i to właśnie form  $GA_4$  i  $GA_7$  (Wykres 25. i 26.) a nie  $GA_1$  i  $GA_3$  (Wykres 23. i 24.). Należy podkreślić, że przeciwstawione sobie aktywne formy hormonów należą do dwóch różnych grup, hydroksylowanych i niehydroksylowanych w pozycji C13 (MacMillan, 1984; Takahashi i in., 1986). Można też rozważyć sytuację, w której ABA kontroluje jedynie część przemian związanych z biosyntezą oraz stabilnością i degradacją giberelin. Czy do takiej regulacji dochodzi przypadku wypełniania nasion łubinu żółtego pozostaje kwestią dalszych, bardziej szczegółowych badań. Należy pamiętać, że gibereliny to bardzo duża grupa związków. W biosyntezę form aktywnych i nieaktywnych zaangażowanych jest kilkanaście enzymów. Podobnie jest z inaktywacją i przechodzeniem form aktywnych w nieaktywne. Dodatkową komplikacją jest fakt, że niemal w każdym z opisywanych w literaturze procesów, homeostaza hormonalna wykazuje nieco odmienny wzorzec. Stwierdzono na przykład, że w dojrzałych nasionach rzodkiewnika pospolitego stosunek stężenia  $GA_1$  do  $GA_4$  wynosi 10 do 1. Natomiast w czasie rozwoju wegetatywnego a także w czasie kiełkowania proporcje te są dokładnie odwrotne (Curaba i in., 2004). Wzrost ilości  $GA_4$  w nasionach łubinu żółtego może wynikać z jeszcze jednej zależności. Jak już podkreślono kilkakrotnie, 30 dni po wykształceniu kwiatu to etap rozwoju nasion, w którym inicjowana jest desykcja i spoczynek. Jak wiadomo, w kolejnym etapie, zachodzącym najczęściej już poza rośliną macierzystą, dochodzi do kiełkowania i zapoczątkowania autonomicznego rozwoju wegetatywnego. Prace nawet sprzed kilku dziesięcioleci wskazywały, że proces kiełkowania, w tym np. inicjacja enzymów związanych z hydrolizą materiałów zapasowych i kolejnymi przemianami, kontrolowany jest przez gibereliny. Sądzone początkowo, że kluczowe znaczenie w ich kontroli ma  $GA_1$ . Jednak dokładniejsze badania pokazują, że decydującą rolę pełni w tym przypadku  $GA_4$  (Ogawa i in., 2003). Dlatego też wzrost ilości  $GA_4$  w późnych etapach embriogenezy może być konieczny jako swoiste zabezpieczenie kolejnych etapów rozwoju nasion i zapewnienie zarodkowi niezbędnych ilości tego hormonu w czasie, kiedy nie wykazuje on wzmożonej aktywności metabolicznej. Na podstawie wyników badań prowadzonych u innych gatunków roślin sugeruje się podobieństwo funkcjonalne pomiędzy  $GA_4$  i  $GA_7$  (Ito i in., 2016). Stąd też



obserwowane u łubinu żółtego zmiany akumulacji GA<sub>7</sub> mogą być efektem uczestniczenia obu tych form GA w tych samych przemianach fizjologicznych.

## 6.5. Wpływ suszy na ekspresję wybranych genów

Susza jest jednym z najpoważniejszych problemów jakie obecnie przyczyniają się do spadku plonowania i zmniejszania się areałów upraw na Ziemi. Tematyka tych zagadnień poruszana jest już od kilku lat przez różne jednostki organizacyjne ONZ (Howitt i in., 2015). Prognozuje się, że spadek plonowania na terenach naturalnie nawadnianych w najbliższych latach może spaść nawet od 40 do 60% (The State of Food and Agriculture, 2020). Stąd konieczne jest podjęcie wszelkich możliwych działań, aby ograniczyć spadek produktywności oraz zmniejszyć zużycie wody, głównie w rolnictwie. Niemal każdy gatunek uprawny wykazuje większą lub mniejszą wrażliwość na okresowe niedobory wody na różnych etapach wzrostu. U łubinu taka nadwrażliwość występuje już w fazie kiełkowania. Wtedy to materiały zgromadzone w nasionach mogą związać ilość wody odpowiadającą 170% swojej masy (Dymerska i Grabowska, 2014). W kolejnych etapach wzrostu rośliny dostęp wody determinuje rozwój korzeni, zawiązywanie brodawek czy rozwój części nadziemnej. Jednak z punktu widzenia plonowania najważniejsze jest to, co dzieje się na etapie rozwoju generatywnego. Wówczas deficyt wody powoduje zmniejszenie ilości strąków i nasion, odpadanie organów generatywnych, brak możliwości gromadzenia materiałów zapasowych czy zamieranie zarodka (Dymerska i Grabowska, 2014).

W niniejszej pracy opisano wyniki przeprowadzonych badań wpływu niedoborów wody na ekspresję wybranych genów związanych z gromadzeniem białek zapasowych w nasionach łubinu żółtego odmiany Taper. W nasionach zbieranych 30 dni po wykształceniu kwiatów wykazano charakterystyczny wzorzec ekspresji badanych genów. Zależny był on od długości wcześniejszego etapu suszy, jakim poddawano uprawiane rośliny. Bez względu na to czy były to geny kodujące konglutyny (Wykres 17. i 18.), czy należący do rodziny B3 gen kodujący czynnik transkrypcyjny LIABI3 (Wykres 15.), czy gen *LIPKL* kodujący białko zaangażowane w remodelowanie chromatyny (Wykres 16.), wszystkie one wykazywały niewielki wzrost ekspresji po 10 dniach ograniczenia dostępności wody. Podobną obserwację, dla roślin poddanych takim samym warunkom suszy, odnotowywano w nasionach zbieranych po 30 dniach od wykształcenia kwiatów. We wszystkich pozostałych wariantach, w najstarszych nasionach (30 DAA) stwierdzono spadek aktywności transkrypcyjnej badanych genów. Wyjątek stanowił gen *LIPKL*, który to wykazywał podwyższoną ekspresję

po 10 dniach suszy w porównaniu do próby kontrolnej, a w nasionach 15 DAA nie wykazywał negatywnej odpowiedzi (Wykres 16.).

Dane literaturowe wskazują na udział kwasu abscysynowego w odpowiedzi na warunki stresowe, w tym susze. Jak pokazują badania prowadzone głównie na ryżu, to właśnie ABA odpowiedzialny jest za kontrolę ekspresji licznych genów związanych z funkcjonowaniem szlaku transdukcji sygnału właśnie tego hormonu. Jako jeden z genów najczęściej pojawiających się w tym kontekście jest *ABI5*, kodujący czynnik transkrypcyjny odpowiedzi na ABA (Zou i in., 2008; Li i in., 2022). Jak pokazały badania prowadzone na pszenicy, odmiany tolerujące suszę akumulują w nasionach mniejsze ilości kwasu abscysynowego (Ji i in., 2011). Zmierzono w nich także wyższą aktywność enzymów odpowiedzialnych za biodegradację tego hormonu (8'-hydroksylaz ABA) oraz niższą związaną z biosyntezą. Wydaje się, że mimo licznych danych, rola ABA w odpowiedzi roślin na susze wciąż pozostaje nierozstrzygnięta. Można jednak przypuszczać, że zmiany ilościowe kwasu abscysynowego oraz funkcjonalność szlaków transdukcji sygnałów może mieć także pozytywny wpływ na przebieg wielu procesów wzrostowych czy rozwojowych, np. poprzez indukcję wcześniejszego spoczynku nasion czy przyspieszenie procesów starzenia (Gietler i in., 2020). Obserwowane w nasionach łubinu żółtego zmiany ekspresji wybranych genów mogą być pochodną właśnie takiego działania. Dochodzi do tego zwłaszcza w przypadku suszy trwającej co najmniej kilkanaście dni. W przypadku dziesięciodniowego niedoboru wody wydaje się, że następuje swoista mobilizacja transkrypcji także genów kodujących konglutyny (Wykres 17. i 18.). Nie udało się niestety określić dokładnych zależności oraz plonu powstałego pod wpływem działania okresów suszy. W tym przypadku prowadzenie doświadczeń w układzie kontrolowanych warunków sztucznych spowodowało liczne ograniczenia, uniemożliwiające pełniejsze poznanie opisywanych przemian.

## **Podsumowanie**

Podsumowując powyższe rozważania można stwierdzić, że zależności i efekty obserwowane u łubinu żółtego, mimo swej skomplikowanej natury są jednak tylko niewielką częścią całości przemian jakim podlega kontrola i gromadzenie materiałów zapasowych m.in. w nasionach roślin strączkowych. Na przestrzeni kilku ostatnich lat zidentyfikowano cały szereg nowych elementów tej skomplikowanej sieci zależności funkcjonujących na różnych etapach rozwoju nasion (Verma i in., 2022). Opisano szczegółowo geny kontrolowane przez sieć LAFL, określono ich znaczenie w procesie rozwoju nasion oraz wykazano współdziałanie

hormonów w kontroli tych przemian (Jia i in., 2014). W niniejszej dyskusji wielokrotnie przytaczano dane literaturowe wskazujące na kluczowe znaczenie w kontroli rozwoju nasion ABA, GA oraz IAA. Dziś z całą pewnością można stwierdzić, że uczestniczą w tym także pozostałe hormony (Yamamoto i in., 2010; Stone i in., 2008; Lumba i in., 2012; Ali i in., 2022). W analizach transkryptomów nasion *Fagopyrum tararicum* zidentyfikowano 633 geny o różnicowej ekspresji, związane z biosyntezą i metabolizmem fitohormonów, tj. 149 genów dla ABA, 132 dla auksyn, 130 dla etylenu, 67 dla kwasu salicylowego, 59 dla brasinosteroidów, 33 dla cytokinin, 33 dla kwasu jasmonowego oraz 30 genów związanych z GA (Huang i in., 2017). Z innych źródeł literaturowych wiadomo, że w bardziej lub mniej bezpośredni sposób zaangażowane w procesy związane z rozwojem nasion są także miRNA. Oczywiście niezwykle ważna jest również funkcja metabolizmu podstawowego i zdolność rośliny do produkcji i gromadzenia węglowodanów, mogących także pełnić funkcję sygnałowe (Verdier i Thompson, 2008). Jeśli dodamy do tego udział w przemianach związanych z gromadzeniem materiałów zapasowych w roślinach strączkowych, także ilości dostarczanego azotu, powstaje wielka sieć zależności (Foley i in., 2011). Aktualnie opisanie jej szczegółowo, nawet w badaniach opartych na najnowszych i najczulszych metodach, jest nadal niewykonalne. Optymistyczne jest jednak to, jak długa droga została już pokonana a pełne poznanie mechanizmów determinujących rozwój nasion, w tym także gromadzenie białek zapasowych, wydaje się już tylko „na wyciągnięcie... myśli”.

## 7. Wnioski

1. W wyniku przeprowadzonych badań zidentyfikowano homologi genów kodujących białka regulatorowe oraz białka zapasowe. Białka (LIPKL, LILEC2, LIABI3, LIFUS3, LIVAL1, LIBETA, LIDELTA2) kodowane przez wyselekcjonowane geny zawierają domeny występujące w homologach opisanych u gatunków pokrewnych.
2. Badania ekspresji zidentyfikowanych genów wskazują na funkcjonowanie w procesie dojrzewania nasion łubinu żółtego odmiany Taper, sieci czynników transkrypcyjnych należących do rodziny LILAFL (LILEC2, LIABI3, LIFUS3) i regulujących ich aktywność białek zaangażowanych w procesy remodelowania chromatyny, LIPKL i LIVAL1.
3. Efektywne gromadzenie konglutyn u łubinu żółtego jest skutkiem funkcjonowania sieci czynników transkrypcyjnych LILAFL.
4. Egzogenna aplikacja ABA i GA<sub>3</sub> nie jest kluczowym czynnikiem warunkującym zmiany ekspresji genów *LILAFL* w warunkach naturalnej uprawy łubinu żółtego.
5. Egzogennie podana GA<sub>3</sub> w początkowych etapach wypełniania nasion, wpływa pozytywnie jedynie na ekspresję genów kodujących konglutyny w 30 dniu od wykształcenia kwiatów, nie wykazując zmian poziomu akumulacji białek zapasowych.
6. Ogólny wzorzec ekspresji genów kodujących białka zapasowe, uzyskany dla nasion łubinu żółtego odmiany Taper, jest zgodny z danymi literaturowymi, wskazującymi na stopniowy wzrost ilości białek zapasowych i najwyższy ich poziom w nasionach najstarszych.
7. Wpływ suszy na ekspresję zidentyfikowanych u łubinu żółtego genów zależy jest od czasu jej trwania. Przedłużający się okres suszy prowadzi do zahamowania ekspresji genów kodujących białka zapasowe, z kolei krótkotrwała susza powoduje wzrost ekspresji genów związanych z gromadzeniem materiałów zapasowych w nasionach.
8. Podawany egzogennie ABA wywołuje wzrost ilości endogennej ABA tylko w najstarszych nasionach łubinu żółtego. Natomiast egzogennie podana GA<sub>3</sub> znacząco zwiększa ilość endogennej GA<sub>3</sub> w nasionach, już kilka godzin po podaniu.
9. Wykazano, że bioaktywne gibereliny GA<sub>1</sub>, GA<sub>3</sub> oraz GA<sub>4</sub> i GA<sub>7</sub> pełnią w nasionach łubinu żółtego odmienne, zależne od etapu rozwoju i stanu fizjologicznego funkcje.

## 8. Literatura

1. **Achard, P. i Genschik, P.** (2009). Releasing the brakes of plant growth: how GAs shutdown DELLA proteins. *J. Exp. Bot.* **60**: 1085–1092.
2. **Ahluwalia, O., Singh, P.C., i Bhatia, R.** (2021). A review on drought stress in plants: Implications, mitigation and the role of plant growth promoting rhizobacteria. *Resour. Environ. Sustain.* **5**: 100032.
3. **Ali, F., Qanmber, G., Li, F., i Wang, Z.** (2022). Updated role of ABA in seed maturation, dormancy, and germination. *J. Adv. Res.* **35**: 199–214.
4. **Allen, D.K. i Young, J.D.** (2013). Carbon and nitrogen provisions alter the metabolic flux in developing soybean embryos. *Plant Physiol.* **161**: 1458–1475.
5. **An, Y.Q.C., Goettel, W., Han, Q., Bartels, A., Liu, Z., i Xiao, W.** (2017). Dynamic Changes of Genome-Wide DNA Methylation during Soybean Seed Development. *Sci. Reports 2017 71 7*: 1–14.
6. **Atif, R.M., Patat-Ochatt, E.M., Svabova, L., Ondrej, V., Klenoticova, H., Jacas, L., Griga, M., i Ochatt, S.J.** (2013). Gene Transfer in Legumes. W *Progress in Botany* (Springer-Verlag: Berlin Heidelberg), ss. 37–100.
7. **Augustyńska, I. i Bębenista, A.** (2019). Ekonomiczne aspekty uprawy soi i łubinu słodkiego w Polsce. *Zesz. Nauk. SGGW w Warszawie - Probl. Rol. Światowego* **19**: 256–268.
8. **Awasthi, R., Kaushal, N., Vadez, V., Turner, N.C., Berger, J., Siddique, K.H.M., i Nayyar, H.** (2014). Individual and combined effects of transient drought and heat stress on carbon assimilation and seed filling in chickpea. W *Functional Plant Biology* (CSIRO), ss. 1148–1167.
9. **Barendse, G.W.M., Karssen, C.M., i Koornneef, M.** (1991). Role of Endogenous Gibberellins During Fruit and Seed Development. W *Gibberellins* (Springer New York), ss. 179–187.
10. **Van Barneveld, R.J.** (1999). Understanding the nutritional chemistry of lupin (*Lupinus* spp.) seed to improve livestock production efficiency. *Nutr. Res. Rev.*: 203–230.
11. **Bernardi, J., Lanubile, A., Li, Q.B., Kumar, D., Kladnik, A., Cook, S.D., Ross, J.J., Marocco, A., i Chourey, P.S.** (2012). Impaired Auxin Biosynthesis in the defective endosperm18 Mutant Is Due to Mutational Loss of Expression in the *ZmYuc1* Gene Encoding Endosperm-Specific YUCCA1 Protein in Maize. *Plant Physiol.* **160**: 1318.

12. **Bewley, J.D. i Nonogaki, H.** (2017). Seed Maturation and Germination ☆. Reference Module in Life Sciences (Elsevier).
13. **Binenbaum, J., Weinstain, R., i Shani, E.** (2018). Gibberellin Localization and Transport in Plants. *Trends Plant Sci.* **23**: 410–421.
14. **Binkowski, M., Osiecka, A., i Stuczyńska, E.** (2021). Lista opisowa odmian roślin rolniczych 2021 Bobowate Soja Wiechlinowate (Centralny Ośrodek Badania Odmian Roślin Uprawnych: Słupia Wielka).
15. **Bleckmann, A., Alter, S., i Dresselhaus, T.** (2014). The beginning of a seed: Regulatory mechanisms of double fertilization. *Front. Plant Sci.* **5**: 452.
16. **Bojarszczuk, J. i Księżak, J.** (2014). Opłacalność uprawy mieszanek łubinu żółtego ze zbożami. *Stud. i Rap. IUNG-PIB* **41**: 85–98.
17. **Boulard, C., Thévenin, J., Tranquet, O., Laporte, V., Lepiniec, L., i Dubreucq, B.** (2018). LEC1 (NF-YB9) directly interacts with LEC2 to control gene expression in seed. *Biochim. Biophys. Acta - Gene Regul. Mech.* **1861**: 443–450.
18. **Branca, G., Lipper, L., McCarthy, N., i Jolejole, M.C.** (2013). Food security, climate change, and sustainable land management. A review. *Agron. Sustain. Dev.* **33**: 635–650.
19. **Braybrook, S.A. i Harada, J.J.** (2008). LECs go crazy in embryo development. *Trends Plant Sci.* **13**: 624–630.
20. **Britz, S.J., Prasad, P.V.V., Moreau, R.A., Allen, L.H., Kremer, D.F., i Boote, K.J.** (2007). Influence of growth temperature on the amounts of tocopherols, tocotrienols, and  $\gamma$ -oryzanol in brown rice. *J. Agric. Food Chem.* **55**: 7559–7565.
21. **Brukhin, V. i Morozova, N.** (2011). Plant growth and development - Basic knowledge and current views. *Math. Model. Nat. Phenom.* **6**: 1–53.
22. **Cagnola, J.I. i in.** (2018). Long-Day Photoperiod Enhances Jasmonic Acid-Related Plant Defense. *Plant Physiol.* **178**: 163.
23. **Cao, J., Li, G., Qu, D., Li, X., i Wang, Y.** (2020). Into the seed: Auxin controls seed development and grain yield. *Int. J. Mol. Sci.* **21**.
24. **Cao, X., Yang, H., Shang, C., Ma, S., Liu, L., i Cheng, J.** (2019). The Roles of Auxin Biosynthesis YUCCA Gene Family in Plants. *Int. J. Mol. Sci.* 2019, Vol. 20, Page 6343 **20**: 6343.
25. **Carbonero, P., Iglesias-Fernández, R., i Vicente-Carbajosa, J.** (2017). The AFL subfamily of B3 transcription factors: Evolution and function in angiosperm seeds. *J. Exp. Bot.* **68**: 871–880.

26. **Chen, Z., Ly Vu, B., Leprince, O., i Verdier, J.** (2021). RNA sequencing data for heat stress response in isolated medicago truncatula seed tissues. *Data Br.* **35**.
27. **Chern, M.-S., Eiben, H.G., i Bustos, M.M.** (1996). The developmentally regulated bZIP factor ROM1 modulates transcription from lectin and storage protein genes in bean embryos.
28. **Corbineau, F., Xia, Q., Bailly, C., i El-Maarouf-Bouteau, H.** (2014). Ethylene, a key factor in the regulation of seed dormancy. *Front. Plant Sci.* **5**: 539.
29. **Curaba, J., Moritz, T., Blervaque, R., Parcy, F., Raz, V., Herzog, M., i Vachon, G.** (2004). AtGA3ox2, a key gene responsible for bioactive gibberellin biosynthesis, is regulated during embryogenesis by Leafy Cotyledon2 and FUSCA3 in arabidopsis. *Plant Physiol.* **136**: 3660–3669.
30. **Cutler, A.J. i Krochko, J.E.** (1999). Formation and breakdown of ABA. *Trends Plant Sci.* **4**: 472–478.
31. **Cutler, S.R., Rodriguez, P.L., Finkelstein, R.R., i Abrams, S.R.** (2010). Abscisic acid: Emergence of a core signaling network. *Annu. Rev. Plant Biol.* **61**: 651–679.
32. **Davière, J.M. i Achard, P.** (2013). Gibberellin signaling in plants. *Dev.* **140**: 1147–1151.
33. **Dean Rider, S., Henderson, J.T., Jerome, R.E., Edenberg, H.J., Romero-Severson, J., i Ogas, J.** (2003). Coordinate repression of regulators of embryonic identity by *PICKLE* during germination in *Arabidopsis*. *Plant J.* **35**: 33–43.
34. **DeLisle, A.J. i Crouch, M.L.** (1989). Seed Storage Protein Transcription and mRNA Levels in *Brassica napus* during Development and in Response to Exogenous Abscisic Acid. *Plant Physiol.* **91**: 617–623.
35. **Doroszewski, A., Pudelko, R., Żyłowska, K., Jadczyzyn, J., Koza, P., Jędrejek, A., Kozak, M., Jóźwicki, T., i Matczuk, A.** (2021). Klimatyczny Bilans Wodny za okres od 1 maja do 30 czerwca 2021. <https://www.iung.pl/2021/07/06/klimatyczny-bilans-wodny-za-okres-od-1-maja-do-30-czerwca-2021/>.
36. **Duranti, M., Consonni, A., Magni, C., Sessa, F., i Scarafoni, A.** (2008). The major proteins of lupin seed: Characterisation and molecular properties for use as functional and nutraceutical ingredients. *Trends Food Sci. Technol.* **19**: 624–633.
37. **Dymerska, A. i Grabowska, K.** (2014). Prognozowanie plonów łubinu żółtego w zależności od wybranych scenariuszy zmian klimatu. *Acta Agroph. Monogr.* **2**: 1–98.
38. **Eichenberger, S., Miguez, F., Edwards, J., i Knapp, A.** (2015). Changes in kernel filling with selection for grain yield in a maize population. *Crop Sci.* **55**: 521–526.

39. **Emes, M.J., Bowsher, C.G., Hedley, C., Burrell, M.M., Scrase-Field, E.S.F., Tetlow, I.J.** (2003). Starch synthesis and carbon partitioning in developing endosperm. *J. Exp. Bot.* **54**: 569–575.
40. **Enders, T.A. i Strader, L.C.** (2015). Auxin activity: Past, present, and future. *Am. J. Bot.* **102**: 180–196.
41. **Fauteux, F. i Strömvik, M. V.** (2009). Seed storage protein gene promoters contain conserved DNA motifs in Brassicaceae, Fabaceae and Poaceae. *BMC Plant Biol.* **9**.
42. **Fernández-Pascual, M., Pueyo, J., Felipe, M., Golvano, M., i Lucas, M.** (2007). Singular Features of the Bradyrhizobium-Lupinus Symbiosis. *Dyn. soil, Dyn. plant* **1**: 1–16.
43. **Figueiredo, D.D. i Köhler, C.** (2018). Auxin: a molecular trigger of seed development.
44. **Finkelstein, R., Reeves, W., Ariizumi, T., i Steber, C.** (2008). Molecular aspects of seed dormancy. *Annu. Rev. Plant Biol.* **59**: 387–415.
45. **Finkelstein, R.R. i Gibson, S.I.** (2002). ABA and sugar interactions regulating development: cross-talk or voices in a crowd? *Curr. Opin. Plant Biol.* **5**: 26–32.
46. **Foley, R.C., Gao, L.-L., Spriggs, A., Soo, L.Y., Goggin, D.E., Smith, P.M., Atkins, C.A., i Singh, K.B.** (2011). Identification and characterisation of seed storage protein transcripts from *Lupinus angustifolius*. *BMC Plant Biol.* **11**: 59.
47. **Foley, R.C., Jimenez-Lopez, J.C., Kamphuis, L.G., Hane, J.K., Melser, S., i Singh, K.B.** (2015). Analysis of conglutin seed storage proteins across lupin species using transcriptomic, protein and comparative genomic approaches. *BMC Plant Biol.* **15**.
48. **Footitt, S., Douterelo-Soler, I., Clay, H., i Finch-Savage, W.E.** (2011). Dormancy cycling in *Arabidopsis* seeds is controlled by seasonally distinct hormone-signaling pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**: 20236–20241.
49. **Gacek, E.S., Kotecki, A., Kozak, M., Malarz, W., i Szukała, J.** (2012). Rośliny strączkowe w rolnictwie integrowanym (Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu).
50. **Gagete, A.P., Riera, M., Franco, L., i Rodrigo, M.I.** (2009). Functional analysis of the isoforms of an ABI3-like factor of *Pisum sativum* generated by alternative splicing. *J. Exp. Bot.* **60**: 1703–14.
51. **Gao, X., Zhang, Y., He, Z., i Fu, X.** (2017). Gibberellins. W *Hormone Metabolism and Signaling in Plants* (Elsevier Inc.), ss. 107–160.
52. **Gao, Y., Liu, J., Zhang, Z., Sun, X., Zhang, N., Fan, J., Niu, X., Xiao, F., i Liu, Y.** (2013). Functional characterization of two alternatively spliced transcripts of tomato ABSCISIC ACID INSENSITIVE3 (ABI3) gene. *Plant Mol. Biol.* **82**: 131–145.



53. **Garcia, J., Barker, D.G., i Journet, E.P.** (2006). Seed storage and germination. W The *Medicago truncatula* handbook (CABI Press: Egham, UK), ss. 1–9.
54. **Gazzarrini, S., Tsuchiya, Y., Lumba, S., Okamoto, M., i McCourt, P.** (2004). The Transcription Factor FUSCA3 Controls Developmental Timing in Arabidopsis through the Hormones Gibberellin and Abscisic Acid. *Dev. Cell* **7**: 373–385.
55. **Ge, W., Bu, H., Wang, X., Xia, Y., Martinez, S.A., Wang, X., Qi, W., Liu, K., i Du, G.** (2020). Changes in endogenous hormone contents during seed germination of *Anemone rivularis* var. *flore-minore*. *Glob. Ecol. Conserv.* **24**.
56. **Ghanbari, A.A., Mousavi, S.H., Gorji, A.M., i Rao, I.** (2013). EFFECTS OF WATER STRESS ON LEAVES AND SEEDS OF BEAN (*Phaseolus vulgaris* L.).
57. **Gianinazzi-Pearson, V.** (1996). Plant Cell Responses to Arbuscular Mycorrhizal Fungi: Getting to the Roots of the Symbiosis (American Society of Plant Physiologists).
58. **Gietler, M., Fidler, J., Labudda, M., i Nykiel, M.** (2020). Abscisic Acid—Enemy or Savior in the Response of Cereals to Abiotic and Biotic Stresses? *Int. J. Mol. Sci.* 2020, Vol. 21, Page 4607 **21**: 4607.
59. **Giraudat, J., Hauge, B.M., Valon, C., Smalle, J., Parcy, F., i Goodmana, H.M.** (1992). Isolation of the Arabidopsis AB13 Gene by Positional Cloning.
60. **González-Santiago, A.E., Vargas-Guerrero, B., García-López, P.M., Martínez-Ayala, A.L., Domínguez-Rosales, J.A., i Gurrola-Díaz, C.M.** (2017). Lupinus albus Conglutin Gamma Modifies the Gene Expressions of Enzymes Involved in Glucose Hepatic Production In Vivo. *Plant Foods Hum. Nutr.* **72**: 134–140.
61. **Gray D. i Thomas T.H.** (1982). Seed germination and seedling emergence as influenced by the position of development of the seed on, and chemical applications to, the parent plant. W *The physiology and biochemistry of seed development, dormancy and germination*, Khan A.A, red (Elsevier Biomedical), ss. 81–110.
62. **Guo, X., Hou, X., Fang, J., Wei, P., Xu, B., Chen, M., Feng, Y., i Chu, C.** (2013). The rice GERMINATION DEFECTIVE 1, encoding a B3 domain transcriptional repressor, regulates seed germination and seedling development by integrating GA and carbohydrate metabolism. *Plant J.* **75**: 403–416.
63. **Han, J.D., Li, X., Jiang, C.K., Wong, G.K.S., Rothfels, C.J., i Rao, G.Y.** (2017). Evolutionary analysis of the LAFL genes involved in the land plant seed maturation program. *Front. Plant Sci.* **8**.
64. **Han, Q., Bartels, A., Cheng, X., Meyer, A., Charles An, Y.Q., Hsieh, T.F., i Xiao, W.** (2019). Epigenetics regulates reproductive development in plants. *Plants* **8**.

65. **Hane, J.K. i in.** (2017). A comprehensive draft genome sequence for lupin (*Lupinus angustifolius*), an emerging health food: insights into plant–microbe interactions and legume evolution. *Plant Biotechnol. J.* **15**: 318–330.
66. **Hedden, P. i Phillips, A.L.** (2000). Gibberellin metabolism: new insights revealed by the genes.
67. **Hedden, P. i Thomas, S.G.** (2012). Gibberellin biosynthesis and its regulation. *Biochem. J.* **444**: 11–25.
68. **Henderson, J.T., Li, H.-C., Rider, S.D., Mordhorst, A.P., Romero-Severson, J., Cheng, J.-C., Robey, J., Sung, Z.R., de Vries, S.C., i Ogas, J.** (2004). PICKLE acts throughout the plant to repress expression of embryonic traits and may play a role in gibberellin-dependent responses. *Plant Physiol.* **134**: 995–1005.
69. **Holdsworth, M.J., Bentsink, L., i Soppe, W.J.J.** (2008). Molecular networks regulating *Arabidopsis* seed maturation, after-ripening, dormancy and germination. *New Phytol.*
70. **Horstman, A., Li, M., Heidmann, I., Weemen, M., Chen, B., Muino, J.M., Angenent, G.C., i Boutilier, K.** (2017). The BABY BOOM Transcription Factor Activates the LEC1-ABI3-FUS3-LEC2 Network to Induce Somatic Embryogenesis. *Plant Physiol.* **175**: 848–857.
71. **Howitt, R., Macewan, D., Medellín-Azuara, J., Lund, J., i Sumner, D.** (2015). Economic Analysis of the 2015 Drought For California Agriculture.
72. **Hu, J. i in.** (2008). Potential Sites of Bioactive Gibberellin Production during Reproductive Growth in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **20**: 320.
73. **Hu, W. i in.** (2017). The core regulatory network of the abscisic acid pathway in banana: genome-wide identification and expression analyses during development, ripening, and abiotic stress. *BMC Plant Biol.* **17**.
74. **Hu, Y., Zhou, L., Huang, M., He, X., Yang, Y., Liu, X., Li, Y., i Hou, X.** (2018). Gibberellins play an essential role in late embryogenesis of *Arabidopsis*. *Nat. Plants* **4**: 289–298.
75. **Hu, Y., Zhou, L., Yang, Y., Zhang, W., Chen, Z., Li, X., Qian, Q., Kong, F., Li, Y., Liu, X., i Hou, X.** (2021). The gibberellin signaling negative regulator RGA-LIKE3 promotes seed storage protein accumulation. *Plant Physiol.* **185**: 1697–1707.
76. **Huang, J., Deng, J., Shi, T., Chen, Q., Liang, C., Meng, Z., Zhu, L., Wang, Y., Zhao, F., Yu, S., i Chen, Q.** (2017). Global transcriptome analysis and identification of genes involved in nutrients accumulation during seed development of rice tartary

- buckwheat (*Fagopyrum Tararicum*). *Sci. Rep.* **7**.
77. **Huang, X.Q., He, R.Q., Liao, X.Y., Zhou, B., Peng, W.S., Lin, J.Z., Tang, D.Y., Zhu, Y.H., Zhao, X.Y., i Liu, X.M.** (2014). Effect of exogenous gibberellin on reserve accumulation during the seed filling stage of oilseed rape. *Genet. Mol. Res.* **13**: 2827–2839.
  78. **Islam, S. i Ma, W.** (2016). Lupine. W *Encyclopedia of Food and Health* (Elsevier), ss. 579–585.
  79. **Ito, A., Sakamoto, D., Itai, A., Nishijima, T., Oyama-Okubo, N., Nakamura, Y., Moriguchi, T., i Nakajima, I.** (2016). Effects of GA<sub>3+4</sub> and GA<sub>4+7</sub> application either alone or combined with prohexadione-ca on fruit development of Japanese pear ‘Kosui’. *Hortic. J.* **85**: 201–208.
  80. **Iuchi, S., Kobayashi, M., Yamaguchi-Shinozaki, K., i Shinozaki, K.** (2000). A Stress-Inducible Gene for 9-cis-Epoxycarotenoid Dioxygenase Involved in Abscisic Acid Biosynthesis under Water Stress in Drought-Tolerant Cowpea. *Plant Physiol.* **123**: 553–562.
  81. **Ji, X., Dong, B., Shiran, B., Talbot, M.J., Edlington, J.E., Hughes, T., White, R.G., Gubler, F., i Dolferus, R.** (2011). Control of Abscisic Acid Catabolism and Abscisic Acid Homeostasis Is Important for Reproductive Stage Stress Tolerance in Cereals. *Plant Physiol.* **156**: 647.
  82. **Jia, H., Suzuki, M., i Mccarty, D.R.** (2014). Regulation of the seed to seedling developmental phase transition by the LAFL and VAL transcription factor networks. *Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol.* **3**: 135–145.
  83. **Jimenez-Lopez, J.C.** (2020). Narrow-leaved lupin ( *Lupinus angustifolius* L.)  $\beta$ -conglutin: A multifunctional family of proteins with roles in plant defence, human health benefits, and potential uses as functional food . *Legum. Sci.* **2**.
  84. **Jing, Y., Guo, Q., Zha, P., i Lin, R.** (2019). The chromatin-remodelling factor PICKLE interacts with CONSTANS to promote flowering in Arabidopsis. *Plant Cell Environ.* **42**: 2495–2507.
  85. **Jing, Y. i Lin, R.** (2013). PICKLE is a repressor in seedling de-etiolation pathway. *Plant Signal. Behav.* **8**.
  86. **Jones, S.I. i Vodkin, L.O.** (2013). Using RNA-Seq to Profile Soybean Seed Development from Fertilization to Maturity. *PLoS One* **8**: e59270.
  87. **Kagaya, Y., Toyoshima, R., Okuda, R., Usui, H., Yamamoto, A., i Hattori, T.** (2005). LEAFY COTYLEDON1 Controls Seed Storage Protein Genes through Its

- Regulation of FUSCA3 and ABSCISIC ACID INSENSITIVE3. *Plant Cell Physiol.* **46**: 399–406.
88. **Kanno, Y., Jikumaru, Y., Hanada, A., Nambara, E., Abrams, S.R., Kamiya, Y., i Seo, M.** (2010). Comprehensive Hormone Profiling in Developing Arabidopsis Seeds: Examination of the Site of ABA Biosynthesis, ABA Transport and Hormone Interactions. *Plant Cell Physiol.* **51**: 1988–2001.
  89. **Kim, S.Y., Warpeha, K.M., i Huber, S.C.** (2019). The brassinosteroid receptor kinase, BRI1, plays a role in seed germination and the release of dormancy by cold stratification. *J. Plant Physiol.* **241**.
  90. **Knecht, K.T., Sanchez, P., i Kinder, D.H.** (2020). *Lupine Seeds (Lupinus spp.). Nuts and Seeds in Health and Disease Prevention (Elsevier)*, ss. 393–402.
  91. **Kondhare, K.R., Hedden, P., Kettlewell, P.S., Farrell, A.D., i Monaghan, J.M.** (2014). Quantifying the impact of exogenous abscisic acid and gibberellins on pre-maturity Î±-amylase formation in developing wheat grains. *Sci. Rep.* **4**.
  92. **Kozaki, A. i Aoyanagi, T.** (2022). Molecular Aspects of Seed Development Controlled by Gibberellins and Abscisic Acids. *Int. J. Mol. Sci.* 2022, Vol. 23, Page 1876 **23**: 1876.
  93. **Krawczyk, R., Mrówczyński, M. (1951-), i Instytut Ochrony Roślin.** (2012). *Metodyka integrowanej ochrony łubinu wąskolistnego, żółtego i białego dla producentów : opracowanie zbiorowe (Instytut Ochrony Roślin - Państwowy Instytut Badawczy)*.
  94. **Labanauskas, C.K., Shouse, P., Stolzy, L.H., i Handy, M.F.** (1981). Protein and free amino acids in field-grown cowpea seeds as affected by water stress at various growth stages. *Plant Soil* **63**: 355–368.
  95. **Lalanne, D., Malabarba, J., Ly Vu, J., Hundertmark, M., Delahaie, J., Leprince, O., Buitink, J., i Verdier, J.** (2021). Medicago abi3 splicing isoforms regulate the expression of different gene clusters to orchestrate seed maturation. *Plants* **10**: 1710.
  96. **Lepiniec, L., Devic, M., Roscoe, T.J., Bouyer, D., Zhou, D.-X., Boulard, C., Baud, S., i Dubreucq, B.** (2018). Molecular and epigenetic regulations and functions of the LAFL transcriptional regulators that control seed development. *Plant Reprod.* **31**: 291–307.
  97. **Leyser, O.** (2018). Auxin Signaling. *Plant Physiol.* **176**: 465–479.
  98. **Li, H., Wang, B., Zhang, Q., Wang, J., King, G.J., i Liu, K.** (2017a). Genome-wide analysis of the auxin/indoleacetic acid (Aux/IAA) gene family in allotetraploid rapeseed (*Brassica napus* L.). *BMC Plant Biol.* **17**: 1–14.

99. **Li, R., Chen, L., Wu, Y., Zhang, R., Baskin, C.C., Baskin, J.M., i Hu, X.** (2017b). Effects of Cultivar and Maternal Environment on Seed Quality in *Vicia sativa*. *Front. Plant Sci.* **8**: 1411.
100. **Li, R., Yang, R., Zheng, W., Wu, L., Zhang, C., i Zhang, H.** (2022). Melatonin Promotes SGT1-Involved Signals to Ameliorate Drought Stress Adaption in Rice. *Int. J. Mol. Sci.* **23**: 599.
101. **Liu, B., Sun, G., Liu, C., i Liu, S.** (2021). LEAFY COTYLEDON 2: A regulatory factor of plant growth and seed development. *Genes (Basel).* **12**: 1896.
102. **Liu, X. i Hou, X.** (2018). Antagonistic regulation of ABA and GA in metabolism and signaling pathways. *Front. Plant Sci.* **9**.
103. **Locascio, A., Roig-Villanova, I., Bernardi, J., i Varotto, S.** (2014). Current perspectives on the hormonal control of seed development in *Arabidopsis* and maize: A focus on auxin. *Front. Plant Sci.* **5**.
104. **Lopez-Molina, L., Mongrand, S., McLachlin, D.T., Chait, B.T., i Chua, N.H.** (2002). ABI5 acts downstream of ABI3 to execute an ABA-dependent growth arrest during germination. *Plant J.* **32**: 317–328.
105. **Lucas, M.M., Stoddard, F.L., Annicchiarico, P., Frias, J., Martinez-Villaluenga, C., Sussmann, D., Duranti, M., Seger, A., Zander, P.M., i Pueyo, J.J.** (2015). The future of lupin as a protein crop in Europe. *Front. Plant Sci.* **0**: 705.
106. **Luerßen, H., Kirik, V., Herrmann, P., i Misé, S.** (1998). FUSCA3 encodes a protein with a conserved VP1/ABI3-like B3 domain which is of functional importance for the regulation of seed maturation in *Arabidopsis thaliana*.
107. **Lumba, S., Tsuchiya, Y., Delmas, F., Hezky, J., Provart, N.J., Shi Lu, Q., McCourt, P., i Gazzarrini, S.** (2012). The embryonic leaf identity gene FUSCA3 regulates vegetative phase transitions by negatively modulating ethylene-regulated gene expression in *Arabidopsis*.
108. **Lur, H.S. i Setter, T.L.** (1993). Role of Auxin in Maize Endosperm Development (Timing of Nuclear DNA Endoreduplication, Zein Expression, and Cytokinin). *Plant Physiol.* **103**: 273.
109. **MacMillan, J.** (1984). Analysis of plant hormones and metabolism of gibberellins. *Semin. Ser. - Soc. Exp. Biol.*
110. **Magome, H., Yamaguchi, S., Hanada, A., Kamiya, Y., i Oda, K.** (2008). The DDF1 transcriptional activator upregulates expression of a gibberellin-deactivating gene, GA2ox7, under high-salinity stress in *Arabidopsis*. *Plant J.* **56**: 613–626.

111. **Marciniak, K., Kesy, J., Tretyn, A., i Kopcewicz, J.** (2014). Gibberellins - structure, biosynthesis and deactivation in plants. *Postepy Biochem.* **58**: 14–25.
112. **Martínez-Villaluenga, C., Frías, J., i Vidal-Valverde, C.** (2006). Functional lupin seeds (*Lupinus albus* L. and *Lupinus luteus* L.) after extraction of  $\alpha$ -galactosides. *Food Chem.* **98**: 291–299.
113. **Matilla, A.J.** (2020). Auxin: Hormonal signal required for seed development and dormancy. *Plants* **9**: 1–17.
114. **Mishra, S., Upadhyay, S., i Shukla, R.K.** (2017). The role of strigolactones and their potential cross-talk under hostile ecological conditions in plants. *Front. Physiol.* **7**.
115. **Mousavi-Derazmahalleh, M. i in.** (2018). Exploring the genetic and adaptive diversity of a pan-Mediterranean crop wild relative: narrow-leafed lupin. *Theor. Appl. Genet.* **131**: 887–901.
116. **Muthayya, S., Sugimoto, J.D., Montgomery, S., i Maberly, G.F.** (2014). An overview of global rice production, supply, trade, and consumption. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1324**: 7–14.
117. **Naganowska, B., Wolko, B., Śliwińska, E., i Kaczmarek, Z.** (2003). Nuclear DNA content variation and species relationships in the genus *Lupinus* (Fabaceae). *Ann. Bot.* **92**: 349–355.
118. **Nambara, E. i Marion-Poll, A.** (2003). ABA action and interactions in seeds. *Trends Plant Sci.* **8**: 213–217.
119. **Nayyar, H., Kaur, S., Singh, S., i Upadhyaya, H.D.** (2006). Differential sensitivity of Desi (small-seeded) and Kabuli (large-seeded) chickpea genotypes to water stress during seed filling: Effects on accumulation of seed reserves and yield. *J. Sci. Food Agric.* **86**: 2076–2082.
120. **Nodine, M.D. i Bartel, D.P.** (2010). MicroRNAs prevent precocious gene expression and enable pattern formation during plant embryogenesis. *Genes Dev.* **24**: 2678–2692.
121. **Nonogaki, H.** (2019). ABA responses during seed development and germination. *Adv. Bot. Res.* **92**: 171–217.
122. **Ogas, J., Cheng, J.C., Sung, Z.R., i Somerville, C.** (1997). Cellular differentiation regulated by gibberellin in the *Arabidopsis thaliana* pickle mutant. *Science* (80-. ). **277**: 91–94.
123. **Ogawa, M., Hanada, A., Yamauchi, Y., Kuwahara, A., Kamiya, Y., i Yamaguchi, S.** (2003). Gibberellin biosynthesis and response during *Arabidopsis* seed germination. *Plant Cell* **15**: 1591–1604.

124. **Ötvös, K., Miskolczi, P., Marhavý, P., Cruz-Ramírez, A., Benková, E., Robert, S., i Bakó, L.** (2021). Pickle recruits retinoblastoma related 1 to control lateral root formation in arabidopsis. *Int. J. Mol. Sci.* **22**: 3862.
125. **Pandey, A., Sharma, M., i Pandey, G.K.** (2016). Emerging roles of strigolactones in plant responses to stress and development. *Front. Plant Sci.* **7**: 434.
126. **Parcy, F., Valon, C., Raynal, M., Gaubier-Comella, P., Delseny, M., i Giraudat, J.** (1994). Regulation of Gene Expression Programs during Arabidopsis Seed Development: Roles of the AB13 Locus and of Endogenous Abscisic Acid. *Plant Cell* **6**: 1567–1582.
127. **Park, J., Oh, D.-H., Dassanayake, M., Nguyen, K.T., Ogas, J., Choi, G., i Sun, T.-P.** (2017). Gibberellin Signaling Requires Chromatin Remodeler PICKLE to Promote Vegetative Growth and Phase Transitions. *Plant Physiol.* **173**: 1463–1474.
128. **Park, Y.J., Kim, J.Y., Lee, J.H., Lee, B.D., Paek, N.C., i Park, C.M.** (2020). GIGANTEA Shapes the Photoperiodic Rhythms of Thermomorphogenic Growth in Arabidopsis. *Mol. Plant* **13**: 459–470.
129. **Paula, S., Naulin, P.I., Arce, C., Galaz, C., i Pausas, J.G.** (2016). Lignotubers in Mediterranean basin plants. *Plant Ecol.* **217**: 661–676.
130. **Penfield, S. i MacGregor, D.R.** (2017). Effects of environmental variation during seed production on seed dormancy and germination. *J. Exp. Bot.* **68**: 819–825.
131. **Podlesny, J. i Brzoska, F.** (2010). Uprawa łubinu wąskolistnego i wykorzystanie nasion w żywieniu zwierząt . *Instr. Upowsz. Inst. Uprawy, Nawożenia i Glebozn. w Puławach* **172**: 1–34.
132. **Prasad, P.V.V., Pisipati, S.R., Momčilović, I., i Ristic, Z.** (2011). Independent and Combined Effects of High Temperature and Drought Stress During Grain Filling on Plant Yield and Chloroplast EF-Tu Expression in Spring Wheat. *J. Agron. Crop Sci.* **197**: 430–441.
133. **Quint, M., Drost, H.G., Gabel, A., Ullrich, K.K., Bönn, M., i Grosse, I.** (2012). A transcriptomic hourglass in plant embryogenesis. *Nature* **490**: 98–101.
134. **Reid, J.B., Botwright, N.A., Smith, J.J., O'Neill, D.P., i Kerckhoffs, L.H.J.** (2002). Control of Gibberellin Levels and Gene Expression during De-Etiolation in Pea. *Plant Physiol.* **128**: 734–741.
135. **Roach, D.A. i Wulff, R.D.** (1987). MATERNAL EFFECTS IN PLANTS.
136. **Roscoe, T.T., Guillemot, J., Bessoule, J.-J., Berger, F., i Devic, M.** (2015). Complementation of Seed Maturation Phenotypes by Ectopic Expression of ABSCISIC

- ACID INSENSITIVE3, FUSCA3 and LEAFY COTYLEDON2 in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol.* **56**: 1215–1228.
137. **Roudier, F. i in.** (2011). Integrative epigenomic mapping defines four main chromatin states in Arabidopsis. *EMBO J.* **30**: 1928–1938.
  138. **Ruan, J., Chen, H., Zhu, T., Yu, Y., Lei, Y., Yuan, L., Liu, J., Wang, Z.Y., Kuang, J.F., Lu, W.J., Huang, S., i Li, C.** (2021). Brassinosteroids repress the seed maturation program during the seed-to-seedling transition. *Plant Physiol.* **186**: 534–548.
  139. **Ruiz-Sola, M.Á. i Rodríguez-Concepción, M.** (2012). Carotenoid Biosynthesis in Arabidopsis: A Colorful Pathway. *Arab. B.* **10**: e0158.
  140. **Sadras, V.O. i Egli, D.B.** (2008). Seed size variation in grain crops: Allometric relationships between rate and duration of seed growth. *Crop Sci.* **48**: 408–416.
  141. **Saha, D., Choyal, P., Mishra, U.N., Dey, P., Bose, B., MD, P., Gupta, N.K., Mehta, B.K., Kumar, P., Pandey, S., Chauhan, J., i Singhal, R.K.** (2022). Drought stress responses and inducing tolerance by seed priming approach in plants. *Plant Stress* **4**.
  142. **Salazar-Cerezo, S., Martínez-Montiel, N., García-Sánchez, J., Pérez-y-Terrón, R., i Martínez-Contreras, R.D.** (2018). Gibberellin biosynthesis and metabolism: A convergent route for plants, fungi and bacteria. *Microbiol. Res.* **208**: 85–98.
  143. **Santos-Mendoza, M., Dubreucq, B., Baud, S., Parcy, F., Caboche, M., i Lepiniec, L.** (2008). Deciphering gene regulatory networks that control seed development and maturation in Arabidopsis. *Plant J.* **54**: 608–620.
  144. **Sarnowska, E., Gratkowska, D.M., Sacharowski, S.P., Cwiek, P., Tohge, T., Fernie, A.R., Siedlecki, J.A., Koncz, C., i Sarnowski, T.J.** (2016). The Role of SWI/SNF Chromatin Remodeling Complexes in Hormone Crosstalk. *Trends Plant Sci.* **21**: 594–608.
  145. **Sauer, M., Robert, S., i Kleine-Vehn, J.** (2013). Auxin: simply complicated. *J. Exp. Bot.* **64**: 2565–2577.
  146. **Sehgal, A., Sita, K., Kumar, J., Kumar, S., Singh, S., Siddique, K.H.M., i Nayyar, H.** (2017). Effects of drought, heat and their interaction on the growth, yield and photosynthetic function of lentil (*Lens culinaris medikus*) genotypes varying in heat and drought sensitivity. *Front. Plant Sci.* **8**.
  147. **Sehgal, A., Sita, K., Siddique, K.H.M., Kumar, R., Bhogireddy, S., Varshney, R.K., HanumanthaRao, B., Nair, R.M., Prasad, P.V.V., i Nayyar, H.** (2018). Drought or/and heat-stress effects on seed filling in food crops: Impacts on functional biochemistry, seed yields, and nutritional quality. *Front. Plant Sci.* **871**: 1705.



148. **Silverstone, A.L., Chang, C.W., Krol, E., i Sun, T.P.** (1997). Developmental regulation of the gibberellin biosynthetic gene GA1 in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **12**: 9–19.
149. **Singh, K.B., Kamphuis, L.G., i Nelson, M.N.** (2020). *The Lupin Genome*. K.B. Singh, L.G. Kamphuis, i M.N. Nelson, red (Springer International Publishing: Cham).
150. **Sirko, A., Wawrzyńska, A., Brzywczy, J., i Sieńko, M.** (2021). Control of aba signaling and crosstalk with other hormones by the selective degradation of pathway components. *Int. J. Mol. Sci.* **22**.
151. **Slater, S.M.H., Yuan, H.Y., Lulsdorf, M.M., Vandenberg, A., Zaharia, L.I., Han, X., i Abrams, S.R.** (2013). Comprehensive hormone profiling of the developing seeds of four grain legumes. *Plant Cell Rep.* **32**: 1939–1952.
152. **Smýkal, P., Vernoud, V., Blair, M.W., Soukup, A., i Thompson, R.D.** (2014). The role of the testa during development and in establishment of dormancy of the legume seed. *Front. Plant Sci.* **5**: 1–19.
153. **Srikanth, A. i Schmid, M.** (2011). Regulation of flowering time: all roads lead to Rome. *Cell. Mol. Life Sci.* **68**: 2013–2037.
154. **Srivastava, L.M.** (2002). Seed Development and Maturation. W *Plant Growth and Development* (Elsevier), ss. 431–446.
155. **Stone, S.L., Braybrook, S.A., Paula, S.L., Kwong, L.W., Meuser, J., Pelletier, J., Hsieh, T.F., Fischer, R.L., Goldberg, R.B., i Harada, J.J.** (2008). *Arabidopsis* LEAFY COTYLEDON2 induces maturation traits and auxin activity: Implications for somatic embryogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**: 3151–3156.
156. **Stone, S.L., Kwong, L.W., Yee, K.M., Pelletier, J., Lepiniec, L., Fischer, R.L., Goldberg, R.B., i Harada, J.J.** (2001). LEAFY COTYLEDON2 encodes a B3 domain transcription factor that induces embryo development. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**: 11806–11811.
157. **Suzuki, M., Wang, H.H.-Y., i McCarty, D.R.** (2007). Repression of the LEAFY COTYLEDON 1/B3 regulatory network in plant embryo development by VP1/ABSCISIC ACID INSENSITIVE 3-LIKE B3 genes. *Plant Physiol.* **143**: 902–11.
158. **Takahashi, F., Kuromori, T., Urano, K., Yamaguchi-Shinozaki, K., i Shinozaki, K.** (2020). Drought Stress Responses and Resistance in Plants: From Cellular Responses to Long-Distance Intercellular Communication. *Front. Plant Sci.* **11**: 1407.
159. **Takahashi, F., Suzuki, T., Osakabe, Y., Betsuyaku, S., Kondo, Y., Dohmae, N., Fukuda, H., Yamaguchi-Shinozaki, K., i Shinozaki, K.** (2018). A small peptide

- modulates stomatal control via abscisic acid in long-distance signaling. *Nature* **556**: 235–238.
- 160. Takahashi, M., Kamiya, Y., Takahashi, N., i Graebe, J.E.** (1986). Metabolism of gibberellins in a cell-free system from immature seeds of *Phaseolus vulgaris* L. *Planta* **168**: 190–199.
- 161. Tal, I. i in.** (2016). The Arabidopsis NPF3 protein is a GA transporter. *Nat. Commun.* 2016 71 **7**: 1–11.
- 162. Tan, S., Luschnig, C., i Friml, J.** (2021). Pho-view of Auxin: Reversible Protein Phosphorylation in Auxin Biosynthesis, Transport and Signaling. *Mol. Plant* **14**: 151–165.
- 163. The State of Food and Agriculture** (2020). (FAO) <http://www.fao.org/documents/card/en/c/cb1447en>
- 164. Thompson, A.J., Jackson, A.C., Parker, R.A., Morpeth, D.R., Burbidge, A., i Taylor, I.B.** (2000). Abscisic acid biosynthesis in tomato: regulation of zeaxanthin epoxidase and 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase mRNAs by light/dark cycles, water stress and abscisic acid.
- 165. To, A., Valon, C., Savino, G., Guilleminot, J., Devic, M., Giraudat, J., i Parcy, F.** (2006). A network of local and redundant gene regulation governs Arabidopsis seed maturation. *Plant Cell* **18**: 1642–1651.
- 166. Tsukagoshi, H., Morikami, A., i Nakamura, K.** (2007). Two B3 domain transcriptional repressors prevent sugar-inducible expression of seed maturation genes in Arabidopsis seedlings. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**: 2543–2547.
- 167. Tsukagoshi, H., Saijo, T., Shibata, D., Morikami, A., i Nakamura, K.** (2005). Analysis of a sugar response mutant of Arabidopsis identified a novel B3 domain protein that functions as an active transcriptional repressor. *Plant Physiol.* **138**: 675–685.
- 168. Unterholzner, S.J., Rozhon, W., Papacek, M., Ciomas, J., Lange, T., Kugler, K.G., Mayer, K.F., Sieberer, T., i Poppenberger, B.** (2015). Brassinosteroids are master regulators of gibberellin biosynthesis in Arabidopsis. *Plant Cell* **27**: 2261–2272.
- 169. Varbanova, M. i in.** (2007). Methylation of gibberellins by Arabidopsis GAMT1 and GAMT2. *Plant Cell* **19**: 32–45.
- 170. Verdier, J. i Thompson, R.D.** (2008). Transcriptional regulation of storage protein synthesis during dicotyledon seed filling. *Plant Cell Physiol.* **49**: 1263–1271.
- 171. Verma, S., Attuluri, V.P.S., i Robert, H.S.** (2022). Transcriptional control of

- Arabidopsis seed development. *Planta* **255**: 90.
172. **Voisin, A.S., Cazenave, A.B., Duc, G., i Salon, C.** (2013). Pea nodule gradients explain C nutrition and depressed growth phenotype of hypernodulating mutants. *Agron. Sustain. Dev.* **33**: 829–838.
  173. **Wang, H., Zhang, Y., Xiao, N., Zhang, G., Wang, F., Chen, X., i Fang, R.** (2020). Rice GERMIN-LIKE PROTEIN 2-1 Functions in Seed Dormancy under the Control of Abscisic Acid and Gibberellic Acid Signaling Pathways. *Plant Physiol.* **183**: 1157–1170.
  174. **Wang, Q., Quan, S., i Xiao, H.** (2019). Towards efficient terpenoid biosynthesis: manipulating IPP and DMAPP supply. *Bioresour. Bioprocess.* 2019 61 **6**: 1–13.
  175. **Wasternack, C., Forner, S., Strnad, M., i Hause, B.** (2013). Jasmonates in flower and seed development. *Biochimie* **95**: 79–85.
  176. **Weston, D.E., Elliott, R.C., Lester, D.R., Rameau, C., Reid, J.B., Murfet, I.C., i Ross, J.J.** (2008). The Pea DELLA Proteins LA and CRY Are Important Regulators of Gibberellin Synthesis and Root Growth. *Plant Physiol.* **147**: 199.
  177. **Wilhite, D.A. i Glantz, M.H.** (1985). Understanding: the Drought Phenomenon: The Role of Definitions. *Water Int.* **10**: 111–120.
  178. **Willmann, M.R., Mehalick, A.J., Packer, R.L., i Jenik, P.D.** (2011). MicroRNAs regulate the timing of embryo maturation in Arabidopsis. *Plant Physiol.* **155**: 1871–1884.
  179. **Wilmowicz, E., Frankowski, K., Kućko, A., Świdziński, M., de Dios Alché, J., Nowakowska, A., i Kopcewicz, J.** (2016). The influence of abscisic acid on the ethylene biosynthesis pathway in the functioning of the flower abscission zone in *Lupinus luteus*. *J. Plant Physiol.* **206**: 49–58.
  180. **Wilson, R.L., Kim, H., Bakshi, A., i Binder, B.M.** (2014). The Ethylene Receptors ETHYLENE RESPONSE1 and ETHYLENE RESPONSE2 Have Contrasting Roles in Seed Germination of Arabidopsis during Salt Stress. *Plant Physiol.* **165**: 1353.
  181. **Wiśniewski, J.R., Zougman, A., Nagaraj, N., i Mann, M.** (2009). Universal sample preparation method for proteome analysis. *Nat. Methods* **6**: 359–362.
  182. **De Wit, M., Galvão, V.C., i Fankhauser, C.** (2016). Light-Mediated Hormonal Regulation of Plant Growth and Development. *Annu. Rev. Plant Biol.* **67**: 513–537.
  183. **Wolko, B., Clements, J.C., Naganowska, B., Nelson, M.N., i Yang, H.** (2011). *Lupinus*. W *Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources* (Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg), ss. 153–206.

184. Wu, J., Gao, F., Li, T., Guo, H., Zhang, L., Fan, Y., Chen, A., Wang, J., Shi, F., Shan, G., Guo, H., i Zeng, F. (2021). Genome-Wide cis-Regulatory Element Based Discovery of Auxin-Responsive Genes in Higher Plant. *Genes* 2022, Vol. 13, Page 24  
13: 24.
185. Xia, T., Zhan, Y., Mu, Y., Zhang, J., i Xu, W. (2022). MNSs-mediated N-glycan processing is essential for auxin homeostasis in Arabidopsis roots during alkaline response. *iScience* 25.
186. Xiong, L. i Zhu, J.K. (2003). Regulation of abscisic acid biosynthesis. *Plant Physiol.* 133: 29–36.
187. Xue, L.W., Du, J.B., Yang, H., Xu, F., Yuan, S., i Lin, H.H. (2009). Brassinosteroids counteract abscisic acid in Germination and growth of Arabidopsis. *Zeitschrift fur Naturforsch. - Sect. C J. Biosci.* 64: 225–230.
188. Yamada, Y., Otake, M., Furukawa, T., Shindo, M., Shimomura, K., Yamaguchi, S., i Umehara, M. (2019). Effects of Strigolactones on Grain Yield and Seed Development in Rice. *J. Plant Growth Regul.* 38: 753–764.
189. Yamaguchi, S. (2008). Gibberellin metabolism and its regulation. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59: 225–251.
190. Yamamoto, A., Kagaya, Y., Usui, H., Hobo, T., Takeda, S., i Hattori, T. (2010). Diverse Roles and Mechanisms of Gene Regulation by the Arabidopsis Seed Maturation Master Regulator FUS3 Revealed by Microarray Analysis. *Plant Cell Physiol.* 51: 2031–2046.
191. Yamauchi, Y., Ogawa, M., Kuwahara, A., Hanada, A., Kamiya, Y., i Yamaguchi, S. (2004). Activation of Gibberellin Biosynthesis and Response Pathways by Low Temperature during Imbibition of Arabidopsis thaliana Seeds. *Plant Cell* 16: 367–378.
192. Yan, A. i Chen, Z. (2020). The Control of Seed Dormancy and Germination by Temperature, Light and Nitrate. *Bot. Rev.* 86: 39–75.
193. Yang, J., Zhang, J., Wang, Z., Liu, K., i Wang, P. (2006). Post-anthesis development of inferior and superior spikelets in rice in relation to abscisic acid and ethylene. *J. Exp. Bot.* 57: 149–160.
194. Yang, J., Zhang, J., Wang, Z., Xu, G., i Zhu, Q. (2004). Activities of Key Enzymes in Sucrose-to-Starch Conversion in Wheat Grains Subjected to Water Deficit during Grain Filling. *Plant Physiol.* 135: 1621.
195. Yang, R., Hong, Y., Ren, Z., Tang, K., Zhang, H., Zhu, J.K., i Zhao, C. (2019). A role for PICKLE in the regulation of cold and salt stress tolerance in arabidopsis. *Front.*

Plant Sci. **10**.

196. **Yu, Y., Xue, L., i Yang, L.** (2014). Winter legumes in rice crop rotations reduces nitrogen loss, and improves rice yield and soil nitrogen supply. *Agron. Sustain. Dev.* **34**: 633–640.
197. **Yuan, L., Song, X., Zhang, L., Yu, Y., Liang, Z., Lei, Y., Ruan, J., Tan, B., Liu, J., i Li, C.** (2021). The transcriptional repressors VAL1 and VAL2 recruit PRC2 for genome-wide Polycomb silencing in Arabidopsis. *Nucleic Acids Res.* **49**: 98–113.
198. **Zeevaart, J.A.D., Talon, M., i Wilson, T.M.** (1991). Stem Growth and Gibberellin Metabolism in Spinach in Relation to Photoperiod. W Gibberellins (Springer New York), ss. 273–279.
199. **Zentella, R., Zhang, Z.L., Park, M., Thomas, S.G., Endo, A., Murase, K., Fleet, C.M., Jikumaru, Y., Nambara, E., Kamiya, Y., i Sun, T.P.** (2007). Global analysis of DELLA direct targets in early gibberellin signaling in Arabidopsis. *Plant Cell* **19**: 3037–3057.
200. **Zha, P., Liu, S., Li, Y., Ma, T., Yang, L., Jing, Y., i Lin, R.** (2020). The Evening Complex and the Chromatin-Remodeling Factor PICKLE Coordinately Control Seed Dormancy by Directly Repressing DOG1 in Arabidopsis. *Plant Commun.* **1**: 100011.
201. **Zhang, H., Bishop, B., Ringenberg, W., Muir, W.M., i Ogas, J.** (2012). The CHD3 remodeler PICKLE associates with genes enriched for trimethylation of histone H3 lysine 27. *Plant Physiol.* **159**: 418–32.
202. **Zhang, Y., Zhang, B., Yan, D., Dong, W., Yang, W., Li, Q., Zeng, L., Wang, J., Wang, L., Hicks, L.M., i He, Z.** (2011). Two Arabidopsis cytochrome P450 monooxygenases, CYP714A1 and CYP714A2, function redundantly in plant development through gibberellin deactivation. *Plant J.* **67**: 342–353.
203. **Zhang, Y., Zhu, Y., Peng, Y., Yan, D., Li, Q., Wang, J., Wang, L., i He, Z.** (2008). Gibberellin homeostasis and plant height control by EUI and a role for gibberellin in root gravity responses in rice. *Cell Res.* 2008 183 **18**: 412–421.
204. **Zhao, L., Chang, W.C., Xiao, Y., Liu, H.W., i Liu, P.** (2013). Methylerythritol phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis. *Annu. Rev. Biochem.* **82**: 497–530.
205. **Zhao, X.-Y., Yu, X.-H., Liu, X.-M., i Lin, C.-T.** (2007). Light Regulation of Gibberellins Metabolism in Seedling Development. *J. Integr. Plant Biol.* **49**: 21–27.
206. **Zhu, Y. i in.** (2006). *ELONGATED UPPERMOST INTERNODE* Encodes a Cytochrome P450 Monooxygenase That Epoxidizes Gibberellins in a Novel Deactivation Reaction in Rice. *Plant Cell* **18**: 442–456.

- 207. Zou, M., Guan, Y., Ren, H., Zhang, F., i Chen, F.** (2008). A bZIP transcription factor, OsABI5, is involved in rice fertility and stress tolerance. *Plant Mol. Biol.* **66**: 675–683.

