

Instytut Chemii Bioorganicznej
Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu
Zespół Fizjologii Molekularnej Roślin

"Identyfikacja pełnych transporterów ABCG
Medicago truncatula oraz wstępna analiza
funkcjonalna wybranych genów zaangażowanych
w odpowiedź na stres biotyczny"

„Identification of full size ABCG transporters in *Medicago truncatula* and
functional analysis of selected genes involved in biotic stress response”

mgr Joanna Banasiak

Praca wykonana pod kierunkiem
dr. hab Michała Jasińskiego

Poznań, 2013

Praca finansowana z następujących środków:

Grant MNiSW N301 114 32/3928 „Udział transporterów ABC w oddziaływaniach pomiędzy rośliną motylkowatą *Medicago truncatula* a symbiotycznymi bakteriami asymilującymi azot atmosferyczny”

Grant MNiSW NN301 392139 promotorski "Identyfikacja pełnych transporterów ABCG *Medicago truncatula* oraz wstępna analiza funkcjonalna wybranych genów zaangażowanych w odpowiedź na stres biotyczny"

Stypendium dla doktorantów w ramach projektu pt.: „Wsparcie stypendialne dla doktorantów na kierunkach uznawanych za strategiczne z punktu widzenia rozwoju Wielkopolski” Poddziałanie 8.2.2 Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki 2011/2012

Publikacje powstałe w trakcie realizacji pracy doktorskiej:

Joanna Banasiak, Wanda Biała, Anna Staszaków, Barbara Swarczewicz, Ewa Kępczyńska, Marek Figlerowicz, Michał Jasiński. A Medicago truncatula ABC transporter belonging to subfamily G modulates the level of isoflavonoids. *Journal of Experimental Botany*, 2013, doi: 10.1093/jxb/ers380.

Anna Staszaków, Barbara Swarczewicz, **Joanna Banasiak**, Dorota Muth, Michał Jasiński, Maciej Stobiecki. LC/MS profiling of flavonoid glycoconjugates isolated from hairy roots, suspension root cell cultures and seedling roots of *Medicago truncatula*. *Metabolomics*, 2011 Dec;7(4):604-613.

Michał Jasiński, **Joanna Banasiak**, Marcin Radom, Anna Kalitkiewicz, Marek Figlerowicz. Full-Size ABC Transporters from the ABCG Subfamily in *Medicago truncatula*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2009, 22(8): 921-931.

Michał Jasiński, **Joanna Banasiak**, Marek Figlerowicz. Transportery PDR – czyli historia jeszcze nienapisana. *Od syntezy chemicznej do biologii syntetycznej*, Ośrodek Wydawnictw Naukowych, 2009: 147-160.

Michał Jasiński, **Joanna Banasiak**, Marek Figlerowicz. Roślinne transportery ABC. Na pograniczu chemii i biologii, Wydawnictwo Naukowe UAM, 2007 t. XVII: 257-274.

Serdeczne dziękuję:

Promotorowi, **dr hab. Michałowi Jasińskiemu**,
za opiekę naukową, przekazaną wiedzę, zaangażowanie oraz możliwość rozwoju

Koleżankom i kolegom z Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN,
szczególnie Ani Urbanowicz, Asi Śliwiak, Agnieszce Gruszczyńskiej,
Piotrowi Małeckiemu i Miłoszowi Ruszkowskiemu,
za czas spędzony wspólnie w Instytucie i nasze „obiadki czwartkowe”

Studentom,
z którymi współpracowałam: Pawłowi Rodziewiczowi, Andrzejowi Szewczakowi,
Iwonie Ziomkiewicz, Wandzie Białej, Sylwii Głazowskiej i Maciejowi Grajewskiemu

Iwonie Femiak,
za bezcenną pomoc, życzliwość i cierpliwość

Prof. Markowi Figlerowiczowi,
za poświęcony czas i pomoc

Rodzicom i rodzeństwu,
za wszystko

Tomkowi,
za wsparcie i wiarę we mnie

STRESZCZENIE

Transportery ABC (ang. *ATP Binding Cassette transporters*) tworzą jedną z najliczniejszych rodzin białkowych. Charakteryzują się specyficznym modularnym typem budowy i obecnością silnie zachowawczego rejonu będącego miejscem wiązania ATP, tzw. kasety ATP. Białka te stały się obiektem intensywnych badań biomedycznych kiedy dowiedziono, że biorą udział w usuwaniu chemioterapeutyków z ssaczych komórek nowotworowych, przyczyniając się do wykształcenia tzw. oporności wielolekowej. Jak dotąd stosunkowo mało wiadomo o roślinnych transporterach ABC, szczególnie tych pochodzących z roślin bobowatych (*Fabaceae*). Do białek ABC należą m.in. pełne transportery ABCG (dawniej PDR – białka plejotropowej oporności). Istnieje szereg przesłanek świadczących o tym, że przynajmniej część z nich odgrywa ważną rolę w modulacji oddziaływań roślina–środowisko. Prawdopodobnie biorą one udział w transporcie cząstek sygnałnych bądź metabolitów wtórnych o właściwościach obronnych.

W prezentowanej pracy doktorskiej przeprowadzono identyfikację oraz wstępną charakterystykę genów *ABCG* obecnych w genomie modelowej rośliny bobowatej *Medicago truncatula*. Na podstawie uzyskanych danych do dalszych analiz funkcjonalnych wybrano *MtABCG10*, który jest potencjalnie zaangażowany w odpowiedź rośliny na stres biotyczny. Badania prowadzono z zastosowaniem narzędzi bioinformatycznych, technik biologii molekularnej, mikroskopii, hodowli *in vitro*, patogenów roślinnych oraz analiz metabolomicznych. Wykazano, że ekspresja badanego genu jest wyraźnie indukowana przez elicytor grzybowy, wywołujący podstawową odpowiedź obronną. Co więcej ustalono, iż głównym miejscem aktywności promotora *MtABCG10*, w różnych organach *Medicago*, są komórki otaczające wiązki przewodzące. Wykorzystując specyficzne przeciwciała, określono lokalizację białka *MtABCG10* w błonie komórkowej (plazmolemmie). Ponadto stwierdzono, iż wyciszenie ekspresji genu *MtABCG10* skutkuje obniżeniem akumulacji (izo)flawonoidów, będących prekursorami fitoaleksyny – medikarpiny, co przekłada się na wzrost wrażliwości *Medicago* na infekcje grzybowe.

Przedstawione w niniejszej pracy wyniki pozwalają sądzić, iż białko MtABCG10 jest zaangażowane w modulację poziomu (izo)flawonoidów, syntetyzowanych de novo w odpowiedzi na atak patogenów.

SUMMARY

ATP Binding Cassette transporters (ABC transporters) form one of the largest and evolutionary conserved family of proteins present in all kingdoms. These proteins use ATP hydrolysis as a source of energy to transport a wide variety of substrates across cellular membranes. Historically they are mostly known for being involved in the so-called multidrug resistance phenomena observed, for instance, during anticancer therapy.

My doctoral work focused on plant ABC transporters, belonging to the full size ABCG subfamily (former PDR), from model legume *Medicago truncatula*. There is growing evidence that some of these proteins play a role in plant defense or signaling system. Despite the importance of ABCG-based transport for plant–microbe interactions, they are still poorly recognized in legumes.

The aim of my research was identification and functional characterization of *Medicago* full size ABCG transporters implicated in biotic stress response. Here, we identify and classify 19 genes coding full size ABCG proteins in *M. truncatula*. A preliminary expression profile analysis of *MtABCG* has shown that two of them, namely *MtABCG10* and *MtABCG16*, are up-regulated during infection with pathogenic fungi *Phoma medicaginis* and *Fusarium culmorum*. Expression of *MtABCG10* was also strongly induced after the treatment with PAMPs (pathogen associated molecular patterns), like oligosaccharides from a fungal cell wall. *MtABCG10* transcript occurs mainly within vascular tissues, and the corresponding protein is located in the plasma membrane. We observed that *MtABCG10* silencing significantly lowered the amount of various (iso)flavonoids (precursors of the phytoalexin medicarpin) in hairy roots and, as a consequence caused higher susceptibility of *Medicago* towards *Fusarium oxysporum* infection.

Based on the presented data, it is proposed that *MtABCG10* transporter might modulate isoflavonoid levels during the defense response associated with *de novo* synthesis of phytoalexins.

WYKAZ SKRÓTÓW:

ABA - kwas abscysynowy (ang. *abscisic acid*)

AOH - homologi ABC1 (ang. *ABC1 homologues*)

ATH - homologi ABC2 (ang. *ABC2 homologues*)

ATM - mitochondrialne białka ABC (ang. *ABC transporter of the mitochondria*)

avr - czynnik awirulencji (ang. *avirulence factor*)

białka ABC – białka posiadające kasetę wiążącą ATP (ang. *ATP binding cassette proteins*)

białka PR – białka powiązane z patogenezą (ang. *pathogenesis-related proteins*)

Ct - cykl progowy (ang. *threshold cycle*)

EST- sekwencyjne znaczniki ekspresji (ang. *expressed sequence tags*)

ET – etylen (ang. *ethylene*)

ETI – odporność wyzwalana przez efektor (ang. *effector-triggered immunity*)

ETS - wrażliwość wyzwalana przez efektor (ang. *effector-triggered susceptibility*)

EV – pusty wektor (ang. *empty vector*)

FST - sekwencje flankujące Tnt1 (ang. *flanking sequence tag*)

GCN20 - homologi białka GCN20 drożdży (ang. *general control non-repressible*)

gen R – gen odporności (ang. *resistance gene*)

GFP – białko zielonej fluorescencji (ang. *green fluorescent protein*)

IBA - kwas indolilo-3-masłowy (ang. *indole-3-butyric acid*)

IFS – syntaza izoflawonowa (ang. *isoflavone synthase*)

IPTG – izopropylotiogalaktozyd (ang. *isopropylthiogalactoside*)

ISR - indukowana odporność systemiczna (ang. *induced systemic resistance*)

JA - kwas jasmonowy (ang. *jasmonic acid*)

MAMPs - wzorce molekularne powiązane z mikroorganizmami (ang. *microbe-associated molecular patterns*)

MAPK - kinazy aktywowane mitogenami (ang. *mitogen-activated protein kinases*)

mdr - oporność wielolekowa (ang. *multidrug resistance*)

MDR - transportery odpowiedzialne za oporność wielolekową (ang. *multidrug resistance transporters*)

MeJA – jasmonian metylu (ang. *methyl jasmonate*)

Mi – frakcja mikrosomalna (ang. *microsomal fraction*)

MRP - białka powiązane z opornością wielolekową (ang. *multidrug resistance-associated proteins*)

NBD - domena wiążąca nukleotyd (ang. *nucleotide binding domain*)

NBF - rejon, będący miejscem wiązania ATP (ang. *nucleotide binding fold*)

NHR - odporność typu non-host (ang. *non-host resistance*)

PAL – amoniako-liaza fenyloalaninowa (ang. *phenylalanine ammonia-lyase*)

PAMPs – wzorce molekularne powiązane z patogenezą (ang. *pathogen-associated molecular patterns*)

PAT - polarny transport auksyn (ang. *polar auxin transport*)

PCR - łańcuchowa reakcja polimerazy (ang. *polymerase chain reaction*)

PDR - białka plejotropowej oporności (ang. *pleiotropic drug resistance proteins*)

PEG - polietylenoglikol (ang. *polyethylene glycol*)

PGP - homologi glikoproteiny P (ang. *P-glycoprotein homologues*)

PGPR - bakterie promujące wzrost roślin (ang. *plant growth-promoting rhizobacteria*)

PMP - białka peroksysomów (ang. *peroxisomal membrane proteins*)

PR – białka powiązane z patogenezą (ang. *pathogenesis-related proteins*)

PRR - receptory rozpoznające wzorce molekularne (ang. *pattern recognition receptors*)

PTI – odpowiedź obronna wyzwalana przez PAMP (ang. *PAMP-triggered immunity*)

qRT-PCR - ilościowa reakcja PCR w czasie rzeczywistym (ang. *quantitative RealTime PCR*)

RLI - inhibitor RNazyL (ang. *RNase L inhibitor*)

RNAi - interferencja RNA (*RNA interference*)

ROS - reaktywne formy tlenu (ang. *reactive oxygen species*)

SA - kwas salicylowy (ang. *salicylic acid*)

SAR - nabyta odporność systemiczna (ang. *systemic acquired resistance*)

SNF - symbiotyczne wiązanie azotu atmosferycznego (ang. *symbiotic nitrogen fixation*)

SPE - ekstrakcja do fazy stałej (ang. *solid phase extraction*)

TAP - transportery biorące udział w odpowiedzi immunologicznej (ang. *transporters associated with antigen processing*)

TMD - domena transbłonowa (ang. *transmembrane domain*)

TTSS - system sekrecji typu III (ang. *type-III secretion system*)

WBC - homologi białek ABC u *Drosophila*, których aktywność wpływa na kolor oczu (ang. *white-brown complex homologues*)

X-Gal - 5-bromo-4-chloro-3-indolylo- β -D-galaktozyd (ang. *5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside*)

X-Gluc - 5-bromo-4-chloro-3-indolylo- β -D-glukuronid (ang. *5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronide*)

β -AS - syntaza β -amyryny (ang. *β -amylin synthase*)

SPIS TREŚCI

1. PRZEGLĄD LITERATURY	1
1.1 Białka ABC	1
1.1.1 Wprowadzenie	1
1.1.2 Budowa białek ABC.....	2
1.1.3 Mechanizm transportu.....	5
1.1.4 Klasyfikacja roślinnych białek ABC.....	8
1.2 Roślinne pełne transportery ABCG/PDR	12
1.3 System odpornościowy roślin	19
1.5 <i>Medicago truncatula</i> modelowa roślina bobowata	25
2. CEL PRACY	29
3. MATERIAŁY I METODY	30
3.1 Praca z materiałem roślinnym	30
3.1.1 Sterylizacja i kiełkowanie nasion <i>M. truncatula</i>	30
3.1.2 Hodowla <i>M. truncatula</i> w doniczkach.....	30
3.1.3 Hodowla <i>M. truncatula</i> w warunkach <i>in vitro</i>	32
3.1.4 Hodowla zawiesinowa <i>M. truncatula</i>	32
3.1.5 Hodowla korzeni włosowatych <i>M. truncatula</i>	33
3.1.6 Izolacja protoplastów z hodowli zawiesinowej <i>M. truncatula</i>	35
3.1.7 Transformacja <i>M. truncatula</i> z udziałem <i>A. rhizogenes</i>	36
3.1.8 Transformacja i regeneracja <i>M. truncatula</i> poprzez somatyczną embriogenezę.....	36
3.2 Praca z bakteriami	39
3.2.1 Przygotowanie bakterii symbiotycznych <i>S. meliloti</i>	39
3.2.2 Przygotowanie komórek kompetentnych do elektroporacji.....	39
3.2.3 Transformacja komórek <i>E. coli/Agrobacterium</i> metodą elektroporacji.....	40
3.2.4 Transformacja komórek <i>E. coli</i> metodą szoku cieplnego	41
3.2.5 Przygotowanie stoków glicerolowych bakterii <i>E. coli</i> , <i>A. rhizogenes</i> i <i>A. tumefaciens</i>	41
3.3 Praca z grzybami	42

3.3.1 Przygotowanie zarodników grzybów: <i>F.oxysporum</i> , <i>F.culmorum</i> <i>i P. medicaginis</i> do infekcji <i>M. truncatula</i>	42
3.3.2 Przygotowanie elicytora grzybowego (oligosacharydy ścian komórkowych <i>P. medicaginis</i>)	42
3.4 Praca z kwasami nukleinowymi	44
3.4.1 Izolacja genomowego DNA.....	44
3.4.2 Izolacja całkowitego RNA	44
3.4.3 Odwrotna transkrypcja.....	44
3.4.4 Łańcuchowa reakcja polimerazy (PCR).....	45
3.4.5 Elektroforeza fragmentów DNA i RNA w żelu agarozowym.....	47
3.4.6 Oczyszczanie produktów reakcji PCR	47
3.4.7 Oczyszczanie fragmentów DNA z żelu agarozowego.....	47
3.4.8 Ilościowa reakcja PCR w czasie rzeczywistym (qRT-PCR)	47
3.4.9 Ligacja do wektora pGEM-T-Easy	49
3.4.10 Izolacja plazmidowego DNA z komórek bakteryjnych na małą skalę	49
3.4.11 Sekwencjonowanie wklonowanych produktów PCR.....	50
3.4.12 Hybrydyzacja Southern blot	51
3.5 Praca z materiałem białkowym	53
3.5.1 Izolacja frakcji mikrosomalnej (Mi) do analizy białek błonowych	53
3.5.2 Izolacja frakcji błony komórkowej metodą rozdziału między dwie fazy (ang. <i>Two Phase Partition</i>)	54
3.5.3 Oznaczanie zawartości białka metodą Bradford	54
3.5.4 Elektroforeza białek SDS-PAGE.....	55
3.5.5 Elektrotransfer półsuchy (ang. <i>Semi-Dry</i>).....	56
3.3.6 Hybrydyzacja Western blot	56
3.6 Analiza przestrzenna aktywności promotora <i>MtABCG</i>	57
3.6.1 Przygotowanie konstruktów fuzyjnych Promotor <i>MtABCG10::GUS</i>	57
3.6.2 Analiza histochemiczna	58
3.7 Immunolokalizacja subkomórkowa metodą „whole-mount”	60
3.7.1 Utrwalanie komórek <i>M. truncatula</i>	60
3.7.2 Redukcja autofluorescencji	60
3.7.3 Nadtrawianie ścian komórkowych i permeabilizacja błony komórkowej	61

3.7.4 Blokowanie i inkubacja z przeciwciałami.....	61
3.7.5 Obserwacja mikroskopowa	61
3.8 Wyciszenie ekspresji genu <i>MtABCG10</i>	62
3.8.1 Przygotowanie konstruktów wyciszających z wykorzystaniem wektora działającego w systemie Gateway.....	62
3.8.2 Transformacja <i>M. truncatula</i> i selekcja transgenicznego materiału	63
3.9 Analiza metabolitów wtórnych	63
3.9.1 Izolacja związków fenolowych z hodowli korzeni włosowatych.....	63
3.9.2 Izolacja związków fenolowych z pożywki, metodą ekstrakcji do fazy stałej (SPE; <i>Solid Phase Extraction</i>)	63
3.9.3 Analiza związków fenolowych metodą chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas z jonizacją poprzez elektrorozpraszanie (LC/ESI/MS).....	64
4. WYNIKI	66
4.1 Identyfikacja i wstępna charakterystyka pełnych transporterów ABCG z <i>M. truncatula</i>.....	66
4.2 Analiza profilu ekspresji genów kodujących pełne transportery ABCG z <i>M. truncatula</i>.....	74
4.3 Analiza funkcjonalna genu <i>MtABCG10</i>.....	84
4.3.1 <i>MtABCG10</i> i jego dwa bliskie homologi	84
4.3.2 Analiza profilu ekspresji genu <i>MtABCG10</i>	92
4.3.3 Określenie organo- i tkankowospecyficznego wzoru ekspresji <i>MtABCG10</i> ..	96
4.3.4 Określenie lokalizacji subkomórkowej białka <i>MtABCG10</i>	100
4.3.5 Wyciszenie ekspresji genu <i>MtABCG10</i> w korzeniach włosowatych <i>M. truncatula</i>	107
4.3.6 Analizy fenotypowe	114
4.3.6.1 Porównanie profilu związków fenolowych pomiędzy materiałem kontrolnym i z wyciszoną ekspresją <i>MtABCG10</i>	114
4.3.6.2 Porównanie podatności roślin kontrolnych i z wyciszoną ekspresją genu <i>MtABCG10</i> na infekcje grzybowe	123
5. DYSKUSJA	126
6. LITERATURA	135
7. ZAŁĄCZNIKI.....	145

1. PRZEGLĄD LITERATURY

1.1 Białka ABC

1.1.1 Wprowadzenie

Białka ABC (ang. *ATP Binding Cassette proteins*) tworzą jedną z najliczniejszych i najszerzej rozpowszechnionych rodzin białkowych. Znaleźć je można niemal we wszystkich grupach systematycznych począwszy od *Archea*, a skończywszy na ssakach. Charakteryzują się specyficznym domenowym typem budowy i obecnością silnie zachowawczego rejonu wiążącego ATP, tzw. kasety ATP (Kang et al. 2011; Rea 2007).

Stwierdzono, że u *Escherichia coli* prawie 5% genomu zajmują geny kodujące transportery ABC (Blattner et al. 1997). W genomie człowieka zidentyfikowano ich 48 (Dean et al. 2001), podobną liczbę odkryto u *Caenorhabditis elegans* (60) i muszki owocowej *Drosophila melanogaster* (57) (Sheps et al. 2004), a nieco mniej u drożdży piekarniczych *Saccharomyces cerevisiae* (30) (Decottignies i Goffeau 1997) oraz patogennych drożdży *Candida albicans* (28) (Gaur et al. 2005). Szczególnie bogate w geny kodujące białka ABC wydają się być rośliny. U *Arabidopsis thaliana* czy *Oryza sativa* ich liczba przekracza 120 (Garcia et al. 2004; Verrier et al. 2008), a w przypadku modelowej rośliny bobowatej *Lotus japonicus* sięga 91 (Sugiyama et al. 2006).

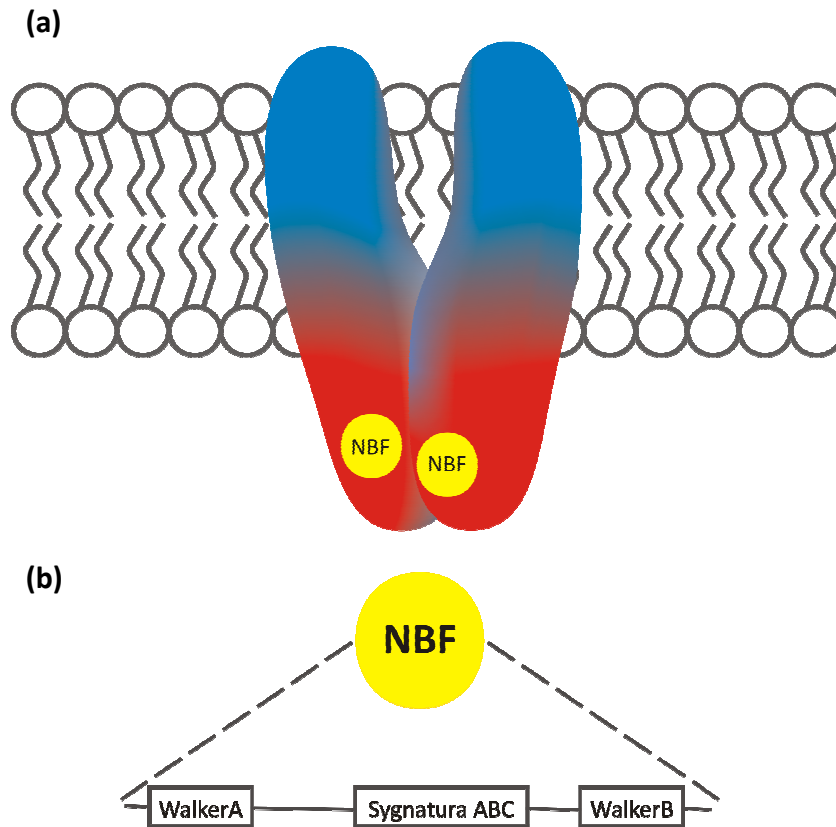
Białka ABC najczęściej opisywane były w kontekście zjawiska zwanego opornością wielolekową (mdr, ang. *multidrug resistance*). Polega ono na usuwaniu chemioterapeutyków z ssaczycy komórek nowotworowych. Za eliminację cytostatyków podczas kuracji odpowiadają głównie przedstawiciele dwóch podrodzin białek ABC. Pierwsze to tzw. transportery oporności wielolekowej (MDR, ang. *multidrug resistance transporters*), drugie to białka powiązane z opornością wielolekową (MRP, ang. *multidrug resistance-associated proteins*) (Stefkova et al. 2004). Lekooporność o podobnym podłożu stanowi istotny problem także w terapii zakażeń bakteryjnych i grzybic. Mikroorganizmy je wywołujące są bowiem zdolne do usuwania leków używanych do ich zwalczania (Gulshan i Moye-Rowley 2007). Warto pamiętać, że dysfunkcja niektórych białek ABC jest przyczyną szeregu chorób genetycznych, takich

jak mukowiscydoza, choroba tangierska, adrenoleukodystrofia, czy wrodzony hiperinsulinizm (Stefkova et al. 2004).

W organizmach eukariotycznych białka ABC biorą udział m.in. w procesach takich jak detoksyfikacja (Klein et al. 2006), β -oksydacja w peroksysomach (Shani i Valle 1996), translacja (Andersen i Leever 2007). Uczestniczą także w odpowiedzi immunologicznej (Abele i Tampe 2004). Pełnią funkcje transporterów peptydów, cukrów, lipidów, syntetycznych i naturalnych toksyn (Verrier et al. 2008). Mogą również działać jako kanały jonowe (Riordan 2005) lub ich regulatory (Aittoniemi et al. 2009). U roślin dodatkowo zaangażowane są w dystrybucję hormonów roślinnych, takich jak auksyny (Lin i Wang 2005) czy kwas abscysynowy (ABA, *ang. abscisic acid*) (Kang et al. 2010), regulację otwierania i zamykania aparatów szparkowych (Gaedeke et al. 2001; Kang et al. 2010), formowanie kutikuli (Bessire et al. 2011) oraz transport metabolitów wtórnych (Badri et al. 2012; Jasinski et al. 2001). Bakteryjne białka ABC, np. tzw. permeazy periplazmatyczne, odpowiadają za import substancji odżywczych. Inne zaangażowane są w wydzielanie związków sygnałnych, czynników wirulencji bądź toksyn (Davidson et al. 2008).

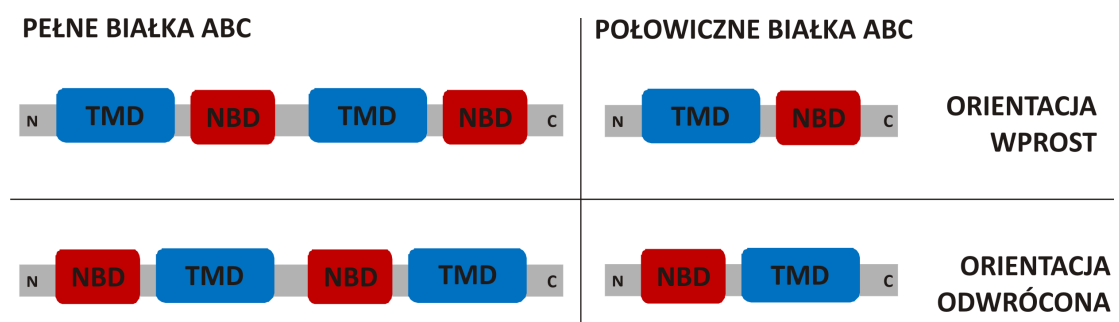
1.1.2 Budowa białek ABC

Rodzina białek ABC obejmuje głównie zakotwiczone w błonie transportery, a także rozpuszczalne białka cytoplazmatyczne. Ich wspólną cechą jest obecność cytozolowej domeny NBD (*ang. nucleotide binding domain* – domena wiążąca nukleotyd), zawierającej silnie zachowawczy rejon, będący miejscem wiązania ATP, tzw. NBF (*ang. nucleotide binding fold*) (**Rycina 1.1a**). Rejon NBF wykazuje 30-50% identyczności aminokwasowej w obrębie wszystkich poznanych transporterów ABC. Szczególnie zachowawcze motywy to Walker A (GX4GK[ST]) i Walker B ((hydrofobowe)₄[DE]), między którymi znajduje się tzw. sygnatura ABC ([LIVMFY]S[SG]GX3[RKA][LIVMYA]X[LIVFM][AG]) (**Rycina 1.1b**). Większość białek ABC zawiera także hydrofobową domenę transbłonową TMD (*ang. transmembrane domain* – domena transbłonowa). Jest ona zazwyczaj zbudowana z sześciu alfa helis i odpowiada za wiązanie substratu (**Rycina 1.1a**) (Rea 2007; Zolnerciks et al. 2011).



Rycina 1.1. Schemat przedstawiający pełny transporter ABC w błonie (a) oraz organizację regionu NBF z układem zachowawczych motywów Walker A, B i sygnatury (b). (Niebieski – TMD, czerwony – NBD, żółty – NBF).

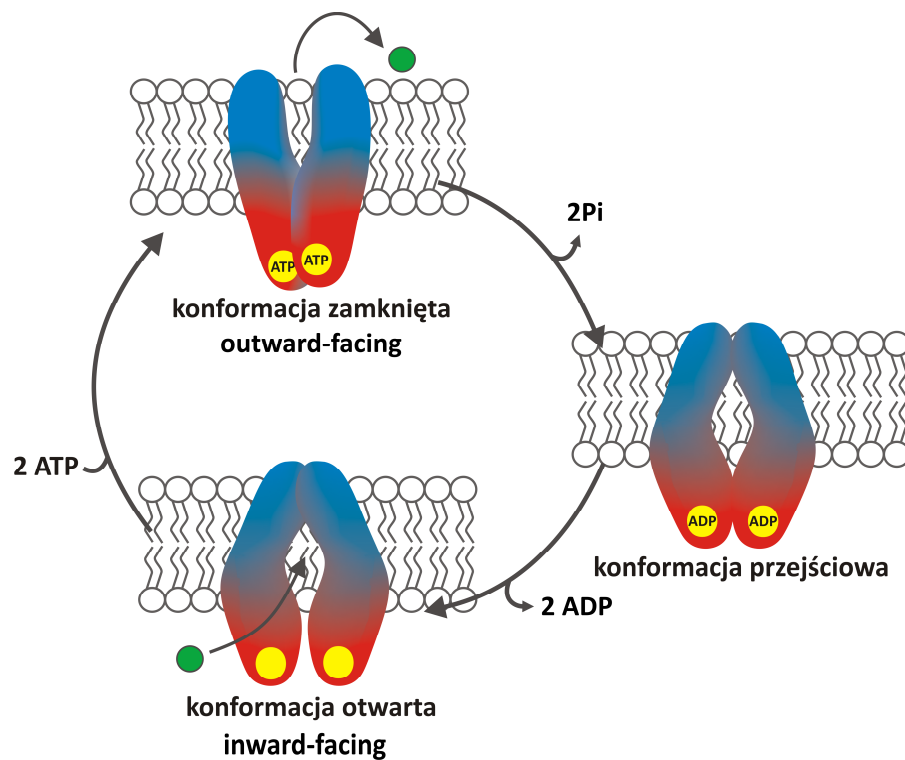
Ze względu na budowę białka ABC podzielić można na: (i) pełne (ang. *full size*), które złożone są z dwóch domen NBD i dwóch domen TMD, (ii) połowiczne (ang. *half size*) posiadające po jednej domenie NBD i TMD oraz (iii) rozpuszczalne zbudowane tylko z domen NBD. Usytuowanie względem siebie domen NBD i TMD pozwala wyróżnić tzw. białka ABC o orientacji wprost (ang. *forward*), kiedy na N-końcu białka znajduje się domena transbłonowa i o orientacji odwróconej (ang. *reverse*), kiedy na N-końcu białka występuje domena wiążąca nukleotyd (**Rycina 1.2**). U Prokaryota poszczególne domeny zwykle kodowane są przez odrębne geny, często będące elementem wspólnego operonu (Holland et al. 2003). W przypadku organizmów eukariotycznych wszystkie domeny wchodzące w skład funkcjonalnego białka mogą być kodowane przez jeden gen (pełne transportery) lub dwa geny (połowiczne transportery). Uważa się, że transportery połowiczne aktywne są tylko w postaci homo- bądź heterodimeru, co stanowi ekwiwalent struktury pełnych białek ABC (Kang et al. 2011).



Rycina 1.2. Podział białek ABC ze względu na liczbę oraz ułożenie względem siebie domen NBD i TMD (czerwony – NBD, niebieski – TMD).

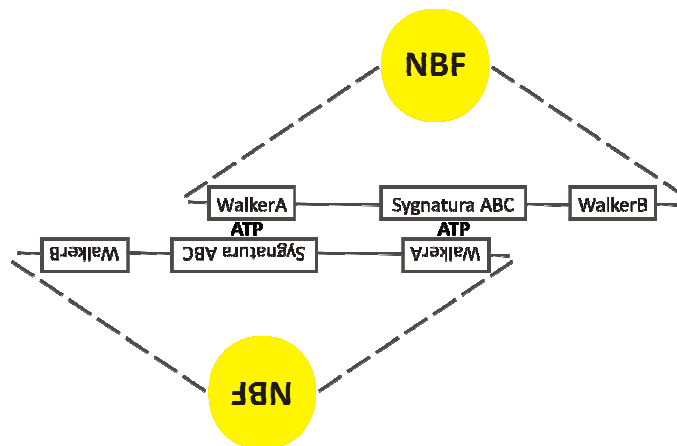
1.1.3 Mechanizm transportu

Większość genów *ABC* koduje transbłonowe białka. Wykorzystują one hydrolizę ATP do transportu poprzez błony biologiczne szeregu niepowiązanych ze sobą strukturalnie i funkcjonalnie związków. Wśród nich zidentyfikowano zarówno eksportery, jak i importery (Kang et al. 2011). Bakteryjne importery wymagają obecności dodatkowego białka wiążącego (*ang. binding protein*), odpowiedzialnego za przechwycenie substratu i przekazanie go transporterowi ABC. Mechanizm działania transporterów ABC nie jest do końca poznany, co wynika z braku dostatecznej liczby danych biochemicznych i krystalograficznych. Jeden z obecnie proponowanych sposobów działania transporterów ABC, opracowany na podstawie dostępnych danych, przedstawiony został na **Rycinie 1.3** i **Rycinie 1.4**. Zakłada on, że białka ABC mogą występować przynajmniej w trzech stanach konformacyjnych: otwartej pozbawionej nukleotydu (*ang. inward-facing*), zamkniętej ze związanymi cząsteczkami ATP (*ang. outward-facing*) i przejściowej ze związanymi cząsteczkami ADP. Cykl transportu rozpoczyna się od przyjęcia przez białko konformacji otwartej z oddalonymi od siebie domenami NBD. Po związaniu substratu, a następnie dwóch cząsteczek ATP dochodzi do dimeryzacji domen NBD. W wyniku tego rearanzacji ulegają helisy transbłonowe, a białko przejmuje konformację zamkniętą. W tym momencie kieszeń wiążąca substrat eksponowana zostaje po przeciwnej stronie błony i dochodzi do uwolnienia cząsteczki transportowanej. Następnie ATP ulega hydrolizie, oddysocjując cząsteczki ADP i białko powraca do stanu wyjściowego (**Rycina 1.3**) (Hohl et al. 2012; Procko et al. 2009).



Rycina 1.3. Proponowany, uproszczony mechanizm działania transporterów ABC. Cykl transportu rozpoczyna się od przyjęcia przez białko tzw. konformacji otwartej z oddalonymi od siebie domenami NBD, co umożliwia związanie substratu w obrębie części transbłonowej białka. Przyłączenie substratu, a następnie dwóch cząsteczek ATP powoduje zbliżenie się domen NBD w konsekwencji czego dochodzi do reorganizacji helis transbłonowych i przejścia do tzw. konformacji zamkniętej, w której kieszeń wiążąca substrat eksponowana jest po przeciwnej stronie błony. Taki układ przestrzenny białka umożliwia uwolnienie substratu. Następnie dochodzi do hydrolizy ATP, oddysocjowania ADP i powrotu białka do stanu wyjściowego. (Niebieski – TMD, czerwony – NBD, żółty – NBF, zielony – substrat). Na podstawie Hohl et al. 2012; Procko et al. 2009.

Miejsce wiązania cząsteczki ATP oraz centrum katalityczne znajdują się w obrębie NBF. Tworzą je wspomniane wcześniej trzy zachowawcze motywy: Walker A, Walker B i sygnatura ABC. Rejony NBF dwóch sąsiadujących domen NBD są ułożone względem siebie w orientacji głowa do ogona. Dzięki temu możliwe jest wiązanie reszty fosforanowej cząsteczki γ ATP pomiędzy Walker A jednej domeny a rejon sygnatury ABC drugiej i *vice versa*, co prowadzi do ich dimeryzacji. Walker B każdej z domen NBD zaangażowany jest w hydrolizę cząsteczki ATP, po której następuje rozluźnienie połączenia między domenami cytozylicznymi (**Rycina 1.4**) (Rea 2007; Zolnerciks et al. 2011).



Rycina 1.4. Ułożenie względem siebie (w orientacji głowa do ogona) rejonów NBF dwóch sąsiadujących domen NBD.

1.1.4 Klasyfikacja roślinnych białek ABC

Istnieje kilka systemów klasyfikacji i nazewnictwa białek ABC. Najważniejsze z nich to stworzony przez HUGO (ang. *Human Genome Organisation*) system klasyfikacji ludzkich i mysich białek ABC oraz zaproponowany przez Sanchez-Fernandez system klasyfikacji dla białek ABC z *A. thaliana*, który znalazł zastosowanie także dla innych roślin (Dean i Annilo 2005; Dean et al. 2001; Sanchez-Fernandez et al. 2001). W obu systemach podstawowe kryterium podziału białek ABC na poszczególne podrodziny obejmowało następujące elementy: pokrewieństwo filogenetyczne, homologię sekwencji, liczbę domen wchodzących w skład białka, orientację domen względem siebie oraz dodatkowe modyfikacje struktury. W systemie HUGO białka ABC podzielono na siedem podrodzin (ABCA-ABCG), dodatkowo z czasem włączono kolejną podrodzinę ABCH, której przedstawiciele wprawdzie nie znaleziono u ludzi ale wiadomo, że występują np. u owadów czy ryb. Roślinne białka ABC podzielono na 12 podrodzin. Tworząc ich nazwy wzięto pod uwagę podobieństwo do ludzkich bądź drożdżowych homologów lub efekt fenotypowy jaki ich dysfunkcja powoduje. W 2008 roku Verrier i współpracownicy dokonali próby ujednoczenia nomenklatury dla wszystkich eukariotycznych białek ABC, proponując zaadaptowanie nazewnictwa przyjętego przez HUGO dla transporterów roślinnych (**Tabela 1.1**) (Verrier et al. 2008).

Białka należące do podrodziny **ABCA** jak dotąd nie zostały funkcjonalnie scharakteryzowane u roślin. Wiadomo, że u człowieka odpowiadają za transport cholesterolu, retinolu i lipoprotein. U *Arabidopsis* występuje jeden przedstawiciel tzw. pełnych białek ABCA (dawniej AOH, homologów ABC1, ang. *ABC1 homologues*) oraz 11 połowicznych białek ABCA (dawniej ATH, homologów ABC2, ang. *ABC2 homologues*). Wszystkie posiadają orientację wprost, dodatkowo pełny transporter zawiera długą domenę łącznikową (Kang et al. 2011; Rea 2007; Verrier et al. 2008).

Wśród podrodziny **ABCB** znaleźć można pełne i połowiczne białka, u których domeny także przyjmują orientację wprost. Do najlepiej poznanych należą transportery dawniej określane jako MDR/PGP (białka odpowiedzialne za zjawisko oporności wielolekowej/homologi glikoproteiny P, ang. *multidrug resistance proteins/P-glycoprotein homologues*). U człowieka biorą one udział w usuwaniu związków toksycznych w tym leków, a ich nadekspresja w komórkach nowotworowych prowadzi do wykształcenia tzw. oporności wielolekowej. Roślinne białka MDR mogą uczestniczyć

w transporcie ksenobiotyków, auksyn oraz metabolitów wtórnych. Poznanie roli, takich białek jak AtMDR1/AtPGP19, AtPGP1 i AtPGP4 w translokacji auksyn, pozwoliło na uzupełnienie obowiązującego chemiosmotycznego modelu opisującego polarny transport auksyn (PAT, ang. *polar auxin transport*). Do połowicznych białek ABCB należą (i) transportery biorące udział w odpowiedzi immunologicznej (TAP, ang. *transporters associated with antigen processing*), których funkcja u roślin nie została jak dotąd określona oraz (ii) mitochondrialne białka ABC (ATM, ang. *ABC transporters of the mitochondrion*), zaangażowane w obniżanie wrażliwości rośliny na metale ciężkie (Kang et al. 2011; Rea 2007; Verrier et al. 2008).

Podrodzina **ABCC** obejmuje białka związane z opornością wielolekową (MRP, ang. *multidrug resistance-associated proteins*). Są to pełne transportery ABC, o orientacji wprost, które posiadają dodatkową domenę hydrofobową na N-końcu (tzw. TMD0) oraz krótką sekwencję łącznikową bogatą w aminokwasy polarne. Białka ABCC stanowią zarówno w przypadku komórek zwierzęcych jak i roślinnych ważny element systemu detoksyfikacji. Pokazano, że u roślin pełnią one funkcję pomp koniugatów glutationu (GSH), które kosztem energii pochodzącej z hydrolizy ATP transportują ksenobiotyki, a także metale ciężkie do wakuoli. Transportery ABCC są także odpowiedzialne za odkładanie antocyjanów czy endogennych produktów rozpadu chlorofilu do tego przedziału komórkowego. Co więcej mogą działać jako regulatory kanałów jonowych i w ten sposób regulować otwieranie i zamykanie aparatów szparkowych (Kang et al. 2011; Rea 2007; Verrier et al. 2008).

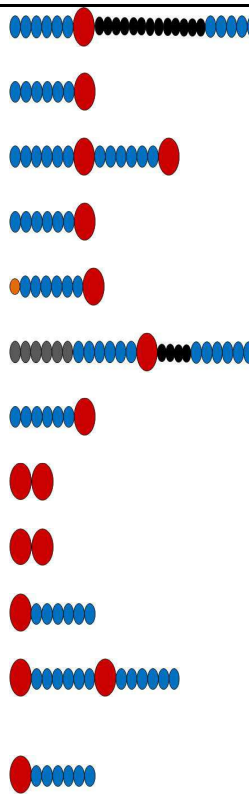












W skład podrodziny **ABCD** wchodzi głównie połowiczne białka peroksysomów (PMP, ang. *peroxisomal membrane proteins*), które w formie homo- bądź hetero dimerów uczestniczą w imporcie kwasów tłuszczowych do peroksysomów (Kang et al. 2011; Rea 2007; Verrier et al. 2008).

Przedstawiciele kolejnych dwóch podrodzin **ABCE** i **ABCF** są przykładem rozpuszczalnych białek ABC, pozbawionych domen transbłonowych. Białka ABCE, znane także jako homologi inhibitora RNazyL (ang. *RNase L inhibitor*), u roślin wykazują zdolność supresji wyciszania genów z udziałem RNA (RNAi). Funkcja przedstawicieli ABCF (homologów GCN20 drożdży) u roślin nie jest znana, wiadomo, że u ludzi i drożdży aktywują kinazę elf-2 α (Kang et al. 2011; Rea 2007; Verrier et al. 2008).

Podrodzinę **ABCG** tworzą połowiczne białka WBC (homologi białek ABC u *Drosophila*, których aktywność wpływa na kolor oczu, ang. *White Brown Complexes*) oraz pełne białka PDR (białka pleiotropowej oporności, ang. *pleiotropic drug resistance*). Wszystkie posiadają odwróconą orientację domen. Podrodzina ta jest wyraźnie rozpowszechniona u roślin, ponad 40 genów *ABCG* zidentyfikowano w genomach Arabidopsis i ryżu. Pokazano, że roślinne białka WBC m.in. biorą udział w formowaniu kutikuli, w transporcie ABA, czy nawiązywaniu mikoryzy arbuskularnej (Kang et al. 2011). O ile WBC są obecne zarówno u bakterii jak i organizmów eukariotycznych to białka PDR znaleźć można prawie wyłącznie w królestwie roślin i grzybów. Wiadomo, że drożdżowe transportery PDR mogą wypompowywać z komórki m.in. leki, fungicydy, herbicydy czy antybiotyki. Co więcej zaobserwowano, iż białka te mają istotne znaczenie dla grzybów patogennych, umożliwiając usuwanie produkowanych przez roślinę związków ograniczających infekcję. W przypadku roślin, wiele wskazuje na to, że odgrywają one również ważną rolę w interakcjach rośliny ze środowiskiem (Kang et al. 2011; Rea 2007; Verrier et al. 2008). Szczegółowy opis roślinnych transporterów PDR zamieszczono w podrozdziale 1.2.

Ostatnia podrodzina **ABCH** obejmuje połowiczne białka ABC o odwróconej orientacji domen, które nie występują w organizmach roślinnych (Kang et al. 2011; Rea 2007; Verrier et al. 2008)

Tabela 1.1. Zestawienie dwóch systemów klasyfikacji roślinnych białek ABC, systemu HUGO i systemu zaproponowanego przez Sanchez-Fernandez, z podanymi historycznymi nazwami roślinnych białek ABC (Dean i Annilo 2005; Dean et al. 2001; Sanchez-Fernandez et al. 2001). (Niebieski – TMD, czerwony – NBD, szary – TMD0, czarny – łącznik między domenami, zielony – C-terminalne przedłużenie, pomarańczowy – amfipatyczny N-końcowy peptyd sygnałny). Na podstawie Rea 2007, Verrier et al. 2008.

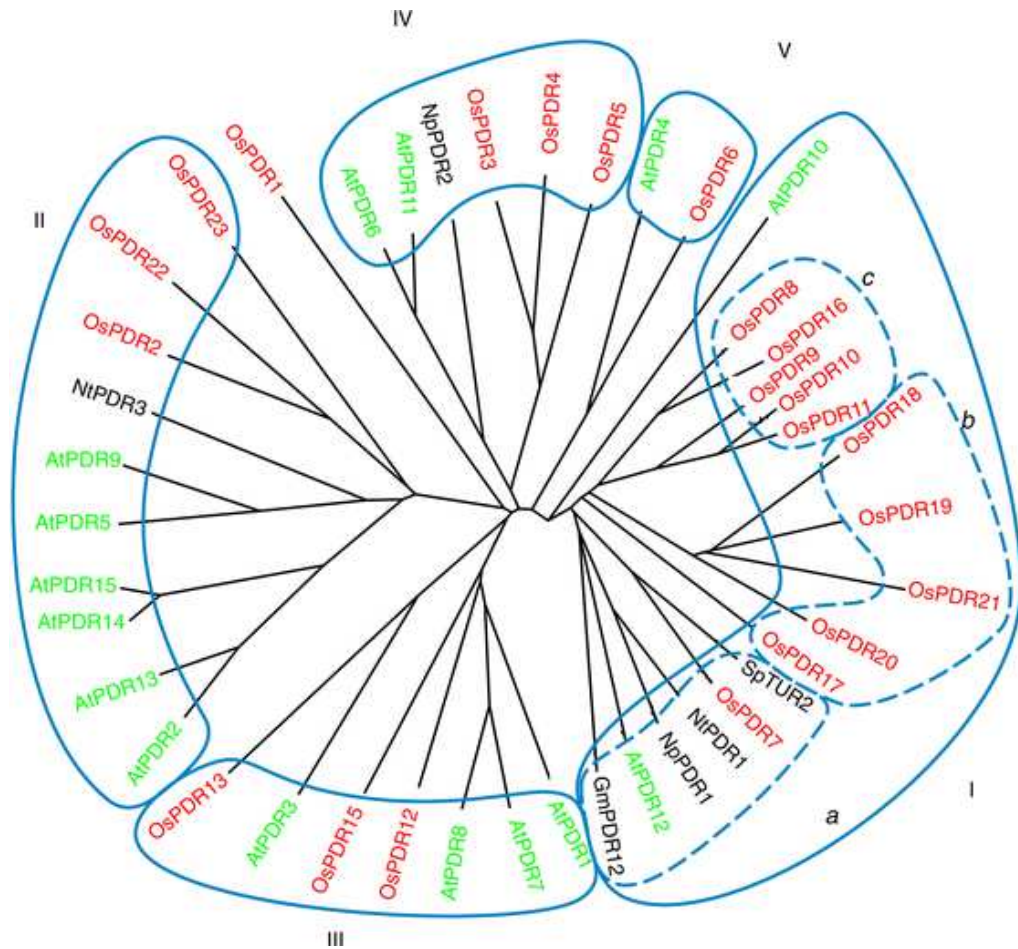
HUGO	Sanchez-Fernandez	Organizacja domen		Grupa systematyczna
ABCA	homologi ABC1 (AOH)	(TMD-NBD) ₂		eukariota (bez drożdży)
	homologi ABC2 (ATH)	TMD-NBD		eukariota
ABCB	białka odpowiedzialne za zjawisko oporności wielolekowej (MDR)	(TMD-NBD) ₂		prokariota i eukariota
	transportery biorące udział w odpowiedzi immunologicznej (TAP)	TMD-NBD		eukariota
	mitochondrialne białka ABC (ATM)	TMD-NBD		eukariota
ABCC	białka związane ze zjawiskiem oporności wielolekowej (MRP)	TMD0 (TMD-NBD) ₂		eukariota
ABCD	białka peroksysomów (PMP)	TMD-NBD; (TMD-NBD) ₂		bakterie i eukariota
ABCE	inhibitor RNazyL (RLI)	NBD-NBD		archea i eukariota
ABCF	homologi białka GCN20 drożdży (GCN20)	NBD-NBD		bakterie i eukariota
ABCG	homologi białek ABC u <i>Drosophila</i> , których aktywność wpływa na kolor oczu (WBC)	NBD-TMD		bakterie i eukariota
	białka plejotropowej oporności (PDR)	(NBD-TMD) ₂		rośliny, grzyby, łęgniowce, śluzowce i brunatnice
ABCH	-	NBD-TMD		prokariota, śluzowce, szkarłupnie, owady, ryby

1.2 Roślinne pełne transportery ABCG/PDR

Jak opisano powyżej, białka plejotropowej oporności (PDR) razem z homologami białek WBC w najnowszej klasyfikacji ujęte zostały w jedną podrodzinę ABCG. Przy czym białka WBC, według nowej nomenklatury, należą do tzw. połowicznych (NBD-TMD) natomiast PDR pełnych (NBD-TMD)₂ transporterów ABCG (**Tabela 1.1**) (Verrier et al. 2008). Ze względu na to, że w literaturze stosowane są zarówno historyczne jak i nowe nazwy dla pełnych białek ABCG w niniejszej pracy będę się posługiwać nimi zamiennie.

Roślinne pełne transportery ABCG charakteryzują się wysokim stopniem podobieństwa sekwencji aminokwasowej, rzadko spadającym poniżej 50% identyczności. Jest to szczególnie widoczne w przypadku domen NBD. W ich obrębie, oprócz motywów charakterystycznych dla wszystkich białek ABC, znaleźć można cztery rejony zawierające sześć lub więcej identycznych aminokwasów, które opisane zostały jako tzw. sygnatury PDR: sygnatura PDR1 (LLLGPP), sygnatura PDR2 (GLDSST), sygnatura PDR3 (GLDARAAIIVMR) i sygnatura PDR4 (VCTIHQPSI). Podobna sytuacja nie występuje w pozostałych podrodzinach (van den Brule i Smart 2002).

Projekty sekwencjonowania genomów różnych roślin umożliwiły systematyczną identyfikację i klasyfikację genów kodujących pełne białka ABCG. W genomach *A. thaliana* i *O. sativa* zidentyfikowano kolejno 15 i 23 geny je kodujące (Crouzet et al. 2006; Sanchez-Fernandez et al. 2001). Na podstawie podobieństwa sekwencji, pełne białka ABCG podzielono na pięć klastrów o różnych rozmiarach. W każdym z nich znaleźć można przedstawicieli pochodzących zarówno z rośliny dwuliściennej (*A. thaliana*) jak i jednoliściennej (*O. sativa*), co może świadczyć o tym, że podział na poszczególne grupy nastąpił przed rozdzieleniem się tych dwóch linii ewolucyjnych. Pod kątem funkcjonalnym najlepiej scharakteryzowane są pełne transportery ABCG należące do klastra I (Moons 2008) (**Rycina 1.5**).



Rycina 1.5. Analiza filogenetyczna roślinnych pełnych białek ABCG (PDR) z: *A. thaliana* (At), *O. sativa* (Os), *Nicotiana plumbaginifolia* (Np.), *Nicotiana tabacum* (Nt), *Spirodela polyrrhiza* (Sp) i *Glycine max* (Gm). Białka homologiczne z różnych roślin zostały zgrupowane w pięć oddzielonych klastrow I-V. Dodatkowo klastrow I podzielony został na trzy podgrupy a-c (Źródło: Moons 2008).

Historycznie pierwszym opisanym pełnym transporterem ABCG u roślin był SpTUR2 z wodnej rośliny *S. polyrrhiza*. Stwierdzono, że poziom ekspresji genu *SpTUR2* ulega podwyższeniu na skutek działania niskich temperatur i zasolenia, a także pod wpływem hormonu stresowego, jakim jest ABA (Smart i Fleming 1996).

Do tej pory zidentyfikowano endogenne substraty tylko dla nielicznych pełnych transporterów ABCG tj.: NpPDR1 z *N. plumbaginifolia* (Jasinski et al. 2001), AtABCG36/AtPDR8 (Kim et al. 2007), AtABCG37/AtPDR9 (Ruzicka et al. 2010) i AtABCG40/AtPDR12 (Kang et al. 2010) z *A. thaliana*, PhPDR1 z *Petunia hybrida* (Kretschmar et al. 2012) oraz AtABCG29 także z *A. thaliana* (Alejandro et al. 2012). Białka te są kolejno zaangażowane m.in. w reakcje obronne, obniżanie wrażliwości na metale ciężkie, modulację poziomu auksyn, ochronę przed nadmierną utratą wody, oddziaływania symbiotyczne i biosyntezę lignin.

NpPDR1 (NpABC1) jest białkiem błony komórkowej i najprawdopodobniej odpowiada za wydzielanie na powierzchnię liści tytoniu diterpenu sklareolu. Związek ten jest toksyczny dla patogennych bakterii i grzybów dzięki czemu chroni roślinę przed infekcjami. Pokazano, że potraktowanie hodowli komórkowej tytoniu sklareolem i jego analogiem sklareolidem powoduje zwiększenie poziomu zarówno transkryptu jak i białka NpPDR1. Co więcej dowiedziono zależność między wzrostem akumulacji białka NpPDR1 w plazmolemie, a ilością eksportowanego z komórki radioaktywnie wyznakowanego sklareolidu (Jasinski et al. 2001). O udziale NpPDR1 w mechanizmach obronnych tytoniu świadczyć może także fakt, że ekspresja genu go kodującego jest wyraźnie indukowana w wyniku infekcji patogennymi i niepatogennymi bakteriami z rodzaju *Pseudomonas* (*P. syringae* pv *tabaci*, *P. fluorescens*, *P. marginalis*), a także nekrotroficznym grzybem *Botrytis cinerea*. Dodatkowo tytoń z wyciszoną ekspresją *NpPDR1* charakteryzuje się wzrostem podatności na spontaniczne infekcje oraz wyższą wrażliwością na zakażenia *B. cinerea*, *Fusarium oxysporum* czy lęgniowcem *Phytophthora nicotianae* (Bultreys et al. 2009; Stukkens et al. 2005). Także jasmonian metylu (MeJA, ang. *methyl jasmonate*), promujący syntezę diterpenów, jest czynnikiem powodującym wzrost poziomu transkryptu *NpPDR1* (Grec et al. 2003).

Białko AtPDR8, funkcjonujące także pod nazwami AtABCG36 lub PEN3, stało się obiektem zainteresowania wielu grup badawczych. Jest dobrym przykładem plejotropowości funkcji pełnych transporterów ABCG. Dowiedziono, że AtPDR8 jest

m.in. zaangażowany w obniżanie wrażliwości *Arabidopsis* na metale ciężkie. Eksperymenty transportu radioaktywnie znakowanego kadmu, z wykorzystaniem protoplastów, pokazały że tempo wypływu jonów Cd^{2+} zależy od poziomu białka AtPDR8. Porównując z kontrolą (typ dziki) było ono znacząco wyższe w przypadku materiału z nadekspresją *AtPDR8* i odpowiednio niższe dla mutantu *atpdr8* (Kim et al. 2007). Ponadto AtABCG8/AtABCG36 odpowiada za wzrost tolerancji *Arabidopsis* na suszę i zasolenie (Kim et al. 2010) oraz modulację wrażliwości tej rośliny na IBA (kwas indolilo-3-masłowy, prekursor auksyny IAA). Autorzy sugerują, że białko to może uczestniczyć w eksporcie IBA z komórki i w ten sposób wpływać na homeostazę hormonalną w roślinie (Strader i Bartel 2009). Co więcej badania dwóch niezależnych zespołów nad mutantami z nieaktywnym genem kodującym AtPDR8/PEN3 pokazały, że stanowi ono ważny element podstawowego systemu obronnego rośliny, który warunkuje odporność typu non-host. *AtPDR8* ulega konstytutywnej ekspresji na wysokim poziomie, która dodatkowo jest indukowana podczas infekcji patogenami. Białko AtPDR8 zlokalizowane jest w plazmolemie i akumuluje w rejonach błony w pobliżu miejsca infekcji. Wykazano, że *A. thaliana* pozbawiona transportera AtPDR8 staje się podatna na zakażenia nieprzystosowanymi patogenami (*ang. inappropriate pathogens*) takimi jak *Blumeria graminis* f. sp. *hordei*, *Erysiphe pisi*, *Phytophthora infestans*, dla których nie jest naturalnym gospodarzem i które nie są w stanie skutecznie infekować roślin typu dzikiego. W przypadku mutantu *atpdr8/pen3*, w odróżnieniu do typu dzikiego, obserwowano wnikanie strzępek grzybów w głąb tkanek oraz pojawianie się zmian chlorotycznych i nekrotycznych. Śmierć komórek związana była z uruchomieniem reakcji obronnej zależnej od kwasu salicylowego i skutkowałą nabyciem przez mutantu odporności na obligatoryjnego biotrofa (*Erysiphe cichoracearum*), wywołującego chorobę u roślin typu dzikiego (Stein et al. 2006). Postuluje się, że AtPDR8 odpowiada za wydzielanie endogennego związku, stanowiącego pierwszą linię obrony przed patogenami, którego akumulacja w komórce jest toksyczna dla rośliny (Kobae et al. 2006; Stein et al. 2006). Dowiedziono, że AtPDR8/PEN3 odgrywa także rolę w procesie odkładania kalozy (Clay et al. 2009).

Poszukiwania mutacji, powodujących u *Arabidopsis* z jednej strony obniżenie wrażliwości na syntetyczną auksynę (2,4-D - stosowaną m.in. do zwalczania chwastów), z drugiej zaś nie powodujących zaburzeń rozwojowych, doprowadziły do identyfikacji

i scharakteryzowania transportera AtPDR9/AtABCG37. Wykazano, że mutant (*pdr9-1*) (mutacja typu uzyskania funkcji ang, *gain-of-function*) jest w porównaniu z roślinami dzikimi mniej wrażliwy na 2,4-D. Z kolei mutant (*pdr9-2*) z nieaktywnym genem kodującym AtPDR9 wykazuje nadwrażliwość na ten herbicyd. Co istotne, obie mutacje nie wpływały na transport naturalnej auksyny IAA, a tym samym nie powodowały zaburzeń rozwojowych (Ito i Gray 2006). Inna grupa badawcza dowiodła, że naturalnym substratem dla AtABCG37 jest prekursor auksyn IBA, aczkolwiek w układach heterologicznych (drożdżowym i komórek HeLa) białko to było zdolne do transportu także syntetycznej auksyny 2,4-D (Ruzicka et al. 2010).

AtPDR12/AtABCG40 okazał się być importerem kwasu abscysynowego, będącego seskwiterpenem. Eksperymenty transportu w układach heterologicznych (drożdżowym i hodowli BY2) wykazały zwiększone pobieranie ABA przez komórki z ekspresją *AtABCG40*. Ponadto w przypadku protoplastów mutantu *atabcg40* obserwowano spadek akumulacji tego związku w komórkach w porównaniu z kontrolą. Dowiedziono, że AtABCG40 warunkuje m.in. prawidłowe funkcjonowanie aparatów szparkowych, które u mutantu utraty funkcji (ang, *loss-of-function*) zamykają się wolniej w odpowiedzi na ABA. Skutkuje to wzrostem wrażliwości na wysychanie (Kang et al. 2010). Wcześniej stwierdzono, że ekspresja *AtPDR12/AtABCG40* indukowana jest podczas infekcji grzybami patogennymi (*Sclerotinia sclerotiorum*, *Alternaria brassicicola*) oraz pod wpływem hormonów stresowych, szczególnie kwasu salicylowego (SA, ang. *salicylic acid*), ale także etylenu (ET, ang. *ethylene*) i jasmonianu metylu. Sugerowano, że AtPDR12 podobnie jak NpPDR1 może brać udział w ochronie rośliny przed patogenami poprzez eksport do apoplastu metabolitów wtórnych o właściwościach antygrzybiczych. Pokazano również, że potraktowanie mutantu insercyjnego *atpdr12* związkiem antygrzybiczym sklareolem, powoduje opóźnienie kiełkowania nasion oraz silniejszą inhibicję wydłużania korzeni w porównaniu z roślinami dzikimi (Campbell et al. 2003). Co ciekawe inna grupa badawcza wskazywała na udział AtPDR12 w obniżaniu wrażliwości rośliny na metale ciężkie (Lee et al. 2005).

Niedawno pokazano, że obecny u Arabidopsis ABCG29 jest transporterem alkoholu p-kumarylowego, jednego z trzech głównych monolignoli, będących prekursorami w biosyntezie lignin. Ekspresja heterologiczna *AtABCG29* w drożdżach

wykazała, że obecność białka AtABCG29 redukuje toksyczne działanie alkoholu p-kumarylowego. Efekt ten związany jest z aktywną sekrecją tego monolignolu na zewnątrz komórek drożdżowych, co potwierdziły eksperymenty transportu. Ponadto linie insercyjne ze zintegrowanym T-DNA w obrębie genu *AtABCG29*, wykazywały zwiększoną wrażliwość na działanie alkoholu p-kumarylowego, co manifestowało się zahamowaniem wzrostu korzeni. U mutantów obserwowano także zmniejszony poziom lignin oraz zmienioną kompozycję monolignoli (Alejandro et al. 2012).

PhPDR1 z petunii (*P. hybrida*) został zidentyfikowany jako eksporter strigolaktonu. Ten fitohormon należy do laktonów seskwiterpenowych i odpowiada m.in.: za inicjację mikoryzy arbuskularnej, poprzez stymulację rozgałęziania strzępek grzybowych; a także za kontrolę rozkrzewiania pędów, poprzez inhibicję wzrostu pąków bocznych. Pokazano, że w warunkach niedoboru fosforu, w których strigolakton uwalniany jest do ryzosfery oraz pod wpływem GR24 (syntetyczny strigolakton) dochodzi do wzrostu poziomu mRNA *PhPDR1*. Ponadto stwierdzono, że ekspresja *PhPDR1* jest specyficznie indukowana w komórkach kory pierwotnej korzenia, w trakcie jej kolonizacji przez grzyby mikoryzowe. W częściach naziemnych aktywność promotora *PhPDR1* odnotowano w wiązkach przewodzących. Była ona szczególnie wysoka w miejscach leżących poniżej uspionych pąków pachwinowych. U mutantów *phpdr1* obserwowano zarówno ograniczony rozwój mikoryzy, wynikający z redukcji wydzielania przez korzenie strigolaktonu, jak i zmieniony wzór rozgałęziania rośliny, związany z zaburzeniem rozmieszczenia tego hormonu. Co więcej wykazano, że nadekspresja *PhPDR1* w *A. thaliana* skutkuje wzrostem tolerancji rośliny na wysokie stężenie egzogenego, syntetycznego strigolaktonu, co wynika z wydajniejszego uwalniania tego związku przez korzenie (Kretzschmar et al. 2012).

Analizę funkcjonalną przeprowadzono także dla innych pełnych transporterów ABCG, jednak nie udało się jednoznacznie określić ich substratów. Postuluje się, że część z tych białek jest zaangażowana w odpowiedź rośliny na stres biotyczny. Obserwowano m.in. (i) znaczący wzrost poziomu transkryptu genu *NtPDR1* z hodowli komórkowej *N. tabacum* (BY2) w wyniku traktowania generalnymi elicytorami (elicytyna INF1 z *P. infestans*, flagelina z *P. syringae* pv tomatu, ekstrakt drożdżowy) (Sasabe et al. 2002) czy (ii) indukcję ekspresji czterech genów *PDR* (*StPDR1-StPDR4*) z *Solanum tuberosum* pod wpływem infekcji *P. infestans* (Ruocco et al. 2011). Jeden

z pełnych transporterów ABCG (określany jako Lr34) warunkuje, w nieznanym dotąd sposób, nabycie przez niektóre odmiany pszenicy trwałej odporności na trzy groźne gatunki grzybów patogennych (Krattinger et al. 2009). Ostatnio zidentyfikowano także białko ABCG5/PDR5 z *N. tabacum*, które bierze udział w obronie rośliny przed szkodliwymi owadami (Bienert et al. 2012). U soi (*G. max*) ilość mRNA, kodującego pełny transporter ABCG (GmPDR12) wzrasta w odpowiedzi na kwas salicylowy i kwas jasmonowy (Eichhorn et al. 2006).

Rola białek PDR nie ogranicza się tylko do ich udziału w odpowiedzi rośliny na stresy biotyczne. NtPDR3 z *N. tabacum* prawdopodobnie jest zaangażowany w utrzymywanie homeostazy żelaza (Ducos et al. 2005). Białko AtABCG32/PEC1 z *Arabidopsis* oraz jego bliski homolog z jęczmienia HvABCG31 są niezbędne w procesie formowania funkcjonalnej kutikuli (Bessire et al. 2011; Chen et al. 2011). Akumulacja transportera OsPDR9 z ryżu wzrasta po potraktowaniu metalami ciężkimi, a także pod wpływem niedoboru tlenu czy zaburzeń równowagi redoks (Moons 2003). Niewykluczony jest też udział tej grupy białek w oddziaływaniach symbiotycznych. Świadczą o tym badania zmian poziomu ekspresji potencjalnych genów *PDR* u *L. japonicus* pod wpływem bakterii brodawkowych. Kilka z tych genów było wyraźnie indukowanych w korzeniach inokulowanych *Mesorhizobium loti* (Sugiyama et al. 2006). Co więcej za transport genisteiny, flawonoidu z soi pełniącego funkcję związku sygnałnego podczas interakcji rośliny z bakteriami symbiotycznymi, może być odpowiedzialny transporter PDR (Sugiyama et al. 2007).

Opierając się na przedstawionych powyżej danych literaturowych można postawić hipotezę, iż przynajmniej część pełnych białek ABCG stanowi ważny element systemu obronnego roślin. Stąd w kolejnym podrozdziale zamieszczono poglądowy opis funkcjonowania w roślinach układu odpornościowego.

1.3 System odpornościowy roślin

Rośliny narażone są na ciągłe ataki szerokiej grupy patogenów, które stosują różne strategie pozwalające skutecznie infekować gospodarza. Ze względu na prowadzony tryb życia patogeny zostały podzielone na trzy grupy. Jedną z nich stanowią nekrotrofy (np. *B. cinerea*), pobierające związki odżywcze z martwych bądź obumierających komórek. Kolejną, odżywiające się żywą tkanką, patogeny biotroficzne (np. *P. syringae*). I w końcu tzw. hemibiotrofy (np. *Hyaloperonospora arabidopsidis*), które swój cykl rozpoczynają jako biotrofy i z czasem przechodzą na nekrotroficzny tryb życia (**Rycina 1.6**) (Pieterse et al. 2009).

PODZIAŁ PATOGENÓW BAKTERYJNYCH I GRZYBOWYCH



Rycina 1.6. Podział patogenów bakteryjnych i grzybowych: ze względu na rodzaj oddziaływań między patogenem a rośliną (a), ze względu na tryb życia (b).

Dzięki wykształceniu systemu odpornościowego (ang. *plant immune system*) większość roślin jest zdolna skutecznie bronić się przed niepożądaną kolonizacją. Pierwszą linię ochrony przed atakiem patogena stanowią bariery konstytutywne. Są one niespecyficzne i mogą mieć charakter zarówno strukturalny, jak i chemiczny.

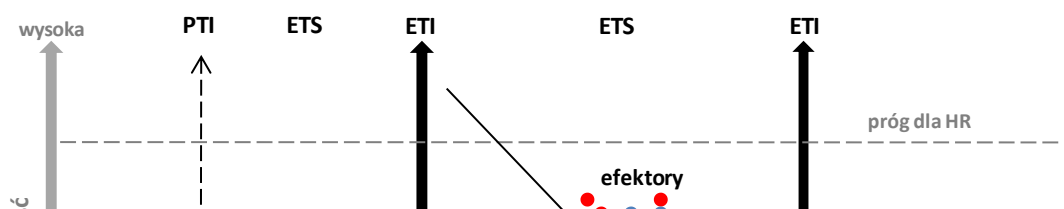
Określona budowa anatomiczna rośliny np. liczba i wielkość aparatów szparkowych, grubość ściany komórkowej czy wysycenie kutyną i woskami, może ograniczyć możliwość wtargnięcia niektórym mikroorganizmom. Co więcej konstytutywna synteza oraz magazynowanie w wyspecjalizowanych organach bądź tkankach specyficznych metabolitów wtórnych o właściwościach antybakteryjnych i antygrzybiczych tzw. fitoantycypin, może stanowić skuteczną ochronę przeciwko nieprzystosowanym patogenom (ang. *nonadapted pathogens*) (Ayliffe et al. 2011; Bednarek i Osbourn 2009; Dangl i Jones 2001).

Rośliny dysponują także mechanizmami obronnymi uruchamianymi podczas ataku patogena. Ten typ oddziaływań został dobrze opisany za pomocą modelu zig zag (**Rycina 1.7**). Zakłada on, iż indukowana odpowiedź obronna w pierwszej kolejności jest aktywowana przez tzw. molekularne wzorce powiązane z mikroorganizmami lub patogenami w skrócie MAMP-sy lub PAMP-sy (ang. *microbe- or pathogen-associated molecular patterns*), inaczej określane jako generalne elicytory (Jones i Dangl 2006; Zipfel i Robatzek 2010). Stanowią one niejednorodną pod względem strukturalnym i funkcjonalnym grupę związków. Są szeroko rozpowszechnione wśród mikroorganizmów i ze względu na istotne funkcje jakie pełnią nie mogą podlegać szybkim zmianom ewolucyjnym. Należą do nich m.in. bakteryjna flagelina, białka szoku cieplnego, czynnik elongacji Tu (EF-Tu), bakteryjne lipopolisacharydy (LPS), chityna, β -glukan. MAMP-sy/PAMP-sy wiążą się do zewnątrzkomórkowych, transbłonowych receptorów rozpoznających wzorce molekularne tzw. PRR (ang. *pattern recognition receptors*) co wywołuje niespecyficzną, lokalną, odpowiedź odpornościową PTI (ang. *PAMP-triggered immunity*). Obejmuje ona szereg uniwersalnych reakcji w tym: (i) aktywację kaskady kinaz MAP (kinaz aktywowanych mitogenami, ang. *mitogen-activated protein kinases*), co pociąga za sobą szybką, zależną od czynników transkrypcyjnych WRKY, indukcję genów obronnych; (ii) produkcję reaktywnych form tlenu (ROS, ang. *reactive oxygen species*); (iii) wzmocnienie ściany komórkowej poprzez syntezę i depozycję kalozy i ligniny; (iv) syntezę metabolitów wtórnych o charakterze antybakteryjnym i antygrzybiczym (fitoaleksyn) oraz (v) akumulację białek powiązanych z patogenezą (PR, ang. *pathogenesis-related proteins*), takich jak np. chitynazy czy glukozylazy (Jones i Dangl 2006; Pieterse et al. 2009).

Część patogenów jest zdolna do supresji PTI za pośrednictwem białkowych efektorów (czynniki wirulencji), które wprowadzane są bezpośrednio do cytoplazmy komórek gospodarza. Wiadomo, że bakterie wykorzystują do tego celu system sekrecji typu III (TTSS, ang. *type-III secretion system*), natomiast w przypadku grzybów i łęgniowców mechanizm dostarczania efektorów do komórki roślinnej jak na razie nie jest znany (Dodds i Rathjen 2010). Działanie efektorów może polegać m.in. na blokowaniu aktywności kinazowej receptorów PRR, tak jest w przypadku produkowanego przez *P. syringae* AvrPto (Xiang et al. 2008). HopAI1 odpowiada za defosforylację kinaz MPK3 i MPK6, co skutkuje przedwczesną terminacją szlaku sygnałnego PTI (Zhang et al. 2007). Znane są także przykłady hamowania przez efekторы biosyntezy metabolitów wtórnych, taką funkcję spełnia HopZ1 (Zhou et al. 2011). Zablockowanie PTI wywołane aktywnością efektorów prowadzi do wykształcenia tzw. wyzwalanej przez efektor wrażliwości ETS (ang. *effector-triggered susceptibility*) i w konsekwencji rozwoju choroby. Patogeny zdolne do przełamania barier konstytutywnych, a następnie supresji odpowiedzi PTI, określane są jako przystosowane (ang. *adapted pathogens*) (Ayliffe et al. 2011). Indywidualny szczep fitopatogena bakteryjnego może kodować 20-30 różnych efektorów, w przypadku grzybów czy łęgniowców liczba ta może być jeszcze wyższa. W odróżnieniu do MAMP/PAMP-sów efekторы nie są niezbędne do prawidłowego funkcjonowania organizmu, dlatego też charakteryzują się dużą zmiennością. Często zdarza się, że blisko spokrewnione ze sobą szczepy bakterii bądź izolaty grzybowe posiadają odmienne zestawy efektorów przez co zakażają różne gatunki bądź odmiany roślin.

Produkowane przez patogeny efekторы mogą stać się czynnikami awirulencji (*avr*, ang. *avirulence factor*). Dzieje się tak gdy komórka roślinna dysponuje rozpoznającymi je, wewnątrzkomórkowymi receptorami, kodowanymi przez tzw. geny odporności R (ang. *resistance genes*). Receptory te najczęściej należą do klasy NB-LRR, a ich bezpośrednie bądź pośrednie związanie z czynnikiem awirulencji prowadzi do uruchomienia specyficznej, wyzwalanej przez efektor odporności ETI (ang. *effector-triggered immunity*). Zarówno efekторы jak i białka R mogą podlegać szybkim zmianom co prowadzi do dynamicznej koewolucji układu roślina-patogen. Przypomina to swoisty „wyścig zbrojeń”, w którym celem rośliny jest posiadanie odpowiedniego genu R, rozpoznającego dany efektor, natomiast patogen dąży do unikania rozpoznania, np.

poprzez mutację w genie kodującym efektor (Boller i He 2009; Jones i Dangl 2006). Uważa się, że ETI jest szybszą i silniejszą wersją PTI. Często skutkuje rozwinięciem reakcji nadwrażliwości (HR, ang. *hypersensitive response*). HR prowadzi do śmierci komórek gospodarza otaczających miejsce infekcji, a tym samym odcina patogena od źródła żywych tkanek, co jest skuteczne w przypadku ochrony przed biotrofami (Jones i Dangl 2006). W zależności od tego, czy produkowane przez mikroorganizmy chorobotwórcze efekторы są rozpoznawane przez roślinne białka odporności, patogeny podzielono na wirulentne i awirulentne, a oddziaływania roślina-patogen odpowiednio na kompatybilne (ang. *compatible*) i niekompatybilne (ang. *incompatible*). W pierwszym przypadku dochodzi do zakażenia rośliny i rozwoju choroby. W drugim następuje uruchomienie silnej odpowiedzi obronnej, prowadzącej do wykształcenia odporności typu host (ang. *host resistance*), która skutecznie zabezpiecza przed infekcją wywołaną określoną rasą patogena (Tao et al. 2003). Obok specyficznej odporności typu host, wyróżnia się także niespecyficzną odporność non-host (NHR, ang. *non-host resistance*), przez niektórych autorów nazywaną także podstawową odpornością (ang. *basal defense*). Zwykle warunkowana jest ona wieloma genami i angażuje zarówno mechanizmy konstytutywnej jak i indukowanej odpowiedzi obronnej. Charakteryzuje się mniejszą siłą, jest natomiast stosunkowo trwała i chroni roślinę przed szerokim spektrum patogenów (Jaulneau et al. 2010; Lipka et al. 2008).



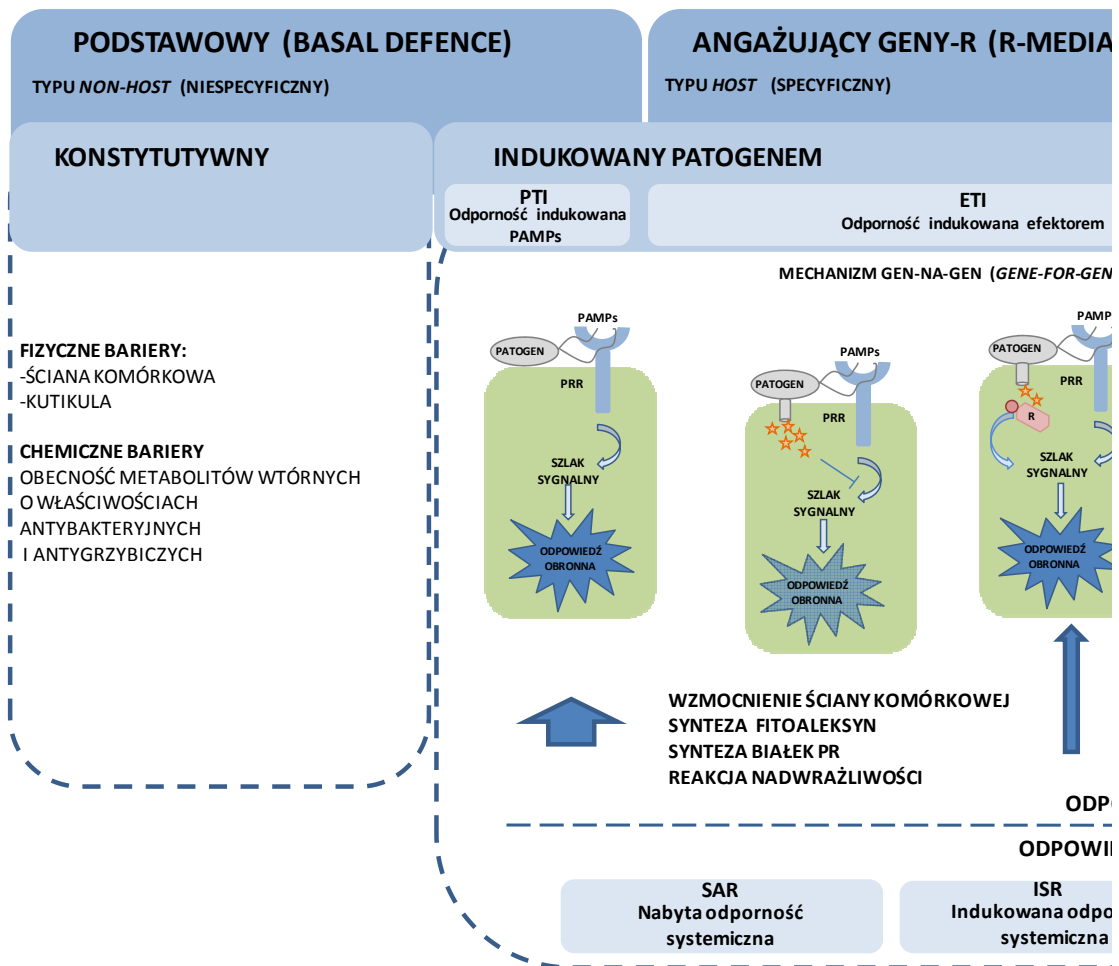
Rycina 1.7. Schemat rozwoju odporności roślin według modelu zig zag, na podstawie Jones i Dangl 2006.

Początkowo słaba lokalna reakcja obronna z czasem może rozszerzyć się na całą roślinę i prowadzić do pojawienia nabytej odporności systemicznej (SAR, ang. *systemic acquired resistance*). Za przekazanie sygnału z miejsca pierwotnej infekcji do dystalnych części rośliny odpowiada kwas salicylowy, transportowany systemem naczyń. Odporność tego typu pozwala roślinie uruchomić szybką i skuteczną reakcję obronną, związaną m.in. z aktywacją genów *PR*. Jest ona skierowana przeciwko szerokiemu spektrum patogenów (Pieterse et al. 2009).

Innym przykładem odporności systemicznej jest indukowana odporność systemiczna (ISR, ang. *induced systemic resistance*), wywołana przez tzw. bakterie promujące wzrost roślin (PGPR, ang. *plant growth-promoting rhizobacteria*), najczęściej z rodzaju *Pseudomonas* i *Bacillus*, a także arbuskularne grzyby mikoryzowe i związki syntetyczne. ISR sprowadza się do promowania reakcji obronnych (ang. *priming*), czyli szybszej bądź silniejszej aktywacji mechanizmów obronnych w odpowiedzi na atak patogena. ISR jest zwykle regulowana przez szlaki sygnałowe zależne od kwasu jasmonowego (JA) i etylenu (ET) (Pieterse et al. 2009).

Jak dotąd wiele wskazuje na udział pełnych białek ABCG w niespecyficznym reakcjach obronnych, w tym nadawaniu odporności typu non-host (Krattinger et al. 2009). Pokazano, że ekspresja genów ABCG jest indukowana przez nieprzystosowane patogeny, hormony stresowe czy PAMP-sy, a ich dysfunkcja skutkuje wzrostem wrażliwości roślin na infekcje. Przypuszcza się, że ochronna rola pełnych białek ABCG polega na wydzielaniu metabolitów wtórnych o właściwościach antybakteryjnych czy antygrzybiczych bądź transporcie związków o charakterze sygnałowym (Campbell et al. 2003; Jasinski et al. 2001; Sasabe et al. 2002; Stein et al. 2006).

SYSTEM ODPORNOŚCIOWY U ROŚLIN (PLANT IMMUNE SYSTEM)



Rycina 1.8. Schemat przedstawiający organizację systemu odpornościowego roślin.

1.3 *Medicago truncatula* modelowa roślina bobowata

Bobowate (*Fabaceae*) dawniej określane jako motylkowate stanowią trzecią co do wielkości i drugą pod względem znaczenia gospodarczego rodziną roślin nasiennych (Young i Bharti 2012). Dzięki współpracy z bakteriami brodawkowymi rozwinęły unikalną zdolność symbiotycznego wiązania azotu atmosferycznego (SNF; *symbiotic nitrogen fixation*). Nawiązują także bardziej powszechną w przyrodzie symbiozę z grzybami mikoryzowymi oraz dysponują szerokim spektrum mechanizmów, chroniących je przed atakiem patogenów. Stąd bobowate postrzegane są jako idealna grupa pozwalająca badać szeroko rozumiane interakcje rośliny z mikroorganizmami zarówno symbiotycznymi, jak i patogennymi (Bell et al. 2001).

Rośliny bobowate odgrywają kluczową rolę w nowoczesnym rolnictwie. Ich uprawa przyczynia się do wzbogacenia gleby w łatwo przyswajalne związki azotu, które mogą być wykorzystane przez rośliny następcze. Pozwala to na ograniczenie stosowania nawozów sztucznych, a co za tym idzie redukcję kosztów i ochronę środowiska naturalnego. Są także tanim źródłem wysokiej jakości białka dla ludzi i zwierząt oraz substancji o właściwościach leczniczych takich jak, np. izoflawonoidy. Dlatego duży nacisk kładzie się na identyfikację genów warunkujących cechy użytkowe tej grupy roślin, które odpowiadają za plonowanie, gospodarkę mineralną, syntezę i dystrybucję metabolitów wtórnych czy odporność na choroby (Dixon i Sumner 2003).

Znaczenie ekonomiczne bobowatych oraz aspekt poznawczy związany ze zrozumieniem procesu SNF, mikoryzy, odpowiedzi obronnej oraz ich wzajemnych powiązań, skłoniły naukowców do wyłonienia roślin modelowych, pozwalających badać biologię tej rodziny. Główną uwagę skupiono na dwóch gatunkach *L. japonicus* i *M. truncatula*. Ze względu na to, że najważniejsze uprawiane w Europie bobowate takie jak lucerna siewna, koniczyna, groch czy fasola należą do tej samej grupy filogenetycznej co *M. truncatula* to właśnie ta roślina stała się właściwym modelem bobowatych w Europie (Young i Udvardi 2009).

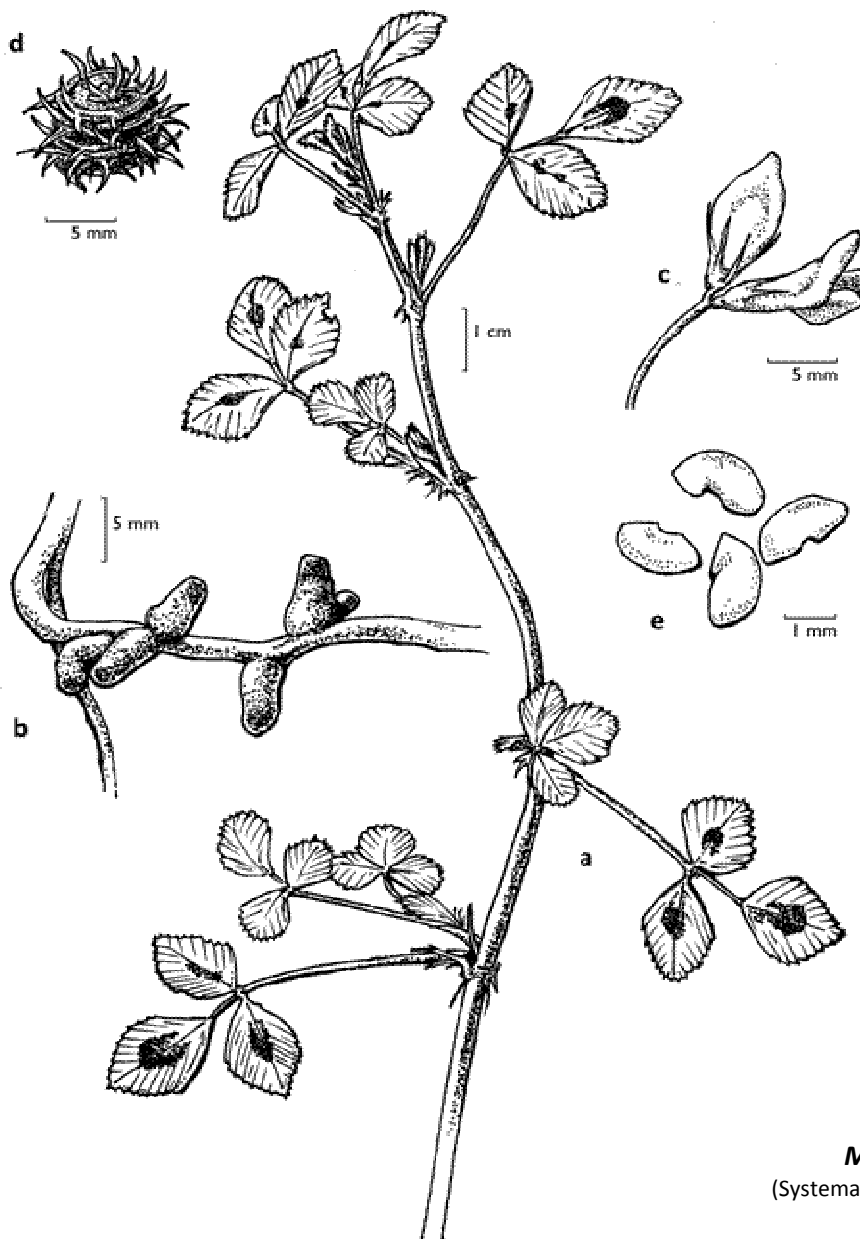


Fig. x. Rysunek przedstawiający *M. truncatula*,

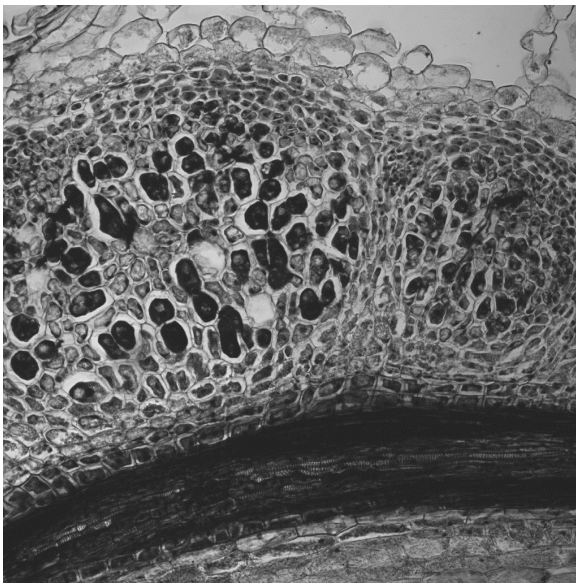
Medicago truncatula
(Systematyka według Takhtajana)

Królestwo: Rośliny (*Plantae*)
Gromada: Okrytonasienne (*Magnoliophyta*)
Klasa: Dwuliścienne (*Magnoliopsida*)
Rząd: Bobowce (*Fabales*)
Rodzina: Bobowate (*Fabaceae*)
Rodzaj: Lucerna (*Medicago*)
Gatunek: *Medicago truncatula*

Rycina 1.9. *M. truncatula*, dojrzały pęd (a), korzeń z brodawkami (b), kwiat (c), owoc (d), nasiona (e). Dzięki uprzejmości Andrzeja Szewczaka (Źródło: praca magisterska Andrzej Szewczak, 2011).

M. truncatula, pochodzi z Basenu Morza Śródziemnego. Jest rośliną jednoroczną, obecnie powszechnie uprawianą w Australii (Young i Udvardi 2009). Ze względu na kształt strąka, który przypomina beczkę w języku angielskim określa się ją mianem *barrel medic*. Jej liście są trzykrotnie złożone, a żółte kwiaty posiadają charakterystyczny dla całej rodziny motylkowaty wygląd.

M. truncatula wchodzi w symbiozę z bakteriami brodawkowymi z rodzaju *Sinorhizobium*, czego wynikiem jest powstawanie brodawek korzeniowych typu niezdeteminowanego (**Rycina 1.10**) (Gubry-Rangin et al. 2010).



Rycina 1.10. Przekrój podłużny przez brodawki korzeniowe *M. truncatula*

W odróżnieniu do wielu roślin bobowatych *M. truncatula* posiada mały (500-550Mbp), diploidalny genom (2×8 chromosomów). Charakteryzuje się krótkim cyklem życiowym (ok. 10-12 tygodni) i dużą produkcją nasion. Ulega samozapyleniu co dodatkowo ułatwia analizę genetyczną. Jest gatunkiem stosunkowo prostym w transformacji i hodowli *in vitro*. Duże znaczenie w pracy z *M. truncatula* ma łatwy dostęp do opracowanych protokołów zawartych m.in. w podręczniku „*Medicago truncatula Handbook*” <http://www.noble.org/MedicagoHandbook/>, a także występowanie dużych kolekcji mutantów i zróżnicowanych ekotypów *Medicago* czy w końcu poznanie 2011 roku sekwencji jej genomu (Cook 1999; Young et al. 2011).

Automatyczne przewidywanie w poznanej sekwencji genomu *M. truncatula* genów i ich adnotację, powierzono międzynarodowej grupie IMGGA (International Medicago Genome Annotation Group) <http://www.medicago.org/genome/IMGAG/>.

Istnieje także szereg projektów mających na celu poznanie transkryptomu, proteomu oraz profilu metabolicznego *M. truncatula* (Young i Udvardi 2009).

Przez SRNF (Samuel Roberts Noble Foundation) udostępniony został „Atlas ekspresji genów *Medicago truncatula*” (MtGEA, ang. *The Medicago truncatula Gene Expression Atlas*) <http://mtgea.noble.org/v2/>, bazujący na danych mikromacierzowych. Pozwala on na wstępne określenie profilu ekspresji większości genów Medicago w różnych organach, podczas rozwoju rośliny i jej odpowiedzi na bodźce środowiskowe. Bogate są także kolekcje EST-ów (ang. *Expressed Sequence Tags*), zdeponowanych m.in. w *Medicago truncatula Gene Index* (MtGI) <http://compbio.dfci.harvard.edu/cgi-bin/tgi/gimain.pl?gudb=medicago>.

Informacje dotyczące szlaków metabolicznych *M. truncatula* i ich wzajemnych powiązań znaleźć można w bazie MedicCyc <http://mediccyc.noble.org/>.

Poza tym dostępne są liczne bazy danych dedykowane genetyce odwrotnej (ang. *reverse genetics*), m.in. bazy danych mutantów *M. truncatula*: i) inercyjnych Tnt1; ii) delecyjnych, otrzymywanych poprzez bombardowanie roślin wiązką szybkich neutronów (FNB, ang. *Fast Neutron Bombardment*) <http://medicago-mutant.noble.org/mutant/> czy iii) mutantów uzyskanych metodą TILLING (ang. *Targeting Induced Local Lesions IN Genomes*) <http://revgenuk.jic.ac.uk/>, a także baza danych RNAi Medicago <https://mtrnai.msi.umn.edu/>.

O postępie pracy nad *M. truncatula* można dowiedzieć się z portalu <http://www.medicago.org/>, który gromadzi linki do szeregu stron internetowych poświęconych *M. truncatula* i roślinom bobowatym. Część z nich została zamieszczona w tekście powyżej.

2. CEL PRACY

Celem niniejszej pracy doktorskiej było poznanie roli jaką pełnią pełne transportery ABCG *M. truncatula* w modulacji oddziaływań biotycznych.

W trakcie jej realizacji przeprowadzono: (i) identyfikację oraz wstępną charakterystykę pełnych transporterów ABCG *Medicago*, (ii) wyselekcjonowano geny *MtABCG*, których ekspresja indukowana jest podczas oddziaływań biotycznych, a także (iii) przeprowadzono szczegółową analizę funkcjonalną jednego z nich, *MtABCG10*.

3. MATERIAŁY I METODY

3.1 Praca z materiałem roślinnym

3.1.1 Sterylizacja i kiełkowanie nasion *M. truncatula*

Nasiona *M. truncatula* (ekotyp Jemalong J5 i R108) pochodziły z hodowli prowadzonej w Instytucie Chemii Bioorganicznej PAN, wyprowadzonej z nasion uzyskanych od A. Kondorosi z CNRS, Gif-surYvette we Francji. Do próbówki typu Eppendorf (2 ml) przesypano ok. 150 nasion *Medicago*, a następnie dodano pod dygestorium 1,5 ml stężonego kwasu siarkowego. Mieszano zawartość przez odwracanie próbówki do czasu pojawienia się ciemnych odbarwień na powierzchni nasion, ok. 17 min. Odpipetowano kwas siarkowy do zlewki z wodą, a nasiona bardzo dokładnie przepłukano (10x) sterylną destylowaną wodą, wcześniej schłodzoną w lodzie. Za każdym razem mieszano przez odwracanie lub pipetowanie. Umieszczoną na szalce bibułę, zwilżono sterylną wodą destylowaną, a następnie wyłożono nasiona przy pomocy pęsety (ok. 80 nasion na szalkę o średnicy 20 cm). Szalkę owinięto dokładnie folią aluminiową i przechowywano 5 dni w ciemności w 4°C, następnie 2 dni w ciemności w temperaturze 23°C do skiełkowania.

3.1.2 Hodowla *M. truncatula* w doniczkach

Siedmiodniowe siewki wysadzano w zależności od potrzeb do doniczek z mieszanką: i) wermikulit:perlit:piasek (1:1:1) (ii) wermikulit:perlit (1:1) oraz (iii) perlit:piasek (3:1). Rośliny hodowano w pokojach fitotronowych w kontrolowanych warunkach (22°C, wilgotność 40%, 16 h/8 h fotoperiod). Rośliny podlewano wodą i dwa razy w tygodniu **pożywką do nawożenia lucerny (Tabela 3.1)**.



Rycina 3.1. Trzytygodniowa *M. truncatula* rosnąca w doniczce

Tabela 3.1. Skład pożywki do nawożenia lucerny

skład roztworów wyjściowych (1L)			ostateczny skład pożywki (1L)	
A	MgSO ₄ x 7 H ₂ O	98 g	A	5 ml
B	K ₂ SO ₄	85 g	B	10 ml
C	KCl	10 g	C	10 ml
D	FeSO ₄ x 7 H ₂ O	5560 mg	D	5 ml
	Na ₂ EDTA x 2 H ₂ O	7580 mg		
E	CaCl ₂ x 2 H ₂ O	25,2 g	E	10 ml
F	KNO ₃	4,5 g	F	0,1 ml
G	MnSO ₄ x 5H ₂ O	4 g	G	5 ml
	MnCl ₂ x 4 H ₂ O	905 mg		
	KI	166 mg		
	ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	1720 mg		
	CoCl ₂ x 6 H ₂ O	5 mg		
	CuSO ₄ x 5 H ₂ O	16 mg		
	H ₃ BO ₃	1240 mg		
	Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	50 mg		
H	KH ₂ PO ₄	68 g	H	4 ml
I	NH ₄ H ₂ PO ₄	23 g	I	10 ml
J	Ca(NO ₃) ₂ x 4 H ₂ O	49,2 g	J	10 ml

3.1.3 Hodowla *M. truncatula* w warunkach *in vitro*

Siewki *M. truncatula* (ekotyp Jemalong J5) hodowano w pokoju hodowlanym na szalkach ze zwilżoną bibułą, w kontrolowanych warunkach (22°C, 16 h/8 h fotoperiod). Siedmiodniowe siewki w zależności od potrzeb traktowano: grzybem patogennym *Fusarium culmorum* szczep Cul-3 z kolekcji Instytutu Genetyki Roślin PAN w Poznaniu lub bakterią symbiotyczną *Sinorhizobium meliloti* Rm1021 (Meade et al. 1982). Kontrolę odpowiednio stanowiła woda lub 10 mM siarczan magnezu. W celu analizy zmian poziomu ekspresji wybranych genów pod wpływem związków chemicznych, siedmiodniowe siewki Medicago przenoszono z bibuły na pożywkę ½ B-5 Gamborga (G5768 Sigma Aldrich) z dodatkiem testowanych substancji. W Tabeli 3.2 zamieszczono wykaz stosowanych związków.



Rycina 3.2. Siedmiodniowe siewki *M. truncatula* rosnące na szalce z bibułą

Tabela 3.2. Wykaz związków używanych do testów, prowadzonych na siewkach *M. truncatula*

nazwa związku	producent	stosowane stężenia końcowe	kontrola
elicytor z <i>P. medicaginis</i>	podrozdział 3.3.2	25 µg ekwiwalentu glukozy/ml	H ₂ O
MeJA	Sigma-Aldrich	10 µM	DMSO
Izolikwiritigenina	ExstraSynthese	100 µM	DMSO
Daidzeina	ExstraSynthese	100 µM	DMSO
Formononetyna	ExstraSynthese	100 µM	DMSO

3.1.4 Hodowla zawieszinowa *M. truncatula*

Hodowle zawieszinowe (60 ml) wyprowadzono z liści lub korzeni *M. truncatula* (ekotyp Jemalong J5 i R108). Utrzymywano je w pokojach hodowlanych, w kontrolowanych

warunkach (22°C, 16 h/8 h fotoperiod w przypadku hodowli liściowych i 24 h ciemności w przypadku hodowli korzeniowych). Komórki hodowano w pożywce MS z witaminami Gamborga (M0404 Sigma Aldrich) z dodatkiem sacharozy (30 g/L), 2,4D (2 mg/L) i kinetyny (0,25 mg/L), pH=5,8 z wytrząsaniem (150 rpm). Hodowle pasażowano co dwa tygodnie przenosząc 20 ml hodowli do 40 ml świeżej pożywki. W przypadku analizy zmian poziomu ekspresji wybranych genów, siedmiodniową hodowlę rozpipetowano po 3 ml do 6-dołkowych płytek (140675 Nunc), aklimatyzowano przez 24 h, a następnie dodawano testowanego związku. W **Tabeli 3.3** zamieszczono wykaz stosowanych związków.



Rycina 3.3. Hodowla zawieszinowa wyprowadzona z liści *M. truncatula*

Tabela 3.3. Wykaz związków używanych do testów prowadzonych na hodowli zawieszinowej *M. truncatula*

nazwa związku	stosowane stężenia końcowe	kontrola
MeJA	10 µM	DMSO
SA	10 µM	DMSO
ABA	10 µM	NaOH

3.1.5 Hodowla korzeni włosowatych *M. truncatula*

Hodowla korzeni włosowatych *M. truncatula* (ekotyp Jemalong J5) została wyprowadzona z korzeni transgenicznych, uzyskanych w wyniku transformacji *Medicago* bakteriami *Agrobacterium rhizogenes* Arqua1 (patrz podrozdział 3.1.7). Hodowlę korzeni prowadzono w pokoju hodowlanym w kontrolowanych warunkach (22°C, 24 h w ciemności), na stałej zmodyfikowanej **pożywce Fahraeus (Fa)**

z dodatkiem sacharozy (10 g/L), mioinozytolu (100 mg/L), tiaminy (10 mg/L), pirydoksyny (1 mg/L), biotyny (1 mg/L), kwasu nikotynowego (1 mg/L), glicyny (2 mg/L), pH=5,8. Hodowlę pasażowano co trzy tygodnie przenosząc fragment korzenia ze stożkiem wzrostu na świeżą pożywkę. Dla potrzeb analiz zmian poziomu ekspresji wybranych genów oraz badań metabolomicznych, trzytygodniową hodowlę korzeniową podzielono na dwie części i przeniesiono do 5 ml świeżej płynnej pożywki. Aklimatyzowano przez 24 h, a następnie dodano elicytora – oligosacharydy ścian komórkowych *Phoma mediacaginis* (stężenie końcowe 25 µg ekwiwalentu glukozy/ml) (patrz podrozdział 3.3.2) lub wody w przypadku kontroli.



Rycina 3.4. Trzytygodniowa hodowla korzeni włosowatych *M. truncatula*

Tabela 3.4. Skład zmodyfikowanej pożywki Fahraeus (Fa)

makroelementy	stężenie końcowe	10X stężone na 1L (pobrać 100 ml/L pożywki)	
MgSO ₄ x 7H ₂ O	0,5 mM	1,2324 g	
KH ₂ PO ₄	0,7 mM	0,9526 g	
Na ₂ HPO ₄	0,8 mM	1,136 g	
NH ₄ NO ₃	0,5 mM	0,4 g	
cytrynian żelaza	20 µM	0,0049 g	dodawać bezpośrednio do
CaCl ₂ x 2H ₂ O	0,9 mM	0,1323 g	pożywki 1X
mikroelementy	stężenie końcowe	roztwór wyjściowy stężenie 1 mg/ml (pobrać 100 µl/L pożywki)	
MnCl ₂ x 4H ₂ O	100 µg/L	100 µl	
CuSO ₄ x 5H ₂ O	100 µg/L	100 µl	
ZnCl ₂	100 µg/L	100 µl	
H ₃ BO ₃	100 µg/L	100 µl	
Na ₂ MoO ₄ x 2H ₂ O	100 µg/L	100 µl	
agar dla roślin	14 g/L		
pH=7,5 ustalono NaOH, autoklawowano, dodano kanamycyny (końcowe stężenie 25 mg/L)			

3.1.6 Izolacja protoplastów z hodowli zawieszinowej *M. truncatula*

Izolację protoplastów z dwunastodniowej hodowli zawieszinowej, wyprowadzonej z liści *M. truncatula*, przeprowadzono według zmodyfikowanej procedury opisanej przez He et al., 2007. Wszystkie wirowania wykonywano przy użyciu wirówki z rotorem uchylnym Heraeus Biofuge. Przyspieszanie i hamowanie obrotów wynosiło odpowiednio 6 i 4.

W pierwszej kolejności przygotowano **mieszaninę enzymów trawiących** ścianę komórkową (20 ml/szalkę), a następnie ogrzewano ją przez 10 min w temperaturze 55°C (w łaźni wodnej), w celu inaktywacji proteaz i pełnego rozpuszczenia enzymów. Po ostudzeniu do temperatury pokojowej (ok. 20°C) przefiltrowano mieszaninę enzymów (filtr 0,22 µm) na szalkę Petriego. Równolegle 50 ml hodowli (2x 25 ml) wirowano przy 200 g przez 5 min. Osad zawieszono w 1 objętości 0,4 M mannitolu i wirowano jak wyżej (2x). Odrzucono supernatant, a osad komórek przeniesiono sterylną szpatułką na szalkę z mieszaniną enzymów trawiących, po czym inkubowano w ciemności przez 24 h w temperaturze pokojowej, delikatnie wytrząsając (ok. 60 rpm, Bio Shaker 3D BIOSAN). Kontrolę procesu trawienia ścian komórkowych prowadzono przy pomocy mikroskopu świetlnego (Carl Zeiss Jena), w razie potrzeby przedłużono czas inkubacji z enzymami. Następnie delikatnie przeniesiono protoplasty do próbówki typu Falcon (50 ml) przy pomocy pipety 5 ml i dodano jedną objętość **buforu W5**. Protoplasty przefiltrowano przy użyciu sita do komórek (CD1-1KT Sigma Aldrich). Od tego momentu kolejne etapy prowadzono w temperaturze 4°C. Przesącz wirowano przy 200 g przez 2 min, osad zawieszono w 15 ml buforu W5, delikatnie wymieszano przez odwracanie, a następnie nawarstwiono na 10 ml 16% sacharozy. Wirowano przez 8 min przy 950 g. Zebrano 8 ml mieszaniny protoplastów znajdujących się na granicy faz i przeniesiono do nowej próbówki typu Falcon (50 ml). Dodano 2 objętości buforu W5 i delikatnie wymieszano przez odwracanie. Wirowano 200 g przez 2 min, po czym zawieszono osad w 4 ml buforu W5.

- **mieszanina enzymów trawiących ścianę komórkową:** 1,5% Celulaza R10; 0,6% Macerozym R10; 1% Driselaza; 0,4 M Mannitol; 20 mM KCl; 20 mM MES
- **bufor W5:** 154 mM NaCl; 125 mM CaCl₂; 5 mM KCl; 2 mM MES

3.1.7 Transformacja *M. truncatula* z udziałem *A. rhizogenes*

Transformację przeprowadzono według zmodyfikowanej procedury A. Boisson-Dernier, zamieszczonej w *Medicago truncatula* handbook 2007 (<http://www.noble.org/medicagohandbook/pdf/AgrobacteriumRhizogenes.pdf>).

Przygotowanie siewek do transformacji. Wysterylizowano nasiona *M. truncatula* (Jemalong J5, R108) i po pięciu dniach inkubacji w 4°C w ciemności szalki z kiełkującymi nasionami przeniesiono do 23°C, trzymano w ciemności do czasu aż część korzeniowa zalążka rośliny osiągnęła ok. 0,5 cm długości (ok. 4-5 h).

Przygotowanie kultury *A. rhizogenes* ARqua1 (Quandt et al. 1993). Bakterie *A. rhizogenes*, zawierające odpowiedni plazmid, wysiano na stałą **pożywkę YEP** z antybiotykami selekcyjnymi: streptomycyną 100 µg/ml (źródło oporności: genom bakteryjny) oraz kanamycyną 50 µg/ml (źródło oporności: plazmid pPR97) lub spektynomycyną 100 µg/ml (źródło oporności: plazmid pK7GWIWG2(II)-p35S::DsRED), bakterie inkubowano 48 h w 28°C.

Transformacja. Sterylnym skalpelem odcięto część wierzchołkową korzenia, a następnie miejsce przecięcia zanurzono w bakteriach rosnących na szalce. Przeniesiono roślinę na szalkę Petriego z zmodyfikowaną **pożywką Fahraeus (Fa)** z antybiotykiem selekcyjnym (kanamycyna 25 mg/L). Rośliny hodowano w 23°C przy fotoperiodzie 16 h/8 h, do czasu pojawienia się transgenicznych korzeni włosowatych (ok. 3 tygodni).

- **Pożywka YEP:** NaCl 5 g/L; baktotrypton 10 g/L; ekstrakt drożdżowy 10 g/L; (pH=7,0 ustalone NaOH); agar 15 g/L
- **Pożywka Fahraeus: (Tabela 3.4)**

3.1.8 Transformacja i regeneracja *M. truncatula* poprzez somatyczną embriogenezę

Transformację przeprowadzono według zmodyfikowanej procedury V. Cosson, zamieszczonej w *Medicago truncatula* handbook 2007 (<http://www.noble.org/Global/medicagohandbook/pdf/AgrobacteriumTumefaciens.pdf>).

Przygotowanie roślin do transformacji. Siewki *M. truncatula* ekotyp R108 wysadzono do doniczek zawierających mieszankę wermikulit:perlit (1:1). Rośliny hodowano w pokojach fitotronowych, w kontrolowanych warunkach (22°C, wilgotność 40%, 16 h/8 h fotoperiod).

Przygotowanie kultury *A. tumefaciens* EHA105 (Hellens et al. 2000). Bakterie *A. tumefaciens*, zawierające plazmid pPR97, wysiano na stałą pożywkę **YEP** z antybiotykami selekcyjnymi: streptomycyną 100 µg/ml (źródło oporności: genom bakteryjny) oraz kanamycyną 50 µg/ml (źródło oporności: plazmid pPR97), bakterie inkubowano 48 h w 28°C.

Z pojedynczej kolonii wyprowadzono płynną prehodowlę (2 ml), która posłużyła do założenia 30 ml właściwej hodowli. Hodowlę właściwą prowadzono do uzyskania $OD_{600} = 0,6$. Bakterie wirowano przy 3000 g przez 20 min, a następnie ich osad zawieszono w 50 ml sterylnej płynnej pożywki **SH3a (Tabela 3.5)**.

Przygotowanie liści do transformacji oraz infiltracja. Do transformacji użyto liści pochodzących z pięcioletniowych roślin. Ich sterylizację (20-30 liści) prowadzono w 50 ml próbówce typu Falcon. Liście przepłukano wodą, a następnie zalano roztworem podchlorynu sodu (1,25% aktywnego chloru), delikatnie wymieszano i inkubowano 14 min. Wszystkie dalsze manipulacje wykonywane były w warunkach sterylnych. Liście przepłukano 3 razy sterylną wodą, a następnie przeniesiono na 9 cm szalkę Petriego z wodą. Z liści przy użyciu skalpela wycięto kwadratowe fragmenty tak aby nie zawierały brzegów blaszki liściowej. Fragmenty liści przeniesiono do kolby próżniowej z hodowlą *Agrobacterium* (20-30 liści na 50 ml hodowli). Delikatnie wymieszano i podłączono próżnię na 20 min (650 psi). Po zwolnieniu próżni kolbę wytrząsano (50-60 rpm) w temperaturze pokojowej przez 2 h.

Kokultywacja (48 h). Eksplantaty przeniesiono do pustych 9 cm szalek Petriego, usunięto nadmiar bakterii, po czym przełożono fragmenty liści na stałą pożywkę SH3a bez antybiotyku. Inkubowano 2 dni w ciemności w 24°C.

Formowanie kalusa z selekcją (5-6 tygodni). Eksplantaty liściowe przeniesiono na świeżą pożywkę SH3a zawierającą 800 mg/L augmentinu (eliminacja bakterii) oraz 40 mg/L kanamycyny (selekcja transformowanych komórek). Materiał inkubowano w ciemności w 24°C przez 5-6 tygodni. Co dwa tygodnie odporne na antybiotyki kalusy przenoszono na świeżą pożywkę selekcyjną.

Embriogeneza (3-6 tygodni). Kalusy przełożono na stałą pożywkę **SH9 (Tabela 3.5)** zawierającą kanamycynę 40 mg/L, hodowano w 24°C przy fotoperiodzie 12 h. Do czasu pojawienia się pre-zarodków, co 3 tygodnie kalusy przenoszono na świeżą pożywkę SH9 bez antybiotyku. Kiedy z zarodków zaczęły rozwijać się rośliny przeniesiono je na

pożywkę ½ SH9 (Tabela 3.5), w celu indukcji ukorzenia. Ukorzone rośliny przesadzano do doniczek z podłożem wermikulit:perlit:piasek (1:1:1) i hartowano w celu ochrony przed nadmierną utratą wody. Hodowano do czasu wydania nasion.

Pożywka YEP: podrozdział 3.1.7

Tabela 3.5. Sposób przygotowania pożywek SH3a, SH9 i ½ SH9

	SH3a	SH9	½ SH9
N6 makroelementy (Tabela 3.6)	100 ml	100 ml	50 ml
SH mikroelementy (Tabela 3.7)	1 ml	1 ml	0,5 ml
SH witaminy (Tabela 3.8)	1 ml	1ml	0,5 ml
EDFS	20 ml	20 ml	10 ml
miocinozylol	100 mg	100 mg	50 mg
sacharoza	30 g	20 g	10 g
2-4 D	4 mg	--	--
BAP	0,5 mg	--	--
pH	5,8	5,8	5,8
H ₂ O	do 1 L	do 1 L	do 1L
Fitożel	3 g		
agar Kalys		7g	7g

Tabela 3.6. Skład stężonego roztworu makroelementów N6

N6 roztwór makroelementów		
związek chemiczny	ilość na 1 L	końcowe stężenie w roztworze stężonym
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	1,85 g	7,5 mM
KNO ₃	28,30 g	280 mM
(NH ₄) ₂ SO ₄	4,63 g	35 mM
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	1,66 g	11 mM
KH ₂ PO ₄	4,00 g	30 mM
H ₂ O	do 1 L	--

Tabela 3.7. Skład stężonego roztworu mikroelementów SH

SH roztwór mikroelementów		
związek chemiczny	ilość na 100 ml	końcowe stężenie w roztworze stężonym
MnSO ₄ x H ₂ O	1 g	60 mM
H ₃ BO ₃	500 mg	80 mM
ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	100 mg	3,5 mM
KI	100 mg	6 mM
Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	10 mg	1 mM
CuSO ₄ x 5 H ₂ O	20 mg	0,8 mM
CoCl ₂ x 6 H ₂ O	10 mg	0,4 mM
H ₂ O	do 100 ml	--

Tabela 3.8. Skład mieszaniny witamin

SH witaminy		
związek chemiczny	ilość na 100 ml	końcowe stężenie w roztworze stężonym
kwas nikotynowy	500 mg	40 mM
tiamina HCl	500 mg	15 mM
pirydoksyna HCl	500 mg	24 mM
H ₂ O	do 100 ml	--

3.2 Praca z bakteriami

3.2.1 Przygotowanie bakterii symbiotycznych *S. meliloti*

Bakterie *S. meliloti* szczep Rm1021 (Meade et al. 1982) wysiano na podłoże selekcyjne **2TY**_{streptomycyna 500µg/ml}, inkubowano 48 h w 28°C w cieplarni. Następnie przygotowano 20 ml prehodowli, która posłużyła do wyprowadzenia właściwej hodowli *S. meliloti*. Bakterie rosły w płynnej pożywce **2TY**_{streptomycyna 500µg/ml}, w temperaturze 28°C z wytrząsaniem z prędkością 300 rpm, do czasu osiągnięcia OD₆₀₀=0,6-1,0, po czym przeniesiono je na lód. Przelano pożywkę z bakteriami (20 ml) do próbówki typu Falcon (50 ml) i wirowano 10 min 5000 rpm w 4°C. Zlano supernatant a następnie dodano 20 ml 10 mM roztworu MgSO₄ (taka sama objętość jak wyjściowej hodowli), zawieszono komórki przez pipetowanie i wirowano 10 min 5000 rpm w 4°C. Kolejny raz zlano supernatant, zawieszono bakterie w 20 ml 10 mM roztworu MgSO₄ i wirowano 10 min 5000 rpm w 4°C. Ostatecznie, osad zawieszono w 20 ml 10 mM roztworu MgSO₄. W przypadku traktowania siewek rosnących na szalkach, bakterie rozcieńczono 30x i podlewano każdy korzeń siewki 300 µl zawiesiny bakterii. Rośliny kontrolne podlewano odpowiednią objętością 10 mM roztworu MgSO₄.

- **Pożywka 2TY:** NaCl 5 g/L; baktotrypton 16 g/L; ekstrakt drożdżowy 10 g/L; (pH=7,0 ustalone NaOH); w przypadku pożywki stałej dodawano agar 15 g/L

3.2.2 Przygotowanie komórek kompetentnych do elektroporacji

Do 20 ml **pożywki LB** (*E. coli*) lub **YEP** (*Agrobacterium*), dodano odpowiedni szczep bakterii i inkubowano przez noc w 37°C (*E. coli*) lub w 28°C (*Agrobacterium*),

z wytrząsaniem z prędkością 300 rpm. Następnego dnia przeniesiono 5 ml prehodowli do 0,5 L pożywki LB/YEP (rozcieńczenie 1/100) i inkubowano w temperaturze 37°C/28°C z wytrząsaniem z prędkością 300 rpm. Sprawdzano OD hodowli bakteryjnej co godzinę, do momentu osiągnięcia $OD_{600}=0,5-0,8$, po czym kolbę z bakteriami umieszczono w lodzie. Wlano po 250 ml hodowli do 2 butelek do wirowania i wirowano 15 min, przy 5000 rpm, w temperaturze 4°C. Zlano supernatant, a osad zawieszono w 250 ml wody destylowanej i wirowano jak poprzednio. Po zlaniu supernatantu osad zawieszono w 125 ml **wody MQ** i ponownie wirowano. Otrzymany osad zawieszono w 5 ml zimnego 10% glicerolu, wirowano 15 min, przy 5000 rpm, w temperaturze 4°C. Supernatant usunięto, a do osadu dodano 0,5-0,8 ml (w zależności od OD hodowli) 10% schłodzonego glicerolu i zawieszono bakterie. Rozpipetowano po 40 μ l bakterii do probówek typu Eppendorf (1,5ml) i umieszczono w ciekłym azocie. Elektrokompetentne bakterie przechowywano w -80°C.

- **Pożywka LB:** NaCl 10 g/L; baktotrypton 10 g/L; ekstrakt drożdżowy 5 g/L; (pH=7,0 ustalone NaOH)
- **Pożywka YEP:** podrozdział 3.1.7
- **Woda MQ:** woda dejonizowana w systemie Milli-Q Millipore

3.2.3 Transformacja komórek *E. coli*/*Agrobacterium* metodą elektroporacji

10 μ l mieszaniny ligacyjnej umieszczono na filtrze do odsalania (VSWPO1300 MILLIPORE) i pozostawiono na 15 min. W lodzie rozmrożono wcześniej przygotowane komórki kompetentne *E.coli* TOP10 (40 μ l), po czym dodano 7 μ l odsolonej mieszaniny ligacyjnej. W przypadku transformacji plazmidem do 40 μ l komórek kompetentnych *E.coli* TOP10 lub *Agrobacterium* dodano ok. 1 ng plazmidu. Następnie bakterie poddano działaniu pola elektrycznego o napięciu 2,5 kV ok. 4-5 s, wykorzystując elektrtoporator Gene Pulser (BioRad) i kuwety ze szczeliną szerokości 0,2 cm (165-2086 BioRad). Komórki po elektroporacji zawieszono w 1 ml czystej **pożywki LB (YEP)***. Inkubowano przez 45 min w 37°C (28°C)*, a następnie wysiano na pożywkę stałą LB (YEP)*, zawierającą antybiotyk selekcyjny. Szalki inkubowano przez noc w 37°C (48 h w 28°C)*. Obecność insertu weryfikowano metodą PCR, jako matrycę stosując zawieszono w wodzie pojedyncze klony bakteryjne, inkubowane przez 10 min w 95°C.

Gwiazdką oznaczono warunki dla *Agrobacterium*.

W przypadku systemu selekcji białe/niebieskie kolonie, bakterie wysiewano na stałą pożywkę LB z 15 μ l 0,1 M IPTG (izopropylotiogalaktozyd) i 30 μ l X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolylo- β -D-galaktozyd) o stężeniu 50 mg/ml, co pozwoliło na wyselekcjonowanie potencjalnych, pozytywnych klonów na podstawie ich białej barwy.

- **Pożywka LB:** podrozdział 3.2.2
- **Pożywka YEP:** podrozdział 3.1.7

3.2.4 Transformacja komórek *E. coli* metodą szoku cieplnego

Do rozmrożonych w lodzie komórek kompetentnych *E. coli* One Shot OmniMax (50 μ l) (Invitrogen) dodano 1 μ l mieszaniny reakcyjnej (reakcja rekombinacji z użyciem klonazy BP lub LR, patrz podrozdział 3.8.1). Inkubowano w lodzie przez 30 min, następnie przeniesiono na 30 sekund do 42°C, po czym ponownie umieszczono w lodzie. Dodano 450 μ l **pożywki LB** bez antybiotyku i inkubowano z wytrząsaniem (200 rpm) przez 1 h w 37°C. Następnie bakterie wysiano na pożywkę stałą LB, zawierającą antybiotyk selekcyjny i hodowano przez noc w 37°C. Obecność insertu weryfikowano metodą PCR, jako matrycę stosując zawieszony w wodzie pojedyncze klony bakteryjne, inkubowane przez 10 min w 95°C .

- **Pożywka LB:** podrozdział 3.2.2

3.2.5 Przygotowanie stoków glicerolowych bakterii *E. coli*, *A. rhizogenes* i *A. tumefaciens*

Zaszczepiono bakteriami 2 ml pożywki LB (YEP)^{*} z antybiotykiem selekcyjnym. Hodowano przez noc w temperaturze 37°C (28°C)^{*}, z wytrząsaniem z prędkością 300 rpm. Do 500 μ l 50% glicerolu dodano 500 μ l hodowli nocnej bakterii. Wymieszano przez worteksowanie i umieszczono w ciekłym azocie. Stoki przechowywano w -80°C. Gwiazdką oznaczono warunki dla *Agrobacterium*.

3.3 Praca z grzybami

3.3.1 Przygotowanie zarodników grzybów: *F. oxysporum*, *F. culmorum* i *P. medicaginis* do infekcji *M. truncatula*

Podstawą do sporządzenia inokulum w przypadku wszystkich trzech grzybów była trzytygodniowa grzybnia, rosnąca na stałej pożywce PDA (70139 Sigma Aldrich) w 28°C. Zawiesinę spor uzyskano poprzez ich wmywanie sterylną wodą z szalki Petriego. Stężenie spor zostało określone przy użyciu hemocytometru.

Tabela 3.9. Zestawienie grzybów patogennych stosowanych do infekcji *M. truncatula*

nazwa	z kolekcji	infekcja	stężenie spor
<i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>medicaginis</i> szczep 179.29	Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS), Utrecht, w Holandii	Transgeniczne korzenie <i>M. truncatula</i> , 100 µl /korzeń	1,3 x 10 ⁶ spor na ml
<i>F. culmorum</i> szczep Cul-3	Intytutu Genetyki Roślin PAN w Poznaniu	Siedmiodniowe korzenie siewek <i>M. truncatula</i> , 500 µl /korzeń	5 x 10 ⁵ spor na ml
<i>P. medicaginis</i> szczep PH 33	Intytutu Genetyki Roślin PAN w Poznaniu	Trzytygodniowe rośliny <i>M. truncatula</i> , rozpylanie zawiesiną spor	2 x 10 ⁶ spor na ml

3.3.2 Przygotowanie elicytora grzybowego (oligosacharydy ścian komórkowych *P. medicaginis*)

W celu uzyskania elicytora grzybowego zastosowano zmodyfikowaną procedurę opisaną przez Hahn et., al. 1992.

Izolacja ścian komórkowych. Grzybnię *P. medicaginis* homogenizowano w 5 objętościach (przyjmując, że 1 ml to 1 g grzybni) 0,5 M NaCl przy użyciu homogenizatora typu T25 firmy IKA. Otrzymaną zawiesinę wirowano 4000 rpm przez 15 min w 4°C, w celu odzyskania osadu. Proces homogenizacji i wirowanie powtórzono jeszcze dwukrotnie. Uzyskany osad ścian komórkowych homogenizowano dodatkowo w 5 objętościach buforu Tris-EDTA, a następnie wirowano 4000 rpm przez 15 min w 4°C. Homogenizację i wirowanie powtórzono dwukrotnie. Osad ścian komórkowych

mieszano w buforze Tris-EDTA przez 3 h, po czym wirowano jak wyżej. Osad przepłukano 15 objętościami buforu Tris-EDTA, a następnie 10 objętościami zimnej destylowanej wody. W tym celu wykorzystano sączenie na lejku Buchnera pod zmniejszonym ciśnieniem, z użyciem pompy wodnej. Przemyty osad zawieszono w 5 objętościach mieszaniny chloroform:metanol w stosunku 1:1 v/v. Rozpuszczalnik organiczny usunięto przez sączenie. Następnie zawieszono osad w 5 objętościach acetonu, po czym znowu usunięto rozpuszczalnik przez sączenie, a osad wysuszono na powietrzu. Otrzymany osad zawieszono w wodzie destylowanej (100 ml/1 g ścian komórkowych) i poddano czterokrotnie dializie w 80 objętościach 0,5 M kwasu octowego, w celu usunięcia soli nieorganicznych. Powtórzono dializę 4x w 80 objętościach destylowanej wody. Ostatecznie uzyskane ściany komórkowe poddano liofilizacji.

Izolacja oligosacharydów ścian komórkowych grzyba. Odważono 100 mg liofilizatu ścian komórkowych i rozpuszczono w 10 ml wody, a następnie autoklawowano (121°C, 1 h). Mieszaninę poddano 20 min sonikacji, po czym wirowano 3 min 3000 g. Pobrano 0,5 ml supernatantu do oznaczenia stężenia cukrów, resztę osuszono w wirówce próżniowej (ang. *speedvac*), a uzyskany osad zawieszono w 2 ml wody MQ.

Oznaczenie stężenia elicytora przeprowadzono według procedury opisanej przez Fry et al., 1994. Do 0,5 ml roztworu oligosacharydów ścian komórkowych dodano 0,114 g kwasu trifluorooctowego. Materiał hydrolizowano przez 1 h w 121°C, a następnie próbę suszono przez odparowanie w strumieniu azotu. Dodano 300 µl izopropanolu i ponownie odparowano. Osad zawieszono w 1 ml wody. Przygotowano roztwory glukozy w wodzie o stężeniach: 10 µg/ml, 30 µg/ml, 50 µg/ml, 70 µg/ml, 90 µg/ml do krzywej standardowej. Następnie przeprowadzono reakcję kolorymetryczną. Do 1 ml próby badanej jak i wzorców dodano 1 ml 5% fenolu i 5 ml stężonego kwasu siarkowego, delikatnie wymieszano. Absorbancję mierzono przy długości fali 490 nm.

- **BuforTris-EDTA:** 20 mM bufor Tris-HCl, pH=7,5 z 50 mM EDTA

3.4 Praca z kwasami nukleinowymi

3.4.1 Izolacja genomowego DNA

W zależności od potrzeb, korzenie, liście i pędy *Medicago* utarto w ciekłym azocie, dodano 400 μ l **buforu do izolacji genomowego DNA** (na 100 mg materiału) i worteksowano 5 sekund, po czym wirowano przez 1 min przy 13000 rpm. Przeniesiono 300 μ l supernatantu do świeżej próbówki i dodano 300 μ l izopropanolu, inkubowano 2 min w temperaturze pokojowej, a następnie wirowano przez 3 min przy 13000 rpm. Osad zawieszono w 100 μ l **buforu TE**.

- **Bufor do izolacji genomowego DNA:** 200 mM Tris HCl; 250 mM NaCl; 25 mM EDTA; 0,5% SDS; pH=7,5
- **Bufor TE:** 10 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA (pH=8,0)

3.4.2 Izolacja całkowitego RNA

Izolację całkowitego RNA przeprowadzano przy użyciu zestawu do izolacji totalnego RNA z roślin (RNeasy Mini Kit firmy Qiagen), zgodnie z załączoną przez producenta instrukcją. Pomiar stężenia RNA wykonano za pomocą spektrofotometru (NanoDrop 1000) przy długości fali 260 nm. Jakość wyizolowanego RNA oceniono spektrofotometrycznie (NanoDrop 1000) przez określenie stosunku absorbancji A_{260}/A_{280} oraz za pomocą rozdziłu elektroforetycznego w 1,5% żelu agarozowym.

3.4.3 Odwrotna transkrypcja

Odwrotną transkrypcję, przeprowadzono za pomocą zestawu Omniscript firmy Qiagen lub zestawu Super Script firmy Invitrogen, odpowiednio w celu analizy poziomu ekspresji oraz uzyskania pełnej sekwencji cDNA genu *MtABCG10*, zgodnie z załączoną przez producentów instrukcją.

3.4.4 Łańcuchowa reakcja polimerazy (PCR, ang. *Polymerase Chain Reaction*)

Półilościową reakcją PCR prowadzono w termocyklerze MJ Mini personal thermo cycler (BioRad). Liczbę cykli dobierano eksperymentalnie (22-32). Skład mieszaniny reakcyjnej (**Tabela 3.10**), profil temperaturowo-czasowy (**Tabela 3.11**) oraz sekwencje starterów stosowanych w reakcji (**Tabela 3.12**) przedstawiono poniżej. Startery zostały zsyntetyzowane przez Serwis Sekwencjonowania i Syntezy DNA IBB PAN lub firmę Genomed.

Tabela 3.10. Skład mieszaniny reakcyjnej PCR

komponent reakcji	objętość [μ l]	stężenie końcowe
matryca*	2	-
starter wprost (10 μ M)	1,25	0,5 μ M
starter odwrócony (10 μ M)	1,25	0,5 μ M
bufor GoTaqFlexi 5X	5	1X
MgCl ₂ (25 mM)	1,5	1,5 mM
dNTP (2 mM)	2,5	0,2 mM
woda	11,4	-
polimeraza GoTaqFlexi (5 u/ μ l)	0,1	0,02 u/ μ l
objętość końcowa	25	-

*10x rozcieńczone cDNA, uzyskane w wyniku reakcji odwrotnej transkrypcji (Omniscript) z 500 ng totalnego RNA

Tabela 3.11. Profil temperaturowo-czasowy reakcji PCR dla poszczególnych genów

profil temperaturowo-czasowy	wstępna denaturacja	denaturacja	przyłączenie startera	elongacja
nazwa genu				
<i>MtABCG1-MtABCG19</i>	95°C – 3'	95°C – 30''	52°C – 30''	72°C – 30''
<i>MtABCG9/11</i>	95°C – 3'	95°C – 30''	46°C – 30''	72°C – 45''
<i>Mtβ-aktyna</i>	95°C – 3'	95°C – 30''	52°C – 30''	72°C – 30''
<i>MtPAL</i>	95°C – 3'	95°C – 30''	52°C – 30''	72°C – 30''
<i>MtIFS</i>	95°C – 3'	95°C – 30''	52°C – 30''	72°C – 30''
<i>Mtβ-AS</i>	95°C – 3'	95°C – 30''	52°C – 30''	72°C – 30''
<i>Foβ-tubulina</i>	95°C – 3'	95°C – 30''	54°C – 30''	72°C – 15''
<i>dsRED</i>	95°C – 3'	95°C – 30''	56°C – 15''	72°C – 90''

Tabela 3.12. Zestawienie starterów stosowanych w reakcji PCR

nazwa genu (nr dostępu)	nazwa startera	sekwencja startera	Tm	długość amplikonu
<i>MtABC1</i> (XM_003625351)	PDR1_F	5'- TGG TGG CTT CAC AAT ATG G -3'	52,6 °C	335 pz
	PDR1_R	5'- GGA GTA TAA TTG ACT ACC CG -3'	49,4 °C	
<i>MtABC2</i> (XM_003625350)	PDR2_F	5'- GAT GGA AGA CAA ACA GTG G -3'	50,9 °C	304 pz
	PDR2_R	5'- TAC TTA CAT GAC ATC GGA CC -3'	51,4 °C	
<i>MtABC3</i> (XM_003625353)	PDR3_F	5'- GGA AGA CAA ACA GTA GAA GG -3'	50,3 °C	251pz
	PDR3_R	5'- CTA ATC ACT AGC ACG ATA CAG -3'	50,0 °C	
<i>MtABC4</i> (XM_003625313)	PDR4_F	5'- CAA TGA TGG AAG CCA AAC C -3'	51,9 °C	313 pz
	PDR4_R	5'- CTT TAT CGA AGC CGT ATC AC -3'	50,8 °C	
<i>MtABC5</i> (XM_003625357)	PDR5_F	5'- GAC TAT TTA AGA GAC TAC TTT GG -3'	48,3 °C	181 pz
	PDR5_R	5'- AGG CTA TCC ATT TTA ACC ATC -3'	50,1 °C	
<i>MtABC6</i> (XM_003625355)	PDR6_F	5'- GGA TAG TTT GGA TTT CAA TGG -3'	49,2 °C	265 pz
	PDR6_R	5'- TCT GGT TTA TTC TTG AGT TGC -3'	50,6 °C	
<i>MtABC7</i> (XM_003588650)	PDR7_F	5'- CAT GGA CAC ACT TGA TAA TGG -3'	51,3 °C	282 pz
	PDR7_R	5'- TCT TCT TCA TTC ATG TAT GGC -3'	50,3 °C	
<i>MtABC8</i> (XM_003588651)	PDR8_F	5'- CTT GAG AAT GGT CAA AGG G -3'	50,7 °C	302 pz
	PDR8_R	5'- CAT TAT TTT CCG CAT TTG TAG G -3'	50,3 °C	
<i>MtABC9</i> (XM_003597768)	PDR9/11_F	5'- TAT TCT TCA TGT ACT TCA C -3'	42,5 °C	619 pz
	PDR9/11_R	5'- CTC AAA TTA ATA CAA CAA AAG -3'	42,6 °C	
<i>MtABC10</i> (XM_003597771)	PDR10_F	5'- AAC TAC TGT TAT GTC GAC CG -3'	49,7 °C	406pz
	PDR10_R	5'- CAC TAT CTT TCA TTG ATG ATC -3'	46,5 °C	
<i>MtABC11</i> (XM_003597770)	PDR9/11_F	5'- TAT TCT TCA TGT ACT TCA C -3'	42,5 °C	619 pz
	PDR9/11_R	5'- CTC AAA TTA ATA CAA CAA AAG -3'	42,6 °C	
<i>MtABC12</i> (XM_003625724)	PDR12_F	5'- GGT ACT ATT GGG CTT CTC C -3'	52,1 °C	366pz
	PDR12_R	5'- TGA ATG AGA TCA GGT TGA TG -3'	49,6 °C	
<i>MtABC13</i> (XM_003625725)	PDR13_F	5'- GGT ACT ATT GGG CTT CTC C -3'	52,1 °C	366pz
	PDR13_R	5'- TGC TCA AAG AGG TGA TTC C -3'	47,4 °C	
<i>MtABC14</i> (XM_003625727)	PDR14_F	5'- GGT ACT ATT GGG CTT CTC C -3'	52,1 °C	395 pz
	PDR14_R	5'- GGT GAT TTC ACA TGA GAC ATA C -3'	51,3 °C	
<i>MtABC15</i> (XM_003609817)	PDR15_F	5'- TTA CTA TGG GTT CAG ACA CG -3'	51,6 °C	291 pz
	PDR15_R	5'- CCA ATA TAC ATC ATT GCT GC -3'	49,2 °C	
<i>MtABC16</i> (XM_003626986)	PDR16_F	5'- TGA TTG TGT CTC AAT ATC ACG -3'	50,2 °C	294 pz
	PDR16_R	5'- CAC ATG GAC TGT AAT GTA ACC -3'	51,0 °C	
<i>MtABC17</i> (XM_003615586)	PDR17_F	5'- ATG TAG AAA CAA GAA TTG TGG -3'	48,5 °C	258 pz
	PDR17_R	5'- CTA CACTA TGA TGT CAA AGG G -3'	49,8 °C	
<i>MtABC18</i> (XM_003597635)	PDR18_F	5'- GTA TAG AGA TGT GAC AAT AGG C -3'	51,1 °C	291 pz
	PDR18_R	5'- CGA TAC GAA ATG TGT TGT CC -3'	49,7 °C	
<i>MtABC19</i> (XM_003609152)	PDR19_F	5'- GTG ATG GGA TGG ACT TTG C -3'	51,1 °C	210 pz
	PDR19_R	5'- AAC AGG AAA GCC TAC AAA CC -3'	49,7 °C	
<i>Mtβ-aktyna</i> (JQ028731)	Aktyna_F	5'- TTC TCT CAG TAC TTT CCA GC -3'	49,7 °C	288 pz
	Aktyna_R	5'- AAG CAT CAC AAT CAC TCC -3'	45,8 °C	
<i>MtPAL</i> (XM_003625614)	PAL_F	5'- AGC AAT TGA TTT AAG ACA TTT GG -3'	48,1 °C	251 pz
	PAL_R	5'- CAT TAA CTA ATG CAT GAT CTA CC -3'	49,9 °C	
<i>MtIFS</i> (AY939826)	IFS_F	5'- CAA GAA TGT GAG ATC GAC GG -3'	51,8 °C	233 pz
	IFS_R	5'- CAC ACA TGA GAT TAT GTG CC -3'	49,7 °C	
<i>Mtβ-AS</i> (XM_003604073)	β-AS_F	5'- TAG AGA TAT TTA CCC CTT GTG G -3'	53,9 °C	327 pz
	β-AS_R	5'- TAT CCC TAC GGC AAA CAT -3'	53,0 °C	
<i>Foβ-tubulina</i> (DQ092478)	Tubulina_F	5'- ACC GTT GTA GAC ACC ATT GC -3'	51,8 °C	141 pz
	Tubulina_R	5'- AGT GCG TAA GTG CTC ATC G -3'	51,1 °C	
<i>dsRED</i>	dsRed_F	5'- CTC CAA GAA CGT CAT CAA GG -3'	55,4 °C	628 pz
	dsRed_R	5'- CAC GAT GGT GTA GTC CTC G -3'	57,3 °C	

3.4.5 Elektroforeza DNA i RNA w żelu agarozowym

Elektroforezę DNA/RNA przeprowadzano w 1% i 1,5% żelach agarozowych, zawierających bromek etydyny o stężeniu 1 µg/ml, w buforze 1X TBE lub 1X TAE. Stosowano napięcie 80-110V. Rozdzielone fragmenty DNA/RNA uwidaczniano w świetle UV. Obraz zapisywano przy pomocy systemu do dokumentacji żeli (Gel Logic 200, Kodak). Wielkość fragmentów ustalano stosując komercyjne markery (GeneRuler 1kb, Fermentas).

- **Bufor 5X TBE (1L):** Tris(hydroksymetylo)aminometan 54 g; kwas borowy 27,5 g; 0,5 M EDTA (pH=8.0) 20 ml
- **Bufor 50X TAE (1L):** Tris(hydroksymetylo)aminometan 242 g; lodowaty kwas octowy 57,1 ml; 0,5 M EDTA (pH=8.0) 100 ml

3.4.6 Oczyszczanie produktów reakcji PCR

Oczyszczanie produktów reakcji PCR przeprowadzano za pomocą zestawu firmy QIAGEN (QIAquick PCR Purification Kit - z użyciem mikrowirówki), zgodnie z załączoną przez producenta instrukcją.

3.4.7 Oczyszczanie fragmentów DNA z żelu agarozowego

Fragmenty DNA rozdzielane w żelu agarozowym (1%-1,5%), oczyszczano za pomocą zestawu firmy QIAGEN (QIAquick Gel Extraction Kit - z użyciem mikrowirówki), zgodnie z załączoną przez producenta instrukcją.

3.4.8 Ilościowa reakcja PCR w czasie rzeczywistym (qRT-PCR)

Ilościową reakcję PCR prowadzono w aparacie Rotor Gene RG-3000 firmy Corbett Research. W celu detekcji przyrostu produktu w kolejnych cyklach reakcji stosowano barwnik fluorescencyjny Sybr Green, interkalujący do dwuniciowego DNA. Wykorzystywano dostępne komercyjnie odczynniki: Power SYBR Green PCR Master Mix firmy Applied Biosystem lub MESA GREEN qPCRMastermix Plus for SYBR firmy Eurogentec. Analizę danych wykonywano wykorzystując oprogramowanie Rotor Gene 6 i metodę dwóch krzywych standardowych (ang. *two standard curves method*)

http://www.vtpup.cz/common/manual/LF_umikrob_CorbetResearch_Rotor-Gene6000_manual_EN.pdf.

Metoda ta wymaga przygotowania dwóch krzywych standardowych, kolejno dla badanego genu i genu referencyjnego (charakteryzującego się stałym poziomem ekspresji w danych warunkach eksperymentu). Uzyskane krzywe są następnie wykorzystywane do ilościowego określenia stężenia DNA (odpowiadającego analizowanemu genom) w poszczególnych próbach. Względną ekspresję badanego genu określa się przeprowadzając tzw. normalizację czyli dzieląc wartości stężenia uzyskane dla genu badanego przez wartości stężenia uzyskane dla genu referencyjnego.

Przygotowanie krzywych standardowych. Wykonano serię rozcieńczeń seryjnych roztworu zawierającego znane stężenie powielanej sekwencji (oczyszczonego z żelu produktu PCR, obejmującego region namnażany podczas właściwej reakcji ilościowej). Następnie przeprowadzono reakcję qRT-PCR dla każdego rozcieńczenia w trzech powtórzeniach. Pozwoliło to wygenerować krzywą standardową, w której dla danego rozcieńczenia przypisany został tzw. cykl progowy (Ct, ang. *threshold cycle*), czyli cykl, w którym fluorescencja przekracza poziom tła, a reakcja wchodzi w fazę logarytmiczną. Dodatkowo w celu określenia specyficzności produktu wyznaczono krzywą topnienia w zakresie temperatur 52°C – 95°C. Warunki reakcji dla poszczególnych genów przedstawiono poniżej w **Tabelach 3.13, 3.14 i 3.15**.

Właściwa analiza qRT-PCR. W przypadku oceny poziomu ekspresji genów *MtABCG10* i *MtABCG16* matrycę stanowiło cDNA, odpowiadające puli całkowitego mRNA w materiale, który pozyskano w danych warunkach eksperymentalnych. Wartości cyklu progowego (Ct) dla poszczególnych genów odnoszono do przygotowanych wcześniej krzywych standardowych. Względną ekspresję *MtABCG10* i *MtABCG16* określano przeprowadzając normalizację w użyciu *Mtβ-aktyny*, jako genu referencyjnego.

Tabela 3.13. Skład mieszaniny reakcyjnej qRT-PCR

komponent reakcji	objętość [μl]	stężenie końcowe
matryca*	2	-
starter wprost (10 μl)	1	0,5 μM
starter odwrócony (10 μl)	1	0,5 μM
woda	6	-
SYBR GREEN/MESA GREEN master mix (2X)	10	1X
objętość końcowa	20	-

*10x rozcieńczone cDNA, uzyskane wyniku reakcji odwrotnej transkrypcji (Omniscript) z 500 ng totalnego RNA lub oczyszczony produkt PCR

Tabela 3.14. Profil temperaturowo-czasowy reakcji qRT-PCR dla poszczególnych genów

profil temperaturowo-czasowy gen	wstępna denaturacja	denaturacja	przyłączenie startera	elongacja
<i>Mtβ-aktyna</i>	95°C – 10'	95°C – 20''	52°C – 15''	72°C – 20''
<i>MtABCG10</i>	95°C – 10'	95°C – 20''	52°C – 15''	72°C – 20''
<i>MtABCG16</i>	95°C – 10'	95°C – 20''	52°C – 15''	72°C – 20''

Tabela 3.15. Zestawienie starterów stosowanych w reakcji qRT-PCR

nazwa genu	nazwa startera	sekwencja startera	Tm	długość amplikonu
<i>MtABCG10</i>	PDR10_F	5'- AAC TAC TGT TAT GTC GAC CG -3'	49,7°C	143 pz
	PDR10_R	5'- CAA CAG CGA AAA TAA AGG CA -3'	47,7 °C	
<i>MtABCG16</i>	PDR16_F	5'- TGA TTG TGT CTC AAT ATC ACG -3'	50.2 °C	294 pz
	PDR16_R	5'- CAC ATG GAC TGT AAT GTA ACC -3'	51.0 °C	
<i>Mtβ-aktyna</i>	Aktyna_F	5'- TTC TCT CAG TAC TTT CCA GC -3'	49,7 °C	288 pz
	Aktyna_R	5'- AAG CAT CAC AAT CAC TCC -3'	45,8 °C	

3.4.9 Ligacja do wektora pGEM-T-Easy

Do próbówki przeniesiono odpowiednią ilość oczyszczonego wcześniej produktu reakcji PCR (do reakcji dodawano taką ilość wstawki by stosunek molowy wektora do wstawki wynosił 1:3). Następnie dodano 2 µl 10X stężonego buforu do ligacji, 0,5 µl wektora pGEM-T-Easy (25 ng) i 1 µl ligazy (3 u). Reakcję ligacji prowadzono w temperaturze 16°C lub 4°C przez noc.

3.4.10 Izolacja plazmidowego DNA z komórek bakteryjnych na małą skalę (1,5 ml)

Izolację plazmidowego DNA z komórek bakteryjnych przeprowadzano za pomocą zestawu firmy QIAGEN (QIAprep Spin Miniprep Kit - z użyciem mikrowirówki), zgodnie z załączoną przez producenta instrukcją.

Stosowano także zmodyfikowaną procedurę Zhou 1990. Wirowano 1,5 ml hodowli nocnej bakterii przez 10 s, przy 10000 rpm. Delikatnie zlano supernatant pozostawiając w próbówce ok. 50-100 µl jego objętości. Zawieszono bakterie, po czym dodano 300 µl **buforu TENS** i worteksowano 10 s. Następnie dodano 150 µl 3 M octanu sodu o pH 5,2 i worteksowano 10 s. Wirowano 5 min przy 14000 rpm w celu osadzenie resztek komórek i genomowego DNA. Supernatant przeniesiono do czystych próbówek typu Eppendorf i dodano 900 µl schłodzonego etanolu 98%. Inkubowano w -20°C przez

15 min. Wirowano przez 30 min 14000 rpm w 4°C, w celu osadzenia plazmidowego DNA i RNA. Usunięto supernatant i dodano 200 µl 70% etanolu, a następnie wirowano przez 10 min, przy 14000 rpm w 4°C. Usunięto supernatant, osad suszono i rozpuszczono DNA w 50 µl buforu TE, do którego wcześniej dodano RNazęA (na 50 µl 0,5 µl ze stoku 1 mg/ml).

- **bufor TENS:** bufor TE pH=8 z 0,1 N NaOH i 0,5% SDS

3.4.11 Sekwencjonowanie wklonowanych produktów PCR

Automatyczne sekwencjonowanie wykonano metodą Sanger z wykorzystaniem fluorescencyjnie znakowanych dideoksynukleotydów (ddNTP). Użyto zestawu BigDye® Terminator V1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems). Powielanie matrycy do sekwencjonowania wykonano w aparacie MJ Mini Personal Thermal Cycler, firmy BioRad. Skład mieszaniny reakcyjnej (**Tabela 3.16**) oraz stosowany program przedstawiono poniżej.

Tabela 3.16. Skład mieszaniny reakcyjnej stosowanej w reakcji sekwencjonowania

komponent reakcji	objętość (µl)	stężenie końcowe
plazmidowy DNA	-	150-300 ng/µl
starter (3,3 µM)	1	0,33 µM
BigDaySequencind Buffer (5X)	2	1X
TRR (Terminator Ready Reaction Mix)	4	1X
woda MQ	do 10	-
objętość końcowa	10	-

Program: 95°C-1'; (95°C-10", 50°C-10", 60°C-4')x25; 4°C ∞

Po reakcji wytrącono produkty sekwencjonowania: przeniesiono mieszaninę reakcyjną do próbówki typu Eppendorf i kolejno dodano: 1 µl 125 mM EDTA, 1 µl 3 M octanu sodu i 25 µl 98% etanolu. Następnie zworteksowano i inkubowano w ciemności przez 15 min w temperaturze pokojowej. Próby wirowano przez 30 min, przy 14000 rpm w 4°C. Usunięto supernatant i dodano 100 µl 70% etanolu, a następnie wirowano przez 10 min, przy 14000 rpm w 4°C. Po usunięciu supernatantu osad wysuszono, a następnie DNA rozpuszczono w 10 µl formamidu. Rozdział elektroforetyczny

przeprowadzono w aparacie ABI 3130xl Genetic Analyzer w Wydziałowej Pracowni Techniki Biologii Molekularnej UAM w Poznaniu. Do analizy sekwencji wykorzystano program Lasergene (DNASTAR).

3.4.12 Hybrydyzacja Southern blot

Izolacja genomowego DNA. Izolację genomowego DNA z korzeni siewek *M. truncatula* (ekotyp Jemalong J5 i R108) przeprowadzano przy użyciu zestawu do izolacji genomowego DNA z roślin (DNeasy Plant Maxi Kit, Qiagen), zgodnie z załączoną przez producenta instrukcją. Pomiar stężenia DNA wykonano za pomocą spektrofotometru (NanoDrop 1000) przy długości fali 260 nm.

Trawienie DNA enzymami restrykcyjnymi. Niezależnie poddano trawieniu enzymami restrykcyjnymi EcoRV (Fermentas) lub HindIII (Fermentas) 40 µg totalnego DNA. Skład mieszaniny reakcyjnej podano w **Tabeli 3.17**.

Tabela 3.17. Skład mieszaniny reakcyjnej stosowanej przy trawieniu DNA EcoRI/HindIII

komponent reakcji	objętość	stężenie końcowe
genomowe DNA	-	0,1 µg/µl
EcoRI/HindIII (50u/µl)	4 µl	0,5 u/µl
bufor R 10X	40 µl	1X
woda	do 400 µl	-

Reakcję trawienia prowadzono w temperaturze 37°C przez 4 godziny, po czym do mieszaniny dodano dodatkowo po 2 µl odpowiedniego enzymu restrykcyjnego (EcoRI lub HindIII) i inkubowano dalsze 2 godziny.

Elektroforezę nietrawionego i trawionego DNA prowadzono w 1% żelu agarozowym w buforze TBE. Stosowano napięcie 60 V przez 20 min, a następnie 20 V przez noc. Żel wybarwiono w bromku etydyny i sfotografowano razem z markerem, a następnie odbarwiono płuczając w buforze TBE.

Depurynacja , denaturacja i neutralizacja DNA. Żel płukano kolejno: 20 min w 1% HCl, w celu depurynacji DNA, 30 min w 1,5 M NaCl, 0,5 M NaOH, w celu denaturacji DNA i w końcu 3 M NaCl, Tris pH=7,5, w celu neutralizacji DNA. Pomędzy poszczególnymi

etapami żel był przemywany wodą, a na końcu przeniesiony do 20X stężonego **buforu SSC**.

Transfer DNA na membranę. Transfer prowadzono przez noc metodą kapilarną z wykorzystaniem buforu 20X SSC. Na nasączoną 20X stężonym buforem SSC bibułę Wathman 3mm nałożono kolejno: żel, membranę Hybond N+ (Amersham) o rozmiarach żelu, dwie bibuły Whatman 3mm o rozmiarach żelu a na końcu stos ręczników papierowych. Żel, membrana i bibuły przed nałożeniem były zanurzane w 20X SSC. Po zakończeniu transferu membranę przepłukano w 20X SSC, umieszczono między bibułami Whatman 3mm i zapieczono w piecu do hybrydyzacji (2 h 80°C).

Przygotowanie sondy DNA metodą PCR. Do probówki dodano kolejno: matrycy (genomowe DNA, ok. 100 ng); 5 µl 5X bufor GoTaqFlexi; 1,25 µl starter wprost 10 µM (5'-GGATCTCACCTATGATGTACG-3'); 1,25 µl starter odwrócony 10 µM (5'-AACACAAATCCAGCCAATCC-3'); 2,5 µl 2mM dNTP (-dCTP); 2,5 µl 40 µM dCTP; 0,2 µl polimeraza GoTaqFlexi (Promega), uzupełniono wodą do 23,8 µl, po czym w pokoju radioaktywnym dodano 1,2 µl P³²dCTP. Reakcję PCR prowadzono w aparacie PTC-200 firm MJ Research, stosując następujący program:

Program: 98°C-5'; (95°C-30", 52°C-30", 72°C-1')x30; 4°C ∞

Produkt reakcji oczyszczono zestawem QIAquick PCR Purification (Qiagen) do oczyszczania produktów PCR. Pomiar radioaktywności wykonano za pomocą czytnika (MicroBeta², PerkinElmer).

Hybrydyzacja. Prehybrydyzację prowadzono przez 2 h w 60°C w **buforze prehybrydyzacyjnym**, po czym do buforu dodano oczyszczoną sondę DNA, którą wcześniej zdenaturowano ogrzewając przez 10 minut w 98°C. Hybrydyzację prowadzono przez 12 h w temperaturze 60°C. Następnie membranę trzykrotnie przepłukano 2X stężonym buforem **SSPE** z 0,1% SDS, inkubując po 10 min w 60°C. Detekcję radioaktywności (autoradiografię) przeprowadzono przy pomocy skanera Typhoon.

- **20X SSC:** 3,0 M NaCl; 0,3 M cytrynian sodu, pH=7,0

- **Bufor prehybrydyzacyjny:** 6,25 ml **20X SSPE**; 2,5 ml **50X odczynnika Denhardta**; 1,25 ml 10% SDS; 15 ml wody, bufor podgrzano do 60°C i dodano 0,5 ml DNA ze spermy śledzia (1 mg/ml) wcześniej inkubowanej 10 min w 98°C
- **50X odczynnik Denhardta:** 1% BSA; 1% PVP; 1% Ficoll-400
- **20X SSPE:** 3,0 M NaCl; 0,2 M NaH₂PO₄; 0,02 M EDTA, pH=7,4

3.5 Praca z materiałem białkowym

3.5.1 Izolacja frakcji mikrosomalnej (Mi) do analizy białek błonowych

W zależności od potrzeb materiał roślinny roztarto w mrożeniu w obecności ciekłego azotu. Następnie dodano **buforu homogenizacyjnego (I)** (2-3 objętości w stosunku do masy wyjściowego materiału (przyjmując, że 100 mg odpowiada 100 μl). Wszystkie etapy izolacji przeprowadzono na lodzie. Homogenizat przeniesiono do próbek typu Eppendorf lub próbek wirówkowych i wirowano 5 min przy 5000 g w 4°C. Przeniesiono supernatant do nowych próbek i ponownie wirowano 5 min przy 10000 g w 4°C.

W zależności od objętości supernatant przeniesiono do odpowiednich próbek, zrównoważono i wirowano:

- Próbkę typu Beckman 1,5 ml (rotor TLA45, ultrawirówka TL-10) 40000 rpm 1 h 4°C
- Beckman quick seal 13,5 ml (rotor 70.1 Ti, ultrawirówka XL-70) 40000 rpm 1h 4°C
- Beckman quick seal 39 ml (rotor 70 Ti, ultrawirówka XL-70) 35000 rpm 1 h 4°C

Po wirowaniu usunięto supernatant, a osad zawieszono w **roztworze do zawieszania (II)** frakcji mikrosomalnej. Po dokładnym zawieszeniu próby zwirowano 1 min 10000 rpm, supernatant przeniesiono do nowych próbek i przechowywano w -20°C.

- **Bufor do homogenizacji (I):** 250 mM sorbitol; 50 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA; pH=8,0 ustalone stężonym HCl. Bufor autoklawowano, przechowywano w 4°C. Bezpośrednio przed użyciem dodano: 5 mM DTT lub w przypadku korzeni 20 mM DTT; nierozpuszczalny PVP 0,6%; PMSF 0,001 M; 10 μl/ml inhibitorów proteaz (Sigma P9599).
- **Roztwór do zawieszania (II):** 5 mM KH₂PO₄; 330 mM sacharoza; 3 mM KCl; pH=7,8 ustalone KOH. Roztwór sterylizowano przy użyciu filtra 0,22 μm (Millipore), przechowywano w 4°C.

3.5.2 Izolacja frakcji błony komórkowej metodą rozdziału między dwie fazy (ang. *Two Phase Partition*)

Izolację frakcji błony komórkowej (plazmolemmy) przeprowadzono według zmodyfikowanej procedury opisanej przez Larsson et al. 1987, metodą rozdziału pomiędzy dwie fazy (polietylenoglikol (PEG)/Dekstran).

Do izolacji frakcji błony komórkowej wykorzystano 2 ml frakcji mikrosomalnej o stężeniu białka ok. 2,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, wyizolowanej z 6 g siedmiodniowej hodowli zawieszinowej *M. truncatula*. Przygotowaną **mieszaninę dwufazową (Tabela 3.18)**, rozpipetowano po 6 g do świeżych próbek i wirowano 10 min przy 1500 rpm w 4°C, w celu rozdzielenia faz. Następnie nałożono 2 g frakcji mikrosomalnej na powierzchnię mieszaniny dwufazowej i energicznie wymieszano. Wirowano przy 1500 rpm w 4°C przez 10 min. Zebrano górną warstwę ok. 5 ml i rozcieńczono 4x **buforem do rozcieńczenia (III)**. Materiał przeniesiono do próbek wirówkowych typu quickseal 13,5 ml i wirowano (rotor 70.1 Ti, ultrawirówka XL-70) przez 1 h w 4°C przy 40000 rpm. Otrzymany osad zawieszono w **roztworze do zawieszania (II)**.

Tabela 3.18. Skład mieszaniny dwufazowej

składniki	na 27 g mieszaniny
dekstran 20%	11,52 g
PEG 40%	5,76 g
sacharoza	3,05 g
KH_2PO_4 0,2 M pH=7,8	675 μl
KCl 1 M	82 μl
H_2O	do 27 g
Mieszano przez noc w 4°C	

- **Bufor do rozcieńczenia (III):** 10 mM Tris-HCl, 330 mM sacharoza, pH=7,8 ustalone HCl. Bufor sterylizowano przy użyciu filtra 0,22 μm (Millipore), przechowywano w 4°C.
- **Roztwór do zawieszania (II):** podrozdział 3.5.1

3.5.3 Oznaczanie zawartości białka metodą Bradford

Przygotowano krzywą standardową w następujący sposób: do 6 próbek typu Eppendorf zawierających po 600 μl wody destylowanej dodano wody i BSA według Tabeli 3.19.

Tabela 3.19. Skład prób wykorzystywanych do wykreślenia krzywej standardowej w metodzie Bradford

Lp.	H ₂ O [μl]	BSA 0,1 mg/ml [μl]	końcowe stężenie BSA [μg/μl]
1.	200	0	0
2.	175	25	2,5
3.	150	50	5
4.	125	75	7,5
5.	100	100	10
6.	75	125	12,5

Następnie do każdej próbowki dodano 200 μl odczynnika Bradford (BioRad) i delikatnie zworteksowano.

Przygotowano właściwe próby do oznaczenia zawartości białka (w dwóch powtórzeniach): do próbówek typu Eppendorf dodano po 798 μl wody destylowanej, następnie 2 μl próby i na koniec 200 μl odczynnika Bradford (BioRad), całość dobrze wymieszano. Absorbancję mierzono przy długości fali 595 nm.

3.5.4 Elektroforeza białek SDS-PAGE

Elektroforezę prowadzono przy użyciu zestawu Mini-Protean firmy BioRad. Przygotowano żel rozdzielający (R) i zagęszczający (Z) według **Tabeli 3.20**

Tabela 3.20. Skład żelu rozdzielającego i zagęszczającego

składniki	7% żel rozdzielający	żel zagęszczający
akrylamid-bisakrylamid (30% – 0,8%)	4,2 ml	1,2 ml
bufor R/bufor Z	4,5 ml	2 ml
woda	9,2 ml	4,7 ml
APS 10%	100 μl	75 μl
TEMED	9 μl	7,5 μl

Następnie przygotowano próby. Do odpowiedniej objętości próby, dodano 3X stężony **bufor do zawieszania prób białkowych (SBB)**, a następnie inkubowano 15 min w 37° C i wirowano przez 5 min przy 13000 rpm. Supernatant przeniesiono do świeżej próbowki. Próby poddano elektroforezie w żelu poliakrylamidowym (złożonym z 7% żelu rozdzielającego oraz żelu zagęszczającego) w **buforze do elektroforezy**. Elektroforezę prowadzono przy napięciu 50 V do momentu przekroczenia przez

barwnik żeluzagęszczającego, a następnie przełączono na 100 V do czasu wypłynięcia barwnika z żelu.

- **Bufor elektroforetyczny (Laemmli) 10X:** 250 mM Tris; 1,92 M glicyna, pH=8,3
- **Bufor elektroforetyczny (Laemmli) 1X:** bufor elektroforetyczny; 0,1% SDS
- **Bufor do żeluzdzielającego (R) 4X:** 1,5 M Tris; 0,4% SDS; pH=8,8 ustalone stężonym HCl, przechowywany w 4°C
- **Bufor do żeluzagęszczający (Z) 4X:** 0,5 M Tris; 0,4% SDS; pH=6,8 ustalone stężonym HCl, przechowywany w 4°C
- **Bufor do zawieszania prób (SBB) 3X:** Tris/HCl 1 M pH=6,8 (4,8 ml); SDS (1,2 g); glicerol 100% (6 g); błękit bromofenolowy (0,003 g). Przed użyciem część buforu przeniesiono do próbówki typu Eppendorf i dodano szczyptę DTT
- **10% roztwór APS ((NH₄)₂S₂O₈):** 0,5 mg APS rozpuszczono w 5 ml wody destylowanej, przechowywano w -20°C
- **30,8% roztwór monomerów akrylamidu:** 30% akrylamid; 0,8% metylenobisakrylamid, przechowywano w 4°C

3.5.5 Elektrotransfer półsuchy (ang. *Semi-Dry*)

Przygotowano 2 bibuły do elektrotransferu (BioRad) i membranę PVDF (Millipore) o wymiarach żeluzdzielającego. Membranę przepłukano w metanolu, a następnie przeniesiono do pojemnika z **buforem do transferu półsuchego**. W aparacie do elektrotransferu półsuchego (BioRad) umieszczono kolejno: bibułę, membranę, żel, bibułę. Za każdym razem wyrównywano powierzchnię, używając szklanej pipety. Całość polano niewielką ilością buforu. Elektrotransfer prowadzono przy napięciu 22 V przez 1 h.

- **Bufor do transferu półsuchego:** 48 mM Tris; 39 mM glicyna; 10% metanol, 0,0375% SDS

3.5.6 Hybrydyzacja Western blot

Membranę PVDF po elektrotransferze płukano, wytrząsając ją przez 15 min w **buforze do przemywania**, inkubowano w **roztworze blokującym** przez 1,5 h, po czym ponownie płukano przez 15 min. Następnie membranę inkubowano z przeciwciałami

pierwszorzędowymi przez 1 h. Poniżej podano najczęściej stosowane rozcieńczenia przeciwciał wykorzystywanych w pracach eksperymentalnych:

- przeciwciała anti-H⁺-ATP-aza (W1G) 1:10000 (Morsomme et al. 1998)
- przeciwciała anti-ABCG (GPDR) 1:1000 (Ducos et al. 2005)
- oczyszczone przeciwciała anti-MtABCG10 (MtABC10) 1:5000 (Eurogentec)
- surowica sprzed immunizacji peptydem swoistym dla MtABCG10 (PPI 10) 1:1000 (Eurogentec)

Po inkubacji z przeciwciałami pierwszorzędowymi membranę płukano dwukrotnie po 15 min w buforze do przemywania, a następnie inkubowano przez 1 h z rozcieńczonymi w stosunku 1:15000 przeciwciałami drugorzędowymi (Sigma Aldrich anti-królicze sprzężone z alkaliczną fosfatazą). Po inkubacji z przeciwciałami, membranę płukano czterokrotnie po 5 min buforem do przemywania. Celem przeprowadzenia reakcji barwnej na aktywność alkalicznej fosfatazy, przeniesiono membranę na szalkę Petriego i zalano roztworem zawierającym substraty dla alkalicznej fosfatazy (NBT, ang. *Nitro Blue Tetrazolium*) oraz (BCIP, ang. *Bromo-Chloro-Indolylo-Phosphate*) (SigmaFast BCIP/NBT B5655 Sigma Aldrich). Inkubowano w ciemności do pojawienia się właściwego sygnału. Reakcję zastopowano przez przeniesienie membrany do wody. Wszystkie etapy prowadzono w temperaturze pokojowej. Podczas płukań i inkubacji z przeciwciałami membranę delikatnie wytrząsano (Bio Shaker 3D BIOSAN).

- **roztwór do przemywania/rozcieńczania przeciwciał:** 1X TBS; 0,1% Tween 80; 0,5% mleko w proszku
- **roztwór blokujący:** 1X TBS; 0,5% Tween 80; 3% mleko w proszku
- **TBS 10X:** 200 mM Tris; 1,37 M NaCl; pH=7,6 ustalone HCl, przechowywane w 4°C

3.6 Analiza aktywności promotora *MtABCG10*

3.6.1 Przygotowanie konstruktów fuzyjnych Promotor*MtABCG10*::*GUS*

Na matrycy genomowego DNA przy użyciu specyficznych starterów (pr10F: 5`-ATGAATTCAAGAAGCTGCCACTAAAGC-3` pr10R: 5`-TAGGATCCATTTTTTGCTGTTGTG-

3') z wprowadzonymi miejscami restrykcyjnymi, odpowiednio EcoRI dla startera wprost i BamHI dla startera odwróconego, amplifikowano rejon obejmujący fragment promotora genu *MtABCG10*, długości 710 pz. Reakcję PCR przeprowadzono z wykorzystaniem polimerazy GoTaq (Promega), stosując następujący program:

Program: 98°C-5'; (95°C-30", 56°C-30", 72°C-1')x30; 4°C ∞

Następnie produkt PCR oraz wektor ekspresyjny pPR97, niosący gen reporterowy *uidA (GUS)* (Szabados et al. 1995) poddano trawieniu restrykcyjnemu enzymami EcoRI i BamHI (Promega) w temperaturze 37°C przez 2 h (**Tabela 3.21**).

Tabela 3.21. Skład mieszaniny reakcyjnej stosowanej przy trawieniu DNA enzymami EcoRI i BamHI

komponent reakcji	objętość	stężenie końcowe
DNA*	-	0,2-1 µg
bufor MULTI-CORE 10X	5 µl	1X
BSA 10 µg/µl	0,5 µl	0,1 µg/µl
HindIII 10 u/µl	2,0 µl	0,4 u/µl
EcoRI 10 u/µl	1,5 µl	0,3 u/µl
woda	do 50 µl	-

*produkt reakcji PCR lub wektor pPR97

Produkty trawienia oczyszczono z żelu i ligowano w 4°C przez 16 h (ligaza T4, Promega), a następnie transformowano bakterie *E. coli* TOP10 metodą elektroporacji. Poprawność uzyskanego konstruktów potwierdzono przez sekwencjonowanie.

3.6.2 Analiza histochemiczna

Materiał transgeniczny (korzenie, całe rośliny), niosące konstrukt fuzyjny promotor *MtABCG10::GUS* umieszczono w mieszaninie reakcyjnej do lokalizacji ekspresji *GUS* (mieszanina wybarwiająca) i inkubowano przez noc w 37°C w ciemności. Mieszaninę wybarwiającą, wykonano według protokołu opisanego przez Gallagher 1992, jej skład przedstawiono w **Tabeli 3.22**.

Tabela 3.22. Skład mieszaniny reakcyjne do lokalizacji ekspresji GUS

roztwór stężony	10 ml mieszaniny	50 ml mieszaniny	stężenie końcowe
0,5 M bufor fosforanowy pH=7,0	2 ml	10 ml	0,1 M
0,25 M EDTA pH=7,0	0,4 ml	2 ml	10 mM
5 m M $K_4Fe(CN)_6 \times 3H_2O$	1 ml	5 ml	0,5 mM
5 mM $K_3Fe(CN)_6$	1 ml	5 ml	0,5 mM
10% Triton X-100	0,1 ml	0,5 ml	0,1%
0,02 X-Gluc (przygotować na świeżo)	0,5 ml	2,5 ml	1 mM
H ₂ O destylowana	5 ml	25 ml	

W przypadku części naziemnych usunięto chlorofil i jednocześnie odwodniono materiał stosując szereg etanolowy (10%, 15%, 20%, 30%, 50%, 70% Et-OH, inkubowano po 30 min, w razie potrzeby kilkakrotnie wymieniano roztwór 70% Et-OH). W przypadku korzeni, które posłużyły do wykonania skrawków mikroskopowych, utrwalono materiał inkubując go przez noc w 4°C w 3,7% formaldehydzie w **buforze ½ MTSB**. Następnie trzykrotnie płukano w buforze ½ MTSB, po czym odwodniono stosując szereg etanolowy (10%, 15%, 20%, 30%, 50%, 70% Et-OH, inkubowano po 10 min w 4°C). Pod binokulem pocięto korzenie na 0,5 cm fragmenty i przeprowadzono kolejny etap odwadniania (70%, 80%, 90%, 95% Et-OH, inkubowano po 1 h w 4°C, 2x 100% Et-OH, po 30 min w 4°C). Do fragmentów korzeni zanurzonych w 100% etanolu dodano taką samą objętość **wosku Steedmana** i inkubowano w 37°C przez noc. Zlano wosk z etanolem i dodano 100% wosku, inkubowano 3 h w 37°C. Wylano bloczki wykorzystując silikonową foremkę. Skrawki grubości 14 µm cięto na mikrotomie Leica RM2165 i umieszczano na szkiełku podstawowym pokrytym **PEI** i kroplą wody, a następnie delikatnie osuszano w 28°C. Szkiełka z preparatami inkubowano w 98% etanolu w kopolinie do momentu całkowitego odplukania wosku, przeniesiono szkiełka do kopoliny zawierającej roztwór etanolu 98% i ksylenu (1:1), a następnie do kopoliny z ksylenem. Nałożono kroplę entellanu (107961.0100 Merck) na szkiełko nakrywkowe i zamknięto preparat. Obserwacje prowadzono przy użyciu binokularu Nikon SMZ-10A i mikroskopu Nikon A1R-SI.

- **Bufor fosforanowy:** 0,5 M $NaH_2PO_4 \times 2H_2O$; 0,5 M $Na_2HPO_4 \times 7H_2O$, oba roztwory zmieszać tak aby uzyskać pH=7,0
- **0,25 M EDTA:** 4,65 g/50 ml; pH=7,0 ustalone 1N NaOH
- **5 mM $K_4Fe(CN)_6$ (FW 422,4):** 0,106 g/50 ml
- **5 mM $K_3Fe(CN)_6$ (FW 329,2):** 0,08 g/50 ml

- **0,02 M X-Gluc:** 0,01 g/1 ml DMF-dimetyloformamid
- **10% Triton X-100:** 1 ml (100%)/10 ml wody
- **Bufor ½MTSB:** 25 mM PIPES; 2,5 mM MgSO₄·7H₂O; 2,5 mM EGTA; pH=6,9 ustalone KOH
- **Wosk Steedmana:** PEG 400 i 1-heksadekanol (9:1 w/w), mieszane na mieszadle magnetycznym w temperaturze 65°C
- **Szkiełka mikroskopowe pokryte PEI (polietylenoimina):** Na szkiełko podstawowe naniesiono 200 µl 0,1% polietylenoiminy rozpuszczonej w wodzie destylowanej i przykryto drugim szkiełkiem podstawowym. Szkiełka inkubowano 30 min w wilgotnej komorze, po czym rozdzielono. Przepłukano wodą destylowaną i pozostawiono do wyschnięcia.

3.7 Immunolokalizacja subkomórkowa metodą „whole-mount”

Procedurę prowadzono w temperaturze pokojowej. Kolejne roztwory wymieniano przez wirowanie przy 200 g przez 3 min (Eppendorf model 5415D).

3.7.1 Utrwalanie komórek *M. truncatula*

Do 24 ml pożywki MS z witaminami Gamborga (M0404 Sigma Aldrich) o pH=6,8 z dodatkiem 0,2 M sorbitolu, dodano 6 ml zawiesiny komórkowej *M. truncatula*, inkubowano 15 min, po czym dodano 3,3 ml 37% formaldehydu (stężenie końcowe 3,7%) i inkubowano przez kolejne 30 min. Komórki trzykrotnie płukano po 10 min w mieszaninie: pożywka MS z witaminami Gamborga z dodatkiem 0,2 M sorbitolu/bufor ½ MTSB w stosunku 1:1.

- **Bufor ½MTSB:** 25 mM PIPES; 2,5 mM MgSO₄·7H₂O; 2,5 mM EGTA; pH=6,9 ustalone KOH

3.7.2 Redukcja autofluorescencji

W celu usunięcia autofluorescencji, wywołanej przez aldehyd, komórki Medicago inkubowano w **roztworze redukującym** (2x po 10 min), a następnie płukano (3x po 10 min) buforem ½ MTSB.

- **Roztwór redukujący:** 1mg NaBH₄ na 1ml buforu ½ MTSB

3.7.3 Nadtrawianie ścian komórkowych i permeabilizacja błony komórkowej

Komórki inkubowano w ciemności przez 30 min w roztworze zawierającym **enzymy trawiące ścianę komórkową**. Następnie komórki płukano (3x po 10 min) buforem ½ **MTSB-T**. Błone komórkową permeabilizowano w buforze ½ MTSB z 0,1% Triton X-100 i 0,05% Tween20 przez 30 min. Komórki ponownie płukano (3x po 10 min) buforem ½ MTSB-T.

- **Roztwór enzymów trawiących ścianę komórkową:** 1,5% celulazy R10 (Serva), 0,6% macerozym (Serva), 1% driselaza w 0,2M mannitol; 20mM KCl; 20mM MES (pH=5,8).
- **½ MTSB-T:** ½ MTSB z 0,1% TritonX-100

3.7.4 Blokowanie i inkubacja z przeciwciałami

Niespecyficzne miejsca wiązania dla przeciwciał blokowano w buforze **PBS** z 0,05% Tween20 i 2% BSA. Po 1h inkubacji do mieszaniny blokującej dodano **przeciwciał pierwszorzędowych** i inkubowano przez noc w 4°C. Komórki czterokrotnie płukano po 10 min buforem **PBS-T**, a następnie inkubowano przez 2 h w roztworze przeciwciał drugorzędowych (1:600), sprzężonych z barwnikiem fluorescencyjnym AlexaFluor488 (Invitrogen). Po przepłukaniu (4x po 10 min, PBS-T), komórki zawieszono w buforze PBS-T z dodatkiem roztworu hamującego wygaszanie fluorescencji (CITIFLUOR AF1).

- **Bufor PBS:** 140mM NaCl; 2,7mM KCl; 6,5mM Na₂HPO₄·2H₂O; 1,5mM KH₂PO₄; pH=7,4
- **Bufor PBS-T:** PBS z 0,05% Tween20
- **Przeciwciała pierwszorzędowe:**
 - przeciwciała anti-H⁺-ATP-aza (W1G) 1:400
 - oczyszczone przeciwciała anti-MtABCG10 (MtABCG10) 1:50
 - surowica sprzed immunizacji peptydem swoistym dla MtABCG10 (PPI 10) 1:50

3.7.5 Obserwacja mikroskopowa

Obserwacje prowadzono w Instytutowej Pracowni Mikroskopowej (IBMiB, UAM), przy użyciu skaningowego mikroskopu konfokalnego Nikon A1R-SI, wykorzystując laser argonowy. Parametry dotyczące mocy lasera i czułości detektora dobierane były eksperymentalnie.

3.8 Wyciszenie ekspresji genu *MtABCG10*

3.8.1 Przygotowanie konstruktów wyciszającego z wykorzystaniem wektora działającego w systemie Gateway

Na matrycy cDNA (uzyskanego z totalnego RNA w reakcji odwrotnej transkrypcji - Super Script, Invitrogen) przy użyciu specyficznych starterów (RNAi10F: 5'- GGG GAC AAG TTT GTA CAA AAA AGC AGG CTG ATG ATT CAT CTA CCG TAC-3'; RNAi10R: 5'-GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTC ATC AAA AGT GAT AGA ATG TG -3'), zawierających odpowiednie miejsca rekombinacji attB, amplifikowano rejon długości 139 pz. Reakcję PCR przeprowadzono z wykorzystaniem polimerazy GoTaq (Promega), stosując następujący program:

profil temperaturowo- czasowy	wstępna denaturacja	denaturacja	przyłączenie startera	elongacja	liczba cykli
fragment	98°C – 5'	95°C – 30''	54°C – 30''	72°C – 30''	5
RNAi <i>MtABCG10</i>		95°C – 30''	60°C – 30''	72°C – 30''	5
		95°C – 30''	58°C – 30''	72°C – 30''	25

Następnie, na drodze rekombinacji, wprowadzono oczyszczony produkt PCR do wektora pośredniego pDONR/Zeo (Invitrogen) przy udziale BP klonazy (Invitrogen), zgodnie z załączoną przez producenta instrukcją. Mieszaniną reakcyjną transformowano bakterie *E. coli* One Shot OmniMax, metodą szoku cieplnego. Pozytywne klony, które wyrosły na pożywce selekcyjnej (LB_{zeocyna}) posłużyły do izolacji plazmidowego DNA (QIAprep Spin Miniprep Kit, Qiagen). Następnie przeprowadzono reakcję rekombinacji przy udziale LR klonazy (Invitrogen), pomiędzy miejscami attL obecnymi w uzyskanym w poprzednim etapie plazmidzie, a miejscami attR obecnymi w wektorze docelowym pK7GWIWG2(II)-p35S::DsRED (Limpens et al. 2005). Ponownie transformowano bakterie *E. coli* One Shot OmniMax, metodą szoku cieplnego. Pozytywne klony, które wyrosły na pożywce selekcyjnej (LB_{spektynomycyna}) posłużyły do izolacji plazmidowego DNA. Poprawność otrzymanych konstruktów potwierdzono przez sekwencjonowanie.

3.8.2 Transformacja *M. truncatula* i selekcja transgenicznego materiału

Przy użyciu *A. rhizogenes* Arqua1, do których wcześniej na drodze elektroporacji wprowadzono właściwy wektor, transformowano rośliny *M. truncatula* (patrz podrozdział 3.1.7). Na selekcję transgenicznego materiału składała się hodowla roślin na pożywce selekcyjnej (Fa_{kanamycyna}), a także analiza obecności fluorescencyjnego białka DsRED (skaner Fluor Imager Fla-51000 (Fujifilm) zielony laser (532 nm) i filtr LPG). Stopień wyciszenia materiału oceniono na poziomie mRNA metodą qRT-PCR i na poziomie białka metodą Western blot.

3.9 Analiza metabolitów wtórnych

3.9.1 Izolacja związków fenolowych z hodowli korzeni włosowatych

Korzenie włosowate, rosnące w pożywce płynnej, przepłukano wodą, delikatnie osuszono bibułą, a następnie zważono i umieszczono w ciekłym azocie. Materiał ucierano w moździerzu w obecności ciekłego azotu, po czym dodano 2 ml schłodzonego w lodzie 80% metanolu (4x po 0,5 ml). Następnie próby przenoszono przy użyciu pasterówki do próbkówki szklanej. Dodano 10 µl luteoliny - standard wewnętrzny (ze stoku 1 mg/ml). Próby sonikowano (sonikator Sonorex Super RK 103H) przez 20 min, a następnie wirowano 15 min w 18°C przy 5000 rpm. Supernatant przeniesiono do świeżej próbkówki szklanej. Do osadu dodano 1 ml schłodzonego w lodzie 80% metanolu, ponownie zworteksowano, sonikowano i wirowano. Uzyskany supernatant połączono z zebrany wcześniej. Próby odparowano w wirówce próżniowej i przechowywano w -80°C.

3.9.2 Izolacja związków fenolowych z pożywki, metodą ekstrakcji do fazy stałej (SPE; *Solid Phase Extraction*)

Wypełniono pustą kolumnę do SPE 400 mg żelu krzemionkowego z przyłączonymi łańcuchami węglowodorowymi C18. Aktywowano kolumnę poprzez przemywanie 5 ml 100% metanolu, a następnie 5 ml wody MQ. Do 10 ml pożywki dodano 10 µl luteoliny - standard wewnętrzny (ze stoku 1 mg/ml) i wymieszano. Całą pożywkę przepuszczono

przez kolumnę, nie dopuszczając do jej wyschnięcia. Kolumnę przepłukano 5 ml wody MQ. Związki fenolowe wymyto stosując 100% metanol (5 ml). Procedurę wykonywano przy użyciu zestawu spe-12G firmy Baker z pompą próżniową. Próby odparowano w wirówce próżniowej i przechowywano w -80°C .

3.9.3 Analiza związków fenolowych metodą chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas z jonizacją poprzez elektrorozpraszanie (LC/ESI/MS)

Do odparowanych prób (ekstraktów z korzeni włosowatych i pożywek) dodano 100 μl 80% metanolu, a następnie zworteksowano, sonikowano przez 15 min i znowu zworteksowano. Mieszaninę przeniesiono do próbek typu Eppendorf. Do wyjściowej próbki ponownie dodano 100 μl 80% metanolu, worteksowano, sonikowano i worteksowano. Połączono obie mieszaniny i wirowano przez 5 min przy 13000 rpm. Supernatant (ok. 200 μl) przeniesiono do fiolek chromatograficznych.

Analizę prowadzono przy użyciu chromatografu cieczowego AgilentRR 1200 sprzężonego ze spektrometrem mas model micrOTof-Q, ze źródłem jonizacji typu elektrorozpraszania (ESI) (BrukerDaltonics). Rozdział chromatograficzny prowadzono na kolumnie ZorbaxEclipse XDB-C18 (Agilent) z fazą ruchomą stanowiącą mieszaninę dwóch rozpuszczalników A (99,5% H_2O /0,5% kwas mrówkowy v/v) i B (99,5% acetonitryl/0,5% kwas mrówkowy v/v). Przepływ fazy ruchomej prowadzono z prędkością 0,5 ml/min w gradiencie. Spektrometr działał: z napięciem na kapilarze ± 4.5 kV, nubilizacja azotem pod ciśnieniem 1,6 barów, przepływie gazu suchego z prędkością 8 l/min w temperaturze 220°C . Aparat był obsługiwany przez oprogramowania micrOTOFcontrolver 2.3. Analizę danych prowadzono przy użyciu programu Bruker Data Analysis v. 4. Profile metabolitów były zapisywane w trybie jonów dodatnich $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Ilość analizowanych związków zarówno w korzeniach transgenicznych jak i pożywkach zostały przedstawione jako względne wartości w odniesieniu do standardu wewnętrznego (luteoliny). Identyfikację analizowanych związków ((izo)flawonoidów i ich koniugatów) przeprowadzono na podstawie dostępnych standardów, danych literaturowych, czasu retencji i widm masowych. Poniżej zamieszczono **Tabelę 3.23** z wykazem stosowanych standardów.

Tabela 3.23. Wykaz stosowanych standardów (izo)flawonoidów

nazwa standardu	producent
izolikwiritigenina	ExtraSynthese
likwiritigenina	ExtraSynthese
daidzeina	ExtraSynthese
formononetyna	ExtraSynthese
2'OHformononetyna	ExtraSynthese
westiton	ExtraSynthese
naringenina	ExtraSynthese
biocjanina A	ExtraSynthese
apigenina	ExtraSynthese
luteolina	ExtraSynthese

4. WYNIKI

Liczne dane literaturowe wskazują, iż roślinne, pełne białka ABCG mogą odgrywać ważną rolę w oddziaływaniach biotycznych. Jedną z proponowanych funkcji, jakie im się przypisuje, jest aktywny transport metabolitów wtórnych. Te niskocząsteczkowe związki naturalne mogą stanowić zarówno chemiczny system obrony przed czynnikami chorobotwórczymi, jak i uczestniczyć w procesach komunikacji rośliny z innymi organizmami. Przed rozpoczęciem moich badań, identyfikację i klasyfikację pełnych białek ABCG przeprowadzono jedynie dla *A. thaliana* (15), *O. sativa* (23) (Jasinski et al. 2003) i częściowo dla *L. japonicus* (Sugiyama et al. 2006). Nasza wiedza o potencjalnych funkcjach pełnych białek ABCG u bobowatych ograniczała się do GmPDR12 z soi (Eichhorn et al. 2006). Nie znany był także żaden pełny transporter ABCG u modelowej rośliny bobowatej *M. truncatula*.

4.1 Identyfikacja i wstępna charakterystyka pełnych transporterów ABCG z *M. truncatula*

Zainicjowany w 2001 roku i realizowany przez międzynarodowe konsorcjum MGSC (ang. *Medicago Genome Sequencing Consortium*) projekt sekwencjonowania genomu *M. truncatula* stworzył możliwości systematycznego poszukiwania genów *MtABCG*, co stanowi punkt wyjścia do ich dalszej analizy funkcjonalnej. W momencie rozpoczęcia mojej pracy doktorskiej znana była sekwencja genomu *Medicago* obejmująca 214 Mpz, reprezentująca ponad 60% pokrycia sekwencji kodujących białka (wersja Mt 2.0). W celu identyfikacji białek *MtABCG* przeszukano bazę danych IMGAG Protein 2.0, w której zdeponowano przewidywane sekwencje aminokwasowe pochodzące z translacji *in silico* danych uzyskanych po sekwencjonowaniu genomu *Medicago* (http://www.medicagohapmap.org/advanced_search_page.php?seq). Wykorzystano dostępne, na podanej powyżej stronie internetowej, narzędzie BlastP (ang. *Basic Local Alignment Search Tool*), a jako zapytania użyto sekwencji aminokwasowej, arbitralnie wybranego, pełnego białka ABCG z *Arabidopsis* (GenBank: NP_173005.1). W rezultacie uzyskano listę trafień sekwencji homologicznych. Każda z nich posiadała przyporządkowaną

tymczasową nazwę, opatrzona była krótkim opisem (adnotacją) oraz zawierała odnośniki zarówno do odpowiadającej sekwencji genomowej, jak i przewidzianej *in silico* sekwencji kodującej i aminokwasowej. Następnie przeprowadzono wstępną weryfikację uzyskanych wyników. Spośród zidentyfikowanych sekwencji do dalszych analiz użyto takich, które spełniały dwa warunki: (i) ich długość była większa niż 1000 aminokwasów (AA) (średnia długość białek ABCG wynosi ok. 1400 AA) oraz posiadały co najmniej 3 motywy PDR (w sekwencji aminokwasowej wszystkich znanych, roślinnych pełnych transporterów ABCG znaleźć można cztery takie motywy: i) GLDARAA, ii) TIHQPS, iii) LLLGPP i iv) GLDSST) (van den Brule i Smart 2002). W ten sposób wyselekcjonowano 19 pełnych transporterów ABCG z czego trzy miały długość poniżej 1300 AA. Dla tych trzech, dzięki zastosowaniu programu FGENESH+ (<http://linux1.softberry.com/berry.phtml>), który przewiduje strukturę genu na bazie sekwencji genomowej i dodatkowo sekwencji białka homologicznego, udało się wyznaczyć otwarte ramki odczytu, kodujące białka pełnej długości. Otrzymane wyniki zestawiono w **Tabeli 4.1**.

Nazwy pełnym białkom MtABCG (PDR) przypisano zgodnie z ujednoliconą nomenklaturą zaproponowaną przez Verrier i współ. 2008. Przy nadawaniu numerów pominięto połowiczne transportery ABCG (WBC). Jak na razie ich liczba nie jest znana u *Medicago*.

Dodatkowo w **Tabeli 4.2** zamieszczono aktualne numery dostępu dla *MtABCG*/MtABCG. Ich sekwencje zdeponowane zostały w bazie GenBank po zakończeniu w 2011 roku kolejnego etapu sekwencjonowania genomu *M. truncatula*, który objął 95% sekwencji kodujących białka (baza danych wersja Mt 3.5) (Young et al. 2011).

Tabela 4.1. Szczegóły dotyczące zidentyfikowanych pełnych genów/białek ABCG z *M. truncatula*. Informacje pochodzą z bazy danych Mt 2.0.

nazwa	numer TC TIGR	nazwa IMGAG	wielkość genu [bp]	wielkość mRNA [bp]	wielkość białka [AA]	sygnatury PDR	contig
MtABCG1	TC131744	AC171532_22	8343	4866	1469	4	mth2-5a15 (chr07_pseudomolecule_IMGAG_V2)
MtABCG2	...	AC171532_32	8028	4388	1462	4	mth2-5a15 (chr07_pseudomolecule_IMGAG_V2)
MtABCG3	TC1232185	AC171532_16	8014	4510	1462	4	mth2-5a15 (chr07_pseudomolecule_IMGAG_V2)
MtABCG4*	...	AC147517_9	8285	4329	1443	4	chr07_pseudomolecule_IMGAG
MtABCG5	...	AC171532_21	7120	4413	1471	4	mth2-5a15 (chr07_pseudomolecule_IMGAG_V2)
MtABCG6	...	AC171532_26	7089	4575	1433	4	mth2-5a15 (chr07_pseudomolecule_IMGAG_V2)
MtABCG7	TC136665	AC144617_13	8440	4494	1425	4	mth2-7m9 (chr01_pseudomolecule_IMGAG_V2)
MtABCG8	TC114314	AC144617_23	10538	5649	1442	4	mth2-7m9 (chr01_pseudomolecule_IMGAG_V2)
MtABCG9	TC107192	AC144340_29	7261	4479	1493	4	mth2-7k2 (chr02_pseudomolecule_IMGAG_V2)
MtABCG10	TC107191	AC144340_27	7071	4453	1406	3	mth2-7k2 (chr02_pseudomolecule_IMGAG_V2)
MtABCG11	...	AC144340_9	7820	5631	1428	4	mth2-7k2 (chr02_pseudomolecule_IMGAG_V2)
MtABCG12	...	AC170988_18	7406	4284	1428	4	mth2-53m12 (chr07_pseudomolecule_IMGAG_V2)
MtABCG13	...	AC170988_6	7320	4368	1456	4	mth2-53m12 (chr07_pseudomolecule_IMGAG_V2)
MtABCG14	...	AC170988_17	9304	4677	1473	4	mth2-53m12 (chr07_pseudomolecule_IMGAG_V2)
MtABCG15	TC102393	AC174352_33	8260	4522	1429	4	mth2-7o1 (chr08_pseudomolecule_IMGAG_V2)
MtABCG16	TC107302	AC123976_31	10684	5221	1462	4	mth2-30j23 (chr08_pseudomolecule_IMGAG_V2)
MtABCG17	...	CR954192_34	8686	3738	1246	3	mth2-15h3 (chr05_pseudomolecule_IMGAG_V2)
MtABCG18	TC109879	AC170856_10	8763	4088	1251	3	mth2-13d14 (chr02_pseudomolecule_IMGAG_V2)
MtABCG19	...	AC202577_4	6878	3558	1115	3	mth2-176a4 (chr08_pseudomolecule_IMGAG_V2)

*przypisany numer pochodzi z bazy Mt 1.0.

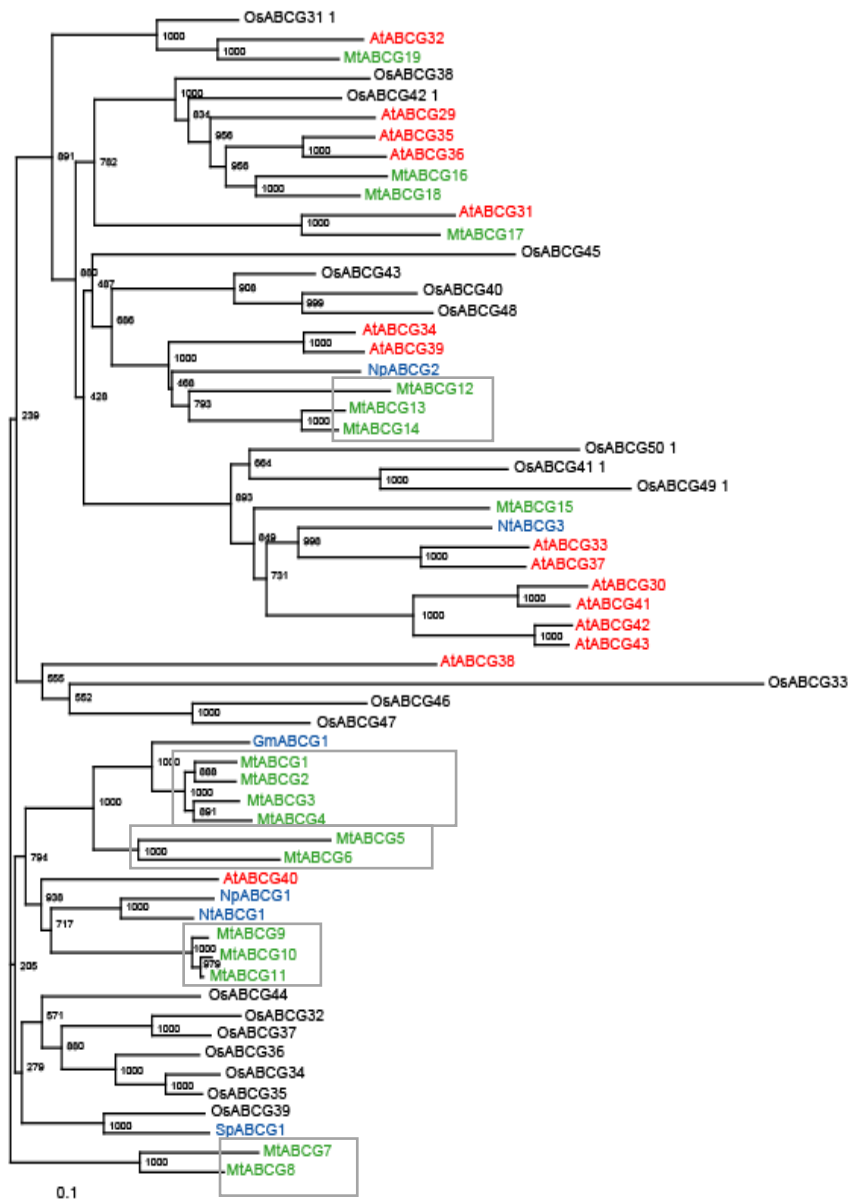
Tabela 4.2. Szczegóły dotyczące zidentyfikowanych pełnych genów/białek ABCG z *M. truncatula*. Tabela przedstawia numery dostępu dla pełnych genów/białek MtABCG, których sekwencje zostały zdeponowane w 2011 roku w bazie GenBank, po zakończeniu kolejnego etapu sekwencjonowania genomu *M. truncatula* (baza danych Mt 3.5).

nazwa	GenBank					
	nr identyfikacyjny genu (ang. <i>gene ID</i>)	położenie (ang. <i>locus tag</i>)	numer dostępu mRNA (ang. <i>mRNA accession number</i>)	wielkość mRNA [bp]	numer dostępu białka (ang. <i>protein accession number</i>)	wielkość białka [aa]
MtABCG1	ID: 11444776	MTR_7g098750	XM_003625351/XM_003625352	4410/4197	XP_003625399/XP_003625400	1469/1398
MtABCG2	ID: 11440458	MTR_7g098740	XM_003625350	4335	XP_003625398	1444
MtABCG3	ID: 11440459	MTR_7g098760	XM_003625353	4662	XP_003625401	1483
MtABCG4	ID: 11419478	MTR_7g098300	XM_003625313	4503	XP_003625361	1500
MtABCG5	ID: 11445273	MTR_7g098800	XM_003625357	4215	XP_003625405	1404
MtABCG6	ID: 11445272	MTR_7g098780	XM_003625355	4604	XP_003625403	1440
MtABCG7	ID: 11429631	MTR_1g011640	XM_003588650	4498	XP_003588698	1424
MtABCG8	ID: 11431337	MTR_1g011650	XM_003588651	4632	XP_003588699	1454
MtABCG9	ID: 11430684	MTR_2g102640	XM_003597768	4479	XP_003597816	1492
MtABCG10	ID: 11436363	MTR_2g102670	XM_003597771	4233	XP_003597819	1410
MtABCG11	ID: 11434774	MTR_2g102660	XM_003597770	4284	XP_003597818	1427
MtABCG12	ID: 11432962	MTR_7g104100	XM_003625724	4362	XP_003625772	1453
MtABCG13	ID: 11425785	MTR_7g104110	XM_003625725	4368	XP_003625773	1455
MtABCG14	ID: 11442008	MTR_7g104130	XM_003625727	4386	XP_003625775	1461
MtABCG15	ID: 11424645	MTR_4g123850	XM_003609817	4648	XP_003609865	1470
MtABCG16	ID: 11434035	MTR_8g014360	XM_003626986/XM_003626987	4386/3870	XP_003627034/XP_003627035	1461/1289
MtABCG17	ID: 11405496	MTR_5g070320	XM_003615586	4464	XP_003615634	1487
MtABCG18	ID: 11432375	MTR_2g101090	XM_003597635	3906	XP_003597683	1301
MtABCG19	ID: 11440635	MTR_4g113070	XM_003609152	4119	XP_003609200	1372

Następnie skonstruowano drzewo filogenetyczne. Wykorzystano do tego celu sekwencje aminokwasowe zidentyfikowanych białek MtABCG oraz wszystkie znane sekwencje homologiczne pochodzące z *A. thaliana* (At), *O. sativa* (Os), *N. plumbaginifolia* (Np.), *N. tabacum* (Nt), *S. polyrrhiza* (Sp), *G. max* (Gm). Wymienione sekwencje porównano przy pomocy programu Clustal W (Thompson 1994). Analizę filogenetyczną przeprowadzono wykorzystując metodę najbliższego sąsiada (ang. *Neighbor Joining*) (Saitou i Nei 1987), korzystając z programu, który dostępny jest w pakiecie PHYLIP (Felsenstein 1985). Uzyskany dendrogram pozwolił m.in. uwidocznic grupowanie się białek ABCG z danego gatunku oraz określić najbliższe para- i ortologi (**Rycina 4.1**).

Mimo, że średni poziom identyczności między białkami MtABCG wynosi ok. 60% stwierdzono, że w kilku przypadkach może sięgać ok. 75% (MtABCG5/MtABCG6), 80% (MtABCG7/MtABCG8), 90% (MtABCG1/MtABCG2/MtABCG3/MtABCG4), (MtABCG13/MtABCG14), a nawet 98% (MtABCG9/MtABCG10/MtABCG11). Obserwowany wysoki stopień podobieństwa między poszczególnymi paralogami **Rycina 4.1**¹ ma także swoje odbicie w strukturze genów je kodujących, co przedstawiono na **Rycina 4.2** oraz lokalizacji w genomie, patrz **Rycina 4.3**.

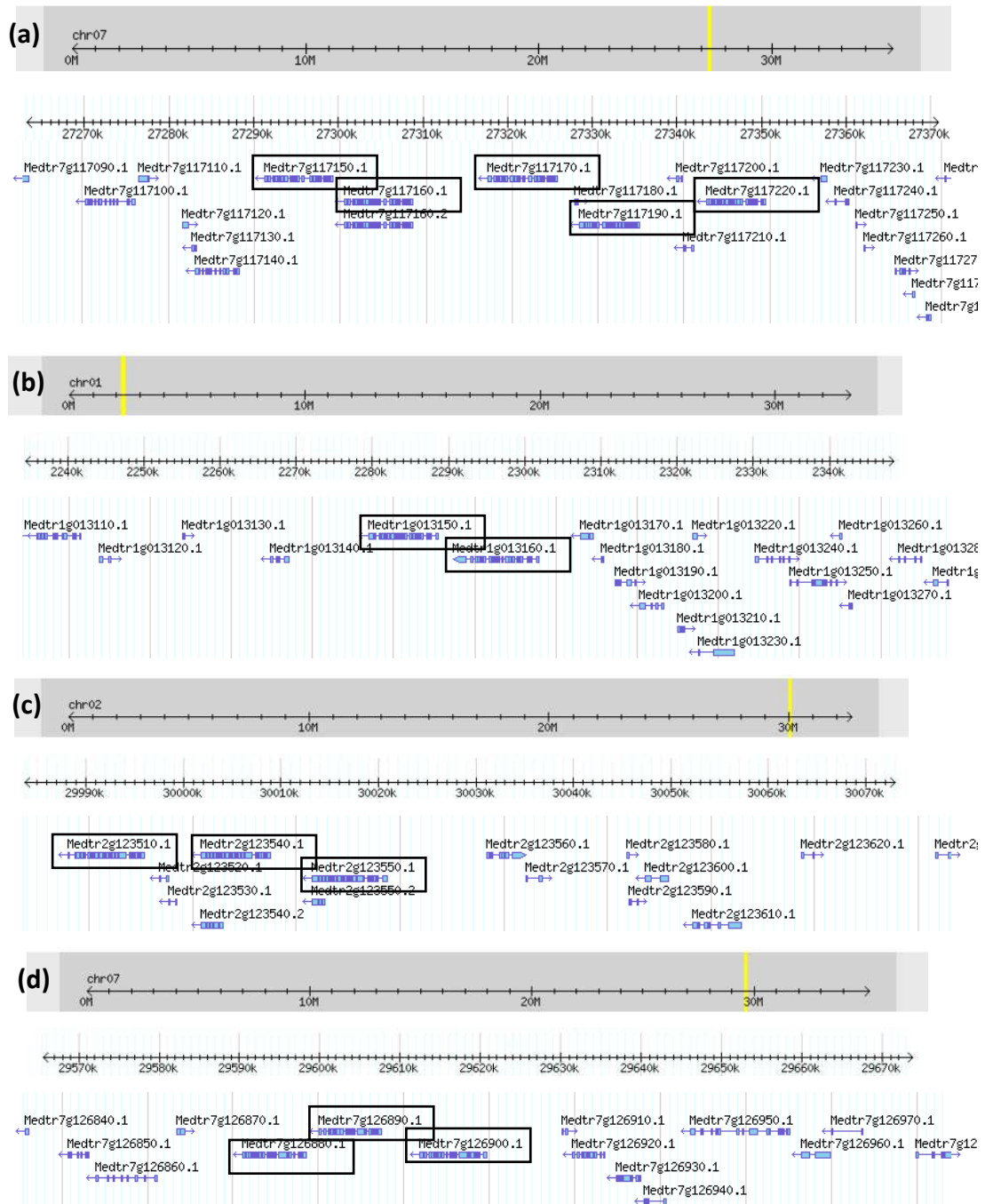
¹ Tabele obrazujące stopień identyczności pomiędzy białkami MtABCG oraz MtABCG a AtABCG zamieszczono w załącznikach nr 1 i nr 2.



Rycina 4.1. Drzewo filogenetyczne ilustrujące zależności między pełnymi transporterami ABCG z: *M. truncatula* (Mt) kolor zielony, *A. thaliana* (At) kolor czerwony, *O. sativa* (Os) kolor czarny, *N. plumbaginifolia* (Np) kolor czarny, *N. tabacum* (Nt) kolor czarny, *S. polyrrhiza* (Sp) kolor czarny, *G. max* (Gm) kolor czarny. Drzewo skonstruowane metodą najbliższego sąsiada. Powyżej węzłów podano wartość bootstrap. Ramkami zaznaczono białka MtABCG wykazujące stopień identyczności powyżej 70%.



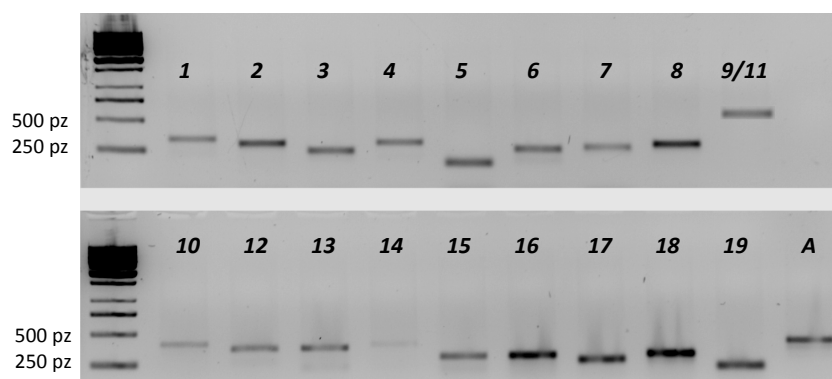
Rycina 4.2. Schemat przedstawiający strukturę poszczególnych genów *MtABCG1-19*, określoną na podstawie informacji o długości egzonów i intronów zawartych w bazie danych Mt 2.0. Ramkami zaznaczono geny wykazujące wysoki stopień identyczności względem siebie, który ma swoje odzwierciedlenie także w ich strukturze.



Rycina 4.3. Schemat ilustrujący lokalizację genów *MtABC*G (ramki). Na chromosomie 7, kolejno *MtABC*2,1,3,6,5 (a); na chromosomie 1 kolejno *MtABC*7,8 (b); na chromosomie 2, kolejno *MtABC*9,11,10 (c) i na chromosomie 7 kolejno *MtABC*12,13,14 (d). http://gbrowse.jcvi.org/cgi-bin/gbrowse/medicago_imgag/. Geny leżące jeden za drugim na danym chromosomie wykazują wysoki stopień identyczności względem siebie. Nazwy genów na schemacie odnoszą się do wersji Mt 3.0.

4.2 Analiza profilu ekspresji genów kodujących pełne transportery ABCG z *M. truncatula*

W celu określenia profilu ekspresji genów *MtABCG* przeprowadzono półilościową analizę RT-PCR (ang. *reverse transcriptase PCR*). Na bazie przewidzianych *in silico* sekwencji cDNA genów *MtABCG*, zaprojektowano specyficzne startery, spełniające następujące kryteria: i) co najmniej jeden starter z pary obejmuje sekwencję rejonu 3'UTR, ii) długość aplikonu w granicach od 180 pz do 400 pz, iii) temperatura topnienia starterów ok. 50°C. Wyjątek stanowiły startery wspólne dla dwóch genów *MtABCG9* i *MtABCG11* (patrz podrozdział 4.3.1). Wydajność zaprojektowanych starterów przetestowano na matrycy genomowego DNA (**Rycina 4.4**), a ich specyficzność potwierdzono przez sekwencjonowanie produktów amplifikacji.

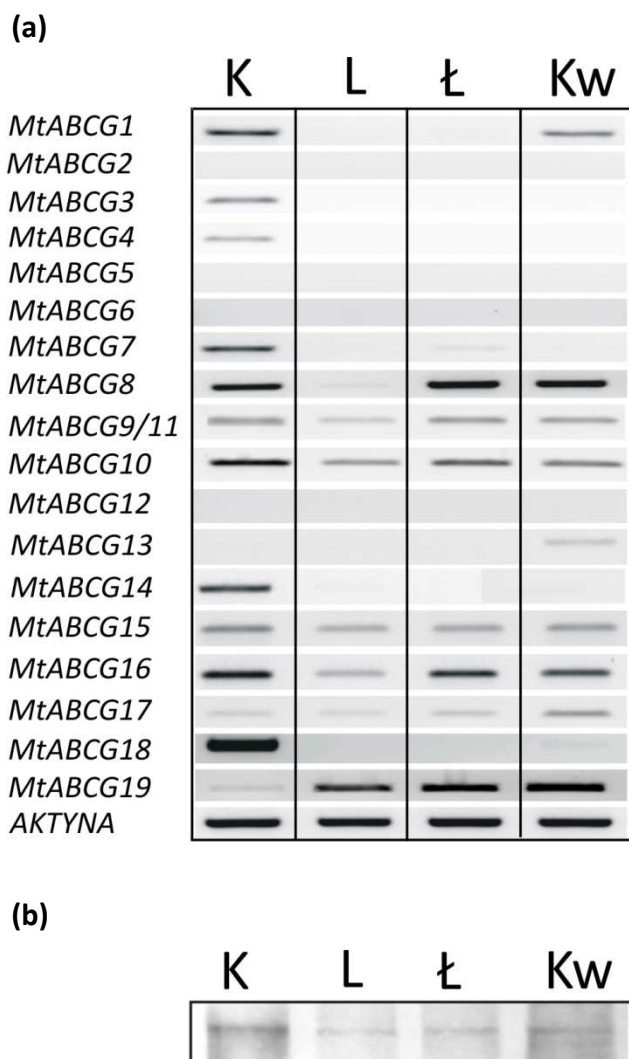


Rycina 4.4. Analiza produktów reakcji PCR (25 cykli) metodą elektroforezy w 1,5% żelu agarozowym. Reakcje PCR przeprowadzono na matrycy genomowego DNA (40 ng/reakcję) z użyciem specyficznych starterów dla genów *MtABCG* (1-19) oraz aktyny (A).

W pierwszej kolejności określono poziom akumulacji mRNA genów *MtABCG* w różnych organach *Medicago*. Do analizy wykorzystano sześciotygodniowe rośliny rosnące w pokoju fitotronowym. W przypadku czterech genów (*MtABCG2*, *MtABCG5*, *MtABCG6*, *MtABCG12*) nie wykryto transkryptów. Powtórzono dla nich reakcję PCR, wykorzystując nowe pary starterów i ponownie obserwowano brak produktów.

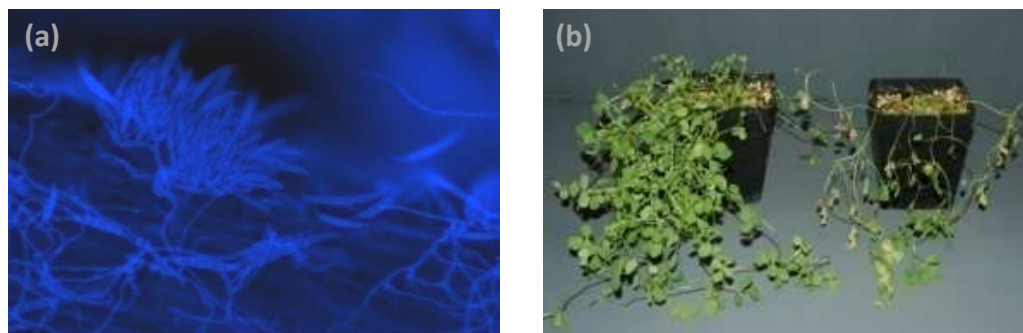
Największa liczba genów ulegała ekspresji w korzeniach (14 z 19) *MtABCG1*, *MtABCG3*, *MtABCG4*, *MtABCG7* do *MtABCG11* i *MtABCG14* do *MtABCG19*, a najmniejsza w liściach (8 z 19) *MtABCG8* do *MtABCG11*, *MtABCG15* do *MtABCG17* i *MtABCG19*. W kwiatach i łodygach wykryto transkrypty kolejno dla jedenastu i dziewięciu genów (**Rycina 4.5a**). Analiza Western blot, w której wykorzystano przeciwciała rozpoznające wszystkie roślinne pełne białka ABCG (tzw. przeciwciała GPDR)², pokazała najwyższy poziom akumulacji białek MtABCG w korzeniach (**Rycina 4.5b**). Część genów *MtABCG* charakteryzowała się organospecyficznym profilem ekspresji. Na przykład *MtABCG3*, *MtABCG4*, *MtABCG14* i *MtABCG18* były obecne wyłącznie w korzeniach. Inne znajdowano w różnych częściach rośliny. Zwykle najbliższe paralogi miały podobny profil ekspresji aczkolwiek dwa geny, kodujące białka MtABCG o poziomie identyczności 91%, wykryto w dwóch różnych organach, *MtABCG14* w korzeniu, a *MtABCG13* w kwiatach (**Rycina 4.5a**).

² Krótka charakterystyka przeciwciał GPDR zamieszczona została w załączniku nr 3.



Rycina 4.5. Analiza produktów reakcji RT-PCR (30 cykli) metodą elektroforezy w 1,5% żelu agarozowym, dla fragmentów cDNA, z różnych organów, amplifikowanych z użyciem starterów specyficznych dla genów *MtABCG1-MtABCG19* (a). Analiza Western blot dla frakcji mikrosomalnej (30 μ g), z wykorzystaniem przeciwciał GPDR rozpoznających wszystkie roślinne pełne białka ABCG (b). K - korzeń, L - liść, ł - łodyga, Kw - kwiat.

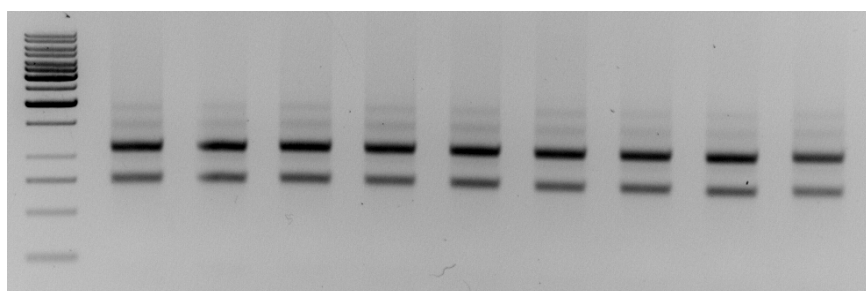
Część pełnych transporterów ABCG jest zaangażowana w reakcje obronne, tak jest w przypadku AtPDR8 czy NpPDR1. Przykładowo pokazano, że ekspresja genów je kodujących indukowana jest obecnością patogenów roślinnych, a ich dysfunkcja prowadzi do wzrostu wrażliwości rośliny na infekcje grzybowe i/lub bakteryjne (Bultreys et al. 2009; Kobae et al. 2006; Stein et al. 2006; Stukkens et al. 2005). W celu wyłonienia białek MtABCG, które mogłyby brać udział w oddziaływaniach roślina-patogen, przeprowadzono analizę zmian poziomu ekspresji genów je kodujących pod wpływem infekcji Medicago grzybami patogennymi *F. culmorum* i *P. medicaginis*. Wyżej wymienione grzyby wybrano, ponieważ przyczyniają się do powstawania chorób wielu roślin bobowatych (<http://nt.ars-grin.gov/fungalatabases/>) i jednocześnie były dostępne w kolekcji Instytutu Genetyki Roślin PAN w Poznaniu. *F. culmorum* jest grzybem glebowym należącym do grupy nekrotrofów, który wywołuje zgniliznę korzenia (**Rycina 4.6a**) (Tivoli et al. 2006), natomiast *P. medicaginis* atakuje głównie części naziemne i odpowiada, m.in. za pojawianie się plam nekrotycznych na liściach lucerny (**Rycina 4.6b**) (Kamphuis et al. 2008).



Rycina 4.6. Fragment korzenia *M. truncatula* zainfekowanego grzybem *F. culmorum*. Preparat wybarwiony Calcofluor white i obserwowany pod mikroskopem fluorescencyjnym (filtr DAPI) (a). *M. truncatula*: roślina kontrolna i roślina 14 dni po infekcji grzybem *P. medicaginis*. Dzięki uprzejmości Pawła Rodziewicza (Źródło: praca magisterska Paweł Rodziewicz, 2009) (b).

Wszystkie eksperymenty mające na celu ocenę zmian poziomu ekspresji analizowanych genów pod wpływem czynników biotycznych były przeprowadzane według ujednoliconego schematu.

Po izolacji RNA oraz jego ilościowej i jakościowej analizie (**Rycina 4.7**) przeprowadzano odwrotną transkrypcję, z użyciem startera oligodT. W ten sposób otrzymano pulę cDNA (ang. *complementary deoxyribonucleic acid*), odpowiadającą całkowitemu mRNA, który pochodził z analizowanego materiału roślinnego. Następnie uzyskany cDNA był rozcieńczany dziesięciokrotnie. Liczbę cykli w reakcji PCR dobierano eksperymentalnie, aby uzyskać, w miarę możliwości, liniową zależność między ilością produktu a wyjściową ilością analizowanego cDNA. Jako kontrolę wewnętrzną użyto genu kodującego β -aktynę, który wykazuje wysoki i stały poziom ekspresji, niezależnie od warunków eksperymentu.



Rycina 4.7. Przykładowy żel agarozowy przedstawiający analizę jakościową RNA, wyizolowanego z korzeni siewek *M. truncatula*.

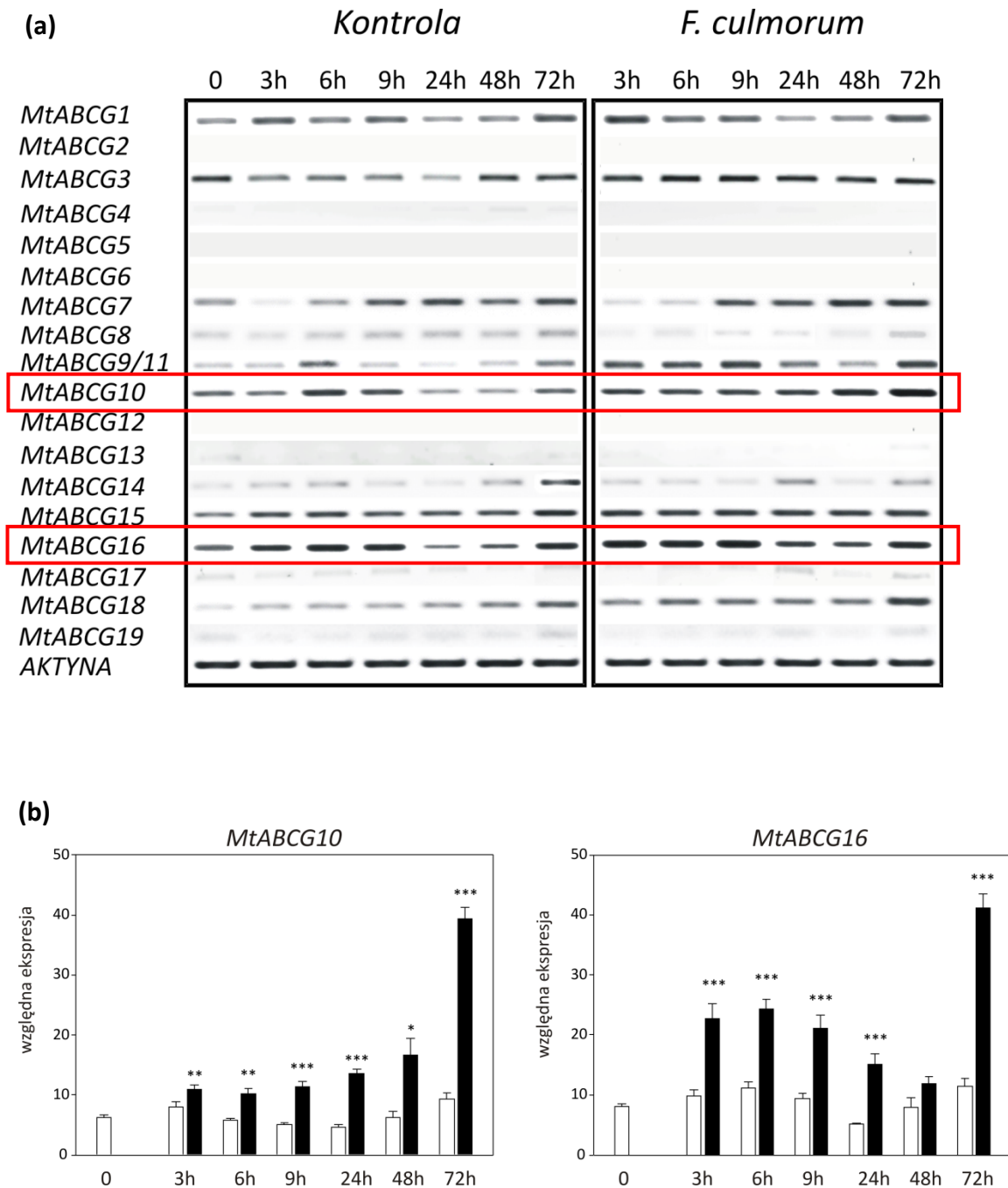
Zmiany poziomu ekspresji genów *MtABCG* pod wpływem patogenów grzybowych, monitorowano w różnym czasie (3h, 6h, 9h, 24h, 48h, 72h) od momentu inokulacji, zarówno korzeni siewek sporami *F. culmorum*, jak i liści *Medicago* sporami *P. medicaginis*. Kontrolę stanowił materiał roślinny nietraktowany patogenami. Infekcja korzeni siewek *Medicago* *F. culmorum* skutkowała wzrostem akumulacji mRNA dwóch (*MtABCG10* i *MtABCG16*) spośród 14 genów *MtABCG* ekspresowanych w korzeniach (**Rycina 4.8a**). W celu ilościowego określenia stopnia indukcji *MtABCG10* i *MtABCG16* zastosowano metodę PCR z detekcją w czasie rzeczywistym (**Rycina**

4.8b)³. Wyniki przedstawiono jako wartości względnej ekspresji analizowanych genów w stosunku do genu referencyjnego *β-aktyny*. Szczególnie wysoki poziom obu transkryptów obserwowano 72 h po infekcji.

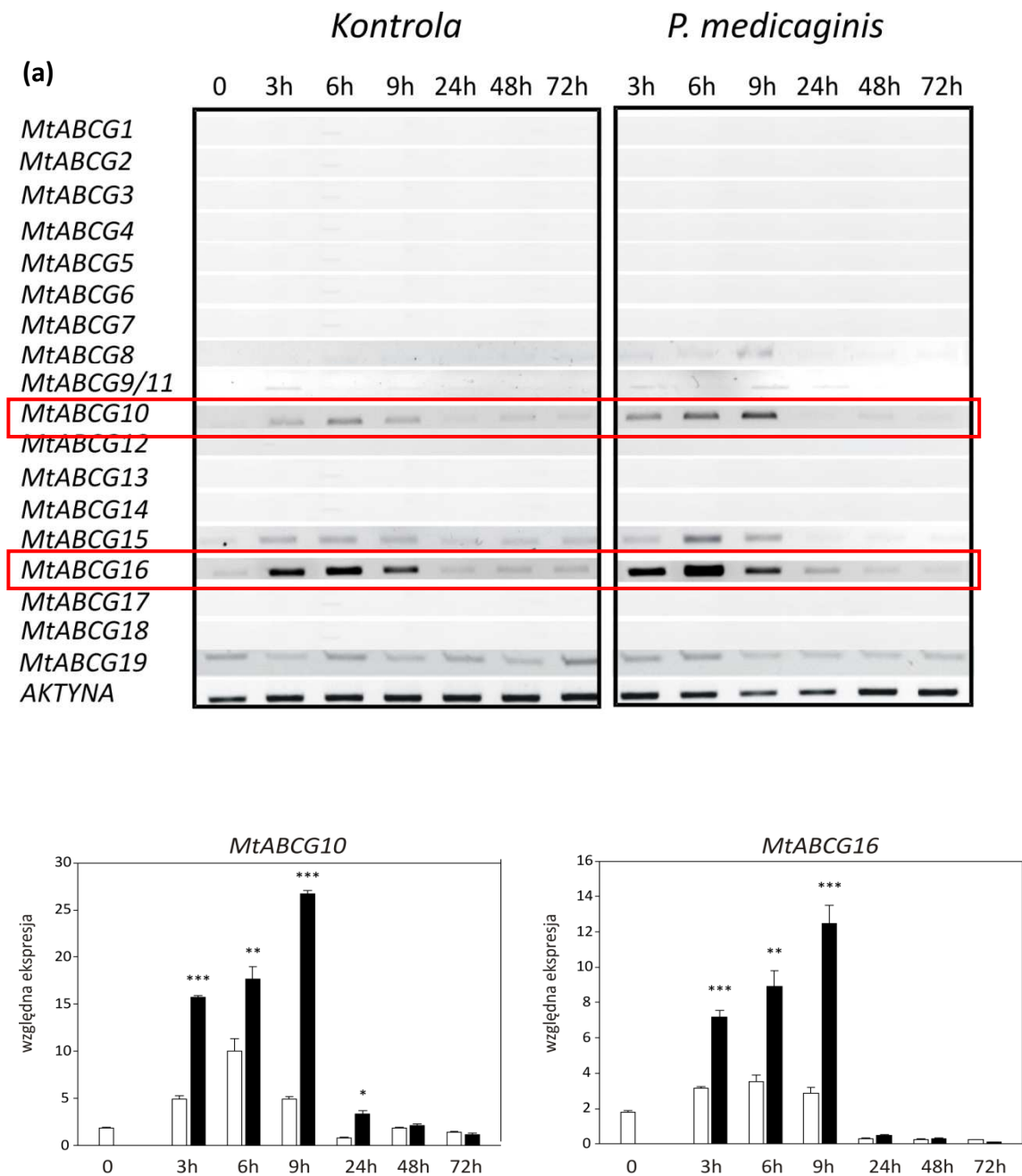
W przypadku potraktowania liści *Medicago* grzybem *P. medicaginis* ponownie obserwowano wzrost akumulacji transkryptów *MtABCG10* i *MtABCG16*. Co ciekawe poziom ich mRNA w dużym stopniu zależał także od cyklu dobowego (**Rycina 4.9a i 4.9b**).

Szczególnie interesującym typem oddziaływań biotycznych jest symbioza. W przypadku *L. japonicus* stwierdzono, że ekspresja kilku genów ABCG (homologów *AtPDR12*) była indukowana w korzeniach inokulowanych bakteriami symbiotycznymi *M. loti* (Sugiyama et al. 2006). Postanowiono więc sprawdzić jak zachowują się geny kodujące pełne białka MtABCG podczas interakcji *Medicago* z *S. meliloti*. W odróżnieniu do odpowiedzi na infekcje patogenami, bakterie brodawkowe powodowały jedynie nieznaczny wzrost akumulacji transkryptu *MtABCG10* (**Rycina 4.10a i 4.10b**).

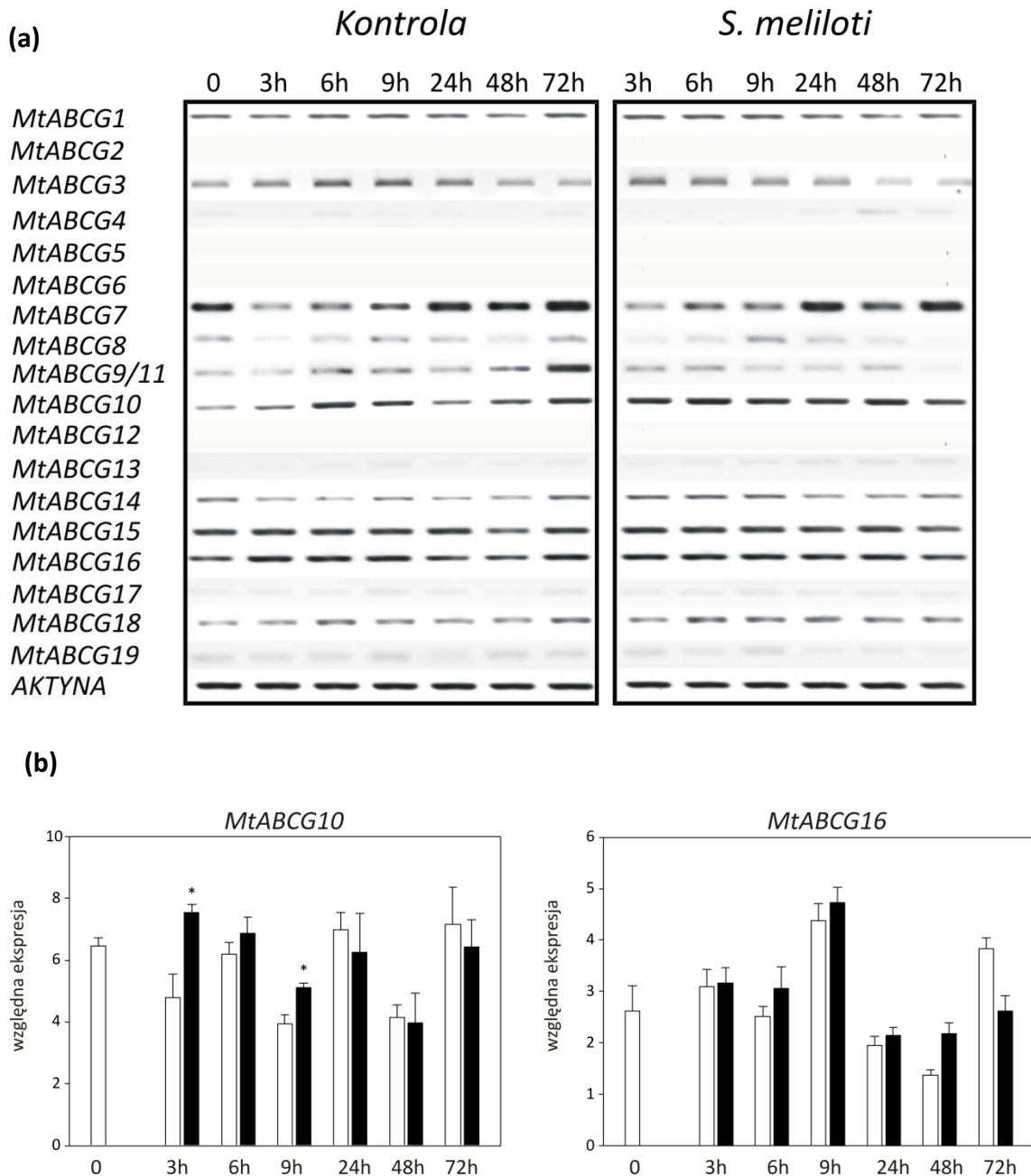
³ Krzywe standardowe dla genów *MtABCG10*, *MtABCG16* i *β-aktyny* oraz krzywe topnienia ich aplikonów zamieszczono kolejno w załącznikach nr 4., 5., 6.



Rycina 4.8. Analiza zmian poziomu ekspresji genów *MtABCG* w korzeniach siewek *M. truncatula* pod wpływem *F. culmorum*, w różnym czasie po infekcji. Dla genów *MtABCG1-19* z zastosowaniem półilościowej metody PCR (27 cykli). Czerwoną ramką oznaczono geny wyselekcjonowane do qRT-PCR (a); Dla genów *MtABCG10* i *MtABCG16* dodatkowo z zastosowaniem ilościowej metody RealTime PCR. Białe słupki odpowiadają materiałowi kontrolnemu, a czarne traktowanemu sporami grzyba. Wyniki przedstawiają średnie oraz odchylenia standardowe dla dwóch powtórzeń biologicznych. Różnice istotne statystycznie określono przy użyciu testu t-Studenta (*= $P < 0,05$; **= $P < 0,02$; ***= $P < 0,01$) (b). Kontrolę wewnętrzną i gen referencyjny stanowiła β -aktyna.

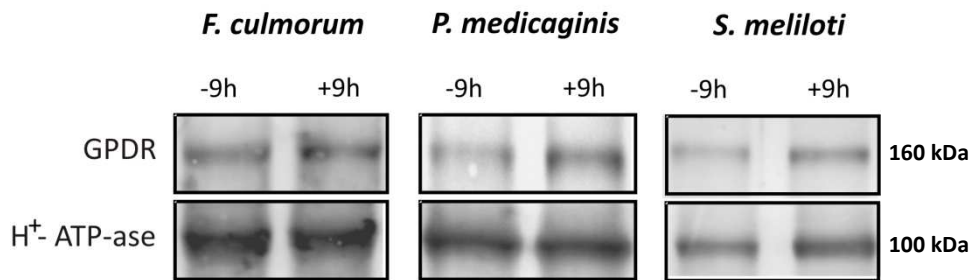


Rycina 4.9. Analiza zmian poziomu ekspresji genów *MtABCG* w liściach *M. truncatula* pod wpływem *P. medicaginis*, w różnym czasie po infekcji. Dla genów *MtABCG1-19* z zastosowaniem półilościowej metody PCR (27 cykli). Czerwoną ramką oznaczono geny wyselekcjonowane do qRT-PCR (a); Dla genów *MtABCG10* i *MtABCG16* dodatkowo z zastosowaniem ilościowej metody RealTime PCR. Białe słupki odpowiadają materiałowi kontrolnemu, a czarne traktowanemu sporami grzyba. Wyniki przedstawiają średnie oraz odchylenia standardowe dla dwóch powtórzeń biologicznych. Różnice istotne statystycznie określono przy użyciu testu t-Studenta (*= $P < 0,05$; **= $P < 0,02$; ***= $P < 0,01$) (b). Kontrolę wewnętrzną i gen referencyjny stanowiła β -aktyna.



Rycina 4.10. Analiza zmian poziomu ekspresji genów *MtABCG* w korzeniach siewek *M. truncatula* pod wpływem *S. meliloti*, w różnym czasie po inokulacji. Dla genów *MtABCG1-19* z zastosowaniem półilościowej metody PCR (27 cykli) (a); Dla genów *MtABCG10* i *MtABCG16* dodatkowo z zastosowaniem ilościowej metody RealTime PCR. Białe słupki odpowiadają materiałowi kontrolnemu, a czarne traktowanemu bakteriami. Wyniki przedstawiają średnie oraz odchylenia standardowe dla dwóch powtórzeń biologicznych. Różnice istotne statystycznie określono przy użyciu testu t-Studenta (*= $P < 0,05$) (b). Kontrolę wewnętrzną i gen referencyjny stanowiła β -aktyna.

Analiza Western blot z wykorzystaniem przeciwciał rozpoznających wszystkie transportery MtABCG, nie wykazała znaczących różnic w akumulacji tej grupy białek między materiałem kontrolnym, a traktowanym kolejno grzybami patogennymi i bakteriami symbiotycznymi (**Rycina 4.11**).



Rycina 4.11. Analiza Western blot poziomu akumulacji pełnych białek MtABCG we frakcji mikrosomalnej (5 μg), pochodzącej z materiału kontrolnego i traktowanego kolejno *F. culmorum*, *P. medicaginis* i *S. meliloti*. W eksperymencie wykorzystano przeciwciała GPDR jako kontrolę wewnętrzną zastosowano przeciwciała W1G rozpoznające H⁺ ATP-azy.

4.3 Analiza funkcjonalna genu *MtABCG10*

Analiza danych, uzyskanych na pierwszym etapie badań, pozwoliła wyłonić dwa geny *MtABCG10* oraz *MtABCG16*, potencjalnie zaangażowane w reakcje obronne. Aby zweryfikować postawioną hipotezę o udziale białek ABCG w modulacji oddziaływań biotycznych, w dalszej części pracy, skupiono się na szczegółowej analizie funkcjonalnej jednego z nich. Zdecydowano się na próbę określenia roli białka *MtABCG10* w korzeniach *Medicago*. Wiadomo, że homologi *MtABCG10*, takie jak *AtPDR12* (Bultreys et al. 2009; Stukkens et al. 2005), *NtPDR1* (Sasabe et al. 2002) czy *NpPDR1* (Jasinski et al. 2001) uczestniczą w ochronie rośliny przed patogenami. Ryzosfera jest natomiast miejscem szczególnie intensywnych interakcji rośliny ze środowiskiem, w których ważną rolę odgrywają uwalniane do podłoża metabolity wtórne. Warto przypomnieć, że związki te są proponowanymi substratami pełnych transporterów ABCG (Badri et al. 2012).

W związku z tym, że w genomie *M. truncatula* występują dwa bliskie paralogi *MtABCG10*, w pierwszej kolejności przeprowadzono krótką charakterystykę wszystkich trzech genów, obrazującą zależności między nimi (**rozdział 4.3.1**). Następnie wykonano właściwą analizę funkcjonalną *MtABCG10* obejmującą: (i) badanie zmian poziomu ekspresji genu *MtABCG10* pod wpływem wybranych czynników (**rozdział 4.3.2**), (ii) określenie organospecyficznej aktywności promotora genu *MtABCG10* (**rozdział 4.3.3**) oraz (iii) subkomórkowej lokalizacji białka *MtABCG10* (**rozdział 4.3.4**), uzyskano także (iv) rośliny złożone (ang. *composite plants*) oraz hodowlę korzeni włosowatych, wykazujących częściowe wyciszenie ekspresji *MtABCG10* (**rozdział 4.3.5**) i w końcu (v) przeprowadzono analizy fenotypowe wyciszonego materiału roślinnego, obejmujące badanie profilu metabolitów wtórnych (**rozdział 4.3.6.1**) oraz badanie podatności na infekcje grzybowe (**rozdział 4.3.6.2**).

4.3.1 *MtABCG10* i jego dwa bliskie homologi

Analiza *in silico* wykazała, że w *Medicago* obok transportera *MtABCG10* znaleźć można jego dwa bardzo bliskie homologie *MtABCG9* i *MtABCG11*. Stopień identyczności

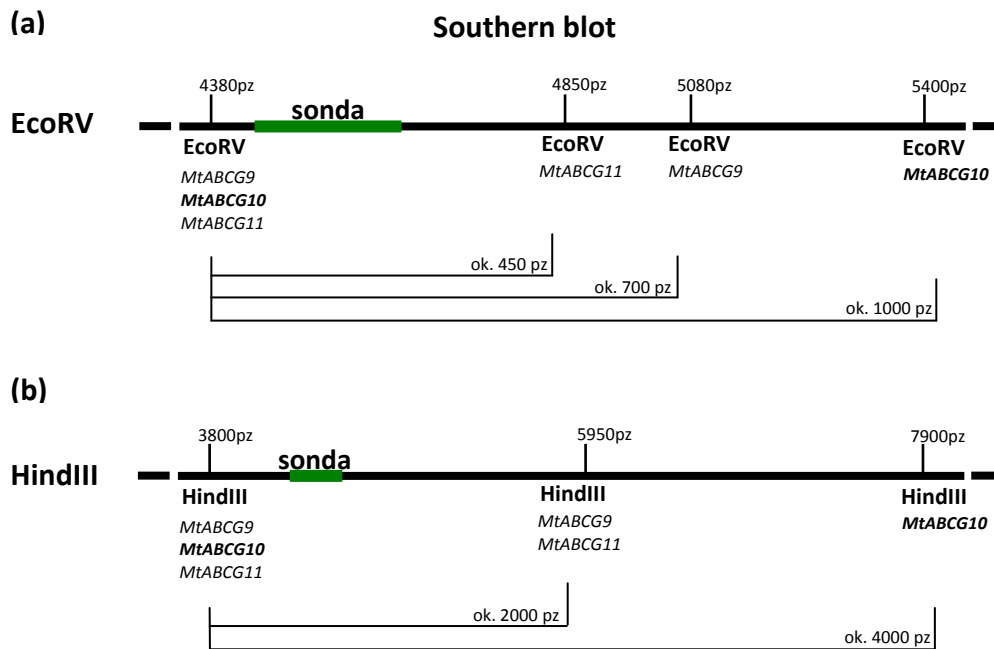
między nimi sięga 98% (**Tabela 4.3**). Wszystkie trzy geny kodujące wyżej wymienione białka ułożone są tandemowo na chromosomie drugim i posiadają podobną strukturę (**Rycina 4.2, Rycina 4.3**).

Tabela 4.3. Stopień identyczności między MtABCG9, MtABCG10 i MtABCG11 na poziomie sekwencji cDNA i aminokwasowej (AA), określony dzięki narzędziu bl2seq.

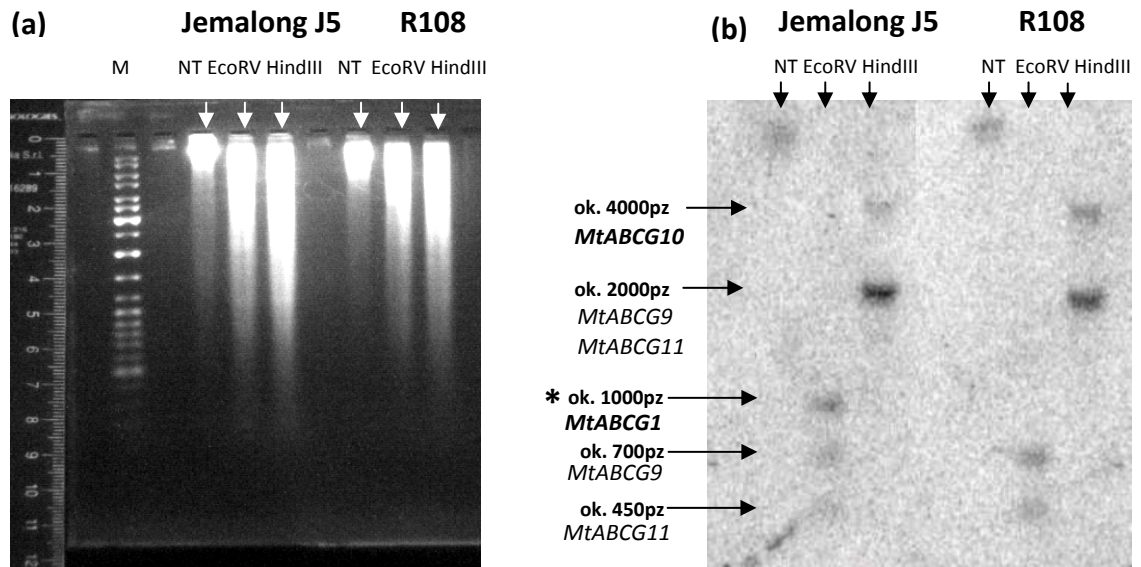
http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch&PROG_DEF=blastn&BLAST_PROG_DEF=megaBlast&SHOW_DEFAULTS=on&BLAST_SPEC=blast2.

Stopień identyczności	cDNA	AA
MtABCG10/MtABCG9	94%	96%
MtABCG10/MtABCG11	96%	98%
MtABCG9/MtABCG11	95%	96%

Większość sekwencji, pochodzących z *M. truncatula*, dostępnych w bazach danych, odpowiada ekotypowi Jemalong A17. Wynika to z faktu, że genom tego ekotypu uznano za referencyjny i objęto projektem sekwencjonowania. W badaniach prowadzonych w ramach niniejszej pracy doktorskiej wykorzystywano natomiast dwa inne ekotypy Jemalong J5 oraz R108, które dostępne były w kolekcji IChB PAN. W związku z różnicami jakie mogą występować pomiędzy poszczególnymi ekotypami, postanowiono sprawdzić eksperymentalnie, metodą Southern blot, obecność wszystkich trzech paralogów w genomach *M. truncatula* Jemalong J5 oraz R108. Przyjęta strategia opierała się na detekcji prążków o wielkościach specyficznych dla danego genu, otrzymanych w wyniku trawienia genomowego DNA enzymami restrykcyjnymi EcoRV lub HindIII. Wyboru enzymów dokonano na podstawie analizy przeprowadzonej przy pomocy programu NEBcutter V2.0 (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/>). Sondę stanowił znakowany radioaktywnie fragment DNA długości 270 pz, uniwersalny dla wszystkich trzech badanych genów (**Rycina 4.12**). Uzyskane wyniki jednoznacznie wskazały na obecność trzech paralogów w genomie *M. truncatula*, zarówno ekotypie Jemalong J5, jak i R108. Brak prążka w ścieżce EcoRI dla *MtABCG10* w przypadku ekotypu R108 wynika z polimorfizmu w obrębie miejsca restrykcyjnego, co potwierdzono sekwencjonowaniem (**Rycina 4.13**).



Rycina 4.12. Schemat ilustrujący przyjętą strategię Southern blot, pozwalającą potwierdzić występowanie trzech paralogów (*MtABCG9*, *MtABCG10* i *MtABCG11*) w genomie *M. truncatula*. Na schemacie przedstawiono miejsca cięcia EcoRV (a) i HindIII (b) dla *MtABCG9*, *MtABCG10* i *MtABCG11* w obrębie wybranego rejonu sekwencji genomowej oraz długości fragmentów dla poszczególnych genów, powstających na skutek cięcia danym enzymem restrykcyjnym. Kolorem zielonym oznaczono miejsce wiązania sondy o długości 270pz.



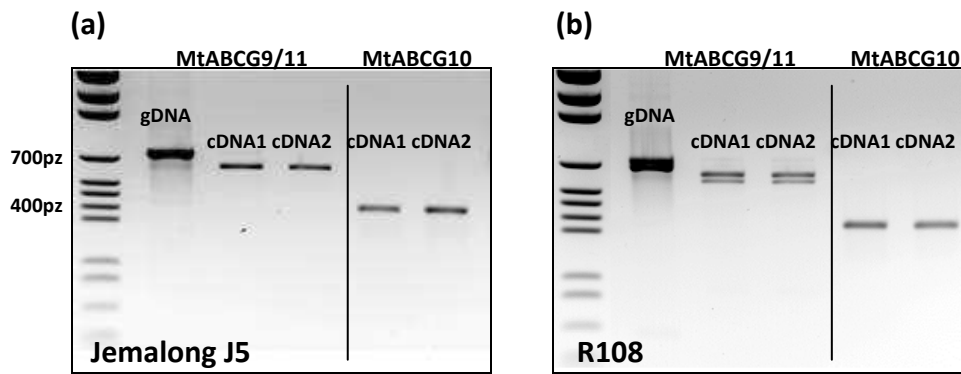
Rycina 4.13. Żel agarozowy przedstawiający gDNA *M. truncatula* (ekotyp: Jemalong J5 i R108), nietrawione (NT) i po trawieniu enzymami restrykcyjnymi kolejno EcoRV i HindIII (a). Wywołana klisza rentgenowska, obrazująca miejsce wiązania znakowanej radioaktywnie sondy. Analiza uzyskanych sygnałów potwierdziła obecność wszystkich trzech genów w obu ekotypach. (*) brak sygnału w przypadku ekotypu R108, w ścieżce EcoRV, dla genu *MtABCG10* jest wynikiem występowania polimorfizmu między ekotypami, który ujawnił się brakiem jednego miejsca restrykcyjnego, co potwierdzono przez sekwencjonowanie (b).

Metodą RT-PCR dowiedziono, że wszystkie trzy geny są także aktywne transkrypcyjnie w korzeniach siewek *Medicago*. Wysoki stopień identyczności uniemożliwił zaprojektowanie specyficznych starterów dla wszystkich trzech paralogów, stąd zdecydowano się ekspresję *MtABCG9* i *MtABCG11* analizować za pomocą wspólnej pary starterów. Aby mieć pewność, że uzyskany na matrycy cDNA produkt dla *MtABCG9* i *MtABCG11* nie odpowiada sekwencji genomowej (wzięto pod uwagę potencjalne zanieczyszczenie matrycy genomowym DNA), startery zaprojektowano tak, aby obejmowały także intron (**Rycina 4.14**). Obecność dwóch prążków, odpowiadających produktom *MtABCG9* i *MtABCG11*, w przypadku ekotypu R108 związana była z trzydziesto nukleotydową insercją w jednym z nich. Specyficzność starterów potwierdzono przez sekwencjonowanie uzyskanych produktów (**Rycina 4.15**).

Wykazano także, że spośród trzech bliskich homologów (*MtABCG9*, *MtABCG10* i *MtABCG11*) ekspresji na najwyższym poziomie ulega *MtABCG10*. Określono to przeprowadzając ilościową analizę transkryptów interesujących genów. Opierała się ona na klonowaniu i sekwencjonowaniu produktów PCR, uzyskanych z wykorzystaniem pary starterów, po pierwsze (i) wspólnej dla wszystkich trzech genów, po drugie (ii) flankującej rejon pozwalający na ich rozróżnienie (**Rycina 4.16**). Spośród 70 dowolnie wybranych klonów, 100% odpowiadało *MtABCG10*. Obserwacja ta była zgodna z analizami *in silico*. Większość EST-ów dostępnych w bazach danych także odpowiada *MtABGG10*. Warto dodać, że podobna analiza przeprowadzona na matrycy genomowego DNA, skutkowała rozkładem liczby klonów odpowiednio dla *MtABCG9:MtABCG10:MtABCG11* 1:1:1. Z uwagi na fakt, iż *MtABCG10* jawi się jako gen ulegający dominującej ekspresji, w dalszej części pracy skupiono się głównie na jego analizie funkcjonalnej. Przeprowadzając kolejne doświadczenia uwzględniano jednak obecność dwóch bliskich homologów, zarówno na etapie projektowania eksperymentów, jak i wyciągania wniosków.

MtABCG10	GGTATCTATTCTTCATGACTTCACATTGCTCTACTTCACCTTCTATGGTATGATGGCTG	
MtABCG11	GGTATCTATTCTTCATGACTTCACATTGCTCTACTTCACCTTCTATGGTATGATGGCTG	PDR9/11F
MtABCG9	GGTATCTATTCTTCATGACTTCACATTGCTCTACTTCACCTTCTATGGTATGATGGCAG	PDR9/11F
MtABCG10	TGGCAGTGACACCAAATCACCATGTTGCTTCTATTGTGGCTGCTGCATTTTATGCAATTT	
MtABCG11	TGGCAGTGACACCAAATCACCATGTTGCTTCTATTGTGGCTGCTGCATTTTATGCAATTT	
MtABCG9	TGGCTGTGACACCAAATCACCATGTTGCTTCTATTGTGGCTGCTGCATTTTATGCAATCT	
MtABCG10	GGAATCTCTTTTCAGGATTTGTCGTCCCAGACCTGTAAGTATAGTATATAGTACATTG	
MtABCG11	GGAATCTCTTTTCAGGATTTGTCGTCCCAGACCTGTAAGTATAGTATATAGTACATTG	
MtABCG9	GGAATCTCTTTTCAGGATTTGTCGTCCCAGACCTGTAAGTATAAGTATAAGTACATTT	
MtABCG10	TGAAAGACTGTTTCAAATGGATG-----TATGTATATGATCCTAACCATTTT-----	
MtABCG11	TGAAAGACTTTTCAAATGGATG-----TATGTATATGATCCTAACGTTTTTT-----	intron
MtABCG9	AGAAAGAATGGTTAGTTGGATGACATTATATATGCAATATGCTAACGTTTTTTTCTT	
MtABCG10	---CTTGCCTTTTGATAACAGAGCATTCCAATATGGTGGAGATGGTACTATTGGGCATGT	
MtABCG11	---CTTGCCTTTTGATAACAGAGCATTCCAATATGGTGGAGATGGTACTATTGGGCATGT	
MtABCG9	CTTCTTGCCTTTTGATAACAGAGCATTCCAATATGGTGGAGATGGTACTATTGGGCATGT	
MtABCG10	CCAGTTCATGGACCATCTATGGATTGGTTGCATCTCAATTTGGAGATATAACTACTGTT	PDR10F
MtABCG11	CCAGTTCATGGACCATCTATGGATTGGTTGCATCTCAATTTGGAGATATAACTACTGTT	
MtABCG9	CCAGTTCATGGACCATCTATGGATTGGTTGCATCTCAATTTGGAGATATAACTACTGTT	
MtABCG10	ATGTCGACCGAAGGCCGAAAAGATGTAAGACTTTCCTTGACGACTTTTTTGGTATCCAA	
MtABCG11	ATGTCGACCGAAGGCCGAAAAGATGTAAGACTTTCCTTGACGACTTTTTTGGTATCCAA	
MtABCG9	ATGACGACTGAAGGTGAAAAGATGTAAAACCTTTCCTTGACGACTTTTTTGGTATCCAA	
MtABCG10	CACGACTTCATAGGATGGTGTGCACTTGTGGTGGTGGAAATGCCGTGGGCTTTGCCTTT	
MtABCG11	CACGACTTCATAGGATGGTGTGCACTTGTGGTGGTGGAAATGCCGTGGGCTTTGCCTTT	
MtABCG9	CACGACTTCATAGGATGGTGTGCGCTTGTGGTGGTGGAAATGCCGTGGCCTTTGCCTTT	
MtABCG10	ATTTTCGCTGTGCAATCAAGTCCTTTAACTTCCAAAGAGATAGTTTGCCTCTTTCTC	
MtABCG11	ATTTTCGCTGTGCAATCAAGTCCTTTAACTTCCAAAGAGATAGTTTGCCTCTTTTTC	kodon stop
MtABCG9	ATATTCGCTGTGCAATCAAAATCCTTTAACTTCCAGAAAGAGATAGTTTGCCTCTTTCTC	
MtABCG10	CAACAAGAAAGATTCTTTTTATTTTTATTTT-CCCTCCCAAATTTTTCCTAGCTTG---	
MtABCG11	CAACAAGAAAGATTCTTTTTATTTTTATTTT--CCTCCCAAATTTTCATTGCTCATA	
MtABCG9	CAACAAGAAAGATTCTTTTTATTTTTATTTTCCCTCCCAAATTTTCATTGCTCATA	
MtABCG10	-TATAATACCTGTATCTATATCCCATGCCTTAGTTTCTTAGGAAATTTATTTCCCTTTG	
MtABCG11	TGTATTTGTTGTAGCCATCTTACATGCAGTAGTTGAT-AGGAATTTATTTACCCTAC	
MtABCG9	TGTATTTGTTGCAGCCATCTTACATGCAGTAGTTGAT-AGGAATTTATTTACCCTAC	
MtABCG10	TTTGACACAATTTAAAGCTTCTTT-ATAAATGTACAAGCATTTGAATTTGAATAAGACA	
MtABCG11	TGC----CAATTTGCAGTTTCTTTTGATACATGTACAAGCATATAAATG-----ATGTA	
MtABCG9	TGC----CAATTTGCAGTTTCTTTTGATATATATACAA-CATATAAATG-----ATGTA	
MtABCG10	ATAATTTTGTATTATCATTTTGA-TCATCAATGAAAGATAGTGTATA	PDR10R
MtABCG11	ATACTTTGTGTTATTAATTTGAGTTGTCATTGAAATATATTTTG	PDR9/11
MtABCG9	ATACTTTGTGTTATTAATTTGAGTAATCATTTGAAATATATTTTG	PDR9/11

Rycina 4.14. Zestawienie sekwencji cDNA *MtABCG10*, *MtABCG11* i *MtABCG9* w rejonie 3' końca genów http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_multalinan.html. Długość oraz sekwencję 3'UTR dla genu *MtABCG10* ustalono eksperymentalnie techniką 3'RACE (praca magisterska 2007, Joanna Banasiak). Kolorem szarym zaznaczono sekwencje starterów.



Rycina 4.15. Analiza produktów reakcji RT-PCR metodą elektroforezy w 1,5% żelu agarozowym, dla fragmentów DNA amplifikowanych z użyciem starterów specyficznych dla *MtABCG10* i wspólnej pary starterów dla genów *MtABCG9* i *MtABCG11*. *M. truncatula* ekotyp J5 (a), *M. truncatula* ekotyp R108 (b). cDNA1 i cDNA2 odpowiadają produktom dla dwóch niezależnych matryc, które uzyskano w wyniku odwrotnej transkrypcji; gDNA, produkty uzyskane na matrycy genomowego DNA.

```

MtABC9      TTCCCACATGCATATTGGTATTGGATAGGCGTTGGGGGATTGGCTGGATTGTGTTCTT
MtABC10     TTCCCACATGCATATTGGTATTGGATAGGCGTTGGGGGATTGGTTGGATTGTGTTCTT
MtABC11     TTCCCACATGCATATTGGTATTGGATAGGCGTTGGGGGATTGGTTGGATTGTCTTCTT

MtABC9      TTCAACGCGGCGTTTGGTGTGGCTCTCGCTGTACTAGGCCCATTTGATAAGCCTAGTGCA
MtABC10     TTCAACGCGGCGATTGGTGTGGCTCTCGCTGTACTAGGCCCATTTGATAAGCCTAGTGCA
MtABC11     TTCAACGTTGGCGTTTGGTGTGGCTCTCGCTGTACTAGGCCCATTTGATAAGCCTAGTGCA

MtABC9      ACAATAACTGATAA---TTCAGAAGATGATTCATCGAATTACATGACCCGACAAGAAGTT
MtABC10     ACAATAACTGAAGAAGATTTCAGAAGATGATTCATCTA-----CCGTACAAGAAGTT
MtABC11     ACAATAACTGAAGA---TTCAGAAGATGATTCATCTA-----CCGTACAAGAAGTT

MtABC9      GAATTACCACGCATAGAAAGTTCAGGAGAGGAGATTCTGTTACAGTGTCCAGCCATGGA
MtABC10     GAATTACCACGTATGAAAGTTCAGGTAGAAAGAGATTCTGTTACAGAAATCCAGCCATGGA
MtABC11     GAATTACCACGTATGAAAGTTCAGGAGAGCTGATTCTGTTACAGAGTCCAGCCATGGA

MtABC9      AAGAAAAAGGGAATGGTTCTTCCATTTGAACCACATTCTATCACTTTTGATGATATTGTA
MtABC10     AAGAAAAAGGGAATGGTTCTTCCATTTGAACCACATTCTATCACTTTTGATGATATTGTA
MtABC11     AAGAAAAAGGGAATGGTTCTTCCATTTGAACCACATTCTATCACTTTTGATGATATTGTA

MtABC9      TACTCTGTTGACATGCCAGCTGAAATGAAGGAGCAAGGTGTTACAGAGGACAGACTAGTG
MtABC10     TACTCTGTTGACATGCCAGCGGAAATGAAGGAGCAAGGTGTTACAGAGGACAGATTAGTG
MtABC11     TACTCTGTTGATATGCCAGTGAAATGAAGGAGCAAGGTGTTAGAGAAACAGATTAGTG

MtABC9      CTTTGAAGGGTGTAGCGGTGCATTTCAGGCCGGTGTCTCACAGCTTTGATGGGTGTA
MtABC10     CTTTGAAGGGTGTAGTGGCGCATTTCAGGCCGGTGTACTTACGGCTTTGATGGGTGTA
MtABC11     CTTTGAAGGGTGTAGTGGTGCATTTCAGGCCGGTGTCTCACAGCTTTGATGGGTGTA

MtABC9      AGTGGAGCTGGTAAAACAACCTCTGATGGATGTTCTGGCTGGTAGGAAAACAGGTGGATAT
MtABC10     AGTGGAGCTGGTAAAACAACCTCTGATGGATGTTCTGGCTGGTAGGAAAACAGGTGGATAT
MtABC11     AGTGGAGCTGGTAAAACAACCTCTGATGGATGTTCTGGCTGGTAGGAAAACAGGTGGATAT

```

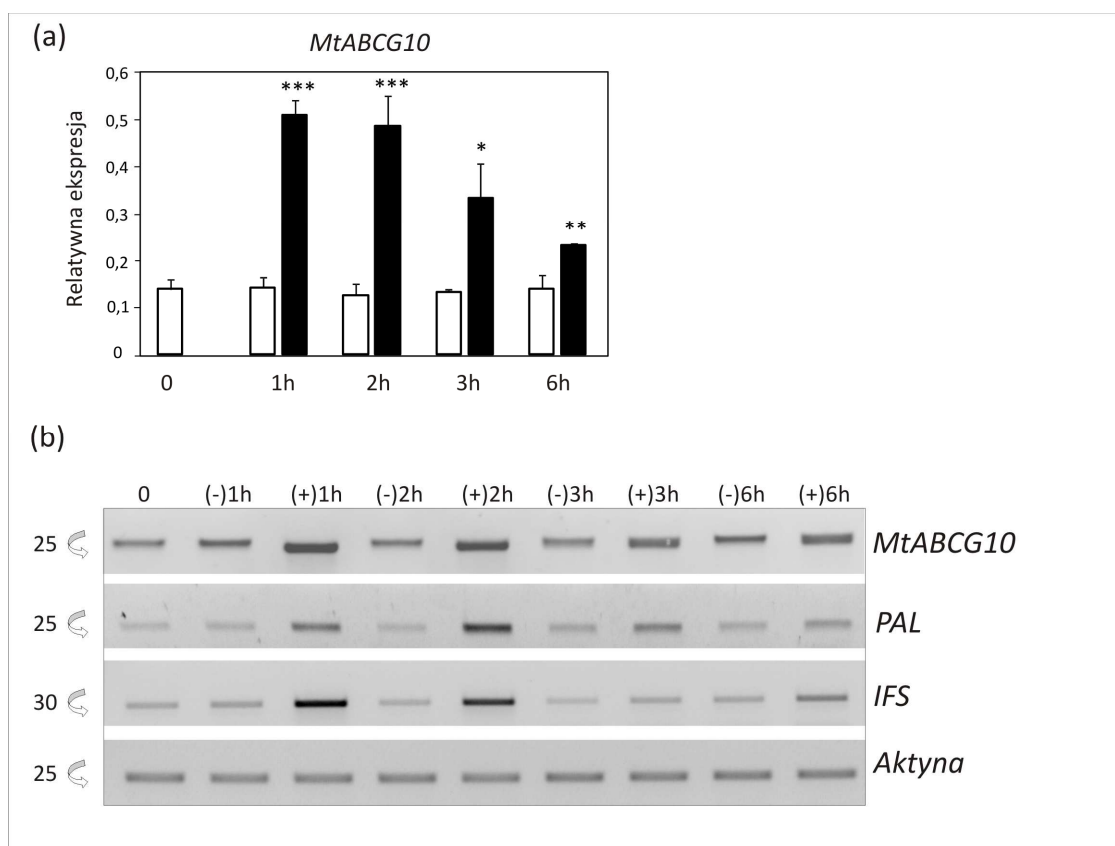
Rycina 4.16. Zestawienie sekwencji cDNA genów *MtABC9*, *MtABC10* i *MtABC11* w rejonie spełniającym dwa warunki: i) pozwalającym rozróżnić trzy paralogi oraz ii) pozwalającym zaprojektować wspólną parę starterów flankujących interesujące sekwencje. Kolorem szarym zaznaczono sekwencje starterów.

http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_multalinan.html.

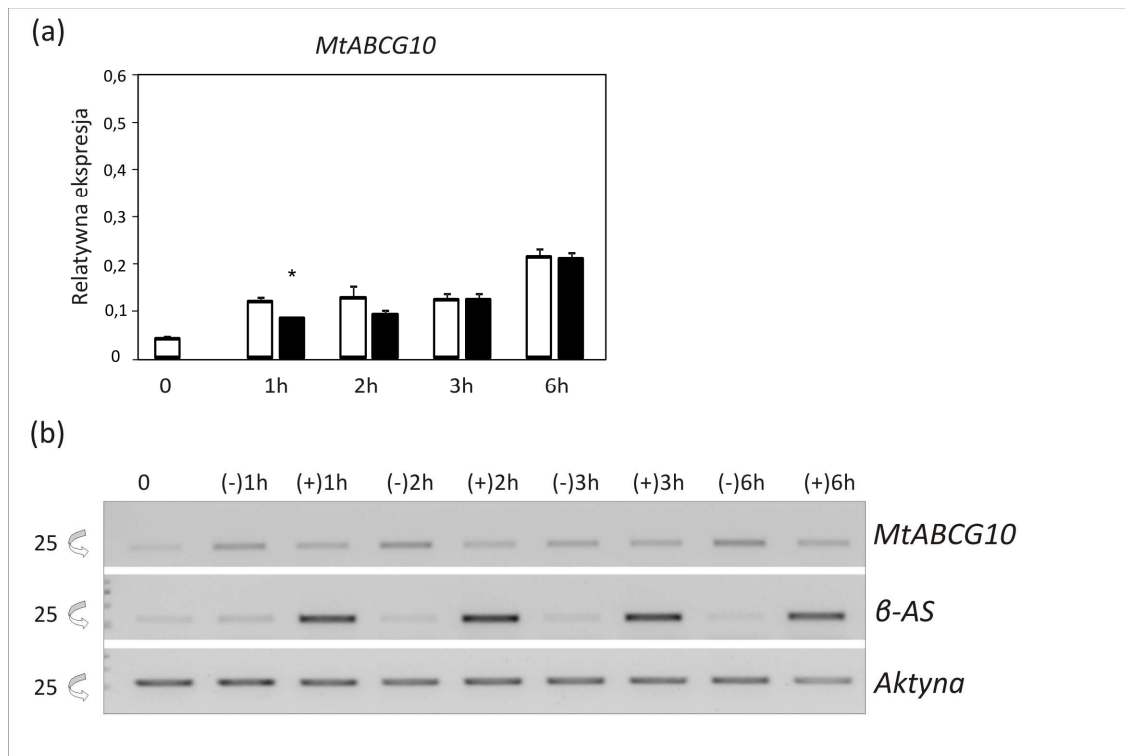
4.3.2 Analiza profilu ekspresji genu *MtABCG10*

Jak pokazano w podrozdziale 4.2 ekspresja genu *MtABCG10* jest indukowana pod wpływem infekcji grzybowych. Co więcej istnieją przesłanki, wskazujące na udział pełnych białek ABCG w ochronie rośliny przed patogenami, poprzez transport metabolitów wtórnych o właściwościach antybakteryjnych i antygrzybiczych (Jasinski et al. 2001). W przypadku roślin bobowatych główną grupę niskocząsteczkowych związków zaangażowanych w odpowiedź na stres biotyczny, stanowią izoflawonoidy. Mając to na uwadze postanowiono sprawdzić jak zmienia się profil ekspresji genu *MtABCG10* pod wpływem dwóch znanych induktorów odpowiedzi obronnej, powiązanych odpowiednio z biosyntezą *de novo* izoflawonoidów (elicytor grzybowy – ekstrakt oligosacharydów wyizolowanych ze ściany komórkowej) (**Rycina 4.17**) oraz biosyntezą terpenoidów i uruchamianiem puli zmagazynowanych w wakuoli koniugatów izoflawonoidów (MeJA – ester metylowy kwasu jasmonowego) (**Rycina 4.18**) (Farağ et al. 2008; Naoumkina et al. 2007).

Analiza ilościowa RealTime PCR, przeprowadzona na materiale pochodzącym z korzeni siewek *Medicago* wykazała, że poziom mRNA *MtABCG10* wyraźnie wzrasta w obecności zastosowanego elicytora grzybowego. Indukcja ta ma charakter szybki i przejściowy (najwyższy poziom obserwowano 1 i 2 h po elicytacji). Podobny profil ekspresji odnotowano dla genów *PAL* (GenBank XM_003625614) i *IFS* (GenBank AY939826). Pierwszy z nich koduje amoniako-liazę fenyloalaninową (ang. *phenylalanine ammonia-lyase*), rozpoczynającą szlak fenylopropanoidowy natomiast drugi syntazę izoflawonową (ang. *isoflavone synthase*), która jest kluczowym enzymem w biosyntezie izoflawonoidów (**Rycina 4.17b**). W odróżnieniu do elicytora grzybowego MeJA w stężeniu 10 μ M nie powodował znaczących zmian w akumulacji transkryptu *MtABCG10*, mimo że stężenie to było wystarczające do wyraźnej indukcji ekspresji genu markerowego β -AS (GenBank XM_003604073), kodującego syntazę β -amyryny (ang. *β -amyrin synthase*), zaangażowaną w biosyntezę triterpenów (**Rycina 4.18b**). Uzyskany wynik może stanowić przesłankę, wskazującą na udział *MtABCG10* w reakcjach obronnych, powiązanych ze szlakiem izoflawonoidowym. W szczególności z biosyntezą izoflawonoidów *de novo* w odpowiedzi na atak patogena.



Rycina 4.17. Analiza zmian poziomu ekspresji wybranych genów w korzeniach siewek *M. truncatula* pod wpływem elicytora grzybowego, w różnym czasie po potraktowaniu elicytorem. Dla genu *MtABCG10* z zastosowaniem ilościowej metody RealTime PCR. Białe słupki odpowiadają materiałowi kontrolnemu, a czarne traktowanemu elicytorem. Wyniki przedstawiają średnie oraz odchylenia standardowe dla dwóch powtórzeń biologicznych. Różnice istotne statystycznie określono przy użyciu testu t-Studenta (*= $P < 0,05$; **= $P < 0,005$; ***= $P < 0,0005$), kontrolę wewnętrzną i gen referencyjny stanowiła β -aktyna (a) oraz dla genów *MtABCG10*, *PAL*, *IFS* i β -aktyny z zastosowaniem półilościowej metody RT-PCR (liczba cykli \hookrightarrow)(b).



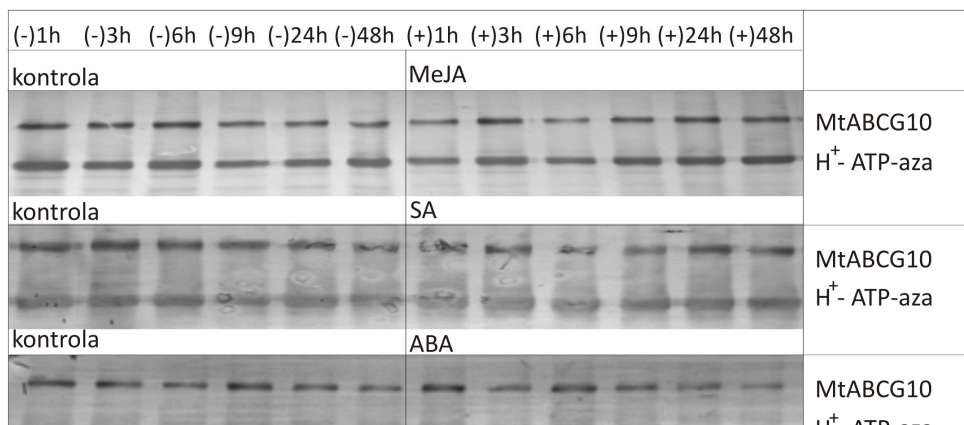
Rycina 4.18. Analiza zmian poziomu ekspresji wybranych genów w korzeniach siewek *M. truncatula* pod wpływem 10 μ M MeJA, w różnym czasie po potraktowaniu MeJA. Dla genu *MtABCG10* z zastosowaniem ilościowej metody RealTime PCR. Białe słupki odpowiadają materiałowi kontrolnemu, a czarne traktowanemu MeJA. Wyniki przedstawiają średnie oraz odchylenia standardowe dla dwóch powtórzeń biologicznych. Różnice istotne statystycznie określono przy użyciu testu t-Studenta (*= $P < 0,05$), kontrolę wewnętrzną i gen referencyjny stanowiła β -aktyna (a) oraz dla genów *MtABCG10*, β -AS i β -aktyny z zastosowaniem półilościowej metody RT-PCR (liczba cykli \hookrightarrow)(b).

Co ciekawe nie tylko MeJA, ale także inne tzw. hormony stresowe roślin jak ABA czy SA nie wpływały na poziom ekspresji genu oraz akumulację białka MtABCG10, w materiale pochodzącym z hodowli zawiesinowej *Medicago* (**Rycina 4.19**). Pomimo, że związki te nawet w niskich stężeniach indukują ekspresję bliskich homologów *MtABCG10* z innych roślin, takich jak *NtPDR1*, *SpTUR2* i *GmPDR1* (Smart i Fleming, 1996; Sasabe 2002; Eichhorn 2006).

(a)



(b)



Rycina 4.19. Analiza zmian poziomu ekspresji genu *MtABCG10* z zastosowaniem półilościowej metody RT-PCR (a) oraz akumulacji białka *MtABCG10* z wykorzystaniem analizy Western blot (b) w hodowli zawiesinowej *M. truncatula* pod wpływem hormonów stresowych ABA (10 μM), SA (10 μM), MeJA (10 μM), w różnym czasie po potraktowaniu. Jako kontrolę wewnętrzną zastosowano odpowiednio gen β -aktyny i przeciwciała W1G rozpoznające H⁺-ATP-azy.

4.3.3 Określenie organo- i tkankowospecyficznego wzoru ekspresji *MtABCG10*

W kolejnym etapie badań postanowiono ustalić organo- i tkankowospecyficzny wzór ekspresji genu *MtABCG10*, poprzez zbadanie aktywności jego promotora. Przed przystąpieniem do właściwej analizy podjęto próbę identyfikacji potencjalnych elementów regulatorowych cis w obrębie wybranego regionu promotora o długości 710 pz. W tym celu wykorzystano program PLACE (ang. *Plant Cis-acting Regulatory DNA Elements*), który dostępny jest na stronie www.dna.affrc.go.jp/PLACE/. Charakterystyka *in silico* promotora *MtABCG10* ujawniła obecność szeregu elementów regulatorowych, takich jak W-box, GCC-box, GT-1 czy Dof, które znajdują się także w promotorach genów powiązanych z odpowiedzią obronną (Chakravarthy et al. 2003; Eulgem et al. 1999; Nishiuchi et al. 2004; Yamamoto et al. 2004) (**Rycina 4.20**).

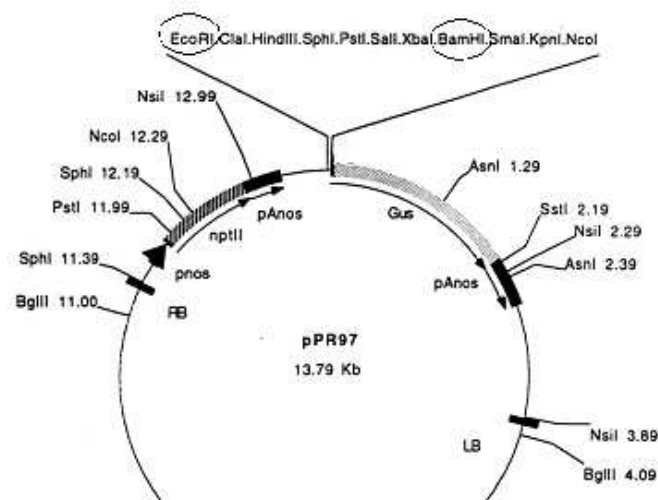
```

          DOF
-549 AAGAAGCTGCCACTAAAGCAAGGGCTTTAGACCTCCAAATTTTTAAAATTTCGCCTTAAGACTACAAATAC
-479 ATTGGGTCGACCTGAAACTCTTATACAACGACTTGAACATAATTCATCCCTACTTATGGTTACATCATGA
          W-box                                DOF GT-1 DOF
-409 GCAATGTTATTTGAACAATCATTTATTGTGACAATTTTTTAAACAACAAGATTATAAAAAGAAAAAGTTA
          W-box
-339 TCAAAAAATAATTGTTGAATATGATTTCACTTTCTAGTAGATCATA TGACC CGTGTCTTTACTGTTTTT
          W-box
-269 GACGAAAACCCGTGCTCTTTTTTACTTTAGGACCCGTTATTATTCACTAATCACTATTCCCGTTAACTA
          W-box
-199 AAGTACTTTATTTGGCCACTAAAAATGAAATCATTTCTTTTTCAGTACGGTCTCCATTACTGACTCCTTTT
          W-box                                GCC-box
-129 ATATAATAATTTCTTTTTTAAATAAATTATTTCTTATAAACTCTTAAACATTTGACTTTTTCAATCGCCGCC
          TATA-box                                +1
-59  AGATTTTTTGAATCAAAAATCAAACAAATATAATATACACATATTTCCCATTTCCCATATTCATTTTTT
          12  CACAAAACACAATCCTCAAAAATAGTAACAAAACAAAACACTTCTCTTTCTTCATCATTCTTTGATTCTTT
          82  CATAGTGCTTGTCTTATTAATTTTCAAAAAACAAGAACAAGCTTGTGTAAAGCTGTTTCACAACAGC
          152 ACAAAAAATG

```

Rycina 4.20. Wynik analizy fragmentu promotora genu *MtABCG10* pod kątem obecności elementów regulatorowych cis, uzyskany za pomocą programu PLACE (ang. *Plant Cis-acting Regulatory DNA Elements*). +1 miejsce startu transkrypcji, poniżej rejon 5'UTR, powyżej fragment promotora, na którym zaznaczono m.in. TATA-box oraz szereg elementów regulatorowych cis: W-box, GCC-box, GT-1, Dof.

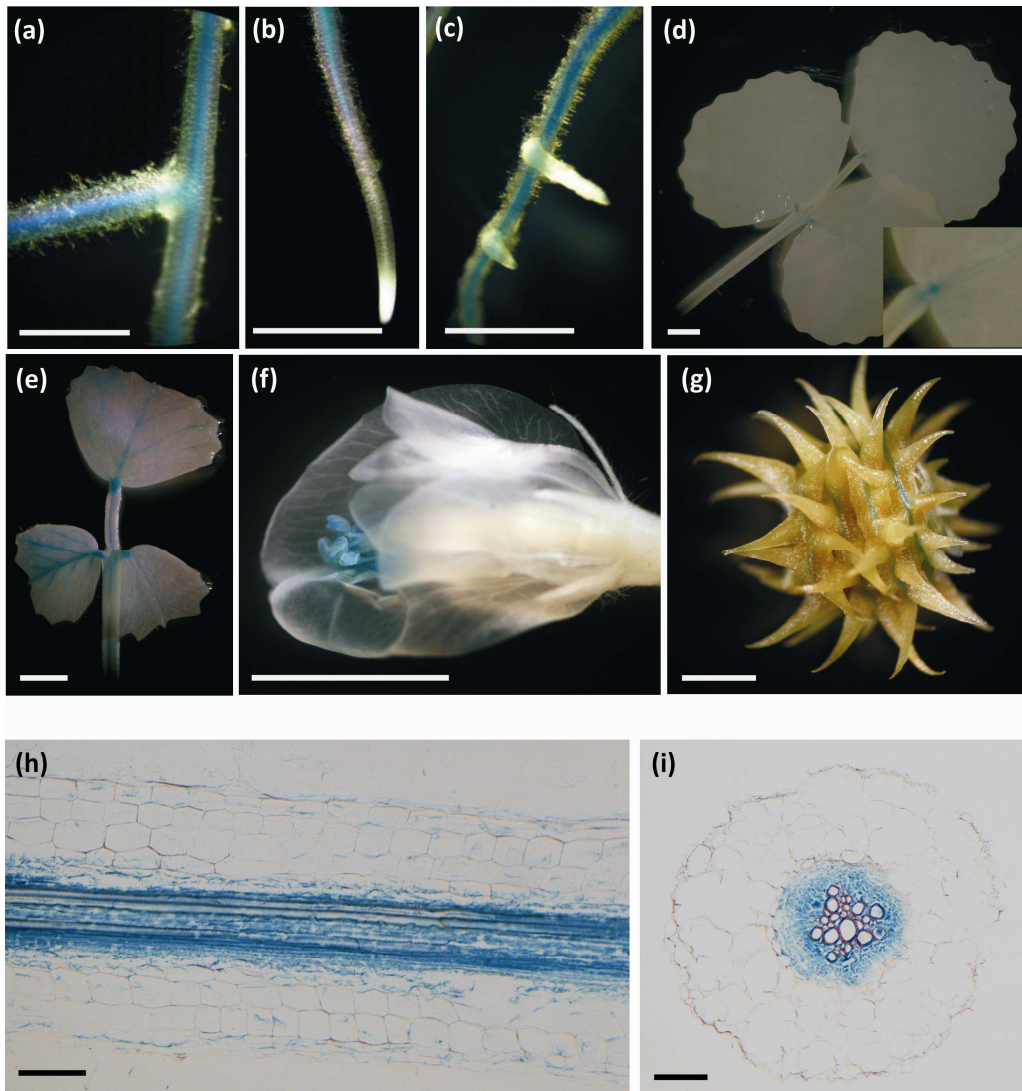
Następnie metodą PCR powielono analizowany fragment promotora genu *MtABCG10* i za pomocą enzymów restrykcyjnych (EcoRI i BamHI) wklonowano go do wektora ekspresyjnego pPR97 (Szabados et al. 1995) (**Rycina 4.21**). W ten sposób stworzono konstrukt fuzyjny złożony z genu reporterowego *GUS* pod kontrolą badanego promotora. Odpowiednio przygotowany plazmid wprowadzono drogą elektroporacji do *A. tumefaciens* szczep EHA105. Bakterie te są zdolne są do tzw. genetycznej kolonizacji, czyli integracji własnych genów (znajdujących się w obrębie T-DNA) z genomem gospodarza roślinnego. Następnie przeprowadzono transformację i regenerację *M. truncatula* metodą somatycznej embriogenezy. Uzyskano sześć niezależnych linii transgeniczných roślin, które poddano histochemicznemu barwieniu na obecność GUS (enzymu β -glukuronidazy) z użyciem substratu X-Gluc (5-bromo-4-chloro-3-indolylo- β -D-glukuronid). Pojawienie się w wyniku reakcji niebieskiego zabarwienia, świadczy o aktywności enzymu GUS, a tym samym miejscu aktywności badanego promotora (Jefferson 1987).



Rycina 4.21. Wektor ekspresyjny pPR97 z genem reporterowym kodującym β -glukuronidazę (GUS) oraz miejscem, pozwalającym za pomocą enzymów restrykcyjnych wprowadzać rejon promotorowy interesującego genu (Szabados et al. 1995).

Analiza histochemiczna przeprowadzona na transgenicznym roślinach, niosącym konstrukcję fuzyjny promotor *MtABCG10::GUS*, wykazała, że *MtABCG10* ulega ekspresji we wszystkich analizowanych organach. Głównym miejscem aktywności promotora są komórki miękiszowe otaczające wiązki przewodzące. W korzeniach niebieskie zabarwienie, niezależnie od wieku rośliny, obserwowano w obrębie walca osiowego (**Rycina 4.22 a-c, h, i**). Inaczej było w przypadku liści, gdzie wzór ekspresji *MtABCG10* zmieniał się wraz z wiekiem. Dla liści pochodzących z ośmiotygodniowych roślin rosnących w doniczkach, ograniczał się do miejsca łączenia poszczególnych listków z osadką (**Rycina 4.22d**). Młode liście roślin rosnących *in vitro*, oprócz wspomnianego rejonu, niebieskie zabarwienie wykazywały dodatkowo w obrębie naczyń (**Rycina 4.22e**). Analiza aktywności promotora *MtABCG10* w kwiatach wskazała na pylniki jako miejsce ekspresji genu *MtABCG10* w tym organie (**Rycina 4.22f**). Natomiast w przypadku owoców *Medicago* ponownie aktywność GUS rejestrowana była w obszarze, w którym biegną wiązki przewodzące (**Rycina 4.22g**).

Ze względu na szczególne zainteresowanie rolą białka *MtABCG10* w korzeniach, postanowiono dokładniej przyjrzeć się jak wygląda wzór ekspresji genu *MtABCG10* w tkankach tego organu. W tym celu przygotowano preparaty mikroskopowe. Transgeniczne korzenie siedmiodniowych siewek wybarwiono, a następnie aby zachować morfologię, utrwalono przy użyciu formaldehydu. Jako medium do zatapiania użyto wosku Steedmana, a skrawki mikroskopowe grubości 14 μm pocięto wykorzystując mikrotom Leica RM 2165. Uzyskano zarówno podłużne, jak i poprzeczne przekroje transgenicznych korzeni *Medicago*, które obserwowano przy użyciu mikroskopu Nikon A1R-S1. Potwierdzono aktywność promotora *MtABCG10* w obrębie walca osiowego, w komórkach miękiszowych otaczających wiązki przewodzące (**Rycina 4.22 h, i**).



Rycina 4.22. Analiza histochemiczna przeprowadzona na wybranych organach transgenicznych roślin, niosących konstrukcję fuzyjny promotor *MtABCG10::GUS*. Niebieskie zabarwienie wskazuje na miejsce aktywności promotora w: korzeniach w obrębie walca osiowego (a-c); liściach w miejscu łączenia się poszczególnych listków z osadką (ośmiotygodniowe rośliny) (d); młodych liściach w obrębie naczyń (siedmiodniowych siewek) (e); kwiatach w obrębie pylników (f); owocach w miejscu gdzie biegną wiązki przewodzące (g). Przekroje transgenicznych korzeni siewek *M. truncatula*, podłużny (h) i poprzeczny (i). Skala: 1,25 cm dla (a-c); 2,5 cm dla (b-g); 100 μm dla (h,i).

4.3.4 Określenie lokalizacji subkomórkowej białka MtABCG10

(Pomoc przy obsłudze mikroskopu konfokalnego dr Michalina Maruniewicz)

Ważnym elementem analizy funkcjonalnej badanego białka jest określenie jego subkomórkowej lokalizacji. Istnieje szereg eksperymentalnych strategii pozwalających ustalić umiejscowienie białka w określonym kompartmentie komórki. Należą do nich analizy biochemiczne, immunolokalizacja *in situ* czy wprowadzenie do komórki roślinnej na drodze transformacji konstruktów fuzyjnych badanego genu z genem reporterowym, najczęściej kodującym białko zielonej fluorescencji (GFP, ang. green fluorescent protein) lub jego pochodne. Dwie ostatnie metody wymagają zastosowania mikroskopii fluorescencyjnej i/lub konfokalnej dzięki czemu pozwalają na precyzyjne określenie rozmieszczenia białka.

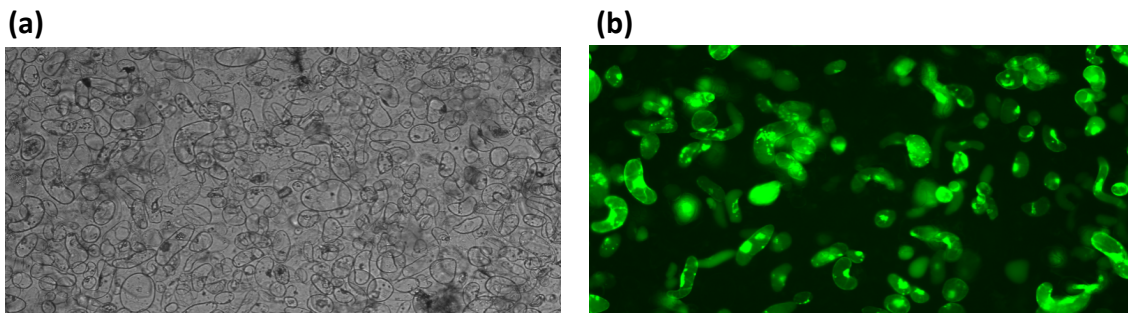
Technika immunolokalizacji wykorzystuje zdolność specyficznego wiązania się przeciwciał do antygenów. Wymaga utrwalenia tkanki/komórki, w celu zatrzymania procesu autolizy oraz zachowania oryginalnej morfologii. Usieciowanie komórki nie może być jednak zbyt silne gdyż mogłoby prowadzić do maskowania epitopów i być przyczyną niepowodzenia eksperymentu. Prawidłowe wykonanie doświadczenia zapewnia jednak uzyskanie obrazu natywnej lokalizacji makromolekuł (Frugier i Crespi 2006).

Wizualizacja białka fuzyjnego jest możliwa w żywej komórce, dzięki czemu unika się pracochłonnego etapu utrwalania. Niestety włączenie dodatkowego łańcucha polipeptydowego może powodować nieprawidłowe fałdowanie lub błędne odczytanie sekwencji kierującej, a w konsekwencji prowadzić do błędnej interpretacji wyników (Ehrhand 2003). Dlatego zaleca się w przypadku wszystkich metod przeprowadzania serii kontroli pozytywnych i negatywnych oraz stosowania dwóch lub więcej podejść jednocześnie. Ze względu na trudności z uzyskaniem konstruktów fuzyjnych *MtABCG10:GFP*, w celu określenia lokalizacji analizowanego białka zastosowano immunolokalizację *in situ* oraz analizę biochemiczną.

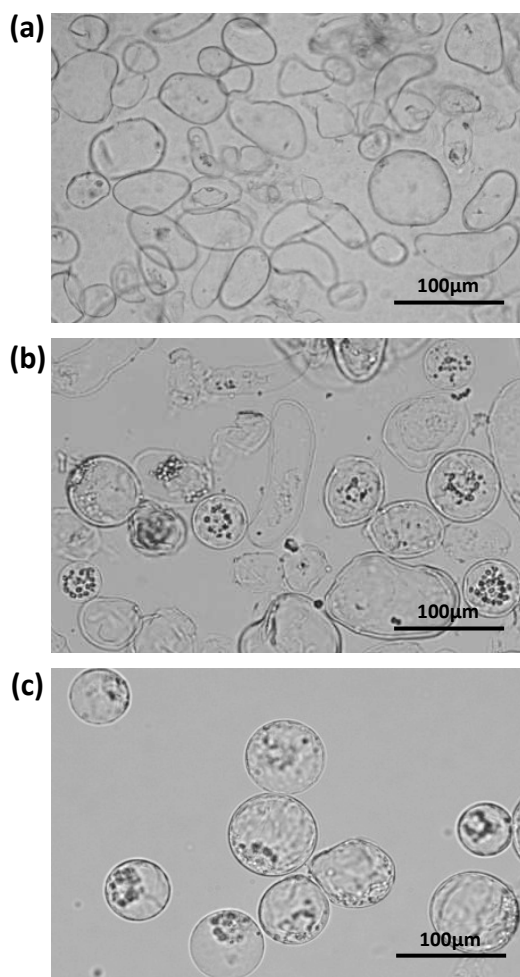
Do immunolokalizacji subkomórkowej *in situ* użyto liściowej hodowli zawieszinowej *M. truncatula* oraz protoplastów wyizolowanych z tej hodowli. Mimo, że większość prowadzonych badań skupiała się na określeniu roli MtABCG10 w korzeniach, zrezygnowano z hodowli komórkowej wyprowadzonej z tego organu.

Miała ona bowiem większą tendencję do tworzenia agregatów oraz była trudniejsza w utrzymaniu przy kolejnych pasażach.

Do izolacji protoplastów wykorzystano mieszaninę enzymów trawiących ścianę komórkową (celulaza, macerozym i drizelaza), zarówno jej skład jak i czas inkubacji dobrane zostały eksperymentalnie. Obserwowana niska wydajność stosowanej procedury, mimo prób jej optymalizacji, najprawdopodobniej wynikała z bardzo dużej liczby komórek martwych w wyjściowej hodowli. Ich żywotność w kulturze oznaczona została na podstawie barwienia dioctanem fluoresceiny (FDA). Odczynnik ten przenika przez błonę komórkową i w żywych komórkach jest hydrolizowany do fluoresceiny (Kvach i Veras 1982). W ten sposób przy wykorzystaniu mikroskopii fluorescencyjnej określono udział żywych, fluoryzujących na zielono komórek, który wynosił mniej niż 50% (**Rycina 4.23**). W celu pozbycia się, po trawieniu, szczątków uszkodzonych bądź niestrawionych komórek, niezbędne było zastosowanie oczyszczania protoplastów na pożywce zawierającej wysokie stężenie sacharozy. Na **Rycinie 4.24** przedstawiono obrazy komórek, pochodzące z kolejnych etapów izolacji protoplastów.



Rycina 4.23. Obraz spod mikroskopu fluorescencyjnego dwunastodniowej hodowli zawieszinowej *M. truncatula*, traktowanej dioctanem fluoresceiny (FDA): w świetle widzialnym (a), po wzbudzeniu światłem niebieskim, żywe komórki wykazują zieloną fluorescencję (b).



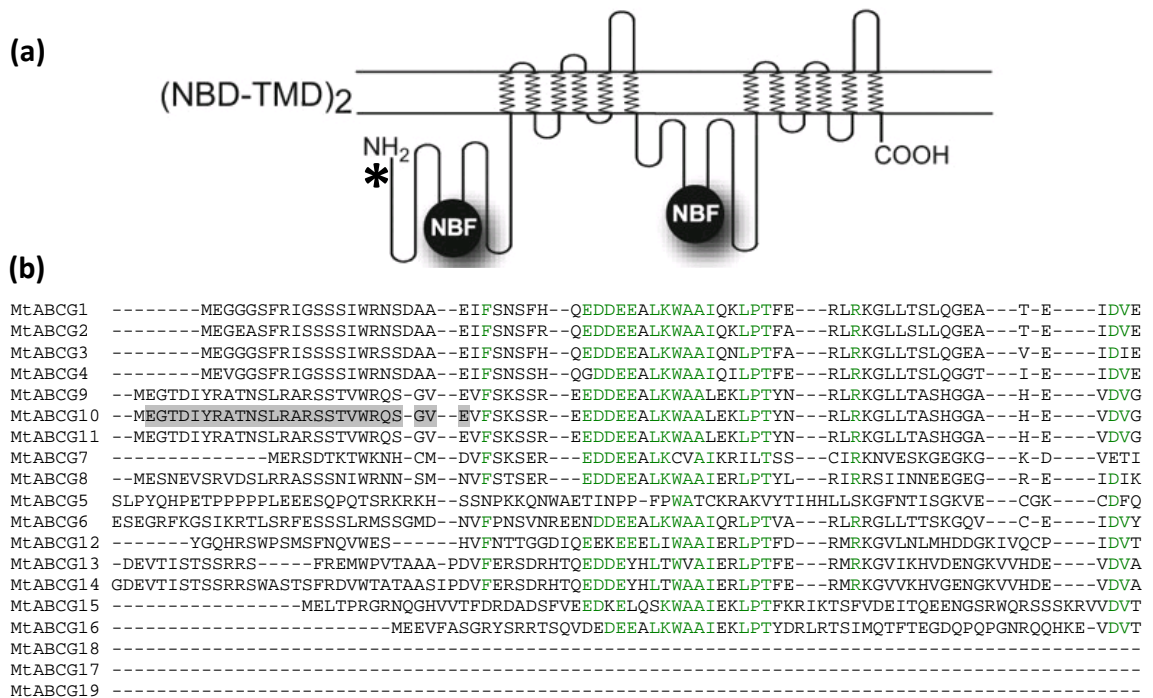
Rycina 4.24. Kolejne etapy izolacji protoplastów z dwunastodniowej hodowli zawiesinowej *M. truncatula*. Hodowla zawiesinowa przed trawieniem ścian komórkowych (a). Hodowla 24 h po trawieniu ścian komórkowych mieszaniną enzymów (b). Protoplasty oczyszczone przez wirowanie w pożywce zawierającej 16% sacharozy (c).

W przeprowadzanych eksperymentach immunolokalizacji wykorzystywano przeciwciała poliklonalne IgG anty-MtABCG10. Zostały one uzyskane na drodze immunizacji królika syntetycznym peptydem długości 26 AA, sprzężonym z adiuwantem KLH. Sekwencję peptydu dobrano tak aby zapewniała możliwie dużą specyficzność względem badanego białka (**Rycina 4.25**). Przeciwciała zostały dodatkowo oczyszczone metodą chromatografii powinowactwa z wykorzystaniem immunogenu jako liganda (przeciwciała wyprodukowane zostały przez firmę Eurogentec). W celu wstępnego określenia powinowactwa stosowanych przeciwciał do analizowanego białka oraz ich specyficzności, wykonano analizę Western blot. Uzyskano wyraźny sygnał na wysokości odpowiadającej wielkości pełnych białek ABCG (ok. 160 kDa) i bardzo niski poziom tła (**Rycina 4.26**).

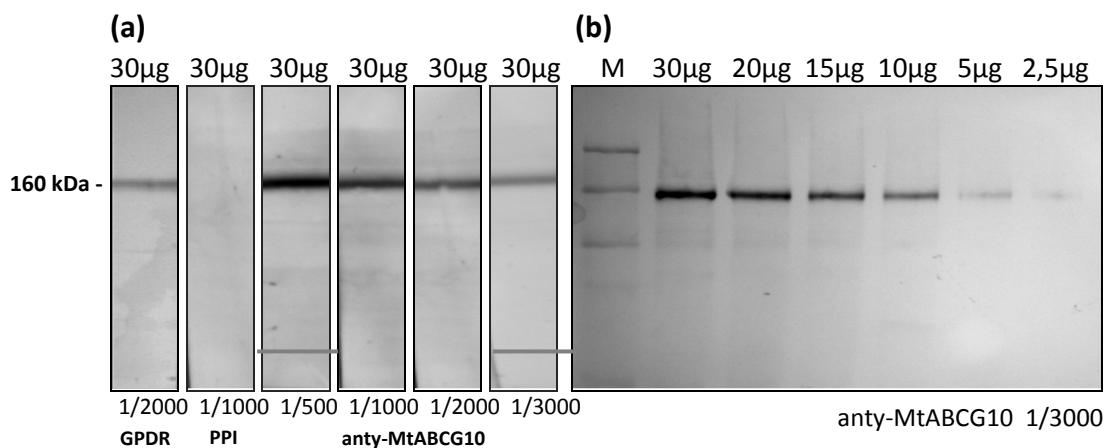
W celu detekcji użyto przeciwciał drugorzędowych anty-króliczych sprzężonych z barwnikiem fluorescencyjnym Alexa fluor 488 (Invitrogen), powszechnie stosowanym w eksperymentach immunolokalizacji. Jako kontrolę pozytywną wykorzystano przeciwciała rozpoznające białko H⁺-ATPazy, będące markerem błony komórkowej (Morsomme et al. 1998). Kontrolę negatywną stanowiła surowica pochodząca sprzed immunizacji (ang. *preimmune serum*). Wszystkie obserwacje prowadzono z użyciem skaningowego mikroskopu konfokalnego Nikon A1R-SI, wyposażonego w laser argonowy.

Immunolokalizacja, wykonana zarówno na komórkach liściowej hodowli zawiesinowej jak i protoplastach *M. truncatula*, wskazała na rozmieszczenie białka MtABCG10 w błonie komórkowej (**Rycina 4.27 a,e**). Przy tych samych parametrach (siła lasera, czas ekspozycji) kontrola negatywna, w której zastosowano surowicę sprzed immunizacji nie dała żadnego sygnału (**Rycina 4.27 b,f**). Co więcej uzyskany dla MtABCG10 obraz był analogiczny do tego obserwowanego dla przeciwciał anty-H⁺-ATPazy, rozpoznających marker błony komórkowej (**Rycina 4.27c**). Dzięki wykorzystaniu w eksperymencie protoplastów można było wykluczyć pochodzenie sygnału z mogącej wykazywać autofluorescencję ściany komórkowej (**Rycina 4.27e**). O tym, że białko MtABCG10 nie jest zlokalizowane w tonoplaście wnioskowano na podstawie obrazów uzyskanych po wybarwieniu komórek hodowli zawiesinowej czerwiecią neutralną (ang. *neutral red*). Jak pokazano, wykorzystane do eksperymentu komórki posiadają liczne drobne wakuole (**Rycina 4.27h**).

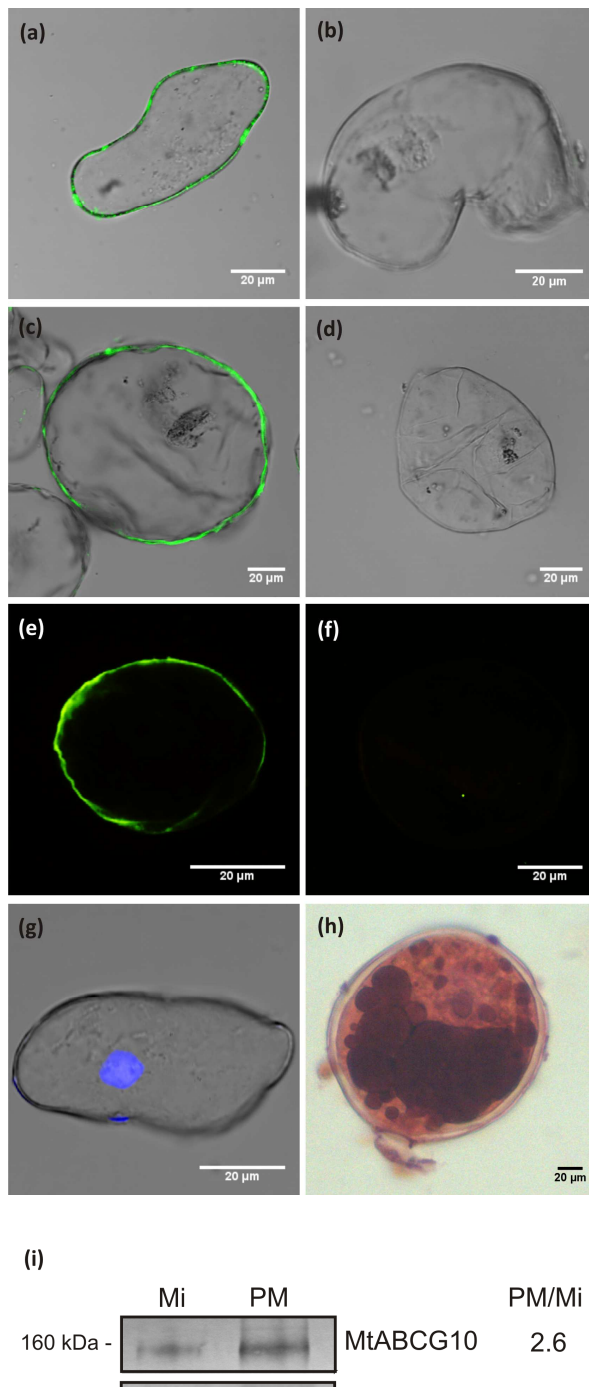
Drugie podejście, mające na celu określenia lokalizacji interesującego białka, polegało na porównaniu intensywności sygnału dla MtABCG10 pochodzącego z frakcji mikrosomalnej (Mi) (składającej się z heterogennych pęcherzyków, pochodzących z różnych błon) oraz oczyszczonej frakcji błony komórkowej/plazmolemy (PM). Frakcję błony komórkowej uzyskano stosując metodę rozdziału między dwie fazy (ang. *two phase partition-purification*), która wykorzystuje różnice we właściwościach powierzchniowych różnych błon. Podczas oczyszczania, pęcherzyki błon komórkowych lokują się w bardziej hydrofobowej, górnej warstwie zawierającej PEG natomiast błony wewnątrzkomórkowe w bardziej hydrofilowej, dolnej warstwie zawierającej dekstran, a także w interfazie (Larsson et al. 1987). Pokazano, że stosunek wartości sygnału PM/Mi dla MtABCG10 jest zbliżony do uzyskanego dla białka będącego markerem błon komórkowych H⁺-ATPazy (**Rycina 4.27i**). W ten sposób potwierdzono, że białko MtABCG10 zlokalizowane jest w błonie komórkowej, podobnie jak wszystkie do tej pory scharakteryzowane pełne białka ABCG (Alejandro 2012; Jasiński et al. 2001; Kang et al. 2010; Kim et al. 2007).



Rycina 4.25. Rejon białka MtABCG10 rozpoznawany przez przeciwciała anti-MtABCG10. Schemat przedstawiający pełny transporter ABCG z zaznaczonym (gwiazdką) miejscem rozpoznawanym przez przeciwciała anti-MtABCG10 (a); Zestawienie sekwencji AA pełnych białek MtABCG w rejonie obejmującym miejsce rozpoznawane przez przeciwciała anti-MtABCG10 (kolor szary) (b).



Rycina 4.26. Analiza Western blot dla frakcji mikrosomalnej, wyizolowanej z liściowej hodowli zawieszinowej, z wykorzystaniem oczyszczonych przeciwciał anti-MtABCG10. Dla takich samych ilości frakcji mikrosomalnej (30 µg) i różnych stężeń przeciwciał anti-MtABCG10 (a); dla różnych ilości frakcji mikrosomalnej przy danym stężeniu przeciwciał anti-MtABCG10 (1/3000) (b). GPDR – próba inkubowana z przeciwciałami anti-ABCG, rozpoznającymi wszystkie roślinne pełne białka ABCG; PPI surowica sprzed immunizacji.



Rycina 4.27. Białko MtABCG10 zlokalizowane w błonie komórkowej. Immunolokalizacja przeprowadzona na komórkach liściowej hodowli zawieszinowej *M. truncatula* z przeciwciałami drugorzędowymi sprzężonymi z fluoroforem Alexa Fluor 488 (a-d), oraz oczyszczonymi przeciwciałami pierwszorzędowymi anty-MtABCG10 (a), surowicą kontrolną (sprzed immunizacji) (b), przeciwciałami pierwszorzędowymi anty- H^+ -ATPaza (c), tylko przeciwciałami drugorzędowymi (d). Immunolokalizacja przeprowadzona na protoplastach wyizolowanych z komórek liściowej hodowli zawieszinowej *M. truncatula* z przeciwciałami drugorzędowymi sprzężonymi z fluoroforem Alexa Fluor 488 (e-f), oraz oczyszczonymi przeciwciałami pierwszorzędowymi anty-MtABCG10 (e), surowicą kontrolną (sprzed immunizacji) (f). Jądro komórkowe wybarwione DAPI (g), drobne wakuole wybarwione czerwienią neutralną (h).

Analiza Western blot dla frakcji mikrosomalnej (Mi) i frakcji błony komórkowej (PM) wyizolowanych z liściowej hodowli zawieszinowej *M. truncatula*, z przeciwciałami pierwszorzędowymi anty-MtABCG10 lub anty- H^+ -ATPaza i przeciwciałami drugorzędowymi sprzężonymi z alkaliczną fosfatazą. PM/Mi dla białka MtABCG10 jest zbliżony do uzyskanego dla markera błony komórkowej H^+ -ATPazy, wskazuje to na lokalizację MtABCG10 w plazmolemie.

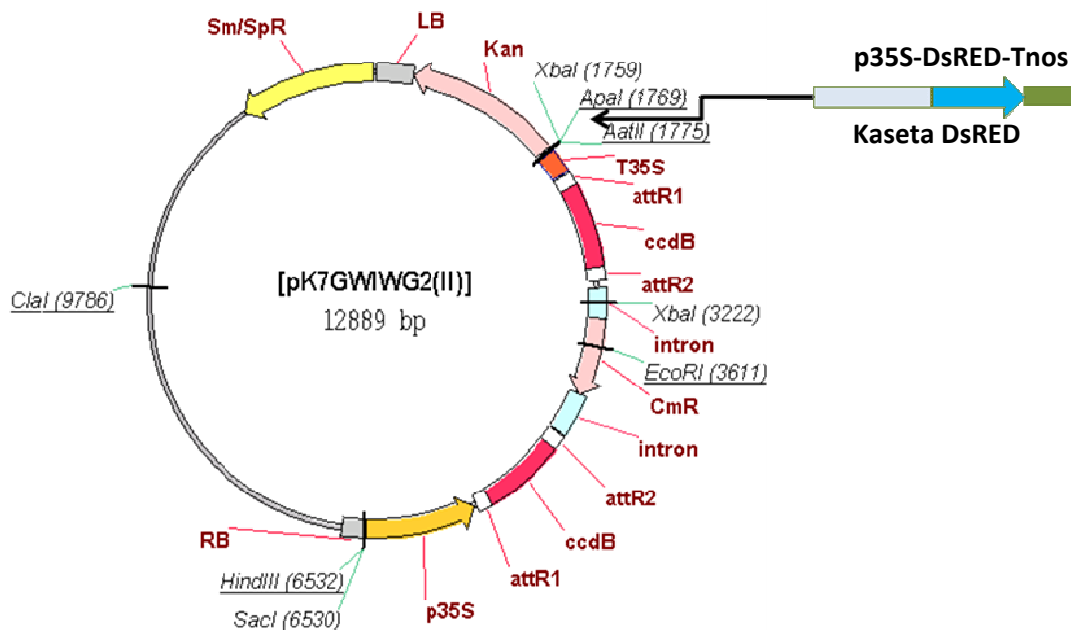
4.3.5 Wyciszenie ekspresji genu *MtABCG10* w korzeniach włosowatych *M. truncatula*

Jednym z podstawowych narzędzi stosowanych w analizie funkcjonalnej jest uzyskanie, a następnie badanie roślin z częściowo lub całkowicie wyłączonym interesującym nas genem. Obok mutagenyzy efekt ten można uzyskać wykorzystując zjawisko interferencji RNA (RNAi, *RNA interference*), prowadzące do wyciszenia ekspresji genów. Wszelkie obserwowane zmiany morfologiczne, anatomiczne, fizjologiczne czy biochemiczne mogą wskazywać na udział inaktywowanego genu w określonym procesie zachodzącym w roślinie.

W pierwszej kolejności przeprowadzono próbę identyfikacji mutantów *mtabcg10*. W tym celu przeszukano bazę danych mutantów insercyjnych Tnt1 *M. truncatula* <http://medicago-mutant.noble.org/mutant/>. Posłużono się dostępnym na stronie narzędziem BLAST, umożliwiającym porównanie sekwencji genomowej badanego genu z bazą tzw. sekwencji flankujących Tnt1 (FST, *ang. Flanking Sequence Tag*). Mimo, że w obrębie przeszukiwanej kolekcji udało się zidentyfikować mutanty dla 7 genów kodujących pełne białka MtABCG, żaden z nich nie odpowiadał *MtABCG10*. Dlatego ostatecznie zdecydowano się na wykorzystanie metody inaktywacji badanego genu przy udziale RNA.

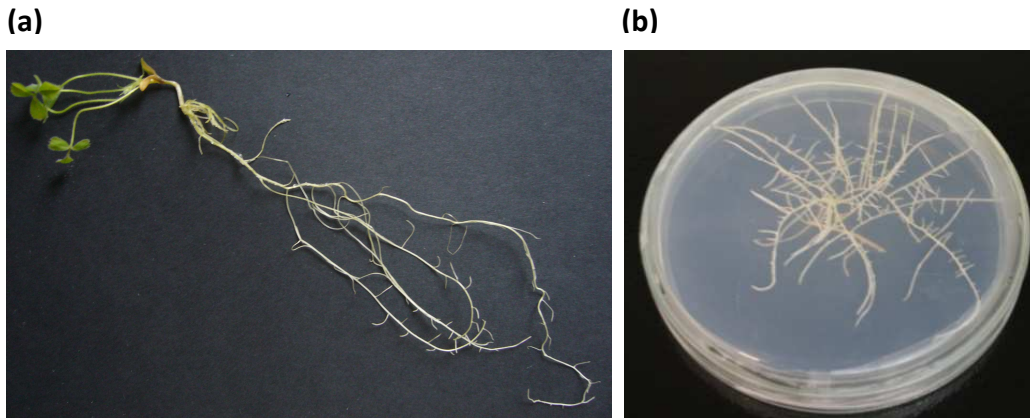
Na podstawie analizy sekwencji cDNA wszystkich genów *MtABCG* wyselekcjonowano rejon *MtABCG10* długości 139 pz, charakteryzujący się dużą specyficznością. Ze względu na wysoki stopień identyczności *MtABCG10* do dwóch bliskich homologów (*MtABCG9* i *MtABCG11*) nie udało się uniknąć nakładania ich sekwencji. Stąd efekt wyciszenia obejmował wszystkie trzy geny (**Rycina 4.28**). Następnie docelowa sekwencja została powielona na matrycy cDNA z użyciem starterów zawierających dodatkowo miejsca rekombinacji, które pozwalają na klonowanie w systemie Gateway. Otrzymany produkt PCR został oczyszczony i włączony w reakcji BP klonazy (Invitrogen) do wektora „wejściowego” (pDONR), w wyniku czego uzyskano tzw. „klon wejściowy” (*ang. entry clone*) (pENTR_RNAi10). Po izolacji plazmidowego DNA i jego weryfikacji przez sekwencjonowanie, wektor pENTR_RNAi10 użyto w reakcji LR klonazy (Invitrogen) w celu wprowadzenia sekwencji wyciszającej do wektora docelowego. Wybrano zmodyfikowany plazmid

pK7GWIWG2(II), zawierający dodatkową kasetę reporterową z genem kodującym białko fluorescencyjne DsRED, pod kontrolą promotora 35S (**Rycina 4.29**). Obecność kasety pozwala na łatwą identyfikację stransformowanego materiału. Stosowany wektor umożliwia włączenie sekwencji wyciszającej w dwóch kopiach w postaci odwróconych powtórzeń, rozdzielonych intronem. W wyniku ekspresji takiego konstruktów powstaje RNA, przyjmujący strukturę typu spinki do włosów. Jest on rozpoznawany przez komórkową maszynę wyciszającą, której uruchomienie prowadzi do degradacji interesującego nas transkryptu. Poprawność uzyskanego konstruktów, w tym określenie właściwej orientacji intronu, warunkującej wysoką wydajność, zostało potwierdzone przez sekwencjonowanie (Helliwell i Waterhouse 2003; Limpens et al. 2005).



Rycina 4.29. Wektor wyciszający (ekspresyjny) pK7GWIWG2(II) (Karimi et al. 2002), z zaznaczonym miejscem, do którego wprowadzono kasetę reporterową DsRED

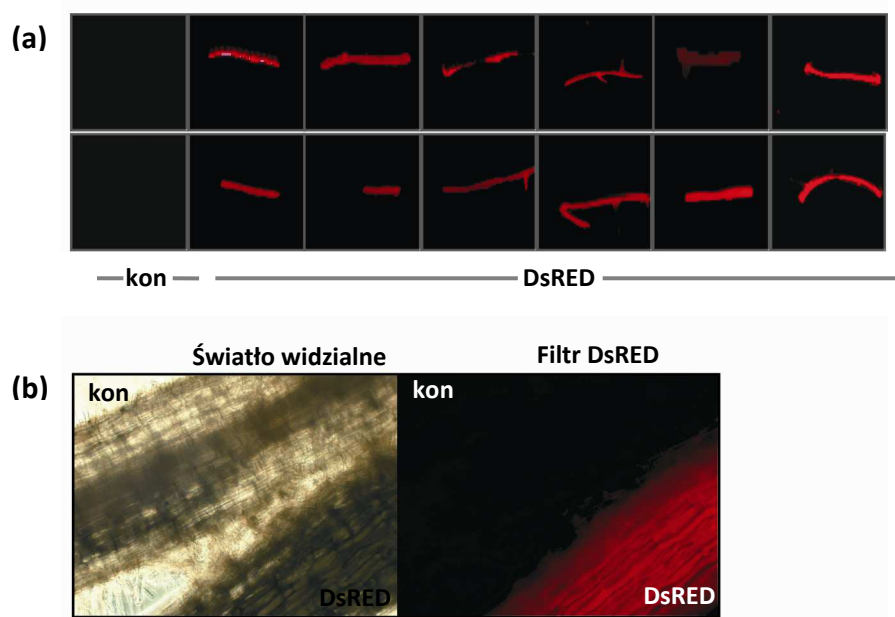
Odpowiednio przygotowany plazmid wprowadzono drogą elektroporacji do bakterii *A. rhizogenes* szczep Arqua1. Gatunek *A. rhizogenes* pozwala w krótkim czasie uzyskać tzw. rośliny złożone (ang. *composite plants*), które składają się z transgenicznych korzeni włosowatych oraz pędu typu dzikiego. Co ważne pokazano, że rośliny takie nadają się do badania funkcji genów u bobowatych. Mogą służyć zarówno do przeprowadzania testów brodawkowania, mikoryzy jak i infekcji grzybowych. Dlatego uznano je za dobrą alternatywę dla stałych transformantów (Anderson et al. 2010; Limpens et al. 2004; Mrosk et al. 2009). W swojej pracy stosowałam metodę transformacji zawiązków korzeni *M. truncatula* przy udziale *A. rhizogenes*. Oprócz roślin złożonych (**Rycina 4.30a**), które użyto do testów fenotypowych, dodatkowo wyprowadzono hodowle korzeni włosowatych (transgenicznych) (**Rycina 4.30b**), które posłużyły do wykonania analiz fitochemicznych.



Rycina 4.30. Roślina złożona *M. truncatula*, która rośnie na zmodyfikowanej pożywce Fahraeus, zawierającej antybiotyk selekcyjny kanamycynę, cztery tygodnie po transformacji (a). Przykładowa, trzytygodniowa hodowla korzeni włosowatych *M. truncatula*, wyprowadzona z fragmentu korzenia transgenicznego (b).

Obecność, w stosowanym do transformacji wektorze, kasety reporterowej DsRED pozwala na dodatkową obok oporności na kanamycynę selekcję korzeni transgenicznych, poprzez analizę uzyskanego materiału na skanerze materiałów znakowanych fluorescencyjnie lub przy zastosowaniu mikroskopu fluorescencyjnego (**Rycina 4.31**). Dzięki temu można pominąć czasochłonny etap potwierdzania obecności transgenu w genomie rośliny na poziomie DNA. Do dalszych analiz wykorzystywano wyłącznie materiał wykazujący fluorescencję DsRED.

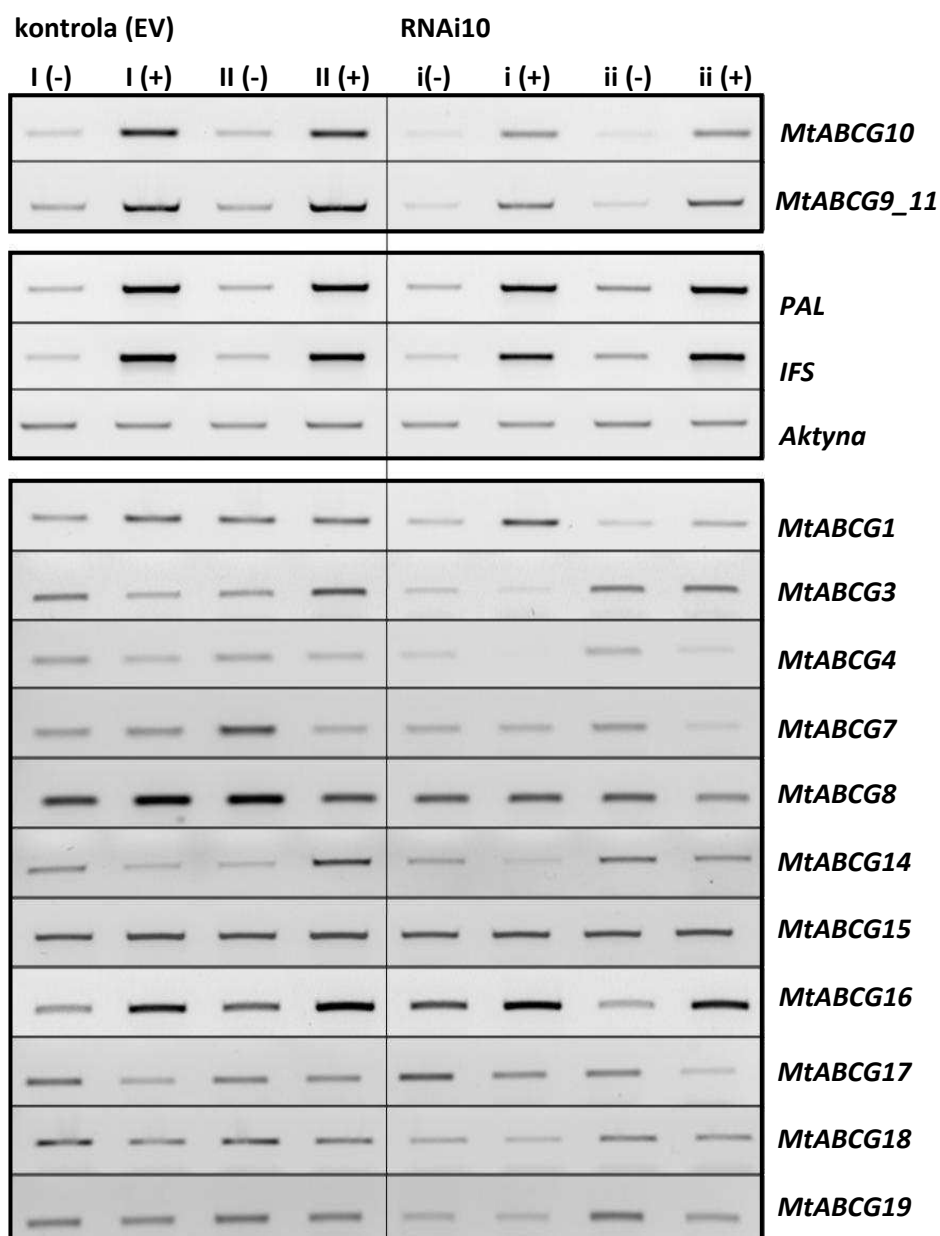
Stopień wyciszenia genu *MtABCG10* określono zarówno na poziomie transkryptu metodą RealTime PCR oraz na poziomie białka metodą Western blot. Kontrolę stanowiły korzenie uzyskane w wyniku transformacji pustym wektorem pK7GWIWG2(II):DsRED (EV, ang. *empty vector*). Zaobserwowano wyraźny spadek akumulacji zarówno transkryptu jak i białka *MtABCG10*, nie miało to jednak wpływu na widoczne cechy morfologiczne hodowli korzeni transgenicznych (**Rycina 4.32**).



Rycina 4.31. Obraz korzeni roślin typu dzikiego (kon) i transformowanych wektorem pK7GWIWG2(II):DsRED (DsRED) po skanowaniu na Fuji (a); spod mikroskopu fluorescencyjnego (b).

Porównano także poziom ekspresji wszystkich genów *MtABCG* w transgenicznym korzeniach uzyskanych w wyniku transformacji pustym wektorem (EV) lub wektorem wyciszającym (RNAi10). Zgodnie z założeniami obniżenie akumulacji transkryptu obserwowano tylko dla genu *MtABCG10* i jego dwóch najbliższych homologów (*MtABCG9* i *MtABCG11*). Konstruktor wyciszający nie wpływał na poziom ekspresji pozostałych genów kodujących białka ABCG Medicago.

Dodatkowo analizowany materiał potraktowano elicytorem grzybowym w celu sprawdzenia efektu jaki wywołuje jego aplikacja zarówno na gen *MtABCG10* oraz geny ze szlaku biosyntezy izoflawonoidów. Test ten stanowił punkt wyjścia do kolejnych eksperymentów opisanych w podrozdziale 4.3.6.1, a mianowicie określenia wpływu wyciszenia genu *MtABCG10* na poziom akumulacji (izo)flawonoidów, zarówno w warunkach kontrolnych jak i imitujących infekcję grzybową (**Rycina 4.33**).



Rycina 4.33. Analiza poziomu ekspresji, półilościową metodą RT-PCR, genów *MtABCG1-19*, *PAL*, *IFS* i β -*aktyny* w hodowli korzeni włosowatych *M. truncatula*: transformowanych pustym wektorem (EV) lub wektorem wyciszającym (RNAi10), kontrolnych (-) lub traktowanych elicytorem grzybowym (+).

4.3.6 Analizy fenotypowe

4.3.6.1 Porównanie profilu związków fenolowych pomiędzy kontrolą a materiałem z wyciszoną ekspresją *MtABCG10*

(Pomoc przy obsłudze chromatografu sprzężonego ze spektrometrem mas Anna Wojakowska)

Wysokosprawna chromatografia cieczowa sprzężona z spektrometrem mas (LC/MS) została wykorzystana do identyfikacji i monitorowania zmian profilu (izo)flawonoidów i ich koniugatów w ekstraktach korzeniowych *M. truncatula* oraz ich eksudatach. Materiał wyjściowy stanowiły hodowle korzeni transgenicznych kontrolnych (EV), jak i z wyciszoną ekspresją genu *MtABCG10* (RNAi10) (podrozdział 4.3.5). W związku z obserwowaną korelacją profilu ekspresji *MtABCG10*, *PAL* i *IFS* (podrozdział 4.3.2) po potraktowaniu elicytorem grzybowym, postanowiono dodatkowo przeanalizować wpływ wyciszenia *MtABCG10* na profil pochodnych flawonoidowych w warunkach indukcji szlaku biosyntezy izoflawonoidów.

Do wyprowadzenia hodowli korzeni włosowatych wybierano tylko te korzenie transgeniczne, które wykazywały najwyższy poziom fluorescencji DsRED. Uzyskane hodowle, 6 niezależnych linii EV i 6 niezależnych linii RNAi10, użyto następnie do klonalnej propagacji materiału oraz oceny stopnia wyciszenia na poziomie białka (podrozdział 4.3.5). Właściwe analizy metabolomiczne prowadzono z wykorzystaniem trzytygodniowych hodowli korzeni włosowatych, pochodzących z pierwszego pasażu. Materiał odpowiadający każdej linii dzielono na dwie równe części (po ok. 300 mg) i przenoszono do 5 ml płynnej pożywki (zmodyfikowana pożywka Fahraeus z witaminami Gamborga), aklimatyzowano 24 h w ciemności z wytrząsaniem (150 rpm), a następnie dodawano elicytora grzybowego bądź w przypadku kontroli wody. Podobna procedura powtarzana była trzykrotnie przy czym za pierwszym razem materiał zbierano po 6 (eksperyment I), a następnie kolejno po 24 (eksperyment II) i 72 h (eksperyment III) od elicytacji.

Ekstrakcję związków fenolowych z próbek stałych (korzeni) przeprowadzono z użyciem rozpuszczalnika (80% metanolu), wspomaganego ultradźwiękami. W przypadku cieczy (pożywek) wykorzystano metodę ekstrakcji do fazy stałej.

Otrzymane ekstrakty poddano rozdzielaniu chromatograficznemu w gradiencie acetonitryl/woda za pomocą chromatografu cieczowego AgilentRR 1200 sprzężonego ze spektrometrem mas model micrOTof-Q, zgodnie z parametrami podanymi w podrozdziale 3.9.3.

Do analizy otrzymanych chromatografów wykorzystano program DataAnalysis 4.0 firmy Bruker Daltonics. Związki zidentyfikowano na podstawie wartości m/z protonowych cząsteczek $[M+H]^+$ rejestrowanych z dokładnością do czwartego miejsca po przecinku, a także widm masowych, danych literaturowych oraz czasów retencji standardów dostępnych dla części związków (**Tabela 4.4**).

Tabela 4.4. Masy i czasy retencji analizowanych związków

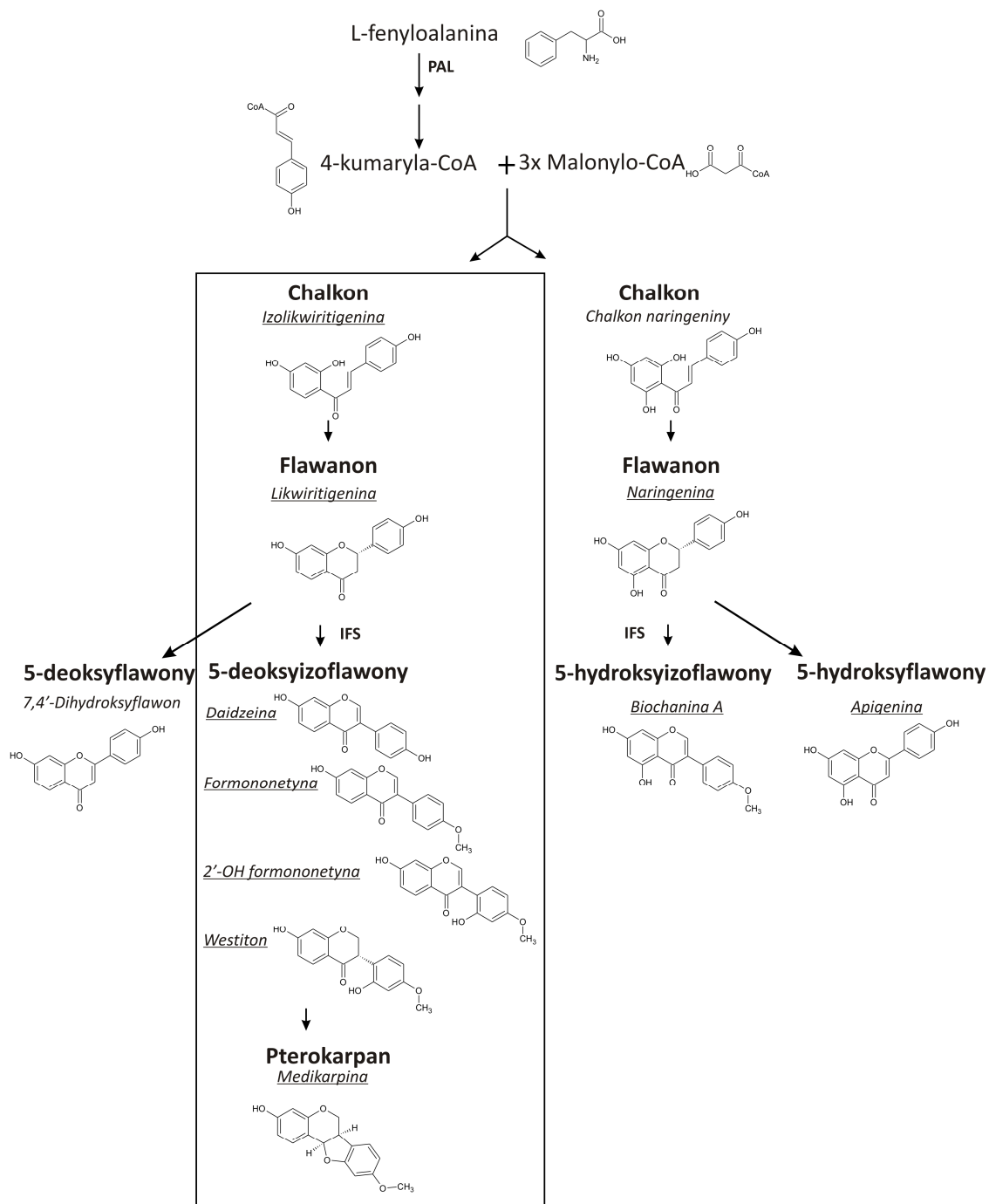
związek	m/z $[M+H]^+$	czas retencji (min) eksperyment I	czas retencji (min) eksperyment II i III
wolne aglikony flawonoidowe			
izolikwiritigenina ^{a,b}	257,0808	8,8	9,8
likwiritigenina ^{a,b}	257,0808	6,2	6,8
daidzeina ^{a,b}	255,0652	6,2	6,8
formononetyna ^{a,b}	269,0808	9,3	10,8
2'OHformononetyna ^{a,b}	285,0757	7,8	8,8
westiton ^{a,b}	287,0914	7,5	8,3
naringenina ^{a,b}	273,0757	7,4	8,8
bioczanina A ^{a,b}	285,0757	14,2	14,8
apigenina ^{a,b}	271,0601	7,5	8,3
luteolina ^{a,b}	287,0538	6,6	7,2
glikozydy flawonoidowe			
afrormozyna MalGlc ^a	547,1446	7,3	7,7
formononetyna Glc ^a	431,1337	6,0	6,5
formononetyna MalGlc ^a	517,1341	7,0	7,5
medikarpina MalGlc ^a	519,1497	7,8	8,6

Glc – reszta glukozy ; Mal – reszta kwasu malonylowego

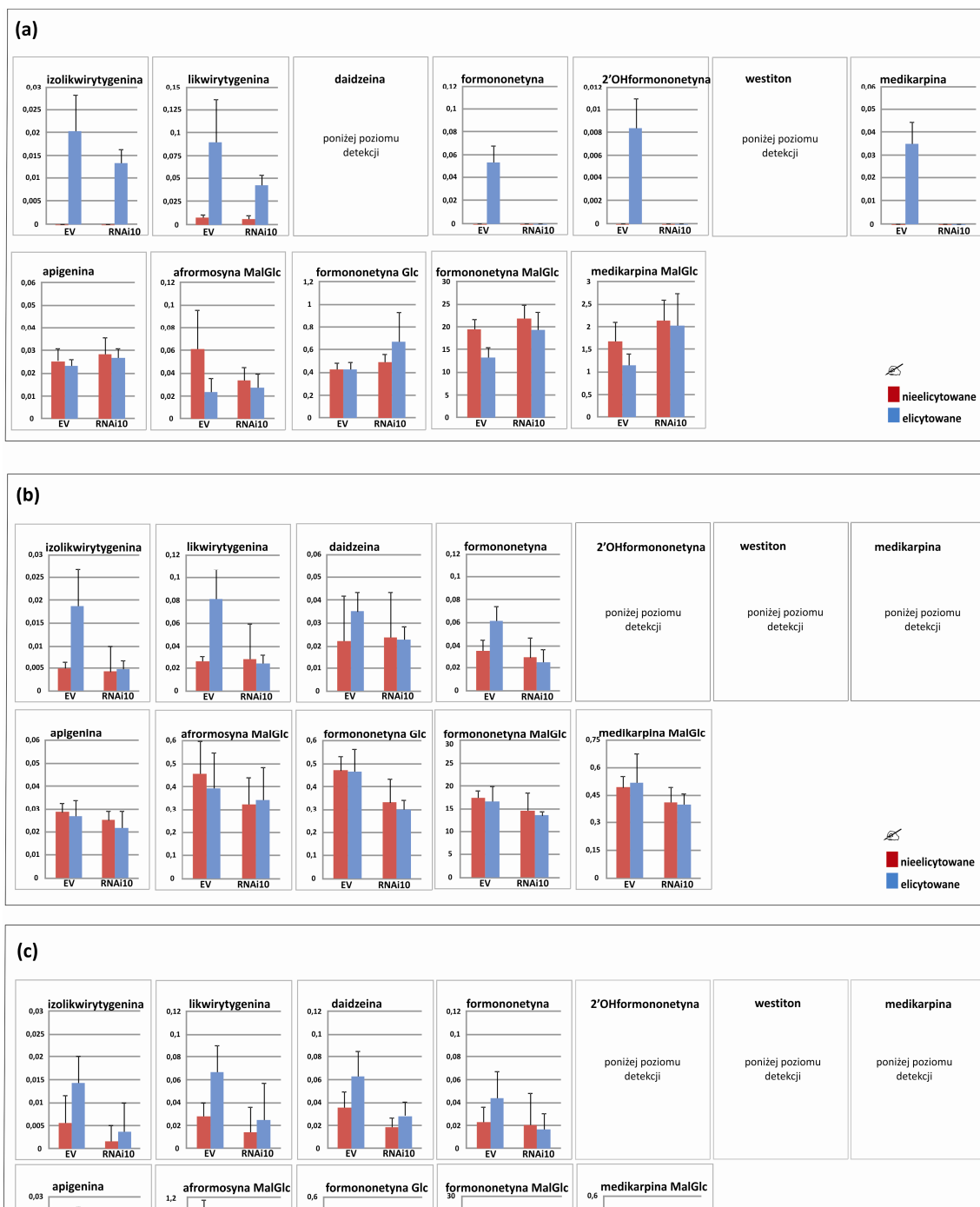
a - związki zidentyfikowany na podstawie kompozycji elementarnej $[M+H]^+$ oraz danych literaturowych

b – tożsamość potwierdzone na bazie czasów retencji standardów

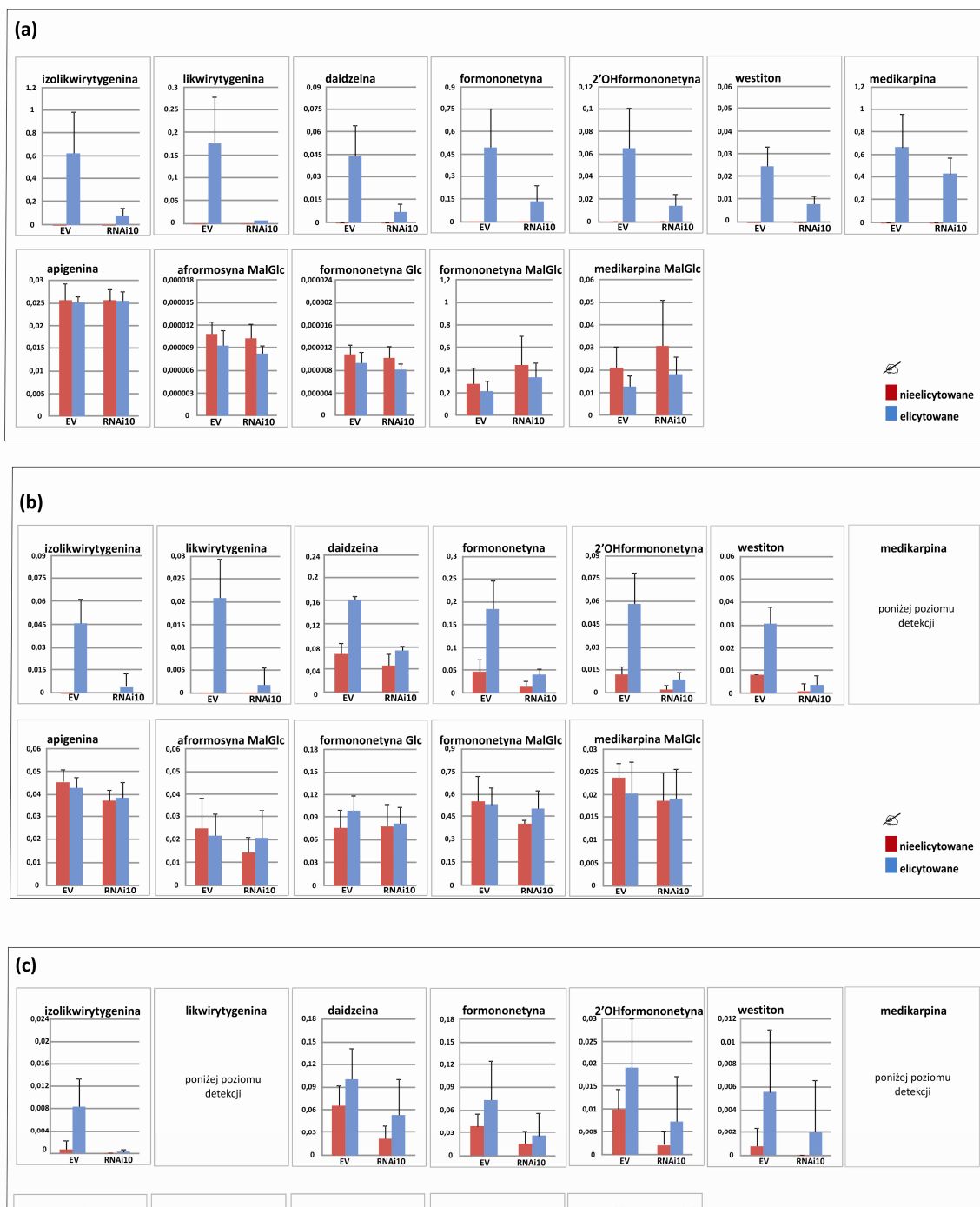
Przeprowadzona analiza LC/MS wykazała, że wolne aglikony takie jak izolikwiritigenina, a także jej pochodne: likwiritigenina, 5-deoksyizoflawony (daidzeina, formononetyna, 2'OHformononetyna, westiton) oraz pterokarpan medikarpina wyraźnie różnicują próby elicytowane i nieelicytowane. Podobną zależność, a mianowicie wyższy poziom akumulacji w materiale elicytowanym obserwowano dla naringeniny i 5-hydroksyizoflawonu biochaniny A, choć efekt ten był mniej widoczny. Co ciekawe ilości wszystkich wyżej wymienionych aglikonów były niższe w przypadku ekstraktów pochodzących z prób z wyciszoną ekspresją *MtABCG10* (RNAi10) w porównaniu z kontrolą (EV) (**Rycina 4.34, Rycina 4.35, Rycina 4.36**). Najbardziej znaczące różnice widoczne były dla eksudatów korzeniowych po potraktowaniu elicytorem grzybowym. Zawartość glikozylowanych form badanych związków, m.in. glukozydu formononetyny, malonylowanego glukozydu formononetyny czy malonylowanego glukozydu medikarpiny, a także flawonu apigeniny, nie ulegała istotnym zmianom, ani pod wpływem elicytacji, ani w wyniku wyciszenia genu *MtABCG10* (**Rycina 4.35, Rycina 4.36**). Wynik ten może sugerować udział białka *MtABCG10* w modulacji poziomu (izo)flawonoidów podczas reakcji obronnych, związanych z biosyntezą de novo fitoaleksyny medikarpiny.



Rycina 4.34. Uproszczony schemat szlaku biosyntezy izo(flawonoidów) *M. truncatula* z uwzględnieniem wzorów strukturalnych wybranych związków. W ramce zamieszczono aglikony, które wyraźnie różnicowały próby elicytowane i nieelicytowane oraz materiał pochodzący z roślin kontrolnych i z wyciszoną ekspresją *MtABCG10*. Dodatkowo podkreślono związki, których poziom monitorowano podczas przeprowadzanych analiz metabolomicznych.

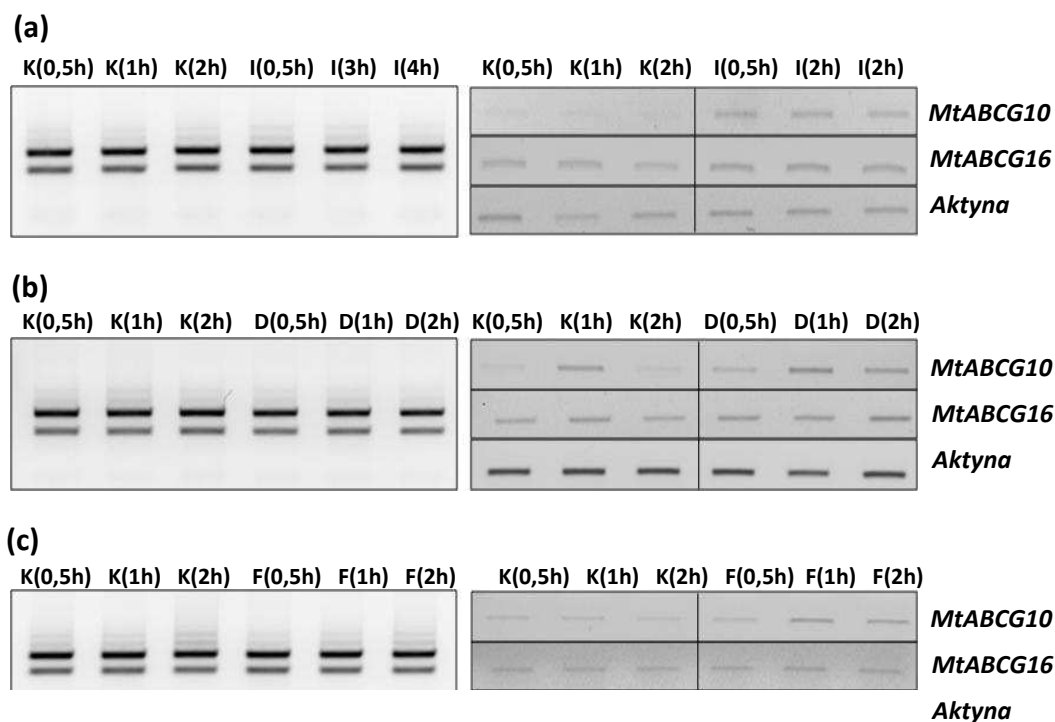


Rycina 4.35. Uśredniony względny poziom wybranych izo(flawonoidów) i koniugatów izoflawonoidów w hodowli korzeni włosowatych *M. truncatula*, dla linii kontrolnych (EV) i linii z wyciszoną ekspresją *MtABC10* (RNAi10). Ilość danego metabolitu w mierzonej próbce określano zliczając pole powierzchni pod zidentyfikowanym pikiem, a ostatecznie przedstawiano jako uśrednione dla 6 niezależnych linii wartości względne w odniesieniu do standardu wewnętrznego (luteoliny). Niebieskie słupki odpowiadają materiałowi traktowanemu oligosacharydami wyizolowanymi ze ściany komórkowej *P. medicaginis*, czerwone słupki odpowiadają materiałowi nietraktowanemu. Analiza przeprowadzona była na materiale zbieranym 6 h (a); 24 h (b); 72 h (c) po elicytacji.



Rycina 4.36. Uśredniony względny poziom wybranych izo(flawonoidów) i koniugatów izoflawonoidów w eksudatach korzeniowych *M. truncatula*, dla linii kontrolnych (EV) i linii z wyciszoną ekspresją *MtABCG10* (RNAi10). Ilość danego metabolitu w mierzonej próbce określano zliczając pole powierzchni pod zidentyfikowanym pikiem, a ostatecznie przedstawiano jako uśrednione dla 6 niezależnych linii wartości względne w odniesieniu do standardu wewnętrznego (luteoliny). Niebieskie słupki odpowiadają materiałowi traktowanemu oligosacharydami wyizolowanymi ze ściany komórkowej *P. medicaginis*, czerwone słupki odpowiadają materiałowi nietraktowanemu. Analiza przeprowadzona była na materiale zbieranym 6 h (a); 24 h (b); 72 h (c) po elicytacji.

Postanowiono także sprawdzić, czy wybrane związki (izolikwiritigenina, formononetyna i daidzeina), których poziom zmienia się w wyniku wyciszenia genu *MtABCG10* mogą indukować jego ekspresję (**Rycina 4.37**). Wiadomo bowiem, iż substancje transportowane przez białka ABCG (np. sklareolide) wpływają na akumulację ich transkryptów (np. NpABC1) (Jasinski et al. 2001). Stwierdzono, iż wszystkie trzy testowane substancje przyczyniają się do wzrostu akumulacji transkryptu *MtABCG10*, przy czym najsilniejszy efekt obserwowano dla izolikwiritigeniny. Wydaje się, że indukcja ta ma charakter specyficzny. Świadczyć o tym może fakt, iż np. profil ekspresji *MtABCG16* nie zmienia po aplikacji analizowanych związków (**Rycina 4.37**), mimo że patogeny i elicytor grzybowy wpływają podobnie na ekspresję obu genów (**Rycina 4.8, 4.9 i 4.33**).



Rycina 4.37. Analiza zmian poziomu ekspresji genów *MtABCG10* i *MtABCG16* w korzeniach siewek *M. truncatula* pod wpływem izolikwiritigeniny (100µM) (a), daidzeiny (100µM) (b), formononetyny (100µM) (c), w różnym czasie po potraktowaniu. Z lewej strony zamieszczono żele agarozowe przedstawiające analizę jakościową RNA, z prawej wynik półilościowej reakcji RT-PCR. Kontrolę wewnętrzną stanowiła β -aktyna. K-kontrola, I-izolikwiritigenina, D-daidzeina, F-formononetyny.

4.3.6.2 Porównanie podatności roślin kontrolnych i z wyciszoną ekspresją genu *MtABCG10* na infekcje grzybowe

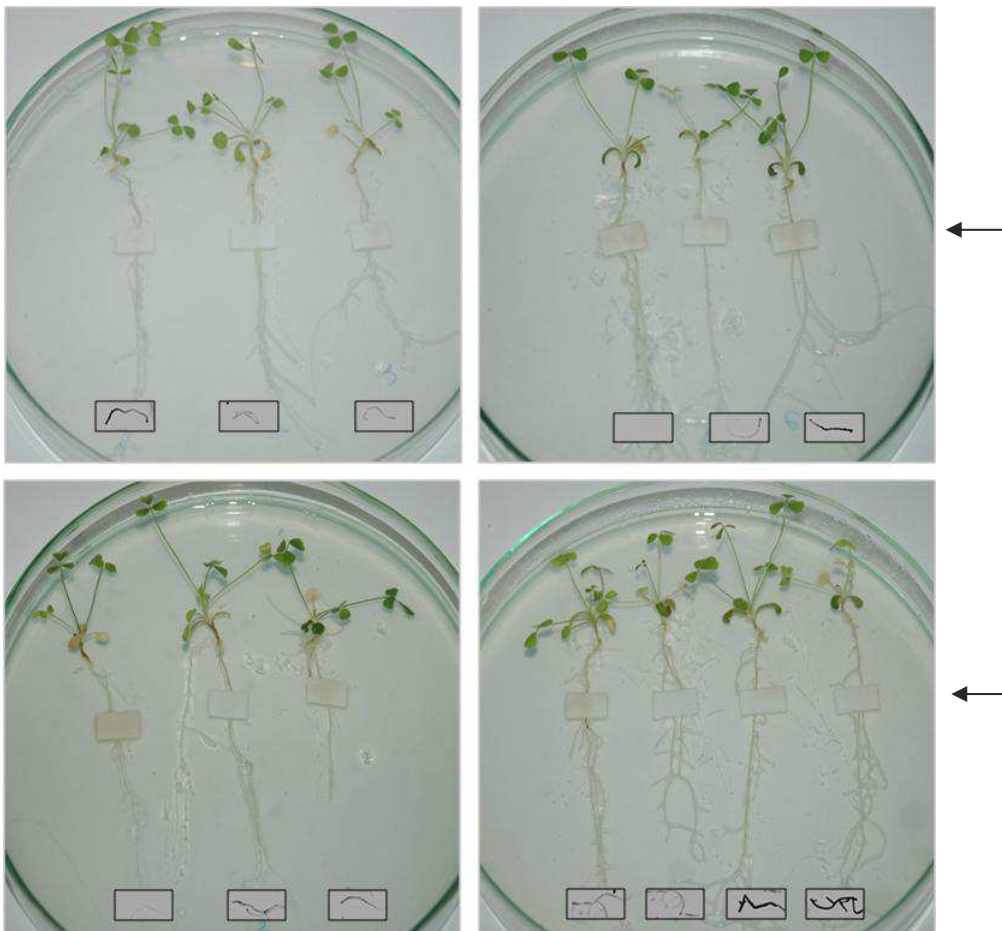
(Współpraca z Instytutem Genetyki Roślin PAN w Poznaniu)

Bazując na wynikach uzyskanych w poprzednich etapach pracy, zadano pytanie, czy wyciszenie ekspresji genu *MtABCG10* może wpłynąć na wzrost podatności *Medicago* na infekcje grzybowe. W tym celu przeprowadzono wstępne testy z wykorzystaniem roślin złożonych, posiadających transgeniczne korzenie oraz grzyba patogennego *F. oxysporum* f.sp. *medicaginis*. Wcześniej pokazano, że rośliny złożone mogą być z powodzeniem wykorzystywane do analizy funkcjonalnej genów *Medicago*, zaangażowanych w odpowiedź obronną (Anderson et al. 2010). Co więcej potwierdzono także rolę izoflawonoidów, jako związków hamujących rozwój grzybów z rodzaju *Fusarium* (Lozovaya et al. 2004).

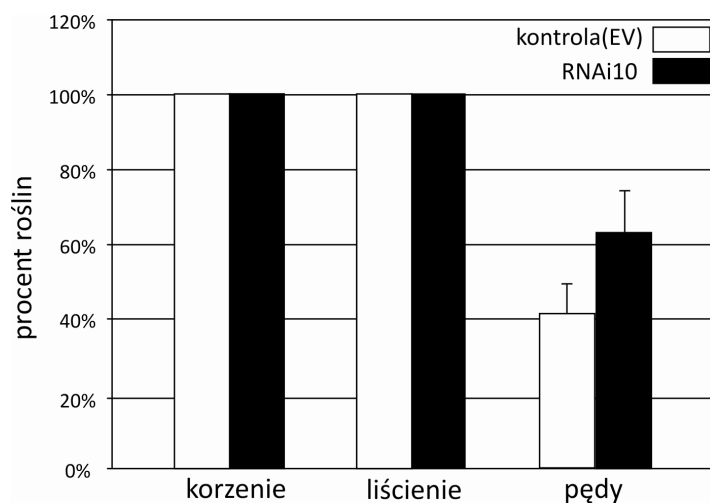
Ponieważ promotor genu *MtABCG10* aktywny jest głównie w komórkach otaczających wiązki przewodzące, w eksperymentach zdecydowano się na wykorzystanie *F. oxysporum*, wywołującego choroby naczyniowe. Jest to grzyb glebowy, infekujący wiele gatunków roślin. Rozwija się w wiązkach przewodzących, prowadząc do ich zamykania i w konsekwencji więdnienie części naziemnych (Ramirez-Suero i Khashour 2010). Zarodniki tego grzyba mogą także wraz z prądem wody przemieszczać się w górę rośliny (Beckman 1987).

Rośliny złożone zarówno kontrolne, jak i z wyciszoną ekspresją genu *MtABCG10* hodowano na szklach ze zmodyfikowaną pożywką Fahraeus. Korzenie traktowano punktowo zawiesiną zarodników i obserwowano przez dziesięć dni, do czasu pojawienia się pierwszych objawów choroby (ciemnych przebarwień na korzeniach oraz chlorozy liścieni). Nie stwierdzono wyraźnych różnic pomiędzy roślinami kontrolnymi i wyciszonymi (**Rycina 4.38**). Dlatego też dodatkowo postanowiono monitorować postępy infekcji na poziomie molekularnym, poprzez analizę poziomu grzybowego DNA w korzeniach, liścieniach i pędach *Medicago*. W tym celu wyizolowano genomowe DNA z poszczególnych organów. Oznaczono jego stężenie, a następnie taką samą ilość (40 ng) użyto jako matrycy w reakcji PCR. Wykorzystano startery specyficznie rozpoznające grzybowy DNA (gen *Fo β -tubuliny*). Detekcję produktów reakcji PCR, po 30 cyklach, prowadzono w żelu agarazowym.

W danych warunkach eksperymentu obecność grzybowego DNA (pojawienie się prążka) stwierdzono w korzeniach i liścieniach 100% analizowanych roślin, zarówno kontrolnych, jak i wyciszonych. W przypadku pędów rozkład ten wynosił odpowiednio 40% i 60%. Wynik ten wskazuje, iż dysfunkcja genu *MtABCG10* może wpływać na tempo rozprzestrzenianie się grzyba w roślinie.



Rycina 4.38. Rośliny złożone *M. truncatula*, kontrolne (EV) (powyżej) i z wyciszoną ekspresją genu *MtABCG10* (RNAi10) (poniżej) 10 dni po inokulacji zawiesiną zarodników *F. oxysporum* (stężenie $1,3 \times 10^6$; 100 μ l na korzeń). Strzałką zaznaczono rejon korzenia traktowany zarodnikami. W ramkach zamieszczono fragmenty korzeni, skanowane na obecność białka reporterowego DsRED.



Rycina 4.39. Detekcja grzybowego DNA za pomocą PCR, w różnych organach *M. truncatula* kontrolnych (n=18) (białe słupki) i z wyciszoną ekspresją *MtABCG10* (n=18) (czarne słupki). Materiał analizowano 10 dni po infekcji roślin zawieszoną zarodników *F. oxysporum*.

5. DYSKUSJA

Poznanie sekwencji kilku genomów eukariontów ujawniło znacząco wyższy udział genów kodujących białka ABC u roślin (> 120), w porównaniu z innymi organizmami wielokomórkowymi (~50) (Jasiński et al. 2003; Sugiyama et al. 2006; Verrier et al. 2008). Pomimo ważnej roli jaką odgrywają transportery ABC w królestwie roślin, wiedza na ich temat jest wciąż bardzo ograniczona i w głównej mierze opiera się na badaniach prowadzonych z wykorzystaniem *A. thaliana*. Zebrane dotychczas dane wskazują na to, że białka te są zaangażowane m. in. w reakcje obronne.

Coraz większą uwagę badaczy wzbudza także potencjalna rola transporterów ABC w symbiozie. Ponieważ *Arabidopsis* nie nawiązuje interakcji z mikroorganizmami symbiotycznymi, istotnym wydaje się być rozszerzenie naszej wiedzy o tej grupie białek wykraczające poza wspomniany wyżej model badawczy. Stąd nasze zainteresowanie białkami ABC u modelowej rośliny bobowatej *M. truncatula*. W pracy tej skupiono się na jednej z podrodzin ABC, obejmującej pełne transportery ABCG, które odgrywają ważną rolę w odpowiedzi rośliny na działanie czynników biotycznych (Campbell et al. 2003; Kobae et al. 2006; Stein et al. 2006; Stukkens et al. 2005).

Przeprowadzone poszukiwania *in silico* pozwoliły zidentyfikować w genomie *Medicago* 19 genów kodujących pełne białka MtABCG. Liczba ta jest wyższa, porównując z *Arabidopsis* (15) i zbliżona do uzyskanej dla ryżu (23) (Cruzet et al. 2006). W momencie przystąpienia do analizy genomu *Medicago* poznany był na poziomie 60% pokrycia sekwencji kodującej, stąd wysoce prawdopodobne wydaje się, że liczba MtABCG przekracza 19. Świadczyć o tym może obecność sekwencji (TC102516) z adnotacją PDR (ABCG) z *Medicago*, znajdującej się w bazach danych EST-ów (ang. *Expression Sequenced Tag*) bez odpowiednika w dostępnej sekwencji genomowej (wersja 2.0). Produkt genu TC102516, ze względu na brak informacji o jego pełnej długości, nie został włączony do zamieszczonego w niniejszej pracy drzewa filogenetycznego, ani nie podlegał dalszej charakterystyce. Wiadomo jednak, że na poziomie sekwencji cDNA wykazuje 82% identyczności z MtABCG10. Co więcej, ponowne przeszukanie genomu *Medicago* (Mt 3.5, 2011), obejmującego 95% sekwencji kodującej, ujawniło obecność dodatkowych 4 sekwencji, odpowiadających

genom pełnych białek ABCG (GenBank: XM_003603407; XM_003625729; XM_003625366; XM_003608391) (Young et al. 2011).

Podobną identyfikację genów ABC u innej modelowej rośliny bobowatej *L. japonicus* (70% pokrycia genomu) przeprowadzili Sugiyama i współpracownicy. Wśród 91 genów kodujących transportery ABC tylko 12 przydzielono do podrodziny pełnych ABCG. Zaskakująco niska liczba *LjABCG* mogła wynikać z zastosowanej przez grupę metodologii. Identyfikacja i klasyfikacja opierała się bowiem tylko na analizie obecności domen (NBD i TMD) nie zaś identyfikacji pełnych sekwencji (Sugiyama et al. 2006). Wydaje się, że przy takim podejściu mogło dojść do uznania bliskich paralogów za pojedynczy gen. Niewykluczone, że obserwowany w przypadku *Medicago* wysoki poziom identyczności ABCG powyżej 90% może mieć także miejsce u *Lotus* i utrudnić rozróżnienie poszczególnych genów.

Na podstawie przewidzianej *in silico* sekwencji aminokwasowej pełnych transporterów ABCG *M. truncatula* (MtABCG) skonstruowano drzewo filogenetyczne, do którego włączono także opisane dotychczas pełne białka ABCG rzodkiewnika, ryżu, soi i tytoniu. Uzyskany dendrogram uwidoczniał pewne zależności między analizowanymi sekwencjami. Pozwolił m.in. na przyporządkowanie białkom MtABCG, najbliższych para- i ortologów. Dodatkowo drzewo filogenetyczne pozwoliło zaobserwować gatunkowo specyficzne grupowanie pełnych białek ABCG (Rycina 4.1). Ciekawa sytuacja ma miejsce w przypadku najlepiej scharakteryzowanego pod względem funkcjonalnym klastra I, który grupuje zaangażowane w oddziaływania biotyczne białka ABCG z różnych roślin (Rycina 1.5 i 4.1). W klastrze tym na jednego przedstawiciela *Arabidopsis* (AtABCG40/AtPDR12) przypada 11 z *Medicago*, jeden *GmPDR12* (*GmABCG1*) z soi i 5 spośród 12 ABCG *L. japonicus* (Sugiyama et al. 2006). Tak wysoka reprezentacja w tym klastrze transporterów ABCG z roślin bobowatych może sugerować ich ważną rolę w gatunkowo specyficznych oddziaływaniach symbiotycznych bądź w reakcjach obronnych. Pojawienie się dodatkowych kopii genów, pozwala bowiem na gromadzenie w nich mutacji i z czasem przejście nowych funkcji, które mogą być istotne z punktu widzenia określonego gatunku, np. adaptacji do zmian środowiskowych. W przypadku *Medicago*, wspomniane wyżej transportery tworzą wyraźne trzy grupy (MtABCG1-6), (MtABCG7/8), (MtABCG9-11). Wysoki stopień podobieństwa między nimi, ma swoje odbicie w strukturze genów je kodujących oraz

ich lokalizacji w genomie (Rycina 4.2 i 4.3). Pozwala to przypuszczać, że powstały one na drodze duplikacji tandemowej, będącej znanym mechanizmem prowadzącym do ewolucji rodzin wielogenowych (Cannon et al. 2003). U *M. truncatula* poziom takich lokalnych duplikacji jest 3,1 razy wyższy niż u *G. max* i 1,6 razy wyższy w porównaniu z *A. thaliana* (Young et al. 2011). Niedawno, na podstawie szczegółowych analiz dostępnych sekwencji genomowych *Medicago*, zaobserwowano, że wysoki stopień rekombinacji u tej rośliny, ma miejsce szczególnie tam, gdzie występują skupiska genów należących do rodzin wielogenowych. Co ciekawe, jest to widoczne zwłaszcza w przypadku genów, których produkty ekspresji biorą udział w reakcjach obronnych czy modulacji oddziaływań biotycznych (Paape et al. 2012).

W celu weryfikacji postawionej hipotezy o udziale pełnych białek ABCG *Medicago* w oddziaływaniach biotycznych, przeprowadzono ich wstępną charakterystykę. W pierwszej kolejności określono metodą RT-PCR, jak wygląda profil ekspresji genów je kodujących w różnych organach *Medicago*. Obok *MtABCG*, których transkrypty zlokalizowano we wszystkich częściach rośliny, wyróżnić można było takie, które cechuje organospecyficzny wzór ekspresji. Aktywność transkrypcyjną największej liczby genów *MtABCG* stwierdzono w korzeniach. Podobną zależność obserwowano identyfikując białka ABCG metodą Western blot (Rycina 4.5). Obecność tak wielu pełnych transporterów ABCG w korzeniach *Medicago* wydaje się być uzasadniona dużym znaczeniem aktywnych systemów transportu w tym organie. Ryzosfera jest bowiem miejscem szczególnie intensywnej interakcji rośliny z innymi organizmami, gdzie ważną rolę odgrywa sekrecja różnego typu związków o charakterze obronnym bądź sygnałnym. Tu także ma miejsce intensywne pobieranie makro i mikroelementów. Wcześniej pokazano, że delekcja genów kodujących białka ABCG *Arabidopsis* prowadzi do zmiany kompozycji eksudatów korzeniowych (Badri et al. 2008, Badri et al. 2012). Postuluje się, że u soi za transport genisteiny, która indukuje syntezę bakteryjnego czynnika NOD, odpowiada także białko należące do podrodziny pełnych ABCG (Sugiyama et al. 2007). Co więcej jedno z białek ABCG z tytoniu (*NtPDR3*) bierze udział w utrzymywaniu homeostazy żelaza. Sugeruje się, że jego funkcja polega na bezpośrednim pobieraniu tego pierwiastka z ryzosfery bądź uwalnianiu jego chelatorów, przez co przyczynia się do zwiększenia puli żelaza dostępnego dla rośliny w glebie (Ducos et al. 2005).

O ile większość genów *MtABCG* ulega ekspresji na najwyższym poziomie w korzeniach, to transkrypt *MtABCG19*, obecny jest przede wszystkim w częściach naziemnych (Rycina 4.5). Homologi *MtABCG19* tj., *AtABCG32* z *Arabidopsis* i *HvABCG31* z jęczmienia są niezbędne w procesie formowania funkcjonalnej kutikuli, chroniącej przed nadmierną utratą wody (Bessire et al. 2011; Chen et al. 2011).

Kolejnym ciekawym przykładem jest *MtABCG13*, którego ekspresja zachodzi wyłącznie w kwiatach (Rycina 4.5). Jego najbliższe homologi *NpPDR2* z tytoniu i *AtPDR11/AtABCG39* z *Arabidopsis* także są aktywne transkrypcyjnie w tym organie. Pierwszy z nich w szyjce słupka, natomiast drugi w zalążni. Badacze sugerują, iż pełne ABCG w kwiecie mogą brać udział w transporcie lotnych metabolitów wtórnych bądź cząstek sygnałnych (Trombik et al. 2008; Zimmermann et al. 2004). Dodatkowo mRNA *NpPDR2* i *AtPDR11/AtABCG39* obecne były w korzeniu, co nie ma miejsca w przypadku *MtABCG13*. Warto jednak dodać, że najbliższy paralog *MtABCG13* tj. *MtABCG14* (91% identyczności na poziomie aminokwasowym) ulega specyficznej ekspresji w korzeniu (Rycina 4.5). Można więc przypuszczać, że u *Medicago* doszło np. do rozdzielenia pełnionej funkcji w różnych częściach rośliny pomiędzy te dwa geny.

Spośród 19 genów *MtABCG* dla pięciu nie udało się otrzymać produktów RT-PCR w żadnym z analizowanych organów (Rycina 4.5). Najprawdopodobniej nie ulegają one ekspresji w danych warunkach eksperymentu. Niewykluczone także, że są to pseudogeny, powstałe na drodze duplikacji tandemowej. Wszystkie bowiem wchodzą w skład grup genów charakteryzujących się wysokim stopniem identyczności, rozmieszczonych w genomie jeden za drugim (Rycina 4.3). Założenie to wsparte jest brakiem odpowiadających im EST-ów w dostępnych bazach danych.

Aby uzyskać więcej informacji, pozwalających na wyłonienie genów *MtABCG* zaangażowanych w oddziaływania biotyczne, przeprowadzono analizę zmian poziomu ich ekspresji podczas infekcji *Medicago* grzybami patogennymi, zarówno w korzeniach, jak i częściach naziemnych. Wybrano grzyby nekrotroficzne, odpowiednio *F. culmorum* i *P. medicaginis*, które wywołują choroby roślin bobowatych. Zarodniki obu gatunków powodowały wzrost aktywności transkrypcyjnej dwóch genów ABCG *Medicago* (*MtABCG10* i *MtABCG16*) (Rycina 4.8 i 4.9). Co więcej zauważono, iż ich ekspresja w liściach dodatkowo regulowana jest przez światło (Rycina 4.9). Podobną zależność, czyli fluktuacje poziomu akumulacji mRNA w ciągu dnia i indukcję ekspresji po

potraktowaniu patogenami odnotowano dla *AtPDR12* (Campbell et al. 2003). Warto zaznaczyć, że ekspresja przynajmniej części genów zaangażowanych w odpowiedź obronną zmienia się w cyklu dobowym. Może być to związane m.in. z przystosowaniem się rośliny do wzmożonej ochrony przed infekcjami grzybowymi w okresie sprzyjającym kiełkowaniu zarodników (Wang et al. 2011). Dodatkowo inokulacja korzeni *Medicago* bakterią symbiotyczną *S. meliloti* skutkowała nieznacznym wzrostem poziomu mRNA *MtABCG10* (Rycina 4.10). Obserwowana indukcja może mieć charakter niespecyficznego i być związana z uruchomieniem słabych reakcji obronnych, wywołanych obecnością mikroorganizmu symbiotycznego (Jones et al. 2008).

W dalszej części pracy postanowiono bliżej przyjrzeć się białku *MtABCG10*, którego homologii z innych roślin, takie jak *AtPDR12*, *NpABC1*, *SpTUR2*, *NtPDR1*, czy *GmPDR12* odgrywają ważną rolę w odpowiedzi rośliny na stresy środowiskowe (Eichhorn et al. 2006; Jasiński et al. 2001; Sasabe et al. 2002; Smart i Fleming 1996). W tym celu przeprowadzono jego analizę funkcjonalną, wykorzystując m.in. metody genetyki odwrotnej.

Wykazano, że poziom mRNA *MtABCG10* wzrasta pod wpływem oligosacharydów wyizolowanych ze ścian komórkowych grzyba *P. medicaginis*. Indukcja ekspresji obserwowana jest już po godzinie od elicytacji i ma charakter krótkotrwały (Rycina 4.17). W podobny sposób działają różnego typu elicytory (PAMPsy) na transkrypt *NtPDR1*, który jest bliskim homologiem *MtABCG10* u tytoniu (Sasabe et al. 2002). W odróżnieniu od *NtPDR1* i innych opisanych wcześniej genów kodujących transportery ABCG (e.g., *GmPDR12* and *SpTUR2*) (Eichhorn et al. 2006; Smart i Fleming 1996), *MtABCG10* nie reaguje wzrostem akumulacji mRNA po potraktowaniu MeJA, czy innymi hormonami stresowymi, jak SA i ABA (Rycina 4.17 i 4.19).

Co ciekawe, w obrębie promotora *MtABCG10* (1500 pz) stwierdzono obecność dużej liczby (57) elementów regulatorowych W-box, rozpoznawanych przez czynniki transkrypcyjne WRKY. Wiadomo, że PAMPsy za pośrednictwem kaskady sygnałowej kinaz MAP, aktywują czynniki transkrypcyjne WRKY (Eulgem i Somssich 2007). Te z kolei wiążą się do elementów regulatorowych cis, takich jak W-box, które często znajdują się w promotorach genów, biorących udział w ochronie rośliny przed patogenami (Yamamoto et al. 2004). Można więc przypuszczać, iż najprawdopodobniej

MtABCG10 należy do grupy genów obronnych, których ekspresja zależna jest od szlaku PAMP/MAPK/WRKY.

Jak już wcześniej wspomniano jedną z proponowanych funkcji pełnych białek ABCG jest transport metabolitów wtórnych (Badri et al. 2012). Wykazano, że część z transportowanych w ten sposób związków, może odgrywać ważną rolę zarówno w konstytutywnej, jak i indukowanej odpowiedzi obronnej. Przypisuje się im bezpośrednie działanie antybakteryjne i antygrzybicze. Coraz więcej uwagi poświęca się także zrozumieniu ich roli w procesach sygnałnych powiązanych z odpowiedzią obronną (Bednarek et al. 2009, Bednarek et al. 2012). Rośliny syntetyzują i akumulują olbrzymią liczbę tych strukturalnie niejednorodnych związków niskocząsteczkowych. Prekursorami do ich biosyntezy są w większości przypadków aminokwasy, a także inne końcowe bądź pośrednie produkty metabolizmu podstawowego. Występowanie poszczególnych metabolitów wtórnych jest zwykle ograniczone do jednej grupy filogenetycznej, a nawet pojedynczego gatunku. Często są one syntetyzowane w określonych organach lub tkankach, na danym etapie rozwoju rośliny lub w danych warunkach środowiska (Bednarek et al. 2009). Unikalną grupę metabolitów wtórnych, występujących niemal wyłącznie u bobowatych stanowią izoflawonoidy, powstające w szlaku fenylopropanoidowym (Du et al. 2010). W roślinie izoflawonoidy mogą występować w dwóch formach, jako wolne aglikony oraz ich glikozylowane koniugaty. Uważa się, że wolne aglikony stanowią formę aktywną biologicznie, w takiej postaci są także uwalniane przez roślinę do środowiska. Natomiast izoflawonoidy w postaci glikozydów są składowane w wakuoli i stanowią pulę dostępnych prekursorów, które w określonych warunkach mogą być mobilizowane i przekształcane do aktywnego produktu końcowego (Veitch 2007).

Do izoflawonoidów należy m.in. główna fitoaleksyna *Medicago*, medikarpina. Stwierdzono, że jej poziom wzrasta zarówno podczas infekcji grzybowych, jak i w obecności PAMPsów czy MeJA (Farang et al. 2008; Jasiński et al. 2009; Naoumkina et al. 2007). Przy czym percepcja PAMPsów prowadzi do jej biosyntezy *de novo*, poprzez indukcję ekspresji genów kodujących enzymy z wczesnych etapów szlaku biosyntezy izoflawonoidów (m.in. *PAL*, *IFS*). Natomiast MeJA odpowiada za remobilizację zmagazynowanych w wakuoli glikozylowanych prekursorów, zużywanych w końcowej fazie syntezy medikarpiny (Farang et al. 2008; Naoumkina et al. 2007).

Przedstawione w niniejszej pracy wyniki pozwalają sądzić, iż białko MtABCG10 jest zaangażowane w modulację poziomu (izo)flawonoidów, syntetyzowanych *de novo* w odpowiedzi na atak patogenów. Stwierdzono, że *MtABCG10* ulega w korzeniach *Medicago* koekspresji z genami *PAL* i *IFS* po potraktowaniu oligosacharydami ze ścian komórkowych grzyba (reprezentującymi PAMPsy). Poziom transkryptu *MtABCG10* nie zmienia się natomiast po wpływie MeJA. Eksperymenty immunolokalizacji wykluczyły obecność białka MtABCG10 w tonoplaście, wskazując na jego rozmieszczenie w błonie komórkowej. Co istotne, analizy metabolomiczne przeprowadzone z wykorzystaniem hodowli korzeni transgenicznych wykazały, że wyciszenie ekspresji *MtABCG10* skutkuje obniżeniem akumulacji aglikonów izoflawonów, szczególnie tych pochodzących z odgałęzienia 5'-deoksy (daidzeina, formononetyna, westiton) oraz ich prekursorów (izolikwiritigenina, likwiritigenina) (Rycina 4.34). W przypadku części roślin bobowatych (np. *Medicago sp.* i *Glycine sp.*) odgałęzienie 5'-deoksy prowadzi do biosyntezy fitoaleksyn i wydaje się być kluczowe w nadawaniu roślinie odporności na choroby (Graham et al. 2007; Kamphuis et al. 2012). Jednocześnie wyciszenie *MtABCG10* nie miało wpływu na ilość zmagazynowanych w wakuoli form glikozylowanych (Rycina 4.35 i 4.36). Aplikacja elicytora grzybowego skutkowała wzrostem akumulacji dokładnie tych samych związków, które różnicowały materiał kontrolny i wyciszony.

Wciąż bez odpowiedzi pozostaje pytanie, w jaki sposób MtABCG10 wpływa na modulację poziomu aglikonów izoflawonów. Początkowo zakładano, że białko to może być zaangażowane w sekrecję metabolitów wtórnych, podobnie jak jego najbliższy homolog NpABC1 z tytoniu (Jasiński et al. 2001). Funkcja ta wydaje się jednak mało prawdopodobna, zważywszy, że wyciszenie ekspresji *MtABCG10* skutkuje obniżeniem akumulacji izoflawonów i ich prekursorów zarówno w korzeniach, jak i w eksudatach korzeniowych (Rycina 4.35 i 4.36). Dodatkowo, promotor *MtABCG10* jest aktywny w komórkach otaczających wiązki przewodzące, nie zaś w ryzodermie (Rycina 4.22). Niewykluczone, że potencjalnymi substratami MtABCG10 są izolikwiritigenina, czy likwiritigenina, będące prekursorami w biosyntezie 5'-deoksyizoflawonów. Oba związki wyraźnie indukują ekspresję *MtABCG10* (Rycina 4.37). Wcześniej pokazano, że substraty białek ABCG (np. sklareolide) wpływają na wzrost poziomu transkryptów swoich transporterów (np. NpABC1) (Jasinski et al. 2001). Jednym ze sposobów weryfikacji powyższego założenia może być przeprowadzenie w przyszłości

eksperymentów transportu, które z powodzeniem realizowane były w przypadku innych białek ABCG. Wśród możliwych podejść eksperymentalnych wymienić należy badanie transportu przy udziale interesującego nas białka, którego gen ulega ekspresji w układach heterologicznych (drożdżowym, komórek HeLa), czy wykorzystując materiał z inaktywowanym genem *MtABCG10*. Pierwsza strategia wymaga sklonowania sekwencji cDNA pełnej długości. Jak dotąd, mimo wielu prób, nie udało się tego zrealizować w przypadku *MtABCG10*. Jednym z proponowanych rozwiązań byłoby uzyskanie konstruktów hybrydowych, składających się z sekwencji cDNA, zawierającej kilka intronów (Bessire et al. 2011). Pokazano bowiem, że taki układ umożliwia powielenie w bakteriach pełnej sekwencji kodującej transportery ABCG. Główną zaletą systemu heterologicznego jest brak bliskich homologów interesującego nas białka w wykorzystywanym organizmie, a także nieobecność potencjalnej cząstki transportowanej, której źródło jest wyłącznie egzogenne. W przypadku drugiego sposobu głównym ograniczeniem jest potrzeba posiadania mutantu utraty funkcji, ewentualnie materiału z wyciszoną ekspresją badanego genu. W obu opisanych powyżej eksperymentach transportu, monitorowanie wpływu badanej cząsteczki prowadzić można wykorzystując znakowany radioaktywnie potencjalny substrat lub stosując metody chromatograficzne, sprzężone ze spektrometrią mas (Alejandro et al. 2012; Jasinski et al. 2001; Kang et al. 2010; Kim et al. 2007; Kretzschmar et al. 2012; Ruzicka et al. 2010).

Przemieszczanie się w roślinie związków fenolowych, w szczególności flawonoidów i izoflawonoidów jest wciąż tematem wielu debat. Jak dotąd zaproponowano kilka mechanizmów transportu tych związków. Uważa się, że w obrębie komórki są one najprawdopodobniej transportowane za pośrednictwem systemu pęcherzykowego, bądź przy udziale zlokalizowanych w błonach białek MATE (ang. multidrug and toxic extrusion compounds) lub ABC. Transport w roślinie na dalekie odległości oraz ich sekrecja do środowiska są jeszcze słabiej poznane (Goodman et al. 2004; Hassan i Mathesius 2012; Zhao i Dixon 2010). Zrozumienie roli, jaką *MtABCG10* pełni w zmianach poziomu izoflawonów w roślinie, może uzupełnić tę poważną lukę w naszej wiedzy.

Warte rozważenia jest zaproponowanie, jako związku transportowanego przez *MtABCG10*, cząstki sygnałnej, regulującej biosyntezę izoflawonoidów. W materiale

kontrolnym, jak i z wyciszoną ekspresją *MtABCG10* nie zaobserwowano różnic w akumulacji mRNA *PAL* i *IFS* (Rycina 4.33). Świadczyć to może o tym, że proponowana cząstka sygnałna, najprawdopodobniej nie wpływa na kluczowe enzymy ze szlaku biosyntezy izoflawonoidów, przynajmniej na poziomie transkryptu. Tkankowy wzór ekspresji *MtABCG10*, zobrażony za pośrednictwem systemu reporterowego GUS oraz lokalizacja białka *MtABCG10* w błonie komórkowej mogą sugerować, że jest ono odpowiedzialne za translokację owej cząstki wiązkami przewodzącymi.

Biorąc pod uwagę plejotropowość funkcji, oraz niespecyficzną substratową, często obserwowaną w przypadku pełnych białek ABCG (e.g. *AtABCG36/AtPDR8*, Kim et al. 2007; Stein et al. 2006; Strader i Bartel 2009), nie można także wykluczyć, że *MtABCG10* bierze udział w transporcie kilku różnych związków.

Bez względu na to, w jaki sposób *MtABCG10* wpływa na zmianę poziomu izo(flawonoidów), konsekwencją jego dysfunkcji jest wzrost wrażliwości *Medicago* na infekcję wywołaną grzybem *F. oxysporum*. Uzyskany wynik nie pozwala jednoznacznie określić, czy *MtABCG10* bierze udział w reakcjach obronnych o charakterze specyficznym, czy też niespecyficznym. Odpowiedź na to pytanie wymagałaby przeprowadzenia szeregu testów wykorzystujących różne typy patogenów (przystosowanych, nieprzystosowanych, wirulentnych, awirulentnych). Indukcja ekspresji *MtABCG10* przez PAMPsy sugeruje udział białka *MtABCG10* w podstawowej odpowiedzi obronnej. Jak dotąd aktywność pełnych białek ABCG wiązano z odpornością typu non-host (Krattinger et al. 2009; Stein et al. 2006). Jest to najbardziej powszechna i trwała forma odporności, która chroni roślinę przed szerokim spektrum mikroorganizmów chorobotwórczych. Pomimo, że odgrywa ona istotną rolę w długoterminowej ochronie roślin przed wieloma chorobami, wciąż niewiele wiadomo na temat jej molekularnego podłoża (Jaulneau et al. 2010; Lipka et al. 2008). Poznanie funkcji *MtABCG10* mogłoby przyczynić się do pełniejszego zrozumienia tego typu odporności.

6. LITERATURA

Abele R, Tampe R (2004) The ABCs of immunology: structure and function of TAP, the transporter associated with antigen processing. *Physiology (Bethesda)* 19: 216-224

Aittoniemi J, Fotinou C, Craig TJ, de Wet H, Proks P, Ashcroft FM (2009) Review. SUR1: a unique ATP-binding cassette protein that functions as an ion channel regulator. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 364: 257-267

Alejandro S, Lee Y, Tohge T, Sudre D, Osorio S, Park J, Bovet L, Geldner N, Fernie AR, Martinoia E (2012) AtABCG29 is a monolignol transporter involved in lignin biosynthesis. *Curr Biol* 22: 1207-1212

Andersen DS, Leever SJ (2007) The essential *Drosophila* ATP-binding cassette domain protein, pixie, binds the 40 S ribosome in an ATP-dependent manner and is required for translation initiation. *J Biol Chem* 282: 14752-14760

Anderson JP, Lichtenzweig J, Gleason C, Oliver RP, Singh KB (2010) The B-3 ethylene response factor MtERF1-1 mediates resistance to a subset of root pathogens in *Medicago truncatula* without adversely affecting symbiosis with rhizobia. *Plant Physiol* 154: 861-873

Ayliffe M, Devilla R, Mago R, White R, Talbot M, Pryor A, Leung H (2011) Nonhost resistance of rice to rust pathogens. *Mol Plant Microbe Interact* 24: 1143-1155

Badri DV, Chaparro JM, Manter DK, Martinoia E, Vivanco JM (2012) Influence of ATP-Binding Cassette Transporters in Root Exudation of Phytoalexins, Signals, and in Disease Resistance. *Front Plant Sci* 3: 149

Beckman CH (1987) The nature of wilt diseases of plants. Minnesota: APS Press.

Bednarek P (2012) Chemical warfare or modulators of defence responses - the function of secondary metabolites in plant immunity. *Curr Opin Plant Biol* 4: 407-14

Bednarek P, Osbourn A (2009) Plant-microbe interactions: chemical diversity in plant defense. *Science* 324: 746-748

Bell CJ, Dixon RA, Farmer AD, Flores R, Inman J, Gonzales RA, Harrison MJ, Paiva NL, Scott AD, Weller JW, May GD (2001) The *Medicago* Genome Initiative: a model legume database. *Nucleic Acids Res* 29: 114-117

Bessire M, Borel S, Fabre G, Carraca L, Efremova N, Yephremov A, Cao Y, Jetter R, Jacquat AC, Metraux JP, Nawrath C (2011) A member of the PLEIOTROPIC DRUG RESISTANCE family of ATP binding cassette transporters is required for the formation of a functional cuticle in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 23: 1958-1970

Bienert MD, Siegmund SE, Drozak A, Trombik T, Bultreys A, Baldwin IT, Boutry M (2012) A Pleiotropic Drug Resistance transporter in *Nicotiana tabacum* is involved in defense against the herbivore *Manduca sexta*. *Plant J*

- Blattner FR, Plunkett G, 3rd, Bloch CA, Perna NT, Burland V, Riley M, Collado-Vides J, Glasner JD, Rode CK, Mayhew GF, Gregor J, Davis NW, Kirkpatrick HA, Goeden MA, Rose DJ, Mau B, Shao Y** (1997) The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* 277: 1453-1462
- Boller T, He SY** (2009) Innate immunity in plants: an arms race between pattern recognition receptors in plants and effectors in microbial pathogens. *Science* 324: 742-744
- Bultreys A, Trombik T, Drozak A, Boutry M** (2009) *Nicotiana plumbaginifolia* plants silenced for the ATP-binding cassette transporter gene NpPDR1 show increased susceptibility to a group of fungal and oomycete pathogens. *Mol Plant Pathol* 10: 651-663
- Campbell EJ, Schenk PM, Kazan K, Penninckx IA, Anderson JP, Maclean DJ, Cammue BP, Ebert PR, Manners JM** (2003) Pathogen-responsive expression of a putative ATP-binding cassette transporter gene conferring resistance to the diterpenoid sclareol is regulated by multiple defense signaling pathways in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 133: 1272-1284
- Cannon SB, McCombie WR, Sato S, Tabata S, Denny R, Palmer L, Katari M, Young ND, Stacey G** (2003) Evolution and microsynteny of the apyrase gene family in three legume genomes. *Mol Genet Genomics* 4: 347-61
- Chakravarthy S, Tuori RP, D'Ascenzo MD, Fobert PR, Després C, Martin GB** (2003) The Tomato Transcription Factor Pti4 Regulates Defense-Related Gene Expression via GCC Box and Non-GCC Box cis Elements *Plant Cell* 12: 3033-3050
- Chen G, Komatsuda T, Ma JF, Nawrath C, Pourkheirandish M, Tagiri A, Hu YG, Sameri M, Li X, Zhao X, Liu Y, Li C, Ma X, Wang A, Nair S, Wang N, Miyao A, Sakuma S, Yamaji N, Zheng X, Nevo E** (2011) An ATP-binding cassette subfamily G full transporter is essential for the retention of leaf water in both wild barley and rice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 12354-12359
- Christey MC, Braun RH** (2005) Production of hairy root cultures and transgenic plants by *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation. *Methods Mol Biol* 286: 47-60
- Clay NK, Adio AM, Denoux C, Jander G, Ausubel FM** (2009) Glucosinolate metabolites required for an *Arabidopsis* innate immune response. *Science* 323: 95-101
- Cook DR** (1999) *Medicago truncatula*--a model in the making! *Curr Opin Plant Biol* 2: 301-304
- Crouzet J, Trombik T, Frayse AS, Boutry M** (2006) Organization and function of the plant pleiotropic drug resistance ABC transporter family. *FEBS Lett* 580: 1123-1130
- Dangl JL, Jones JD** (2001) Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* 411: 826-833
- Davidson AL, Dassa E, Orelle C, Chen J** (2008) Structure, function, and evolution of bacterial ATP-binding cassette systems. *Microbiol Mol Biol Rev* 72: 317-364
- Dean M, Annilo T** (2005) Evolution of the ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily in vertebrates. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 6: 123-142
- Dean M, Rzhetsky A, Allikmets R** (2001) The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Genome Res* 11: 1156-1166

- Decottignies A, Goffeau A** (1997) Complete inventory of the yeast ABC proteins. *Nat Genet* 15: 137-145
- Dixon RA, Sumner LW** (2003) Legume natural products: understanding and manipulating complex pathways for human and animal health. *Plant Physiol* 131: 878-885
- Dodds PN, Rathjen JP** (2010) Plant immunity: towards an integrated view of plant-pathogen interactions. *Nat Rev Genet* 11: 539-548
- Du H, Huang Y, Tang Y** (2010) Genetic and metabolic engineering of isoflavonoid biosynthesis. *Appl Microbiol Biotechnol* 86:1293-312
- Ducos E, Fraysse S, Boutry M** (2005) NtPDR3, an iron-deficiency inducible ABC transporter in *Nicotiana tabacum*. *FEBS Lett* 579: 6791-6795
- Ehrhardt D** (2003) GFP technology for live cell imaging. *Curr Opin Plant Biol* 6: 622-628
- Eichhorn H, Klinghammer M, Becht P, Tenhaken R** (2006) Isolation of a novel ABC-transporter gene from soybean induced by salicylic acid. *J Exp Bot* 57: 2193-2201
- Eulgem T, Rushton PJ, Schmelzer E, Hahlbrock K, Somssich IE** (1999) Early nuclear events in plant defence signalling: rapid gene activation by WRKY transcription factors. *EMBO J* 17: 4689-4699
- Eulgem T, Somssich IE** (2007) Networks of WRKY transcription factors in defense signaling. *Curr Opin Plant Biol* 4: 366-71
- Farag MA, Huhman DV, Dixon RA, Sumner LW** (2008) Metabolomics reveals novel pathways and differential mechanistic and elicitor-specific responses in phenylpropanoid and isoflavonoid biosynthesis in *Medicago truncatula* cell cultures. *Plant Physiol* 146: 387-402
- Felsenstein J** (1985) Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783-791
- Fry SC**. (1994) Chemical analysis of components of the primary cell wall. In: Harris N, Oparka KJ, eds. *Plant Cell Biology – Practical Approach*, Oxford, UK: Oxford University Press, 199-220
- Frugier F, Crespi M** (2006) Immunolocalization. *Medicago truncatula* handbook.
- Gaedeke N, Klein M, Kolukisaoglu U, Forestier C, Muller A, Ansoerge M, Becker D, Mamnun Y, Kuchler K, Schulz B, Mueller-Roeber B, Martinoia E** (2001) The *Arabidopsis thaliana* ABC transporter AtMRP5 controls root development and stomata movement. *EMBO J* 20: 1875-1887
- Gallagher SR** (1992) *GUS* protocols: using the *GUS* gene as a reporter of geneexpression San Diego: Academic Press
- Garcia O, Bouige P, Forestier C, Dassa E** (2004) Inventory and comparative analysis of rice and *Arabidopsis* ATP-binding cassette (ABC) systems. *J Mol Biol* 343: 249-265

- Gaur M, Choudhury D, Prasad R.** (2005) Complete inventory of ABC proteins in human pathogenic yeast, *Candida albicans*. *J Mol Microbiol Biotechnol* 9: 3-15
- Goodman CD, Casati P, Walbot V** (2004) A multidrug resistance-associated protein involved in anthocyanin transport in *Zea mays*. *Plant Cell* 16: 1812-26
- Graham TL, Graham MY, Subramanian S, Yu O** (2007) RNAi silencing of genes for elicitation or biosynthesis of 5-deoxyisoflavonoids suppresses race-specific resistance and hypersensitive cell death in *Phytophthora sojae* infected tissues. *Plant Physiol* 144: 728-40
- Grec S, Vanham D, de Ribaucourt JC, Purnelle B, Boutry M** (2003) Identification of regulatory sequence elements within the transcription promoter region of NpABC1, a gene encoding a plant ABC transporter induced by diterpenes. *Plant J* 35: 237-250
- Gubry-Rangin C, Garcia M, Bena G** (2010) Partner choice in *Medicago truncatula*-*Sinorhizobium* symbiosis. *Proc Biol Sci* 277: 1947-1951
- Gulshan K, Moye-Rowley WS** (2007) Multidrug resistance in fungi. *Eukaryot Cell* 6: 1933-1942
- Hahn MG, Darvill A, Albersheim P, Bergmann C, Cheong J-J, Koller A, Lo VM** (1992) Purification and characterization of oligosaccharide elicitors of phytoalexin accumulation. In: Gurr S, McPherson M, Bowles DJ, eds. *Mol Plant Pathol - A Practical Approach*, Vol. 2. IRL Press. 103-147
- Hassan S, Mathesius U** (2012) The role of flavonoids in root-rhizosphere signalling: opportunities and challenges for improving plant-microbe interactions. *J Exp Bot* 63: 3429-44
- He P, Shan L, Sheen J** (2007) The use of protoplasts to study innate immune responses. *Methods Mol Biol* 354:1-9
- Hellens R, Mullineaux P, Klee H** (2000) A guide to *Agrobacterium* binary Ti vectors. *Trends in Plant Sci* 5:446-451
- Helliwell C, Waterhouse P** (2003) Constructs and methods for high-throughput gene silencing in plants. *Methods* 30: 289-295
- Hohl M, Briand C, Grütter MG, Seeger MA** (2012) Crystal structure of a heterodimeric ABC transporter in its inward-facing conformation. *Nat Struct Mol Biol* 19: 395-402
- Holland BI, Cole SPC, Kuchler K, Higgins CF, editors** (2003) ABC proteins: From bacteria to man. Amsterdam: Academic Press.
- Ito H, Gray WM** (2006) A gain-of-function mutation in the *Arabidopsis* pleiotropic drug resistance transporter PDR9 confers resistance to auxinic herbicides. *Plant Physiol* 142: 63-74
- Jasinski M, Ducos E, Martinoia E, Boutry M** (2003) The ATP-binding cassette transporters: structure, function, and gene family comparison between rice and *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 131: 1169-1177
- Jasinski M, Stukkens Y, Degand H, Purnelle B, Marchand-Brynaert J, Boutry M** (2001) A plant plasma membrane ATP binding cassette-type transporter is involved in antifungal terpenoid secretion. *Plant Cell* 13: 1095-1107

- Jaulneau V, Cazaux M, Wong Sak Hoi J, Fournier S, Esquerre-Tugaye MT, Jacquet C, Dumas B** (2010) Host and nonhost resistance in *Medicago-Colletotrichum* interactions. *Mol Plant Microbe Interact* 23: 1107-1117
- Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan MW** (1987) GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J* 13: 3901-3907
- Jones JD, Dangl JL** (2006) The plant immune system. *Nature* 444: 323-329
- Jones KM, Sharopova N, Lohar DP, Zhang JQ, VandenBosch KA, Walker GC** (2008) Differential response of the plant *Medicago truncatula* to its symbiont *Sinorhizobium meliloti* or an exopolysaccharide-deficient mutant. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2: 704-9
- Kamphuis LG, Lichtenzweig J, Oliver RP, Ellwood SR** (2008) Two alternative recessive quantitative trait loci influence resistance to spring black stem and leaf spot in *Medicago truncatula*. *BMC Plant Biol* 8: 30
- Kamphuis LG, Williams AH, Kuster H, Trengove RD, Singh KB, Oliver RP, Ellwood SR** (2012) *Phoma medicaginis* stimulates the induction of the octadecanoid and phenylpropanoid pathways in *Medicago truncatula*. *Mol Plant Pathol* 13: 593-603
- Kang J, Hwang JU, Lee M, Kim YY, Assmann SM, Martinoia E, Lee Y** (2010) PDR-type ABC transporter mediates cellular uptake of the phytohormone abscisic acid. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 2355-2360
- Kang J, Park J, Choi H, Burla B, Kretschmar T, Lee Y, Martinoia E** (2011) Plant ABC Transporters. *Arabidopsis Book* 9
- Karimi M, Inzé D, Depicker A** (2002) GATEWAY vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Trends Plant Sci* 5: 193-5
- Kim DY, Bovet L, Maeshima M, Martinoia E, Lee Y** (2007) The ABC transporter AtPDR8 is a cadmium extrusion pump conferring heavy metal resistance. *Plant J* 50: 207-218
- Kim DY, Jin JY, Alejandro S, Martinoia E, Lee Y** (2010) Overexpression of AtABCG36 improves drought and salt stress resistance in *Arabidopsis*. *Physiol Plant* 139: 170-180
- Klein M, Burla B, Martinoia E** (2006) The multidrug resistance-associated protein (MRP/ABCC) subfamily of ATP-binding cassette transporters in plants. *FEBS Lett* 580: 1112-1122
- Kobae Y, Sekino T, Yoshioka H, Nakagawa T, Martinoia E, Maeshima M** (2006) Loss of AtPDR8, a plasma membrane ABC transporter of *Arabidopsis thaliana*, causes hypersensitive cell death upon pathogen infection. *Plant Cell Physiol* 47: 309-318
- Krattinger SG, Lagudah ES, Spielmeier W, Singh RP, Huerta-Espino J, McFadden H, Bossolini E, Selter LL, Keller B** (2009) A putative ABC transporter confers durable resistance to multiple fungal pathogens in wheat. *Science* 323: 1360-1363
- Kretschmar T, Kohlen W, Sasse J, Borghi L, Schlegel M, Bachelier JB, Reinhardt D, Bours R, Bouwmeester HJ, Martinoia E** (2012) A petunia ABC protein controls strigolactone-dependent symbiotic signalling and branching. *Nature* 483: 341-344

- Kvach JT, Veras JR** (1982) A fluorescent staining procedure for determining the viability of mycobacterial cells. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* 2: 183-192
- Larsson C, Widell S, Kjellbom P** (1987) Preparation of High-Purity Plasma Membranes. *Methods in Enzymology* 148: 558-568
- Lee M, Lee K, Lee J, Noh EW, Lee Y** (2005) AtPDR12 contributes to lead resistance in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 138: 827-836
- Limpens E, Mirabella R, Fedorova E, Franken C, Franssen H, Bisseling T, Geurts R** (2005) Formation of organelle-like N₂-fixing symbiosomes in legume root nodules is controlled by DMI2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 10375-10380
- Limpens E, Ramos J, Franken C, Raz V, Compaan B, Franssen H, Bisseling T, Geurts R** (2004) RNA interference in *Agrobacterium rhizogenes*-transformed roots of *Arabidopsis* and *Medicago truncatula*. *J Exp Bot* 55: 983-992
- Lin R, Wang H** (2005) Two homologous ATP-binding cassette transporter proteins, AtMDR1 and AtPGP1, regulate *Arabidopsis* photomorphogenesis and root development by mediating polar auxin transport. *Plant Physiol* 138: 949-964
- Lipka U, Fuchs R, Lipka V** (2008) *Arabidopsis* non-host resistance to powdery mildews. *Curr Opin Plant Biol* 11: 404-411
- Lozovaya VV, Lygin AV, Zernova OV, Li S, Hartman GL, Widholm JM** (2004) Isoflavonoid accumulation in soybean hairy roots upon treatment with *Fusarium solani*. *Plant Physiol Biochem* 7-8: 671-9
- Meade HM, Long SR, Ruvkun GB, Brown SE, Ausubel FM** (1982) Physical and genetic characterization of symbiotic and auxotrophic mutants of *Rhizobium meliloti* induced by transposon Tn5 mutagenesis. *J Bacteriol* 149: 114-122
- Moons A** (2003) Ospdr9, which encodes a PDR-type ABC transporter, is induced by heavy metals, hypoxic stress and redox perturbations in rice roots. *FEBS Lett* 553: 370-376
- Moons A** (2008) Transcriptional profiling of the PDR gene family in rice roots in response to plant growth regulators, redox perturbations and weak organic acid stresses. *Planta* 229: 53-71
- Morsomme P, Dambly S, Maudoux O, Boutry M** (1998) Single point mutations distributed in 10 soluble and membrane regions of the *Nicotiana plumbaginifolia* plasma membrane PMA2 H⁺-ATPase activate the enzyme and modify the structure of the C-terminal region. *J Biol Chem* 273: 34837-34842
- Mrosk C, Forner S, Hause G, Kuster H, Kopka J, Hause B** (2009) Composite *Medicago truncatula* plants harbouring *Agrobacterium rhizogenes*-transformed roots reveal normal mycorrhization by *Glomus intraradices*. *J Exp Bot* 60: 3797-3807
- Naoumkina M, Farag MA, Sumner LW, Tang Y, Liu CJ, Dixon RA** (2007) Different mechanisms for phytoalexin induction by pathogen and wound signals in *Medicago truncatula*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 17909-17915

- Nishiuchi T, Shinshi H, Suzuki K** (2004) Rapid and transient activation of transcription of the ERF3 gene by wounding in tobacco leaves: possible involvement of NtWRKYs and autorepression. *J Biol Chem* 53: 55355-55361.
- Paape T, Zhou P, Branca A, Briskine R, Young N, Tiffin P** (2012) Fine-scale population recombination rates, hotspots, and correlates of recombination in the *Medicago truncatula* genome. *GBE* 5: 726-37
- Pieterse CM, Leon-Reyes A, Van der Ent S, Van Wees SC** (2009) Networking by small-molecule hormones in plant immunity. *Nat Chem Biol* 5: 308-316
- Procko E, O'Mara ML, Bennett WF, Tieleman DP, Gaudet R** (2009) The mechanism of ABC transporters: general lessons from structural and functional studies of an antigenic peptide transporter. *FASEB J* 23: 1287-302
- Quandt HJ, Pühler A, Broer I** (1993). Transgenic root nodules of *Vicia hirsuta*: a fast and efficient system for the study of gene expression in indeterminate-type nodules. *Mol. Plant Microbe Interact* 6: 699-706
- Ramírez-Suero M, Khanshour A, Martinez Y, Rickauer M** (2010) A study on the susceptibility of the model legume plant *Medicago truncatula* to the soil-borne pathogen *Fusarium oxysporum*. *European Journal of Plant Pathology* 4: 517-530
- Rea PA** (2007) Plant ATP-binding cassette transporters. *Annu Rev Plant Biol* 58: 347-375
- Riordan JR** (2005) Assembly of functional CFTR chloride channels. *Annu Rev Physiol* 67: 701-718
- Ruocco M, Ambrosino P, Lanzuise S, Woo SL, Lorito M, Scala F** (2011) Four potato (*Solanum tuberosum*) ABCG transporters and their expression in response to abiotic factors and *Phytophthora infestans* infection. *J Plant Physiol* 168: 2225-2233
- Ruzicka K, Strader LC, Bailly A, Yang H, Blakeslee J, Langowski L, Nejedla E, Fujita H, Itoh H, Syono K, Hejatko J, Gray WM, Martinoia E, Geisler M, Bartel B, Murphy AS, Friml J** (2010) *Arabidopsis* PIS1 encodes the ABCG37 transporter of auxinic compounds including the auxin precursor indole-3-butyric acid. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 10749-10753
- Saitou N, Nei M** (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4: 406-425
- Sanchez-Fernandez R, Davies TG, Coleman JO, Rea PA** (2001) The *Arabidopsis thaliana* ABC protein superfamily, a complete inventory. *J Biol Chem* 276: 30231-30244
- Sasabe M, Toyoda K, Shiraishi T, Inagaki Y, Ichinose Y** (2002) cDNA cloning and characterization of tobacco ABC transporter: NtPDR1 is a novel elicitor-responsive gene. *FEBS Lett* 518: 164-168
- Shani N, Valle D** (1996) A *Saccharomyces cerevisiae* homolog of the human adrenoleukodystrophy transporter is a heterodimer of two half ATP-binding cassette transporters. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 11901-11906

- Sheps JA, Ralph S, Zhao Z, Baillie DL, Ling V** (2004) The ABC transporter gene family of *Caenorhabditis elegans* has implications for the evolutionary dynamics of multidrug resistance in eukaryotes. *Genome Biol* 5: R15
- Smart CC, Fleming AJ** (1996) Hormonal and environmental regulation of a plant PDR5-like ABC transporter. *J Biol Chem* 271: 19351-19357
- Stefkova J, Poledne R, Hubacek JA** (2004) ATP-binding cassette (ABC) transporters in human metabolism and diseases. *Physiol Res* 53: 235-243
- Stein M, Dittgen J, Sanchez-Rodriguez C, Hou BH, Molina A, Schulze-Lefert P, Lipka V, Somerville S** (2006) Arabidopsis PEN3/PDR8, an ATP binding cassette transporter, contributes to nonhost resistance to inappropriate pathogens that enter by direct penetration. *Plant Cell* 18: 731-746
- Strader LC, Bartel B** (2009) The Arabidopsis PLEIOTROPIC DRUG RESISTANCE8/ABCG36 ATP binding cassette transporter modulates sensitivity to the auxin precursor indole-3-butyric acid. *Plant Cell* 21: 1992-2007
- Stukkens Y, Bultreys A, Grec S, Trombik T, Vanham D, Boutry M** (2005) NpPDR1, a pleiotropic drug resistance-type ATP-binding cassette transporter from *Nicotiana plumbaginifolia*, plays a major role in plant pathogen defense. *Plant Physiol* 139: 341-352
- Sugiyama A, Shitan N, Sato S, Nakamura Y, Tabata S, Yazaki K** (2006) Genome-wide analysis of ATP-binding cassette (ABC) proteins in a model legume plant, *Lotus japonicus*: comparison with Arabidopsis ABC protein family. *DNA Res* 13: 205-228
- Sugiyama A, Shitan N, Yazaki K** (2007) Involvement of a soybean ATP-binding cassette-type transporter in the secretion of genistein, a signal flavonoid in legume-Rhizobium symbiosis. *Plant Physiol* 144: 2000-2008
- Szabados L, Charrier B, Kondorosi A, de Bruijn FJ, Ratet P** (1995) New plant promoter and enhancer testing vectors. *Mol. Breed* 1, 419-423
- Tao Y, Xie Z, Chen W, Glazebrook J, Chang HS, Han B, Zhu T, Zou G, Katagiri F** (2003) Quantitative nature of Arabidopsis responses during compatible and incompatible interactions with the bacterial pathogen *Pseudomonas syringae*. *Plant Cell* 15: 317-330
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ** (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22: 4673-4680
- Tivoli B, Baranger A, Sivasithamparam K, Barbetti MJ** (2006) Annual Medicago: from a model crop challenged by a spectrum of necrotrophic pathogens to a model plant to explore the nature of disease resistance. *Ann Bot* 98: 1117-1128
- Trombik T, Jasinski M, Crouzet J, Boutry M** (2008) Identification of a cluster IV pleiotropic drug resistance transporter gene expressed in the style of *Nicotiana plumbaginifolia*. *Plant Mol Biol* 66: 165-175
- van den Brule S, Smart CC** (2002) The plant PDR family of ABC transporters. *Planta* 216: 95-106

Veitch NC (2007) Isoflavonoids of the leguminosae. *Nat Prod Rep* 2: 417-64

Verrier PJ, Bird D, Burla B, Dassa E, Forestier C, Geisler M, Klein M, Kolukisaoglu U, Lee Y, Martinoia E, Murphy A, Rea PA, Samuels L, Schulz B, Spalding EJ, Yazaki K, Theodoulou FL (2008) Plant ABC proteins--a unified nomenclature and updated inventory. *Trends Plant Sci* 13: 151-159

Wang W, Barnaby JY, Tada Y, Li H, Tör M, Caldelari D, Lee DU, Fu XD, Dong X (2011) Timing of plant immune responses by a central circadian regulator. *Nature* 473: 110-4

Xiang T, Zong N, Zou Y, Wu Y, Zhang J, Xing W, Li Y, Tang X, Zhu L, Chai J, Zhou JM (2008) *Pseudomonas syringae* effector AvrPto blocks innate immunity by targeting receptor kinases. *Curr Biol* 18: 74-80

Yamamoto S, Nakano T, Suzuki K, Shinshi H (2004) Elicitor-induced activation of transcription via W box-related cis-acting elements from a basic chitinase gene by WRKY transcription factors in tobacco. *Biochim Biophys Acta* 1677: 279-87

Young ND, Bharti AK (2012) Genome-enabled insights into legume biology. *Annu Rev Plant Biol* 63: 283-305

Young ND, Debelle F, Oldroyd GE, Geurts R, Cannon SB, Udvardi MK, Benedito VA, Mayer KF, Gouzy J, Schoof H, Van de Peer Y, Proost S, Cook DR, Meyers BC, Spannagl M, Cheung F, De Mita S, Krishnakumar V, Gundlach H, Zhou S, Mudge J, Bharti AK, Murray JD, Naoumkina MA, Rosen B, Silverstein KA, Tang H, Rombauts S, Zhao PX, Zhou P, Barbe V, Bardou P, Bechner M, Bellec A, Berger A, Berges H, Bidwell S, Bisseling T, Choisne N, Couloux A, Denny R, Deshpande S, Dai X, Doyle JJ, Dudez AM, Farmer AD, Fouteau S, Franken C, Gibelin C, Gish J, Goldstein S, Gonzalez AJ, Green PJ, Hallab A, Hartog M, Hua A, Humphray SJ, Jeong DH, Jing Y, Jocker A, Kenton SM, Kim DJ, Klee K, Lai H, Lang C, Lin S, Macmil SL, Magdelenat G, Matthews L, McCarrison J, Monaghan EL, Mun JH, Najjar FZ, Nicholson C, Noirot C, O'Bleness M, Paule CR, Poulain J, Prion F, Qin B, Qu C, Retzel EF, Riddle C, Sallet E, Samain S, Samson N, Sanders I, Saurat O, Scarpelli C, Schiex T, Segurens B, Severin AJ, Sherrier DJ, Shi R, Sims S, Singer SR, Sinharoy S, Sterck L, Viollet A, Wang BB, Wang K, Wang M, Wang X, Warfsmann J, Weissenbach J, White DD, White JD, Wiley GB, Wincker P, Xing Y, Yang L, Yao Z, Ying F, Zhai J, Zhou L, Zuber A, Denarie J, Dixon RA, May GD, Schwartz DC, Rogers J, Quetier F, Town CD, Roe BA (2011) The *Medicago* genome provides insight into the evolution of rhizobial symbioses. *Nature* 480: 520-524

Young ND, Udvardi M (2009) Translating *Medicago truncatula* genomics to crop legumes. *Curr Opin Plant Biol* 12: 193-201

Zhang J, Shao F, Li Y, Cui H, Chen L, Li H, Zou Y, Long C, Lan L, Chai J, Chen S, Tang X, Zhou JM (2007) A *Pseudomonas syringae* effector inactivates MAPKs to suppress PAMP-induced immunity in plants. *Cell Host Microbe* 1: 175-185

Zhao J, Dixon RA (2010). The 'ins' and 'outs' of flavonoid transport. *Trends in Plant Science* 15: 72-80

Zimmermann P, Hirsch-Hoffmann M, Hennig L, Gruissem W (2004) GENEVESTIGATOR. *Arabidopsis* microarray database and analysis toolbox. *Plant Physiol* 136: 2621-32

Zhou H, Lin J, Johnson A, Morgan RL, Zhong W, Ma W (2011) *Pseudomonas syringae* type III effector HopZ1 targets a host enzyme to suppress isoflavone biosynthesis and promote infection in soybean. *Cell Host Microbe* 9: 177-186

Zhou C, Yang Y, Jong AY (1990) Mini-prep in ten minutes. *BioTechniques* 8: 172-173

Zipfel C, Robatzek S (2010) Pathogen-associated molecular pattern-triggered immunity: veni, vidi...? *Plant Physiol* 154: 551-554

Zolnerciks JK, Andress EJ, Nicolaou M, Linton KJ (2011) Structure of ABC transporters. *Essays Biochem* 50: 43-61

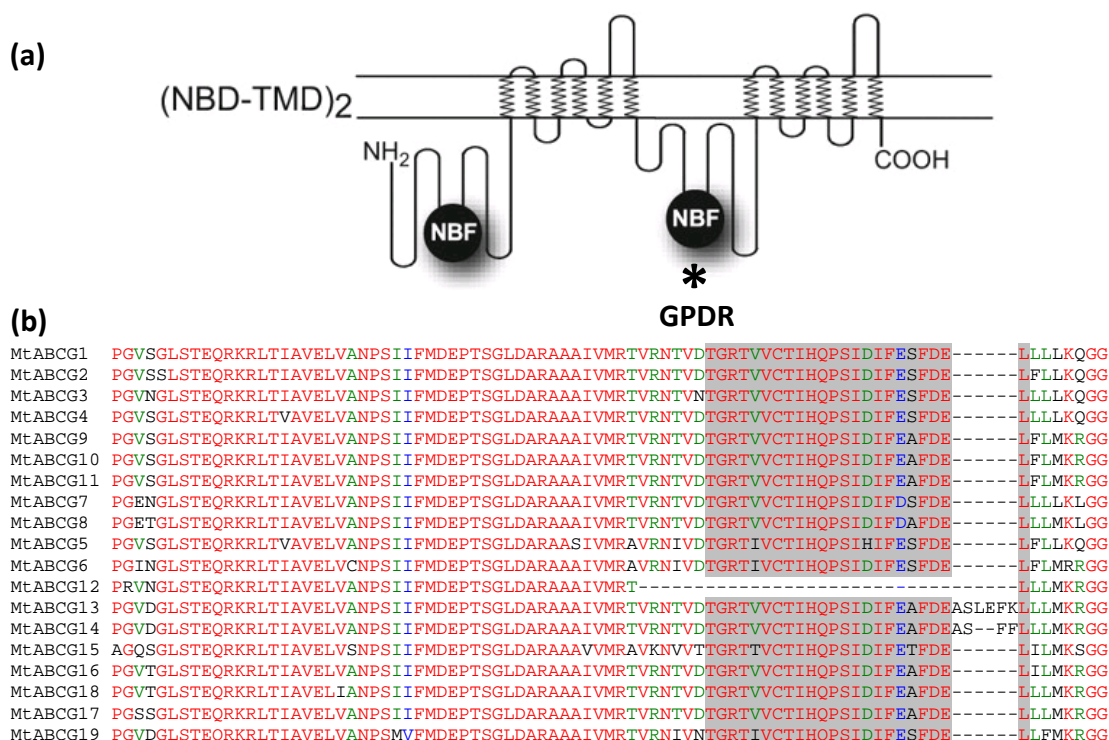
Załącznik nr 2. Stopień identyczności między białkami MtABCG a AtABCG

Tabela 7.2. Stopień identyczności na poziomie aminokwasowym, pomiędzy pełnymi białkami ABCG z *M. truncatula* pełnymi białkami ABCG z *A. thaliana*, określony przy użyciu bl2seq

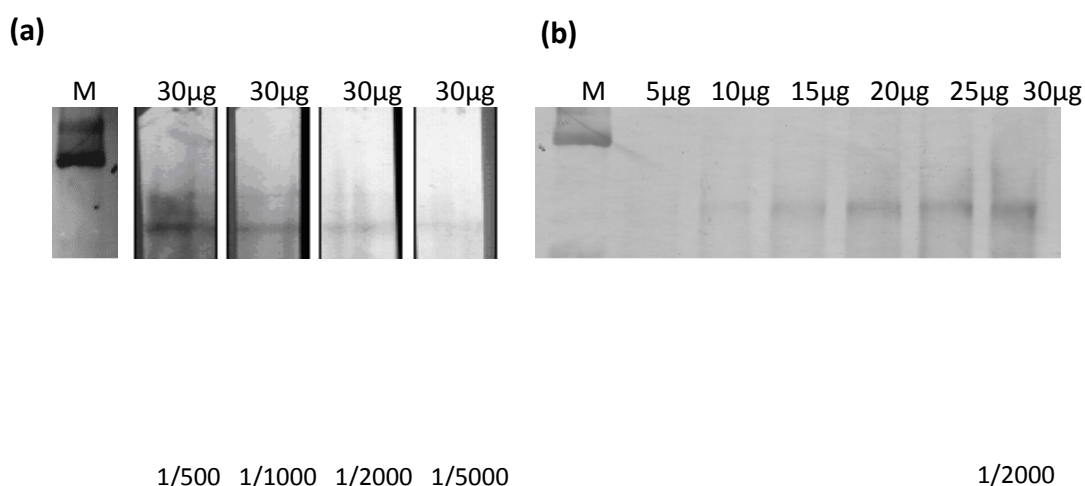
http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch&PROG_DEF=blastn&BLAST_PROG_DEF=megaBlast&SHOW_DEFAULTS=on&BLAST_SPEC=blast2seq&LINK_LOC=align2seq

AtABCG MtABCG	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1	56%	46%	51%	55%	50%	58%	55%	55%	49%	54%	58%	67%	47%	48%	48%
2	56%	46%	51%	55%	50%	58%	55%	55%	49%	56%	57%	67%	48%	48%	47%
3	56%	46%	51%	56%	51%	59%	55%	55%	50%	55%	58%	67%	48%	49%	48%
4	56%	46%	51%	54%	49%	58%	55%	55%	49%	54%	58%	66%	47%	48%	48%
5	56%	48%	53%	57%	51%	58%	55%	54%	51%	55%	58%	64%	48%	50%	50%
6	56%	48%	53%	55%	50%	57%	55%	54%	50%	53%	56%	62%	50%	50%	50%
7	55%	46%	52%	56%	50%	57%	55%	55%	49%	54%	57%	63%	47%	48%	47%
8	56%	46%	53%	58%	50%	57%	56%	56%	50%	55%	57%	65%	48%	47%	47%
9	58%	46%	53%	59%	50%	60%	59%	58%	50%	56%	59%	70%	48%	47%	47%
10	57%	46%	52%	57%	49%	59%	58%	58%	49%	54%	58%	70%	48%	46%	46%
11	58%	47%	53%	59%	50%	60%	60%	59%	51%	55%	59%	71%	49%	47%	48%
12	55%	44%	51%	52%	47%	64%	53%	54%	47%	50%	65%	58%	46%	45%	46%
13	57%	45%	53%	55%	50%	70%	56%	57%	50%	51%	70%	59%	48%	48%	48%
14	57%	46%	53%	56%	51%	73%	56%	58%	51%	51%	73%	60%	48%	48%	48%
15	53%	56%	48%	48%	60%	53%	53%	53%	60%	47%	53%	51%	58%	59%	59%
16	68%	46%	54%	54%	50%	56%	70%	72%	52%	48%	55%	56%	49%	48%	48%
17	55%	45%	74%	51%	49%	54%	55%	55%	48%	49%	53%	56%	47%	47%	46%
18	71%	49%	54%	56%	52%	57%	72%	74%	53%	50%	57%	58%	49%	48%	48%
19	53%	45%	51%	74%	47%	55%	52%	52%	47%	51%	55%	57%	45%	45%	45%

Załącznik nr 3. Charakterystyka przeciwciał GPDR

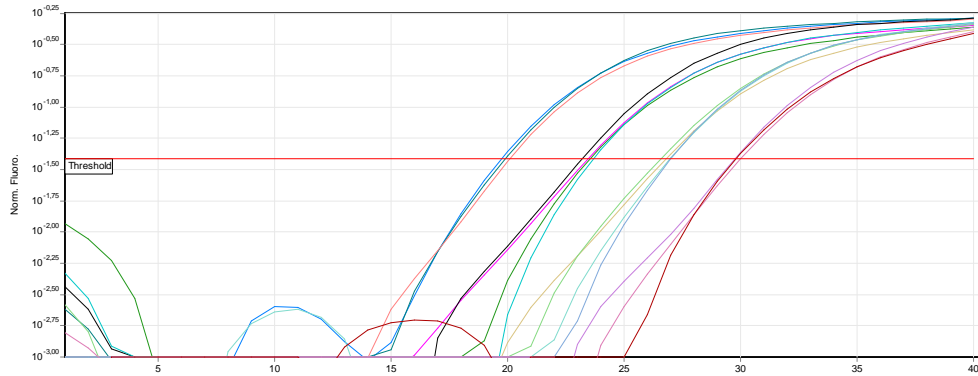


Rycina 7.1. Rejon białek MtABCG rozpoznawany przez przeciwciała GPDR. Schemat przedstawiający pełny transporter ABCG z zaznaczonym (gwiazdką) miejscem rozpoznawanym przez przeciwciała GPDR (a); Zestawienie sekwencji AA pełnych białek MtABCG w rejonie obejmującym miejsce rozpoznawane przez przeciwciała GPDR (kolor szary) (b).

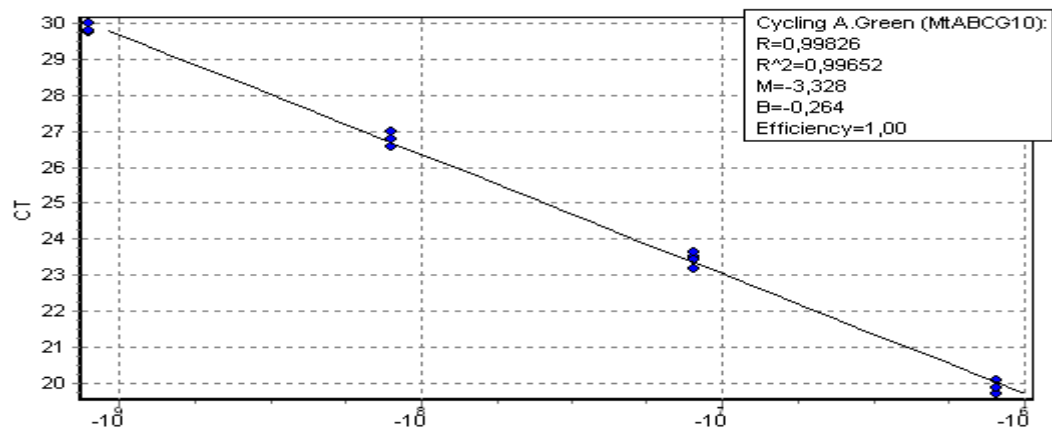


Rycina 7.2. Analiza Western blot dla frakcji mikrosomalnej, wyizolowanej z liściowej hodowli zawiesinowej, z wykorzystaniem przeciwciał (GPDR) rozpoznających wszystkie białka ABCG. Dla takich samych ilości frakcji mikrosomalnej (30 µg) i różnych stężeń przeciwciał GPDR (a); dla różnych ilości frakcji mikrosomalnej przy danym stężeniu przeciwciał GPDR (1/2000) (b).

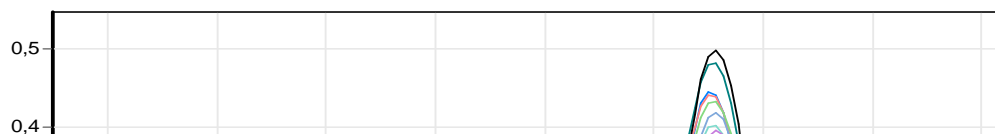
Załącznik nr 4. Wykresy RealTime PCR dla genu *MtABCG10* (odczynnik Power SYBR Green PCR Master Mix)



Rycina 7.3. Krzywa amplifikacji standardów dla genu *MtABCG10* przedstawiona w postaci wykresu logarytmicznego z zaznaczoną wartością progową (*threshold*).

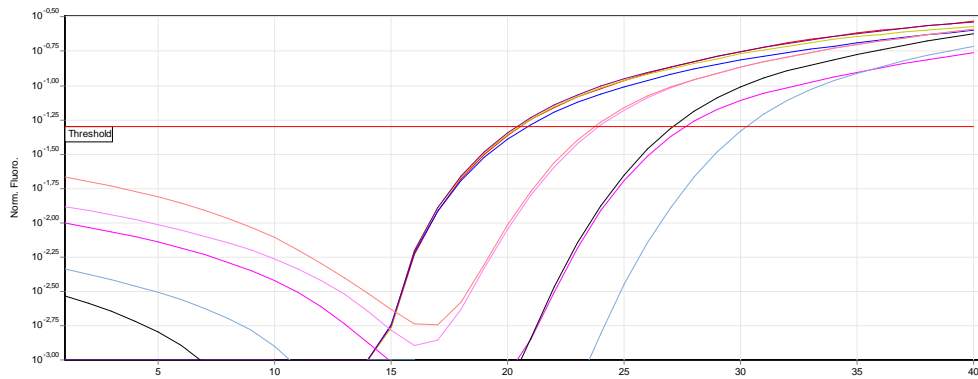


Rycina 7.4. Krzywa standardowa dla genu *MtABCG10*.

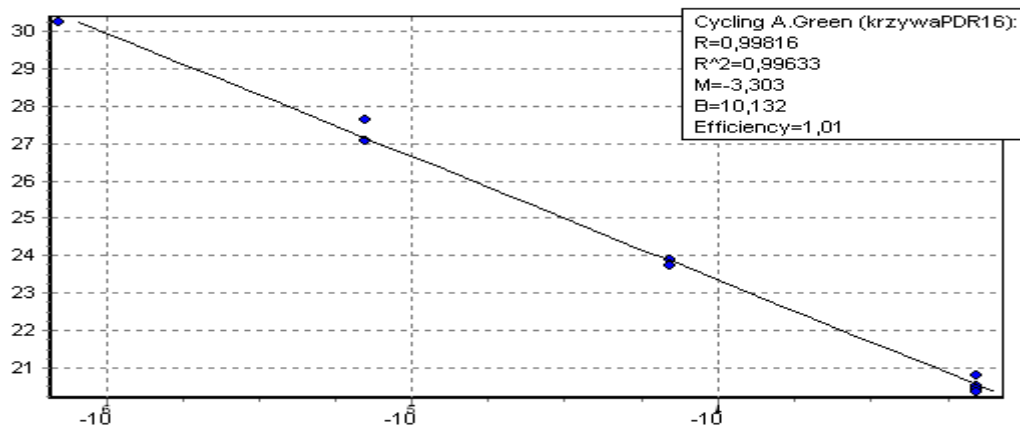


Rycina 7.5. Wykres krzywej topnienia ampliconu *MtABCG10*.

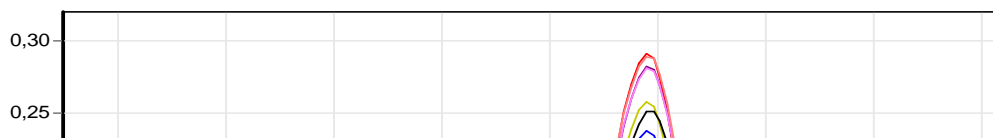
Załącznik nr 5. Wykresy RealTime PCR dla genu *MtABCG16* (odczynnik Power SYBR Green PCR Master Mix)



Rycina 7.6. Krzywa amplifikacji standardów dla genu *MtABCG16* przedstawiona w postaci wykresu logarymicznego z zaznaczoną wartością progową (*threshold*).

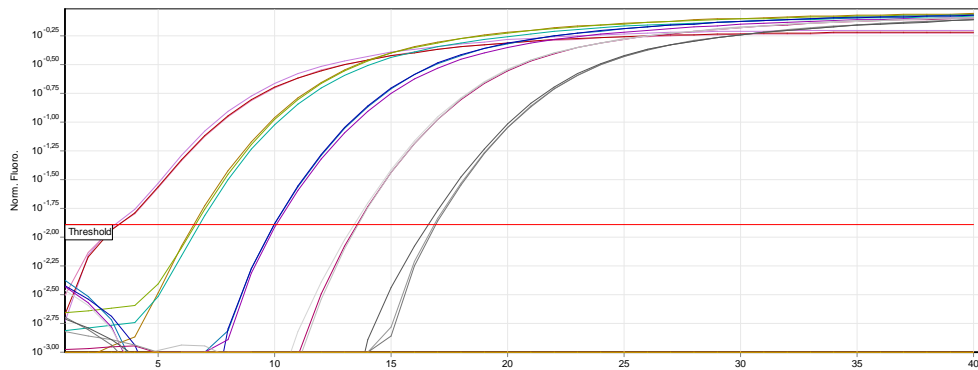


Rycina 7.7. Krzywa standardowa dla genu *MtABCG16*.

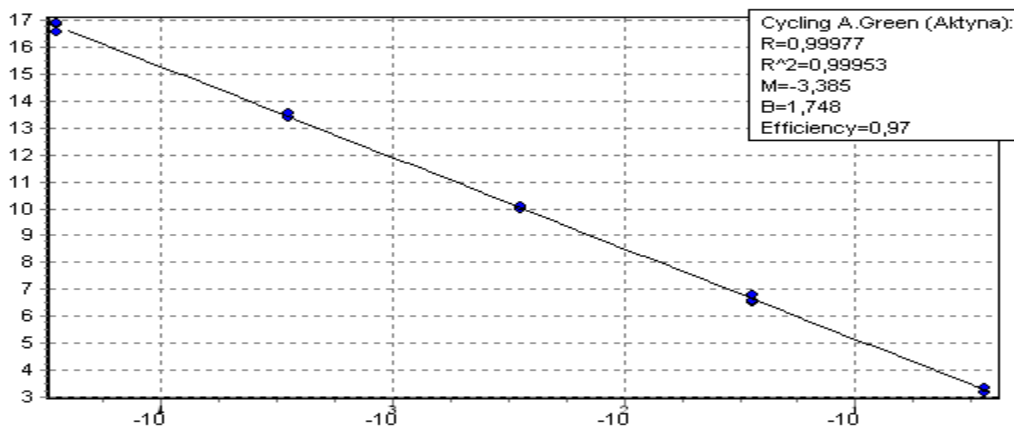


Rycina 7.8. Wykres krzywej topnienia ampliconu *MtABCG16*.

Załącznik nr 6. Wykresy RealTime PCR dla genu *aktyny* (odczynnik Power SYBR Green PCR Master Mix)



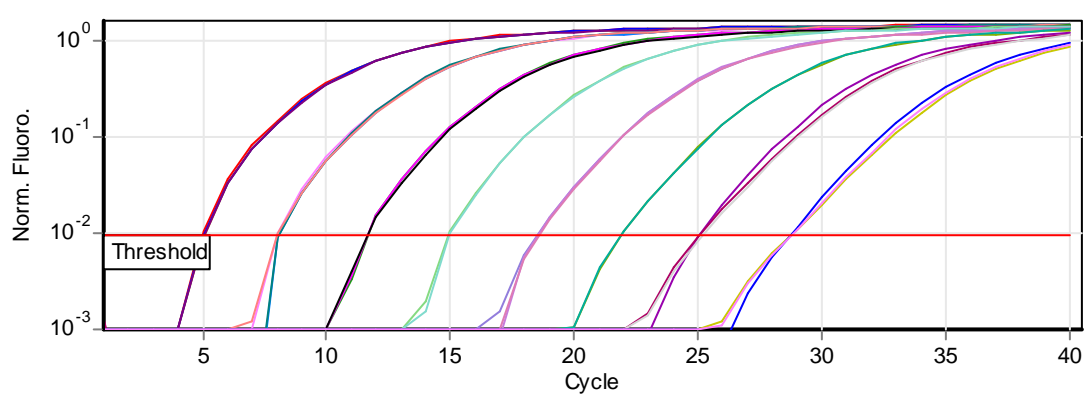
Rycina 7.9. Krzywa amplifikacji standardów dla genu *aktyny* przedstawiona w postaci wykresu logarytmicznego z zaznaczoną wartością progową (*treshold*). (Praca magisterska Marty Frankowskiej 2007).



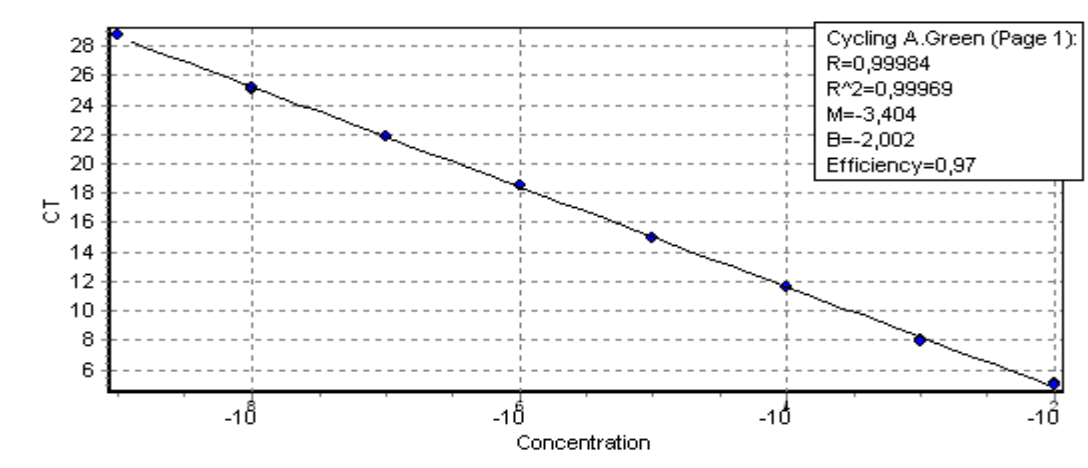
Rycina 7.10. Krzywa standardowa dla genu *aktyny*. (Praca magisterska Marty Frankowskiej 2007).



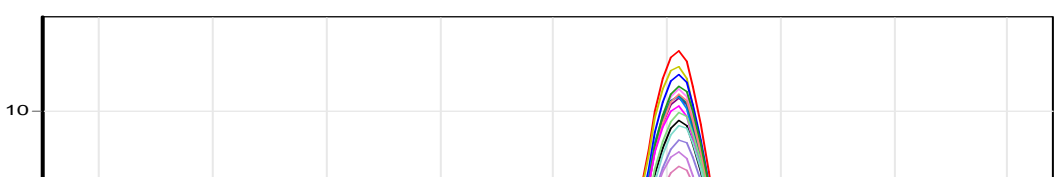
Rycina 7.11. Wykres krzywej topnienia amplikonu *aktyny*. (Praca magisterska Marty Frankowskiej 2007).

Załącznik nr 7. Wykresy RealTime PCR dla genu *aktyny* (odczynnik MESA GREENqPCR)

Rycina 7.12. Krzywa amplifikacji standardów dla genu *aktyny* przedstawiona w postaci wykresu logarytmicznego z zaznaczoną wartością progową (*threshold*).

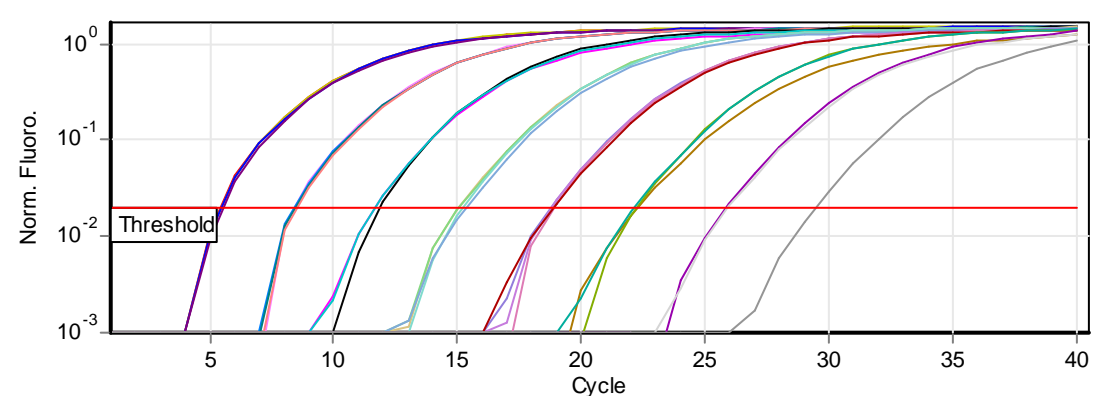


Rycina 7.13. Krzywa standardowa dla genu *aktyny*.

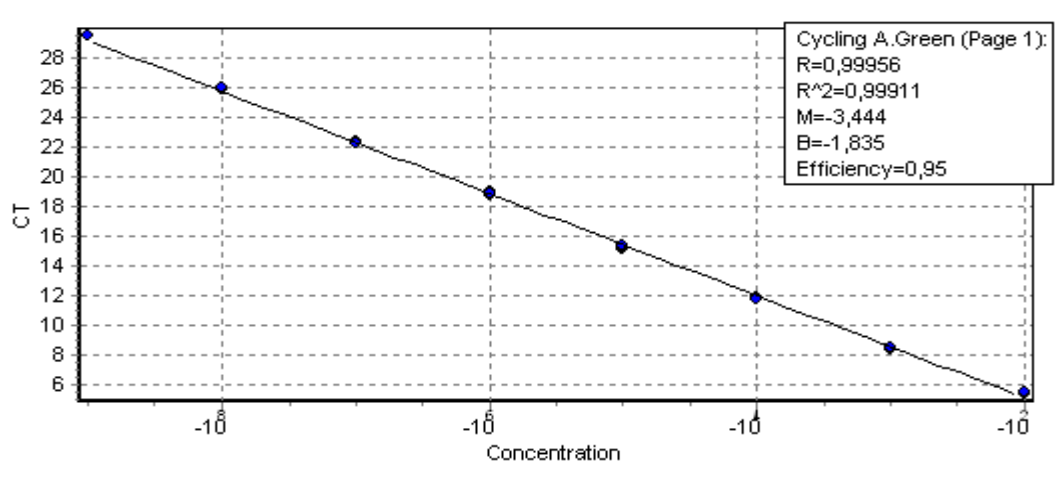


Rycina 7.14. Wykres krzywej topnienia ampliconu *aktyny*.

Załącznik nr 8. Wykresy RealTime PCR dla genu *MtABCG10* (odczynniki MESA GREENqPCR)



Rycina 7.15. Krzywa amplifikacji standardów dla genu *MtABCG10* przedstawiona w postaci wykresu logarytmicznego z zaznaczoną wartością progową (*threshold*).



Rycina 7.16. Krzywa standardowa dla genu *MtABCG10*.



Rycina 7.18. Wykres krzywej topnienia ampliconu *MtABCG10*.