

Instytut Chemii Bioorganicznej

Polskiej Akademii Nauk



**Analiza funkcjonalna transportera ABCG
biorącego udział w negatywnej regulacji
gęstości korzeni bocznych i liczby brodawek
u *Medicago truncatula***

mgr inż. Tomasz Jamruszka

Praca doktorska wykonana

w Zakładzie Fizjologii Molekularnej Roślin

pod kierunkiem promotora: prof. dr. hab. Michała Jasińskiego

i promotor pomocniczej: dr Joanny Banasiak

Poznań 2023

Praca została sfinansowana z następujących środków:

- Grant NCN OPUS 2015/19/B/NZ9/03548: Rola transporterów błonowych w kaskadzie sygnałowej cytokinin podczas symbiozy bobowatych z bakteriami brodawkowymi; *kierownik: prof. dr hab. Michał Jasiński*

Publikacje powstałe w trakcie realizacji pracy doktorskiej:

- Jarzyniak K, Banasiak J, **Jamruszka T**, Pawela A, Di Donato M, Novak O, Geisler M, Jasinski M. (2021). Early stages of legume–rhizobia symbiosis are controlled by ABCG-mediated transport of active cytokinins. *Nature Plants*, 7: 428–436. (doi: 10.1038/s41477-021-00873-6)
- Banasiak J, **Jamruszka T**, Murray JD, Jasiński M. (2021). A roadmap of plant membrane transporters in arbuscular mycorrhizal and legume rhizobium symbioses. *Plant Physiology*, 1–21. (doi: 10.1093/plphys/kiab280)

Publikacje w trakcie recenzji, dostępne w formie „preprint”:

- **Jamruszka T**, Banasiak J, Pawela A, Jarzyniak K, Xia J, Biała-Leonhard W, Plačková L, Iacobini FR, Novák O, Geisler M, Jasiński M. (2022). *Medicago truncatula* ABCG40 is a cytokinin importer negatively regulating lateral root density and nodule number. *bioRxiv* (doi: 10.1101/2022.11.10.516000)

Nagrody uzyskane w trakcie realizacji pracy doktorskiej:

- Nagroda Naukowa Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN za najlepszą publikację eksperymentalną powstałą w Instytucie w roku 2021
- Wyróżnienie Komitetu Biologii Molekularnej Komórki PAN w konkursie im. prof. K. Bassalika za artykuł „Early stages of legume–rhizobia symbiosis are controlled by ABCG-mediated transport of active cytokinins”
- Nagroda Wydziału II Nauk Biologicznych i Rolniczych PAN w 2022 roku za wybitne osiągnięcie badawcze pt. „Poznanie mechanizmu dystrybucji cytokinin w procesie biologicznego wiązania azotu u roślin bobowatych”

Serdecznie dziękuję:

*Promotorowi, **prof. dr hab. Michałowi Jasińskiemu**,
za przyjęcie mnie do swojego Zespołu, opiekę naukową
i niezachwianą wiarę w powodzenie badań*

*Promotor pomocniczej, **dr Joannie Banasiak**,
za tysiące rozwiązanych wspólnie problemów,
szczerą pomoc i inspirowanie do działania*

*Byłym i obecnym Koleżankom i Kolegom z Zakładu Fizjologii Molekularnej Roślin,
Oli Paweli, Wandzi Białej-Leonhard, Konradowi Pakule, Karolinie Jarzyniak,
Marcie Wojnickiej, Praveenowi Awasthi, Krishanaprii Anirudhan i Maciejowi Nowakowi,
za stworzenie niepowtarzalnej atmosfery pracy i pomoc przy realizacji eksperymentów*

***Koleżankom i Kolegom z Zakładu Metabolomiki Funkcjonalnej Roślin,**
za wszystkie dyskusje na tematy naukowe i pozanaukowe*

***Pracownikom Instytutu,**
za życzliwość i okazane wsparcie podczas moich codziennych zmagania*

***Sebastianowi,**
za dodawanie siły, gdy mi jej brakowało*

Pracę dedykuję moim najwierniejszym fanom,

babci Stasi i dziadkowi Bogusiowi

Streszczenie

Niedobór azotu jest dla roślin jednym z najdotkliwszych stresów abiotycznych, przyczyniającym się do ich poważnych zaburzeń rozwojowych. Ważną reakcją przystosowawczą roślin do ograniczonych zasobów azotu w środowisku są modyfikacje morfologii korzenia. Obejmują one u części gatunków wydłużanie korzenia głównego oraz zmiany gęstości korzeni bocznych. Odpowiedzią roślin bobowatych na niską dostępność azotu jest ponadto nawiązywanie relacji symbiotycznych z bakteriami zdolnymi wiązać azot atmosferyczny, skutkujące produkcją brodawek korzeniowych. Co warte uwagi, wymienione reakcje korzenia zależne są nie tylko od warunków zewnętrznych, ale także od wielu czynników endogennych. Jednymi z nich są fitohormony, dynamika ich przemian i transport, czego szczególnym przykładem są cytokininy. Aktywność tego hormonu ma wielowymiarowy wpływ m.in. na długość korzenia głównego, liczbę korzeni bocznych oraz rozwój i liczbę brodawek, nierzadko w antagonistycznej relacji z innymi hormonami, takimi jak auksyny.

W prezentowanej pracy doktorskiej przedstawiono charakterystykę jednego z białek należących do rodziny transporterów ABC (ang. *ATP-binding cassette transporters*) u *Medicago truncatula*, MtABCG40. Przeprowadzone eksperymenty dowiodły, że MtABCG40 jest białkiem błony komórkowej, importującym *trans*-zeatynę, będącą aktywną biologicznie formą cytokinin. Przeprowadzone analizy wykazały, że kodujący je gen ulega najsilniejszej ekspresji w korzeniach o obniżonej gęstości korzeni bocznych, mającej miejsce przy niedoborze azotu i w czasie traktowania cytokininami. Aktywność promotora *MtABCG40* widoczna była we wiązce przewodzącej korzenia, merystemie apikalnym (ang. *root apical meristem*, RAM) oraz w zawiązkach korzeni bocznych. Mutanty pozbawione funkcjonalnego *MtABCG40* charakteryzowały się spowolnieniem wzrostu korzenia głównego z jednoczesnym skróceniem jego RAM oraz zmianami ekspresji genów markerowych odpowiedzi komórek na cytokininy i auksyny. Produkowały one ponadto zwiększoną liczbę korzeni bocznych, które na etapie wczesnych primordiów wykazywały większą w stosunku do roślin typu dzikiego liczbę komórek. Podobne obserwacje miały miejsce także w przypadku brodawek korzeniowych. Rośliny *mtabcg40* tworzyły ich więcej, a ich primordia liczyły więcej komórek. Nie odnotowano zmian ekspresji *MtABCG40* pod wpływem systemicznych sygnałów brodawkowania.

Uzyskane wyniki wskazują na udział MtABCG40 w negatywnej regulacji gęstości korzeni bocznych u *M. truncatula* przy niedoborach azotu. Regulacja ta polega na obniżaniu

wrażliwości komórek RAM na cytokininy produkowane w czapeczce korzenia, co skutkuje przyspieszeniem wydłużania korzenia głównego, oraz na hamowaniu inicjacji powstawania korzeni bocznych, obniżając ich liczbę. W podobny sposób redukowana jest przez MtABCG40 również liczba powstających brodawek korzeniowych. Zjawisko to ma wyłącznie lokalny, korzeniowy charakter i nie jest zależne od systemicznych sygnałów pochodzących z części nadziemnych rośliny.

Summary

Nitrogen deficiency is one of the most severe abiotic stresses, which leads to serious developmental alterations in plants. Adjustment of their root morphology is an important adaptive response when facing limited nitrogen resources. This comprises an elongation of the primary root and changes in lateral root density in some species. Such conditions also cause *Fabaceae* family members to develop a symbiotic relationship with nitrogen-fixing bacteria that results in the formation of root nodules. Noteworthy, aforementioned root reactions are dependent not only on environmental stimuli, but also on many endogenous factors. One of them are phytohormones, their metabolism and transport, as in the case of cytokinins. The activity of this hormone is multidirectional and influences, *inter alia*, the length of primary root, number of lateral roots, as well as development and number of nodules. Moreover, cytokinins often antagonize other hormones, such as auxins.

The goal of the presented doctoral dissertation was to characterize one of the proteins from the ABC (ATP-binding cassette transporters) transporter family in *Medicago truncatula*, namely MtABCG40. Carried out experiments showed that MtABCG40 is a plasma membrane protein, which imports *trans*-zeatin, known to be an active form of cytokinin. The gene encoding the transporter was most strongly induced in roots which exhibited the lowest lateral root density caused by nitrogen deprivation and cytokinin treatment. The activity of *MtABCG40* promoter was visible in *M. truncatula* root vascular bundle, root apical meristem (RAM) and lateral root primordium. The growth of *mtabcg40* primary root was slowed down which was accompanied by its shortened root tip and an induction of cytokinin and auxin RAM cell response. There were also more lateral roots produced. Their early primordia comprised more cells compared to the wild type. Similar observations were made for nodules. *mtabcg40* plants created more of them and the nodule primordia consisted of more cells. Any changes of *MtABCG40* expression due to the systemic autoregulation of nodulation signals were not recorded.

The obtained results indicate that MtABCG40 takes part in the negative regulation of *M. truncatula* lateral root density under nitrogen deprivation. This regulation relies on its ability to reduce RAM cells' sensitivity to root cap cytokinins, which results in the acceleration of primary root growth, and the suppression of lateral roots' initiation that causes their lower number. The number of nodules is reduced by MtABCG40 in a similar manner. The latter phenomenon is local, root-specific and not dependent on systemic signals from the shoot.

Wykaz skrótów

6-BAP – 6-benzyloaminopuryna (ang. *6-benzylaminopurine*)

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

AHK – roślinne receptorowe kinazy histydynowe (ang. *Arabidopsis histidine kinase*)

AMP, ADP, ATP – adenzynomono-, adenzynodi-, adenzynotrifosforan

AON – systemiczna autoregulacja brodawkowania (ang. *autoregulation of nodulation*)

AUX/LAX – importery IAA (ang. *AUXINI/LIKE-AUX1*)

BSA – surowicza albumina bydłęca (ang. *bovine serum albumin*)

CKX – dehydrogenaza/oksydaza cytokinin (ang. *cytokinin dehydrogenase/oxidase*)

CRE1 – receptor cytokinin (ang. *Cytokinin Response 1*)

CYP735A1, CYP735A2 – monooksygenazy cytochromu P450 (ang. *cytochrome P450 monooxygenases*)

cZ – *cis*-zeatyna (ang. *cis-zeatin*)

DHZ – dihydrozeatyna (ang. *dihydrozeatin*)

DMSO – dimetylosulfotlenek (ang. *dimethyl sulfoxide*)

DR5 – syntetyczny promotor indukowany auksynami

DZ – strefa różnicowania (ang. *differentiation zone*)

EdU – 5-etynylo-2'-deoksyurydina (ang. *5-ethynyl-2'-deoxyuridine*)

ER – retikulum endoplazmatyczne (ang. *endoplasmic reticulum*)

EZ – strefa wydłużania korzenia (ang. *elongation zone*)

FC – krotność zmiany (ang. *fold change*)

GAL – β -galaktozydaza (ang. *β -galactosidase*)

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

GUS – β -glukuronidaza (ang. *β -glucuronidase*)

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

iP – izopentenyloadenina (ang. *isopentenyl adenine*)

IPT – transferaza izopentenyłowa (ang. *isopentenyltransferase*)

LBD16 – czynnik transkrypcyjny zależny od auksyn (ang. *ORGAN BOUNDARIES DOMAIN 16*)

LIC – metoda klonowania niezależna od ligacji (ang. *ligation-independent cloning*)

LOG – fosforybohydrolaza katalizująca hydrolizę cytokinin do aktywnych biologicznie wolnych zasad azotowych (ang. *Lonely Guy*)

LRFC – komórki założycielskie korzeni bocznych (ang. *lateral root founder cells*)

MSP – kaskada transferu grup fosforanowych (ang. *multistep phosphorelay*)

MZ – strefa merystematyczna korzenia (ang. *meristematic zone*)

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

NLS – sekwencja kierująca białko do jądra komórkowego (ang. *nuclear localization sequence*)

OD – gęstość optyczna (ang. *optical density*)

OZ – strefa korzenia u podstawy merystemu wierzchołkowego (RAM) wykazująca cykliczne zmiany stężenia i odpowiedzi komórkowej na auksyny (ang. *oscillation zone*)

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

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

PEG – glikol polietylenowy (ang. *polyethylene glycol*)

PI – jodek propidyny (ang. *propidium iodide*)

PIN – eksporter IAA (ang. *PIN-FORMED*)

PUP – permeaza purynowa (ang. *purine permease*)

QC – centrum spoczynkowe (ang. *quiescent center*)

RAM – merystem apikalny korzenia (ang. *root apical meristem*)

RNAi – interferencja RNA (ang. *RNA interference*)

RR – regulator odpowiedzi (ang. *response regulator*)

RT-PCR – ilościowa reakcja łańcuchowa polimerazy w czasie rzeczywistym (ang. *Real-Time PCR*)

Starter F – starter wprost (ang. *forward*)

Starter R – starter odwrócony (ang. *reverse*)

TCS – dwuskładnikowy system transdukcji sygnału (ang. *two-component signalling system*)

TMD – domena transmembranowa (ang. *transmembrane domain*)

Transportery ABC – transportery posiadające kasetę wiążącą ATP (ang. *ATP-binding cassette transporters*)

tZ – *trans*-zeatina (ang. *trans-zeatin*)

TZ – strefa przejściowa korzenia (ang. *transition zone*)

UBI – ubikwityna (ang. *ubiquitin*)

UTR – region nieulegający translacji (ang. *untranslated region*)

Woda MQ – ultraczysta woda laboratoryjna *Milli-Q*

WT – typ dziki (ang. *wild type*)

SPIS TREŚCI

1 WPROWADZENIE LITERATUROWE	15
1.1 Wstęp.....	15
1.2 Rozwój korzenia i zmiany jego morfologii w reakcji na stresy abiotyczne.....	16
1.3 Metabolizm cytokinin i ich percepcja przez komórki	19
1.4 Udział auksyn i cytokinin w negatywnej regulacji procesów morfogenetycznych korzenia.....	24
1.4.1 Wydłużanie korzenia głównego.....	24
1.4.2 Morfogenezę korzenia bocznego	26
1.4.3 Negatywna regulacja brodawkowania	30
1.5 Transport cytokinin w korzeniu	32
1.5.1 Produkcja cytokinin i ich transport ksylemowy	32
1.5.2 Transportery cytokinin z rodziny białek ABC.....	33
1.5.3 Pozostałe transportery cytokinin.....	35
1.6 <i>Medicago truncatula</i> jako organizm modelowy w badaniach podstawowych	36
2. CEL PRACY	40
3. MATERIAŁY I METODY	41
3.1 Materiały.....	41
3.1.1 Szczepy bakteryjne	41
3.1.2 Materiał roślinny.....	42
3.1.3 Wektory	43
3.1.4 Oligonukleotydy	44
3.1.5 Pożywki do hodowli bakterii	47
3.1.6 Pożywki do hodowli roślin	47
3.2 Metody	49
3.2.1 Praca z bakteriami.....	49

3.2.1.1	Hodowla bakterii.....	49
3.2.1.2	Przygotowanie bakterii do długoterminowego przechowywania.....	49
3.2.1.3	Przygotowanie komórek elektrokompetentnych	50
3.2.1.4	Transformacja komórek bakterii metodą elektroporacji.....	50
3.2.2	Praca z materiałem roślinnym.....	51
3.2.2.1	Skaryfikacja i sterylizacja nasion	51
3.2.2.2	Warunki hodowli roślin w doniczkach	51
3.2.2.3	Warunki hodowli roślin <i>in vitro</i>	52
3.2.2.4	Transformacja <i>Medicago truncatula</i> z użyciem bakterii <i>Agrobacterium rhizogenes</i> ..	53
3.2.2.5	Analiza wzoru aktywności promotorów genów w tkankach korzenia	54
3.2.2.6	Grawitropiczna stymulacja inicjacji korzeni bocznych u <i>Medicago truncatula</i>	57
3.2.2.7	Analiza rozmiaru merystemów apikalnych korzeni	58
3.2.2.8	Pomiar stężenia fitohormonów we wierzchołkach wzrostu korzenia.....	58
3.2.2.9	Wyprowadzanie roślin o rozdzielonym systemie korzeniowym	59
3.2.2.10	Inokulacja <i>Medicago truncatula</i> bakteriami symbiotycznymi <i>Sinorhizobium meliloti</i>	60
3.2.2.11	Znakowanie jąder komórek dzielących się z użyciem 5-etynylo-2'-deoksyurydyny .	61
3.2.2.12	Izolacja i transformacja protoplastów z liści mezofilu <i>Arabidopsis thaliana</i>	63
3.2.2.13	Agroinfiltracja komórek mezofilu liści <i>Nicotiana benthamiana</i>	65
3.2.2.14	Eksperymenty transportu	66
3.2.3	Praca z kwasami nukleinowymi	67
3.2.3.1	Izolacja DNA z tkanek roślinnych.....	67
3.2.3.2	Izolacja plazmidowego DNA z bakterii.....	69
3.2.3.3	Izolacja całkowitego RNA z materiału roślinnego	69
3.2.3.4	Ocena stężenia i jakości prób DNA i RNA	69
3.2.3.5	Odwrotna transkrypcja.....	70
3.2.3.6	Reakcja łańcuchowa polimerazy	70

3.2.3.7 Analiza ekspresji genów metodą ilościowej reakcji PCR w czasie rzeczywistym.....	72
3.2.3.8 Genotypowanie mutantów insercyjnych <i>Tnt1</i>	73
3.2.3.9 Przygotowanie konstrukcji genowych	74
3.2.4 Przygotowywanie preparatów mikroskopowych.....	80
3.2.4.1 Barwienie ścian komórkowych jodkiem propidyny	80
3.2.4.2 Odbarwianie preparatów z użyciem wodzianu chloralu.....	81
3.2.5 Analiza statystyczna	82
3.2.6 Numery akcesyjne genów	82
4. WYNIKI	83
4.1 Negatywny wpływ MtABCG40 na gęstość korzeni bocznych u <i>Medicago truncatula</i>	83
4.1.1 Profil ekspresji <i>MtABCG40</i> w organach <i>Medicago truncatula</i>	83
4.1.2 Zależność gęstości korzeni bocznych od ekspresji <i>MtABCG40</i> w wybranych warunkach	83
4.1.3 Analiza gęstości korzeni bocznych <i>mtabcg40</i>	85
4.2 Określenie subkomórkowej lokalizacji białka MtABCG40.....	87
4.3 Transport cytokinin przez MtABCG40.....	88
4.4 Analiza koekspresji <i>MtABCG40</i> i genów biorących udział w aktywacji cytokinin	90
4.4.1 Charakterystyka profilu ekspresji genów <i>Lonely Guy (LOG)</i> u <i>M. truncatula</i>	90
4.4.2 Analiza morfologii korzeni <i>MtABCG40</i> RNAi i <i>MtLOG3</i> RNAi	91
4.4.3 Analiza wzoru ekspresji <i>MtLOG3</i> i <i>MtABCG40</i> w korzeniu	93
4.5 Wpływ MtABCG40 na funkcjonowanie merystemu wierzchołkowego korzenia.....	94
4.5.1 Wpływ mutacji w <i>MtABCG40</i> na długość merystemu wierzchołkowego korzenia.....	94
4.5.2 Analiza stężenia aktywnych cytokinin oraz poziomu ekspresji <i>MtRR4</i> w RAM roślin <i>mtabcg40</i>	95
4.5.3 Wpływ MtABCG40 na stężenie IAA oraz aktywność promotora <i>DR5</i> w RAM	96
4.6 Wpływ MtABCG40 na formowanie korzenia bocznego	97
4.6.1 Analiza zmian ekspresji <i>MtABCG40</i> pod wpływem egzogennej aplikacji IAA	97
4.6.2 Wpływ MtABCG40 na inicjację powstawania korzeni bocznych	98

4.7 Rola MtABCG40 w formowaniu brodawek korzeniowych	100
4.7.1 Analiza wzoru ekspresji <i>MtABCG40</i> w brodawkach	100
4.7.2 Analiza zmian ekspresji <i>MtABCG40</i> po inokulacji <i>Sinorhizobium meliloti</i>	101
4.7.3 Określenie wpływu MtABCG40 na liczbę brodawek u <i>Medicago truncatula</i>	102
4.7.4 Wpływ MtABCG40 na zależną od auksyn inicjację organogenezy brodawek	102
4.7.5 Analiza udziału MtABCG40 w systemicznej regulacji brodawkowania	104
5. DYSKUSJA	107
5.1 Wydłużanie korzenia głównego	107
5.2 Inicjacja organogenezy korzenia bocznego	109
5.3 Inicjacja organogenezy brodawki korzeniowej	114
6. WNIOSKI	117
7. LITERATURA	118
8. ZAŁĄCZNIKI.....	137

1 WPROWADZENIE LITERATUROWE

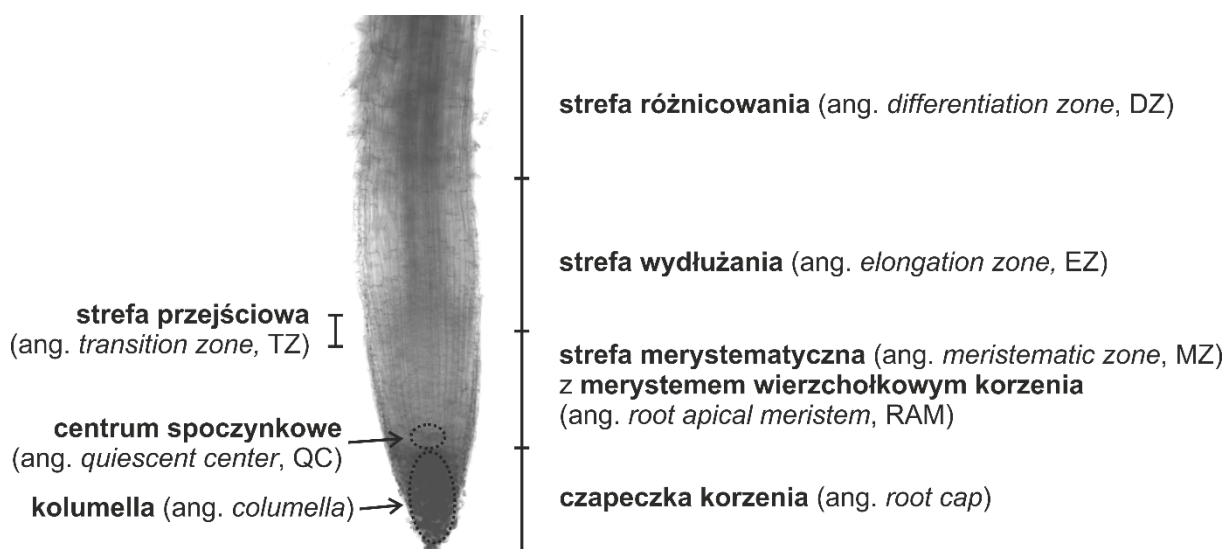
1.1 Wstęp

Osiadły tryb życia roślin powoduje, że są one inaczej niż zwierzęta narażone na niekorzystne działanie środowiska. Wśród stresów abiotycznych silnie ograniczających wzrost i rozwój roślin wymienia się często obniżoną dostępność wody i związków mineralnych (Kant i wsp., 2011; Lamaoui i wsp., 2018). Brak możliwości zmiany miejsca wegetacji sprawia, że rośliny poddane negatywnemu wpływowi środowiska, w tym suszy i niedoborom składników odżywczych, wykorzystują różne strategie obronne, przeciwdziałające ich potencjalnym niekorzystnym następstwom. Do powszechnie spotykanych zarówno u roślin jednorocznych, jak i wieloletnich, mechanizmów obronnych, klasyfikowanych jako element tzw. strategii unikania (ang. *avoidance strategy*) stresu abiotycznego, należą zmiany architektury systemu korzeniowego (dos Santos i wsp., 2022; Giehl i wsp., 2014). Rola korzeni w ochronie całej rośliny przed stresem abiotycznym ma kluczowe znaczenie, gdyż to one odpowiedzialne są za pobieranie wody i składników odżywczych oraz za reakcję na niekiedy bardzo dynamiczne fluktuacje ich dostępności w glebie. Do najczęstszych modyfikacji organów podziemnych w odpowiedzi roślin na stres należy wydłużanie lub skracanie długości korzenia głównego oraz dostosowywanie gęstości korzeni bocznych (Khan i wsp., 2016). Szczególnym przykładem adaptacji systemu korzeniowego do niedoborów związków mineralnych jest dodatkowo wytwarzanie przez rośliny bobowate (*Fabaceae*) wyspecjalizowanych struktur, zwanych brodawkami, zasiedlanych przez bakterie wiążące azot atmosferyczny, co ma za zadanie przeciwdziałać skutkom niedoborów tego pierwiastka w glebie (Roy i wsp., 2020). Warto podkreślić jest również to, że zależna od warunków środowiska produkcja brodawek, podobnie jak zmiany innych parametrów morfologicznych korzenia, jest ostatecznie przede wszystkim wyrazem aktualnej kondycji rośliny, jej wewnętrznego nawodnienia i statusu mineralnego (Gautrat i wsp., 2021). Plastyczność reakcji rośliny na stresy abiotyczne uzależniona jest tym samym od procesów biochemicznych, mających miejsce w jej tkankach, i angażuje wiele związków, w tym hormony roślinne. Synteza, metabolizm, percepcja przez komórki i transport fitohormonów stoją zatem u podstaw fizjologii rośliny, zarówno w optymalnych, jak i niekorzystnych warunkach (Karlova i wsp., 2021).

1.2 Rozwój korzenia i zmiany jego morfologii w reakcji na stresy abiotyczne

Selekcja wysokowydajnych odmian roślin od lat opiera się głównie na bezpośredniej ocenie efektywności ich plonowania, z naciskiem na biomasę części nadziemnych oraz produkcję nasion (Herder i wsp., 2010). Mniejszą uwagę zwraca się natomiast na architekturę systemu korzeniowego oraz zakres jej plastyczności w zmiennych warunkach środowiska. Zwiększenie nacisku na selekcję roślin pod kątem korzystnych parametrów morfologicznych ich organów podziemnych może mieć w przyszłości ogromne znaczenie m.in. dla upraw na glebach mniej zasobnych i przy utrudnionym dostępie do nawozów (Lynch i Brown, 2012). Wybór ten wymagać będzie poznania licznych zależności pomiędzy wyglądem korzenia i warunkami promującymi wzrost i rozwój całej rośliny.

Rozwój systemu korzeniowego rozpoczyna się od pojawienia się korzenia zarodkowego poza łupiną nasienną, co sygnalizuje zakończenie etapu kiełkowania i rozpoczęcie wzrostu rośliny (Carrera-Castaño i wsp., 2020). Korzeń zarodkowy przekształca się następnie w korzeń główny u roślin o palowym systemie korzeniowym (Lynch i Brown, 2012). Dzięki obecności merystemu boczno i wierzchołkowego, korzeń główny przyrastać może odpowiednio na grubość i długość, co wiąże się nierozłącznie z powiększaniem się powierzchni jego kontaktu z materią glebową, będącą głównym źródłem wody i soli mineralnych (Brukhin i Morozova, 2011; Goss i wsp., 1993). Szybkość wydłużania się korzenia głównego jest natomiast wypadkową tempa podziałów komórek merystemu wierzchołkowego (ang. *root apical meristem*, RAM) oraz czasu osiągnięcia przez nie strefy wydłużania (ang. *elongation zone*, EZ) w tzw. strefie przejściowej (ang. *transition zone*, TZ), znajdującej się u podstawy merystemu (Salvi i wsp., 2020) (rycina 1.1). Strefa TZ jest ponadto miejscem, w którym niektóre komórki perycyklu znajdujące się naprzeciwko protoksylemu wiązki przewodzącej przekształcane są w komórki założycielskie korzeni bocznych (ang. *lateral root founder cells*, LRFC). Te ostatnie zdolne są w określonych warunkach środowiska wytworzyć korzenie boczne. Reakcja ta zapoczątkowana może być jednakże dopiero w wyższych partiach korzenia, w tzw. strefie różnicowania (Laskowski i ten Tusscher, 2017). Od częstości tejsze inicjacji i tempa wydłużania korzenia głównego zależy odległość pomiędzy sąsiednimi korzeniami bocznymi (ang. *lateral root spacing*) (de Smet i wsp., 2007; Placido i wsp., 2020; Santos Teixeira i ten Tusscher, 2019).



Rycina 1.1 Budowa wierzchołka wzrostu korzenia. Szczegółowy opis w podrozdziałach 1.2 i 1.4.

Do najczęściej opisywanych zmian morfologii korzenia należą te, które zachodzą przy obniżonych stężeniach związków mineralnych w środowisku. Reakcje tego typu charakterystyczne są m.in. dla azotanów (NO_3^-), których cząsteczki są łatwo wymywane z powierzchniowych warstw gleb (Koevoets i wsp., 2016). U niektórych roślin zaobserwowano w związku z tym wydłużanie korzeni głównych, jak np. u *Medicago truncatula* (Esteban i wsp., 2016; Pellizzaro i wsp., 2014; Zang i wsp., 2020), *Oryza sativa* (Tian i wsp., 2008), czy *Glycine max* (Saito i wsp., 2014). Podobny efekt u *M. truncatula* wywołuje ponadto znaczne obniżenie zawartości jonów amonowych (NH_4^+) lub jednocześnie obu tych jonów (NH_4NO_3) w podłożu (Esteban i wsp., 2016; Lagunas i wsp., 2019). Zmiana liczby korzeni bocznych przy deficycie azotu wydaje się mieć równie duży wpływ na morfologię korzenia. Często dochodzi u roślin do zmniejszenia wartości tego parametru, jak u *O. sativa* (Wang i wsp., 2020), choć są i gatunki, u których się takiego zjawiska nie obserwuje, w tym u *M. truncatula* (Bourion i wsp., 2014; Lagunas i wsp., 2019).

Różnice w reakcji roślin na niedobory związków fosforu względem azotu wynikają przede wszystkim z ich odmiennej mobilności w glebie. Fosfor jest pierwiastkiem trudniej wymywanym przez wodę i akumulującym się w warstwie uprawnej. Skutkuje to koniecznością wytworzenia przez rośliny płytkich systemów korzeniowych. Dzieje się tak np. u *Arabidopsis thaliana*, u której wraz z obniżeniem stężenia jonów PO_4^{3-} dochodzi do skrócenia korzenia głównego, czemu towarzyszy przyrost ilości korzeni bocznych. Te ostatnie charakteryzują się jednocześnie znacznym wzrostem długości (Williamson i wsp., 2001).

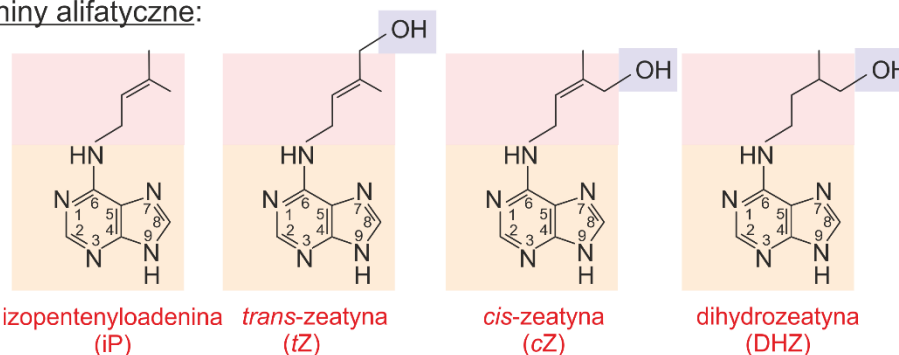
Przykładem dobrze zbadanych morfologicznych reakcji korzeni roślin na stres są te zachodzące w warunkach suszy (Brunner i wsp., 2015; Kang i wsp., 2022; Liang i Harris, 2005). W związku z wysychaniem w pierwszej kolejności powierzchniowych warstw gleby, niektóre z roślin wykształciły zdolność wydłużania korzenia głównego by dotrzeć do jej głębszych i wilgotniejszych warstw. Dzieje się tak np. u *Gossypium hirsutum* i *Zea mays* (Comas i wsp., 2013; Pace i wsp., 1999). Nie jest to jednak jedyna spotykana reakcja. Odpowiedzią *A. thaliana* na egzogenną aplikację kwasu abscysynowego (ABA), hormonu produkowanego u roślin w czasie suszy, jest skracanie korzenia głównego oraz spadek liczby korzeni bocznych (Deak i Malamy, 2005; Dong i wsp., 2020; Liang i Harris, 2005). Odmianą reorganizację architektury korzenia w czasie suszy obserwuje się natomiast u *M. truncatula*. Egzogenna aplikacja ABA wpływa pozytywnie na gęstość jej korzeni bocznych poprzez zwiększanie ich liczby (Herrbach i wsp., 2014; Liang i Harris, 2005).

Wśród innych abiotycznych czynników stresogennych dla roślin wymienia się ponadto wahania temperatury, zasolenie oraz warunki beztlenowe gleb. Ze względu na wahania temperatury niższe niż w przypadku powietrza atmosferycznego, głębsze warstwy gleb uprawnych pełnią nierzadko funkcję ochronną dla gospodarki wodno-mineralnej roślin w czasie upałów i mrozów. Przystosowanie się korzeni roślin do takich warunków obejmuje najczęściej skrócenie ich korzenia głównego oraz zmniejszenie liczby odchodzących od niego korzeni bocznych, skutkujące spadkiem ich gęstości. Jednocześnie wzrasta masa całego korzenia, co spowodowane jest przyrostem korzeni na grubość oraz intensywną produkcją korzeni bocznych wyższego rzędu. Zmiany takie zahamowane są jednak przy zbyt dużych odstępstwach od temperatury optymalnej (Koevoets i wsp., 2016). Jednym z czynników spowalniających wzrost korzenia głównego, jak i korzeni bocznych, jest również wysokie zasolenie (Julkowska i wsp., 2014). Ochroną przed wywoływanym przez nie stresem osmotycznym jest u roślin m.in. zredukowany grawitropizm, mający na celu zahamowanie penetracji korzenia do głębszych i często bardziej zasobnych w sole warstw gleby (Sun i wsp., 2008). Szczególnym przykładem reakcji systemu korzeniowego na stres jest ponadto obniżenie stężenia tlenu w ryzosferze. Warunki takie prowadzą do powstawania korzeni przybyszowych wyposażonych w tkankę aerenchymatyczną, podczas gdy zwykła i nieprzystosowana masa korzeniowa zostaje zredukowana (Gibberd i wsp., 2001).

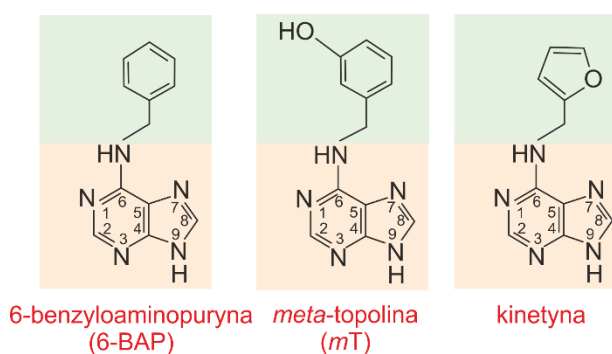
1.3 Metabolizm cytokinin i ich percepcja przez komórki

Cytokiny to pochodne adeniny, u których do grupy aminowej znajdującej się przy atomie azotu w pozycji N⁶ pierścienia aromatycznego dołączony został pięciowęglowy, izoprenowy łańcuch alifatyczny (cytokiny alifatyczne) lub grupa benzylova (cytokiny aromatyczne). Do cytokinin alifatycznych należą wolne zasady azotowe i pochodne *trans*-zeatyny (ang. *trans-zeatin*, *tZ*), *cis*-zeatyny (ang. *cis-zeatin*, *cZ*), isopentyloadeniny (ang. *isopentenyl adenine*, *iP*) i dihydrozeatyny (ang. *dihydrozeatin*, *DHZ*). Do cytokinin aromatycznych zaliczamy benzyloaminopurynę (ang. *benzylaminopurine*, *BAP*) oraz topoliny z ich pochodnymi (Kieber i Schaller, 2014) (rycina 1.2). Pierwotna definicja tej grupy hormonów podkreślała ich zdolność do inicjowania i podtrzymywania podziałów komórek w kulturach zawieszinowych (Caplin i Steward, 1948), jednak nie oddaje ona rzeczywistej złożoności funkcji, jakie cytokiny mogą pełnić u roślin. Ma to swoje potwierdzenie w różnorodności procesów, w których uczestniczą (Kieber i Schaller, 2014). Pierwszą scharakteryzowaną cytokiną była kinetyna (N⁶-furfuryladenina), związek odkryty w latach pięćdziesiątych ubiegłego wieku (Miller i wsp., 1955a; Miller i wsp., 1955b). Pierwszą poznaną roślinną cytokiną była natomiast zeatyna, wyizolowana prawie dwie dekady później z niedojrzałego bielma kukurydzy (Letham, 1973).

Cytokiny alifatyczne:



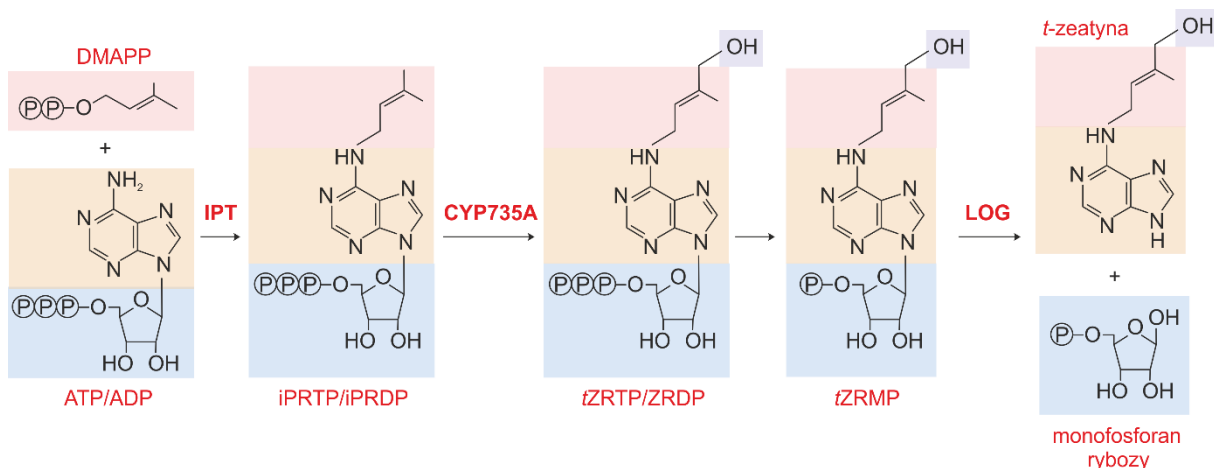
Cytokiny aromatyczne:



Rycina 1.2 Wzory strukturalne cytokinin w formie wolnych zasad azotowych. Górny panel przedstawia cytokiny alifatyczne: izopentyloadeninę (iP), *trans*-zeatynę (tZ), *cis*-zeatynę (cZ) i dihydrozeatynę

(DHZ). Dolny panel przedstawia cytokininy aromatyczne: 6-benzyloaminopurynę (6-BAP), *meta*-topolinę (*mT*) i kinetynę. Na pomarańczowym tle umieszczono adeninę; na różowym i zielonym odpowiednio łańcuchy alifatyczne i aromatyczne; na fioletowym grupę hydroksylową zeatyny. Podana została numeracja atomów pierścieni aromatycznych adeniny.

Różnorodność cytokinin wynika przede wszystkim ze złożoności przemian biochemicznych, jakim podlegają. Przemiany te zaliczyć można do czterech głównych rodzajów reakcji: syntezy *de novo*, koniugacji, aktywacji i degradacji (Kudo i wsp., 2010). Do syntezy *de novo* cytokinin dochodzi w wyniku aktywności enzymów z grupy transferaz izopentenyłowych (ang. *isopentenyltransferase*, IPT). Katalizują one reakcję przyłączania grupy izopentenyłowej, pochodzącej z α,α -dimetyloallilopirofosforanu (DMAPP), do grupy aminowej cząsteczki nukleotydu adeninowego (zwykle ADP lub ATP). Ich aktywność spotykana jest w cytoplazmie, mitochondriach i plastydach (Kasahara i wsp., 2004). Substratem dla części enzymów IPT bywa również tRNA, co ma miejsce w syntezie *de novo* pochodnych *cZ* (Miyawaki i wsp., 2006). Powstałe rybotydy *iP* przekształcane są z udziałem monooksygenaz cytochromu P450 (CYP735A1, CYP735A2) do rybotydów *tZ* poprzez hydroksylację łańcucha izopentenyłowego (Takei i wsp., 2004) (rycina 1.3). Rybotydy *iP* i *tZ* mogą zostać zdefosforylowane do rybozydów przez odpowiednie fosfatazy (Sakakibara, 2006).



Rycina 1.3 Schemat przedstawiający wybrane przemiany cytokinin od biosyntezy *de novo* do aktywacji, na przykładzie *tZ*. Biosynteza cytokinin polega na przeniesieniu reszty prenyłowej z difosforanu dimetylenu (ang. *dimethylallyl diphosphate*, DMAPP) na atom azotu w pozycji N⁶ cząsteczki adenylozotryfosforanu (ATP) lub adenylozodifosforanu (ADP) przez enzym transferazę izopentenyłową (ang. *isopentenyltransferase*, IPT). Tak powstały trifosforan lub difosforan izopentenyloadenozyny (ang. *isopentenyladenine riboside triphosphate/diphosphate*, iPRTP/iPRDP) może zostać następnie poddany hydroksylacji do trifosforanu lub difosforanu rybozydu *trans*-zeatyny (ang. *trans-zeatin riboside triphosphate/diphosphate*, tZRTP/tZRD) z udziałem monooksygenaz cytochromu P450 (ang. *cytochrome P450 monooxygenase*, CYP735A). Powstały z tZRTP/tZRD po defosforylacji monofosforan rybozydu *trans*-zeatyny (ang. *trans-zeatin riboside monophosphate*,

tZRMP) jako forma nieaktywna biologicznie jest przekształcany do aktywnej biologicznie *trans*-zeatyny poprzez hydrolizę wiązania N-glikozydowego, znajdującego się pomiędzy rybozą a zasadą azotową, przez enzymy LOG. Na błękitnym tle umieszczono rybozę z przyłączonymi do niej w pozycji 5' resztami fosforanowymi (oznaczone symbolem $\text{\textcircled{P}}$); na pomarańczowym adeninę; na różowym DMAPP lub łańcuch alifatyczny; na fioletowym grupę hydroksylową *tZ*.

Rybotydy i rybozydy uważane są za formy nieaktywne, pod postacią których cytokininy są magazynowane w komórkach lub transportowane na większe odległości w roślinie (Osugi i wsp., 2017). Formami nieaktywnymi cytokinin są też ich koniugaty z resztami cukrowymi, zwane O- i N-glikozydami. O-glikozylacja bocznego łańcucha zeatyny uważana jest za reakcję odwracalną. N-glikozylacja pierścienia purynowego cytokinin w pozycjach N⁷ i N⁹ uznawana jest za nieodwracalną (Hluska i wsp., 2021).

Do grupy aktywnych cytokinin, zdolnych bezpośrednio do uruchomienia szlaków sygnałowych komórki, zaliczane są jedynie ich wolne formy, zawierające pierścień purynowy z pojedynczym podstawnikiem w pozycji N⁶, w tym *tZ*, iP i 6-BAP (Lomin i wsp., 2015; Romanov i Schmülling, 2022). Mechanizm aktywacji cytokinin zależy od ich wyjściowej postaci. Glikozydy cytokinin aktywowane są poprzez odłączenie reszty cukrowej na drodze hydrolizy z udziałem odpowiednich β -glukozydaz (Brzobohaty i wsp., 1993; Hošek i wsp., 2020). Monofosforany rybozydów aktywowane są natomiast poprzez hydrolizę wiązania N-glikozydowego, znajdującego się pomiędzy rybozą a zasadą azotową, przez enzymy zwane fosforybohydrolazami (ang. *Lonely Guy*, LOG) (rycina 1.3) działające w cytoplazmie i w jądrze komórkowym (Kurakawa i wsp., 2007; Kuroha i wsp., 2009). Główna forma transportowa cytokinin, rybozyd *tZ*, musi zostać wcześniej ufosforylowana do monofosforanu przez odpowiednie kinazy adenozynowe (ang. *adenosine kinase*, ADK), by mogła zostać przekształcona do formy aktywnej przez enzymy LOG. Co ważne, substratem dla tej grupy enzymów może być jedynie cytokinina, a nie AMP, co świadczy o wyraźnej specyficzności enzymów LOG w stosunku do cząsteczek tego hormonu (Kuroha i wsp., 2009). W literaturze natrafić można poza tym na wzmiankę o możliwym drugim, pośrednim szlaku aktywacji monofosforanów rybozydów. Jak się przypuszcza, miałyby być one przekształcane do rybozydów, a następnie do wolnych zasad azotowych przez odpowiednio nukleotyduazy i nukleozyduazy. Badania z użyciem tych dwóch rodzajów enzymów, pozyskanych z zarodka pszenicy dowiodły, iż nie są one tak specyficzne jak enzymy LOG, i oprócz cytokinin hydrolizują również adenozynę i ATP. Nie odnaleziono jednak dotychczas genów, które mogłyby je kodować u roślin (Chen i Kristopeit, 1981a; Chen i Kristopeit, 1981b).

Cytokinininy podlegają ponadto reakcji nieodwracalnej degradacji, w której, w przeciwieństwie do reakcji przyłączania reszty izopentenylowej, usuwany jest boczny łańcuch w pozycji N⁶ zasady azotowej, a produktem reakcji jest adenina lub adenozyne. Enzymami katalizującymi tę reakcję są dehydrogenazy/oksydazy cytokinin (ang. *cytokinin dehydrogenase/oxidase*, CKX), znajdujące się w apoplacie, cytoplazmie i wakuoli (Werner i wsp., 2006).

Percepcja aktywnych form cytokinin przez komórki roślinne opiera się na szlaku sygnałowym przypominającym ten, z udziałem którego sygnały środowiskowe odbierają komórki bakterii (Stock i wsp., 2000). Szlak ten nazwano dwuskładnikowym systemem transdukcji sygnału (ang. *two-component signalling system*, TCS) ze względu na dwa główne budujące go składniki, czyli zakotwiczoną w błonie kinazę z funkcją receptorową oraz białkowy regulator odpowiedzi w jądrze komórkowym (ang. *response regulator*, RR), które odpowiednio zapoczątkowują i kończą szlak, uruchamiając aktywność transkrypcyjną komórki. W szlaku tym, przyłączenie się cząsteczki sygnałowej powoduje autofosforylację receptora w miejscu silnie zakonserwowanej histydyny (His). U bakterii, jon fosforanowy (PO_4^{3-}) z His zostaje następnie bezpośrednio przeniesiony na resztę kwasu asparaginowego (Asp) budującego odpowiedni regulator odpowiedzi, aktywując go tym samym transkrypcyjnie (Stock i wsp., 1989). U roślin przeniesienie PO_4^{3-} z receptora na RR angażuje jednak dodatkowo inne białka, przez co jest to system bardziej złożony, składający się z wielu następujących po sobie reakcji fosforylacji (ang. *multistep-phosphorelay*, MSP) (Pekárová i wsp., 2016). Reszta fosforanowa przyłączona w wyniku autofosforylacji do His domeny kinazowej receptora przenoszona jest następnie na resztę Asp dodatkowej, charakterystycznej dla roślin domeny tego samego receptora, zwanej domeną akceptorową (Kakimoto, 2003; Yamada i wsp., 2001). Następnie PO_4^{3-} łączony jest ze znajdującymi się w cytoplazmie komórki białkami fosfotransferowymi zawierającymi His (ang. *His-containing phosphotransfer protein*, HP) (Hutchison i wsp., 2006). Białka HP przemieszczają się w kolejnym etapie do wnętrza jądra komórkowego, by podobnie jak u bakterii, fosforylować RR jako ostatni element szlaku MSP (Imamura i wsp., 1999). Białka RR typu B to czynniki transkrypcyjne, zbudowane na C-końcu z domen biorących udział w ich wiązaniu z DNA, uruchamianiu transkrypcji oraz w wyznaczaniu lokalizacji jądrowej (Kieber, 2002). RR typu B odpowiedzialne są za uruchomienie specyficznej dla danego rodzaju sygnału środowiskowego odpowiedzi komórkowej, w tym za wzmacnianie charakterystycznego dla cytokinin wpływu na aktywność transkrypcyjną komórki (Argyros i wsp., 2008). Aktywność RR typu B jest jednocześnie hamowana na zasadzie ujemnego sprzężenia zwrotnego przez RR typu A (To i wsp., 2004). RR typu A nie są

czynnikami transkrypcyjnymi, gdyż nie posiadają charakterystycznego motywu umożliwiającego wiązanie do DNA. Mechanizm działania RR typu A opiera się prawdopodobnie na możliwości kompetencyjnego przechwytywania przez te białka jonu fosforanowego na ostatnim etapie MSP, przez co nie jest on dostępny dla RR typu B (Dortay i wsp., 2006; Zubo i Schaller, 2020).

Roślinne receptory cytokinin to białka transbłonowe, które składają się, obok wcześniej wspomnianych domen biorących udział w przenoszeniu reszt fosforanowych, z co najmniej dwóch domen przezbłonowych oraz z domeny receptorowej CHASE (ang. *cyclases/histidine kinases-associated sensing extracellular domain*), znajdującej się poza błoną, w świetle retikulum endoplazmatycznego (ang. *endoplasmic reticulum*, ER) lub przestrzeni międzykomórkowej. Receptory te mogą być zatem zakotwiczone w dwóch rodzajach błon, błonie komórkowej oraz błonie ER, a możliwość ich koegzystencji w komórce roślinnej jest od lat przedmiotem żywej dyskusji (Durán-Medina i wsp., 2017; Kubiasová i wsp., 2020; Osugi i Sakakibara, 2015). Wyniki dotychczasowych badań wskazują na błony ER jako główne miejsce, w którym zlokalizowane są receptory cytokinin (Caesar i wsp., 2011; Romanov i wsp., 2006; Wulfetange i wsp., 2011). Sugeruje to m.in. zwiększona wydajność wiązania cytokinin do receptorów w warunkach obojętnego i lekko zasadowego pH (7,0-8,0), które odpowiada odczynowi wnętrza komórki. Obniżenie wiązania hormonu obserwuje się przy odczynie kwasowym (4,5-6,0), charakterystycznym dla apoplastu, czyli miejsca wiązania ligandów przez receptory błony komórkowej (Romanov i wsp., 2006). Co warte uwagi, w ostatnich latach częściej podkreśla się jednak obecność i znaczenie receptorów cytokinin w błonach komórkowych komórek o charakterze merystematycznym (Kubiasová i wsp., 2020; Zürcher i wsp., 2016).

Pierwszym ze zidentyfikowanych roślinnych receptorów cytokinin był wspomniany wcześniej CRE1/AHK4 (ang. *Cytokinin Response 1/Arabidopsis Histidine Kinase 4*) u *A. thaliana*. Już w momencie odkrycia została mu przypisana zdolność inicjowania komórkowego szlaku sygnałowego zależnego od cytokinin, przez co rośliny z mutacją w obrębie tego receptora (*cre1*) charakteryzują się obniżoną wrażliwością na cytokininy (Inoue i wsp., 2001; Suzuki i wsp., 2001). W genomie *Arabidopsis* zakodowane są ponadto dwa dodatkowe receptory cytokinin, AHK2 i AHK3. Podobnie jak w przypadku innych rodzin białek, receptory te pełnią wiele wspólnych, redundantnych funkcji, o czym wnioskować można m.in. z ich silnie zakonserwowanej struktury. W efekcie fenotyp mutantów pojedynczych AHK bywa często niezauważalny. Dzieje się tak m.in. w przypadku ich udziału w inicjacji morfogenezy korzenia

bocznego (Chang i wsp., 2013; Nishimura i wsp., 2004; Ueguchi i wsp., 2001). Ortologi rodziny AHK zostały znalezione i scharakteryzowane także u innych roślin. *M. truncatula* posiada trzy tego typu receptory, HK2, HK3 i CRE1, który jest najbliższym homologiem CRE1 u *A. thaliana*. To właśnie temu ostatniemu przypisywana jest główna rola w regulacji procesów morfogenetycznych korzenia (Gonzalez-Rizzo i wsp., 2006).

1.4 Udział auksyn i cytokinin w negatywnej regulacji procesów morfogenetycznych korzenia

1.4.1 Wydłużanie korzenia głównego

Wydłużanie korzenia głównego pozwala roślinie na penetrację głębszych warstw gleby w poszukiwaniu niezbędnych do życia związków mineralnych i wody (Koevoets i wsp., 2016). Tempo przyrostu korzenia na długość przejawia się przede wszystkim w zmianach morfologii jego dystalnej części, zwanej wierzchołkiem (stożkiem) wzrostu. Addytywny efekt szybkości podziałów i wzrostu elongacyjnego (wydłużeniowego) komórek w tej części korzenia pozwala dostosować jego morfologię do zmiennych warunków środowiska oraz wewnętrznych sygnałów znamionujących aktualną kondycję rośliny (Colombi i wsp., 2018; Hodge, 2004).

Złożoność budowy wierzchołka wzrostu korzenia odzwierciedla różnorodność pełnionych przez niego funkcji. Najbardziej dystalną częścią korzenia jest merystem wierzchołkowy, którego centrum organizacyjnym jest grupa komórek zwana centrum spoczynkowym (ang. *quiescent center*, QC), którego obecność zapewnia utrzymanie pluripotentnego charakteru przez otaczające komórki merystematyczne. Merystem wierzchołkowy z zewnątrz okrywają komórki czapeczki, będącej strukturą pełniącą liczne funkcje. Zapewnia ona ochronę mechaniczną korzenia, penetrację i percepcję statusu mineralnego gleby oraz uczestniczy w metabolizmie endogennych związków, wliczając hormony roślinne. Powyżej QC znajduje się strefa MZ będąca miejscem intensywnych podziałów komórkowych, kończących się na granicy ze strefą EZ, w której nowo powstałe komórki przestają się dzielić i zaczynają wydłużać. Region pomiędzy aktywnie dzielącymi się komórkami merystemu a komórkami wydłużającymi się zwany jest strefą TZ (rycina 1.1). Jest to miejsce ważne z punktu widzenia kontroli dynamiki wzrostu wydłużeniowego korzenia i kontrolowane przez różnorodne czynniki, w tym przez hormony roślinne (Li i wsp., 2021; Overvoorde i wsp., 2010)).

Auksyny uznawane są za główny hormon regulujący morfologię i funkcje wierzchołka wzrostu korzenia. Związane jest to nierozdzielnie ze zmianami kierunku ich przemieszczania się w

obrębie tkanek wierzchołka, które stały się podstawą zaproponowanego po raz pierwszy w 2003 roku modelu „odwróconej fontanny” (ang. *reverse fountain model*) (Swarup i Bennett, 2003). W modelu tym auksyny transportowane są akropetalnie z części nadziemnych rośliny floemem wiązki przewodzącej w kierunku komórek wierzchołka wzrostu korzenia. Osiągając komórki czapeczki, kierunek ich przemieszczania się ulega zmianie i kierowane są one bazypetalnie poprzez komórki epidermy i kory pierwotnej wierzchołka ponownie do wiązki przewodzącej w okolicach TZ. Transport ten możliwy jest dzięki asymetrycznej dystrybucji białkowych transporterów w błonach komórkowych, przez co zwany też polarnym transportem auksyn (ang. *polar auxin transport, PAT*). Głównymi transporterami umożliwiającymi PAT są zlokalizowane w błonach komórkowych po przeciwnych stronach komórki białka z rodziny AUX1/LAX (ang. *AUXINI/LIKE-AUX1*) oraz PIN (ang. *PIN-FORMED*), będące odpowiednio importerami oraz eksporterami auksyn. Tak ukierunkowany transport pozwala na utworzenie w obrębie merystemu apikalnego korzenia gradientu stężeń auksyn z maksimum zlokalizowanym w QC oraz przyległych do niego komórkach czapeczki korzenia. Gradient ten ma kluczowe znaczenie m.in. dla utrzymania funkcji merystemu, jego aktywności podziałowej oraz tempa wydłużania komórek w strefie elongacji (Barbez i wsp., 2017; Bensmihen, 2015). Wykorzystanie mutantów defektywnych w genach odpowiadających za biosyntezę auksyn (*WEI8*, *TAR2*) pozwoliło stwierdzić ponadto, że elementem niezwykle ważnym dla prawidłowego rozwoju wierzchołka wzrostu korzenia jest również lokalne powstawanie tego hormonu w komórkach QC i czapeczki. Zaburzenie biosyntezy auksyn w tych komórkach prowadzi m.in. do degeneracji merystemu apikalnego (Brumos i wsp., 2018).

Interakcja auksyn z innymi hormonami roślinnymi niezbędna jest do prawidłowego funkcjonowania wierzchołka wzrostu korzenia. Rola cytokinin wydaje się mieć tu kluczowe znaczenie. Świadczyć o tym może chociażby ich synteza z udziałem enzymów IPT oraz LOG w komórkach czapeczki korzenia, w bezpośrednim sąsiedztwie aktywnych podziałowo komórek merystemu apikalnego oraz dobrze poznany wpływ, jaki wywierają na regulację poziomu auksyn oraz ich dystrybucję na poziomie komórki (Aloni i wsp., 2005; Kuroha i wsp., 2009; Miyawaki i wsp., 2006). Egzogenna aplikacja cytokinin, podobnie jak nadekspresja genów *IPT*, odpowiedzialnych za ich syntezę, przyczynia się do wzrostu biosyntezy auksyn w młodych, rozwijających się wierzchołkach wzrostu korzenia. Odwrotny efekt osiąga się poprzez nadekspresję genów *CKX*, degradujących cytokininy. Obserwacje te są sprzeczne z widocznym w przypadku wielu innych procesów antagonizmem obu hormonów i świadczą prawdopodobnie o roli cytokinin w zapewnieniu odpowiedniego poziomu auksyn, niezbędnego

do funkcjonowania korzenia (Brumos i wsp., 2018; Jones i wsp., 2010). Pomimo pozytywnego wpływu na syntezę auksyn, obecność cytokinin powoduje jednocześnie formowanie koniugatów IAA z aminokwasami, głównie z kwasem glutaminowym (IAA-Glu) i asparaginowym (IAA-Asp), poprzez indukcję genów kodujących enzymy z rodziny GH3 (Gretchen Hagen 3) w czapeczce korzenia. Obniża to poziom auksyn docierających do strefy TZ i EZ (Staswick i wsp., 2005). Cytokiny obniżają ponadto ekspresję genów kodujących transportery z rodzin PIN i AUX1/LAX odpowiedzialnych za PAT oraz hamują dokowanie ich białek w błonach komórkowych, przez co destabilizują gradient auksyn w obrębie korzenia (Růžička i wsp., 2009). Negatywny wpływ cytokinin na dystrybucję auksyn wzmacniany jest dodatkowo poprzez indukcję ekspresji genów dla wewnątrzkomórkowych transporterów PIN oraz PILS (PIN-LIKES) (Di Mambro i wsp., 2019). Zaburzony transport auksyn, podobnie jak tworzenie nieaktywnych koniugatów auksyn, obniża tempo proliferacji komórek merystemu apikalnego, hamuje wydłużanie komórek strefy EZ, przyspieszając jednocześnie różnicowanie komórek, przez co negatywnie wpływa na rozmiar merystemu i wierzchołka wzrostu korzenia (Di Mambro i wsp., 2017; Pierdonati i wsp., 2019).

1.4.2 Morfogeneza korzenia bocznego

Udział cytokinin w inicjowaniu oraz w procesie formowania się korzenia bocznego opiera się, podobnie jak w przypadku wielu innych procesów zachodzących u roślin, przede wszystkim na ich antagonistycznym w stosunku do auksyn oddziaływaniu na tempo podziałów zachodzących w primordium oraz na późniejszych etapach morfogenezy (Jing i Strader, 2019; Schaller i wsp., 2015). Auksyny uważane są za główny z hormonów regulujących powstawanie korzeni bocznych, którego działanie modulowane może być przez obecność innych związków, w tym cytokinin, co stanowi ważny element wpływający na plastyczność morfologii korzenia w odpowiedzi na kondycję rośliny oraz warunki środowiskowe (Mroue i wsp., 2018)

Miejsce powstania przyszłego korzenia bocznego zostaje ściśle zdefiniowane już w chwili różnicowania się tkanek z komórek merystemu wierzchołkowego korzenia, w jego strefie TZ. Strefa ta zwana jest także strefą oscylacji (ang. *oscillation zone*, OZ) ze względu na zachodzącą w niej w regularnych odstępach czasu zmianę wrażliwości komórek na auksyny (co 15 godzin u *A. thaliana*), jak również obserwowane wahania poziomu ekspresji genów (de Smet i wsp., 2007; Moreno-Risueno i wsp., 2010). Źródłem wspomnianych fluktuacji jest tzw. programowana śmierć komórek, zachodząca w najbardziej proksymalnych i najstarszych komórkach czapeczki korzenia. W wyniku ich apoptozy dochodzi do uwalniania auksyn, co

wpływa w sposób istotny na aktywność przyległych do czapeczki komórek strefy TZ/OZ, w tym na pojawienie się komórek zdolnych do utworzenia korzenia bocznego spośród komórek perycyklu sąsiadujących z protoksylemem nowopowstałego fragmentu wiązki przewodzącej, czyli LRFC. Co warte uwagi, wykorzystanie konstrukcji reporterowej TCS:GFP pozwoliło stwierdzić, że korzeń *Arabidopsis* w strefie OZ charakteryzuje się obniżoną w stosunku do sąsiadujących komórek wrażliwością na cytokininy. Sugeruje to konieczność obniżenia przez roślinę hamującego wpływu cytokinin w strefie OZ, by nie zakłócały one wczesnych etapów rozwoju korzenia ważnych dla pozycjonowania przyszłych korzeni bocznych (Bielach i wsp., 2012; de Smet i wsp., 2007; Xuan i wsp., 2016).

Położenie LRFC względem merystemu wierzchołkowego korzenia zmienia się wraz ze wzrostem korzenia na długość, lecz dopiero w strefie DZ komórki te mogą wejść w fazę podziałową i utworzyć funkcjonalny zawiązek korzenia bocznego (Herrbach i wsp., 2014; Laskowski i ten Tusscher, 2017). Zainicjowanie podziałów komórek LRFC zależy od wielu czynników, takich jak m.in. dostępność wody i związków mineralnych w glebie, wynikające z tego nawodnienie i status mineralny rośliny, jak i czynnik mechaniczny w postaci regularnych zakrzywień korzenia (Laskowski i wsp., 2008). Wzajemna interakcja hormonów roślinnych pozwala natomiast na precyzyjną integrację informacji o panujących warunkach i ewentualnym zapoczątkowaniu bądź zablokowaniu wczesnych etapów morfogenezy korzenia bocznego. Wśród hormonów biorących udział w tego rodzaju regulacji znajdują się auksyny, cytokininy oraz ABA (Fukaki i Tasaka, 2009).

Auksyny to pozytywny regulator formowania korzeni bocznych, indukujący zmiany prowadzące do pierwszego podziału LRFC. Zwiększone stężenie auksyn w komórkach LRFC, będące wynikiem działania importerów auksyn, takich jak AUX1 oraz syntezy hormonu *de novo* we wnętrzu LRFC, prowadzi do połączenia hormonu z jądrowymi receptorami TIR1/AFB1–3 (ang. *TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE1/AUXIN SIGNALLING F-BOX PROTEIN1–3*). Przyczynia się to do uwolnienia odpowiednich czynników transkrypcyjnych z rodziny ARF (ang. *AUXIN RESPONSE FACTOR*) z ich dimerów z białkami AUX/IAA (ang. *AUXIN/INDOLE-3-ACETIC ACID*), dzięki czemu mogą one regulować ekspresję genów zależnych od auksyn, w tym genów kodujących białka rodziny LBD/ASL (ang. *LATERAL ORGAN BOUNDARIES-DOMAIN/ASYMMETRIC LEAVES-LIKE*) (Okushima i wsp., 2007; Skalický i wsp., 2018). Jednym z nich jest chociażby białko LBD16, ważny czynnik transkrypcyjny, niezbędny do zapoczątkowania pierwszego podziału LRFC (Goh i wsp., 2012). Synteza auksyn *de novo* w komórkach LRFC odbywa się natomiast z udziałem enzymów tzw.

szlaku zależnego od tryptofanu, aminotransferazy tryptofanowej (ang. *tryptophan aminotransferase*, TAA) oraz białek należących do bogatej rodziny monooksygenaz flawinowych YUCCA (ang. *YUCCA flavin containing monooxygenases*). Tryptofan zostaje z udziałem TAA przekształcony do kwasu indolilo-3-pirogronowego (IPA), a IPA kolejno do kwasu indolilo-3-octowego przez enzymy YUCCA (Zhao, 2012). Następstwem wzrostu stężenia auksyn oraz uruchomienia zależnego od nich szlaku sygnałowego jest zapoczątkowanie pierwszego podziału komórek LRFC (Dubrovsky i wsp., 2008).

Pozytywny wpływ auksyn na inicjację morfogenezy korzenia bocznego wzmacniają ponadto u *Medicago* stężenia egzogennie aplikowanego ABA poniżej 10 μM (stężenie 50 μM działa hamująco). Hormon ten powstające głównie we wiązkach przewodzących, zarówno części nadziemnych, jak i korzenia np. w czasie suszy (Ariel i wsp., 2010; Gonzalez i wsp., 2015; Hartung i wsp., 2002). Wpływ ABA na morfologię korzenia zależny jest jednak silnie od gatunku rośliny i może hamować powstawanie korzeni bocznych nawet przy stężeniu 1 μM , co ma miejsce np. u *Arabidopsis* (Liang i Harris, 2005). Z tego też powodu znalezienie uniwersalnych zależności pomiędzy aktywnością auksyn i ABA w formowaniu korzeni bocznych wydaje się być niezwykle trudne. Niemniej, analiza mutantów w genach ważnych dla biosyntezy, transportu, czy szlaków sygnałowych ABA wskazuje na powszechną dla wielu roślinnych procesów rozwojowych zależność aktywności auksyn od obecności ABA, nie odwrotnie (Brady i wsp., 2003; Emenecker i Strader, 2020).

O wiele dokładniej od ABA działanie auksyn scharakteryzowane zostało w kontekście ich interakcji z cytokininami. Obecność cytokinin spowalnia reakcję komórek LRFC na auksyny i bywa czynnikiem decydującym o zahamowaniu ich pierwszego podziału (Laplaze i wsp., 2007). Cytokiny przyczyniają się do zwiększania odległości pomiędzy sąsiadującymi korzeniami bocznymi powstającymi wzdłuż korzenia głównego (ang. *lateral root spacing*). Synteza cytokinin zachodzi intensywniej w miejscach sąsiadujących z powstałymi wcześniej korzeniami bocznymi, co u *A. thaliana* ma swój wyraz w podwyższonej ekspresji genów z rodziny *IPT* i *LOG*. Obserwacje aktywności szlaków sygnałowych cytokinin i auksyn z użyciem odpowiednio konstrukcji reporterowych TCS:GFP oraz DR5:GFP potwierdziły obniżenie wrażliwości komórek LRFC na cytokiny z jednoczesnym wzrostem ich reakcji na auksyny (Bielach i wsp., 2012). Nadekspresja genu *CKX1*, kodującego enzym degradujący cytokiny oraz mutacja w genie *CYP735A*, skutkująca obniżeniem poziomu *tZ*, również powodują zaburzenia w regularnym rozmieszczeniu korzeni bocznych (Chang i wsp., 2015). Zaburzona percepcja cytokinin w mutantach receptorów CRE1 u *Medicago* skutkuje natomiast

zwiększeniem ilości powstających korzeni bocznych (Gonzalez-Rizzo i wsp., 2006). Wpływ cytokinin na komórki LRFC i inne otaczające je tkanki skutkuje przede wszystkim zaburzeniem prawidłowej dystrybucji auksyn, wymaganej dla inicjacji korzenia bocznego. Dzieje się to na drodze hamowania polarnego transportu auksyn, poprzez obniżanie ekspresji genów kodujących transportery PIN (np. *PIN1*) oraz hamujący wpływ na lokowanie się tych białek w błonie komórkowej (el-Showk i wsp., 2015; Laplaze i wsp., 2007; Šimášková i wsp., 2015). Analiza ekspresji genów cyklin, będących białkami uczestniczącymi w mających miejsce podziałach komórkowych dowiodła również, że aktywność cytokinin wpływa ponadto na zatrzymanie podziałów LRFC, powodując ich blokadę w fazie G2 cyklu komórkowego, bezpośrednio poprzedzającej mitozę (Francis, 2007; Li i wsp., 2006).

Wzrost korzenia bocznego (ang. *lateral root outgrowth*), zaczynający się tuż po pierwszym, inicjalnym podziale komórkowym, obejmuje sekwencję kolejnych następujących po sobie podziałów, wśród których zarówno u *A. thaliana*, jak i u *M. truncatula*, wyróżniono siedem głównych etapów. Ostatni z nich ma miejsce tuż przed wydostaniem się korzenia bocznego na powierzchnię epidermy (ang. *lateral root emergence*), kiedy to korzeń boczny posiada już anatomiczną strukturę korzenia głównego (Herrbach i wsp., 2014; Malamy i Benfey, 1997)

Podobnie jak w przypadku powstawania LRFC oraz inicjacji, udział auksyn jest kluczowym elementem regulującym formowanie primordium i dojrzałego korzenia bocznego. Odpowiedź komórek na auksyny, zwizualizowana przy użyciu genów reporterowych pod promotorem DR5, widoczna jest przede wszystkim w komórkach wczesnego primordium oraz na późniejszych etapach, w miejscach powstawania wiązki przewodzącej oraz merystemu wierzchołkowego (Herrbach i wsp., 2014). Formowanie odpowiedniego gradientu auksyn możliwe jest dzięki aktywności transporterów błonowych, w tym importera AUX1 i eksportera PIN1 (Benková i wsp., 2003; Marchant i wsp., 2002). Produkcja auksyn w nowo powstałym primordium wpływa ponadto m.in. na ekspresję LAX3, innego importera auksyn, w komórkach przyległej kory pierwotnej. Umożliwia to rozluźnienie sąsiednich komórek, co jest jednym z czynników umożliwiających późniejsze wydostanie się korzenia bocznego na powierzchnię epidermy korzenia głównego (Swarup i wsp., 2008; van Gelderen i wsp., 2018).

Cytokininy osłabiają gradient auksyn obecny w formującym się primordium korzenia bocznego. Ma to związek, podobnie jak w przypadku wierzchołka wzrostu korzenia głównego, z wpływem jaki wywierają na powstawanie i aktywność transporterów PIN, zarówno wewnątrzkomórkowych, jak i tych w błonach komórkowych. Potwierdzono ponadto, że zmiany

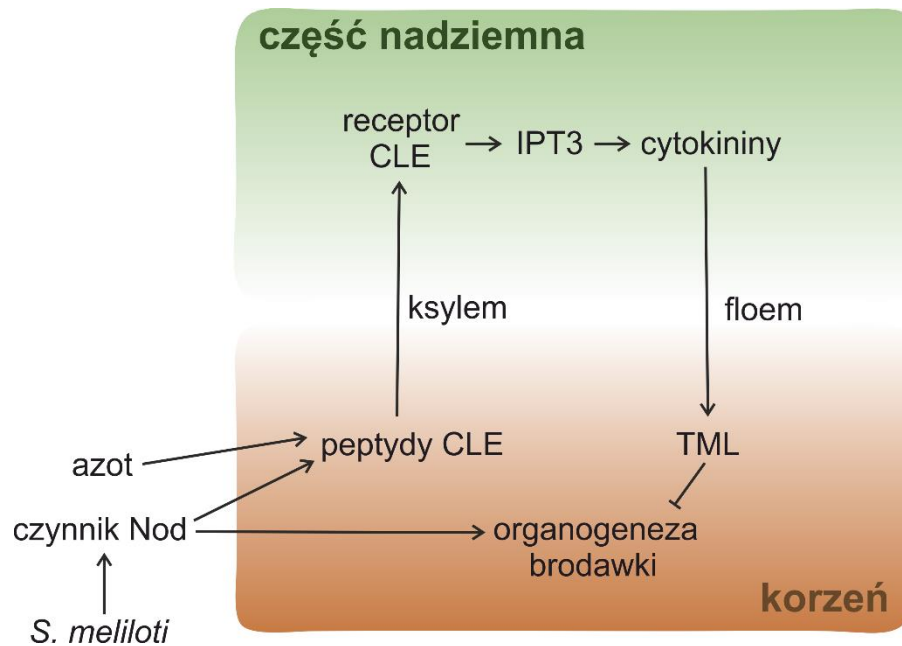
te zależne są od receptorów dla cytokinin (Marhavý i wsp., 2011; Růžička i wsp., 2009). Efekt działania cytokinin widoczny jest w postaci mniej wyraźnego i rozmytego wzoru DR5:GUS, a sygnał charakterystyczny dla wierzchołka primordium często zanika (Laplaze i wsp., 2007).

1.4.3 Negatywna regulacja brodawkowania

Rośliny bobowate nawiązują symbiozę z Gram-ujemnymi bakteriami symbiotycznymi, zwanymi zbiorczo rhizobiami, zdolnymi do przekształcania azotu atmosferycznego (N_2) do jego formy amonowej (NH_4^+), która może być dalej metabolizowana w organizmie roślinnym. Proces ten zachodzi w warunkach niskiej dostępności azotu glebowego, pod wpływem którego korzeń rośliny produkuje i wydziela do ryzosfery flawonoidy. Pod wpływem flawonoidów w komórkach bakterii symbiotycznych zainicjowana zostaje synteza i sekrecja lipochitooligosacharydowych cząsteczek czynnika Nod (ang. *Nod factor*), które przyczyniają się bezpośrednio do zapoczątkowania formowania brodawki (Cooper, 2007; Sugiyama i wsp., 2007). Poprzez połączenie się czynnika Nod z receptorami na powierzchni ryzodermi dochodzi do uruchomienia specyficznego szlaku sygnałowego, skutkującego m.in. produkcją aktywnych form cytokinin (*tZ*, *iP*) w komórkach ryzodermi i kory pierwotnej. Pod wpływem cytokinin dochodzi do powstawania flawonoidów (kemferol, izolikwiritigenina, itp.), które powodują zahamowanie PAT (Ng i wsp., 2015). Akumulacja auksyn doprowadza do zapoczątkowania podziałów komórek perycyklu, endodermi oraz wewnętrznej warstwy kory pierwotnej, co skutkuje powstaniem brodawki korzeniowej. Jest ona, poprzez wytworzenie nici infekcyjnych, zasiedlana przez bakterie symbiotyczne, które przekształcają się w bakteroidy i dzięki syntezie enzymu nitrogenazy, prowadzą asymilację azotu atmosferycznego z powietrza (Buhian i Bensmihen, 2018).

Wiązanie azotu atmosferycznego zachodzące w brodawce korzeniowej wymaga energetycznego nakładu ze strony rośliny, która przeznaczając część produktów fotosyntezy na funkcjonowanie bakteroidów (Clarke i wsp., 2014). Z tego też powodu symbioza bobowatych z rhizobiami wiąże się ze strony rośliny z koniecznością zapewnienia negatywnych mechanizmów kontrolujących liczbę powstających brodawek. Jednym z nich jest stopniowe hamowanie tworzenia nici infekcyjnych w ryzodermie. Proces ten związany jest z produkcją cytokinin na wczesnych etapach brodawkowania i ich percepcją w korze pierwotnej, a w konsekwencji również z produkcją etylenu (Miri i wsp., 2019). Infekcja bakterii symbiotycznych inicjuje ponadto w korzeniu syntezę peptydów z rodziny CLE (ang. *CLAVATA3/EMBRYO SURROUNDING REGION-RELATED*), które jako mobilne cząsteczki

sygnałowe wędrują ksylemem do części nadziemnych rośliny, by tam połączyć się z odpowiednimi receptorami LRR-RLK (ang. *LEUCINE-RICH REPEAT RECEPTOR-LIKE KINASE*). Receptory te zostały zidentyfikowane m.in. u *M. truncatula* jako białka SUNN (ang. *SUPER NUMERIC NODULES*) (Okamoto i wsp., 2009; Schnabel i wsp., 2005). Ich aktywacja skutkuje produkcją cząsteczek, które transportowane są z powrotem do korzenia, by poprzez produkcję białka TML (ang. *TOO MUCH LOVE*) w korzeniu hamować powstawanie nadmiarowej dla rośliny liczby brodawek (ang. *shoot-derived inhibitor*, SDI). Natura tych cząsteczek nie została jednak dokładnie poznana. Wśród nich proponuje się głównie pochodne izopentyloadeniny i microRNA (Jin i wsp., 2012; Magori i wsp., 2009; Okuma i wsp., 2020; Sasaki i wsp., 2014). Co warte uwagi, produkcja peptydów CLE w korzeniu zachodzi także pod wpływem wysokich stężeń azotu. Azotany w sposób plejotropowy kontrolują ponadto kolejne etapy brodawkowania, przez co proces ten jest wyhamowywany, gdy zwiększa się ich dostępność w glebie. Wpływają one m.in. na wydajność wiązania azotu atmosferycznego przez nitrogenazę. Pojawienie się azotanów w otoczeniu ma ogromne znaczenie dla wzrostu i rozwoju całej rośliny, dlatego też transportowane są one do części nadziemnych jednocześnie jako składnik odżywczy i cząsteczka sygnałowa (Lebedeva i wsp., 2020; Lin i wsp., 2021; Nishida i Suzaki, 2018). Co ważne, pobierane przez korzeń azotany indukują produkcję cytokinin, które również pełnią funkcję systemicznego sygnału na drodze korzeń-część nadziemna (Rahayu i wsp., 2005) (rycina 1.4).



Rycina 1.4 Schemat mechanizmu systemicznej autoregulacji brodawkowania (ang. *autoregulation of nodulation*, AON). AON indukowany jest w obecności bakterii symbiotycznych lub w wyniku suplementacji azotu. Czynniki te indukują produkcję peptydów CLE w korzeniu. CLE transportowane są elementami ksylemu do części nadziemnych, gdzie łączą się z właściwymi sobie receptorami i, poprzez indukcję *IPT3*, inicjują produkcję cytokinin, będących pochodnymi iP. Cytokiny te przemieszczają się następnie z powrotem do korzenia, by hamować proces brodawkowania z udziałem m.in. białka TML.

1.5 Transport cytokinin w korzeniu

1.5.1 Produkcja cytokinin i ich transport ksylemowy

Produkcja cytokinin odbywa się głównie w młodych i rozwijających się tkankach korzenia i części nadziemnych, na co wskazuje wzór ekspresji genów kodujących enzymy z rodziny IPT, katalizujących powstawanie tej grupy związków, a dokładnie fosforanów izopentenyloadenozyny na pierwszym etapie biosyntezy *de novo* (Miyawaki i wsp., 2004). Istotną różnicą w funkcjonowaniu korzenia i części nadziemnych rośliny jest natomiast aktywność enzymów CYP735A, odpowiedzialnych za hydroksylację iP do *tZ*. Kodujące je geny ulegają ekspresji tylko w korzeniu, co wpływa w istotny sposób na formę cytokinin transportowanych na długie dystanse elementami wiązek przewodzących. Podczas gdy główną formą produkowaną w częściach nadziemnych i transportowaną floemem do korzenia jest iP i jej pochodne, w ksylemie znaleźć można powstałą w korzeniu *tZ* i jej pochodne (Corbesier i wsp., 2003; Takei i wsp., 2004).

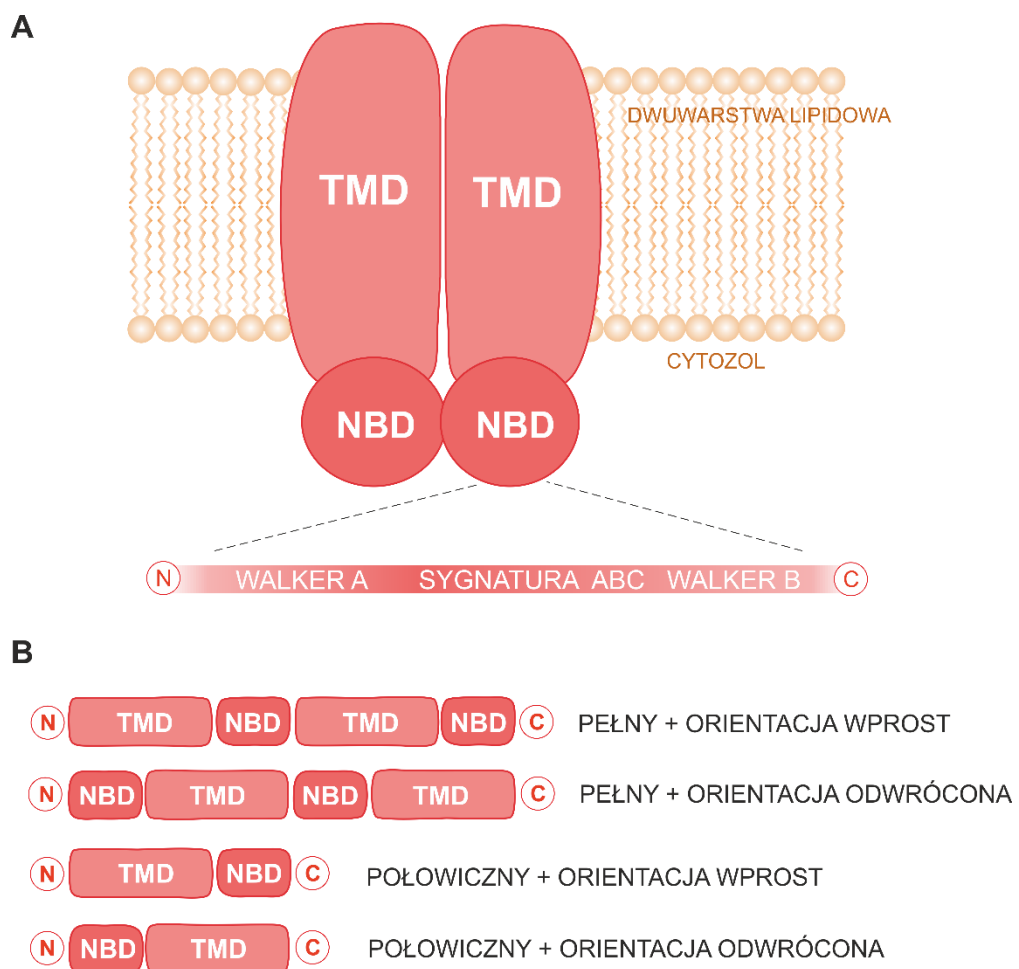
Czapeczka korzenia uważana jest za główne źródło cytokinin zarówno dla samego korzenia, jak i dla całej rośliny. Ma to związek z jej licznymi funkcjami, w tym z jej udziałem w reakcjach na zmienne warunki środowiska, których nierozłącznym elementem jest metabolizm fitohormonów. To właśnie w budującej tę strukturę kolumelli zaobserwowano ekspresję *IPT5* (Miyawaki i wsp., 2004). Akumulację cytokinin w tym miejscu potwierdzono również przy użyciu konstrukcji reporterowej *ARR5::GUS*, z promotorem aktywowanym przez ten hormon, oraz przeciwciał skierowanym przeciwko *tZ* i jej pochodnym. Dodatkowo udowodniono także, że produkowane w czapeczce cytokiny przemieszczają się elementami ksylemu do wyższych partii korzenia oraz do części nadziemnych jako efekt działania transpiracji i siły ssącej liści (Aloni i wsp., 2005).

Jednym z lepiej opisanych mechanizmów powstawania ksylemowych cytokinin jest również ten oparty o aktywność *IPT3* we wiązce przewodzącej korzenia. Ekspresja kodującego go genu indukowana jest w komórkach towarzyszących łyka (ang. *phloem companion cells*) pod wpływem egzogennej suplementacji azotanami (Miyawaki i wsp., 2004; Takei i wsp., 2004). Podanie azotanów prowadzi ponadto do indukcji wiązkowych genów *CYP735A*, co wpływa na wzrost akumulacji pochodnych *tZ* w ksylemie korzenia i do ich transportu do części nadziemnych (Kiba i wsp., 2013). W tych samych warunkach represji ulegają chociażby niektóre z genów *LOG* (Ramireddy i wsp., 2014).

1.5.2 Transportery cytokinin z rodziny białek ABC

Transportery ABC to powszechnie spotykana rodzina białek ze szczególnie liczną reprezentacją wśród roślin (Hwang i wsp., 2016). Wykorzystują one energię z hydrolizy ATP do transportu różnorodnych cząsteczek przez błony biologiczne wbrew gradientowi stężeń. Podstawą identyfikacji białek ABC jest obecność w ich strukturze charakterystycznych, silnie zachowawczych sekwencji aminokwasowych, z których najważniejszy to tzw. sygnatura ABC ([LIVMFY]S[SG]GX3[RKA][LIVMYA]X[LIVFM][AG]), znajdująca się pomiędzy sekwencjami motywów określanymi jako Walker A (GX4GK[ST]) i Walker B ((hydrofobowy)4[DE]). Wspólnie są one częścią cytoplazmatycznej domeny wiążącej ATP (ang. *nucleotide-binding domain*, NBD). Drugą z domen białek ABC jest hydrofobowa domena transmembranowa (ang. *transmembrane domain*, TMD), składająca się z 5 do 10 α -helis przebijających błonę komórkową (ter Beek i wsp., 2014; Verrier i wsp., 2008) (rycina 1.5A). Białka ABC mogą być ponadto transporterami pełnymi (ang. *full-size*), w których w jednym peptydzie znajdują się dwie domeny NBD i dwie TMD, oraz transporterami połowicznymi

(ang. *half-size*), które zawierają tylko po jednej domenie każdego typu i muszą ulec dimeryzacji, by móc transportować odpowiednie dla siebie związki. Różnorodność białek ABC wynika także z możliwości przyjmowania przez nie dwóch orientacji. Pierwszą z nich jest orientacja wprost, w której na końcu aminowym znajduje się domena TMD (N-[TMD-NBD]_x-C, x = 1 dla transportera połowicznego, x = 2 dla transportera pełnego), a drugą orientacja odwrócona, z domeną NBD na końcu aminowym (N-[NBD-TMD]_x-C) (rycina 1.5B). Biorąc pod uwagę organizację domen oraz wzajemne relacje filogenetyczne białka ABC podzielono na 9 podrodziny (ABCA do ABCI), z których 8 (poza ABCH) zostało zidentyfikowanych u roślin (Verrier i wsp., 2008). Wśród transportowanych przez białka ABC związków u roślin znajdują się m.in. fitohormony, produkty fotosyntezy, kwasy tłuszczowe i metale ciężkie (Do i wsp., 2021).



Rycina 1.5 Schemat prezentujący budowę białek ABC. A, Budowa transportera ABC z zaznaczoną domeną transmembranową (TMD) oraz cytozolową domeną wiążącą ATP (NBD). Poniżej przedstawiony został fragment domeny NBD z charakterystycznymi dla niej motywami

Walkera A, sygnatury ABC i Walkera B. B, Podział białek ABC ze względu na liczbę i układ domen TMD i NBD. N – koniec aminowy białka; C – koniec karboksylowy białka.

Najliczniejszą grupę transporterów ABC u roślin stanowi podrodzina ABCG (Banasiak i Jasiński, 2022). Transportery ABCG występują zarówno jako białka połowiczne, jak i pełne w odwróconej orientacji. Jak dotąd wszystkie pełne transportery ABCG zidentyfikowano jako białka błony komórkowej. Pełnią one ważne funkcje w reakcjach roślin na stresy środowiskowe i patogeny (Borghini i wsp., 2015). W grupie tej znaleźć można również białka biorące udział w relacjach symbiotycznych roślin, będące nierzadko transporterami hormonów roślinnych, jak np. MtABCG20, kontrolujący liczbę brodawek korzeniowych poprzez transport ABA, czy PaPDR1 i MtABCG59, transportujące strigolaktyny, będące roślinnymi atraktantami dla grzybów w mikoryzie arbuskularnej (Banasiak i wsp., 2020; Paweła i wsp., 2019; Sasse i wsp., 2015). Jednym z pełnych transporterów cytokinin jest MtABCG56. Bierze on udział we wczesnych etapach powstawania brodawki korzeniowej u *M. truncatula*. *MtABCG56* ulega ekspresji w ryzodermie i korze pierwotnej korzenia pod wpływem czynnika Nod, inokulacji bakteriami *Sinorhizobium meliloti* oraz po traktowaniu cytokininami. Sam transporter natomiast to białko błony komórkowej, transportujące aktywne formy cytokinin (iP, *tZ*), których synteza w korzeniu w warunkach symbiotycznych prowadzi do zainicjowania pierwszych podziałów komórek przyszłej brodawki korzeniowej (Jarzyniak i wsp., 2021). Drugim z pełnych transporterów cytokinin z podrodziny ABCG jest ABCG14 u *A. thaliana*. *AtABCG14* ulega ekspresji w komórkach wiązki przewodzącej, gdzie kolokalizuje z genami odpowiedzialnymi za biosyntezę cytokinin, takimi jak *IPT3*, *CYP735A1* i *CYP735A2*, które indukowane są przez azotany. Będąc eksporterem *tZ*, *AtABCG14* uważany jest zatem za transporter biorący udział w załadunku tej cytokininy oraz jej pochodnych do ksylemu wiązki przewodzącej, skąd związek ten przemieszcza się do części nadziemnych, gdzie sygnalizuje dostępność azotu w glebie. Systemiczne oddziaływanie *AtABCG14* na roślinę potwierdza obniżone stężenie pochodnych *tZ* w soku ksylemowym mutantów *atabcg14* (Ko i wsp., 2014; Takei i wsp., 2004; Zhang i wsp., 2014). W ostatnim czasie podobną do *AtABCG14* funkcję przypisano jego ortologowi z *Oryza sativa*, OsABCG18 (Zhao i wsp., 2019).

1.5.3 Pozostałe transportery cytokinin

Do scharakteryzowanych transporterów cytokinin w korzeniu, oprócz tych należących do rodziny ABC, zalicza się również białka trzech dodatkowych rodzin: PUP (ang. *PURINE*

PERMEASE), *AZG* (ang. *AZA-GUANINE RESISTANT*) oraz *ENT* (ang. *EQUILIBRATIVE NUCLEOSIDE TRANSPORTER*).

AtPUP14 to transporter zlokalizowany w błonie komórkowej komórek merystemu apikalnego korzenia oraz primordium korzenia bocznego, importujący aktywne formy cytokinin (*tZ*, *iP* i *6-BAP*). Gen *AtPUP14* ulega ekspresji w miejscach, w których obserwuje się występowanie najsłabszego sygnału konstrukcji reporterowej TCS:GFP, obrazującej poziom reakcji komórek na obecność cytokinin. Rolą AtPUP14 jest zmniejszanie wrażliwości komórek na cytokiny, co wpływa na podtrzymanie pluripotentnego charakteru tkanek merystematycznych oraz właściwej im aktywności podziałowej. Rośliny *pup14* charakteryzują się zatem występowaniem poważnych wad rozwojowych, wynikających z nieprawidłowego wykształcenia merystemów (Zürcher i wsp., 2016).

Rodzina *AZG* reprezentowana jest w grupie transporterów cytokinin przez białko AtAZG2, transportujące aktywne formy cytokinin, w tym *iP*, *tZ*, *6-BAP* oraz kinetynę. Jest ono zlokalizowane w błonie komórkowej oraz błonie ER. Jego obecność w komórkach kory pierwotnej i epidermy, okrywających z zewnątrz formujące się primordium korzenia bocznego, oraz zwiększona gęstość korzeni bocznych mutantów sugerują, iż AtAZG2 wpływa hamująco na wydobywanie się nowo powstałych korzeni bocznych na powierzchnię ryzodermy (Tessi i wsp., 2021).

Ostatni z transporterów cytokinin, AtENT3, w przeciwieństwie do wymienionych wcześniej białek, bierze udział w translokacji tego fitohormonu w formie rybozydów, a nie wolnych zasad azotowych. Kodujący go gen ulega ekspresji w komórkach budujących wiązki przewodzące oraz wierzchołek wzrostu korzenia. AtENT3 przyczynia się prawdopodobnie do importu cytokinin do tychże komórek. Wskazuje na to fenotyp mutantów, które charakteryzują się zmniejszoną akumulacją rybozydów w korzeniach i ich zwiększonym stężeniem w częściach nadziemnych (Cornelius i wsp., 2012; Korobova i wsp., 2021; Traub i wsp., 2007).

1.6 *Medicago truncatula* jako organizm modelowy w badaniach podstawowych

Bobowate (łac. *Fabaceae*) tworzą zróżnicowaną i liczną, bo szacowaną na 19 tys. gatunków, rodzinę o różnorodnym pokroju, charakterystycznym zarówno dla roślin drzewiastych, krzewów, jak i roślin zielnych (Egan i Crandall, 2008). Wśród gatunków powszechnie wykorzystywanych przez ludzi są jednak głównie przedstawiciele tej ostatniej grupy, w tym m.in.: groch (łac. *Pisum sativum*), fasola (łac. *Phaseolus vulgaris*), bób (łac. *Vicia faba*), soja

(łac. *Glycine max*), łubin (łac. *Lupinus albus*), lucerna siewna (łac. *Medicago sativa*), koniczyna (łac. *Trifolium sp.*) i komonica (łac. *Lotus corniculatus*). Rośliny te, ze względu na wysoką zawartość białka i składników mineralnych, są nieocenionym elementem diety człowieka i składnikiem pasz dla zwierząt (Jasińska i Kotecki, 2003; Molares i Ladio, 2012). Bobowate wykorzystywane w charakterze międzyplonu zwiększają ponadto produkcję innych roślin uprawnych poprzez zasilanie ziemi w azot, związki organiczne i próchnicę, poprawianie struktury gleb, zapobieganie wymywaniu z nich związków mineralnych oraz hamowanie erozji wietrznej i wodnej. Ważną rolą roślin z tej rodziny jest również stwarzanie odpowiednich warunków dla rozwoju mikroorganizmów i poprawianie przez to aktywności biologicznej gleb. Nieocenione znaczenie ma tu przede wszystkim zdolność bobowatych do zawiązywania symbioz z grzybami mikorytycznymi oraz bakteriami brodawkowymi (Wójcik i wsp., 2014).

Mikoryza arbuskularna to spotykana powszechnie, bo u 70-80% roślin, forma symbiozy z grzybami należącymi do podtypu *Glomeromycota*. Zakłada się, że jej powstanie ułatwiło roślinom kolonizację suchych środowisk lądowych ok. 450 mln lat temu, jeszcze na długo przed pojawieniem się funkcjonalnych korzeni (Kenrick i Strullu-Derrien, 2014). Polega ona na wnikanii strzępek grzyba mikoryzowego do wnętrza korzenia gospodarza i tworzeniu wewnątrz komórek jego kory pierwotnej struktur zwanych arbuskulami, co ułatwiła roślinom pobieranie wody i związków mineralnych (Wilkes, 2021).

Procesem, który mógł wyewoluować wtórnie ze dolności bobowatych do zawiązywania mikoryzy arbuskularnej, jest brodawkowanie (Szczygłowski i Amyot, 2003). Odbyło się to prawdopodobnie m.in. poprzez zaadaptowanie obecnych już w mikoryzie szlaków sygnałowych, takich jak wspólny symbiotyczny szlak sygnałowy (ang. *common symbiotic signaling pathway*, CSSP) (Genre i Russo, 2016), czy szlaki niezbędne do wzajemnego rozpoznania się partnerów symbiotycznych, uruchamiane w warunkach niedoboru substancji odżywczych. Brodawkowanie polega na zawiązywaniu przez rośliny symbiotycznych relacji z bakteriami wiążącymi azot atmosferyczny, czego makroskopowym efektem jest powstawanie struktur zwanych brodawkami korzeniowymi. Pomimo mniejszej niż mikoryza arbuskularna powszechności wśród roślin, symbiotyczne wiązanie azotu przyczynia się do wzbogacenia gleb corocznie o 200 Tg (10^{12} g) azotu organicznego (Goyal i wsp., 2021), ze znaczącym udziałem roślin z rodziny *Fabaceae*. Symbiotycznymi partnerami bobowatych są Gram-ujemne bakterie zwane zbiorczo rhizobiami, do których należą przedstawiciele rodzajów: *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium*, *Azorhizobium* i *Mesorhizobium*. W zależności od gospodarza

roślinnego, jego korzeń zainfekowany może być przez odmienny gatunek lub rodzaj bakterii (Sawada i wsp., 2003).

Zdolność roślin bobowatych do zawiązywania relacji symbiotycznych z bakteriami brodawkowymi oraz grzybami mikoryzowymi uatrakcyjnia ich wybór na organizmy modelowe na tle innych powszechnie wykorzystywanych w tym celu roślin, które nie tworzą symbioz, jak np. *A. thaliana*. Niestety, ograniczenia związane np. z bardziej złożoną budową tkankową roślin bobowatych w porównaniu z *Arabidopsis*, nie zachęcają do wykorzystania gatunków z rodziny *Fabaceae* w badaniach nad kluczowymi dla rozwoju roślin procesami, jakim są np. funkcjonowanie merystemów, czy organogeneza korzeni bocznych (Krämer, 2015). Okazuje się jednak, że nawet w przypadku wspólnych dla wszystkich roślin procesów rozwojowych, występują wśród nich różnice, których spektrum złożoności nie sposób wyjaśnić na podstawie analizy prostych organizmów modelowych. Pogląd taki ma w ostatnich latach swoje odzwierciedlenie w choćby coraz powszechniejszych badaniach nad biologią roślin bobowatych w warunkach niesymbiotycznych (Bevan i Walsh, 2004; Krukowski i wsp., 2020).

Wśród roślin bobowatych najczęściej wykorzystywanych jako modelowe w badaniach podstawowych znajduje się *M. truncatula*. Jest to jednoroczna roślina zielna, charakterystyczna dla terenów klimatu umiarkowanego, w szczególności dla basenu Morza Śródziemnego, wykorzystywana najczęściej jako międzyplon w uprawach innych roślin (Tivoli i wsp., 2006). *M. truncatula* to roślina osiągająca do kilkudziesięciu centymetrów wysokości, pokroju koniczyny. Posiada trójlistkowe, zaokrąglone liście, charakteryzujące się u niektórych ekotypów (np. Jemalong A17) brązową plamką antocyjanową, umieszczoną pośrodku każdego z listków. Kwiaty *M. truncatula* są żółte i, podobnie jak u innych bobowatych, mają kształt grzbiecisty (motylkowy). Roślina ta jest samopylna. Owoce mają postać ściśle i spiralnie upakowanych strąków z gładkimi nerkowatymi nasionami. Co ważne przy wyborze *M. truncatula* na organizm modelowy, jedna roślina jest w stanie wyprodukować znaczną liczbę owoców, bo od kilkudziesięciu do stu kilkudziesięciu. Jej cykl życiowy jest ponadto stosunkowo krótki i trwa ok. 3-4 miesięcy. *M. truncatula* posiada ponadto mały w porównaniu z innymi bobowatymi (ok. 375 Mbp) i diploidalny ($2n = 16$) genom. W 2011 roku udostępniona została niepełna (pokrywająca ok. ~94% genów), a w 2014 roku całkowita sekwencja genomu jednego z ekotypów *M. truncatula* o nazwie Jemalong A17/J5 (Tang i wsp., 2014; Young i wsp., 2011). W badaniach wykorzystywany jest również inny z ekotypów o oznaczeniu R108. Sekwencja jego genomu udostępniona została stosunkowo niedawno, bo w 2017 roku. W przeciwieństwie jednak do sekwencji genomu A17, ta z R108 nie posiada tak szczegółowej

adnotacji (Moll i wsp., 2017). Mimo to ekotyp R108, ze względu na wysoką podatność na transformację z użyciem *Agrobacterium tumefaciens*, posłużył m.in. do stworzenia łatwo dostępnych linii mutantów insercyjnych *Tnt1*, które stały się nieocenionym narzędziem np. w badaniach nad funkcją genów (Tadege i wsp., 2008). Przejściową transformację genetyczną (niestabilną, bo nie mającą wpływu na materiał genetyczny kolejnych pokoleń) obu ekotypów przeprowadzić można ponadto z użyciem *Agrobacterium rhizogenes*. Powstające w wyniku infekcji bakteryjnej korzenie włosowate są wykorzystywane m.in. jako narzędzie do analizy tkankowo specyficznej ekspresji genów, czy do wyciszania ekspresji genów metodą interferencji RNA (ang. *RNA interference*, RNAi) (Limpens i wsp., 2004).

Coraz większa popularność *M. truncatula* w roli organizmu modelowego ma swój wyraz w rosnącej liczbie przeznaczonych jej baz danych oraz narzędzi bioinformatycznych. Przełomowym wydarzeniem, kluczowym dla powstania tego typu źródeł informacji, było zidentyfikowanie w pierwszej dekadzie XXI w. genów markerowych brodawkowania (Györgyey i wsp., 2000; Journet i wsp., 2001). Ich sklonowanie przyczyniło się do powstania mikromacierzy DNA, których wyniki udostępnione zostały w bazie *Medicago Gene Expression Atlas* (MtGEA), będącej od niedawna częścią portalu *MtExpress* (Carrere i wsp., 2021). Dostępne są również inne, bardziej zawężone tematycznie wyniki analiz transkryptomicznych, takie jak te zawarte w bazie *Symbimics*, skupiające się na wydzielonych strefach brodawki korzeniowej. Wyniki sekwencjonowania genomów ekotypów *M. truncatula* są natomiast od lat regularnie uaktualniane w ramach wielu projektów, z których najważniejsze to: *Medicago truncatula Genome Database* (MtGDB), *Plant Genome Database* (PlantGDB) i HAPMAP2. Przeszukiwanie baz danych na temat *M. truncatula* ułatwia ponadto ich integracja w ramach publicznie dostępnych portali, w tym m.in. *Phytozome* oraz *LegumeIP*.

2. CEL PRACY

Celem przedstawionej pracy doktorskiej było poznanie roli, jaką pełni transporter MtABCG40 w reakcji korzenia modelowej rośliny bobowatej *Medicago truncatula* na niedobór azotu w środowisku.

Cele pośrednie obejmowały:

- (i) identyfikację transportowanego przez MtABCG40 związku poprzez przeprowadzenie eksperymentów transportu w układzie heterologicznym,
- (ii) przeprowadzenie analizy funkcjonalnej MtABCG40 z uwzględnieniem jego udziału w procesach morfogenetycznych korzenia,
- (iii) zaproponowanie mechanizmu oddziaływania MtABCG40 i cytokinin na morfologię korzenia *M. truncatula* w warunkach niedoboru azotu.

3. MATERIAŁY I METODY

3.1 Materiały

3.1.1 Szczepy bakteryjne

Wykorzystywane w trakcie realizacji pracy doktorskiej szczepy bakteryjne (tabela 3.1) pochodziły z kolekcji Zakładu Fizjologii Molekularnej Roślin ICHB PAN w Poznaniu, Wydziału Biologii Uniwersytetu we Fryburgu lub zostały zakupione w firmie Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, USA).

Tabela 3.1 Zestawienie szczepów bakteryjnych wykorzystywanych w pracy doktorskiej

Nazwa szczepu bakteryjnego	Charakterystyka
<i>Escherichia coli</i> DH5α	Elektrokompetentny szczep wykorzystany do namnażania konstrukcji genowych przed analizą ich sekwencji i dalszym subklonowaniem; genotyp: F ⁻ φ80 <i>lacZ</i> Δ <i>M15</i> Δ(<i>lacZYA-argF</i>)U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (r ^{k-} , m ^{k+}) <i>gal⁻phoA supE44 λ⁻thi-1 gyrA96 relA1</i> .
<i>Agrobacterium rhizogenes</i> ARqual	Szczep wykorzystany do transformacji siewek <i>Medicago truncatula</i> w celu uzyskania tzw. roślin złożonych (ang. <i>composite plants</i>) z transgenicznymi korzeniami włosowatymi (Boisson-Dernier i wsp., 2007)
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> AGL1	Szczep wykorzystany do przejściowej transformacji liści epidermy <i>Nicotiana benthamiana</i> w analizie lokalizacji subkomórkowej MtABCG40 (Zhang i wsp., 2020).
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> GV3101	Szczep wykorzystany do przejściowej transformacji liści epidermy <i>N. benthamiana</i> , z których wyizolowane zostały protoplasty użyte podczas eksperymentów transportu (Zhang i wsp., 2020).
<i>Sinorhizobium meliloti</i> 1021	Dziki szczep bakterii symbiotycznych wykorzystany do analizy wydajności brodawkowania linii mutantów <i>Tnt1 M. truncatula</i> (Bederska-Błaszczyk i wsp., 2021).
<i>Sinorhizobium meliloti</i> 2011/pMH682	Szczep bakterii symbiotycznych nadprodukujący czynnik Nod (ang. <i>Nod factor</i>) (Roche i wsp., 1991). Wykorzystany do analizy tempa podziałów komórkowych w zawiązkach brodawek korzeniowych linii mutantów <i>Tnt1 M. truncatula</i> .
<i>Sinorhizobium meliloti</i> SL44	Modyfikacja dzikiego szczepu bakterii symbiotycznych 1021; szczep niezdolny do produkcji czynnika Nod z powodu delecji w operonie <i>nod</i>

	(<i>ΔnodDIABC</i>) (Fisher i wsp., 1988). Wykorzystany jako kontrolna dla szczepu E65 w badaniu wpływu czynnika Nod na ekspresję genów w korzeniu.
<i>Sinorhizobium meliloti</i> E65	Modyfikacja dzikiego szczepu bakterii symbiotycznych 1021; szczep nadprodukujący czynnik Nod dzięki dodatkowemu plazmidowi pE65 ekspresjonującemu gen <i>nodD3</i> (Barnett i wsp., 2004). Wykorzystany w badaniu wpływu czynnika Nod na ekspresję genów w korzeniu.
<i>Sinorhizobium meliloti</i> 1021/pXLGD4	Szczep zawierający plazmid ekspresjonujący konstytutywnie gen <i>lacZ</i> kodujący enzym β-galaktozydazę (GAL) i umożliwiający, dzięki barwnej reakcji, oznaczenie komórek bakteryjnych w formującej się brodawce (Díaz i wsp., 2005).

3.1.2 Materiał roślinny

Wykorzystywane w trakcie realizacji pracy doktorskiej nasiona roślin pochodziły z kolekcji Zakładu Fizjologii Molekularnej Roślin ICHB PAN w Poznaniu oraz z fundacji The Samuel Roberts Noble Foundation (Armore, Oklahoma, USA) (tabela 3.2).

Tabela 3.2 Zestawienie materiału roślinnego wykorzystywanego w pracy doktorskiej

Gatunek	Linia	Ekotyp	WT/Mutacja
<i>Medicago truncatula</i>	-	Jemalong J5/A17	WT
<i>Medicago truncatula</i>	-	R108	WT
<i>Medicago truncatula</i>	NF21323	R108	<i>mtabcg40-1</i> ; insercja <i>Tnt1</i> w egzonie 22. genu <i>MtABCG40</i> , inne insercje <i>Tnt1</i> w linii
<i>Medicago truncatula</i>	NF21323	R108	WT-1; brak insercji <i>Tnt1</i> w egzonie 22. genu <i>MtABCG40</i> , inne insercje <i>Tnt1</i> w linii
<i>Medicago truncatula</i>	NF17891	R108	<i>mtabcg40-2</i> ; insercja <i>Tnt1</i> w intronie 1. genu <i>MtABCG40</i> , inne insercje <i>Tnt1</i> w linii
<i>Medicago truncatula</i>	NF17891	R108	WT-2; brak insercji <i>Tnt1</i> w intronie 1. genu <i>MtABCG40</i> , inne insercje <i>Tnt1</i> w linii
<i>Arabidopsis thaliana</i>	-	Columbia-0 (Col-0)	WT
<i>Nicotiana benthamiana</i>	-	-	WT

3.1.3 Wektory

W trakcie realizacji pracy doktorskiej wykorzystywano wektory (tabela 3.3) znajdujące się w kolekcji Zakładu Fizjologii Molekularnej Roślin ICHB PAN w Poznaniu.

Tabela 3.3 Charakterystyka wektorów wykorzystanych w pracy doktorskiej

Nazwa wektora	Charakterystyka	Oporność
pDONR/Zeo	Wektor wykorzystywany w technologii Gateway (Invitrogen, Waltham, Massachusetts, USA) do subklonowania wybranych fragmentów DNA do wektorów docelowych na drodze rekombinacji homologicznej (Karimi i wsp., 2007).	zeocyna 50 µg/ml (B)
pKGWFS7	Wektor umożliwiający analizę aktywności promotorów genów poprzez ich umieszczenie przed sekwencją kodującą białko zielonej fluorescencji (ang. <i>green fluorescence protein</i> , GFP) oraz enzym β -glukuronidazę (ang. <i>β-glucuronidase</i> , GUS), przekształcający 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronid w barwny produkt (Karimi i wsp., 2002; Gallagher, 2012).	spektynomycyna 100 µg/ml (B), kanamycyna 50 µg/ml (P)
pPLV04	Wektor umożliwiający analizę aktywności promotorów genów poprzez ich umieszczenie przed sekwencją kodującą białko GFP połączone od końca N z sekwencją lokalizacji jądrowej (ang. <i>nuclear localization sequence</i> , NLS), kierującą białko fuzyjne do jądra komórkowego. Wprowadzenie docelowej sekwencji do wektora pPLV04 możliwe jest dzięki aktywności egzonukleazowej 3'→5' polimerazy T4 DNA w systemie klonowania niezależnego od ligazy (ang. <i>ligation independent cloning</i> , LIC) (de Rybel i wsp., 2011).	kanamycyna 25 µg/ml (B, P)
pPLV11	Wektor umożliwiający analizę aktywności promotorów genów poprzez ich umieszczenie przed sekwencją kodującą fluorescencyjne białko tdTomato połączone od końca N z sekwencją NLS, kierującą białko fuzyjne do jądra komórkowego. Wprowadzenie docelowej sekwencji do wektora pPLV04 możliwe jest dzięki aktywności egzonukleazowej 3'→5' polimerazy T4 DNA w systemie klonowania LIC (De Rybel i wsp., 2011).	kanamycyna 25 µg/ml (B, P)

pMDC43	Wektor umożliwiającą ekspresję białek fuzyjnych składających się z białka docelowego połączonego na końcu N z białkiem GFP pod kontrolą silnego promotora 2x35S, pochodzącego z wirusa mozaiki tytoniu (CaMV) (Curtis i Grossniklaus, 2003).	kanamycyna 50 µg/ml (B), higromycyna 15 µg/ml (P)
pK7GWIWG2(II)- DsRED	Wektor wykorzystywany do wyciszania ekspresji genów metodą interferencji RNA (ang. <i>RNA interference</i> , RNAi). Docelowa sekwencja umieszczona jest w wektorze w dwóch identycznych, lecz odwróconych w stosunku do siebie kopiach, rozdzielonych intronem. Ich ekspresja, kontrolowana przez promotor 35S, prowadzi do powstania RNA o strukturze spinki do włosów, który jest źródłem tzw. małych interferujących RNA (siRNA), biorących udział w degradacji mRNA. Powstające na matrycy tego wektora białko DsRed umożliwia selekcję transgenicznych korzeni (Limpens i wsp., 2004).	spektynomycyna 100 µg/ml (B), kanamycyna 50 µg/ml (P)

B – oporność umożliwiająca selekcję w układzie bakteryjnym

P – oporność umożliwiająca selekcję w roślinach

3.1.4 Oligonukleotydy

Startery wykorzystywane w pracy doktorskiej do reakcji łańcuchowej polimerazy (ang. *polymerase chain reaction*, PCR) syntetyzowane były przez firmę Genomed (Warszawa). Przedstawiono je w tabeli 3.4. Starter wprost (ang. *forward*) oznaczono jako „F”, a starter odwrócony (ang. *reverse*) jako R.

Tabela 3.4 Startery wykorzystywane w badaniach podczas reakcji PCR

Przeznaczenie eksperymentalne	Starter F/R	Sekwencja (fragmenty komplementarne do matrycy zostały zapisane WERSALIKAMI)	Tm [°C]	Długość ampliconu [pz]
Genotypowanie mutantów insercyjnych <i>Tnt1</i> z linii NF21323				
Identyfikacja roślin <i>mtabcg40-1</i>	F	5'-AATGTATGGCTTGCTTATGG-3'	50,6	378
	R	5'-GCTACCAACCAAACCAAGTC-3'	54,0	
Identyfikacja roślin WT-1	F	5'-AATGTATGGCTTGCTTATGG-3'	50,6	1030
	R	5'-ATCTCCATATTGTGAAGCCG-3'	52,3	

Analiza poziomu ekspresji <i>MtABCG40</i>	F	5'-CAATGATGGAAGCCAAACC-3'	51,9	312
	R	5'-CTTTATAGAAGCCGTATCAC-3'	47,7	
Genotypowanie mutantów insercyjnych <i>Tnt1</i> z linii NF17891				
Identyfikacja roślin <i>mtabcg40-2</i>	F	5'-TAACTGGGGTATCGTAAAGG-3'	51,1	479
	R	5'-GCTACCAACCAAACCAAGTC-3'	54,0	
Identyfikacja roślin WT-2	F	5'-TAACTGGGGTATCGTAAAGG-3'	51,1	1246
	R	5'-CATATTGAGGTCCAACCTCCTTGG-3'	55,3	
Analiza poziomu ekspresji <i>MtABCG40</i>	F	5'-CAATGATGGAAGCCAAACC-3'	51,9	312
	R	5'-CTTTATAGAAGCCGTATCAC-3'	47,7	
Przygotowanie konstrukcji <i>proMtABCG40:GUS</i>				
Amplifikacja <i>proMtABCG40</i> z sekwencjami <i>attB</i>	F	5'-ggggacaagttgtacaaaaagcaggc TTCAGTAACGAATATGGTAGG-3'	66,0	2073
	R	5'-ggggaccactttgtacaagaaagctgggt CAATAACAGGAAAAAGTTTTATCC-3'	66,4	
Przygotowanie konstrukcji <i>proMtLOG3:GUS</i>				
Amplifikacja <i>proMtLOG3</i> z sekwencjami <i>attB</i>	F	5'-ggggacaagttgtacaaaaagcaggc TCTAAAATTGCTAAGTTCAGAGG-3'	66,0	2056
	R	5'-ggggaccactttgtacaagaaagctgggt GATCTTCTTTGTGGAAAGGT-3'	68,3	
Przygotowanie konstrukcji <i>MtABCG40</i> RNAi				
Amplifikacja fragmentu 5'UTR z <i>attB</i>	F	5'-ggggacaagttgtacaaaaagcaggctAATAT GTAGCATAAACATATGAACA-3'	64,8	246
	R	5'-ggggaccactttgtacaagaaagctgggt CAATAACAGGAAAAAGTTTTATCC-3'	66,4	
Przygotowanie konstrukcji <i>MtLOG3</i> RNAi				
Amplifikacja fragmentu 3'UTR z <i>attB</i>	F	5'-ggggacaagttgtacaaaaagcaggctTGATC TTATATAAGTAAGACTAGTGG-3'	64,9	258
	R	5'-ggggaccactttgtacaagaaagctgggt GCATCATCAACATTAACATTAGTTG-3'	67,1	
Przygotowanie konstrukcji <i>proUBI10:GFP-MtABCG40</i>				
Amplifikacja <i>proUBI10</i> z miejscami restrykcyjnymi	F	5'-aactgcag GTCGACGAGTCAGTAATAAACG-3'	61,4	702
	R	5'-cgggatcc CTGTTAATCAGAAAACTCAG-3'	59,0	

Przygotowanie konstrukcji <i>ProMtABCG40:NLS-GFP</i>				
Amplifikacja <i>proMtABCG40</i> z adapterami LIC	F	5'-tagttggaatgggttcgaa TCAGTAACGAATATGGTAGG-3'	62,4	2053
	R	5'-ttatggagttgggttcgaa CAATAACAGGAAAAAGTTTTATCC-3'	62,1	
Przygotowanie konstrukcji <i>ProMtLOG3:NLS-tdTomato</i>				
Amplifikacja <i>proMtLOG3</i> z adapterami LIC	F	5'-tagttggaatgggttcgaa AATGATTTTATAGATGTGTCGG-3'		2111
	R	5'-ttatggagttgggttcgaa GATCTTCTTTGTGGAAAGG-3'		
Analiza poziomu ekspresji genów metodą Real-Time PCR				
<i>MtABCG40</i>	F	5'-CAATGATGGAAGCCAAACC-3'	51,9	312
	R	5'-CTTTATAGAAGCCGTATCAC-3'	47,7	
<i>MtLOG1</i>	F	5'-ACTAACAATGGACTCACGC-3'	52,9	380
	R	5'-CTCCAGAGTTCCATATCCC-3'	51,6	
<i>MtLOG2</i>	F	5'-GAGAGCTAACTGGTGAAACG-3'	53,1	265
	R	5'-GCATTTGGACTGATAAATCCC-3'	51,7	
<i>MtLOG3</i>	F	5'-AAGAGAGATAACTGGTGACC-3'	51,1	322
	R	5'-CTCTAATTCCTAACCAATTCC-3'	50,6	
<i>MtLOG3 RNAi</i>	F	5'-TGATCTTATATAAGTAAGACTAGTGG-3'	49,4	200
	R	5'-GCATCATCAACATTAACATTAGTTG-3'	51,1	
<i>MtLOG-podobny</i> 1	F	5'-GAACTATGGAAGAGCTTCTGG-3'	52,7	221
	R	5'-GGAAGGAGAGTAACTCTCCA-3'	52,8	
<i>MtLOG-podobny</i> 2	F	5'-ATTGCTGAATGTTGATGGATAC-3'	51,1	250
	R	5'-CTCTACACAACTGCCATCG-3'	53,4	
<i>MtLOG-podobny</i> 3	F	5'-ATGAAGGTTTTGTAACACCAGC-3'	53,7	261
	R	5'-GTTCAAAGTAGAAAATCAGCGG-3'	52,1	
<i>MtLOG-podobny</i> 4	F	5'-AGAGATCACTGGAGAGACAG-3'	52,8	200
	R	5'-AGCCATCTACATTCAACAACC-3'	52,9	
<i>MtRR4</i>	F	5'-CTGAATCTGATGCTTTTGTTC-3'	52,2	183
	R	5'-CCTCCAAACATCTGTCAATGC-3'	54,2	
<i>MtLBD16</i>	F	5'-AGCTCGTATCAGAGACCCTGTG-3'	58,1	75
	R	5'-TGCAAGCATGCTACCTGTTGTTG-3'	58,5	
<i>MtTML2</i>	F	5'-TCTGGTGACAATGGTTCCTC-3'	54,5	75
	R	5'-AAGACATGGTAATGGTAGTAGAAC-3'	52,1	

3.1.5 Pożywki do hodowli bakterii

W tabeli 3.5 zestawiono skład pożywek wykorzystywanych do hodowli bakterii: pożywki LB (ang. *Lysogeny Broth*; Bertani, 2004), pożywki YEP (ang. *Yeast Extract Peptone*; <http://cshprotocols.cshlp.org/>) oraz pożywki BMM (ang. *Bergersen's modified medium*, Rolfe i wsp., 1980).

Tabela 3.5 Skład pożywek bakteryjnych LB, YEP i BMM

Nazwa pożywki	LB	YEP	BMM
Gatunek bakterii	<i>E. coli</i>	<i>A. rhizogenes</i> , <i>A. tumefaciens</i>	<i>S. meliloti</i>
pH	7,0	7,0	6,8
Składniki dodawane przed autoklawowaniem (g/l)			
Ekstrakt drożdżowy	5	10	0,5
Pepton	10	10	<i>nd.</i>
NaCl	10	5	<i>nd.</i>
Na ₂ HPO ₄	<i>nd.</i>	<i>nd.</i>	0,14
MgSO ₄ x 7H ₂ O	<i>nd.</i>	<i>nd.</i>	0,08
Mannitol	<i>nd.</i>	<i>nd.</i>	3
Biotyna	<i>nd.</i>	<i>nd.</i>	0,02
Agar	12	12	12
Składniki dodawane po autoklawowaniu (g/l)			
CaCl ₂ x 2H ₂ O	<i>nd.</i>	<i>nd.</i>	0,05
FeCl ₃	<i>nd.</i>	<i>nd.</i>	0,003
Pożywka B5 Gamborga	<i>nd.</i>	<i>nd.</i>	3,1
Chlorowodorek tiaminy	<i>nd.</i>	<i>nd.</i>	0,002

nd. – nie dotyczy

3.1.6 Pożywki do hodowli roślin

W tabelach 3.6 i 3.7 zamieszczono, odpowiednio: skład zmodyfikowanej pożywki Fahraeus oraz pożywki ½ MS, które wykorzystywane były w hodowli *in vitro* roślin.

Tabela 3.6 Skład zmodyfikowanej pożywki Fahraeus

Składnik	Stężenie końcowe Fahraeus	Stężenie końcowe Fahraeus (-N)
Makroelementy		
CaCl ₂ x 2H ₂ O	0,9 mM	0,9 mM
MgSO ₄ x 7H ₂ O	0,5 mM	0,5 mM
KH ₂ PO ₄	0,7 mM	0,7 mM
Na ₂ HPO ₄	0,8 mM	0,8 mM
NH ₄ NO ₃	0,5 mM	0,0 mM
cytrynian żelaza	20 µM	20 µM
Mikroelementy		
MnCl ₂ x 4H ₂ O	100 µg/l	100 µg/l
CuSO ₄ x 5H ₂ O	100 µg/l	100 µg/l
ZnCl ₂	100 µg/l	100 µg/l
H ₃ BO ₃	100 µg/l	100 µg/l
Na ₂ MoO ₄ x 2H ₂ O	100 µg/l	100 µg/l
Agar dla roślin (Duchefa Biochemie)	12 g/l	12 g/l

pH 7,5 (6,5 dla roślin poddawanych brodawkowaniu)

Płynna (niezestaloną agarem) pożywka Fahraeus wykorzystywana była do podlewania roślin rosnących w doniczkach.

Tabela 3.7 Skład pożywki ½ MS

Składnik	Stężenie końcowe (g/l)
½ MS (M5519, Merck)	2,2
Agar dla roślin (Duchefa Biochemie)	8

pH 5,8

3.2 Metody

3.2.1 Praca z bakteriami

3.2.1.1 Hodowla bakterii

Hodowle bakterii prowadzono na stałym podłożu hodowlanym lub w płynnej pożywce (tabela 3.5), z dodatkiem odpowiedniego antybiotyku selekcyjnego, w określonych warunkach temperaturowych i przedziale czasowym (tabela 3.8). W przypadku hodowli płynnych, wzrost bakterii trwał do momentu osiągnięcia odpowiedniej wartości gęstości optycznej (ang. *optical density*, OD) mierzonej przy długości fali równej 600 nm (OD₆₀₀) w przedziale od 0,6 do 0,8.

Tabela 3.8 Warunki hodowli bakterii wykorzystanych w badaniach

Gatunek bakterii	Pożywka	Antybiotyk selekcyjny	Temperatura hodowli	Czas hodowli
<i>E. coli</i>	LB	<i>nd.</i>	37°C	ok. 16 h (hodowla nocna)
<i>A. rhizogenes</i>	YEP	streptomycyna (100 µg/ml)	28°C	ok. 48 h
<i>A. tumefaciens</i>	YEP	karbencylina (50 µg/ml)	28°C	ok. 48 h
<i>S. meliloti</i>	BMM	<i>nd.</i>	28°C	48 – 72 h

nd. – nie dotyczy

3.2.1.2 Przygotowanie bakterii do długoterminowego przechowywania

Zaszczepiano bakteriami 2 ml pożywki bakteryjnej (tabela 3.5) zawierającej odpowiednie antybiotyki selekcyjne i hodowano bakterie w określonych warunkach (tabela 3.8) z wytrząsaniem. Następnie 800 µl hodowli przenoszono do krioprobówek, po czym dodawano 800 µl 50% sterylnej, schłodzonego glicerolu. Próby mieszano za pomocą wytrząsarki stołowej Vortex Genie 2 (Scientific Industries, Bohemia, Nowy Jork, USA), a następnie przenoszono do ciekłego azotu. Bakterie przechowywano w temperaturze -80°C (zamrażarka CryoCube F570, Eppendorf, Niemcy)

3.2.1.3 Przygotowanie komórek elektrokompetentnych

Przygotowano 25 ml prehodowli bakterii w pożywce zawierającej odpowiedni antybiotyk selekcyjny. Następnie hodowlę rozcieńczano ok. 100-krotnie poprzez dodanie do 0,5 l pożywki bez antybiotyku 5 ml prehodowli. Po osiągnięciu OD₆₀₀ w zakresie 0,5 – 0,7, hodowlę bakteryjną umieszczano na lodzie. Dalsze etapy opisanego protokołu miały na celu usunięcie soli oraz innych elektrycznie nieobojętnych składników pożywki. Wyrosła 0,5-litrowa hodowla rozdzielona została na dwie części po 250 ml, które niezwłocznie wirowano z prędkością 5000 rpm w temperaturze 4°C przez 15 min. Do tego celu wykorzystano wirówkę J2-21 firmy Beckman (Pasadena, Kalifornia, USA) z wychylnym rotorem, zapewniającym odpowiednie warunki sedymentacji komórek. Supernatant usuwano, a pozostały w każdej z butelek osad zawieszono następnie w 250 ml schłodzonej wody destylowanej. Osad ten po kolejnych wirowaniach zawieszano jeszcze kolejno w 125 ml ultraczystej wody MQ, 5 ml zimnego 10% glicerolu oraz, w zależności od wyjściowej OD₆₀₀ hodowli, 0,5-0,8 ml 10% glicerolu. Z zawieszonych w 10% glicerolu bakterii przygotowano alikwoty o objętości 40 µl w 1,5 ml probówkach typu Eppendorf i mrożono poprzez zanurzenie w ciekłym azocie. Elektrokompetentne bakterie przechowywano w temperaturze -80°C (zamrażarka CryoCube F570).

3.2.1.4 Transformacja komórek bakterii metodą elektroporacji

10 µl odsolonej mieszaniny ligacyjnej lub 5 ng plazmidowego DNA (pDNA) (< 10 µl) dodawano do 40 µl świeżo rozmrożonej zawiesiny bakterii elektrokompetentnych. Następnie całość przenoszono do schłodzonej kuwety do elektroporacji ze szczeliną szerokości 0,2 cm typu GenePulser (Bio-Rad, Hercules, Kalifornia, USA). Kuwetę umieszczano niezwłocznie w urządzeniu do elektroporacji GenePulser (Bio-Rad) i bakterie poddawano działaniu pola elektrycznego o napięciu 2,5 kV przez 5 ms. Po elektroporacji bakterie zawieszano w 1 ml płynnej pożywki SOC (ang. *super optimal catabolite repression*) (*E. coli*) lub YEP (Agrobacterium). Po 1,5-godzinnej inkubacji bakterii w temperaturze odpowiednio 37°C i 28°C z wytrząsaniem, 50 µl transformowanej hodowli rozprowadzano równomiernie na szalkach Petriego z pożywkami hodowlanymi LB/YEP suplementowanymi odpowiednimi antybiotykami selekcyjnymi. Inkubacja bakterii na szalkach do momentu uzyskania widocznych gołym okiem kolonii prowadzona była przez noc w temperaturze 37°C (*E. coli*) lub 48 h w 28°C (Agrobacterium).

3.2.2 Praca z materiałem roślinnym

3.2.2.1 Skaryfikacja i sterylizacja nasion

W celu sterylizacji i skaryfikacji (zniesienia uśpienia fizycznego poprzez uszkodzenie okrywy nasiennej), nasiona *M. truncatula* wytrząsano w obecności 96% kwasu siarkowego (VI). W momencie pojawienia się na powierzchni nasion ciemnych odbarwień (po 10-15 min) usuwano kwas siarkowy, a następnie nasiona płukano 10-krotnie sterylną, schłodzoną wodą destylowaną. Tak przygotowane nasiona wykładano na powierzchnię zespolonej agarem pożywki ½ MS. Brzegi szalki zabezpieczano plastikową folią typu Parafilm, a następnie owijano w folię aluminiową w celu odcięcia dostępu światła. Nasiona inkubowano przez 4 dni w temperaturze 4°C w celu stratyfikacji (zniesienia uśpienia fizjologicznego) i zsynchronizowania kiełkowania. Proces kiełkowania inicjowano poprzez umieszczenie nasion w temperaturze pokojowej.

3.2.2.2 Warunki hodowli roślin w doniczkach

Medicago truncatula

Rośliny *M. truncatula* przeznaczone do propagacji oraz rośliny złożone, posiadające transgeniczne korzenie, hodowane były w doniczkach w pomieszczeniach fitotronowych w kontrolowanych warunkach, tj. w fotoperiodzie 16 h dzień/8 h noc, temperaturze 22°C, przy wilgotności powietrza 40% i natężeniu światła 250 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Rośliny przeznaczone do propagacji hodowano w podłożu wermikulit:perlit:ziemia, wymieszanych w stosunku objętościowym 5:2:3. Podlewano je trzykrotnie w ciągu tygodnia, w tym raz wodą oraz dwukrotnie nawozem do roślin doniczkowych (Agrecol, Mesznary, Polska), rozcieńczanym zgodnie z zaleceniami producenta (14 ml nawozu na 4 l wody). Rośliny złożone *M. truncatula* hodowano w podłożu perlit:wermikulit w stosunku objętościowym 5:2 i podlewano trzykrotnie w ciągu tygodnia, raz wodą oraz dwukrotnie płynną zmodyfikowaną pożywką Fahraeus bez azotu (tabela 3.6).

Arabidopsis thaliana

Kilkadziesiąt nasion *A. thaliana* wysiewanych było jednorazowo na powierzchni ziemi wypełniającej doniczki o pojemności 0,5 l. Rośliny podlewano regularnie wodą. Po około 2-3 tygodniach hodowli w pomieszczeniu fitotronowym zapewniającym kontrolowane warunki wzrostu (fotoperiod 10 h dzień/14 h noc, temperatura 22°C, natężenie światła 75 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$,

wilgotność 60%) odpowiednią ilość wyrosłych siewek, zależną od zapotrzebowania eksperymentalnego, przenoszono pojedynczo na krążki torfowe o średnicy 44 mm firmy Jiffy (Zwijndrecht, Holandia). Krążki ze świeżo przeniesionymi siewkami podlewano jednorazowo wodą z dodatkiem nawozu Wuxal (Kazgod, Polska) w stężeniu 0,1% (v/v). Rośliny umieszczone z powrotem w pomieszczeniu fitotronowym podlewano jedynie wodą.

Nicotiana benthamiana

Nasiona *N. benthamiana* wysadzano do 0,5 l doniczek zawierających ziemię i hodowane w komorach fitotronowych w fotoperiodzie 16 h dzień/8 h noc, temperaturze 22°C, przy wilgotności powietrza 40% i natężeniu światła 250 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Rośliny podlewano trzykrotnie w ciągu tygodnia wodą. 6-tygodniowe rośliny poddawano agroinfiltracji.

3.2.2.3 Warunki hodowli roślin *in vitro*

Hodowla roślin *M. truncatula* w warunkach *in vitro* odbywała się w szalkach Petriego o średnicy 20 cm, wewnątrz komór fitotronowych firmy Percival (E-41E) w kontrolowanych warunkach, w fotoperiodzie 16 h dzień/8 h noc, temperaturze 22°C, przy wilgotności powietrza 60% i natężeniu światła 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Siewki po skielkowaniu wykładano w sterylnych warunkach (pod komorą laminarną) na zestalone agarem pożywki hodowlanej pokryte bibułą (by zapobiec wrastaniu korzeni w głąb pożywki) (rycina 3.1).



Rycina 3.1 Hodowla *M. truncatula* na zmodyfikowanej pożywce Fahraeus

Rodzaj przygotowywanych pożywek wykorzystywanych w hodowli zależny był od docelowego przeznaczenia roślin. Wśród nich znajdowały się: stała zmodyfikowana pożywka Fahraeus w różnych wariantach ze zmienną zawartością azotanu amonu (NH_4NO_3) jako jedyne źródła

azotu oraz stała pożywka ½ MS. Ich skład wymieniony został odpowiednio w tabeli 3.6 oraz w tabeli 3.7. Pożywka ½ MS wykorzystywana była w eksperymentach, w których siewki *M. truncatula* traktowano egzogenicznie cytokininami, izopentenyladeniną (iP) i *trans*-zeatyną (tZ). Pozostałe eksperymenty *in vitro* prowadzone były na szalkach ze zmodyfikowaną pożywką Fahraeus.

3.2.2.4 Transformacja *Medicago truncatula* z użyciem bakterii *Agrobacterium rhizogenes*

Transformację *M. truncatula* poprzedzało wysianie bakterii *A. rhizogenes* zawierających pożądaną konstrukcję genową na stałą pożywkę YEP uzupełnioną o odpowiednie antybiotyki selekcyjne i ich hodowla przez 48 h w temperaturze 28°C. Zestaw wykorzystanych podczas hodowli antybiotyków wynikał z dwóch źródeł oporności bakterii. Pierwszym z nich była obecność genu kodującego białko oporności na streptomycynę w genomie wykorzystywanego w badaniach szczepu ARqua1 (tabela 3.8). Drugim natomiast była oporność tych bakterii wynikająca z użycia do ich transformacji odpowiednich wektorów plazmidowych, niosących, oprócz badanych konstrukcji genowych, również charakterystyczne geny oporności na antybiotyki (tabela 3.3). Kombinacje użytych konstrukcji genowych i odpowiadających im antybiotyków selekcyjnych podczas hodowli *A. rhizogenes* ARqua1 przedstawiono w tabeli 3.9.

Tabela 3.9 Antybiotyki użyte do selekcji bakterii *A. rhizogenes* zawierających odpowiednie konstrukcje genowe

Wektor	Konstrukcja genowa	Antybiotyki selekcyjne (stężenie końcowe)
pKGWFS7	<i>proMtABCG40:GUS</i>	streptomycyna (100 µg/ml), kanamycyna (50 µg/ml)
	<i>proMtLOG3:GUS</i>	
pPLV04	<i>proMtABCG40:NLS-GFP</i>	streptomycyna (100 µg/ml), kanamycyna (50 µg/ml)
pPLV11	<i>proMtLOG3:NLS-tdTomato</i>	streptomycyna (100 µg/ml), kanamycyna (50 µg/ml)
pK7GWIWG2(II)- DsRED	<i>MtABCG40</i> RNAi	streptomycyna (100 µg/ml), spektynomycyna (100 µg/ml)
	<i>MtLOG5</i> RNAi	

Transformacji bakteriami *A. rhizogenes* poddawane były świeżo skielkowane siewki *M. truncatula*. Ich korzeń o długości do 0,5 cm pozbawiany był części wierzchołkowej za pomocą

sterylnego skalpela. Powierzchnia powstałego w ten sposób zranienia przykładana była do hodowli bakterii *A. rhizogenes*. Tak potraktowana siewka odkładana była na stałą pożywkę Fahraeus wypełniającą szklane szalki Petriego o średnicy 9 cm, zawierającą 1 mM kwas α -aminoizomasłowy (ang. *α -aminoisobutyric acid*, AIB), który obniża hamujące rozwój roślin działanie etylenu (Serrano i wsp., 1990). Nietransgeniczne korzenie włosowate powstałe po tygodniu w miejscu zranienia były usuwane. Dalszy wzrost siewek odbywał się na pożywce Fahraeus zawierającej kanamycynę o stężeniu 25 μ g/ml w celu zahamowania wzrostu nietransgenicznych korzeni. Trwał on zwykle ok. 2-3 tygodni. Transgeniczność powstałych po tym czasie korzeni potwierdzano poprzez detekcję białka fluorescencyjnego (GFP, tdTomato, DsRED), analizę aktywności enzymatycznej GUS lub obniżenie ekspresji wycisanego genu (RNAi) względem konstrukcji kontrolnych. Przykładową szalkę z roślinami złożonymi przedstawiono na rycinie 3.2.



Rycina 3.2 Szalka z roślinami złożonymi, posiadającymi transgeniczne korzenie włosowate powstałe po transformacji bakteriami *A. rhizogenes*. Skala: 1 cm.

3.2.2.5 Analiza wzoru aktywności promotorów genów w tkankach korzenia

Materiał do analizy przestrzennego wzoru aktywności przedstawionych w pracy doktorskiej promotorów *MtABCG40* i *MtLOG3* stanowiły korzenie włosowate powstałe po transformacji siewek *M. truncatula* bakteriami *A. rhizogenes* niosącymi konstrukcje genowe: *proMtABCG40:GUS*, *proMtLOG3:GUS*, *proMtABCG40:NLS-GFP* oraz *proMtABCG40:NLS-tdTomato*. Badaniu poddawane były korzenie włosowate hodowane przez dwa tygodnie w doniczkach i niesuplementowane azotem. Celem analizy aktywności promotora *MtABCG40* podczas procesu brodawkowania, część z roślin transformowanych konstrukcją *proMtABCG40:GUS* inokulowano również bakteriami *S. meliloti* 1021/pXLGD4.

Zastosowanie tego szczepu umożliwiło odróżnienie formujących się brodawek korzeniowych od korzeni bocznych na podstawie barwnej reakcji mającej miejsce w komórkach bakterii dzięki aktywności enzymu GAL (tabela 3.1).

Korzenie transformowane konstrukcjami z genem kodującym GUS umieszczone zostały w mieszaninie wybarwiającej (tabela 3.10) zawierającej chromogenny substrat X-GlcA (ang. *5-bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-glucuronide cyclohexylammonium salt*) (nr kat. B6650, Sigma-Aldrich). Materiał poddano działaniu próżni przez 30 min, a następnie umieszczano w temperaturze 37°C do momentu pojawienia się niebieskiego zabarwienia korzeni. W zależności od badanego promotora, trwało to od kilku do 24 h. Wybarwione korzenie umieszczano na noc w roztworze 4% formaldehydu w PBS (BioShop) w temperaturze 4°C. Kolejnego dnia materiał płukano dwukrotnie w PBS przez 15 min i odwadniano w szeregu etanolowym: 15%, 20%, 30%, 50%, 70%, stosując każde ze stężeń przez 15 min. Korzenie przechowywane były w 70% etanolu w temperaturze 4°C. Tak przygotowany materiał przygotowywano do obserwacji mikroskopowych poprzez odbarwienie w roztworze podchlorynu sodu (nr kat. 806722992, POCH). Obserwacje prowadzono przy użyciu mikroskopu Leica DMI 4000B.

Tabela 3.10 Skład mieszaniny wybarwiającej do GUS

Składnik	Stężenie końcowe
Bufor fosforanowy (pH 7,0)	0,1 M
EDTA (pH 7,0)	10 mM
$K_4Fe(CN)_6 \times 3H_2O$	0,5 mM
$K_3Fe(CN)_6$	0,5 mM
Triton X-100	0,1%
X-GlcA*	1 mM
Woda destylowana	<i>nd.</i>

nd. – nie dotyczy

Korzenie transformowane *S. meliloti* 1021/pXLGD4 po wybarwianiu GUS płukane były dwukrotnie w buforze Z' (tabela 3.11) i inkubowane przez noc w temperaturze 28°C w 2% roztworze glutaraldehydu w buforze Z'. Następnie płukano je ponownie w buforze Z' i inkubowano przez noc w temperaturze 28°C w buforze (tabela 3.12) zawierającym Magenta-Gal (ang. *5-bromo-6-chloro-3-indolyl β -D-galactopyranoside*) (nr kat. B8931, Sigma-Aldrich), będący chromogennym substratem dla GAL. Tak wybarwiony materiał płukano dwukrotnie w

buforze Z' i odwadniano w szeregu etanolowym: 15%, 20%, 30%, 50%, 70%, stosując każde ze stężeń przez 15 min. Korzenie przechowywane były w 70% etanolu w temperaturze 4°C. Tak przygotowany materiał odbarwiany był przed obserwacjami mikroskopowymi w roztworze podchlorynu sodu. Obserwacje prowadzono przy użyciu mikroskopu Leica DMI 4000B

Tabela 3.11 Skład buforu Z'

Składnik	Stężenie końcowe
Bufor fosforanowy (pH 7,4)	0,1 M
MgSO ₄	1 mM
KCl	10 mM

Tabela 3.12 Skład mieszaniny wybarwiającej do GAL

Składnik	Stężenie końcowe
Bufor Z' (pH 7,4)	1X
K ₃ Fe(CN) ₈	5 mM
K ₄ Fe(CN) ₆	5 mM
Magenta-GAL	0,08%

Przygotowanie skrawków korzeniowych rozpoczynano od pocięcia odwodnionych w szeregu etanolowym do stężenia 70% korzeni na małe, kilkumilimetrowe fragmenty. Następnie przystępowano do kolejnego etapu odwadniania w stężeniach etanolu: 80%, 85%, 90%, 95%, 99,8%. Do korzeni w 99,8% etanolu dodawano jedną objętość wosku Steedmana (Norenburg i Barrett, 1987) i inkubowano przez noc w temperaturze 37°C. Materiał przenoszono do 100% wosku i inkubowano przez 3 h w temperaturze 37°C. W kolejnym kroku materiał zatapiano we wosku wypełniającym silikonowe rynienki. Powstałe woskowe bloczki cięto na skrawki o grubości 16 µm przy użyciu mikrotomu Leica RM2165, które umieszczano na szkiełkach podstawowych pokrytych 0,01% polietylenoiminą (ang. *polyethylenimine*, PEI; nr kat. 03880, Sigma) i zwilżonych wodą. Tak przygotowane szkiełko z materiałem zanurzano w 98% etanolu do momentu całkowitego odpłukania wosku, a następnie umieszczano na kilka sekund w ksylenie. Pozostały na szkiełku materiał pokrywano kroplą Entalanu (nr kat. 107961.0100, Merck) i zamykano szkiełkiem nakrywkowym. Obserwacje mikroskopowe prowadzone były przy użyciu mikroskopu Leica DMI 4000B.

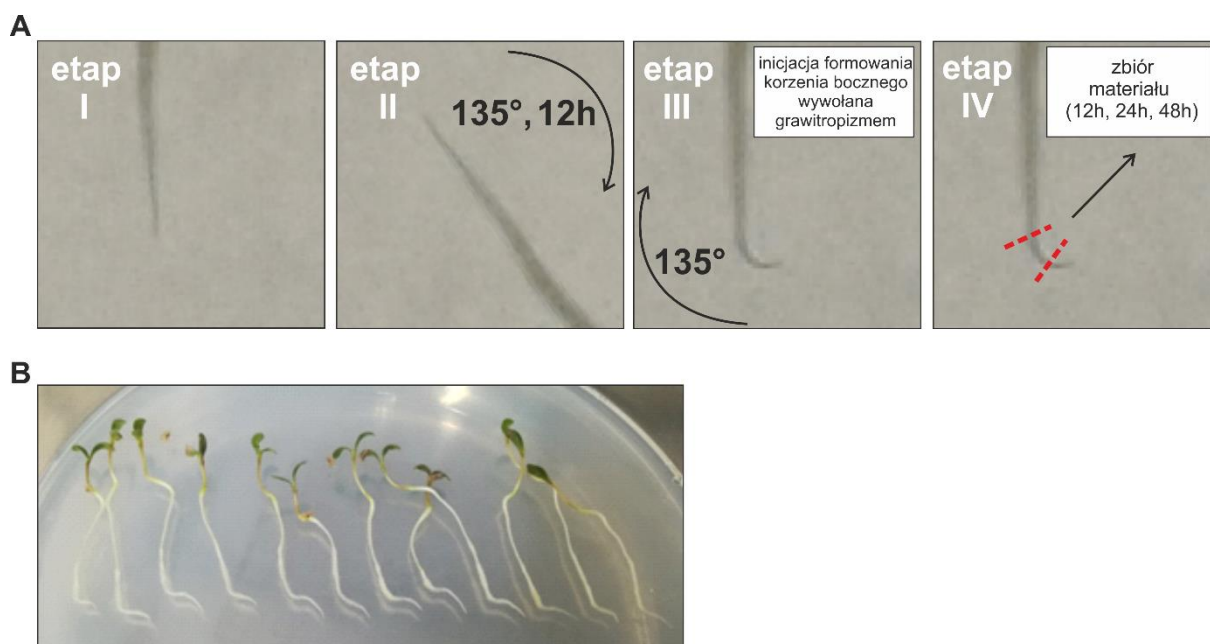
Transgeniczne korzenie włosowate niosące konstrukcje z genem kodującym GFP lub tdTomato umieszczane były na noc w roztworze 4% formaldehydu w PBS (BioShop) w temperaturze 4°C. Kolejnego dnia materiał płukano je dwukrotnie w PBS przez 15 min, po czym umieszczano w roztworze odbarwiający zawierającym mocznik (tabela 3.13). Tak przygotowany materiał poddawano obserwacjom przy użyciu laserowego skaningowego mikroskopu konfokalnego Leica TCS SP5.

Tabela 3.13 Skład roztworu odbarwiającego z mocznikiem

Składnik	Stężenie końcowe
Mocznik	6 M
Glicerol	30% (v/v)
Triton X-100	0,1% (v/v)
Bufor PIPES (pH 7)	80 mM

3.2.2.6 Grawitropiczna stymulacja inicjacji korzeni bocznych u *Medicago truncatula*

Grawitropiczna stymulacja (tzw. grawi-stymulacja) formowania korzeni bocznych prowadzona była na trzydniowych siewkach *M. truncatula* rosnących na pełnej zmodyfikowanej pożywce Fahraeus (0,5 mM NH₄NO₃), pokrytej bibułą w okrągłych szalkach Petriego o średnicy 20 cm (etap I). 72 h od skielkowania, szalki wraz z wyłożonymi na nich roślinami obracane były na 12 h o 135°. Prowokowało to zmianę kierunku wzrostu siewek i utworzenie charakterystycznego zagięcia przez ich korzenie (etap II). Po 12 h, szalki obracane były z powrotem do pozycji wyjściowej, co przyjmowano w przeprowadzonych eksperymentach za zerowy punkt czasowy. Korzenie wystawione były na działanie siły grawitacji, która stymulowała tworzenie korzeni bocznych z ich zagiętych fragmentów (etap III). Fragmenty takie były następnie zbierane w odpowiednich punktach czasowych do dalszych analiz (etap IV). Opisaną powyżej procedurę przedstawiono graficznie na rycinie 3.3.



Rycina 3.3 Grawitropiczna stymulacja (tzw. grawi-stymulacja) formowania korzeni bocznych u *M. truncatula*. A, Schemat przedstawiający przebieg procedury. B, Zdjęcia siewek poddanych grawi-stymulacji.

3.2.2.7 Analiza rozmiaru merystemów apikalnych korzeni

Analizie długości RAM poddawane były korzenie roślin rosnących przez 10 dni na zmodyfikowanej pożywce Fahraeus bez azotu (tabela 3.6). W celu ułatwienia oceny kształtu budujących je komórek, fragmenty apikalne tych korzeni, o długości ok. 1 cm, barwiono jodkiem propidyny (ang. *propidium iodide*, PI) (podrozdział 3.2.4.1), a następnie odbarwiano w roztworze wodzianu chloralu i zatapiano w płynie Hoyera (podrozdział 3.2.4.2). Rozmiar RAM określano jako odległość pomiędzy ich centrum spoczynkowym (ang. *quiescent center*, QC) a granicą merystemu ze strefą elongacji. Granica ta wyznaczana była w miejscu pojawienia się pierwszych wydłużonych komórek drugiej warstwy kory pierwotnej. Pomiaru rozmiaru komórek RAM ze ścianami komórkowymi wybarwionymi PI oraz z wykorzystaniem kontrastu Nomarskiego dokonywano z użyciem laserowego skaningowego mikroskopu konfokalnego Leica TCS SP5.

3.2.2.8 Pomiar stężenia fitohormonów we wierzchołkach wzrostu korzenia

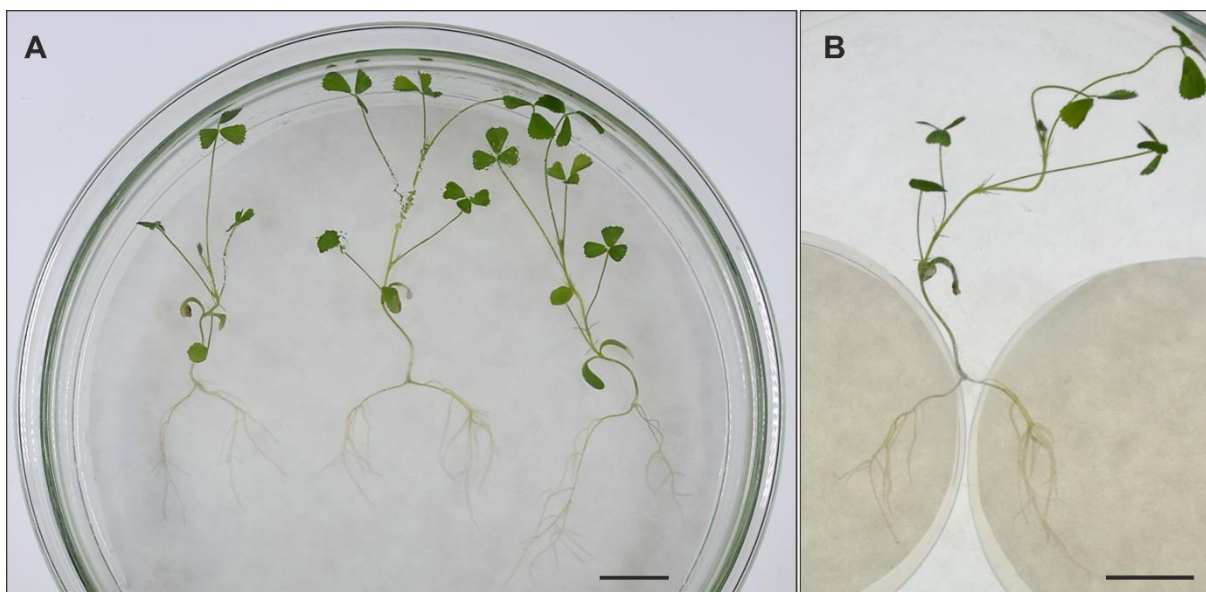
Pomiary przeprowadzili: Lenka Plačková i Ondřej Novák, Uniwersytet Palackiego w Ołomuńcu, Czechy.

Analizie stężenia aktywnych form cytokinin: iP, tZ, cZ i DHZ, oraz kwasu indolilo-3-octowego (ang. *indolilo-3-acetic acid*, IAA) poddane zostały korzenie roślin rosnących przez 10 dni na

zmodyfikowanej pożywce Fahraeus bez azotu (tabela 3.6). Każda z badanych prób zawierała 50 wierzchołków wzrostu. Zostały one umieszczone w sterylnej wodzie i zliofilizowane. Próby zostały zhomogenizowane, po czym poddano je ekstrakcji w 0,5 ml zmodyfikowanego buforu Bieleckiego (60% MeOH, 10% HCOOH, 30% H₂O) z dodatkiem wewnętrznych standardów w postaci fitohormonów wyznakowanych stabilnymi izotopami (0,25 pmol [²H₆]iP, [¹³C₅]cZ, [¹³C₅]tZ, [²H₃]DHZ lub 5 pmol of [¹³C₆]IAA na jedną próbę) (Svačinová i wsp., 2012). Poziom fitohormonów określono przy użyciu wysokosprawnej chromatografii cieczowej połączonej z tandemową spektrometrią mas z elektrorozpylaniem (HPLC-MS-ESI; system Acquity UPLC I-Class połączony ze spektrometrem masowym Xevo TQ-S, Milford, Massachusetts, Stany Zjednoczone) przy wykorzystaniu metod LC-MS/MS opracowanych przez Pěnčík i wsp. (2018) oraz Svačinová i wsp. (2012).

3.2.2.9 Wyprowadzanie roślin o rozdzielonym systemie korzeniowym

Siewki *M. truncatula* po skielkowaniu wykładano na szklane szalki Petriego o średnicy 20 cm ze zmodyfikowaną pożywką Fahraeus (pH 7,5) pokrytą bibułą. W szóstym dniu od skielkowania korzenie siewek usuwano i zakrywano końce pędów bibułą, by zapewnić odpowiednią wilgotność regenerującym korzeniom przybyszowym. Po 7 dniach regeneracji bibułę zdejmowano i dokonywano selekcji wyrosłych korzeni. Do dalszych eksperymentów wybierano tylko te rośliny, które posiadały parę względnie równych korzeni przybyszowych. Rośliny te rosły kolejne 7 dni, po czym ich korzenie przybyszowe umieszczano na dwóch rozdzielonych przestrzennie (dwie plastikowe szalki Petriego o średnicy 9 cm) stałych zmodyfikowanych pożywkach Fahraeus bez azotu, aby przygotować je do inokulacji bakteriami symbiotycznymi (rycina 3.4).



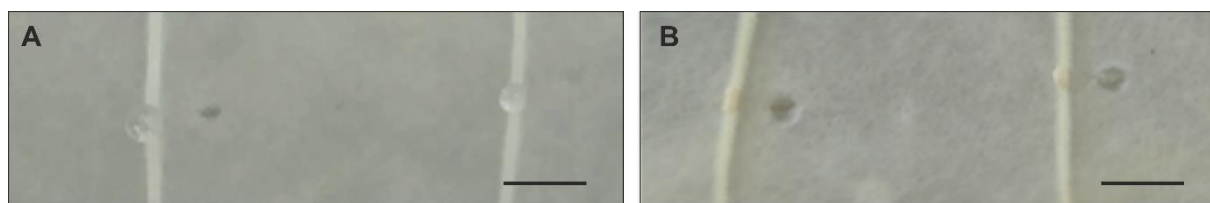
Rycina 3.4 Przygotowanie roślin *M. truncatula* z rozdzielonym systemem korzeniowym. A, Wybrane do badań rośliny z dwoma względnie równymi korzeniami przybyszowymi. B, Zastosowany układ doświadczalny z dwoma korzeniami przybyszowymi rozdzielonymi przestrzennie. Skala: 2 cm.

3.2.2.10 Inokulacja *Medicago truncatula* bakteriami symbiotycznymi *Sinorhizobium meliloti*

Przebieg hodowli bakterii *S. meliloti* przedstawiono w podrozdziale 3.2.1.1. Podczas gdy tak przygotowana hodowla większości szczepów bakterii *S. meliloti* była bezpośrednio wykorzystywana do inokulacji roślin, szczep 2011/pMH682 przed inokulacją hodowano dodatkowo bez antybiotyku selekcyjnego, a z dodatkiem 3 μ M luteoliny, zgodnie z protokołem punktowej inokulacji korzeni opisanym przez Schiessl i wsp. (2019). Miało to na celu stymulację produkcji czynnika Nod jeszcze przed kontaktem bakterii z korzeniami, co przyspieszyło późniejszą reakcję rośliny.

Sposób inokulacji poszczególnymi szczepami *S. meliloti* zależny był od sposobu hodowli roślin (doniczki, szalki *in vitro*) oraz od specyfiki przeprowadzanych doświadczeń. Rośliny złożone rosące przez tydzień w 0,5-litrowych doniczkach z mieszaniną perlitu i wermikulitu w stosunku 5:2 (v/v) i podlewane płynną pożywką Fahraeus bez azotu (pH 6,5) inokulowane były hodowlą bakterii *S. meliloti* 1021/pXLGD4 rozcieńczoną do $OD_{600} = 0,01$ w objętości 50 ml na doniczkę. Rozcieńczenia hodowli dokonano również za pomocą płynnej pożywki Fahraeus bez azotu (pH 6,5). Rozwój brodawek analizowany był w różnych punktach czasowych, od momentu inokulacji do 14 dni po inokulacji. Rośliny *mtabcg40* w analizie wydajności brodawkowania oraz rośliny WT ekotypu Jemalong A17 do analizy zmian ekspresji *MtABCG40* pod wpływem czynnika Nod rosące 4 dni na szalkach ze stałą pożywką Fahraeus

bez azotu (pH 6,8) inokulowane były rozcieńczonymi do $OD_{600} = 0,01$ hodowlami odpowiednich szczepów *S. meliloti* (tabela 3.1) w objętości 200 μ l na korzeń. Liczba brodawek *mtabcg40* zliczana była 21 dni po inokulacji. Ekspresja *MtABCG40* pod wpływem *S. meliloti* analizowana była w punktach czasowych: 6, 24 i 48 h po inokulacji. Punktowa inokulacja roślin podczas analizy tempa podziałów komórkowych w zawiązkach brodawek mutantów *MtABCG40* miała miejsce poprzez umieszczenie 0,5 μ l kropli zawiesiny *S. meliloti* 2011/pMH682 za pomocą pipety w strefie wrażliwej na bakterie symbiotyczne 3-dniowych korzeni roślin rosnących na pożywce Fahraeus bez azotu (pH 6,5). Hodowla szczepu 2011 była przed nakropieniem na korzenie rozcieńczona do $OD_{600} = 0,02$ (Schiessl i wsp., 2019). Strefa korzenia wrażliwa na bakterie symbiotyczne wyznaczana była pod binokulem w miejscu powyżej merystemu apikalnego, w którym po raz pierwszy pojawiają się włósniki. Miejsce nakropienia zawiesiny bakterii oznaczone zostało poprzez wykonanie kropki na fragmencie sąsiadującej z nim bibuły (rycina 3.5A). Materiał w postaci 2-3 mm fragmentów korzenia znajdujących się bezpośrednio pod kroplą zbierany był do dalszych analiz w punktach czasowych: 12, 24 i 48 h po inokulacji. W celu sprawdzenia efektywności punktowej inokulacji, niektóre z korzeni pozostawiano do momentu pojawienia się na nich brodawek korzeniowych w zaznaczonych wcześniej miejscach (rycina 3.5B).



Rycina 3.5 Siewki *M. truncatula* poddane punktowej inokulacji bakteriami symbiotycznymi *S. meliloti*. A, Siewki 12 h po punktowej inokulacji. B, Brodawki wyrosłe na korzeniach 10 dni po inokulacji. Miejsca nałożenia kropli zawiesiny *S. meliloti* oznaczone zostały poprzez wykonanie kropki na sąsiadującym z nim fragmencie bibuły. Skala: 5 mm.

3.2.2.11 Znakowanie jąder komórek dzielących się z użyciem 5-etynylo-2'-deoksyurydyny

Znakowanie jąder komórkowych we fragmentach korzenia wykazujących aktywność podziałową komórek rozpoczynało się od przygotowania stałej zmodyfikowanej pożywki Fahraeus z dodatkiem 10 μ M 5-etynylo-2'-deoksyurydyny (EdU; nr kat. A10044, Invitrogen), będącej analogiem tyminy. Na pożywkę taką przenoszono rośliny, a następnie pokrywano ich korzenie na 5 min bibułą nasączoną płynną zmodyfikowaną pożywką Fahraeus z dodatkiem 20 μ M EdU. Wzrost roślin po zdjęciu mokrej bibuły na stałej pożywce z EdU trwał 4 h, po czym

ich korzenie odcinane były i odwadniane z użyciem rosnącego szeregu etanolowego o stężeniach: 15%, 30%, 50%, 70%, 85%, 95% i 100%. Materiał pozostawiano na noc w 100% etanolu. W kolejnym dniu korzenie były traktowane odwrotnym szeregiem etanolowym: 100%, 95%, 85%, 70%, 50%, 30%, 15%. Następnie płukano je dwukrotnie w buforze fosforanowym (tabela 3.14) i inkubowano przez noc w temperaturze 37°C w roztworze α -amylazy (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany) o stężeniu 0,3 mg/mL w buforze fosforanowym (tabela 3.14). Materiał poddawano następnie barwieniu PI (podrozdział 3.2.4.1) i odbarwianiu (podrozdział 3.2.4.2), po czym przeprowadzono obserwacje mikroskopowe z wykorzystaniem laserowego skaningowego mikroskopu konfokalnego Leica TCS SP5.

Tabela 3.14 Skład buforu fosforanowego do α -amylazy

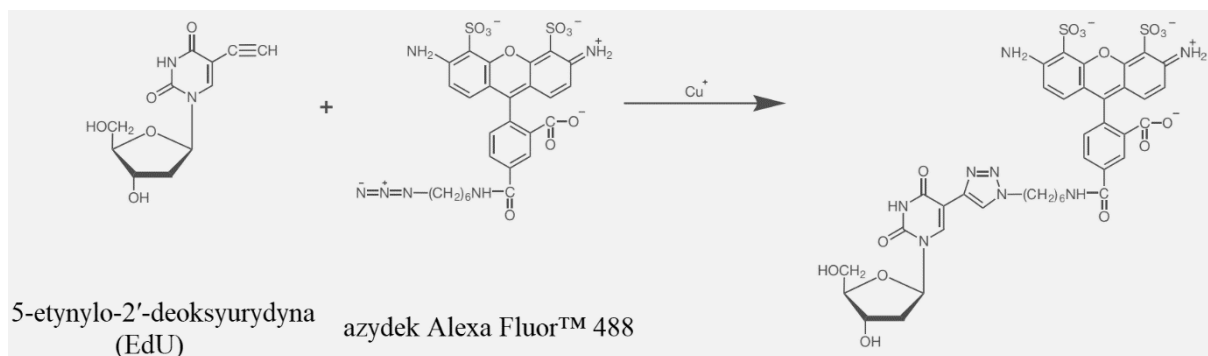
Składnik	Stężenie końcowe
NaH ₂ PO ₄	20 mM
NaCl	2 mM
CaCl ₂	0,25 mM

pH 7,0

Następnego dnia analizowane fragmenty korzeni płukane były dwukrotnie w wodzie i inkubowano je kolejno w zaciemnieniu w dwóch roztworach azydki Alexa Fluor™ 488 o stężeniu 10 μ M (nr kat. A10266, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) (tabela 3.15). Inkubacja w pierwszym z nich trwała 1 h, w drugim natomiast 0,5 h. W tym czasie azydek przyłączał się na drodze reakcji typu „click” do EdU obecnego w analizowanym materiale (rycina 3.6).

Tabela 3.15 Skład roztworów zawierających azydek Alexa Fluor™ 488

Składnik	Stężenie końcowe
Roztwór I (pH 8,5)	
Tris	100 mM
Azydek Alexa Fluor™ 488	10 μ M
Roztwór II (pH 8,5)	
Tris	100 mM
CuSO ₄	1 mM
Kwas askorbinowy	100 mM
Azydek Alexa Fluor™ 488	10 μ M



Rycina 3.6 Mechanizm katalizowanej przez jony miedzi (Cu^+) reakcji typu „click” zachodzącej pomiędzy EdU i azydem Alexa Fluor™ 488 (thermofisher.com/handbook; zmodyfikowane). W reakcji tej azydek Alexa Fluor™ 488 o właściwościach fluoroforu łączy cząsteczką EdU, który jako analog tymidyny wbudowuje się w DNA komórek podczas ich podziałów.

3.2.2.12 Izolacja i transformacja protoplastów z liści mezofilu *Arabidopsis thaliana*

Izolacja protoplastów z liści mezofilu *A. thaliana*

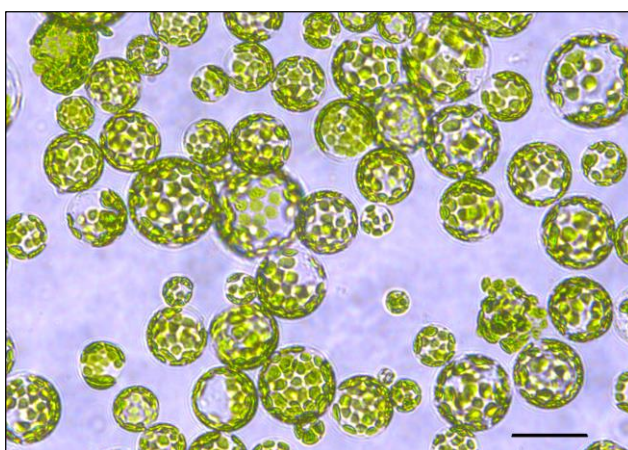
Do izolacji protoplastów wykorzystywane były liście 4 do 6-tygodniowych roślin *A. thaliana* z ekotypu Columbia (Col-0). W pierwszej kolejności przygotowano 20 ml mieszaniny enzymów trawiących ścianę komórkową, składających się z celulazy i macerozymu (tabela 3.16). Mieszaninę enzymów inkubowano 10 min w łaźni wodnej w temperaturze 55°C , po czym schładzano do temperatury pokojowej, filtrowano na zimo (filtr $0,22\ \mu\text{m}$) i wylewano na dno plastikowej szalki Petriego o średnicy 9 cm.

Do izolacji protoplastów wykorzystywano materiał z kilku do kilkunastu liści *A. thaliana*. Pojedynczy liść obklejano z dwóch stron taśmą klejącą, po czym delikatnym, zdecydowanym ruchem usuwano z niego warstwę dolnej epidermy. Pozostałą część liścia układano na powierzchnię mieszaniny enzymów trawiących ścianę komórkową i mieszano (40 rpm) w ciemności w temperaturze 28°C . Po 45 min inkubacji usuwano liście i uwolnione protoplasty dotrawiano przez kolejne 15 min. Roztwór zawierający protoplasty delikatnie przenoszono do 50 ml probówki typu Falcon i umieszczano na lodzie. Materiał wirowano w temperaturze 4°C z prędkością $200\ g$ przez 3 min (wirówka Eppendorf 5804R). Aby uniknąć pęknięcia protoplastów, podczas wirowania użyto rotora wychylnego (A-4-44), a wartości przyspieszenia oraz hamowania jego obrotów ustawiono na najwolniejsze z możliwych (0 w skali 0-9). Supernatant po wirowaniu usunięto, a pozostały osad zawieszono w 15 ml roztworu W5. Falcon z protoplastami w buforze W5 wirowano dwukrotnie w temperaturze 4°C z prędkością $150\ g$ przez 3 min, po czym zawieszono je w 1 ml roztworu MMg (tabela 3.16). Na tym etapie

integralność i liczbę wyizolowanych protoplastów sprawdzano pod mikroskopem świetlnym (rycina 3.7).

Tabela 3.16 Skład buforów wykorzystywanych podczas izolacji i transformacji protoplastów

Nazwa buforu	Składnik	Stężenie końcowe
Mieszanina enzymów	Cellulaza R10 (Serva)	1,2% (w/v)
	Macerozym R10 (Serva)	0,4 % (w/v)
	KCl	20 mM
	MES	20 mM
W1	Mannitol	500 mM
	KCl	20 mM
	MES	4 mM
W5	NaCl	154 mM
	CaCl ₂	125 mM
	KCl	5 mM
	MES	2 mM
MMg	Mannitol	400 mM
	MgCl ₂	15 mM
	MES	4 mM



Rycina 3.7 Zdjęcie protoplastów wyizolowanych z liści mezofilu *A. thaliana* spod mikroskopu świetlnego. Skala: 50 μ m.

Transformacja protoplastów

Transformację protoplastów poprzedzała izolacja plazmidu niosącego konstrukcję genową *proUBI10:GFP-MtABCG40* oraz plazmidu z konstrukcją *35S:AtPIP2A-mCherry*, kodującą białko akwaporyny AtPIP2a, będące markerem błony komórkowej, połączone z fluorescencyjnym białkiem mCherry. W celu uzyskania wysokiej ilości pDNA, niezbędnej do wydajnej transformacji protoplastów, jego izolacji dokonano z wykorzystaniem zestawu NucleoBond Xtra Midi Plus (Macherey-Nagel, Düren, Niemcy), uzyskując stężenia rzędu kilku $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Oba rodzaje pDNA, zawieszane w buforze TE (nr kat. 93283, Sigma-Aldrich), połączone zostały w ilości kilku mikrogram tak, by łączna objętość ich roztworów nie przekraczała kilkunastu mikrolitrów.

Transformację protoplastów prowadzono w 2 ml próbkach typu Eppendorf. Do wyizolowanych plazmidów (2-6 μg) zawieszonych w 4 μl buforu TE dodano 100 μl świeżo wyizolowanych protoplastów oraz 110 μl roztworu PEG (tabela 3.17) i delikatnie wymieszano. Tak przygotowaną mieszaninę inkubowano w ciemności w temperaturze pokojowej przez 20 min. Po tym czasie dodawano 450 μl roztworu W5, delikatnie mieszano i poddawano wirowaniu z prędkością 300 g przez 3 min. Powstałą warstwę supernatantu usuwano, a osad zawierający protoplasty zawieszano w 300 μl roztworu W1 i inkubowano w temperaturze pokojowej w ciemności przez kolejne 16 h (przez noc). Materiał poddawano obserwacjom przy użyciu laserowego skaningowego mikroskopu konfokalnego Leica TCS SP5.

Tabela 3.17 Skład roztworu PEG użytego do transformacji protoplastów

Składnik	Stężenie końcowe
PEG400 (Serva)	40% (w/v)
Mannitol	200 mM
CaCl ₂	100 mM

3.2.2.13 Agroinfiltracja komórek mezofilu liści *Nicotiana benthamiana*

Hodowlę bakterii *A. tumefaciens*, zawierających plazmid niosący analizowaną konstrukcję genową, prowadzono w temperaturze 28°C w 30 ml płynnej pożywki YEP z dodatkiem odpowiedniego antybiotyku selekcyjnego do momentu uzyskania OD₆₀₀ o wartości ok. 0,8. Hodowlę tę przenoszono do 50 ml probówek typu Falcon i wirowano w temperaturze pokojowej z prędkością 5000 rpm. Powstały supernatant usuwano, a osad zawieszano w 30 ml

buforu do agroinfiltracji, zawierającym acetosyringon (tabela 3.18) tak, by ponownie uzyskać OD \approx 0,8. Bakterie inkubowano następnie przez 3 h w temperaturze pokojowej z delikatnym mieszaniem na wyrzășarce rolkowej SU1400 (Sunlab). PrzygotowanĂ w ten sposób zawiesinĂ przenoszono do strzykawk (bez igły) i wstrzykiwano jĂ od spodniej strony liœci *N. benthamiana*. Liœcie poddane agroinfiltracji oznaczano. Po trzech dniach od nastrzykiwania materiał analizowano przy uŹyciu laserowego skaningowego mikroskopu konfokalnego Leica TCS SP5.

Tabela 3.18 Skład buforu do agroinfiltracji

Składnik	Stężenie końcowe
3M MgCl ₂	10 mM
1M MES-KOH (pH 5,6)	10 mM
150 mM acetosyringon (w DMSO)	150 μM

3.2.2.14 Eksperymenty transportu

Eksperymenty transportu przeprowadzili: Jian Xia i Markus Geisler, Uniwersytet we Fryburgu, Szwajcaria.

Protoplasty do eksperymentów transportu wyizolowane zostały z liœci *N. benthamiana* cztery dni po ich transformacji konstrukcją genowĂ *proUBI10:GFP-MtABCG40* lub wektorem kontrolnym (pMDC43), nie zawierającym sekwencji badanego genu. Transformację wykonano technikĂ agroinfiltracji. Transport przeprowadzony został zgodnie z protokołem opisanym przez Henrichs i wsp. (2012). Eksperymenty eksportu rozpoczynały się od inkubacji protoplastów w buforze zawierającym radioaktywnĂ *tZ* (¹⁴C-*tZ*) lub IAA (³H-IAA), co umożliwiło załadunek tych związków do wnętrza protoplastów na drodze dyfuzji. Protoplasty odseparowywano następnie od buforu z wykorzystaniem wirowania w gradiencie gęstości Percollu (50-30-5%). Eksport cytokinin inicjowano wraz z rozpoczęciem inkubacji protoplastów w temperaturze 25°C i przerywano poprzez wirowanie w oleju krzemionkowym. Pomiar radioaktywności uzyskanych faz wodnych w punkcie czasowym $t = x$ (20 min dla *tZ*, 15 min dla IAA) oraz $t = 0$ (bezpośrednio przed rozpoczęciem inkubacji w temperaturze 25°C) umożliwił określenie wartości względnego eksportu *tZ* i IAA z wnętrza protoplastów do supernatantu na podstawie wzoru:

$$\frac{(\text{radioaktywność supernatantu } t = x) - (\text{radioaktywność supernatantu } t = 0)}{\text{radioaktywność supernatantu } t = 0} * 100\%$$

Eksperymenty importu ^{14}C - tZ wykonywano z wykorzystaniem protokołu analogicznego do tego opisanego w przypadku eksperymentów eksportu. Dokonywano jednak pomiarów przemieszczania się badanego związku w odwrotnym kierunku, tj. ze supernatantu do wnętrza protoplastów na podstawie poziomu radioaktywności protoplastów. Wartość względnego import obliczano z wykorzystaniem wzoru:

$$\frac{(\text{radioaktywność protoplastów } t = x) - (\text{radioaktywność protoplastów } t = 0)}{\text{radioaktywność protoplastów } t = 0} * 100\%$$

3.2.3 Praca z kwasami nukleinowymi

3.2.3.1 Izolacja DNA z tkanek roślinnych

Genomowy DNA (gDNA) pozyskiwano z młodych liści *M. truncatula* oraz *A. thaliana*. Izolację prowadzono według protokołu opisanego przez Healeya i wsp. (2014). Pozwala on uzyskać wysokiej jakości gDNA, który wykorzystywano do tworzenia konstrukcji genowych. W celu określenia genotypu roślin z linii mutantów insercyjnych *Tnt1*, wykorzystywano szybszą metodę izolacji gDNA, opisaną przez Edwardsa i wsp. (1991).

Izolacja gDNA wg Healeya i wsp. (2014)

W schłodzonym moździerzu w ciekłym azocie ucierano 1 g świeżych liści *M. truncatula* lub *A. thaliana*. Utarty materiał roślinny zawieszono w buforze ekstrakcyjnym (tabela 3.19) ogrzany do 65°C i inkubowano 60 min, delikatnie mieszając co 10 min. Próby wirowano w temperaturze pokojowej przez 5 min z prędkością 5000 g. Otrzymany po wirowaniu supernatant przenoszono do 50 ml probówki typu Falcon i dodawano do niego 1 objętość mieszaniny chloroformu z alkoholem izoamylovym (24:1). Zawartość probówki delikatnie mieszano przez 5 min, a następnie wirowano przez 5 min w temperaturze pokojowej z prędkością 5000 g. Otrzymaną po wirowaniu górną fazę wodną przenoszono do nowej 50 ml probówki typu Falcon i po dodaniu 5 µl RNazy A o stężeniu 10 mg/ml inkubowano 15 min w 37°C, delikatnie mieszając. Do zawartości probówki dodano 1 objętość mieszaniny chloroformu z alkoholem izoamylovym (24:1), delikatnie mieszano przez 5 min, a następnie wirowano przez 10 min z prędkością 5000 g w temperaturze pokojowej. Górną fazę wodną przenoszono do nowej 50 ml probówki typu Falcon. Próbę połączono w kolejnym kroku z 0,5 objętości 5 M NaCl, a następnie z 3 objętościami 95% etanolu, po czym inkubowano przez 1 h w temperaturze -20°C. Próby wirowano przez 10 min z prędkością 5000 g, a powstały supernatant dekantowano.

Pozostały osad przemyto 3 ml 70% etanolu i wirowano 10 min z prędkością 5000 g. Supernatant ponownie dekantowano, a osad, zawierający gDNA, suszono w temperaturze pokojowej przez 15 min i rozpuszczono w 200 µl buforu TE.

Tabela 3.19 Skład buforu ekstrakcyjnego do izolacji gDNA metodą Healeya i wsp. (2014)

Składnik	Stężenie końcowe
Tris-HCl (pH 7,5)	100 mM
EDTA	25 mM
CTAB	2% (w/v)
NaCl	1,5 M
β-merkaptioetanol*	0,3% (v/v)

* dodawany na świeżo przed użyciem

Izolacja gDNA wg Edwardsa i wsp. (1991)

Do izolacji gDNA tą metodą wykorzystywano zwykle 3 młode liście *M. truncatula*, umieszczone w probówce typu Eppendorf o objętości 1,5 ml w ciekłym azocie lub przechowywane w temperaturze -80°C. Zamrożony materiał ucierano mikrohomogenizatorem ręcznym (nr kat. A-7100399, Bionovo) do otrzymania homogennego proszku, a następnie dodawano do niego 400 µl buforu do izolacji (tabela 3.20) i wytrząsano na wytrząsarce stołowej Vortex Genie 2 (Scientific Industries). Mieszaninę wirowano przez 1 min z prędkością 13000 rpm. 300 µl powstałego supernatantu zbierano do nowej probówki, dodawano do niego 300 µl izopropanolu, inkubowano w temperaturze pokojowej przez 2 min i wirowano przez 5 min z prędkością 13000 rpm. Supernatant usuwano, osad suszono i zawieszono w 75 µl buforu TE. Próbę wirowano z prędkością 13000 rpm przez 30 s. Powstały supernatant, zawierający gDNA, przenoszono do nowej probówki i przechowywano w temperaturze -20°C.

Tabela 3.20 Skład buforu do izolacji gDNA metodą Edwardsa i wsp. (1991)

Składnik	Stężenie końcowe
Tris-HCl (pH 7,5)	200 mM
NaCl	250 mM
EDTA	25 mM
SDS	0,5%

3.2.3.2 Izolacja plazmidowego DNA z bakterii

Plazmidowy DNA (pDNA) z hodowli bakteryjnych izolowano z wykorzystaniem zestawu Zymy Plasmid Miniprep Kit (Zymo Research), zgodnie z instrukcją dostarczoną przez producenta. Rozpuszczone w wodzie pDNA po izolacji przechowywano w temperaturze -20°C .

W celu uzyskania wysokiej ilości pDNA, niezbędnej do wydajnej transformacji protoplastów, izolacji dokonywano z wykorzystaniem zestawu NucleoBond Xtra Midi Plus (Macherey-Nagel, Düren, Niemcy).

3.2.3.3 Izolacja całkowitego RNA z materiału roślinnego

Całkowite RNA z tkanek roślinnych izolowano z wykorzystaniem zestawu RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen), zgodnie z instrukcją dostarczoną przez producenta. Rozpuszczony w wodzie RNA po izolacji przechowywano w temperaturze -20°C .

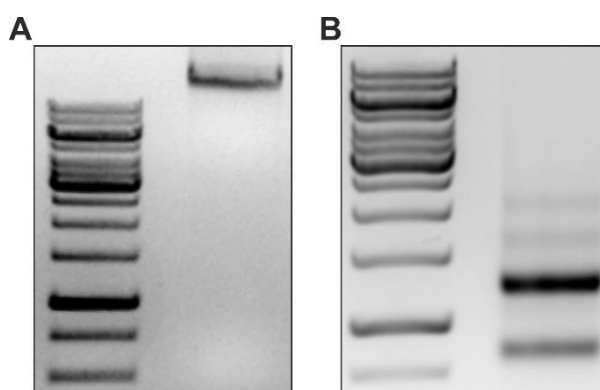
3.2.3.4 Ocena stężenia i jakości prób DNA i RNA

Pomiaru stężenia kwasów nukleinowych dokonywano przy użyciu spektrofotometru UV-VIS do mikroobjętości, NanoDrop One (Thermo Scientific). Urządzenie to umożliwiało jednocześnie ocenę jakości DNA i RNA poprzez wyznaczenie współczynników absorbancji A_{260}/A_{280} oraz A_{260}/A_{230} .

Jakość prób DNA i RNA oceniania była również poprzez ich rozdział elektroforetyczny w 1-1,5% żelu agarozowym przygotowanym z wykorzystaniem buforu 1xTAE (tabela 3.21) i zawierającym barwnik Gel View (Novazym) o stężeniu 1,6 $\mu\text{l}/100\text{ ml}$. Elektroforezę prowadzono przy napięciu 90 V przez 15 do 45 min, zależnie od momentu uzyskania wyraźnego rozdziału frakcji kwasów nukleinowych. Do analizy rozdziałów wykorzystywano transiluminator ChemiDoc XRS System (Bio-Rad). Na podstawie obrazów uzyskanych rozdziałów dokonywano oceny jakości i względnej ilości DNA lub RNA. Ich przykłady przedstawiono na rycinie 3.8.

Tabela 3.21 Skład buforu 1xTAE do elektroforezy

Składnik	Stężenie końcowe
Tris	40 mM
EDTA	1 mM
Kwas octowy	20 mM



Rycina 3.8 Przykładowe obrazy rozdziału kwasów nukleinowych wyizolowanych z materiału roślinnego w 1% żelu agarozowym. A, Rozdział 500 ng gDNA wyizolowanego z liści *M. truncatula*. Na zdjęciu widoczny jest tylko jeden prążek o wielkości powyżej 10 kpz, co świadczy o niskim stopniu degradacji wyizolowanego gDNA. B, Rozdział całkowitego RNA wyizolowanego z korzeni *M. truncatula*. Obecność i różnice intensywności widocznych prążków względem siebie świadczą o właściwie przeprowadzonej izolacji. W pierwszej ze ścieżek każdego z żeli zastosowano marker wielkości GeneRuler 1 kb DNA Ladder (nr kat. SM0311, Thermo Fisher Scientific).

3.2.3.5 Odwrotna transkrypcja

Reakcje odwrotnej transkrypcji RNA przeprowadzano z wykorzystaniem zestawu Omniscript RT Kit (QIAGEN), zgodnie z instrukcją producenta. Tak przygotowany cDNA wykorzystywano do analizy ekspresji genów. W celu uzyskania dłuższych i bardziej wiernych w stosunku do matrycowego RNA fragmentów cDNA, do klonowania wykorzystywano zestaw SuperScript III Reverse Transcriptase (Invitrogen), zgodnie z instrukcją producenta. W przypadku obu zestawów, do reakcji odwrotnej transkrypcji w objętości 20 μ l wykorzystywano zwykle 500 ng całkowitego RNA.

3.2.3.6 Reakcja łańcuchowa polimerazy

Reakcja PCR wykorzystywana była w pracy do potwierdzania występowania w próbach określonego fragmentu DNA, lub do klonowania fragmentów DNA. Do pierwszego z wymienionych celów wykorzystywano polimerazę GoTaq® DNA Polymerase (nr kat. M300, Promega). Skład mieszaniny reakcyjnej rekomendowanej przez producenta polimerazy został empirycznie zoptymalizowany przez pracowników Zakładu Fizjologii Molekularnej Roślin ICHB PAN – przedstawiono go w tabeli 3.22. Reakcję PCR prowadzono w termocyklerze C1000 Touch (Bio-Rad), zgodnie z profilem temperaturowym zawartym w tabeli 3.23.

Tabela 3.22 Skład mieszaniny reakcji PCR z polimerazą GoTaq® DNA Polymerase

Składnik	Stężenie początkowe	Objętość w mieszaninie reakcyjnej	Stężenie końcowe
Bufor do polimerazy GoTaq®	5x	5 µl	1x
Starter F	10 µM	1,25 µl	0,5 µM
Starter R	10 µM	1,25 µl	0,5 µM
dNTP	2 mM	2,5 µl	0,2 mM
Matryca	> 60 ng/µl	< 14,9 µl	4 ng/µl
Polimeraza GoTaq®	5 U/µl	0,1 µl	0,02 U/µl
H ₂ O MQ	<i>nd.</i>	do 25 µl	<i>nd.</i>

nd. – nie dotyczy

Tabela 3.23 Profil temperaturowy reakcji PCR z polimerazą GoTaq® DNA Polymerase

Nr etapu	Nazwa etapu	Temperatura	Czas trwania
1.	Denaturacja wstępna	95°C	5 min
2.	Denaturacja	95°C	30 s
3.	Przyłączenie starterów	50-56°C	30 s
4.	Wydłużanie	72°C	60 s/1000 pz
5.	Powrót do etapu nr 2 (całkowita liczba cykli -1)		
6.	Wydłużanie końcowe	72°C	10 min

Amplifikację fragmentów DNA wykorzystywanych do klonowania przeprowadzano z użyciem polimerazy KOD Hot Start DNA Polymerase (nr kat. 582423, Millipore). Było to podyktowane jej wysoką wiernością ze względu na aktywność 3'→5'egzonukleazową. Skład mieszaniny reakcyjnej rekomendowanej przez producenta polimerazy został zoptymalizowany przez pracowników Zakładu podczas wcześniejszych analiz. Przedstawiono go w tabeli 3.24. Reakcje PCR prowadzono w termocyklerze C1000 Touch (Bio-Rad), zgodnie z profilem temperaturowym opisanym w tabeli 3.25.

Tabela 3.24 Skład mieszaniny reakcji PCR z polimerazą KOD Hot Start DNA Polymerase

Składnik	Stężenie początkowe	Objętość w mieszaninie reakcyjnej	Stężenie końcowe
Bufor do polimerazy KOD	10x	2,5 µl	1x
Starter F	10 µM	0,75 µl	0,3 µM
Starter R	10 µM	0,75 µl	0,3 µM
dNTP	2 mM	2,5 µl	0,2 mM
MgSO ₄	25 mM	1,5 µl	1,5 mM
Betaina	5 M	5 µl	1 M
Matryca	> 46 ng/µl	< 11,5 µl	4 ng/µl
Polimeraza KOD	1 U/µl	0,5 µl	0,02 U/µl
H ₂ O MQ	<i>nd.</i>	do 25 µl	<i>nd.</i>

nd. – nie dotyczy

Tabela 3.25 Profil temperaturowy reakcji PCR z polimerazą KOD Hot Start DNA Polymerase

Nr etapu	Nazwa etapu	Temperatura	Czas trwania
1.	Denaturacja wstępna	95°C	2 min
2.	Denaturacja	95°C	20 s
3.	Przyłączenie starterów	50-56°C	10 s
4.	Wydlużanie	70°C	20 s/1000 pz
5.	Powrót do etapu nr 2 (całkowita liczba cykli -1)		

Jedną z metod wykorzystaną w pracy doktorskiej do potwierdzania obecności pożądanego fragmentu DNA tzw. wstawki (ang. *insert*) po klonowaniu w docelowym wektorze była modyfikacja tradycyjnej metody PCR, zwana kolonijną reakcją PCR. Polega ona na wykorzystaniu jako matrycy w reakcji PCR lizatu komórek bakteryjnych zawierających analizowane DNA/konstrukcję genową. Lizat taki otrzymywano poprzez inkubację komórek bakteryjnych przez 10-15 min w temperaturze 96°C. Kolonijną reakcją PCR przeprowadzano z użyciem polimerazy GoTaq® DNA Polymerase (Promega).

3.2.3.7 Analiza ekspresji genów metodą ilościowej reakcji PCR w czasie rzeczywistym

Wykorzystanie metody ilościowej reakcji PCR w czasie rzeczywistym (ang. *Real-Time PCR*, RT-PCR) pozwoliło na wyznaczenie względnej ekspresji genów *M. truncatula* w badanych próbach. Jednostkowa mieszanina reakcyjna podczas reakcji RT-PCR miała objętość 10 µl. Jej

skład przedstawiony został w tabeli 3.26. Użyto starterów o specyficznych genowo sekwencjach, wymienionych w tabeli 3.4. Reakcję PCR prowadzono w termocyklerze CFX Connect (Bio-Rad), zgodnie z profilem temperaturowym zawartym w tabeli 3.27.

Tabela 3.26 Skład 10 µl mieszaniny reakcyjnej w reakcji RT-PCR

Składnik	Stężenie początkowe	Objętość w mieszaninie reakcyjnej	Stężenie końcowe
matryca (cDNA)	*	1 µl	-
Starter F	10 µM	0,5 µl	0,5 µM
Starter R	10 µM	0,5 µl	0,5 µM
iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix (Bio-Rad)	2x	5 µl	1x
H ₂ O MQ	<i>nd.</i>	3 µl	<i>nd.</i>

* 10-krotnie rozcieńczona matryca cDNA przygotowana poprzez wykonanie reakcji odwrotnej transkrypcji 500 ng całkowitego RNA w 20 µl mieszaniny reakcyjnej.

nd. – nie dotyczy

Tabela 3.27 Profil temperaturowy reakcji RT-PCR

Nr etapu	Nazwa etapu	Temperatura	Czas
1.	Denaturacja wstępna	95°C	3 min
2.	Denaturacja	95°C	5 s
3.	Przyłączenie starterów	50-60°C	30 s
4.	Wydłużanie	70°C	30 s
5.	Powrót do etapu nr 2 (całkowita liczba cykli -1)		

Poziom ekspresji badanych genów określany został z wykorzystaniem metody $\Delta\Delta C_t$ przy pomocy oprogramowania Bio-Rad CFX Maestro 1.1. Do normalizacji wartości ekspresji użyto genu kodującego β -aktynę, ulegający ekspresji konstytutywnie i na stałym poziomie (Kakar i wsp., 2008). Ostateczny poziom ekspresji danego genu w próbie dla każdego powtórzenia biologicznego był wynikiem uśrednienia odczytów z trzech powtórzeń technicznych.

3.2.3.8 Genotypowanie mutantów insercyjnych *Tnt1*

Udostępnione w bazie *Medicago truncatula Mutant Database* (<https://medicago-mutant.dasnr.okstate.edu/mutant/index.php>) mapy insercji *Tnt1* w obrębie pozyskanych linii roślin NF21323 i NF17891 pozwoliły na zaprojektowanie starterów (tabela 3.4), które zostały

wykorzystane do wyselekcjonowania mutantów homozygotycznych (odpowiednio *mtabcg40-1* i *mtabcg40-2*), zawierających mutacje w obu allelach *MtABCG40* oraz roślin typu dzikiego (odpowiednio WT-1 i WT-2), które ich nie posiadają. Określenie genotypu roślin wykonane zostało dla każdej z linii poprzez przeprowadzenie dwóch reakcji PCR. Reakcja potwierdzająca obecność allelu zmutowanego wymagała użycia jednego startera znajdującego się obok miejsca mutacji oraz drugiego komplementarnego do sekwencji insercji retrotranspozonu *Tnt1*. Brak mutacji w roślinach WT powodował tym samym brak produktu PCR. W reakcji dla allelu WT wykorzystywano natomiast dwa startery komplementarne do analizowanego genu, okalające wyznaczone miejsce insercji i tworzące amplikon o długości kilkuset pz. Mutacja w tym miejscu skutkowałą brakiem produktu amplifikacji ze względu na długość retrotranspozonu, ok. 5 tys. pz. Opisane reakcje PCR przebiegały zgodnie z protokołem dla polimerazy GoTaq® DNA Polymerase (Promega) opisanym w podrozdziale 3.2.3.6. Produkty reakcji PCR rozdzielone zostały w 1,5% żelu agarozowym z dodatkiem barwnika Gel View (Novazym) o stężeniu 1,6 µl/100 ml. Elektroforezę prowadzono przy napięciu 90 V przez 30 min. Do analizy rozdzielców wykorzystywano transiluminator ChemiDoc XRS System (Bio-Rad).

3.2.3.9 Przygotowanie konstrukcji genowych

Źródłem konstrukcji genowych wykorzystywanych w trakcie realizacji niniejszej pracy były następujące metody klonowania: metoda restrykcji-ligacji, metoda klonowania w systemie Gateway (Invitrogen), metoda klonowania niezależna od ligacji (ang. *ligation-independent cloning*, LIC). Jedną z użytych konstrukcji genowych stworzona została ponadto przez firmę GeneScript (Holandia).

Klonowanie w systemie Gateway (ang. *Gateway Cloning System*)

Wykorzystanie systemu klonowania Gateway pozwoliło na otrzymanie konstrukcji genowych wymienionych w tabeli 3.28. W pierwszym etapie klonowania amplifikacji poddawano pożądane fragmenty DNA przy użyciu starterów z przyłączonymi na końcach 5' odpowiednio sekwencjami *attB1* i *attB2*, co warunkuje wprowadzenie wstawki do wektora donorowego (ang. *donor vector*), pDONR/Zeo (Invitrogen), zawierającego sekwencje *attP1* i *attP2* na drodze rekombinacji homologicznej. Reakcja ta katalizowana jest przez mieszaninę enzymów BP Clonase™ II, zawierającą integrację bakteryjną i czynnik integracji gospodarza i prowadzi do powstania tzw. klonu wejściowego (ang. *entry clone*). Skład mieszaniny reakcji BP został wymieniony w tabeli 3.29. Reakcja BP prowadzona była przez 1,5 h w temperaturze 25°C.

Inaktywację przeprowadzano poprzez dodanie do próby proteiny K i dalszą inkubację przez 10 min w temperaturze 37°C.

Tabela 3.28 Konstrukcje genowe powstałe z wykorzystaniem systemu klonowania Gateway

Docelowa konstrukcja genu	Wstawka	Wektor donorowy	Wektor docelowy	Przeznaczenie eksperymentalne
<i>proMtABCG40:GUS</i>	<i>proMtABCG40</i>	pDONR/Zeo	pKGWFS7	• określenie wzoru ekspresji <i>MtABCG40</i>
<i>proMtLOG3:GUS</i>	<i>proMtLOG3</i>	pDONR/Zeo	pKGWFS7	• określenie wzoru ekspresji <i>MtLOG3</i>
<i>MtABCG40</i> RNAi	fragment 5'UTR	pDONR/Zeo	pK7GWIWG2(II): DsRED	• wyciszenie ekspresji <i>MtABCG40</i>
<i>MtLOG3</i> RNAi	fragment 3'UTR	pDONR/Zeo	pK7GWIWG2(II): DsRED	• wyciszenie ekspresji <i>MtLOG3</i>

Tabela 3.29 Skład mieszaniny reakcyjnej reakcji BP

Składnik	Objętość
Produkt PCR (flankowany sekwencjami <i>attB</i>)	1-7 µl (150 ng)
pDONR/Zeo	1 µl (150 ng)
Bufor TE pH 8.0	ad 8 µl
BP Clonase II	2 µl

Z mieszaniny reakcyjnej po reakcji BP usuwano sól poprzez mikrodializę i przystępowano do transformacji bakterii *E.coli* DH5α na drodze elektroporacji (podrozdział 3.2.1.4). Zawiesinę po transformacji wysiewano na stałą pożywkę LB o obniżonej zawartości soli (tabela 3.30) z dodatkiem antybiotyku selekcyjnego w postaci zeocyny o stężeniu 50 µg/ml. Powstałe kolonie bakteryjne poddawane były selekcji na obecność wstawki za pomocą kolonijnej reakcji PCR (podrozdział 3.2.3.6), a następnie pozytywne kolonie posłużyły do izolacji plazmidowego DNA (klonu wejściowego).

Tabela 3.30 Skład stałej pożywki LB o obniżonej zawartości soli

Składnik	Ilość (na 1 l)
Pepton	10 g
Ekstrakt drożdżowy	5 g
NaCl	5 g
Agar	12 g

Następnie na drodze rekombinacji homologicznej katalizowanej przez mieszaninę enzymów LR Clonase II (Invitrogen) interesujący fragment DNA umieszczony między sekwencjami *attL1* i *attL2* w obrębie klonu wejściowego przeniesiono do wektora docelowego (ang. *destination vector*), zawierającego sekwencje *attR1* i *attR2* (tabela 3.28). Skład mieszaniny reakcji LR został wymieniony w tabeli 3.31. Reakcję prowadzono przez 1,5 h w temperaturze 25°C. Reakcję zatrzymywano poprzez dodanie 1 µl proteiny K i inkubację 10 min w temperaturze 37°C.

Tabela 3.31 Skład mieszaniny reakcyjnej reakcji LR

Składnik	Objętość
Wektor wejściowy ze wstawką	1-7 µl (150 ng)
Wektor docelowy	1 µl (150 ng)
Bufor TE pH 8.0	<i>ad</i> 8 µl
BP Clonase II	2 µl

Powstałe konstrukcje docelowe były odsalane i wprowadzane do komórek *E. coli* DH5α na drodze elektroporacji (podrozdział 3.2.1.4). Kolonie bakteryjne wyrastały na stałej pożywce LB (tabela 3.5) z dodatkiem odpowiedniego antybiotyku selekcyjnego. Obecność pozytywnych klonów bakteryjnych, czyli kolonii posiadających pożądaną wstawkę, potwierdzano za pomocą kolonijnej reakcji PCR (podrozdział 3.2.3.6), hydrolizy enzymami restrykcyjnymi oraz sekwencjonowania. Do analizy restrykcyjnej wykorzystywano enzymy FastDigest (Thermo Scientific), zgodnie z zaleceniami producenta. Sekwencjonowanie otrzymanego pDNA wykonane było przez firmę Genomed (Warszawa).

Synteza wykonana przez firmę GeneScript

Konstrukcja genu *pro2x35S:GFP-MtABCG40* sporządzona została komercyjnie przez firmę GenScript (Holandia) (tabela 3.32). Jej przygotowanie rozpoczęło się od syntezy fragmentu genu *MtABCG40* zbudowanego z dwóch części: sekwencji genomowej (od 1. egzonu do 4. intronu) na końcu 5' oraz sekwencji cDNA (składającej się z egzonów od 5. do ostatniego, 24.). Sekwencja ta w obrębie egzonów została zoptymalizowana w celu zwiększenia wydajności tworzenia funkcjonalnego białka w układzie heterologicznym w komórkach tytoniu. Zsyntetyzowany fragment *MtABCG40* został następnie wprowadzony za pomocą enzymów restrykcyjnych *AscI* i *PacI* do wektora pMDC43. Powstałą konstrukcję przechowywano w bakteriach *E. coli*.

Tabela 3.32 Konstrukcja przygotowana przez firmę GeneScript

Docelowa konstrukcja genu	Wyjściowy wektor	Wstawka	Wykorzystane enzymy restrykcyjne	Przeznaczenie eksperymentalne
<i>pro2x35S: GFP-MtABCG40</i>	pMDC43	zoptymalizowany hybrydowy (gDNA + cDNA) fragment <i>MtABCG40</i>	<i>AscI, PacI</i>	• stworzenie konstrukcji genowej <i>ProUBI10: GFP-MtABCG40</i>

Metoda restrykcji-ligacji

Na drodze restrykcji-ligacji otrzymano konstrukcję genową opisaną w tabeli 3.33.

Tabela 3.33 Konstrukcja genu otrzymana metodą restrykcji-ligacji

Docelowa konstrukcja genu	Wyjściowa konstrukcja genu	Wstawka	Wykorzystane enzymy restrykcyjne	Przeznaczenie eksperymentalne
<i>proUBI10: GFP-MtABCG40</i>	<i>pro2x35S: GFP-MtABCG40</i>	<i>proUBI10 (A.thaliana)</i>	<i>PstI</i> (nr kat. FD0615), <i>BamHI</i> (nr kat. FD0054)	• określenie subkomórkowej lokalizacji <i>MtABCG40</i> • transport cytokinin przez <i>MtABCG40</i>

Klonowanie w wykorzystaniu tej metody poprzedziła amplifikacja docelowej wstawki z użyciem starterów (tabela 3.4) zawierających na końcu 5' dodatkowe sekwencje z miejscami rozpoznawanymi przez enzymy restrykcyjne oraz poprzedzające je 4 nukleotydy, których obecność miała na celu zwiększenie wydajności hydrolizy. Powstały podczas reakcji PCR fragment z miejscami restrykcyjnymi był następnie oczyszczany przy użyciu zestawu DNA Clean & Concentrator™ (nr kat. D4005, Zymo Research), zgodnie z instrukcją producenta. Oczyszczona wstawka oraz wyjściowa konstrukcja genu hydrolyzowane były w kolejnym kroku przez wybrane enzymy restrykcyjne FastDigest (Thermo Scientific), zgodnie z instrukcją producenta, przy długości hydrolizy zamieszczonej w tabeli 3.34.

Tabela 3.34 Czas trwania hydrolizy enzymami restrykcyjnymi

	<i>pro2x35S:GFP-MtABCG40</i>	<i>proUBI10</i>
FastDigest <i>Pst</i> I	5 min	30 min
FastDigest <i>Bam</i> HI	5 min	5 min

Wstawka po hydrolizie oczyszczana była po raz kolejny zestawem DNA Clean & Concentrator™. Wyjściowa konstrukcja genu była natomiast po hydrolizie mieszaniną dwóch liniowych fragmentów DNA: mniejszego, zawierającego jedynie promotor *2x35S*, usuwanego podczas dalszych etapów klonowania, oraz większego, zbudowanego z sekwencji *GFP-MtABCG40* oraz reszty wektora pMDC43. Pozbycia się promotora *2x35S* dokonano poprzez rozdział obu fragmentów w 0,7% żelu agarozowym MB Agarose (nr kat. 20012-4174, Biotools) zawierającym bromek etydyny o stężeniu 1 µg/ml w buforze Modified TAE Buffer (nr kat. LSKMTAE50, Millipore), charakteryzującym się zmniejszoną zawartością EDTA. Elektroforezę prowadzono początkowo przy napięciu 50 V. Po 15 min wartość napięcia zwiększono do 90 V. Całkowity czas elektroforezy równy był 2 h. Większy z fragmentów DNA, o długości powyżej 10 kbp wycięty został przy użyciu sterylnej skalpela z fragmentem otaczającym go żelu i oczyszczony przy użyciu zestawu Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit (nr kat. D4002, Zymo Research), zgodnie z instrukcją producenta. Tak przygotowana wstawka oraz zlinearyzowany wektor, zawierające komplementarne lepkie końce, poddane zostały ligacji w stosunku molowym 3:1. Do tego celu użyto ligazy DNA faga T4 (nr kat. E1060, EURx), zgodnie z protokołem producenta. Reakcja ligacji prowadzona była przez 4 h w temperaturze pokojowej, po czym mieszaninę ligacyjną umieszczono w 4°C w celu

niezwłocznego odsolenia i wykorzystania do transformacji bakterii metodą elektroporacji. Obecność pozytywnych klonów bakteryjnych, czyli kolonii posiadających pożądaną wstawkę, potwierdzano za pomocą kolonijnej reakcji PCR (podrozdział 3.2.3.6), hydrolizy enzymami restrykcyjnymi oraz sekwencjonowania. Do analizy restrykcyjnej wykorzystywano enzymy FastDigest (Thermo Scientific), zgodnie z zaleceniami producenta. Sekwencjonowanie otrzymanego pDNA wykonane było przez firmę Genomed (Warszawa).

Metoda klonowania bez ligacji (ang. *ligation-independent cloning, LIC*)

Wykorzystanie metody klonowania LIC pozwoliło na otrzymanie konstrukcji genowych wymienionych w tabeli 3.35.

Tabela 3.35 Konstrukcje genowe otrzymane metodą LIC

Docelowa konstrukcja genu	Wyjściowy wektor	Wstawka	Przeznaczenie eksperymentalne
<i>proMtABCG40:NLS-GFP</i>	pPLV04_v2	<i>proMtABCG40</i>	• określenie wzoru ekspresji <i>MtABCG40</i>
<i>proMtLOG3:NLS-tdTomato</i>	pPLV11_v2	<i>proMtLOG3</i>	• określenie wzoru ekspresji <i>MtLOG3</i>

Klonowanie z użyciem tej metody rozpoczęło się od przygotowania wstawek, czyli fragmentów *MtABCG40* i *MtLOG3* o długości ok. 2000 pz, znajdujących się przed początkiem ich sekwencji kodującej i odpowiadających promotorom tych genów (od końca 5') oraz sekwencjom 5'UTR (od końca 3'). Wstawki zamplifikowano z użyciem starterów z przyłączonymi od strony 5' sekwencjami adapterów, charakterystycznymi dla LIC (tabela 3.4). W kolejnym kroku odpowiedni wektor z serii pPLV został zlinearyzowany z użyciem enzymu restrykcyjnego FastDigest *KspAI* (izoschizomer *HpaI*, nr kat. FD1034, Thermo Scientific). Wektor po hydrolizie został rozdzielony w 0,7% żelu agarozowym MB Agarose (nr kat. 20012-4174, Biotools) z bromkiem etydyny o stężeniu 1µg/ml w buforze Modified TAE Buffer (nr kat. LSKMTAE50, Millipore), o zmniejszonej zawartości EDTA. Rozdział prowadzono przez 15 min przy napięciu 50 V, a następnie przez 45 min przy 90 V. Fragment żelu ze zlinearyzowanym wektorem został wycięty sterylnym skalpelem. DNA wektora zostało oczyszczone z żelu przy pomocy zestawu Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit (Zymo Research). Następnie przystąpiono do tworzenia tzw. „lepkich końców” na zakończeniach

przygotowanej wstawki oraz zlinearyzowanego wektora. Wykorzystano w tym celu aktywność 3'→5' egzonukleazową polimerazy DNA z faga T4 (nr kat. M0203S, NEB). Skład mieszanin reakcyjnych dla wstawki i wektora przedstawiono w tabeli 3.36. Reakcję prowadzono w termocyklerze C1000 Touch firmy Bio-Rad przez 75 min w 22°C i inaktywowano przez 20 min w 75°C. Wstawkę i wektor po reakcji tworzenia lekkich końców połączono w stosunku molowym 3:1 i inkubowano przez noc w temperaturze 4°C. Mieszaninę niezwłocznie odsolono i użyto do elektroporacji bakterii *E. coli* DH5α (podrozdział 3.2.1.4). Obecność pozytywnych klonów bakteryjnych, czyli kolonii posiadających pożądaną wstawkę, potwierdzano za pomocą kolonijnej reakcji PCR (podrozdział 3.2.3.6) oraz sekwencjonowania. Do analizy restrykcyjnej wykorzystywano enzymy FastDigest (Thermo Scientific), zgodnie z zaleceniami producenta. Sekwencjonowanie otrzymanego pDNA wykonane było przez firmę Genomed (Warszawa).

Tabela 3.36 Skład mieszanin reakcyjnych tworzenia lekkich końców dla wstawki i wektora

Składnik	Mieszanina reakcyjna ze wstawką		Mieszanina reakcyjna z wektorem	
	Objętość	Stężenie końcowe	Objętość	Stężenie końcowe
Roztwór DNA	(350 ng DNA)	17,5 ng/ μl	(350 ng DNA)	8,75 ng/ μl
Bufor T4 (10x)	2 μl	1x	4 μl	1x
dGTP (100 mM)	2 μl	10 mM	<i>nd.</i>	10 mM
dCTP (100 mM)	<i>nd.</i>	<i>nd.</i>	4 μl	5 mM
DTT (100 mM)	1 μl	5 mM	2 μl	<i>nd.</i>
BSA (100 x)	0,2 μl	1x	0,4 μl	1x
Polimeraza T4 DNA (3 U/μl)	0,4 μl	0,06 U/μl	0,8 μl	0,06 U/μl
H ₂ O MQ	<i>ad</i> 20 μl	<i>nd.</i>	<i>ad</i> 40 μl	<i>nd.</i>

nd. – nie dotyczy

3.2.4 Przygotowywanie preparatów mikroskopowych

3.2.4.1 Barwienie ścian komórkowych jodkiem propidyny

Materiał poddany barwieniu jodkiem propidyny (nr kat. P4170, Sigma) był wstępnie inkubowany przez 0,5 h w 1% roztworze kwasu nadjodowego (nr kat. P7875, Sigma-Aldrich). Następnie kwas ten odpłukiwano dwukrotnie wodą destylowaną, po czym materiał umieszczano na 2 h w mieszaninie zasady Schiffa z jodkiem propidyny, której skład

zamieszczono w tabeli 3.37. Następnie przystępowano do odparwania preparatu wodzianem chloralu (podrozdział 3.2.4.2).

Tabela 3.37 Skład zasady Schiffa z jodkiem propidyny

Składnik	Stężenie końcowe
Pirosiarczyn sodu	100 mM
HCl	0,15 N
Jodek propidyny*	100 µg/ml

* dodawany do mieszaniny na świeżo

3.2.4.2 Odbarwianie preparatów z użyciem wodzianu chloralu

Obserwacje mikroskopowe korzeni poprzedzane były ich odbarwianiem przez 1 h z wykorzystaniem wodzianu chloralu (nr kat. 23100, Sigma-Aldrich) w mieszaninie, której skład przedstawiono w tabeli 3.38.

Tabela 3.38 Skład mieszaniny do odbarwiania prób

Składnik	Ilość
Wodzian chloralu	4 g
Glicerol	1 ml
Woda	2 ml

Materiał był następnie наносzony na szkiełka podstawowe i pokrywany cienką warstwą środka utrwalającego, zwanego płynem Hoyera (tabela 3.39), i przykrywany szkiełkiem nakrywkowym. Tak przygotowane preparaty były odkładane na co najmniej 3 dni w zaciemnione miejsce do momentu ich utrwalenia. Po tym czasie przystępowano do obserwacji mikroskopowych.

Tabela 3.39 Skład płynu Hoyera

Składnik	Ilość
Woda	50 ml
Wodzian chloralu	200 g
Glicerol	20 g
Guma arabska	30 g

Płyn Hoyera przygotowano pod włączonym wyciągiem. Gumę arabską w szklanej zlewce dodano do wody, po czym tak przygotowaną zawiesinę mieszano do momentu rozpuszczenia z użyciem mieszadła magnetycznego w temperaturze 60°C. Następnie, ciągle mieszając w 60°C, dodawno kolejno wodzian chloralu i glicerol. Wyłączano mieszadło magnetyczne w celu pozbycia się pęcherzyków powietrza. W przypadku zbyt niskiej płynności przygotowanej mieszaniny, dodawano do niej niewielkie ilości glicerolu do momentu upłynnienia. Mieszaninę przechowywano szczelnie zamkniętą i nakładano na preparaty w temperaturze pokojowej.

3.2.5 Analiza statystyczna

Do analiz statystycznych przeprowadzonych w pracy doktorskiej użyto oprogramowania GraphPad Prism 8.0. Normalność rozkładu danych w każdej z analizowanych grup była weryfikowana w oparciu o test Shapiro-Wilka. Istotność statystyczną danych o rozkładzie normalnym określano z wykorzystaniem testów parametrycznych, tj. dwustronnego testu t-Studenta, dwustronnego testu t-Welcha lub jednoczynnikowego testu ANOVA z testem post-hoc wielokrotnych porównań Tukeya. Istotność statystyczną danych niemających rozkładu normalnego określono z wykorzystaniem testów nieparametrycznych, tj. dwustronnego testu Manna-Whitneya lub testu Kruskala-Wallisa z testem post-hoc wielokrotnych porównań Dunna. Rodzaj testów statystycznych wykorzystanych w pracy doktorskiej do analizy wyników przedstawiony został w opisach rycin, na których te wyniki zostały zaprezentowane.

3.2.6 Numery akcesyjne genów

Poniżej wymienione zostały numery akcesyjne genów, których sekwencje wykorzystano w trakcie realizacji pracy doktorskiej:

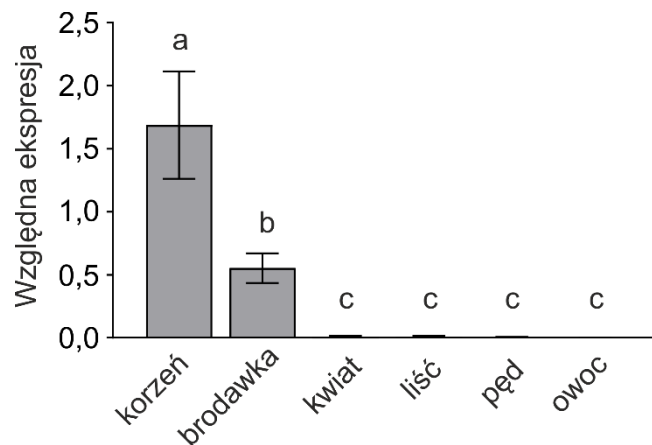
MtABCG40 (Medtr7g098300), *Mtβ-aktyna* (Medtr3g095530), *MtLOG1* (Medtr7g101290), *MtLOG2* (Medtr1g064260), *MtLOG3* (Medtr1g057020), *MtLOG-podobny 1* (Medtr1g015830), *MtLOG-podobny 2* (Medtr2g094790), *MtLOG-podobny 3* (Medtr3g113710), *MtLOG-podobny 4* (Medtr4g058740), *MtLBD16* (Medtr7g096530), *MtRR4* (Medtr5g036480), *AtLOG1* (At2g28305), *AtLOG2* (At2g35990), *AtLOG3* (At2g37210), *AtLOG4* (At3g53450), *AtLOG5* (At4g35190), *AtLOG6* (At5g03270), *AtLOG7* (At5g06300), *AtLOG8* (At5g11950), *AtLOG9* (At5g26140).

4. WYNIKI

4.1 Negatywny wpływ MtABCG40 na gęstość korzeni bocznych u *Medicago truncatula*

4.1.1 Profil ekspresji MtABCG40 w organach *Medicago truncatula*

Transporter MtABCG40 został zaklasyfikowany do grupy pełnych transporterów ABCG (Jasinski i wsp., 2009). Przeprowadzone w ramach niniejszej pracy analizy wykazały, że kodujący go gen ulega najsilniejszej ekspresji w korzeniu oraz w brodawce korzeniowej *M. truncatula*. Poziom transkryptu *MtABCG40* w korzeniu był ok. 3-krotnie wyższy niż w brodawce (rycina 4.1).

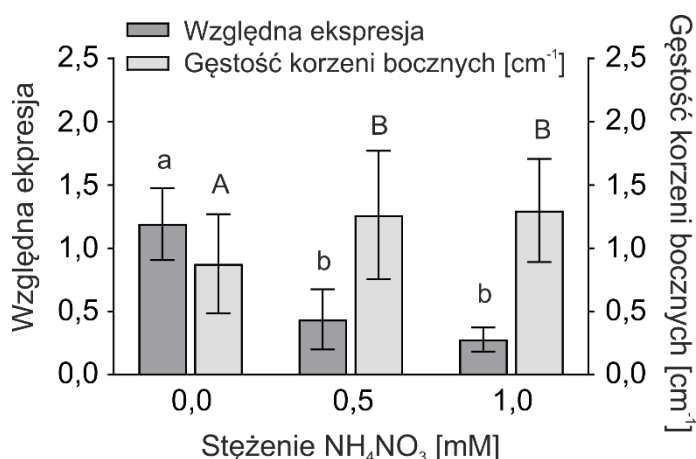


Rycina 4.1 Analiza poziomu ekspresji *MtABCG40* w organach *M. truncatula*. Poziom ekspresji *MtABCG40* określony został przy użyciu metody Real-Time PCR i znormalizowany względem β -aktyny. Na wykresie przedstawione zostały wartości średnich oraz odchyłeń standardowych z trzech niezależnych powtórzeń biologicznych. Istotność statystyczna różnic pomiędzy średnimi z porównywanych grup określona została z wykorzystaniem jednoczynnikowego testu ANOVA i testu post-hoc wielokrotnych porównań Tukeya. Takie same lub różne oznaczenia literowe świadczą odpowiednio o braku lub obecności istotności statystycznej; $P < 0,05$.

4.1.2 Zależność gęstości korzeni bocznych od ekspresji MtABCG40 w wybranych warunkach

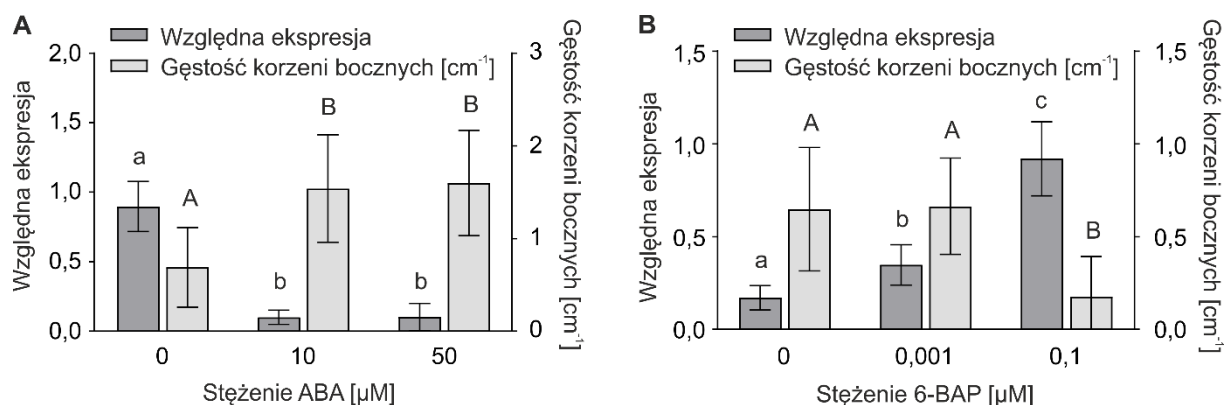
Biorąc pod uwagę specyficzny korzeniowo wzór ekspresji *MtABCG40*, w kolejnym etapie badań sprawdzono, czy poziom mRNA *MtABCG40* w tym organie jest zależny od zmieniającego się stężenia azotu w środowisku i czy istnieje związek pomiędzy poziomem ekspresji *MtABCG40* a parametrami morfologicznymi korzenia. Analiza poziomu mRNA *MtABCG40* w korzeniach trzytygodniowych roślin wykazała, że gen ten ulega najsilniejszej ekspresji w warunkach niedoboru azotu (0 mM NH_4NO_3), która spada wraz ze wzrostem

stężenia azotan(V) amonu (NH_4NO_3). Wraz z pojawieniem się azotu dostrzec można było wzrost gęstości korzeni bocznych *M. truncatula*. Cecha ta wykazała zatem negatywną zależność w stosunku do poziomu transkryptu *MtABCG40* w korzeniu przy zmiennej dostępności azotu dla roślin (rycina 4.2).



Rycina 4.2 Zależność ekspresji *MtABCG40* w korzeniu i gęstości korzeni bocznych *M. truncatula* od stężenia NH_4NO_3 . Poziomą ekspresję *MtABCG40* określony został przy użyciu metody Real-Time PCR i znormalizowany względem β -aktyny. Na wykresie przedstawione zostały wartości średnich oraz odchyłeń standardowych z trzech niezależnych powtórzeń biologicznych. Istotność statystyczna różnic pomiędzy średnimi z porównywanych grup określona została z wykorzystaniem jednoczynnikowego testu ANOVA i testu post-hoc wielokrotnych porównań Tukeya. Takie same lub różne oznaczenia literowe świadczą odpowiednio o braku lub obecności istotności statystycznej; $P < 0,05$.

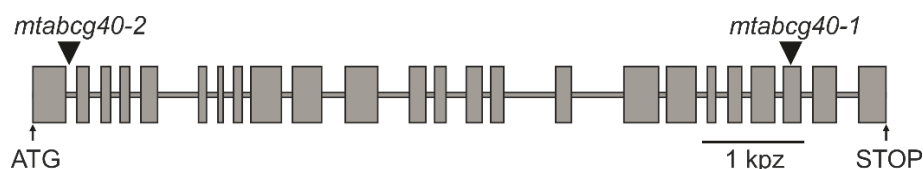
Wśród fitohormonów zaangażowanych w interakcje roślin z otoczeniem oraz mających wpływ na gęstość korzeni bocznych, tak jak przedstawione powyżej związki azotu, jest kwas abscysynowy (ABA) oraz cytokininy (Laplaze i wsp., 2007; Liang i Harris, 2005). Aby sprawdzić, istnienie zależności poziomu mRNA *MtABCG40* od obecności wymienionych hormonów oraz powiązać ją z charakterystyczną dla działania obu hormonów morfologią korzenia, przeprowadzono analizę korzeni dwutygodniowych roślin, rosnących na pożywkach ze zmienną zawartością ABA i syntetycznej cytokininy, 6-benzyloaminopuryny (6-BAP). Dodanie ABA do pożywki spowodowało wzrost gęstości korzeni bocznych *M. truncatula* z jednoczesnym spadkiem poziomu ekspresji *MtABCG40* (rycina 4.3A). Odwrotny efekt był następstwem zastosowania 6-BAP, którego rosnące stężenie obniżyło gęstość korzeni bocznych u roślin oraz przyczyniło się do akumulacji transkryptu *MtABCG40* w ich korzeniach (rycina 4.3 B).



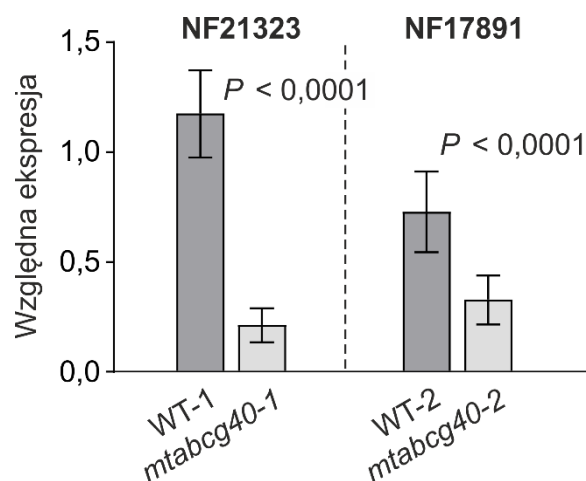
Rycina 4.3 Zależność ekspresji *MtABCG40* w korzeniu i gęstości korzeni bocznych *M. truncatula* od stężenia ABA (A) i 6-BAP (B). Poziom ekspresji *MtABCG40* określony został przy użyciu metody Real-Time PCR i znormalizowany względem β -aktyny. Na wykresie przedstawione zostały wartości średnich oraz odchyłeń standardowych z trzech niezależnych powtórzeń biologicznych. Istotność statystyczna różnic pomiędzy średnimi z porównywanych grup w analizie ekspresji określona została z wykorzystaniem testu Kruskala-Wallisa i testu post-hoc wielokrotnych porównań Dunna (A) oraz jednoczynnikowego testu ANOVA i testu post-hoc wielokrotnych porównań Tukeya (B). Istotność statystyczna różnic pomiędzy średnimi z porównywanych grup w analizie gęstości korzeni bocznych określona została z wykorzystaniem testu Kruskala-Wallisa i testu post-hoc wielokrotnych porównań Dunna (A i B). Takie same lub różne oznaczenia literowe świadczą odpowiednio o braku lub obecności istotności statystycznej; $P < 0,05$.

4.1.3 Analiza gęstości korzeni bocznych *mtabcg40*

Przeszukanie bazy danych udostępnionej przez *Noble Research Institute* (Ardmore, Oklahoma, USA), zawierającej informacje o dostępnych mutantach insercyjnych *Tnt1* u *M. truncatula*, pozwoliło na zidentyfikowanie dwóch linii roślin z mutacjami w genie *MtABCG40*: NF21323 (*mtabcg40-1*) i NF17891 (*mtabcg40-2*). Określenie dokładnego miejsca mutacji możliwe było dzięki analizie sekwencji FST (ang. *flanking sequence tag*) genu *MtABCG40*, które znajdują się w bezpośrednim sąsiedztwie retrotranspozonu *Tnt1*. Pozwoliło to stwierdzić, że linia NF21323 posiada mutację w obrębie 22 egzonu, a linia NF17891 w pierwszym intronie *MtABCG40* (rycina 4.4). Mutanty te wykazywały obniżony poziom ekspresji *MtABCG40* względem roślin typu dzikiego (rycina 4.5).

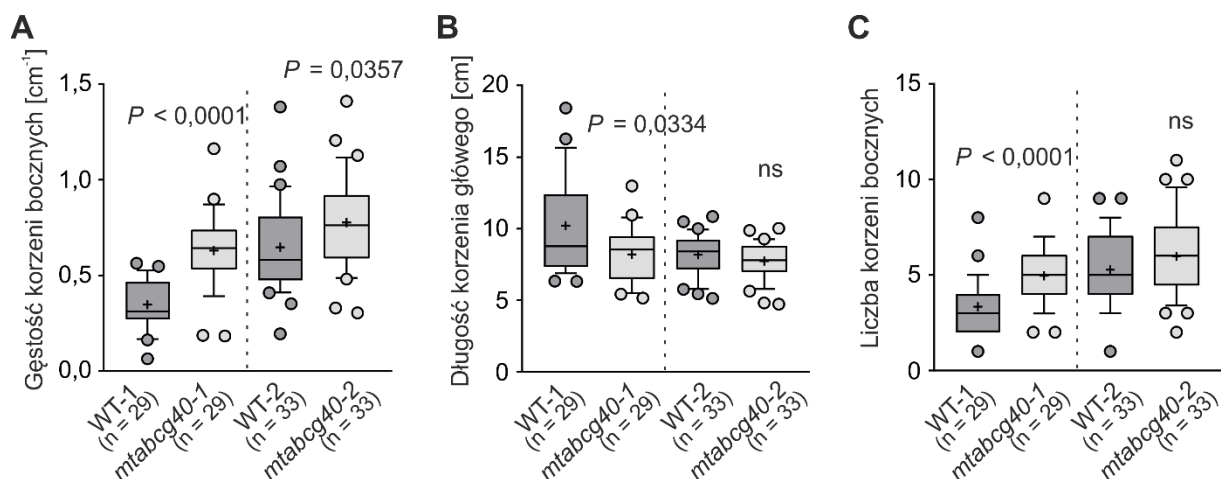


Rycina 4.4 Schemat przedstawiający umiejscowienie insercji retrotranspozonu *Tnt1* (czarne trójkąty) w obrębie genu *MtABCG40* w linii NF21323 (*mtabcg40-1*) oraz NF17891 (*mtabcg40-2*). Szarymi prostokątami oznaczono położenie egzonów; przestrzenie pomiędzy prostokątami przedstawiają lokalizację intronów.



Rycina 4.5 Analiza poziomu ekspresji *MtABCG40* w korzeniach roślin typu dzikiego (WTi) oraz korzeniach mutantów (*mtabcg40*) z linii NF21323 oraz NF17891. Rośliny hodowane były na pożywkach niesuplementowanych azotem. Poziom ekspresji *MtABCG40* określony został przy użyciu metody Real-Time PCR i znormalizowany względem β -aktyny. Na wykresie przedstawione zostały wartości średnich oraz odchyłeń standardowych z trzech niezależnych powtórzeń biologicznych. Istotność statystyczna różnic pomiędzy średnimi z porównywanych grup określona została z wykorzystaniem dwustronnego testu t-Welcha (NF21323) i dwustronnego testu t-Studenta (NF17891).

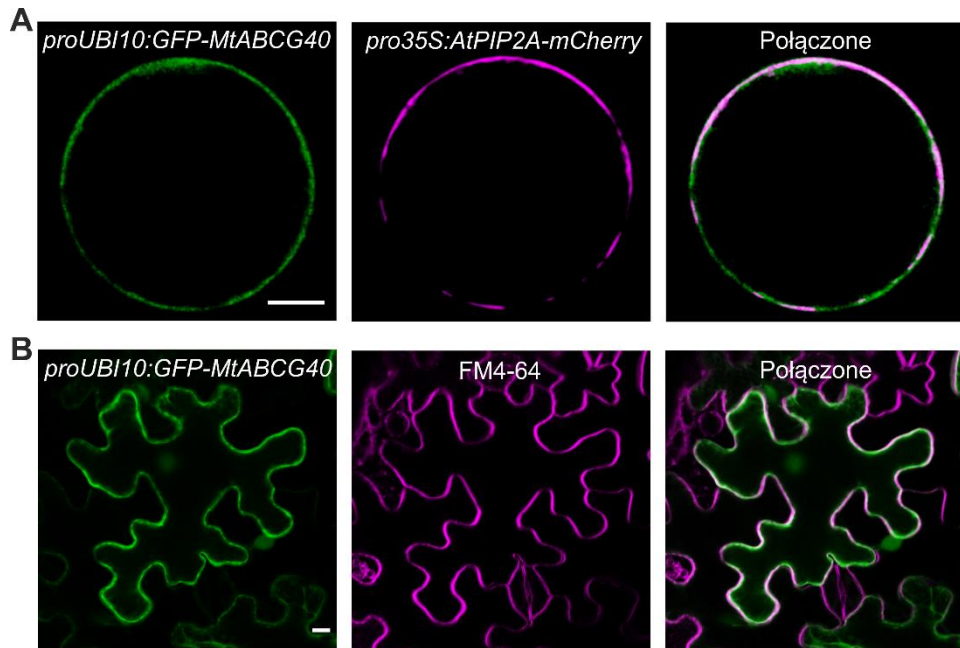
W kolejnym etapie badań dokonano oceny wpływu transportera *MtABCG40* na gęstość korzeni bocznych u *M. truncatula*. Wykorzystano do tego celu trzytygodniowe rośliny *mtabcg40-1* oraz *mtabcg40-2*, hodowane na pożywce niesuplementowanej azotem. Charakteryzowały się one zwiększoną gęstością korzeni bocznych w stosunku do odpowiadających im roślin typu dzikiego (WT-1, WT-2) (rycina 4.6 A). Różnice te wynikały ze skracania się korzenia głównego oraz zwiększania liczby korzeni bocznych mutantów, z istotnością statystyczną obu tych cech jedynie w linii NF21323 (rycina 4.6, B i C), która odznaczała się większą różnicą w ekspresji *MtABCG40* pomiędzy korzeniami *mtabcg40* i WT (rycina 4.5). Podobna analiza przeprowadzona została na pożywkach zawierających 1 mM NH_4NO_3 , przy którym zaobserwowano wcześniej obniżoną względem 0 mM NH_4NO_3 ekspresję *MtABCG40* (rycina 4.2). Suplementowane azotem rośliny *mtabcg40* z obu linii różniły się gęstością korzeni bocznych względem odpowiadających im roślin WT. Różnica ta była jednak mniej znacząca niż w przypadku warunków bez azotu (załącznik 1).



Rycina 4.6 Analiza morfologii korzenia mutantów (*mtabcg40*) oraz roślin typu dzikiego (WT) z linii NF21323 oraz NF17891 z uwzględnieniem gęstości korzeni bocznych (A), długości korzenia głównego (B) oraz liczby korzeni bocznych (C). Dla każdego wykresu pudełkowy: linia pośrodku przedstawia położenie wartości mediany; „+” przedstawia położenie wartości średniej; prostokąt obejmuje wartości w przedziale percentyli 25-75; wąsy obejmują wartości pomiędzy pudełkiem a percentylem 10 i 90. Wartości powyżej i poniżej wąsów są zaprezentowane jako pojedyncze punkty. Istotność statystyczna różnic pomiędzy średnimi z porównywanych grup określona została z wykorzystaniem dwustronnego testu t-Welcha (A) oraz dwustronnego testu Manna–Whitneya (B i C); ns, różnica nieistotna statystycznie; n określa liczbę roślin poddanych analizie w ramach trzech niezależnych powtórzeń biologicznych (A-C).

4.2 Określenie subkomórkowej lokalizacji białka MtABCG40

Określenie subkomórkowej lokalizacji białka MtABCG40 rozpoczęto od stworzenia konstrukcji fuzyjnej *proUBI10:GFP-MtABCG40*. Posłużyła ona do transformacji protoplastów wyizolowanych z mezofilu liści *Arabidopsis thaliana* metodą z użyciem glikolu polietylenowego (PEG) oraz agroinfiltracji liści tytoniu *Nicotiana benthamiana*. Do obserwacji mikroskopowych protoplastów oraz komórek epidermy liści tytoniu przystąpiono odpowiednio po 18 h i 4 dniach od transformacji. Sygnał białka GFP dostrzegalny był w obu przypadkach w błonie komórkowej, co potwierdzono z wykorzystaniem białka PIP2, będącego markerem błony komórkowej, oraz barwnika fluorescencyjnego FM4-64, barwiącego błonę komórkową, odpowiednio w protoplastach i komórkach epidermy liści tytoniu (rycina 4.7). Wektor pMDC43 niezawierający sekwencji *MtABCG40*, a jedynie *GFP*, posłużył jako kontrola przy obu transformacjach. Sygnał wolnego białka GFP powstałego na matrycy wektora kontrolnego, nie zawierającego sekwencji MtABCG40, pojawił się w cytoplazmie komórek (załącznik 2).

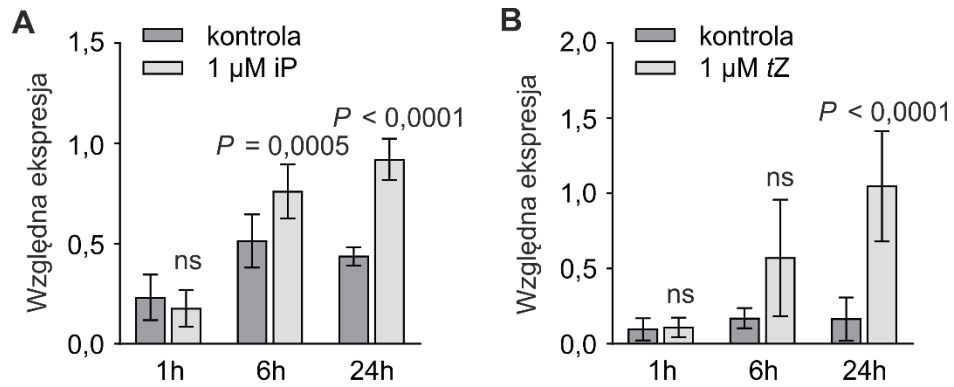


Rycina 4.7 Lokalizacja subkomórkowa transportera MtABCG40 w błonie komórkowej protoplastów izolowanych z mezofilu liści *A. thaliana* (A) oraz komórek epidermy liści tytoniu *N. benthamiana* (B). Sygnał zielony – fluorescencja GFP; sygnał purpurowy (ang. *magenta*) – fluorescencja mCherry; skala: 5 μm .

4.3 Transport cytokinin przez MtABCG40

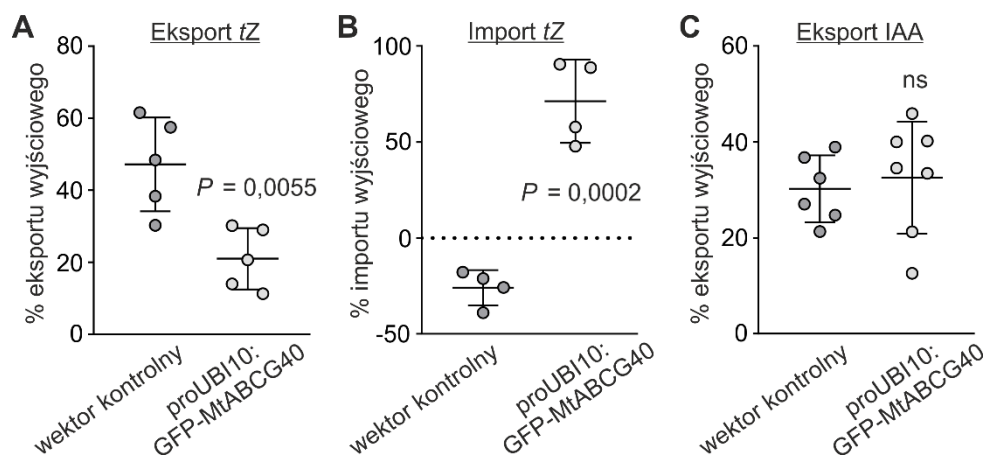
(współpraca: Jian Xia i Markus Geisler, Uniwersytet we Fryburgu, Szwajcaria)

Często obserwowanym podczas badań nad transporterami ABCG zjawiskiem jest indukcja ekspresji kodujących je genów pod wpływem transportowanych przez nie cząsteczek (Jarzyniak i wsp., 2021; Kuromori i wsp., 2010). W związku z zaobserwowaną wcześniej indukcją ekspresji *MtABCG40* przez 6-BAP (rycina 4.3B), a także izopentenyloadenię (iP) oraz *trans*-zeatynę (*tZ*) (rycina 4.8), postanowiono sprawdzić, czy to cytokininy są fitohormonami transportowanymi przez MtABCG40.



Rycina 4.8 Analiza poziomu ekspresji *MtABCG40* w korzeniach *M. truncatula* po egzogennej aplikacji 1 μM izopentyloadeniny (iP) (A) oraz 1 μM *trans*-zeatyny (*tZ*). Poziom ekspresji określony został przy użyciu metody Real-Time PCR i znormalizowany względem β -aktyny. Na wykresie przedstawione zostały wartości średnich oraz odchyłeń standardowych z trzech niezależnych powtórzeń biologicznych. Istotność statystyczna różnic pomiędzy średnimi z porównywanych grup kontrolnych (ciemne słupki) i traktowanych hormonami (jasne słupki) określona została z wykorzystaniem dwustronnego testu Manna–Whitneya (A i B); ns, różnica nieistotna statystycznie.

Eksperymenty transportu poprzedziła transformacja liści *N. benthamiana* konstrukcją genową *proUBI10:GFP-MtABCG40* oraz wektorem kontrolnym, niezawierającym sekwencji *MtABCG40*, na drodze agroinfiltracji. Z liści tych po 4 dniach wyizolowano protoplasty, do których egzogenicznie dodano znakowaną radioaktywnie *tZ*, [^{14}C]*tZ*. Następnie, z wykorzystaniem pomiarów radioaktywności supernatantu, obserwowano wpływ cytokininy z protoplastów do supernatantu. Poziom eksportu przedstawiono jako procent radioaktywności supernatantu po 20 min względem jego radioaktywności na początku eksperymentu. Protoplasty transformowane konstrukcją *proUBI10:GFP-MtABCG40* charakteryzowały się obniżoną w stosunku do wektora kontrolnego wartością eksportu (rycina 4.9A). Wynikający z tego potencjalny import *tZ* przez *MtABCG40* sprawdzony został poprzez wykonanie eksperymentu, w którym obserwowano napływ [^{14}C]*tZ* z supernatantu do protoplastów, z pomiarem radioaktywności protoplastów. Jego wyniki wykazały znaczący względem kontroli import cytokininy będący udziałem *MtABCG40* (rycina 4.9B). Specyficzność badanego transportera względem cytokinin została ponadto potwierdzona poprzez przeprowadzenie dodatkowego eksperymentu eksportu z udziałem radioaktywnego kwasu indolilo-3-octowego, [^3H]IAA, który nie był przez niego transportowany (rycina 4.9C).

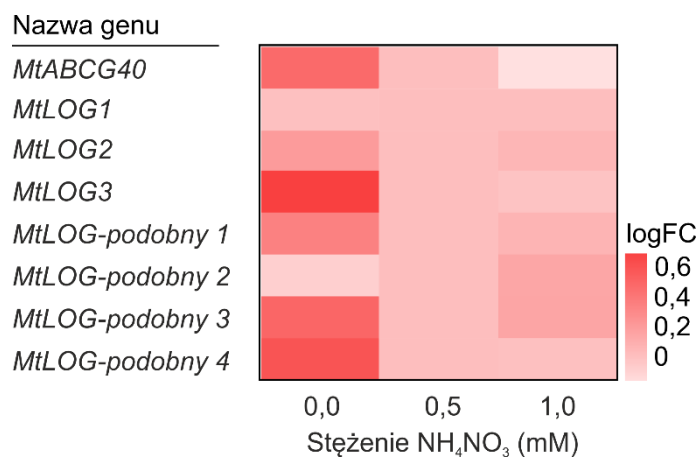


Rycina 4.9 Analiza transportu tZ oraz IAA w protoplastach izolowanych z mezofilu liści tytoniu *N. benthamiana* transformowanych konstrukcją genową *proUBI10:GFP-MtABCG40* i wektorem kontrolnym. A, Eksperyment eksportu [^{14}C] tZ . B, Eksperyment importu [^{14}C] tZ . C, Eksperyment eksportu [3H]IAA. Na wykresach przedstawione zostały wartości średnich oraz odchyłeń standardowych z co najmniej 4 niezależnych powtórzeń biologicznych. Istotność statystyczna różnic pomiędzy średnimi z porównywanych grup określona została z wykorzystaniem dwustronnego testu t-Studenta; ns, różnica nieistotna statystycznie.

4.4 Analiza koekspresji *MtABCG40* i genów biorących udział w aktywacji cytokinin

4.4.1 Charakterystyka profilu ekspresji genów *Lonely Guy* (*LOG*) u *M. truncatula*

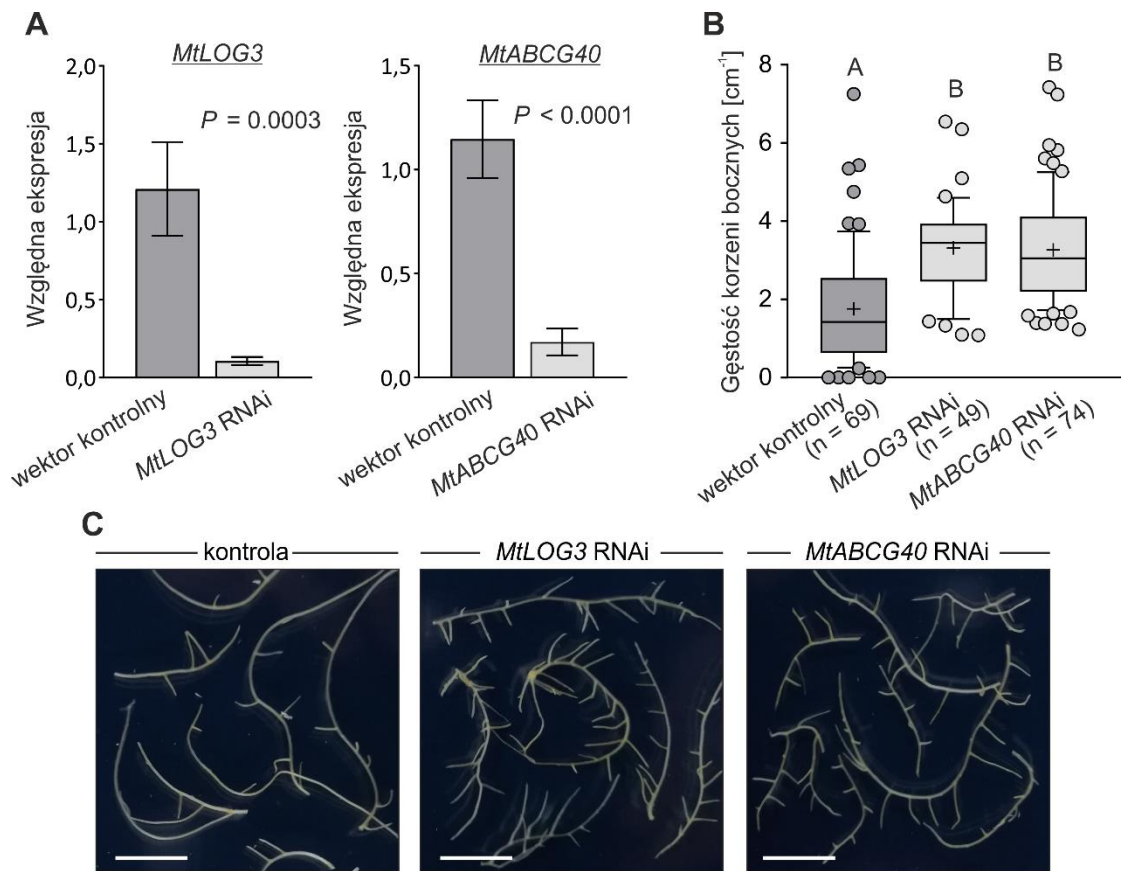
Celem sprawdzenia potencjalnej koekspresji *MtABCG40* i genów biorących udział w aktywacji cytokinin, w kolejnym etapie badań dokonano analizy ekspresji siedmiu genów z rodziny *Lonely Guy* (*LOG*) u *M. truncatula* (Mortier i wsp., 2014; van Zeijl i wsp., 2015) w trzytygodniowych korzeniach wyrosłych na pożywkach o zmiennym stężeniu NH_4NO_3 . Wyniki wskazują na wzrost akumulacji mRNA pięciu z nich w korzeniu przy braku azotu (0 mM NH_4NO_3) względem tych rosnących na pożywce suplementowanej tym pierwiastkiem. Były to *MtLOG2*, *MtLOG3*, *MtLOG-podobny 1*, *MtLOG-podobny 3* i *MtLOG-podobny 4* (rycina 4.10). Jako *MtLOG-podobne* (ang. *MtLOG-like*) opisano geny wytypowane jako *LOG* na podstawie homologii do genów u *A. thaliana*.



Rycina 4.10 Ekspresja *MtABCG40* oraz genów z rodziny *MtLOG* w korzeniach trzytygodniowych siewek *M. truncatula* rosnących na pożywkach o różnym stężeniu NH_4NO_3 . Na diagramie przedstawione zostały wartości logarytmu z krotności zmian ekspresji (ang. *log fold change*, logFC) względem 0,5 mM NH_4NO_3 .

4.4.2 Analiza morfologii korzeni *MtABCG40* RNAi i *MtLOG3* RNAi

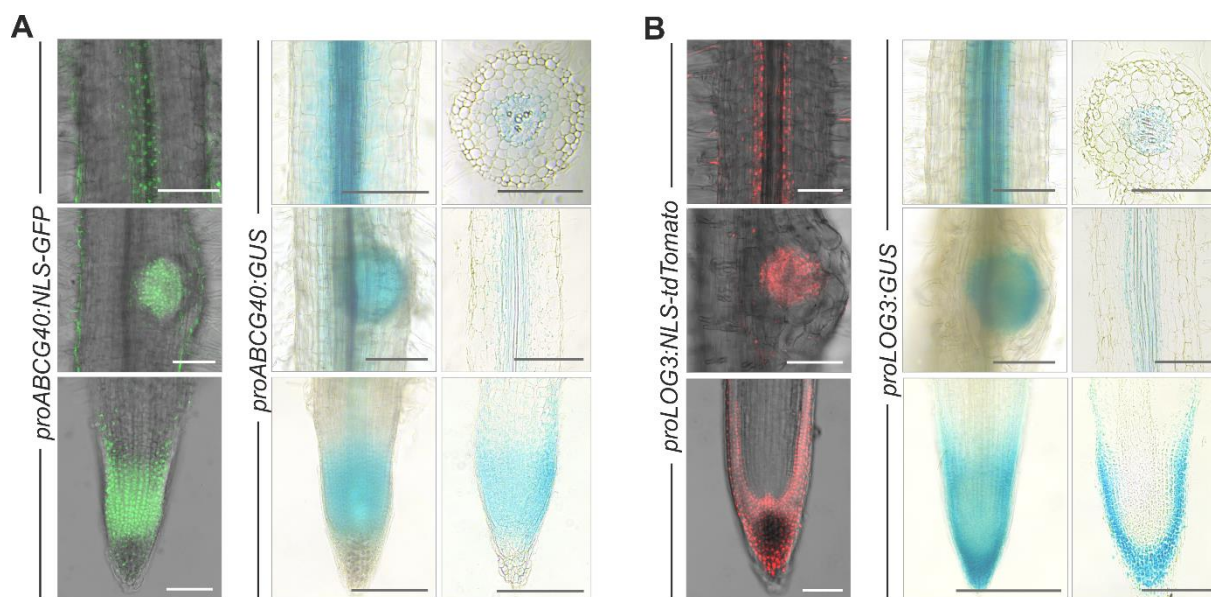
Geny takie jak *AtLOG2* i *AtLOG7* uznane zostały za istotne dla prawidłowego rozwoju korzeni bocznych u *A. thaliana*, gdyż podwójne mutanty *log2 log7* charakteryzowały się zwiększoną liczbą korzeni bocznych w stosunku do roślin typu dzikiego (Kuroha i wsp., 2009). Co więcej, ekspresja *AtLOG7* indukowana jest przy niedoborach azotu (załącznik 3) (Walker i wsp., 2017), podobnie jak *MtLOG3* (rycina 4.10). Ze względu na najwyższy stopień podobieństwa sekwencji nukleotydowej *MtLOG3* do *AtLOG2* i *AtLOG7* (załącznik 4), postanowiono przyjrzeć się morfologii korzeni z wyciszoną z użyciem interferencji RNA (ang. *RNA interference*, RNAi) ekspresją *MtLOG3*. Przygotowana konstrukcja wyciszająca zaprojektowana została z uwzględnieniem jak najwyższej specyficzności wyciszania. Celem analiz porównawczych przygotowano również konstrukcję wyciszającą *MtABCG40*. Po transformacji z użyciem *A. rhizogenes*, wyrosłe na pożywce niesuplementowanej azotem korzenie włosowate poddane zostały selekcji na obecność białka DsRed, którego sekwencja była również zawarta w wektorze. Potwierdzony został także obniżony poziom ekspresji genów *MtLOG3* oraz *MtABCG40* w korzeniach niosących odpowiadające im konstrukcje względem tych transformowanych wektorem kontrolnym, niezawierającym sekwencji wyciszających (rycina 4.11A). W kolejnym kroku przystąpiono do analizy morfologii korzeni. Korzenie transformowane obiema konstrukcjami wyciszającymi charakteryzowały się podobną gęstością korzeni bocznych. W obu przypadkach zaobserwowano również wzrost wartości tego parametru względem korzeni transformowanych wektorem kontrolnym (rycina 4.11, B i C).



Rycina 4.11 Analiza korzeni włosowatych transformowanych konstrukcjami wyciszającymi *MtLOG3* RNAi oraz *MtABCG40* RNAi. A, Analiza poziomu ekspresji *MtLOG3* i *MtABCG40* w korzeniach z odpowiadającym im wyciszeniem RNAi względem korzeni transformowanych wektorem kontrolnym. Poziom ekspresji określony został przy użyciu metody Real-Time PCR i znormalizowany względem β -aktyny. Na wykresie przedstawione zostały wartości średnich oraz odchyłeń standardowych z dwóch niezależnych powtórzeń biologicznych. Istotność statystyczna różnic pomiędzy średnimi z porównywanych grup określona została z wykorzystaniem dwustronnego testu Manna–Whitneya. B i C, Analiza morfologii korzeni z wyciszoną ekspresją *MtLOG3* i *MtABCG40* względem korzeni transformowanych wektorem kontrolnym. Gęstość korzeni bocznych analizowanych korzeni (B). Dla każdego wykresu pudełkowego: linia pośrodku przedstawia położenie wartości mediany; „+” przedstawia położenie wartości średniej; prostokąt obejmuje wartości w przedziale percentyli 25-75; wąsy obejmują wartości pomiędzy pudełkiem a percentylem 10 i 90. Wartości powyżej i poniżej wąsów są zaprezentowane jako pojedyncze punkty. Istotność statystyczna różnic pomiędzy średnimi z porównywanych grup w analizie gęstości korzeni bocznych określona została z wykorzystaniem testu Kruskala-Wallisa i testu post-hoc wielokrotnych porównań Dunna. Takie same lub różne oznaczenia literowe świadczą odpowiednio o braku lub obecności istotności statystycznej; $P < 0,05$. Wartość n oznacza łączną liczbę roślin analizowanych w dwóch niezależnych powtórzeń biologicznych. Zdjęcia analizowanych korzeni (C). Skala: 1 cm.

4.4.3 Analiza wzoru ekspresji *MtLOG3* i *MtABCG40* w korzeniu

Ocenę potencjalnych podobieństw we wzorze ekspresji *MtLOG3* i *MtABCG40* rozpoczęto od przygotowania konstrukcji genowych kodujących białka reporterowe znajdujące się pod kontrolą promotorów *MtABCG40* i *MtLOG3*. Promotor *MtABCG40* połączono z genem kodującym β -glukuronidazę (ang. *β -glucuronidase*, GUS), katalizującą barwną reakcję hydrolizy X-GlcA (5-bromo-4-chloro-3-indolylo- β -D-glukuronidu), oraz z genem dla białka GFP z sygnałem lokalizacji jądrowej (ang. *nuclear localization signal*, NLS). Promotor *MtLOG3* połączono z genem kodującym GUS oraz białko czerwonej fluorescencji tdTomato z NLS. Tym samym powstały następujące konstrukcje genowe: *proMtABCG40:GUS*, *proMtABCG40:NLS-GFP*, *proMtLOG3:GUS* oraz *proMtLOG3:NLS-tdTomato*, które posłużyły do transformacji korzeni siewek *M. truncatula* z wykorzystaniem *A. rhizogenes*. Ekspresja *MtABCG40* zaobserwowana została we wnętrzu wiązki przewodzącej oraz w przyległych do niego warstwach korzenia odpowiedzialnych u *M. truncatula* za formowanie zawiązka korzenia bocznego, tj. w pericyklu, endodermie oraz w wewnętrznych warstwach kory pierwotnej (rycina 4.12A) (Herrbach i wsp., 2014). Aktywność promotora *MtABCG40* obecna była także w samym primordium korzenia bocznego oraz w komórkach RAM (rycina 4.12A). Wzór ekspresji *MtLOG3* pokrywał się z tym dla *MtABCG40* we wiązce przewodzącej oraz w zawiązku korzenia bocznego. Poza tym występował również w komórkach czapeczki korzenia, ważnym miejscu odpowiedzialnym za biosyntezę cytokinin (rycina 4.12B) (Aloni i wsp., 2005). Aktywność promotorów obu tych genów zdawała się zatem w obrębie wierzchołka wzrostu korzenia nie pokrywać a jedynie występować w przyległych miejscach (rycina 4.12, A i B).

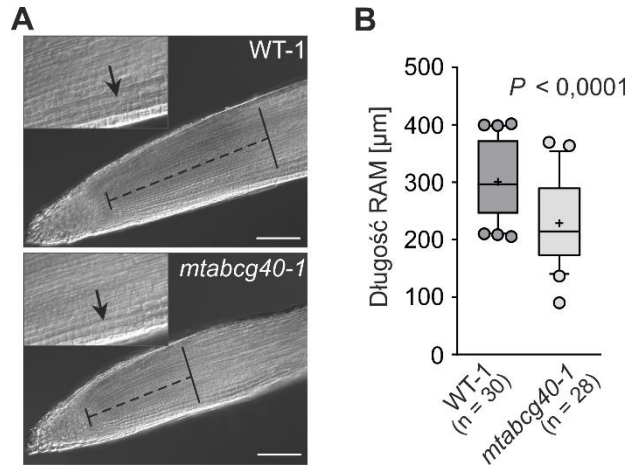


Rycina 4.12 Analiza wzoru ekspresji *MtABCG40* i *MtLOG3* w transgenicznych korzeniach włosowatych niosących konstrukcje *ProMtABCG40:GUS* i *ProMtABCG40:NLS-GFP* (A) oraz *ProMtLOG3:GUS* i *ProMtLOG3:NLS-tdTomato* (B). Każdy z paneli (A i B) zawiera obrazy spod mikroskopu konfokalnego (lewa strona) oraz mikroskopu świetlnego (prawa strona). Obrazy spod mikroskopu konfokalnego przedstawiają kolejno: korzeń, zawiązek korzenia bocznego oraz wierzchołek wzrostu korzenia, podobnie jak obrazy spod mikroskopu świetlnego w lewej kolumnie. Obrazy spod mikroskopu świetlnego w prawej kolumnie przedstawiają kolejno: przekrój poprzeczny i podłużny przez korzeń oraz przekrój podłużny przez wierzchołek wzrostu korzenia. Zamieszczone obrazy reprezentują wzory ekspresji zaobserwowane podczas analizy >20 korzeni z trzech niezależnych powtórzeń biologicznych (transformacji). Skala: 0,5 cm.

4.5 Wpływ *MtABCG40* na funkcjonowanie merystemu wierzchołkowego korzenia

4.5.1 Wpływ mutacji w *MtABCG40* na długość merystemu wierzchołkowego korzenia

Aby zbadać przyczyny pojawiających się różnic w długości korzenia głównego pomiędzy mutantami *mtabcg40* i roślinami typu dzikiego (rycina 4.6B), w kolejnym etapie badań skupiono się na analizie ich merystemów apikalnych (RAM). W związku z pozytywną zależnością tempa wydłużania się korzenia głównego od rozmiaru RAM (Dello Ioio i wsp., 2007; Wang i wsp., 2020), na wstępie dokonano pomiarów długości tej struktury u roślin *mtabcg40-1* oraz WT-1. Długość RAM definiowano jako odległość od jego centrum spoczynkowego (ang. *quiescent center*, QC), do podstawy merystemu na granicy ze strefą elongacji (ang. *elongation zone*, EZ). Początek EZ był miejscem pojawienia się pierwszej wydłużonej komórki w drugiej warstwie kory pierwotnej. Wyniki pomiarów wykonanych na 10-dniowych roślinach wyrosłych na pożywce niesuplementowanej azotem wskazały na wydłużenie RAM korzeni roślin *mtabcg40-1* względem typu dzikiego (rycina 4.13).

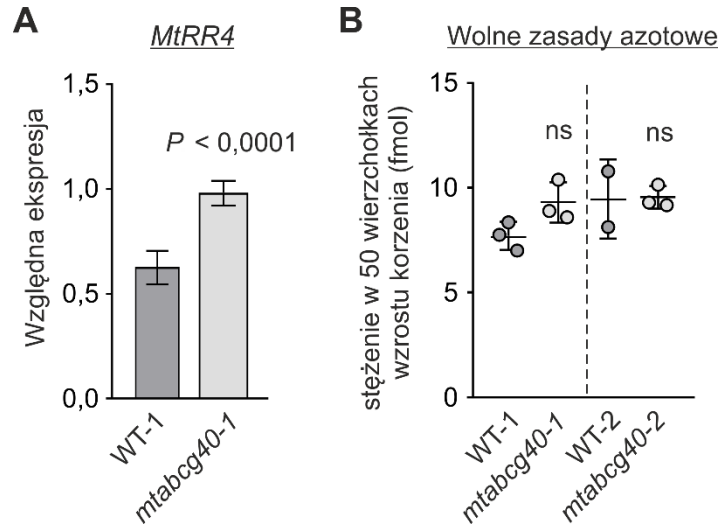


Rycina 4.13 Analiza długości RAM 10-dniowych korzeni WT-1 i *mtabcg40-1* wyrosłych na pożywce niesuplementowanej azotem. A, Obraz stref apikalnych korzeni głównych roślin WT-1 i *mtabcg40-1* przedstawiony z użyciem kontrastu Nomarskiego z zaznaczoną długością RAM (przerywana linia), mierzoną od ich QC do początku EZ; początek EZ wyznaczony został w miejscu pojawienia się pierwszej wydłużonej komórki drugiej warstwy kory pierwotnej (strzałka). B, Wykres przedstawiający długość RAM roślin WT-1 i *mtabcg40-1*. Dla każdego wykresu pudełkowego: linia pośrodku przedstawia położenie wartości mediany; „+” przedstawia położenie wartości średniej; prostokąt obejmuje wartości w przedziale percentyli 25-75; wąsy obejmują wartości pomiędzy pudełkiem a percentylem 10 i 90. Wartości powyżej i poniżej wąsów są zaprezentowane jako pojedyncze punkty. Istotność statystyczna różnic pomiędzy średnimi z porównywanych grup określona została z wykorzystaniem dwustronnego testu t-Studenta. Wartość n oznacza łączną liczbę roślin analizowanych w ramach dwóch niezależnych powtórzeń biologicznych. Skala: 100 µm.

4.5.2 Analiza stężenia aktywnych cytokinin oraz poziomu ekspresji *MtRR4* w RAM roślin *mtabcg40*

(współpraca: Lenka Plačková i Ondřej Novák, Uniwersytet Palackiego w Ołomuńcu, Czechy)

Wyjaśnienie przyczyny zaobserwowanych w podrozdziale 4.5.1 różnic pomiędzy długością RAM u roślin typu dzikiego (WT-1) i mutantów *MtABCG40* (*mtabcg40-1*) rozpoczęto od analizy poziomu ekspresji *MtRR4* w wierzchołkach wzrostu ich korzeni wyrosłych na pożywce niesuplementowanej azotem. Wybór *MtRR4* podyktowany był faktem, iż jest on wykorzystywany jako marker uruchomienia szlaku sygnałowego zależnego od aktywnych form cytokinin (Gonzalez-Rizzo i wsp., 2006). Badanie to pokazało silniejszą akumulację mRNA *MtRR4* w korzeniach mutantów w porównaniu z korzeniami WT (rycina 4.14A). Dokonano ponadto w RAM analizowanych roślin pomiaru stężenia cytokinin w postaci wolnych zasad azotowych, w tym iP, tZ, cis-zeatyny (cZ) i dihydrozetyny (DHZ). Wyniki wskazały na brak istotnych różnic pomiędzy zawartością analizowanych cząsteczek w korzeniach mutantów względem korzeni typu dzikiego (rycina 4.14B).



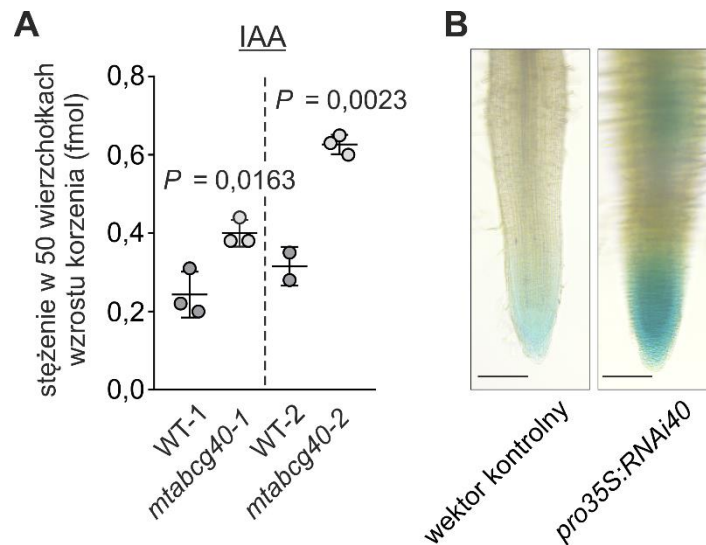
Rycina 4.14 Analiza poziomu ekspresji *MiRR4* (A) oraz stężenia aktywnych biologicznie form cytokinin (B) w wierzchołkach wzrostu korzenia roślin typu dzikiego (WT) i mutantów (*mtabcg40*). A, Ekspresja *MiRR4*, markera uruchomienia szlaku sygnałowego zależnego od aktywnych form cytokinin, w wierzchołkach wzrostu korzenia roślin typu dzikiego (WT-1) oraz mutantów (*mtabcg40-1*). Poziom ekspresji określony został przy użyciu metody Real-Time PCR i znormalizowany względem β -aktyny. Na wykresie przedstawione zostały wartości średnich oraz odchyłeń standardowych z dwóch niezależnych powtórzeń biologicznych. Istotność statystyczna różnic pomiędzy średnimi z porównywanych grup określona została z wykorzystaniem dwustronnego testu t-Studenta. B, Pomiar sumarycznego stężenia aktywnych form cytokinin, tj. wolny zasad azotowych (iP, *tZ*, *cZ*, DHZ), w wierzchołkach wzrostu korzenia roślin typu dzikiego (WT-1, WT-2) oraz mutantów (*mtabcg40-1*, *mtabcg40-2*). Każda z analizowanych prób składała się z 50 wierzchołków wzrostu, obejmujących fragment od czapeczki korzenia do granicy RAM ze strefą EZ. Na wykresie przedstawione zostały wartości średnich oraz odchyłeń standardowych stężeń z dwóch lub trzech niezależnych powtórzeń biologicznych. Istotność statystyczna różnic pomiędzy średnimi z porównywanych grup określona została z wykorzystaniem dwustronnego testu t-Studenta; ns, różnica nieistotna statystycznie.

4.5.3 Wpływ MtABCG40 na stężenie IAA oraz aktywność promotora *DR5* w RAM

(współpraca: Lenka Plačková i Ondřej Novák, Uniwersytet Palackiego w Ołomuńcu, Czechy)

W związku z obserwowaną w RAM zależnością pomiędzy cytokiniami i auksynami (Jones i wsp., 2010; Marhavý i wsp., 2011), w kolejnym etapie badań ocenie poddano stężenie obecnego w wierzchołku wzrostu korzenia IAA. Wyniki wskazały na wzrost akumulacji tego hormonu w korzeniach mutantów (*mtabcg40-1*, *mtabcg40-2*) obu analizowanych linii względem odpowiadających im korzeni typu dzikiego (WT-1, WT-2) (rycina 4.15A). Wyciszenie ekspresji *MtABCG40* z użyciem RNAi w korzeniach niosących konstrukcję reporterową *DR5:GUS* wskazało ponadto na silniejszą względem roślin kontrolnych aktywność promotora

DR5 (rycina 4.15 B), będącego markerem aktywacji szlaku sygnałowego zależnego od auksyn (Korasick i wsp., 2013).

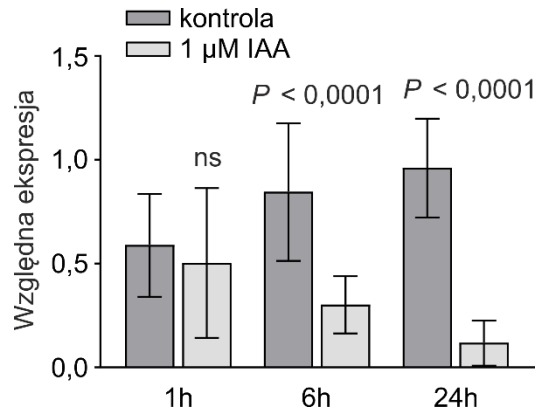


Rycina 4.15 Analiza zależności stężenia IAA (A) oraz poziomu aktywacji szlaku sygnałowego zależnego od auksyn (B) od poziomu ekspresji *MtABCG40* w wierzchołkach wzrostu korzeni. A, Pomiar akumulacji IAA w wierzchołkach wzrostu korzenia roślin typu dzikiego (WT-1, WT-2) oraz mutantów (*mtabcg40-1*, *mtabcg40-2*). Każda z analizowanych prób składała się z 50 wierzchołków wzrostu, obejmujących fragment od czapeczki korzenia do granicy RAM ze strefą EZ. Na wykresie przedstawione zostały wartości średnich oraz odchyłeń standardowych z dwóch lub trzech niezależnych powtórzeń biologicznych. Istotność statystyczna różnic pomiędzy średnimi z porównywanych grup określona została z wykorzystaniem dwustronnego testu t-Studenta. B, Ekspresja konstrukcji reporterowej *DR5:GUS* w korzeniach transformowanych konstrukcją wyciszającą *MtABCG40* metodą RNAi (*Pro35S:RNAi40*) lub wektorem kontrolnym z wykorzystaniem *A. rhizogenes*. Zamieszczone obrazy reprezentują wzory ekspresji zaobserwowane w 10 korzeniach na konstrukt z dwóch niezależnych powtórzeń biologicznych (transformacji). Skala: 100 μ m.

4.6 Wpływ *MtABCG40* na formowanie korzenia bocznego

4.6.1 Analiza zmian ekspresji *MtABCG40* pod wpływem egzogennej aplikacji IAA

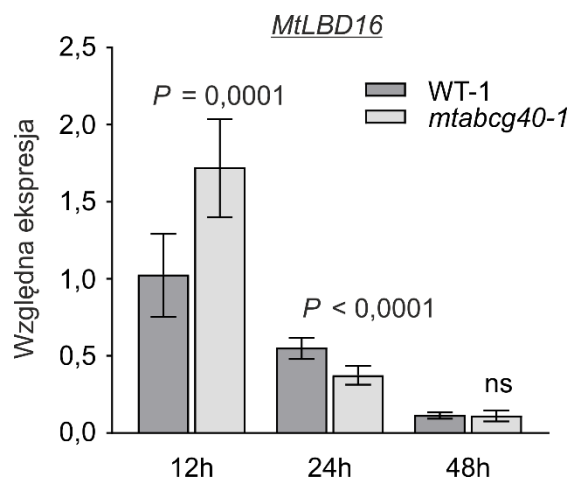
Z powodu zaobserwowanego wpływu *MtABCG40* na liczbę korzeni bocznych (rycina 4.6C), przeprowadzono analizę ekspresji kodującego go genu pod wpływem IAA, będącego hormonem promującym formowanie korzeni bocznych (Du i Scheres, 2018). *MtABCG40* uległ represji po 6 h od egzogennej podania hormonu (rycina 4.16).



Rycina 4.16 Poziom ekspresji *MtABCG40* w korzeniach traktowanych 1 μ M IAA i w nietraktowanych korzeniach kontrolnych. Analizy dokonano przy użyciu metody Real-Time PCR, a wyniki znormalizowano względem β -aktyny. Na wykresie przedstawione zostały wartości średnich oraz odchyłeń standardowych z trzech niezależnych powtórzeń biologicznych. Istotność statystyczna różnic pomiędzy średnimi z porównywanych grup określona została z wykorzystaniem dwustronnego testu Manna–Whitneya.

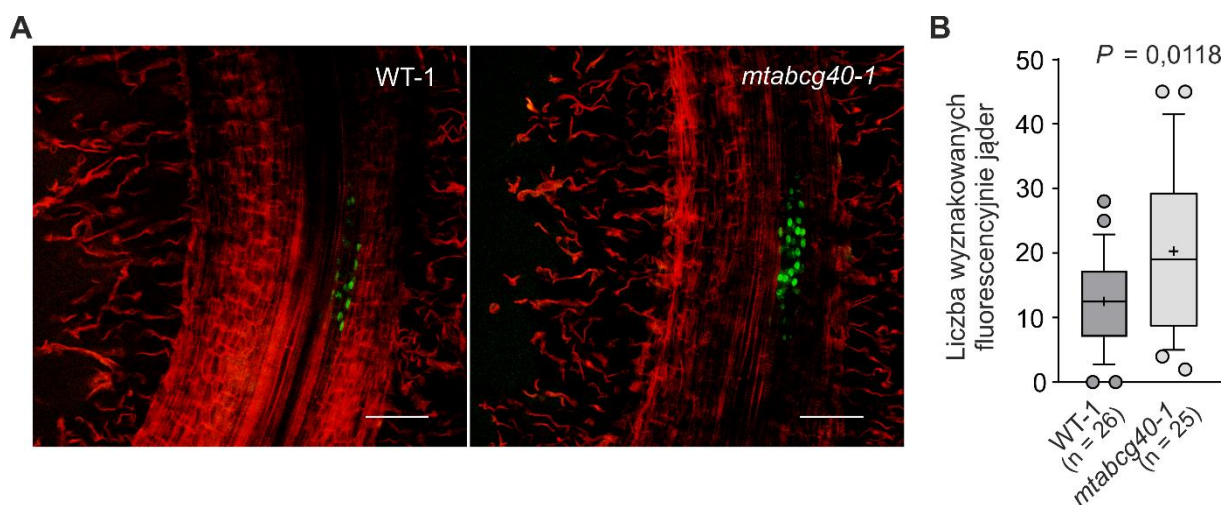
4.6.2 Wpływ *MtABCG40* na inicjację powstawania korzeni bocznych

W kolejnym etapie badań dokonano analizy wpływu transportera *MtABCG40* na pierwsze podziały komórkowe podczas formowania korzenia bocznego. Pozyskane metodą grawitropicznej stymulacji fragmenty korzeni mutantów *MtABCG40* zawierające 12-, 24- i 48-godzinne primordia poddane zostały analizie poziomu ekspresji *MtLBD16*. Jest to gen kodujący czynnik transkrypcyjny zależny od auksyn i promujący wczesne etapy organogenezy korzeni bocznych (Schiessl i wsp., 2019). Wyniki wskazały na wzrost akumulacji transkryptu *MtLBD16* po 12 h od inicjacji organogenezy korzenia bocznego w stymulowanych grawitropicznie fragmentach *mtabcg40-1* względem WT-1 (rycina 4.17).



Rycina 4.17 Poziom ekspresji *MtLBD16*, genu indukowanego przez auksyny i promującego wczesną organogenezę brodawki korzeniowej, we fragmentach korzeni roślin typu dzikiego (WT-1) oraz mutantów *MtABCG40* (*mtabcg40-1*) zawierających 12-, 24- i 48-godzinne zawiązki korzeni bocznych. Analizy dokonano przy użyciu metody Real-Time PCR, a wyniki znormalizowano względem β -aktyny. Na wykresie przedstawione zostały wartości średnich oraz odchyłeń standardowych z trzech niezależnych powtórzeń biologicznych. Istotność statystyczna różnic pomiędzy średnimi z porównywanych grup określona została z wykorzystaniem dwustronnego testu t-Studenta.

12-godzinne primordia *mtabcg40* zanalizowano ponadto pod względem liczby tworzących je komórek. Wykorzystano do tego znakowanie dzielącego się DNA syntetycznym nukleozydem, 5-etynylo-2'-deoksyurydyny (EdU) z przyłączoną do niego fluorescencyjną cząsteczką azydku Alexa Fluor® 488. Zliczenie jąder wykazujących fluorescencyjny sygnał wskazało na większą w stosunku do korzeni typu dzikiego (WT-1) liczbę komórek wypełniających primordia korzeni bocznych mutantów (*mtabcg40-1*) (rycina 4.18).



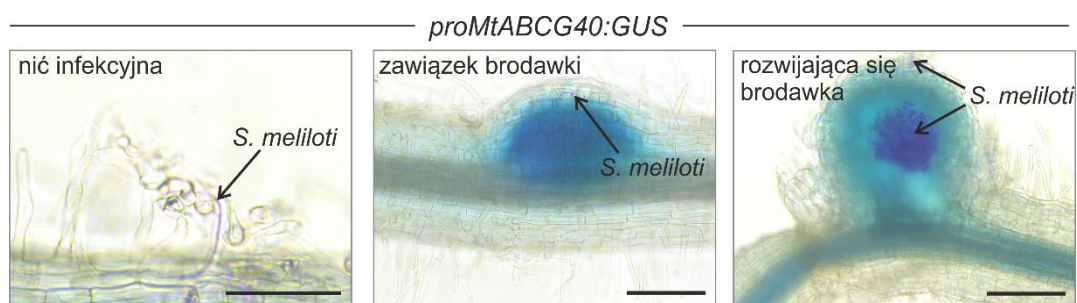
Rycina 4.18 Porównanie liczby komórek tworzących wczesne primordia korzeni bocznych roślin typu dzikiego (WT-1) i mutantów (*mtabcg40-1*). A, Obraz mikroskopowy 12-godzinnych primordiów korzeni bocznych indukowanych metodą grawistymulacji, przedstawiający jądra komórkowe wyznakowane z wykorzystaniem 5-etynylo-2'-deoksyurydyny (EdU) i przyłączonej do niego

fluorescencyjnej cząsteczki azydku Alexa Fluor™ 488 (sygnał zielony). Ściany komórkowe wybarwione zostały za pomocą jodku propidyny (sygnał czerwony). Skala: 100 μm . B, Porównanie liczby wyznakowanych fluorescencyjnie jąder w analizowanych primordiach korzeni bocznych. Dla każdego wykresu pudełkowego: linia pośrodku przedstawia położenie wartości mediany; „+” przedstawia położenie wartości średniej; prostokąt obejmuje wartości w przedziale percentyli 25-75; wąsy obejmują wartości pomiędzy pudełkiem a percentylem 10 i 90. Wartości powyżej i poniżej wąsów są zaprezentowane jako pojedyncze punkty. Istotność statystyczna różnic pomiędzy średnimi z porównywanych grup określona została z wykorzystaniem dwustronnego testu t-Studenta. Wartość n oznacza łączną liczbę primordiów analizowanych w ramach dwóch niezależnych powtórzeń biologicznych.

4.7 Rola MtABCG40 w formowaniu brodawek korzeniowych

4.7.1 Analiza wzoru ekspresji *MtABCG40* w brodawkach

W związku z zaobserwowaną akumulacją transkryptu *MtABCG40* w brodawkach korzeniowych u *M. truncatula* (rycina 4.1), dalsze badania poświęcono wyjaśnieniu potencjalnego wpływu transportera MtABCG40 na proces brodawkowania. W pierwszej kolejności przeprowadzono analizę wzoru jego ekspresji poprzez analizę histochemiczną transgenicznych korzeni niosących konstrukcję genową *proMtABCG40:GUS* i inokulowanych bakteriami symbiotycznymi *Sinorhizobium meliloti* 1021/pXLGD4. Wykorzystanie tego szczepu pozwoliło na odróżnienie formujących się na powierzchni korzeni brodawek od korzeni bocznych poprzez barwną reakcję wewnątrz komórek bakterii katalizowaną przez enzym β -galaktozydazę (ang. β -galactosidase, GAL), kodowany przez transgen *lacZ*. Aktywność promotora *MtABCG40* widoczna była w formującym się zawiązku brodawki, jak również później, w rozwijającej się brodawce 14 dni po inokulacji (rycina 4.19).

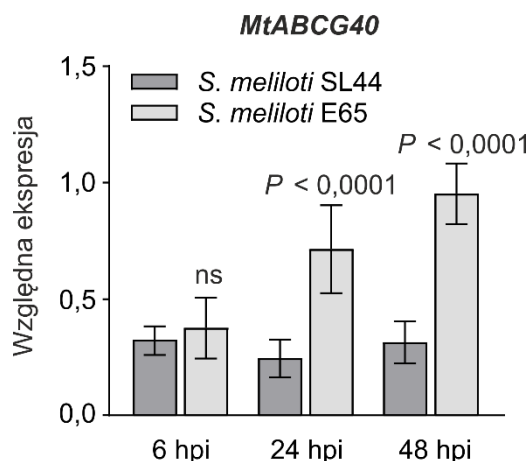


Rycina 4.19 Wzór ekspresji *MtABCG40* w czasie brodawkowania transgenicznych korzeni niosących konstrukcję genową *proMtABCG40:GUS*. Zdjęcia przedstawiają kolejno: infekcję bakteryjną, formowanie zawiązku brodawki oraz rozwijającą się brodawkę korzeniową 14 dni po infekcji. Podwójne barwienie z wykorzystaniem substratów chromogennych X-GlcA i Magenta-Gal pozwoliło na wizualizowanie odpowiednio miejsc ekspresji *MtABCG40* na niebiesko oraz *S. meliloti* w kolorze

purpurowym (ang. *magenta*). Czarne strzałki wskazują na położenie nici infekcyjnych lub zainfekowanych bakteriami komórek brodawki. Skala, odpowiednio: 50 μ M, 100 μ M i 100 μ M.

4.7.2 Analiza zmian ekspresji *MtABCG40* po inokulacji *Sinorhizobium meliloti*

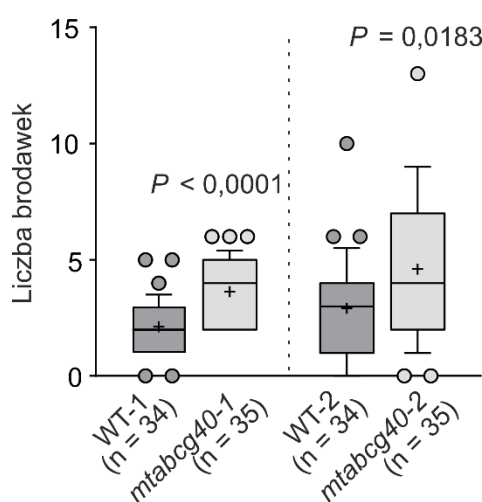
Formowanie brodawki inicjowane jest w korzeniu roślin bobowatych poprzez związanie cząsteczki sygnałowej określanej jako czynnik Nod (ang. *Nod factor*) z receptorem, znajdującym się na powierzchni ryzodermy. Percepcja czynnika Nod aktywuje kaskadę sygnałową, co w konsekwencji prowadzi do szeregu przemian o charakterze transkryptomycznym, które kontrolują cały proces (Buhian i Bensmihen, 2018). W celu sprawdzenia wpływu czynnika Nod na zmianę akumulacji transkryptu *MtABCG40*, korzenie *M. truncatula* inokulowano dwoma szczepami *S. meliloti*, różniącymi się zdolnością do jego produkcji. Szczepem E65, konstytutywnie produkującym czynnik Nod oraz szczepem kontrolnym SL44 z delecją genów *nodABC* odpowiedzialnych za jego biosyntezę. Badanie wskazało na wzrost poziomu ekspresji *MtABCG40* wywołany przez szczep E65 względem szczepu SL44 po 24 h i 48 h od inokulacji, a tym samym na indukcję ekspresji *MtABCG40* pod wpływem czynnika Nod (rycina 4.20).



Rycina 4.20 Analiza poziomu ekspresji *MtABCG40* w korzeniach *M. truncatula* pod wpływem czynnika Nod, przeprowadzona z wykorzystaniem szczepu bakterii *S. meliloti* nieprodukującego (SL44) oraz konstytutywnie produkującego (E65) czynnika Nod. Analizowano punkty czasowe: 6, 24 i 48 h po inokulacji (hpi, ang. *hours post inoculation*). Poziom ekspresji określony został przy użyciu metody Real-Time PCR i znormalizowany względem β -aktyny. Na wykresie przedstawione zostały wartości średnich oraz odchyłeń standardowych z trzech niezależnych powtórzeń biologicznych. Istotność statystyczna różnic pomiędzy średnimi z porównywanych grup określona została z wykorzystaniem dwustronnego testu Manna-Whitneya.

4.7.3 Określenie wpływu MtABCG40 na liczbę brodawek u *Medicago truncatula*

W związku z aktywnością promotora *MtABCG40* w brodawkach korzeniowych (podrozdział 4.7.1) oraz jego podwyższonym poziomem ekspresji w obecności czynnika Nod (podrozdział 4.7.2), w kolejnym etapie badań podjęto się charakterystyki wpływu transportera *MtABCG40* na wydajność brodawkowania u *M. truncatula*. Wykorzystano do tego linie mutantów *mtabcg40* (NF21323: *mtabcg40-1*, WT-1 oraz NF17891: *mtabcg40-2*, WT-2), które inokulowano zawiesiną natywnego szczepu bakterii *S. meliloti* 1021. Liczba brodawek powstałych po 21 dniach na korzeniach mutantów *mtabcg40* obu linii była większa od tej zaobserwowanej u odpowiadających im roślin typu dzikiego, WT (rycina 4.21).

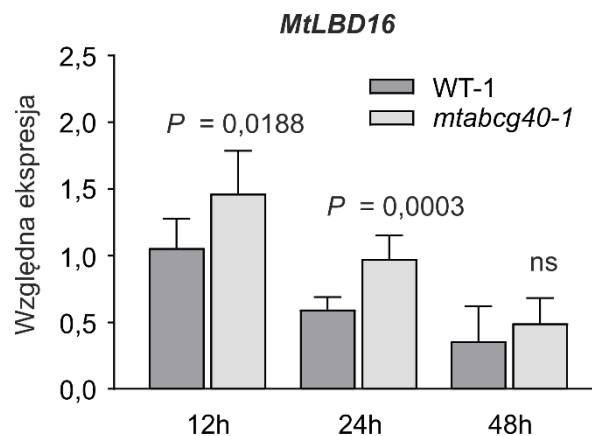


Rycina 4.21 Porównanie liczby brodawek tworzonych przez rośliny *mtabcg40* z linii NF21323 (*mtabcg40-1*) i NF17891 (*mtabcg40-2*) oraz odpowiadającym im roślinom typu dzikiego (WT-1, WT-2) 21 dni po inokulacji bakteriami *S. meliloti* 1021. Dla każdego wykresu pudełkowego: linia pośrodku przedstawia położenie wartości mediany; „+” przedstawia położenie wartości średniej; prostokąt obejmuje wartości w przedziale percentyli 25-75; wąsy obejmują wartości pomiędzy pudełkiem a percentylem 10 i 90. Wartości powyżej i poniżej wąsów są zaprezentowane jako pojedyncze punkty. Istotność statystyczna różnic pomiędzy średnimi z porównywanych grup określona została z wykorzystaniem dwustronnego testu Manna-Whitneya. Wartość n oznacza łączną liczbę brodawek zliczonych w ramach dwóch niezależnych powtórzeń biologicznych.

4.7.4 Wpływ MtABCG40 na zależną od auksyn inicjację organogenezy brodawek

Ze względu na zwiększenie liczby brodawek produkowanych przez korzenie roślin z mutacją *MtABCG40*, w dalszej fazie badań skupiono się na wyjaśnieniu mechanizmu stojącego za zaobserwowanym fenotypem. Z uwagi na postulowane częściowe podobieństwo do organogenezy korzeni bocznych (Schiessl i wsp., 2019), opisane poniżej analizy formowania brodawki zdecydowano się przeprowadzić z użyciem metod analogicznych do tych, jakich

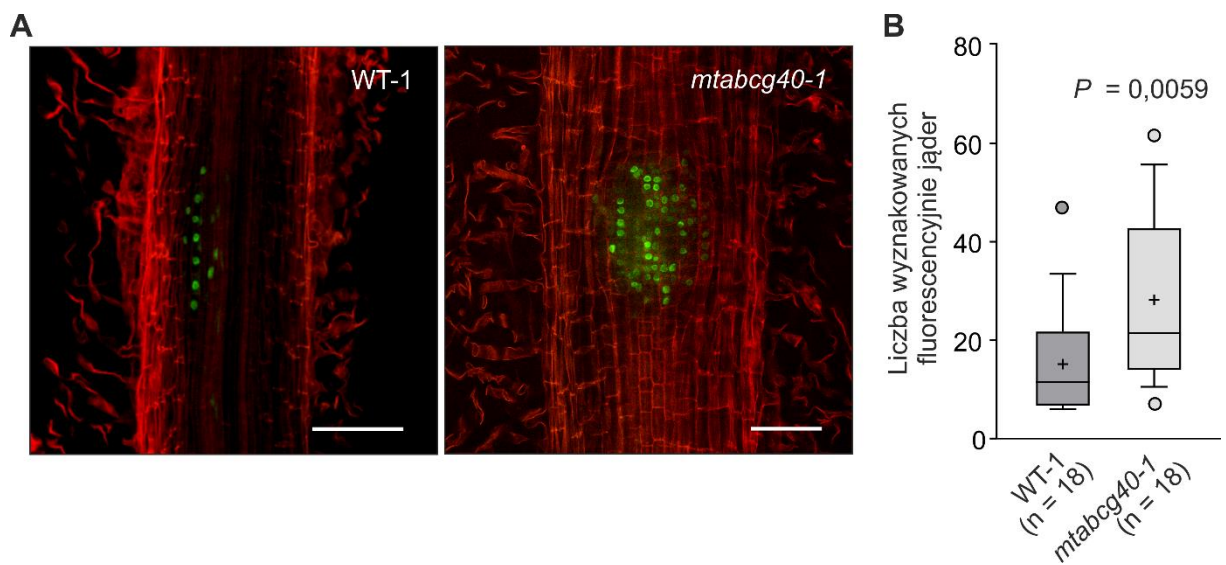
użyto w niniejszej pracy do badania korzeni bocznych. Precyzyjna kontrola momentu inicjacji procesu brodawkowania w czasie i w określonej strefie korzenia możliwa była dzięki wykorzystaniu techniki punktowej inokulacji bakterii symbiotycznych. Technika ta polega na zaaplikowaniu kropli zawiesiny *S. meliloti* na dystalny fragment strefy różnicowania korzenia, charakteryzującej się występowaniem młodych i wciąż jeszcze wydłużających się włośników. Jest to jednocześnie miejsce najbardziej wrażliwe na infekcje bakteryjne, gwarantujące wydajne brodawowanie (Bhuvanewari i wsp., 1980). Przyjmując moment umieszczenia kropli na powierzchni korzenia za punkt zerowy, dokonano zbioru fragmentów korzenia znajdujących się w miejscu inokulacji w kolejnych punktach czasowych 12, 24 i 48 h po inokulacji. Materiał posłużył do analizy poziomu ekspresji *MtLBD16*, genu kodującego jeden z czynników transkrypcyjnych, którego ekspresja indukowana jest w obecności auksyn na wczesnych etapach organogenezy brodawki (Schiessl i wsp., 2019). Zaobserwowano podwyższoną akumulację transkryptu *MtLBD16* w materiale z korzeni *mtabcg40* względem WT (rycina 4.22).



Rycina 4.22 Poziom ekspresji *MtLBD16*, genu markerowego odpowiedzi komórek na auksyny, we fragmentach korzeni roślin typu dzikiego (WT-1) oraz mutantów *MtABCG40* (*mtabcg40-1*) 12, 24, 48 godzin po inokulacji bakteriami symbiotycznymi w miejscu inicjacji formowania brodawek korzeniowych. Poziom ekspresji określony został przy użyciu metody Real-Time PCR i znormalizowany względem β -aktyny. Na wykresie przedstawione zostały wartości średnich oraz odchyłeń standardowych z trzech niezależnych powtórzeń biologicznych. Istotność statystyczna różnic pomiędzy średnimi z porównywanych grup określona została z wykorzystaniem dwustronnego testu Manna-Whitneya.

W związku z podwyższoną ekspresją *MtLBD16* w zawiązkach brodawek *mtabcg40* względem roślin WT-1 (rycina 4.22), w kolejnym etapie badań dokonano analizy tempa zachodzących w ich obrębie podziałów komórkowych, które są silnie zależne od auksyn. W tym celu badane

korzenie poddano analizie z wykorzystaniem syntetycznego nukleozydu, EdU. Podobnie jak w przypadku korzeni bocznych, formujące się brodawki, 12 godzin po punktowej inokulacji bakteriami *S. meliloti*, przeniesione zostały na pożywkę z EdU, co spowodowało jego wbudowanie się do DNA komórek ulegających w tym czasie podziałom. Przyłączenie fluorescencyjnej cząsteczki azydku Alexa Fluor® 488 do EdU zintegrowanego z DNA pozwoliło na wizualizację ich jąder. Obserwacje prowadzone z wykorzystaniem mikroskopu konfokalnego wskazały na wzrost tempa podziałów komórkowych w obrębie zawiązków brodawek korzeniowych mutantów *mtabcg40-1* względem roślin typu dzikiego, WT-1 (rycina 4.23).

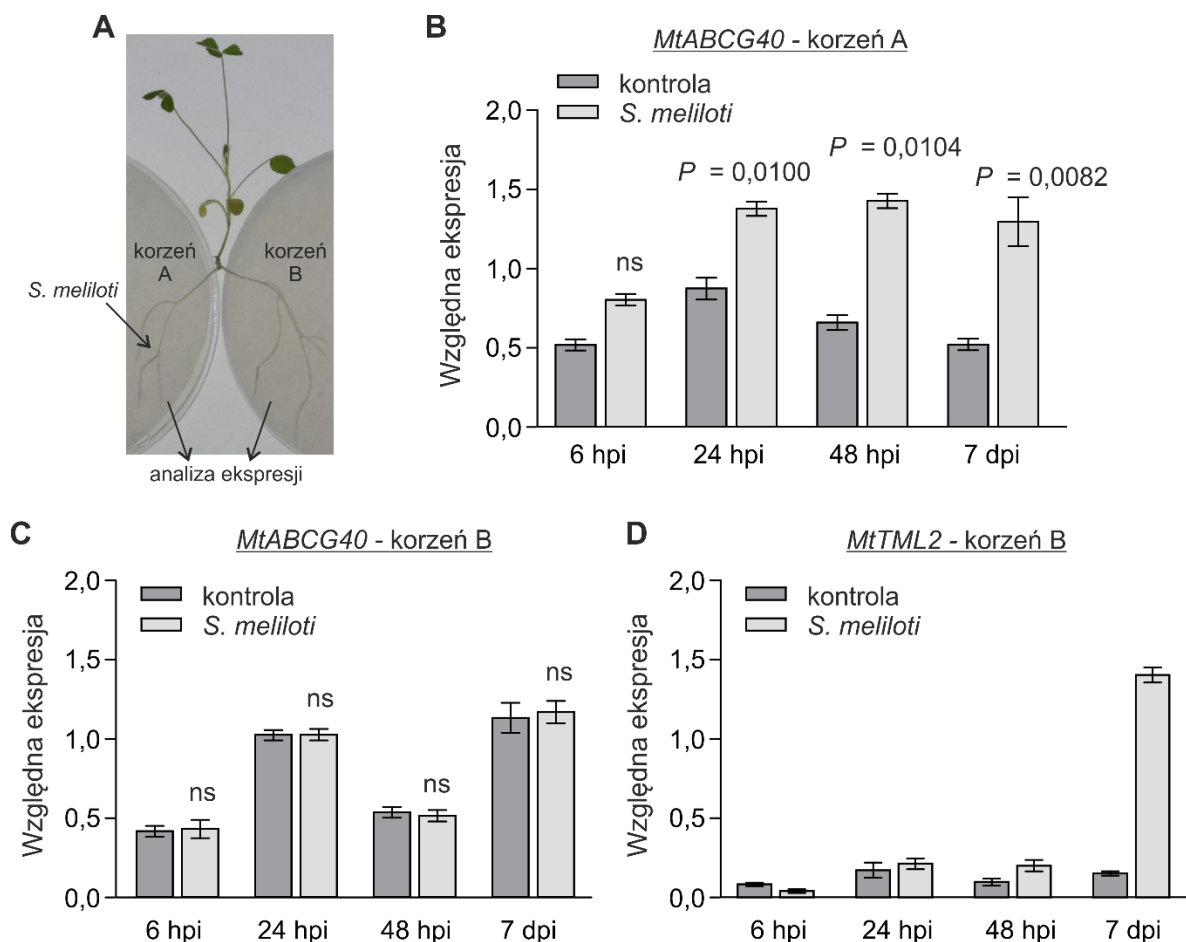


Rycina 4.23 Porównanie tempa podziałów komórkowych w zawiązkach brodawek roślin typu dzikiego (WT) i mutantów (*mtabcg40*). **A**, Obraz mikroskopowy 12-godzinnych zawiązków brodawek indukowanych metodą punktowej inokulacji bakteriami *S. meliloti*, przedstawiający jądra komórkowe wyznakowane z wykorzystaniem 5-etynylo-2'-deoksyurydyny (EdU) i przyłączonego do niego fluorescencyjnego związku Alexa Fluor™ 488 Azide (sygnał zielony). Ściany komórkowe wybarwione zostały za pomocą jodku propidyny (sygnał czerwony). Skala: 100 μm . **B**, Porównanie liczby wyznakowanych fluorescencyjnie jąderek w analizowanych zawiązkach brodawek. Dla każdego wykresu pudełkowego: linia pośrodku przedstawia położenie wartości mediany; „+” przedstawia położenie wartości średniej; prostokąt obejmuje wartości w przedziale percentyli 25-75; wąsy obejmują wartości pomiędzy pudełkiem a percentylem 10 i 90. Wartości powyżej i poniżej wąsów są zaprezentowane jako pojedyncze punkty. Istotność statystyczna różnic pomiędzy średnimi z porównywanych grup określona została z wykorzystaniem dwustronnego testu Manna-Whitneya. Wartość n oznacza łączną liczbę zawiązków brodawek korzeniowych analizowanych w ramach dwóch niezależnych powtórzeń biologicznych.

4.7.5 Analiza udziału MtABCG40 w systemicznej regulacji brodawkowania

Przeprowadzone analizy wskazały na rolę MtABCG40 w negatywnej regulacji formowania brodawek korzeniowych u *M. truncatula*. W związku z licznymi doniesieniami o istnieniu u roślin bobowatych systemicznej autoregulacji brodawkowania (ang. *autoregulation of*

nodulation, AON), w kolejnym etapie badań sprawdzono możliwość udziału badanego transportera w tym procesie. Aby tego dokonać wyprowadzono rośliny *M. truncatula* o tzw. rozdzielonym systemie korzeniowym (ang. *split-root system*), posiadające dwa względnie równe korzenie przybyszowe. Po tygodniowym wzroście na dwóch rozdzielonych przestrzennie pożywkach niesuplementowanych azotem, jeden z tak przygotowanych korzeni, oznaczony jako A, potraktowany został zawiesiną *S. meliloti*, drugi z korzeni, oznaczony jako B, niepotraktowany *S. meliloti* posłużył do analizy odpowiedzi systemicznej (rycina 4.24A). Zarówno korzenie A, jak i korzenie B zostały zebrane w określonych punktach czasowych po inokulacji bakteriami i wykorzystane do badania ekspresji *MtABCG40*. Analiza poziomu *MtABCG40* w korzeniu A wskazała na wzrost akumulacji jego transkryptu pod wpływem bakterii symbiotycznych, a tym samym odpowiedź lokalną (rycina 4.24B). Jednocześnie nie zaobserwowano zmian poziomu ekspresji *MtABCG40* w korzeniu B, które miałyby charakter systemiczny (rycina 4.24C). Eksperyment został odpowiednio zwalidowany poprzez analizę ekspresji jednego z charakterystycznych dla AON genów markerowych, *MtTML2* (Gautrat i wsp., 2019), którego ekspresja indukowana była w korzeniu B po 7 dniach od inokulacji bakteriami (rycina 4.24D).



Rycina 4.24 Analiza wpływu systemycznego mechanizmu AON na ekspresję *MtABCG40* z wykorzystaniem *M. truncatula* z rozdzielonym systemem korzeniowym. A, Schemat przedstawiający przebieg eksperymentu. Dwa korzenie przypyszowe A i B siewki *M. truncatula* zostały przestrzennie rozdzielone. Korzeń oznaczony jako A został potraktowany zawiesiną bakterii symbiotycznych *S. meliloti*. Następnie w określonych punktach czasowych oba z korzeni, korzeń A oraz nietraktowany korzeń B, zostały poddane analizie ekspresji wybranych genów. Analizowano punkty czasowe: 6, 24, 48 h oraz 7 dni po inokulacji (hpi/dpi, ang. *hours/days post inoculation*) B, Analiza ekspresji *MtABCG40* w korzeniu A. C i D, Analiza ekspresji *MtABCG40* (C) i *MtTML2*, genu markerowego AON (D), w korzeniu B. Poziomą ekspresję określony został przy użyciu metody Real-Time PCR i znormalizowany względem β -aktyny. Na wykresie przedstawione zostały wartości średnich oraz odchyłeń standardowych z trzech powtórzeń technicznych. Istotność statystyczna różnic pomiędzy średnimi z porównywanych grup określona została z wykorzystaniem dwustronnego testu Manna-Whitneya.

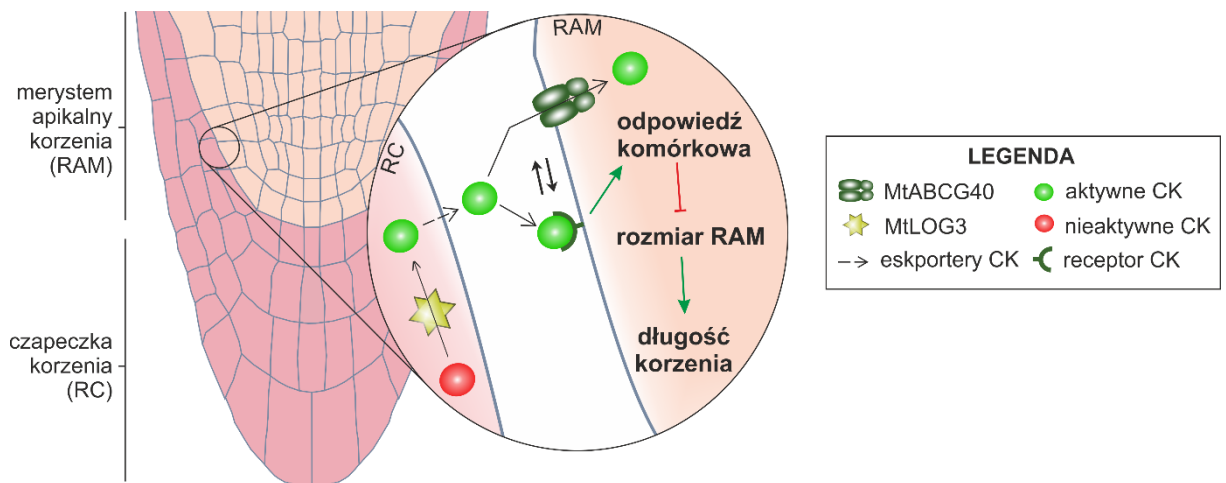
5. DYSKUSJA

W pracy doktorskiej dokonano charakterystyki funkcjonalnej białka MtABCG40, będącego jednym z transporterów cytokinin w modelowej roślinie bobowatej, *Medicago truncatula*. Przeprowadzone analizy pozwoliły stwierdzić, że aktywność MtABCG40 przyczynia się przy niedoborze azotu w środowisku do zmian morfologii korzenia obejmujących: (I) wydłużanie korzenia głównego, (II) hamowanie inicjacji powstawania korzeni bocznych oraz (III) hamowanie inicjacji powstawania brodawek korzeniowych.

5.1 Wydłużanie korzenia głównego

Do wydłużania korzenia głównego dochodzi w wyniku powiększenia się rozmiarów jego merystemu apikalnego (RAM), spowodowanego wzmożoną proliferacją komórek, wzrostem ich objętości, intensywniejszym wydłużaniem po przejściu do strefy elongacji oraz opóźnionym różnicowaniem (Dello Ioio i wsp., 2007; Wang i wsp., 2020). Wśród czynników odpowiedzialnych za hamowanie ww. procesów wymienia się cytokininy. Negatywny wpływ cytokinin na rozmiar RAM udowodniony został m.in. poprzez eksperymenty obejmujące charakterystykę mutantów w genach ich biosyntezy oraz roślin z nadekspresją genów kodujących enzymy je degradujące, wykazujących przyspieszony wzrost korzenia głównego (Miyawaki i wsp., 2006; Werner i wsp., 2001). Sytuacja na pozór odwrotna ma miejsce u *M. truncatula* przy deficycie azotu. Dochodzi w niej do wydłużania korzenia głównego (załącznik 5A) z jednoczesną aktywacją cytokinin wywołaną indukcją ekspresji genów kodujących enzymy LOG (rycina 4.10) (Kuroha i wsp., 2009). Co warte uwagi, jednym z miejsc aktywacji cytokinin jest czapeczka korzenia, na co wskazuje wzór ekspresji *MtLOG3* (rycina 4.12B). Biorąc pod uwagę, iż struktura ta posiada znaczny wpływ na przyległy RAM, wydłużanie korzenia głównego *M. truncatula* pomimo aktywacji cytokinin w tym miejscu sugeruje istnienie mechanizmu obniżającego wrażliwość komórek merystemu na ten hormon przy deficycie azotu (Tsugeki i Fedoroff, 1999). Funkcję taką pełnić może transporter MtABCG40. Ekspresja kodującego go genu indukowana jest przy braku NH_4NO_3 w środowisku (rycina 4.2) we wspomnianych komórkach RAM (rycina 4.12A). Przebiegający z jego udziałem import aktywnych form cytokinin do tych komórek może przyczyniać się do obniżania puli hormonu w apoplacie, przez co nie byłby on dostępny dla receptorów cytokinin zakotwiczonych w błonach komórkowych (rycina 5.1). Sytuacja taka skutkowałaby znoszeniem hamującego wpływu, jaki cytokininy mają na wierzchołek wzrostu korzenia i elongację całego organu (Růžička i wsp., 2009). Na opisaną funkcję MtABCG40 w korzeniu wskazywać może ponadto

analiza jego mutantów, które charakteryzują się skróconym RAM (rycina 4.13) i krótszym korzeniem głównym (rycina 4.6B). Na możliwą akumulację cytokinin w apoplaście RAM roślin *mtabcg40* wskazał podwyższony względem roślin typu dzikiego poziom ekspresji jednego z genów indukowanych przez ten hormon, *MtRR4* (rycina 4.14A), biorącego udział w kaskadzie sygnałowej tego hormonu (Gonzalez-Rizzo i wsp., 2006). Jednocześnie nie zaobserwowano w RAM mutantów *mtabcg40* zmian w stężeniu aktywnych form cytokinin (rycina 4.14B), co może sugerować, że łączna ich pula, tj. apoplastyczna i wewnątrzkomórkowa, nie zmieniła się. Podobną do MtABCG40 funkcję w RAM zaproponowano również dla innego z importerów aktywnych form cytokinin, PUP14 z *Arabidopsis thaliana*. Mutacja kodującego go genu prowadziła do poważnych defektów morfologicznych korzenia, w tym do jego skrócenia (Zürcher i wsp., 2016).



Rycina 5.1 Proponowany model przedstawiający udział transportera MtABCG40 w zmniejszeniu wrażliwości komórek RAM na cytokiny przy niedoborze azotu w środowisku. Produkowane w czapeczce korzenia nieaktywne formy cytokinin są w jej komórkach bezpośrednio przekształcane do form aktywnych przy udziale enzymów LOG, jak np. MtLOG3. Aktywne cytokiny eksportowane są do apoplastu otaczającego komórki RAM, a następnie importowane do tych komórek przez transporter MtABCG40. Zmniejsza to pulę cytokinin wiążących się z receptorami na powierzchni błony komórkowej RAM, przez co hamuje ich negatywny wpływ na tę strukturę i w konsekwencji na wydłużanie korzenia głównego.

Kwestią sporną/otwartą w przypadku wielu analiz dotyczących wpływu cytokinin na metabolizm komórkowy pozostaje często lokalizacja wiążących je receptorów. W dostępnej literaturze znaleźć można przede wszystkim dowody na ich zakotwiczenie w błonie retikulum endoplazmatycznego (ER) (Romanov i wsp., 2018), jednak coraz częściej pojawiają się także wzmianki o ich obecności w błonkach komórkowych (Antoniadi i wsp., 2020; Kubiasová i wsp., 2020). Miejsce występowania receptorów warunkowane jest prawdopodobnie przez

charakter komórek, w których można je odnaleźć. Podczas gdy receptory w ER przeważają w większości komórek, te spotykane w plazmalemmie znamionują najczęściej komórki merystematyczne. Receptory cytokinin obecne w błonie komórkowej wykryto do tej pory w RAM oraz w tworzącej się w czasie podziałów komórkowych przegrodzie pierwotnej. Co ważne, receptory z frakcji zakotwiczonej w ER mogą zmieniać swoją lokalizację na drodze sekrecji do powierzchni błony komórkowej (Kubiasová i wsp., 2020).

Oddziaływanie cytokinin na morfologię organów roślinnych jest zawsze wypadkową ich interakcji z innymi fitohormonami. Ma ono również istotne znaczenie dla funkcjonowania wierzchołka wzrostu korzenia i jego strefy merystematycznej, gdzie dochodzi do zależnej od wzajemnego stosunku cytokinin i auksyn kontroli zachodzących procesów fizjologicznych i morfogenetycznych (Wu i wsp., 2021). Nie jest zaskoczeniem zatem zaobserwowana w RAM mutantów *mtabcg40* względem roślin typu dzikiego zmiana stężenia i odpowiedzi komórek na kwas indolilo-3-octowy (IAA) (rycina 4.15), będący aktywną biologicznie i najczęściej spotykaną u roślin formą auksyn (Korasick i wsp., 2013). Pomimo często spotykanej antagonistycznej zależności obu hormonów, która ma miejsce np. w czasie formowania korzenia bocznego (Jing i Strader, 2019), przeprowadzone analizy RAM mutantów dowiodły jednoczesnego wzrostu stymulacji komórek przez cytokininy (rycina 4.14A) oraz wspomnianego stężenia IAA (rycina 4.15A). Sytuację taką wytłumaczyć można spotykaną w korzeniu stymulacją produkcji auksyn przez cytokininy. Jak się przypuszcza, ma ona na celu podtrzymanie bazowego poziomu auksyn w warunkach fizjologicznych, co jest warunkiem niezbędnym do prawidłowego funkcjonowania merystemu (Jones i wsp., 2010). Możliwe jednak także, że zaobserwowany wzrost stężenia IAA u mutantów *MtABCG40* przekracza dopuszczalne fizjologicznie wartości, przez co dochodzi do skracania ich korzenia głównego. Zjawisko o podobnym charakterze ma miejsce w przypadku egzogennej aplikacji IAA do korzenia w stężeniach przekraczających te występujące *in vivo* (załącznik 6A) (Pilet i wsp., 1979). Niewykluczone ponadto, że podwyższony poziom cytokinin ma także negatywny wpływ na ekspresję genów kodujących transportery auksyn lub poprawne dokowanie tych białek w błonach komórkowych, przez co zaburza polarny transport auksyn i powoduje ich akumulację w obrębie wierzchołka wzrostu korzenia (Wu i wsp., 2021).

5.2 Inicjacja organogenezy korzenia bocznego

Zaobserwowane zmniejszanie gęstości korzeni bocznych u *M. truncatula* przy niedoborze azotu (rycina 4.2), przy jednoczesnym wydłużaniu korzenia głównego (załącznik 5A),

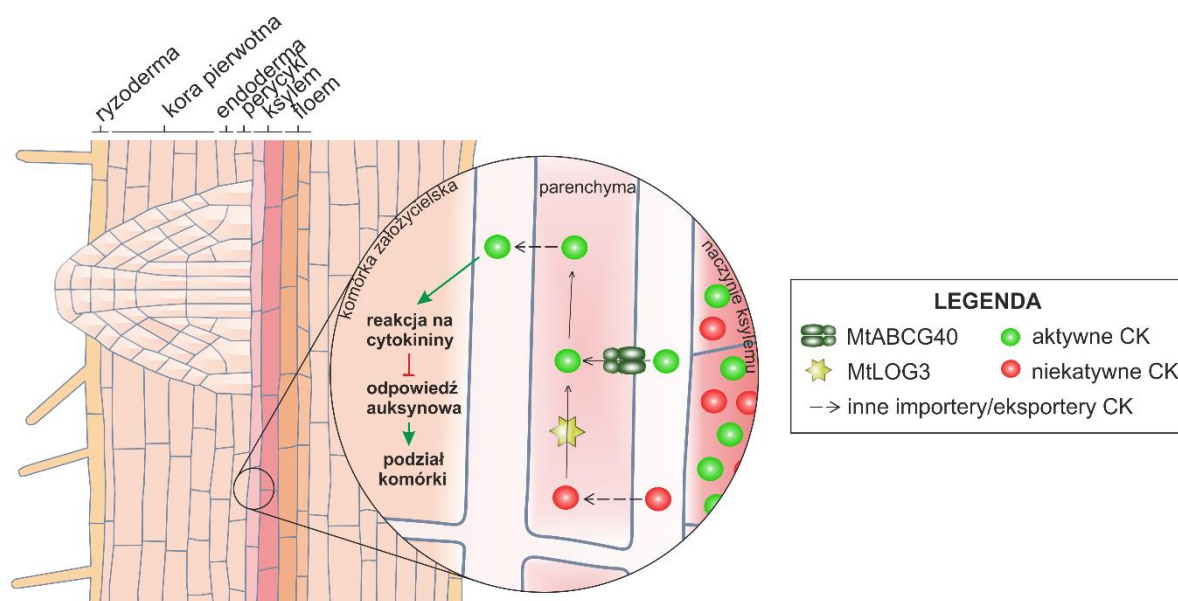
skutkowało wzrostem odległości pomiędzy wytwarzanymi przez roślinę korzeniami bocznymi (ang. *lateral root spacing*). Oznacza to więc, że pomimo zwiększania się powierzchni korzenia, nie dochodzi jednocześnie do równie intensywnego formowania nowych korzeni bocznych (załącznik 5B). Jednym z głównych czynników odpowiedzialnych za takie zjawisko są cytokininy (Chang i wsp., 2015). Doskonale obrazuje to tzw. rozgałęziony fenotyp (ang. *bushy phenotype*) korzeni roślin z mutacjami w genach kodujących receptory wiążące cytokininy (Gonzalez-Rizzo i wsp., 2006), białka regulatorów odpowiedzi (RR) w zależnej od cytokinin kaskadzie sygnałowej (To i wsp., 2004), oraz roślin z nadekspresją genów kodujących enzymy degradujące ten hormon (CKX) (Werner i wsp., 2001). Wszystkie one charakteryzują się zwiększoną gęstością korzeni bocznych, a zarazem mniejszą odległością pomiędzy powstającymi korzeniami bocznymi w porównaniu z roślinami typu dzikiego. Podobny fenotyp zaobserwowano również w przypadku mutantów *mtabcg40* (rycina 4.6A). Nie bez znaczenia jest ponadto fakt, iż miejscem, w którym gen ten ulega ekspresji, podobnie jak np. geny kodujące receptory cytokinin u *M. truncatula*, jest wiązka przewodząca (Boivin i wsp., 2016)(rycina 4.12A). Na jej obrzeżach, w perycyklu u *A. thaliana*, stwierdzono występowanie komórek zdolnych do zapoczątkowania organogenezy nowych korzeni bocznych, zwanych komórkami założycielskimi (LRFC), charakteryzujących się obniżoną wrażliwością na cytokininy z jednoczesnym wzrostem reaktywności w stosunku do auksyn, stymulujących wspomniany proces (Dubrovsky i wsp., 2008; Bielach i wsp., 2012). Wrażliwość na cytokininy, której poziom zobrazowano za pomocą konstrukcji reporterowych pod promotorem TCS, przypisuje się natomiast fragmentom wiązki przewodzącej znajdującym się pomiędzy formującymi się korzeniami bocznymi (Bielach i wsp., 2012). Jest to związane m.in. z intensywniejszą syntezą aktywnych form cytokinin w tych miejscach, na co wskazuje podwyższony względem komórek LRFC poziom ekspresji genów z rodziny *IPT* i *LOG* (Chang i wsp., 2015). Wzrost ekspresji *MtLOG* (rycina 4.10), powiązany ze spadkiem gęstości korzeni bocznych u *M. truncatula* (rycina 4.2) przy niedoborze azotu, widoczny był też w trakcie analiz przeprowadzonych w ramach niniejszej pracy doktorskiej. Poddany analizie *MtLOG3* posiadał także wiążkowy wzór ekspresji (rycina 4.12B).

Inicjacja formowania korzenia bocznego, jak już wcześniej wspomniano, wymaga obniżenia wrażliwości LRFC na cytokininy, które hamują ten proces (Bielach i wsp., 2012). Jest to warunek niezbędny do wytworzenia odpowiedniego gradientu auksyn, który skutkuje zapoczątkowaniem zależnych od tego hormonu przemian biochemicznych i pierwszym podziałem wymienionych komórek (Benková i wsp., 2003; Laplaze i wsp., 2007).

Makroskopowym przejawem negatywnego wpływu MtABCG40 jako transportera cytokinin na inicjację organogenezy korzenia bocznego może być tzw. auksynowy fenotyp (Fukui i Hayashi, 2018; Kakei i wsp., 2015) *mtabcg40*, które tworzą więcej korzeni bocznych niż odpowiadające im rośliny dzikiego typu (rycina 4.6C). Widoczny antagonizm aktywności MtABCG40 i auksyn w formowaniu korzeni bocznych potwierdza dodatkowo spadek ekspresji kodującego ten transporter genu pod wpływem egzogennej aplikacji IAA (rycina 4.16) oraz towarzyszący jej wzrost liczby korzeni bocznych u traktowanych auksyną roślin (załącznik 6B). Opisaną zależność potwierdzają także dostępne dane transkryptomiczne, które pokazują, że ekspresja *MtABCG40* spada w chwili zachodzenia pierwszych podziałów zawiązka korzenia bocznego i wzrasta dopiero po ich zakończeniu (załącznik 7A) (Schiessl i wsp., 2019).

Suplementacja azotem, w postaci zarówno NO_3^- , jak i NH_4^+ , stymuluje produkcję cytokinin *de novo* w korzeniu. Spowodowane jest to indukcją ekspresji genów *IPT* oraz *CYP735A* w jego wiązce przewodzącej, dlatego też główną z powstających w tych warunkach form hormonu jest rybozyd *trans*-zeatyny (Kamada-Nobusada i wsp., 2013; Takei i wsp., 2004; Wang i wsp., 2004). Pomimo intensywniejszej niż w przypadku deficytu azotu syntezy cytokinin (Wang i wsp., 2020), przy dostępności tego pierwiastka w środowisku w mniejszym stopniu dochodzi do ich przekształcenia do aktywnych biologicznie wolnych zasad azotowych. Wynika to ze spadku poziomu ekspresji genów kodujących enzymy LOG (rycina 4.10) (Ramireddy i wsp., 2014) i prowadzi do zmniejszenia negatywnego oddziaływania hormonu m.in. na inicjację powstawania korzeni bocznych, co przekłada się na wzrost ich gęstości na powierzchni korzenia głównego (rycina 4.2) (Kuroha i wsp., 2009). Powstające rybozydy mogą być zatem załadowywane do ksylemu wiązki przewodzącej z udziałem transporterów błonowych (potencjalnych homologów takich jak np. *AtABCG14*, *OsABCG18*), a następnie odtransportowane do części nadziemnych (Ko i wsp., 2014; Zhao i wsp., 2019). Efektem zwiększonego stężenia związków azotu w środowisku jest zatem m.in. obserwowane hamowanie dominacji wierzchołkowej w częściach nadziemnych, ich rozkrzewianie oraz zazielenienie wywołane wzmożoną syntezą chlorofilu (Rahayu i wsp., 2005; Zhang i wsp., 2014). Wyniki niniejszej pracy wskazują natomiast na odmienne od tych opisanych powyżej efekty oddziaływania cytokinin na powstawanie korzeni bocznych przy obniżonym dostępie roślin do związków azotu. Ekspresja genu *MtLOG3* w czapeczce korzenia *M. truncatula* (rycina 4.12B) sugeruje, że produkowane w tym samym miejscu *de novo* rybozydy (Miyawaki i wsp., 2004) przekształcane są od razu do form aktywnych i w takiej formie przemieszczają się elementami ksylemu korzenia do wyższych jego partii (Aloni i wsp., 2005). Następnie mogą

być importowane z apoplastu otaczającego naczynia ksylemu do wnętrza komórek parenchymatycznych wypełniających wiązkę przewodzącą przy udziale MtABCG40, na co wskazuje wzór ekspresji kodującego go genu (rycina 4.12A). Dalsza translokacja aktywnych form cytokinin z ksylemu na zewnątrz wiązki przewodzącej, czyli w kierunku perycyklu, endodermy i wewnętrznych warstw kory pierwotnej, powodować może ostatecznie hamowanie inicjacji organogenezy korzeni bocznych zachodzącej w tych miejscach u *M. truncatula* (Herrbach i wsp., 2014) (rycina 5.2). Co ciekawe, widoczne wzmożenie produkcji korzeni bocznych u roślin pozbawionych wierzchołka wzrostu korzenia potwierdza możliwość udziału ksylemowych cytokinin w opisanym procesie (Lloret i wsp., 1988). Zaobserwowana ponadto we wspomnianej tkance parenchymatycznej ekspresja genu *MtLOG3* (rycina 4.12B) sugerować może, iż we wiązce przewodzącej korzenia transportowane mogą być poza aktywnymi formami cytokinin jeszcze również ich rybozydy, które aktywowane są dopiero w jej komórkach, bezpośrednio przed dotarciem do potencjalnych miejsc inicjacji korzeni bocznych (rycina 5.2).



Rycina 5.2 Proponowany model przedstawiający udział transportera MtABCG40 w negatywnej regulacji inicjacji korzenia boczego i brodawki korzeniowej. Produkowane w czapeczce korzenia cytokininy, zarówno biologicznie aktywne, jak i nieaktywne, transportowane są elementami naczyń ksylemowych do wyższych partii korzenia. Przy niedoborze azotu w środowisku dochodzi do importu aktywnych form cytokinin z apoplastu otaczającego naczynia do komórek parenchymy wypełniających wiązkę przy udziale transportera MtABCG40. Import ten jest jednym z etapów na drodze cytokinin w kierunku perycyklu, endodermy i wewnętrznych warstw kory pierwotnej, by hamować zachodzącą w tych warstwach inicjację powstawania korzenia boczego lub brodawki. We wspomnianych komórkach parenchymy zachodzić może jednocześnie aktywacja nieaktywnych form cytokinin importowanych z naczyń ksylemu ze względu na ekspresję genów kodujących enzymy LOG, jak np. MtLOG3.

W zaproponowanym modelu transportu cytokinin z udziałem MtABCG40 w komórkach parenchymy wiązki przewodzącej (rycina 5.2) nie uwzględniono subkomórkowej lokalizacji wiążących ten hormon receptorów. Spowodowane jest to wyłącznie pośredniczącą rolą MtABCG40 w translokacji cytokinin pomiędzy naczyniami wiązki przewodzącej i warstwami otaczającymi tą strukturę korzenia z zewnątrz. W związku z udowodnionym wpływem cytokinin na np. różnicowanie się komórek wiązki przewodzącej, wiadomo jednak, że receptory takie pełnią w niej istotną rolę, niezwiązaną bezpośrednio z regulacją organogenezy korzeni bocznych (Aloni, 2013; Chang i wsp., 2022). Ze względu na niemerystematyczny charakter parenchymy wiązkowej, przypuszczać można, że posiada ona wewnątrzkomórkowe receptory cytokinin, zlokalizowane w ER (Kubiasová i wsp., 2020). W tym przypadku rola MtABCG40 polegać mogłaby na dostarczaniu hormonu do wnętrza komórek, by mógł on związać się z receptorami w ER i wywołać odpowiednie dla siebie efekty. MtABCG40 nie brałby zatem prawdopodobnie udziału w obniżaniu wrażliwości tych komórek na cytokininy, co zaproponowano jako jego funkcję w RAM przy lokalizacji receptorów w błonie komórkowej (rycina 5.1). Sygnał GUS świadczący o aktywności promotora *MtABCG40* zaobserwowano ponadto w przyległym do parenchymy wiązki przewodzącej perycyklu, endodermie i korze pierwotnej (rycina 4.12A), czyli w miejscach, w których inicjowana jest organogeneza korzenia bocznego (Herrbach i wsp., 2014). Jak dotąd nie udało się jednak dowieść, czy podobnie jak w przypadku perycyklu *A. thaliana*, warstwy te zawierają LRFC (Dubrovsky i wsp., 2008). O ich tworzeniu u *M. truncatula* świadczyć może silniejszy sygnał aktywności promotora *MtABCG40* w pojedynczych komórkach jednej z warstw sąsiadujących z wiązką przewodzącą, zaobserwowany podczas realizacji niniejszej pracy doktorskiej (załącznik 8). Potwierdzenie ich charakteru jako LRFC w dalszych badaniach mogłoby świadczyć o bezpośrednim wpływie MtABCG40 na przebieg zachodzących w ich wnętrzu procesów, w tym bezpośrednio na hamowanie inicjacji powstawania korzenia bocznego. Odkrycie takie byłoby poza tym argumentem za lokalizacją receptorów dla cytokinin w ER w LRFC. Tylko w takiej sytuacji importowany do cytoplazmy przez MtABCG40 hormon mógłby wywoływać negatywny wpływ na ich aktywność podziałową. Nie byłoby to możliwe w przypadku lokalizacji wspomnianych receptorów w błonie komórkowej, kiedy to import z udziałem badanego transportera obniżałby pulę apoplastycznych cytokinin, przez co nie dochodziłoby do ich związania z receptorem. Brak tych białek w błonie komórkowej świadczyłby tym samym również o niemerystematycznych właściwościach LRFC (De Smet i wsp., 2006; Kubiasová i wsp., 2020).

5.3 Inicjacja organogenezy brodawki korzeniowej

Rośliny z mutacją w genie *MtABCG40* tworzą więcej brodawek korzeniowych w porównaniu z roślinami typu dzikiego (rycina 4.21). Fenotyp ten wskazuje na możliwy udział transportera *MtABCG40* w negatywnej regulacji brodawkowania, i jest podobny do scharakteryzowanych wcześniej u mutantów w genach autoregulujących ten proces, takich jak *RDN1* i *SUNN-4* u *M. truncatula*, czy *HAR1* i *TML* u *L. japonicus* (Magori i wsp., 2009; Schnabel i wsp., 2005; Schnabel i wsp., 2011; Wopereis i wsp., 2000). Co warto uwagi, był on jednocześnie odwrotny do tego zaobserwowanego u roślin z dysfunkcjami w genach biorących udział w promowaniu brodawkowania, które produkują mniej brodawek. Jednym z nich jest np. gen kodujący *MtABCG56*, paralog *MtABCG40* transportujący cytokininy produkowane w ryzodermie i korze pierwotnej korzenia pod wpływem czynnika Nod, co przyczynia się do inicjacji organogenezy brodawki (Jarzyniak i wsp., 2021). Obniżoną w stosunku do typu dzikiego liczbę brodawek posiada także mutant w genie kodującym receptor cytokinin u *M. truncatula*, *CRE1* (Plet i wsp., 2006). Podobnie jak *MtABCG56*, pod wpływem bakterii symbiotycznych pojawia się on w korze pierwotnej korzenia i bierze udział we wczesnych etapach brodawkowania, poprzedzających pierwszy podział komórek (Jardinaud i wsp., 2016). Ważnym podobieństwem roślin *mtabcg40* i *mtcre1* jest fakt, iż w przeciwieństwie do liczby brodawek (Plet i wsp., 2011), charakteryzują się one podobnym fenotypem w przypadku korzeni bocznych, wykazując ich zwiększoną liczbę (rycina 4.6C) (Laffont i wsp., 2015). Posiadają one ponadto wiązkowy wzór ekspresji w warunkach niesymbiotycznych (rycina 4.12A) (Jardinaud i wsp., 2016), co sugeruje możliwość uczestnictwa receptora *MtCRE1* w negatywnej regulacji inicjacji korzeni bocznych z udziałem ksylemowych cytokinin, tak jak to zostało zaproponowane dla *MtABCG40* (rycina 5.2). Biorąc pod uwagę, iż usunięcie wierzchołka wzrostu korzenia, będącego miejscem produkcji cytokinin w korzeniu, przyczynia się do zwiększenia liczby korzeni bocznych (Aloni i wsp., 2005; Lloret i wsp., 1988), jaki i brodawek (Nutman, 1952), istnieje możliwość, że podobny mechanizm autoregulacyjny ma miejsce także podczas brodawkowania, a *MtABCG40* i *MtCRE1* biorą w nim udział (rycina 5.2). Różnica w liczbie formowanych brodawek u mutantów *mtabcg40* i *mtcre1* względem roślin typu dzikiego wynikałaby zatem z ich różnych wzorów ekspresji w korzeniu po inokulacji bakteriami symbiotycznymi względem warunków niesymbiotycznych. Podczas gdy *MtABCG40* w obu przypadkach pozostaje we wiązce przewodzącej (rycina 4.12A), *MtCRE1* rozszerza się z wiązki na korę pierwotną w obecności bakterii (Jardinaud i wsp., 2016). Efekt mutacji *MtCRE1* we wiązce przewodzącej, również ze względu na pierwszeństwo zachodzenia wczesnych etapów brodawkowania

względem mechanizmów negatywnej regulacji (Nishida i Suzaki, 2018b), może być zatem maskowany przez ten w korze pierwotnej, co nie może mieć miejsca u *MtABCG40*.

Zaproponowany model negatywnej regulacji powstawania brodawki korzeniowej przez *MtABCG40* na etapie inicjacji (rycina 5.2) ma swoje odzwierciedlenie także w dostępnych danych transkryptomicznych. Analizy przeprowadzone przez Schiessl i wsp. (2019) wskazały na spadek poziomu ekspresji kodującego go genu towarzyszący pierwszym podziałom komórkowym tworzącego się primordium (załącznik 7B). Świadczyć to może o konieczności obniżenia hamującego wpływu cytokinin na ten etap organogenezy brodawki poprzez zredukowanie ilości transporterów tego hormonu. Jednocześnie we wspomnianych danych widoczny był wzrost ekspresji markerów reakcji komórek na auksyny, które promują cały proces. Analiza jednego z nich, genu kodującego czynnik transkrypcyjny *MtLBD16* (Goh i wsp., 2012), w korzeniach roślin *mtabcg40*, wykazała wzrost jego ekspresji względem korzeni typu dzikiego (rycina 4.22). Jest to dowód na częściowe zniesienie negatywnego wpływu cytokinin na aktywność auksyn u badanych mutantów. W konsekwencji doszło do zwiększenia liczby komórek w primordiach formujących się brodawek roślin *mtabcg40* (rycina 4.23), co wywołane było u nich prawdopodobnie szybszym rozpoczęciem etapu inicjacji względem roślin kontrolnych. Podobieństwo zmian poziomu ekspresji *MtLBD16* i tempa podziałów komórkowych zachodzące u mutantów *mtabcg40* względem dzikich typów podczas brodawkowania oraz tworzenia korzeni bocznych świadczyć może ponadto o ewolucyjnym pokrewieństwie mechanizmów negatywnej regulacji obu tych procesów (Battenberg i Hayashi, 2022).

Ze względu na stosunkowo wysokie koszty brodawkowania, reakcją roślin towarzyszącą temu procesowi jest uruchamianie mechanizmów negatywnie regulujących jego intensywność. Jednym z nich jest autoregulacja brodawkowania (AON). Rozpoczyna się ona od produkcji cytokinin, będących pochodnymi iP, w częściach nadziemnych pod wpływem infekcji bakterii symbiotycznych w korzeniu. Cytokininy te transportowane są następnie elementami floemu do korzenia, by obniżyć liczbę powstających brodawek korzeniowych poprzez hamowanie inicjacji ich organogenezy. Genami indukowanymi przez cytokininy z części nadziemnych w korzeniu są *MtTML1* i *MtTML2* (Wang i wsp., 2018). Jego ekspresja, znamionująca uruchomienie AON, zaczyna wzrastać po kilku dniach od infekcji (Gautrat i wsp., 2019) (rycina 4.24D). Czas jest zatem elementem pozwalającym rozróżnić wczesne i lokalne mechanizmy autoregulacyjne od tych systemicznych, gdyż np. blokada tworzenia brodawki rozpoczyna się już w ciągu kilku godzin traktowania azotem o wysokim stężeniu (Barbulova i wsp., 2007).

Indukcja ekspresji *MtABCG40* po 24 h od podania *S. meliloti* bezpośrednio na korzeń *M. truncatula* (ryciny 4.20 i 4.24B) sugerowała zatem lokalny charakter działania badanego transportera. Stwierdzone występowanie cząsteczek biorących udział w obu mechanizmach, tak jak np. białka CLE (Mortier i wsp., 2010), oraz ekspresja *MtABCG40* w komórkach parenchymy otaczających elementy ksylemu, ale również floemu (rycina 4.12A), nie wykluczały jednak udziału *MtABCG40* w transporcie systemicznych cytokinin. Niemniej zaprzeczyła temu analiza ekspresji *MtABCG40* pod wpływem systemicznych sygnałów brodawkowania z użyciem roślin z rozdzielonym systemem korzeniowym (rycina 4.24C). Zależność *MtABCG40* od systemicznych sygnałów wyklucza też ich dowiedziona aktywacja wywołana, obok bakterii symbiotycznych, także suplementacją azotu (Lebedeva i wsp., 2020), podczas gdy ekspresja *MtABCG40* zachodzi przy jego niedoborze (rycina 4.2).

6. WNIOSKI

Analiza otrzymanych wyników pozwoliła na sformułowanie następujących wniosków końcowych:

- MtABCG40 jest białkiem błony komórkowej, transportującym aktywne formy cytokinin.
- *MtABCG40* ulega ekspresji w merystemie wierzchołkowym (RAM) i wiązce przewodzącej korzenia oraz w rozwijającym się korzeniu bocznym i brodawce korzeniowej.
- Ekspresja *MtABCG40* w korzeniu jest najwyższa w warunkach niedoboru azotu w podłożu, podobnie jak genów kodujących enzymy Lonely Guy (LOG), przekształcających cytokininy do ich aktywnych form.
- Aktywność MtABCG40 wpływa negatywnie na gęstość korzeni bocznych *M. truncatula* poprzez wydłużanie korzenia głównego oraz obniżanie liczby korzeni bocznych.
- Akumulacja aktywnych form cytokinin, produkowanych przez czapczkę korzenia, w apoplacie RAM mutantów *mtabcg40* wpływa hamująco na rozmiar wierzchołka wzrostu korzenia i wydłużanie korzenia głównego. Przejawem zaburzeń zachodzących w RAM tych roślin są zmiany w homeostazie oraz odpowiedzi komórek na auksyny i cytokininy.
- Import cytokinin z udziałem MtABCG40 z apoplastu naczyń ksylemu do otaczających go komórek parenchymy jest jednym z elementów translokacji tego hormonu na zewnątrz wiązki przewodzącej, gdzie hamuje on zależne od auksyn inicjalne etapy powstawania korzeni bocznych i brodawek korzeniowych.
- Pomimo indukcji pod wpływem bakterii symiotycznych i czynnika Nod, ekspresja *MtABCG40* nie jest zależna od systemicznych sygnałów autoregulacji brodawkowania (AON) i ma wyłącznie lokalny, korzeniowy charakter.

7. LITERATURA

- Aloni, R. (2013). Role of hormones in controlling vascular differentiation and the mechanism of lateral root initiation. *Planta*, 238(5), 819–830. <https://doi.org/10.1007/S00425-013-1927-8>
- Aloni, R., Langhans, M., Aloni, E., Dreieicher, E., Ullrich, C. I. (2005). Root-synthesized cytokinin in *Arabidopsis* is distributed in the shoot by the transpiration stream. *Journal of Experimental Botany*, 56(416), 1535–1544. <https://doi.org/10.1093/jxb/eri148>
- Antoniadi, I., Novák, O., Gelová, Z., Johnson, A., Plíhal, O., Simerský, R., Mik, V., Vain, T., Mateo-Bonmatí, E., Karady, M., Pernisová, M., Plačková, L., Opassathian, K., Hejátko, J., Robert, S., Friml, J., Doležal, K., Ljung, K., Turnbull, C. (2020). Cell-surface receptors enable perception of extracellular cytokinins. *Nature Communications*, 11(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17700-9>
- Argyros, R. D., Mathews, D. E., Chiang, Y. H., Palmer, C. M., Thibault, D. M., Etheridge, N., Argyros, D. A., Mason, M. G., Kieber, J. J., Schaller, G. E. (2008). Type B response regulators of *Arabidopsis* play key roles in cytokinin signaling and plant development. *Plant Cell*, 20(8), 2102–2116. <https://doi.org/10.1105/tpc.108.059584>
- Ariel, F., Diet, A., Verdenaud, M., Gruber, V., Frugier, F., Chan, R., Crespi, M. (2010). Environmental regulation of lateral root emergence in *Medicago truncatula* requires the HD-zip 1 transcription factor HB1. *Plant Cell*, 22(7), 2171–2183. <https://doi.org/10.1105/tpc.110.074823>
- Banasiak, J., Borghi, L., Stec, N., Martinoia, E., Jasiński, M. (2020). The Full-Size ABCG Transporter of *Medicago truncatula* Is Involved in Strigolactone Secretion, Affecting Arbuscular Mycorrhiza. *Frontiers in Plant Science*, 11, 18. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00018>
- Banasiak, J., Jasiński, M. (2022). ATP-binding cassette transporters in nonmodel plants. *New Phytologist*, 233, 1597–1612. <https://doi.org/10.1111/nph.17779>
- Barbez, E., Dunser, K., Gaidora, A., Lendl, T., Busch, W. (2017). Auxin steers root cell expansion via apoplastic pH regulation in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114, E4884–E4893. <https://doi.org/10.5061/dryad.sq7s3>
- Barbulova, A., Rogato, A., D'Apuzzo, E., Omrane, S., Chiurazzi, M. (2007). Differential Effects of Combined N Sources on Early Steps of the Nod Factor–Dependent Transduction Pathway in *Lotus japonicus*. *Molecular Plant Microbe Interactions*, 20, 994–1003. <https://doi.org/10.1094/MPMI-20-8-0994>
- Barnett, M. J., Toman, C. J., Fisher, R. F., Long, S. R. (2004). A dual-genome Symbiosis Chip for coordinate study of signal exchange and development in a prokaryote-host interaction. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101, 16636–16641. www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0407269101
- Battenberg, K., Hayashi, M. (2022). Evolution of root nodule symbiosis: Focusing on the transcriptional regulation from the genomic point of view. *Plant Biotechnology*, 39(1), 79. <https://doi.org/10.5511/PLANTBIOTECHNOLOGY.22.0127A>
- Bederska-Błaszczuk, M., Sujkowska-Rybkowska, M., Borucki, W. (2021). *Sinorhizobium medicae* 419 vs *S. meliloti* 1021: differences in root nodules induced by these two strains on the *Medicago truncatula* host. *Acta Physiologiae Plantarum*, 43(1), 1–18. <https://doi.org/10.1007/S11738-020-03166-1/METRICS>

- Benková, E., Michniewicz, M., Sauer, M., Teichmann, T., Seifertová, D., Jürgens, G., Friml, J. (2003). Local, Efflux-Dependent Auxin Gradients as a Common Module for Plant Organ Formation. *Cell*, 115(5), 591–602. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00924-3](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00924-3)
- Bensmihen, S. (2015). Hormonal control of lateral root and nodule development in legumes. *Plants*, 4, 523–547. <https://doi.org/10.3390/plants4030523>
- Bertani, G. (2004). Lysogeny at Mid-Twentieth Century: P1, P2, and Other Experimental Systems. *Journal of Bacteriology*, 186(3), 595–600. <https://doi.org/10.1128/JB.186.3.595-600.2004>
- Bevan, M., Walsh, S. (2004). Positioning Arabidopsis in plant biology. A key step toward unification of plant research. *Plant Physiology*, 35(2), 602–606. <https://doi.org/10.1104/pp.104.043216>
- Bhuvaneshwari, T., Turgeon, B. G., Bauer, W. D. (1980). Early Events in the Infection of Soybean (*Glycine max* L. Merr) by *Rhizobium japonicum* I. Localization of Infectible Root Cells. *Plant Physiology*, 66(6), 1027–1031. <https://doi.org/10.1104/PP.66.6.1027>
- Bielach, A., Podlešáková, K., Marhavý, P., Duclercq, J., Cuesta, C., Müller, B., Grunewald, W., Tarkowski, P., Benková, E. (2012). Spatiotemporal regulation of lateral root organogenesis in Arabidopsis by cytokinin. *Plant Cell*, 24(10), 3967–3981. <https://doi.org/10.1105/tpc.112.103044>
- Boisson-Dernier, A., Chabaud, M., Garcia, F., Bécard, G., Rosenberg, C., Barker, D. G. (2007). *Agrobacterium rhizogenes*-Transformed Roots of *Medicago truncatula* for the Study of Nitrogen-Fixing and Endomycorrhizal Symbiotic Associations. *Molecular Plant Microbe Interactions*, 14, 695–700. <https://doi.org/10.1094/MPMI.2001.14.6.695>
- Boivin, S., Kazmierczak, T., Brault, M., Wen, J., Gamas, P., Mysore, K. S., Frugier, F. (2016). Different cytokinin histidine kinase receptors regulate nodule initiation as well as later nodule developmental stages in *Medicago truncatula*. *Plant, Cell & Environment*, 39(10), 2198–2209. <https://doi.org/10.1111/PCE.12779>
- Borghi, L., Kang, J., Ko, D., Lee, Y., Martinoia, E. (2015). The role of ABCG-type ABC transporters in phytohormone transport. *Biochemical Society Transactions*, 43, 924–930. <https://doi.org/10.1042/BST20150106>
- Bourion, V., Martin, C., de Larambergue, H., Jacquin, F., Aubert, G., Martin-Magniette, M. L., Balzergue, S., Lescure, G., Citerne, S., Lepetit, M., Munier-Jolain, N., Salon, C., Duc, G. (2014). Unexpectedly low nitrogen acquisition and absence of root architecture adaptation to nitrate supply in a *Medicago truncatula* highly branched root mutant. *Journal of Experimental Botany*, 65(9), 2365–2380. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru124>
- Brady, S. M., Sarkar, S. F., Bonetta, D., McCourt, P. (2003). The ABSCISIC ACID INSENSITIVE 3 (ABI3) gene is modulated by farnesylation and is involved in auxin signaling and lateral root development in Arabidopsis. *Plant Journal*, 34(1), 67–75. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2003.01707.x>
- Brukhin, V., Morozova, N. (2011). Plant growth and development - Basic knowledge and current views. *Mathematical Modelling of Natural Phenomena*, 6(2), 1–53. <https://doi.org/10.1051/mmnp/20116201>
- Brumos, J., Robles, L. M., Yun, J., Vu, T. C., Jackson, S., Alonso, J. M., Stepanova, A. N. (2018). Local Auxin Biosynthesis Is a Key Regulator of Plant Development. *Developmental Cell*, 47(3), 306–318. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2018.09.022>
- Brunner, I., Herzog, C., Dawes, M. A., Arend, M., Sperisen, C. (2015). How tree roots respond to drought. *Frontiers in Plant Science*, 6. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00547>

- Brzobohaty, B., Moore, L., Kristoffersen, P., Bako, L., Campos, N., Schell, J., Palmet, K. (1993). Release of Active Cytokinin by a 13-Glucosidase Localized to the Maize Root Meristem. *Science*, 262, 1051–1054. <https://doi.org/10.1126/science.8235622>
- Buhian, W. P., Bensmihen, S. (2018). Mini-review: nod factor regulation of phytohormone signaling and homeostasis during rhizobia-legume symbiosis. *Frontiers in Plant Science*, 9, 1247. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01247>
- Caesar, K., Thamm, A. M. K., Witthöft, J., Elgass, K., Huppenberger, P., Grefen, C., Horak, J., Harter, K. (2011). Evidence for the localization of the Arabidopsis cytokinin receptors AHK3 and AHK4 in the endoplasmic reticulum. *Journal of Experimental Botany*, 62(15), 5571–5580. <https://doi.org/10.1093/jxb/err238>
- Caplin, S. M., Steward, F. C. (1948). Effect of coconut milk on the growth of explants from carrot root. *Science*, 108(2815), 655–657. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.108.2815.655/ASSET/C14834FE-E3E0-4431-9F72-B96A174CA6B1/ASSETS/SCIENCE.108.2815.655.FP.PNG>
- Carrera-Castaño, G., Calleja-Cabrera, J., Pernas, M., Gómez, L., Oñate-Sánchez, L. (2020). An updated overview on the regulation of seed germination. *Plants*, 9(6), 1–42. <https://doi.org/10.3390/plants9060703>
- Carrere, S., Verdier, J., Gamas, P. (2021). MtExpress, a Comprehensive and Curated RNAseq-based Gene Expression Atlas for the Model Legume *Medicago truncatula*. *Plant and Cell Physiology*, 62(9), 1494–1500. <https://doi.org/10.1093/PCP/PCAB110>
- Chang, L., Ramireddy, E., Schmülling, T. (2013). Lateral root formation and growth of Arabidopsis is redundantly regulated by cytokinin metabolism and signalling genes. *Journal of Experimental Botany*, 64(16), 5021–5032. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert291>
- Chang, L., Ramireddy, E., Schmülling, T. (2015). Cytokinin as a positional cue regulating lateral root spacing in Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany*, 66(15), 4759–4768. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv252>
- Chang, W., Chen, H., Jiao, G., Dou, Y., Liu, L., Qu, C., Li, J., Lu, K. (2022). Biomolecular Strategies for Vascular Bundle Development to Improve Crop Yield. *Biomolecules*, 12(12), 1772. <https://doi.org/10.3390/BIOM12121772>
- Chen, C.-M., Kristopeit, S. M. (1981). Metabolism of Cytokinin: Dephosphorylation of Cytokinin Ribonucleotide by 5'-Nucleotidases from Wheat Germ Cytosol. *Plant Physiology*, 67(3), 494–498. <https://doi.org/10.1104/PP.67.3.494>
- Clarke, V. C., Loughlin, P. C., Day, D. A., Smith, P. M. C. (2014). Transport processes of the legume symbiosome membrane. *Frontiers in Plant Science*, 5, 699. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00699>
- Colombi, T., Torres, L. C., Walter, A., Keller, T. (2018). Feedbacks between soil penetration resistance, root architecture and water uptake limit water accessibility and crop growth – A vicious circle. *Science of the Total Environment*, 626, 1026–1035. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.01.129>
- Comas, L. H., Becker, S. R., Cruz, V. M. v., Byrne, P. F., Dierig, D. A. (2013). Root traits contributing to plant productivity under drought. *Frontiers in Plant Science*, 4, 442. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00442>

- Cooper, J. E. (2007). Early interactions between legumes and rhizobia: Disclosing complexity in a molecular dialogue. *Journal of Applied Microbiology*, *103*(5), 1355–1365. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03366.x>
- Corbesier, L., Prinsen, E., Jacqumard, A., Lejeune, P., van Onckelen, H., Périlleux, C., Bernier, G. (2003). Cytokinin levels in leaves, leaf exudate and shoot apical meristem of *Arabidopsis thaliana* during floral transition. *Journal of Experimental Botany*, *54*(392), 2511–2517. <https://doi.org/10.1093/jxb/erg276>
- Cornelius, S., Traub, M., Bernard, C., Salzig, C., Lang, P., Möhlmann, T. (2012). Nucleoside transport across the plasma membrane mediated by equilibrative nucleoside transporter 3 influences metabolism of *Arabidopsis* seedlings. *Plant Biology*, *14*(5), 696–705. <https://doi.org/10.1111/j.1438-8677.2012.00562.x>
- Curtis, M. D., Grossniklaus, U. (2003). A Gateway Cloning Vector Set for High-Throughput Functional Analysis of Genes in Plants. *Plant Physiology*, *133*(2), 462. <https://doi.org/10.1104/PP.103.027979>
- de Rybel, B. D., van den Berg, W., Lokerse, A., Liao, C. Y., van Mourik, H., Möller, B., Peris, C. L., Weijers, D. (2011). A Versatile Set of Ligation-Independent Cloning Vectors for Functional Studies in Plants. *Plant Physiology*, *156*(3), 1292–1299. <https://doi.org/10.1104/PP.111.177337>
- de Smet, I., Tetsumura, T., de Rybel, B., dit Frey, N. F., Laplaze, L., Casimiro, I., Swarup, R., Naudts, M., Vanneste, S., Audenaert, D., Inzé, D., Bennett, M. J., Beeckman, T. (2007). Auxin-dependent regulation of lateral root positioning in the basal meristem of *Arabidopsis*. *Development*, *134*(4), 681–690. <https://doi.org/10.1242/dev.02753>
- de Smet, I., Vanneste, S., Inzé, D., Beeckman, T. (2006). Lateral Root Initiation or the Birth of a New Meristem. *Plant Molecular Biology*, *60*(6), 871–887. <https://doi.org/10.1007/S11103-005-4547-2>
- Deak, K. I., Malamy, J. (2005). Osmotic regulation of root system architecture. *Plant Journal*, *43*(1), 17–28. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2005.02425.x>
- Dello Ioio, R., Linhares, F. S., Scacchi, E., Casamitjana-Martinez, E., Heidstra, R., Costantino, P., Sabatini, S. (2007). Cytokinins Determine *Arabidopsis* Root-Meristem Size by Controlling Cell Differentiation. *Current Biology*, *17*(8), 678–682. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2007.02.047>
- Di Mambro, R., de Ruvo, M., Pacifici, E., Salvi, E., Sozzani, R., Benfey, P. N., Busch, W., Novak, O., Ljung, K., di Paola, L., Marée, A. F. M., Costantino, P., Grieneisen, V. A., Sabatini, S. (2017). Auxin minimum triggers the developmental switch from cell division to cell differentiation in the *Arabidopsis* root. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *114*(36), E7641–E7649. <https://doi.org/10.1073/pnas.1705833114>
- Di Mambro, R., Svolacchia, N., Dello Ioio, R., Pierdonati, E., Salvi, E., Pedrazzini, E., Vitale, A., Perilli, S., Sozzani, R., Benfey, P. N., Busch, W., Costantino, P., Sabatini, S. (2019). The Lateral Root Cap Acts as an Auxin Sink that Controls Meristem Size. *Current Biology*, *29*(7), 1199–1205. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2019.02.022>
- Díaz, C. L., Schlaman, H. R., Spink, H. P. (2005). Chapter 3.1 Concurrent Visualization of GusA and LacZ Reporter Gene Expression. *The Arabidopsis Book*, 99–109.
- Do, T. H. T., Martinoia, E., Lee, Y., Hwang, J. U. (2021). 2021 update on ATP-binding cassette (ABC) transporters: How they meet the needs of plants. *Plant Physiology*, *187*(4), 1876–1892. <https://doi.org/10.1093/plphys/kiab193>

- Dong, H., Ma, X., Zhang, P., Wang, H., Li, X., Liu, J., Bai, L., Song, C. peng. (2020). Characterization of Arabidopsis thaliana Root-Related Mutants Reveals ABA Regulation of Plant Development and Drought Resistance. *Journal of Plant Growth Regulation*, 39(3), 1393–1401. <https://doi.org/10.1007/s00344-020-10076-6>
- Dortay, H., Mehnert, N., Bürkle, L., Schmülling, T., Heyl, A. (2006). Analysis of protein interactions within the cytokinin-signaling pathway of Arabidopsis thaliana. *FEBS Journal*, 273(20), 4631–4644. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2006.05467.x>
- dos Santos, T. B., Ribas, A. F., de Souza, S. G. H., Budzinski, I. G. F., Domingues, D. S. (2022). Physiological Responses to Drought, Salinity, and Heat Stress in Plants: A Review. *Stresses*, 2(1), 113–135. <https://doi.org/10.3390/stresses2010009>
- Du, Y., Scheres, B. (2018). Lateral root formation and the multiple roles of auxin. *Journal of Experimental Botany*, 69(2), 155–167. <https://doi.org/10.1093/JXB/ERX223>
- Dubrovsky, J. G., Sauer, M., Napsucially-Mendivil, S., Ivanchenko, M. G., Friml, J., Shishkova, S., Celenza, J., Benková, E. (2008). Auxin acts as a local morphogenetic trigger to specify lateral root founder cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 105, 8790-8794. www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0712307105
- Durán-Medina, Y., Díaz-Ramírez, D., Marsch-Martínez, N. (2017). Cytokinins on the move. *Frontiers in Plant Science*, 8. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00146>
- Edwards, K., Johnstone, C., Thompson, C. (1991). A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic Acids Research*, 19(6), 1349. <https://doi.org/10.1093/NAR/19.6.1349>
- Egan, A. N., Crandall, K. A. (2008). Divergence and diversification in North American Psoraleeae (Fabaceae) due to climate change. *BMC Biology*, 6. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-6-55>
- el-Showk, S., Help-Rinta-Rahko, H., Blomster, T., Siligato, R., Marée, A. F. M., Mähönen, A. P., Grieneisen, V. A. (2015). Parsimonious Model of Vascular Patterning Links Transverse Hormone Fluxes to Lateral Root Initiation: Auxin Leads the Way, while Cytokinin Levels Out. *PLoS Computational Biology*, 11(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1004450>
- Emenecker, R. J., Strader, L. C. (2020). Auxin-abscisic acid interactions in plant growth and development. *Biomolecules*, 10(2). <https://doi.org/10.3390/biom10020281>
- Esteban, R., Royo, B., Urarte, E., Zamarreño, Á. M., Garcia-Mina, J. M., Moran, J. F. (2016). Both free indole-3-acetic acid and photosynthetic performance are important players in the response of medicago truncatula to urea and ammonium nutrition under axenic conditions. *Frontiers in Plant Science*, 7. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00140>
- Fisher, R. F., Egelhoff, T. T., Mulligan, J. T., Long, S. R. (1988). Specific binding of proteins from Rhizobium meliloti cell-free extracts containing NodD to DNA sequences upstream of inducible nodulation genes. *Genes & Development*, 2(3), 282–293. <https://doi.org/10.1101/GAD.2.3.282>
- Francis, D. (2007). The plant cell cycle - 15 Years on. *New Phytologist*, 174(2), 261–27). <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.02038.x>
- Fukaki, H., Tasaka, M. (2009). Hormone interactions during lateral root formation. *Plant Molecular Biology*, 69(4), 437–449. <https://doi.org/10.1007/s11103-008-9417-2>
- Fukui, K., Hayashi, K. I. (2018). Manipulation and Sensing of Auxin Metabolism, Transport and Signaling. *Plant & Cell Physiology*, 59(8), 1500–1510. <https://doi.org/10.1093/PCP/PCY076>

- Gallagher, S.R. (1992) GUS Protocols: Using the GUS Gene as a Reporter of Gene Expression. San Diego, CA: Academic Press.
- Gautrat, P., Laffont, C., Frugier, F., Ruffel, S. (2021). Nitrogen Systemic Signaling: From Symbiotic Nodulation to Root Acquisition. *Trends in Plant Science*, 26(4), 392–406. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2020.11.009>
- Gautrat, P., Mortier, V., Laffont, C., de Keyser, A., Fromentin, J., Frugier, F., Goormachtig, S. (2019). Unraveling new molecular players involved in the autoregulation of nodulation in *Medicago truncatula*. *Journal of Experimental Botany*, 70(4), 1407. <https://doi.org/10.1093/JXB/ERY465>
- Genre, A., Russo, G. (2016). Does a Common Pathway Transduce Symbiotic Signals in Plant–Microbe Interactions? *Frontiers in Plant Science*, 7. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2016.00096>
- Gibberd, M. R., Gray, J. D., Cocks, P. S., Colmer, T. D. (2001). Waterlogging tolerance among a diverse range of *Trifolium* accessions is related to root porosity, lateral root formation and ‘aerotropic rooting’. *Annals of Botany*, 88(4), 579–589. <https://doi.org/10.1006/anbo.2001.1506>
- Giehl, R. F. H., Gruber, B. D., von Wirén, N. (2014). It’s time to make changes: Modulation of root system architecture by nutrient signals. *Journal of Experimental Botany*, 65(3), 769–778. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert421>
- Goh, T., Joi, S., Mimura, T., Fukaki, H. (2012). The establishment of asymmetry in *Arabidopsis* lateral root founder cells is regulated by LBD16/ASL18 and related LBD/ASL proteins. *Development*, 139(5), 883–893. <https://doi.org/10.1242/dev.071928>
- Gonzalez, A. A., Agbévénou, K., Herrbach, V., Gough, C., Bensmihen, S. (2015). Abscisic acid promotes pre-emergence stages of lateral root development in *Medicago truncatula*. *Plant Signaling and Behavior*, 10(1). <https://doi.org/10.4161/15592324.2014.977741>
- Gonzalez-Rizzo, S., Crespi, M., Frugier, F. (2006). The *Medicago truncatula* CRE1 cytokinin receptor regulates lateral root development and early symbiotic interaction with *Sinorhizobium meliloti*. *Plant Cell*, 18(10), 2680–2693. <https://doi.org/10.1105/tpc.106.043778>
- Goss, M. J., Miller, M. H., Bailey, L. D., Grant, C. A. (1993). Root growth and distribution in relation to nutrient availability and uptake. *European Journal of Agronomy*, 2(2), 57–67. [https://doi.org/10.1016/s1161-0301\(14\)80135-4](https://doi.org/10.1016/s1161-0301(14)80135-4)
- Goyal, R. K., Schmidt, M. A., Hynes, M. F. (2021). Molecular biology in the improvement of biological nitrogen fixation by rhizobia and extending the scope to cereals. *Microorganisms*, 9(1), 1–24. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9010125>
- Györgyey, J., Vaubert, D., Jiménez-Zurdo, J. I., Charon, C., Troussard, L., Kondorosi, Á., Kondorosi, É. (2000). Analysis of *Medicago truncatula* Nodule Expressed Sequence Tags. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 13(1), 62-71. <https://doi.org/10.1094/MPMI.2000.13.1.62>
- Hartung, W., Sauter, A., Hose, E. (2002). Abscisic acid in the xylem: where does it come from, where does it go to? Abscisic acid in the xylem: where does it come from, where does it go? *Journal of Experimental Botany*, 53, 27-32. <https://doi.org/10.1093/jexbot/53.366.27>
- Healey, A., Furtado, A., Cooper, T., Henry, R. J. (2014). Protocol: a simple method for extracting next-generation sequencing quality genomic DNA from recalcitrant plant species. *Plant Methods*, 10. <https://doi.org/10.1186/1746-4811-10-21>
- Henrichs, S., Wang, B., Fukao, Y., Zhu, J., Charrier, L., Lien Bailly, A., Oehring, S. C., Linnert, M., Weiwad, M., Endler, A., Nanni, P., Pollmann, S., Mancuso, S., Schulz, A., Geisler, M. (2012).

- Regulation of ABCB1/PGP1-catalysed auxin transport by linker phosphorylation. *The EMBO Journal*, 31, 2965–2980. <https://doi.org/10.1038/emboj.2012.120>
- Herder, G. den, van Isterdael, G., Beeckman, T., de Smet, I. (2010). The roots of a new green revolution. *Trends in Plant Science*, 15(11), 600–607. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2010.08.009>
- Herrbach, V., Remblière, C., Gough, C., Bensmihen, S. (2014). Lateral root formation and patterning in *Medicago truncatula*. *Journal of Plant Physiology*, 171(3–4), 301–310. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2013.09.006>
- Hluska, T., Hlusková, L., Emery, R. J. N. (2021). The hulks and the deadpools of the cytokinin universe: A dual strategy for cytokinin production, translocation, and signal transduction. *Biomolecules*, 11(2), 1–40. <https://doi.org/10.3390/biom11020209>
- Hodge, A. (2004). The plastic plant: Root responses to heterogeneous supplies of nutrients. *New Phytologist*, 162(1), 9–24. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2004.01015.x>
- Hošek, P., Hoyerová, K., Kiran, N. S., Dobrev, P. I., Zahajská, L., Filepová, R., Motyka, V., Müller, K., Kamínek, M. (2020). Distinct metabolism of N-glucosides of isopentenyladenine and trans-zeatin determines cytokinin metabolic spectrum in *Arabidopsis*. *New Phytologist*, 225(6), 2423–2438. <https://doi.org/10.1111/nph.16310>
- Hutchison, C. E., Li, J., Argueso, C., Gonzalez, M., Lee, E., Lewis, M. W., Maxwell, B. B., Perdue, T. D., Schaller, G. E., Alonso, J. M., Ecker, J. R., Kieber, J. J. (2006). The *Arabidopsis* histidine phosphotransfer proteins are redundant positive regulators of cytokinin signaling. *Plant Cell*, 18(11), 3073–3087. <https://doi.org/10.1105/tpc.106.045674>
- Hwang, J. U., Song, W. Y., Hong, D., Ko, D., Yamaoka, Y., Jang, S., Yim, S., Lee, E., Khare, D., Kim, K., Palmgren, M., Yoon, H. S., Martinoia, E., Lee, Y. (2016). Plant ABC Transporters Enable Many Unique Aspects of a Terrestrial Plant’s Lifestyle. *Molecular Plant*, 9(3), 338–355. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2016.02.003>
- Imamura, A., Hanaki, N., Nakamura, A., Suzuki, T., Taniguchi, M., Kiba, T., Ueguchi, C., Sugiyama, T., Mizuno, T. (1999). Compilation and Characterization of *Arabidopsis thaliana* Response Regulators Implicated in His-Asp Phosphorelay Signal Transduction. *Plant Cell Physiology*, 40(7), 733–742. <https://academic.oup.com/pcp/article/40/7/733/1825767>
- Inoue, T., Higuchi, M., Hashimoto, Y., Seki, M., Kobayashi, M., Kato, T., Tabata, S., Shinozaki, K., Kakimoto, T. (2001). Identification of CRE1 as a cytokinin receptor from *Arabidopsis*. *Nature*, 409(6823), 1060–1063. <https://doi.org/10.1038/35059117>
- Jardinaud, M. F., Boivin, S., Rodde, N., Catrice, O., Kisiala, A., Lepage, A., Moreau, S., Roux, B., Cottret, L., Sallet, E., Brault, M., Emery, R. J. N., Gouzy, J., Frugier, F., Gamas, P. (2016). A Laser Dissection-RNAseq Analysis Highlights the Activation of Cytokinin Pathways by Nod Factors in the *Medicago truncatula* Root Epidermis. *Plant Physiology*, 171(3), 2256–2276. <https://doi.org/10.1104/PP.16.00711>
- Jarzyniak, K., Banasiak, J., Jamruszka, T., Pawela, A., di Donato, M., Novák, O., Geisler, M., Jasiński, M. (2021). Early stages of legume–rhizobia symbiosis are controlled by ABCG-mediated transport of active cytokinins. *Nature Plants*, 7(4), 428–436. <https://doi.org/10.1038/s41477-021-00873-6>
- Jasińska, Z., Kotecki, A. (2003). Rośliny strączkowe. Szczegółowa uprawa roślin, J. Z., and K. A. (Wrocław: AR).

- Jasinski, M., Banasiak, J., Radom, M., Kalitkiewicz, A., Figlerowicz, M. (2009). Full-Size ABC Transporters from the ABCG Subfamily in *Medicago truncatula*. *Molecular Plant–Microbe Interactions*, 22, 921–931. <https://doi.org/10.1094/MPMI-22-8-0921>
- Jin, J., Watt, M., Mathesius, U. (2012). The Autoregulation Gene SUNN Mediates Changes in Root Organ Formation in Response to Nitrogen through Alteration of Shoot-to-Root Auxin Transport. *Plant Physiology*, 159(1), 489. <https://doi.org/10.1104/PP.112.194993>
- Jing, H., Strader, L. C. (2019). Interplay of auxin and cytokinin in lateral root development. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(3). <https://doi.org/10.3390/ijms20030486>
- Jones, B., Ljung, K., Gunnerås, S. A., Petersson, S., Tarkowski, P., Graham, N., May, S., Dolezal, K., Sandberg, G. (2010). Cytokinin regulation of auxin synthesis in *Arabidopsis* involves a homeostatic feedback loop regulated via auxin and cytokinin signal transduction. *Plant Cell*, 22(9), 2956–2969. <https://doi.org/10.1105/tpc.110.074856>
- Journet, E.-P., van Tuinen, D., Rome Gouzy, J. Â., Crespeau, H. Â., Ronique Carreau, V. Â., Farmer, M.-J., Niebel, A., Schiex, T., Jaillon, O., Chatagnier, O., Godiard, L., Micheli, F., Kahn, D., Gianinazzi-Pearson, V., Gamas, P. (2002). Exploring root symbiotic programs in the model legume *Medicago truncatula* using EST analysis. *Nucleic Acids Research*, 30(24), 5579–5592.
- Julkowska, M. M., Hoefsloot, H. C. J., Mol, S., Feron, R., de Boer, G. J., Haring, M. A., Testerink, C. (2014). Capturing *Arabidopsis* root architecture dynamics with root-fit reveals diversity in responses to salinity. *Plant Physiology*, 166(3), 1387–1402. <https://doi.org/10.1104/pp.114.248963>
- Kakar, K., Wandrey, M., Czechowski, T., Gaertner, T., Scheible, W. R., Stitt, M., Torres-Jerez, I., Xiao, Y., Redman, J. C., Wu, H. C., Cheung, F., Town, C. D., Udvardi, M. K. (2008). A community resource for high-throughput quantitative RT-PCR analysis of transcription factor gene expression in *Medicago truncatula*. *Plant Methods*, 4(1), 1–12. <https://doi.org/10.1186/1746-4811-4-18/TABLES/3>
- Takei, Y., Yamazaki, C., Suzuki, M., Nakamura, A., Sato, A., Ishida, Y., Kikuchi, R., Higashi, S., Kokudo, Y., Ishii, T., Soeno, K., Shimada, Y. (2015). Small-molecule auxin inhibitors that target YUCCA are powerful tools for studying auxin function. *The Plant Journal*, 84(4), 827–837. <https://doi.org/10.1111/TPJ.13032>
- Kakimoto, T. (2003). Perception and Signal Transduction of Cytokinins. *Annual Review of Plant Biology*, 54, 605–627. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.54.031902.134802>
- Kamada-Nobusada, T., Makita, N., Kojima, M., Sakakibara, H. (2013). Nitrogen-dependent regulation of de novo cytokinin biosynthesis in rice: the role of glutamine metabolism as an additional signal. *Plant Cell Physiology*, 54: 1881–1893. <https://doi.org/10.1093/pcp/pct127>
- Kang, J., Peng, Y., Xu, W. (2022). Crop Root Responses to Drought Stress: Molecular Mechanisms, Nutrient Regulations, and Interactions with Microorganisms in the Rhizosphere. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(16). <https://doi.org/10.3390/ijms23169310>
- Kant, S., Bi, Y. M., Rothstein, S. J. (2011). Understanding plant response to nitrogen limitation for the improvement of crop nitrogen use efficiency. *Journal of Experimental Botany*, 62(4), 1499–1509. <https://doi.org/10.1093/jxb/erq297>
- Karimi, M., Depicker, A., Hilson, P. (2007). Recombinational Cloning with Plant Gateway Vectors. *Plant Physiology*, 145(4), 1144. <https://doi.org/10.1104/PP.107.106989>

- Karimi, M., Inzé, D., Depicker, A. (2002). GATEWAY™ vectors for Agrobacterium-mediated plant transformation. *Trends in Plant Science*, 7(5), 193–195. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(02\)02251-3](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(02)02251-3)
- Karlova, R., Boer, D., Hayes, S., Testerink, C. (2021). Root plasticity under abiotic stress. *Plant Physiology*, 187(3), 1057–1070. <https://doi.org/10.1093/plphys/kiab392>
- Kasahara, H., Takei, K., Ueda, N., Hishiyama, S., Yamaya, T., Kamiya, Y., Yamaguchi, S., Sakakibara, H. (2004). Distinct Isoprenoid Origins of cis- and trans-Zeatin Biosyntheses in Arabidopsis. *Journal of Biological Chemistry*, 279(14), 14049–14054. <https://doi.org/10.1074/jbc.M314195200>
- Kenrick, P., Strullu-Derrien, C. (2014). Focus Issue on Roots: The Origin and Early Evolution of Roots. *Plant Physiology*, 166(2), 570. <https://doi.org/10.1104/PP.114.244517>
- Khan, M. A., Gemenet, D. C., Villordon, A. (2016). Root system architecture and abiotic stress tolerance: Current knowledge in root and tuber crops. *Frontiers in Plant Science*, 7. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01584>
- Kiba, T., Takei, K., Kojima, M., Sakakibara, H. (2013). Side-Chain Modification of Cytokinins Controls Shoot Growth in Arabidopsis. *Developmental Cell*, 27(4), 452–461. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2013.10.004>
- Kieber, J. J. (2002). Cytokinins. *The Arabidopsis Book*, 1. <https://doi.org/10.1199/tab.0063>
- Kieber, J. J., Schaller, G. E. (2014). Cytokinins. *The Arabidopsis Book*, 12. <https://doi.org/10.1199/tab.0168>
- Ko, D., Kang, J., Kiba, T., Park, J., Kojima, M., Do, J., Kim, K. Y., Kwon, M., Endler, A., Song, W. Y., Martinoia, E., Sakakibara, H., Lee, Y. (2014). Arabidopsis ABCG14 is essential for the root-to-shoot translocation of cytokinin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(19), 7150–7155. <https://doi.org/10.1073/pnas.1321519111>
- Koevoets, I. T., Venema, J. H., Elzenga, J. T. M., Testerink, C. (2016). Roots withstanding their environment: Exploiting root system architecture responses to abiotic stress to improve crop tolerance. *Frontiers in Plant Science*, 7. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01335>
- Korasick, D. A., Enders, T. A., Strader, L. C. (2013). Auxin biosynthesis and storage forms. *Journal of Experimental Botany*, 64(9), 2541. <https://doi.org/10.1093/JXB/ERT080>
- Korobova, A., Kuluev, B., Möhlmann, T., Veselov, D., Kudoyarova, G. (2021). Limitation of cytokinin export to the shoots by nucleoside transporter ENT3 and its linkage with root elongation in arabidopsis. *Cells*, 10(2), 1–12. <https://doi.org/10.3390/cells10020350>
- Krämer, U. (2015). Planting molecular functions in an ecological context with arabidopsis thaliana. *ELife*, 2015(4). <https://doi.org/10.7554/eLife.06100.001>
- Krukowski, P. K., Ellenberger, J., Röhlen-schmittgen, S., Schubert, A., Cardinale, F. (2020). Phenotyping in Arabidopsis and Crops—Are We Addressing the Same Traits? A Case Study in Tomato. *Genes*, 11(9), 1011. <https://doi.org/10.3390/GENES11091011>
- Kubiasová, K., Montesinos, J. C., Šamajová, O., Nisler, J., Mik, V., Semerádová, H., Plíhalová, L., Novák, O., Marhavý, P., Cavallari, N., Zalabák, D., Berka, K., Doležal, K., Galuszka, P., Šamaj, J., Strnad, M., Benková, E., Plíhal, O., Spíchal, L. (2020). Cytokinin fluoroprobe reveals multiple sites of cytokinin perception at plasma membrane and endoplasmic reticulum. *Nature Communications*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17949-0>

- Kudo, T., Kiba, T., Sakakibara, H. (2010). Metabolism and long-distance translocation of cytokinins. *Journal of Integrative Plant Biology*, 52(1), 53–60. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2010.00898.x>
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35(6), 1547. <https://doi.org/10.1093/MOLBEV/MSY096>
- Kurakawa, T., Ueda, N., Maekawa, M., Kobayashi, K., Kojima, M., Nagato, Y., Sakakibara, H., Kyoizuka, J. (2007). Direct control of shoot meristem activity by a cytokinin-activating enzyme. *Nature*, 445(7128), 652–655. <https://doi.org/10.1038/nature05504>
- Kuroha, T., Tokunaga, H., Kojima, M., Ueda, N., Ishida, T., Nagawa, S., Fukuda, H., Sugimoto, K., Sakakibara, H. (2009). Functional analyses of LONELY GUY cytokinin-activating enzymes reveal the importance of the direct activation pathway in Arabidopsis. *Plant Cell*, 21(10), 3152–3169. <https://doi.org/10.1105/tpc.109.068676>
- Kuromori, T., Miyaji, T., Yabuuchi, H., Shimizu, H., Sugimoto, E., Kamiya, A., Moriyama, Y., Shinozaki, K. (2010). ABC transporter AtABCG25 is involved in abscisic acid transport and responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(5), 2361. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0912516107>
- Laffont, C., Rey, T., André, O., Novero, M., Kazmierczak, T., Debellé, F., Bonfante, P., Jacquet, C., Frugier, F. (2015). The CRE1 Cytokinin Pathway Is Differentially Recruited Depending on Medicago truncatula Root Environments and Negatively Regulates Resistance to a Pathogen. *PLoS ONE*, 10(1). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0116819>
- Lagunas, B., Achom, M., Bonyadi-Pour, R., Pardal, A. J., Richmond, B. L., Sergaki, C., Vázquez, S., Schäfer, P., Ott, S., Hammond, J., Gifford, M. L. (2019). Regulation of Resource Partitioning Coordinates Nitrogen and Rhizobia Responses and Autoregulation of Nodulation in Medicago truncatula. *Molecular Plant*, 12(6), 833–846. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2019.03.014>
- Lamaoui, M., Jemo, M., Datla, R., Bekkaoui, F. (2018). Heat and drought stresses in crops and approaches for their mitigation. *Frontiers in Chemistry*, 6. <https://doi.org/10.3389/fchem.2018.00026>
- Laplaze, L., Benkova, E., Casimiro, I., Maes, L., Vanneste, S., Swarup, R., Weijers, D., Calvo, V., Parizot, B., Herrera-Rodriguez, M. B., Offringa, R., Graham, N., Dumas, P., Friml, J., Bogusz, D., Beeckman, T., Bennett, M. (2007). Cytokinins act directly on lateral root founder cells to inhibit root initiation. *Plant Cell*, 19(12), 3889–3900. <https://doi.org/10.1105/tpc.107.055863>
- Laskowski, M., Grieneisen, V. A., Hofhuis, H., ten Hove, C. A., Hogeweg, P., Marée, A. F. M., Scheres, B. (2008). Root system architecture from coupling cell shape to auxin transport. *PLoS Biology*, 6(12), 2721–2735. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0060307>
- Laskowski, M., ten Tusscher, K. H. (2017). Periodic lateral root priming: What makes it tick? *Plant Cell*, 29(3), 432–444. <https://doi.org/10.1105/tpc.16.00638>
- Lebedeva, M., Azarakhsh, M., Yashenkova, Y., Lutova, L. (2020). Nitrate-induced cle peptide systemically inhibits nodulation in medicago truncatula. *Plants*, 9(11), 1–12. <https://doi.org/10.3390/plants9111456>
- Letham, D. S. (1973). Cytokinins from Zea mays". *Phytochemistry*, 12. Pergamon Press. Printed in England.

- Li, C., Liu, G., Geng, X., He, C., Quan, T., Hayashi, K. I., de Smet, I., Robert, H. S., Ding, Z., Yang, Z. B. (2021). Local regulation of auxin transport in root-apex transition zone mediates aluminium-induced Arabidopsis root-growth inhibition. *Plant Journal*, *108*(1), 55–66. <https://doi.org/10.1111/tpj.15424>
- Li, X., Mo, X., Shou, H., Wu, P. (2006). Cytokinin-mediated cell cycling arrest of pericycle founder cells in lateral root initiation of Arabidopsis. *Plant and Cell Physiology*, *47*(8), 1112–1123. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcj082>
- Liang, Y., Harris, J. M. (2005). Response of root branching to abscisic acid is correlated with nodule formation both in legumes and nonlegumes. *American Journal of Botany*, *92*(10), 1675–1683. <https://doi.org/10.3732/ajb.92.10.1675>
- 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*. *Journal of Experimental Botany*, *55*(399), 983–992. <https://doi.org/10.1093/jxb/erh122>
- Lin, J., Roswanjaya, Y. P., Kohlen, W., Stougaard, J., Reid, D. (2021). Nitrate restricts nodule organogenesis through inhibition of cytokinin biosynthesis in *Lotus japonicus*. *Nature Communications*, *12*(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-021-26820-9>
- Lloret, P. G., Casero, P. J., Navascues, J., Pulgarin, A. (1988). The effects of removal of the root tip on lateral root distribution in adventitious roots of anion. *New Phytologist*, *110*(2), 143–149. <https://doi.org/10.1111/J.1469-8137.1988.TB00247.X>
- Lomin, S. N., Krivosheev, D. M., Steklov, M. Y., Arkhipov, D. v., Osolodkin, D. I., Schmülling, T., Romanov, G. A. (2015). Plant membrane assays with cytokinin receptors underpin the unique role of free cytokinin bases as biologically active ligands. *Journal of Experimental Botany*, *66*(7), 1851–1863. <https://doi.org/10.1093/jxb/eru522>
- Lynch, J. P., Brown, K. M. (2012). New roots for agriculture: Exploiting the root phenome. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *367*(1595), 1598–1604. <https://doi.org/10.1098/rstb.2011.0243>
- Magori, S., Oka-Kira, E., Shibata, S., Umehara, Y., Kouchi, H., Hase, Y., Tanaka, A., Sato, S., Tabata, S., Kawaguchi, M. (2009). TOO MUCH LOVE, a Root Regulator Associated with the Long-Distance Control of Nodulation in *Lotus japonicus*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, *22*, 259–268. <https://doi.org/10.1094/MPMI-22-3-0259>
- Malamy, J. E., Benfey, P. N. (1997). Organization and cell differentiation in lateral roots of *Arabidopsis thaliana*. *Development*, *124*(1), 33–44. <https://doi.org/10.1242/DEV.124.1.33>
- Marchant, A., Bhalerao, R., Casimiro, I., Eklöf, J., Casero, P. J., Bennett, M., Sandberg, G. (2002). AUX1 promotes lateral root formation by facilitating indole-3-acetic acid distribution between sink and source tissues in the Arabidopsis seedling. *Plant Cell*, *14*(3), 589–597. <https://doi.org/10.1105/tpc.010354>
- Marhavý, P., Bielach, A., Abas, L., Abuzeineh, A., Duclercq, J., Tanaka, H., Pařezová, M., Petrášek, J., Friml, J., Kleine-Vehn, J., Benková, E. (2011). Cytokinin modulates endocytic trafficking of PIN1 auxin efflux carrier to control plant organogenesis. *Developmental Cell*, *21*(4), 796–804. <https://doi.org/10.1016/J.DEVCEL.2011.08.014>
- Miller, C. O., Skoog, F., Shigeo Okumura, F., von Saltza, M. H., Strong, F. M. (1955a). Structure and Synthesis of Kinetin. *Journal of the American Chemical Society*, *77*(9), 2662–2663. https://doi.org/10.1021/JA01614A108/ASSET/JA01614A108.FP.PNG_V03

- Miller, C. O., Skoog, F., von Saltza, M. H., Strong, F. M. (1955b). Kinetin, a Cell Division Factor from Deoxyribonucleic Acid. *Journal of the American Chemical Society*, 77(5), 1392. https://doi.org/10.1021/JA01610A105/ASSET/JA01610A105.FP.PNG_V03
- Miri, M., Janakirama, P., Huebert, T., Ross, L., McDowell, T., Orosz, K., Markmann, K., Szczyglowski, K. (2019). Inside out: root cortex-localized LHK1 cytokinin receptor limits epidermal infection of *Lotus japonicus* roots by *Mesorhizobium loti*. *New Phytologist*, 222(3), 1523–1537. <https://doi.org/10.1111/nph.15683>
- Miyawaki, K., Matsumoto-Kitano, M., Kakimoto, T. (2004). Expression of cytokinin biosynthetic isopentenyltransferase genes in *Arabidopsis*: Tissue specificity and regulation by auxin, cytokinin, and nitrate. *Plant Journal*, 37(1), 128–138. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2003.01945.x>
- Miyawaki, K., Tarkowski, P., Matsumoto-Kitano, M., Kato, T., Sato, S., Tarkowska, D., Tabata, S., ran Sandberg, G., Kakimoto, T. (2006). Roles of *Arabidopsis* ATPADP isopentenyltransferases and tRNA isopentenyltransferases in cytokinin biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States*, 103(44). <https://doi.org/10.1073/pnas.0603522103>
- Molares, S., Ladio, A. (2012). The usefulness of edible and medicinal Fabaceae in argentine and Chilean Patagonia: Environmental availability and other sources of supply. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/901918>
- Moll, K. M., Zhou, P., Ramaraj, T., Fajardo, D., Devitt, N. P., Sadowsky, M. J., Stupar, R. M., Tiffin, P., Miller, J. R., Young, N. D., Silverstein, K. A. T., Mudge, J. (2017). Strategies for optimizing BioNano and Dovetail explored through a second reference quality assembly for the legume model, *Medicago truncatula*. *BMC Genomics*, 18(1), 1–16. <https://doi.org/10.1186/S12864-017-3971-4/FIGURES/3>
- Moreno-Risueno, M. A., van Norman, J. M., Moreno, A., Zhang, J., Ahnert, S. E., Benfey, P. N. (2010). Oscillating gene expression determines competence for periodic *Arabidopsis* root branching. *Science*, 329(5997), 1306–1311. <https://doi.org/10.1126/science.1191937>
- Mortier, V., den Herder, G., Whitford, R., van de Velde, W., Rombauts, S., D’haeseleer, K., Holsters, M., Goormachtig, S. (2010). CLE Peptides Control *Medicago truncatula* Nodulation Locally and Systemically. *Plant Physiology*, 153(1), 222. <https://doi.org/10.1104/PP.110.153718>
- Mortier, V., Wasson, A., Jaworek, P., de Keyser, A., Decroos, M., Holsters, M., Tarkowski, P., Mathesius, U., Goormachtig, S. (2014). Role of LONELY GUY genes in indeterminate nodulation on *Medicago truncatula*. *New Phytologist*, 202(2), 582–593. <https://doi.org/10.1111/NPH.12681>
- Mroue, S., Simeunovic, A., Robert, H. S. (2018). Auxin production as an integrator of environmental cues for developmental growth regulation. *Journal of Experimental Botany*, 69(2), 201–212. <https://doi.org/10.1093/jxb/erx259>
- Ng, J. L. P., Hassan, S., Truong, T. T., Hocart, C. H., Laffont, C., Frugier, F., Mathesius, U. (2015). Flavonoids and auxin transport inhibitors rescue symbiotic nodulation in the *Medicago truncatula* cytokinin perception mutant cre1. *Plant Cell*, 27(8), 2210–2226. <https://doi.org/10.1105/tpc.15.00231>
- Nishida, H., Suzaki, T. (2018a). Nitrate-mediated control of root nodule symbiosis. *Current Opinion in Plant Biology*, 44, 129–136. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2018.04.006>

- Nishida, H., Suzaki, T. (2018b). Two Negative Regulatory Systems of Root Nodule Symbiosis: How Are Symbiotic Benefits and Costs Balanced? *Plant and Cell Physiology*, 59(9), 1733–1738. <https://doi.org/10.1093/PCP/PCY102>
- Nishimura, C., Ohashi, Y., Sato, S., Kato, T., Tabata, S., Ueguchi, C. (2004). Histidine kinase homologs that act as cytokinin receptors possess overlapping functions in the regulation of shoot and root growth in arabidopsis. *Plant Cell*, 16(6), 1365–1377. <https://doi.org/10.1105/tpc.021477>
- Norenburg, J. L., Barrett, J. M. (1987). Steedman's polyester wax embedment and de-embedment for combined light and scanning electron microscopy. *Journal of Electron Microscopy Technique*, 6(1), 35–41. <https://doi.org/10.1002/JEMT.1060060106>
- Nutman, P.S. (1951). Studies on the physiology of nodule formation. III. Experiments on the excision of root tips and nodules. *Annals of Botany*, 16, 79-101.
- Okamoto, S., Ohnishi, E., Sato, S., Takahashi, H., Nakazono, M., Tabata, S., Kawaguchi, M. (2009). Nod factor/nitrate-induced CLE genes that drive HAR1-mediated systemic regulation of nodulation. *Plant and Cell Physiology*, 50(1), 67–77. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcn194>
- Okuma, N., Soyano, T., Suzaki, T., Kawaguchi, M. (2020). MIR2111-5 locus and shoot-accumulated mature miR2111 systemically enhance nodulation depending on HAR1 in *Lotus japonicus*. *Nature Communications*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-020-19037-9>
- Okushima, Y., Fukaki, H., Onoda, M., Theologis, A., Tasaka, M. (2007). ARF7 and ARF19 regulate lateral root formation via direct activation of LBD/ASL genes in Arabidopsis. *Plant Cell*, 19(1), 118–130. <https://doi.org/10.1105/tpc.106.047761>
- Osugi, A., Kojima, M., Takebayashi, Y., Ueda, N., Kiba, T., Sakakibara, H. (2017). Systemic transport of trans-zeatin and its precursor have differing roles in Arabidopsis shoots. *Nature Plants*, 3(8), 1–6. <https://doi.org/10.1038/nplants.2017.112>
- Osugi, A., Sakakibara, H. (2015). Q and A: How do plants respond to cytokinins and what is their importance? *BMC Biology*, 13(1). <https://doi.org/10.1186/s12915-015-0214-5>
- Overvoorde, P., Fukaki, H., Beeckman, T. (2010). Auxin control of root development. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 2(6). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a001537>
- Pace, P. F., Cralle, H. T., El-Halawany, S. H. M., Cothren, J. T., Senseman, S. A. (1999). Drought-induced Changes in Shoot and Root Growth of Young Cotton Plants. *The Journal of Cotton Science*, 3, 183-187. <https://doi.org/10.1111/pce.13356>
- Pawela, A., Banasiak, J., Biała, W., Martinoia, E., Jasiński, M. (2019). MtABCG20 is an ABA exporter influencing root morphology and seed germination of *Medicago truncatula*. *Plant Journal*, 98(3), 511–523. <https://doi.org/10.1111/tpj.14234>
- Pekárová, B., Szmítowska, A., Dopitová, R., Degtjarik, O., Žídek, L., Hejátko, J. (2016). Structural Aspects of Multistep Phosphorelay-Mediated Signaling in Plants. *Molecular Plant*, 9(1), 71–85. <https://doi.org/10.1016/J.MOLP.2015.11.008/ATTACHMENT/98B47D25-2147-42A6-9B16-6AB3EB09512A/MMC1.PDF>
- Pellizzaro, A., Clochard, T., Cukier, C., Bourdin, C., Juchaux, M., Montrichard, F., Thany, S., Raymond, V., Planchet, E., Limami, A. M., Morère-Le Paven, M. C. (2014). The Nitrate Transporter MtNPF6.8 (MtNRT1.3) transports abscisic acid and mediates nitrate regulation of primary root growth in *Medicago Truncatula*. *Plant Physiology*, 166(4), 2152–2165. <https://doi.org/10.1104/pp.114.250811>

- Pěňčík, A., Casanova-Sáez, R., Pilařová, V., Žukauskaite, A., Pinto, R., Micol, J. L., Ljung, K., Novák, O. (2018). Ultra-rapid auxin metabolite profiling for high-throughput mutant screening in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany*, 69(10), 2569. <https://doi.org/10.1093/JXB/ERY084>
- Pierdonati, E., Unterholzner, S. J., Salvi, E., Svolacchia, N., Bertolotti, G., Dello Ioio, R., Sabatini, S., di Mambro, R. (2019). Cytokinin-dependent control of GH3 group II family genes in the *Arabidopsis* root. *Plants*, 8(4). <https://doi.org/10.3390/plants8040094>
- Pilet, P. E., Elliott, M. C., Moloney, M. M. (1979). Endogenous and exogenous auxin in the control of root growth. *Planta*, 146(4), 405–408. <https://doi.org/10.1007/BF00380852/METRICS>
- Placido, D. F., Sandhu, J., Sato, S. J., Nersesian, N., Quach, T., Clemente, T. E., Staswick, P. E., Walia, H. (2020). The LATERAL ROOT DENSITY gene regulates root growth during water stress in wheat. *Plant Biotechnology Journal*, 18(9), 1955–1968. <https://doi.org/10.1111/pbi.13355>
- Plet, J., Wasson, A., Ariel, F., le Signor, C., Baker, D., Mathesius, U., Crespi, M., Frugier, F. (2011). MtCRE1-dependent cytokinin signaling integrates bacterial and plant cues to coordinate symbiotic nodule organogenesis in *Medicago truncatula*. *The Plant Journal*, 65(4), 622–633. <https://doi.org/10.1111/J.1365-313X.2010.04447.X>
- Rahayu, Y. S., Walch-Liu, P., Neumann, G., Römheld, V., von Wirén, N., Bangerth, F. (2005). Root-derived cytokinins as long-distance signals for NO₃-induced stimulation of leaf growth. *Journal of Experimental Botany*, 56(414), 1143–1152. <https://doi.org/10.1093/jxb/eri107>
- Ramireddy, E., Chang, L., Schmülling, T. (2014). Cytokinin as a mediator for regulating root system architecture in response to environmental cues. *Plant Signaling & Behavior*, 9. <https://doi.org/10.4161/PSB.27771>
- Rolfe, B. G., Gresshoff, P. M., Shine, J. (1980). Rapid screening for symbiotic mutants of *Rhizobium* and white clover. *Plant Science Letters*, 19(3), 277–284. [https://doi.org/10.1016/0304-4211\(80\)90082-6](https://doi.org/10.1016/0304-4211(80)90082-6)
- Romanov, G. A., Lomin, S. N., Schmülling, T. (2006). Biochemical characteristics and ligand-binding properties of *Arabidopsis* cytokinin receptor AHK3 compared to CRE1/AHK4 as revealed by a direct binding assay. *Journal of Experimental Botany*, 57(15), 4051–4058. <https://doi.org/10.1093/jxb/erl179>
- Romanov, G. A., Lomin, S. N., Schmülling, T. (2018). Cytokinin signaling: from the ER or from the PM? That is the question! *New Phytologist*, 218(1), 41–53. <https://doi.org/10.1111/NPH.14991>
- Romanov, G. A., Schmülling, T. (2022). On the biological activity of cytokinin free bases and their ribosides. *Planta*, 255(1). Springer Science and Business Media Deutschland GmbH. <https://doi.org/10.1007/s00425-021-03810-1>
- Roche, P., Debellé, F., Maillet, F., Lerouge, P., Faucher, C., Truchet, G., Dénarié, J., Promé, J.C. (1991). Molecular basis of symbiotic host specificity in *Rhizobium meliloti*: nodH and nodPQ genes encode the sulfation of lipo-oligosaccharide signals. *Cell*, 67, 1131–1143.
- Roy, S., Liu, W., Nandety, R. S., Crook, A., Mysore, K. S., Pislariu, C. I., Frugoli, J., Dickstein, R., Udvardi, M. K. (2020). Celebrating 20 Years of Genetic Discoveries in Legume Nodulation and Symbiotic Nitrogen Fixation. *The Plant Cell*, 32(1), 15–41. <https://doi.org/10.1105/tpc.19.00279>

- Růžička, K., Šimášková, M., Duclercq, J., Petrášek, J., Zažímalová, E., Simon, S., Friml, J., van Montagu, M. C. E., Benková, E. (2009). Cytokinin regulates root meristem activity via modulation of the polar auxin transport. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States*, 106(11), 4284–4289. https://doi.org/10.1073/PNAS.0900060106/SUPPL_FILE/0900060106SI.PDF
- Saito, A., Tanabata, S., Tanabata, T., Tajima, S., Ueno, M., Ishikawa, S., Ohtake, N., Sueyoshi, K., Ohya, T. (2014). Effect of nitrate on nodule and root growth of soybean (*Glycine max* (L.) merr.). *International Journal of Molecular Sciences*, 15(3), 4464–4480. <https://doi.org/10.3390/ijms15034464>
- Sakakibara, H. (2006). Cytokinins: Activity, biosynthesis, and translocation. *Annual Review of Plant Biology*, 57, 431–449. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.57.032905.105231>
- Salvi, E., di Mambro, R., Sabatini, S. (2020). Dissecting mechanisms in root growth from the transition zone perspective. *Journal of Experimental Botany*, 71(8), 2390–2396. <https://doi.org/10.1093/JXB/ERAA079>
- Santos Teixeira, J. A., ten Tusscher, K. H. (2019). The Systems Biology of Lateral Root Formation: Connecting the Dots. *Molecular Plant*, 12(6), 784–803. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2019.03.015>
- Sasaki, T., Suzaki, T., Soyano, T., Kojima, M., Sakakibara, H., Kawaguchi, M. (2014). Shoot-derived cytokinins systemically regulate root nodulation. *Nature Communications*, 5. <https://doi.org/10.1038/ncomms5983>
- Sasse, J., Simon, S., Gübeli, C., Liu, G. W., Cheng, X., Friml, J., Bouwmeester, H., Martinoia, E., Borghi, L. (2015). Asymmetric localizations of the ABC transporter PaPDR1 trace paths of directional strigolactone transport. *Current Biology*, 25(5), 647–655. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.01.015>
- Sawada, H., Kuykendall, L. D., Young, J. M. (2003). Changing concepts in the systematics of bacterial nitrogen-fixing legume symbionts. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 49(3), 155–179. <https://doi.org/10.2323/JGAM.49.155>
- Schaller, G. E., Bishopp, A., Kieber, J. J. (2015). The yin-yang of hormones: Cytokinin and auxin interactions in plant development. *Plant Cell*, 27(1), 44–63. <https://doi.org/10.1105/tpc.114.133595>
- Schiessl, K., Lilley, J. L. S., Lee, T., Tamvakis, I., Kohlen, W., Bailey, P. C., Thomas, A., Luptak, J., Ramakrishnan, K., Carpenter, M. D., Mysore, K. S., Wen, J., Ahnert, S., Grieneisen, V. A., Oldroyd, G. E. D. (2019). NODULE INCEPTION Recruits the Lateral Root Developmental Program for Symbiotic Nodule Organogenesis in *Medicago truncatula*. *Current Biology*, 29(21), 3657. <https://doi.org/10.1016/J.CUB.2019.09.005>
- Schnabel, E., Journet, E. P., de Carvalho-Niebel, F., Duc, G., Frugoli, J. (2005). The *Medicago truncatula* SUNN gene encodes a CLV1-like leucine-rich repeat receptor kinase that regulates nodule number and root length. *Plant Molecular Biology*, 58(6), 809–822. <https://doi.org/10.1007/s11103-005-8102-y>
- Schnabel, E. L., Kassaw, T. K., Smith, L. S., Marsh, J. F., Oldroyd, G. E., Long, S. R., Frugoli, J. A. (2011). The ROOT DETERMINED NODULATION1 Gene Regulates Nodule Number in Roots of *Medicago truncatula* and Defines a Highly Conserved, Uncharacterized Plant Gene Family. *Plant Physiology*, 157(1), 328. <https://doi.org/10.1104/PP.111.178756>

- Serrano, M., Romojaro, F., Casas, J. L., del Rio, J. A., Acosta, M. (1990). Action and mechanism of α -aminoisobutyric acid as a retardant of cut carnation senescence. *Scientia Horticulturae*, *44*(1–2), 127–134. [https://doi.org/10.1016/0304-4238\(90\)90023-8](https://doi.org/10.1016/0304-4238(90)90023-8)
- Šimášková, M., O'Brien, J. A., Khan, M., van Noorden, G., Ötvös, K., Vieten, A., de Clercq, I., van Haperen, J. M. A., Cuesta, C., Hoyerová, K., Vanneste, S., Marhavý, P., Wabnik, K., van Breusegem, F., Nowack, M., Murphy, A., Friml, J., Weijers, D., Beeckman, T., Benková, E. (2015). Cytokinin response factors regulate PIN-FORMED auxin transporters. *Nature Communications*, *6*, 8717. <https://doi.org/10.1038/ncomms9717>
- Skalický, V., Kubeš, M., Napier, R., Novák, O. (2018). Auxins and cytokinins—The role of subcellular organization on homeostasis. *International Journal of Molecular Sciences*, *19*(10). <https://doi.org/10.3390/ijms19103115>
- Staswick, P. E., Serban, B., Rowe, M., Tiryaki, I., Maldonado, M. T., Maldonado, M. C., Suza, W. (2005). Characterization of an arabidopsis enzyme family that conjugates amino acids to indole-3-acetic acid. *Plant Cell*, *17*(2), 616–627. <https://doi.org/10.1105/tpc.104.026690>
- Stock, A. M., Robinson, V. L., Goudreau, P. N. (2000). Two-Component Signal Transduction. *Annual Review of Biochemistry*, *69*, 183–215. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.69.1.183>
- Stock, J. B., Ninfa, A. J., Stock, A. M. (1989). Protein Phosphorylation and Regulation of Adaptive Responses in Bacteria. *Microbiological Reviews*, *53*(4), 450–490.
- 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 Physiology*, *144*(4), 2000–2008. <https://doi.org/10.1104/pp.107.096727>
- Sun, F., Zhang, W., Hu, H., Li, B., Wang, Y., Zhao, Y., Li, K., Liu, M., Li, X. (2008). Salt Modulates Gravity Signaling Pathway to Regulate Growth Direction of Primary Roots in Arabidopsis. *Plant Physiology*, *146*(1), 178. <https://doi.org/10.1104/PP.107.109413>
- Suzuki, T., Miwa, K., Ishikawa, K., Yamada, H., Aiba, H., Mizuno, T. (2001). The Arabidopsis Sensor His-kinase, AHK4, Can Respond to Cytokinins. *Plant and Cell Physiology*, *42*(2), 107–113. <https://doi.org/10.1093/PCP/PCE037>
- Svačinová, J., Novák, O., Plačková, L., Lenobel, R., Holík, J., Strnad, M., Doležal, K. (2012). A new approach for cytokinin isolation from Arabidopsis tissues using miniaturized purification: pipette tip solid-phase extraction. *Plant Methods*, *8*(1), 17. <https://doi.org/10.1186/1746-4811-8-17>
- Swarup, K., Benková, E., Swarup, R., Casimiro, I., Péret, B., Yang, Y., Parry, G., Nielsen, E., de Smet, I., Vanneste, S., Levesque, M. P., Carrier, D., James, N., Calvo, V., Ljung, K., Kramer, E., Roberts, R., Graham, N., Marillonnet, S., ... Bennett, M. J. (2008). The auxin influx carrier LAX3 promotes lateral root emergence. *Nature Cell Biology*, *10*(8), 946–954. <https://doi.org/10.1038/ncb1754>
- Swarup, R., Bennett, M. (2003). Auxin transport: The fountain of life in plants? *Developmental Cell*, *5*(6), 824–826. [https://doi.org/10.1016/S1534-5807\(03\)00370-8](https://doi.org/10.1016/S1534-5807(03)00370-8)
- Szczyglowski, K., Amyot, L. (2003). Symbiosis, inventiveness by recruitment? *Plant Physiology*, *131*(3), 935–940. <https://doi.org/10.1104/pp.017186>
- Tadege, M., Wen, J., He, J., Tu, H., Kwak, Y., Eschstruth, A., Cayrel, A., Endre, G., Zhao, P. X., Chabaud, M., Ratet, P., Mysore, K. S. (2008). Large-scale insertional mutagenesis using the Tnt1 retrotransposon in the model legume *Medicago truncatula*. *The Plant Journal*, *54*(2), 335–347. <https://doi.org/10.1111/J.1365-313X.2008.03418.X>

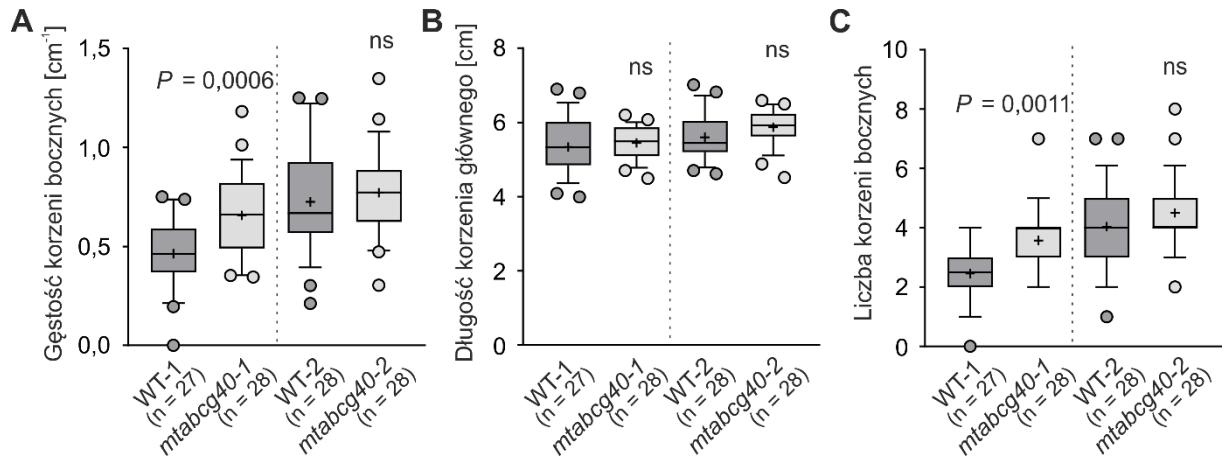
- Takei, K., Ueda, N., Aoki, K., Kuromori, T., Hirayama, T., Shinozaki, K., Yamaya, T., Sakakibara, H. (2004). AtIPT3 is a Key Determinant of Nitrate-Dependent Cytokinin Biosynthesis in Arabidopsis. *Plant Cell Physiology*, 45(8).
<https://academic.oup.com/pcp/article/45/8/1053/1836996>
- Takei, K., Yamaya, T., Sakakibara, H. (2004). Arabidopsis CYP735A1 and CYP735A2 encode cytokinin hydroxylases that catalyse the biosynthesis of trans-Zeatin. *Journal of Biological Chemistry*, 279(40), 41866–41872. <https://doi.org/10.1074/jbc.M406337200>
- Tang, H., Krishnakumar, V., Bidwell, S., Rosen, B., Chan, A., Zhou, S., Gentzbittel, L., Childs, K. L., Yandell, M., Gundlach, H., Mayer, K. F., Schwartz, D. C., Town, C. D. (2014). An improved genome release (version Mt4.0) for the model legume *Medicago truncatula*. *BMC Genomics*, 15, 312.
- ter Beek, J., Guskov, A., Slotboom, D. J. (2014). Structural diversity of ABC transporters. *The Journal of General Physiology*, 143(4), 419. <https://doi.org/10.1085/JGP.201411164>
- Tessi, T. M., Brumm, S., Winklbauer, E., Schumacher, B., Pettinari, G., Lescano, I., González, C. A., Wanke, D., Maurino, V. G., Harter, K., Desimone, M. (2021). Arabidopsis AZG2 transports cytokinins in vivo and regulates lateral root emergence. *New Phytologist*, 229(2), 979–993. <https://doi.org/10.1111/nph.16943>
- Tian, Q., Chen, F., Liu, J., Zhang, F., Mi, G. (2008). Inhibition of maize root growth by high nitrate supply is correlated with reduced IAA levels in roots. *Journal of Plant Physiology*, 165(9), 942–951. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2007.02.011>
- Tivoli, B., Baranger, A., Sivasithamparam, K., Barbetti, M. J. (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. *Annals of Botany*, 98(6), 1117–1128. <https://doi.org/10.1093/aob/mcl132>
- To, J. P. C., Haberer, G., Ferreira, F. J., Deruère, J., Mason, M. G., Schaller, G. E., Alonso, J. M., Ecker, J. R., Kieber, J. J. (2004). Type-A Arabidopsis Response Regulators Are Partially Redundant Negative Regulators of Cytokinin Signaling. *The Plant Cell*, 16(3), 658. <https://doi.org/10.1105/TPC.018978>
- Traub, M., Flörchinger, M., Piecuch, J., Kunz, H. H., Weise-Steinmetz, A., Deitmer, J. W., Neuhaus, H. E., Möhlmann, T. (2007). The fluorouridine insensitive 1 (fur1) mutant is defective in equilibrative nucleoside transporter 3 (ENT3), and thus represents an important pyrimidine nucleoside uptake system in Arabidopsis thaliana. *Plant Journal*, 49(5), 855–864. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2006.02998.x>
- Tsugeki, R., Fedoroff, N. (1999). Genetic ablation of root cap cells in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(22), 12941–12946
www.bio.nethypermilARABIDOPSIS96060025.
- Ueguchi, C., Sato, S., Kato, T., Tabata, S. (2001). The AHK4 Gene Involved in the Cytokinin-Signaling Pathway as a Direct Receptor Molecule in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell Physiology*, 42(7), 751–755.
- van Gelderen, K., Kang, C., Paalman, R., Keuskamp, D., Hayes, S., Pierik, R. (2018). Far-red light detection in the shoot regulates lateral root development through the HY5 transcription factor. *Plant Cell*, 30(1), 101–116. <https://doi.org/10.1105/tpc.17.00771>
- van Zeijl, A., Op Den Camp, R. H. M., Deinum, E. E., Charnikhova, T., Franssen, H., Op Den Camp, H. J. M., Bouwmeester, H., Kohlen, W., Bisseling, T., Geurts, R. (2015). Rhizobium Lipo-

- chitoooligosaccharide Signaling Triggers Accumulation of Cytokinins in *Medicago truncatula* Roots. *Molecular Plant*, 8(8), 1213–1226. <https://doi.org/10.1016/J.MOLP.2015.03.010>
- Verrier, P. J., Bird, D., Burla, B., Dassa, E., Forestier, C., Geisler, M., Klein, M., Kolukisaoglu, Ü., Lee, Y., Martinoia, E., Murphy, A., Rea, P. A., Samuels, L., Schulz, B., Spalding, E. J., Yazaki, K., Theodoulou, F. L. (2008). Plant ABC proteins - a unified nomenclature and updated inventory. *Trends in Plant Science*, 13(4), 151–159. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2008.02.001>
- Walker, L., Boddington, C., Jenkins, D., Wang, Y., Grønlund, J. T., Hulsmans, J., Kumar, S., Patel, D., Moore, J. D., Carter, A., Samavedam, S., Bonomo, G., Hersh, D. S., Coruzzi, G. M., Burroughs, N. J., Gifford, M. L. (2017). Changes in Gene Expression in Space and Time Orchestrate Environmentally Mediated Shaping of Root Architecture. *The Plant Cell*, 29(10), 2393–2412. <https://doi.org/10.1105/TPC.16.00961>
- Wang, C., Reid, J. B., Foo, E. (2018). The art of self-control – Autoregulation of plant–microbe symbioses. *Frontiers in Plant Science*, 9, 988. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2018.00988/XML/NLM>
- Wang, Q., Zhu, Y., Zou, X., Li, F., Zhang, J., Kang, Z., Li, X., Yin, C., Lin, Y. (2020). Nitrogen Deficiency-Induced Decrease in Cytokinins Content Promotes Rice Seminal Root Growth by Promoting Root Meristem Cell Proliferation and Cell Elongation. *Cells*, 9(4). <https://doi.org/10.3390/cells9040916>
- Wang, R., Tischner, R., Gutiérrez, R. A., Hoffman, M., Xing, X., Chen, M., Coruzzi, G., Crawford, N. M. (2004). Genomic Analysis of the Nitrate Response Using a Nitrate Reductase-Null Mutant of *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 136(1), 2512. <https://doi.org/10.1104/PP.104.044610>
- Werner, T., Köllmer, I., Bartrina, I., Holst, K., Schmülling, T. (2006). New insights into the biology of cytokinin degradation. *Plant Biology*, 8(3), 371–381. <https://doi.org/10.1055/s-2006-923928>
- Werner, T., Motyka, V., Strnad, M., Schmülling, T. (2001). Regulation of plant growth by cytokinin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(18), 10487–10492. <https://doi.org/10.1073/PNAS.171304098>
- Wilkes, T. I. (2021). Arbuscular Mycorrhizal Fungi in Agriculture. *Encyclopedia*, 1(4), 1132–1154. <https://doi.org/10.3390/encyclopedia1040085>
- Williamson, L. C., Ribrioux, S. P. C. P., Fitter, A. H., Leyser, H. M. O. (2001). Phosphate Availability Regulates Root System Architecture in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 126 (2), 875–882. doi: 10.1104/pp.126.2.875
- Wójcik, P., Dyśko, J., Kaniszewski, S., Kowalczyk, W., Nowak, J. S. (2014). *Zrównoważone nawożenie roślin ogrodnich : opracowanie zbiorowe*. Instytut Ogrodnictwa.
- Wopereis, J., Pajuelo, E., Dazzo, F. B., Jiang, Q., Gresshoff, P. M., de Bruijn, F. J., Stougaard, J., Szczyglowski, K. (2000). Short root mutant of *Lotus japonicus* with a dramatically altered symbiotic phenotype. *Plant Journal*, 23(1), 97–114. <https://doi.org/10.1046/J.1365-313X.2000.00799.X>
- Wu, L., Wang, J. L., Li, X. F., Guo, G. Q. (2021). Cytokinin-Controlled Gradient Distribution of Auxin in *Arabidopsis* Root Tip. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(8), 3874. <https://doi.org/10.3390/IJMS22083874>
- Wulfetange, K., Lomin, S. N., Romanov, G. A., Stolz, A., Heyl, A., Schmülling, T. (2011). The cytokinin receptors of *Arabidopsis* are located mainly to the endoplasmic reticulum. *Plant Physiology*, 156(4), 1808–1818. <https://doi.org/10.1104/pp.111.180539>

- Xuan, W., Band, L. R., Kumpf, R. P., van Damme, D., Parizot, B., de Rop, G., Opdenacker, D., Möller, B. K., Skorzinski, N., Njo, M. F., de Rybel, B., Audenaert, D., Nowack, M. K., Vanneste, S., Beeckman, T. (2016). Cyclic programmed cell death stimulates hormone signaling and root development in Arabidopsis. *Science*, 351(6271), 384–387. https://doi.org/10.1126/SCIENCE.AAD2776/SUPPL_FILE/XUAN-SM.PDF
- Yamada, H., Suzuki, T., Terada, K., Takei, K., Ishikawa, K., Miwa, K., Yamashino, T., Mizuno, T. (2001). The Arabidopsis AHK4 Histidine Kinase is a Cytokinin-Binding Receptor that Transduces Cytokinin Signals Across the Membrane. *Cell Physiology*, 42(9), 1017-1023.
- Young, N. D., Debellé, F., Oldroyd, G. E. D., Geurts, R., Cannon, S. B., Udvardi, M. K., Benedito, V. A., Mayer, K. F. X., Gouzy, J., Schoof, H., van de Peer, Y., Proost, S., Cook, D. R., Meyers, B. C., Spannagl, M., Cheung, F., de Mita, S., Krishnakumar, V., Gundlach, H., ... Roe, B. A. (2011). The Medicago genome provides insight into the evolution of rhizobial symbioses. *Nature*, 480(7378), 520–524. <https://doi.org/10.1038/nature10625>
- Zang, L., Morère-Le Paven, M. C., Clochard, T., Porcher, A., Satour, P., Mojović, M., Vidović, M., Limami, A. M., Montrichard, F. (2020). Nitrate inhibits primary root growth by reducing accumulation of reactive oxygen species in the root tip in Medicago truncatula. *Plant Physiology and Biochemistry*, 146, 363–373. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2019.11.006>
- Zhang, K., Novak, O., Wei, Z., Gou, M., Zhang, X., Yu, Y., Yang, H., Cai, Y., Strnad, M., Liu, C. J. (2014). Arabidopsis ABCG14 protein controls the acropetal translocation of root-synthesized cytokinins. *Nature Communications*, 5, 3274. <https://doi.org/10.1038/ncomms4274>
- Zhang, Y., Chen, M., Siemiatkowska, B., Toleco, M. R., Jing, Y., Strotmann, V., Zhang, J., Stahl, Y., Fernie, A. R. (2020). A Highly Efficient Agrobacterium-Mediated Method for Transient Gene Expression and Functional Studies in Multiple Plant Species. *Plant Communications*, 1(5). <https://doi.org/10.1016/J.XPLC.2020.100028>
- Zhao, J., Yu, N., Ju, M., Fan, B., Zhang, Y., Zhu, E., Zhang, M., Zhang, K. (2019). ABC transporter OsABCG18 controls the shootward transport of cytokinins and grain yield in rice. *Journal of Experimental Botany*, 70(21), 6277–6291. <https://doi.org/10.1093/JXB/ERZ382>
- Zhao, Y. (2012). Auxin biosynthesis: A simple two-step pathway converts tryptophan to indole-3-Acetic acid in plants. *Molecular Plant*, 5(2), 334–338. <https://doi.org/10.1093/mp/ssr104>
- Zubo, Y. O., Schaller, G. E. (2020). Role of the cytokinin-activated type-B response regulators in hormone crosstalk. *Plants*, 9(2). <https://doi.org/10.3390/plants9020166>
- Zürcher, E., Liu, J., di Donato, M., Geisler, M., Müller, B. (2016). Plant development regulated by cytokinin sinks. *Science*, 353(6303), 1027–1030. https://doi.org/10.1126/SCIENCE.AAF7254/SUPPL_FILE/ZUERCHER.SM.PDF

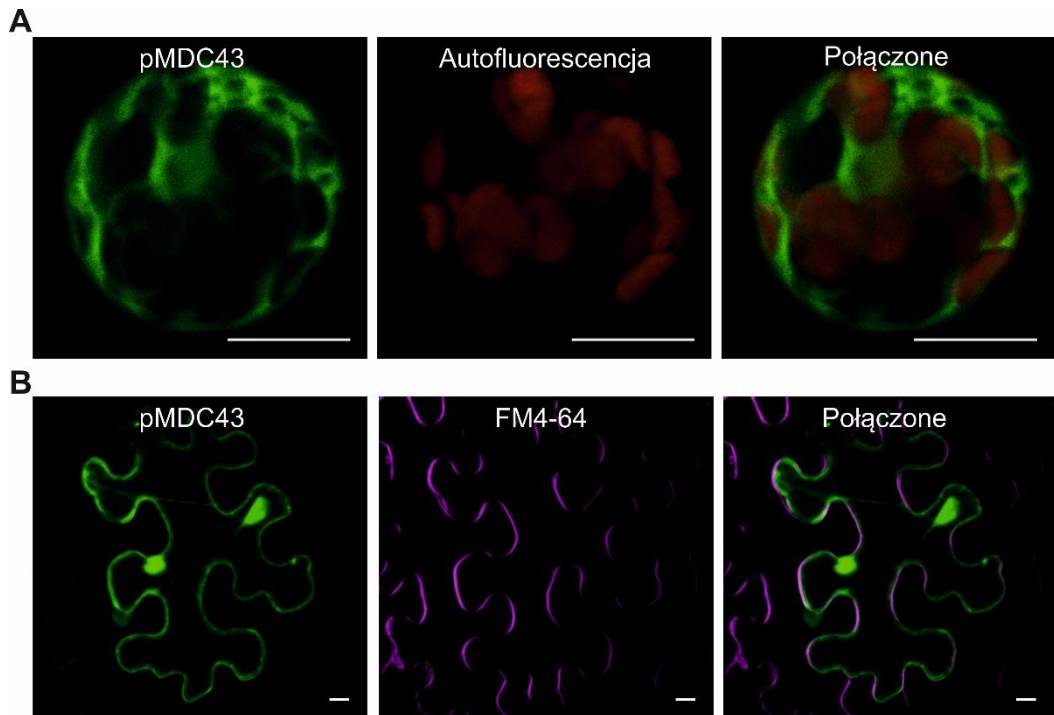
8. ZAŁĄCZNIKI

Załącznik 1 Morfologia korzeni *mtabcg40* i WT suplementowanych azotem



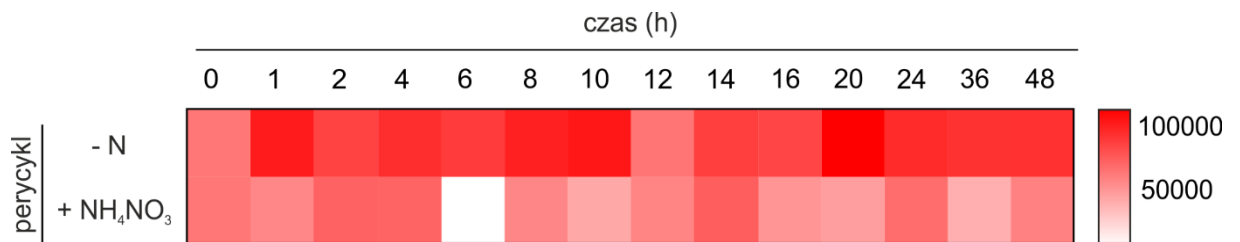
Rycina Z1 Analiza morfologii korzeni mutantów (*mtabcg40*) oraz roślin typu dzikiego (WT) z linii NF21323 oraz NF17891 wyrosłych na pożywce z 1 mM NH_4NO_3 z uwzględnieniem gęstości korzeni bocznych (A), długości korzenia głównego (B) oraz liczby korzeni bocznych przypadających na roślinę (C). Dla każdego wykresu pudełkowego: linia pośrodku przedstawia położenie wartości mediany; „+” przedstawia położenie wartości średniej; prostokąt obejmuje wartości w przedziale percentyli 25-75; wąsy obejmują wartości pomiędzy prostokątem a percentylem 10 i 90. Wartości powyżej i poniżej wąsów są zaprezentowane jako pojedyncze punkty. Istotność statystyczna różnic pomiędzy średnimi z porównywanych grup określona została z wykorzystaniem dwustronnego testu t-Studenta (A), dwustronnego testu t-Welcha (B) oraz dwustronnego testu Manna–Whitneya (C); ns, różnica nieistotna statystycznie; n określa liczbę roślin poddanych analizie w ramach dwóch niezależnych powtórzeń biologicznych (A-C).

Załącznik 2 Kontrola negatywna dla eksperymentu lokalizacji MtABCG40



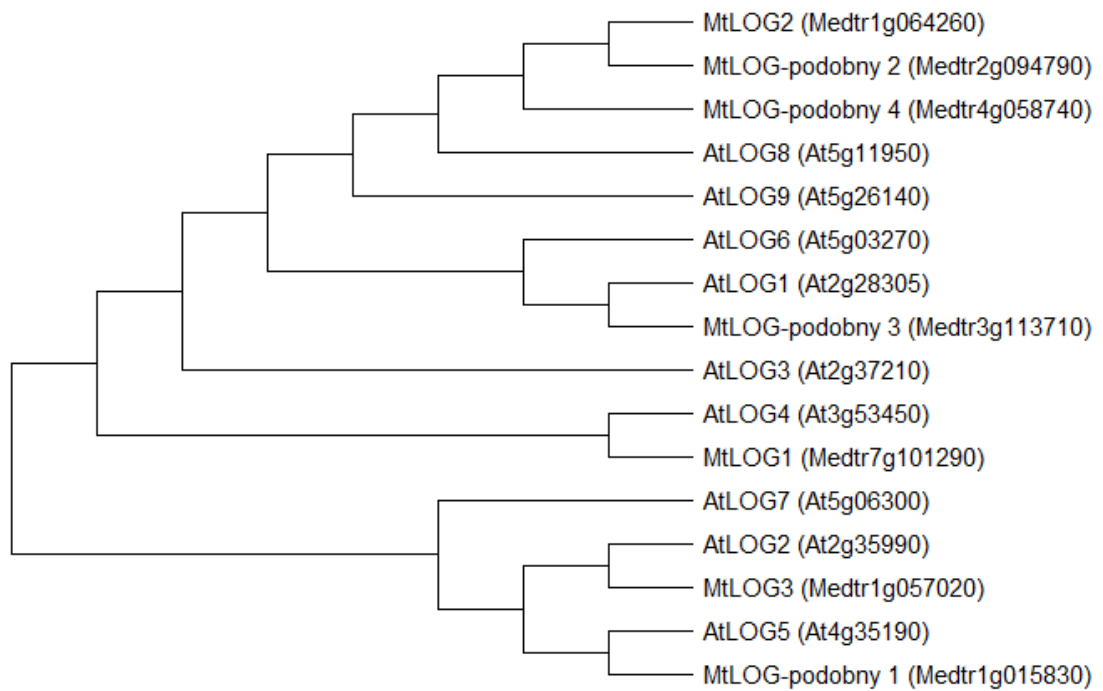
Rycina Z2 Lokalizacja subkomórkowa wolnego białka zielonej fluorescencji (ang. *green fluorescence protein*, GFP) powstałego na matrycy wektora pMDC43. A, Zielony sygnał GFP widoczny w cytoplazmie protoplastów izolowanych z mezofilu liści *Arabidopsis thaliana*. Sygnał czerwony – autofluorescencja chlorofilu. B, Zielony sygnał GFP widoczny w cytoplazmie i jądrach komórek epidermy liści tytoniu *Nicotiana benthamiana*. Sygnał purpurowy (ang. *magenta*) – fluorescencja barwnika FM4-64, znakującego błonę komórkową. Skala: 10 μ m.

Załącznik 3 Zależność zmian poziomu ekspresji *AtLOG7* od dostępności azotu



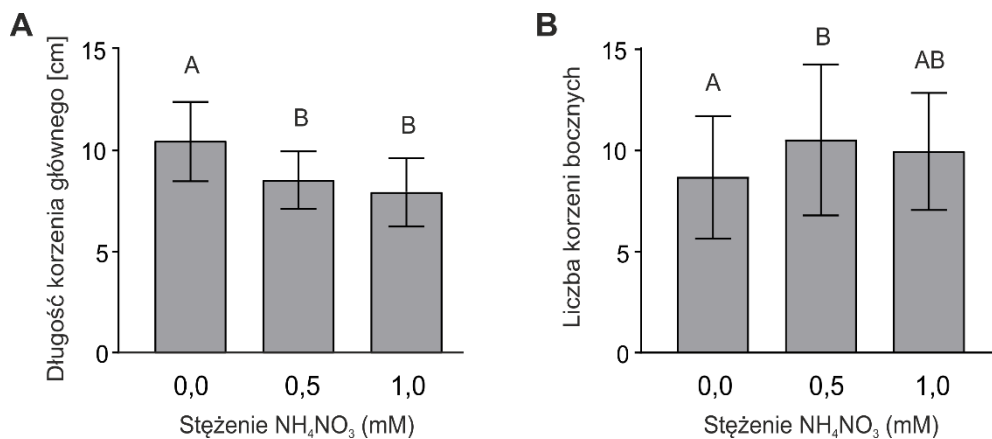
Rycina Z3 Zmiany poziomu ekspresji *AtLOG7* w perycyli korzenia *Arabidopsis thaliana* w warunkach kontrolnych (-N, 0,3 mM NH₄NO₃) oraz w ciągu 48 h od egzogennej aplikacji azotu (+ NH₄NO₃, 5 mM NH₄NO₃). Na diagramie przedstawione zostały wartości logarytmu dziesiętnego z krotności zmian ekspresji (ang. *log₁₀ fold change*, logFC) względem 0,5 mM NH₄NO₃. Dane zaczerpnięte z Walker i wsp., 2017.

Załącznik 4 Analiza podobieństwa sekwencji genów *Lonely Guy (LOG)* z *Medicago truncatula* i *Arabidopsis thaliana*



Rycina Z4 Drzewo filogenetyczne przedstawiające bliskie podobieństwo sekwencji kodujących (ang. coding sequence, CDS) genów *MtLOG3* do *AtLOG2* i *AtLOG7*. Przebieg ewolucji przedstawionych sekwencji został określony z użyciem metody najwyższej wiarygodności (ang. maximum likelihood method) przy pomocy oprogramowania MEGA X (Kumar i wsp., 2018).

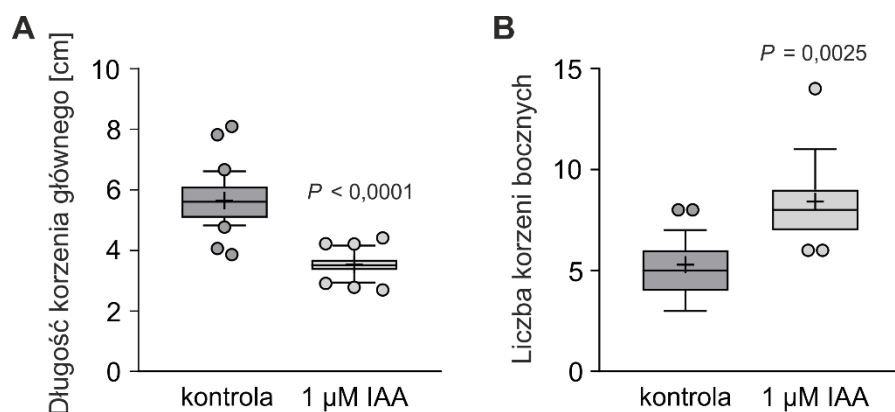
Załącznik 5 Zmiany morfologii korzenia głównego *Medicago truncatula* przy zmiennym stężeniu azotu



Rycina Z5 Zależność długości korzenia głównego (A) oraz liczby korzeni bocznych *Medicago truncatula* (B) od stężenia azotanu (V) amonu (NH_4NO_3). Na wykresie przedstawione zostały wartości średnich oraz odchyłeń standardowych z trzech niezależnych powtórzeń biologicznych (39-45 korzeni)

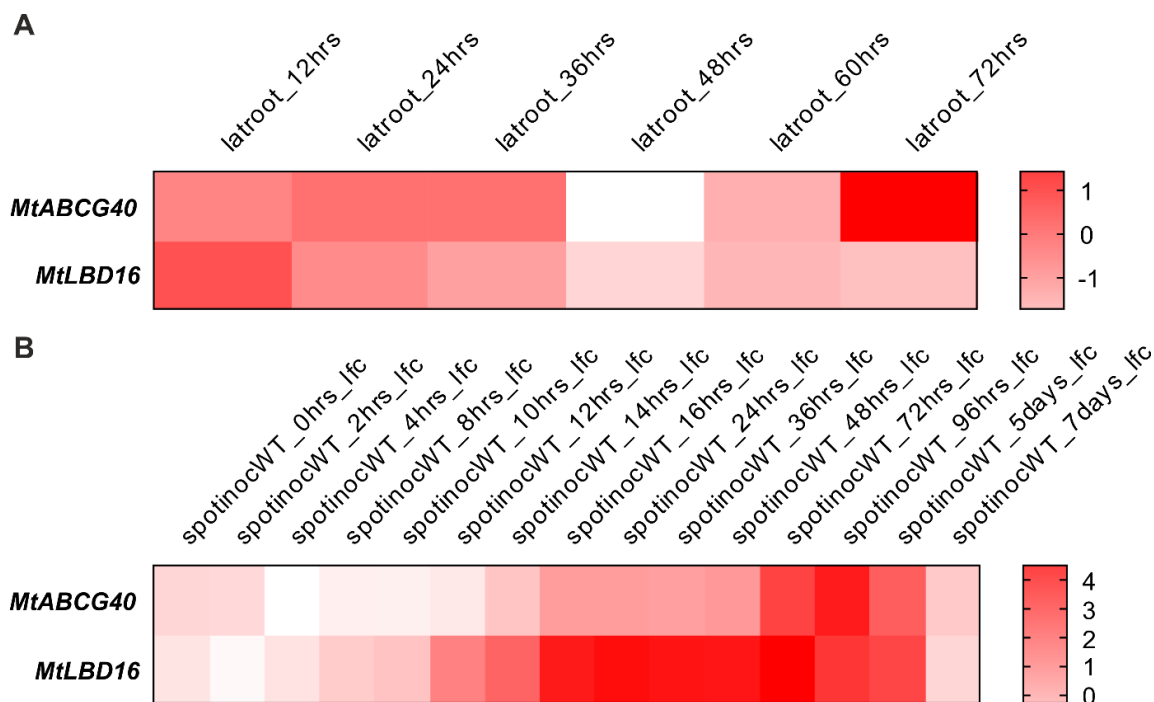
na warunek). Istotność statystyczna różnic pomiędzy średnimi z porównywanych grup określona została z wykorzystaniem jednoczynnikowego testu ANOVA i testu post-hoc wielokrotnych porównań Tukeya (A), testu Kruskala-Wallisa i testu post-hoc wielokrotnych porównań Dunna (B). Takie same lub różne oznaczenia literowe świadczą odpowiednio o braku lub obecności istotności statystycznej; $P < 0,05$.

Załącznik 6 Reakcje korzenia *Medicago truncatula* na egzogenną aplikację auksyn



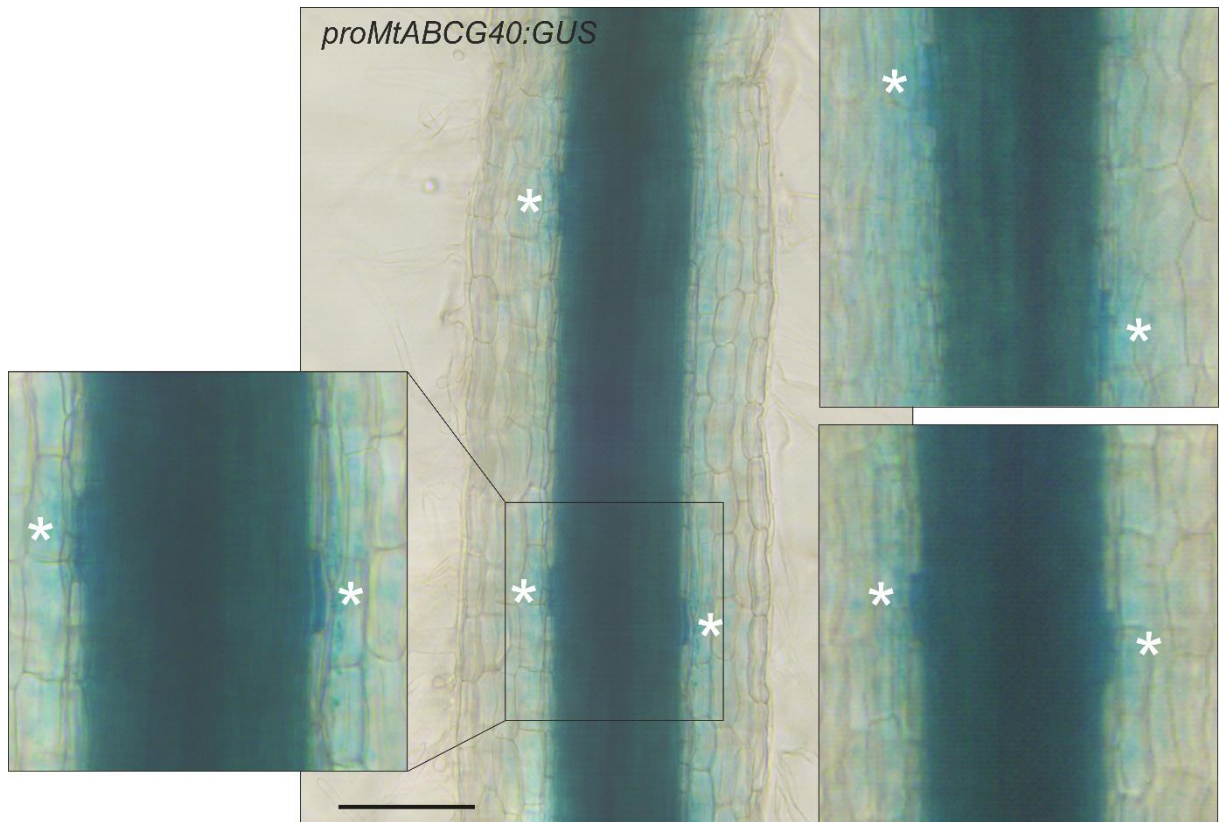
Rycina Z6 Długość korzenia głównego (A) i liczba korzeni bocznych *Medicago truncatula* (B) traktowanych 1 μM kwasem indolilo-3-octowym (IAA) w porównaniu z roślinami nietraktowanymi (kontrola). Tygodniowe rośliny rosnące na pożywce bez IAA zostały przełożone na pożywkę z hormonem, po czym po tygodniu dokonano pomiarów morfologii ich korzeni. Dla każdego wykresu pudełkowego: linia pośrodku przedstawia położenie wartości mediany; „+” przedstawia położenie wartości średniej; prostokąt obejmuje wartości w przedziale percentyli 25-75; wąsy obejmują wartości pomiędzy prostokątem a percentylem 10 i 90. Wartości powyżej i poniżej wąsów są zaprezentowane jako pojedyncze punkty. Istotność statystyczna różnic pomiędzy średnimi z porównywanych grup określona została z wykorzystaniem dwustronnego testu Manna-Whitneya; n określa liczbę roślin poddanych analizie w ramach dwóch niezależnych powtórzeń biologicznych.

Załącznik 7 Analiza danych transkryptomycznych zamieszczonych w pracy Schiessl i wsp. (2019)



Rycina Z7 Zmiany ekspresji *MtABCG40* oraz *MtLBD16*, genu markerowego odpowiedzi komórek na auksyny, zachodzące podczas organogenezy korzenia bocznego (A) i brodawki korzeniowej (B). Eksperymenty wykonane zostały z wykorzystaniem techniki grawitropicznej stymulacji formowania korzeni bocznych (A) lub punktowej inokulacji bakteriami symbiotycznymi *Sinorhizobium meliloti* (B). W obu eksperymentach obserwowano pierwszy podział komórkowy przyszłego primordium po ok. 12 od wprowadzenia czynnika inicjującego proces. Na diagramie przedstawione zostały wartości logarytmu z krotności zmian ekspresji (ang. *log fold change*, logFC) względem prób zawierających fragmenty korzeni niepoddane stymulacji grawitropicznej lub inokulacji bakteriami. Dane zaczerpnięte ze Schiessl i wsp., 2019.

Załącznik 8 Aktywność promotora *MtABCG40* zaobserwowana w niektórych komórkach na obrzeżach wiązki przewodzącej *Medicago truncatula* przy niedoborze azotu



Rycina Z8 Analiza histochemiczna korzeni włosowatych *Medicago truncatula* wyrosłych na podłożu niesuplementowanym azotem i niosących konstrukcję *proMtABCG40:GUS*. Barwienie przeprowadzone zostało z wykorzystaniem chromogenego substratu X-Gal, barwiącego miejsca ekspresji *MtABCG40* w korzeniu na niebiesko. Gwiazdkami oznaczono silniej zabarwione komórki jednej z warstw korzenia na obrzeżach wiązki przewodzącej. Skala: 100 μ m.