

Instytut Chemii Bioorganicznej
Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu



**Rola transporterów ABCG w dystrybucji
kwasu abscysynowego u *Medicago truncatula***

mgr Aleksandra Paweła

Praca doktorska wykonana
w Zakładzie Fizjologii Molekularnej Roślin
pod kierunkiem dr hab. Michała Jasińskiego, prof. ICHB PAN

Poznań 2019

Serdecznie dziękuję:

Promotorowi dr hab. Michałowi Jasińskiemu za opiekę naukową, możliwość indywidualnego rozwoju, pomoc w rozwiązywaniu wszystkich problemów, zaufanie oraz możliwość prezentowania wyników na międzynarodowych konferencjach

Dr Joannie Banasiak za Jej ogromną wiedzę, dokładność, pomoc w przeprowadzeniu i analizowaniu eksperymentów oraz wsparcie i motywacje w trudnych momentach

Dr Wandzie Białej-Leonhard, Wandzi za wszystko, za to że była i się o mnie troszczyła

Wszystkim Koleżankom i Kolegom z Zakładu Fizjologii Molekularnej Roślin za stworzenie wspaniałej labowej rodziny, w której każdy jest zupełnie inny i niezastąpiony, za niezwykłą atmosferę, zgraną współpracę oraz wspólne dyskusje na każdy temat, szczególnie Natalii Stec za niewidzialną moc porozumienia

Dr Michałowi Michalakowi za inspirujące wprowadzenie w Świat Nauki oraz za wszelką pomoc przy eksperymentach

Życzliwym Pracownikom siostrzanych Zakładów: Biochemii Produktów Naturalnych, Metabolomiki Funkcjonalnej Roślin, Pracowni Spektrometrii Mas oraz Pracowni Kultur Komórkowych i Tkankowych za wszelką pomoc i dobre słowo

Wszystkim Pracownikom Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN za codzienną dawkę życzliwych uśmiechów

Znajomym i Przyjaciołom, szczególnie Klaudii Kulczyńskiej, Marcie Wojnickiej, Karolinie Kułak, Pawłowi Rodziewiczowi za niezwykle wsparcie podczas pisania pracy i wiarę we mnie

Kochanym Rodzicom za miłość, wychowanie, przygotowanie do dorosłego życia oraz za częste powtarzanie, że nauka i wykształcenie to największy skarb, którego nikt mi nie odbierze

Najbliższej Rodzinie, szczególnie Joannie i Pawłowi za to, że zawsze można na Nich liczyć, odwiedzić, zadzwonić oraz za nieustające przypominanie, że poza pracą istnieje inny wymiar, równie piękny i interesujący, Rodzina

Chciałabym również wspomnieć o dwóch osobach, których już z Nami nie ma:

Dziękuję Iwonce Femiak za wszystko czego zdążyła mnie nauczyć i za każde dobro, które od Niej otrzymałam

Dziękuję mojej Babci Marysi za to, że dzisiaj byłaby Najdumniejszą Babcią na Świecie

*Pracę dedykuję moim cudownym bratanicom Agacie i Julicie,
żebyście każdego dnia miały odwagę spełniać swoje marzenia*

Praca została sfinansowana z następujących środków:

- Grant NCN HARMONIA 2013/10/M/NZ3/00260 : Transport ABA u bobowatych – między odpowiedzią na stres suszy, a wydajnym wiązaniem azotu atmosferycznego; *kierownik: dr hab. Michał Jasiński, prof. ICHB PAN*
- Projekt badawczy służący rozwojowi młodych naukowców oraz uczestników studiów doktoranckich (2017): Oznaczenie zmian ilości kwasu abscysynowego w bielmie i zarodku nasion *Medicago truncatula*; *kierownik: Aleksandra Pawela*

Publikacje powstałe w trakcie realizacji pracy doktorskiej:

- Biała W, Banasiak J, Jarzyniak K, **Pawela A**, Jasiński M. (2017) *Medicago truncatula* ABCG10 is a transporter of 4-coumarate and liquiritigenin in the medicarpin biosynthetic pathway. *Journal of Experimental Botany*, 68, 3231-3241 (doi: 10.1093/jxb/erx059)
- **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*. *The Plant Journal*, 98, 511-523 (doi: 10.1111/tpj.14234)

Wyróżnienia uzyskane w trakcie realizacji pracy doktorskiej:

- Wyróżnienie dla A. Paweli za najlepszą publikację eksperymentalną powstałą w Instytucie Chemii Bioorganicznej PAN w roku 2017
- Stypendium dla najlepszych doktorantów Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu w roku 2018

Streszczenie

Hormony roślinne (fitohormony) są niezbędnymi czynnikami regulatorowymi obecnymi w roślinie na wszystkich etapach rozwoju. Fitohormony umożliwiają przekazywanie informacji między komórkami oraz reagowanie na biotyczne i abiotyczne czynniki środowiskowe. Jednym z fitohormonów jest kwas abscysynowy (ang. *abscisic acid*, ABA), który wpływa na szereg cech istotnych z agronomicznego punktu widzenia, takich jak jakość nasion czy odpowiedź roślin na suszę. W nasionach, ABA wpływa na ich dojrzewanie i kiełkowanie, a jego obecność w zarodku utrzymuje dojrzałe nasiona w stanie spoczynku. W odpowiedzi na niedobór wody, ABA przede wszystkim wpływa na zamykanie aparatów szparkowych, zmianę architektury korzeni oraz aktywuje szereg czynników transkrypcyjnych, które pośrednio biorą udział w odpowiedzi na stres suszy.

Celem pracy doktorskiej było zidentyfikowanie transporterów ABC (ang. *ATP-binding cassette transporter*), zaangażowanych w dystrybucję kwasu abscysynowego w modelowej roślinie bobowatej, *Medicago truncatula*. Spośród wyselekcjonowanej grupy 9 genów kodujących połowiczne transportery ABCG u *M. truncatula*, potencjalnie zaangażowane w translokację ABA, ekspresja 4 z nich (*MtABCG20*, *MtABCG26*, *MtABCG27*, *MtABCG29*) była indukowana pod wpływem egzogennej aplikacji ABA i PEG. Dalsze badania dowiodły, że jeden z nich tj. *MtABCG20* jest białkiem błony komórkowej, w której tworzy homodimer i aktywnie uczestniczy w translokacji ABA. Analiza aktywności promotora wykazała, że *MtABCG20* ulega ekspresji w wiązce przewodzącej korzeni, brodawce korzeniowej oraz w zarodku nasion, specyficznie w regionie pomiędzy hipokotylem, a wierzchołkiem korzenia zarodkowego. Brak transportera *MtABCG20* skutkuje akumulacją ABA w miejscu jego biosyntezy. Podczas analiz fenotypowych, przeprowadzonych na roślinach pozbawionych funkcjonalnego *MtABG20*, zaobserwowano spadek wydajności kiełkowania, zmniejszenie liczby powstających korzeni bocznych oraz zwiększenie liczby brodawek korzeniowych, podczas suszy.

Uzyskane wyniki pokazują, że w korzeniach *M. truncatula*, *MtABCG20* bierze udział w eksporcie ABA z miejsca biosyntezy i reguluje procesy reorganizacji architektury korzeni w odpowiedzi na niedobór wody. Natomiast w nasionach *MtABCG20* pełni prawdopodobnie funkcję usuwania ABA z głównego centrum decyzyjnego zarodka i wspomaga proces kiełkowania, w korzystnych warunkach środowiska.

Summary

Plant hormones (phytohormones) are essential regulatory factors present in the plant at all development stages. Phytohormones facilitate the transfer of information between cells and response to biotic and abiotic environmental factors. The phytohormone abscisic acid (ABA) plays a crucial role in different aspects associated with plant growth and development, including embryo and seed maturation, post germinative growth. Growing evidence suggests that ABA movement within plant can determine proper ABA perception and subsequently trigger adequate responses under unfavorable conditions.

The goal of the doctoral dissertation was to identify ABC transporters (ATP-binding cassette transporter) involved in the distribution of abscisic acid in the model legume plant, *Medicago truncatula*. Based on phylogenetic tree of the half-size ABCG proteins, four potential ABA transporters from *M. truncatula* were selected. It was shown that their expression is strongly induced upon drought stress, mimicked by PEG and ABA. Further studies revealed that the one of them namely MtABCG20 is a plasma membrane protein, where it forms a homodimer, and actively participates in ABA translocation across the membrane. Promoter activity analysis showed that *MtABCG20* is expressed in the roots, vascular bundles, nodules and in the specific region of the seed embryodescribed as hypocotyl-radicle transition zone. The lack of the MtABCG20 resulted in the ABA accumulation in its biosynthesis place. Phenotypic analyzes of *MtABG20*-mutant plants under the drought stress revealed a decrease of germination efficiency, depletion of lateral roots number as well as an increase of nodulation rate.

The obtained results suggest that in the *M. truncatula* roots MtABCG20 participates in the ABA export from the biosynthesis site and regulates the processes of reorganization of the root architecture in drought stress. Moreover, in seeds MtABCG20 is probably promoting seed germination by ABA extrusion from the embryo's main decision-making center and supports germination in favorable environmental conditions.

Wykaz skrótów

³H-ABA – kwas abscysynowy radioaktywnie znakowany trytem

AAO – oksydaza kwasu abscysynowego (ang. *abscisic aldehyde oxidase*)

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

ABA-GE – ester glukozowy kwasu abscysynowego (ang. *abscisic acid glucosyl ester*)

ABF – czynniki transkrypcyjne rozpoznające sekwencje ABRE (ang. *ABRE binding factors*)

ABRE – elementy regulatorowe znajdujące się w promotorach genów związanych z odpowiedzią na kwas abscysynowy (ang. *ABA response elements*)

ACMA – 9-amino-6-chloro-2-metoksyakrydyna

AOG – glukozylotransferaza kwasu abscysynowego (ang. *glucosylotransferase*)

AREB – czynniki transkrypcyjne rozpoznające sekwencje ABRE (ang. *ABA-responsive element binding protein*)

ATP – adenozynotrifosforan

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

BNF – biologiczne wiązanie azotu (ang. *biological nitrogen fixation*)

BSA – surowicza albumina bydlęca (ang. *Bovine serum albumine*)

BY2 – *Nicotiana tabacum* cv. *Bright Yellow 2*

CDPK – kinazy zależne od wapnia (ang. *calcium-dependent protein kinases*)

CE – elementy sprzęgające (ang. *coupling elements*)

CFP – białko niebieskiej fluorescencji (ang. *Cyan Fluorescent Protein*)

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

FDA – dioctan fluoresceiny (ang. *fluorescein diacetate*)

GFP – białko zielonej fluorescencji (ang. *Green Fluorescent Protein*)

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

HPLC/MS – wysokosprawna chromatografia cieczowa/ spektrometria mas (ang. *High Performance Liquid Chromatography/Mass Spectrometry*)

HUGO – Organizacja Genomu Ludzkiego (ang. *Human Genom Organisation*)

LC/ESI/MS – chromatograf cieczowy sprzężony ze spektrometrem mas z jonizacją przez elektrorozpraszanie (ang. *liquid chromatography/electrospray ionization/mass spectrometer*)

LEA – białka późnej embriogenezy (ang. *late embriogenesis abundant*)

LIC – metoda klonowania niezależna od ligacji (ang. *Ligation Independent Cloning*)

MATE – białka odpowiedzialne za wydzielanie leków i związków toksycznych (ang. *multidrug and toxic compound extrusion*)

mcBiFC – wielokolorowa dwucząsteczkowa komplementacja fluorescencji (ang. *multicolour Bimolecular Fluorescence Complementation*)

NBD – domena wiążąca nukleotydy białek ABC (ang. *nucleotide binding domain*)

NBF – rejon wiążący nukleotydy w obrębie domeny NBD (ang. *nucleotide binding fold, NBF*).

NCED – dioksygenaza 9-cis-epoksykarotenoidowa (ang. *9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase*)

NF – czynnik Nod (ang. *Nod Factor*)

NLS – sekwencja kierująca białko fuzyjne do jądra komórkowego (ang. *Nuclear Localization Sequence*)

OD – gęstość optyczna

PCR – reakcja łańcuchowa polimerazy (ang. *Polymerase Chain Reaction*)

PDR – białka plejotropowej oporności (ang. *pleiotropic drug resistance*),

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

PP2C – fosfatazy typu 2C (ang. *protein phosphatase 2C*)

PYR/RCAR – receptory kwasu abscysynowego (ang. *pyrabactin resistance/regulatory component of ABA receptor*)

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

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

SD – odchylenie standardowe (ang. *standard deviation*)

SDR – dehydrogenaza/reduktaza alkoholowa (ang. *short-chain dehydrogenase/reductase*)

SDS-PAGE – rozdzielanie elektroforetyczne białek w warunkach denaturujących (ang. *SDS-polyacrylamide Gel Electrophoresis*)

SnRK2 – kinazy serynowo-treoninowe typu 2s (ang. *SNF1-related protein kinase 2s*)

ssDNA – jednoniciowe DNA (ang. *single stranded DNA*)

TMD – domena transbłonowa białek ABC (ang. *transmembrane domain*)

UTR – region niepodlegający translacji (ang. *Untranslated Region*)

UV – promieniowanie ultrafioletowe

WBC – homolog białek ABC u *Drosophilla melanogaster*, których aktywność warunkuje barwę oczu (ang. *white-brown complex*)

WT – typ dziki (ang. *wild type*)

ZEP – epoksydaza zeaksantyny (ang. *zeaxanthin epoxidase*)

SPIS TREŚCI

1. WPROWADZENIE LITERATUROWE	14
1.1 Wstęp.....	14
1.2 <i>Medicago truncatula</i> jako roślina modelowa z rodziny bobowatych.....	15
1.3 Kwas abscysynowy.....	18
1.3.1 Wewnątrzkomórkowy szlak sygnałowy kwasu abscysynowego.....	21
1.3.2 Udział kwasu abscysynowego w odpowiedzi na stres suszy.....	23
1.3.3 Udział kwasu abscysynowego w spoczynku i kiełkowaniu nasion.....	26
1.4 Roślinne transportery ABC	27
1.4.1 Budowa białek ABC	27
1.4.2 Białka ABCG	28
1.4.3 Udział transporterów ABCG w dystrybucji kwasu abscysynowego	30
2. CEL PRACY	34
3. MATERIAŁY I METODY	35
3.1 Szczepy bakteryjne	35
3.2 Wektory	35
3.3 Materiał roślinny.....	37
3.4 Praca z bakteriami.....	37
3.4.1 Przygotowanie bakteryjnych komórek kompetentnych do elektroporacji	37
3.4.2 Transformacja komórek <i>Escherichia coli</i> oraz <i>Agrobacterium</i> metodą elektroporacji	38
3.4.3 Transformacja komórek <i>Escherichia coli</i> metodą szoku cieplnego	38
3.4.4 Przechowywanie konstrukcji genowych w bakteriach	39
3.5 Praca z materiałem roślinnym.....	39
3.5.1 Skaryfikacja i sterylizacja nasion <i>Medicago truncatula</i>	39
3.5.2 Uprawa roślin <i>Medicago truncatula</i> i <i>Arabidopsis thaliana</i>	40
3.5.3 Uprawa roślin <i>Medicago truncatula</i> w warunkach <i>in vitro</i>	41

3.5.4 Transformacja <i>Medicago truncatula</i> za pomocą bakterii <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	41
3.5.5 Propagacja transgenicznych korzeni włosowatych <i>Medicago truncatula</i>	43
3.5.6 Transformacja i regeneracja <i>Medicago truncatula</i> poprzez somatyczną embriogenezę	44
3.5.7 Inokulacja <i>Medicago truncatula</i> bakteriami symbiotycznymi <i>Sinorhizobium meliloti</i>	46
3.5.8 Izolacja oraz transformacja protoplastów <i>Arabidopsis thaliana</i>	47
3.5.9 Propagacja kultur kalusa <i>Nicotiana tabacum</i> BY2	49
3.5.10 Propagacja hodowli zawiesinowych komórek kalusa <i>Nicotiana tabacum</i> BY2 .	49
3.5.11 Ocena jakości hodowli zawiesinowych komórek <i>Nicotiana tabacum</i> BY2	49
3.5.12 Transformacja hodowli zawiesinowych komórek <i>Nicotiana tabacum</i> BY2 z wykorzystaniem <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	50
3.6 Izolacja frakcji błonowych i praca z materiałem białkowym.....	51
3.6.1 Izolacja frakcji błonowych z komórek <i>Nicotiana tabacum</i> BY2	51
3.6.2 Oznaczenie stężenia białka metodą Bradford	52
3.6.3 Ocena jakości wyizolowanej frakcji błonowej (test ACMA)	52
3.6.4 Rozdział elektroforetyczny białek w warunkach denaturujących	53
3.6.5 Elektrotransfer typu Semi-Dry (półsuchy)	54
3.6.6 Hybrydyzacja Western blot	54
3.7 Praca z kwasami nukleinowymi	55
3.7.1 Izolacja plazmidowego DNA z bakterii.....	55
3.7.2 Izolacja DNA z tkanek roślinnych.....	56
3.7.3 Izolacja całkowitego RNA z tkanek roślinnych	56
3.7.4 Ilościowa i jakościowa ocena preparatów DNA i RNA	57
3.7.5 Odwrotna transkrypcja.....	57
3.7.6 Analiza ekspresji genów <i>Medicago truncatula</i> metodą reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR, ang. <i>Polymerase Chain Reaction</i>).....	57

3.7.7 Analiza ekspresji genów <i>Medicago truncatula</i> metodą ilościowej reakcji PCR w czasie rzeczywistym	59
3.7.8 Przygotowanie konstrukcji genowych	61
3.7.9 Genotypowanie mutantów insercyjnych Tnt1	69
3.7.10 Identyfikacja wprowadzonego transgenu u <i>Medicago truncatula</i> metodą PCR .	70
3.8 Analiza przestrzenna aktywności promotorów <i>MtABCG</i>	71
3.9 Analiza lokalizacji subkomórkowej transporterów <i>MtABCG</i>	73
3.10 Dwucząsteczkowa komplementacja fluorescencji (BiFC)	73
3.11 Eksperymenty transportu kwasu abscysynowego	74
3.11.1 Transport kwasu abscysynowego w hodowlach zawieszinowych komórek <i>Nicotiana tabacum</i> BY2	74
3.11.2 Transport ³ H-ABA w pęcherzykach błonowych	77
3.11.3 Transport ³ H-ABA w nasionach <i>Medicago truncatula</i>	78
4. WYNIKI	80
4.1 Selekcja połowicznych białek ABCG potencjalnie zaangażowanych w transport kwasu abscysynowego	80
4.1.1 Analiza filogenetyczna	80
4.1.2 Profil ekspresji genów kodujących transportery <i>MtABCG</i> , potencjalnie zaangażowanych w transport kwasu abscysynowego	82
4.1.3 Określenie tkankowo-specyficznego wzoru ekspresji genów <i>MtABCG20</i> , <i>MtABCG26</i> , <i>MtABCG27</i> , <i>MtABCG29</i> w korzeniach <i>Medicago truncatula</i>	84
4.2 Analiza funkcjonalna transportera <i>MtABCG20</i>	84
4.2.1 Analiza ekspresji genu <i>MtABCG20</i>	85
4.2.2 Określenie lokalizacji subkomórkowej białka <i>MtABCG20</i>	88
4.2.3 Określenie zdolności transportera <i>MtABCG20</i> do tworzenia homo- lub heterodimerów	89
4.2.4 Transport kwasu abscysynowego przez <i>MtABCG20</i>	90
4.2.4.1 Transport radioaktywnie znakowanego kwasu abscysynowego (³ H-ABA) w pęcherzykach błonowych uzyskanych z komórek <i>Nicotiana tabacum</i> BY2	94

4.2.5 Zależność transportera MtABCG20 od wewnątrzkomórkowego szlaku sygnałowego kwasu abscysynowego.....	95
4.2.6 Analizy fenotypowe.....	96
4.2.6.1 Akumulacja radioaktywnie znakowanego kwasu abscysynowego (³ H-ABA) w nasionach <i>Medicago truncatula</i>	97
4.2.6.2 MtABCG20 reguluje proces kiełkowania nasion <i>Medicago truncatula</i>	98
4.2.6.3 MtABCG20 bierze udział w zmianach morfologii korzeni <i>Medicago truncatula</i>	100
5. DYSKUSJA	103
6. WNIOSKI.....	109
7. LITERATURA.....	110
8. ZAŁĄCZNIKI.....	120

1. WPROWADZENIE LITERATUROWE

1.1 Wstęp

Stresy abiotyczne, ograniczające produktywność roślin uprawnych, stanowią poważne zagrożenie dla rolnictwa i bezpieczeństwa żywnościowego całego świata (Reynolds i Tuberosa, 2008). Zapewnienie wystarczającej ilości pożywienia dla ludzi i zwierząt jest jednym z największych wyzwań gospodarczych XXI wieku. Liczba ludności na świecie wzrasta każdego roku, a według danych pochodzących ze światowych organizacji, w roku 2024 przekroczy 8 miliardów (Singh i wsp., 2013). Dodatkowo, przewidywane niekorzystne zmiany klimatyczne, takie jak wzrost średnich temperatur, fale upałów oraz zmniejszenie ilości opadów spowodują wzrost powierzchni obszarów suchych i półsuchych na świecie oraz w konsekwencji zasolenie gleby. Wnikliwe badania nad strategiami przystosowywania się roślin do zmieniającego się środowiska, wydają się być niezbędne do uzyskiwania nowych, odpornych odmian roślin użytkowych, charakteryzujących się lepszym plonowaniem na obecnie uprawianych ziemiach (Cominelli i wsp., 2013).

Rośliny posiadają swoisty system adaptacji do zmiennych warunków środowiskowych, w którym dużą rolę odgrywa precyzyjne współdziałanie hormonów roślinnych (Hirayama i Shinozaki, 2010). Hormony roślinne (fitohormony) to grupa organicznych związków chemicznych, które stanowią podstawę systemu komunikacji między komórkami. Fitohormony wywołują reakcję rośliny działając w bardzo niskich stężeniach od $\sim 10^{-6}$ do 10^{-5} mol/L (Simura i wsp., 2018). Do najważniejszych zidentyfikowanych hormonów roślinnych należą: auksyny, cytokininy, kwas abscysynowy, etylen, gibereliny, kwas jasmonowy, kwas salicylowy, strigolaktyny. Odpowiedni balans fitohormonów pomaga w (i) aklimatyzacji roślin do zmieniających się warunków środowiskowych, (ii) w efektywnym i selektywnym pobieraniu substancji dostępnych w podłożu oraz (iii) w nawiązywaniu interakcji z mikrosymbiontami. Każdy ze zidentyfikowanych fitohormonów zaangażowany jest w wiele różnych procesów fizjologicznych, w ściśle określonych warunkach i stadium rozwojowym rośliny. Fitohormony współdziałają ze sobą lub działają antagonistycznie, tworząc zaawansowaną sieć połączeń między szlakami sygnałowymi, a ich niskie stężenie w komórkach warunkuje wysoką czułość oraz szybkość działania. Prawidłowa gospodarka hormonalna jest kontrolowana przez biosyntezę, katabolizm, szlaki sygnałowe oraz precyzyjny transport (Wani i wsp., 2016).

1.2 *Medicago truncatula* jako roślina modelowa z rodziny bobowatych

Rośliny należące do rodziny bobowatych (łac. *Fabaceae*) są drugą co do wielkości grupą roślin uprawianych na świecie i stanowią podstawę wyżywienia ludzi i zwierząt (Benedito i wsp., 2008). Ich przedstawicielami są np. groch (łac. *Pisum sativum*), bób (łac. *Vicia faba*), lucerna siewna (łac. *Medicago sativa*), ciecierzycza (łac. *Cicer arietinum*), koniczyna (łac. *Trifolium sp.*), soja (łac. *Glycine max*) oraz łubin (łac. *Lupinus albus*) (Jasińska i Kotecki, 2003).

Charakterystyczną cechą roślin bobowatych jest zdolność nawiązywania interakcji z mikrosymbiontami. Do takich interakcji zaliczamy symbiozę z bakteriami z rodzaju *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium* (wspólnie nazywanych Rhizobiami), w efekcie której na częściach podziemnych rośliny powstają nowe struktury, nazywane brodawkami korzeniowymi (Benedito i wsp., 2008). Rhizobia posiadają naturalną zdolność redukcji azotu atmosferycznego (N₂) do amoniaku (NH₃), w procesie nazywanym biologicznym wiązaniem azotu (ang. *biological nitrogen fixation*, BNF). Szacuje się, że całkowite wiązanie N₂ na świecie w procesie BNF wynosi 100-290 Tg N/rok (1Tg=10¹²g), w tym około 50-70 Tg N/rok stanowi azot wiązany w uprawach rolniczych (Stasiak i wsp., 2016). Uprawa roślin bobowatych w naturalny sposób wpływa na podniesienie jakości ziemi rolnej przez wzbogacanie gleby w łatwo przyswajalne formy azotu. Takie uprawy ograniczają stosowanie nawozów sztucznych, które zanieczyszczają glebę, wody powierzchniowe i głębinowe doprowadzając do ich eutrofizacji (Rose, 2008). Symbioza *Fabaceae* z bakteriami brodawkowymi jest dodatnio skorelowana z wysoką zawartością białka w nasionach (20-50% suchej masy), dlatego powszechnie wykorzystuje się rośliny bobowate do produkcji pasz i koncentratów dla zwierząt, o dobrze zbilansowanym składzie aminokwasowym (Jasińska i Kotecki, 2003).

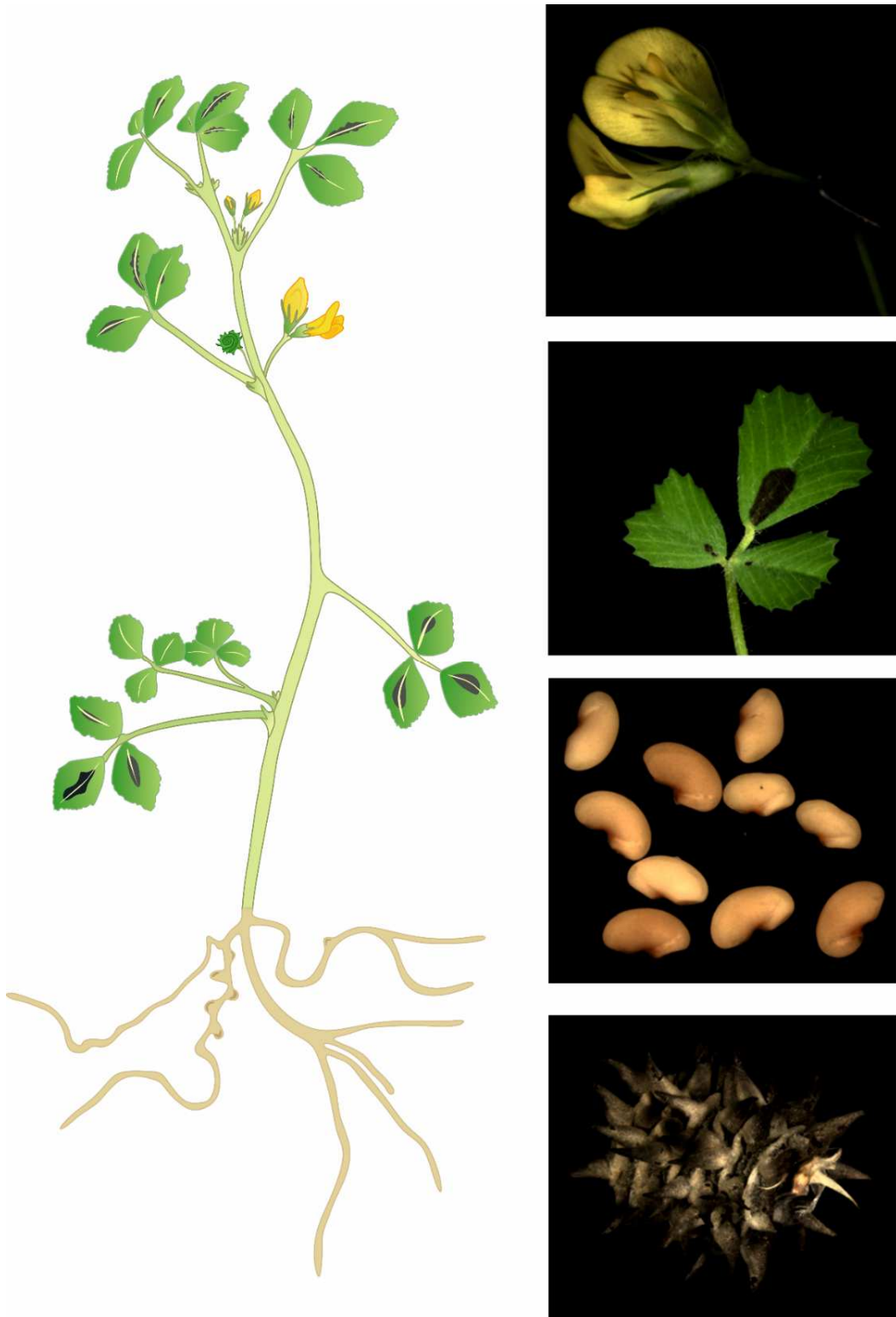
Innym przykładem interakcji, w której uczestniczą rośliny bobowate, jest mikoryza arbuskularna z grzybami należącymi do gromady *Glomeromycota*. Produkowane przez rośliny flawonoidy stymulują kiełkowanie spor grzybów. Strzępki grzybów, za sprawą strigolaktonów, rozrastają się pomiędzy komórkami korzenia, a następnie przedostają się przez ścianę komórek kory i tworzą specjalnie rozgałęzione struktury, nazywane arbuskulami. Przez arbuskule dostarczane są do rośliny głównie związki azotu i fosforu pobrane przez grzybnię (Oldroyd, 2013; Stec i wsp., 2016).

Modelową rośliną bobowatą wykorzystywaną w badaniach podstawowych jest *Medicago truncatula* (ang. *barrel medic*; Ryc. 1.1). *M. truncatula* jest rośliną

jednoroczną, pochodzącą z basenu Morza Śródziemnego, Półwyspu Arabskiego, Iraku oraz terenów wschodnich Bałkanów (Kang i wsp., 2016; Maureira-Butler i wsp., 2008), obecnie powszechnie uprawianą w Australii. Charakteryzuje się stosunkowo niewielkimi wymaganiami uprawy, takimi jak oświetlenie, temperatura oraz skład podłoża, w porównaniu do innych roślin bobowatych. *M. truncatula* jest rośliną samopylną, co zapewnia niewielką zmienność genetyczną, a jej rozwój wegetatywny trwa około 12 tygodni. Dorosła roślina o pokroju płozącym lub wzniesionym osiąga wysokość 10-60 cm. Liście ułożone są na łodydze spiralnie, trójlistkowe, o owalnym kształcie z antocyjanowymi plamkami po środku i ząbkowanym brzegiem. Żółte kwiaty posiadają charakterystyczną budowę dla roślin bobowatych, czyli motylkowatą koronę składającą się z płatków określanych jako żagielek, skrzydełka (wioselka) oraz łódeczka. Roślina wytwarza owoce w postaci kolczastych strąków, wewnątrz których znajduje się 4-14 spiralnie ułożonych nasion, o nerkowatym kształcie. Nasiona przechodzą okres spoczynku przez około 3 miesiące. Istnieje kilkaset ekotypów *M. truncatula*, różniących się między sobą anatomią, specyficznością oddziaływań z mikrosymbiontami oraz podatnością na atak patogenów. W pracy laboratoryjnej największe zastosowanie znalazły ekotypy Jemalong J5/A17, R-108. Najczęściej wykorzystywanymi partnerami symbiotycznymi *M. truncatula* są bakterie brodawkowe *Sinorhizobium meliloti* oraz grzyby mikorytyczne *Glomus intraradices* (Bednarska i Borucki, 2012; Hoffmann i wsp., 1997).

M. truncatula jest rośliną diploidalną (w 2011 roku ukończono projekt sekwencjonowania genomu), której genom składa się z ~375 Mbp ułożonych na 8 chromosomach ($2n=16$) i jest blisko dwukrotnie mniejszy od genomu *M. sativa* (Kang i wsp., 2016; Young i wsp., 2011). Jednym z kryteriów wybrania *M. truncatula* jako rośliny modelowej jest stosunkowa łatwość pracy *in vitro* oraz jej transformacji z wykorzystaniem różnych szczepów *Agrobacterium tumefaciens* oraz *Agrobacterium rhizogenes* (Wang i wsp., 1996). Metodyka transformacji jest dobrze opisana w wielu protokołach i często nie wymaga stadium kultur tkankowych. Regenerację roślin przeprowadza się stosując somatyczną embriogenezę, kulturę zarodków lub bezpośrednią organogenezę (Thomas i wsp., 1992). Obecnie dostępnych jest wiele baz danych dostarczających informacji z zakresu: biologii, hodowli i transformacji (<https://www.noble.org/medicago-handbook/>); ekspresji genów i danych mikromacierzowych (<https://mtgea.noble.org/v3/>); populacji mutantów insercyjnych

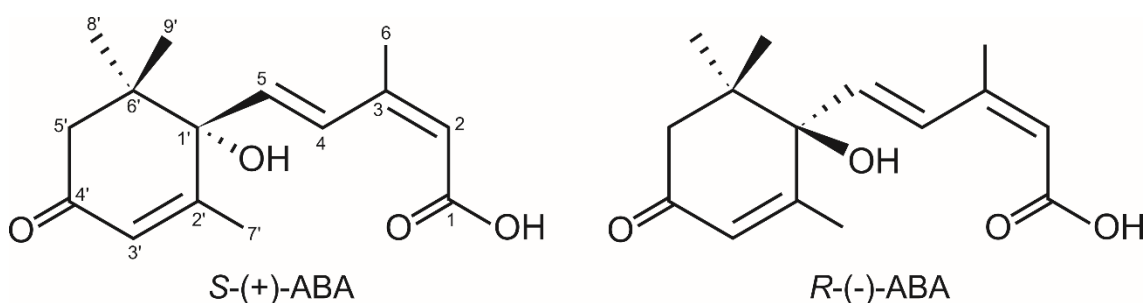
(<https://medicago-mutant.noble.org/mutant/database.php>) oraz szlaków metabolicznych (<http://www.plantcyc.org/typeofpublication/mediccyc>) *M. truncatula*.



Ryc. 1.1 *Medicago truncatula* – roślina w stadium wegetatywnym, kwiat, liść, nasiona i owoc.
Rys., fot. dr K. Jarzyniak, mgr M. Wojnicka.

1.3 Kwas abscysynowy

Kwas abscysynowy (ang. *abscisic acid*, ABA) jest jednym z hormonów roślinnych, odpowiedzialnym głównie za adaptację roślin do zmieniających się warunków środowiska oraz jakość produkowanych nasion, czyli kluczowe procesy mające znaczenie podczas uprawy roślin użytkowych (Yoshida i wsp., 2019). ABA należy do grupy terpenów zbudowanych z trzech jednostek izoprenowych (seskwiterpeny), zawierających 15 atomów węgla i 24 atomy wodoru (C₁₅H₂₄). W strukturze ABA znajduje się pierścień sześciowęglowy, w którym przy węglu C1' tworzy się centrum chiralne cząsteczki. Dlatego podczas syntezy kwasu abscysynowego otrzymywane są dwa enancjomery *S*-(+)-ABA i *R*-(-)-ABA (Ryc. 1.2), przy czym w środowisku naturalnym występuje tylko konfiguracja *S*-(+)-ABA (Cornforth i wsp., 1965; Harada, 1973).



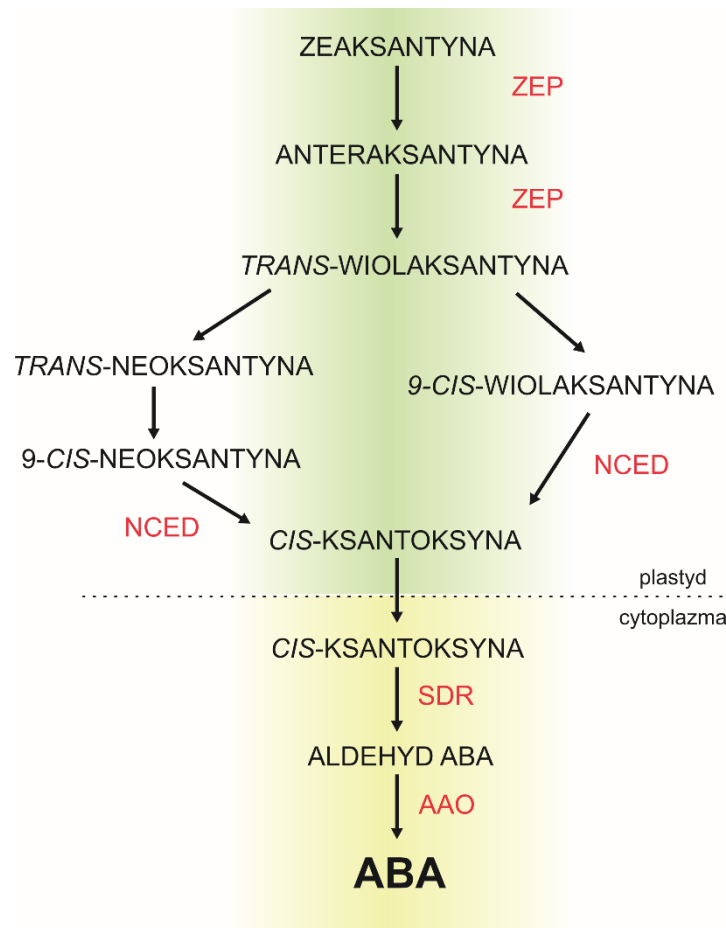
Ryc. 1.2 Wzory chemiczne dwóch enancjomerów kwasu abscysynowego: *S*-(+)-ABA oraz *R*-(-)-ABA.

Dzięki obecności grupy karboksylowej na końcu łańcucha bocznego, ABA przyjmuje właściwości słabego kwasu, którego p*K*_a wynosi 4,7 (Kramer, 2006). W wyższym pH (>4,7) wodór ulega dysocjacji od grupy karboksylowej i powstaje forma zjonizowana ABA⁻. Natomiast w niższym pH (<4,7) kwas abscysynowy występuje w formie uprotonowanej (ABA-H), która posiada właściwości lipofilowe, co ułatwia przenikanie ABA przez błony biologiczne na drodze biernej dyfuzji. Końcowe etapy biosyntezy kwasu abscysynowego mają miejsce w cytozolu, którego pH utrzymuje się w przedziale 7,2-7,4. W cytozolu zdecydowana większość ABA występuje w formie ABA⁻, dlatego konieczne jest występowanie specyficznych transporterów umożliwiających eksport kwasu abscysynowego na zewnątrz komórki. Po wydostaniu się z komórki ABA trafia do apoplastu, gdzie pH oscyluje w przedziale 5,0-6,0. W apoplaste pH jest niższe niż w cytozolu, dlatego część cząsteczek może przyjmować

formę ABA-H i przez dyfuzję wnikać do wnętrza komórek. W sytuacji stresu suszy, pH apoplastu wzrasta do wartości $\sim 7,0$, co powoduje zapotrzebowanie na swoiste importery kwasu abscysynowego w komórkach docelowych (Hartung i wsp., 2002; Wilkinson i Davies, 2002).

Na zawartość fitohormonu w poszczególnych tkankach/komórkach wpływa przede wszystkim tempo jego biosyntezy/degradacji, transport oraz tworzenie nieaktywnych pochodnych, głównie estrowych.

Biosynteza ABA rozpoczyna się w plastydach i może odbywać się zarówno w częściach nadziemnych (Kuromori i wsp., 2014) jak i podziemnych (Ernst i wsp., 2010; Merilo i wsp., 2018) rośliny (Ryc. 1.3). Szlak biosyntezy ABA zapoczątkowuje reakcja pirogronianu z aldehydem 3-fosfoglicerynowym. W konsekwencji kolejnych przemian, charakterystycznych dla syntezy seskwiterpenów, powstaje likopen, β -karoten, a ostatecznie zeaksantyna, która jest bezpośrednim prekursorem ABA. Zeaksantyna, przy pomocy epoksydazy zeaksantyny (ang. *zeaxanthin epoxidase*, ZEP), jest przekształcana w *trans*-wiołaksantynę. Końcowym etapem biosyntezy ABA zachodzącej w plastydach jest konwersja *trans*-wiołaksantyny do 9-*cis*-wiołaksantyny lub 9'-*cis*-neoksantyny, a następnie ich przekształcenie w *cis*-ksantoksynę, przy pomocy dioksygenazy 9-*cis*-epoksykarotenoidowej (ang. *9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase*, NCED). Kolejne etapy biosyntezy ABA mają miejsce w cytoplazmie. Ksantoksyna podczas reakcji redukcji, katalizowanej przez dehydrogenazę/reduktazę alkoholową (ang. *short-chain dehydrogenase/reductase*, SDR), przekształca się w aldehyd kwasu abscysynowego. W ostatniej reakcji, przy pomocy oksydazy (ang. *abscisic aldehyde oxidase*, AAO), aldehyd abscysynowy zostaje utleniony do kwasu abscysynowego (Frankowski i wsp., 2013; Hauser i wsp., 2011; North i wsp., 2007; Seiler i wsp., 2011).



Ryc. 1.3 Szlak biosyntezy kwasu abscysynowego. Szczegółowy opis w tekście (wg Frankowski i wsp., 2013; zmodyfikowane).

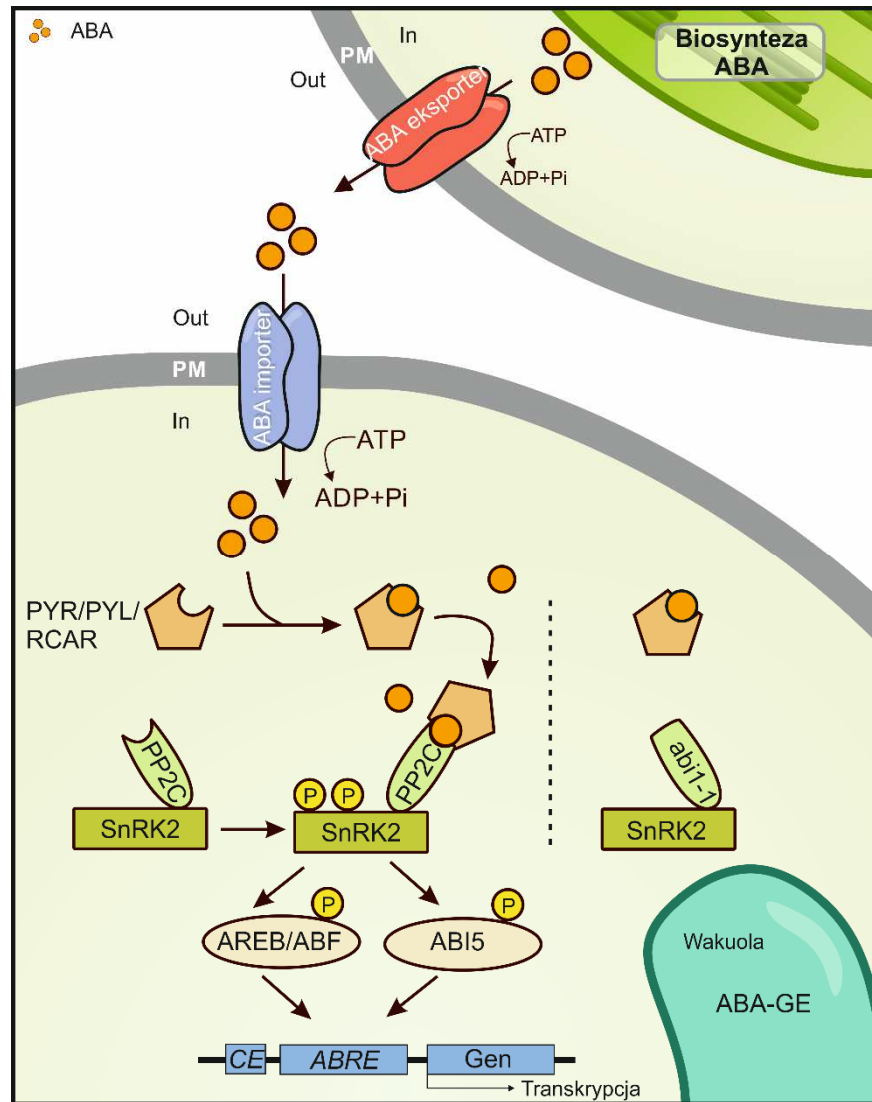
Na podstawie badań aktywności enzymów biorących udział w końcowych etapach biosyntezy ABA, takich jak SDR oraz AAO określono, że kwas abscysynowy jest biosyntetyzowany w komórkach towarzyszących łyka, w wiązce przewodzącej (Kuromori i wsp., 2014). Po syntezie, ABA jest eksportowany z komórek wiązki przewodzącej do komórek docelowych m. in. komórek przyszparkowych, gdzie wywołuje swoiste zmiany fizjologiczne (Kuromori i wsp., 2010). W przypadku obniżenia wilgotności powietrza, biosynteza ABA może zachodzić także bezpośrednio w komórkach przyszparkowych, powodując ich zamknięcie (Bauer i wsp., 2013). W nasionach ABA może być biosyntetyzowany zarówno w bielmie jak i zarodku, w zależności od etapu rozwoju oraz aktywności nasiona (Bethke i wsp., 2007; Topham i wsp., 2017).

Kwas abscysynowy po połączeniu z glukozą (ang. *abscisic acid glucosyl ester*, ABA-GE), na drodze reakcji katalizowanej przez glukozylotransferazę (ang. *glucosylotransferase*, AOG), tworzy pewien stały rezerwuar hormonu zgromadzony

w wakuolach komórek roślinnych. Forma ABA-GE nie wykazuje aktywności fizjologicznej, jednak w odpowiedzi na dehydratację zostaje uwolniona do cytoplazmy, gdzie przy udziale β -glukozydaz przekształcana jest w aktywną formę ABA (Burla i wsp., 2013). Wykorzystanie przez organizmy roślinne zapasów ABA zakumulowanych w postaci ABA-GE jest jedną z pierwszych reakcji obronnych na niekorzystne warunki środowiska. Dzięki wykorzystaniu technik chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas, zmieniającą się ilość ABA-GE zaobserwowano również w dojrzewających oraz kiełkujących nasionach (Chiwocha i wsp., 2003).

1.3.1 Wewnątrzkomórkowy szlak sygnałowy kwasu abscysynowego

Obecność kwasu abscysynowego w komórkach efektorowych uruchamia wewnątrzkomórkowy szlak sygnałowy (Ryc. 1.4), w który zaangażowane są trzy główne grupy białek: receptory PYR/RCAR (ang. *pyrabactin resistance/regulatory component of ABA receptor*), fosfatazy typu 2C (ang. *protein phosphatase 2C*, PP2C) oraz kinazy serynowo-treoninowe typu 2s (ang. *SNF1-related protein kinase 2s*, SnRK2) (Yoshida i wsp., 2019). Fosfataza PP2C funkcjonuje jako negatywny regulator szlaku, wyłączając aktywność kinazy SnRK2. W pierwszej kolejności ABA łączy się z receptorem cytoplazmatycznym należącym do rodziny białek PYR/RCAR, tworząc kompleks, który wiąże się do fosfatazy. Po związaniu kompleksu receptora PYR/RCAR z ABA do fosfatazy PP2C następuje odblokowanie aktywności kinazy SnRK2 i umożliwienie fosforylacji docelowych białek (Ma i wsp., 2009; Mitula i wsp., 2015; Umezawa i wsp., 2010). Trzy klasy białek (receptory, fosfatazy i kinazy) zaangażowane w wewnątrzkomórkowy szlak sygnałowy ABA należą do rodzin wielogenowych. Badania wykorzystujące odwrotną genetykę, przeprowadzone głównie na *A. thaliana*, pozwoliły określić geny specyficznym zaangażowane w odpowiedź komórkową, indukowaną przez ABA. Jednym z ważnych zidentyfikowanych genów jest *ABII* (ang. *ABA-insensitive 1*), kodujący fosfatazę PP2C (Nguyen i wsp., 2019). Rośliny z dysfunkcją genu *ABII* wykazują niewrażliwość na kwas abscysynowy w różnych tkankach i stadiach rozwojowych rośliny. Mutacja punktowa w sekwencji kodującej domenę katalityczną fosfatazy, która powoduje zamianę aminokwasu glicyny na asparaginian powoduje zaburzenie w wiązaniu fosfatazy z kompleksem receptora PYR/RCAR i ABA, a w konsekwencji brak możliwości fosforylacji kinazy SnRK2. Mutanty *abi1-1* są szeroko stosowane w badaniach nad sygnalizacją oraz translokacją ABA (Krzywinska i wsp., 2016; Leung i wsp., 1994).



Ryc. 1.4 Wewnątrzkomórkowy szlak sygnałowy kwasu absycynowego. Szczegółowy opis w tekście.

Zwiększenie ilości kwasu absycynowego w komórkach docelowych oraz uruchomienie szlaku sygnałowego skutkuje aktywacją/fosforylacją czynników transkrypcyjnych genów, których ekspresja jest indukowana przez ABA zarówno w tkankach wegetatywnych jak i nasionach. Do genów indukowanych kwasem absycynowym związanych z odpowiedzią i tolerancją na stres suszy zaliczane są między innymi geny kodujące białka późnej embriogenezy, kinazy i fosfatazy białkowe, transportery, enzymy zaangażowane w syntezę osmoprotektantów, sygnalizację fosfolipidów, metabolizm kwasów tłuszczowych i węglowodanów (Dekkers i wsp., 2015; Kuromori i wsp., 2018). Warto pamiętać, że ABA w niekorzystnych warunkach środowiskowych wpływa także na inhibicję czynników transkrypcyjnych genów, których ekspresja skutkowałaby wysokim zapotrzebowaniem energetycznym, czyli np. genów

zaangażowanych we wzrost i rozwój rośliny (Kempa i wsp., 2008). Szacuje się, że u *Arabidopsis thaliana* ekspresja blisko 10% genów kodujących białka jest regulowana przez kwas abscysynowy. Wykazano, że ABA wpływa na znacznie większy podzbiór genów niż inne hormony roślinne (Nemhauser i wsp., 2006). Czynniki transkrypcyjne aktywowane przez szlak sygnałowy ABA zawierają regiony AREB (ang. *ABA-responsive element binding protein*) oraz ABF (ang. *ABRE binding factors*), które oddziałują z promotorami genów związanych z odpowiedzią na kwas abscysynowy zawierającymi tzw. sekwencje ABRE (ang. *ABA response elements*; PyACGTGG/TC) (Liu i wsp., 2019). Zasadniczo pojedynczy motyw ABRE nie jest wystarczający, aby wywołać indukcję transkrypcji zależną od ABA. Skuteczna ekspresja genu wymaga dodatkowych kopii ABRE, albo elementów sprzęgających (ang. *coupling elements*, CE). Ponadto wydaje się, że motywy te muszą znajdować się w pobliżu miejsca rozpoczęcia transkrypcji genów (Berendzen i wsp., 2006). Badania przeprowadzone na *A. thaliana* wykazały, że w nasionach głównymi czynnikami transkrypcyjnymi, rozpoznającymi sekwencje ABRE, są białka z rodziny ABI5 (ang. *ABA-insensitive5*), które wpływają na ekspresję genów zaangażowanych w dojrzewanie i kiełkowanie nasion (Bensmihen i wsp., 2005; Fujita i wsp., 2011).

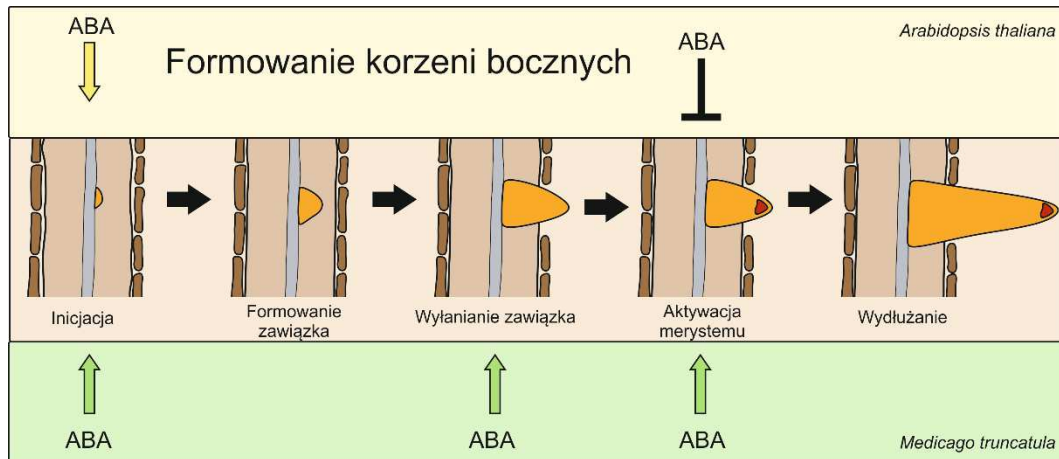
1.3.2 Udział kwasu abscysynowego w odpowiedzi na stres suszy

Kwas abscysynowy uważany jest za jedną z najważniejszych molekuł sygnałowych regulującą odpowiedź obronną roślin na suszę. Działanie ABA zaobserwowano już na bardzo wczesnych etapach niedoboru wody w podłożu i/lub przy zmniejszeniu wilgotności powietrza, oraz podczas długotrwałego stresu suszy (Jarzyniak i Jasinski, 2014).

Jednym z pierwszych mechanizmów obronnych uruchamianym przez ABA (tzw. odpowiedź szybka) jest zamykanie aparatów szparkowych i ograniczenie transpiracji. Proces ten opiera się na kontroli gospodarki jonowej komórek przyszparkowych. Usunięcie jonów NO_3^- , Cl^- , SO_4^{2-} , K^+ i napływ jonów Ca^{2+} do komórek powoduje zwiększenie ciśnienia osmotycznego i aktywuje działanie akwaporyn. Uruchomienie akwaporyn PIP (ang. *Plasma Membrane Intrinsic Protein*) prowadzi do utraty wody z komórek szparkowych, czyli zmniejszenia ich turgoru i zamknięcia aparatu szparkowego (Groszmann i wsp., 2017). Zaobserwowano, że ABA uczestniczy w aktywacji kanałów jonowych, akwaporyn i transporterów jonów wpływających na zamknięcie aparatów szparkowych w stresie suszy. U *A. thaliana* kluczową rolę w tym

procesie odgrywa kinaza SnRK2.6/OST1 (ang. *Open Stomata1*) będąca elementem wewnątrzkomórkowego szlaku uruchamianego przez ABA. Kinaza OST1 fosforyluje transportery potasu z grupy HAK/KUP (Osakabe i wsp., 2014) oraz kanał KAT1, które wspomagają usuwanie jonów K^+ z komórek przyszparkowych (Sato i wsp., 2009). Uruchomienie kinaz ze szlaku sygnałowego ABA, które fosforylują oksydazy NADPH, powoduje nadprodukcję reaktywnych form tlenu (ang. *reactive oxygen species*, ROS). Podwyższony poziom ROS wpływa na zwiększenie stężenia, jonów Ca^{2+} w komórkach aparatów szparkowych (Roelfsema i Hedrich, 2010). W towarzystwie jonów Ca^{2+} , kinazy aktywowane ABA z grupy SnRK2 uruchamiają kinazy zależne od wapnia (ang. *calcium-dependent protein kinases*, CDPK) (Brandt i wsp., 2015). W tym przypadku kinazy CDPK wpływają na działanie kanałów jonowych, co prowadzi do depolaryzacji błony i wypompowania wody przez akwaporyny z komórek przyszparkowych.

Podczas utrzymującego się niedoboru wody, ABA uruchamia mechanizmy indukujące wzrost wydłużeniowy i podziały komórek korzeni, skutkujące zmianami ich architektury (tzw. odpowiedź późna) (Bao i wsp., 2014; Sozzani i Iyer-Pascuzzi, 2014). W zmianach tych istnieją różnice międzygatunkowe (Ryc. 1.5). Przykładowo u *A. thaliana*, z palowym systemem korzeniowym, następuje wydłużenie korzenia głównego w celu pobierania wody z głębszych warstw gleby (Vilches-Barro i Maizel, 2015). Inną strategię przyjmują rośliny z wiązkowym systemem korzeniowym, do których możemy zaliczyć m. in. *M. truncatula*. W tym przypadku ABA indukuje wzrost korzeni bocznych i zwiększenie powierzchni chłonnej (Ariel i wsp., 2010; Harris, 2015). Podstawowa różnica w procesie powstawania korzeni bocznych *A. thaliana* i *M. truncatula* zachodzi na etapie aktywacji merystemu korzeni bocznych. U *M. truncatula* ABA utrzymuje aktywność komórek merystematycznych, wpływa na ich proliferację oraz wzrost wydłużeniowy (Ryc. 1.5) (Harris, 2015). Szlak sygnałowy uruchamiany przez ABA prowadzi do ekspresji m.in. genów *RBOH* (ang. *respiratory burst oxidase homolog*) kodujących oksydazy NADPH (Zhang i wsp., 2014a). Obecność oksydaz w strefie wzrostu korzenia na długość skutkuje zmniejszeniem akumulacji reaktywnych form tlenu i zwiększeniem objętości nowopowstałych, różnicujących się komórek korzenia (Harris, 2015). U *A. thaliana* wysoki poziom azotanów oraz ABA blokuje aktywację nowopowstałych merystemów, zatrzymując wzrost pojawiających się korzeni bocznych (Harris, 2015).



Ryc. 1.5 Formowanie korzeni bocznych pod wpływem działania ABA w stresie suszy u *A. thaliana* i *M. truncatula* (Harris, 2015).

U roślin bobowatych, kwas abscysynowy działa także hamująco na proces zawiązywania symbiozy z bakteriami z rodziny *Rhizobium* (posiadającymi naturalną zdolność redukcji azotu atmosferycznego do amoniaku). W sytuacji niedoboru azotu, rośliny wydzielają do ryzosfery flawonoidy, które są rozpoznawane przez określone gatunki bakterii symbiotycznych. W odpowiedzi, mikrosymbionty uruchamiają transkrypcję genów *nod* (ang. *nodulation*), umożliwiając syntezę bakteryjnych cząstek sygnałowych – czynników Nod (ang. *Nod Factor*, NF) (Limpens i wsp., 2015). Czynniki Nod są to lipochitooligosacharydy, które po dotarciu w okolice włosników korzeniowych, zostają rozpoznawane przez zlokalizowane w błonie komórkowej roślinne receptory czynnika Nod, takie jak np. MtLYK3/MtNFP (Zipfel i Oldroyd, 2017). Związanie NF z receptorem skutkuje zmianami wewnątrzkomórkowego stężenia jonów wapnia (Ca^{2+}) i aktywacją kinazy białkowej MtDMI3. Kinaza białkowa MtDMI3 fosforyluje czynniki transkrypcyjne odpowiedzialne za ekspresję genów symbiotycznych, tzw. nodulin (Limpens i wsp., 2015; Zipfel i Oldroyd, 2017). Zaobserwowano, że egzogenna aplikacja ABA/niedobór wody powoduje zmniejszenie liczby brodawek korzeniowych u *M. truncatula* (Ding i wsp., 2008), *Trifolium repens* (Suzuki i wsp., 2004), *Lotus japonicus* (Biswas i wsp., 2009). ABA hamuje infekcję bakteryjną przez oddziaływanie na NF, co wpływa na gospodarkę jonów Ca^{2+} oraz zmniejsza ekspresję genów wczesnych nodulin takich jak *ENOD11* i *RIP1* (Ding i wsp., 2008; Zipfel i Oldroyd, 2017). Równoległe do procesów zachodzących pod wpływem NF w ryzodermie, w komórkach kory pierwotnej dochodzi do formowania zawiązka brodawki korzeniowej z udziałem

cytokinin. Kwas abscysynowy reguluje biosyntezę cytokinin, hamując podziały komórkowe w korze pierwotnej. Warto zauważyć, iż mutanty *M. truncatula* z zaburzonym szlakiem sygnałowym ABA (*abi1-1*) przejawiały hipernodulację, w przeciwieństwie do mutantów wrażliwych na ABA (*sta1*), u których zaobserwowano redukcję liczby powstających brodawek (Ding i wsp., 2008). Regulacja procesu brodawkowania przez ABA zachodzi na bardzo wczesnych etapach i ma na celu ograniczenie powstawania nowych brodawek korzeniowych w sytuacji stresu suszy.

1.3.3 Udział kwasu abscysynowego w spoczynku i kiełkowaniu nasion

Wytwarzanie nasion przez rośliny jest adaptacją do życia w środowisku lądowym. Dojrzałe nasiona są utrzymywane w stanie spoczynku do momentu zaistnienia sprzyjających czynników, w których roślina będzie mogła rozpocząć swój okres wegetatywny. Kwas abscysynowy jest kluczowym hormonem koordynującym procesy uśpienia i kiełkowania nasion (Chahtane i wsp., 2017). Mutanty niezdolne do syntezy ABA lub z zaburzoną sygnalizacją ABA nie rozwijają dojrzałych nasion. Niedojrzałe nasiona nie mogą zostać wprowadzone w stan spoczynku, dlatego zarodki wspomnianych mutantów pozostają zielone, są mniej odporne na wysychanie i charakteryzują się przedwczesnym kiełkowaniem (Delmas i wsp., 2013). Stwierdzono, że nasiona z zaburzoną syntezą/percepcją ABA mają niski poziom białek późnej embriogenezy (ang. *late embriogenesis abundant*, LEA) oraz związków magazynujących (Dekkers i wsp., 2015). Kwas abscysynowy jest biosyntetyzowany w nasionach zarówno w endospermie, jak i w zarodku. Uważa się, że podczas końcowych etapów dojrzewania nasion dużą rolę odgrywa ABA pochodzący z zarodka. Jednak wprowadzenie nasion w stan spoczynku związane jest z utrzymywaniem wysokiego stężenia ABA pochodzącego z endospermy (Bethke i wsp., 2007). Oddzielenie łupin nasiennych i endospermy od zarodków dojrzałych nasion skutkuje przyspieszonym kiełkowaniem, co potwierdza udział endospermy w utrzymywaniu uśpienia nasion (Kang i wsp., 2015). Co więcej, ABA hamuje przedwczesne kiełkowanie nasion, które nie zostały wprowadzone w stan spoczynku. Pokazano, że podczas imbibicji nieuśpionych nasion poziom ABA utrzymuje się na wysokim poziomie, w przeciwieństwie do uśpionych nasion, w których po napęcznieniu poziom ABA maleje (Ali-Rachedi i wsp., 2004). Ponadto, zaobserwowano, że traktowanie nasion norflurazonem lub fluridonem, inhibitorami syntezy ABA, powoduje kiełkowanie uśpionych nasion (Lee i wsp., 2010). Usunięcie ABA z zarodka, głównie regionu pomiędzy wierzchołkiem korzenia zarodkowego,

a hipokotylem umożliwia zapoczątkowanie procesu kiełkowania. To właśnie lokalne zmiany ilości ABA w korzeniu zarodkowym, regulowane tempem biosyntezy, degradacji i precyzyjnym transportem tego hormonu, warunkują przebicie okrywy nasiennej (Topham i wsp., 2017). Degradacja ABA jest indukowana m. in. pojawieniem się antagonistycznego fitohormonu, kwasu giberelinowego (Gimeno-Gilles i wsp., 2009).

1.4 Roślinne transportery ABC

Transportery ABC (ang. *ATP-binding cassette*) są powszechnie występującymi białkami u wszystkich organizmów żywych. Wspólną cechą wszystkich transporterów ABC jest wykorzystywanie energii hydrolizy wiązania pomiędzy resztami fosforanowymi w ATP, do translokacji molekuł poprzez błony biologiczne, wbrew gradientowi stężeń. Białka ABC biorą udział w transporcie szeregu różnych związków, m. in. aminokwasów, peptydów, lipidów, cukrów (Kang i wsp., 2011). W porównaniu z innymi organizmami, genomy roślin lądowych zawierają dużą liczbę genów kodujących białka ABC. Genom *A. thaliana* ma ich 130, genom ryżu (*Oryza sativa*) 133 i jest to liczba o wiele większa, niż przykładowo u człowieka 49, czy myszy 53 (Hwang i wsp., 2016). Pierwsze roślinne białka ABC zidentyfikowano jako wakuolarnie transportery ksenobiotyków (Martinoia i wsp., 1993). Do tej pory stwierdzono, że transportery ABC uczestniczą w wielu podstawowych procesach fizjologicznych roślin, takich jak odżywianie, rozwój, reakcje na stres biotyczny i abiotyczny oraz interakcje ze środowiskiem zewnętrznym (Do i wsp., 2018).

1.4.1 Budowa białek ABC

Transportery ABC charakteryzują się modularnym typem budowy oraz obecnością silnie zachowawczego regionu odpowiedzialnego za wiązanie ATP. W ich budowie można wyróżnić dwa rodzaje domen: cytozoolową (ang. *nucleotide binding domain*, NBD) oraz transbłonową (ang. *transmembrane domain*, TMD) (Ryc. 1.6A). W większości przypadków transporter zbudowany jest z dwóch domen TMD, oraz dwóch domen NBD. Wyróżniamy pełne transportery ABC (ang. *full-size*), w których wszystkie cztery domeny zawarte są w jednym polipeptydzie oraz połowiczne transportery ABC (ang. *half-size*), zawierające w polipeptydzie po jednej domenie TMD i NBD. Połowiczne białka ABC tworzą dimery (homodimery lub heterodimery). Domena NBD zawiera silnie zachowawczy rejon odpowiedzialny za wiązanie ATP (ang. *nucleotide binding fold*, NBF). NBF posiada charakterystyczne motywy określane jako

Walker A i Walker B, które są rozdzielone tzw. sygnaturą ABC (Ryc. 1.6B) (Lefevre i Boutry, 2018; van den Brule i Smart, 2002; Walker i wsp., 1982). Domena TMD jest hydrofobowa i odpowiada za wiązanie i przenoszenie molekuł przez błony biologiczne. Bardzo często domena TMD zbudowana jest z 6 α -helis zakotwiczonych w błonie, jednak w przeciwieństwie do domeny NBD, domeny TMD wykazują duże zróżnicowanie sekwencyjne nawet w obrębie jednego organizmu. Dlatego domena TMD najprawdopodobniej wpływa na specyficzność substratów białek ABC (Verrier i wsp., 2008). Ze względu na wzajemne ułożenie domen w jednym polipeptydzie, wyróżniamy białka ABC o orientacji wprost (ang. *forward*), gdzie na końcu aminowym znajduje się domena transbłonowa, oraz o orientacji odwróconej (ang. *reverse*), gdy na końcu aminowym ulokowana jest domena wiążąca ATP (Ryc. 1.6B) (Jasinski i wsp., 2003; Kang i wsp., 2011; Sanchez-Fernandez i wsp., 2001).

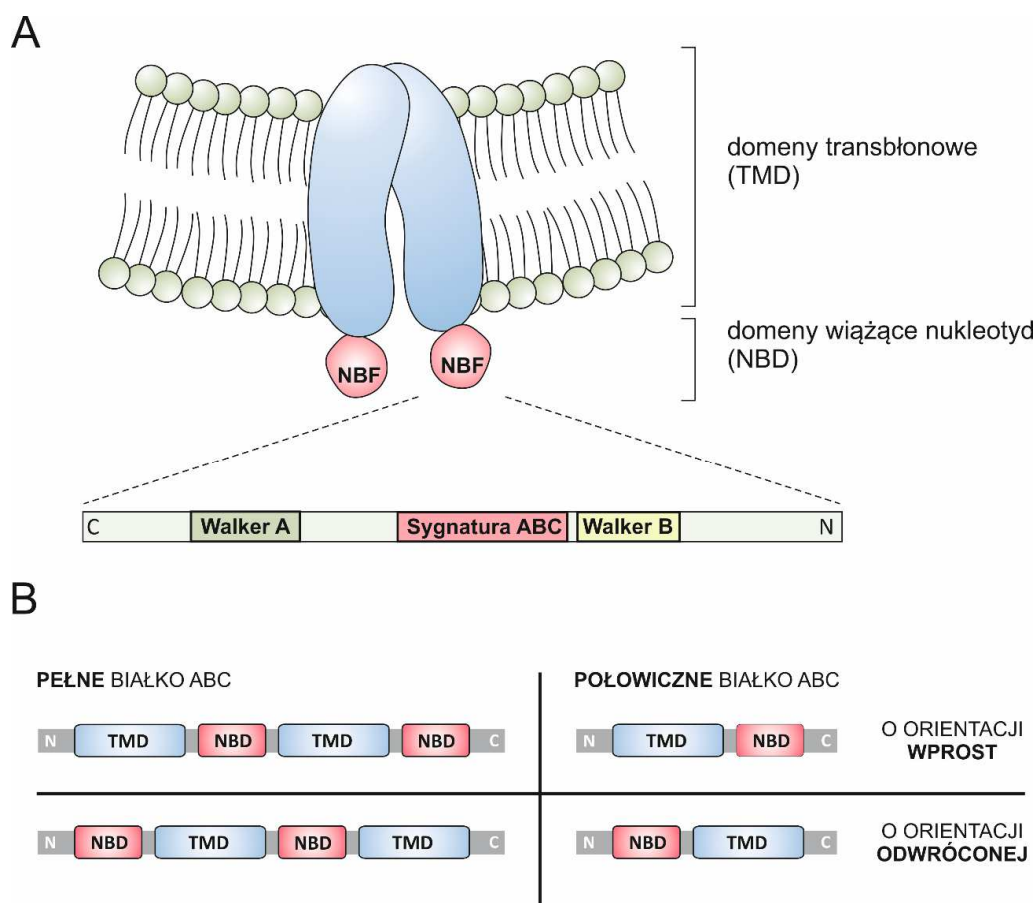
Istnieją dwa główne systemy klasyfikacji i nazewnictwa transporterów ABC. Pierwszy system został stworzony przez organizację HUGO (ang. *Human Genom Organisation*), który systematyzował ludzkie i mysie białka ABC. W systemie HUGO wyróżniono osiem podrodzin białek ABC, które oznaczono kolejnymi literami alfabetu (ABCA-ABCH). Drugi system, stworzony przez Sanchez-Fernandez, dedykowany był transporterom ABC pochodzącym z *A. thaliana*, lecz znalazł również zastosowanie dla innych gatunków. W systemie Sanchez-Fernandez wyróżniono 11 podrodzin, których nazwy odnoszą się do transporterów zidentyfikowanych w pierwszej kolejności dla danej grupy. W przypadku obu systemów kryterium podziału stanowiły następujące elementy: homologia sekwencji, pokrewieństwo filogenetyczne, liczba i wzajemna orientacja domen oraz obecność dodatkowych modyfikacji (Jasinski i wsp., 2009; Sanchez-Fernandez i wsp., 2001; Verrier i wsp., 2008).

1.4.2 Białka ABCG

W przypadku roślin, najliczniejszą grupę transporterów ABC stanowią białka z podrodziny ABCG, w której wyróżnia się zarówno połowiczne jak i pełne transportery, charakteryzujące się odwróconą orientacją domen. Połowiczne białka ABCG określane są także jako WBC (ang. *white-brown complex*), a ich nazwa historycznie wywodzi się od białek warunkujących barwę oczu u muszki owocowej (*Drosophila melanogaster*). Pełne transportery ABCG znane są jako białka PDR (ang. *pleiotropic drug resistance*), gdyż są one odpowiedzialne za zjawisko oporności plejotropowej zaobserwowanej m.in. u drożdży *Saccharomyces cerevisiae* (Kolaczkowski i wsp., 1998). Pełne transportery

ABCG stanowią szczególną grupę, ponieważ ich występowanie ogranicza się do roślin, grzybów, śluzowców, łęgniowców i brunatnic (Kang i wsp., 2011; Verrier i wsp., 2008). Podrodzina ABCG jest zdecydowanie największa wśród roślin (przykładowo u *A. thaliana* 43 białka ABCG/130 ABC), a jej liczebność jest prawdopodobnie związana z ich rolą w przystosowaniu się roślin do środowiska lądowego (Hwang i wsp., 2016). U roślin lądowych, transportery ABCG zostały powiązane m.in. z formowaniem kutykuli, kontrolą transpiracji, transportem hormonów i metabolitów wtórnych, czy kiełkowaniem nasion, adaptacjami niezbędnymi do przetrwania na lądzie (Lefevre i Boutry, 2018).

Transportery ABC należące do podrodziny ABCG, są obiektem badań prowadzonych w Zakładzie Fizjologii Molekularnej Roślin ICHB PAN, w którym była realizowana niniejsza praca doktorska.



Ryc. 1.6 Schematy ilustrujące budowę oraz model działania białek ABC. (A) Budowa transportera ABC z zaznaczonymi domenami TMD, NBD oraz rejonem NBF. (B) Podział białek ABC ze względu na liczbę i układ domen TMD i NBD. Szczegółowy opis w tekście.

1.4.3 Udział transporterów ABCG w dystrybucji kwasu abscysynowego

Białka z rodziny ABCG uczestniczą w dystrybucji kwasu abscysynowego. Obecność transporterów ABA stanowi bardzo ważny element regulacji działania tego fitohormonu. Rośliny pozbawione białek odpowiedzialnych za transport ABA wykazywały zaburzenia w procesach fizjologicznych kontrolowanych przez ABA, takich jak zamykanie aparatów szparkowych, kiełkowanie nasion (Park i wsp., 2017).

W częściach nadziemnych *A. thaliana* zidentyfikowano dwa transportery ABA, należące do podrodziny białek ABCG, AtABCG25/AtWBC25 oraz ATABCG40/AtPDR12 (Ryc. 1.7) (Kuromori i wsp., 2014). AtABCG25 występuje w komórkach towarzyszących łyka i uczestniczy w eksporcie ABA z wiązki przewodzącej liści (miejsce biosyntezy ABA) do ksylemu. Transport ABA przez AtABCG25 pokazano wykorzystując owadzie komórki z ekspresją badanego transportera oraz znakowany radioaktywnie ABA (Kang i wsp., 2011; Kuromori i wsp., 2010). Mutanty, przejawiające wyższą ekspresję genu *AtABCG25* (ang. *over expression*, *oe*), charakteryzowały się niższym poziomem transpiracji przy jednoczesnym zachowaniu prawidłowego wzrostu, w porównaniu do roślin dzikiego typu. Zaobserwowano, że nadekspresja *AtABCG25* stymulowała zamykanie aparatów szparkowych pod wpływem ABA, co powodowało utrzymywanie wyższej zawartości wody w roślinie. W konsekwencji rośliny te posiadały wyższą tolerancję na suszę (Kuromori i wsp., 2016). Co ciekawe, na przykładzie *AtABCG25* pokazano, że proces autoregulacji powstawania i degradacji transporterów ABC może odbywać się na drodze endocytozy zależnej od klatryny. Zmieniające się stężenie ABA w komórce wpływa na kierowanie *AtABCG25* do wakuoli i jego degradację lub uwolnienie z endosomów wczesnych i ulokowanie w błonie komórkowej (Park i wsp., 2016). Białko *AtABCG40* jest obecne w błonie komórek przyszparkowych i funkcjonuje jako importer ABA. Aktywny transport ABA przez *AtABCG40* udowodniono stosując różne systemy heterologiczne tj. komórki drożdży, komórki tytoniu oraz protoplasty mezofilu liści *A. thaliana* (Kang i wsp., 2010; Kuromori i wsp., 2014). Rośliny pozbawione transportera *AtABCG40* wykazywały zaburzone działanie aparatów szparkowych oraz były bardziej podatne na wysychanie. Transportery *AtABCG25* i *AtABCG40* wspólnie regulują translokację ABA z miejsca biosyntezy do komórek aparatu szparkowego podczas ograniczonego dostępu do wody (Kuromori i wsp., 2018).

W nasionach *A. thaliana* do tej pory zostały opisane cztery transportery kwasu abscysynowego. Obok dwóch już wcześniej wspomnianych transporterów AtABCG25 i AtABCG40 znalazły się dwa inne transportery z podrodziny białek ABCG, AtABCG30 i AtABCG31 (Ryc. 1.7) (Kang i wsp., 2015). Połowiczny transporter AtABCG25 oraz pełen transporter AtABCG31 zlokalizowane są w bielmie nasion, natomiast pełne transportery AtABCG30 i AtABCG40 występują w zarodkach nasion. Eksperymenty transportu w połączeniu z testami kiełkowania mutantów z dysfunkcją badanych transporterów potwierdziły, że białka AtABCG25 i AtABCG31 uczestniczą w eksporcie ABA z bielma, podczas gdy AtABCG30 i AtABCG40 są odpowiedzialne za pobieranie ABA do zarodka. Akumulacja kwasu abscysynowego w zarodku utrzymuje nasiona w stanie spoczynku i zapobiega kiełkowaniu niedojrzałych nasion lub dojrzałych nasion w niekorzystnych warunkach środowiska. Nasiona mutantów z zaburzoną ekspresją genów kodujących opisywane transportery, charakteryzowały się skróconym czasem kiełkowania (Kang i wsp., 2015; Lefevre i Boutry, 2018; Park i wsp., 2017).

W pszenicy gen *Lr34* koduje pełen transporter ABCG, który transportuje ABA. *Lr34* jest znany, jako jeden z genów warunkujących trwałą odporność pszenicy na działanie wielu patogenów grzybowych wywołujących rdzę liści. Odporne odmiany pszenicy posiadają formę genu *Lr34res*, która różni się dwoma mutacjami punktowymi od formy *Lr34sus*, występującej w odmianach podatnych na infekcje. Przeprowadzone eksperymenty transportu w komórkach drożdżowych pokazały, że zarówno *Lr34res* oraz *Lr34sus*, kodują białka transportujące ABA przez błony biologiczne. Przypuszcza się, że dystrybucja ABA za pośrednictwem *Lr34res* wpływa na fizjologię roślin i przyczynia się do odporności na choroby grzybowe (Krattinger i wsp., 2019).

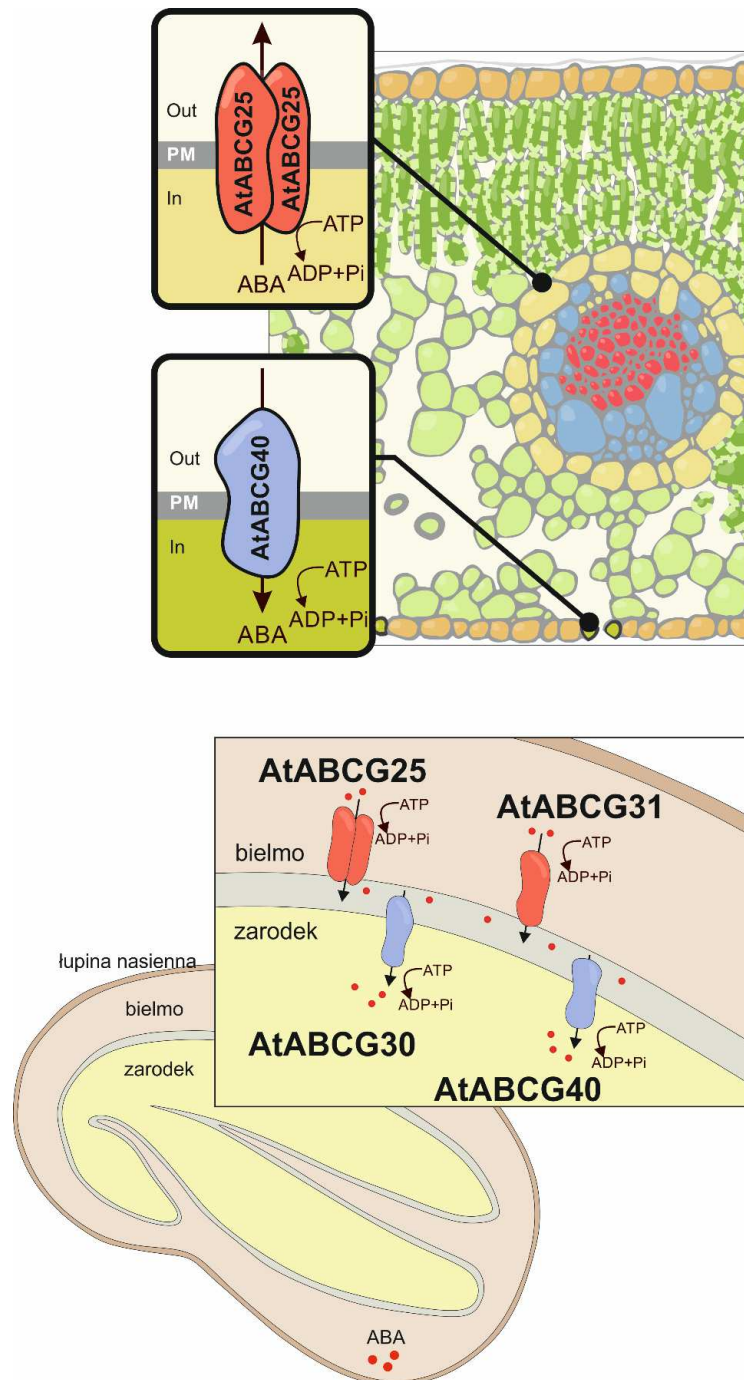
Analizy fenotypowe, prowadzone na mutantach z nieprawidłowym działaniem transporterów ABA, często wykazują zaburzenia w percepcji ABA oraz procesach morfogenetycznych/obronnych kontrolowanych przez ABA. Jednak nie zawsze analizy fenotypowe przeprowadzono razem z eksperymentami transportu ABA, które jednoznacznie określają zdolność badanych białek do przenoszenia tego fitohormonu przez błony biologiczne. Przykładem takiego białka jest AtABCG16 znaleziony w błonie komórkowej aparatów szparkowych w *A. thaliana*. Ekspresja genu *AtABCG16* jest indukowana kwasem abscysynowym, a dysfunkcja tego genu powoduje słabszą odporność roślin na infekcję patogenem *Pseudomonas syringae* (*PstDC3000*). *P. syringae* produkuje toksynę koronatyne, która uruchamia biosyntezę ABA i prowadzi do akumulacji hormonu wewnątrz komórek przyszparkowych, wymuszając ich otwarcie

(Ji i wsp., 2014). Innym przykładem jest transporter AtABCG22, również zlokalizowany w błonie komórek przyszparkowch *A. thaliana*. Analizy fenotypowe, przeprowadzone na mutancie *atabcg22*, wykazały zaburzenie w funkcjonowaniu aparatów szparkowych i większą podatność tych roślin na utratę wody (podobnie jak w przypadku mutantów zdefiniowanego transportera ABA, AtABCG40). Co więcej, zaobserwowany efekt fenotypowy *atabcg22* był wzmacniany dodatkowymi mutacjami w obrębie genów uczestniczących w biosyntezie lub sygnalizacji ABA. W przypadku białka AtABCG22 również nie udało się przeprowadzić eksperymentów transportu, które potwierdziłyby, że opisywany transporter jest zaangażowany w translokację ABA przez błony biologiczne (Kuromori i wsp., 2011). W aparatach szparkowych ryżu (*Oryza sativa*) zidentyfikowano transporter OsABCG5/RCN1, którego obecność w błonie była skorelowana z akumulacją ABA w tych samych komórkach. Dodatkowo, egzogenna stymulacja kwasem abscysynowym powodowała zwiększenie ilości komórek, w których znajdował się zarówno transporter OsABCG5 jak i ABA. Mutanty z zaburzonym działaniem OsABCG5 wykazywały znaczne zmniejszenie liczby zamykanych aparatów szparkowych pod wpływem ABA oraz szybszą utratę wody w liściach, w porównaniu do roślin dzikiego typu (Matsuda i wsp., 2016).

Białka ABCG stanowią istotną część opisanych do tej pory transporterów ABA. Jednak, oprócz przedstawionych transporterów z grupy ABC, wiadomo o transporterach ABA, będących przedstawicielami innych rodzin białkowych. Transporter błonowy DTX50 z *A. thaliana* należy do rodziny białek MATE (ang. *multidrug and toxic compound extrusion*) i odpowiedzialny jest za eksport ABA z wiązki przewodzącej, podobnie jak transporter AtABCG25 (Zhang i wsp., 2014b). Inny transporter NPF4.6/AIT1 (ang. *nitrate transport1/peptide transporter family4.6/ABA-importing transporter1*) został zlokalizowany w aparatach szparkowych i wiązce przewodzącej *A. thaliana* i posiada zdolność importowania ABA do wnętrza komórki (Chiba i wsp., 2015). W *M. truncatula* transporter MtNPF6.8 bierze udział w transporcie azotanów oraz ABA podczas regulacji wzrostu korzenia głównego (Pellizzaro i wsp., 2014). Kolejny poznany transporter ABA to pochodzący z ryżu OsPM1 (ang. *plasma membrane protein1*), który należy do rodziny białek AWPM-19 (ang. *ABA-induced wheat plasma membrane polipeptide-19*). OsPM1 bierze udział w imporcie hormonu do komórek wiązki przewodzącej, aparatów szparkowych oraz zarodka nasion (Yao i wsp., 2018).

Do tej pory nie zidentyfikowano żadnego transportera kwasu abscysynowego, należącego do rodziny ABC, u przedstawicieli roślin bobowatych. U *M. truncatula*,

podczas utrzymującego się niedoboru wody, ABA indukuje m.in. powstawanie korzeni bocznych, oraz zmniejsza ilość powstających brodawek korzeniowych. Mimo tego, iż fitohormon ten tak znacząco wpływa na morfologię korzeni podczas stresu abiotycznego, niewiele wiadomo o transporterach uczestniczących w dystrybucji ABA u roślin bobowatych.



Ryc. 1.7 Schemat przedstawiający zidentyfikowane transportery kwasu absycynowego, należące do rodziny białek ABCG w *A. thaliana*.

2. CEL PRACY

Celem pracy doktorskiej było zidentyfikowanie transporterów ABC (ang. *ATP-binding cassette transporter*), zaangażowanych w dystrybucję kwasu abscysynowego (ang. *abscisic acid*, ABA) w modelowej roślinie bobowatej, *Medicago truncatula*.

Cele pośrednie:

- (i) wyselekcjonowanie potencjalnych transporterów ABA przy użyciu narzędzi bioinformatycznych,
- (ii) uzyskanie linii komórkowych tytoniu BY2 ekspresjonujących wybrany transporter oraz wykorzystanie tych linii do przeprowadzenia eksperymentów transportu ABA,
- (iii) analiza funkcjonalna wybranego transportera z wykorzystaniem mutantów insercyjnych *M. truncatula*.

3. MATERIAŁY I METODY

3.1 Szczepy bakteryjne

Szczepy bakteryjne wykorzystane w trakcie realizacji pracy doktorskiej zestawiono w tabeli 3.1. Opisane szczepy pochodziły z kolekcji Zakładu Fizjologii Molekularnej Roślin ICHB PAN w Poznaniu oraz z firmy Invitrogen.

Tab. 3.1 Zestawienie szczepów bakteryjnych wykorzystanych w pracy doktorskiej

Szczep bakterii	Opis
<i>Escherichia coli</i> DH5a	Genotyp: F- Φ 80lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17(rk-, mk+) phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 λ -.
<i>Escherichia coli</i> ccdB Survival TM 2	Genotyp: F-mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 recA1 ara Δ 139 Δ (ara-leu)7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG fhuA::IS2. Szczep umożliwiający namnażanie plazmidów zawierających kasetę ccdB (wektory w systemie Gateway).
<i>Agrobacterium rhizogenes</i> Arqua1	Szczep umożliwiający transformację siewek <i>Medicago truncatula</i> i uzyskanie transgenicznych korzeni włosowatych (Quandt i wsp., 1993).
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> AGL1	Szczep umożliwiający transformację siewek/liści <i>Medicago truncatula</i> i uzyskanie transgenicznych roślin (Lazo i wsp., 1991).
<i>Sinorhizobium meliloti</i> 1021	Mikrosymbiont <i>Medicago truncatula</i> umożliwiający tworzenie brodawek korzeniowych (Meade i wsp., 1982).

3.2 Wektory

Wektory wykorzystane w pracy doktorskiej wraz z opisem zestawiono w tabeli 3.2. Wektory pochodziły z kolekcji Zakładu Fizjologii Molekularnej Roślin ICHB PAN w Poznaniu. Wektory pSAT otrzymano dzięki uprzejmości dr Michała Michalaka.

Tab.3.2 Zestawienie i opis wektorów wykorzystanych w pracy doktorskiej

Nazwa	Opis	Oporność	Referencje
pPR97	Wektor umożliwiający analizę aktywności promotorów badanych genów. Zawiera sekwencję kodującą enzym β -glukuronidazę (GUS). Wprowadzenie sekwencji promotorowej przez enzymy restrykcyjne jest możliwe dzięki obecności polilinkera (ang. <i>multi cloning site</i> , MSC).	Kan50(B) Kan25(R)	(Szabados i wsp., 1995)

pLV04	Wektor umożliwiający fuzję sekwencji badanego promotora z sekwencją kodującą białko zielonej fluorescencji (ang. <i>Green Fluorescence Protein</i> , GFP) oraz z sekwencją kierującą białko fuzyjne do jądra komórkowego (ang. <i>Nuclear Localization Sequence</i> , NLS). Wektor przystosowany do klonowania w systemie niezależnym od ligazy (ang. <i>Ligation Independent Cloning</i> , LIC), opartym na wykorzystaniu aktywności 3'-5' egzonukleazy T4 DNA polimerazy.	Kan25(B) Kan25(R)	(De Rybel i wsp., 2011)
pDONR/Zeo	Wektor pośredniczący, wykorzystywany w technologii Gateway (Invitrogen). Wprowadzenie insertu jest możliwe dzięki rekombinacji homologicznej.	Zeo50(B)	
pMDC43	Wektor docelowy, wykorzystywany w technologii Gateway (Invitrogen). Zawiera sekwencję kodującą białko GFP. Posiada dwukrotnie powtórzony promotor pochodzący z wirusa mozaiki kalafiora (CaMV), który zapewnia wysoki poziom ekspresji badanego genu.	Kan50(B) Hyg10(R)	(Curtis i Grossniklaus, 2003)
pSAT5-DEST-cCFP	Wektor wykorzystywany do badania oddziaływań między białkami metodą mBiFC (ang. <i>multicolour Bimolecular Fluorescence Complementation</i>). Posiada promotor <i>ubikwityny-10</i> pochodzący z <i>A. thaliana</i> , który wspomaga silną ekspresję genów kodujących białka fluorescencyjne w protoplastach <i>A. thaliana</i> . Zawiera sekwencję kodującą część białka fluorescencyjnego CFP (aminokwasy 155-239). Wektor przystosowany do klonowania w systemie Gateway (Invitrogen).	Amp100	(Mitula i wsp., 2015)
pSAT3-nVenus-DEST	Wektor wykorzystywany do badania oddziaływań między białkami metodą mBiFC (ang. <i>multicolour Bimolecular Fluorescence Complementation</i>). Posiada promotor <i>ubikwityny-10</i> pochodzący z <i>A. thaliana</i> , który wspomaga silną ekspresję genów kodujących białka fluorescencyjne w protoplastach <i>A. thaliana</i> . Zawiera sekwencję kodującą część białka fluorescencyjnego Venus (aminokwasy 1-173). Wektor przystosowany do klonowania w systemie Gateway (Invitrogen).	Amp100	(Mitula i wsp., 2015)

3.3 Materiał roślinny

Materiał roślinny wykorzystany w pracy doktorskiej zestawiono w tabeli 3.3. Nasiona pochodziły z kolekcji Zakładu Fizjologii Molekularnej Roślin ICHB PAN w Poznaniu oraz z fundacji S.R. Noble Foundation (mutanty Tnt1).

Tab. 3.3 Zestawienie materiału roślinnego wykorzystanego w pracy doktorskiej

Gatunek	Linia	Ekotyp	Mutacja
<i>Medicago truncatula</i>	Jemalong J5/A17	Jemalong J5/A17	WT
<i>Medicago truncatula</i>	R108	R108	WT
<i>Medicago truncatula</i>	NF6539 (<i>mtabcg20-1</i>)	R108	Insercja Tnt1 w egzonie 5 genu <i>MtABCG20</i>
<i>Medicago truncatula</i>	NF10694 (<i>mtabcg20-1</i>)	R108	Insercja Tnt1 w egzonie 2 genu <i>MtABCG20</i>
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Columbia-0 (Col-0)	Columbia (Col-0)	WT
<i>Nicotiana tabacum</i>	cv. <i>Bright Yellow 2</i>		WT

3.4 Praca z bakteriami

3.4.1 Przygotowanie bakteryjnych komórek kompetentnych do elektroporacji

Bakterie *Escherichia coli*, *Agrobacterium rhizogenes* lub *Agrobacterium tumefaciens* wysiano na stałe podłoże, odpowiednio LB lub YEP (Tab. 3.4). W przypadku bakterii z rodzaju *Agrobacterium* pożywka zawierała odpowiedni antybiotyk selekcyjny (*A. rhizogenes* szczep Arqua1 – streptomycyna 100 µg/ml; *A. tumefaciens* szczep AGL1 – karbencylina 50 µg/ml). Bakterie inkubowano: *E. coli* 18 h w temperaturze 37°C, *Agrobacterium* 48 h w temperaturze 28°C. Z pojedynczej kolonii bakteryjnej wyprowadzono płynną, 2 ml hodowlę, która następnie posłużyła do założenia 25 ml hodowli. 5 ml hodowli przeniesiono do kolby stożkowej o pojemności 2 l, zawierającej 0,5 l świeżej pożywki LB/YEP (rozcieńczenie 1:100). Hodowlę prowadzono do momentu uzyskania gęstości optycznej w przedziale wartości od 0,5 do 0,8 (przy długości fali $\lambda=600$ nm, OD₆₀₀). Kolbę z bakteriami schłodzono w lodzie. Następnie hodowlę wirowano z prędkością obrotową 5000 rpm przez 15 min, w temperaturze 4°C (Beckman J2-21, rotor wychylny). Usunięto supernatant, osad zawieszono w 250 ml schłodzonej wody destylowanej i ponownie wirowano. Po usunięciu supernatantu osad zawieszono w 125 ml schłodzonej wody MQ i wirowano jak poprzednio. Osad zawieszono w 5 ml schłodzonego 10% glicerolu, wirowano. Końcowy osad zawieszono w 0,5-0,8 ml 10%

glicerolu (w zależności od OD hodowli wyjściowej). Zawiesinę bakterii umieszczono w schłodzonych probówkach typu Eppendorf, o pojemności 1,5 ml (po 40 μ l/probówkę) i zamrożono w ciekłym azocie. Elektrokompetentne bakterie przechowywano w temperaturze -80°C .

Tab. 3.4 Skład pożywek LB i YEP

	Pożywka LB pH 7,0	Pożywka YEP pH 7,0
Składnik	Ilość g/l	Ilość g/l
Ekstrakt drożdżowy	5 g	10 g
Pepton	10 g	10 g
NaCl	10 g	5 g
Agar	15 g	15 g

3.4.2 Transformacja komórek *Escherichia coli* oraz *Agrobacterium* metodą elektroporacji

10 μ l odsolonej mieszaniny ligacyjnej lub 5-10 ng plazmidowego DNA dodano do 40 μ l rozmrożonych w lodzie komórek elektrokompetentnych. Mieszaninę umieszczono w schłodzonej kuwecie do elektroporacji (Gene Pulser 1652086, Bio-Rad). Bakterie poddano działaniu pola elektrycznego o napięciu 2,5 kV przez 5 ms przy użyciu elektroporatora Gene Pulser (Bio-Rad). Po elektroporacji komórki zawieszono w 900 μ l pożywki LB (*E. coli*) lub YEP (*Agrobacterium*) i inkubowano z wytrząsaniem (300 rpm) przez 45 min w temperaturze 37°C (*E. coli*) lub 75 min w temperaturze 28°C (*Agrobacterium*). Następnie bakterie wysiano na stałe podłoże LB/YEP zawierające odpowiednie antybiotyki selekcyjne i inkubowano 18 h w temperaturze 37°C (*E. coli*) lub 48 h w temperaturze 28°C (*Agrobacterium*).

❖ Skład pożywek LB i YEP: podrozdział 3.4.1

3.4.3 Transformacja komórek *Escherichia coli* metodą szoku cieplnego

Do rozmrożonych w lodzie komórek kompetentnych *Escherichia coli* szczep ccdB SurvivalTM 2 (Invitrogen) dodano 5 ng plazmidowego DNA. Mieszaninę inkubowano w lodzie przez 30 min. Następnie mieszaninę umieszczono na 30 s w temperaturze 42°C i ponownie umieszczono w lodzie na około dwie min (szok cieplny, ang. *heat shock*). Do bakterii dodano 250 μ l pożywki SOC (Invitrogen) i inkubowano z wytrząsaniem

(300 rpm) przez 45 min w temperaturze 37°C. Bakterie wysiano na stałe podłoże LB zawierające odpowiedni antybiotyk selekcyjny i inkubowano 18 h w temperaturze 37°C.

❖ Skład pożywki LB: podrozdział 3.4.1

3.4.4 Przechowywanie konstrukcji genowych w bakteriach

Pojedynczą kolonię bakteryjną zaszczepiono do 2 ml płynnej pożywki LB (*E. coli*), YEP (*Agrobacterium*) lub 2TY (*Sinorhizobium meliloti*) (Tab. 3.5), zawierającej odpowiednie antybiotyki selekcyjne. Hodowlę inkubowano z wytrząsaniem (300 rpm) 18 h w temperaturze 37°C (*E. coli*) lub 48 h w temperaturze 28°C (*Agrobacterium*, *S. meliloti*). Do 800 µl hodowli dodano 800 µl 50% schłodzonego glicerolu i dokładnie wymieszano. Próby zamrożono w ciekłym azocie i przechowywano w temperaturze -80°C.

Tab. 3.5 Skład pożywki 2TY

Składnik	Ilość g/l
Ekstrakt drożdżowy	10 g
Pepton	16 g
NaCl	5 g
Agar	15 g
pH 7,0	

❖ Skład pożywek LB i YEP: podrozdział 3.4.1

3.5 Praca z materiałem roślinnym

3.5.1 Skaryfikacja i sterylizacja nasion *Medicago truncatula*

W probówce typu Eppendorf o pojemności 2 ml umieszczono około 100 nasion *Medicago truncatula*. W celu uszkodzenia okrywy nasiennej oraz sterylizacji materiału roślinnego dodano 1,5 ml 95% kwasu siarkowego (VI). Zawartość probówki mieszano przez odwracanie do momentu pojawienia się ciemnych odbarwień na powierzchni nasion (około 12 min). Następnie dokładnie usunięto kwas siarkowy i przepłukano nasiona sterylną wodą destylowaną (10x). Sterylne nasiona wyłożono na szalkę Petriego o średnicy 20 cm, zawierającą pożywkę ½ MS zestaloną agarem (Tab. 3.6). Szalkę z nasionami zabezpieczono folią aluminiową i inkubowano 5 dni w temperaturze 4°C, w ciemności, w celu zniesienia uśpienia nasion i wyrównania tempa kiełkowania. Następnie szalkę z nasionami inkubowano przez 1 dzień, w temperaturze 23°C, w ciemności, w celu skiełkowania.

Tab. 3.6 Skład pożywki ½ MS

Składnik	Ilość g/l
½ MS (M5519, Sigma)	2,2 g
agar (Kalys)	8 g
pH 5,8	

3.5.2 Uprawa roślin *Medicago truncatula* i *Arabidopsis thaliana*

Medicago truncatula

Siedmiodniowe siewki *Medicago truncatula* wysadzono do doniczek o pojemności 0,5 l, zawierających mieszankę wermikulitu, perlitu i ziemi w stosunku 5:2:3. Rośliny uprawiano w pomieszczeniach fitotronowych, w kontrolowanych warunkach: temperatura 22°C, natężenie światła 250 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, wilgotność 40%, fotoperiod 16 h dzień/8 h noc. Rośliny podlewano wodą i raz w tygodniu pożywką do nawożenia lucerny (Tab. 3.7).

Tab. 3.7 Skład pożywki do nawożenia lucerny

Nazwa	Składnik	Ilość mg/l
A	$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	490 mg
B	K_2SO_4	850 mg
C	KCl	100 mg
D	$\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	27,8 mg
	$\text{Na}_2\text{EDTA} \times \text{H}_2\text{O}$	37,9 mg
E	$\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$	252 mg
F	KNO_3	1020 mg
G	$\text{MnSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$	20 mg
	$\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$	4,53 mg
	KI	0,58 mg
	$\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	8,6 mg
	$\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$	0,025 mg
	$\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$	0,08 mg
	H_3BO_3	6,2 mg
	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$	0,25 mg
H	KH_2PO_4	272 mg
I	$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	230 mg
J	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$	492 mg

Arabidopsis thaliana

Nasiona *Arabidopsis thaliana* wysiano do doniczek o pojemności 0,5 l, zawierających ziemię i umieszczono w pomieszczeniach fitotronowych w kontrolowanych warunkach: temperatura 22°C, natężenie światła 75 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, wilgotność 60%, fotoperiod 10 h dzień/14 h noc. Po około 2 tygodniach pojedyncze siewki przeniesiono do krążków torfowych o średnicy 44 mm (Jiffy, Niemcy) i podlano jednorazowo wodą z 0,1% (v/v) nawozem Wuxal (Kazgod, Polska). Następnie rośliny podlewano wodą dwa razy w tygodniu.

3.5.3 Uprawa roślin *Medicago truncatula* w warunkach *in vitro*

Siewki *Medicago truncatula*, których korzeń zarodkowy osiągnął długość około 1 cm umieszczono na szalkach Petriego, zawierających bibułę filtracyjną nasączoną pożywką lub podłoże zestalone agarem. Rośliny uprawiano w fitotronie firmy Percival (E-41E), w kontrolowanych warunkach: temperatura 22°C, natężenie światła 100 $\mu\text{mol m}^{-1} \text{s}^{-1}$, wilgotność 60%, fotoperiod 16 h dzień/8 h noc. W tabeli 3.8 zestawiono związki użyte przy analizie zmian poziomu ekspresji wybranych genów w korzeniach *M. truncatula*.

Tab. 3.8 Związki użyte przy analizie poziomu zmian ekspresji badanych genów

Pożywka	Nazwa substancji	Stężenie końcowe	Kontrola	Podłoże
½ MS	kwas abscysynowy (Sigma)	10 μM	NaOH	podłoże stałe
½ MS	glikol polietylenowy (PEG 6000, Serva)	15%	-	bibuła filtracyjna nasączona płynną pożywką
½ MS	glikol polietylenowy (PEG 6000 Serva)	5%	-	podłoże stałe

❖ Skład pożywek ½ MS: podrozdział 3.5.1

3.5.4 Transformacja *Medicago truncatula* za pomocą bakterii *Agrobacterium rhizogenes*

Transformację siewek *M. truncatula* przeprowadzono według zmodyfikowanego protokołu, opisanego przez A. Boisson-Dernier i współpracowników w 2001 r. (<https://www.noble.org/globalassets/docs/medicagohandbook/agrobacteriumrhizogenes.pdf>).

Bakterie *A. rhizogenes* Arqua1 zawierające odpowiednią konstrukcję genową wysiano na stałą pożywkę YEP z odpowiednimi antybiotykami selekcyjnymi (Tab. 3.9) i inkubowano przez 48 h w temperaturze 28°C.

Tab. 3.9 Spis konstrukcji genowych wprowadzonych do *A. rhizogenes**

Konstrukcja genowa	Antybiotyk	Stężenie końcowe	Wektor
<i>proMtABCG20::GUS</i>	Streptomycyna	100 µg/ml	pPR97
	Kanamycyna	50 µg/ml	
<i>proMtABCG26::GUS</i>	Streptomycyna	100 µg/ml	pPR97
	Kanamycyna	50 µg/ml	
<i>proMtABCG27::GUS</i>	Streptomycyna	100 µg/ml	pPR97
	Kanamycyna	50 µg/ml	
<i>proMtABCG29::GUS</i>	Streptomycyna	100 µg/ml	pPR97
	Kanamycyna	50 µg/ml	
<i>proMtNCED::GUS</i>	Streptomycyna	100 µg/ml	pPR97
	Kanamycyna	50 µg/ml	
<i>proMtABCG20:NLS-GFP</i>	Streptomycyna	100 µg/ml	pPLV04
	Kanamycyna	25 µg/ml	
*Szczep Arqua1 zawiera w swoim genomie gen kodujący oporność na antybiotyk streptomycynę. Oporność bakterii na kanamycynę wynika z obecności plazmidu.			

Do transformacji wykorzystano sterylne siewki *M. truncatula* ekotyp Jemalong J5, których korzeń zarodkowy osiągnął długość ok. 0,5 cm (podrozdział 3.5.1). Sterylnym skalpelem odcięto część wierzchołkową korzenia (ok. 3 mm), a następnie miejsce przecięcia zanurzone w bakteriach rosnących na stałej pożywce YEP. Siewki wykładano na stałą pożywkę Fahraeus (Tab. 3.10), zawierającą antybiotyk selekcyjny kanamycynę 25 mg/l (5 siewek/szalkę o średnicy 9 cm). Uprawę prowadzono przez 3 tygodnie, w warunkach opisanych w podrozdziale 3.5.3.

Tab. 3.10 Skład pożywki Fahraeus

Składnik	Ilość (na 1 l)
CaCl ₂ x 2H ₂ O	132,3 mg
MgSO ₄ x 7H ₂ O	123,24 mg
KH ₂ PO ₄	95,26 mg
Na ₂ HPO ₄	113,6 mg
FeC ₆ H ₅ O ₇ x 6H ₂ O	4,9 mg
NH ₄ NO ₃	40,02 mg

MnCl ₂ x 4H ₂ O	100 µg
CuSO ₄ x 5H ₂ O	100 µg
ZnCl ₂	100 µg
H ₃ BO ₃	100 µg
Na ₂ MoO ₄ x 2H ₂ O	100 µg
Agar (Kalys)	14 g
pH 7,5	
Po autoklawowaniu dodano: Kanamycyna 25 mg/l	

❖ Skład pożywki YEP: podrozdział 3.4.1

3.5.5 Propagacja transgenicznych korzeni włosowatych *Medicago truncatula*

Po trzech tygodniach od transformacji za pomocą *Agrobacterium rhizogenes* fragment korzenia o długości około 0,5 cm, zawierający stożek wzrostu, przeniesiono na stałą pożywkę Fahraeus z dodatkiem witamin (Tab. 3.11) i antybiotyków (kanamycyna 25 mg/l, karbencylina 500 mg/l). Propagację korzeni prowadzono w stałej temperaturze 23°C, w ciemności. Co 4 tygodnie korzenie przenoszono na świeżą pożywkę.

Tab. 3.11 Skład pożywki Fahraeus z dodatkiem witamin

Składnik	Ilość (na 1 l)
CaCl ₂ x 2H ₂ O	132,3 mg
MgSO ₄ x 7H ₂ O	123,24 mg
KH ₂ PO ₄	95,26 mg
Na ₂ HPO ₄	113,6 mg
FeC ₆ H ₅ O ₇ x 6H ₂ O	4,9 mg
NH ₄ NO ₃	40,02 mg
MnCl ₂ x 4H ₂ O	100 µg
CuSO ₄ x 5H ₂ O	100 µg
ZnCl ₂	100 µg
H ₃ BO ₃	100 µg
Na ₂ MoO ₄ x 2H ₂ O	100 µg
Mioinozytol	100 mg
Tiamina	10 mg
Pirydoksyna	1 mg
Glicyna	2 mg
Kwas nikotynowy	1 mg
Biotyna	1 mg
Sacharoza	20 g

Agar (Kalys)	14 g
pH 5,8	
Po autoklawowaniu dodano: Kanamycyna 25 mg/l, Karbencylina 500 mg/l	

3.5.6 Transformacja i regeneracja *Medicago truncatula* poprzez somatyczną embriogenezę

Transformację przeprowadzono według zmodyfikowanego protokołu opisanego przez P. Ratet i H. Trinh w 2001 r.

Przygotowanie bakterii *Agrobacterium tumefaciens* AGL1

Bakterie *A. tumefaciens* AGL1 zawierające odpowiednią konstrukcję genową wysiano na stałą pożywkę YEP z odpowiednimi antybiotykami selekcyjnymi (Tab. 3.12) i inkubowano przez 48 h w temperaturze 28°C. Z pojedynczej kolonii wyprowadzono płynną, 2 ml hodowlę wstępną, która posłużyła do założenia 30 ml hodowli właściwej. Hodowlę właściwą prowadzono do momentu uzyskania gęstości optycznej OD₆₀₀=0,6. Następnie bakterie zwirowano w wirówce z uchylnym rotorem (5804R, Eppendorf) z prędkością 3000 g, przez 20 min. Osad bakteryjny zawieszono w 50 ml sterylnej pożywki SH3a (Tab.3.13).

Tab. 3.12 Spis konstrukcji genowych wprowadzonych do *A. tumefaciens**

Konstrukcja genowa	Antybiotyk	Stężenie końcowe	Wektor
<i>proMtABCG20::GUS</i>	Karbencylina	50 µg/ml	pPR97
	Kanamycyna	50 µg/ml	
	Kanamycyna	50 µg/ml	
*Szczep AGL1 zawiera w swoim genomie gen kodujący oporność na antybiotyk karbencylinę. Oporność bakterii na kanamycynę wynika z obecności plazmidu.			

Agroinfiltracja liści *Medicago truncatula* R108

Rośliny *Medicago truncatula* ekotyp R108 typu dzikiego uprawiano przez 6 tygodni w warunkach opisanych w podrozdziale 3.5.2. Następnie zebrano ok. 100 pojedynczych liści i umieszczono w 50 ml probówce typu Falcon. Liście przepłukano wodą z dodatkiem Tween 20 (Sigma-Aldrich). Przeprowadzono sterylizację liści w 1,5% roztworze podchlorynu sodu przez 14 min. Materiał roślinny przepłukano sterylną wodą i odcięto skalpelem brzegi liści. Fragmenty liści umieszczono w kolbie zawierającej zawiesinę

A. tumefaciens i poddano działaniu próżni (650 psi) przez 20 min. Następnie liście w zawieszynie bakteryjnej wytrząsano z prędkością obrotową 60 rpm przez 45 min, w temperaturze 24°C, w ciemności.

Kokultywacja

Fragmenty liści osuszono przy pomocy sterylnej bibuły i umieszczono na stałej pożywce SH3a (Tab. 3.13) bez dodatku antybiotyków (wykorzystano szalki Petriego o średnicy 9 cm). Eksplantaty inkubowano w pokoju fitotronowym przez 48 h, w temperaturze 24°C, w ciemności.

Inicjacja kultur kalusa

Eksplantaty przepłukano trzykrotnie sterylną wodą i umieszczono na stałej pożywce SH3a, zawierającej antybiotyki: taromentin (800 mg/l, eliminacja bakterii *A. tumefaciens*) oraz kanamycyna (25 mg/l, selekcja transformantów). Materiał inkubowano w ciemności, w temperaturze 24°C, do momentu pojawienia się tkanki kalusowej (około 5-6 tygodni). Eksplantaty przenoszono na świeżą pożywkę selekcyjną co 3 tygodnie.

Embriogeneza somatyczna oraz konwersja zarodków somatycznych

Tkankę kalusową przeniesiono na stałą pożywkę SH9 (Tab. 3.13), zawierającą antybiotyki: taromentin (800 mg/l) oraz kanamycynę (25 mg/l). Materiał przenoszono na świeżą pożywkę selekcyjną co 3 tygodnie. Powstające z zainicjowanych zarodków somatycznych rośliny przeniesiono na pożywkę ½SH9 (Tab. 3.13), w celu przyspieszenia ich ukorzenia. Ukorzone rośliny wprowadzono do warunków *in vivo*. Transgeniczne rośliny uprawiano do czasu wydania i zbioru nasion (podrozdział 3.5.2).

Tab. 3.13 Skład pożywek SH3a, SH9, ½ SH9

	SH3a	SH9	½ SH9
Składnik	Ilość (na 1 l)	Ilość (na 1 l)	Ilość (na 1 l)
KNO ₃	2831 mg	2831 mg	1416 mg
MgSO ₄ x 7H ₂ O	184,9 mg	184,9 mg	92,5 mg
(NH ₄) ₂ SO ₄	462,5 mg	462,5 mg	231,3 mg
KH ₂ PO ₄	408,3 mg	408,3 mg	204,2 mg
CaCl ₂ x 2H ₂ O	161,7 mg	161,7 mg	80,9 mg
MnSO ₄ x H ₂ O	1,01 mg	1,01 mg	0,51 mg
H ₃ BO ₃	4,94 mg	4,94 mg	2,47 mg
ZnSO ₄ x 7H ₂ O	1 mg	1 mg	0,5 mg

KI	1 mg	1 mg	0,5 mg
Na ₂ MoO ₄ x 2H ₂ O	0,24 mg	0,24 mg	0,12 mg
CuSO ₄ x 5H ₂ O	0,2 mg	0,2 mg	0,1 mg
CoCl ₂ x 6H ₂ O	0,1 mg	0,1 mg	0,05 mg
EDFS	139,5 mg	-	-
Mioinozytol	100 mg	100 mg	50 mg
Tiamina	5,06 mg	5,06 mg	2,53 mg
Kwas nikotynowy	4,92 mg	4,92 mg	2,46 mg
Pirydoksyna	4,94 mg	4,94 mg	2,47 mg
2,4-D	4 mg	-	-
BAP	0,5 mg	-	-
Sacharoza	30 g	20 g	10 g
Agar (Kalys)	-	9 g	9 g
Fitożel	3 g	-	-
pH 5,8			
Po autoklawowaniu dodano: Kanamycyna 25 mg/l, Taromentin 800 mg/l			

❖ Skład pożywki YEP: podrozdział 3.4.1

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

Przygotowanie bakterii *Sinorhizobium meliloti*

Bakterie *S. meliloti* szczep 1021 wysiano na stałą pożywkę 2TY, z antybiotykiem streptomycyną (500 mg/l, selekcja dla szczepu 1021) i inkubowano 48 h w temperaturze 28°C. Z pojedynczej kolonii wyprowadzono płynną, 2 ml hodowlę wstępną, która posłużyła do założenia 20 ml hodowli właściwej. Hodowlę właściwą prowadzono przez noc do momentu uzyskania OD₆₀₀=0,7. Zawiesinę bakteryjną wirowano przez 10 min z prędkością obrotową 5000 rpm, w temperaturze 4°C. Osad bakteryjny zawieszono w 20 ml 10 mM roztworu MgSO₄.

Inokulacja w warunkach *in vitro*

Siewki *M. truncatula* dzikiego typu, posiadające korzeń zarodkowy o długości ok. 1 cm, jak również 3 tygodniowe rośliny złożone, uzyskane w wyniku transformacji *Agrobacterium rhizogenes* wyłożono na bibułę filtracyjną, nasączoną pożywką Fahraeus (-N) (Tab. 3.14). Rośliny inkubowano przez 5 dni na pożywce pozbawionej związków

azotu. Następnie rośliny inokulowano trzydziestokrotnie rozcieńczoną zawiesiną bakteryjną (200 µl/korzeń).

Tab. 3.14 Skład pożywki Fahraeus pozbawionej związków azotu

Składnik	Ilość (na 1 l)
CaCl ₂ x 2H ₂ O	132,3 mg
MgSO ₄ x 7H ₂ O	123,24 mg
KH ₂ PO ₄	95,26 mg
Na ₂ HPO ₄	113,6 mg
FeC ₆ H ₅ O ₇ x 6H ₂ O	4,9 mg
MnCl ₂ x 4H ₂ O	100 µg
CuSO ₄ x 5H ₂ O	100 µg
ZnCl ₂	100 µg
H ₃ BO ₃	100 µg
Na ₂ MoO ₄ x 2H ₂ O	100 µg
Agar (Kalys)	15 g
pH 6,5	

❖ Skład pożywki 2TY: podrozdział 3.4.4

3.5.8 Izolacja oraz transformacja protoplastów *Arabidopsis thaliana*

Izolację oraz transformację protoplastów przeprowadzono według zmodyfikowanego protokołu opisanego przez M. Smolarkiewicz i współpracowników (Smolarkiewicz i wsp., 2014).

Izolacja protoplastów

Do izolacji protoplastów wykorzystano liście rozety 4-6 tygodniowych roślin *Arabidopsis thaliana*, ekotyp Columbia (Col-0).

10 ml roztworu enzymów trawiących ścianę komórkową (Tab. 3.15), inkubowano przez 10 min w temperaturze 55°C. Roztwór enzymów umieszczono w plastikowej szalce Petriego i ostudzono do temperatury pokojowej. Pojedynczy liść *A. thaliana* umieszczono pomiędzy dwoma kawałkami taśmy klejącej (Scotch Magic Tape, 3M). Następnie delikatnie rozdzielono kawałki taśmy klejącej, powodując rozwarstwienie liścia i usunięcie dolnej epidermy. Liście pozbawione epidermy umieszczono w roztworze enzymów i wytrząsano z prędkością obrotową 40 rpm, w temperaturze 28°C, w ciemności. Po 45 min usunięto taśmę klejącą i zawiesinę wytrząsano przez kolejne 15

min, w celu dotrawienia ścian komórkowych. Roztwór zawierający protoplasty delikatnie przeniesiono do 50 ml probówki typu Falcon i umieszczono na lodzie. Roztwór wirowano z prędkością 200 g przez 3 min, w temperaturze 4°C (wirówka Eppendorf 5804R; rotor wychylny A4-44; przyspieszenie i hamowanie obrotów wirówki wynosiło 0). Delikatnie usunięto supernatant, osad zawieszono w 15 ml roztworu W5 (Tab. 3.15) i wirowano z prędkością 150 g przez 3 min, w temperaturze 4°C (etap powtórzono dwukrotnie). Protoplasty zawieszono w 1 ml roztworu MMg (Tab. 3.15).

Transformacja protoplastów

Do 2 ml probówki typu Eppendorf dodano: i) 6 µg plazmidu zawieszonego w buforze TE (Sigma, 93283) (w przypadku kotransformacji dodawano po 6 µg każdego plazmidu, tak aby ich wspólna objętość nie przekraczała 15 µl) ii) 100 µl protoplastów oraz iii) 110 µl roztworu PEG (Tab. 3.15). Mieszaninę delikatnie wymieszano i inkubowano w temperaturze pokojowej przez 20 min, w ciemności. Następnie dodano 450 µl roztworu W5 (Tab. 3.15), delikatnie wymieszano i wirowano przez 3 min z prędkością 300 g. Zebrano supernatant, protoplasty zawieszono w 300 µl roztworu W1 (Tab. 3.15) i inkubowano w temperaturze pokojowej, w ciemności. Obserwacje mikroskopowe prowadzono po ok. 17 h od transformacji.

Tab. 3.15 Skład buforów potrzebnych podczas izolacji

Nazwa	Składnik	Stężenie końcowe
Roztwór enzymów	Cellulase R10 (Serva)	1,2% (w/v)
	Macerozyme 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
PEG	PEG 4000 (Serva)	40% (w/v)

	Mannitol	200 mM
	CaCl ₂	100 mM

3.5.9 Propagacja kultur kalusa *Nicotiana tabacum* BY2

Tkanka kalusa *Nicotiana tabacum* cv. *Bright Yellow 2* (BY2) była utrzymywana na stałej pożywce BY2 (Tab. 3.16) w ciemności, w temperaturze 24°C. Komórki przenoszono na świeżą pożywkę co 4 tygodnie.

Tab. 3.16 Skład pożywki BY2

Składnik	Ilość (na 1 l)
MS (M5524 Sigma)	4,3 g
Mioinozytol	100 mg
KH ₂ PO ₄	370 mg
Tiamina	1 mg
2,4-D	200 mg
Sacharoza	30 g
Agar (Kalys)	8 g
pH 5,125	

3.5.10 Propagacja hodowli zawiesinowych komórek kalusa *Nicotiana tabacum* BY2

Hodowle zawiesinowe komórek tytoniu BY2 (Nagata i wsp., 1992) inicjowano przez umieszczenie ok. 2 g rozdrobnionej tkanki kalusowej w 15 ml płynnej pożywki BY2 (kolba stożkowa o pojemności 100 cm³). Hodowle zawiesinowe prowadzono w inkubatorze (Innova 42, Incubator Shaker Series), w kontrolowanych warunkach, z prędkością wytrząsania 130 rpm, w temperaturze 26°C. Po trzech dniach zawiesinę przeniesiono do kolby stożkowej o pojemności 300 cm³ i dodano do niej 45 ml świeżej pożywki BY2 i inkubowano przez pięć dni. Uzyskana zawiesina służyła do dalszej propagacji hodowli na potrzeby eksperymentów. Hodowlę komórek zawiesinowych pasażowano co siedem dni w stosunku 1:5 (10 ml zawiesiny : 50 ml świeżej pożywki).

❖ Skład pożywki BY2: podrozdział 3.5.9

3.5.11 Ocena jakości hodowli zawiesinowych komórek *Nicotiana tabacum* BY2

Jakość hodowli zawiesinowych komórek tytoniu BY2 oceniono wykorzystując barwienie diocetanem fluoresceiny (ang. *fluorescein diacetate*, FDA). Diocetan fluoresceiny jest

niefluoryzującą pochodną fluoresceiny, która posiada zdolność do przenikania przez błony biologiczne. W komórce FDA jest hydrolizowany przez wewnątrzkomórkowe esterazy, do fluoresceiny – związku wykazującego właściwości fluoryzujące. W żywych komórkach aktywność esteraz jest wysoka, dlatego dochodzi do akumulacji fluoresceiny i komórki wykazują zieloną fluorescencję (po wzbudzeniu światłem niebieskim). Komórki martwe i apoptotyczne nie wykazują fluorescencji. Do 5 ml hodowli zawiesinowych komórek tytoniu BY2 dodano 10 μ l diocjanu fluoresceiny (roztwór FDA w acetonie o stężeniu 1 mg/ml) i inkubowano przez 15 min w temperaturze 37°C. Materiał analizowano wykorzystując mikroskop fluorescencyjny (Leica DMI 4000B).

3.5.12 Transformacja hodowli zawiesinowych komórek *Nicotiana tabacum* BY2 z wykorzystaniem *Agrobacterium tumefaciens*

Przygotowanie bakterii *Agrobacterium tumefaciens* AGL1

Bakterie *A. tumefaciens* AGL1 zawierające odpowiednią konstrukcję genową wysiano na stałą pożywkę YEP z odpowiednimi antybiotykami selekcyjnymi (Tab. 3.17) i inkubowano 48 h w temperaturze 28°C. Z pojedynczej kolonii wyprowadzono płynną, 2 ml hodowlę wstępną, która posłużyła do założenia 30 ml hodowli właściwej. Hodowlę właściwą prowadzono do momentu uzyskania $OD_{600}=0,6$. Następnie bakterie zwirowano w wirówce z uchylnym rotorem (Eppendorf, 5804R) z prędkością 5000 g przez 10 min, w temperaturze 4°C. Osad bakteryjny zawieszono w 1 ml sterylnej pożywki BY2.

Tab. 3.17 Spis konstrukcji genowych wprowadzonych do komórek *Nicotiana tabacum*

Konstrukcja genowa	Antybiotyk	Stężenie końcowe	Wektor
<i>pMDC43:MtABCG20</i>	Karbencylina	50 μ g/ml	pMDC43
	Kanamycyna	50 μ g/ml	
	Kanamycyna	50 μ g/ml	

Transformacja

Pięciodniową zawiesinę komórek BY2 przeniesiono na płytkę 6-dołkową (5 ml/dołek) i do każdego dołka dodano po 50 μ l bakterii. Płytki wytrząsano z prędkością obrotową 130 rpm przez 48 h, w temperaturze 24°C, w ciemności. Następnie zawiesiny przeniesiono do 50 ml probówek typu Falcon (połączono materiał z trzech dołków, 15 ml/Falcon) i wirowano z prędkością obrotową 2000 rpm przez 5 min, w temperaturze pokojowej. Osad płukano trzykrotnie świeżą pożywką BY2. Komórki przeniesiono

na stałą pożywkę BY2 zawierającą antybiotyki selekcyjne: higromycynę (75 mg/l), taromentin (400 mg/l). Szalki z komórkami zabezpieczono parafilmem i umieszczono w pokoju hodowlanym, w temperaturze 24°C, w ciemności. Po około 3 tygodniach obserwowano formujące się grudki transgenicznego kalusa. Komórki przenoszono na świeżą pożywkę co 4 tygodnie.

- ❖ Skład pożywki BY2: podrozdział 3.5.9
- ❖ Skład pożywki YEP: podrozdział 3.4.1

3.6 Izolacja frakcji błonowych i praca z materiałem białkowym

3.6.1 Izolacja frakcji błonowych z komórek *Nicotiana tabacum* BY2

Fracje błonowe izolowano z komórek *Nicotiana tabacum* BY2 odfiltrowanych z płynnych hodowli zawiesinowych. Do izolacji wykorzystano około 20 g materiału. Komórki bardzo dokładnie roztarto w moździerzu w obecności ciekłego azotu. Następnie dodano 20 ml buforu do homogenizacji (Tab. 3.18) i kontynuowano ucieranie do momentu uzyskania klarownego roztworu. Homogenat przeniesiono do 50 ml probówki typu Falcon i wirowano z prędkością obrotową 5000 rpm, przez 5 min, w temperaturze 4°C. Supernatant przeniesiono do nowych probówek i wirowano z prędkością obrotową 9000 rpm przez 10 min, w temperaturze 4°C. Supernatant przeniesiono do probówek wirówkowych typu Beckman i wirowano z prędkością obrotową 20000 rpm przez 1,5 h, w temperaturze 4°C. Uzyskany osad zawieszono w 2,5 ml buforu STED10 (Tab. 3.19) i przechowywano w temperaturze -20°C. Przed zamrożeniem oznaczono stężenie białek w izolacie metodą Bradford.

Tab. 3.18 Skład buforu do homogenizacji

Składnik	Stężenie końcowe
Sorbitol	250 mM
Tris-HCl	50 mM
EDTA	2 mM
DTT*	0,1%
PVP*	0,6%
PMSF w etanolu 0,1 M*	1 mM
Inhibitory proteaz (Sigma 9599)*	1%
pH 8,0	
* składniki dodawane bezpośrednio przed izolacją	

Tab. 3.19 Skład buforu STED10 do zawieszania frakcji błonowych

Składnik	Stężenie końcowe
Tris-HCl	10 mM
EDTA	10 mM
DTT	1 mM
sacharoza	10%
pH 7,0	

3.6.2 Oznaczenie stężenia białka metodą Bradford

Stężenie białka w próbach, uzyskanych z izolacji frakcji błonowych, oznaczono na podstawie kolorymetrycznej reakcji z odczynnikiem Bradford (Bio-Rad 5000205).

Wykorzystano krzywą wzorcową sporządzoną ze znanych stężeń surowiczej albuminy bydlęcej (ang. *Bovine serum albumine*, BSA): 0 $\mu\text{g/ml}$, 125 $\mu\text{g/ml}$, 250 $\mu\text{g/ml}$, 500 $\mu\text{g/ml}$, 750 $\mu\text{g/ml}$, 1000 $\mu\text{g/ml}$, 1500 $\mu\text{g/ml}$, 2000 $\mu\text{g/ml}$. Właściwe próby przygotowano wg schematu: 798 μl H_2O , 2 μl badanej próby, 200 μl odczynnika Bradford. Pomiar wykonano przy pomocy spektrofotometru, przy długości fali $\lambda=595$ nm. Próby rozcieńczono tak, aby stężenie białka wynosiło 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

3.6.3 Ocena jakości wyizolowanej frakcji błonowej (test ACMA)

Integralność błon wyizolowanych frakcji sprawdzono za pomocą testu ACMA. Odczynnik 9-amino-6-chloro-2-metoksyakrydyna (ACMA, Invitrogen A1324), wykorzystywany podczas reakcji, jest związkiem interkalującym DNA, którego fluorescencja zależna jest od pH. Uzyskana frakcja błonowa formuje zamknięte micelle/pęcherzyki, do których na drodze dyfuzji wnika odczynnik ACMA. Dodanie ATP do mieszaniny reakcyjnej uruchamia pompy protonowe obecne w błonach komórkowych. Napływ jonów H^+ do wnętrza pęcherzyków prowadzi do zakwaszenia środowiska wewnętrznego i w tym przypadku do wygaszenia sygnału fluorescencji ACMA. Wykonano pomiar fluorescencji mieszaniny reakcyjnej (Tab. 3.20), przy wzbudzeniu 419 nm, a następnie do próby dodano ATP (5 mM). Ponownie wykonano pomiar fluorescencji przy zachowaniu tych samych parametrów (wzbudzenie 419 nm, typ widma EM, zakres skanowania 439-318 nm, przesłona 10 nm) (spektrofluorofotometr Shimadzu RF5301PC).

Tab. 3.20 Skład mieszaniny reakcyjnej wykorzystanej do testu ACMA

Składnik	Stężenie końcowe
(NH ₄)SO ₄	25 mM
MgCl ₂	6 mM
ACMA	4 μM
frakcja błonowa (OD=5)	50 μl

3.6.4 Rozdział elektroforetyczny białek w warunkach denaturujących

Do 20 μl próby zawierającej 20 μg białka (stężenie 1 μg/μl) dodano 3x stężony bufor do rozpuszczania prób białkowych SBB (Tab. 3.21). Próby inkubowano przez 15 min w temperaturze 37°C, a następnie wirowano z prędkością obrotową 13000 rpm przez 5 min. Supernatant wprowadzono do kieszonek żelu poliakrylamidowego (Tab. 3.22) i przeprowadzono rozdział elektroforetyczny SDS-PAGE (ang. *SDS-polyacrylamide Gel Electrophoresis*). Elektroforezę prowadzono w buforze elektroforetycznym Laemmli'ego (Tab. 3.23), przy napięciu 100 V przez 3 h. Elektroforezę przeprowadzono przy użyciu zestawu Mini Protean firmy Bio-Rad.

Żel po rozdzieleniu elektroforetycznym barwiono Coomassie Brilliant Blue G (Sigma-Aldrich B0770), zgodnie z instrukcją załączoną przez producenta.

Tab. 3.21 Skład buforu do rozpuszczania prób białkowych 3x SBB

Składnik	Ilość (na 20 ml)
1M Tris-HCl pH 6,8	4,8 ml
SDS	1,2 g
Glicerol 100%	6 g
Błękit bromofenolowy	0,003 g
Bezpośrednio przed użyciem dodano DTT	

Tab. 3.22 Przygotowanie żelu poliakrylamidowego

Składnik	Żel rozdzielający 10%	Żel zagęszczający 5%
Poliakrylamid (roztwór 40% 19:1; Roth)	2,5 ml	500 μl
1,5 M Tris pH 8,8	2,5 ml	-
1 M Tris pH 6,8	-	500 μl
10% APS	100 μl	40 μl
10% SDS	100 μl	40 μl

TEMED	4 μ l	4 μ l
H ₂ O MQ	4,8 ml	2,92 ml

Tab. 3.23 Skład buforu elektroforetycznego Laemmli 1x

Składnik	Stężenie końcowe
Tris	0,025 M
Glicyna	0,192 M
SDS	0,1%

3.6.5 Elektrotransfer typu Semi-Dry (półsuchy)

Dwie bibuły do elektrotransferu (Bio-Rad 1703966) nasączono buforem do elektrotransferu (Tab. 3.24). Membranę PVDF (Immobilon P, Millipore) aktywowano przez przepłukanie w 100% metanolu i umieszczono w buforze do elektrotransferu. Po rozdziale elektroforetycznym z żelu usunięto część z żelem zagęszczającym. Następnie w aparacie do elektrotransferu (Trans-blot SD Semi-Dry transfer cel, Bio-Rad) ułożono kolejno: bibułę, membranę, żel, bibułę. Elektrotransfer prowadzono przy napięciu 22 V przez 1 h.

Tab. 3.24 Skład buforu do elektrotransferu

Składnik	Stężenie końcowe
Tris	48 mM
Glicyna	39 mM
Metanol	10%
SDS	0,0375%

3.6.6 Hybrydyzacja Western blot

Po elektrotransferze membranę płukano w buforze do przemywania (Tab. 3.26) przez 15 min, w temperaturze pokojowej, z wytrząsaniem 30 rpm. Następnie membranę inkubowano w buforze do blokowania (Tab. 3.27), przez 18 h, w temperaturze 4°C. Ponownie przepłukano membranę w buforze do przemywania. Tak przygotowaną membranę inkubowano w roztworze z poliklonalnymi przeciwciałami pierwszorzędowymi (rozcieńczone 1:500 w buforze 1x TBS, Tab.3.25), specyficznymi dla białka zielonej fluorescencji (ang. *Green Fluorescence Protein*, GFP), przez 1 h

w temperaturze pokojowej, z wytrząsaniem 30 rpm. Po inkubacji membranę przepłukano dwukrotnie w buforze do przemywania. Następnie membranę inkubowano w roztworze z przeciwciałami drugorzędowymi IgG, sprzężonymi z alkaiczną fosfatazą w rozcieńczeniu 1:15000 (rozcieńczenie w buforze 1x TBS). Po inkubacji membranę przepłukano czterokrotnie w buforze do przemywania. Membranę przeniesiono do roztworu zawierającego substraty dla alkalicznej fosfatazy BCIP oraz NBT (SigmaFAST) i inkubowano w ciemności do momentu pojawienia się barwnych prążków. Reakcję zatrzymano przez umieszczenie membrany w H₂O MQ.

Tab. 3.25 Skład buforu TBS 10x

Składnik	Stężenie końcowe
Tris	200 mM
Glicyna	1,37 M
pH 7,6	

Tab. 3.26 Skład buforu do przemywania

Składnik	Stężenie końcowe
TBS 10x	1x
Tween 80	0,1%

Tab. 3.27 Skład buforu do blokowania

Składnik	Stężenie końcowe
TBS 10x	1x
Tween 80	0,5%
odtłuszczone mleko w proszku	3%

3.7 Praca z kwasami nukleinowymi

3.7.1 Izolacja plazmidowego DNA z bakterii

Izolację plazmidowego DNA z komórek bakteryjnych przeprowadzono za pomocą zestawu Zymy Plasmid Miniprep Kit (Zymo Research), zgodnie z instrukcją załączoną przez producenta. Wyizolowany plazmidowy DNA przechowywano w temperaturze -20°C.

3.7.2 Izolacja DNA z tkanek roślinnych

W zależności od celu wykorzystania DNA stosowano dwie różne metody izolacji genomowego DNA z tkanek roślinnych.

W celu przygotowania konstrukcji genowych wykorzystano zestaw do izolacji DNA (DNeasy Plant Mini Kit, Qiagen), zgodnie z instrukcją załączoną przez producenta.

Do analiz weryfikacji transgenicznego materiału (rośliny, kalusy) oraz układu insercji w roślinach z mutacją w obrębie badanych genów *MtABCG*, izolację DNA przeprowadzono za pomocą zmodyfikowanej procedury opisanej przez Edwards'a i współpracowników (Edwards i wsp., 1991).

Zmodyfikowana metoda izolacji genomowego DNA wg Edwardsa

Trzy pojedyncze liście *Medicago truncatula* lub 300 mg tkanki kalusowej *Nicotiana tabacum* umieszczono w probówce typu Eppendorf i zamrożono w ciekłym azocie. Materiał utarto przy pomocy mikrohomogenizatora ręcznego (A-7100399, Bionovo). Do utartego materiału dodano 400 µl buforu do izolacji (Tab. 3.28) i wytrząsano przez 5 s przy wykorzystaniu urządzenia typu wortex. Próbę wirowano z prędkością obrotową 13000 rpm przez 1 min. 300 µl supernatantu przeniesiono do nowej probówki i dodano 300 µl izopropanolu. Próbę inkubowano w temperaturze pokojowej przez 2 min, a następnie wirowano z prędkością obrotową 13000 rpm przez 5 min. Dokładnie usunięto supernatant, osad osuszono i zawieszono w 40 µl buforu TE (Sigma 93283). Próbę wirowano z prędkością obrotową 13 000 rpm przez 15 s, supernatant przeniesiono do nowej probówki. Wyizolowany DNA przechowywano w temperaturze -20°C.

Tab. 3.28 Skład buforu do izolacji genomowego DNA

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

3.7.3 Izolacja całkowitego RNA z tkanek roślinnych

Izolację całkowitego RNA z tkanek roślinnych przeprowadzono za pomocą zestawu RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen), zgodnie z instrukcją załączoną przez producenta.

W celu ograniczenia zanieczyszczenia prób genomowym DNA zastosowano RNase-Free DNase Set (Qiagen). Wyizolowany RNA przechowywano w temperaturze -20°C .

3.7.4 Ilościowa i jakościowa ocena preparatów DNA i RNA

Analizę ilościową wyizolowanych kwasów nukleinowych przeprowadzono przy pomocy spektrofotometru Nano Drop One (Thermo Scientific). Na podstawie współczynnika absorbancji A_{260}/A_{280} określono stopień zanieczyszczenia prób białkami. Wyznaczenie współczynnika A_{260}/A_{230} pozwoliło monitorować stopień zanieczyszczenia prób m. in. polisacharydami lub etanolem.

Jakość wyizolowanego DNA/RNA oceniano również za pomocą rozdziału elektroforetycznego w 1% żelu agarozowym, zawierającym barwnik fluorescencyjny Gel View (1,5 $\mu\text{l}/100\text{ ml}$, Novazym), w buforze 1x TAE (Tab. 3.29). Elektroforezę prowadzono przy napięciu 90 V przez 30 min. Do analizy rozdziału wykorzystano transiluminator ChemiDoc XRS System (Bio-Rad).

Tab. 3.29 Skład buforu TAE 1x

Składnik	Ilość (na 1 l)	Stężenie końcowe
Tris	4,84 g	40 mM
Kwas octowy	1,2 ml	20 mM
EDTA	0,372 g	1 mM
Wykorzystano 0,5 M roztwór EDTA o pH 8,0 – 2 ml/1 l		

3.7.5 Odwrotna transkrypcja

Reakcję odwrotnej transkrypcji przeprowadzono za pomocą zestawu Omniscript RT Kit (Qiagen) lub SuperScript III Reverse Transcriptase (Invitrogen), zgodnie z załączoną przez producentów instrukcją.

3.7.6 Analiza ekspresji genów *Medicago truncatula* metodą reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR, ang. *Polymerase Chain Reaction*)

Uzyskany po reakcji odwrotnej transkrypcji cDNA został wykorzystany jako matryca do półilościowej reakcji łańcuchowej polimerazy (ang. *semi-quantitative PCR*). Reakcje były przeprowadzone w aparacie C1000 Touch (Bio-Rad), z wykorzystaniem polimerazy Go Taq DNA Polymerase (M300, Promega). Liczbę cykli dobierano eksperymentalnie (24-32). Skład mieszaniny reakcyjnej, profil temperaturowo-czasowy oraz sekwencje

wykorzystanych oligonukleotydów przedstawiono w tabelach 3.30, 3.31, 3.32. Oligonukleotydy wykorzystane podczas reakcji zostały zaprojektowane w ten sposób, aby amplifikowały region ok. 300 par zasad w obrębie regionu 3'-UTR. Rozdział elektroforetyczny został przeprowadzony w 1,5% żelu agarozowym z dodatkiem barwnika fluorescencyjnego Gel View (1,5 μ l/100 ml, Novazym), w buforze 1x TAE. Elektroforezę prowadzono przy napięciu 90 V przez 30 min. Do analizy rozdziału wykorzystano transiluminator ChemiDoc XRS System (Bio-Rad). Do oceny prawidłowej wielkości amplifikowanych produktów wykorzystano marker Gene Ruler 1kb (Fermentas). W eksperymencie wykorzystano gen referencyjny β -aktyny, którego poziom ekspresji był stabilny w układzie eksperymentalnym.

Tab. 3.30 Skład mieszaniny reakcji PCR

Składnik	Objętość	Stężenie końcowe
matryca*	2 μ l	-
starter 1 (10 μ M)	1,25 μ l	0,5 μ M
starter 2 (10 μ M)	1,25 μ l	0,5 μ M
bufor Go Taq (5x)	5 μ l	1x (1,5 mM MgCl ₂)
dNTP (2 mM)	2,5 μ l	0,2 mM
H ₂ O MQ	12,9 μ l	-
polimeraza Go Taq (5 U/ μ l)	0,1 μ l	0,02 U/ μ l
objętość końcowa	25 μ l	
*10x rozcieńczony cDNA, uzyskany w wyniku reakcji odwrotnej transkrypcji (Omniscript RT) z 500 ng całkowitego RNA		

Tab. 3.31 Profil temperaturowo-czasowy reakcji PCR

Etap	Temperatura	Czas
Denaturacja wstępna	95°C	5 min
Denaturacja	95°C	30 s
Przylączenie starterów	48-54°C	30 s
Wydłużanie	72°C	60 s/1000 pz
Wydłużanie końcowe	72°C	10 min

Tab. 3.32 Sekwencje oligonukleotydów wykorzystanych podczas reakcji PCR

Nazwa	Sekwencja	T _m [°C]
MtABCG3_F	5'- GCACATACCAAAGTTCATGC -3'	49,7
MtABCG3_R	5'- AAGAACCGAAAGCAAATAGC -3'	47,7
MtABCG12_F	5'- AGCAACTACACTAGCTTCTG -3'	49,7
MtABCG12_R	5'- TAACCAAACAACATCAAG GC -3'	47,7
MtABCG20_F	5'- TCTCATGGATGTTAAGCAGG -3'	49,7
MtABCG20_R	5'- CTCCCCACATATTACCAAGC -3'	51,8
MtABCG26_F	5'-GTGGATACTATGTCCATAAGG-3'	49,9
MtABCG26_R	5'-TTGATACGTCTCAAGGCAAG-3'	48,8
MtABCG27_F	5'-CATTTTCCTCAAGAAAGAGCC-3'	50,6
MtABCG27_R	5'-ACTACTTCTGTCAAACCACC-3'	50,3
MtABCG28_F	5'-AGAGAGCAATGTTGAATAAGG-3'	48,7
MtABCG28_R	5'-TGAAGATCATCACGGTTACG-3'	49,9
MtABCG29_F	5'-CCACTAGACCTTGTATTACCG-3'	50,7
MtABCG29_R	5'-TGGCTATTAGAGCAACAACC-3'	50,0
MtABCG30_F	5'-CTCATCATACTTCATGTCAAGG-3'	48,6
MtABCG30_R	5'-TCATACTGAGACCCTAAAGC-3'	49,5
MtABCG31_F	5'TCTTTCAAGCAATCTTCACC-3'	49,3
MtABCG31_R	5'-TAGAACAAGGATATGTATCACC-3'	50,1
MtNCED_F	5'-GATTGGATCATGTATGACACC-3'	50,1
MtNCED_R	5'-TGAAATCCATAAGGAACACG-3'	47,9
MtGPAT5_F	5'- TTC CTA CCG TGA GAC TAA CC -3'	51,8
MtGPAT5_R	5'- CTT TCC GAG TAA AGT TAG TGC -3'	50,5
abi1-1_F	5'- CTT CCA TTA TCC GTT GAC C -3'	48,9
abi1-1_R	5'- CAC ACT TAT GTT GTC TTT GC -3'	47,7
Act_F	5'- TTC TCT CAG TAC TTT CCA GC -3'	49,7
Act_R	5'- AAG CAT CAC AAT CAC TCC -3'	45,8

❖ Skład buforu TAE: podrozdział 3.7.4

3.7.7 Analiza ekspresji genów *Medicago truncatula* metodą ilościowej reakcji PCR w czasie rzeczywistym

W celu porównywania poziomu ekspresji badanych genów *M. truncatula* posłużono się metodą ilościowej reakcji łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym (ang. *Real Time PCR*, RT-PCR). RT-PCR przeprowadzono w aparacie CFX Connect (Bio-Rad). Wykorzystano dostępne komercyjnie odczynniki iTaqTM Universal SYBR® Green Supermix (Bio-Rad). Ekspresję badanego genu mierzono z wykorzystaniem analizy

względnej $2^{-\Delta\Delta C_T}$ (Livak i Schmittgen, 2001). Jako kontrolę wewnętrzną do normalizacji poziomu ekspresji badanych genów zastosowano gen β -aktyny (Medtr3g095530), ulegający ekspresji konstytutywnie, niezależnie od warunków eksperymentów (Kakar i wsp., 2008). Analizę danych wykonano wykorzystując oprogramowanie Bio-Rad CFX manager 3.1. Każda reakcja została przeprowadzona z wykorzystaniem specyficznych oligonukleotydów (Tab. 3.35), w trzech powtórzeniach technicznych, z których wyznaczono średnią dla każdego powtórzenia biologicznego. Trzy niezależne próby biologiczne były wykorzystane do analiz statystycznych. Statystycznie istotne różnice zostały określone na podstawie testu t-Studenta dla prób niezależnych. Skład mieszaniny reakcyjnej oraz warunki reakcji przedstawiono w tabelach 3.33, 3.34.

Tab. 3.33 Profil temperaturowo-czasowy reakcji RT-PCR

Etap	Temperatura	Czas
Denaturacja wstępna	95°C	3 min
Denaturacja	95°C	5 s
Przyłączanie starterów	54,3°C	30 s
Wydłużanie	70°C	30 s

Tab. 3.34 Skład mieszaniny reakcji RT-PCR

Składnik	Objętość	Stężenie końcowe
matryca*	1 μ l	-
starter 1 (10 μ M)	0,5 μ l	0,5 μ M
starter 2 (10 μ M)	0,5 μ l	0,5 μ M
H ₂ O MQ	2 μ l	-
iTaq Supermix 2x	5 μ l	1x
objętość końcowa	10 μ l	
*10x rozcieńczony cDNA, uzyskany w wyniku reakcji odwrotnej transkrypcji (Omniscrypt RT) z 500 ng całkowitego RNA		

Tab. 3.35 Sekwencje oligonukleotydów wykorzystanych podczas reakcji RT-PCR

Nazwa	Sekwencja	T_m [°C]
MtABCG20rt_F	5'- TCTCATGGATGTTAAGCAGG -3'	49,7
MtABCG20rt_R	5'- CTCCCCACATATTACCAAGC -3'	51,8
MtABCG26rt_F	5'-GTGGATACTATGTCCATAAGG-3'	49,9
MtABCG26rt_R	5'-TTGATACGTCTCAAGCAAG-3'	48,8

MtABCG27rt_F	5'-CATTCCTCAAGAAAGAGCC-3'	50,6
MtABCG27rt_R	5'-ACTACTTCTGTCAAACCACC-3'	50,3
MtABCG29rt_F	5'-CCACTAGACCTTGTATTACCG-3'	50,7
MtABCG29rt_R	5'-TGGCTATTAGAGCAACAACC-3'	50,0
MtNCEDrt_F	5'-TTCTATTTCAGCTTCCTTCTCG-3'	50,5
MtNCEDrt_R	5'-GTAAAATCTCTACTCACAGACC-3'	51,1
MtHAI2rt_F	5'-ATCATAAGCCGGATCGACC-3'	51,1
MtHAI2rt_R	5'-ACCAATAGCTCTTGACATGG-3'	49,7
MtEXP1rt_F	5'-GTATAGGAGAGTTGGGTGC-3'	51,1
MtEXP1rt_R	5'-ATAGCTGTACGAGTCTTCC-3'	48,9
Actrt_F	5'-GTACTTTCCAGCAGATGTGG-3'	51,8
Actrt_R	5'-AACCTACAGACATCCAGTGG-3'	51,8

3.7.8 Przygotowanie konstrukcji genowych

Podczas realizacji pracy doktorskiej przygotowano szereg konstrukcji genowych, które zestawiono w tabeli 3.36. Zastosowano różne metody klonowania: i) metoda wykorzystująca enzymy restrykcyjne oraz ligazę DNA (restrykcja-ligacja), ii) metoda klonowania niezależna od ligacji (ang. *Ligation Independent Cloning*, LIC), iii) metoda klonowania w systemie Gateway (Gateway Cloning System, Invitrogen).

Tab. 3.36 Konstrukcje genowe uzyskane podczas realizacji pracy doktorskiej

Nazwa	Wektor	Metoda klonowania	Przeznaczenie
<i>proMtABCG20:GUS</i>	pPR97	restrykcja-ligacja	Analiza przestrzenna aktywności promotorów
<i>proMtABCG26:GUS</i>	pPR97	restrykcja-ligacja	
<i>proMtABCG27:GUS</i>	pPR97	restrykcja-ligacja	
<i>proMtABCG29:GUS</i>	pPR97	restrykcja-ligacja	
<i>proMtNCED:GUS</i>	pPR97	restrykcja-ligacja	
<i>proMtABCG20:NLS-GFP</i>	pPLV04_v2	Ligation Independent Cloning	
<i>MtABCG20-GFP</i>	pMDC43	Gateway Cloning System	lokalizacja subkomórkowa/nadekspresja
<i>pSU5nVenus:MtABCG20</i>	pSU5nVenus	Gateway Cloning System	Analiza BiFC
<i>pSU3cCFP:MtABCG20</i>	pSU3cCFP	Gateway Cloning System	
<i>pSU5nVenus:MtABCG26</i>	pSU5nVenus	Gateway Cloning System	
<i>pSU3cCFP:MtABCG26</i>	pSU3cCFP	Gateway Cloning System	

Amplifikacja fragmentów DNA metodą PCR

Do amplifikacji fragmentów DNA zastosowano polimerazę KOD DNA Polymerase (Millipore). Polimeraza KOD wykazuje aktywność 3'-5' egzonukleazy, która jest wykorzystywana do kontroli poprawności wbudowanych nukleotydów (ang. *proofreading activity*). Dodatkowo skład mieszaniny reakcyjnej wzbogacono roztworem betainy (Sigma-Aldrich), która zapobiega formowaniu się struktur II rzędowych ssDNA (ang. *single stranded DNA*) w rejonach bogatych w guaninę i cytozynę oraz poprawia wydajność ich amplifikacji (Henke i wsp., 1997). Skład mieszaniny reakcyjnej, profil temperaturowo-czasowy oraz sekwencje wykorzystanych oligonukleotydów przedstawiono w tabelach 3.37, 3.38, 3.39.

Startery wykorzystane do amplifikacji sekwencji promotorowych badanych genów zawierały na końcu 5' dodatkowe sekwencje rozpoznawane przez enzymy restrykcyjne. W przypadku klonowania w systemie LIC, startery użyte podczas amplifikacji insertu zawierały na końcu 5' 19 nukleotydowe adaptory. Sekwencje kodujące genów *MtABCG20* i *MtABCG26* wprowadzono do wektorów wykorzystując system Gateway, dlatego startery użyte do amplifikacji zawierały 25 nukleotydowe odcinki attB1 oraz attB2, służące do rekombinacji homologicznej.

Tab. 3.37 Skład mieszaniny reakcji PCR

Składnik	Objętość	Stężenie końcowe
matryca*	2 µl	-
starter 1 (10 µM)	0,75 µl	0,3 µM
starter 2 (10 µM)	0,75 µl	0,3 µM
bufor KOD 10x	2,5 µl	1x
Betaina (5 M)	5 µl	1 M
dNTP (2 mM)	2,5 µl	0,2 mM
MgSO ₄ (25 mM)	1,5 µl	1,5 mM
H ₂ O MQ	9,5 µl	-
polimeraza KOD Hot Start (1 U/µl)	0,5 µl	0,02 U/µl
objętość końcowa	25 µl	
*10x rozcieńczony cDNA, uzyskany w wyniku reakcji odwrotnej transkrypcji (Super Script) z 500 ng całkowitego RNA lub 100 ng genomowego DNA		

Tab. 3.38 Profil temperaturowo-czasowy reakcji PCR

Etap	Temperatura	Czas
Denaturacja wstępna	95°C	2 min
Denaturacja	95°C	20 s
Przyłączanie starterów	48-58°C	10 s
Wydłużanie	70°C	20 s/1000 pz
Termocykler C1000 Touch (Bio-Rad)		

Tab. 3.39 Sekwencje oligonukleotydów użytych podczas przygotowania konstrukcji genowych

Nazwa	Sekwencja	T_m [°C]	Długość amplikonu
PrABCG20_F	5'- GGA CGA GTT ATT TGT TTA GG -3'	48,4	1282 pz
PrABCG20_R	5'- CAT CTT AGA TAT AAG ATA AAG TTT TG -3'	46,2	
PrABCG20GUS_F	5'- ATG AAT TCG GAC GAG TTA TTT GTT TAG G -3'	55,6	1297 pz
PrABCG20GUS_R	5'- TAG GAT CCATCT TAG ATA TAA GAT AAA GTT TTG -3'	53,2	
PrABCG20lic_F	5'- TAG TTG GAA TGG GTT CGA AGG ACG AGT TAT TTG TTT AGG -3'	62,8	1317 pz
PrABCG20lic_R	5'- TTA TGG AGT TGG GTT CGA ACT TAG ATA TAA GAT AAA GTT TTG -3'	59,3	
PrABCG26_F	5'- GTC GAG AAC TAG AAA GTT AGC -3'	51,0	1750 pz
PrABCG26_R	5'- GTG TTG GAA GAG TCT ACG -3'	49,7	
PrABCG26GUS_F	5'- ATG AAT TCG TCG AGA ACT AGA AAG TTA GC -3'	56,7	1765 pz
PrABCG26GUS_R	5'- TAG GAT CCA TTA TTA CTT TTG TTA CG -3'	51,1	
PrABCG27_F	5'- GGA AAG TAG TTG GTG TGG -3'	50,3	1970 pz
PrABCG27_R	5'- TCT GAT TGT GTC CTA GAT ATC C -3'	51,0	
PrABCG27GUS_F	5'- TAG GAT CCG GAA AGT AGT TGG TGT GG -3'	59,8	1985 pz
PrABCG27GUS_R	5'- TAG GTA CCA ACT GCC CAA AAA AAT TTA ATT AGC -3'	58,1	
PrABCG29_F	5'- TAC CTT GTC CTT GTG AGC -3'	51,6	1900 pz
PrABCG29_R	5'- GTT CCG ATT TCG TTC TCC -3'	50,6	
PrABCG29GUS_F	5'- TAG GAT CCT ACC TTG TCC TTG TGA GC -3'	59,5	1915 pz
PrABCG29GUS_R	5'- TAG GTA CCA TGC CAC CTC ACT AAT TAC -3'	57,7	
PrNCED_F	5'- AAT ATT GGT AGT CTT GTT TCG G -3'	50,5	2054 pz

PrNCED_R	5'- TTA ATC CAT GTG TTT GAT GAA GC -3'	51,8	2062 pz
PrNCEDGUS_F	5'- ATG AAT TCG ACA TTC TGT TGC A -3'	53,1	
PrNCEDGUS_R	5'- TAG GTA CCA GTG ATG ATA ATA GTT A -3'	50,5	
ABCG20cdna_F	5'- CTT ATA TCT AAG ATG ATG CCC -3'	44,8	2565 pz
ABCG20cdna_R	5'- GGC ATT TAG GTT GCC C -3'	50,9	
ABCG20BP_F	5'- GGG GAC AAG TTT GTA CAA AAA AGC AGG CTTCC TTA TAT CTA AGA TGA TGC C -3'	65,7	2621 pz
ABCG20BP_R	5'- GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTCG GCA TTT AGG TTG CCC -3'	70,3	
ABCG26cdna_F	5'- ATG CCA ACA ACA AAA GAA GC -3'	52,2	2326 pz
ABCG26cdna_R	5'- ACT CTT GAT ACG TCT CAA GG -3'	51,3	
ABCG26BP_F	5'- GGG GAC AAG TTT GTA CAA AAA AGC AGG CTTCA TGC CAA CAA CAA AAG AAG C -3'	67,8	2359 pz
ABCG26BP_R	5'- GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTCA CTC TTG ATA CGT CTC AAG G -3'	68,4	

Hydroliza DNA za pomocą enzymów restrykcyjnych

Produkty reakcji PCR, zawierające sekwencje rozpoznawane przez enzymy restrykcyjne oraz wektor pPR97 poddano niezależnej hydrolizie enzymami restrykcyjnymi FastDigest (Fermentas), według zaleceń producenta. Do reakcji wykorzystano 300 ng produktu reakcji PCR lub 1000 ng wektora.

Tab. 3.40 Enzymy restrykcyjne użyte podczas przygotowywania konstrukcji genowych

Nazwa insertu	Wektor	Enzymy restrykcyjne
<i>proMtABCG20</i>	pPR97	<i>EcoRI/BamHI</i>
<i>proMtABCG26</i>	pPR97	<i>EcoRI/BamHI</i>
<i>proMtABCG27</i>	pPR97	<i>BamHI/KpnI</i>
<i>proMtABCG29</i>	pPR97	<i>BamHI/KpnI</i>
<i>proMtNCED</i>	pPR97	<i>EcoRI/KpnI</i>

Oczyszczanie fragmentów DNA

Oczyszczanie produktów reakcji PCR, jak również produktów PCR po hydrolizie enzymami restrykcyjnymi przeprowadzono za pomocą zestawu DNA Clean & Concentrator™ (D4005, Zymo Research), zgodnie z instrukcją załączoną przez producenta.

Elektroforeza w żelu agarozowym i oczyszczanie fragmentów DNA plazmidu

Fragmenty DNA plazmidu pPR97, po hydrolizie enzymami restrykcyjnymi rozdzielano w 0,7% żelu agarozowym (MB Agarose, Biotools) zawierającym bromek etydyny (1µg/ml) w buforze o zmniejszonej zawartości EDTA (Modified TAE Buffer, Millipore). Elektroforezę prowadzono przez 10 min przy napięciu 50V, a następnie przez 30 min przy napięciu 90V. Wielkość fragmentów określono na podstawie komercyjnego markera Gene Ruler 1kb (Fermentas). Przy użyciu sterylnej ostrza skalpela wycięto fragment żelu zawierający właściwy fragment DNA i umieszczono w probówce typu Eppendorf (1,5 ml). Próbę zważono, a następnie oczyszczono za pomocą zestawu Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit (Zymo Research), zgodnie z instrukcją załączoną przez producenta.

Ligacja

W wyniku reakcji hydrolizy enzymami restrykcyjnymi uzyskano produkty PCR (inserty) oraz zlinearyzowany wektor pPR97 posiadający homologiczne, „lepkie końce”. W celu ich połączenia zastosowano ligazę DNA z faga T4 (T4 DNA Ligase, Promega). Stosunek molowy insertu do wektora wynosił 3:1. Reakcję ligacji prowadzono w temperaturze 4°C przez 18 h. Mieszaninę ligacyjną inaktywowano poprzez 10-minutową inkubację w temperaturze 70°C. Następnie mieszaninę ligacyjną pozbawiono soli przez mikrodializę. W tym celu, na powierzchni 50 ml H₂O MQ, znajdującej się w zlewce, umieszczono membranę Millipore 0,025 µm (VSWP01300). Roztwór DNA nałożono na membranę i zebrano po 15 min inkubacji w temperaturze pokojowej. 8 µl odsolonej mieszaniny wykorzystano do transformacji komórek *Escherichia coli* DH5α metodą elektroporacji (podrozdział 3.4.2).

Ligation Independent Cloning

Zastosowana metoda klonowania niezależna od ligazy została opisana przez Bert De Rybel (De Rybel i wsp., 2011). Metoda opiera się na wykorzystaniu aktywności 3'-5' egzonukleazy T4 DNA polimerazy (NEB). Reakcje prowadzono w termocyklerze C1000 Touch (Bio-Rad).

Przygotowanie wektora

W pierwszej kolejności wektor pPLV04_v2 został zlinearyzowany poprzez hydrolizę enzymem restrykcyjnym HpaI (FastDigest HpaI, Fermentas). Następnie wektor został rozdzielony w 0,7% żelu agarozowym i właściwa forma wektora została oczyszczona

przy pomocy zestawu Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit (Zymo Research). W celu uzyskania „lepkich końców” przeprowadzono reakcję z wykorzystaniem T4 DNA polimerazy. Skład mieszaniny reakcyjnej i profil temperaturowo-czasowy zamieszczono w tabeli 3.41.

Tab. 3.41 Skład mieszaniny reakcyjnej i profil temperaturowo-czasowy reakcji „lepkich końców” przeprowadzonej dla wektora pPLV04_v2

Składnik	Objętość	Stężenie końcowe
zlinearyzowany wektor	x (~1,2 µg)	-
bufor T4 (10x)	4 µl	1x
dCTP (100 mM)	4 µl	10 mM
DTT (100 mM)	2 µl	5 mM
BSA (100x)	0,4 µl	1x
polimeraza T4 DNA	0,8 µl	-
H ₂ O MQ	do 40 µl	-
objętość końcowa	40 µl	
Inkubacja 75 min, 22°C Inaktywacja 20 min, 75°C		

Przygotowanie insertu

Fragment DNA *proMtABCG20* z adapterami do klonowania metodą LIC wykorzystano do reakcji z polimerazą T4 DNA, w celu utworzenia „lepkich końców”. Skład mieszaniny reakcyjnej oraz profil temperaturowo-czasowy zamieszczono w tabeli 3.42.

Tab. 3.42 Skład mieszaniny reakcyjnej i profil temperaturowo-czasowy reakcji „lepkich końców” przeprowadzonej dla insertów

Składnik	Objętość	Stężenie końcowe
oczyszczony produkt reakcji PCR	x (~400 ng)	-
bufor T4 (10x)	2 µl	1x
dGTP (100 mM)	2 µl	10 mM
DTT (100 mM)	1 µl	5 mM
BSA (100x)	0,2 µl	1x
polimeraza T4 DNA	0,4 µl	-
H ₂ O MQ	do 20 µl	-
objętość końcowa	20 µl	
Inkubacja 75 min, 22°C; Inaktywacja 20 min, 75°C		

Połączenie insertu i wektora

Uzyskane podczas reakcji tworzenia „lepkich końców” insert i wektor połączono w stosunku molowym 3:1. Mieszaninę inkubowano w temperaturze 4°C przez 18 h, a następnie pozbawiono soli przez mikrodializę. 8 µl odsolonej mieszaniny wykorzystano do transformacji komórek *Escherichia coli* DH5α metodą elektroporacji (podrozdział 3.4.2).

Gateway Cloning System

W pracy doktorskiej wykorzystano technologię klonowania typu Gateway (Invitrogen), która jest oparta na rekombinacji homologicznej i składa się z dwóch etapów. W pierwszym etapie produkt reakcji PCR wprowadzany jest do „wektora wejściowego” (reakcja BP). W drugim etapie fragment DNA może być przeniesiony, na drodze rekombinacji homologicznej (reakcja LR), do wielu różnych wektorów docelowych („wektory wyjściowe”), z zachowaniem prawidłowej orientacji oraz ramki odczytu.

Reakcja BP

W pierwszej reakcji Gateway (reakcja BP), dzięki obecności odcinków flankujących produkt PCR (attB1 oraz attB2) i mieszaniny enzymów BP Clonase II (Invitrogen), doszło do wymiany odcinka znajdującego się w wektorze pDONR/Zeo (Invitrogen), wyznaczonego przez sekwencje attP1 oraz attP2. W rezultacie powstał klon wejściowy zawierający miejsca rekombinacji attL1 oraz attL2. Skład mieszaniny reakcyjnej oraz profil temperaturowo-czasowy zamieszczono w tabeli 3.43.

Tab. 3.43 Skład mieszaniny reakcyjnej oraz profil temperaturowo-czasowy reakcji BP

Składnik	Objętość
produkt PCR (z odcinkami attB1 i attB2)	x µl (~75 ng)
wektor pDONR/Zeo	1 µl (150 ng)
bufor klonazy BP (5x)	2 µl
bufor TE, pH 8,0	do 8 µl
BP Clonase II	1 µl
Inkubacja 1 h, 25°C	
Inaktywacja mieszaniny enzymów BP poprzez dodanie 1 µl Proteinazy K oraz inkubację 10 min, 37°C	

Z mieszaniny reakcyjnej usunięto sól poprzez mikrodializę. Komórki *Escherichia coli* DH5α transformowano metodą elektroporacji (podrozdział 3.4.2). Bakterie wysiano

na stałe podłoże LB o obniżonej zawartości soli (Tab. 3.44), zawierające antybiotyk selekcyjny zeocynę (50 µg/ml).

Tab. 3.44 Skład pożywki LB o obniżonej zawartości soli

Składnik	Ilość (na 1 l)
pepton	10 g
ekstrakt drożdżowy	5 g
NaCl	5 g

Reakcja LR

W drugiej reakcji Gateway (reakcja LR), dzięki obecności odcinków flankujących insert (attL1 oraz attL2) w wektorze wejściowym oraz (attR1 i attR2) w wektorze docelowym, w obecności mieszaniny enzymów LR Clonase II (Invitrogen), doszło do wymiany fragmentów wektorów znajdujących się między wymienionymi odcinkami. W rezultacie powstał wektor ekspresyjny, zawierający żądany insert w odpowiedniej orientacji i z zachowaniem ramki odczytu. Skład mieszaniny reakcyjnej oraz profil temperaturowo-czasowy zamieszczono w tabeli 3.45.

Tab. 3.45 Skład mieszaniny reakcyjnej oraz profil temperaturowo-czasowy reakcji LR

Składnik	Objętość
wektor wejściowy (pDONR)	1 µl (150 ng)
wektor docelowy	1 µl (150 ng)
bufor klonazy LR (5x)	2 µl
bufor TE, pH 8,0	4 µl
LR Clonase II	1 µl
Inkubacja 1 h, 25°C	
Inaktywacja mieszaniny enzymów BP poprzez dodanie 1 µl Proteinazy K oraz inkubację 10 min, 37°C	

Z mieszaniny reakcyjnej usunięto sól poprzez mikrodializę. Komórki *Escherichia coli* DH5α transformowano metodą elektroporacji (podrozdział 3.4.2). Bakterie wysiano na stałe podłoże LB, zawierające odpowiedni antybiotyk selekcyjny.

- ❖ Skład pożywki LB: podrozdział 3.4.1

Identyfikacja pozytywnych klonów bakteryjnych

Identyfikację pozytywnych kolonii bakteryjnych przeprowadzono za pomocą trzech metod: i) kolonijnej reakcji PCR (polimeraza GoTaq, Promega), ii) hydrolizy enzymami restrykcyjnymi plazmidowego DNA (FastDigest, Fermentas), iii) sekwencjonowania.

Wszystkie uzyskane konstrukcje genowe zostały przesekwencjonowane przez firmę Genomed. Do analizy wyników sekwencjonowania wykorzystano bezpłatny program FinchTV.

3.7.9 Genotypowanie mutantów insercyjnych Tnt1

W celu selekcji roślin homozygotycznych z mutacją w obrębie genu *MtWBC20*, *mtabcg20-1* (NF10694) oraz *mtabcg20-2* (NF6539) wykorzystano reakcję PCR. Zaprojektowano dwie pary starterów tak, aby możliwe było stwierdzenie czy doszło do wbudowania retrotranspozonu Tnt1 do genomu roślinnego, w obrębie obu alleli badanego genu. Pierwsza para starterów umożliwiała powstanie produktu PCR tylko w przypadku wbudowania elementu transpozycyjnego, bowiem jeden ze starterów był komplementarny do sekwencji retrotranspozonu Tnt1. Druga para starterów przyłączała się do rejonu genu, który flankuje potencjalne miejsce insercji. Mając na uwadze długość retrotranspozonu Tnt1 (5334 pz) czas wydłużania starterów dostosowano w taki sposób, aby możliwe było uzyskanie amplikonu tylko dla alleli dzikich. Skład mieszaniny reakcyjnej, profil temperaturowo-czasowy oraz sekwencje wykorzystanych oligonukleotydów przedstawiono w tabelach 3.46, 3.47, 3.48. Matrycę do reakcji PCR stanowił genomowy DNA (100 ng), wyizolowany z liści 4 tygodniowych roślin, wyprowadzonych z zakupionych nasion mutantów oraz roślin typu dzikiego (ang. *wild type*, WT), ekotyp R108. Jako kontrolę pozytywną reakcji PCR zastosowano gen β -aktyny. Produkty reakcji PCR rozdzielono w 1% żelu agarozowym z dodatkiem barwnika fluorescencyjnego (Gel View) i na podstawie układu prążków wyselekcjonowano rośliny homozygotyczne.

Tab. 3.46 Skład mieszaniny reakcji PCR

Składnik	Objętość	Stężenie końcowe
matryca*	2 μ l	-
starter 1 (10 μ M)	1,25 μ l	0,5 μ M
starter 2 (10 μ M)	1,25 μ l	0,5 μ M
bufor Go Taq (5x)	5 μ l	1x (1,5 mM MgCl ₂)

dNTP (2 mM)	2,5 µl	0,2 mM
H ₂ O MQ	12,9 µl	-
polimeraza Go Taq (5 U/µl)	0,1 µl	0,02 U/µl
objętość końcowa	25 µl	
*100 ng genomowego DNA wyizolowanego z liści <i>M. truncatula</i> metodą Edwardsa		

Tab. 3.47 Profil temperaturowo-czasowy reakcji PCR

Etap	Temperatura	Czas
Denaturacja wstępna	95°C	5 min
Denaturacja	95°C	30 s
Przylączenie starterów	52°C	30 s
Wydłużanie	72°C	60 s/1000 pz
Wydłużanie końcowe	72°C	10 min

Tab. 3.48 Sekwencje oligonukleotydów wykorzystanych podczas genotypowania mutantów Tnt1

Nazwa	Sekwencja 5'-3'	T _m [°C]	Długość amplikonu w przypadku insercji	Długość amplikonu w przypadku braku insercji
abcg20-1_F	TGGAACCATAACATACAACG	50,2	<6000 pz	509 pz
abcg20-1_R	CGCATTACCACTGTAAATCG	49,7		
abcg20-1_F	TGGAACCATAACATACAACG	50,2	500 pz	-
Tnt1_R	GCTACCAACCAAACCAAGTC	51,8		
abcg20-2_F	ACATGATGAGATAGAGCAGC	53,2	<6000 pz	1308 pz
abcg20-2_R	GCTTGGTAATATGTGGGGAG	52,9		
abcg20-2_F	ACATGATGAGATAGAGCAGC	53,2	1137 pz	-
Tnt1_R	GCTACCAACCAAACCAAGTC	51,8		

3.7.10 Identyfikacja wprowadzonego transgenu u *Medicago truncatula* metodą PCR

Z trzech pojedynczych liści *Medicago truncatula*, uzyskanych na drodze transformacji za pomocą *Agrobacterium tumefaciens*, wyizolowano genomowy DNA. 100 ng wyizolowanego DNA posłużyło do przeprowadzenia reakcji PCR, mającej na celu sprawdzenie czy wprowadzany transgen został wbudowany do genomu roślinnego. Do reakcji amplifikacji wykorzystano polimerazę GoTaq (Promega). Zastosowane

startery obejmowały fragment sekwencji genu reporterowego β -glukuronidazy (GUS). Skład mieszaniny reakcyjnej, profil temperaturowo-czasowy oraz sekwencje wykorzystanych oligonukleotydów przedstawiono w tabelach 3.46, 3.47, 3.49. Jako kontrolę negatywną wykorzystano genomowy DNA wyizolowany z roślin R108 typu dzikiego (WT). Jako kontrolę pozytywną reakcji PCR wykorzystano gen β -aktyny.

Tab. 3.49 Sekwencje oligonukleotydów wykorzystanych podczas identyfikacji transformantów roślinnych

Nazwa	Sekwencja	T _m [°C]	Długość amplikonu
GUS_F	5'- GTC ACT CCG TAT GTT ATT GC -3'	49,7	526 pz
GUS_R	5'- CAC ACT CTG TCT GGC TTT TG -3'	51,8	

3.8 Analiza przestrzenna aktywności promotorów *MtABCG*

Przygotowanie materiału

Transgeniczne korzenie włosowate (uzyskane po transformacji przy pomocy bakterii *Agrobacterium rhizogenes*) lub nasiona (uzyskane po transformacji przy pomocy bakterii *Agrobacterium tumefaciens*) niosące konstrukcję odpowiednio: i) *proMtABCG20:GUS*, ii) *proMtABCG26:GUS*, iii) *proMtABCG27:GUS*, iv) *proMtABCG29:GUS*, umieszczono w mieszaninie wybarwiającej, zawierającej substrat dla enzymu β -glukuronidazy. Materiał poddano działaniu próżni przez 20 min, a następnie inkubowano w temperaturze 37°C, w ciemności, do momentu pojawienia się niebieskiego zabarwienia (w zależności od konstrukcji genowej czas inkubacji wynosił od 6 h do 24 h). Po usunięciu mieszaniny wybarwiającej materiał utrwalono przez inkubację w 3,7% roztworze formaldehydu w PBS (BioShop) przez 18 h, w temperaturze 4°C. Następnie korzenie dwukrotnie przepłukano w roztworze PBS przez 15 min. Materiał odwodniono stosując szereg etanolowy 15%, 20%, 30%, 50%, 70% (inkubacja po 15 min w temperaturze 4°C). Materiał przechowywano w 70% alkoholu etylowym. Obserwacje mikroskopowe prowadzono przy użyciu binokularu Nikon SMZ-10A i mikroskopu Leica DMI 4000B.

W celu wykonania skrawków, część korzeni pocięto na 0,5 cm fragmenty i przeprowadzono kolejny etap odwadniania 75%, 80%, 90%, 95%, 99,8% (inkubacja po 1 h w temperaturze 4°C). Do korzeni umieszczonych w 99,8% etanolu dodano воск Steedmana (Norenburg i Barrett, 1987) w stosunku 1:1 i inkubowano 18 h w temperaturze

37°C. Następnie usunięto wosk z etanolem, a korzenie umieszczono w 100% wosku, inkubowano przez 3 h w temperaturze 37°C. Wykorzystując silikonową foremkę wylano bloczki woskowe zawierające fragmenty korzeni. Przy użyciu mikrotomu Leica RM2165 uzyskano skrawki o grubości 14 µm, które umieszczono na szkiełku podstawowym pokrytym PEI (ang. *poly(ethyleneimine)*, Sigma 03880) i kroplą wody. Szkiełka z preparatami inkubowano w 98% etanolu do momentu całkowitego odpłukania wosku. Na szkiełko nakrywkowe nałożono kroplę entallanu (107961.0100 Merck) i zamknięto preparat. Obserwacje mikroskopowe prowadzono przy użyciu mikroskopu Leica DMI 4000B.

W przypadku badania aktywności promotora *MtABCG20* w brodawkach korzeniowych, trzytygodniowe rośliny po transformacji przy pomocy *A. rhizogenes* zostały inokulowane bakteriami symbiotycznymi *Sinorhizobium meliloti*. Po 21 dniach od inokulacji korzenie z brodawkami zostały umieszczone w mieszaninie wybarwiającej i postępowano według procedury opisanej powyżej.

W celu sprawdzenia, czy wzór ekspresji promotora *MtABCG20* zmienia się po egzogennej aplikacji kwasu abscysynowego, wyprowadzono 10 niezależnych linii hodowli korzeni włosowatych, niosących konstrukcję *proMtABCG20:GUS*. Korzenie każdej linii podzielono na dwie części i przełożono na stałą pożywkę Fahreaus HR z dodatkiem lub bez (kontrola) 10 µM ABA. Materiał inkubowano przez 24 h, a następnie umieszczono w mieszaninie wybarwiającej i postępowano według procedury opisanej powyżej.

Podczas realizacji pracy doktorskiej użyto również system oparty na fuzji sekwencji badanego promotora z sekwencją GFP oraz NLS (ang. *Nuclear Localization Sequence*) (De Rybel i wsp., 2011). Przygotowana konstrukcja genu *proMtABCG20:NLS-GFP* została wprowadzona do korzeni poprzez transformację siewek *M. truncatula* z wykorzystaniem bakterii *A. rhizogenes*. Po trzech tygodniach od transformacji, nowo powstałe korzenie transgeniczne analizowano przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego (Leica DMI 4000B).

Wszystkie analizy aktywności promotorów wykonywano w co najmniej 10 powtórzeniach, na korzeniach pochodzących z niezależnych roślin, transformowanych poszczególnymi konstrukcjami genowymi. W pracy zamieszczono przykładowe zdjęcia powtarzalnych wyników.

3.9 Analiza lokalizacji subkomórkowej transporterów MtABCG

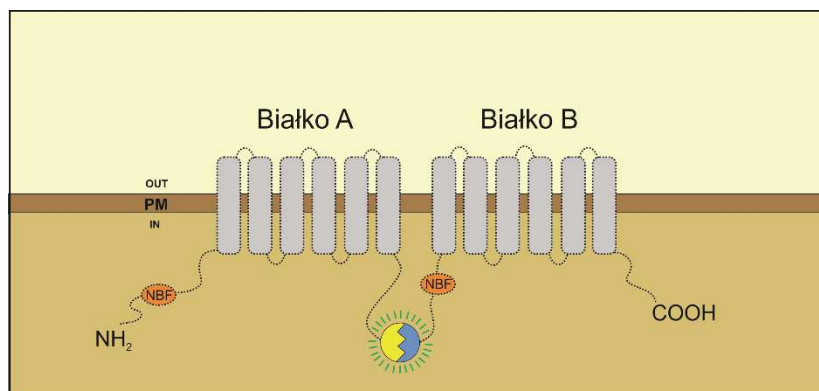
Wyizolowane protoplasty z mezofilu liści *Arabidopsis thaliana* transformowano jednocześnie dwoma konstrukcjami genowymi: *MtABCG20:GFP* (6 µg) oraz *PIP:mCherry* (6 µg) i inkubowano przez 17 h w temperaturze pokojowej, w ciemności. Obserwacje transformowanych protoplastów przeprowadzono przy użyciu mikroskopu konfokalnego (Leica TCS SP5). Konstrukcja fuzyjna *PIP:mCherry* zawiera sekwencję *AtPIP2A* połączoną z sekwencją kodującą białko fluorescencyjne mCherry. *AtPIP2A* koduje białko akwaporynę, które wykorzystano jako białko markerowe błony komórkowej. Gotową konstrukcję *PIP:mCherry* otrzymano dzięki uprzejmości dr Karoliny Jarzyniak.

3.10 Dwucząsteczkowa komplementacja fluorescencji (BiFC)

Do określenia dimeryzacji badanych transporterów wykorzystano metodę wielokolorowej dwucząsteczkowej komplementacji fluorescencji mcBiFC (ang. *multicolor Bimolecular Fluorescence Complementation*), służącej do badania oddziaływań między białkami w żywych komórkach. W pierwszej kolejności przygotowano fuzyjne konstrukcje genowe zawierające sekwencje badanych białek połączone z sekwencją części N (część aminowa) lub C (część karboksylowa) białka fluorescencyjnego SCFP3A lub Venus. Następnie transformowano protoplasty *Arabidopsis thaliana* następującymi parami wektorów:

- i) *pSU5nVenus::MtABCG20/pSU3cCFP::MtABCG20*,
- ii) *pSU5nVenus::MtABCG26/pSU3cCFP::MtABCG26*,
- iii) *pSU5nVenus::MtABCG20/pSU3cCFP::MtABCG26*,
- iv) *pSU5nVenus::MtABCG20/pSU3cCFP* (kontrola negatywna),
- v) *pSU5nVenus::MtABCG26/pSU3cCFP* (kontrola negatywna).

Pary wektorów zostały dobrane w ten sposób, aby jeden z plazmidów zawierał część N białka Venus, a drugi część C białka SCFP3A. W przypadku oddziaływań między badanymi białkami, części białek fluorescencyjnych zbliżają się do siebie na odległość umożliwiającą odtworzenie funkcjonalnej struktury chromoforu i zaobserwowanie zjawiska fluorescencji (Ryc. 3.1). Obserwacje transformowanych protoplastów przeprowadzono przy użyciu mikroskopu konfokalnego (Leica TCS SP5). Wektory *pSU5nVenus* oraz *pSU3cCFP*, dostosowane do klonowania w systemie Gateway, otrzymano dzięki uprzejmości dr Michała Michalaka.



Ryc. 3.1 Schemat wykorzystania mcBiFC w badaniach nad oddziaływaniami między transporterami ABC.

3.11 Eksperymenty transportu kwasu abscysynowego

3.11.1 Transport kwasu abscysynowego w hodowlach zawiesinowych komórek *Nicotiana tabacum* BY2

Do eksperymentu transportu wykorzystano hodowle zawiesinowe komórek tytoniu BY2, których co najmniej 75% stanowiły żywe komórki. Żywotność komórek w zawiesinach oceniono przy użyciu FDA (podrozdział 3.5.11).

Opis eksperymentu transportu

Do eksperymentu wykorzystano 4-dniowe hodowle zawiesinowe komórek tytoniu BY2 nadekspresjonujące *MtABCG20* oraz komórki BY2 transformowane wektorem pMDC43, który nie zawiera sekwencji *MtABCG20* (kontrola, pusty wektor, ang. *empty vector*, EV). Komórki odfiltrowano i zawieszono w świeżej pożywce BY2 o temperaturze 4°C (16 g/100 ml). Do linii dodano kwas abscysynowy, którego stężenie końcowe wynosiło 250 µM (stok 190 mM ABA rozpuszczony w metanolu) i inkubowano 30 min w temperaturze 4°C, z wytrząsaniem 60 rpm. Podczas inkubacji w temperaturze 4°C potencjalny substrat wnika do wnętrza komórek na drodze biernej dyfuzji, a niska temperatura hamuje działanie mechanizmów aktywnego transportu. Następnie komórki odfiltrowano i przeniesiono do świeżej pożywki BY2 o temperaturze 23°C. Próby zbierano przez odfiltrowanie komórek tytoniu z 5 ml zawiesiny po 30, 45 i 60 min, od momentu umieszczenia komórek w pożywce o temperaturze 23°C. Z zebranych komórek przeprowadzono ekstrakcję związków niskocząsteczkowych z użyciem metanolu. Ilość ABA w zebranych próbach analizowano z wykorzystaniem techniki

wysokosprawnej chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas (HPLC/MS, ang. *High Performance Liquid Chromatography/Mass Spectrometry*).

Wyniki zamieszczone w podrozdziale 4.2.4 pokazują relatywną ilość ABA przedstawioną jako stosunek pól powierzchni pod pikami na chromatogramach, odpowiednio dla danego jonu i standardu wewnętrznego. Wartość 100% odpowiada ilości ABA w komórkach w momencie przeniesienia komórek do temperatury pokojowej (czas T₀, start eksperymentu). Wartości reprezentują średnią z trzech niezależnych powtórzeń biologicznych (każde powtórzenie biologiczne było wykonane na niezależnej linii BY2, uzyskanej po transformacji). Różnice istotne statystycznie pomiędzy komórkami kontrolnymi, a ekspresjonującymi *MtABCG20* określono przy użyciu testu t-Studenta.

❖ Skład pożywki BY2: podrozdział 3.5.9

Ekstrakcja związków niskocząsteczkowych z komórek *Nicotiana tabacum* BY2

Ekstrakcję związków niskocząsteczkowych przeprowadzono według metody opisanej przez A. Staszów (2011). Zamrożone komórki tytoniu BY2 utarto w moździerzu w obecności ciekłego azotu. Dodano 2 ml 80% metanolu i przeniesiono zawiesinę do szklanej probówki. Do próby dodano 10 µl standardu wewnętrznego, ²H-ABA (stok 1mg/ml). Próby poddano sonikacji w łaźni ultradźwiękowej (Sonorex Super RK103H, Bandelin) przez 15 min, a następnie wirowano przez 15 min z prędkością obrotową 5000 rpm, w temperaturze 18°C. Supernatant przeniesiono do nowej, szklanej probówki, a do osadu dodano 1 ml 80 % metanolu i ponownie poddano sonikacji i wirowaniu, w tych samych warunkach. Uzyskane ekstrakty wysuszono w wirówce próżniowej, a następnie rozpuszczono w 200 µl 80% metanolu i poddano analizie HPLC/MS.

Analizy HPLC/MS

Analizy LC/MS zostały przeprowadzone z użyciem systemu LC/ESI/MS. System chromatograficzny UPLC Aquity firmy Waters (UK) był sprzężony ze spektrometrem mas micrOTof-Q11 firmy Bruker Daltonics (Niemcy). Parametry pracy poszczególnych układów przedstawiono w tabelach 3.50, 3.51.

Tab. 3.50 Parametry pracy układu Waters UPLC Aquity

Układ Waters UPLC Aquity	
Sposób wprowadzania próby	Automatyczna komora nastrzyku
Kolumna	Poroshell 120-EC-C18 (Agilent)
Wymiary kolumny	2,1 x 100 mm, średnica ziaren 2,7 µm
Temperatura kolumny	35°C
Objętość nastrzyku	5 µl
Przepływ	0,6 ml/min
Temperatura próby	10°C
Czas rozdziału	25 min

Tab. 3.51 Parametry pracy układu micrOToF-QII

Układ micrOToF-QII	
Źródło jonów	ESI
Analizator	Qo-ToF
Napięcie w źródle jonów	+/- 4,5 kV
Temperatura źródła	220°C
Gaz nebulizujący	Azot 1,2 bara
Przepływ gazu suszącego	8 l/min
Rozdzielczość układu	15000 FWHM (przy 200 m/z)
Zakres rejestrowanych mas	50-1200 m/z
Kalibracja aparatu	Zewnętrzna i wewnętrzna – klastrami mrówczanu sodu
Program do analizy danych	Data Analysis 4.0

Fazę ruchomą stanowiły mieszaniny rozpuszczalników:

- Faza A – 99,5% H₂O, 5% kwas mrówkowy (v/v)
- Faza B – 99,5 % acetonitryl, 5% kwas mrówkowy (v/v)

Gradient fazy ruchomej przedstawiono w tabeli 3.52.

Tab. 3.52 Gradient fazy ruchomej wykorzystany przy analizach HPLC/MS

Minuty	% A	% B
0	90	10
5	70	30
12	70	30
13	5	95
15	5	95
18	90	10
25	90	10

Objętość wycieku z kolumny została rozdzielona w stosunku 3:2 (split postkolumnowy), do źródła jonów próba była wprowadzana z prędkością przepływu 0,2 ml/min.

3.11.2 Transport $^3\text{H-ABA}$ w pęcherzykach błonowych

Izolację frakcji błonowej przeprowadzono zgodnie z procedurą opisaną w podrozdziale 3.6.1. Frakcję błonową izolowano z komórek tytoniu *Nicotiana tabacum* BY2, nadeksprymujących *MtABCG20*. Uzyskane frakcje błon komórkowych zawieszono w buforze STED10 (Tab. 3.18), tak aby stężenie białka wynosiło 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Eksperyment przeprowadzono w trzech warunkach i) w obecności ATP, ii) przy braku ATP oraz iii) w obecności ATP i inhibitora kompetycyjnego ATPaz, ortowanadanu sodu. Skład mieszaniny reakcyjnej, dla wszystkich wariantów eksperymentu umieszczono w tabeli 3.53. Kwas abscysynowy wyznakowany trytem ($^3\text{H-ABA}$) pochodził z firmy Hartmann Analytic ART1186. Transport inicjowano poprzez dodanie do mieszaniny reakcyjnej roztworu pęcherzyków błonowych. Próby inkubowano w temperaturze 20°C z wytrząsaniem 120 rpm, a następnie zbierano w następujących punktach czasowych: 1, 2 i 3 min. Podczas zbioru 100 μl próby odfiltrowano na filtrze nitrocelulozowym (0,45 μm , Millipore) i przepłukano buforem do transportu (Tab. 3.54) o temperaturze 4°C z dodatkiem 150 μM zimnego kwasu abscysynowego. Filtry suszono w temperaturze pokojowej, następnie umieszczono w probówkach i dodano 3 ml płynu scyntylacyjnego (OptiPhase SuperMix, PerkinElmer). Poziom radioaktywności mierzono przy użyciu licznika scyntylacyjnego MicroBeta2 Microplate Scintillation Counter (PerkinElmer, Waltham, MA, USA). Każda reakcja została przeprowadzona w trzech powtórzeniach technicznych, z których wyznaczono średnią dla każdego powtórzenia biologicznego.

Trzy niezależne próby biologiczne były wykorzystane do analiz statystycznych. Statystycznie istotne różnice zostały określone na podstawie testów ANOVA i Tukey'a.

Tab. 3.53 Skład mieszaniny reakcyjnej wykorzystanej podczas eksperymentu transportu ^3H -ABA w pęcherzykach błonowych

	+ATP	-ATP	+ATP, +inhibitor
Składnik	Stężenie końcowe	Stężenie końcowe	Stężenie końcowe
Bufor do transportu	1 x	1 x	1 x
MgSO ₄	10 mM	1 mM	10 mM
ATP	4 mM	-	4 mM
^3H -ABA	0,5 μCi	0,5 μCi	0,5 μCi
ortowanadan sodu	-	-	200 mM
NH ₄ Cl	5 mM	5 mM	5 mM
pęcherzyki błonowe	~ 0,3 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	~ 0,3 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	~ 0,3 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
^3H -ABA stężenie stoku 1 mCi/ml; aktywność 10 Ci/mmol			

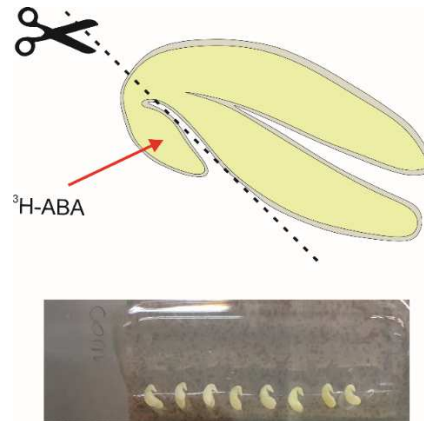
Tab. 3.54 Skład buforu do transportu

Składnik	Stężenie końcowe
KCl	100 mM
Tris-MES pH 7,4	25 mM
Glicerol	10% (v/v)
DTT*	1mM
* składnik dodano bezpośrednio przed eksperymentem	

3.11.3 Transport ^3H -ABA w nasionach *Medicago truncatula*

Dojrzałe nasiona *Medicago truncatula* inkubowano przez 15 min w 96% kwasie siarkowym (VI). Po usunięciu kwasu, nasiona dokładnie przepłukano wodą destylowaną i inkubowano przez 2 h w temperaturze 4°C, całkowicie zanurzone w wodzie. Następnie przy pomocy igieł preparacyjnych, delikatnie odseparowano zarodki od pozostałych elementów nasion tj. okrywy nasiennej i endospermy. Przygotowano mikroskopowe szkiełka podstawowe, na połowie których znajdowała się woda zestalona agarem. Wyizolowane zarodki umieszczono na szkiełkach, tak aby tylko hipokotyle miały kontakt z podłożem (Ryc. 3.2). Następnie na hipokotyle nałożono po 1 μl 1,52 nM ^3H -ABA (0,15 Ci mmol⁻¹) i inkubowano 2 h w temperaturze pokojowej. Po inkubacji odcięte

hipokotyle umieszczono w płynie scyntylacyjnym (OptiPhase SuperMix, PerkinElmer) i dokonano pomiaru radioaktywności przy użyciu licznika scyntylacyjnego MicroBeta2 Microplate Scintillation Counter (PerkinElmer, Waltham, MA, USA) (Ryc. 3.2). Wartości przedstawione w rozdziale 4.2.6.1 reprezentują średnią z 30 niezależnych prób \pm SD. Różnice istotne statystycznie pomiędzy hipokotylami WT, a hipokotylami mutantów *mtabcg20-2* określono przy użyciu testu t-Studenta (***) $P < 0,001$).



Ryc. 3.2 Schemat przebiegu eksperymentu transportu ³H-ABA w nasionach *M. truncatula*.

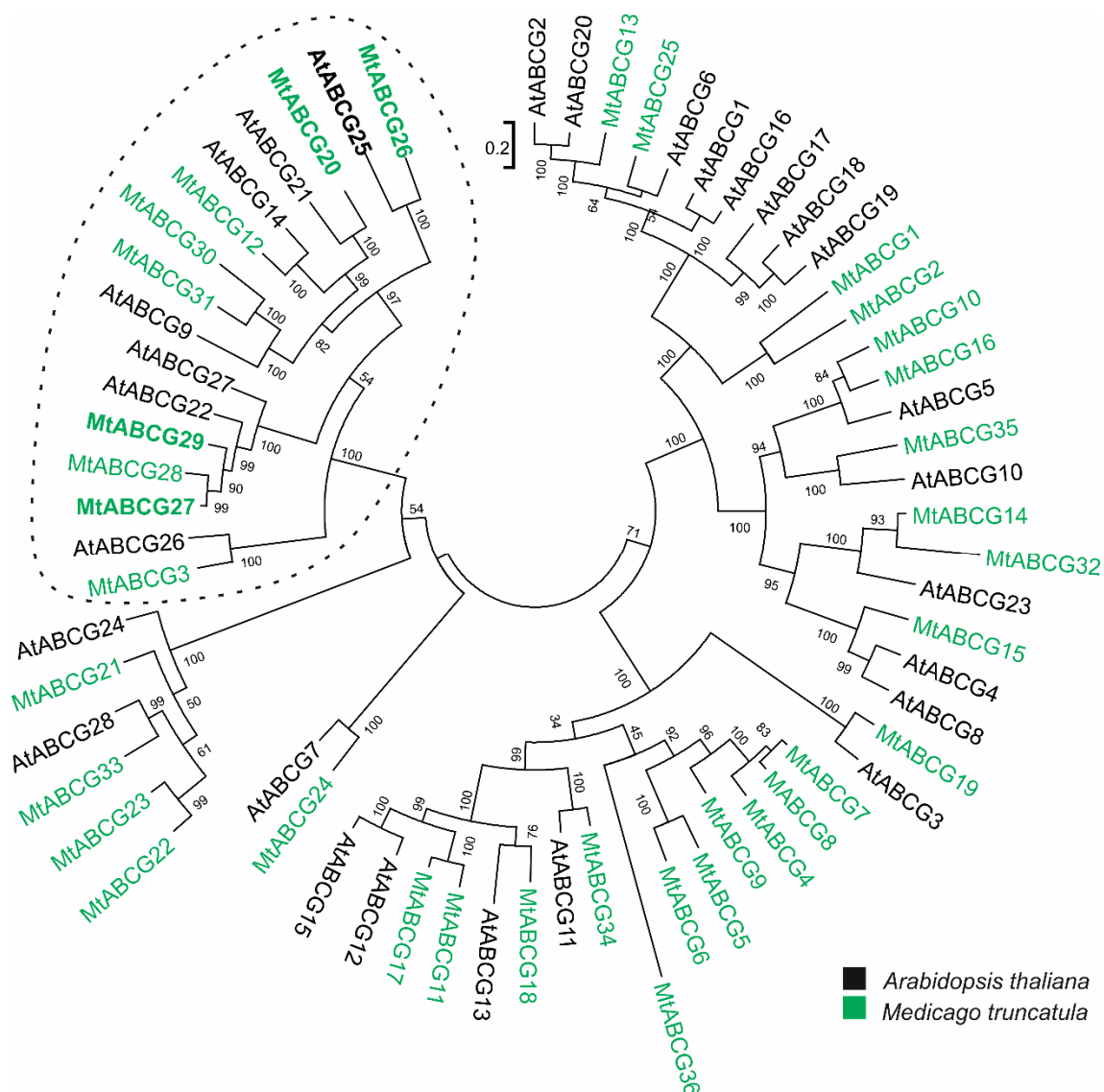
4. WYNIKI

4.1 Selekcja połowicznych białek ABCG potencjalnie zaangażowanych w transport kwasu abscysynowego

4.1.1 Analiza filogenetyczna

W Zakładzie Fizjologii Molekularnej Roślin prowadzone są badania dotyczące identyfikacji i określania funkcji transporterów błonowych z rodziny ABCG w modelowej roślinie bobowatej jaką jest *Medicago truncatula*. Szereg pełnych transporterów ABCG jest zaangażowanych w translokację różnych molekuł w tym hormonów jak np. kwas abscysynowy (ABA). Wiadomo również o jednym połowicznym ABCG biorącym udział w eksporcie ABA u *Arabidopsis thaliana*. Do tej pory rola białek ABCG uczestniczących w dystrybucji ABA u bobowatych jest mało poznana.

Przeprowadzone analizy porównawcze sekwencji aminokwasowych połowicznych transporterów ABCG z *M. truncatula* (36 sekwencji) i *A. thaliana* (28 sekwencji) pokazały, że 9 transporterów *M. truncatula* tj. MtABCG3, MtABCG12, MtABCG20, MtABCG26, MtABCG27, MtABCG28, MtABCG29, MtABCG30 i MtABCG31 wykazywało najwyższy stopień pokrewieństwa do sekwencji transportera AtABCG25, opisanego jako transporter ABA u *A. thaliana* (Ryc. 4.1). Analizy filogenetyczne wykonano metodą maximum likelihood, przy współpracy z dr Joanną Banasiak z Zakładu Fizjologii Molekularnej Roślin ICHB PAN. W tabeli 4.1 zestawiono obliczony dystans pomiędzy parami sekwencji (ang. *pairwise distance*), który określa liczbę substytucji aminokwasów pomiędzy dwiema porównywanymi sekwencjami. Z przeprowadzonych obliczeń wynika, że najbliższym homologiem AtABCG25 jest transporter MtABCG26. Sekwencja aminokwasowa MtABCG3 różni się najbardziej od sekwencji transportera z *A. thaliana* (0,9829). Natomiast stopień pokrewieństwa pozostałych transporterów *M. truncatula* jest na poziomie od 0,7155 do 0,8068 względem białka AtABCG25.



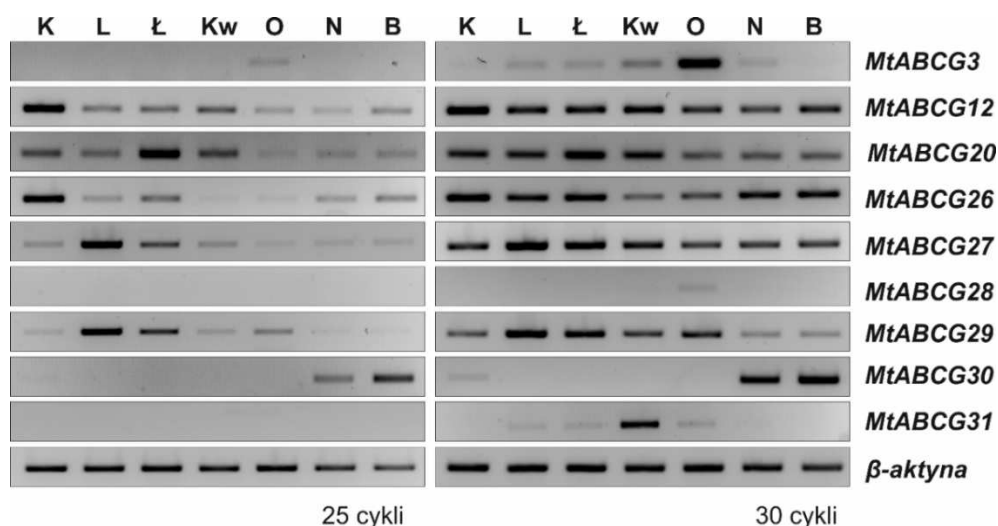
Ryc. 4.1 Drzewo filogenetyczne połowicznych transporterów ABCG. Linią przerywaną oznaczono gałąź najbliższych homologów AtABC25, transportera kwasu abscysynowego u *A. thaliana*. Powyżej węzłów podano wartość bootstrap.

Tab. 4.1 Zestawienie dystansu pomiędzy parami sekwencji (ang. *pairwise distance*), określającego liczbę substytucji aminokwasów pomiędzy dwiema porównywanymi sekwencjami. Czerwonym kolorem wyróżniono obliczenia dla transportera AtABCG25 z *A. thaliana*. Wartość 0 oznacza, że sekwencje są identyczne. Obliczenia wykonano w programie MEGA X.

	MtABCG3	MtABCG12	MtABCG20	MtABCG26	MtABCG27	MtABCG28	MtABCG29	MtABCG30	MtABCG31
MtABCG3									
MtABCG12	0,8290								
MtABCG20	0,9116	0,5311							
MtABCG26	0,9988	0,7046	0,6555						
MtABCG27	0,8058	0,7465	0,7621	0,8365					
MtABCG28	0,7360	0,7126	0,6931	0,8065	0,1306				
MtABCG29	0,8235	0,7431	0,7655	0,8179	0,2745	0,2167			
MtABCG30	0,8636	0,6432	0,6739	0,7293	0,7945	0,7423	0,7762		
MtABCG31	0,8348	0,5709	0,5803	0,6829	0,6826	0,6616	0,6516	0,3829	
AtABCG25	0,9829	0,7178	0,7255	0,4913	0,7776	0,7571	0,8068	0,7953	0,7155

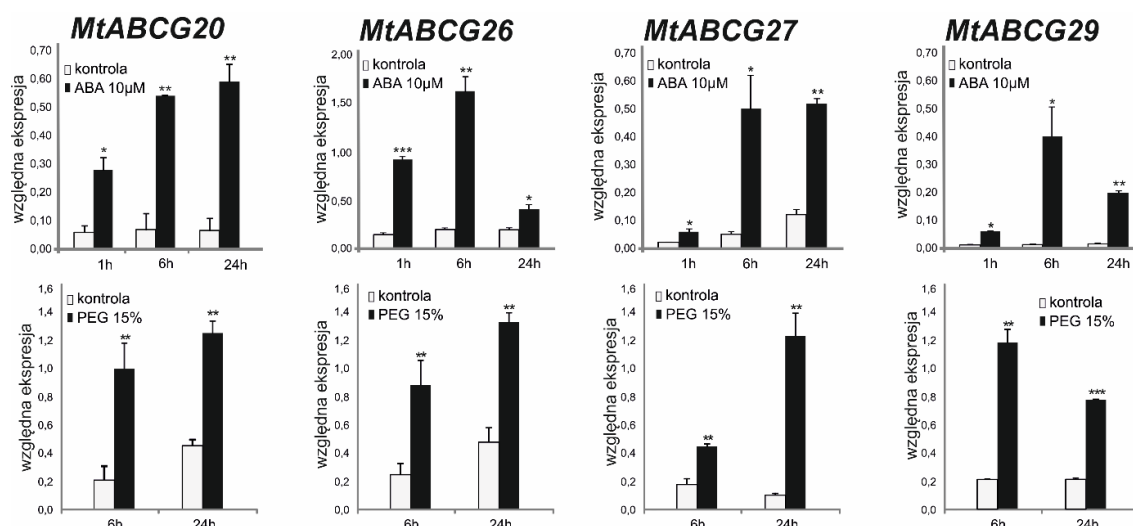
4.1.2 Profil ekspresji genów kodujących transportery MtABCG, potencjalnie zaangażowanych w transport kwasu absycynowego

W kolejnym etapie pracy sprawdzono poziom akumulacji mRNA wybranych genów *MtABCG*, wchodzących w skład grupy najbliższych homologów *AtABCG25*, w różnych organach *Medicago truncatula*. Analizy przeprowadzono na materiale pozyskanym z sześciotygodniowych roślin rosnących w pokoju fitotronowym (podrozdział 3.5.2). Półilościowa analiza PCR (ang. *semi-quantitative PCR*; podrozdział 3.7.6) wykazała, że pięć spośród dziewięciu analizowanych genów: *MtABCG12*, *MtABCG20*, *MtABCG26*, *MtABCG27*, *MtABCG29* ulega ekspresji we wszystkich organach *M. truncatula*. Pozostałe cztery geny (*MtABCG3*, *MtABCG28*, *MtABCG30*, *MtABCG31*) charakteryzują się organospecyficznym profilem ekspresji. *MtABCG3* nie wykazuje obecności transkryptu w korzeniach i zdecydowanie silniej ulega ekspresji w owocach, niż w pozostałych organach. *MtABCG28* ulega ekspresji na niskim poziomie tylko w owocach. *MtABCG30* wykryto głównie w nasionach i brodawkach korzeniowych, natomiast *MtABCG31* w kwiatach (Ryc. 4.2).



Ryc. 4.2 Półilościowa analiza poziomu ekspresji genów *MtABCG* w organach *M. truncatula*. Analiza produktów reakcji RT-PCR została przeprowadzona metodą elektroforezy w 1,5% żelu agarozowym. K - korzeń, L - liść, Ł - łodyga, Kw - kwiat, O - owoc, N - nasiono, B - brodawka korzeniowa. β -aktyna – kontrola wewnętrzna.

Następnie sprawdzono jak zmienia się poziom ekspresji genów ulegających ekspresji w korzeniach tj. *MtABCG12*, *MtABCG20*, *MtABCG26*, *MtABCG27*, *MtABCG29*, *MtABCG30* u siedmiodniowych siewek *M. truncatula* traktowanych 10 μ M kwasem abscysynowym (ABA) lub 15% glikolem polietylenowym (PEG). Przeprowadzona analiza ilościowa Real-Time PCR wykazała co najmniej dwukrotny wzrost aktywności transkrypcyjnej genów *MtABCG20*, *MtABCG26*, *MtABCG27*, *MtABCG29* pod wpływem 10 μ M ABA oraz 15% PEG (Ryc. 4.3).

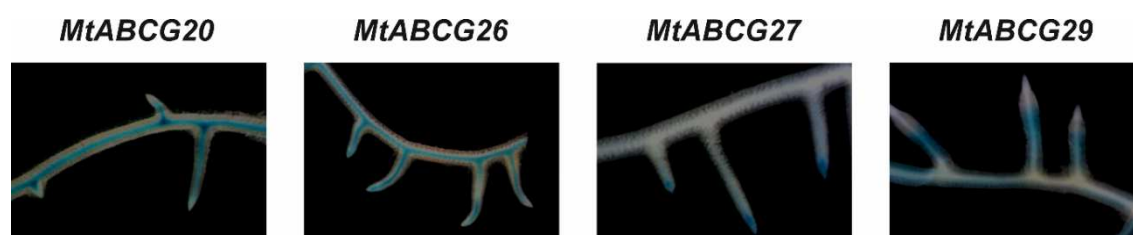


Ryc. 4.3 Ilościowa analiza zmian poziomu ekspresji genów *MtABCG* w korzeniach *M. truncatula* po egzogennej aplikacji ABA (Real-Time PCR) lub PEG (ddPCR). W celu porównania średnich kontrolnych i badanych z dwóch powtórzeń biologicznych zastosowano dwustronny test t-Studenta dla prób niezależnych (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$).

4.1.3 Określenie tkankowo-specyficznego wzoru ekspresji genów *MtABCG20*, *MtABCG26*, *MtABCG27*, *MtABCG29* w korzeniach *Medicago truncatula*

Aby przyjrzeć się profilowi ekspresji genów indukowanych ABA i PEG wykorzystano konstrukcje fuzyjne ich promotorów oraz sekwencji genu reporterowego. W pracy wykorzystano system reporterowy oparty o enzym β -glukuronidazę (ang. *β -glucuronidase*, GUS), który katalizuje reakcję hydrolizy związków z grupy β -glukuronidów (5-bromo-4-chloro-3-indolylo- β -D-glukuronid, X-gluc).

Przygotowano cztery konstrukcje genowe zawierające sekwencje *GUS* pod kontrolą promotorów: *MtABCG20* (*proMtABCG20::GUS*), *MtABCG26* (*proMtABCG26::GUS*), *MtABCG27* (*proMtABCG27::GUS*), *MtABCG29* (*proMtABCG29::GUS*) w wektorze ekspresyjnym pPR97 (podrozdział 3.7.8). Otrzymane konstrukcje posłużyły do transformacji siewek *M. truncatula* przy pomocy bakterii *Agrobacterium rhizogenes* (podrozdział 3.5.4). W wyniku transformacji uzyskano tzw. rośliny złożone (ang. *composite plant*), które posiadają transgeniczne korzenie i część nadziemną typu dzikiego. Uzyskane korzenie poddano analizie histochemicznej, w wyniku której zaobserwowano tkankowo-specyficzne wzory ekspresji badanych genów (Ryc. 4.4). Aktywność promotorów *MtABCG20* i *MtABCG26* została zlokalizowana w wiązce przewodzącej korzenia głównego oraz korzeni bocznych. Promotor *MtABCG27* ulega ekspresji w merystemach wierzchołkowych, natomiast promotor *MtABCG29* w korze strefy wzrostu korzeni na długość.



Ryc. 4.4 Analiza histochemiczna przeprowadzona na korzeniach włosowatych, niosących konstrukcję fuzyjną: *proMtABCG20::GUS*, *proMtABCG26::GUS*, *proMtABCG27::GUS*, *proMtABCG29::GUS*.

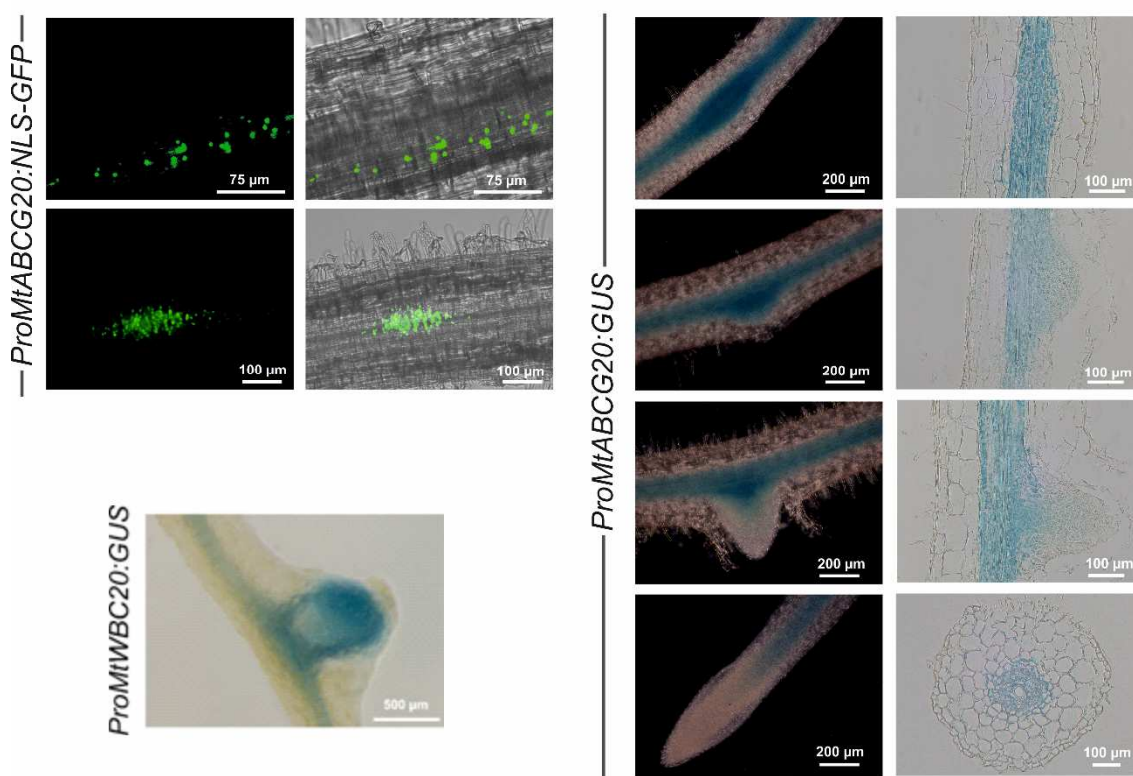
4.2 Analiza funkcjonalna transportera *MtABCG20*

MtABCG20 ulega ekspresji w wiązce przewodzącej korzeni *M. truncatula*, tam też zachodzi biosynteza ABA (Takahashi i wsp., 2018). Jednocześnie wysoki poziom ekspresji tego genu w obecności ABA utrzymywał się najdłużej (24h) spośród wszystkich

zidentyfikowanych i ulegających ekspresji w wiązce przewodzącej transporterów. Te obserwacje oraz fakt dostępności w kolekcji fundacji S.R. Noble Foundation dwóch linii mutantów insercyjnych zadecydowały o wyborze *MtABCG20* do dalszych badań.

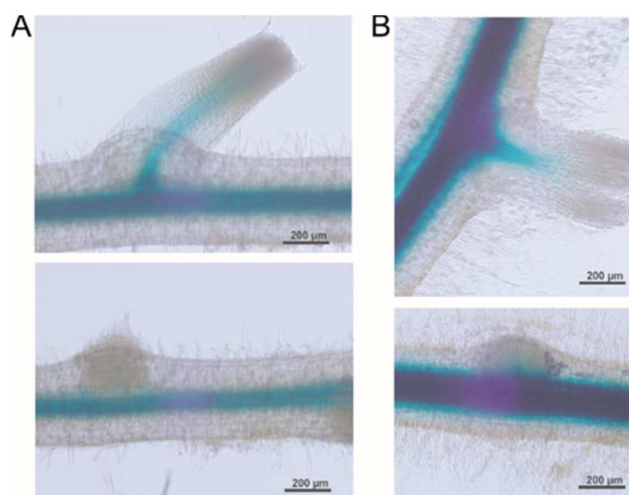
4.2.1 Analiza ekspresji genu *MtABCG20*

Podczas analiz aktywności promotora z wykorzystaniem systemu reporterowego GUS zaobserwowano także, że *MtABCG20* ulega ekspresji w brodawkach korzeniowych oraz w miejscu inicjacji powstawania zawiązków korzeni bocznych (Ryc. 4.5). Obserwacje te wsparto obrazami uzyskanymi przy użyciu białka zielonej fluorescencji. Metoda NLS_GFP oparta jest na fuzji sekwencji badanego promotora z sekwencją białka zielonej fluorescencji (ang. *Green Fluorescence Protein*, GFP) oraz z sekwencją kierującą białko fuzyjne do jądra komórkowego (ang. *Nuclear Localization Sequence*, NLS) (podrozdział 3.8). Zastosowanie tego konstruktów pozwala na precyzyjne określenie pojedynczych komórek wykazujących aktywność promotora *MtABCG20*.



Ryc. 4.5 Analiza aktywności promotora *MtABCG20* w korzeniach *M. truncatula*, niosących konstrukcje genowe *proMtWBC20::GUS* lub *proMtABCG20:NLS-GFP*.

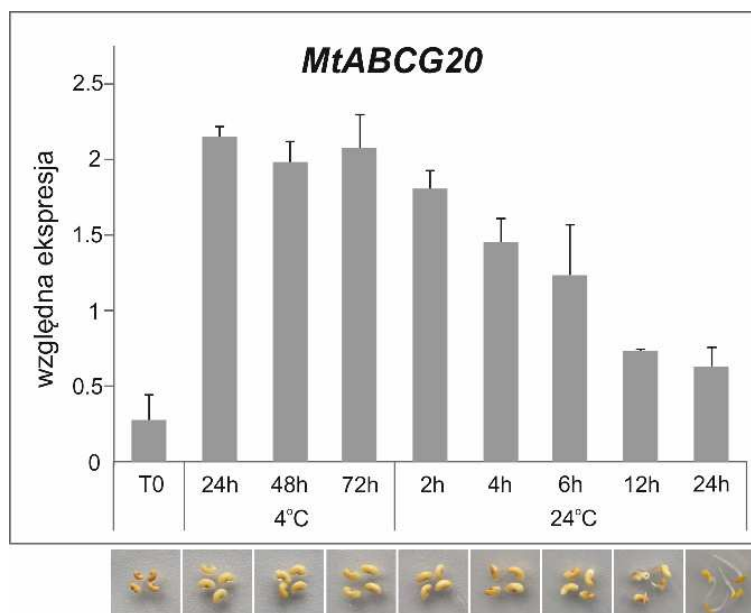
Analizy wzoru ekspresji przeprowadzono także w obecności ABA, sprawdzając czy profil ekspresji promotora *MtABCG20* zmienia się w korzeniach *M. truncatula* pod wpływem działania tego hormonu. Korzenie roślin złożonych, zawierające sekwencję *proMtABCG20::GUS* zintegrowaną z genomem *M. truncatula*, posłużyły do propagacji hodowli korzeni włosowatych (podrozdział 3.5.5). Część uzyskanego materiału biologicznego przeniesiono na podłoże zawierające 10 μ M ABA i inkubowano w ciemności przez 24 h. Analiza histochemiczna wykazała, że miejsce ekspresji *MtABCG20* nie zmienia się pod wpływem działania ABA, natomiast intensywność sygnału GUS jest znacząco wyższa w korzeniach traktowanych kwasem abscysynowym (Ryc. 4.6).



Ryc. 4.6 Analiza aktywności promotora *MtABCG20* w korzeniach *Medicago truncatula*, niosących konstrukcję genową *proMtWBC20::GUS*. (A) Korzenie kontrolne, wzrastające na pożywce bez dodatku ABA. (B) Korzenie przed analizą histochemiczną były traktowane 10 μ M ABA, przez 24 h.

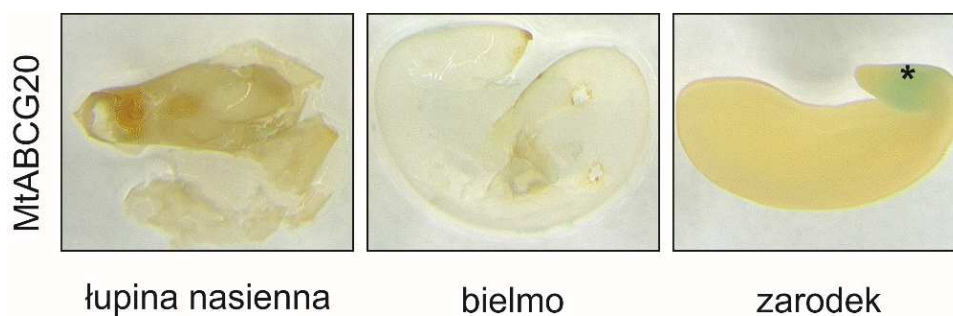
Kwas abscysynowy oprócz uruchamiania procesów związanych z adaptacją roślin do zmieniającego środowiska, odgrywa również ważną rolę w kontroli procesu kiełkowania. ABA pojawia się w nasionach już na bardzo wczesnych etapach rozwoju i bierze udział w ich dojrzewaniu, utrzymywaniu w stanie spoczynku oraz rozpoczęciu kiełkowania. Wysokie stężenie ABA w dojrzałych zarodkach zapobiega przedwczesnemu kiełkowaniu w niekorzystnych warunkach (Chahtane i wsp., 2017). Wcześniejsza analiza ekspresji *MtABCG20* w organach *M. truncatula* wykazała, że badany gen jest obecny w nasionach (Ryc. 4.2). W kolejnym etapie badań sprawdzono jak zmienia się poziom mRNA *MtABCG20* w dojrzałych nasionach dzikiego typu,

na różnych etapach kiełkowania. Ilościowa analiza Real Time PCR wykazała, że ekspresja *MtABCG20* gwałtownie wzrasta na wczesnych etapach kiełkowania podczas imbibicji nasion, a następnie stopniowo zmniejsza się po przeniesieniu nasion do temperatury 24°C (Ryc. 4.7).



Ryc. 4.7 Ilościowa analiza zmian poziomu ekspresji genu *MtABCG20* w nasionach *M. truncatula* na różnych etapach kiełkowania.

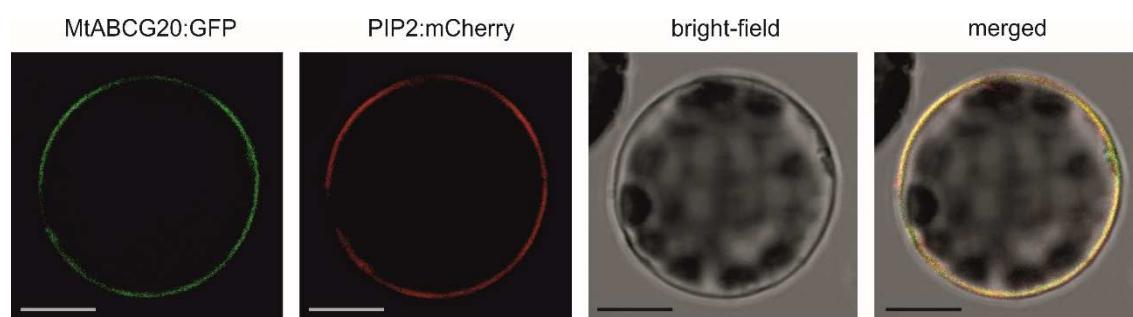
Konstrukcja genuwa przygotowana do badania aktywności promotora w systemie reporterowym GUS posłużyła do określenia wzoru ekspresji *MtABCG20* w nasionach *M. truncatula*. W tym celu wykonano stałą transformację roślin z udziałem *Agrobacterium tumefaciens*, a regenerację roślin przeprowadzono metodą somatycznej embriogenezy (podrozdział 3.5.6). Uzyskanie transgeniczných roślin potwierdzono metodą PCR, wykorzystując startery zaprojektowane w sekwencji genu reporterowego (podrozdział 3.7.10). Analiza histochemiczna nasion uzyskanych z transgeniczných roślin wykazała, że promotor *MtABCG20* ulega ekspresji w zarodku nasion *M. truncatula*, w strefie pomiędzy wierzchołkiem korzenia zarodkowego, a hipokotylem (Ryc. 4.8). Podczas przeprowadzonych analiz nie zaobserwowano aktywności badanego promotora w bielmie oraz łupinie nasiennej.



Ryc. 4.8 Analiza histochemiczna przeprowadzona na nasionach *M. truncatula*, niosących konstrukcję fuzyjną *proMtABCG20::GUS*.

4.2.2 Określenie lokalizacji subkomórkowej białka MtABCG20

MtABCG20 jest białkiem błony komórkowej. Pokazano to wykorzystując konstrukcję fuzyjną, zawierającą sekwencję nukleotydową kodującą białko MtABCG20 oraz sekwencję białka fluorescencyjnego, GFP. Tak przygotowana konstrukcja (podrozdział 3.7.8) posłużyła do transformacji protoplastów wyizolowanych z mezofilu liści *Arabidopsis thaliana* (podrozdział 3.5.8). Sygnał fluorescencji białka GFP obserwowano po 18 h od transformacji. Analiza mikroskopowa wykazała, że białko MtABCG20, tak samo jak marker PIP2 (marker błony komórkowej), lokuje się w obrębie błony komórkowej (Ryc. 4.9). Jako kontrolę negatywną wykorzystano protoplasty transformowane wektorem pMDC43 zawierającym sekwencję tylko GFP. Sygnał wolnego GFP zaobserwowano w cytoplazmie komórek (Załącznik 1).

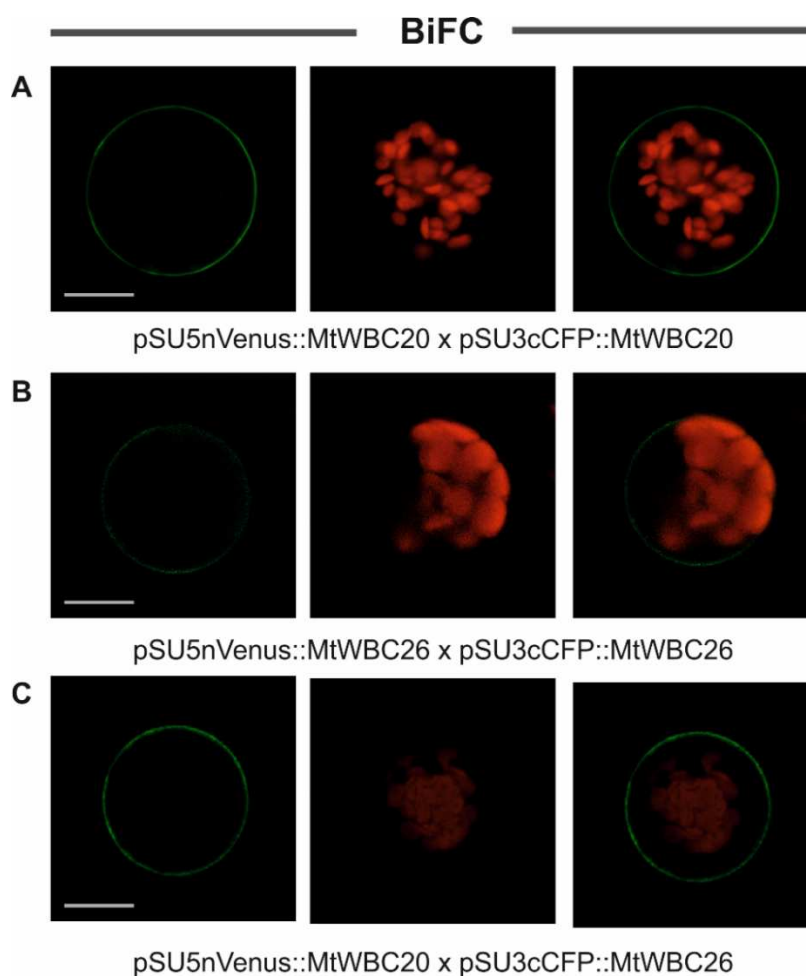


Ryc. 4.9 Lokalizacja subkomórkowa transporterów MtABCG w błonie komórkowej protoplastów *A. thaliana*. Sygnał zielony – fluorescencja GFP, sygnał czerwony – autofluorescencja chlorofilu; skala – 5 μm .

4.2.3 Określenie zdolności transportera MtABCG20 do tworzenia homo- lub heterodimerów

MtABCG20 należy do połowicznych transporterów ABCG, które do prawidłowego funkcjonowania tworzą dimer. Dla potwierdzenia tego faktu, wykorzystano metodę wielokolorowej dwucząsteczkowej komplementacji fluorescencji mcBiFC (ang. *multicolor Bimolecular Fluorescence Complementation*), służącą do badania oddziaływań między białkami w żywych komórkach (podrozdział 3.10). W pierwszej kolejności przygotowano fuzyjne konstrukcje genowe zawierające sekwencję *MtABCG20* połączoną z sekwencją kodującą części N (część aminowa) lub C (część karboksylowa) odpowiednio białka fluorescencyjnego SCFP3A lub Venus (podrozdział 3.7.8). Następnie protoplasty *A. thaliana* transformowano parami wektorów, które zostały dobrane w ten sposób, aby jeden z plazmidów zawierał część N białka Venus, a drugi część C białka SCFP3A (podrozdział 3.10). Protoplasty po 20 h od transformacji analizowano przy wykorzystaniu fluorescencyjnego mikroskopu konfokalnego. W przypadku oddziaływań między dwoma peptydami badanego białka, części białek fluorescencyjnych zbliżają się do siebie na odległość umożliwiającą odtworzenie funkcjonalnej struktury chromoforu i zaobserwowanie zjawiska fluorescencji. Sygnał fluorescencji widoczny w protoplastach transformowanych konstrukcjami *pSU5nVenus::MtABCG20* oraz *pSU3cCFP::MtABCG20*, potwierdził, że MtABCG20 tworzy w błonie komórkowej homodimer (Ryc. 4.10A). Protoplasty transformowane wektorami *pSU5nVenus::MtABCG20* oraz *pSU3cCFP* nie wykazywały fluorescencji (kontrola negatywna).

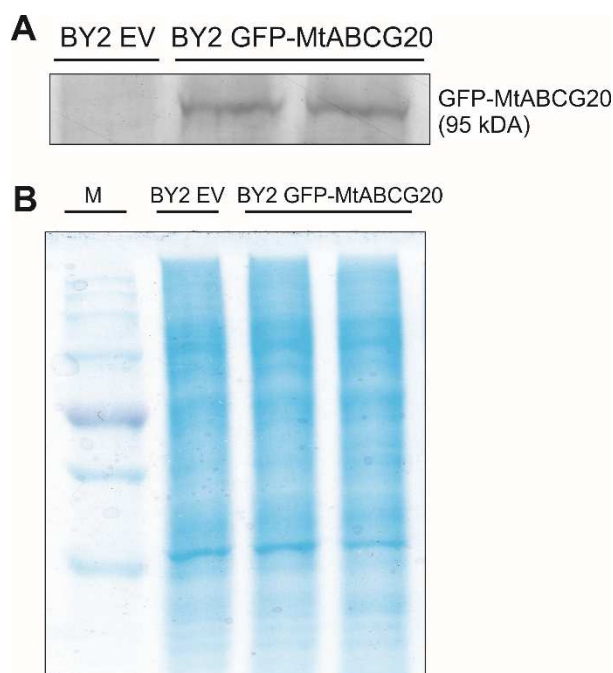
Wcześniejsze analizy, mające na celu określenie tkankowo-specyficznego wzoru ekspresji genów wykazały, że geny *MtABCG20* oraz *MtABCG26* ulegają ekspresji w tym samym miejscu, w wiązkach przewodzących korzeni (Ryc. 4.4). Dlatego w analogiczny sposób jak dla *MtABCG20*, przygotowano konstrukcje genowe zawierające sekwencję *MtABCG26*, a następnie sprawdzono, czy transportery MtABCG20 i MtABCG26 mogą funkcjonować jako heterodimer. Protoplasty transformowane konstrukcjami *pSU5nVenus::MtABCG20* oraz *pSU3cCFP::MtABCG26* również wykazywały sygnał fluorescencji w błonie komórkowej (Ryc. 4.10B). Wynik ten sugeruje, że białko MtABCG20 może tworzyć heterodimery z białkiem MtABCG26. Co więcej pokazano, że MtABCG26 może także tworzyć homodimer (Ryc. 4.10C).



Ryc. 4.10 Wielokolorowa dwucząsteczkowa komplementacja fluorescencji (mcBiFC) w protoplastach *A. thaliana*. Sygnał zielony – fluorescencja, sygnał czerwony – autofluorescencja chlorofilu; skala – 5 μm .

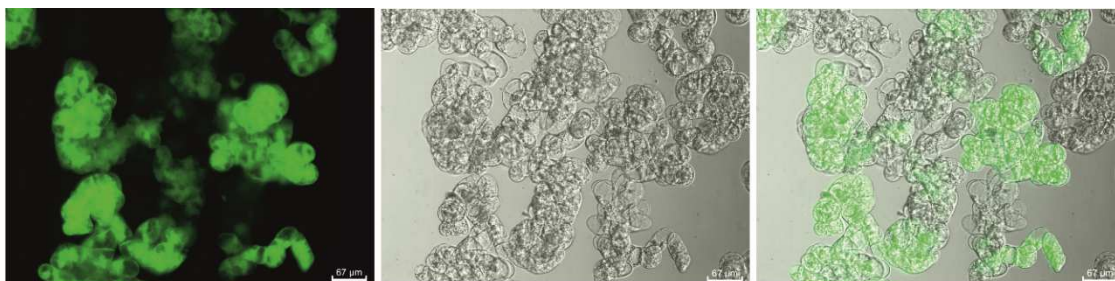
4.2.4 Transport kwasu abscysynowego przez MtABCG20

Celem sprawdzenia, czy MtABCG20 jest transporterem ABA, komórki *Nicotiana tabacum* BY2 były transformowane za pomocą *Agrobacterium tumefaciens* konstrukcją genową zawierającą badany transporter w fuzji z GFP (podrozdział 3.5.12). Transgeniczność linii komórek tytoniu potwierdzono analizą Western Blot wykorzystując przeciwciała pierwszorzędowe anty-GFP (przykładowa analiza Western Blot Ryc. 4.11). Uzyskane transgeniczne kalusy utrzymywano na stałym podłożu zawierającym antybiotyk selekcyjny (higromycyna 75 $\mu\text{g/ml}$).

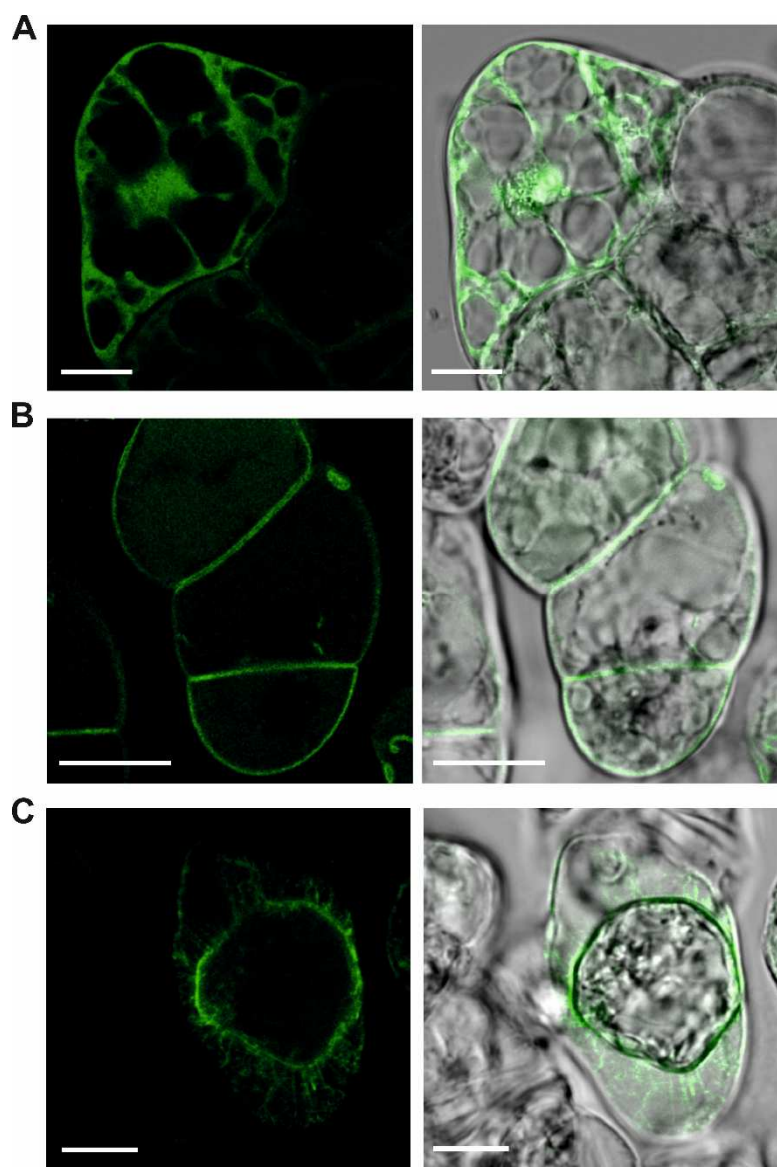


Ryc. 4.11 Przykładowa analiza wybranych linii komórek tytoniu BY2. (A) Analiza Western blot białek błony komórkowej wyizolowanych z komórek BY2 transformowanych pustym wektorem (EV) oraz BY2 ekspresjonujących *MtABCG20* z użyciem przeciwciał anti-GFP. (B) Zdjęcie 10% żelu poliakrylamidowego po rozdziale elektroforetycznym SDS-PAGE, wybarwionego Coomassie blue, pokazującego równą ilość materiału użytego do analizy Wester blot; M – marker mas.

Żywotność komórek w hodowli śledzono przez barwienie diocetanem fluoresceiny (przykładowa analiza Ryc. 4.12; podrozdział 3.5.11). Następnie przeprowadzono obserwacje mikroskopowe, celem potwierdzenia lokalizacji *MtABCG20* w błonie komórkowej (Ryc. 4.13).



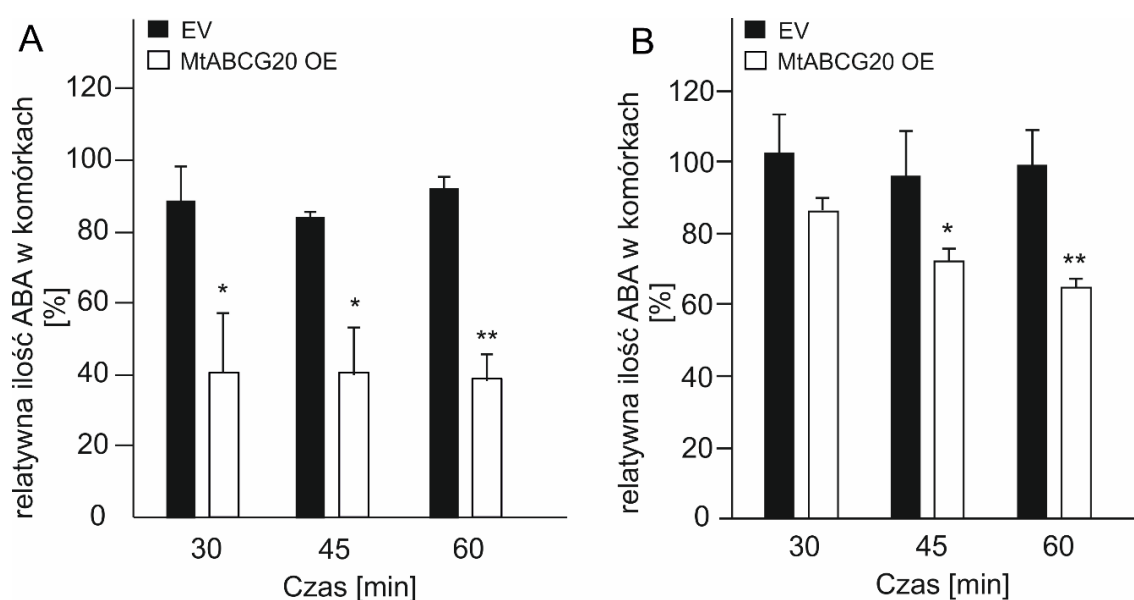
Ryc. 4.12 Ocena jakości hodowli zawiesinowych komórek *N. tabacum* BY2. Obraz mikroskopowy przedstawiający komórki BY2 wybarwione diocetanem fluoresceiny. Po wzbudzeniu światłem niebieskim żywe komórki wykazują zieloną fluorescencję; skala – 67 μm .



Ryc. 4.13 Obserwacje mikroskopowe komórek tytoniu *N. tabacum* BY2 po transformacji przy użyciu *A. tumefaciens*. (A) Komórki BY2 kontrolne, transformowane pustym wektorem (EV). Zielony sygnał GFP jest widoczny w cytoplazmie komórek. (B) Komórki BY2 z ekspresją *MtABCG20*. Sygnał GFP jest widoczny w błonie komórkowej. (C) Plazmoliza komórek BY2 z ekspresją *MtABCG20* (5% NaCl/10 min.). Sygnał GFP jest widoczny w obkurczającej się błonie komórkowej; skala – 15 μm .

W kolejnym etapie do hodowli zawieszinowych komórek BY2 ekspresjonujących *MtABCG20* oraz do komórek transformowanych wektorem, niezawierającym sekwencji badanego transportera (ang. *empty vector*, EV), dodano egzogennie kwas abscysynowy (końcowe stężenie 250 μM). Następnie monitorowano wpływ ABA z komórek w różnych odstępach czasowych przy wykorzystaniu techniki HPLC/MS (podrozdział 3.11.1). Analiza HPLC/MS ekstraktów uzyskanych z komórek wykazała, że ilość ABA

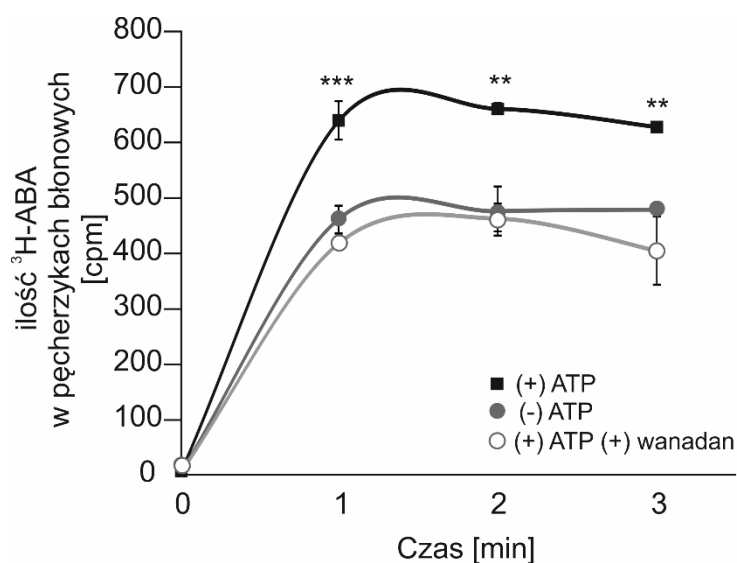
w komórkach ekspresjonujących *MtABCG20* znacząco zmniejsza się w czasie, w porównaniu do kontroli (EV) (Ryc. 4.14A). Zaobserwowany spadek ilości ABA w komórkach był blisko dwukrotnie niższy względem kontroli, a różnicę zaobserwowano już w pierwszym punkcie czasowym po 30 min, która utrzymywała się na podobnym poziomie do końca trwania eksperymentu. Dodatkowo, przeprowadzono analogiczny eksperyment w obniżonej temperaturze 18°C (niższa temperatura pozwala spowolnić aktywny transport), który pokazał stopniowy spadek ilości ABA w komórkach BY2 z ekspresją *MtABCG20* w porównaniu do kontroli (Ryc. 4.14B). Uzyskane wyniki pokazują, że wpływ kwasu abscysynowego z komórek BY2 jest zależny od obecności *MtABCG20* w błonie komórkowej.



Ryc. 4.14 Wpływ kwasu abscysynowego z komórek kontrolnych *N. tabacum* BY2 (czarne słupki) i komórek z ekspresją *MtABCG20* (białe słupki) monitorowany przy użyciu techniki HPLC/MS. Relatywna ilość ABA przedstawiona jest jako stosunek pola powierzchni pod pikiem na chromatogramie dla danego jonu do standardu wewnętrznego. Wartość 100% odpowiada ilości ABA w komórkach w momencie przeniesienia komórek do temperatury pokojowej (czas T₀, start eksperymentu). Wartości reprezentują średnią z trzech niezależnych eksperymentów \pm SD. Różnice istotne statystycznie pomiędzy komórkami kontrolnymi, a ekspresjonującymi *MtABCG20* określono przy użyciu testu t-Studenta (*P<0,05; **P<0,01).

4.2.4.1 Transport radioaktywnie znakowanego kwasu abscysynowego (^3H -ABA) w pęcherzykach błonowych uzyskanych z komórek *Nicotiana tabacum* BY2

Aby potwierdzić zależność translokacji ABA od ATP, przeprowadzono eksperyment transportu z wykorzystaniem ^3H -ABA oraz pęcherzyków błonowych otrzymanych z komórek *Nicotiana tabacum* BY2 ekspresjonujących *MtABCG20* (podrozdział 3.6.1). Eksperyment został przeprowadzany według zmodyfikowanego protokołu opisanego przez Kang (Kang i wsp., 2015). Dokładny opis modyfikacji oraz przebieg eksperymentu został opisany w rozdziale Materiały i Metody, podrozdział 3.11.2. Pomiar radioaktywności wykazał, że tylko w próbce zawierającej pęcherzyki błonowe wyizolowane z komórek tytoniu BY2 ekspresjonujących *MtABCG20* w obecności ATP następuje wzrost sygnału radioaktywnie znakowanego ABA w czasie (Ryc. 4.15). Uzyskany wynik wskazuje, że transport kwasu abscysynowego przez błony biologiczne jest zależny od obecności transportera *MtABCG20* i ATP w środowisku reakcji.

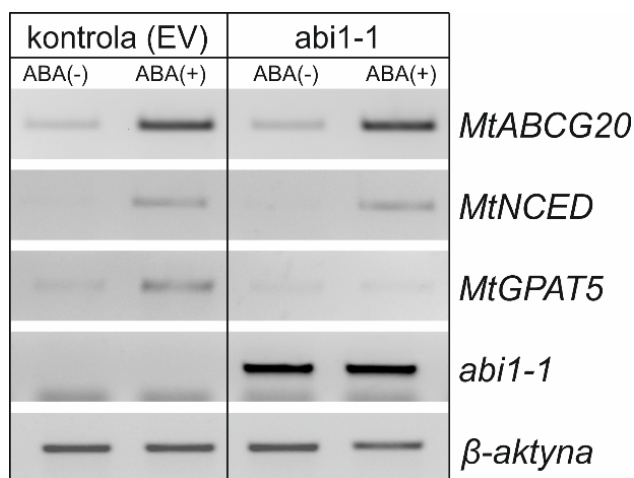


Ryc. 4.15 Transport radioaktywnie znakowanego kwasu abscysynowego w pęcherzykach błonowych uzyskanych z komórek tytoniu *N. tabacum* BY2 z ekspresją *MtABCG20* w obecności ATP (■) przy braku ATP (●) lub w obecności ATP i wanadanu (○). Różnice istotne statystycznie pomiędzy linią ekspresjonującą ATP w obecności ATP, a pozostałymi warunkami zostały określone przy użyciu testów ANOVA i Tukey'a (*** $P < 0,005$; ** $P < 0,01$).

4.2.5 Zależność transportera MtABCG20 od wewnątrzkomórkowego szlaku sygnałowego kwasu abscysynowego

Kwas abscysynowy jest transportowany do komórek efektorowych/docelowych, w których uruchamia wewnątrzkomórkowy szlak sygnałowy. W literaturze opisano, że zaburzenie sygnalizacji ABA hamuje ekspresję genów zależnych od tego fitohormonu (Ding i wsp., 2008). Podczas realizacji pracy doktorskiej sprawdzono, czy ekspresja genu *MtABCG20* jest kontrolowana przez wewnątrzkomórkowy szlak sygnałowy kwasu abscysynowego. W tym celu wykorzystano transgeniczne korzenie *M. truncatula* uzyskane na drodze transformacji bakteriami *Agrobacterium rhizogenes* niosącymi konstrukcję genową zawierającą sekwencję *abi1-1* (podrozdział 3.5.4). Sekwencja *abi1-1* pochodzi z *Arabidopsis thaliana* i charakteryzuje się mutacją punktową w obrębie genu *ABII* skutkującą spadkiem aktywności katalitycznej białka fosfatazy typu 2C (PP2C). Wykazano, że *abi1-1* funkcjonuje jako negatywny dominujący allel, a jego transgeneza skutkuje odwzorowaniem fenotypu w korzeniach *M. truncatula* (Hagenbeek i wsp., 2000). Mutanty *abi1-1* wyróżniają się zahamowanym wewnątrzkomórkowym szlakiem sygnałowym ABA, a tym samym ograniczoną odpowiedzią roślin na działanie tego hormonu. Przeprowadzono eksperyment w którym, sprawdzono jak zmienia się ekspresja wybranych genów z obszaru biosyntezy oraz transportu ABA w korzeniach *M. truncatula* z nadekspresją *abi1-1* i korzeniach transformowanych wektorem kontrolnym (EV). Półilościowa analiza RT-PCR pokazała, że ekspresja genów: i) *MtNCED*, kodującego jeden z głównych enzymów ze szlaku biosyntezy ABA, oraz ii) *MtABCG20*, kodującego transporter ABA, jest indukowana po 24 h od egzogennej aplikacji 10 μ M ABA zarówno w korzeniach kontrolnych jak i w mutancie *abi1-1* (Ryc. 4.16). Dla porównania, w tych samych warunkach eksperymentalnych, sprawdzono ekspresję genu *MtGPAT5*, kodującego jeden z enzymów ze szlaku biosyntezy monomerów suberyn. *MtGPAT5* jest przykładem genu, którego ekspresja jest uruchamiana przez wewnątrzkomórkowy szlak sygnałowy ABA w komórkach docelowych/efektorowych dla kwasu abscysynowego. Produkcja suberyn jest jednym z mechanizmów obronnych uruchamianym przez wewnątrzkomórkowy szlak sygnałowy ABA w stresie suszy zachodzącym w komórkach efektorowych. Ekspresja genu *MtGPAT5* jest indukowana działaniem ABA tylko w korzeniach kontrolnych, natomiast w mutancie *abi1-1* nie zaobserwowano zwiększenia akumulacji transkryptu badanego genu po egzogennej aplikacji ABA (Ryc. 4.16). Ekspresja genu *MtABCG20*

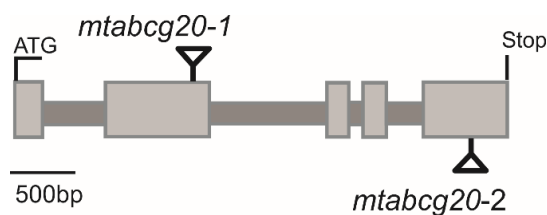
jest niezależna od tego szlaku, podobnie jak ekspresja *MtNCED*, występującego w miejscu biosyntezy ABA.



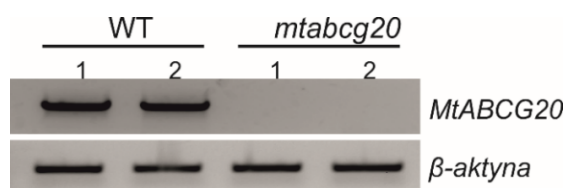
Ryc. 4.16 Półilościowa analiza zmian poziomu ekspresji genów *MtABCG20*, *MtNCED*, *MtGPAT5* w korzeniach *M. truncatula* kontrolnych i nadekspresjonujących *abi1-1* przed i po 24 h od egzogennej aplikacji 10 μ M ABA. Odpowiednio zaprojektowanymi starterami potwierdzono obecność ekspresji genu *abi1-1* w transgenicznym korzeniach *M. truncatula*. Analiza produktów reakcji RT-PCR została przeprowadzona metodą elektroforezy w 1,5% żelu agarozowym. β -aktyna – kontrola wewnętrzna.

4.2.6 Analizy fenotypowe

Po przeszukaniu bazy danych (*Medicago truncatula* Tnt1 Database, Noble Research Institute), przy pomocy narzędzia BLAST, zidentyfikowano dwie linie mutantów z insercją w obrębie genu *MtABCG20*: NF10694 (*mtabcg20-1*, insercja w egzonie 2) oraz NF6539 (*mtabcg20-2*, insercja w egzonie 5) (Ryc. 4.17). Dzięki obecności sekwencji FST (ang. *Flanking Sequence Tag*), flankującej retrotranspozon Tnt1, określono dokładną lokalizację insercji w genomie. Ekspresję genu *MtABCG20* w roślinach homozygotycznych linii NF10694 i NF6539 analizowano za pomocą półilościowej reakcji RT-PCR (podrozdział 3.7.9). W roślinach z mutacją w obrębie genu *MtABCG20* nie stwierdzono obecności transkryptu (Ryc. 4.18). Sprawdzone homozygotyczne linie mutantów były hodowane w pomieszczeniach fitotronowych, a uzyskane nasiona posłużyły do analiz fenotypowych. Przeprowadzone analizy fenotypowe miały na celu pokazanie wpływu transportera ABA, *MtABCG20* na funkcjonowanie roślin.



Ryc. 4.17 Schemat przedstawiający umiejscowienie insercji Tnt1 w obrębie genu *MtABCG20* linii NF10694 (*mtabcg20-1*) oraz NF6539 (*mtabcg20-2*). Kolorem jasnoszarym oznaczono egzony, kolorem ciemnoszarym oznaczono introny.

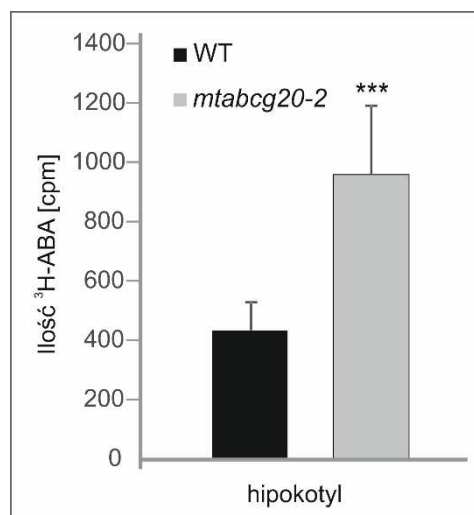


Ryc. 4.18 Półilościowa analiza poziomu ekspresji *MtABCG20* w liściach *M. truncatula* linii NF10694 (*mtabcg20-1*) oraz NF6539 (*mtabcg20-2*). Analiza produktów reakcji RT-PCR została przeprowadzona metodą elektroforezy w 1,5% żelu agarozowym. β -aktyna – kontrola wewnętrzna, WT – materiał pochodzący z roślin *M. truncatula* R-108 dzikiego typu.

4.2.6.1 Akumulacja radioaktywnie znakowanego kwasu abscysynowego (^3H -ABA) w nasionach *Medicago truncatula*

Wcześniej opisane wyniki, uzyskane podczas realizacji pracy doktorskiej, dostarczyły informacji o lokalizacji transportera *MtABCG20* w zarodkach *M. truncatula*, w strefie pomiędzy wierzchołkiem korzenia zarodkowego, a hipokotylem (Fig. 4.7). Prowadzone w innych grupach badania przeprowadzone metodą analizy pojedynczych komórek (ang. *digital single cell analysis*) z wykorzystaniem genów markerowych wykazały, że w obrębie tego miejsca występują komórki odpowiedzialne za biosyntezę jak również degradację ABA. Co więcej, są one przestrzennie rozdzielone, a transport ABA pomiędzy tymi komórkami wydaje się być kluczowym elementem regulującym i inicjującym proces kiełkowania (Topham i wsp., 2017). W tym miejscu dochodzi do produkcji ekspansyn, rozluźnienia ścian komórkowych, a następnie wydłużenia komórek powstającego korzenia zarodkowego (Sliwiska i wsp., 2009). Obecny w zarodkach kwas abscysynowy utrzymuje nasiona w stanie spoczynku i monitorując sygnały pochodzące ze środowiska, zapobiega przedwczesnemu kiełkowaniu w niekorzystnych warunkach np. zbyt niskiej temperaturze. Celem sprawdzenia jaką rolę może odgrywać *MtABCG20* w dystrybucji ABA w zarodku wykonano eksperyment,

w którym sprawdzono, czy dysfunkcja badanego transportera wpływa na przemieszczanie się radioaktywnie znakowanego trytem kwasu abscysynowego (^3H -ABA) wewnątrz zarodków nasion *M. truncatula* (podrozdział 3.11.3). Pomiar radioaktywności wykazał, że ilość radioaktywnie znakowanego ABA w hipokotylach mutantów *mtabcg20-2* jest około dwukrotnie wyższy w porównaniu do dzikiego typu (Ryc. 4.19). Przeprowadzony eksperyment wskazuje na akumulację ABA w hipokotylach zarodków mutantów z dysfunkcją eksportera MtABCG20.

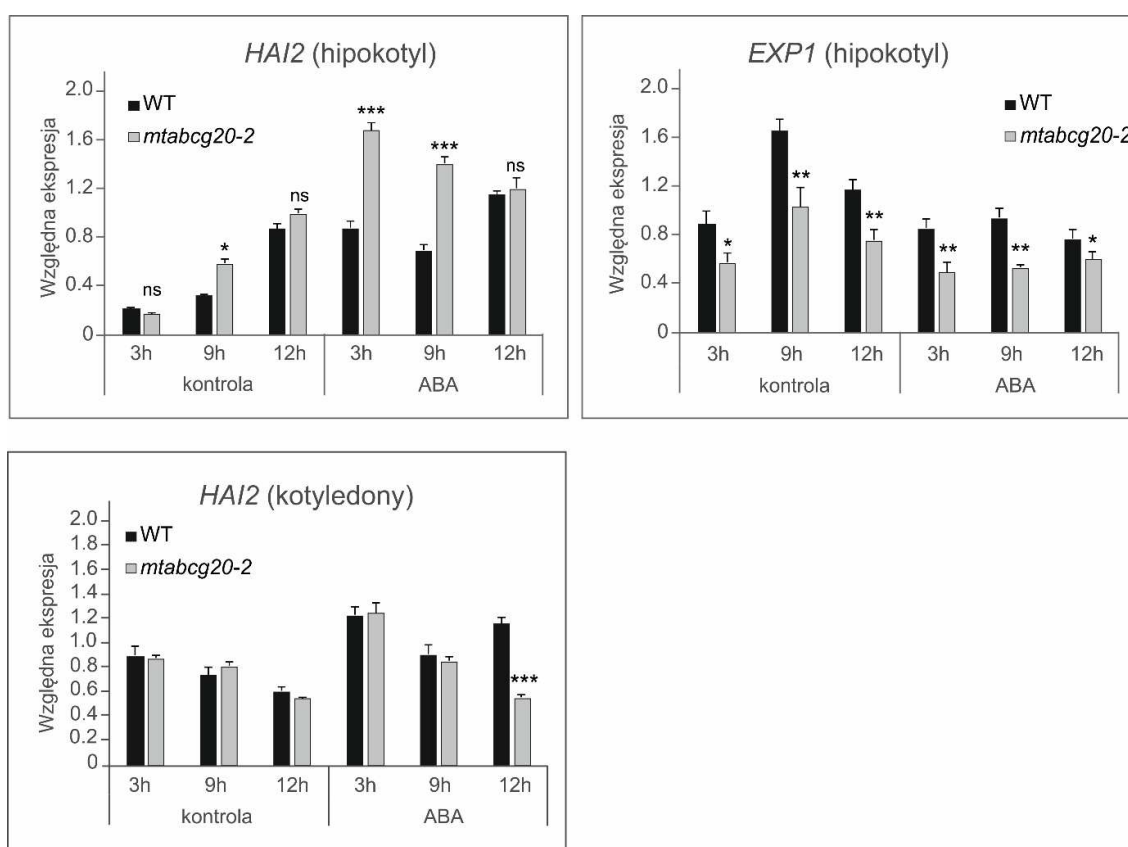


Ryc. 4.19 Akumulacja radioaktywnie znakowanego kwasu abscysynowego w hipokotylach zarodków wyizolowanych z nasion *M. truncatula* WT oraz *mtabcg20*. Wartości reprezentują średnią z 30 niezależnych prób \pm SD. Różnice istotne statystycznie pomiędzy hipokotylami WT, a hipokotylami mutantów *mtabcg20-2* określono przy użyciu testu t-Studenta (*** $P < 0,001$).

4.2.6.2 MtABCG20 reguluje proces kiełkowania nasion *Medicago truncatula*

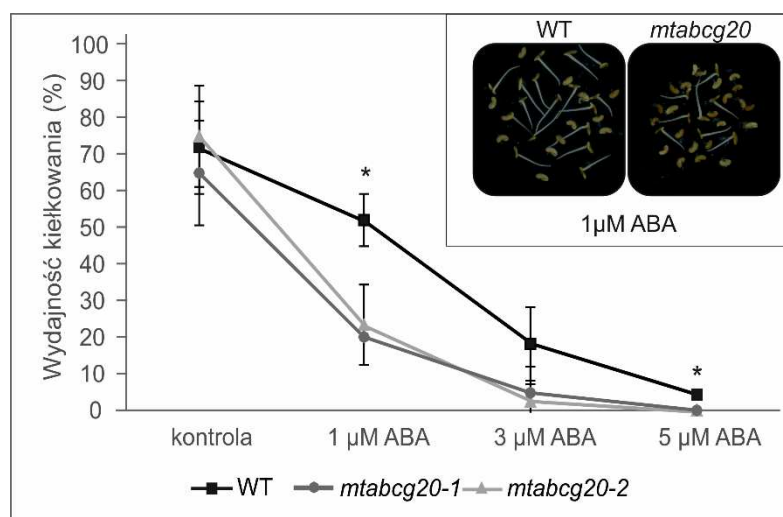
Biorąc pod uwagę wyniki eksperymentu, który wykazał, że radioaktywnie znakowany kwas abscysynowy jest akumulowany w hipokotylach nasion mutantów *mtabcg20*, przeprowadzono analizy ekspresji genów markerowych zależnych od stężenia ABA w zarodkach *M. truncatula*. Eksperyment zakładał zbadanie, jak zmienia się ekspresja wybranych genów, oddzielnie w hipokotylach i kotyledonach zarodków nasion mutantów *mtabcg20* po egzogennej aplikacji 10 μM ABA w porównaniu do zarodków dzikiego typu (WT). Pierwszym z analizowanych genów markerowych był silnie indukowany ABA gen *HAI2* (ang. *Highly ABA-Induced 2*), kodujący jedną z izoform białka katalicznego fosfatazy typu PP2C, które uczestniczy w wewnątrzkomórkowym szlaku sygnałowym ABA w nasionach (Bhaskara i wsp., 2012; Hyung i wsp., 2014).

Ilościowa analiza RT-PCR wykazała, że ekspresja *HAI2* jest indukowana działaniem ABA, a poziom transkryptu badanego genu jest statystycznie wyższy w hipokotylach zarodków mutantów *mtabcg20*, w porównaniu do WT. Natomiast w kotyledonach mutantów *mtabcg20* ekspresja *HAI2* jest na zbliżonym poziomie lub niższa (12 h po aplikacji ABA) w porównaniu do WT (Ryc.4.20). Drugim analizowanym genem markerowym był *EXP1* (ang. *expansin1*), gen kodujący jedną z ekspansyn typu A1, która bierze udział w rozluźnianiu struktury ścian komórkowych i umożliwia wzrost objętościowy komórek hipokotyli na wczesnych etapach kiełkowania (Gimeno-Gilles i wsp., 2009). Ekspresja *EXP1* jest negatywnie regulowana przez działanie ABA. Przeprowadzone analizy wykazały, że poziom mRNA *EXP1* jest znacząco niższy w hipokotylach mutantów *mtabcg20*, w porównaniu do WT (4.20). *EXP1* nie ulega ekspresji w kotyledonach zarodków. Zaobserwowane wyniki wykazały, że brak MtABCG20 skutkuje miejscowym zwiększeniem stężenia ABA wewnątrz hipokotyli nasion *M. truncatula*, co przekłada się na zmiany ekspresji genów zależnych od ABA.



Ryc. 4.20 Ilościowa analiza zmian poziomu ekspresji genów *HAI2* oraz *EXP1* w zarodkach nasion *M. truncatula* R108 dzikiego typu (WT) oraz mutantu *mtabcg20-2*, po egzogennej aplikacji 10 μ M ABA. W celu porównania średnich kontrolnych i badanych z trzech powtórzeń technicznych zastosowano dwustronny test t-Studenta dla prób niezależnych (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$).

Podczas kolejnych analiz próbowano odpowiedzieć na pytanie, jak/czy brak MtABCG20, a tym samym akumulacja ABA w hipokotylach mutantów, wpływa na proces kiełkowania nasion. Dojrzałe nasiona *M. truncatula* dzikiego typu (WT) oraz mutantów *mtabcg20* zostały umieszczone na stałej pożywce ½ MS (kontrola) lub ½ MS z dodatkiem kwasu abscysynowego o różnym stężeniu: 1 μM, 3 μM lub 5 μM. Nasiona inkubowano trzy dni w temperaturze 4°C, a następnie przeniesiono do temperatury 24°C. Po 24 h od przeniesienia nasion do temperatury 24°C sprawdzono wydajność kiełkowania. Przeprowadzony eksperyment wykazał, że nasiona mutantów *mtabcg20* kiełkują statystycznie istotnie słabiej, niż nasiona WT na pożywce zawierającej 1 μM ABA (Ryc. 4.21).

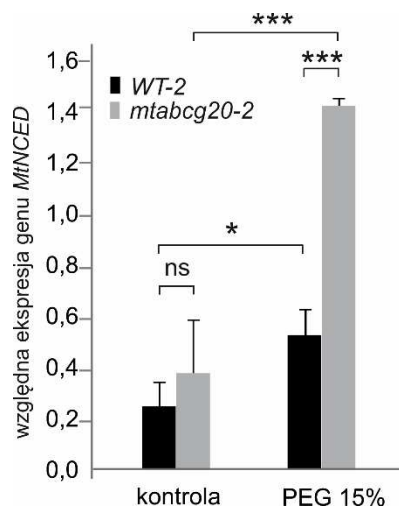


Ryc. 4.21 Wydajność kiełkowania nasion *M. truncatula* R108 dzikiego typu (WT) oraz mutantu *mtabcg20*. Nasiona po sterylizacji i skaryfikacji zostały przeniesione na pożywki ½ MS zawierające różne stężenia kwasu abscysynowego. Liczba skiełkowanych nasion była zliczana po 24 h od przeniesienia roślin do temperatury 24°C. Wartości przedstawiają średni procent skiełkowanych nasion z trzech powtórzeń eksperymentów, gdzie w każdym eksperymencie 100% wynosiło 30 nasion. W celu porównania średnich pomiędzy WT, a nasionami mutantów zastosowano test t-Studenta (*P<0,05).

4.2.6.3 MtABCG20 bierze udział w zmianach morfologii korzeni *Medicago truncatula*

Wcześniejsze analizy aktywności promotora *MtABCG20* określiły, że badany gen ulega ekspresji w wiązce przewodzącej korzeni *M. truncatula*, gdzie zachodzi biosynteza ABA. Dlatego w kolejnym eksperymencie porównano poziom ekspresji genu *MtNCED*, pozytywnie regulowanego przez ABA i kodującego jeden z kluczowych enzymów

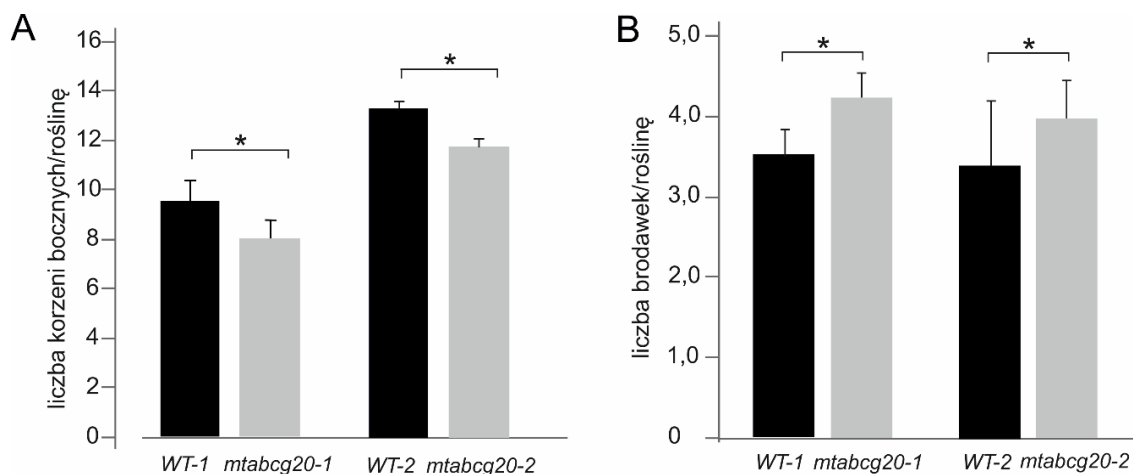
ze szlaku biosyntezy ABA (Han i wsp., 2004), w korzeniach linii *mtabcg20-2* i korzeniach WT, w warunkach stresu suszy. Zaobserwowano, że ekspresja genu *MtNCED* jest znacząco wyższa w korzeniach roślin *mtabcg20*, niż w korzeniach roślin WT (Ryc. 4.22). Uzyskany wynik wskazuje, że brak MtABCG20 powoduje nagromadzenie ABA w miejscu jego biosyntezy.



Ryc. 4.22 Ilościowa analiza zmian poziomu ekspresji genu *MtNCED* w korzeniach *M. truncatula* R108 (WT) oraz mutantów *mtabcg20-2*, 24 h po egzogennej aplikacji 15% PEG. W celu porównania średnich kontrolnych i badanych z dwóch powtórzeń biologicznych zastosowano dwuczynnikowy test ANOVA, poparty testem post-hoc Bonferroni (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$).

Podwyższone stężenie ABA podczas stresu suszy promuje powstawanie korzeni bocznych, a jednocześnie wstrzymuje zawiązywanie nowych brodawek korzeniowych u *M. truncatula*. Sprawdzone jak brak MtABCG20, a tym samym akumulacja ABA w komórkach biosyntezy i ograniczony dostęp do komórek efektorowych, wpływa na rozwój korzeni bocznych oraz na wydajność nawiązywania interakcji z bakteriami symbiotycznymi z rodzaju *Rhizobium* w warunkach stresu suszy. W pierwszym eksperymencie rośliny *mtabcg20* oraz dzikiego typu WT były hodowane na stałej pożywce ½ MS zawierającej 5% PEG. Po upływie 4 tygodni zliczono korzenie boczne przypadające na jedną roślinę. Zaobserwowano, że rośliny z mutacją w obrębie genu *MtABCG20* wykazywały statystycznie mniejszą ilość korzeni bocznych w porównaniu do roślin WT (Ryc. 4.23A). W drugim eksperymencie trzydniowe siewki *mtabcg20* oraz WT były poddane działaniu 10 μM ABA przez 24 h, a następnie inokulowane zawiesiną bakterii *Sinorhizobium meliloti* (podrozdział 3.5.7). Powstające brodawki korzeniowe zliczano 21 dni po inokulacji. Rośliny *mtabcg20* charakteryzowały się większą liczbą

brodawek korzeniowych przypadających na jedną roślinę w porównaniu do roślin WT (Ryc. 4.23B). Porównywane zmiany morfologii korzeni są procesami zależnymi od działania kwasu abscysynowego u roślin bobowatych (Ding i wsp., 2008; Harris, 2015). Uzyskane wyniki wykazały, że eksporter ABA, MtABCG20 wpływa na ilość powstających korzeni bocznych oraz brodawek korzeniowych w warunkach stresu suszy u *Medicago truncatula*.



Ryc. 4.23 Analiza fenotypowa przeprowadzona na korzeniach *M. truncatula* R108 dzikiego typu (WT, czarne słupki) oraz *mtabcg20* (szare słupki). (A) Porównanie liczby korzeni bocznych przypadających na jedną roślinę. Wszystkie rośliny wznosiły przez cztery tygodnie na pożywce ½ MS zawierającej 5% PEG. Wartości przedstawiają średnią z trzech powtórzeń biologicznych, gdzie w każdym eksperymencie wykorzystano 30 roślin. W celu porównania średnich pomiędzy WT, a *mtabcg20* zastosowano test t-Studenta (* $P < 0,05$). (B) Porównanie liczby brodawek korzeniowych, 21 dni po inokulacji, przypadających na jedną roślinę. Wartości przedstawiają średnią z dwóch powtórzeń biologicznych, gdzie w każdym eksperymencie wykorzystano 40 roślin. W celu porównania średnich pomiędzy WT, a *mtabcg20* zastosowano test t-Studenta (* $P < 0,05$).

5. DYSKUSJA

W pracy doktorskiej podjęto próbę poznania roli jaką mogą pełnić transportery ABCG w dystrybucji kwasu abscysynowego (ABA) w modelowej roślinie bobowatej, *Medicago truncatula*. Na podstawie analiz porównawczych, spośród 36 połowicznych transporterów ABCG u *M. truncatula* wyselekcjonowano grupę białek potencjalnie zaangażowanych w translokację ABA (Ryc. 4.1). Ekspresja czterech genów kodujących potencjalne transportery ABA tj. *MtABCG20*, *MtABCG26*, *MtABCG27* oraz *MtABCG29*, była indukowana w korzeniach *M. truncatula* po egzogennej aplikacji ABA (Ryc. 4.3). Podczas badań nad transporterami ABCG często obserwuje się, że obecność translokowanej molekuly indukuje ekspresję genu kodującego jej transporter (Kang i wsp., 2015; Kuromori i wsp., 2010). Gwałtowny wzrost ekspresji genów *MtABCG20* oraz *MtABCG26* zaobserwowano już w pierwszej godzinie po potraktowaniu ABA, natomiast w przypadku *MtABCG27* i *MtABCG29* wzrost indukcji występował dopiero po 6 godzinach. Analiza aktywności promotorów wykazała, że zarówno *MtABCG20* i *MtABCG26* ulegają ekspresji w wiązkach przewodzących korzeni *M. truncatula*, czyli w głównym miejscu biosyntezy ABA (Ryc. 4.4). Pozostałe dwa transportery *MtABCG27* i *MtABCG29* występują w komórkach kory strefy wydłużeniowej korzenia lub w merystemach korzeni bocznych (Ryc. 4.4).

W przedstawionej pracy szczegółowo scharakteryzowano transporter *MtABCG20*. Jako białko błony komórkowej (Ryc. 4.9, Ryc. 4.13) tworzy ono homodimer (Ryc. 4.10A) i aktywnie uczestniczy w dystrybucji ABA zarówno w korzeniach jak i zarodku. *MtABCG20* jest pierwszym zidentyfikowanym transporterem ABC kwasu abscysynowego, u bobowatych. Eksperymenty transportu przeprowadzone na komórkach tytoniu BY2, ekspresjonujących *MtABCG20*, udowodniły udział badanego transportera w eksporcie ABA na zewnątrz komórki (Ryc. 4.14). Transport ten jest zależny od ATP (Ryc. 4.15).

Szczegółowa analiza aktywności promotora *MtABCG20* wykazała, że intensywność sygnału GUS ulega zwiększeniu po egzogennej aplikacji ABA (Ryc. 4.6). Podobne zwiększenie intensywności sygnału GUS w wiązkach przewodzących liści i korzeni po egzogennej aplikacji ABA zaobserwowano w badaniach nad *AtABCG25*, który zdefiniowano jako eksporter ABA u *A. thaliana* (Kuromori i wsp., 2010).

ABA odgrywa dużą rolę w modulacji architektury korzeni pod wpływem zmieniających się warunków środowiska. W stresie suszy dochodzi do biosyntezy i translokacji ABA w obrębie korzeni, gdzie uruchamia swoiste strategie obronne, mające na celu zwiększenie efektywności poboru wody z podłoża. U *M. truncatula* ABA aktywuje powstawanie nowych primordiów i rozwój korzeni bocznych (Gonzalez i wsp., 2015; Harris, 2015). Biorąc pod uwagę obecność MtABCG20 w komórkach odpowiedzialnych za biosyntezę ABA sprawdzono czy dysfunkcja tego transportera wpływa na ekspresję *MtNCED*, kodującego jeden z enzymów uczestniczących w końcowych etapach biosyntezy ABA. MtNCED jest elementem pozytywnej autoregulacji biosyntezy ABA, co oznacza, że ilość jego transkryptu wzrasta w obecności hormonu. Przeprowadzony eksperyment wykazał, że w korzeniach mutantów *mtabcg20* następuje statystycznie istotny (ponad dwukrotny) wzrost ekspresji *MtNCED* w warunkach stresu suszy (stymulującej biosyntezę ABA), w porównaniu do korzeni kontrolnych (Ryc. 4.22). Dodatkowo, wzór ekspresji *MtABCG20* rozszerza się do miejsca tworzenia nowych zawiązków korzeniowych (Ryc. 4.5). W tym miejscu zwiększone stężenie ABA indukuje etap inicjacji formowania korzeni bocznych (Harris, 2015). Aby odpowiedzieć na pytanie, czy ekspresja *MtABCG20* ma znaczenie dla np. architektury korzeni, przeprowadzono analizy fenotypowe, w których zliczano powstające korzenie boczne. Mutanty *mtabcg20* przejawiały mniejszą ilość korzeni bocznych w porównaniu z roślinami kontrolnymi, po czterech tygodniach wzrostu na podłożu zawierającym 5% PEG (Ryc. 4.23A). Zaobserwowany efekt fenotypowy jest istotny statystycznie lecz nie drastyczny. Brak silnego fenotypu może być związany z bierną dyfuzją ABA oraz z powszechnym zjawiskiem redundancji funkcjonalnej (ang. *functional redundancy*) obserwowanej dla dużych rodzin białkowych u roślin, w tym białek ABC. Rzeczywiście zauważono, że mutanty z zaburzonym funkcjonowaniem zidentyfikowanych transporterów ABA u *A. thaliana* (*atabcg25*, *atabcg40*) przejawiają łagodny efekt fenotypowy w porównaniu do mutantów ze znaczącym niedoborem ABA, wynikającym np. z zaburzenia biosyntezy (Bhattacharjee i wsp., 2013; Danisman i wsp., 2013; Kuromori i wsp., 2018). Wykazano również, że w transport ABA może być zaangażowanych więcej transporterów zarówno w aparatach szparkowych jak i nasionach (Kang i wsp., 2010; Kang i wsp., 2015; Kuromori i wsp., 2010; Kuromori i wsp., 2014).

Szczególną cechą roślin bobowatych jest nawiązywanie symbiozy z bakteriami wiążącymi azot atmosferyczny (Rhizobiami). ABA jest negatywnym regulatorem tego

procesu przez hamowanie rozwoju nici infekcyjnej w ryzodermie oraz blokowanie powstawania zawiązków brodawek korzeniowych w korze pierwotnej (Ding i wsp., 2008; Oldroyd, 2013). Korzenie roślin *mtabcg20* charakteryzowały się większą ilością brodawek korzeniowych przypadających na roślinę w porównaniu z roślinami kontrolnymi (Ryc. 4.23B). Podobny efekt obserwowano także w korzeniach *M. truncatula* z nadekspresją negatywnego, dominującego allelu *abil-1* (kodującego fosfatazę PP2C) z zaburzonym wewnątrzkomórkowym szlakiem sygnałowym ABA (Ding i wsp., 2008). Jednak zaburzenie sygnalizacji ABA spowodowane mutacją *abil-1* nie wpływa na ekspresję genów *MtABCG20* i *MtNCED* w korzeniach *M. truncatula* (Ryc. 4.16). Można więc przypuszczać, iż *MtABCG20* oraz *MtNCED* nie są kontrolowane przez szlak sygnałowy angażujący fosfatazę PP2C (ABI1). Możliwe, że szlak ABI1 funkcjonuje tylko w komórkach efektorowych dla ABA, a nie w komórkach biosyntezy, w których znajdują się transporter *MtABCG20* oraz enzym *MtNCED*. Dlatego zwiększona liczba brodawek u *mtabcg20* może być tłumaczona zatrzymaniem ABA w miejscu biosyntezy i tym samym niewystarczającą ilością ABA do wywołania reakcji w komórkach kory i ryzodermy. Znaczący, ale raczej nie drastyczny efekt fenotypowy można ponownie wytłumaczyć dyfuzją oraz działaniem innych transporterów, pełniących analogiczną funkcję do transportera *MtABCG20*. U *M. truncatula* funkcję taką może przykładowo pełnić transporter *LATD/NIP*, którego ekspresja jest regulowana przez ABA, i który bierze udział w zawiązywaniu i utrzymywaniu aktywności merystemów brodawek korzeniowych (Yendrek i wsp., 2010). Warto pamiętać, że działanie ABA nie ogranicza się tylko do wczesnych etapów procesu brodawkowania. Zaobserwowano np., że poziom leghemoglobiny, uczestniczącej w procesie wiązania azotu atmosferycznego we wnętrzu brodawek, spada po egzogennej aplikacji ABA (Gonzalez i wsp., 2001). Co więcej, mutant *Lotus japonicus enf1* (ang. *enhanced nitrogen fixation 1*), wykazujący zwiększoną wydajność wiązania azotu przez brodawki korzeniowe, charakteryzuje się zmniejszoną ilością endogenego ABA w porównaniu do roślin dzikiego typu (Tominaga i wsp., 2010). Analiza aktywności promotora *MtABCG20* wykazała, że badany gen ulega ekspresji we wnętrzu brodawki korzeniowej (Ryc. 4.5). Jednak, aby odpowiedzieć na pytanie, czy *MtABCG20* wpływa również na procesy metaboliczne zachodzące we wnętrzu brodawek, należy przeprowadzić dodatkowe eksperymenty.

ABA odgrywa kluczową rolę podczas rozwoju zarodka, dojrzewania nasion, wprowadzenia i utrzymywania nasion w stanie spoczynku oraz w zapoczątkowaniu

kiełkowania w optymalnych warunkach środowiska. Przejście nasiona do stadium wegetatywnego jest krytycznym momentem w cyklu życiowym rośliny, warunkującym jej przeżycie (Chahtane i wsp., 2017). Dlatego proces podjęcia decyzji o zapoczątkowaniu kiełkowania jest ściśle regulowany także wewnątrz zarodka przez współdziałanie wielu molekuł sygnałowych, w tym ABA. W nasionach *A. thaliana* zidentyfikowano cztery transportery ABA: AtABCG25, AtABCG31 uczestniczące w eksporcie ABA z bielma oraz AtABCG30, AtABCG40 importujące ABA do zarodka (Kang i wsp., 2015). Wszystkie cztery transportery opisane u *A. thaliana* uczestniczą w utrzymywaniu nasion w stanie spoczynku zapobiegając kiełkowaniu w niekorzystnych warunkach. Koniecznym czynnikiem do kiełkowania nasion, pochodzącym ze środowiska zewnętrznego, jest obecność wody w podłożu, która umożliwia zmiękczenie okrywy nasiennej i przebicie się korzenia zarodkowego (Sliwiska i wsp., 2009). Ilość mRNA *MtABCG20* gwałtownie wzrasta na wczesnych etapach kiełkowania, podczas imbibicji (Ryc. 4.7). Co ciekawe specyficzny wzór ekspresji *MtABCG20* w zarodkach nasion *M. truncatula* obejmuje region w strefie pomiędzy hipokotylem, a wierzchołkiem korzenia zarodkowego (Ryc. 4.8). Region korespondujący z występowaniem *MtABCG20* jest kluczowy w procesie kiełkowania. W tym miejscu następuje rozluźnienie ścian komórkowych, wydłużanie komórek korzenia zarodkowego oraz synteza ekspansyn (Gimeno-Gilles i wsp., 2009; Sliwiska i wsp., 2009). Badania przeprowadzone metodą analizy pojedynczych komórek (ang. *digital single cell analysis*) z wykorzystaniem genów markerowych wykazały, że w obrębie zarodka w strefie pomiędzy hipokotylem, a wierzchołkiem korzenia zarodkowego występują komórki odpowiedzialne za biosyntezę, jak również degradację ABA. Co więcej są one przestrzennie rozdzielone a transport ABA pomiędzy tymi komórkami wydaje się być kluczowym elementem regulującym i inicjującym proces kiełkowania (Topham i wsp., 2017). Biorąc pod uwagę specyficzny wzór ekspresji *MtABCG20* wysunięto hipotezę, że transporter *MtABCG20* uczestniczy w usuwaniu ABA ze wspomnianej strefy zarodka, wspomagając/kontrolując proces kiełkowania. Argumentem za słusznością wysuniętej hipotezy może być akumulacja ABA w hipokotylach mutantów *mtabcg20* (Ryc. 4.19) oraz niższa wydajność kiełkowania nasion mutantów (Ryc. 4.21). Co więcej ekspresja genu markerowego *MtHAI2* (silnie indukowanego ABA) była wyższa w hipokotylach *mtabg20* w porównaniu do nasion dzikiego typu, podczas gdy ekspresja genu *EXPI* (ulegającego represji pod wpływem ABA) była niższa w hipokotylach *mtabcg20* w porównaniu do nasion kontrolnych, zarówno w warunkach normalnych, jak i w stresie

suszy (Ryc. 4.20). Uzyskane wyniki wskazują na zatrzymanie i zwiększoną ilość ABA w strefie osi zarodkowej nasion *mtabcg20*.

U roślin obserwuje się zwielokrotnioną ilość genów kodujących białka ABCG (Hwang i wsp., 2016). Ewolucyjnie liczebność tej grupy jest prawdopodobnie związana z przystosowaniem roślin do środowiska lądowego (Hwang i wsp., 2016). Rzeczywiście u roślin lądowych, transportery ABCG zostały powiązane z formowaniem kutykuli, mechanizmami obronnymi, transportem hormonów i metabolitów wtórnych, czy kiełkowaniem nasion, z których wszystkie są podstawowymi cechami niezbędnymi do przetrwania na lądzie (Lefevre i Boutry, 2018). Ponadto, połowiczne transportery ABCG mogą funkcjonować jako homo lub heterodimery, co może dodatkowo wpływać na ich funkcjonalność. Przykładowo transporter AtABCG11 jako homodimer bierze udział w transporcie monomerów kutyn w częściach nadziemnych *A. thaliana*. AtABCG11 może również utworzyć w błonie komórkowej heterodimer z białkiem AtABCG12, gdzie wspólnie są odpowiedzialne za transport lipidów. Co ciekawe, AtABCG12 nie tworzy samodzielnie homodimeru i wydaje się, że jego obecność jest ściśle zależna od AtABCG11 (McFarlane i wsp., 2010). Analizy fenotypowe wykazały, że AtABCG11 uczestniczy także w eksporcie suberynu w korzeniach, kiełkowaniu nasion oraz kwitnieniu. Wydaje się, że połowiczny transporter AtABCG11, w zależności od miejsca występowania, łączy się z innymi transporterami, co wpływa na specyficzność substratową (McFarlane i wsp., 2010; Panikashvili i wsp., 2010). Zidentyfikowany w niniejszej pracy doktorskiej transporter ABA, MtABCG20 może utworzyć w błonie komórkowej heterodimer z białkiem MtABCG26 (Ryc. 4.10C). Wzory ekspresji tych dwóch transporterów są takie same w korzeniach *M. truncatula* (Ryc. 4.4). Jednak w zarodkach nasion *M. truncatula* transportery MtABCG20 oraz MtABCG26 występują w zupełnie różnych, rozdzielonych od siebie miejscach (Ryc. 4.8, Załącznik 2). Jeżeli MtABCG26 również jest transporterem ABA to możliwe, że wspólnie z MtABCG20, jako heterodimer uczestniczą w eksporcie ABA z wiązki przewodzącej korzenia. Natomiast w zarodku, *MtABCG26* ulega ekspresji w innym miejscu zatem jeżeli MtABCG26 jako homodimer transportuje ABA, to konsekwencje jego aktywności są najprawdopodobniej zupełnie różne niż w przypadku MtABCG20.

Zgromadzone dotychczas wyniki prac nad transporterami ABA u *A. thaliana*, a także te uzyskane w niniejszej pracy na przykładzie MtABCG20 wskazują, że miejsce aktywności transportera determinuje w szczególny sposób rolę jaką on pełni. Jest to wyjątkowo istotne dla dystrybucji fitohormonów. Jak pokazano na przykładzie

A. thaliana w roślinach występuje co najmniej kilka transporterów należących do rodziny białek ABC zdolnych do translokacji ABA przez błony biologiczne (Kang i wsp., 2015; Kuromori i wsp., 2010). W nasionach *A. thaliana* dwa eksporterzy ABA, AtABCG25 oraz AtABCG31 uczestniczą w eksporcie ABA z endospermy do zarodka wpływając na utrzymanie nasion w stanie spoczynku. MtABCG20 również jest eksporterem ABA, ale zlokalizowany jest w specyficznym miejscu zarodka, gdzie wspomaga kiełkowanie.

Podczas badań przeprowadzonych w trakcie realizacji pracy doktorskiej zauważono, że ekspresja *MtABCG27* i *MtABCG29* również jest silnie indukowana ABA (Ryc. 4.3). Wzory ekspresji tych dwóch transporterów różnią się między sobą w korzeniach *M. truncatula* (Ryc. 4.4). Jeżeli *MtABCG27* (występujący w merystemach korzeni bocznych) oraz *MtABCG29* (występujący w korze strefy wydłużeniowej korzeni bocznych) są transporterami ABA to możliwe, że wpływają na lokalne zmiany ilości tego hormonu w różnych obszarach korzenia, kontrolując np. dwa różne etapy rozwoju korzeni bocznych jak aktywacja merystemu oraz wzrost korzenia na długość.

Badania przedstawione w pracy doktorskiej dostarczają ważnych z agronomicznego punktu widzenia informacji o roli transportu ABA w modelowej roślinie bobowatej *M. truncatula*. W przyszłości wyniki zaprezentowanych badań mogą znaleźć zastosowanie w selekcji odmian roślin bobowatych przejawiających lepsze zdolności adaptacyjne do zmieniającego środowiska. Pierwsze badania w tym kierunku zostały przeprowadzone na przykładzie *A. thaliana*. Rośliny z nadekspresją *AtABCG25*, kodującego eksporter ABA, charakteryzowały się wydłużoną zdolnością przeżycia w sytuacji niedoboru wody w podłożu nawet przez okres 10 dni, przy jednoczesnym zachowaniu prawidłowego wzrostu, w porównaniu z roślinami kontrolnymi. Efekt ten był spowodowany wyższym poziomem biosyntezy ABA, częstszym zamknięciem aparatów szparkowych i w konsekwencji ograniczoną transpiracją (Kuromori i wsp., 2016).

6. WNIOSKI

Na podstawie uzyskanych wyników oraz ich analizy sformułowano następujące wnioski końcowe:

- Spośród wyselekcjonowanej grupy 9 genów kodujących połowiczne transportery ABCG u *Medicago truncatula*, potencjalnie zaangażowane w translokację ABA, ekspresja 4 z nich (*MtABCG20*, *MtABCG26*, *MtABCG27*, *MtABCG29*) jest indukowana pod wpływem egzogennej aplikacji ABA i PEG.
- *MtABCG20* jest białkiem błony komórkowej, w której tworzy homodimer i aktywnie uczestniczy w translokacji ABA przez błonę komórkową przy wykorzystaniu ATP.
- W korzeniach *M. truncatula* *MtABCG20* ulega ekspresji w wiązce przewodzącej, czyli miejscu biosyntezy ABA, brodawce korzeniowej oraz w miejscu inicjacji zawiązywania korzeni bocznych.
- W nasionach *M. truncatula* *MtABCG20* ulega ekspresji w zarodku, tylko w regionie pomiędzy hipokotylem, a wierzchołkiem korzenia zarodkowego.
- Ekspresja *MtABCG20* jest niezależna od wewnątrzkomórkowego szlaku sygnałowego ABA.
- Brak *MtABCG20* powoduje statystycznie istotny spadek wydajności kiełkowania.
- W stresie suszy mutanty *mtabcg20* charakteryzują się mniejszą liczbą powstających korzeni bocznych oraz większą liczbą brodawek korzeniowych w porównaniu do roślin kontrolnych.
- *MtABCG20* jest pierwszym opisanym przedstawicielem białek ABC biorącym udział w transporcie ABA u roślin bobowatych.
- *MtABCG20* kontroluje procesy reorganizacji architektury korzeni w stresie suszy oraz wspomaga kiełkowanie nasion.

7. LITERATURA

Ali-Rachedi, S., Bouinot, D., Wagner, M.H., Bonnet, M., Sotta, B., Grappin, P., and Jullien, M. (2004). Changes in endogenous abscisic acid levels during dormancy release and maintenance of mature seeds: studies with the Cape Verde Islands ecotype, the dormant model of *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 219, 479-488.

Ariel, F., Diet, A., Verdenaud, M., Gruber, V., Frugier, F., Chan, R., and Crespi, M. (2010). Environmental regulation of lateral root emergence in *Medicago truncatula* requires the HD-Zip I transcription factor HB1. *Plant Cell* 22, 2171-2183.

Bao, Y., Aggarwal, P., Robbins, N.E., Sturrock, C.J., Thompson, M.C., Tan, H.Q., Tham, C., Duan, L.N., Rodriguez, P.L., Vernoux, T., *et al.* (2014). Plant roots use a patterning mechanism to position lateral root branches toward available water. *P Natl Acad Sci USA* 111, 9319-9324.

Bauer, H., Ache, P., Lautner, S., Fromm, J., Hartung, W., Al-Rasheid, K.A., Sonnewald, S., Sonnewald, U., Kneitz, S., Lachmann, N., *et al.* (2013). The stomatal response to reduced relative humidity requires guard cell-autonomous ABA synthesis. *Curr Biol* 23, 53-57.

Bednarska, M., and Borucki, W. (2012). *Medicago truncatula* Gaertn. - roślina modelowa z rodziny bobowatych (Fabaceae). *Wiadomości botaniczne*, 21-33.

Benedito, V.A., Torres-Jerez, I., Murray, J.D., Andriankaja, A., Allen, S., Kakar, K., Wandrey, M., Verdier, J., Zuber, H., Ott, T., *et al.* (2008). A gene expression atlas of the model legume *Medicago truncatula*. *Plant J* 55, 504-513.

Bensmihen, S., Giraudat, J., and Parcy, F. (2005). Characterization of three homologous basic leucine zipper transcription factors (bZIP) of the ABI5 family during *Arabidopsis thaliana* embryo maturation. *J Exp Bot* 56, 597-603.

Berendzen, K.W., Stuber, K., Harter, K., and Wanke, D. (2006). Cis-motifs upstream of the transcription and translation initiation sites are effectively revealed by their positional disequilibrium in eukaryote genomes using frequency distribution curves. *BMC Bioinformatics* 7, 522.

Bethke, P.C., Libourel, I.G., Aoyama, N., Chung, Y.Y., Still, D.W., and Jones, R.L. (2007). The *Arabidopsis* aleurone layer responds to nitric oxide, gibberellin, and abscisic acid and is sufficient and necessary for seed dormancy. *Plant Physiol* 143, 1173-1188.

Bhaskara, G.B., Nguyen, T.T., and Verslues, P.E. (2012). Unique Drought Resistance Functions of the Highly ABA-Induced Clade A Protein Phosphatase 2Cs. *Plant Physiology* 160, 379-395.

Bhattacharjee, P., Paul, S., Banerjee, M., Patra, D., Banerjee, P., Ghoshal, N., Bandyopadhyay, A., and Giri, A.K. (2013). Functional compensation of glutathione S-transferase M1 (GSTM1) null by another GST superfamily member, GSTM2. *Sci Rep-Uk* 3.

- Biswas, B., Chan, P.K., and Gresshoff, P.M. (2009). A novel ABA insensitive mutant of *Lotus japonicus* with a wilted phenotype displays unaltered nodulation regulation. *Mol Plant* 2, 487-499.
- Brandt, B., Munemasa, S., Wang, C., Nguyen, D., Yong, T.M., Yang, P.G., Poretsky, E., Belknap, T.F., Waadt, R., Aleman, F., *et al.* (2015). Calcium specificity signaling mechanisms in abscisic acid signal transduction in *Arabidopsis* guard cells. *Elife* 4.
- Burla, B., Pfrunder, S., Nagy, R., Francisco, R.M., Lee, Y., and Martinoia, E. (2013). Vacuolar transport of abscisic acid glucosyl ester is mediated by ATP-binding cassette and proton-antiport mechanisms in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 163, 1446-1458.
- Chahtane, H., Kim, W., and Lopez-Molina, L. (2017). Primary seed dormancy: a temporally multilayered riddle waiting to be unlocked. *J Exp Bot* 68, 857-869.
- Chiba, Y., Shimizu, T., Miyakawa, S., Kanno, Y., Koshihara, T., Kamiya, Y., and Seo, M. (2015). Identification of *Arabidopsis thaliana* NRT1/PTR FAMILY (NPF) proteins capable of transporting plant hormones. *J Plant Res* 128, 679-686.
- Chiwocha, S.D.S., Abrams, S.R., Ambrose, S.J., Cutler, A.J., Loewen, M., Ross, A.R.S., and Kermod, A.R. (2003). A method for profiling classes of plant hormones and their metabolites using liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry: an analysis of hormone regulation of thermodormancy of lettuce (*Lactuca sativa* L.) seeds. *Plant Journal* 35, 405-417.
- Cominelli, E., Conti, L., Tonelli, C., and Galbiati, M. (2013). Challenges and perspectives to improve crop drought and salinity tolerance. *New Biotechnol* 30, 355-361.
- Cornforth, J.W., Milborrow, B.V., and Ryback, G. (1965). Synthesis of (+)-Abscisin 2. *Nature* 206, 715-+.
- Curtis, M.D., and Grossniklaus, U. (2003). A gateway cloning vector set for high-throughput functional analysis of genes in planta. *Plant Physiol* 133, 462-469.
- Danisman, S., van Dijk, A.D.J., Bimbo, A., van der Wal, F., Hennig, L., de Folter, S., Angenent, G.C., and Immink, R.G.H. (2013). Analysis of functional redundancies within the *Arabidopsis* TCP transcription factor family. *J Exp Bot* 64, 5673-5685.
- De Rybel, B., van den Berg, W., Lokerse, A., Liao, C.Y., van Mourik, H., Moller, B., Peris, C.L., and Weijers, D. (2011). A versatile set of ligation-independent cloning vectors for functional studies in plants. *Plant Physiol* 156, 1292-1299.
- Dekkers, B.J.W., Costa, M.C.D., Maia, J., Bentsink, L., Ligterink, W., and Hilhorst, H.W.M. (2015). Acquisition and loss of desiccation tolerance in seeds: from experimental model to biological relevance. *Planta* 241, 563-577.
- Delmas, F., Sankaranarayanan, S., Deb, S., Widdup, E., Bournonville, C., Bollier, N., Northey, J.G., McCourt, P., and Samuel, M.A. (2013). ABI3 controls embryo degreening through Mendel's I locus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, E3888-3894.

- Ding, Y., Kalo, P., Yendrek, C., Sun, J., Liang, Y., Marsh, J.F., Harris, J.M., and Oldroyd, G.E. (2008). Abscisic acid coordinates nod factor and cytokinin signaling during the regulation of nodulation in *Medicago truncatula*. *Plant Cell* *20*, 2681-2695.
- Do, T.H.T., Martinoia, E., and Lee, Y. (2018). Functions of ABC transporters in plant growth and development. *Curr Opin Plant Biol* *41*, 32-38.
- Edwards, K., Johnstone, C., and Thompson, C. (1991). A Simple and Rapid Method for the Preparation of Plant Genomic DNA for Pcr Analysis. *Nucleic Acids Res* *19*, 1349-1349.
- Ernst, L., Goodger, J.Q., Alvarez, S., Marsh, E.L., Berla, B., Lockhart, E., Jung, J., Li, P., Bohnert, H.J., and Schachtman, D.P. (2010). Sulphate as a xylem-borne chemical signal precedes the expression of ABA biosynthetic genes in maize roots. *J Exp Bot* *61*, 3395-3405.
- Frankowski, K., Wilmowicz, E., Kućko, A., Sidłowska, M., Kęsy, J., and Kopcewicz, J. (2013). Metabolizm kwasu abscysynowego. *Postępy Biochemii* *59*, 83-88.
- Fujita, Y., Fujita, M., Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2011). ABA-mediated transcriptional regulation in response to osmotic stress in plants. *J Plant Res* *124*, 509-525.
- Gimeno-Gilles, C., Lelievre, E., Viau, L., Malik-Ghulam, M., Ricoult, C., Niebel, A., Leduc, N., and Limami, A.M. (2009). ABA-mediated inhibition of germination is related to the inhibition of genes encoding cell-wall biosynthetic and architecture: modifying enzymes and structural proteins in *Medicago truncatula* embryo axis. *Mol Plant* *2*, 108-119.
- Gonzalez, A.A., Agbevenou, K., Herrbach, V., Gough, C., and Bensmihen, S. (2015). Abscisic acid promotes pre-emergence stages of lateral root development in *Medicago truncatula*. *Plant Signaling & Behavior* *10*.
- Gonzalez, E.M., Galvez, L., and Arrese-Igor, C. (2001). Abscisic acid induces a decline in nitrogen fixation that involves leghaemoglobin, but is independent of sucrose synthase activity. *J Exp Bot* *52*, 285-293.
- Groszmann, M., Osborn, H.L., and Evans, J.R. (2017). Carbon dioxide and water transport through plant aquaporins. *Plant Cell Environ* *40*, 938-961.
- Hagenbeek, D., Quatrano, R.S., and Rock, C.D. (2000). Trivalent ions activate abscisic acid-inducible promoters through an ABI1-dependent pathway in rice protoplasts. *Plant Physiology* *123*, 1553-1560.
- Han, S.Y., Kitahata, N., Sekimata, K., Saito, T., Kobayashi, M., Nakashima, K., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K., Yoshida, S., and Asami, T. (2004). A novel inhibitor of 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase in abscisic acid biosynthesis in higher plants. *Plant Physiol* *135*, 1574-1582.
- Harada, N. (1973). Absolute Configuration of (+)-Trans-Abscisic Acid as Determined by a Quantitative Application of Exciton Chirality Method. *J Am Chem Soc* *95*, 240-242.

- Harris, J.M. (2015). Abscisic Acid: Hidden Architect of Root System Structure. *Plants (Basel)* 4, 548-572.
- Hartung, W., Sauter, A., and Hose, E. (2002). Abscisic acid in the xylem: where does it come from, where does it go to? *J Exp Bot* 53, 27-32.
- Hauser, F., Waadt, R., and Schroeder, J.I. (2011). Evolution of abscisic acid synthesis and signaling mechanisms. *Curr Biol* 21, R346-355.
- Henke, W., Herdel, K., Jung, K., Schnorr, D., and Loening, S.A. (1997). Betaine improves the PCR amplification of GC-rich DNA sequences. *Nucleic Acids Res* 25, 3957-3958.
- Hirayama, T., and Shinozaki, K. (2010). Research on plant abiotic stress responses in the post-genome era: past, present and future. *Plant J* 61, 1041-1052.
- Hoffmann, B., Trinh, T.H., Leung, J., Kondorosi, A., and Kondorosi, E. (1997). A new *Medicago truncatula* line with superior in vitro regeneration, transformation, and symbiotic properties isolated through cell culture selection. *Mol Plant Microbe In* 10, 307-315.
- Hwang, J.U., Song, W.Y., Hong, D., Ko, D., Yamaoka, Y., Jang, S., Yim, S., Lee, E., Khare, D., Kim, K., *et al.* (2016). Plant ABC Transporters Enable Many Unique Aspects of a Terrestrial Plant's Lifestyle. *Molecular Plant* 9, 338-355.
- Hyung, D., Lee, C., Kim, J.H., Yoo, D., Seo, Y.S., Jeong, S.C., Lee, J.H., Chung, Y., Jung, K.H., Cook, D.R., *et al.* (2014). Cross-family translational genomics of abiotic stress-responsive genes between *Arabidopsis* and *Medicago truncatula*. *PLoS One* 9, e91721.
- Jarzyniak, K.M., and Jasinski, M. (2014). Membrane transporters and drought resistance - a complex issue. *Front Plant Sci* 5.
- Jasinski, M., Banasiak, J., Radom, M., Kalitkiewicz, A., and Figlerowicz, M. (2009). Full-size ABC transporters from the ABCG subfamily in *medicago truncatula*. *Mol Plant Microbe Interact* 22, 921-931.
- Jasinski, M., Ducos, E., Martinoia, E., and Boutry, M. (2003). The ATP-binding cassette transporters: structure, function, and gene family comparison between rice and *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 131, 1169-1177.
- Jasińska, Z., and Kotecki, A. (2003). Rośliny strączkowe. In *Szczegółowa uprawa roślin*, J. Z., and K. A., eds. (Wrocław: AR).
- Ji, H., Peng, Y., Meckes, N., Allen, S., Stewart, C.N., Jr., and Traw, M.B. (2014). ATP-dependent binding cassette transporter G family member 16 increases plant tolerance to abscisic acid and assists in basal resistance against *Pseudomonas syringae* DC3000. *Plant Physiol* 166, 879-888.

- Kakar, K., Wandrey, M., Czechowski, T., Gaertner, T., Scheible, W.R., Stitt, M., Torres-Jerez, I., Xiao, Y.L., Redman, J.C., Wu, H.C., *et al.* (2008). A community resource for high-throughput quantitative RT-PCR analysis of transcription factor gene expression in *Medicago truncatula*. *Plant Methods* 4.
- Kang, J., Hwang, J.U., Lee, M., Kim, Y.Y., Assmann, S.M., Martinoia, E., and Lee, Y. (2010). PDR-type ABC transporter mediates cellular uptake of the phytohormone abscisic acid. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 2355-2360.
- Kang, J., Park, J., Choi, H., Burla, B., Kretschmar, T., Lee, Y., and Martinoia, E. (2011). Plant ABC Transporters. *Arabidopsis Book* 9, e0153.
- Kang, J., Yim, S., Choi, H., Kim, A., Lee, K.P., Lopez-Molina, L., Martinoia, E., and Lee, Y. (2015). Abscisic acid transporters cooperate to control seed germination. *Nat Commun* 6, 8113.
- Kang, Y., Li, M.Y., Sinharoy, S., and Verdier, J. (2016). A Snapshot of Functional Genetic Studies in *Medicago truncatula*. *Front Plant Sci* 7.
- Kempa, S., Krasensky, J., Dal Santo, S., Kopka, J., and Jonak, C. (2008). A central role of abscisic acid in stress-regulated carbohydrate metabolism. *PLoS One* 3, e3935.
- Kolaczowski, M., Kolaczowska, A., Luczynski, J., Witek, S., and Goffeau, A. (1998). In vivo characterization of the drug resistance profile of the major ABC transporters and other components of the yeast pleiotropic drug resistance network. *Microb Drug Resist* 4, 143-158.
- Kramer, E.M. (2006). How far can a molecule of weak acid travel in the apoplast or xylem? *Plant Physiol* 141, 1233-1236.
- Krattinger, S.G., Kang, J., Braunlich, S., Boni, R., Chauhan, H., Selter, L.L., Robinson, M.D., Schmid, M.W., Wiederhold, E., Hensel, G., *et al.* (2019). Abscisic acid is a substrate of the ABC transporter encoded by the durable wheat disease resistance gene Lr34. *New Phytol* 223, 853-866.
- Krzywinska, E., Kulik, A., Bucholc, M., Fernandez, M.A., Rodriguez, P.L., and Dobrowolska, G. (2016). Protein phosphatase type 2C PP2CA together with ABI1 inhibits SnRK2.4 activity and regulates plant responses to salinity. *Plant Signal Behav* 11, e1253647.
- Kuromori, T., Fujita, M., Urano, K., Tanabata, T., Sugimoto, E., and Shinozaki, K. (2016). Overexpression of AtABCG25 enhances the abscisic acid signal in guard cells and improves plant water use efficiency. *Plant Sci* 251, 75-81.
- Kuromori, T., Miyaji, T., Yabuuchi, H., Shimizu, H., Sugimoto, E., Kamiya, A., Moriyama, Y., and Shinozaki, K. (2010). ABC transporter AtABCG25 is involved in abscisic acid transport and responses. *P Natl Acad Sci USA* 107, 2361-2366.
- Kuromori, T., Seo, M., and Shinozaki, K. (2018). ABA Transport and Plant Water Stress Responses. *Trends Plant Sci* 23, 513-522.

- Kuromori, T., Sugimoto, E., and Shinozaki, K. (2011). Arabidopsis mutants of AtABCG22, an ABC transporter gene, increase water transpiration and drought susceptibility. *Plant J* 67, 885-894.
- Kuromori, T., Sugimoto, E., and Shinozaki, K. (2014). Intertissue signal transfer of abscisic acid from vascular cells to guard cells. *Plant Physiol* 164, 1587-1592.
- Lazo, G.R., Stein, P.A., and Ludwig, R.A. (1991). A DNA Transformation-Competent Arabidopsis Genomic Library in Agrobacterium. *Bio-Technol* 9, 963-967.
- Lee, K.P., Piskurewicz, U., Tureckova, V., Strnad, M., and Lopez-Molina, L. (2010). A seed coat bedding assay shows that RGL2-dependent release of abscisic acid by the endosperm controls embryo growth in Arabidopsis dormant seeds. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 19108-19113.
- Lefevre, F., and Boutry, M. (2018). Towards Identification of the Substrates of ATP-Binding Cassette Transporters. *Plant Physiol* 178, 18-39.
- Leung, J., Bouvierdurand, M., Morris, P.C., Guerrier, D., Cheddor, F., and Giraudat, J. (1994). Arabidopsis Aba Response Gene *Abi1* - Features of a Calcium-Modulated Protein Phosphatase. *Science* 264, 1448-1452.
- Limpens, E., van Zeijl, A., and Geurts, R. (2015). Lipochitooligosaccharides modulate plant host immunity to enable endosymbioses. *Annu Rev Phytopathol* 53, 311-334.
- Liu, T., Zhou, T., Lian, M., Liu, T., Hou, J., Ijaz, R., and Song, B. (2019). Genome-Wide Identification and Characterization of the AREB/ABF/ABI5 Subfamily Members from *Solanum tuberosum*. *Int J Mol Sci* 20.
- Livak, K.J., and Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(T)(-Delta Delta C) method. *Methods* 25, 402-408.
- Ma, Y., Szostkiewicz, I., Korte, A., Moes, D., Yang, Y., Christmann, A., and Grill, E. (2009). Regulators of PP2C phosphatase activity function as abscisic acid sensors. *Science* 324, 1064-1068.
- Martinoia, E., Grill, E., Tommasini, R., Kreuz, K., and Amrhein, N. (1993). Atp-Dependent Glutathione S-Conjugate Export Pump in the Vacuolar Membrane of Plants. *Nature* 364, 247-249.
- Matsuda, S., Takano, S., Sato, M., Furukawa, K., Nagasawa, H., Yoshikawa, S., Kasuga, J., Tokuji, Y., Yazaki, K., Nakazono, M., *et al.* (2016). Rice Stomatal Closure Requires Guard Cell Plasma Membrane ATP-Binding Cassette Transporter RCN1/OsABCG5. *Mol Plant* 9, 417-427.
- Maureira-Butler, I.J., Pfeil, B.E., Muangprom, A., Osborn, T.C., and Doyle, J.J. (2008). The reticulate history of Medicago (Fabaceae). *Syst Biol* 57, 466-482.

- McFarlane, H.E., Shin, J.J., Bird, D.A., and Samuels, A.L. (2010). Arabidopsis ABCG transporters, which are required for export of diverse cuticular lipids, dimerize in different combinations. *Plant Cell* 22, 3066-3075.
- Meade, H.M., Long, S.R., Ruvkun, G.B., Brown, S.E., and Ausubel, F.M. (1982). Physical and genetic characterization of symbiotic and auxotrophic mutants of *Rhizobium meliloti* induced by transposon Tn5 mutagenesis. *J Bacteriol* 149, 114-122.
- Merilo, E., Yarmolinsky, D., Jalakas, P., Parik, H., Tulva, I., Rasulov, B., Kilk, K., and Kollist, H. (2018). Stomatal VPD Response: There Is More to the Story Than ABA. *Plant Physiol* 176, 851-864.
- Mitula, F., Tajdel, M., Ciesla, A., Kasprowicz-Maluski, A., Kulik, A., Babula-Skowronska, D., Michalak, M., Dobrowolska, G., Sadowski, J., and Ludwikow, A. (2015). Arabidopsis ABA-Activated Kinase MAPKKK18 is Regulated by Protein Phosphatase 2C ABI1 and the Ubiquitin-Proteasome Pathway. *Plant Cell Physiol* 56, 2351-2367.
- Nagata, T., Nemoto, Y., and Hasezawa, S. (1992). Tobacco by-2 Cell-Line as the HeLa-Cell in the Cell Biology of Higher-Plants. *Int Rev Cytol* 132, 1-30.
- Nemhauser, J.L., Hong, F., and Chory, J. (2006). Different plant hormones regulate similar processes through largely nonoverlapping transcriptional responses. *Cell* 126, 467-475.
- Nguyen, N.H., Jung, C., and Cheong, J.J. (2019). Chromatin remodeling for the transcription of type 2C protein phosphatase genes in response to salt stress. *Plant Physiol Biochem* 141, 325-331.
- Norenburg, J.L., and Barrett, J.M. (1987). Steedman Polyester Wax Embedment and De-Embedment for Combined Light and Scanning Electron-Microscopy. *J Electron Microscop* 6, 35-41.
- North, H.M., De Almeida, A., Boutin, J.P., Frey, A., To, A., Botran, L., Sotta, B., and Marion-Poll, A. (2007). The Arabidopsis ABA-deficient mutant *aba4* demonstrates that the major route for stress-induced ABA accumulation is via neoxanthin isomers. *Plant J* 50, 810-824.
- Oldroyd, G.E. (2013). Speak, friend, and enter: signalling systems that promote beneficial symbiotic associations in plants. *Nat Rev Microbiol* 11, 252-263.
- Osakabe, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K., and Tran, L.S. (2014). ABA control of plant macroelement membrane transport systems in response to water deficit and high salinity. *New Phytol* 202, 35-49.
- Panikashvili, D., Shi, J.X., Bocobza, S., Franke, R.B., Schreiber, L., and Aharoni, A. (2010). The Arabidopsis DSO/ABCG11 transporter affects cutin metabolism in reproductive organs and suberin in roots. *Mol Plant* 3, 563-575.

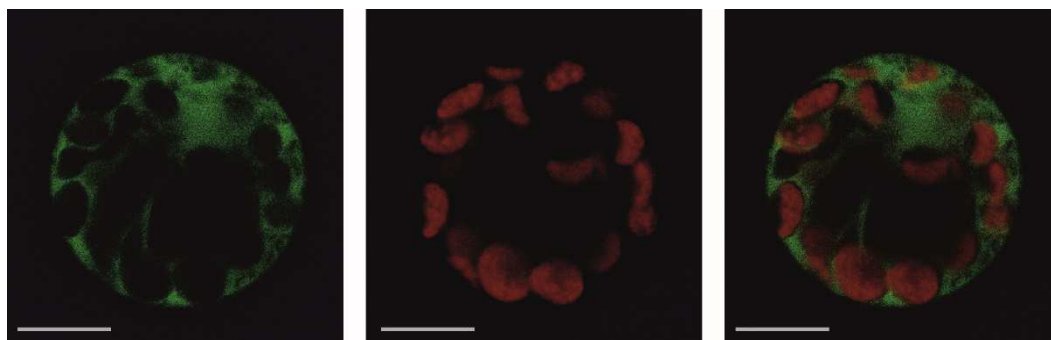
- Park, J., Lee, Y., Martinoia, E., and Geisler, M. (2017). Plant hormone transporters: what we know and what we would like to know. *Bmc Biol* 15.
- Park, Y., Xu, Z.Y., Kim, S.Y., Lee, J., Choi, B., Lee, J., Kim, H., Sim, H.J., and Hwang, I. (2016). Spatial Regulation of ABCG25, an ABA Exporter, Is an Important Component of the Mechanism Controlling Cellular ABA Levels. *Plant Cell* 28, 2528-2544.
- Pellizzaro, A., Clochard, T., Cukier, C., Bourdin, C., Juchaux, M., Montrichard, F., Thany, S., Raymond, V., Planchet, E., Limami, A.M., *et al.* (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, 2152-+.
- Quandt, H.J., Puhler, A., and Broer, I. (1993). Transgenic Root-Nodules of *Vicia-Hirsuta* - a Fast and Efficient System for the Study of Gene-Expression in Indeterminate-Type Nodules. *Mol Plant Microbe In* 6, 699-706.
- Reynolds, M., and Tuberosa, R. (2008). Translational research impacting on crop productivity in drought-prone environments. *Curr Opin Plant Biol* 11, 171-179.
- Roelfsema, M.R., and Hedrich, R. (2010). Making sense out of Ca(2+) signals: their role in regulating stomatal movements. *Plant Cell Environ* 33, 305-321.
- Rose, R.J. (2008). *Medicago truncatula* as a model for understanding plant interactions with other organisms, plant development and stress biology: past, present and future. *Funct Plant Biol* 35, 253-264.
- Sanchez-Fernandez, R., Davies, T.G., Coleman, J.O., and Rea, P.A. (2001). The *Arabidopsis thaliana* ABC protein superfamily, a complete inventory. *J Biol Chem* 276, 30231-30244.
- Sato, A., Sato, Y., Fukao, Y., Fujiwara, M., Umezawa, T., Shinozaki, K., Hibi, T., Taniguchi, M., Miyake, H., Goto, D.B., *et al.* (2009). Threonine at position 306 of the KAT1 potassium channel is essential for channel activity and is a target site for ABA-activated SnRK2/OST1/SnRK2.6 protein kinase. *Biochem J* 424, 439-448.
- Seiler, C., Harshavardhan, V.T., Rajesh, K., Reddy, P.S., Strickert, M., Rolletschek, H., Scholz, U., Wobus, U., and Sreenivasulu, N. (2011). ABA biosynthesis and degradation contributing to ABA homeostasis during barley seed development under control and terminal drought-stress conditions. *J Exp Bot* 62, 2615-2632.
- Simura, J., Antoniadi, I., Siroka, J., Tarkowska, D., Strnad, M., Ljung, K., and Novak, O. (2018). Plant Hormonomics: Multiple Phytohormone Profiling by Targeted Metabolomics. *Plant Physiol* 177, 476-489.
- Singh, R., Feroze, S.M., and Ray, L.I.P. (2013). Effects of Drought on Livelihoods and Gender Roles: A Case Study of Meghalaya. *Indian J Gend Stud* 20, 453-467.
- Sliwinska, E., Bassel, G.W., and Bewley, J.D. (2009). Germination of *Arabidopsis thaliana* seeds is not completed as a result of elongation of the radicle but of the adjacent transition zone and lower hypocotyl. *J Exp Bot* 60, 3587-3594.

- Smolarkiewicz, M., Skrzypczak, T., Michalak, M., Lesniewicz, K., Walker, J.R., Ingram, G., and Wojtaszek, P. (2014). Gamma-secretase subunits associate in intracellular membrane compartments in *Arabidopsis thaliana*. *J Exp Bot* 65, 3015-3027.
- Sozzani, R., and Iyer-Pascuzzi, A. (2014). Postembryonic control of root meristem growth and development. *Curr Opin Plant Biol* 17, 7-12.
- Stasiak, G., Mazur, A., Koper, P., Żebracki, K., and Skorupska, A. (2016). Symbioza rizobiów z roślinami bobowatymi (Fabaceae). *Postępy Mikrobiologii*, 289-299.
- Stec, N., Banasiak, J., and Jasinski, M. (2016). Abscisic acid - an overlooked player in plant-microbe symbioses formation? *Acta Biochim Pol* 63, 53-58.
- Suzuki, A., Akune, M., Kogiso, M., Imagama, Y., Osuki, K., Uchiumi, T., Higashi, S., Han, S.Y., Yoshida, S., Asami, T., *et al.* (2004). Control of nodule number by the phytohormone abscisic Acid in the roots of two leguminous species. *Plant Cell Physiol* 45, 914-922.
- Szabados, L., Charrier, B., Kondorosi, A., Debruijn, F.J., and Ratet, P. (1995). New Plant Promoter and Enhancer Testing Vectors. *Mol Breeding* 1, 419-423.
- Takahashi, F., Kuromori, T., Sato, H., and Shinozaki, K. (2018). Regulatory Gene Networks in Drought Stress Responses and Resistance in Plants. *Adv Exp Med Biol* 1081, 189-214.
- Thomas, M.R., Rose, R.J., and Nolan, K.E. (1992). Genetic transformation of *Medicago truncatula* using *Agrobacterium* with genetically modified Ri and disarmed Ti plasmids. *Plant Cell Rep* 11, 113-117.
- Tominaga, A., Nagata, M., Futsuki, K., Abe, H., Uchiumi, T., Abe, M., Kucho, K., Hashiguchi, M., Akashi, R., Hirsch, A., *et al.* (2010). Effect of abscisic acid on symbiotic nitrogen fixation activity in the root nodules of *Lotus japonicus*. *Plant Signal Behav* 5, 440-443.
- Topham, A.T., Taylor, R.E., Yan, D., Nambara, E., Johnston, I.G., and Bassel, G.W. (2017). Temperature variability is integrated by a spatially embedded decision-making center to break dormancy in *Arabidopsis* seeds. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114, 6629-6634.
- Umezawa, T., Nakashima, K., Miyakawa, T., Kuromori, T., Tanokura, M., Shinozaki, K., and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2010). Molecular Basis of the Core Regulatory Network in ABA Responses: Sensing, Signaling and Transport. *Plant and Cell Physiology* 51, 1821-1839.
- van den Brule, S., and Smart, C.C. (2002). The plant PDR family of ABC transporters. *Planta* 216, 95-106.

- Verrier, P.J., Bird, D., Burla, B., Dassa, E., Forestier, C., Geisler, M., Klein, M., Kolukisaoglu, U., Lee, Y., Martinoia, E., *et al.* (2008). Plant ABC proteins--a unified nomenclature and updated inventory. *Trends Plant Sci* *13*, 151-159.
- Vilches-Barro, A., and Maizel, A. (2015). Talking through walls: mechanisms of lateral root emergence in *Arabidopsis thaliana*. *Curr Opin Plant Biol* *23*, 31-38.
- Walker, J.E., Eberle, A., Gay, N.J., Runswick, M.J., and Saraste, M. (1982). Conservation of Structure in Proton-Translocating ATPases of *Escherichia-Coli* and Mitochondria. *Biochem Soc T* *10*, 203-206.
- Wang, J.H., Rose, R.J., and Donaldson, B.I. (1996). *Agrobacterium*-mediated transformation and expression of foreign genes in *Medicago truncatula*. *Aust J Plant Physiol* *23*, 265-270.
- Wani, S.H., Kumar, V., Shriram, V., and Sah, S.K. (2016). Phytohormones and their metabolic engineering for abiotic stress tolerance in crop plants. *Crop J* *4*, 162-176.
- Wilkinson, S., and Davies, W.J. (2002). ABA-based chemical signalling: the co-ordination of responses to stress in plants. *Plant Cell Environ* *25*, 195-210.
- Yao, L., Cheng, X., Gu, Z., Huang, W., Li, S., Wang, L., Wang, Y.F., Xu, P., Ma, H., and Ge, X. (2018). The AWPM-19 Family Protein OsPM1 Mediates Abscisic Acid Influx and Drought Response in Rice. *Plant Cell* *30*, 1258-1276.
- Yendrek, C.R., Lee, Y.C., Morris, V., Liang, Y., Pislariu, C.I., Burkart, G., Meckfessel, M.H., Salehin, M., Kessler, H., Wessler, H., *et al.* (2010). A putative transporter is essential for integrating nutrient and hormone signaling with lateral root growth and nodule development in *Medicago truncatula*. *Plant Journal* *62*, 100-112.
- Yoshida, T., Obata, T., Feil, R., Lunn, J.E., Fujita, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K., and Fernie, A.R. (2019). The Role of Abscisic Acid Signaling in Maintaining the Metabolic Balance Required for *Arabidopsis* Growth under Nonstress Conditions. *Plant Cell* *31*, 84-105.
- Young, N.D., Debelle, F., Oldroyd, G.E., Geurts, R., Cannon, S.B., Udvardi, M.K., Benedito, V.A., Mayer, K.F., Gouzy, J., Schoof, H., *et al.* (2011). The *Medicago* genome provides insight into the evolution of rhizobial symbioses. *Nature* *480*, 520-524.
- Zhang, C., Bousquet, A., and Harris, J.M. (2014a). Abscisic acid and lateral root organ defective/NUMEROUS INFECTIONS AND POLYPHENOLICS modulate root elongation via reactive oxygen species in *Medicago truncatula*. *Plant Physiol* *166*, 644-658.
- Zhang, H., Zhu, H., Pan, Y., Yu, Y., Luan, S., and Li, L. (2014b). A DTX/MATE-type transporter facilitates abscisic acid efflux and modulates ABA sensitivity and drought tolerance in *Arabidopsis*. *Mol Plant* *7*, 1522-1532.
- Zipfel, C., and Oldroyd, G.E. (2017). Plant signalling in symbiosis and immunity. *Nature* *543*, 328-336.

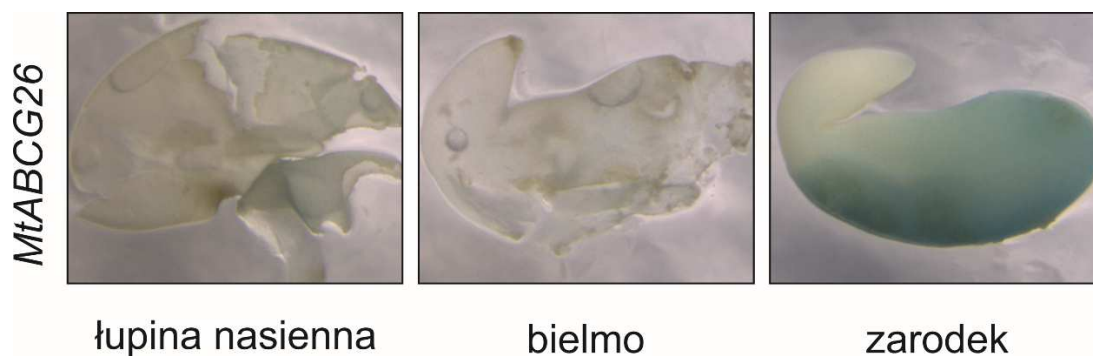
8. ZAŁĄCZNIKI

Załącznik nr 1. Kontrola negatywna do eksperymentu lokalizacji MtABCG20 w błonie komórkowej protoplastów *Arabidopsis thaliana*



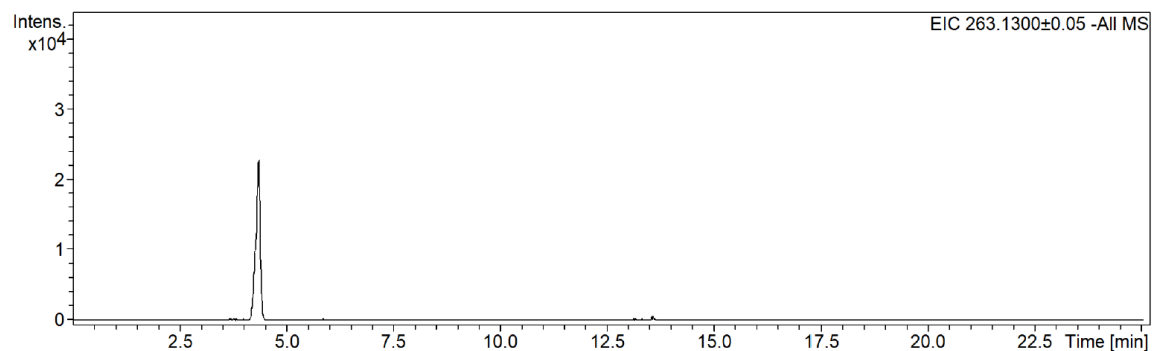
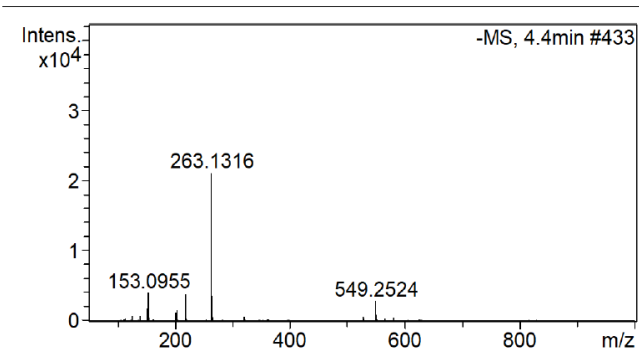
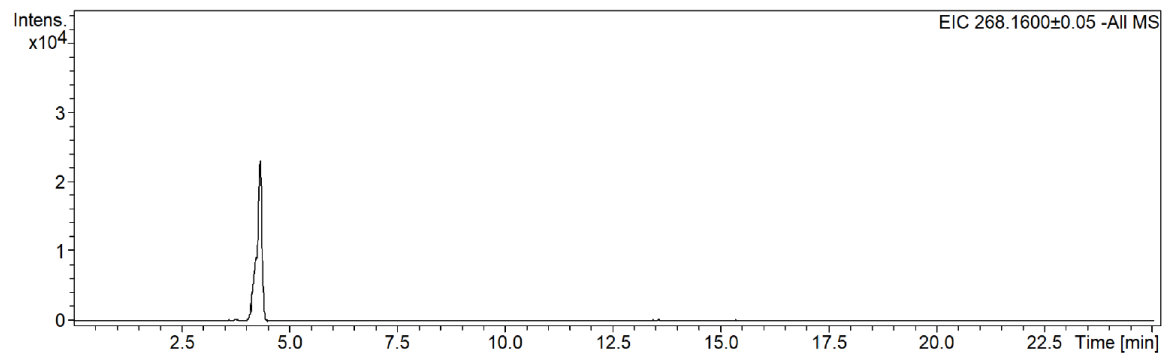
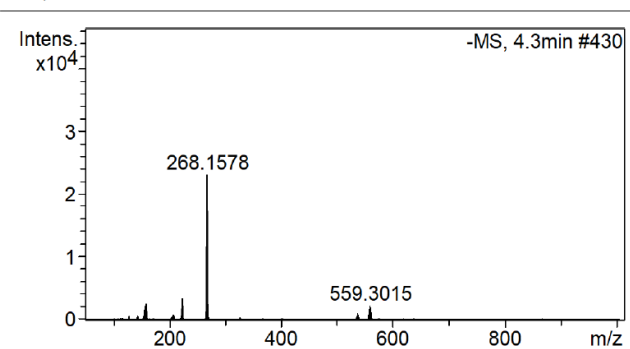
Ryc. Z1 Sygnał wolnego GFP w cytoplazmie chloroplastów *A. thaliana*, transformowanych wektorem pMDC43. Sygnał zielony – fluorescencja GFP, sygnał czerwony – autofluorescencja chlorofilu; skala=5µm.

Załącznik nr 2. Analiza aktywności promotora *MtABCG26* w nasionach *Medicago truncatula*

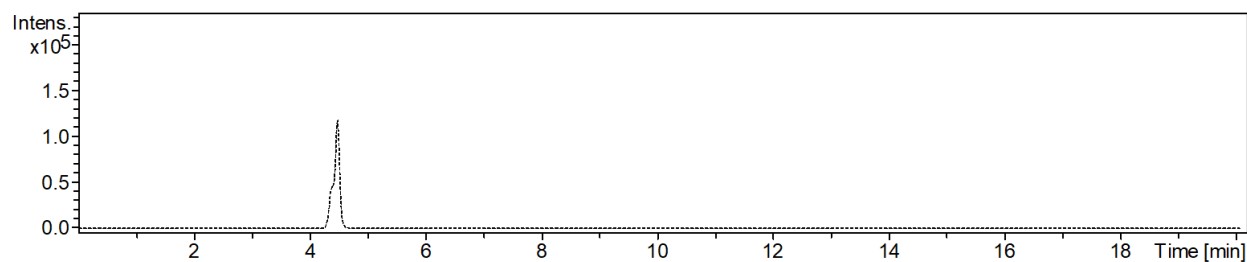
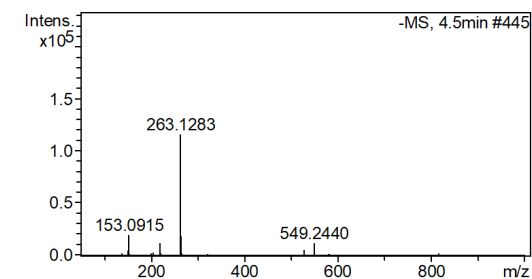
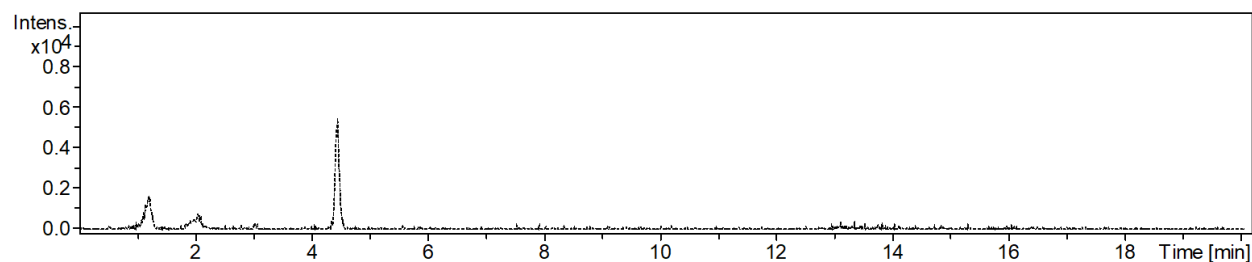
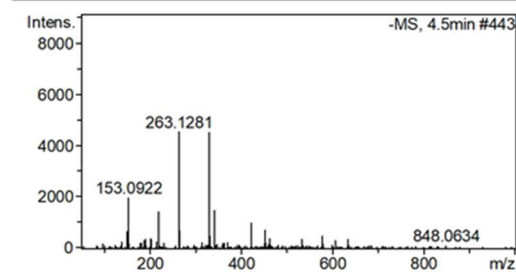
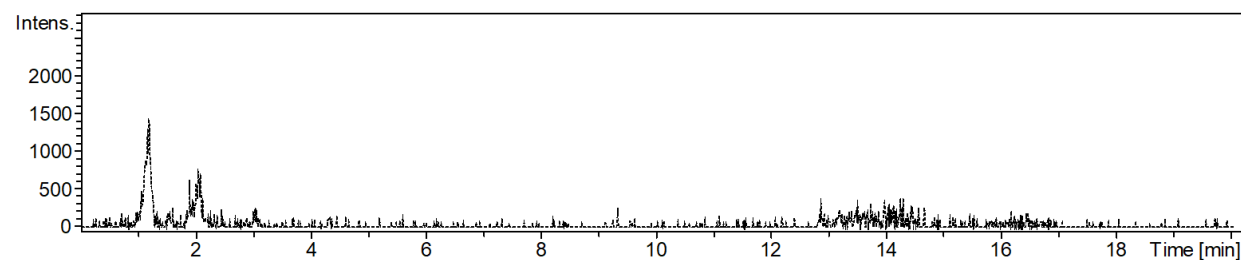
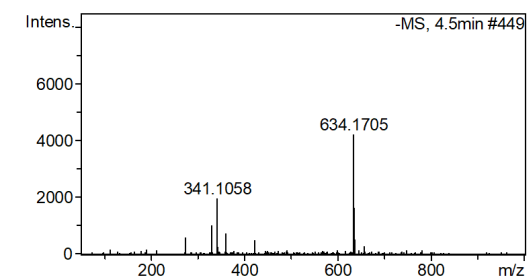


Ryc. Z2 Analiza histochemiczna przeprowadzona na nasionach *M. truncatula*, niosących konstrukcję fuzyjną *proMtABCG26::GUS*.

Załącznik nr 3. Przykładowe chromatogramy oraz widma MS

A**-MS, 4.4min #433****B****-MS, 4.3min #430**

Ryc. Z3 Chromatogramy pojedynczych jonów oraz widma MS zarejestrowane w trybie jonów ujemnych, dla standardu kwasu abscysynowego (A) oraz standardu wewnętrznego ²H-ABA (B).

A**-MS, 4.5min #445****B****-MS, 4.5min #443****C****-MS, 4.5min #449**

Ryc. Z4 Chromatogramy pojedynczych jonów oraz widma MS zarejestrowane w trybie jonów ujemnych, dla standardu kwasu abscysynowego (A) oraz przykładowego ekstraktu z hodowli komórek zawieszinowych BY2 z egzogennym dodatkiem ABA (B) lub bez (C). Poziom endogennego ABA w komórkach BY2 wykorzystywanych do eksperymentu transportu jest poniżej poziomu detekcji.

Załącznik nr 4. Publikacja: MtABCG20 is an ABA exporter influencing root morphology and seed germination of *Medicago truncatula*.

Pawela A, Banasiak J, Biała W, Martinoia E, Jasiński M. (2019) The Plant Journal, 98, 511-523 (doi: 10.1111/tpj.14234)

MtABCG20 is an ABA exporter influencing root morphology and seed germination of *Medicago truncatula*

Aleksandra Pawela^{1,†}, Joanna Banasiak^{1,†}, Wanda Biata¹, Enrico Martinoia² and Michał Jasiński^{1,3,*}

¹Department of Plant Molecular Physiology, Institute of Bioorganic Chemistry, Polish Academy of Sciences, Poznan, Poland,

²Department of Plant and Microbial Biology, University of Zurich, 8008 Zurich, Switzerland, and

³Department of Biochemistry and Biotechnology, Poznan University of Life Sciences, Poznan, Poland

Received 4 September 2018; revised 4 January 2019; accepted 8 January 2019; published online 20 January 2019.

*For correspondence (e-mail jasiński@ibch.poznan.pl).

This article is dedicated to the memory of Iwona Femiak.

[†]These authors contributed equally to this study.

SUMMARY

Abscisic acid (ABA) integrates internal and external signals to coordinate plant development, growth and architecture. It plays a central role in stomatal closure, and prevents germination of freshly produced seeds and germination of non-dormant seeds under unfavorable circumstances. Here, we describe a *Medicago truncatula* ATP-binding cassette (ABC) transporter, MtABCG20, as an ABA exporter present in roots and germinating seeds. In seeds, MtABCG20 was found in the hypocotyl–radicle transition zone of the embryonic axis. Seeds of *mtabcg20* plants were more sensitive to ABA upon germination, due to the fact that ABA translocation within *mtabcg20* embryos was impaired. Additionally, the *mtabcg20* produced fewer lateral roots and formed more nodules compared with wild-type plants in conditions mimicking drought stress. Heterologous expression in *Arabidopsis thaliana* provided evidence that MtABCG20 is a plasma membrane protein that is likely to form homodimers. Moreover, export of ABA from *Nicotiana tabacum* BY2 cells expressing MtABCG20 was faster than in the BY2 without MtABCG20. Our results have implications both in legume crop research and determination of the fundamental molecular processes involved in drought response and germination.

Keywords: ABC transporters, abscisic acid, legumes, germination, root organ formation.

INTRODUCTION

Plant hormones (phytohormones) form a chemical communication system that integrates internal and external signals to coordinate plant development, growth and architecture. Abscisic acid (ABA) regulates plant water status, and promotes seed maturation and dormancy. Under drought stress conditions, ABA *inter alia* triggers stomatal closure, thus minimizing the loss of water through transpiration (Merilo *et al.*, 2015), and changes hydraulic conductivity in a dose-dependent manner (Dodd, 2013; Olaetxea *et al.*, 2015) as well as modulates root system architecture to improve water uptake (Harris, 2015). ABA is also well-recognized as a repressor of seed germination. It prevents germination of freshly produced seeds, and allows avoidance of germination in non-dormant seeds under unfavorable circumstances (Chahtane *et al.*, 2017). Additionally, in legume plants that establish a symbiotic interaction with nitrogen-fixing bacteria, ABA controls, as a negative regulator, infection events in the epidermis and nodule primordium formation in the root cortex (Ding *et al.*, 2008; Ding and Oldroyd, 2009).

Biosynthesis of ABA occurs predominantly in vascular cells, both in roots and shoots (Endo *et al.*, 2008), as well as in the endosperm of seeds (Bethke *et al.*, 2007). Some cell types expressing ABA receptors and perceiving the ABA signal are able to produce this hormone. The ABA synthesized *in situ* in guard cells is sufficient to trigger rapid stomatal closure in response to reduced air humidity (Bauer *et al.*, 2013). However, the site of ABA biosynthesis is usually spatially separated from the site of action. Long-term water deficiency engages ABA translocation through the vasculature (via the xylem), which must be later delivered toward guard cells by active transporters (Hu *et al.*, 2016). Both the guard and vascular cells are functionally redundant in ABA production (Merilo *et al.*, 2018).

Translocation of ABA within a plant occurs by passive diffusion, but is also mediated via primary and secondary transporters to ensure adequate response to environmental changes (Boursiac *et al.*, 2013; Merilo *et al.*, 2015). The following proteins that translocate ABA have been

identified: (i) NRT1/PTR (NPF), originally recognized as nitrate or di/tri-peptide transporters (Kanno *et al.*, 2012); (ii) multidrug and toxic compound extrusion (MATE) proteins (Zhang *et al.*, 2014), AWP19 family protein member (Yao *et al.*, 2018); and (iii) ATP-binding cassette (ABC) transporters (Kuromori *et al.*, 2010; Kang *et al.*, 2015).

ABC transporters form one of the largest and most ancient protein superfamilies, with representatives in all extant phyla. They use ATP hydrolysis as a source of energy to transfer a wide variety of substrates through cellular membranes. In most cases, functional ABC transporters consist of two transmembrane domains (TMDs), which constitute the membrane-spanning pore, and two cytosolic domains, which are referred to as the nucleotide-binding domains (NBDs), as they contain the ATP-binding Walker A and B motifs (Kang *et al.*, 2011). Full-size members are organized in a modular fashion, consisting of two pore-forming TMDs alternating with two cytosolic NBDs. Half-size members, which contain one TMD and one NBD, form homo- or hetero-dimers that act as functional units. Based on structure and sequence homology, ABC proteins have been clustered into eight subfamilies (A–H; Verrier *et al.*, 2008; Kang *et al.*, 2011). Thus far, several members of the G subfamily, belonging to both the so-called half-size ABCG/WBC and full-size ABCG/PDR proteins, have been reported as free-ABA transporters (Borghi *et al.*, 2015). Coordinated ABA translocation mediated by these transporters modulates physiological processes that are important for agricultural traits such as stomatal closure and seed germination (Kang *et al.*, 2010, 2015; Kuromori *et al.*, 2010, 2014, 2016).

Analyses of Arabidopsis mutants that exhibit an altered response to exogenously applied ABA led to the identification of two ABCG transporters involved in the intercellular movement of ABA. It was proposed that half-size AtABCG25 (AtWBC26) acts as an exporter of ABA and releases this hormone from biosynthesizing cells (Kuromori *et al.*, 2010). AtABCG25 is co-expressed in phloem companion cells with genes implicated in ABA biosynthesis (Kuromori *et al.*, 2014). Transport experiments showed that AtABCG25 is a high-affinity ABA efflux transporter (Kuromori *et al.*, 2010). Finally, its overexpression in Arabidopsis resulted in reduced transpiration rates and consequently enhanced drought avoidance (Kuromori *et al.*, 2016). Another research group discovered that full-size AtABCG40 (AtPDR12) mediates specific ABA uptake into guard cells, where AtABCG40 is strongly expressed and where intracellular ABA perception occurs. Phenotypic analyses dedicated to stomatal regulation revealed that *atabcg40* mutant lines exhibited higher transpiration rates and were more sensitive to desiccation. Moreover, tobacco and yeast cells overexpressing AtABCG40 accumulated far more radiolabel-ABA than control cells, whereas ABA influx into the *atabcg40* mutant protoplast was significantly reduced (Kang *et al.*, 2010).

In addition to control of stomatal movement, it was reported that directional ABA transport mediated by ABCG transporters arrests germination. It was shown that four ABCG transporters localized in different seed tissues cooperate to repress seed germination by translocating ABA from the endosperm towards the target embryo. Half-size AtABCG25 and full-size AtABCG31 are involved in ABA efflux from the endosperm, where ABA is produced. ABA influx into embryo tissue is conducted by two importers, namely AtABCG30 and AtABCG40. A lack of these transporters resulted in disturbance of ABA distribution within seeds and shortened germination time in the case of knockout mutants, compared with the corresponding wild-type (WT; Kang *et al.*, 2015). Despite the described cooperative role of several ABCG transporters in ABA export from endosperm and import into the embryo, other transporters are likely to contribute to embryo fate. Recently, a spatially distributed signal and response system to ABA in dormant Arabidopsis seeds has been postulated to contribute to sensing and responding to external stimuli. It was proposed that increasing hormone transport rates within the embryo can further sensitize the system to change embryo fate in response to fluctuating external conditions (Topham *et al.*, 2017). However, no such transporters have been identified, and the specific roles are yet to be established.

In contrast to Arabidopsis, the knowledge about ABA transporters in legumes is limited, although legumes are one of the main types of crops worldwide with important impact on farming, and also on animal and human nutrition. Moreover, numerous studies suggest a relevant role for this phytohormone and its distribution in legumes, for unique processes like nodulation (Suzuki *et al.*, 2004; Ding *et al.*, 2008; Tominaga *et al.*, 2010). Here we present data demonstrating that MtABCG20 is an ABA transporter important for agricultural traits in legume crops.

RESULTS

Gene expression pattern of *MtABCG20* in *Medicago* roots

Among 36 half-size ABCG transporters identified in *Medicago truncatula* (Table S1), the mRNA of *MtABCG20* strongly accumulated 6 and 24 h after treatment of *Medicago* seedling roots with 15% polyethylene glycol (PEG; fold change > 2.5; Figure 1a) and 10 μ M ABA (fold change > 6; Figure 1b), both mimicking drought stress conditions. To further investigate the *MtABCG20* expression profile, we generated *M. truncatula* composite plants expressing the β -glucuronidase (GUS) reporter gene under the control of the native *MtABCG20* promoter (*ProMtABCG20:GUS*). Our analyses revealed a basal expression of *MtABCG20* along vascular bundles and at the sites of lateral root (LR) primordium formation (Figure 1c). The latter finding was additionally confirmed using *ProMtABCG20* fused with green fluorescent protein (GFP) containing a nuclear localization

signal (NLS; Figure 1d; De Rybel *et al.*, 2011). When *ProMtABCG20:GUS* transgenic *Medicago* hairy roots were challenged with 10 μM ABA, the expression pattern did not change in response to ABA, but an increased GUS signal intensity was observed (Figure S1). An expression pattern in the root vasculature similar to that of *MtABCG20* has been reported for genes encoding ABA biosynthesis enzymes (Koiwai *et al.*, 2004; Endo *et al.*, 2008), as well as for *AtABCG25* (Kuromori *et al.*, 2010). *AtABCG25* was previously described as a high-affinity ABA exporter, and exhibits 47% identity at the protein level with *MtABCG20*. Interestingly, *MtABCG20* is also expressed in nodules (Figure S2).

Root phenotype of the *MtABCG20* loss-of-function lines

Two tobacco retrotransposon (Tnt1) insertion lines have been identified for *MtABCG20*. One insertion is located in the second exon (NF10694, *mtabcg20-1*) and another in the fifth exon (NF6539, *mtabcg20-2*; Figure 2a). There was no detectable full-length mRNA for *MtABCG20* in these two homozygous mutant lines, suggesting that *mtabcg20-1* and *mtabcg20-2* are null alleles (Figure 2b). Due to the fact that

drought and ABA promotes LR formation (Gonzalez *et al.*, 2015) and inhibits nodulation in *Medicago* (Ding *et al.*, 2008), we sought to determine whether mutations in *MtABCG20* could affect root architecture in response to drought stress. To stimulate endogenous ABA production, 3-day-old WT and *mtabcg20* seedlings were transferred to medium containing 5% PEG. After incubation for 4 weeks, the number of LRs was counted, and statistically significant reduction in LR formation in *mtabcg20* was observed. The difference in LRs number between analyzed lines (NF10694 and NF6539) may result from distinct genetic backgrounds of them (Figure 2c). Moreover, the *mtabcg20* mutant produced approximately 18% more nodules than the WT during the drought stress mimicking (ABA pre-treatment) condition (Figure 2d). The *mtabcg20* mutant and WT grown without PEG or ABA had no statistically significant differences in LR or nodule numbers, respectively (Figure S3).

Subsequently, we examined whether the disturbance in LR and nodules formation could be related to ABA arrest in biosynthesizing cells. For this reason, expression of *MtNCED* (9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase) in WT and

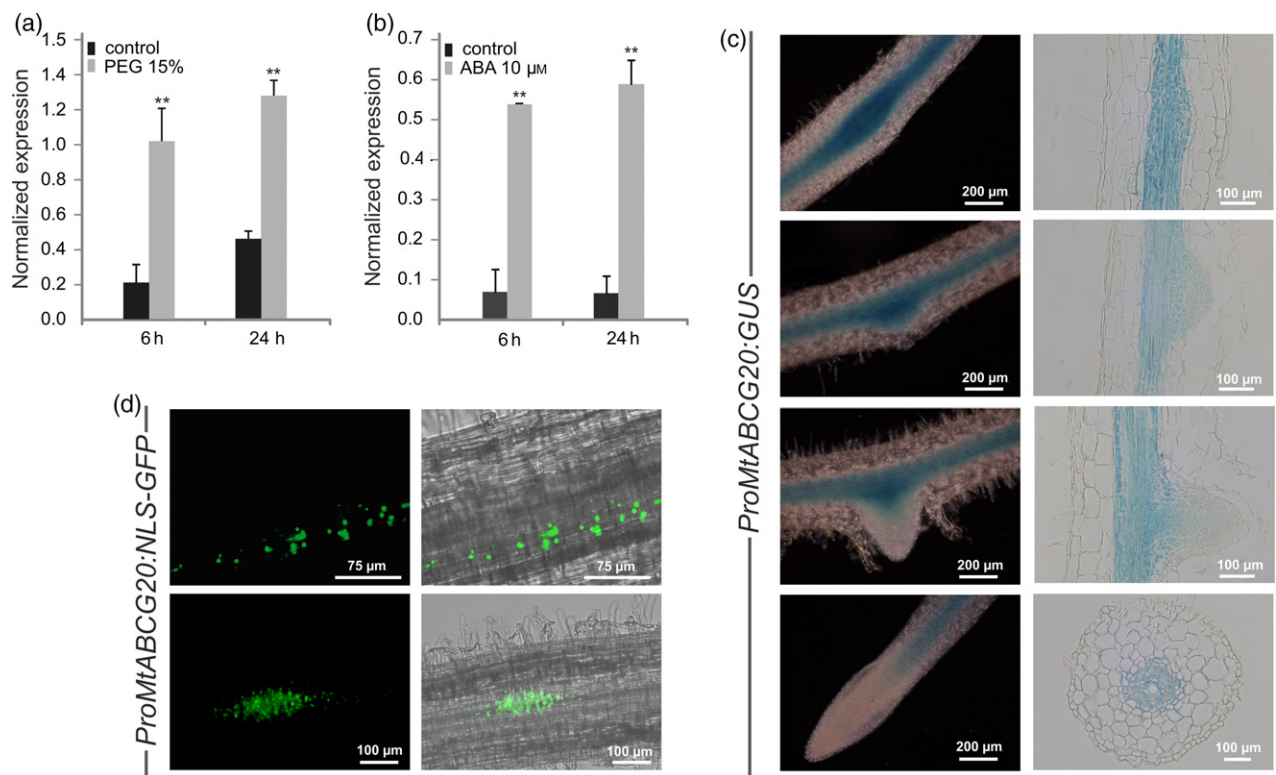


Figure 1. Expression analyses of *MtABCG20* in *Medicago truncatula* roots. Quantitative polymerase chain reaction (qPCR) time-course expression analysis was performed for *MtABCG20* in roots treated with (a) 15% polyethylene glycol [PEG; real-time (RT)-PCR] or (b) 10 μM abscisic acid (ABA; Droplet Digital PCR). The transcript levels were normalized to the *Actin* gene. The data represent the mean \pm SD of two independent biological experiments and three technical repeats. Significant differences from the control plants determined by Student's *t*-test are indicated: ***P* < 0.01. (c) Promoter activity analyses of *MtABCG20* in transgenic *M. truncatula* roots. Expression of *ProMtABCG20:GUS* in the root (left panel) and root cross-section (right panel). (d) Expression of *ProMtABCG20:NLS-GFP*. Fluorescence images (left panel) and the merging of fluorescence and brightfield images (right panel).

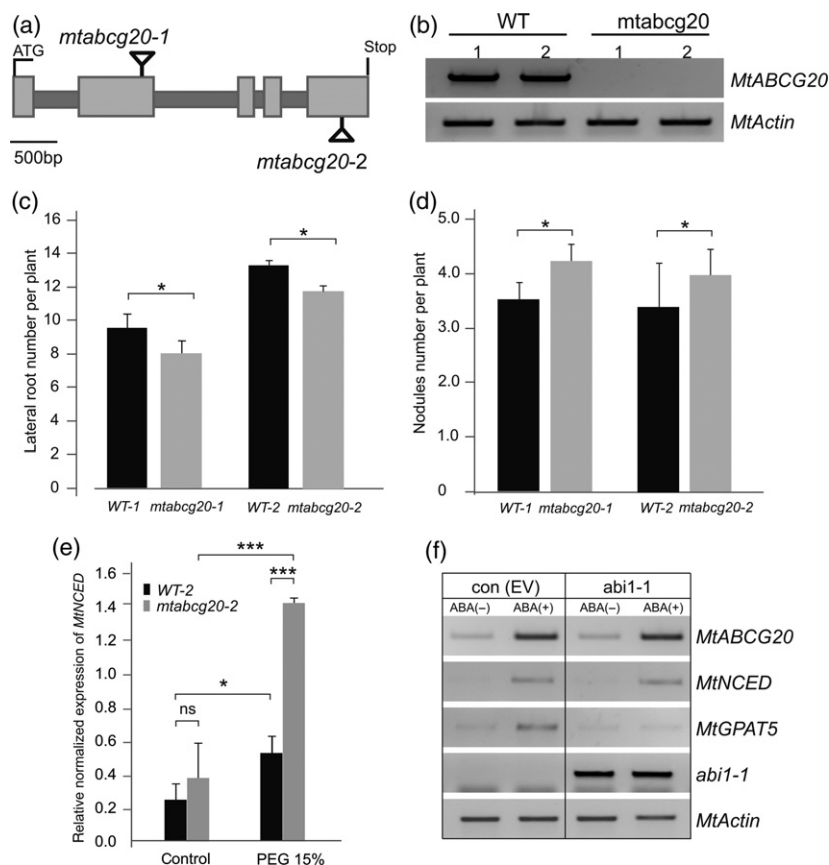


Figure 2. Phenotypic characterization of *mtabcg20* mutants.

(a) Schematic diagram indicating Tnt1 insertions in two *mtabcg20* mutants, *mtabcg20-1* (NF10694) and *mtabcg20-2* (NF6539). Light gray and dark gray boxes indicate exons and introns of *MtABC20*, respectively.

(b) Full-length *MtABC20* mRNA in mutant lines analyzed by reverse transcription (RT)-polymerase chain reaction (PCR). *Actin* used as an internal control.

(c) Average lateral root (LR) number per plant in wild-type (WT) and *mtabcg20* plants. All plants were grown for 4 weeks on ½ Murashige and Skoog (MS) medium containing 5% polyethylene glycol (PEG). Data represent the mean ± SD of three independent biological experiments on 30 plants (Student's *t*-test **P* < 0.05).

(d) Average nodule number per plant in WT and *mtabcg20* plants. Three-day-old seedlings, pre-treated with 10 μM abscisic acid (ABA), were inoculated with *Sinorhizobium meliloti* and grown on modified Fahraeus (-N) medium. At 21 days post-inoculation (dpi), nodule numbers were counted. The data represent the mean ± SD of two independent biological experiments with five technical repeats (eight plants each), per line (Student's *t*-test **P* < 0.05).

(e) Real-time PCR expression analyses of *MtNCED* in roots derived from WT-2 and *mtabcg20-2*, untreated or treated with 15% PEG. Transcript levels were normalized to the *Actin* gene. The data represent the mean ± SD of two independent biological experiments and three technical repeats. Significant differences between the groups were determined by Bonferroni *post hoc* tests following two-way ANOVA with the factors of genotype and condition: **P* < 0.05, ****P* < 0.001.

(f) Semi-quantitative PCR analyses of ABA-dependent induction of *MtABC20*, *MtNCED* and *MtGPAT5* in *M. truncatula* hairy-root cultures transformed with empty vector (EV) or overexpressing *abi1-1*, 24 h after 10 μM ABA treatment. *Abi1-1* primers were used to confirm *abi1-1* allele expression in *M. truncatula* transgenic roots. The *Actin* transcript was used as an internal control.

mtabcg20 roots was compared. *MtNCED* is a key enzyme within the ABA biosynthetic pathway that is positively regulated by ABA at the transcript level (Sussmilch and McAdam, 2017). The quantitative polymerase chain reaction (qPCR) analyses showed that 24 h after PEG application the mRNA accumulation of *MtNCED* was in *mtabcg20* more than twice as high as in WT (Figure 2e). Additionally, the ABA-dependent induction of *MtNCED* as well as *MtABC20* was not affected in the Medicago lines overexpressing the Arabidopsis dominant-negative allele of *abi1-1*. The *abi1-1* allele suppresses the ABA core signaling pathway in the effector cells where this phytohormone triggers responses to stresses (Wu *et al.*, 2003). An example of

such a response in roots is *inter alia* suberin production. In contrast to *MtNCED* and *MtABC20*, the ABA-dependent induction of *MtGPAT5*, encoding an acyltransferase engaged in suberin monomer biosynthesis (Beisson *et al.*, 2007), was abolished in Medicago roots overexpressing *abi1-1* (Figure 2f). The expression analyses that were performed indicate that lack of the *MtABC20* can possibly affect efflux of ABA from the biosynthesis place resulting in the observed *mtabcg20* root phenotypes.

Subcellular localization of *MtABC20*

The subcellular localization of *MtABC20* was investigated *in planta* by transient expression of *MtABC20* fused

N-terminally to GFP under the control of the 35S Cauliflower Mosaic Virus (CaMV) promoter. Subcellular localization of the fusion protein was visualized by confocal microscopy imaging. The GFP signal was present around the cell and co-localized with a plasma membrane marker, aquaporin AtPIP2A fused with mCherry (PM-rK; Nelson *et al.*, 2007; Figure 3a). As MtABCG20 is a half-size ABCG protein, and it is known that half-size ABCGs form dimers that act as functional transporters, we used the multicolor bimolecular fluorescent complementation (mcBiFC) assay to determine whether it dimerizes *in vivo*. Based on the modified pSAT series of vectors, two constructs were prepared: MtABCG20 with the C-terminal portion of cyan fluorescent protein (cCFP); and MtABCG20 with the N-terminal portion of Venus (nVenus). Arabidopsis leaf mesophyll protoplasts co-transformed with cCFP-MtABCG20, and nVenus-MtABCG20 exhibited green fluorescence in the plasma membrane, indicating that MtABCG20 can form a homodimer (Figure 3b).

MtABCG20 is an abscisic acid exporter

To examine whether MtABCG20 can transport ABA through the plasma membrane, the *Pro35S:GFP-MtABCG20* construct was heterologously expressed in *Nicotiana tabacum* BY2 cells. The presence of the protein of interest was confirmed by Western blotting using anti-GFP antibodies (Figure S4), and its plasma membrane localization was determined by confocal microscopy (Figure S5). After preloading MtABCG20-expressing or control cells (transformed with empty vector) with ABA, efflux of this phytohormone from BY2 cells was monitored using HPLC/MS. Deuterated ABA was used as an internal standard for HPLC/MS. ABA efflux from BY2 cells was significantly faster in cells transformed with MtABCG20 compared with those transformed with the

empty vector (Figures 4a and S6). The ABA transport is ATP-dependent, as revealed by the assays conducted with radiolabeled ³H-ABA and inside-out membrane vesicles isolated from BY2 cells overexpressing MtABCG20 (Figure 4b).

Expression pattern of MtABCG20 in the seeds

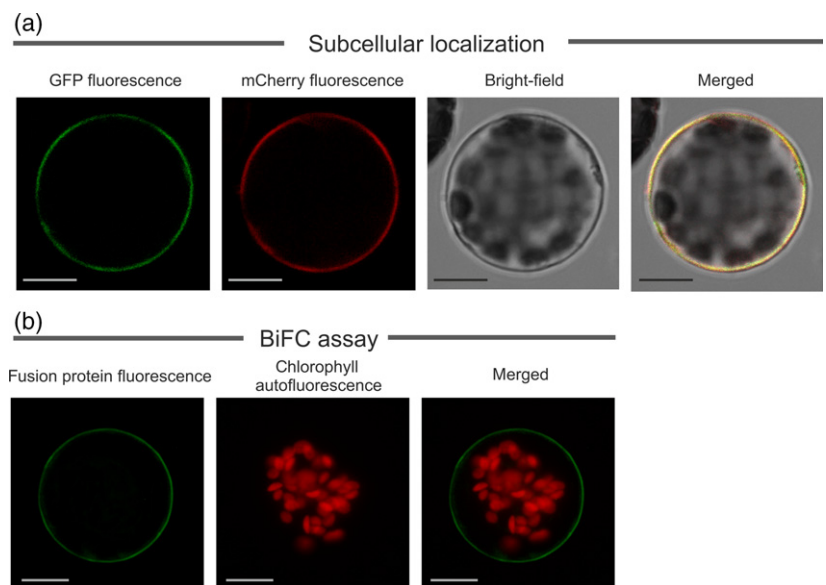
Abscisic acid participates not only in transmitting environmental stress signals such as drought but also in seed germination. It was recently shown that ABA transporters belonging to the ABCG subfamily influence seed germination in Arabidopsis (Kang *et al.*, 2015). To explore whether MtABCG20 plays a role in seed biology, we analyzed the expression of the corresponding gene during seed germination. Scarified mature WT seeds were collected at various time points during germination progress. Quantitative real-time (qRT)-PCR analyses revealed that MtABCG20 mRNA accumulated strongly after imbibitions, and remained relatively constant in seeds incubated at 4°C for the next 1, 2 and 3 days. After stratification, we observed a gradual decline of MtABCG20 transcripts with the initiation of radicle emergence and germination completion (Figure 5a). To define the location of MtABCG20 expression within the seed, we examined its promoter activity using the GUS reporter system, and observed that MtABCG20 is expressed in the hypocotyl–radicle transition zone of the embryonic axis. MtABCG20 promoter activity was detected neither in the endosperm layer nor testa (Figure 5b).

MtABCG20 plays a role in germination and mediates the export of abscisic acid from the hypocotyl–radicle zone

The germination assays using *mtabcg20* and WT seeds, which were stored for 1 month at room temperature and

Figure 3. MtABCG20 plasma membrane localization and homodimer formation.

(a) Co-localization of fused green fluorescent protein (GFP)-MtABCG20 and mCherry-labeled plasma membrane marker AtPIP2A in Arabidopsis mesophyll protoplast. (b) Bimolecular fluorescent complementation (BiFC) assay demonstrating interaction of two MtABCG20 half-size transporters. The fusion proteins Venus-MtABCG20 and MtABCG20-CFP were transiently expressed in Arabidopsis mesophyll protoplasts. Scale bar: 10 μm.



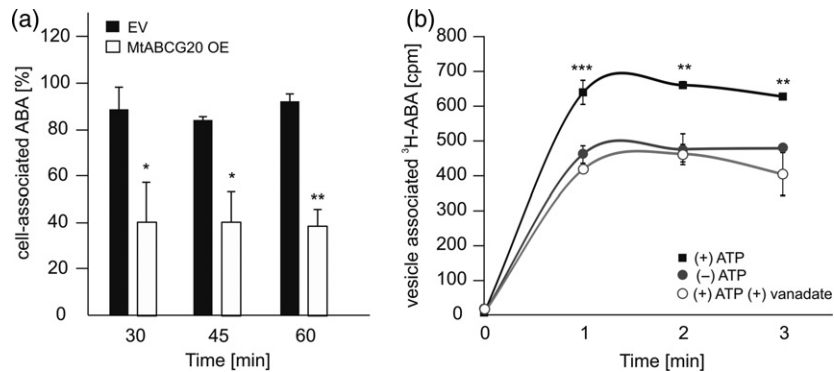


Figure 4. Abscisic acid (ABA) transport assays in BY2 cells and cell-derived vesicles.

(a) ABA efflux from BY2 control (EV) and *MtABCG20*-overexpressing cell lines, conducted at 22°C and monitored by HPLC/MS. The 100% represents a quantity of cell-associated ABA, defined as the ratio of the single-ion chromatogram peak area to the internal standard, at time 0 (T0). Values represent the mean of three independent experiments \pm SD. Significant differences between control and overexpressing lines determined by Student's *t*-test are indicated: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. (b) Transport of ³H-ABA into membrane vesicles derived from BY2 cells overexpressing *MtABCG20* in the absence of ATP as well as in the presence of ATP with or without orthovanadate. Values represent the mean of three independent experiments \pm SD. Significant differences between ³H-ABA uptake in the presence of ATP in comparison to other conditions were determined by an ANOVA test and Tukey's multiple comparison test, and are as follows: ** $P < 0.01$, *** $P < 0.005$.

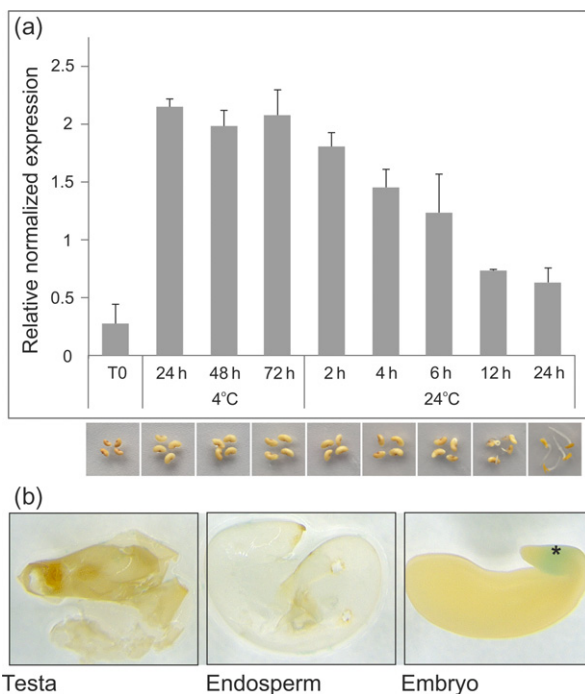


Figure 5. Expression analyses of *MtABCG20* in *Medicago truncatula* seeds. (a) Quantitative polymerase chain reaction (qPCR) time-course expression analysis of *MtABCG20* during seed germination. Data represent the mean \pm SD of two independent biological experiments and three technical repeats. Transcript levels were normalized to the *Actin* gene. Images below the graph show the *Medicago* seeds at different time points during germination. (b) *MtABCG20* promoter activity analyses in *M. truncatula* seeds using the β -glucuronidase (GUS) reporter system. Seeds were stained for GUS activity and, consequently, particular seed parts (testa, endosperm, end embryo) were separated and visualized by light microscopy. *hypocotyl–radicle transition zone of embryo.

imbibed in the presence of different concentrations of ABA, revealed that *mtabcg20* seeds exhibit an enhanced sensitivity to ABA compared with the WT (Figure 6a).

Because cell wall loosening and cell expansion occur in the hypocotyl–radicle junction, leading to radicle emergence (Sliwinska *et al.*, 2009), we hypothesized that *MtABCG20* facilitates germination by extrusion of ABA from the hypocotyl–radicle transition zone. To verify our assumption, we monitored changes in the expression level of ABA-responsive genes, which indirectly reflect ABA concentrations, in WT and *mtabcg20* mutant embryo axes (hypocotyl and radicle) and in cotyledons after application of ABA (Experimental scheme, Figure S7). For this purpose, embryos were isolated from scarified and stratified imbibed seeds. Consequently, the embryos were transferred onto microscope slides covered by solid medium supplied with 10 μ M ABA, in such a way that only the embryo axes were in contact with the medium. Control embryos were placed similarly, but on medium without ABA. Next, embryo axes and cotyledons were collected 3, 9 and 12 h after ABA treatment, and used for RNA isolation. qRT-PCR has been performed for the gene-encoding components of the ABA signaling pathway (*HAI2*, highly ABA-induced PP2C gene 2) and cell expansion during germination completion (*EXP1*, expansin A1-like gene; Gimeno-Gilles *et al.*, 2009; Hyung *et al.*, 2014; Maia *et al.*, 2014). The analyses revealed that expression of *HAI2* was induced after ABA application in the embryo axes. Interestingly, in *mtabcg20*, the *HAI2* expression was higher in embryo axes compared with WT. In contrast, the expression of *EXP1* was downregulated by ABA, and its mRNA accumulation in the embryo axes was lower in *mtabcg20* than in WT (Figures 6b and S8). Concomitantly, in the cotyledons, the expression of *HAI2* was reduced in *mtabcg20* compared with WT (Figure S9). *EXP1* is not expressed in cotyledons in WT or *mtabcg20*. This result supports our assumption about the contribution of *MtABCG20* to ABA extrusion from the embryonic axis to neighbor tissues. To further illustrate that ABA

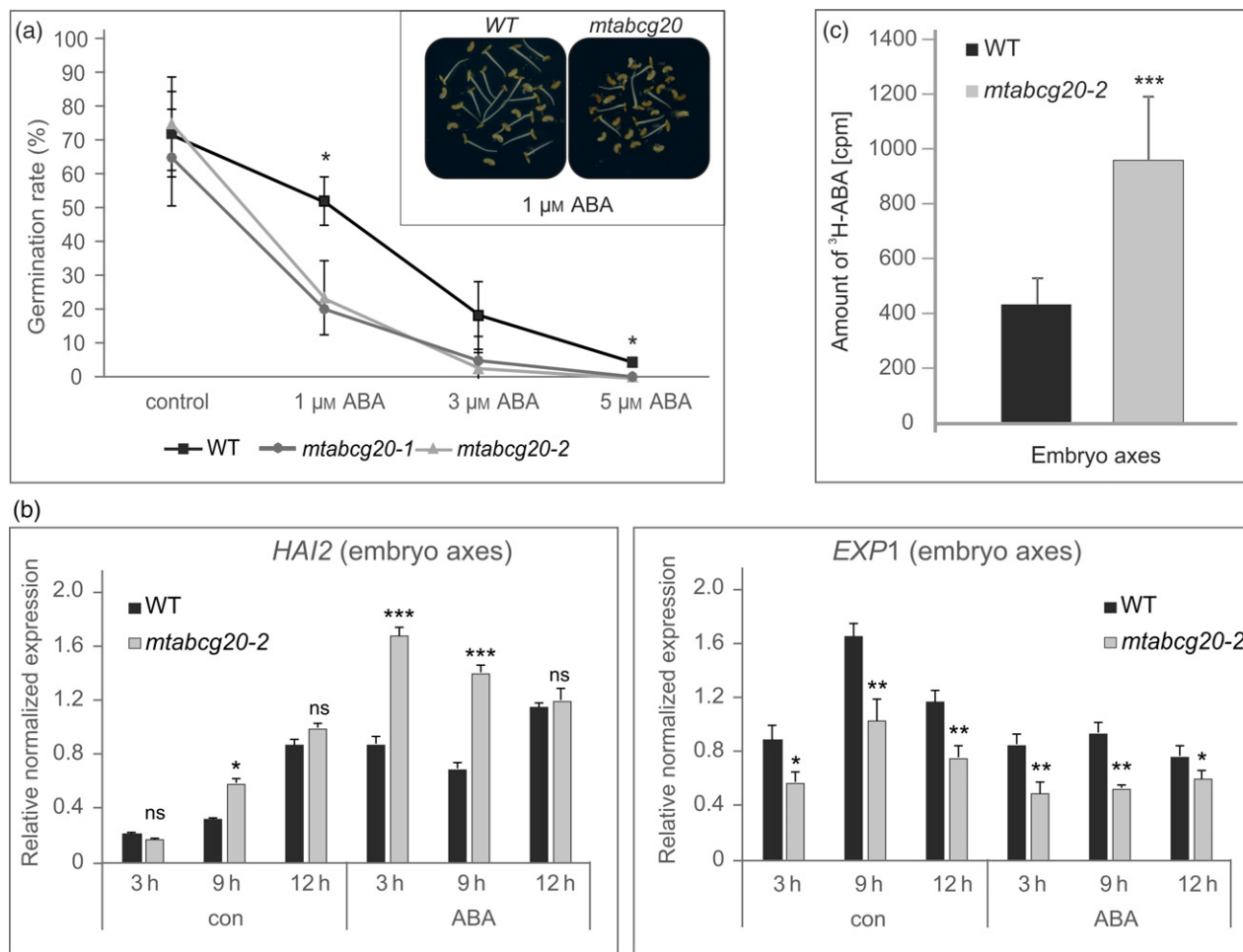


Figure 6. Seed germination phenotype of the *mtabcg20* mutant.

(a) Germination assay of wild-type (WT) and *mtabcg20* seeds. Stratified seeds were imbibed in the presence of different concentrations of abscisic acid (ABA) for 3 days at 4°C in the dark, and then moved to 23°C and scored 24 h after stratification. Each value represents the average percentage of germination of 30 seeds \pm the SD of three replicates. Asterisks indicate significant differences of each *mtabcg20* line compared with WT based on Student's *t*-test (* P < 0.05).

(b) Real-time polymerase chain reaction (PCR) expression analyses of *MtHAI2* and *MtEXP1* in embryo axes derived from WT and *mtabcg20* dissected embryos, untreated or treated with ABA applied onto the hypocotyl–radicle region. Transcript levels were normalized to the *Actin* gene. Results are presented as mean \pm SD of three technical replicates of one representative biological repeat. Significant differences from the WT plants determined by Student's *t*-test are indicated: * P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001.

(c) Accumulation of $^3\text{H-ABA}$ in the embryo axis of WT and *mtabcg20* dissected embryos over 2 h; 1 μ l of $^3\text{H-ABA}$ (0.15 mCi mmol $^{-1}$) was applied to the embryo axis. Data are means \pm SD of n = 30. Significant differences from the control (WT) determined by Student's *t*-test are indicated: *** P < 0.001.

translocation from the hypocotyl–radicle transition zone takes place and is dependent on MtABCG20, we performed experiments with radiolabeled ABA. $^3\text{H-ABA}$ was applied to the embryonic axis of WT and *mtabcg20* dissected embryos, and its accumulation solely in the embryonic axis was monitored by scintillation counting (Figure S7). In the mutant line, we observed a higher level of radioactivity compared with the WT, suggesting that MtABCG20 dysfunction results in a disturbance of ABA removal from this region (Figure 6c).

DISCUSSION

Abscisic acid is a ubiquitous plant hormone, controlling plant growth and development as well as triggering

responses to environmental stresses. Translocation of ABA within a plant is mediated by primary and secondary active transport systems that engage members from diverse protein families (Kang *et al.*, 2010; Kuromori *et al.*, 2010; Pellizaro *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2014). In this study, we characterized MtABCG20, an ABA transporter from *M. truncatula*. MtABCG20 is localized in the plasma membrane and is likely to form a functional homodimer, revealing ABA-exporting activity. Expression of the corresponding gene has been detected in vascular parenchyma cells, where ABA biosynthesis mainly takes place. Its mRNA accumulates in roots after external addition of PEG and ABA.

There is a growing awareness of the role of ABA in the signaling of environmentally influenced plant

developmental processes, *inter alia* in the modulation of the root architecture when a plant experiences abiotic stress (Harris, 2015). The role of ABA signaling in LR development is intricately connected to environmental responses and has different effects in different plant species. This is exemplified for instance by LR development in Arabidopsis and *M. truncatula*. While ABA signaling largely inhibits LR development in Arabidopsis (1 μM ABA is sufficient to block the development of visible LRs), ABA primarily plays a positive role in *M. truncatula* LR development, stimulating initiation, primordium formation, emergence and meristem activation at concentrations ranging from 0.1 to 10 μM (Gonzalez *et al.*, 2015). It has been postulated that this altered ABA response has been acquired at the base of the legume lineage, coincident with the acquisition of a predisposition for nodulation (Liang and Harris, 2005). Notably, ABA transport likely functions in the regulation of LR meristem activation/formation, as the loss of the ABA importer in Arabidopsis, namely AtABCG40, results in a significant increase in LR formation in the presence of ABA (Kang *et al.*, 2010). The role of ATP-driven transporters in ABA signaling and root architecture is further strengthened by our observation that in Medicago, the ABA exporter MtABCG20 maintains LR number following osmotic stress. Considering the expression pattern of *MtABCG20* along the vascular bundles and at the LR primordium, it is likely that this transporter contributes to local changes in ABA concentration and, as a consequence, to LR formation. MtABCG20, similar to its homolog from Arabidopsis, ABCG25/WBC26, can be defined as a transporter responsible for the removal of ABA from its site of biosynthesis to the apoplast, enabling delivery of ABA to the place where ABA-dependent responses occur (Figure 7a). This is supported by the observation that upon drought stress expression of *MtNCED*, positively regulated by ABA, in *mtabcg20* roots is stronger than in the WT. This might suggest that ABA is accumulated at its place of biosynthesis as a consequence of impaired export. The rather slight difference in LR number observed between WT and *mtabcg20* upon PEG treatment can be explained by ABA passive-diffusion and/or the redundancy and functional compensation that often occurs among large protein families. Indeed, it was observed that mutants defective in ABA transport, belonging to ABCG subfamily (*atabcg25*, *atabcg40*), exhibit relatively mild phenotypes compared with typical ABA-deficient mutants (Bhattacharjee *et al.*, 2013; Danisman *et al.*, 2013; Kuromori *et al.*, 2018), and that several ABA transporters are involved in the import and export of ABA both in stomata and seeds (Kang *et al.*, 2010, 2015; Kuromori *et al.*, 2010, 2014).

In Medicago apart from *MtABCG20*, expression of another half-size ABCG is upregulated in roots after ABA treatment, namely *MtABCG26* (Figure S10). The *MtABCG26* is a homolog of AtABCG25, an ABA exporter from

Arabidopsis (Figure S11). Further investigation is needed to demonstrate that *MtABCG26* is an ABA transporter; however, the functional redundancy is possible. In legumes, LR formation and nodulation are adjusted by environmental inputs, hormone signaling, and signals exchanged between the root and rhizobia. ABA acts as a negative regulator for infection events in the epidermis and nodule primordium formation in the root cortex tissue (Ding *et al.*, 2008; Ding and Oldroyd, 2009). The nodulation tests have shown that lack of *MtABCG20* results in increased nodule number compared with WT. Increased nodule number can be also observed in Medicago after heterologous expression of the dominant-negative allele of *abi1-1* affecting the ABA core signaling pathway in the effector cells (Ding *et al.*, 2008). However, such genetic inhibition of ABA signaling does not affect expression of neither *MtABCG20* nor *MtNCED*, suggesting that the nodule increase in *mtabcg20* is likely due to reduced export of ABA from its site of biosynthesis (Figure 7a). The significant, but rather small, effect may again be explained with redundancy of ABA transporters involved in this process.

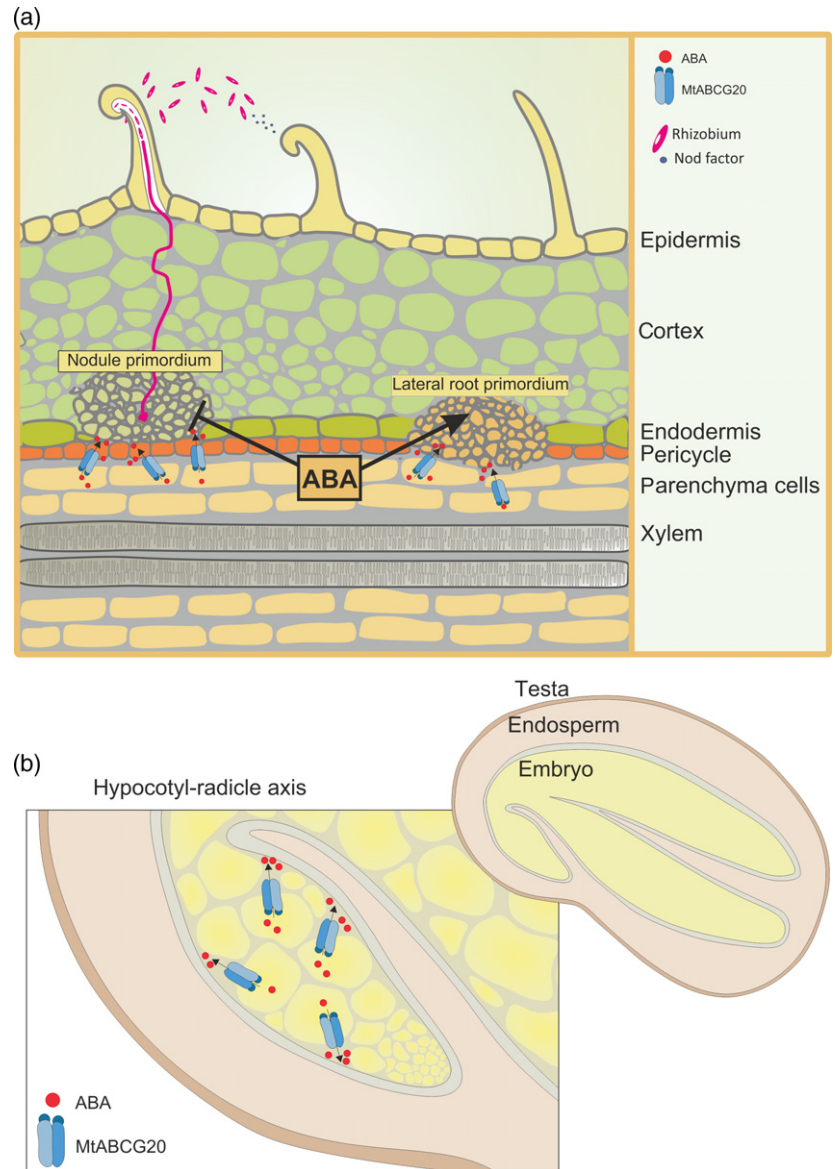
Notably, in Medicago, other ABA transporters can also influence symbiotic nitrogen fixation. For instance, LATD/NIP, whose expression is regulated by ABA, is required for the establishment and maintenance of three root meristems, that of the primary root, LRs and symbiotic root nodules (Yendrek *et al.*, 2010). Moreover, MtNPF6.8, a NRT1 (PTR) family member shown to act as an ABA transporter, is involved in nitrate-mediated inhibition of primary root growth that depends on ABA signaling (Pellizzaro *et al.*, 2014). The effect of ABA is not limited to the early stages of nodule formation. It has been observed that the level of leghemoglobin that buffers free oxygen inside nodules largely declines after external addition of ABA (Gonzalez *et al.*, 2001). The *Lotus japonicus* mutant known as enhanced nitrogen fixation 1 (*enf1*) accumulates lower amounts of endogenous ABA and exhibits higher activity of nitrogenase compared with the WT (Tominaga *et al.*, 2010). *MtABCG20* is also expressed in the interior of the nodule and in vascular bundles developed at the nodule periphery. However, whether *MtABCG20* only has an impact on determining nodule number or is also involved in the metabolic processes for nitrogen fixation must be further investigated.

It has been established that ABA plays a crucial role in embryo development, seed maturation, dormancy and germination. The latter starts with imbibition and completes with radicle emergence. The seed-to-seedlings transition represents a complex and critical developmental switch in the life-cycle of higher plants, and its correct timing can determine seedling survival and subsequent reproduction (Shu *et al.*, 2016). In Arabidopsis, four ABCG transporters can control seed germination through translocation of ABA from the endosperm into the embryo. Their coordinated

Figure 7. A proposed role of the MtABCG20 in *Medicago* roots and seeds.

(a) MtABCG20 is an abscisic acid (ABA) exporter from biosynthesizing cells in roots (vascular parenchyma cells) enabling delivery of this hormone to the place where ABA-dependent responses occur. In this way, MtABCG20 could positively affect lateral root (LR) primordium formation and exert a negative effect on the development of nodule primordia in *Medicago*.

(b) In seeds MtABCG20 is responsible for extrusion of ABA from the hypocotyl–radicle transition zone, thereby facilitating germination.



action participates in embryo growth arrest and germination inhibition. Among them, AtABCG25 and AtABCG31 are localized in the endosperm and act as ABA exporters, while AtABCG30 and AtABCG40 are responsible for ABA uptake into the embryonic tissue (Kang *et al.*, 2015). *MtABCG20* is also expressed in seeds, but its localization in the hypocotyl–radicle region of the embryonic axis attributes a new role to *MtABCG20* (Sliwinska *et al.*, 2009; Baszel *et al.*, 2014). This region, which is well defined as a specific embryo growth zone, is the place where the elongation of embryo cells occurs to effect completion of germination (radicle emergence; Sliwinska *et al.*, 2009). Interestingly, in *M. truncatula*, the inhibitory effect of ABA on germination/radicle emergence is associated with architectural modification, in this embryo axis, leading to the repression of cell wall loosening and cell expansion

(Gimeno-Gilles *et al.*, 2009). However, the general mechanisms by which ABA inhibits seed germination, marked by the appearance of the radicle through the surrounding endosperm and testa, is still poorly understood. Several pieces of evidence support the hypothesis that ABA controls germination through the mobilization of reserves, but recent results favor an alternative hypothesis, namely that ABA acts through its direct effect on radicle emergence (Bethke and Jones, 2001; Gimeno-Gilles *et al.*, 2009). Taking into account the specific expression pattern of *MtABCG20* and the observation that *mtabcg20* mutants exhibited enhanced sensitivity to ABA during germination, we propose that *MtABCG20* contributes to reducing the cellular ABA levels within the hypocotyl–radicle zone (Figure 7b). The latter activity, in addition to reduced uptake of ABA from the endosperm, changes the endogenous level of this

hormone in the embryo. In agreement with this hypothesis is the observation that *mtabcg20* embryos are impaired in ABA translocation from the embryonic axes and hence remove ABA from the hypocotyl–radicle transition zone.

Notably, it was recently proposed that a spatial structure in germinating *Arabidopsis* seed/embryo may filter out noisy inputs from the environment and stimulate the termination of dormancy. In *Arabidopsis* embryos, the responses to ABA and gibberellin were found to occur within distinct cell types, suggesting communication between various signaling centers via hormone transport. The spatial separation of such signaling centers is required to process variable inputs from the environment and to promote the breaking of dormancy (Topham *et al.*, 2017). ABA translocation within the embryo and the result of such signal transduction between biological compartments/cell types underlines the crucial role of transporters and the transport rate as decisive for the developing embryo and developmental fate. Notably, together with the activity of this transporter in environmentally regulated plant developmental processes, like the root architecture it can be postulated that the *MtABCG20* comprehensively participates in response to environmental cues by modulating ABA transport. Its activity can be recognized as a regulatory element of seed germination as well as root morphology and nodulation.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Plant material and growth conditions

Medicago truncatula (ecotype R-108) seeds of the *mtabcg20* Tnt1 insertion mutant lines (NF10694, NF6539) were obtained from the Noble Research Institute.

Medicago truncatula (WT and mutants) seeds were chemically scarified with concentrated sulfuric acid, stratified (4°C in dark for 3 days), and transferred to ½ Murashige and Skoog (MS) agar medium. Seedlings were grown under controlled greenhouse conditions with a mean temperature of 22°C, 50% humidity and a 16-h photoperiod.

Medicago truncatula hairy-root cultures (control and overexpressed *abi1-1*) were initiated from the 10-mm root fragments containing meristem and growing them in the dark at 22°C. Cultures were grown on solid Fahraeus medium, supplemented with sucrose (10 g L⁻¹), myoinositol (100 mg L⁻¹), thiamine (10 mg L⁻¹), pyridoxine (1 mg L⁻¹), biotin (1 mg L⁻¹), nicotinic acid (1 mg L⁻¹) and glycine (2 mg L⁻¹). Fragments of hairy roots were transferred onto fresh medium every 3 weeks.

Nicotiana tabacum Bright Yellow 2 (BY2) suspension cell cultures (Nagata *et al.*, 1992) were grown in a MS basal salt mixture supplemented with 30 g L⁻¹ sucrose, 0.2 mg L⁻¹ 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, 1 mg L⁻¹ thiamine, 100 mg L⁻¹ myo-inositol and 370 mg L⁻¹ KH₂PO₄, in the dark at 26°C on an orbital shaker (130 rpm), and diluted 1:59 every 2 weeks.

Genetic constructs

The promoter region of *MtABCG20* (1281 bp) was amplified and cloned into the following binary vectors: (i) pPR97, carrying the β-glucuronidase (*gusA*) reporter gene (Szabados *et al.*, 1995), by

restriction/ligation using restriction sites for BamHI and EcoRI; and (ii) pPLV04_v2, carrying a GFP reporter gene tagged with a NLS, by ligation-independent cloning (De Rybel *et al.*, 2011). The cDNA fragment (2049 bp) corresponding to the CDS of *MtABCG20* used for overexpression and subcellular localization was amplified and cloned into pMDC43, carrying GFP (Curtis and Grossniklaus, 2003), by restriction/ligation using restriction sites for AscI and PstI. For the BiFC assay, the CDS of *MtABCG20* was cloned into pDONR™/Zeo (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) by site-specific recombination using Gateway BP Clonase II Enzyme Mix (Invitrogen) and then recombined into the pSAT3-nVenus-DEST and pSAT5-DEST-cCFP vectors (Mitula *et al.*, 2015) by site-specific recombination using Gateway LR Clonase II Enzyme Mix (Invitrogen). For primer sequences, see Table S2.

Plant transformation

Transgenic roots carrying *ProMtABCG20:GUS* or *ProMtABCG20:NLS-GFP* constructs or *Arabidopsis abi1-1* allele were obtained from *M. truncatula* after infection of a radicle with *Agrobacterium rhizogenes* Arqua1. Stably transformed *M. truncatula* plants carrying *ProMtABCG20:GUS* were obtained by *Agrobacterium tumefaciens* AGL1-mediated transformation using leaf explants and regeneration via somatic embryogenesis (<http://www.noble.org/medicagohandbook>). Stably transformed BY2 cells were generated by co-cultivation with *A. tumefaciens* AGL1 carrying *Pro35S:GFP-MtABCG20* or *Pro35S:GFP*, as previously described (Biala *et al.*, 2017).

Abscisic acid and polyethylene glycol treatment

Seven-day-old *Medicago* seedlings were transferred to solid ½ MS medium supplemented with 10 μM ABA or Whatman paper saturated with 15% PEG (PEG 6000 Serva 33137; osmotic potential -0.54 MPa) solution. Samples were collected at different time points (3, 6 and 24 h after transfer) and immediately frozen. The collected material was used for qRT-PCR analyses.

Quantitative real-time-polymerase chain reaction analyses

RNA was isolated from plant material with an RNeasy Extraction kit. Genomic DNA was removed by on-column DNase treatment. Total RNA (500 ng) was converted to cDNA with Omniscript reverse transcriptase (Qiagen, Hilden, Germany) following the manufacturer's protocol. Droplet digital PCR was performed with the QX200 Droplet Digital PCR (ddPCR™) System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) using EvaGreen. RT-PCR was performed in a CFX Connect Real-Time System machine (Bio-Rad) using SYBR Green. *Actin* was used as a reference gene for normalization, and the gene expression levels were determined by the ΔΔCt method. For primer sequences, see Table S2.

Transport assays in suspension cell cultures

Four-day-old suspension cell cultures (overexpressing *MtABCG20* or transformed with EV) were filtered, washed, and suspended in fresh, ice-cold growth medium. After the addition of ABA (250 μM) as a substrate, the cells were incubated for 30 min at 4°C with agitation (60 rpm). After incubation, the cells were filtered, washed and transferred to fresh, growth medium (T0), and then incubated with agitation (60 rpm) at 22°C/18°C. Samples (5 ml of cell culture) were collected at the defined time points, filtered and frozen. Frozen cells were ground at 4°C with mortar and pestle, and extracted with 3 ml of 80% methanol. Dried extracted samples were dissolved in 200 μl of 80% methanol and analyzed by liquid chromatography–electrospray ionization–tandem mass spectrometry (LC/ESI/MS) using a Waters UPLC connected to a Bruker

microTOF-Q mass spectrometer (Staszko *et al.*, 2011). Deuterated ABA was used as the internal standard.

³H-ABA UPTAKE INTO MEMBRANE VESICLES

Membranes were prepared from 20 g of filtered BY2 cells (overexpressing *MtABCG20*, or transformed with EV). Frozen material was grounded and suspended in 20 ml of homogenization buffer [250 mM sorbitol, 50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 2 mM EDTA, 6 g L⁻¹ polyvinylpyrrolidone, 0.1% dithiothreitol (DTT), 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride and 1% (v/v) protease inhibitor cocktail; Sigma (St. Louis, MA, USA) at 4°C. The homogenate was centrifuged at 5000 *g* for 5 min at 4°C. The supernatant was centrifuged at 10 000 *g* for 5 min at 4°C. The resulting supernatant was centrifuged at 48 000 *g* for 1.5 h, giving a pelleted microsomal fraction. The microsomal fraction was suspended in STED10 buffer (10 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 1 mM DTT, 10% sucrose, pH 7.0) and diluted to a final total protein concentration of 1 µg µl⁻¹. The quality of the vesicles was tested using 9-amino-6-chloro-2-methoxyacridine (ACMA; Invitrogen A1324) quenching fluorescence assay. The ³H-ABA uptake assay was conducted in reaction buffer [100 mM KCl, 25 mM Tris-MES, pH 7.4, 10% glycerol (v/v), 1 mM DTT]. Uptake was initiated by addition of vesicles to reaction buffer containing 0.078 nM ³H-ABA (5 Ci mmol⁻¹), MgSO₄ (10 mM) and ATP (4 mM). At defined time points, 1, 2 and 3 min samples were vacuum filtered through 0.45-µm cellulose-nitrate filters (Millipore), and washed immediately with ice-cold buffer with 150 µM ABA. The filters were air-dried, and the remaining radioactivity was measured using a MicroBeta2 Microplate Scintillation Counter (PerkinElmer, Waltham, MA, USA).

ACCUMULATION OF ³H-ABA IN THE EMBRYO AXIS

Embryos were separated from the scarified and imbibed WT and *mtabcg20* 1-month-old seeds. Then, 1 µl of 1.52 nM ³H-ABA (0.15 Ci mmol⁻¹) was applied to the embryo axis and incubated at room temperature for 2 h. The embryo axes were cut off and transferred to a liquid scintillation cocktail (OptiPhase SuperMix, PerkinElmer). The accumulation of ³H-ABA in the embryonic axes was monitored by scintillation counting, using a MicroBeta2 Microplate Scintillation Counter (PerkinElmer).

PHENOTYPIC CHARACTERIZATION OF THE *MTABCG20* MUTANT

To analyze the LR number in a condition mimicking drought stress, 3-day-old WT and *mtabcg20* seedlings were transferred onto ½ MS solid medium containing 5% PEG (PEG 6000 Serva 33137; osmotic potential -0.18 MPa). The number of emerged LRs was quantified after 4 weeks.

To compare nodulation efficiency between the WT and *mtabcg20* mutants, 3-day-old seedlings were treated with 10 µM ABA for 24 h, transferred onto modified solid Fahraeus (-N) medium and inoculated with *Sinorhizobium meliloti* strain 1021. Nodule numbers were counted 21 days after inoculation.

One-month stored WT and *mtabcg20* seeds were scarified, transferred onto ½ MS solid medium with different concentrations of ABA and stratified at 4°C in the dark for 3 days. The plates were incubated in the dark at 23°C. Germination was defined as emergence of the radicle through the seed coat. The percentage of germinated seeds was examined 24 h after stratification.

MICROSCOPY OBSERVATION

Transgenic plants carrying the *ProMtABCG20:GUS* reporter construct were stained for GUS using 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-glucuronide, according to the protocol described by Gallagher

(1992) and visualized by light microscopy. Transgenic roots carrying the *ProMtABCG20:NLS-GFP* reporter construct were visualized by fluorescent microscopy (Leica DMI 4000B, Wetzlar, Germany). Microscopic observation of Arabidopsis protoplasts transiently co-expressing GFP-MtABCG20 and AtPIP2A-mCherry fusion proteins or constructs used for the BiFC assay were performed using laser-scanning confocal microscopy (Leica TCS SP5).

ACCESSION NUMBERS

Sequence data from this article can be found in the GenBank database under the following accession numbers: MTR_1g093990 for *MtABCG20*, MTR_3g095530 for *Actin*, MTR_7g111010 for *MtEXP1*, MTR_5g080680 for *MtHAI2*, MTR_2g070460 for *MtNCED*, MTR_5g080360 for *MtGPAT5*.

ACKNOWLEDGEMENT

The authors thank I. Femiak for excellent technical assistance; J. Kang for helpful technical advice regarding the transport assay; M. Michalak for the pSAT3-nVenus-DEST and pSAT5-DEST-cCFP vectors; P. Bednarek for critical comments; National Science Centre Grants supported this work: 2013/10/M/NZ3/00260.

AUTHORS' CONTRIBUTIONS

M.J. designed the research and interpreted results; A.P. and J.B. performed the majority of the experiments, contributed to experimental design and result interpretation; A.P. and W.B. performed transport experiments; A.P. performed BiFC and embryo-based experiments; J.B. conducted phenotypic characterization; M.J., J.B. and A.P. wrote the manuscript; E.M. contributed to experimental design and writing.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

SUPPORTING INFORMATION

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.

Figure S1. Promoter activity analyses of *MtABCG20* in transgenic *M. truncatula* roots.

Figure S2. Promoter activity analyses of *MtABCG20* in transgenic *M. truncatula* nodule.

Figure S3. Phenotypic characterization of *mtabcg20* mutants.

Figure S4. Expression of *MtABCG20* in *N. tabacum* BY2 cells.

Figure S5. Plasma membrane localization of *MtABCG20* in BY2 cells.

Figure S6. ABA transport assay in BY2 cells.

Figure S7. Experimental scheme of ABA application onto *Medicago* embryo.

Figure S8. Real-time PCR expression analyses of *MtHAI2* and *MtEXP1* in embryo axes.

Figure S9. Real-time PCR expression analyses of *MtHAI2* in cotyledons.

Figure S10. Changes of the selected (clustering with *AtABCG25*) half-size *MtABCGs* expression in roots after exogenous ABA application.

Figure S11. Phylogenetic tree of half-size ABCG proteins from *Arabidopsis thaliana* and *Medicago truncatula*.

Table S1. Accession numbers of *Medicago truncatula* half-size ABCG genes (WBC).

Table S2. List of primers used in this study.

REFERENCES

- Bassel, G.W., Stamm, P., Mosca, G., Barbier de Reuille, P., Gibbs, D.J., Winter, R., Janka, A., Holdsworth, M.J. and Smith, R.S. (2014) Mechanical constraints imposed by 3D cellular geometry and arrangement modulate growth patterns in the Arabidopsis embryo. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **111**, 8685–8690.
- Bauer, H., Ache, P., Lautner, S. et al. (2013) The stomatal response to reduced relative humidity requires guard cell-autonomous ABA synthesis. *Curr. Biol.* **23**, 53–57.
- Beisson, F., Li, Y., Bonaventure, G., Pollard, M. and Ohlogge, J.B. (2007) The acyltransferase GPAT5 is required for the synthesis of suberin in seed coat and root of Arabidopsis. *Plant Cell* **19**, 351–368.
- Bethke, P.C. and Jones, R.L. (2001) Cell death of barley aleurone protoplasts is mediated by reactive oxygen species. *Plant J.* **25**, 19–29.
- Bethke, P.C., Libourel, I.G., Aoyama, N., Chung, Y.Y., Still, D.W. and Jones, R.L. (2007) The Arabidopsis aleurone layer responds to nitric oxide, gibberellin, and abscisic acid and is sufficient and necessary for seed dormancy. *Plant Physiol.* **143**, 1173–1188.
- Bhattacharjee, P., Paul, S., Banerjee, M., Patra, D., Banerjee, P., Ghoshal, N., Bandyopadhyay, A. and Giri, A.K. (2013) Functional compensation of glutathione S-transferase M1 (GSTM1) null by another GST superfamily member, GSTM2. *Sci. Rep.* **3**, 2704.
- Biala, W., Banasiak, J., Jarzaniak, K., Pawela, A. and Jasinski, M. (2017) Medicago truncatula ABCG10 is a transporter of 4-coumarate and liquiritigenin in the medicarpin biosynthetic pathway. *J. Exp. Bot.* **68**, 3231–3241.
- Borghgi, L., Kang, J., Ko, D., Lee, Y. and Martinoia, E. (2015) The role of ABCG-type ABC transporters in phytohormone transport. *Biochem. Soc. Trans.* **43**, 924–930.
- Boursiac, Y., Leran, S., Corratge-Faillie, C., Gojon, A., Krouk, G. and Lacombe, B. (2013) ABA transport and transporters. *Trends Plant Sci.* **18**, 325–333.
- Chahtane, H., Kim, W. and Lopez-Molina, L. (2017) Primary seed dormancy: a temporally multilayered riddle waiting to be unlocked. *J. Exp. Bot.* **68**, 857–869.
- Curtis, M.D. and Grossniklaus, U. (2003) A gateway cloning vector set for high-throughput functional analysis of genes in planta. *Plant Physiol.* **133**, 462–469.
- Danisman, S., van Dijk, A.D., Bimbo, A., van der Wal, F., Hennig, L., de Folter, S., Angenent, G.C. and Immink, R.G. (2013) Analysis of functional redundancies within the Arabidopsis TCP transcription factor family. *J. Exp. Bot.* **64**, 5673–5685.
- De Rybel, B., van den Berg, W., Lokerse, A., Liao, C.Y., van Mourik, H., Moller, B., Peris, C.L. and Weijers, D. (2011) A versatile set of ligation-independent cloning vectors for functional studies in plants. *Plant Physiol.* **156**, 1292–1299.
- Ding, Y. and Oldroyd, G.E. (2009) Positioning the nodule, the hormone dicumyl. *Plant Signal. Behav.* **4**, 89–93.
- Ding, Y., Kalo, P., Yendrek, C., Sun, J., Liang, Y., Marsh, J.F., Harris, J.M. and Oldroyd, G.E. (2008) Abscisic acid coordinates nod factor and cytokinin signaling during the regulation of nodulation in *Medicago truncatula*. *Plant Cell* **20**, 2681–2695.
- Dodd, I.C. (2013) Abscisic acid and stomatal closure: a hydraulic conductance conundrum? *New Phytol.* **197**, 6–8.
- Endo, A., Sawada, Y., Takahashi, H. et al. (2008) Drought induction of Arabidopsis 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase occurs in vascular parenchyma cells. *Plant Physiol.* **147**, 1984–1993.
- Gallagher, S.R. (1992) *GUS Protocols: Using the GUS Gene as a Reporter of Gene Expression*. San Diego, CA: Academic Press.
- Gimeno-Gilles, C., Lelievre, E., Viau, L., Malik-Ghulam, M., Ricoult, C., Niebel, A., Leduc, N. and Limami, A.M. (2009) ABA-mediated inhibition of germination is related to the inhibition of genes encoding cell-wall biosynthetic and architecture: modifying enzymes and structural proteins in *Medicago truncatula* embryo axis. *Mol. Plant* **2**, 108–119.
- Gonzalez, E.M., Galvez, L. and Arrese-Igor, C. (2001) Abscisic acid induces a decline in nitrogen fixation that involves leghaemoglobin, but is independent of sucrose synthase activity. *J. Exp. Bot.* **52**, 285–293.
- Gonzalez, A.A., Agbevenou, K., Herrbach, V., Gough, C. and Bensmihen, S. (2015) Abscisic acid promotes pre-emergence stages of lateral root development in *Medicago truncatula*. *Plant Signal. Behav.* **10**, e977741.
- Harris, J.M. (2015) Abscisic acid: hidden architect of root system structure. *Plants (Basel)* **4**, 548–572.
- Hu, B., Cao, J., Ge, K. and Li, L. (2016) The site of water stress governs the pattern of ABA synthesis and transport in peanut. *Sci. Rep.* **6**, 32 143.
- Hyung, D., Lee, C., Kim, J.H. et al. (2014) Cross-family translational genomics of abiotic stress-responsive genes between Arabidopsis and *Medicago truncatula*. *PLoS ONE* **9**, e91721.
- Kang, J., Hwang, J.U., Lee, M., Kim, Y.Y., Assmann, S.M., Martinoia, E. and Lee, Y. (2010) PDR-type ABC transporter mediates cellular uptake of the phytohormone abscisic acid. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **107**, 2355–2360.
- Kang, J., Park, J., Choi, H., Burla, B., Kretzschmar, T., Lee, Y. and Martinoia, E. (2011) Plant ABC transporters. *Arabidopsis Book* **9**, e0153.
- Kang, J., Yim, S., Choi, H., Kim, A., Lee, K.P., Lopez-Molina, L., Martinoia, E. and Lee, Y. (2015) Abscisic acid transporters cooperate to control seed germination. *Nat. Commun.* **6**, 8113.
- Kanno, Y., Hanada, A., Chiba, Y., Ichikawa, T., Nakazawa, M., Matsui, M., Koshiha, T., Kamiya, Y. and Seo, M. (2012) Identification of an abscisic acid transporter by functional screening using the receptor complex as a sensor. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **109**, 9653–9658.
- Koiwai, H., Nakaminami, K., Seo, M., Mitsuhashi, W., Toyomasu, T. and Koshiha, T. (2004) Tissue-specific localization of an abscisic acid biosynthetic enzyme, AAO3, in Arabidopsis. *Plant Physiol.* **134**, 1697–1707.
- Kuromori, T., Miyaji, T., Yabuuchi, H., Shimizu, H., Sugimoto, E., Kamiya, A., Moriyama, Y. and Shinozaki, K. (2010) ABC transporter AtABCG25 is involved in abscisic acid transport and responses. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **107**, 2361–2366.
- Kuromori, T., Sugimoto, E. and Shinozaki, K. (2014) Intertissue signal transfer of abscisic acid from vascular cells to guard cells. *Plant Physiol.* **164**, 1587–1592.
- Kuromori, T., Fujita, M., Urano, K., Tanabata, T., Sugimoto, E. and Shinozaki, K. (2016) Overexpression of AtABCG25 enhances the abscisic acid signal in guard cells and improves plant water use efficiency. *Plant Sci.* **251**, 75–81.
- Kuromori, T., Seo, M. and Shinozaki, K. (2018) ABA transport and plant water stress responses. *Trends Plant Sci.* **23**, 513–522.
- Liang, Y. and Harris, J.M. (2005) Response of root branching to abscisic acid is correlated with nodule formation both in legumes and nonlegumes. *Am. J. Bot.* **92**, 1675–1683.
- Maia, J., Dekkers, B.J., Dolle, M.J., Ligterink, W. and Hilhorst, H.W. (2014) Abscisic acid (ABA) sensitivity regulates desiccation tolerance in germinated Arabidopsis seeds. *New Phytol.* **203**, 81–93.
- Merilo, E., Jalakas, P., Laanemets, K., Mohammadi, O., Horak, H., Kollist, H. and Brosche, M. (2015) Abscisic acid transport and homeostasis in the context of stomatal regulation. *Mol. Plant* **8**, 1321–1333.
- Merilo, E., Yarmolinsky, D., Jalakas, P., Parik, H., Tulva, I., Rasulov, B., Kilk, K. and Kollist, H. (2018) Stomatal VPD response: there is more to the story than ABA. *Plant Physiol.* **176**, 851–864.
- Mitula, F., Tajdel, M., Ciesla, A., Kasproicz-Maluski, A., Kulik, A., Babula-Skowronska, D., Michalak, M., Dobrowolska, G., Sadowski, J. and Ludwikow, A. (2015) Arabidopsis ABA-activated kinase MAPKKK18 is regulated by protein phosphatase 2C ABI1 and the ubiquitin-proteasome pathway. *Plant Cell Physiol.* **56**, 2351–2367.
- Nagata, T., Nemoto, Y. and Hasezawa, S. (1992) Tobacco by-2 cell-line as the hela-cell in the cell biology of higher-plants. *Int. Rev. Cytol.* **132**, 1–30.
- Nelson, B.K., Cai, X. and Nebenfuhr, A. (2007) A multicolored set of in vivo organelle markers for co-localization studies in Arabidopsis and other plants. *Plant J.* **51**, 1126–1136.
- Olaetxea, M., Mora, V., Bacaicoa, E. et al. (2015) Abscisic acid regulation of root hydraulic conductivity and aquaporin gene expression is crucial to the plant shoot growth enhancement caused by rhizosphere humic acids. *Plant Physiol.* **169**, 2587–2596.
- Pellizzaro, A., Clochard, T., Cukier, C. et al. (2014) The nitrate transporter MtNPF6.8 (MtNRT1.3) transports abscisic acid and mediates nitrate regulation of primary root growth in *Medicago truncatula*. *Plant Physiol.* **166**, 2152–2165.

- Shu, K., Liu, X.D., Xie, Q. and He, Z.H. (2016) Two faces of one seed: hormonal regulation of dormancy and germination. *Mol. Plant* **9**, 34–45.
- Sliwinska, E., Bassel, G.W. and Bewley, J.D. (2009) Germination of *Arabidopsis thaliana* seeds is not completed as a result of elongation of the radicle but of the adjacent transition zone and lower hypocotyl. *J. Exp. Bot.* **60**, 3587–3594.
- Staszkw, A., Swarczewicz, B., Banasiak, J., Muth, D., Jasinski, M. and Stobiecki, M. (2011) LC/MS profiling of flavonoid glycoconjugates isolated from hairy roots, suspension root cell cultures and seedling roots of *Medicago truncatula*. *Metabolomics* **7**, 604–613.
- Sussmilch, F.C. and McAdam, S.A.M. (2017) Surviving a dry future: abscisic acid (ABA)-mediated plant mechanisms for conserving water under low humidity. *Plants (Basel)* **6**, E54.
- Suzuki, A., Akune, M., Kogiso, M. *et al.* (2004) Control of nodule number by the phytohormone abscisic acid in the roots of two leguminous species. *Plant Cell Physiol.* **45**, 914–922.
- Szabados, L., Charrier, B., Kondorosi, A., Debruijn, F.J. and Ratet, P. (1995) New plant promoter and enhancer testing vectors. *Mol. Breeding* **1**, 419–423.
- Tominaga, A., Nagata, M., Futsuki, K. *et al.* (2010) Effect of abscisic acid on symbiotic nitrogen fixation activity in the root nodules of *Lotus japonicus*. *Plant Signal. Behav.* **5**, 440–443.
- Topham, A.T., Taylor, R.E., Yan, D., Nambara, E., Johnston, I.G. and Bassel, G.W. (2017) Temperature variability is integrated by a spatially embedded decision-making center to break dormancy in *Arabidopsis* seeds. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **114**, 6629–6634.
- Verrier, P.J., Bird, D., Burla, B. *et al.* (2008) Plant ABC proteins—a unified nomenclature and updated inventory. *Trends Plant Sci.* **13**, 151–159.
- Wu, Y., Sanchez, J.P., Lopez-Molina, L., Himmelbach, A., Grill, E. and Chua, N.H. (2003) The *abi-1-1* mutation blocks ABA signaling downstream of cADPR action. *Plant J.* **34**, 307–315.
- Yao, L., Cheng, X., Gu, Z., Huang, W., Li, S., Wang, L., Wang, Y.F., Xu, P., Ma, H. and Ge, X. (2018) The AWPM-19 family protein OsPM1 mediates abscisic acid influx and drought response in rice. *Plant Cell* **30**, 1258–1276.
- Yendrek, C.R., Lee, Y.C., Morris, V. *et al.* (2010) A putative transporter is essential for integrating nutrient and hormone signaling with lateral root growth and nodule development in *Medicago truncatula*. *Plant J.* **62**, 100–112.
- Zhang, H., Zhu, H., Pan, Y., Yu, Y., Luan, S. and Li, L. (2014) A DTX/MATE-type transporter facilitates abscisic acid efflux and modulates ABA sensitivity and drought tolerance in *Arabidopsis*. *Mol. Plant* **7**, 1522–1532.