Uniwersytet im. Adama Mickiewicza w Poznaniu
Wydział Biologii
Zakład Ekspresji Genów

Aleksandra Smoczyńska

Rola jęczmiennego czynnika transkrypcyjnego MADS27 i jego regulatora mikroRNA444 w odpowiedzi rośliny na niedobór i nadmiar azotu

Rozprawa doktorska

Praca napisana pod kierunkiem
Prof. dr. hab. Zofii Szweykowskiej-Kulińskiej

Poznań, 2021

Podziękowania

Serdeczne podziękowania dla ***Pani Profesor dr hab. Zofii Szweykowskiej-Kulińskiej*** *za możliwość wykonywania tej pracy, cenne rady, mentoring naukowy i prowadzenie doktoratu.*

Serdeczne podziękowania wszystkim członkom Zakładu Ekspresji Genów, którzy służyli mi przez te lata słowami otuchy i pomocą merytoryczną. W szczególności dla: ***Oli Grabowskiej****, która towarzyszyła mi w codziennych eksperymentach, ale także*

Andrzejowi Pacakowi za pomoc merytoryczną,
Halinie Pietrykowskiej za naukę hybrydyzacji Northern,
Patrycji Plewce, za pomoc w przygotowywaniu bibliotek małych RNA,
Dawidowi Bielewiczowi, za wykonanie i pomoc w analizach bioinformatycznych,
Sagarowi Bhat za pomoc w przygotowaniu analizy transkryptomu,
Pawłowi Sega za pomoc w technice western blot,
Jakubowi Dolacie za pomoc w technice ChIP-qPCR
Jak również wszystkich członkom zespołu za możliwość konsultacji i dobre rady

Podziękowania składam również dr hab. Marcinowi Zadwornemu za wspólne przeprowadzenie analizy systemu korzeniowego,
Jak również prof. Jackowi Kęsemu za wprowadzenie w tajniki chromatografii cieczowej i oznaczenie poziomu ABA
Serdeczne podziękowania kieruje także do
Magdaleny Taube *za codzienne wsparcie i pomoc*

Finansowanie

1. Narodowe Centrum Nauki (grant 2016/23/B/NZ9/00862 oraz 2016/23/N/NZ1/0005)
2. KNOW Poznańskie Konsorcjum RNA (01/KNOW2/2014)
3. iCOST CA15233 (European Cooperation in Science and Technology)
4. Projekt POWER- Paszport do przyszłości-Interdyscyplinarne studia doktoranckie na Wydziale Biologii UAM POWR.03.02.00-00-I006/17

Publikacje

Wyniki badań przedstawione w niniejszej rozprawie doktorskiej są przygotowywane do publikacji:

Smoczynska A; Pacak A; Grabowska A; Bielewicz D; Zadworny M; Singh K; Dolata J; Nuc P; Kęsy J; Woźniak M; Ratajczak I, Harwood W; Jarmolowski A; Szweykowska-Kulinska Z: „Excess nitrogen responsive HvMADS27 transcription factor controls barley root architecture by regulating abscisic acid level".

Ponadto w trakcie realizacji pracy doktorskiej zostały opublikowane następujące prace:

- Grabowska A; **Smoczynska A**; Bielewicz D; Pacak A; Jarmolowski A; Szweykowska-Kulinska Z: "Barley microRNAs as metabolic sensors for soil nitrogen availability" 2020, Plant Science; 10.1016/j.plantsci.2020.110608

- **Smoczynska A**; Pacak A; Nuc P; Swida-Barteczka A; Kruszka K; Karlowski W; Jarmolowski A; Szweykowska-Kulinska Z: "A functional network of novel barley

microRNAs and their targets in response to drought" 2020, Genes MDPI; 10.3390/genes11050488

- Grabowska A; Bhat S; **Smoczynska A**; Bielewicz D; Jarmolowski A; Szweykowska-Kulinska Z: "Regulation of plant microRNA biogenensis" 2020, Plant microRNAs; 10.1007/978-3-030-35772-6_1

- **Smoczynska A**; Sega P; Stepien A; Knop K; Jarmolowski A; Pacak A; Szweykowska-Kulinska Z: "miRNA Detection by Stem-Loop RT-qPCR in Studying microRNA Biogenesis and microRNA Responsiveness to Abiotic Stresses: Methods and Protocols" 2019, Plant microRNAs; 10.1007/978-1-4939-9042-9_10

- Skrzypczak T; Krela R; Kwiatkowski W; Wadurka S; **Smoczynska A**; Wojtaszek P: "Plant science view on biohybrid development" 2017, Frontiers in Bioengineering and Biotechnology; 10.3389/fbioe.2017.00046

- **Smoczynska A**; Szweykowska-Kulinska Z: "MicroRNA-mediated regulation of flower development in grasses" 2016, Acta biochimica Polonica; 10.18388/abp.2016_1358

Spis treści

Podziękowania ... 2
Finansowanie ... 3
Publikacje ... 3

WYKAZ SKRÓTÓW ... 6

STRESZCZENIE ... 7

ABSTRACT ... 8

1. WSTĘP ... 9

1.1 Metabolizm azotu u roślin ... 9
1.2 Stres azotowy u roślin ... 12
1.4 Rodzina MIR444 i czynniki transkrypcyjne z domeną MADS-box ... 14

2. CEL PRACY ... 17

3. MATERIAŁY ... 18

3.1 Materiał roślinny ... 18
3.2 Oligonukleotydy ... 18
3.3 Wektory ... 20
3.4 Odczynniki i roztwory ... 23
3.5 Podstawowe odczynniki do hodowli bakterii ... 25
3.6 Materiały do hodowli roślin ... 27
3.7 Materiały do przeprowadzenia transformacji, selekcji i regeneracji zarodków jęczmiennych ... 27
3.8 Materiały do analiz białkowych ... 31
3.9 Materiały do hybrydyzacji Northern ... 34
3.10 Materiały wykorzystane w przygotowaniu bibliotek do głębokiego sekwencjonowania małych RNA i analizy transkryptomu ... 36
3.11 Materiały wykorzystane do przeprowadzenia ChIP-qPCR ... 36
3.12 Narzędzia bioinformatyczne ... 40

4. METODY: ... 42

4.1 Hodowla roślin ... 42
4.2 Eksperymenty z wykorzystaniem kwasów nukleinowych ... 42
4.3 Eksperymenty z wykorzystaniem białek ... 53
4.4 Transformacja niedojrzałych zarodów jęczmiennych ... 54
4.5 Analiza systemu korzeniowego ... 56
4.6 Analiza wrażliwości korzeni na kwas abscysynowy ... 56
4.7 Pomiar stężenia azotu i kwasu abscysynowego w korzeniach ... 57

5. WYNIKI ... 58

5.1 Budowa genów HvMADS27 i MIR444c oraz analiza wzoru ekspresji hvMADS27 i MIRNA444c ... 58
5.4 Analiza elementów regulatorowych w promotorach genów MIR444c i hvMADS27 oraz poziomu ekspresji mRNA hvMADS27 oraz miRNA444c w wybranych stresach. ... 62
5.5 Charakterystyka fenotypu korzeni w liniach transgenicznych jęczmienia wykazujących obniżony poziom hvMADS27 oraz nadekspresję hvMADS27 c-myc w warunkach kontrolnych i w odpowiedzi na stres nadmiaru azotu ... 66
5.7 Analiza odpowiedzi jęczmiennych mutantów hvMADS27 na kwas abscysynowy ... 70
5.8 Analiza transkryptomu korzeni mutantów hvmads27 kd ... 73
5.9 Analiza oddziaływania hvMADS27 z motywami CArG w promotorach wybranych genów ... 75

6. DYSKUSJA ... 81

7. PODSUMOWANIE ... 88

LITERATURA ... 89

Wykaz skrótów

ABA	Kwas abscysynowy
AGO1	ARGONAUTE1
AMT	AMMONIUM TRANSPORTER
APS	Nadsiarczan amonu
BG1	β-glukozydaza 1
ChIP-qPCR	Immunoprecypitacja chromatyny połączona z ilościowym PCR w czasie rzeczywistym
DCL1	DICER-LIKE 1 (endonukleaza typu III)
EDTA	ETHYLENEDIAMINETETRAACETIC ACID
HEN1	HUA ENHANCER 1 (metyltransferaza)
HST	HASTY (eksportyna)
MIR	Gen kodujący miRNA
miRNA	Cząsteczka mikroRNA
mRNA	Informacyjny RNA
NRT.1.1	Transporter azotowy 1.1
RISC	RNA INDUCED SILENCING COMPLEX
RNA Pol II	DNA-zależna polimeraza RNA II
RSV	Wirus pasiastości ryżu
RT-qPCR	Ilościowy PCR w czasie rzeczywistym poprzedzony reakcją odwrotnej transkrypcji
WT	Roślina typu dzikiego

Streszczenie

Azot (N) warunkuje wzrost i rozwój roślin. W warunkach agroekosystemowych, w których dostępność azotu jest czynnikiem ograniczającym, dostarczanie N mineralnego umożliwia wysoką wydajność upraw. Jednym z głównych składników nawozów jest saletra amonowa (azotan amonu), a rośliny przystosowane do środowiska o wysokiej zawartości azotu charakteryzują się przyspieszonym starzeniem się liści, występowaniem krótszych korzeni, a w konsekwencji niższą produktywnością. Jęczmienny czynnik transkrypcyjny HvMADS27 ulega ekspresji głównie w korzeniach i zawiera elementy regulatorowe cis związane z odpowiedzią na N w regionie promotora. Ekspresja hvMADS27 jest silnie obniżona pod wpływem stresu nadmiaru N, ale nie zmienia się w warunkach niedoboru N. Analiza fenotypowa systemu korzeniowego transgenicznych roślin jęczmienia z obniżonym poziomem HvMADS27 i nadekspresją hvMADS27 wykazała, że czynnik ten kontroluje architekturę korzeni jęczmienia i ich reakcję na stres nadmiaru N. Poszukiwania genów regulowanych przez hvMADS27 poprzez analizę transkryptomu korzeni roślin *hvmads27 kd* , a następnie eksperyment ChIP-qPCR na materiale pochodzącym z korzeni roślin *hvmads27 c-Myc OE* wykazały, że hvMADS27 reguluje ekspresję β-glukozydazy BG1 i poziom kwasu abscysynowego (ABA) w korzeniach jęczmienia. W niniejszej pracy proponujemy mechanizm, w którym obniżenie poziomu hvMADS27 pod wpływem stresu nadmiaru N uwalnia ekspresję genu BG1. Zwiększona aktywność BG1 prowadzi do podwyższenia poziomu ABA co powoduje skrócenie korzeni jęczmienia zależne od nadmiaru N.

Abstract

Nitrogen (N) determinates growth and development of plants. In agroecosystem conditions where N is likely limiting, the supply of mineral N enables high crop productivity. One of the main ingredients of fertilizers is ammonium nitrate, and plants adapted to high ammonium nitrate environments enhance leaf senescence, reduce root length and consequently have lower productivity. Barley hvMADS27 transcription factor is exclusively expressed in roots and contains N-responsive cis regulatory elements in the promoter region. HvMADS27 undergoes severe down-regulation under excess N , but its expression does not change under low N conditions. The phenotypic analysis of the root system of barley mutant plants with knock-down and over-expression of hvMADS27 revealed that hvMADS27 controls barley root architecture associated with soil exploration and response to N excess stress. The search for genes regulated by hvMADS27 through analysis of the transcriptome of *hvmads27 kd* plants and subsequent ChIP-qPCR experiments on the material derived from *hvmads27 c-Myc OE* plants showed that hvMADS27 regulates the expression of BG1 ß-glucosidase and in turn the level of abscisic acid (ABA) in roots. In this paper we propose the mechanism in which down-regulation of hvMADS27 upon N excess treatment releases the *BG1* gene from the repression. BG1 increased activity leads to release of ABA from its inactive conjugate which confers N excess-dependent root shortening.

1. WSTĘP

1.1 Metabolizm azotu u roślin

Azot jest jednym z najważniejszych makroelementów determinujących wzrost i rozwój roślin. N stanowi składnik aminokwasów budujących białka, zasad azotowych kwasów nukleinowych, jak również związków chemicznych kluczowych dla prawidłowego funkcjonowania, takich jak chlorofil (Marschner 1995; Galloway i Crowling 2002; Miller i Cramer 2004).

Roślinny metabolizm azotowy obejmuje takie etapy jak: pobieranie, asymilację, translokację oraz remobilizację (Tsay i inni., 2007; Meyer i Stitt i inni., 2001; Diaz i inni 2008). Głównym, dostępnym dla roślin źródłem azotu są jony azotanowe ($NO3^-$) i amonowe ($NH4^+$), oba pobierane przez system korzeniowy za pomocą szeregu transporterów.

System transporterów jonów azotanowych i amonowych jest najlepiej poznany w roślinie modelowej *Arabidopsis thaliana*. Wyróżnia się dwie rodziny transporterów odpowiedzialnych za pobieranie jonów azotanowych u roślin: te wykazujące się niskim powinowactwem- LATS (LOW AFFINITY TRANSPOERTERS) i transportery o wysokim powinowactwie HATS (HIGH AFFINITY TRANSPOERTERS). Natomiast rodzina transporterów amonowych AMT (AMMONIUM TRANSPORTER) jest zaangażowana w pobieranie $NH4^+$ przez system korzeniowy roślin (Ho i inni., 2009).

Do tej pory w grupie genów LATS zidentyfikowano ponad 50 członków w *Arabidopsis thaliana*, a dla części z nich określono specyficzną funkcję. NRT1.1 zlokalizowany jest w błonie komórkowej w epidermie korzenia i endodermie wierzchołka korzeniowego. Wykazano, że NRT1.1 działa jak czujnik azotu zmieniając powinowactwo do azotanu w zależności od jego dostępności w glebie (Ho i inni., 2009). NRT1.8, NRT1.9 i NRT1.5 są zaangażowane w translokację azotanu z korzenia do pędu (Lin i

inni., 2008). NRT1.6 ulega ekspresji w tkance naczyniowej łuszczyny i uważa się, że transportuje azot z tkanek matczynych do rozwijającego się zarodka (Almagro i inni., 2008). Homologi AtNRT1.1 w ryżu i kukurydzy również wykazują aktywność transporterów azotanów. Nadekspresja ryżowego OsNRT1.1 poprawia asymilację azotu przez roślinę i skraca czas jej dojrzewania (Wang i inni., 2018). Podobny fenotyp obserwuje się w przypadku ZmNRT1.1 u kukurydzy (Wen i inni., 2017).

Do systemu transporterów o wysokim powinowactwie należą geny NRT2 (NITRATE TRANSPORTER 2), które działają, gdy zewnętrzny poziom azotu jest niski (Orsel i inni., 2006). Jednakże członkowie tej rodziny nie są w stanie transportować azot bez interakcji z białkami partnerskimi (rodzina NAR2). U Arabidopsis zidentyfikowano siedmiu członków rodziny NRT2, wśród nich funkcja NRT2.1 jest najlepiej poznana. Mutacja powodująca wyciszenie tego genu skutkuje zniesieniem ponad 70% wychwytu $NO3^-$ w warunkach niskiej dostępności azotu (Filleur i inni., 2001). W ostatnim czasie również w jęczmieniu zidentyfikowano czterech członków rodziny NRT2 i NAR2 oraz potwierdzono konieczność interakcji pomiędzy HvNRT2.1 i HvNAR2.3 dla prawidłowego funkcjonowania transportu azotowego (Guo i inni., 2020).

Pobieranie jonów amonowych jest regulowane przez transportery z rodziny AMT. W Arabidopsis zidentyfikowano 6 członków tej rodziny, u ryżu 10 a w soi 16 (Gazzarrini i inni., 1999; Sonoda i inni., 2003; Kobae i inni., 2010). Tę rodzinę również można podzielić na geny kodujące transportery o wysokim i niskim powinowactwie (AMT1 i AMT2). Najlepiej opisanych i zbadanym członkiem rodziny AMT1 jest AtAMT1.1, który występuje jedynie w korzeniach Arabidopsis, a jego ekspresja wzrasta czterokrotnie w odpowiedzi na brak azotu (Sohlenkamp i inni., 2000). W ryżu natomiast, OsAMT1.1 występuje w wielu tkankach, podczas gdy ekspresja OsAMT1.2 i OsAMT1.3 jest ograniczona jedynie do korzeni ryżu (Sonoda i inni 2003a). Jak dotąd w jęczmieniu

zidentyfikowano i scharakteryzowano tylko dwa geny kodujące transportery jonów amonowych (HvAMT1.1 oraz HvAMT1.2) (Han i inni 2016).

Pobrane przez roślinę jony azotanowe i amonowe są następnie włączane w metabolizm stanowiąc budulec do powstawania aminokwasów. Jony amonowe są korzystniejszym źródłem azotu dla roślin, ponieważ azotany podczas asymilacji muszą być zredukowane do jonów amonowych, co wymaga większego nakładu energii (Bloom i inni., 1992; Filiz i inni., 2020). Azotany podlegają redukcji w cytozolu, dzięki aktywności reduktazy azotanowej (Meyer i Stitt i inni. 2001). Powstały w ten sposób azotyn jest dalej transportowany do chloroplastów, gdzie zachodzi redukcja do jonów amonowych przez reduktazę azotynową (Meyer i Stitt i inni. 2001). Następnie jony amonowe są asymilowane i włączane w cykl GS/GOGAT (syntetaza glutaminy- syntaza glutaminianowa), w którym syntetaza glutaminowa (GS) przyłącza jon amonowy do glutaminianu, tworząc glutaminę. Glutamina reaguje następnie z 2-oksoglutaranem, tworząc dwie cząsteczki glutaminianu. Ten etap jest katalizowany przez aminotransferazę 2-oksoglutaranu glutaminy i cykl się zamyka (Lea i Mifin 1974; Lea i Forde 1994; Unno i inni. 2006). Inne aminokwasy powstają w wyniku reakcji transaminacji, w których substratem jest glutamina (Tcherkes i Hodges i inni. 2008).

W trakcie swojego życia rośliny mają zdolność do ponownej mobilizacji wcześniej istniejących źródeł azotu, aby uzupełnić niski poziom tego pierwiastka w ryzosferze lub zaspokoić zapotrzebowanie nowo tworzących się organów (Thompson i Vierstra 2005; Wingler i inni., 2009; Chiba i inni., 2003; Otegui i inni., 2005). Jednym z największych źródeł azotu podczas tego procesu są zdegradowane chloroplasty pochodzące ze starzejących się liści. Internalizacja składników chloroplastów następuje poprzez autofagosomy i transport pęcherzyków związanych ze starzeniem (SAV-senescence associated vesicles). Autofagosomy to związane z błoną struktury zawierające

makrocząsteczki i resztki organelli. Ekspresja większości genów autofagii zwiększa się podczas starzenia rośliny i w odpowiedzi na ograniczenie dostępności azotu (Thompson i Vierstra, 2005; Wingler i inni., 2009, Chiba i inni. 2003). Wykazano również, że Rubisco jest uwalniane z chloroplastów do ciał zawierających Rubisco (RCB- Rubisco-containing bodies) w naturalnie starzejących się liściach. SAV występują tylko w komórkach zawierających chloroplasty, podczas gdy autofagosomy zaobserwowano również w komórkach korzeni (Otegui i inni., 2005; Xiong i inni., 2005).

Poziom azotu w tkankach rośliny oraz prawidłowo funkcjonujący system metabolizmu azotowego to jedne z ważniejszych czynników stanowiących o kondycji rośliny i jakości zbiorów zbóż. Azot pobrany przez system korzeniowy jest dalej transportowany do wszystkich tkanek rośliny. Transport azotu jest szczególnie ważny przed fazą wypełnienia ziarna. Wykazano, że translokacja N w organach wegetatywnych podczas fazy wypełniania ziarna jest procesem bezpośrednio wpływającym na wielkość plonu, jakość i zawartości białka w ziarnach pszenicy, kukurydzy i ryżu (Pollmer i inni. 1979; Canas i inni. 2009; Kiyomiya i inni. 2001).

1.2 Stres azotowy u roślin

Stres azotowy, zarówno niedobór jak i nadmiar tego pierwiastka, negatywnie wpływa na wszystkie aspekty funkcjonowania rośliny. Jak dotąd wiele badań zostało poświęconych analizie reakcji roślin na niedobór azotu (Kant i inni., 2011; Chen i inni., 2018; Vos i inni., 2005; Uribelarrea i inni., 2009; Chen i inni, 2015; Mu i inni., 2016). Rośliny te charakteryzują się zahamowanym wzrostem liści i pędów, jasnozielonym, żółtym lub brązowym kolorem co jest wynikiem zahamowanej syntezy chloroplastów i chlorofilu, jak również zwiększonym więdnięciem i wysychaniem. Natomiast, w

ostatnich latach, ze względu na zwiększające się wymagania populacyjne oraz ubożenie gleby spowodowane brakiem źródeł azotu na polach, wykorzystywanie nawozów azotowych znacznie się zwiększyło co doprowadziło do wystąpienia problemu przenawożenia (Jiao i inni., 2016). Jedynie 40% używanego nawozu jest wykorzystywane przez rośliny, a nadmiar N stanowi zagrożenie środowiskowe (Goulding i inni., 2007; Jiao i inni., 2016). Rośliny rosnące w warunkach nadmiaru N wykazują silny fenotyp, który obejmuje: zahamowanie wzrostu, zmniejszoną liczbę kwiatostanów, skrócenie korzeni, żółknięcie liści, zmniejszenie plonu i wyższą podatność na patogeny z powodu zwiększonej zawartości azotanów w tkankach (Lehmeier i inni., 2013; Kong i inni., 2017; Grabowska i inni., 2020).

Obecnie najczęściej dostępnym nawozem jest azotan amonu zawierający jony amonowe ($NH4^+$) i azotanowe ($NO3^-$) (Gorbovskiy i inni, 2017). Jednym z najbardziej wrażliwych i plastycznych organów rośliny jest system korzeniowy. U jęczmienia występuje system wiązkowy, w którym wyróżniamy korzenie seminalne, nodalne i korzenie boczne o różnym poziomie wrażliwości na czynniki środowiskowe. Architektura systemu korzeniowego roślin jest kształtowana między innymi za pomocą hormonów takich jak auksyny, cytokininy czy kwas abscysynowy.

W ostatnich latach pojawiło się wiele doniesień dotyczących związku pomiędzy metabolizmem azotu w roślinach a produkcją fitohormonów, zwłaszcza kwasu abscysynowego (ABA) (Finkelstein i inni., 2002; Cutler i inni., 2010; Yan i inni., 2014; Sah i inni., 2016; Harris i inni., 2017; Jiao i inni., 2020). ABA kontroluje wiele procesów zachodzących w roślinach, w tym kiełkowanie nasion, reakcję na stresy abiotyczne i biotyczne oraz wzrost korzeni (Finkelstein inni., 2002; Cutler i inni., 2010; Yan i inni., 2014; Sah i inni., 2016; Jiao i inni., 2020). U Arabidopsis wzrost stężenia N w ryzosferze powoduje stopniową akumulację ABA w korzeniach. Ponadto wykazano, że N indukuje

ekspresję genów regulowanych również przez ABA (Harris i inni., 2017). Stwierdzono zatem, że sam N lub razem z ABA reguluje architekturę systemu korzeniowego. W *Arabidopsis thaliana* wykazano również, że czynnik transkrypcyjny SCARECROW (SCR) (TF) kontroluje wydłużenie korzenia poprzez hamowanie ekspresji czynników transkrypcyjnych ABA INSENSITIVE 4 (ABI4) i ABA INSENSITIVE 5 (ABI5). Co ciekawe, wykazano, że ekspresja SCR jest kontrolowana zarówno przez N, jak i ABA (Harris i inni., 2017).

1.4 Rodzina MIR444 i czynniki transkrypcyjne z domeną MADS-box

MiRNA należą do klasy małych niekodujących RNA, zazwyczaj o długości 21 nt. Geny *MIR* są transkrybowane przez polimerazę RNA II, zatem ich transkrypty zawierają na końcu 5' strukturę czapeczki a na końcu 3' ogon poliA. Pierwotne transkrypty genów *MIR* składają się w strukturę spinki do włosów zawierającą miRNA i miRNA*. W wyniku aktywności enzymu DCL1 (DICER LIKE 1) pierwotne transkrypty genów *MIR* przycinane są dwukrotnie a następnie wycinany jest z nich dupleks miRNA / miRNA*, który podlega metylacji dzięki aktywności metylazy Hua Enhancer 1 (HEN1) i jest eksportowany do cytoplazmy poprzez aktywność białka AGO1 (ARGONAUTE 1), gdzie w większości przypadków miRNA* ulega degradacji (Reinhart i inni, 2002; Mallory i inni 2006; Stepien i inni 2016; Kurihara i inni., 2006).

Dojrzałe cząsteczki miRNA są włączane do wielobiałkowego kompleksu wyciszającego- RISC (RNA INDUCED SILENCING COMPLEX) i na zasadzie komplementarności zasad azotowych kierują kompleks do docelowego mRNA. Podstawowym składnikiem kompleksu RISC jest białko ARGONAUTE1 (AGO1), które pośredniczy w cięciu mRNA. Miejsce cięcia w obrębie mRNA znajduje się między

resztami sparowanymi z nukleotydami 10 i 11, licząc od końca 5’ w sekwencji miRNA (Vaucheret i inni 2004; Baumberger i inni 2005; Bartel i inni 2004).

Wyjątkowym przykładem miRNA jest rodzina *MIR444* charakteryzująca się występowaniem jedynie u roślin jednoliściennych i ciekawą strukturą genów (Sunkar i inni 2005). Każdy locus kodujący pri-miRNA444 nakłada się częściowo i jest antysensowny w stosunku do locus kodującego gen docelowy dla miRNA444, którym jest mRNA czynnika transkrypcyjnego z rodziny MADS box. Ponadto w strukturze genu kodującego miRNA444 znajdują się długie introny oddzielające egzony zawierające miRNA i miRNA*. Wycięcie intronów w procesie splicingu jest niezbędne do utworzenia prawidłowej struktury spinki do włosów zawierającej w swym trzonie miRNA/miRNA* i powstania dojrzałego miRNA444 (Gramzow i inni 2019)

Funkcja miRNA z rodziny *MIR444* oraz ich genów docelowych była analizowana w ryżu, gdzie miRNA444 reguluje nie tylko poziom czynnika transkrypcyjnego MADS-box kodowanego na przeciwnej nici DNA, ale równie trzy inne czynniki transkrypcyjne z rodziny MADS box (Wang i inni 2016; Lu i inni 2008). Wykazano, że miRNA444 odgrywa rolę w rozwoju korzeni i pędów, a także w odpowiedzi na atak wirusa pasiastości ryżu (RSV) (Yan i inni. 2014; Wang i inni. 2016). Nadekspresja ryżowego miR444 powoduje zwiększoną odporność rośliny na RSV, poprzez supresję czynników transkrypcyjnych MADS oraz zwiększenie ekspresji OsRDR1 (Wang i inni. 2016). W ostatnich latach wiele badań podniosło kwestię regulacji metabolizmu azotu u jednoliściennych poprzez wzajemne oddziaływanie między sygnalizacją fitohormonów roślinnych i miRNA z rodziny MIR444 oraz ich docelowymi genami (Chu i inni., 2019; Zhang i inni 2018; Yu i inni 2015; Yan i inni., 2014; Guo i inni 2013). W 2014 roku Yan i inni. wykazali, że w *Oryza sativa* czynnik transkrypcyjny MADS-box będący homologiem genu ANR1 (ARABIDOPSIS NITRATE REGULATED 1) jest regulowany

przez miRNA z rodziny miR444. Nadekspresja tego miRNA spowodowała zahamowanie wydłużenia korzeni bocznych, ale promowała wzrost korzenia głównego w sposób zależny od azotanów (Yan i inni. 2014). W późniejszym czasie wykazano, że OsMADS25, który jest specyficznie eksprymowany w korzeniach ryżu, reguluje rozwój korzeni i wpływa na akumulację azotanów w roślinach regulując sygnalizację auksyn (Zhang i inni., 2015; Zhang i inni. 2018). W ostatnich latach Yan i inni. wykazali również, że obecność jonów $NH4^+$ promuje biosyntezę brasinosteroidów (BR) u ryżu poprzez zależną od miRNA444 regulację czynnika transkrypcyjnego MADS57, który bezpośrednio hamuje transkrypcję genu DWARF14 biorącego udział w biosyntezie BR (Jiao i inni. 2020; Guo i inni 2013). Najnowsze doniesienia dotyczące roli czynników transkrypcyjnych MADS wykazują, że pszeniczny homolog ANR1 reguluje poziom ABA poprzez hamowanie ekspresji β-glukozydazy w korzeniach pszenicy oraz reguluje ekspresję transporterów azotu – TaNRT2 (Wang i inni., 2020).

W niniejszej pracy wykazujemy, że jęczmienny czynnik transkrypcyjny hvMADS27 kontroluje rozwój korzeni w sposób zależny od azotu poprzez regulację β-glukozydazy BG1, która uwalnia ABA z biologicznie nieaktywnych koniugatów w postaci estru ABA z glukozą.

2. Cel Pracy

Celem niniejszej pracy jest identyfikacja biologicznej funkcji jęczmiennego czynnika transkrypcyjnego hvMADS27 oraz jest regulatora miRNA444c.

Doniesienia literaturowe z ostatnich lat dowodzą znaczącej funkcji miRNA z rodziny *MIR444* oraz ich genów docelowych- czynników transkrypcyjnych MADS box w kształtowaniu budowy rośliny oraz jej odpowiedzi na stresy środowiskowe.

Odkrycie w genomie jęczmienia trzech genów kodujących miRNA z rodziny *MIR444* oraz genów docelowych dla dwóch z nich skłoniło nas do analizy biologicznej funkcji miRNA444c oraz hvMADS27 poprzez:

- analizę wzoru ekspresji dojrzałej cząsteczki miRNA444c oraz hvMADS27
- identyfikację elementów regulatorowych znajdujących się w promotorach obu genów
- analizę fenotypową transgenicznych linii jęczmienia z obniżonym poziomem i nadekspresją hvMADS27
- identyfikację genów regulowanych przez hvMADS27

3. Materiały

3.1 Materiał roślinny

W trakcie eksperymentów wykorzystano następujące linie roślin *Hordeum vulgare* odmiana Golden Promise:

- Rośliny typu dzikiego (WT)
- Rośliny transgeniczne:
  - *hvmads27 kd* -rośliny z obniżonym poziomem ekspresji czynnika transkrypcyjnego MADS27 na skutek nadekspresji sztucznego mikroRNA
  - *hvmads27 c-Myc OE* - Rośliny nadeksprymujące czynnik transkrypcyjny MADS27 w fuzji z etykietą c-myc

3.2 Oligonukleotydy

Numer	Sekwencja nukleotydowa (5’ – 3’)	Zastosowanie
AS104	TCGGTCTCGTCACCTTCTCC	Amplifikacja fragmentu cDNA MADS27 w celu analizy poziomu ekspresji za pomogą RT-qPCR w czasie rzeczywistym
AS105	TTCGCTCGGCCATATCGATC	
APO445	CATGTGAATCTGAGCAATGTGCAAAC	Amplifikacja końca 5’ transkryptu genu MIR444c w eksperymencie 5’RACE
APO446	CTGTCTCTAGCTTGCCGCCTCCACTT	
APO447	AGGCCAAAGCAAGCCATCAGATGATAC	
APO450	GTTTTCGGGCCATACCGATGATTTTCT	Amplifikacja końca 3’ transkryptu genu MIR444c w eksperymencie 3’RACE
APO451	TGCCTCCCTTTGCCAGAACTATGGAAT	
APO452	GAGCCAAAATGCCTCACTCGATTCACT	
APO453	GCGCAGGTACATGTTTCCTTAGCTCCA	
AS3001	TGAAATGGATATTAGAAATGGG	Amplifikacja fragmentu promotora genu PPC1 zawierającego motyw CArG
AS3002	ATCTTTCATCTCTTCTAGGGTC	
AS3003	AACTGTAGTTTAAAAGTTTTTG	Amplifikacja fragmentu promotora genu ANR1
AS3004	GTTATAAAATTGCATAAGTAGCTGC	

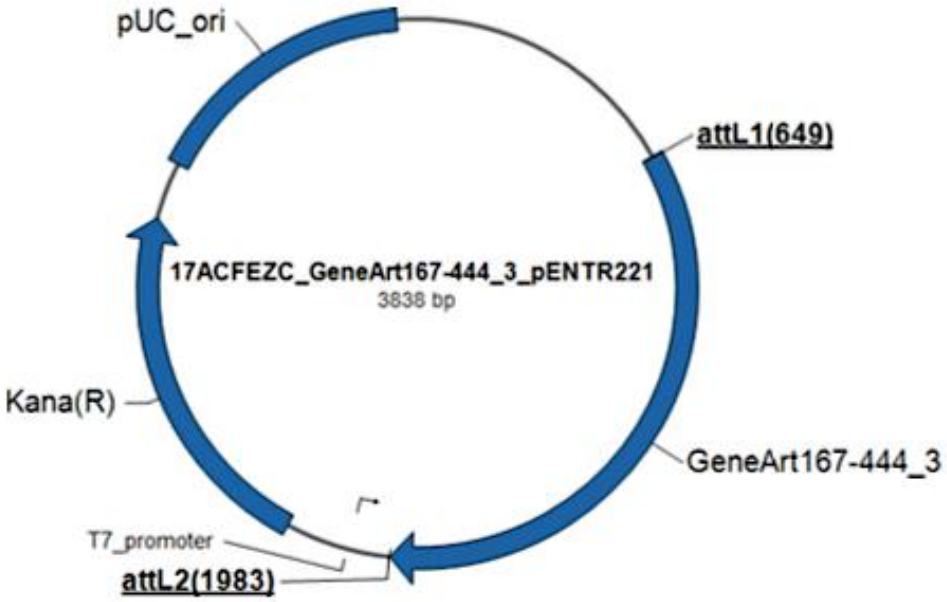
		zawierającego pierwszy motyw CArG
AS3005	TGATAACAAGATATGATACTATGTG	Amplifikacja fragmentu promotora genu ANR1 zawierającego drugi motyw CArG
AS3006	CCTGATTAATTTGATGTTCTTTATGTT	
AS3007	CTGTTACAAGGCTTTTGTACGATTC	Amplifikacja fragmentu promotora genu LAKAZY zawierającego motyw CArG
AS3008	GGCAAGTAAGTGGTTAATAATA	
AS3009	AAGTTGAAGAAACCGTAGCTACAAC	Amplifikacja fragmentu promotora genu UPS2 zawierającego motyw CArG
AS3010	TTATTAGTAAGCTATGTAC	
AS3011	ACTGGGTGGATGGTGAAAATGAAC	Amplifikacja fragmentu promotora genu BG1 zawierającego pierwszy motyw CArG
AS3012	TGCGTTTGCTCATTGGAGTTTTATT	
AS3013	TGCGTCCAACGCTAGCCCGATC	Amplifikacja fragmentu promotora genu BG1 zawierającego drugi motyw CArG
AS3014	GCAATTGTGGACGCGTGGACT	
AS916	TGTACCTTGCGCTGTACCTG	Amplifikacja fragmentu cDNA NRT1.1 w celu analizy poziomu ekspresji za pomogą RT-qPCR w czasie rzeczywistym
AS917	ACTTCTCGGTGCTGTTGGAC	
AS942	GTCCTCGGCCTCTTCCTC	Amplifikacja fragmentu cDNA ABI5 w celu analizy poziomu ekspresji za pomogą RT-qPCR w czasie rzeczywistym
AS943	CGGTACTGGTGTTGATGGTG	
1CafGNRT1.1F	ATGCCATGCGAGTTACTGGT	Amplifikacja fragmentu promotora genu NRT1.1 zawierającego motyw CArG
1CARGNRT1.1R	CGGCCACCAAATCAACACTG	
APO770	ATTTGAATTCATGGGGCGGGGCAAGATAGTG	Amplifikacja sekwencji kodującej MADS27 z miejscami rozpoznawanym przez enzymy restrykcyjne,
APO771	ATTTGGATCCTCATGGATGTAGTTGCAATCCT	

		odpowiednio EcoRI oraz BamHI
APO772	CACCAACCATGGAGGAGCAGAAGCTGAT	Amplifikacja sekwencji kodującej MADS27 wraz z etykietą c-myc z plazmidu pGBKT7
HYGR_F	ATTTCGGCTCCAACAATGTC	Amplifikacja genu odporności na hygromycynę
HYGR_R	GATGTTGGCGACCTCGTATT	
M13_F	CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC	Startery wykorzystane do sekwencjonowania wstawki w plazmidzie pGEM T-easy
M13_R	TCACACAGGAAACAGCTATGAC	

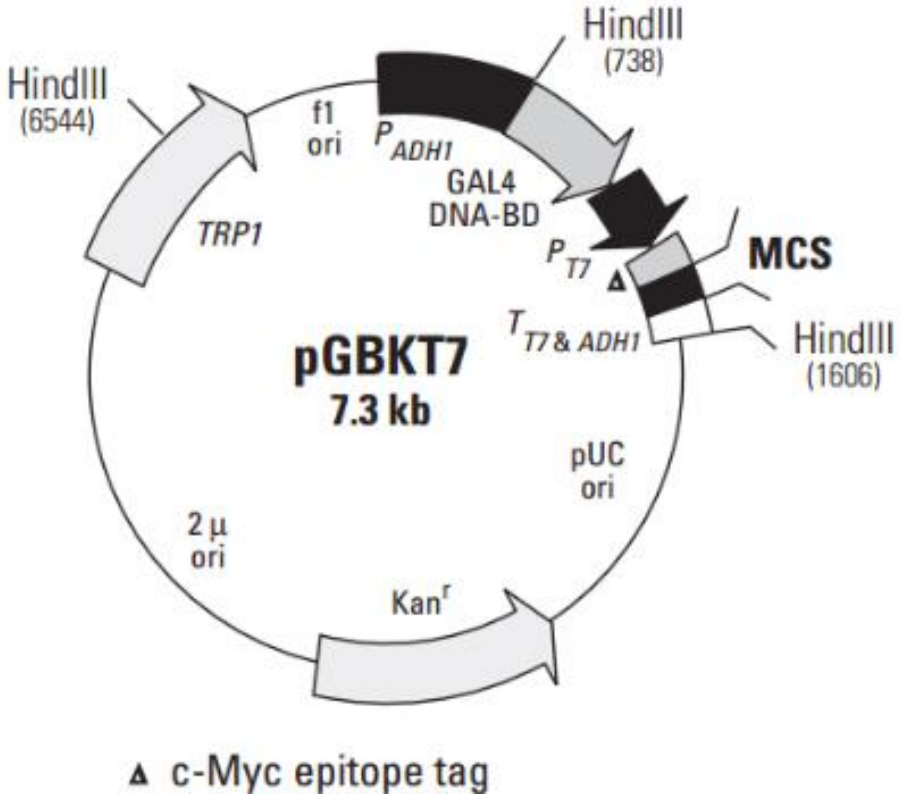
3.3 Wektory

Przygotowanie konstruktów genowych

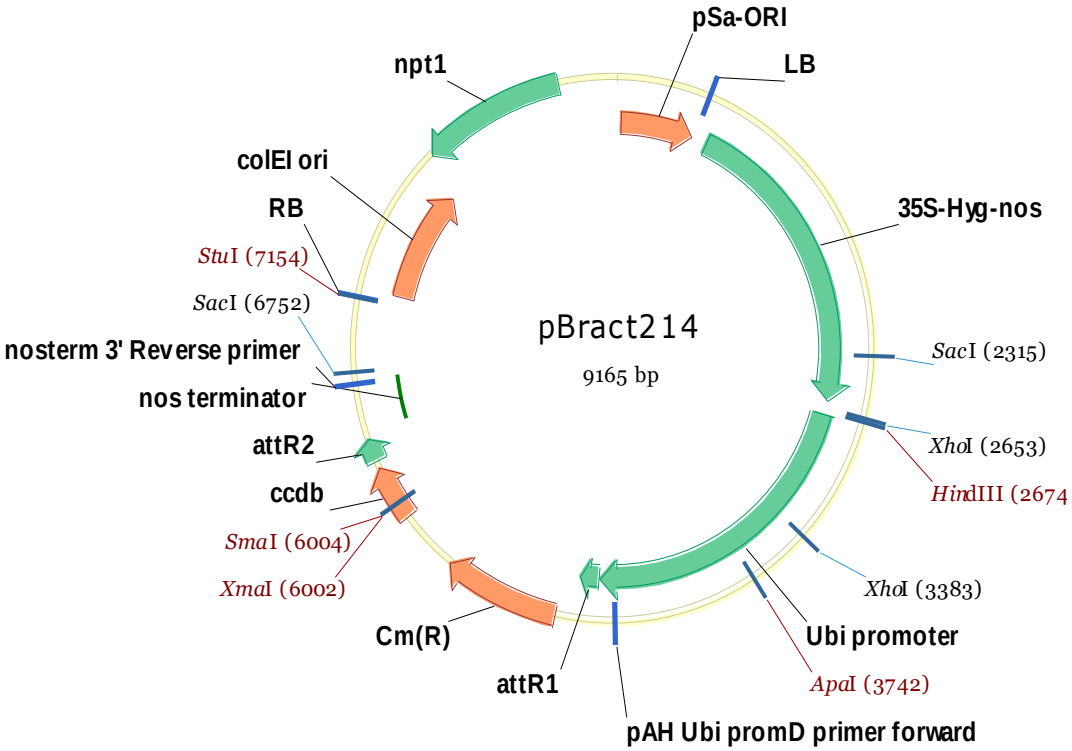
- pENTR/D-TOPO (ThermoFisher Scientific)
- pGEM T-easy (Promega)
- 17ACFEZC_GeneArt167_444_3_pENTR221(Invitrogen)- plazmid donor kompatybilny w systemie Gateway ™, zawierający sekwencję kodującą strukturę spinki do włosów pri-miRNA167h z wprowadzonym dojrzałym miRNA444c w miejsce miRNA176h



- pGBKT7 (Clontech)- plazmid kodujący sekwencję etykiety c-myc



- pBRACT214- wektor z promotorem ubikwitynowym, z serii pBRACT, zaprojektowany i dostosowany do nadekspresji w jęczmieniu jako wektor docelowy w systemie Gateway ™



jic.ac.uk

- pSoup helper- plasmid umożliwiający namnażanie plazmidu pBRACT214 w bakteriach *Agorbacterium tumefaciens*

3.4 Odczynniki i roztwory

ABA	Sigma Aldrich
agaroza	Prona
akryloamid	Sigma Aldrich
antybiotyki	Sigma Aldrich
azotan amonu	Sigma Aldrich
baktotrypton	Difco Laboratories

bromek etydyny	Bio-Rad
chlorek żelaza	Sigma Aldrich
COOMASSIE® Brilliant Blue G-250 dietylopirowęglan (DEPC)	Serva
diwodorofosforan potasu dodecylosiarczan sodu (SDS) EDTA	Sigma Aldrich
ekstrakt drożdżowy	Difco Laboratories
etanol 96%	POCH Gliwice
fenol	POCH Gliwice
izopropanol izopropylo-β-D-tiogalaktopiranozyd (IPTG)	Boehringer Mainheim
kwas borowy	Sigma Aldrich
mocznik	Sigma Aldrich
nadsiarczan amonu (APS)	Sigma Aldrich
sacharoza	Sigma Aldrich
siarczan magenzu	Sigma Aldrich
siarczan manganu	Sigma Aldrich
siarczan miedzi	Sigma Aldrich
siarczan potasu	Sigma Aldrich
Tris-HCL	Sigma Aldrich
Triton X-100	USB
β-merkaptoetanol	Sigma Aldrich

Enzymy

Odwrotna transkryptaza Super Script III (20U/µl)	Invitrogen
Gateway LR Clonase II	ThermoFisher Scientific
DreamTaq polimeraza DNA (5U/µl)	ThermoFisher Scientific
T4 DNA ligaza (5U/µl)	Promega
SYBR® Green PCR Master Mix	ThermoFisher Scientific
Inhibitor rybonukleaz RNasin®	Promega
Inhibitor proteaz Complete Mini EDTA-free	Roche

Markery molekularne

Gene RulerTM 1kb Plus	ThermoFisher Scientific
Gene RulerTM 100bp Plus	ThermoFisher Scientific
PageRulerTM Plus Prestained PageRulerTM Prestained	ThermoFisher Scientific

Zestawy odczynników:

SMARTer® RACE cDNA Amplification Kit (634860)	TakaraBio
GenElute Plasmid Miniprep Kit	Sigma Aldrich
GelElute Gel Extraction Kit	Sigma Aldrich
GenElute PCR Clean-Up Kit	Sigma Aldrich
Direct-zol RNA Mini Prep Kit	Zymo Research

Przeciwciała

Anty c-myc (AS15 3035)	Agrisera
anti-c-myc HRP (9E10 cat num# MA1-980-HRP)	Invitrogen
anti-BG1 (AS20 4419)	Agrisera
anti-H3 (ab18521)	Abcam
anti-rabbit (AS09 602)	Agrisera

3.5 Podstawowe odczynniki do hodowli bakterii

W pracy wykorzystano bakterie *Escherichia coli* szczepy DH5α oraz DB3, jak również *Agrobacterium tumefaciens* szczep AGL1.

Pożywka LB, objętość 200ml

Odczynnik	**Ilość**
Baktotrypton	2g
Ekstrakt drożdżowy	1g
NaCl	2g

Mieszaninę poddano sterylizacji w autoklawie 20min 121 °C. W celu przygotowania pożywki stałej, mieszaninę suplementowano 3g agaru oraz dodawano odpowiedni antybiotyk po ostudzeniu pożywki do 50 °C.

Pożywka MG/L, objętość1 litr:

Odczynnik	Ilość
Baktotrypton	5g
Mannitol	5g
Ekstrakt drożdżowy	2,5g
Kwas L-glutaminowy	1g
KH_2PO_4	250mg
NaCl	100mg
$MgS0_4$ x 7 H_20	100mg
Biotyna-roztwór 0.1mg/l	10ul

Po przygotowaniu mieszaniny ustalano pH7.2 przy użyciu 1M NaOH oraz poddano sterylizacji w autoklawie 20min 121 °C. W celu przygotowania pożywki stałej, mieszaninę suplementowano 15 g agaru oraz dodano odpowiedni antybiotyk po ostudzeniu pożywki do 50 °C.

Antybiotyki

Antybiotyk	Stężenie początkowe	Stężenie końcowe
Ampicylina	50 mg/ml	50 µg/ ml
Ryfampicylina	25mg/ml	25 µg/ ml
Kanamycyna	50 mg/ml	50 µg/ ml

3.6 Materiały do hodowli roślin

Pożywka roślinna stosowana w hodowli w perlicie:

Odczynnik	Stężenie
NH_4NO_3	28 mM
KH_2PO_4	20 mM
K_2SO_4,	4 mM
$MgSO_4x7H_2O$	16 mM
H_3BO_3	53 μM
$CuSO_4$	8 μM
$MnSO_4xH_2O$	4 μM
$FeCl_3x6H_2O$	120 μM

Pożywka po przygotowaniu została poddana filtrowaniu w warunkach sterylnych.

W przypadku stresu nadmiaru azotu w pożywce została zastosowana 10-krotnie większa ilość NH_4NO_3 w porównaniu do warunków kontrolnych. W przypadku zastosowania stresu nadmiaru i niedoboru miedzi podano odpowiednio pożywkę beż dodatku $CuSO_4$ lub z 10-krotnym nadmiarem.

Pożywka ½ MS w objętości 500ml:

Odczynnik	Ilość
Koncentrat MS	1,1g
Sacharoza	7,5g

Mieszaninę dopełniono do końcowej objętości wodą MilliQ, pH doprowadzono do wartości 5.5-5.6 oraz dodano agar (4g). Pożywkę poddano sterylizacji w autoklawie przez 20 minut w121°C.

3.7 Materiały do przeprowadzenia transformacji, selekcji i regeneracji zarodków jęczmiennych

Roztwory:

100-krotnie stężony roztwór witamin do pożywki indukującej kalus:

Odczynnik	**Ilość**
Tiamina HCl	100 mg/l
Mio-inozytol	35 g/l
Prolina	69 g/l

Przygotowana mieszanina została przefiltrowana w sterylnych warunkach oraz przechowywana w 4°C.

100-krotnie stężony roztwór witamin do pożywki przejściowej i odbudowującej:

Odczynnik	**Ilość**
Tiamina HCl	40mg/l
Mio-inozytol	10g/l

Przygotowana mieszanina została przefiltrowana w sterylnych warunkach oraz przechowywana w 4°C.

Roztwór $CuSO_4$:

Odczynnik	**Ilość**
$CuSO_4$x $5H_20$	125mg
H_20	100ml

Przygotowana mieszanina została przefiltrowana w sterylnych warunkach oraz przechowywana w -20°C.

Roztwór Timentin:

Odczynnik	**Ilość**
Timentin	160mg/ml
H_20	1ml

Przygotowana mieszanina została przefiltrowana w sterylnych warunkach oraz przechowywana w -20°C.

Roztwór Dicamba:

Odczynnik	**Ilość**
Dicamba	2,5mg/l
H_20	1000ml

Przygotowana mieszanina została przefiltrowana w sterylnych warunkach, podzielona na alikwoty po 1ml oraz przechowywana w -20°C.

Roztwór kwasu 2,4-dichlorofenoksyoctowego (2,4-D):

Odczynnik	**Ilość**
2,4-D	2,5mg/ml
100% C_2H_5OH	1ml

Przygotowana mieszanina została przefiltrowana w sterylnych warunkach oraz przechowywana w -20°C.

Roztwór 6-benzyloaminopuryna (BAP):

Odczynnik	**Ilość**
BAP	1mg
H_20	1ml

Do przygotowanej mieszaniny dodano dwie krople 1M NaOH, przefiltrowano roztwór sterylnych warunkach oraz przechowywano w -20°C.

Pożywka indukująca kalus:

Odczynnik	**Ilość**
Pożywka Murashige i Skoog (MO221 Duchefa)	4,3g/l
Maltoza	30g/l

Hydrolizat kazeiny	1,0g/l
100x stężony roztwór witamin	10ml/l
Roztwór Dicamba	1ml/l
Roztwór $CuSO_4$**x** $5H_20$	1ml/l
Phytagel	3,5g/l

Po przygotowaniu mieszaniny ustalono pH5.8 przy użyciu 1M NaOH oraz poddano mieszaninę sterylizacji w autoklawie przez 20 minut w 121°C. 100x stężony roztwór witaminowy, roztwór Dicamba i roztwór $CuSO_4$x $5H_20$ podano po sterylizacji, po ostygnięciu pożywki, bezpośrednio przed wylaniem na szalki.

Pożywka przejściowa:

Odczynnik	**Ilość**
Pożywka Murashige i Skoog pozbawiona NH_4NO_3 **(Duchefa MO238)**	2,7g/l
Maltoza	20g/l
NH_4NO_3	165mg/l
Glutamina	750mg/l
100x stężony roztwór witaminowy	10ml/l
Roztwór kwasu 2,4-dichlorofenoksyoctowego (2,4-D)	1ml/l
Roztwór $CuSO_4$**x** $5H_20$	1ml/l
Roztwór BAP	100µl/l
Phytagel	3,5g/l
Timentin 160mg/l	1ml/l
Hygromycyna	50mg/l

Po przygotowaniu mieszaniny ustalono pH5.8 przy użyciu 1M NaOH oraz poddano mieszaninę sterylizacji w autoklawie przez 20 minut w 121°C. 100x stężony roztwór witamin, 2,4-D, $CuSO_4x\ 5H_20$, BAP oraz timentin i hygromycynę podano po sterylizacji, gdy pożywka ostygła, bezpośrednio przed wylaniem na szalki.

Pożywka regenerująca:

Odczynnik	**Ilość**
Pożywka Murashige i Skoog pozbawiona NH_4NO_3 (Duchefa MO238)	2,7g/l
Maltoza	20g/l
NH_4NO_3	165mg/l
Glutamina	750mg/l
100x stężony roztwór witaminowy	10ml/l
Roztwór Timentin 160mg/l	1ml
Hygromycyna	50mg/l
Phytagel	3,5g/l

Po przygotowaniu mieszaniny ustalono pH5.8 przy użyciu 1M NaOH oraz poddano mieszaninę sterylizacji w autoklawie przez 20 minut w 121°C. Po ostudzeniu pożywki podano 100x stężony roztwór witamin, timentin i hygromycynę.

3.8 Materiały do analiz białkowych

Bufor do izolacji białek, objętość 10ml:

Odczynnik	**Ilość**
1M TRIS-HCl pH 7.5	500ul
5M NaCl	200ul
20% Triton X-100	125ul

50mM NaF	100ul
5mM Na_3VO_4	100ul
20% NP-40	125ul
200mM PMSF	50ul
1x inhibitor proteaz complete EDTA-free	200ul
10000xMG132- inhibitor proteasomu	1ul

Mieszanina została dopełniona wodą MilliQ do odpowiedniej objętości.

Elektroforeza białkowa

Obciążacz do białek 6xSSB

Odczynnik	**Ilość**
Tris-HCl	0,375M
Glicerol	60%
SDS	12%
β-merkaptoetanol	10 ul
TEMED	0,6M
Błękit bromofenolowy	0,06%

30% roztwór akryloamid:bisakryloamid (30%AA), objętość 100ml

Odczynnik	**Ilość**
Akryloamid	30g
Bisakryloamid	0,8g
Woda dejonizowana MiliQ	100ml

5% żel poliakrylamidowy zagęszczający

Odczynnik	Ilość
30% AA	900 ul
Tris-HCl pH=6.8	220 ul
10% SDS	17,5 ul
10%APS	10 ul
TEMED	2 ul
Woda dejonizowana MilliQ	1,22ml

13% żel poliakryloamidowy rozdzielający

Odczynnik	Ilość
30% AA	2,48 ml
Tris-HCl pH=8,6	1,825 ml
10% SDS	50 ul
10%APS	30 ul
TEMED	3 ul
Woda dejonizowana MilliQ	670 ul

Bufor Laemmli, 10x stężony, objętość 1litr

Odczynnik	Ilość
Tris-HCl	30g
Glicyna	144g
SDS	10g

Mieszaninę dopełniono wodą MilliQ do 1000ml.

Bufor 10x stężony TBS

Odczynnik	Ilość
Tris-HCl	24g
NaCl	88g

Mieszaninę dopełniono wodą MilliQ do 1000ml oraz ustalono pH=7.6

Bufor TBST

Odczynnik	Ilość
TBS	100ml
Woda MilliQ	900ml
Tween 20	1ml

Bufor TB

Odczynnik	Ilość
Tris-HCl	3,03g
Glicyna	14,4g
10% SDS	10ml
Woda MilliQ	800
Metanol	200ml

3.9 Materiały do hybrydyzacji Northern

15% żel poliakrylamidowy z 7M mocznikiem

Odczynnik	Ilość
Mocznik	31,5g
40% akryloamid	28,125ml
Bufor 10X MOPS	7,5ml
Woda MilliQ	43,125ml

Bufor 10xMOPS w objętości 1000ml

Odczynnik	Ilość
Woda MilliQ	800ml

MOPS	41,86g
Octan sodu	4,1g
Na_2EDTA	3,72g

pH mieszaniny doprowadzono do 7.0 oraz dopełniono mieszaninę wodą MilliQ do objętości 1litra.

Bufor hybrydyzacyjny w objętości 100ml

Odczynnik	**Ilość**
10% SDS	35ml
Na_2HPO_4	37,5ml
NaH_2PO4	12,5ml
Woda MilliQ	15ml

Bufor płuczący w objętości 1000ml

Odczynnik	**Ilość**
20xSSC	100ml
10% SDS	10ml
Woda MilliQ	890ml

Bufor sieciujący w objętości 12ml

Odczynnik	**Ilość**
1-metylimidazol	122,5ul
1M HCl	150ul
EDC	0,3765g
Woda MilliQ	4,5ml

3.10 Materiały wykorzystane w przygotowaniu bibliotek do głębokiego sekwencjonowania małych RNA i analizy transkryptomu

12% żel poliakrylamidowy z 7M mocznikiem

Odczynnik	Ilość
Mocznik	31,5g
40% akryloamid	28,125ml
Bufor 10X TBE	7.5ml
Woda MilliQ	43,125ml

Bufor EBR w objętości 20ml

Odczynnik	Ilość
1M octan magnezu	1ml
1M octan amonu	10ml
0.5M EDTA	40ul
10% SDS	200ul
Woda MilliQ	8,76ml

3.11 Materiały wykorzystane do przeprowadzenia ChIP-qPCR

Bufor 10-krotnie stężony PBS w objętości 100ml

Odczynnik	Ilość
NaCl	7,4g
$Na_2HPO_4xH_2O$	5,84g
$NaH_2PO_4x7H_20$	15,47g
H_20	Do 100ml

Bufor 1xPBS/1%formaldehyd w objętości na 500ml

Odczynnik	Ilość
10x PBS	50ml
36% formaldehyd	11,11ml
H_20	438,89ml

Bufor I w objętości na 500ml

Odczynnik	Ilość
2M sacharoza	50ml
1M Tris-HCl pH=8	11,11ml
1M MgCl	438,89ml
β-merkaptoetanol	0,14ml
0,1M PMSF	4ml
H_20	307,86ml

Bufor II w objętości na 50ml

Odczynnik	Ilość
2M sacharoza	10ml
1M Tris-HCl pH=8	0,5ml
1M MgCl	0,5ml
β-merkaptoetanol	0,0175ml
10% Triton X-100	5ml
0,1M PMSF	0,5ml
Complite EDTA	1ml
Pepstatyna A	0,2ml
H_20	37,28ml

Bufor III w objętości 10ml

Odczynnik	Ilość
2M sacharoza	8,5ml
1M Tris-HCl pH=8	0,1ml
1M MgCl	0,02ml
β-merkaptoetanol	0,0035ml

10% Triton X-100	0,15ml
0,1M PMSF	0,1ml
Complite EDTA	0,2ml
Pepstatyna A	0,04ml
H_20	1,04ml

Bufor lizujący w objętości 5ml

Odczynnik	Ilość
1M Tris-HCl pH=8	0,25ml
0,5M EDTA	0,1ml
10% SDS	0,5ml
0,1M PMSF	0,05ml
Complite EDTA	0,1ml
Pepstatyna A	0,02ml
H_20	3,98ml

Bufor do rozcieńczenia ChIP w objętości 50ml

Odczynnik	Ilość
1M Tris-HCl pH=8	0,835ml
0,5M EDTA	0,12ml
10% Triton X-100	5,5ml
2,5M NaCl	3,34ml
0,1M PMSF	0,5ml
Complite EDTA	1ml
Pepstatyna A	0,2ml
H_20	38,51ml

Bufor płuczący o niskiej zawartości soli w objętości 30ml

Odczynnik	Ilość
1M Tris-HCl pH=8	0,6ml
0,5M EDTA	0,12ml

10% Triton X-100	3,0ml
2,5M NaCl	1,8ml
10% SDS	0,3ml
H_20	24,18ml

Bufor płuczący o wysokiej zawartości soli w objętości 20ml

Odczynnik	**Ilość**
1M Tris-HCl pH=8	0,4ml
0,5M EDTA	0,08ml
10% Triton X-100	2ml
2,5M NaCl	4ml
10% SDS	0,2ml
H_20	13,32ml

Bufor płuczący zawierający LiCl w objętości 20ml

Odczynnik	**Ilość**
1M Tris-HCl pH=8	0,2ml
0,5M EDTA	0,04ml
0,5M LiCl	0,04ml
10% NP-40	2ml
10% Deoksycholan sodu	2ml
H_20	14,51ml

Bufor TE w objętości 30ml

Odczynnik	**Ilość**
1M Tris-HCl pH=8	0,3ml
0,5M EDTA	0,06ml
H_20	29,64ml

Bufor do elucji w objętości na 10ml

Odczynnik	**Ilość**
1M Tris-HCl pH=8	0,1ml

0,5M EDTA	0,02ml
10% SDS	1ml
H_20	8,64ml

3.12 Narzędzia bioinformatyczne

W niniejszej pracy wykorzystano następujące bazy jęczmiennych sekwencji gDNA i cDNA:

- Ensembl Plants (www.plant.ensembl.org/Hordeum_vulgare)
- James Hutton Institute (https://ics.hutton.ac.uk/morexGenes/)

Określenie budowy genów

W celu określenia budowy genów *MIR444c* i *MADS27*, uzyskane w wyniku eksperymentów 5' i 3' RACE sekwencje cDNA przyrównano do sekwencji genomowych znajdujących się w wyżej wymienionych bazach danych z wykorzystaniem narzędzia MAFFT wersja 7 (https://mafft.cbrc.jp/alignment/).

Analiza motywów regulatorowych znajdujących się w promotorach genów MIR444c i MADS27

W celu analizy elementów regulatorowych znajdujących się w promotorach genów *MADS27* i *MIR444c* wykorzystano narzędzie bioinformatyczne NEW PLACE (A Database of Plant Cis-acting Regulatory DNA Elements) (www.dna.affrc.go.jp).

Analiza danych wysokoprzepustowych

Podczas analizy danych pochodzących z głębokiego sekwencjonowania małych RNA użyto programu FASTX-Toolkit w celu usunięcia sekwencji adaptorów. Następnie przyrównanie otrzymanych sekwencji jęczmiennych małych RNA do sekwencji małych

RNA zdeponowanych w bazie miRBase (wydanie 22.1) wykonano przy użyciu skryptu countreads_microRNA.pl (Eminaga i inni 2013). Do obliczenia krotności zmiany i analizy statystycznej wykorzystano pakiet DESeq2 w środowisku programowania R. Podczas analizy danych RNA-seq wykorzystano program FASTQC do oceny jakości sekwencjonowania a następnie oprogramowanie Trimmomatic w celu usunięcia sekwencji adapterów. Otrzymane odczyty przyrównano do genomu i transkryptomu jęczmiennego z bazy Ensembl Plants przy użyciu programów HISAT2 i SALMON, natomiast analiza statystyczna została przygotowana z wykorzystaniem pakietu DESeq2 w środowisku programowania R (Love i inni 2014).

Przygotowanie konstruktu genomowego nadeksprymującego sztuczny miRNA

Do przygotowania konstruktu genomowego nadekspresjonującego sztuczny miRNA amiRMADS27, którego genem docelowym jest jęczmienny MADS27, wykorzystano narzędzie on-line – WMD3-Web MicroRNA Designer (www.wmd3.weigelworld.org).

Analiza systemu korzeniowego

Analizę systemów korzeniowych przeprowadzono za pomocą skanera Epson i oprogramowania WinRHIZO (Regent Instruments, Inc., Quebec, Kanada). Otrzymane dane zostały poddane dalszej analizie statystycznej w programie Statistica 13.1 (Kraków, Polska).

4. METODY:

4.1 Hodowla roślin

Nasiona jęczmienia jarego (*Hordeum vulgare,* odmiana Golden Promise) kiełkowano na mokrej, sterylnej bibule filtracyjnej typu Whatman przez 3 dni w komorze fitotronowej (MLR35-1H, Sanyo, Panasonic) w warunkach długiego dnia (16 godz.) w temperaturze 20 °C. Następnie sadzonki przeniesiono do doniczek (dwie sadzonki na jedną doniczkę) zawierającą perlit, poddany wcześniej sterylizacji w autoklawie i uzupełniono pożywką. Rośliny następnie hodowano w kontrolowanych warunkach, które obejmowały fotoperiod 16 h dzień/8 h noc w temperaturze 20°C w dzień i 15°C w nocy. W stresie niedoboru N nie podano do pożywki NH_4NO_3. W warunkach kontrolnych podano 28mM NH_4NO_3, a w przypadku nadmiaru N zastosowano 10-krotnie zwiększoną ilość NH_4NO_3 (280mM) (Lips i inni., 2008; Yao i inni., 2011; Heuermann i inni., 2021). W stresie niedoboru miedzi nie podano do pożywki $CuSO_4$ a w stresie nadmiaru miedzi podano jego 10-krotną ilość (kontrola-8 μM, nadmiar- 80 μM). W przypadku stresu światła rośliny rosły dwa tygodnie w warunkach całkowitej ciemności (warunki kontrolne- 600 umol światła).

Nasiona do eksperymentu badającego wrażliwość na kwas abscysynowy kiełkowano na szalkach zawierających pożywkę ½ MS suplementowaną 0.1M NaOH (w warunkach kontrolnych) lub 50 uM ABA oraz badano długość korzeni po tygodniu hodowli.

4.2 Eksperymenty z wykorzystaniem kwasów nukleinowych

Izolacja RNA i przygotowanie cDNA

Izolację RNA przeprowadzono z wykorzystaniem komercyjnego zestawu Direct-zol RNA Miniprep Kit (R2062, Zymo Research) zgodnie z zaleceniami producenta.

Jakość uzyskanego RNA oceniano przy użyciu spektrofotometru DeNovix DS -11 (Kijów, Ukraina) oraz żelu agarozowego 1,2%. RNA wykorzystany do przygotowania bibliotek małych RNA i RNA-seq został poddany analizie integralności RNA wyznaczając wartość RIN (RNA integrity number) z wykorzystaniem RNA Nano Chips i Agilent 2100 Bioanalyzer System (Agilent Technologies, USA, No.5067-1511). RNA wykazujący wartości RIN powyżej 8 był wykorzystany do przygotowania bibliotek małych RNA i RNA-seq.

W celu przygotowania matrycy cDNA, 15 µg totalnego RNA poddano reakcji z wykorzystaniem enzymu TURBO™ DNase (Thermo Fisher Scientific) według zaleceń producenta, a następnie godzinnej ekstrakcji w -80 ^{o}C mieszaniną fenol:chloroform oraz precypitacji z wykorzystaniem 3M octanu sodu i 100% etanolu. 3 µg tak przygotowanego RNA poddano reakcji odwrotnej transkrypcji przy użyciu odwrotnej transkryptazy SuperScript™ III Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific, numer katalogowy:18080093) według zaleceń producenta w obecności inhibitora rybonukleaz RNasin® Plus (Promega) przez 1h w 50^{o}C a następnie w 70^{o}C przez 15 minut. Reakcję poprzedzono 5 minutową inkubacją w 65 ^{o}C RNA z 10nM mieszaniną trifosfo-deoksynukleozydów oraz starterem oligo(dT)$_{18}$(Novazym). Przygotowaną matrycę cDNA rozcieńczono 4-krotnie.

Izolacja DNA

Izolację DNA wykonano z wykorzystaniem komercyjnego zestawu DNeasy Plant Mini Kit (Quaigen) według zaleceń producenta.

Szybka amplifikacja końców cDNA techniką 5'/3' RACE

Amplifikację pełnej długości cDNA genów *MIR444c* i *MADS27* wykonano przy użyciu komercyjnego zestawu odczynników SMARTer® RACE 5'/3' (Takara Bio,

USA). Matrycę do analizy 5’ i 3’ przygotowano z mieszaniny RNA pochodzącego z roślin na pięciu etapach rozwojowych jęczmienia (1,2,3,6- tydzień oraz 68 dzień). Do amplifikacji produktów użyto polimerazę Advantage 2 polymerase mix (Takara Bio, USA). Otrzymane produkty wklonowano do plazmidu pGEM T-easy (Promega) z wykorzystaniem ligazy T4 DNA (Thermo Fisher Scientific) oraz sekwencjonowano wklonowane produkty przy użyciu starterów M13. Sekwencje wszystkich oligonukleotydów użytych podczas wykonywania tej pracy są umieszczone w tabeli w sekcji materiały.

Przygotowywanie konstruktów genomowych

Nadekspresja jęczmiennego czynnika MADS27 z etykietą c-myc

Sekwencja kodująca jęczmienny czynnik transkrypcyjny MADS27 została zamplifikowana przy pomocy polimerazy Q5 High-Fidelity (New England BioLabs), według zaleceń producenta, na matrycy cDNA przygotowanej z RNA wyizolowanego z dwutygodniowych korzeni jęczmienia. Reakcję przeprowadzono przy użyciu starterów specyficznych dla tej sekwencji zawierających dodatkowe nukleotydy rozpoznawane przez enzym EcoRI (starter sensowny) i BamHI (starter antysensowny). Produkt reakcji PCR oczyszczono z wykorzystaniem zestawu komercyjnego GenJet PCR Puryfication Kit (ThermoFisher Scientific) oraz poddano trawieniu restrykcyjnemu w 37°C przez 1h i ponownie oczyszczono. Jednocześnie plazmid pGBKT7 niosący etykietę c-myc został poddany trawieniu restrykcyjnemu oraz oczyszczeniu. W kolejnym kroku przeprowadzono ligację sekwencji kodującej MADS27 do wektora pGBKT7 przy pomocy ligazy T4 DNA (ThermoFisher Scienitific) przez 3 godziny w temperaturze pokojowej. Mieszanina ligacyjna posłużyła do transformacji chemicznie kompetentnych komórek *E. coli* szczep DH5α. Bakterie posiewano na stałą pożywkę LB suplementowaną

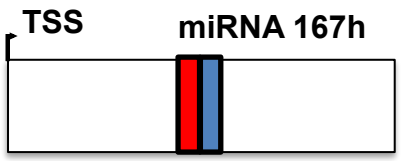
odpowiednim antybiotykiem. Uzyskany plazmid posłużył jako matryca do amplifikacji sekwencji kodującej MADS27 z etykietą c-myc. W tym celu wykorzystano starter sensowny specyficzny dla etykiety c-myc oraz zawierający dodatkowe nukleotydy (CACC oraz sekwencję Kozak) i starter antysensowny specyficzny dla końca 3' sekwencji kodującej MADS27. Do amplifikacji ponownie użyto polimerazę Q5 High-Fidelity (New England BioLabs), według zaleceń producenta. Otrzymany produkt wklonowano do wektora pENTR/D-TOPO wykorzystując 5-minutową reakcję topoizomerazy I, zgodnie z zaleceniami producenta systemu Gateway. Otrzymany plazmid poddano trawieniu restrykcyjnemu z wykorzystaniem enzymem Pvu I, który rozpoznaje miejsce restrykcyjne w genie zapewniającym odporność na kanamycynę, oraz oczyszczono, a następnie stosowano enzym Gateway LR Clonase II Enzyme Mix (ThermoFisher Scientific) w celu przeniesienia wstawki do wektora docelowego-pBRACT214, którym transformowano elektrokompetentne bakterie *Agrobaceterium tumefaciens* szczep AGL1.

Nadekspresja sztucznego miRNA- amiRMADS27

W celu przygotowania konstruktu genomowego nadeksprymującego sztuczne miRNA, dla którego genem docelowym jest jęczmienny MADS27 skorzystano z narzędzia internetowego -WMD3- Web MicroRNA Designer (www.wmd3.weigelworld.org), zastrzegając pełną komplementarność pomiędzy zaprojektowanym sztucznym miRNA a genem docelowym. Następnie skorzystano z usługi GeneArt (ThermoFisher Scientific) oraz zamówiono plazmid kompatybilny w systemie Gateway zawierający sekwencję prekursora jęczmiennego pre-miRNA67h, w którym dojrzała cząsteczka miRNA i jego miRNA* została zastąpiona przez sztuczne amiRMADS27 i amiRMADS27* (patrz Rysunek 1). Tak zaprojektowany plazmid poddano trawieniu restrykcyjnemu z

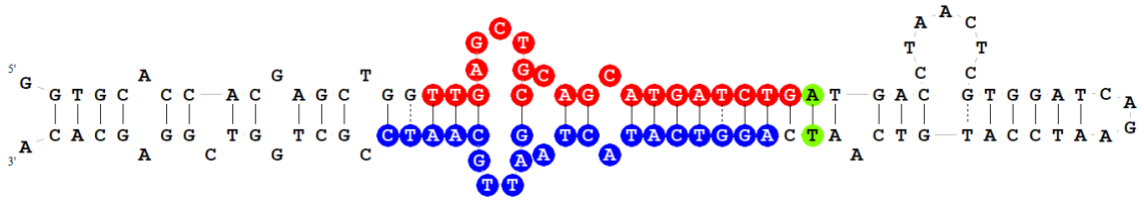
wykorzystaniem enzymem Pvu I, który rozpoznaje miejsce restrykcyjne w genie zapewniającym odporność na kanamycynę oraz oczyszczono, a następnie przeprowadzono reakcję z wykorzystaniem enzymu Gateway LR Clonase II Enzyme Mix (ThermoFisher Scientific) w celu przeniesienia wstawki do wektora docelowego-BRACT214, którym transformowano elektrokompetentne bakterie *A. tumefaciens* szczep AGL1.

a



b

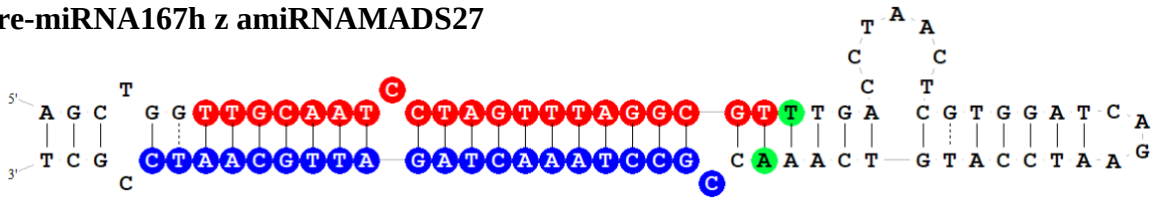
Pre-miRNA167h



ΔG=-42.91

c

Pre-miRNA167h z amiRNAMADS27



ΔG=-44.51

Rysunek 1 amiRMADS27 w prekursorze miRNA167h. (a) Struktura jęczmiennego genu MIR167h gdzie czerwony słupek oznacza pozycję dojrzałego miRNA167h a niebieski miRNA*. TSS- miejsce startu transkrypcji. (b) Struktura i sekwencja pre-miRNA167h, gdzie czerwony kolor pokazuje dojrzałą sekwencję miRNA167h a niebieski miRNA*. Nukleotydy zaznaczone na zielono zostały zmienione w prekursorze amiRMADS27 w celu poprawy struktury spinki do włosów. (c) Pre-miRNA167h z amiRMADS27 i jego zaprojektowanym miRNA*. ΔG= Wartość energii swobodnej Gibbsa poszczególnych pre-miRNA.

Transformacja bakterii *Escherichia coli* szczep DH5α i DB3 oraz *A. tumefaciens* szczep AGL1

Komórki bakterii *Escherichia coli* po wprowadzeniu w stan kompetencji były przechowywane w zamrażarce, w temperaturze -80 °C w 1,5 ml probówkach (Eppendorf). Przed przystąpieniem do transformacji, komórki rozmrażano w lodzie przez 20 minut. Następnie do rozmrożonych komórek dodawano 10 µl mieszaniny ligacyjnej lub 5 µl reakcji LR Clonase, mieszano i inkubowano w lodzie przez 30 minut. Po 30 minutach inkubacji mieszaninę poddawano stresowi termicznemu w temperaturze 42 °C przez 1 minutę i ponownie umieszczano w lodzie na 2 minuty. Następnie dodawano 300 µl płynnej pożywki LB, hodowano przez 1,5 godziny w 37 °C na termobloku z wytrząsaniem 350rpm i posiewano na płytki ze stałą pożywką LB z dodatkiem odpowiedniego antybiotyku. Szalki następnie umieszczano w cieplarce 37 °C na 16 godzin. Po wyselekcjonowaniu odpowiednich kolonii bakterii *E. coli* zaszczepiano nimi 5 ml płynnej pożywki LB z dodatkiem odpowiedniego antybiotyku i hodowano z wytrząsaniem 200 rpm przez 16 godzin w 37 °C. Po tym czasie przystąpiono do izolacji plazmidów, którą prowadzono zgodnie z protokołem producenta zestawu odczynników GenElute™HP plazmid Miniprep Kit (ThermoFisher Scientific).

Komórki bakterii A. tumefaciens

Komórki bakterii *A. tumefaciens* po wprowadzeniu w stan kompetencji były przechowywane w zamrażarce, w temperaturze -80 °C w 1,5 ml probówkach (Eppendorf). Przed przystąpieniem do transformacji, komórki rozmrażano w lodzie przez 10 minut. Następnie do rozmrożonych komórek dodawano 100ng plazmidu pBRACT214 z odpowiednią wstawką i 50ng plazmidu pSoup helper. Następnie bakterie przeniesiono do kuwety do elektroporacji o szerokości szczeliny 1mm (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruher, Niemcy) oraz poddano elektroporacji przy napięciu 2400 volt z użyciem Bio-Rad Gene Pulser Xcell (Bio-Rad, Hercules,Kalifornia, USA). Następnie komórki inkubowano w temperaturze 28 °C przez 3 godziny po czym posiewano na płytki ze stałą pożywką LB z dodatkiem odpowiednich antybiotyków oraz inkubowano przez 48h w 28 °C. Po wyselekcjonowaniu odpowiednich kolonii niosących pożądaną wstawkę zaszczepiono kolonie bakterii *Agrobacterium* do pożywki płynnej MG/L z odpowiednimi antybiotykami i inkubowano w 28 °C 300 rpm w celu przygotowania *inoculum* do transformacji zarodków jęczmiennych.

PCR w czasie rzeczywistym

Reakcję prowadzono z wykorzystaniem odczynnika Power SYBR® Green PCR Master Mix (ThermoFisher Scientific) i aparatu 7900HT Fast Real-Time PCR System lub QuantStudio™ 7 Flex Real-Time PCR System (ThermoFisher Scientific). Mieszanina reakcyjna (10 µl) składała się z: 5 µl odczynnika 2X Power SYBR Green PCR MasterMix, 1 µl matrycy cDNA oraz pary specyficznych starterów (200 nM każdy).

Stosowano następujący profil termiczny:

Etap	Temperatura	Czas	Ilość cykli
Denaturacja wstępna	95^0C	10 min	1
Denaturacja	95^0C	15 s	40
Przyłączenie starterów i amplifikacja	60^0C	1 min	
Krzywa topnienia	95^0C	15 s	1
	60^0C - 95^0C	30 min	1

Poziom ekspresji wyliczano stosując_metodę 2^-ΔCt, natomiast względny poziom ekspresji przy zastosowaniu metody 2^-ΔΔCt. W celu normalizacji danych wykorzystywano poziom 61-nukleotydowego fragmentu mRNA jęczmiennego czynnika rybozylacji ADP 1 (GeneBank: AJ508228.2,) który oznaczano jednocześnie z badanymi transkryptami. W celu analizy istotności różnic między próbami kontrolnymi i badanymi, stosowano Test t-Studenta oprogramowania Microsoft Excel (* $p<0,05$, ** $p<0,01$, *** $p<0,001$). Analizy te prowadzono z wykorzystaniem wartości poziomu ekspresji genów, uzyskanych metodą 2^-ΔCt.

Hybrydyzacja Northern

Totalny RNA poddano rozdziałowi elektorforetycznemu z wykorzystaniem 15 % żelu poliakrylamidowego z 7M mocznikiem przy 300V. Następnie przeprowadzono transfer RNA na membranę nitrocelulozową Amersham przez 1 godzinę przy 20V. Po ukończeniu transferu membranę umieszczono na papierze typu Whatmann nasączonym buforem sieciującym i inkubowano przez 2h w 55^0C. Usieciowaną membranę poddano pre-hybrydyzacji inkubując w buforze hybrydyzującym przez 3h w 37^0C po czym dodano

radioaktywne sondy specyficzne dla U6 snRNA oraz dla amiRMADS27 i prowadzono inkubację przez noc w 37^0C, odmyto membranę buforem płuczącym oraz nastawiono ekspozycję przy użyciu kasety RTG z ekranem wzmacniającym. Po 48 godzinach odczytano sygnał za pomocą skanera FLA500.

Znakowanie radioaktywne sond

Znakowanie sond przeprowadzono z wykorzystaniem ATP, [γ-^{32}P] - 6000Ci/mmol 10mCi/ml (Hartmann-analytic, Niemcy) oraz kinazy polinukleotydowej T4 (New England Biolabs) według zaleceń producenta. Następnie mieszaninę reakcyjną inkubowano 30 minut w 37^0C, 20 minut w 65 ^{0}C oraz oczyszczono na kolumienkach wypełnionych złożem zetadex (emp Biotech) według zaleceń producenta.

Przygotowanie bibliotek małych RNA

Totalny RNA wykazujący wartość RIN powyżej 8 został rozdzielony na 15% żelu poliakryloamidowym w buforze TBE z 7M mocznikiem przy 300V, a następnie żel inkubowano z wykorzystaniem odczynnika SYBR™ Gold Nucleic Acid Gel Stain (Thermo Fisher Scientific numer katalogowy: S11494) w ciemności, przez 20 minut. Z żelu wycięto frakcję RNA odpowiadającą długości 17-30 nukleotydów, fragmenty żelu przeniesiono do probówek 1,5ml Eppendorf typu LoBind (Eppendorf, numer katalogowy:0030122348), żel rozdrobniono oraz dodano 450 µl buforu elucyjnego EBR i inkubowano w 25 ^{0}C przez noc przy 300rpm. W kolejnym kroku do prób dodano 225 µl mieszaniny chloroformu i alkoholu izoamylowego a następnie 225 µl kwaśnego fenolu o pH4.5, mieszano i wirowano na najwyższych obrotach wirówki przez 5 minut. Do fazy wodnej dodano 1,5 µl odczynnika GlycoBlue (Thermo Fisher Scientific) oraz 45 µl 3M octanu sodu i 1350 µl 100% etanolu. Mieszaninę inkubowano przez noc w -20 ^{0}C po czym odwirowano na najwyższych obrotach wirówki przez 5 minut, odrzucono

supernatant, a uzyskany osad rozpuszczono w 5 µl sterylnej wody dołączonej do zestawu komercyjnego Illumina TruSeq Small RNA Library Prep. W dalszych krokach przygotowano biblioteki małych RNA zgodnie z zaleceniami producenta zestawu. Otrzymane biblioteki cDNA oczyszczono poprzez rozdział elektroforetyczny w 15% żelu poliakrylamidowym z glicerolem przy 150V oraz precypitację jak poprzednio, ale używając fenolu wysyconego Tris-HCl pH7.5. Jakość otrzymanych bibliotek oceniono przy użyciu Agilent 2100 Bioanalyzer, z wykorzystaniem High Sensitivity DNA chip (Agilent Tchnologies, Niemcy), stężenie zmierzono przy użyciu Fluorometru Qubit 2.0 (Thermo Fisher Scientific), a następnie przygotowano mieszaninę bibliotek w stężeniu 10 nM każda oraz wysłano tak przygotowaną mieszaninę do sekwencjonowania.

Przygotowanie bibliotek do sekwencjonowania transkryptomu

15 µg totalnego RNA zostało poddane reakcji z wykorzystaniem enzymu TURBO™ DNase (Thermo Fisher Scientific) zgodnie z zaleceniami producenta, a następnie ekstrakcji mieszaniną fenol:chloroform oraz precypitacji z wykorzystaniem 3M octanu sodu i 100% etanolu. Jakość otrzymanego RNA analizowano przy użyciu Agilent 2100 Bioanalyzer i RNA 6000 Nano chip (Agilent Tchnologies, Niemcy). Próby wykazujące wartość RIN powyżej 8 zostały pozbawione rRNA przy użyciu komercyjnego zestawu RiboMinus ™ Plant Kit for RNA-Seq (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific). Następnie stężenie otrzymanego RNA wyznaczono wykorzystując fluorometrem Qubit 2.0 (Thermo Fisher Scientific). 100ng RNA z każdej próby użyto do przygotowania bliblioteki przy użyciu komercyjnego zestawu NEB Ultra II Directional RNA Library Prep Kit for Illumina (New England BioLabs) postępując według zaleceń producenta. Przygotowane biblioteki oczyszczono z wykorzystaniem kuleczek magnetycznych NEBNext Sample Purification Beads (New England BioLabs).

Jakość przygotowanych bibliotek analizowano z wykorzystaniem Agilent 2100 Bioanalyzer oraz High Sensitivity DNA Chip. Stężenie poszczególnych bibliotek zmierzono fluorometrem Qubit 2.0 (Thermo Fisher Scientific).

Immunoprecypitacja chromatyny

Dwutygodniowe rośliny jęczmienia nadeksprymujące MADS27 z etykietą c-myc zostały zanurzone w kolbach w 37,5 ml buforu 1xPBS/1%formaldehyd. Kolby następnie umieszczono w eksykatorze i uruchomiono pompę próżniową dwa razy na okres 10 minut. Po tym czasie do kolb dodano 2,5 ml 2M glicyny, wymieszano oraz uruchomiono pompę na 5 minut. Otrzymane rośliny przemyto wodą MilliQ, osuszono oraz zamrożono w ciekłym azocie. Korzenie roślin roztarto w moździerzu oraz pobrano 2 gramy tkanki na jedną reakcję immunoprecypitacji.

Do roztartej tkanki dodano 30 ml buforu I oraz przefiltrowano materiał przez siateczkę Miracloth, a następnie wirowano 20 minut w rotorze wychylnym przy w 4000xg 4 ^{o}C. Następnie otrzymany osad jądrowy zawieszono w buforze II oraz wirowano 10 minut 1000xg w 4 ^{o}C. Płukanie powtórzono 3 razy do uzyskania białego osadu. Następnie otrzymany osad rozpuszczony w buforze II nawarstwiono na 900 ul buforu III i wirowano 15 minut przy 16 000xg w 4 ^{o}C. Otrzymany osad zawieszono w 300 ul buforu do sonikacji oraz sonikowano przez 14 cykli w trybie „medium" przy interwale 30 sekund (Bioruptor Pico). W celu weryfikacji procesu sonikacji przed i po procesie pobrano alikwoty 15 ul, które inkubowano z RNAzą A oraz proteinazą K oraz rozdzielano na 1,2% żelu agarozowym obserwując pofragmentowaną chromatynę w postaci rozmytego prążka poniżej wysokości 500 par zasad. W kolejnym kroku próby wirowano przez 5 minut przy 3000xg w 4 ^{o}C oraz zawieszano w buforze do immunoprecypitacji. Następnie przeprowadzono reakcję immunoprecypitacji z wykorzystaniem 40ug otrzymanej

chromatyny na każdą reakcję, kulek magnetycznych oraz 2 µg przeciwciała anty c-myc (Agrisera, AS15 3035). Jednocześnie przeprowadzono reakcje kontrolne z wykorzystaniem materiału z roślin typu dzikiego z przeciwciałem oraz materiału z roślin nadeksprymujących MADS27 z etykietą c-myc, do których nie podano przeciwciała. Próby inkubowano na rotorze obrotowym przez noc w 4 ^{o}C. Następnie dokonano serii płukań w 4 ^{o}C: dwukrotnie buforem o niskiej zawartości soli, raz buforem o wysokiej zawartości soli, następnie buforem z LiCl oraz dwukrotnie buforem TE. W następnym kroku przeprowadzono elucję dodając do przemytych kulek magnetycznych ze związanymi fragmentami chromatyny 100 ul buforu elucyjnego oraz inkubując w 65 ^{o}C wytrząsając 8000 rpm przez 30 minut. Otrzymane DNA posłużyło jako matryca do reakcji PCR w czasie rzeczywistym.

4.3 Eksperymenty z wykorzystaniem białek

Ekstrakcję białek z materiału roślinnego przeprowadzono z wykorzystaniem buforu do ekstrakcji. Do 300mg roztartego w ciekłym azocie materiału podano 300µl buforu, wymieszano, a następnie inkubowano w 4 ^{0}C przez godzinę wytrząsając przy 1000 rpm. Następnie próby odwirowano na maksymalnych obrotach wirówki przez 5 minut a otrzymany supernatant stanowiący ekstrakt białkowy zamrożono w ciekłym azocie do ponownego użycia.

20 µl otrzymanych ekstraktów białkowych wymieszanych z obciążaczem 6xSSC nałożono na żel białkowy składający się z 13% żel poliakrylamidowy rozdzielający i 5% żelu zagęszczającego oraz prowadzono elektroforezę przy 150V przez 1,5h. Następnie przystąpiono do transferu białek na membranę. Po wyjęciu żelu z szybek oddzielano żel zagęszczający i korek. Membranę aktywowano w metanolu przez 15 sekund, po czym inkubowano po 2 min w wodzie dejonizowanej i buforze do transferu. Na trzy warstwy

bibuły Whatman nakładano zaktywowaną membranę, następnie żel z rozdzielonymi białkami i przykrywano trzema kolejnymi warstwami bibuły i rolowano w celu usunięcia pęcherzyków powietrza. Transfer prowadzono przy napięciu 15V przez 60min.

Po zakończeniu procesu transferu, membranę blokowano 5% mlekiem odtłuszczonym rozpuszczonym w TBST przez godzinę w temperaturze pokojowej. Po blokowaniu, membranę inkubowano przez godzinę w temperaturze pokojowej w roztworze przeciwciała I-rzędowego (ant c-myc 1:1000 Agrisera, AS15 3035) sporządzonego w 5% roztworze mleka odtłuszczonego. Membranę następnie czterokrotnie płukano buforem TBST (po 10 min) i inkubowano przez godzinę w temperaturze pokojowej w roztworze przeciwciała II rzędowego (1:10000), koniugowanego z peroksydazą chrzanową. Po inkubacji membranę czterokrotnie płukano buforem TBST i nakładano na 5 min substrat Amersham ECL Western Blotting Detection Reagents (500 µl odczynnik A + 500 µl odczynnik B, uprzednio zmieszane). Detekcję prowadzono przy zastosowaniu urządzenia G-Box i oprogramowania Gene-Sys.

4.4 Transformacja niedojrzałych zarodów jęczmiennych

Izolacja niedojrzałych zarodków jęczmiennych

Kłosy jęczmienia zostały zebrane, gdy zarodki osiągnęły średnicę ok 2mm. Nasiona kłosów poddano sterylizacji w 70% etanolu przez 2 minuty, a następnie w sterylnych warunkach przemyto dwa razy wodą oraz kontynuowano sterylizację w 10% podchlorynie sodu przez 4 minuty, po czym wykonano 4-krotne przemycie nasion wodą. Następnie przy użyciu sterylnej pęsety i binokularu z zebranych nasion wyekstrahowano niedojrzałe zarodki oraz usunięto osi zarodkowe i przeniesiono materiał na szalkę z pożywką indukującą kalus. 25 zarodków zostało umieszczonych na jednej szalce. 300

zarodków zostało przeznaczone do transformacji jednym konstruktem genomowym. Tak przygotowane szalki przechowywano w 23 °C w ciemności przez noc.

Przygotowanie kultury *A. tumefaciens* do transformacji niedojrzałych zarodków jęczmienia

Kolonię *A. tumefaciens* szczep AGL1 niosącą odpowiedni plazmid pBRACT razem z plazmidem pSoup zaszczepiono do 10ml pożywki MG/L z 25 µg/ml ryfampicyliny oraz 50 mg/l kanamycyny i inkubowano przez 40h w 28 °C przy wytrząsaniu 200 rpm. Następnie do kultury dodano 10ml 30% glicerolu i wymieszano. Powstałą mieszaninę podzielono na alikwoty po 400 µl i inkubowano przez 2h w temperaturze pokojowej, mieszając co 30 minut. Tak przygotowane inokulum przechowywano w -80 °C. Dzień przed planowaną transformacją częścią inokulum zaszczepiono 10ml pożywki MG/L bez antybiotyków i inkubowano 18h w 28 °C przy wytrząsaniu 200 rpm. Jednorazowo użyto 200 µl kultury do transformacji jednej szalki niedojrzałych zarodków jęczmiennych.

Transformacja niedojrzałych zarodków jęczmienia

Kroplę inokulum naniesiono na powierzchnię każdego wcześniej inkubowanego przez noc w ciemności niedojrzałego zarodka jęczmiennego, następnie szalkę ułożono tak, aby nadmiar kultury spłynął na dno. Szalkę pozostawiono na 10 minut do wyschnięcia. W kolejnym kroku wszystkie zarodki przeniesiono na nową, czystą szalkę z pożywką indukującą kalus. Szalki inkubowano przez 3 dni w 23 °C w ciemności.

Selekcja i regeneracja roślin transgenicznych

Następnie przeniesiono zarodki na pożywkę przejściową, którą suplementowano timentinem 160 mg/l i hygromycyną 50 mg/l oraz inkubowano szalki jak poprzednio

przez okres 2 tygodni. Ten etap powtórzono dwa razy uzyskując całkowity okres selekcji na pożywce przejściowej - 6 tygodni. Otrzymane kalusy przeniesiono na pożywkę regeneracyjną i inkubowano przez 2 tygodnie w świetle w 24 °C. Po 2 tygodniach kalusy wykazujące obecność zielonych rejonów zostały przeniesione na świeżą pożywkę regeneracyjną, na której pozostały do utworzenia sadzonek o 2-3 cm pędach. Powstałe sadzonki zostały przeniesione do plastikowych tub ukorzeniających wypełnionych pożywką regeneracyjną. Gdy pęd roślin wypełnił wnętrze tub, sadzonki zostały przeniesione do doniczek.

4.5 Analiza systemu korzeniowego

Aby przeanalizować strukturę systemu korzeniowego roślin WT i mutantów z wyciszonym lub nadeksprymowanym MADS27 rośliny rosły w komorze Conviron w warunkach 20°C 16 godz. oraz 15°C 8 godz. w doniczkach zawierających perlit uzupełniony odpowiednią pożywką. (Lips i inni., 2008; Yao i inni., 2011; Heuermann i inni., 2021). Po dwóch tygodniach zebrano rośliny, odcięto korzenie i umieszczono w kuwecie wypełnionej wodą oraz zeskanowano za pomocą skanera Epson w rozdzielczości 300 dpi przy współpracy z oprogramowaniem WinRHIZO (Regent Instruments, Inc., Quebec, Kanada). Przenalizowano około 20 roślin na konkretny wariant oraz wyznaczono całkowitą długość systemu korzeniowego. Analizę statystyczną przeprowadzono za pomocą programu Statistica 13.1 (Kraków, Polska). Normalność próbek oceniano testem Shapiro-Wilka, a następnie zastosowano test Kruskala-Wallisa.

4.6 Analiza wrażliwości korzeni na kwas abscysynowy

Kiełkujące sadzonki jęczmienia roślin typu WT i mutantów MADS27 hodowano na płytkach ½ MS, 4 nasiona na płytkę i 3 płytki dla wariantu w komorze fitotronowej

(MLR35-1H, Sanyo, Panasonic) w warunkach długiego dnia w 20°C z suplementacją 0,1M NaOH w warunkach kontrolnych lub 50uM ABA rozpuszczonym w 0,1M NaOH. Po tygodniu wykonano pomiary korzeni roślin i przeprowadzono ich analizę statystyczną za pomocą programu Excel i standardowego testu t-Studenta.

4.7 Pomiar stężenia azotu i kwasu abscysynowego w korzeniach

Rośliny przeznaczone do pomiarów N i ABA rosły w komorze Conviron w warunkach 20°C 16 godz. oraz 15°C 8 godz. w doniczkach zawierających perlit uzupełniony odpowiednią pożywką. W celu zahamowania biosyntezy ABA pożywkę suplementowano 100 µM Norflurazonu (Sigma nr kat.: 34364) (Dong i inni. 2013; Wang i inni., 2020). Około 200 mg roztartych w ciekłym N korzeni inkubowano przez noc w chłodni w mieszaninie 80% acetonitrylu z 5% kwasem mrówkowym i 1 mM BHT oraz wzorcem wewnętrznym, deuterowanym ABA (10 ng/próbkę). Następnie dodano siarczan magnezu i chlorek sodu w stosunku 1:3 i próbki worteksowano przez 1 minutę, odwirowano przez 8 minut z maksymalną prędkością (14000xg). Do otrzymanych supernatantów dodano siarczan sodu, a próbki zworteksowano i odwirowano jak poprzednio. Otrzymany supernatant osuszono w strumieniu azotu w 45°C, a pozostałość zawieszono w 1M kwasie mrówkowym. Próbki poddano następnie ekstrakcji przy użyciu kolumn oktadecylowych C18 z fazą stałą (kolumny J.T. Baker C18 #7020-01), osuszono w strumieniu azotu w temperaturze 45°C, a pozostałość zawieszono w 100 µl 80%. Przygotowane próby poddano analizie w wykorzystaniem ultra-ciśnieniowej chromatografii cieczowej połączonej z tandemową spektrometrią mas (UHPLC-MS/MS) System Shimadzu Nexera XR UHPLC/LCMS-8045, (Kyoto, Japonia) z kolumną Ascentis Express C-18 (2,7 µm, 100 × 2,1 mm, Supelco, USA). Następnie otrzymane

powierzchnie pików: standardowego i endogennego ABA wyeksportowano do pliku Excel i przeanalizowano według wzoru: (powierzchnia piku endogennego ABA/powierzchnia wewnętrznego standardu)*10/waga użytej tkanki w gramach. Otrzymane wyniki podzielono przez współczynnik korelacji 0,98 i poddano analizie statystycznej za pomocą testu t-Studenta. Stężenie N w próbkach oznaczano za pomocą analizatora elementarnego Flash 2000 (Thermo Fisher Scientific, USA). Kalibrację przyrządu przeprowadzono przy użyciu standardowego BBOT (2,5-bis-(tert-butylo-benzoksazol-2-ilo)tiofen) (Thermo Fisher Scientific, USA) i certyfikowanego materiału odniesienia Alfalfa (Elemental Microanalysis Ltd., UK). Dla oznaczenia pierwiastka N wykreślono sześciopunktową krzywą kalibracyjną, stosując jako metodę kalibracji współczynnik K (Rybak i inni., 2020).

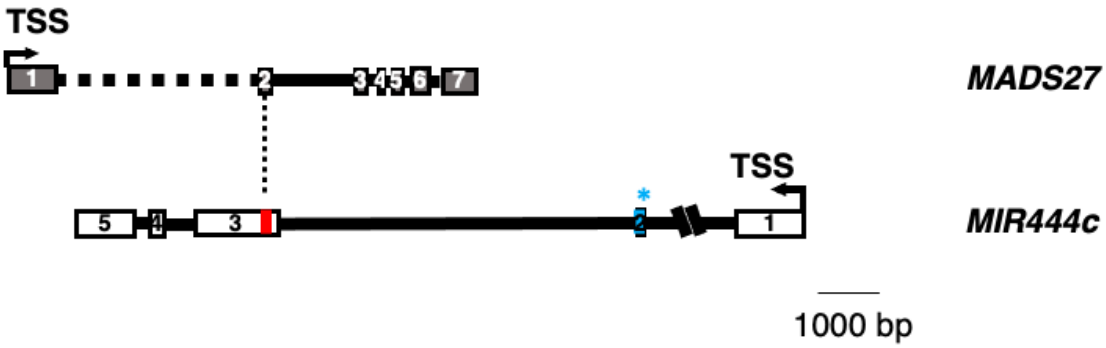
5. Wyniki

5.1 Budowa genów *HvMADS27* i *MIR444c* oraz analiza wzoru ekspresji hvMADS27 i miRNA444c.

Wstępne wyniki uzyskane w Zakładzie Ekspresji Genów wykazały obecność trzech członków rodziny MIR444 (miRNA444a, miRNA444b oraz miRNA444c) w genomie jęczmienia. Przedmiotem niniejszej pracy jest hvMADS27 oraz miRNA444c. Na podstawie danych zawartych w bazach jęczmiennych sekwencji genomowych i cDNA wykazano, że na nici DNA przeciwległej do nici kodującej *MIR444c* znajduje się gen *hvMADS27*. W celu pełniejszej charakterystyki budowy tych genów wykonano eksperyment 5’ i 3’ RACE pozwalający na amplifikację pełnej długości cDNA, dzięki wspólnemu działaniu oligonukleotydu SMARTer II A i odwrotnej transkryptazy SMARTScribe zawartej w zestawie komercyjnym firmy TakaraBio. W procesie

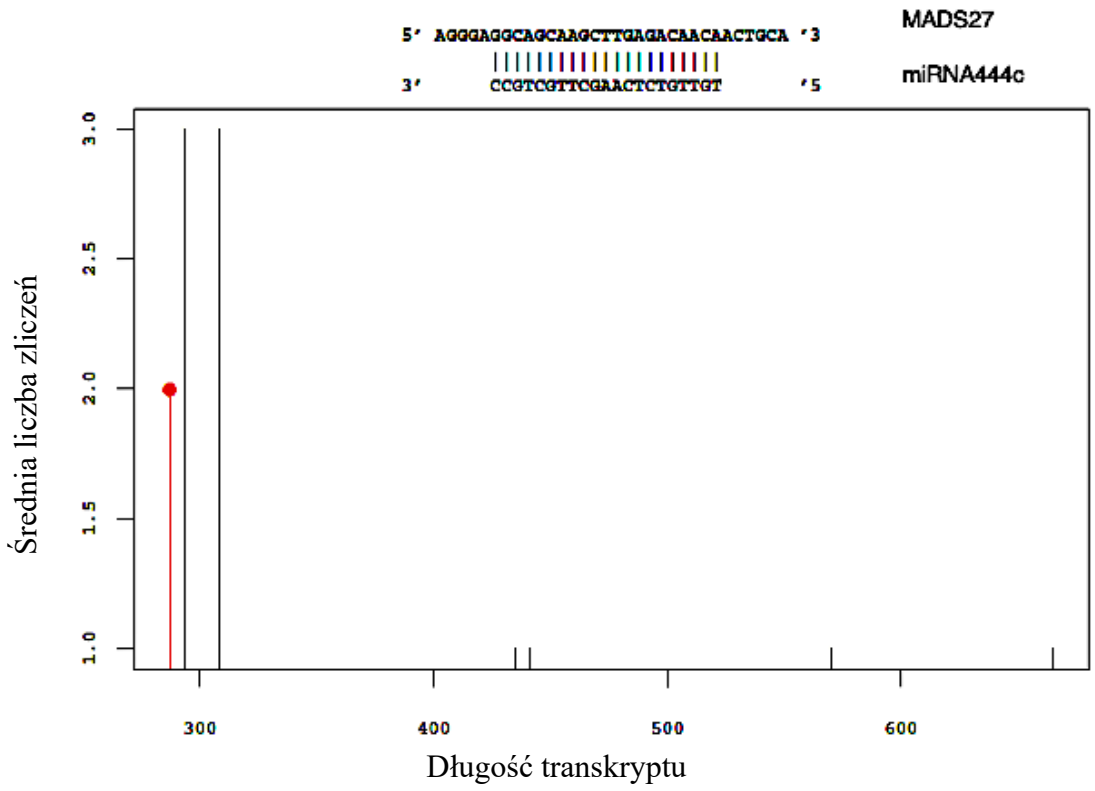
tworzenia matrycy cDNA przeznaczonej do analizy 5'RACE odwrotna transkryptaza SMARTScribe osiągając koniec 5' RNA dodaje dodatkowe nukleotydy do końca 3' pierwszej nici cDNA. Oligonukleotyd SMARTer II A zawiera końcowy odcinek zmodyfikowanych zasad, które hybrydyzują z wydłużonym ogonem cDNA, pozwalając oligonukleotydowi służyć jako matryca dla odwrotnej transkrypcji, generując pełną kopię cDNA oryginalnego RNA z dodatkową sekwencją SMARTer na końcu 5'.

Dzięki wykonanemu eksperymentowi uzyskano budowę obu genów. Gen *HvMADS27* zawiera 7 egzonów i 6 intronów oraz jest zlokalizowany na drugim chromosomie (HORVU2Hr1G080490) na nici DNA przeciwległej do kodującej gen *MIR444c*, który zawiera 5 egzonów i 4 introny, a wycięcie w procesie splicingu intronu 2 jest niezbędne do powstania struktury spinki do włosów i produkcji dojrzałego miRNA. Po transkrypcji i dojrzewaniu transkryptów pomiędzy *HvMADS27* i *MIR444c* występuje 60 komplementarnych nukleotydów, w tym pełna komplementarność pomiędzy sekwencją dojrzałego miR444c a mRNA HvMADS27 (Rysunek 2).



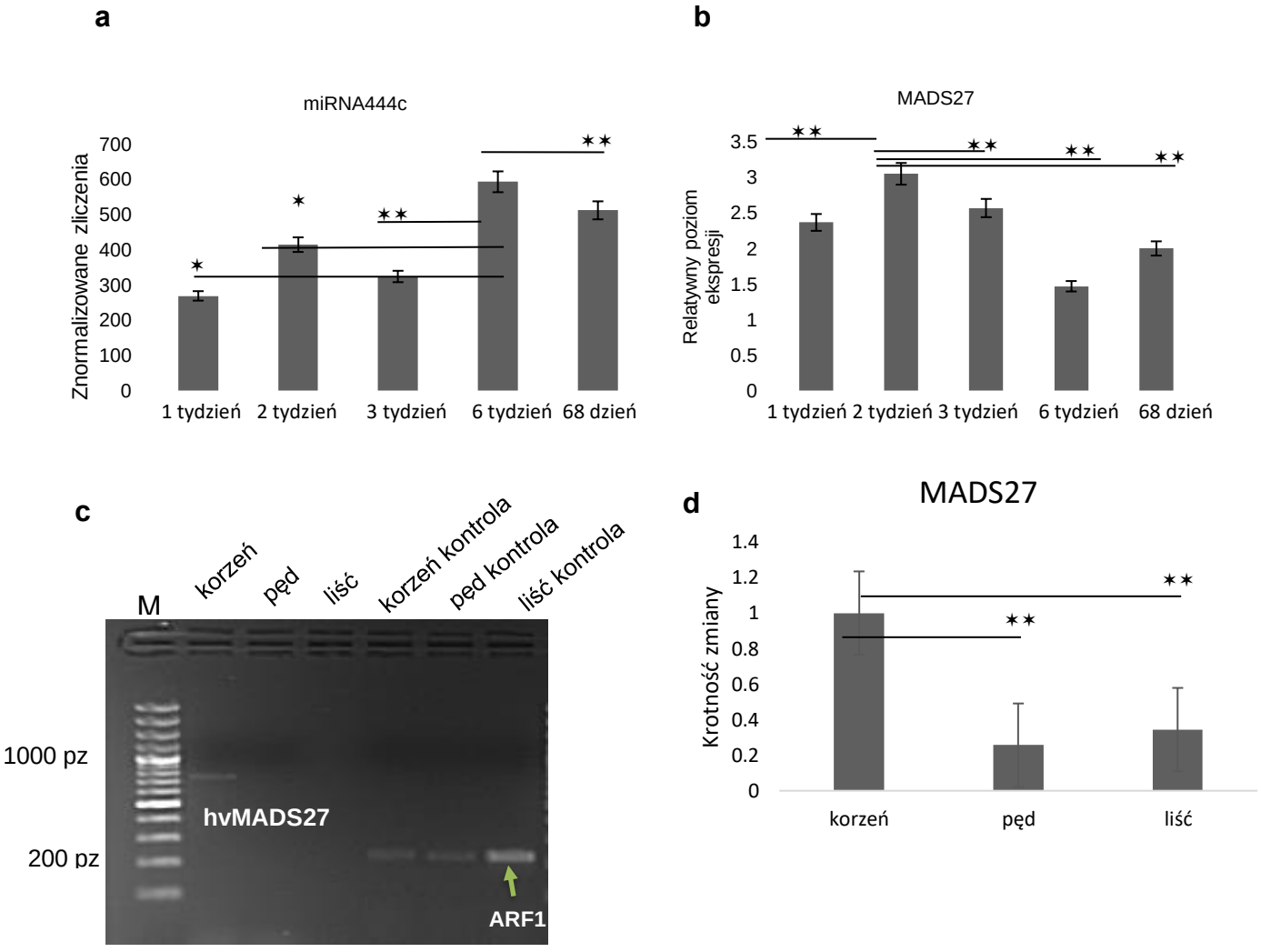
Rysunek 2 Struktura genów *HvMADS27* i *MIR444c*. Białe i szare prostokąty reprezentują egzony a czarne linie introny, niebieski słupek w 2 egzonie genu *MIR444c* reprezentuje pozycję miRNA444c*, a czerwony słupek w 3 egzonie pozycję dojrzałego miRNA444c, podczas gdy kropkowane linie wyznaczają miejsce występowania komplementarnych nukleotydów pomiędzy dojrzałymi transkryptami powstałymi z obu genów.

Następnie korzystając z dostępnych w Zakładzie Ekspresji Genów danych pochodzących z sekwencjonowania bibliotek degradomowych, przygotowanych z korzeni 68-dniowych roślin jęczmienia hodowanych w warunkach kontrolnych, zidentyfikowano w profilu mRNA hvMADS27 produkty cięcia zakończone na 287 nukleotydzie, co odpowiada pozycji pomiędzy 10 a 11 nukleotydem w sekwencji dojrzałego miRNA444c, wskazując eksperymentalnie na regulację ekspresji hvMADS27 za pośrednictwem miRNA444c w tych warunkach (Rysunek 3).



Rysunek 3 mRNA MADS27 jest celem dla miRNA444c w warunkach kontrolnych. Powyżej wykresu pokazano komplementarność między mRNA MADS27 (HORVU2Hr1G080490.4) i miR444c. Oś o-x wykresu przedstawia długość transkryptu MADS27 (722 nt), a oś o-y przedstawia średnią liczbę zliczeń fragmentów cięcia i degradacji. Czerwona linia oznacza miejsce cięcia, w którym pośredniczy miRNA444c.

W celu charakterystyki wzoru ekspresji hvMADS27 i miRNA444c oraz wyznaczenia dalszych warunków eksperymentalnych przeprowadzono analizę poziomu mRNA MADS27 za pomocą ilościowego PCR w czasie rzeczywistym poprzedzonego reakcją odwrotnej transkrypcji, oraz zbadano poziom dojrzałej cząsteczki miRNA444c wykorzystując dane pochodzące z głębokiego sekwencjonowania małych RNA z pięciu wybranych stadiów rozwojowych jęczmienia. MiRNA444c ulega wysokiej ekspresji w 6 tygodniu rozwoju, podczas gdy analiza RT-qPCR wykazała, że najwyższa ekspresja HvMADS27 występuje w drugim tygodniu wzrostu jęczmienia (Rysunek 4a, b). Dalsze badania wykazały, że HvMADS27 ulega ekspresji głównie w korzeniach dwutygodniowych roślin jęczmienia, co skłoniło nas do skupienia się na tym organie w dalszych badaniach (Rysunek 4 c,d).



Rysunek 4 Poziom ekspresji hvMADS27 i miRNA444c w wybranych stadiach rozwojowych i organach jęczmienia. (a) Wynik głębokiego sekwencjonowania bibliotek małych RNA, gdzie oś x reprezentuje stadia rozwojowe jęczmienia, a znormalizowane zliczenia dla miR444c przedstawione są na osi y. Dojrzały miRNA444c wykazuje najwyższą ekspresję w 6 tygodniu rozwoju. (b) Poziom hvMADS27 w stadiach rozwojowych jęczmienia, gdzie oś x przedstawia poszczególne stadia rozwojowe, a oś y relatywny poziom ekspresji mRNA MADS27. Najwyższy poziom obserwuje się w 2 tygodniu rozwoju jęczmienia. (c) Żel agarozowy przedstawiający produkt RT-PCR hvMADS27 eksprymowany wyłącznie w korzeniach dwutygodniowych roślin jęczmienia, jako kontrolę ilości cDNA wykorzystano czynnik rybozylacji ADP1 (ARF1). (d) Ilościowy RT-qPCR w czasie rzeczywistym. hvMADS27 ulega ekspresji głównie w korzeniach 2-tygodniowych roślin jęczmienia. W przypadku głębokiego sekwencjonowania bibliotek sRNA zastosowano wartość *p* opartą na korekcie Bonferroniego, a w przypadku RT-qPCR standardowy testu t Studenta, gdzie wartość p ★<0,05, ★★<0,005, ★★★<0,0001.

5.4 Analiza elementów regulatorowych w promotorach genów *MIR444c* i *hvMADS27* oraz poziomu ekspresji mRNA hvMADS27 oraz miRNA444c w wybranych stresach.

Aby wyjaśnić biologiczną funkcję HvMADS27 i miRNA444c przeanalizowano sekwencje promotorowe obu genów pod kątem występowania wspólnych motywów regulatorowych związanych z odpowiedzią na stresy środowiskowe. W tym celu wykorzystano narzędzie bioinformatyczne New PLACE (www.dna.affrc.go.jp) zawierające bazę roślinnych elementów regulatorowych ekspresji genów działających w cis. W obrębie szeroko pojętego rejonu promotorowego genu zidentyfikowano sekwencje związane z odpowiedzią na stres azotowy, stres związany ze światłem oraz miedzią (Tabela 1). Następnie przeprowadzono analizę poziomu mRNA hvMADS27 w korzeniach jęczmienia poddanych zidentyfikowanym stresom. Jedynie w korzeniach rosnących w stresie nadmiaru azotu zaobserwowano znaczne obniżenie poziomu mRNA hvMADS27 (Rysunek 5 a-c). W kolejnym kroku zbadano poziom dojrzałego miRNA444c w korzeniach poddanych stresowi. Nie zaobserwowano zmiany poziomu względem warunków kontrolnych, co sugeruje, że w badanych warunkach ekspresja genu *hvMADS27* nie pozostaje pod znaczącą kontrolą miRNA444c (Rysunek 5d).

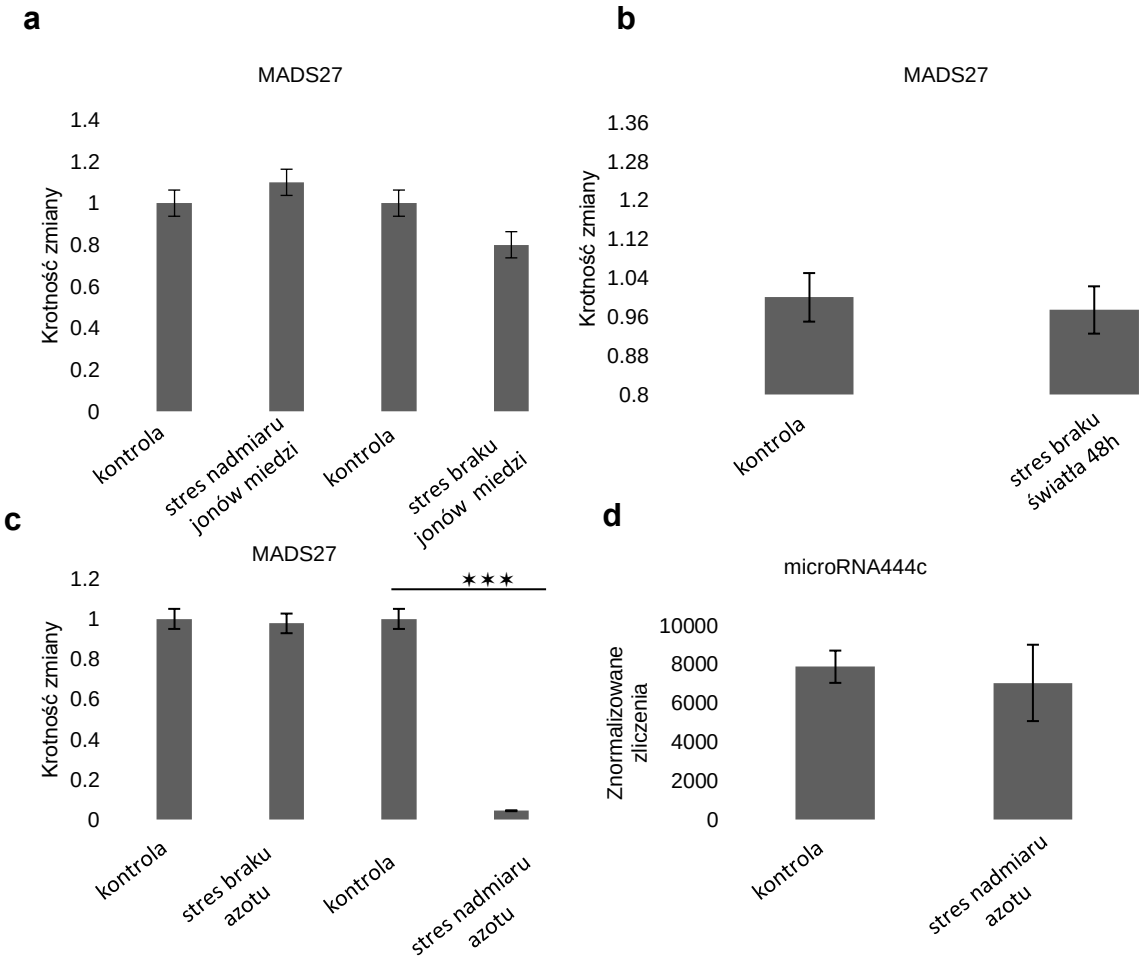
Motyw	Liczba MADS27/MIR444c	Sekwencja	Funkcja
ROOTMOTIFTAPOX1	11/6	ATATT	Motyw związany z ekspresją w korzeniach.
GATABOX	16/11	GATA	Motyw GATA znaleziony w promotorze CaMV 35S. Związany z wiązaniem z ASF-2.
GTGANTG10	9/16	GTGA	Motyw znaleziony w promotorze genu *G10* w tytoniu, który wykazuje homologię do liazy pektynianowej i jest domniemanym homologiem genu pomidora *LAT56*.
POLLEN1LELAT52	17/7	AGAAA	Jeden z dwóch współzależnych elementów regulatorowych odpowiedzialnych za specyficzną dla pyłku aktywację genu *LAT52* u pomidora.
DOFCOREZM	31/21	AAAG	Miejsce wiązania białek Dof
CACTFTPPCA1	26/24	YACT	Związany z odpowiedzią na stres azotowy oraz składnik modułu ekspresji występujący w promotorze karboksylazy fosfoenolopirgronowej (PPCA1)
TBOXATGAPB	3/3	ACTTTG	Motyw związany z ekspresją genów aktywowanych światłem.
CAATBOX1	13/16	CAAT	Motyw znaleziony w sekwencji promotorowej genu *LEGA* grochu
ARR1AT	11/20	NGATT	Motyw znaleziony w promotorze genu *ARR1* u Arabidopsis.
WRKY71OS	8/16	TGAC	Motyw znaleziony w promotorze *AMY32B*, również miejsce wiązania ryżowego genu *WRKY71*, represora transkrypcji, Motyw związany także ze szlakiem sygnałowym giberelin.
CURECORECR	14/6	GTAC	GTAC jest rdzeniem elementu odpowiedzi na miedź - CuRE
EBOXBNNAPA	20/14	CANNTG	E-box genu kodującego białko magazynujące napA w *Brassica napus*.

MYCCONSENSUSAT	20/14	CANNTG	Miejsce rozpoznawania MYC znalezione w promotorze genu odpowiadającego na odwodnienie- *RD22* i w wielu innych promotorach genów Arabidopsis.
TAAAGSTKST1	10/2	TAAAG	Motyw TAAAG występujący w promotorze genu *KST1* u *Solanum tuberosum*. Miejsce docelowe dla działającego w trans białka StDof1.
GT1CONSENSUS	13/7	GRWAAW	Miejsce wiązania GT-1, występujące w promotorach wielu genów regulowanych światłem.
ACGTATERD1	4/4	ACGT	Sekwencja wymagana do indukowanej etiolacją ekspresji ERD1 u Arabidopsis.
SEF4MOTIFGM7S	6/2	CAAACAC	Motyw zachowany w promotorach wielu genów kodujących białka zapasowe.
SORLIP1AT	4/3	GCCAC	Sekwencje nadreprezentowane w promotorach genów indukowanych światłem (SORLIP) w Arabidopsis.
NODCON2GM	3/6	CTCTT	Jedna z dwóch sekwencji zgodnych znajdująca się w promotorach genów kodujących noduliny
NODCON1GM	3/3	AAAGAT	Jedna z dwóch sekwencji zgodnych znajdująca się w promotorach genów kodujących noduliny
OSE1ROOTNODULE	3/3	AAAGAT	Jeden z motywów sekwencji zgodnej elementów organo-specyficznych (OSE) charakterystyczny dla promotorów aktywowanych w zakażonych komórkach brodawek korzeniowych roślin wiążących wolny azot.
DPBFCOREDCDC3	4/4	ACACNNG	Klasa czynników transkrypcyjnych bZIP, sekwencja rdzeniowa DPBF-1 i 2 (czynnik 1 i 2 wiążący promotor Dc3). Związany z odpowiedzią na ABA.
PRECONSCRHSP70A	2/5	SCGAYNR NNNNNN	Sekwencja zgodna PRE (element odpowiedzi

		NNNNNN NNNHD	plastydowej) w promotorach HSP70A.
BIHD1OS	4/4	GTCA	Miejsce wiązania OsBIHD1, homeodomenowego czynnika transkrypcyjnego BELL u ryżu.
CCAATBOX1	3/4	CCAAT	Powszechna sekwencja znaleziona w regionach promotorowych genów reagujących na wysoką temperaturę.

Tabela 1. Elementy regulatorowe wspólne dla promotorów genów *hvMADS27* i *MIR444c*.

W tabeli przedstawiono elementy regulatorowe działające w cis i występujące w promotorach obu genów- *hvMADS27* i *MIR444c*, ich liczbę, sekwencję i funkcję. Czerwonym kolorem zaznaczone są motywy związane z sygnalizacją azotową, niebieskim związane ze stresem światła, a na zielono wyróżnione zostały motywy związane z sygnalizacją poziomu jonów miedzi.

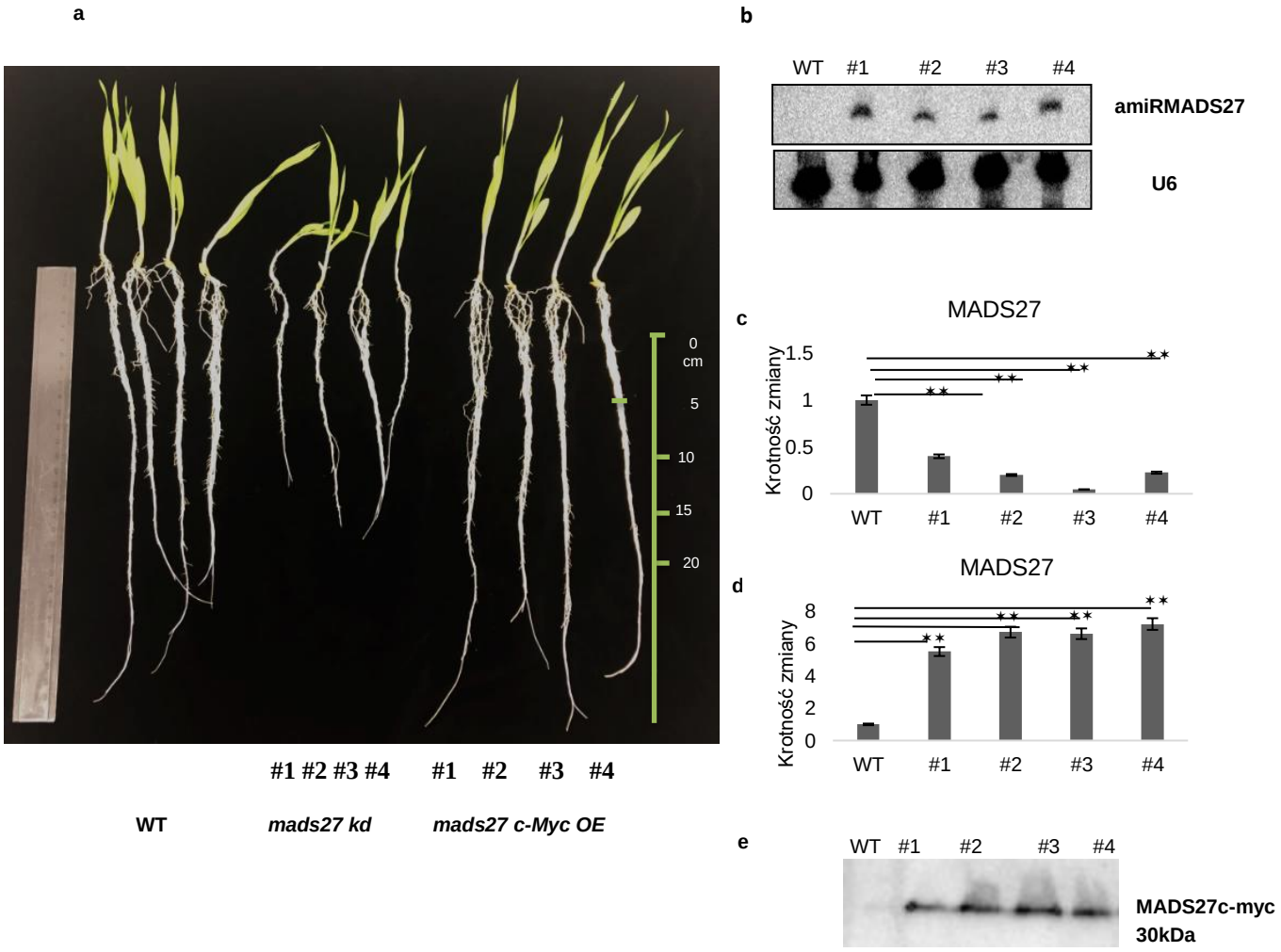


Rysunek 5 Ekspresja hvMADS27 i miRNA444c w korzeniach jęczmienia poddanych wybranym stresom. (a) Poziom ekspresji hvMADS27 wyznaczony za pomocą RT-qPCR w korzeniach dwutygodniowych roślin jęczmienia poddanych stresowi braku i nadmiaru jonów Cu. Stres braku i nadmiaru jonów Cu nie powoduje zmian w ekspresji HvMADS27. (b) Poziom ekspresji hvMADS27 w korzeniach dwutygodniowych roślin jęczmienia poddanych stresowi braku światła przez 48h. Nie zaobserwowano zmiany w poziomie ekspresji HvMADS27 na skutek stresu światła. (c) Poziom ekspresji hvMADS27 w korzeniach roślin dwutygodniowych poddanych stresowi braku i nadmiaru azotu. Zaobserwowano znaczny spadek hvMADS27 w przypadku stresu nadmiaru azotu. (d) Poziom dojrzałego miRNA444c w korzeniach jęczmienia poddanych stresowi nadmiaru azotu. Nie zaobserwowano zmian. Powyżej poszczególnych słupków zaznaczono istotność statystyczną. W przypadku głębokiego sekwencjonowania bibliotek sRNA zastosowano wartość *p* opartą na korekcie Bonferroniego, a w przypadku standardowego testu t Studenta dla RT-qPCR, wartość *p* ★★★<0,0001.

5.5 Charakterystyka fenotypu korzeni w liniach transgenicznych jęczmienia wykazujących obniżony poziom hvMADS27 oraz nadekspresję hvMADS27 c-myc w warunkach kontrolnych i w odpowiedzi na stres nadmiaru azotu.

Aby w pełni zrozumieć funkcję HvMADS27, przygotowano linie transgeniczne jęczmienia z obniżonym poziomem HvMADS27 (*mads27 kd*) i nadekspresją hvMADS27 z etykietą c-myc (*mads27 c-Myc OE*) wykorzystując transformację niedojrzałych zarodków za pośrednictwem *A. tumefaciens*. Rośliny *mads27 kd* uzyskano poprzez nadeksprymowanie sztucznego miRNA ukierunkowanego na mRNA hvMADS27 (amiRMADS27). Do dalszych eksperymentów wybrano cztery niezależne linie transgeniczne, wykazujące podobną ekspresję amiRMADS27 i poziom obniżenia hvMADS27 dla wariantu *mads27 kd* oraz podobny poziom ekspresji białka hvMADS27 c-myc dla *mads27 c-Myc OE* (Rysunek 6a-e).

Analiza fenotypowa korzeni badanych mutantów w warunkach kontrolnych w porównaniu z korzeniami roślin typu dzikiego (WT) wykazała, że rośliny *hvmads27 kd* odznaczają się krótszymi korzeniami, podczas gdy rośliny *mads27 c-Myc OE* tworzą korzenie nie wykazujące znaczących zmian w porównaniu do roślin typu dzikiego (Rysunek 6a).



Rysunek 6 Charakterystyka roślin transgenicznych *mads27 kd* i *mads27 c-Myc OE*. (a) Dwutygodniowe rośliny jęczmienia (WT, *mads27 kd* i *mads27 c-Myc OE*). Rośliny *mads27 kd* tworzą krótsze korzenie. (b) Hybrydyzacja Northern pokazująca obecność amiRNAMADS27 w liniach *mads27 kd*, materiał z korzeni roślin typu WT został użyty jako kontrola specyficzności sygnału a poziom U6 snRNA jako kontrola nałożenia. (c) Poziom ekspresji hvMADS27 w liniach *mads27 kd* w porównaniu do roślin WT, oś x przedstawia poszczególne linie transgeniczne, a oś y krotność zmiany. (d) Poziom mRNA hvMADS27 w liniach transgenicznych z nadekspresją hvMADS27 z etykietą c-myc, oś

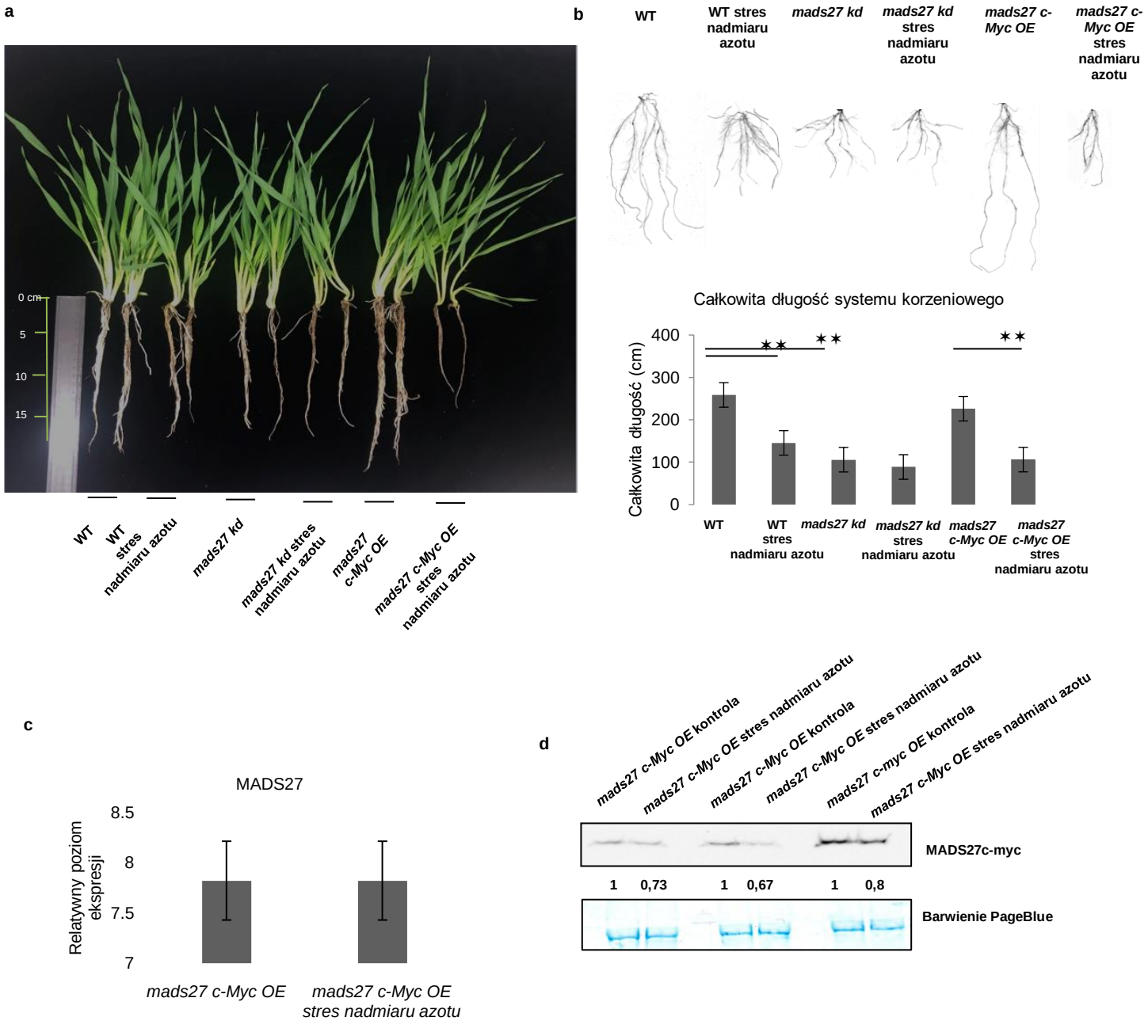
x przedstawia analizowane linie transgeniczne, a oś y przedstawia krotność zmiany. (e) Eksperyment Western blot pokazujący ekspresję białka MADS27 z etykietą c-myc. Powyżej wykresów przedstawiono istotność statystyczną na podstawie wartości *p* standardowego testu t-Studenta; wartości *p* ★★<0,005, ★★★<0,0001.

W kolejnym kroku szczegółowo przeanalizowano reakcję korzeni roślin WT oraz roślin *hvmads27 kd* i *mads27 c-Myc OE* na stres nadmiaru azotu przy użyciu skanera oraz oprogramowania WinRHIZO. Stres nadmiaru azotu wywołuje skrócenie systemu korzeniowego u roślin typu dzikiego. Natomiast, mutanty *hvmads27 kd* wykazują znacznie krótsze korzenie w warunkach kontrolnych i nie reagują na nadmiar N. Co ciekawe, korzenie mutantów *mads27 c-Myc OE* zostały znacznie skrócone w odpowiedzi na stres nadmiaru N, a więc zareagowały podobnie jak rośliny typu WT (Rysunek 7a, b).

Wiedząc, że skrócenie korzenia na skutek nadmiaru N koreluje z mocno obniżonym poziomem mRNA HvMADS27, obserwacje linii transgenicznych z nadekspresją tego białka były trudne do wytłumaczenia. Postanowiono zatem przeanalizować poziom HvMADS27 c-myc w liniach transgenicznych z nadekspresją genu *HvMADS27cmyc OE,* zarówno w warunkach kontrolnych jak i w stresie nadmiaru N, zarówno na poziomie transkryptu i białka (Rysunek 7c, d). Poziom mRNA HvMADS27 nie zmienia się znacząco po zastosowaniu stresu, jednakże, poziom białka HvMADS27c-myc jest obniżony pod wpływem nadmiaru N (Rysunek 7c, d).

Otrzymany wynik jest zgodny z wcześniej uzyskanymi obserwacjami. W roślinach typu dzikiego skrócenie korzeni w odpowiedzi na stres nadmiaru azotu koreluje z obniżonym poziomem ekspresji mRNA hvMADS27. Można przypuszczać, że za tą zmianą idzie również spadek poziomu białka. Niestety nie posiadamy przeciwciał specyficznych dla hvMADS27. Natomiast, w roślinach transgenicznych, nadeksprymujących hvMADS27 z etykietą c-myc poziom białka hvMADS27c-myc, lecz

nie transkryptu, jest obniżony na skutek stresu, co wyjaśnia podobne zachowanie systemów korzeniowych WT i roślin transgenicznych w odpowiedzi na stres nadmiaru N.



Rysunek 7 HvMADS27 kontroluje architekturę systemu korzeniowego jęczmienia w odpowiedzi na stres nadmiaru N. (a) Rośliny transgeniczne i WT w warunkach kontrolnych oraz w stresie nadmiaru azotu. W przypadku roślin WT i *mads27 c-Myc OE* obserwujemy krótsze korzenie w odpowiedzi na stres. Natomiast rośliny *mads27 kd* nie

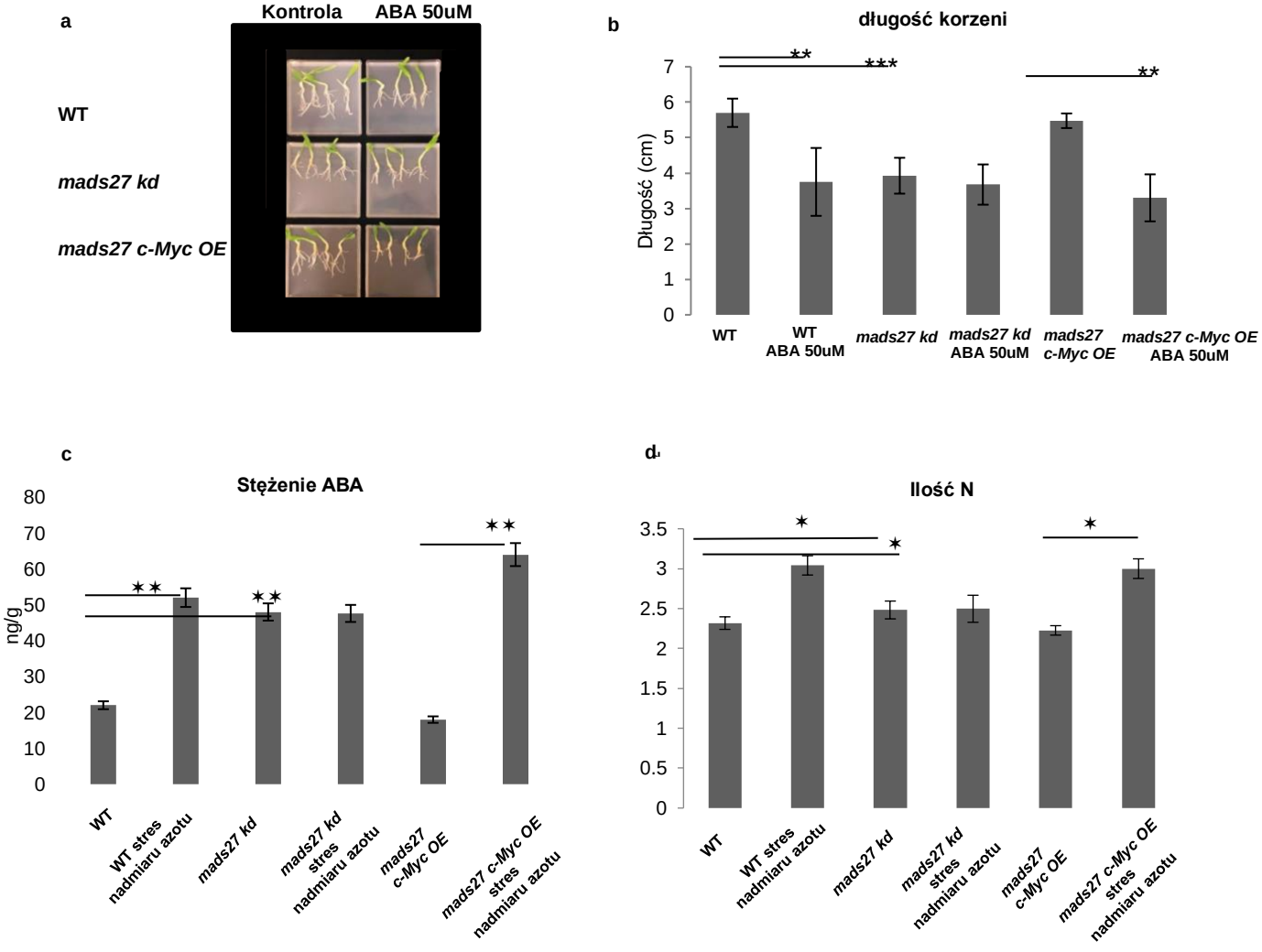
reagują na stres nadmiaru N, a ich korzenie są krótsze już warunkach kontrolnych. (b) Analiza długości systemu korzeniowego za pomocą oprogramowania WinRHIZO (Geomor Technik, Szczecin, Polska), gdzie oś x przedstawia analizowane warianty, a oś y długość całkowitą systemu korzeniowego w cm. Powyżej wykresu znajdują się skany analizowanych systemów korzeniowych. (c) RT-qPCR przedstawiający poziom ekspresji hvMADS27 w liniach *mads27 c-Myc OE* w warunkach kontrolnych i w nadmiarze N. (d) Western blot wykazujący obniżenie poziomu białka c-myc MADS27 w mutantach *mads27 c-Myc OE* po zastosowaniu stresu nadmiaru N. Pod sygnałem umieszczono wyniki pomiarów densytometrycznych. Barwienie PageBlue zastosowano w celu kontroli nałożenia. W przypadku analizy systemu korzeniowego zastosowano test statystyczny Kruskala-Wallisa, ✯✯ $p<0,05$.

5.7 Analiza odpowiedzi jęczmiennych mutantów hvMADS27 na kwas abscysynowy

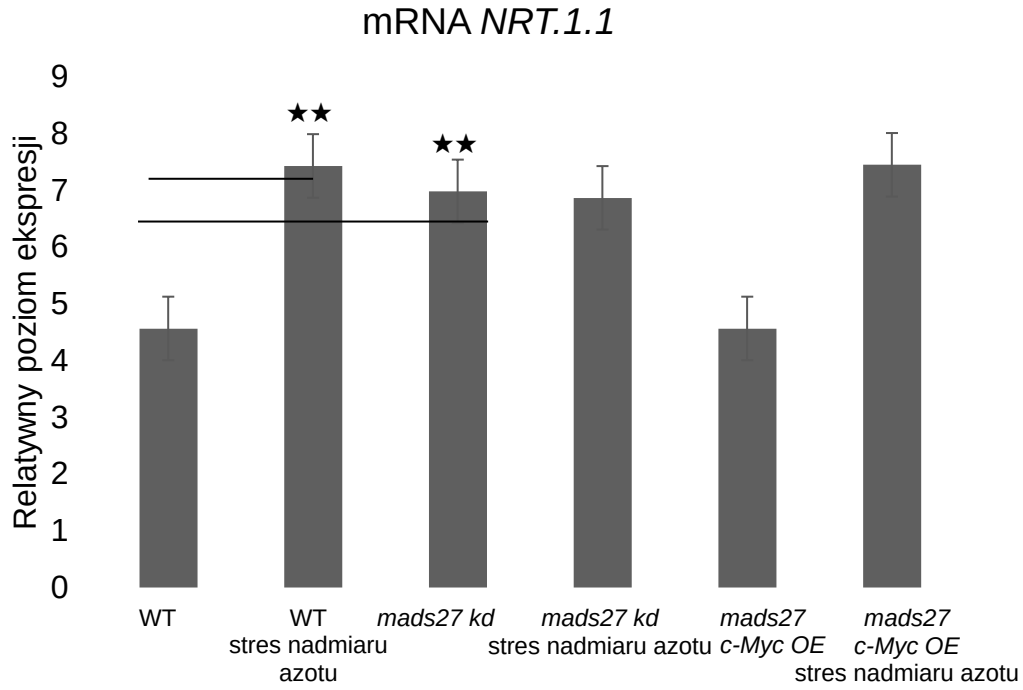
Następnie zbadano podstawy molekularne zaobserwowanych fenotypów korzeni. Analiza zawartości N w korzeniach badanych roślin wykazała, że traktowanie nadmiarem azotu powoduje podwyższenie jego ilości w korzeniach WT oraz *mads27 c-Myc OE,* podczas gdy wyższą ilość N obserwuje się już w warunkach kontrolnych u roślin *hvmads27 kd,* a jego poziom nie zmienia się po zastosowaniu stresu (Rysunek 8a, b). Wyniki te korelują ze wzorcem ekspresji mRNA transportera azotowego NRT1.1, którego poziom wzrasta po zastosowaniu nadmiaru N w korzeniach roślin WT i *mads27 c-Myc OE* oraz wykazuje wysoką ekspresję w korzeniach *hvmads27 kd* zarówno w warunkach kontrolnych jak i w stresie (Rysunek 9).

W celu zbadania mechanizmu skracania korzeni zależnego od nadmiaru N, przeanalizowano możliwości przenikania się ścieżek sygnalizacyjnych kwasu abscysynowego (ABA) i N, ponieważ oba te czynniki regulują architekturę systemu korzeniowego i taki związek został wcześniej opisany w przypadku Arabidopsis i pszenicy (Finkelstein i in., 2002; Cutler i inni., 2010; Sah i inni., 2016; Jiao i inni., 2020; Yan i inni., 2014; Harris i inni., 2017). Test wrażliwości na ABA wykazał, że korzenie roślin WT i *mads27 c-Myc OE* skracają się po zastosowaniu egzogennego ABA, jednak

korzenie mutantów *hvmads27 kd* są krótsze w warunkach kontrolnych i nie reagują na traktowanie kwasem abscysynowym (Rysunek 8a, b). Ponieważ te same obserwacje dotyczące skracania korzeni poczyniono w roślinach WT i mutantów MADS27 KD/OE poddanych nadmiernemu stresowi N, wynik ten sugeruje dominującą rolę hvMADS27 w kontrolowaniu ilości ABA w korzeniach roślin. Dlatego w kolejnym kroku przeanalizowano stężenie ABA w korzeniach roślin typu WT i w korzeniach badanych mutantów (Rysunek 8 c, d). Analiza wykazała, że traktowanie nadmiarem N powoduje wzrost ilości ABA w korzeniach roślin WT, podczas gdy wysoką ilość ABA obserwuje się już w warunkach kontrolnych w roślinach *hvmads27 kd*, a poziom ABA nie zmienia się po traktowaniu nadmiarem N. Rośliny z nadekspresją MADS27 wykazują podobne zachowanie jak typ dziki (WT) (Rysunek 8 c, d).



Rysunek 8 MADS27 kontroluje zależną od nadmiaru N akumulację ABA w korzeniach jęczmienia. (a) Test wrażliwości na ABA korzeni roślin WT i badanych linii transgenicznych hodowanych na płytkach z ½ MS w warunkach kontrolnych lub z dodatkiem 50 uM ABA. (b) Obliczenie całkowitej długości korzeni, gdzie oś x przedstawia analizowane warianty, a oś y długość korzenia w cm. Korzenie roślin *mads27 kd* są krótsze w warunkach kontrolnych i nadmairu azotu, podczas gdy korzenie mutantów *mads27 c-Myc OE* reagują na stres nadmiaru azotu w sposób podobny do WT. (c) Pomiary ilości ABA za pomocą ultra-wysokociśnieniowej chromatografii cieczowej w korzeniach roślin WT i mutantów *mads27 kd* i mads27 c-Myc OE, gdzie na osi x przedstawiono analizowane warianty, a stężenie ABA na osi y w ng/g analizowanej tkanki. (d) Pomiary ilości N przy użyciu analizatora elementarnego w korzeniach WT, *mads27 kd* i *mads27 c-Myc OE* mutantów. Nadmierny stres N powoduje akumulację ABA i N w korzeniach WT i *mads27 c-Myc OE*, podczas gdy korzenie mutantów *mads27 kd* wykazują wysokie stężenie N i ABA w warunkach kontrolnych, jak również po zastosowaniu nadmiernego stresu N. Powyżej wykresów przedstawiono istotność statystyczną w oparciu o wartość *p* standardowego testu t-Studenta wartość *p* ★<0,05, ★★<0,005, ★★★<0,0001.



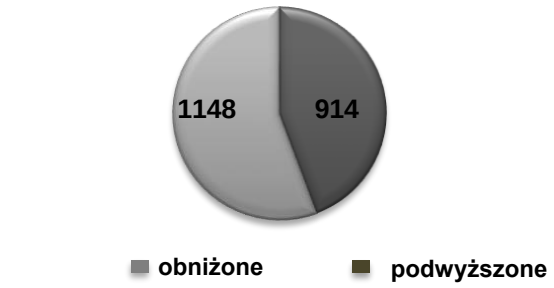
Rysunek 9 Poziom ekspresji mRNA transportera azotowego NRT1.1.
Ekspresja mRNA NRT1.1 w korzeniach roślin WT, *mads27 kd* i *mads27 c-Myc OE* w warunkach kontrolnych i nadmiaru N. Poziom mRNA NRT1.1 jest podwyższony w mutancie *mads27 kd*, a jego ekspresja nie ulega zmianie w stresie nadmiarowym N. W *mads27 c-Myc OE* nadmiar N powoduje wzrost poziomu NRT1.1 w sposób podobny jak

w WT. Powyżej wykresów przedstawiono istotność statystyczną na podstawie standardowego testu t-Studenta, wartość *p* ✯✯<0,005.

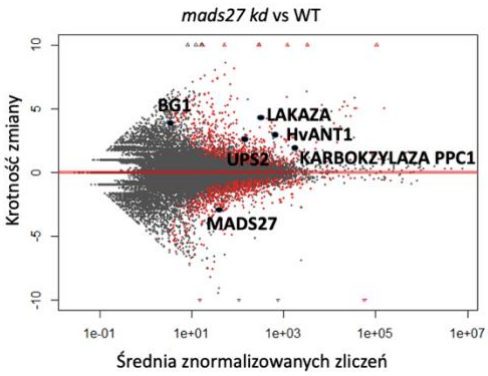
5.8 Analiza transkryptomu korzeni mutantów *hvmads27 kd*

Aby lepiej zrozumieć mechanizm odpowiedzi korzeni analizowanych mutantów hvMADS27 w stresie nadmiaru N, postanowiono zidentyfikować geny regulowane przez czynnik transkrypcyjny HvMADS27. Aby wykonać to zadanie, przeanalizowano transkryptom korzeni roślin WT i *hvmads27 kd* oraz zidentyfikowano geny, których poziom zmienia się istotnie statystycznie w mutancie w porównaniu do WT. Poziom 1148 genów jest istotnie obniżony a 914 podwyższony (Rysunek 10a). Czynniki transkrypcyjne MADS-box, w większości przypadków, hamują transkrypcję genów, dlatego skupiono się na puli genów o podwyższonym poziomie w mutancie *hvmads27 kd* oraz przeanalizowano ich sekwencje promotorowe pod względem występowania motywu wiążącego czynniki transkrypcyjne MADS-box (CArG) (Muino i inni., 2014; Aerts i inni., 2018; Guo i inni., 2013). Wybrano pięć potencjalnych kandydatów (Rysunek 10b, c). HvANT1 (HORVU6Hr1G034900) jest białkiem transbłonowym biorącym udział w transporcie aminokwasów obojętnych i aromatycznych (Chen i inni., 2001), KARBOKSYLAZA PPC1 (HORVU5Hr1G055350) uczestniczy w utrzymaniu homeostazy w metabolizmie węgla/azotu (Li i inni., 2020), UPS2 (UREIDE PERMEASE-2) (HORVU7Hr1G108790) transportuje związki azotu (Rentsch i inni., 2007), LAKAZA (HORVU3Hr1G097860) katalizuje polimeryzację lignin (Rittstieg i inni., 2002), a BG1 ß-glukozydaza (HORVU2Hr1G023590) zaangażowana jest w uwolnienie ABA z biologicznie nieaktywnego koniugatu glukozowego (Harris i inni., 2017) (Rysunek 10b, c). Dodatkowo wzięto pod uwagę ekspresję genu NRT1.1, którego promotor również zawiera motywy CArG.

a



b



c

Nazwa genu	Funkcja	Motyw
ANT1	Białko transbłonowe biorące udział w transporcie aminokwasów obojętnych i aromatycznych	CATTAAATTTAG CATTAAATG
PPC1 KARBOKSYLAZA	Białko uczestniczące w utrzymaniu homeostazy w metabolizmie węgla/azotu	CATTAAAAAG
UPS2	Białko transportujące związki azotu	CATTAAATTTAG
B-GLUKOZYDAZA BG1	Białko zaangażowane w uwolnienie ABA z biologicznie nieaktywnego estru z glukozą	2XCATTAAATTG
LAKAZA	Białko katalizujące polimeryzację lignin	CTTTAAAAAG
NRT1.1	Transporter azotowy	CATTAAATTTAG

Rysunek 10 Analiza transkryptomu korzeni roślin *mads27 kd* w porównaniu do korzeni roślin WT. (a) Wykres kołowy przedstawiający statystycznie zmienione geny na podstawie analizy transkryptomu korzeni mutantów *mads27 kd* w porównaniu z transkryptomem korzeni WT. Poziom 1148 genów był statystycznie obniżony, a 914 podwyższony. Z grupy genów o podwyższonym poziomie wyłoniono kandydatów niosących motyw CArG w regionach promotorowych. (b) Wykres wulkaniczny przedstawiający poziom ekspresji genów kandydatów w korzeniach mutanta *mads27 kd.* Analizowane geny zaznaczone są czarnymi kropkami. Obok każdej kropki podana jest nazwa konkretnego genu. Oś x pokazuje znormalizowane zliczenia, a na osi y zmianę krotności ekspresji genów. Czerwone kropki na wykresie wulkanicznym oznaczają geny, których ekspresja jest statystycznie istotnie zmieniona na podstawie wartości *p* korekty

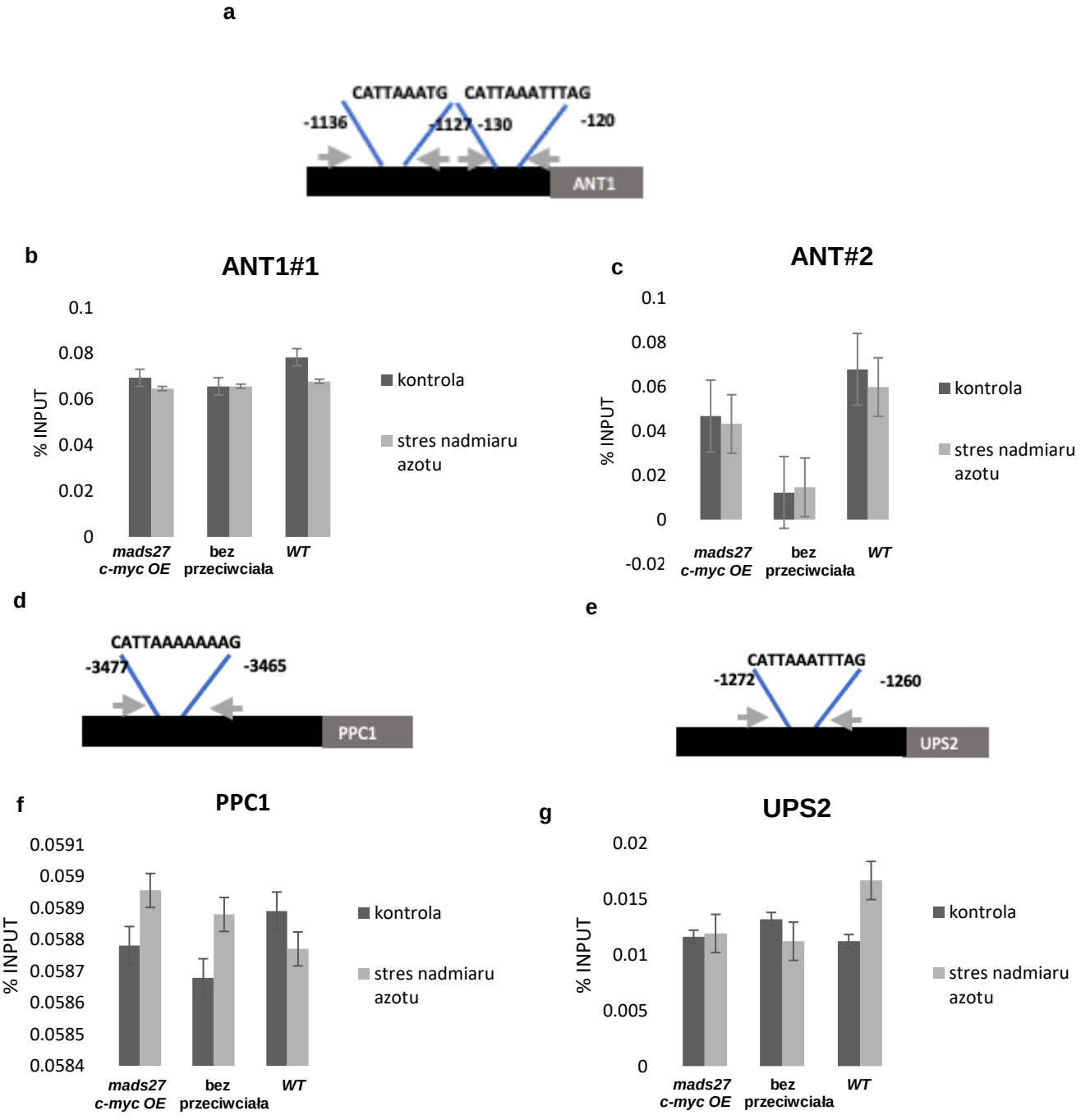
Bonferroniego. (c) Tabela przedstawia nazwy dla poszczególnych genów, ich funkcję i sekwencję motywu osadzonego w promotorze.

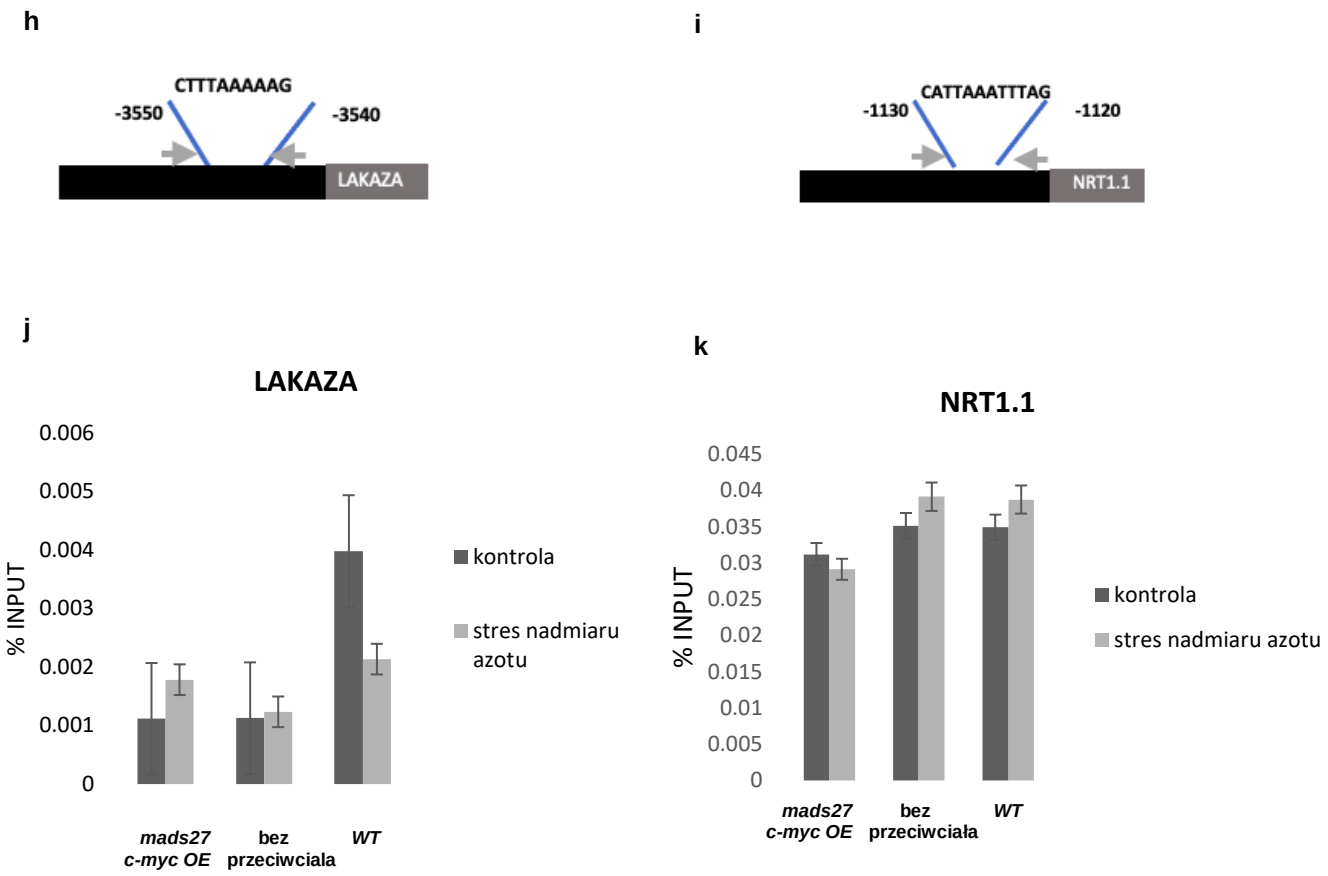
5.9 Analiza oddziaływania hvMADS27 z motywami CArG w promotorach wybranych genów

W celu weryfikacji wiązania hvMADS27 z motywami CArG regionów promotorowych wybranych genów, przeprowadzono eksperyment immunoprecypitacji chromatyny połączony z ilościowym PCR w czasie rzeczywistym (ChIP-qPCR) przy użyciu linii *mads27 c-Myc OE* i oligonukleotydów okalających motywy CArG (Rysunek 11a-k,12a-c). Materiał z korzeni roślin WT, do którego dodano przeciwciała anty-c-myc oraz materiał z korzeni linii transgenicznych, do którego nie dodano przeciwciała podczas immunoprecypitacji posłużył jako kontrola. Jedynie w przypadku genu ß-glukozydazy *HvBG1* uzyskano wzbogacenie produktów PCR reprezentujących fragmenty regionów promotorowego *HvBG1* zawierające motywy CArG (Rysunek 12a-c). Co więcej, obecność HvMADS27 c-myc na promotorze *HvBG1* obniżyła się po traktowaniu nadmiarem N (Rysunek 12b, c). Analiza Western blot poziomu białka HvBG1 w korzeniach roślin WT, *hvmads27 kd* i *mads27 c-Myc OE* w warunkach kontrolnych i w nadmiernym stresie N wykazała, że poziom hvBG1 jest podwyższony po zastosowaniu nadmiaru N w WT i *mads27 c-Myc OE*, podczas gdy w przypadku roślin *hvmads27 kd* zaobserwowano wyższy poziomy HvBG1 w warunkach kontrolnych, jak również w nadmiernym stresie N (Rysunek 12c). Powyższe eksperymenty wykazały, że hvMADS27 działa jako represor transkrypcji, w przypadku genu hvBG1.

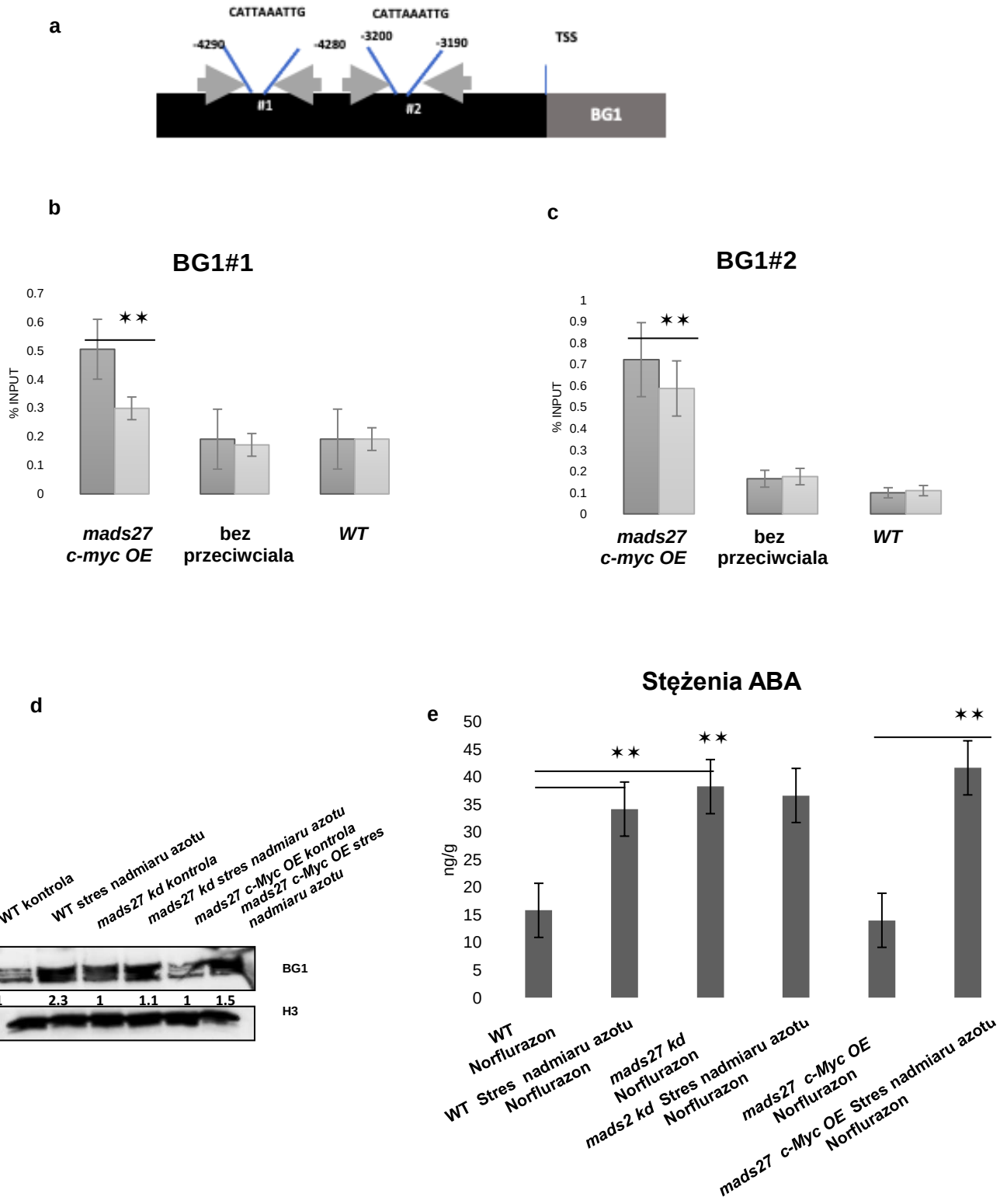
Ponadto w celu weryfikacji czy akumulacja ABA jaką zaobserwowano w mutancie *hvmads27 kd* w warunkach kontrolnych i w stresie oraz w roślinach typu WT i *mads27 c-Myc OE* traktowanych nadmiarem N jest spowodowana aktywnością HvBG1, powtórzono pomiary ABA w korzeniach roślin rosnących w obecności inhibitora

biosyntezy ABA – Norflurazonu (Rysunek 12d) (Dong et al., 2013). Zaobserwowano podwyższony poziom ABA w stresie nadmiaru N w korzeniach mutantów oraz WT, jak również w warunkach kontrolnych w przypadku korzeni *hvmads27 kd*. Zatem, wywnioskowano, że akumulacja ABA w korzeniach mutanta *hvmads27 kd* oraz w korzeniach roślin WT i *mads27 c-Myc OE* poddanych stresowi nadmiaru azotu wynika głównie z mobilizacji nieaktywnych zapasów koniugatu ABA z glukozą.



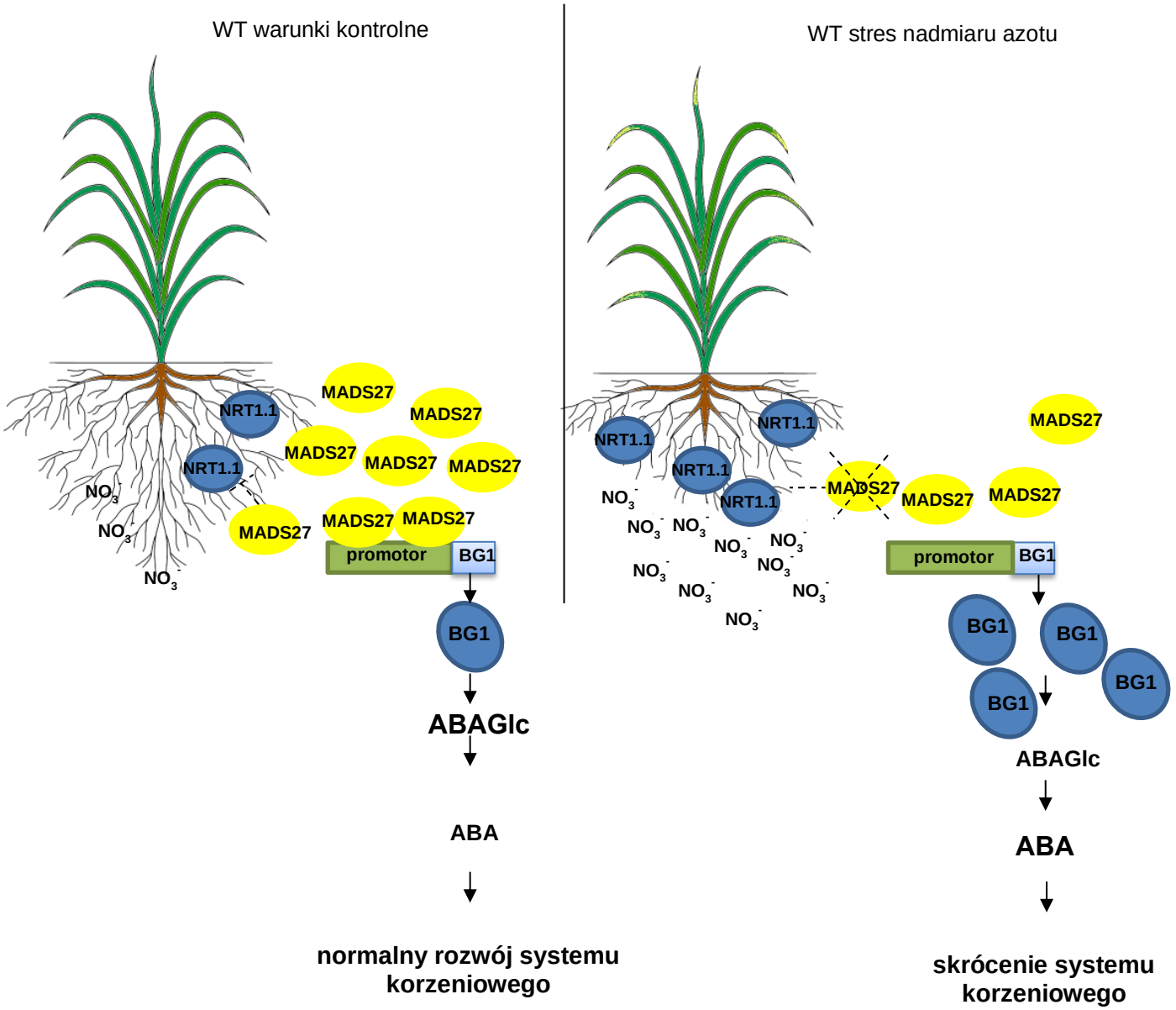


Rysunek 11 ChIP-qPCR z wykorzystaniem zidentyfikowanych genów kandydatów do regulacji za pośrednictwem HvMADS27. (b, c, f, g, j, k) ChIP-qPCR przeprowadzony przy użyciu materiału pochodzącego z korzeni roślin *mads27 c-Myc OE* w kontroli i stresie nadmiaru N przy użyciu oligonukleotydów okalających motywy CArG w promotorach genów: ANT1, PPC1, UPS1 oraz LAKAZY i NRT1.1. (a, d, e, h, i) Czarne prostokąty reprezentują sekwencje promotorowe, szare przedstawiają gen, niebieskie linie okalające pozycje motywów CArG. Dokładne pozycje motywów są podane poprzez liczbę nukleotydów liczonych przed miejscem startu transkrypcji. Szare strzałki pokazują lokalizację starterów okalających motywy CArG. Nie zaobserwowano akumulacji hvMADS27 na analizowanych promotorach.


a
CATTAAATTG
CATTAAATTG
-4290
-4280
-3200
-3190
TSS
#1
#2
BG1
b
BG1#1
% INPUT
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
**
mads27 c-myc OE
bez przeciwciala
WT
c
BG1#2
% INPUT
1
0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
**
mads27 c-myc OE
bez przeciwciala
WT
d
WT kontrola
WT stres nadmiaru azotu
mads27 kd kontrola
mads27 kd stres nadmiaru azotu
mads27 c-Myc OE kontrola
mads27 c-Myc OE stres nadmiaru azotu
BG1
H3
1
2.3
1
1.1
1
1.5
e
Stężenia ABA
ng/g
50
45
40
35
30
25
20
15
10
5
0
**
**
**
WT Norflurazon
WT Stres nadmiaru azotu Norflurazon
mads27 kd Norflurazon
mads2 kd Stres nadmiaru azotu Norflurazon
mads27 c-Myc OE Norflurazon
mads27 c-Myc OE Stres nadmiaru azotu Norflurazon

Rysunek 12 Czynnik transkrypcyjny hvMADS27 reguluje ekspresję BG1 β-GLUKOZYDAZY w korzeniach jęczmienia. (a) Pozycja motywów CArG w promotorze BG1, szara ramka przedstawia ciało genu i sekwencję promotora czarna ramka, niebieskie linie okalające pozycję motywów CArG. Dokładne położenie motywu zostało obliczone na podstawie liczby nukleotydów liczonych poniżej miejsca startu transkrypcji. Szare strzałki pokazują lokalizację starterów otaczających motywy CArG. (b) ChIP RT-qPCR, z korzeni roślin *mads27 c-Myc OE* w kontroli i stresie nadmiaru N, przy użyciu starterów okalających motywy CArG w promotorze BG1. Zaobserwowano akumulację MADS27 na promotorze *hvBG1* zarówno w warunkach kontroli, jak i nadmiaru N przy mniejszej ilości MADS27c-myc w stresie. Powyżej wykresu przedstawiono istotność statystyczną na podstawie standardowego testu t-Studenta, wartość p ✯✯<0,005. (c) Poziom białka hvBG1 w WT i analizowanych mutantach w kontroli i po traktowaniu nadmiarem N przy użyciu techniki western blot. BG1 akumuluje się w nadmiarze N. Poziom białka BG1 jest wysoki w korzeniach mutanta *mads27 kd* zarówno w kontroli, jak i w nadmiarze N. W korzeniach mutanta *mads27 c-Myc OE* obserwujemy akumulację BG1 po stresie N. Poniżej przedstawiono analizę densytometryczną sygnału BG1. Jako kontrolę ładowania wykorzystano sygnał z histonu H3. (d) Pomiary ABA uzyskane za pomocą techniki wysokociśnieniowej chromatografii cieczowej w korzeniach WT i mutantach *mads27 kd, mads27 c-Myc OE* w warunkach kontrolnych i nadmiaru N po traktowaniu inhibitorem biogenezy ABA – Norflurazonem. ABA gromadzi się w korzeniach traktowanych inhibitorem WT po nadmiernym stresie N, w korzeniach roślin *mads27 kd* oraz w korzeniach roślin *mads27 c-Myc OE*. Powyżej wykresów przedstawiono istotność statystyczną na podstawie standardowego testu t-Studenta, wartość p ✯✯<0,005

Biorąc pod uwagę wszystkie wyniki, proponujemy mechanizm regulacji β-glukozydazy BG1 za pośrednictwem HvMADS27, która jest zależna od nadmiaru N, gdzie obecność dużych ilości N w ryzosferze jęczmienia powoduje silne obniżenie poziomu ekspresji hvMADS27 i zwiększenie poziomu NRT1.1. Zmniejszona ilość HvMADS27 na promotorze HvBG1 powoduje aktywację tego enzymu i uwolnienie ABA z jego koniugatu z glukozą. Wysoki poziom ABA z kolei powoduje skrócenie korzeni rośliny.



Rysunek 13 HvMADS27 reguluje reakcję korzeni jęczmienia na stres związany z nadmiarem azotu. Na podstawie naszych eksperymentów proponujemy mechanizm regulacji odpowiedzi korzeni jęczmienia na stres nadmiaru N. Zwiększone stężenie N w ryzosferze aktywuje transporter azotu NRT1.1, który zapewnia napływ N do komórek korzenia. Wysokie stężenie N zmniejsza ekspresję hvMADS27, co uwalnia z represji ekspresję glukozydazy BG1. BG1 jest aktywowany i katalizuje uwalnianie ABA z koniugatu z glukozą, co powoduje wzrost poziomu ABA i skrócenie korzeni jęczmienia.

6. Dyskusja

W niniejszej pracy wykazano, że czynnik transkrypcyjny HvMADS27, który ulega ekspresji głównie w korzeniach jęczmienia, rozpoznaje miejsca CArG w promotorze genu *HvBG1*, kodującego enzym ß-glukozydazę 1, odpowiedzialną za uwolnienie kwasu abscysynowego (ABA) z nieaktywnego biologicznie koniugatu glukozowego.

W warunkach kontrolnych HvMADS27 negatywnie reguluje poziom HvBG1. W przypadku wystąpienia stresu nadmiaru azotu w ryzosferze poziom HvMADS27 znacznie się obniża, co prowadzi do uwolnienia ekspresji genu *HvBG1* oraz wzrostu stężenia ABA w korzeniach jęczmienia, powodując skrócenie ich długości.

HvMADS27, podobnie jak inne czynniki transkrypcyjne zawierające domenę typu MADS-box, stanowią geny docelowe dla miRNA z rodziny *MIR444*. Występowanie tej rodziny mikroRNA zostało wykazane jedynie u roślin jednoliściennych, a jedną z jej cech charakterystycznych jest to, że geny docelowe dla poszczególnych miRNA kodowane są na przeciwległej nici DNA. (Sunkar i inni., 2005; Lu i inni., 2008; Sunkar i inni., 2008). *HvMADS27* jest kodowany na nici DNA przeciwległej do tej kodującej *MIR444c*.

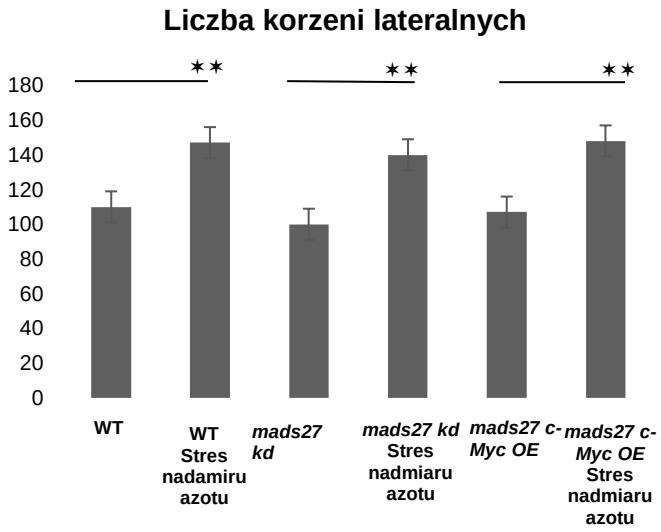
Analiza danych degradomowych pochodzących z korzeni roślin jęczmienia hodowanych w warunkach kontrolnych wykazała występowanie w mRNA HvMADS27 miejsca cięcia odpowiadającego cięciu przez kompleks RISC naprowadzany przez miRNA444c (Rysunek 3). Niemniej jednak, poziom dojrzałej cząsteczki miRNA444c nie koreluje z ekspresją HvMADS27 w warunkach stresu nadmiaru azotu. Wynik ten sugeruje, że miRNA444c nie wpływa znacząco na ekspresję hvMADS27 w badanym

stresie, a regulacja poziomu hvMADS27 za pośrednictwem miRNA444c zachodzi najprawdopodobniej na innych etapach rozwoju rośliny i/lub w odpowiedzi na inne stresy. Analiza wzoru ekspresji dojrzałej cząsteczki miRNA444c wykazała znaczące zmiany jej poziomu podczas poszczególnych etapów rozwojowych jęczmienia (pierwszy, drugi, trzeci, szósty tydzień rozwoju i sześćdziesiąty ósmy dzień wzrostu), co sugeruje rolę miR444c i czynnika transkrypcyjnego HvMADS27 podczas rozwoju rośliny (Rysunek 4a, b).

Niniejsze badania skupione zostały wokół stresu nadmiaru azotu, na skutek którego obserwowano znaczący spadek ekspresji HvMADS27. Analizy fenotypowe mutantów MADS27 wykazały, że czynnik ten kontroluje długość jęczmiennego systemu korzeniowego w odpowiedzi na nadmiar N. Co ciekawe, w liniach *mads27 c-Myc OE* zaobserwowano reakcję podobną do tej, którą wykazują rośliny typu dzikiego (WT). Jednakże, w roślinach WT ekspresja hvMADS27 jest kontrolowana na poziomie mRNA, podczas gdy nie jest tak w przypadku mutantów *mads27 c-Myc OE,* gdzie cDNA MADS27 z etykietą c-Myc znajduje się pod kontrolą promotora ubikwitynowego. Nie możemy jednak bezpośrednio zmierzyć ilości białka MADS27 w roślinach WT i *mads27 c-Myc OE*. Jednakże wykazano, że poziom białka MADS27 z etykietą c-myc jest obniżony w odpowiedzi na stres nadmiaru azotu (Rycina 7d). Wyjaśnieniem tego zjawiska może być fakt, że czynniki transkrypcyjne należące do rodziny MADS-box, mogą funkcjonować jako homo- lub heterodimery i/lub w większych kompleksach, dlatego brak równowagi stechiometrycznej między podjednostkami kompleksu w liniach nadeksprymujących HvMADS27 może prowadzić do jego degradacji i obserwacji fenotypu takiego jak u roślin typu dzikiego (Hugouvieux i inni., 2018). Nie wykluczamy jednocześnie możliwości, iż oddziaływanie MADS27-partner mogło ulec zmianie poprzez nadekspresję MADS27 z etykietą c-myc, co mogło spowodować zmianę

poziomu partnera MADS27, lub poziom partnera MADS27 został zmieniony, ponieważ jest regulowany przez stres nadmiaru azotu. Innym wytłumaczeniem obserwowanego fenotypu mutanta jęczmienia z nadekspresją HvMADS 27 c-myc może być częściowy spadek aktywności tego białka jako represora transkrypcji z uwagi na dołączoną etykietę c-myc. Jednak wyniki ChIP uzyskane dla HvMADS 27 c-myc pozwalają sądzić, że badany czynnik transkrypcyjny jest aktywny. Nie możemy jednak wykluczyć nieco obniżonej aktywności HvMADS 27 c-myc w liniach nadekspresyjnych.

Aby zidentyfikować procesy fizjologiczne kontrolowane przez HvMADS27 zintegrowano podejście molekularne z analizą cech korzeni jęczmienia. Literaturowe doniesienia podają, że nadmiar azotu powoduje skrócenie systemu korzeniowego, ale także wzmaga tworzenie korzeni bocznych u Arabidopsis (Walch-Liu i inni., 2006). System korzeniowy jęczmienia jest typu wiązkowego, oraz składa się z korzeni nodalnych, seminalnych oraz korzeni bocznych o zróżnicowanej zdolności akwizycyjnej (Liu i inni., 2020). Wcześniejsze badania wykazały, że jęczmień tworzy więcej korzeni bocznych w odpowiedzi na dostarczanie azotu, a korzenie seminalne są najbardziej wrażliwe na zmiany substancji mineralnych w ryzosferze (Blaser i inni., 2020). W niniejszych badaniach również zaobserwowano tworzenie większej ilości korzeni bocznych w odpowiedzi na stres nadmiaru azotu w przypadku roślin typu dzikiego, jak również mutantów *hvmads27 kd* i *hvmads27 c-Myc OE*. Co więcej, liczba korzeni bocznych nie zmieniła się znacząco między WT a mutantami w warunkach kontrolnych, co sugeruje, że HvMADS27 kontroluje długość systemu korzeniowego oraz korzeni seminalnych, ale nie liczbę korzeni bocznych (Rysunek 14).



Rysunek 14 Liczba korzeni bocznych obliczona na podstawie skanów systemów korzeniowych roślin WT i mutantów *mads27 kd* i *mads27 c-Myc OE*. Oś x przedstawia analizowane warianty, a oś y liczbę zaobserwowanych korzeni bocznych. W każdym przypadku (WT, *mads27 kd, mads27 c-Myc OE*) zaobserwowano wyższą liczbę korzeni bocznych na skutek stresu nadmiaru N. Ponad wykresami przedstawiono istotność statystyczną na podstawie standardowego testu t-Studenta, wartość *p* ✯✯<0,005

Analiza systemu korzeniowego jest szczególnie ważna, ponieważ głębsze ukorzenienie zwiększa pobieranie azotu poprzez zwiększenie całkowitej eksploracji gleby. Jest to sposób, w jaki rośliny optymalizują długość korzeni, aby reagować na zmieniające się mobilne składniki odżywcze, takie jak azotany, które zwykle występują w głębszych warstwach gleby (Frescher i inni 2020).

Analiza transkryptomu korzeni mutantów *hvmads27 kd* w warunkach kontrolnych wykazała zwiększony poziom genu NRT1.1 oraz HvBG1. Oba geny zawierają w sekwencjach promotorowych motywy CArG rozpoznawane przez czynniki

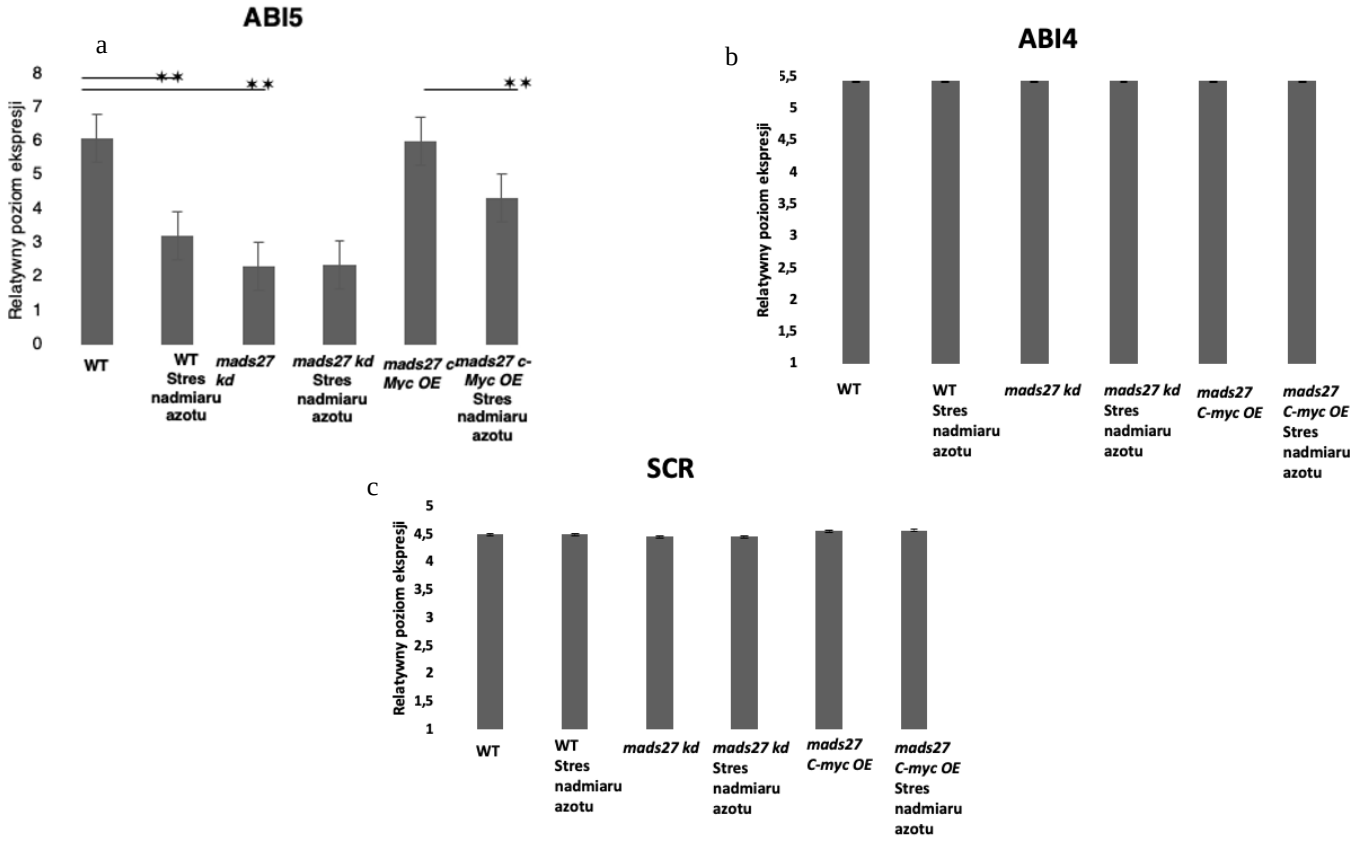
transkrypcyjne z domeną MADS-box. Jednakże eksperyment immunoprecypitacji chromatyny połączony z ilościowym PCR w czasie rzeczywistym potwierdził, że czynnik transkrypcyjny HvMADS27 wiąże się z promotorem genu hvBG1, ale nie NRT1.1. Niemniej jednak poziom mRNA NRT1.1 jest odwrotnie skorelowany z poziomem HvMADS27: zależny od nadmiaru azotu niski poziom hvMADS27 koreluje z wysokim poziomem NRT1.1, podczas gdy w warunkach kontrolnych, gdzie ekspresja MADS27 nie jest obniżona, poziom NRT1.1 jest znacznie niższy. Sugeruje to pośrednią kontrolę poziomu NRT1.1 przez MADS27. Natomiast gen glukozydazy hvBG1 podlega bezpośredniej represji hvMADS27 w warunkach kontrolnych, a obniżenie ekspresji hvMADS27 w stresie z nadmiarem N uwalnia ekspresję hvBG1.

ß-glukozydaza hvBG1 kontroluje poziom kwasu abscysynowego (ABA) w korzeniach jęczmienia. Podobne obserwacje poczyniono również w przypadku pszenicy. Wang i inni. wykazali, że pszeniczny czynnik transkrypcyjny MADS-box, homolog ANR1 z Arabidopsis, aktywuje ekspresję zarówno genu TaBG1, jak i czynnika transkrypcyjnego TaWabi5, który reguluje ekspresję transporterów azotowych z rodziny TaNRT2 (Wang i inni 2020). Sekwencje nukleotydowe i aminokwasowe TaANR1 i HvMADS27 są w 97% podobne. Jednakże, w przeciwieństwie do swojego pszenicznego homologu, hvMADS27 jest represorem ekspresji hvBG1, jak wykazano w analizie transkryptomicznej korzeni mutantów *hvmads27 kd*, gdzie poziom hvBG1 jest podwyższony oraz w analizie ChIP z wykorzystaniem mutantów *hvmads27 c-myc OE*, gdzie poziom MADS27 c-myc spada w obrębie promotora BG1 pod wpływem stresu nadmiaru azotu. Ponadto poziom zarówno mRNA, jak i białka hvBG1 jest podwyższony w roślinach typu dzikiego pod wpływem stresu nadmiaru azotu, co koreluje z obniżonym poziomem hvMADS27.

Rozbieżność między sposobem działania TaANR1 i HvMADS27 może wynikać z różnic ewolucyjnych między pszenicą a jęczmieniem. Pszenica ewoluowała poprzez allopoliploidyzację i hybrydyzację gatunków z rodzin *Aegilops* i *Triticum*, a następnie duplikację genomu (Feldman i inni., 2012). Allopoliploidia przyspieszyła ewolucję genomu poprzez szybkie generowanie zmian genetycznych i epigenetycznych (Feldman i inni., 2012). Ponadto w genomie pszenicy występują dwa homologi AtANR1 (AM502900.1 i XM_037629991.1), co nie ma miejsca w genomie jęczmienia. Ta duplikacja genu może skutkować tworzeniem różnych kompleksów i/lub dimeryzacją z innymi partnerami niż jęczmienny odpowiednik, w wyniku czego jeden gen może być aktywatorem a drugi represorem. W literaturze pojawiają się doniesienia dotyczące przypadków, w których ten sam czynnik transkrypcyjny zawierający domenę MADS działa jako aktywator lub represor w zależności od partnerów z jakimi oddziałuje. Przykładem może być MADS57 w ryżu, który hamuje ekspresję genu DWARF14, ale wzmacnia ekspresję OsWRKY94 (Guo i inni., 2013; Chen i inni., 2018; Chu i inni., 2019).

Wysokie stężenie ABA skutkuje skróceniem korzeni (Harris i inni., 2015). ABA kontroluje wzrost korzeni za pośrednictwem wielu mechanizmów (Sun i inni., 2018). Natomiast badania z wykorzystaniem Arabidopsis pokazują, że ABA poprzez regulację aktywności czynnika transkrypcyjnego SCARECROW (SCR), regulowanego również przez poziom azotu w ryzosferze, kontroluje wzrost korzeni. SCR w warunkach kontrolnych hamuje ekspresję ABA INSENSITIVE 4 (ABI4) i ABA INSENSITIVE 5 (ABI5) w merystemie wierzchołkowym korzenia (Harris i inni., 2017). Wzrost poziomu ABA w ryzosferze powoduje obniżenie poziomu SCR oraz wzrost ekspresji ABI4 i ABI5 co u Arabidopsis skutkuje skróceniem korzeni.

Jednakże, w niniejszych badaniach zaobserwowano obniżenie ekspresji HvABI5, na skutek stresu nadmiaru azotu, co koreluje ze skróceniem korzeni w WT, *mads27 c-Myc OE* i w roślinach *hvmads2 7kd* zarówno w warunkach kontrolnych, jak i nadmiaru azotu (Rysunek 15a). Jednakże nie zaobserwowano zmian w poziomie ekspresji ABI4. Co więcej, poziom jęczmiennego homologa SCR również nie uległ zmianie w odpowiedzi na stres nadmiaru azotu (Rysunek 15b, c). Dotychczas, w przypadku jęczmienia wykazano, że poziom ABI5 wzrasta pod wpływem stresu suszy, któremu towarzyszy zwiększony poziom ABA (Daszkowska-Golec i inni 2016, Collin i inni



2020). Wydaje się zatem, że mechanizm regulujący skracanie korzeni zależne od nadmiaru azotu różni się pomiędzy Arabidopsis i jęczmieniem, jak również uzyskane wyniki sugerują nadrzędną rolą stresu nadmiaru azotu nad stresem spowodowanym wzrostem ABA.

Rysunek 15 Poziom ekspresji ABI5, ABI4, SCR w korzeniach roślin typu WT oraz mutantach MADS27 w warunkach kontrolnych i w stresie nadmiaru azotu. (a) RT-qPCR pokazujące poziom ekspresji ABI5 w WT i mutantach *mads27 kd* i *mads27 c-Myc OE* w warunkach kontrolnych i nadmiaru N. Oś X przedstawia analizowane warianty, a oś Y przedstawia poziom ekspresji w stosunku do czynnika 1 rybozylacji ADP. Poziom ABI5 jest obniżony w korzeniach pod wpływem stresu nadmiaru N zarówno w roślinach WT, jak i mads27 c-Myc OE, ponadto obniżenie ekspresji ABI5 obserwuje się w korzeniach mutanta mads27 kd zarówno w warunkach kontrolnych jak i w stresie. (b) RT-qPCR pokazujące poziom ekspresji ABI4 w WT i mutantach *mads27 kd* i *mads27 c-Myc OE* w warunkach kontrolnych i nadmiaru N. Poziom ABI4 nie ulega zmianie. (c) RT-qPCR pokazujące poziom ekspresji SCR w WT i mutantach *mads27 kd* i *mads27 c-Myc OE* w warunkach kontrolnych i nadmiaru N. Poziom SCR nie ulega zmianie. Ponad wykresami przedstawiono istotność statystyczną na podstawie standardowego testu t-Studenta, wartość p ★★<0,005

Pełne wyjaśnienie mechanizmu skracania korzeni u jęczmienia za pośrednictwem ABA, którego poziom zależy od poziomu azotu w korzeniach, wymaga dalszych badań. Niemniej jednak niniejsze wyniki dostarczają nowych informacji na temat reakcji korzeni jęczmienia na stres nadmiaru azotu i stanowią podstawę do dalszych badań nad mechanizmem reakcji zbóż na przenawożenie.

7. Podsumowanie

1. Jęczmienny czynnik transkrypcyjny hvMADS27 jest kodowany na nici DNA przeciwległej do nici kodującej gen *MIR444c*.
2. HvMADS27 jest genem docelowym dla miRNA444c w warunkach kontrolnych.
3. HvMADS27 ulega ekspresji głównie w korzeniach jęczmienia a jego poziom jest znacznie obniżony pod wpływem stresu nadmiaru azotu, natomiast jest niewrażliwy na niedobór azotu.
4. Mutanty z obniżonym poziomem HvMADS27 wykazują krótsze korzenie w warunkach kontrolnych, wyższe stężenie azotu oraz ABA w tkance oraz nie odpowiadają na stres nadmiaru azotu.

5. HvMADS27 reguluje ekspresję genu BG1 odpowiedzialnego za uwolnienie ABA z nieaktywnego koniugatu z glukozą.
6. Obniżenie poziomu HvMADS27 w warunkach stresu nadmiaru azotu powoduje uwolnienie ekspresji BG1, co prowadzi do akumulacji ABA w korzeniach jęczmienia i skrócenia ich długości.

Literatura

Aerts N, de Bruijn S, van Mourik H, Angenent GC, van Dijk ADJ (2018) Comparative analysis of binding patterns of MADS-domain proteins in Arabidopsis thaliana. BMC Plant Biology (131).

Almagro A, Lin S-H, Tsay Y-F (2008) Characterization of the Arabidopsis nitrate transporter NRT1.6 reveals a role of nitrate in early embryo development. Plant Cell (20) 3289-3299

Bartel DP (2004) MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. Cell, (116): 281-297

Baumberger N, Baulcombe DC (2005) Arabidopsis ARGONAUTE1 is an RNA Slicer that selectively recruits microRNAs and short interfering RNAs. Proc. Natl. Acad. Sci., (102): 11928-11933

Blaser SRG, Koebernick N, Spott O, Thiel E, Vetterlein D (2020) Dynamic of localized nitrogen supply and relevance for root growth of Vicia faba (‘Fuego’) and Hordeum vulgare (‘Marthe’) in soil. Scientific Reports 10(1):15776.

Bloom AJ, Sukrapanna SS, Warner RL (1992) Root respiration associated with ammonium and nitrate absorption and assimilation by barley. Plant Physiol (99): 1294-1301.

Canas RA, Quillere I, Christ A, Hirel B (2009) Nitrogen metabolism in the developing ear of maize (Zea mays): analysis of two lines contrasting in their mode of nitrogen management. New Phytol. 184(2): 340-352

Chen K, Kumudini SV, Tollenaar M, Vyn TJ (2015) Plant biomass and nitrogen partitioning changes between silking and maturity in newer versus older maize hybrids. Field Crop. Res.(183):315.

Chen L, Ortiz-Lopez A, Jung A, Bush DR (2001) ANT1, an aromatic and neutral amino acid transporter in Arabidopsis. Plan Physiology. (125) 1813-1820.

Chen L, Zhao Y, Xu S, Zhang Z, Xu Y, Zhang J, Chong K (2018) OsMADS57 together with OsTB1 coordinated transcription of its target OsWRKY94 and D14 to switch its organogenesis to defense for cold adaptation in rice. New Phytol. 218(1): 219-231.

Chiba A, Ishida H, Nishizawa NK, Makino A, Mae T (2003) Exclusion of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase from chloroplasts by specific bodies in naturally senescing leaves of wheat. Plant Cell Physiol. 44(9):914-21.

Chu Y, Xu N, Wu Q, Yu B, Li X, Chen R, Huang J (2019) Rice transcription factor OsMADS57 regulates plant height by modulating gibberellin catabolism. Rice (12):38.

Collin A, Daszkowska-Golec A, Kurowska M, Szarejko I (2020) Barlet ABI5 (Abscisic Acid INSENSITIVE 5) is involved in abscisic Acid-dependent drought response. Front Plant Sci. 11:1138

Cutler SR, Rodriguez PL, Finkelstein RR, Abrams SR (2010) Abscisic acid: emergence of a core signaling network. Annu Rev Plant Biol. (61) 651-79.

Diaz C, Lemaître T, Christ A, Azzopardi M, Kato Y, Sato F, Morot-Gaudry JF, Le Dily F, Masclaux-Daubresse C (2008) Nitrogen recycling and remobilization are differentially controlled by leaf senescence and development stage in Arabidopsis under low nitrogen nutrition. Plant Physiol. (3):1437-49.

Dong W, Wang M, Xu F, Quan T, Peng K, Xiao L, Xia G (2013) Wheat oxophytodienoate reductase gene TaOPR1 confers salinity tolerance via enhancement of abscisic acid signaling and reactive oxygen species scavenging. Plant Physiol (161): 1217–1228.

Eminaga S, Christodoulou DC, Vigneault F, Church GM, Seidman JG (2013) Quantification of microRNA expression with next-generating sequencing. Curr Protoc Mol Biol. Chapter 4 Unit 4.17.

Feldman M, Levy AA (2012) Genome evolution due to allopolyploidization in wheat. Genetics. 192(3): 763-774.

Filiz E, Akbudak MA (2020) Ammonium transporter 1 (AMT1) gene family in tomato (Solanum lycopersicum L.): Bioinformatics, physiological and expression analyses under drought and salt stresses. Genomics.(112): 3773-3782.

Filleur S, Dorbe MF, Cerezo M, Orsel M, Granier F, Gojon A, Daniel-Vedele F (2001) An Arabidopsis T-DNA mutant affected in Nrt2 genes is impaired in nitrate uptake. FEBS Lett. 489(2-3):220-4.

Finkelstein RR, Gampala SSL, Rock CD (2002) Abscisic acid signaling in seeds and seedlings. Plant Cell. (14):15-45.

Frescher GT, Roumet C, Comasd LH, Weemstra M, Bengough AG, Rewald B, Bardgett RD, De Deyn GB, Johnson D, Klimesova J, Lukac M, McCormack ML, Meier IC, Pages L, Poorter H, Prieto I, Wurzburger N, Zadworny M, Zadworna-Bagniewska A, Blancaflor EB, Brunner I, Gessler A, Hobble SE, Iversen CM, Mommer L, Picon-Cochard C, Postma JA, Rose L, Ryser P, Scherer-Lorenzen M, Soudzilovskaia NA, Sun T, Valverde-Barrantes OJ, Weigelt A, York LM, Stokes A (2020) Root traits as drivers of plant and ecosystem functioning: current understanding, pitfalls and future research needs. New Phytologist.(63)

Galloway JN, Cowling EB (2002) Reactive nitrogen and the world: 200 years of change. Ambio. (31): 64–71.

Gazzarrini S, Lejay, Gojon A, Ninnemann O, Frommer WB, Von Wiren (1999) Three functional transporters for constitutive, diurnally regulated, and starvation-induced uptake of ammonium into Arabidopsis roots. Plant Cell. (5): 937-48.

Gorbovskiy K, Kazakov A, Norov A, Malyavin A, Mikhaylichenko A (2017) Properties of complex ammonium nitrate-based fertilizers depending on the degree of phosphoric acid ammoniation. International Journal of Industrial Chemistry. (8) 315:327

Goulding K, Jarvis S, Whitmore A (2007) Optimizing nutrient management for farm systems. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.(12): 363(1491):667-80.

Grabowska A, Smoczynska A, Bielewicz D, Pacak A, Jarmolowski A, Szweykowska-Kulinska Z (2020) Barley microRNAs as metabolic sensors for soil nitrogen availability. Plan Science (299): 110608.

Gramzow L, TheiBen G (2019) Plant miRNA conservation and evolution. Methods Mol Biol. (1932):41-50

Guo B, Li Y, Wang S, Li S, Lv C, Xu R (2020) Characterization of the nitrate transporter gene family and functional identification of HvNRT2.1 in barley (Hordeum vulgare L.) PLOS ONE. 15(4): e0232056

Guo S, Xu Y, Liu H, Mao Z, Zhang C, Ma Y, Zhang Q, Meng Z, Chong K (2013) The interaction between OsMADS57 and OsTB1 modulates rice tillering via DWARF14. Nature Communications (4):1566.

Han M, Wong J, Su T, Beatty PH, Good A (2016) Identification of nitrogen use efficiency genes in barley: searching for QTLs controlling complex physiological traits. Front.Plant Sci.

Harris JM (2015) Abscisic Acid: hidden architect of root system structure. Plants (Basel). 4(3):548-572.

Harris JM, Ondzighi-Assoume CA (2017) Environmental nitrate signals through abscisic acid in the root tip. Plant Signal Behav. 12(1):e1273303.

Heuermann D, Hahn H, Von Wiren N (2021) Seed yield and nitrogen efficiency in oilseed rape after ammonium nitrate or urea fertilization. Front Plant Sci.(11): 608785.

Ho C-H, Lin S-H, Hu H-C, Tsay Y-F (2009) CHL1 functions as a nitrate sensor in plants. Cell (138): 1184-1194.

Hugouvieux V, Zubieta C (2018) MADS transcription factors cooperate: complexities of complex formation. Journal of Experimental Botany. (68): 1821-1823.

Jiao X, Lyu Y, Wu X, Li H, Cheng L. Zhang C, Yuan L, Jiang R, Jiang B, Rengel Z (2016) Grain production versus resource and environmental costs: towards increasing sustainability of nutrient use in China J. Exp. Bot.(67) : 4935-4949.

Jiao X, Wang H, Yan J, Kong X, Lie Y, Chu J, Chen X, Fang R, Yan Y (2020) Promotion of BR biosynthesis by miR444 is required for ammonium-triggered inhibition of root growth. Plant Physiol. (3): 1454-1466.

Kant S, Bi Y-M, Rothstein SJ (2011) Understanding plant response to nitrogen limitation for the improvement of crop nitrogen use efficiency. Journal of Experimental Botany.(62): 1499-1509.

Kiyomiya S, Nakanishi H, Uchida H, Tsuji A, Nishiyama S, Futatsubashi M, Tsukada H, Ishioka NS, Watanabe S, Ito T, Mizuniwa C, Osa A, Matsuhashi S, Hashimoto S, Sekine T, Mori S (2001) Real time visualization of ^{13}N-translocation in rice under different

environmental conditions using positron emitting tracer imaging system. Plant Physiol. 125(4):1743:1753

Kobae Y, Tamura Y, Takai S, Banba M, Hata S (2010) Localized expression of arbuscular mycorrhiza-inducible ammonium transporters in soybean. Plant Cell Physiol. (9): 1411-5.

Kong L, Xie Y, Hu L, Si J, Wang Z. (2017) Excessive nitrogen application dampens antioxidant capasity and grain filling in wheat as revealed by metabolic and physiological analyses. Sci Rep.(24): 7:43363.

Kurihara Y, Takashi Y, Watanabe Y (2006) The interaction between DCL1 and HYL1 is important for efficient and precise processing of pri-microRNA in plant microRNA biogenesis. RNA, (12): 206-212

Lea PJ, Forde BG (1994) The use of mutants and transgenic plants to study amino acid metabolism. Plant Cell and Environment. (17): 541-556.

Lea PJ,Miflin BJ (1974) Alternative route for nitrogen assimilation in higher plants. Nature. 251(5476): 614-6.

Lehmeier CA, Wild M, Schnyder H (2013) Nitrogen stress affects the turnover and size of nitrogen pools supplying leaf growth in a grass. Plant Physiol. (162): 2095-2105.

Li X, Sanagi M, Lu Y, Nomura Y, Stolze S.C., Yasuda S, Saijo Y, Schulze WX, Feil R, Stitt M, Lunn JE, Nakagami H, Sato T, Yamaguchi J. (2020) Protein phosphorylation dynamics under carbon/nitrogen-nutrient stress and identification of a cell death-related receptor-like kinase in Arabidopsis Front. Plant Sci.(11):377.

Lin S-H, Kuo H-F, Canivenc G, Lin C-S, Lepetit M, Hsu P-K, Tillard P, Lin H-L, Wang Y-Y, Tsai C-B, Gojon A, Tsay Y-F (2008) Mutation of the Arabidopsis NRT1.5 nitrate transporter causes defective root-to-shoot nitrate transporter. Plant Cell (9):2514-28

Lin SH, Kuo HF, Canivenc G, Lin CS, Lepetit M, Hsu PK, Tillard P, Lin HL, Wang YY, Tsai CB, Gojon A, Tsay YF(2008) Mutation of the Arabidopsis NRT1.5 nitrate transporter causes defective root-to-shoot nitrate transport. Plant Cell. 20(9):2514-28.

Lips SH, Leidi EO, Silberbush M, Soares MIM, Lewis OEM (2008) Physiological aspects of ammonium and nitrate fertalization. Journal of Plant Nutrition. (13):1271-1289.

Liu Z, Giehl RFH, Hartmann A, Hajireazaei R, Carpentier S, Von Wiren N (2020) Seminal and nodal roots of barley differ in anatomy proteome and nitrate uptake capacity. Plan Cell Physiol. (61):1297-1308.

Love MI, Huber W, Anders S (2014) Moderate estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. Genome Biology.15(12):550.

Lu C, Jeong DH, Kulkarni K, Pillay M, Nobuta K, German R, ThatcherSR, Maher C, Zhang L, Ware D, et al. (2008) Genome-wide analysis for discovery of rice microRNAs reveals natural antisense microRNAs (nat-miRNAs). Proc Natl Acad Sci U S A (105): 4951–4956.

Mallory AC, Vaucheret H (2006) Functions of microRNAs and related small RNAs in plants. Nat. Genet., 38 (Suppl): 31-36

Marschner H (1995) Mineral nutrition of higher plants. London:Academic Press . 889.
Meyer C, Stitt M. (2001) Nitrate reductase and signalling. Plant nitrogen.New York: Springer; 37–59.

MicroRNAs in plants. Genes Dev. 16 (13) 1616:1626

Miller AJ, Cramer MD (2004) Root nitrogen acquisition and assimilation. Plant and Soil. (274): 1-36.

Mu X, Chen Q, Chen F, Yuan L, Mi G (2016) Within-leaf nitrogen allocation in adaptation to low nitrogen supply in maize during grain-filling stage Front. Plant Sci. (7): 699.

Muino JM, Smaczniak C, Angenent GC, Kaufmann K, Van Gijk ADJ (2014) Structural determinants of DNA recognition by plant MADS-domain transcription factors. Nucleic Acid Research (42):2138-2146.

Orsel M, Chopin F, Leleu O, Smith SJ, Krapp A, Daniel-Vedele F, Miller AJ (2006) Characterization of a two-component high-affinity nitrate uptake system in Arabidopsis. Physiology and protein-protein interaction. Plant Physiol. (3): 1304-17.

Otegui MS, Noh YS, Martínez DE, Vila Petroff MG, Staehelin LA, Amasino RM, Guiamet JJ (2005) Senescence-associated vacuoles with intense proteolytic activity develop in leaves of Arabidopsis and soybean. Plant J. 41(6):831-44.

Pollmer WG, Eberhard D, Klein D, Dhillon BS (1979) Genetic control of nitrogen uptake and translocation in maize. Crop Science (19) 82:86

Reinhart B.J., Weinstein E.G, Rhoades M.W. , Bartel B. , .Bartel D.P (2002)
Rentsch D, Schmidt S, Tegeder M (2007) Transporters for uptake and allocation of organic nitrogen compounds in plants. FEBS Letters. (581): 2281-2289.

Rittstieg K, Suurnakki A, Suortti T, Kruus K, Guebitz G, Buchert J (2002) Investigations on the laccase-catalyzed polymerization of lignin model compounds using size-exclusion HPLC. Enzyme and Microbial Technology. (4):403-410.

Rybak M., Gąbka M., Ratajczak I., Woźniak M., Sobczyński T., Joniak T. (2020) In-situ behavioral response and ecological stoichiometry adjustment of macroalgae (Characeae, Charophyceae) to iron overload: Implications for lake restoration. Water Research (173).

Sah SK, Reddy KR, Li J. (2016) Abscisic acid and abiotic stress tolerance in crop plants. Front. Plant Sci.(7)571.

Skubacz A, Daszkowska-Golec, Szarejko I (2016) The role and regulation of ABI5 (ABA-Insensitive 5) in plant development, abiotic stress responses and phytohormone crosstalk. Front Plant Sci.

Sohlenkamp, C., Shelden, M., Howitt, S., and Udvardi, M. K. (2000) Characterization of Arabidopsis AtAMT2, a novel ammonium transporter in plants. FEBS Lett. 467, 273–278. Doi: 10.1016/S0014-5793(00)01153-4

Sonoda Y, Ikeda A, Saiki S, von Wirén N, Yamaya T, Yamaguchi J (2003a) Distinct expression and function of three ammonium transporter genes (OsAMT1;1-1;3) in rice. Plant Cell Physiol. 44(7):726-34.

Sonoda Y, Ikeda A, Saiki S, Yamaya T, Yamaguchi J (2003) Feedback regulation of the ammonium transporter gene family AMT1 by glutamine in rice. Plan and Cell Physiology (44): 1396-1402.

Stepien A, Knop K, Dolata J, Taube M, Bajczyk M, Barciszewska-Pacak M (2016) Post-transcriptional coordination of splicing and microRNA biogenesis in plants. WIREs RNA, 8 (3)

Sunkar R, Girke T, Jain PK, Zhu JK (2005) Cloning and characterization of microRNAs from rice. Plant Cell (17): 1397–1411.

Sunkar R, Zhou X, Zheng Y, Zhang W, Zhu JK (2008) Identification of novel and candidate miRNAs in rice by high throughput sequencing. BMC Plant Biology (8): 25.

Tcherkes G, Hodges M (2008) How stable isotopes may help to elucidate primary nitrogen metabolism and its interaction with (photo) respiration in C3 leaves. J Exp Bot. 59 (7): 1685-93.

Thompson AR, Vierstra RD (2005) Autophagic recycling: lessons from yeast help define the process in plants. Curr Opin Plant Biol. 8(2):165-73.

Tsay YF, Chiu CC, Tsai CB, Ho CH, Hsu PK (2007) Nitrate transporters and peptide transporters. FEBS Lett. 581(12): 2290-300

Unno H, Uchida T, Sugawara H, Kurisu G, Sugiyama T, Yamaya T, Sakakibara H, Hasa T, Kusunoki M (2006) Atomic structure of plant glutamine synthetase: a key enzyme for plant productivity. J Biol Chem. 281 (39): 29287-96.

Uribelarrea M, Crafts-Brandner SJ, Below FE (2009) Physiological N response of field-grown maize hybrids (Zea mays L.) with divergent yield potential and grain protein concentration. Plant Soil. (316): 151

Vaucheret H, Vazquez F, Crete P, Bartel DP (2004)l The action of ARGONAUTE1 in the microRNA pathway and its regulation by the microRNA pathway are crucial for plant development Genes (18): 1187-1197

Vos J, Van Der Putten P, Birch CJ (2005) Effect of nitrogen supply on leaf appearance, leaf growth, leaf nitrogen economy and photosynthetic capacity in maize (Zea mays L.). Field Crop. Res. (93): 64-73.

Walch-Liu P, Ivanov II, Filleur S, Gan Y, Remans T, Forde BG (2006) Nitrogen regulation of root branching. Ann Bot.95(5):875-881.

Wang M, Zhang P, Liu Q, Li G, Di D, Xia G, Kronzucker HJ, Fang S, Chu J, Shi W (2020) TaANR1-TaBG1 and TaWabi5-TaNRT2s/NAR. Link ABA metabolism and nitrate acquisition in wheat roots. Plant Physiology.(182):1440-1453.

Wang W, Hu B, Yuan D, Liu Y, Che R, Hu Y, Ou S, Liu Y, Zhang Z, Wang H, Li H, Jiang Z, Zhang Z, Gao X, Qiu Y, Meng X, Liu Y, Bai Y, Liang Y, Wang Y, Zhang L, Li L, Sodmergen, Jiang H, Li J, Chu C (2018) Expression of the nitrate transporter gene OsNRT1.1A/OsNPF6.3 confers high yield and early maturation in rice. Plant Cell. (3) 638:651

Wen Z, Tyerman SD, Dechorgnat J, Ovchinnikova E, Dhugga KS, Kaiser BN (2017) Maize NPF6 proteins are homologs of Arabidopsis CHL1 that are selective for both nitrate and chloride. Plant Cell. (10): 2581-2596

Wingler A, Masclaux-Daubresse C, Fischer AM (2009) Sugars, senescence, and ageing in plants and heterotrophic organisms.J Exp Bot. 60(4):1063-6.

Xiong Y, Contento AL, Bassham DC (2005) AtATG18a is required for the formation of autophagosomes during nutrient stress and senescence in Arabidopsis thaliana. Plant J. 2005 42(4):535-46.

Yan Y, Wang H, Hamera S, Chen X, fang R (2014) miR444a has multiple functions in the rice nitrate-signaling pathway. The plant Journal. (78): 44-55.

Yao B, Cao J, Zhao C, Rengel Z (2011) Influence of ammonium and nitrate supply on growth, nitrate reductase activity and N-use efficiency in a natural hybrid pine and its parents. Journal of Plant Ecology.(4): 275-282.

Yu C, Li Y, Zhang A, Su S, Yan A, Huang L, Ali I, Liu Y, Forde BG, Gan Y (2015) MADS-box transcription factor OsMADS25 regulated root development through affection of nitrate accumulation in rice. Plos One. 10(8):e0135196.

Zhang G, Xu N, Chen H, Wang G, Huang J (2018) OsMADS25 regulates root system development via auxin signalling in rice. The plant Journal.(95): 1004-1022.