
PRACA DOKTORSKA



**Korelacja zmian w molekularnym mechanizmie biosyntezy
białka w odpowiedzi na stres wywołany herbicydami
w układzie roślinnym**

Anna Maria Kietrys

Promotor: prof. dr hab. Tomasz Twardowski
Zakład Biologii RNA
Zespół Biosyntezy Białka
Instytut Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk
Poznań, 2013

*Serdecznie dziękuję
Panu prof. dr hab. Tomaszowi Twardowskiemu
za opiekę naukową, okazaną pomoc i wiarę we mnie*

*Pani prof. dr hab. Mirosławie Z. Naskręt-Barciszewskiej
składam podziękowania za cenne rady i okazaną pomoc*

*Panu prof. dr hab. Kazimierzowi Adamczewskiemu
dziękuję za otrzymany materiał roślinny i praktyczne rady*

*Panu prof. dr hab. Markowi Figlerowiczowi
dziękuję za stworzenie możliwości współpracy naukowej*

*Panu prof. dr hab. Janowi Barciszewskiemu
dziękuję za niezwykle cenne dyskusje*

*Serdecznie dziękuję
prof. nadzw. dr hab. Elizie Wyszko
za dobre słowo i okazaną pomoc*

*dr Agnieszce Żmieńko
za owocną współpracę i cenne rady*

*mgr Michałowi Góralskiemu
za współpracę „mikromacierzową”*

*mgr inż. Agnieszce Górskiej
za nieustające wsparcie nie tylko na polu naukowym*

*mgr inż. Dorocie Gurdzie
mgr inż. Aleksandrze Szopie
za cierpliwość i wsparcie w dążeniu do celu*

*koleżankom z Laboratorium
dr Agnieszce Fedoruk-Wyszomirskiej
dr Agacie Tyczewskiej
dr Kamilli Bąkowskiej-Żywickiej
dr Monice Piweckiej
dr Katarzynie Rolle
dr Beacie Plitta
dr Mirosławie Skupińskiej
mgr Agnieszce Belter
mgr inż. Joannie Gracz
oraz wszystkim pracownikom Zakładu Biologii RNA
i Samodzielnego Zakładu Epigenetyki
za okazaną pomoc i niezapomnianą atmosferę*

Pracę tę dedykuję Rodzicom

Spis treści

1.	Streszczenie	4
2.	Cel pracy.....	5
3.	Wykaz ważniejszych skrótów	6
4.	Wprowadzenie literaturowe.....	8
4.1.	Kukurydza – charakterystyka i warunki uprawy.....	8
4.2.	Charakterystyka herbicydów	13
4.2.1.	Herbicyd Roundup.....	14
4.2.2.	Herbicyd Titus	19
4.2.3.	Herbicyd Basta	20
4.3.	Przeływ informacji genetycznej	21
4.3.1.	DNA i epigenetyka	22
4.3.2.	Niekodujące RNA	36
4.3.3.	Degradom	41
4.3.4.	Translacja.....	42
4.4.	Rośliny w warunkach stresowych	44
5.	Materiały i metody	47
5.1.	Hodowla, ocena fenotypowa i zbiór materiału roślinnego.....	47
5.1.1.	Materiał roślinny	47
5.1.2.	Warunki hodowli	47
5.1.3.	Ocena fenotypowa roślin i zbiór materiału.....	47
5.2.	Stosowane odczynniki chemiczne.....	48
5.2.1.	Odczynniki i materiały	48
5.2.2.	Enzymy.....	49
5.2.3.	Przeciwciała.....	50
5.2.4.	Izotopy	50
5.2.5.	Oligonukleotydy	50
5.2.6.	Zestawy komercyjne.....	51
5.2.7.	Bufory i roztwory	52
5.2.8.	Wykorzystane bazy danych.....	56
5.3.	Analiza ekspresji genów z wykorzystaniem mikromacierzy oligonukleotydowych.....	56
5.3.1.	Izolacja całkowitego RNA.....	57
5.3.2.	Analiza ilościowa i jakościowa całkowitego RNA	58
5.3.3.	Trawienie całkowitego RNA DNazą.....	58
5.3.4.	Odwrotna transkrypcja	59
5.3.5.	Znakowanie barwnikami fluorescencyjnymi cDNA.....	60
5.3.6.	Hybrydyzacja do płytek mikromacierzowych.....	61

5.3.7.	Analiza bioinformatyczna i statystyczna.....	62
5.4.	Analiza ekspresji genów z wykorzystaniem techniki real time PCR.....	63
5.4.1.	Odwrotna transkrypcja, otrzymywanie cDNA do reakcji real time PCR.....	63
5.4.2.	PCR w gradiencie temperatur.....	63
5.4.3.	Analiza ilościowa i jakościowa całkowitego DNA.....	65
5.4.4.	Real time PCR.....	65
5.4.5.	Analiza obliczeniowa i statystyczna wyników.....	66
5.5.	Analiza poziomu globalnej metylacji DNA.....	67
5.5.1.	Izolacja całkowitego DNA.....	67
5.5.2.	Enzymatyczne trawienie DNA i znakowanie.....	68
5.5.3.	Rozdział dwukierunkowy TLC.....	69
5.5.4.	Analiza obliczeniowa i statystyczna wyników.....	70
5.6.	Metoda badania miejsc metylacji w DNA z użyciem siarczanu (IV) sodu.....	70
5.6.1.	Modyfikacja DNA wodorosiarczanem (IV) sodu.....	71
5.6.2.	Reakcja PCR.....	72
5.7.	Analiza modyfikacji epigenetycznych chromatyny w obrębie wybranych genów z wykorzystaniem techniki Chip – immunostrącanie chromatyny.....	73
5.7.1.	Blokowanie białek Protein A Agarozy.....	74
5.7.2.	Chemiczne zszywanie komponentów chromatyny w materiale roślinnym.....	74
5.7.3.	Izolacja jąder komórkowych.....	75
5.7.4.	Sonikacja chromatyny.....	75
5.7.5.	Oczyszczanie chromatyny.....	76
5.7.6.	Immunostrącanie.....	76
5.7.7.	Rozszywanie chromatyny.....	77
5.7.8.	Izolacja DNA.....	78
5.7.9.	Analiza poziomu obecności znaczników epigenetycznych.....	78
5.8.	Analiza zmian ilościowych i jakościowych małych niekodujących RNA.....	79
5.8.1.	Izolacja całkowitego RNA.....	79
5.8.2.	Frakcjonowanie niekodujących RNA.....	79
5.8.3.	Enzymatyczne cięcie i znakowanie RNA.....	80
5.8.4.	Rozdział dwukierunkowy TLC.....	81
5.8.5.	Analiza obliczeniowa i statystyczna.....	81
5.9.	Analiza wpływu czynników aktywnych herbicydów na wydajność wiązania aa-tRNA do rybosomu na matrycy poliU.....	82
5.9.1.	Izolacja tRNA.....	82
5.9.2.	Oczyszczanie tRNA na DEAE-Celulozie.....	83
5.9.3.	Oczyszczanie tRNA na BD-Celulozie.....	83
5.9.4.	Izolacja rybosomów 80S z <i>Zea mays</i>	84

5.9.5.	Izolacja frakcji enzymatycznej S100.....	85
5.9.6.	Reakcja aminoacylacji tRNA	86
5.9.7.	Preparatywna reakcja aminoacylacji	86
5.9.8.	Reakcja enzymatycznego wiązania Phe-tRNA ^{Phe} do poli(U) rybosomów (RW)	86
6.	Wyniki i dyskusja	88
6.1.	Hodowla, ocena fenotypowa i zbiór materiału roślinnego	88
6.1.1.	Ocena działania herbicydu Roundup	89
6.1.2.	Ocena działania herbicydu Titus	92
6.1.3.	Ocena działania herbicydu Basta.....	95
6.2.	Analiza zmian poziomu ekspresji genów w warunkach stresowych.....	99
6.2.1.	Przygotowanie materiału biologicznego do analizy zmian poziomu ekspresji genów techniką mikromacierzową.....	100
6.2.2.	Analiza zmian w poziomie ekspresji genów z wykorzystaniem techniki mikromacierzowej	106
6.2.3.	Przygotowanie materiału biologicznego do analizy zmian w poziomie ekspresji genów techniką PCR w czasie rzeczywistym	111
6.2.4.	Analiza zmian w poziomie ekspresji genów z wykorzystaniem techniki PCR w czasie rzeczywistym	113
6.3.	Analiza zmian w poziomie globalnej metylacji DNA w warunkach stresowych	133
6.4.	Analiza obecności m ⁵ C w sekwencji genu białka podobnego do arabinoglikanu z zastosowaniem metody modyfikacji wodorosiarczanem (IV) sodu	137
6.5.	Analiza obecności modyfikacji epigenetycznych białek histonowych w obrębie sekwencji genów	144
6.6.	Analiza zmian w poziomie modyfikacji RNA w obrębie frakcji małych niekodujących RNA	150
6.7.	Analiza wpływu czynników aktywnych herbicydów na wydajność wiązania aa-tRNA do rybosomu na matrycy poliU	167
7.	Wnioski.....	172
8.	Wykaz literatury	173
9.	Życiorys naukowy	194
10.	Załączniki	200

1. Streszczenie

Kukurydza jest rośliną o dużym znaczeniu gospodarczym, która znalazła szerokie zastosowanie przemysłowe: w produkcji bioetanolu, w przemyśle paszowym, spożywczym i włókienniczym. Intensyfikacja upraw kukurydzy i dążenie do ciągłego zwiększania produktywności rośliny wiążą się z powszechnym wykorzystaniem środków ochrony roślin, w tym herbicydów. Zabiegi oprysku herbicydami kukurydzy stanowią czynnik abiotyczny powodujący stres. Na rynku dostępne są linie kukurydzy uzyskane technikami inżynierii genetycznej, które posiadają cechę odporności na działanie herbicydów. W moich badaniach dysponowałam roślinami kukurydzy, które wykazywały naturalną tolerancję lub wrażliwość na działanie herbicydów Roundup, Titus i Basta. Z wykorzystaniem techniki mikromacierzy oligonukleotydowych przeanalizowałam zmiany w poziomie ekspresji genów u kukurydzy zwyczajnej w odpowiedzi na warunki stresowe spowodowane zastosowaniem herbicydów. Wytypowałam geny zaangażowane w reakcję roślin na działanie Roundup i potwierdziłam uzyskane wyniki z użyciem PCR w czasie rzeczywistym. Przeprowadziłam analizę obecności znaczników epigenetycznych w obrębie sekwencji genu kodującego białka podobne do arabinoglikanu wytypowanego, jako biorący udział w kształtowaniu cechy odporności na Roundup. Określiłam poziom zmian w całkowitej metylacji DNA w liściach i wskazałam ich korelację ze zróżnicowaną odpowiedzią na stres herbicydowy u kukurydzy. Oznaczyłam zmienność występowania modyfikowanych nukleotydów w małych RNA w warunkach stresowych wywołanych działaniem Roundup. Wykryłam również we frakcji małych RNA modyfikowany monofosforan nukleotydu, który nie został opisany w literaturze, a którego występowanie można korelować z działaniem herbicydu.

Przeprowadzone przeze mnie doświadczenia pozwoliły na lepsze zrozumienie molekularnego mechanizmu wykształcenia w roślinie tolerancji na warunki stresowe wywołane działaniem herbicydu Roundup. Dane te staną się podstawą do późniejszego wytypowania biomarkerów, umożliwiających rozróżnienie roślin odpornych od wrażliwych na warunki stresu herbicydowego.

2. Cel pracy

Celem pracy było wykazanie korelacji epigenetycznych i regulatorowych mechanizmów odpowiedzi komórkowej rośliny na warunki stresu herbicydowego wpływającymi na poziom ekspresji genów zaangażowanych w kształtowanie cechy odporności na działanie herbicydu Roundup u kukurydzy zwyczajnej (*Zea mays*). Zidentyfikowanie genów odpowiedzialnych za kształtowanie odporności na warunki stresu herbicydowego miało na celu stworzenie podstawy do opracowania metody szybkiej analizy próbek roślinnych umożliwiającej określenie poziomu ich wrażliwości na działanie Roundup.

3. Wykaz ważniejszych skrótów

aa-tRNA – aminoacylo tRNA

AGLP – gen kodujący białka podobne do arabinoglikanu

AGO – białka Argonaute

AHAS – syntaza acetylohydroksykwasową

ALS – syntaza acetylomleczanowa

ATP – adenozylo-5'-trójfosforan

ChIP – immunostrącenie chromatyny

CMT – chromometylaza

DCL – białko podobne do Dicer

DME – Demeter

DML – Demeter podobne

DNA – kwas deoksyrybonukleinowy

DRM – metylotransferaza

dsDNA - dwuniciowy DNA

d-tRNA – deacylo tRNA

eEF – eukariotyczny czynnik elongacyjny

eIF – eukariotyczny czynnik inicjacyjny

EPSPS – syntetaza 5-enolopirogronoszikimo-3-fosforanu

eRF – eukariotyczny czynnik uwalniający

FAO – Organizacja Narodów Zjednoczonych do Spraw Wyżywienia i Rolnictwa

GTP – guanozylo-5'-trójfosforan

GUS - Główny Urząd Statystyczny

HAT – acetylaza histonów

HDAC – deacetylaza histonów

HPS – gen kodujący hipotetyczne białko

IMP – gen kodujący integralne białka membrany

lncRNA – długi niekodujący RNA

m⁵C – 5-metylo-2'-deoksy-cytosyna

MET – metylotransferaza

miRNA – mały RNA

NA2 – gen kodujący transkrypt 2. o nieznannej funkcji

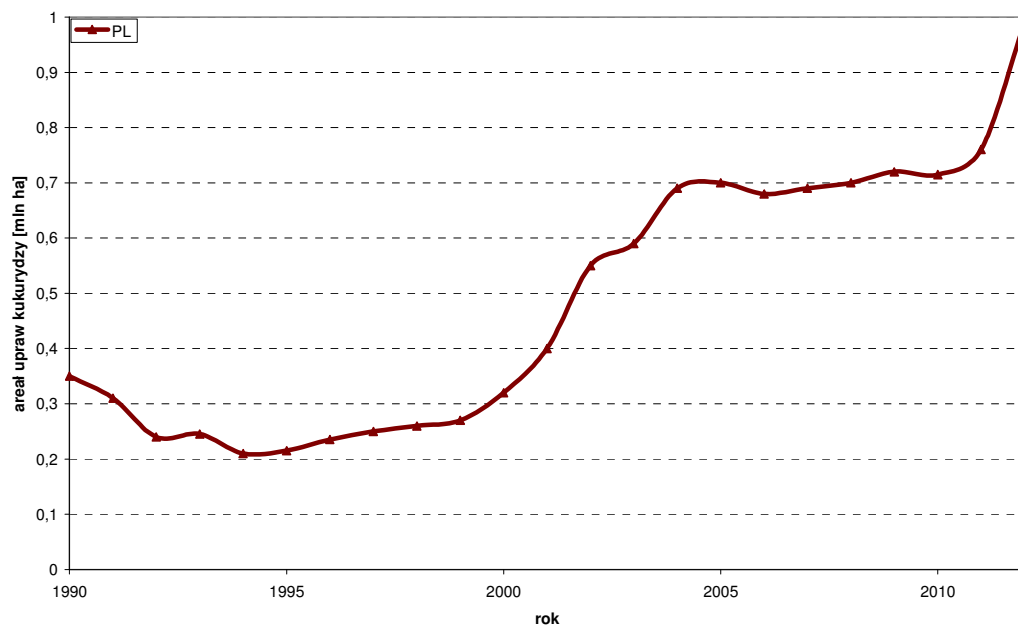
NA4 – gen kodujący transkrypt 4. o nieznannej funkcji

ncRNA – niekodujący RNA
PCR – łańcuchowa reakcja polimeryzacji
PEP – fosfoenolopirogronian
PRP – gen kodujący białka związane z patogenezą
p-tRNA – peptydylo tRNA
RdDM – metylacja DNA zależna od RNA
RdRp, RDR – polimeraza RNA zależna od RNA
RIN – wskaźnik jednorodności RNA
RISC – kompleks wyciszający indukowany przez RNA
RLK – gen kodujący białka kinaz podobnych do receptorowych
RNA – kwas rybonukleinowy
ROS – represor wyciszania
RRF – eukariotyczny czynnik powtórnego wykorzystania rybosomu
rRNA – rybosomalny RNA
rtPCR – PCR w czasie rzeczywistym
S3P – 3-fosforan-szikimianu
SCP – gen kodujący karboksypeptydazę seryny
siRNA – mały interferencyjny RNA
SL – linia wrażliwa
SL⁷ – linia wrażliwa w dniu 7.
snoRNA – mały jąderkowy RNA
snRNA – mały jądrowy RNA
ssDNA – jednoniciowy DNA
SUMO – mały, podobny do ubikwityny związek modyfikujący białka histonowe
TL – linia tolerancyjna
TL⁷ – linia tolerancyjna w dniu 7.
TLC – chromatografia cienkowarstwowa
tRNA – transferowy RNA
UP2 – gen kodujący nieznane białko
WIPI – gen kodujący inhibitory proteinaz indukowane zranieniem

4. Wprowadzenie literaturowe

4.1. Kukurydza – charakterystyka i warunki uprawy

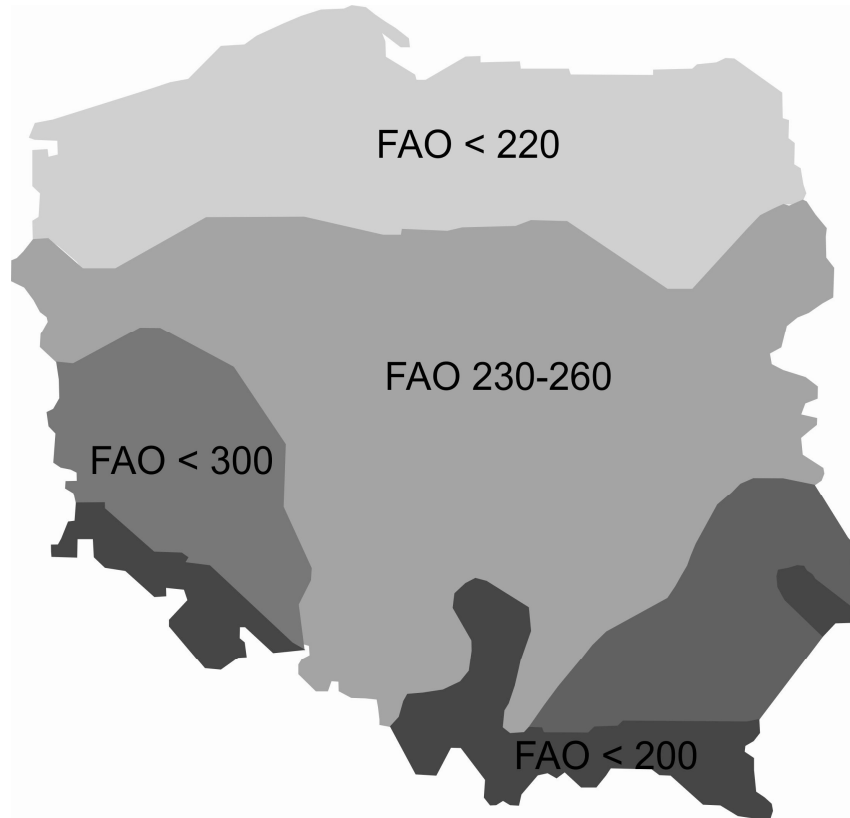
Kukurydza jest rośliną o dużym znaczeniu gospodarczym, która znalazła szerokie zastosowanie przemysłowe m.in. w produkcji bioetanolu, w przemyśle paszowym, spożywczym i włókienniczym. Początki uprawy odmian mieszańcowych kukurydzy w Polsce datuje się na lata powojenne, kiedy to została ona sprowadzona na te tereny kraju. Obecnie wpisane w krajowym rejestrze są 174 odmiany mieszańcowe kukurydzy pastewnej i prowadzone są prace nad kolejnymi odmianami (Adamczyk i in. 2010). W ostatnich latach obserwuje się bardzo dynamiczny rozwój powierzchni upraw kukurydzy na terenie naszego kraju (Wykres 1.). W roku 2000 areał upraw wynosił około 0,3 mln ha, a według ostatnich doniesień GUS w roku 2012 uprawa kukurydzy z przeznaczeniem na kiszonkę wyniosła ok. 0,45 mln ha, a na ziarno 0,539 mln ha (Poślednik 2005; GUS 2012). Całkowite możliwości uprawy tej rośliny na terenie Polski szacuje się na 2 mln ha, istnieje więc możliwość dalszego zwiększania areału kukurydzy (Michalski 2005).



Wykres 1. Areał upraw kukurydzy na terenie Polski na przestrzeni lat (GUS 2012).

Istotne dla uzyskania dobrego plonowania kukurydzy jest właściwe dobranie odmiany do istniejących na terenie kraju warunków klimatycznych. Wczesność odmian rośliny określa się za pomocą skali FAO, czyli porównaniu ocenianej odmiany z przyjętymi wzorcami wczesności (Rysunek 1.) (Bereś i in. 2009). Na terenie Polski uprawia się odmiany wczesne

(FAO do 220), średniowczesne (FAO 230 – 250) i średniopóźne (FAO 250 – 290) (Areseniuk i in. 2012). Odmiany wczesne i średniowczesne są zalecane na ogół do wszystkich celów użytkowych, przy czym dłuższy okres wzrostu sprzyja lepszemu wykształceniu i dojrzaniu ziarna, stąd ich częsta uprawa na ten cel. Odmiany późniejsze głównie stosowane są do produkcji kiszonki, ze względu na krótszy okres wegetacji charakteryzują się dużą ilością masy zielonej, a mniejszym udziałem rdzeni kolbowych (Bereś i in. 2009).



Rysunek 1. Strefy uprawy kukurydzy na terenie Polski z podziałem według liczby FAO (Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin 2013).

Ważnym aspektem uprawy każdej rośliny jest siew na właściwej jakości glebie. W tym względzie kukurydza należy do roślin mało wymagających, choć zaopatrzenie w substancje organiczne i wysoka kultura gleby wpływają na zwiększenie plonowania. Do najlepszych gleb do uprawy kukurydzy należą czarnoziemy i gleby lessowe. Roślina dobrze rośnie również na glebach brunatnych, madach i mocnych piaskach gliniastych. Właściwy odczyn gleby powinien oscylować wokół obojętnego, w granicach pH 5,0 – 7,5, po ich przekroczeniu należy się liczyć z obniżeniem plonowania. Niezwykle istotne

w uprawie kukurydzy jest, aby gleba była głęboka, przewiewna, próchnicza i ciepła oraz mogła gromadzić duże ilości wody (Bereś i in. 2007).

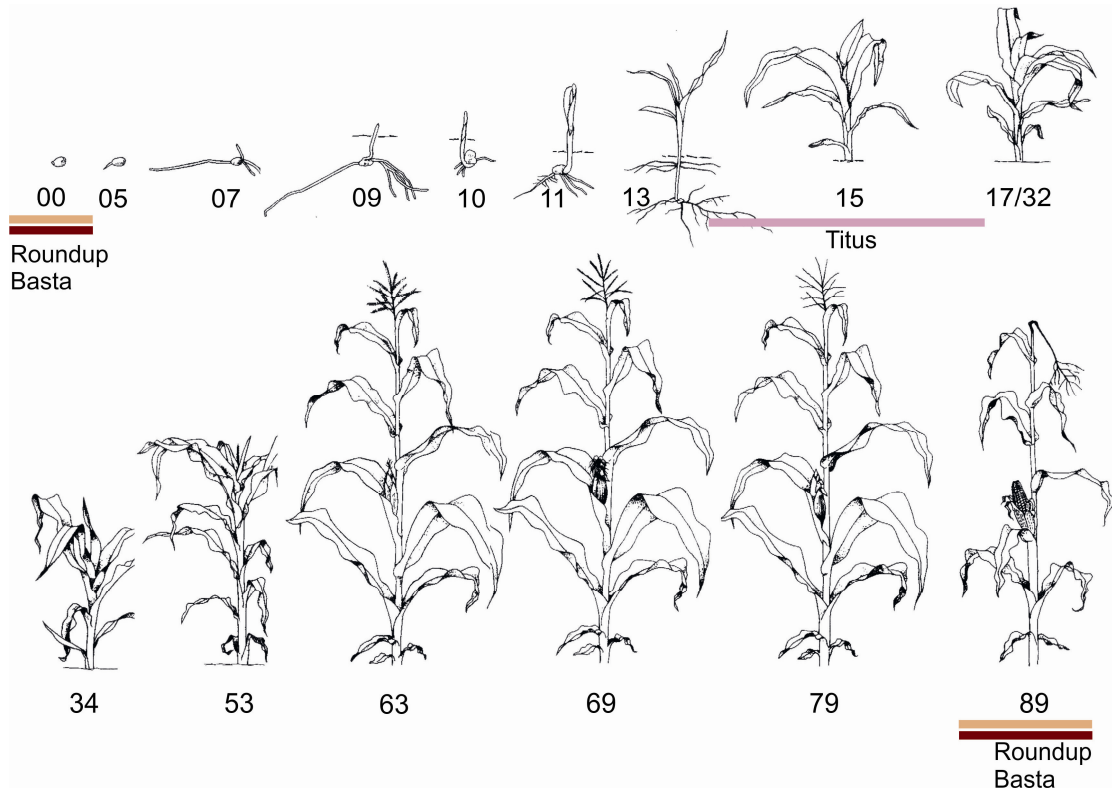
Polska jest krajem charakteryzującym się deficytem wody, dlatego możliwości magazynowania wody w glebie pełnią ważną rolę dla właściwego wzrostu kukurydzy. Ilość opadów w okresie wegetacji od kwietnia do maja jest podstawowym czynnikiem decydującym o późniejszym plonowaniu. Należy podkreślić, że kukurydza należy do roślin o dużych potrzebach wodnych, jednak dzięki dobrze wykształconemu systemowi korzeniowemu i niskiemu poziomowi transpiracji dobrze radzi sobie w warunkach naszego kraju (Bereś i in. 2009).

Kukurydza jest rośliną pochodzącą z Meksyku, która była uprawiana w tamtych rejonach już siedem tysięcy lat temu (Hufford i in. 2012; Snarska 2012). *Zea mays* (kukurydza zwyczajna) należy do grupy roślin ciepłolubnych, a ze względu na swoje pochodzenie może być uznawana za egzotyczną na terenach klimatu umiarkowanego. Trwające tysiące lat zabiegi mające na celu udoskonalenie odmian uprawianej kukurydzy, pozwoliły na jej uprawę początkowo na terenach całej Ameryki, a później w strefach umiarkowanych innych kontynentów, w tym w Polsce. Obecnie uprawiane odmiany mieszańcowe trafiły na teren Polski w 1953 i od tego roku należy datować rozwój uprawy kukurydzy oraz prace nad uzyskaniem nowych, lepiej dostosowanych do warunków środowiskowych linii (Adamczyk i in. 2010). Ze względu na swoje wymagania temperaturowe (kiełkowanie przy temperaturze 10°C) kukurydza siana jest najpóźniej z roślin w uprawach polowych na terenie Polski tj. w połowie kwietnia (Bereś i in. 2009). Niezaprzeczalną zaletą późnego siewu jest możliwość właściwego przygotowania pola przed siewem, kiedy znajduje się na nim większa ilość chwastów, oraz zmniejszenie ryzyka narażenia rośliny na przymrozki. Pozostałe warunki siewu i wzrostu rośliny, takie jak rzadki siew (ok. 8-10 roślin na m²), późne wschody i pionowy, powolny wzrost wąskiej rośliny sprzyjają silnemu wzrostowi chwastów (Bereś i in. 2007; Snarska 2012). Nawet w najbardziej optymalnych warunkach w około miesiąc po siewie, pole kukurydzy pokrywa się chwastami i wymaga interwencji rolnika. W przypadku wystąpienia dodatkowo znacznego ocieplenia i wysokiej wilgotności obserwować można gwałtowny wzrost zachwaszczenia pola. W okresie przed wschodem i po wschodzie rośliny, w warunkach zachwaszczenia pola kukurydzy konieczne jest zastosowanie zabiegów mających na celu ich usunięcie. Obecny stan wiedzy połączony z wieloletnimi obserwacjami pozwala na stwierdzenie, że pole całkowicie pozbawione chwastów od momentu siewu do zbioru nie

jest elementem koniecznym do uzyskania wysokiego i dobrej jakości plonu. Wyznaczono tzw. próg szkodliwości, czyli poziom zachwaszczenia pola, poniżej którego nie ma konieczności stosowania jakiegokolwiek z zabiegów agrotechnicznych (Bereś i in. 2007).

W kontekście zalecanej, a od 2014 roku obowiązkowej, integrowanej ochrony roślin dopuszcza się odchwaszczanie metodami: mechaniczną, mechaniczno-chemiczną i chemiczną. Zastosowanie poszczególnych metod zależy od rolnika, areалу upraw, stanu gleby, zaistniałych warunków pogodowych, poziomu zachwaszczenia i fazy rozwojowej kukurydzy (Snarska 2012). Metody mechaniczne należą do czynności prowadzonych najwcześniej przed siewem. Najlepszym rozwiązaniem jest rozpoczęcie od płytkiej podorywki po zbiorze przedplonu, a następnie bronowanie. Również głęboka orka zimowa sprzyja walce z zachwaszczeniem pola. Zabiegi te powodują zniszczenie rosnących już chwastów. W procesach agrotechnicznych nasiona chwastów są przenoszone głębiej pod ziemię, co uniemożliwia ich kiełkowanie, lub są wyrzucane na powierzchnię co skutkuje ich przemarzaniem po skiełkowaniu. W procesach mechanicznych usuwania chwastów praktykowane jest również pielenie rzędów, zazwyczaj ręcznie, a międzyrzędzi opielaczami. Metoda chemicznego zwalczania chwastów opiera się o stosowanie dwóch rodzajów środków zwanych herbicydami doglebowymi i nalistnymi (Bereś i in. 2007). Zastosowane środki ochrony roślin muszą spełniać kryteria bezpieczeństwa dla ludzi, pszczoł, organizmów wodnych, środowiska naturalnego oraz wykazywać pełną selektywność dla odmian kukurydzy (Warzecha 2010). W przypadku obydwu metod należy zapoznać się z charakterystyką gleby i gatunkami chwastów rosnącymi na polu kukurydzy. Herbicydy doglebowe mają za zadanie zniszczenie nasion chwastów znajdujących się w glebie bez uszkodzenia kukurydzy. Mogą być one stosowane po wschodzie kukurydzy, ale często w mieszance z herbicydem o działaniu totalnym są też stosowane przedwschodowo (Rysunek 2.) (Bereś i in. 2007; Warzecha 2010). Herbicydy nalistne, totalne stosowane są na skiełkowane chwasty w pierwszych fazach wzrostu, ale przed wschodem kukurydzy. Inna grupa herbicydów nalistnych o działaniu układowym na chwasty może być również stosowana powschodowo. W tym przypadku niezwykle istotne jest zastosowanie herbicydu o szerokim spektrum działania w celu usunięcia jak największej ilości chwastów przy jednym zabiegu (Bereś i in. 2007; Warzecha 2010). W przypadku herbicydów nalistnych przedwschodowych jednym z zalecanych preparatów jest herbicyd Roundup (można również zastosować herbicyd Basta) o działaniu totalnym oraz herbicyd Titus, o działaniu układowym, stosowany powschodowo w fazie rozwoju

kukurydzy 1-7 liścia (Bereś i in. 2007; Warzecha 2010; Warzecha 2010; Pietryga i in. 2011).



Rysunek 2. Fazy wzrostu kukurydzy z zaznaczonymi okresami stosowania wybranych, wykorzystanych w pracy herbicydów (Bereś i in. 2007).

Innym ze sposobów uprawy kukurydzy uwzględniającym mniejszą ingerencję w środowisko naturalne i jednocześnie zapobieganie erozji gleby jest uproszczenie w uprawie. Ziarno kukurydzy siane jest do gleby nieoczyszczonej po zeszłorocznych zbiorach. Zastosowanie siewu bezpośredniego wiąże się z ryzykiem niższej temperatury gleby i wolniejszym kiełkowaniem, przy jednoczesnym zachowaniu dużych ilości wody w podłożu oraz słabszym wzroście chwastów. Ostateczny bilans takiego siewu okazuje się korzystny ekonomicznie, a poziom plonowania porównywalny z techniką tradycyjną. Pomimo proponowanych rozwiązań uprawy integrowanej kukurydzy nieuniknione wydaje się stosowanie metod chemicznych ochrony przed chwastami (Bereś i in. 2007).

W kontekście rosnącego zapotrzebowania na kukurydzę i szerokiego zastosowania w przemyśle w ostatnich latach intensyfikacji uległa uprawa, a co za tym idzie wzrosła ilość stosowanych herbicydów. W świetle zasad Dobrej Praktyki Ochrony Roślin, obowiązującego ustawodawstwa i zaleceń integrowanej ochrony należy stosować

kombinację metod biologicznych, biotechnicznych, chemicznych, fizycznych, uprawowych i hodowlanych, przy którym stosowanie chemicznych środków ochrony roślin ogranicza się do niezbędnego minimum umożliwiające uniknięcie strat ekonomicznych (Bereś i in. 2009).

Szczegółowa analiza potrzeb geo-środowiskowych kukurydzy w uprawach na terenie Polski uwidacznia duże znaczenie właściwego doboru odmiany stosowanej na danym obszarze w celu zwiększenia jej plonowania. Próbą przyspieszenia rozwoju hodowlanego kukurydzy jest wprowadzenie modyfikacji genetycznych w roślinie w celu uzyskania cechy odporności na działanie herbicydu (np. kukurydza Roundup Ready®), czy omacnicy prosowianki (kukurydza Bt-176). Alternatywą dla budzących w społeczeństwie kontrowersje odmian GM (genetycznie modyfikowanych, *ang. genetic modified*) kukurydzy jest wprowadzenie linii cechujących się naturalną tolerancją na stres. Prowadzenie prac nad zbadaniem mechanizmów molekularnych (zmiany w poziomie ekspresji genów i regulujące je procesy) zaangażowanych w kształtowanie cechy odporności na poszczególne czynniki stresowe stanowi skomplikowane zadania, ale pozwoli na poznanie czynników komórkowych biorących udział w kształtowaniu tolerancji (Anioł i in. 2007; Korbin i in. 2009).

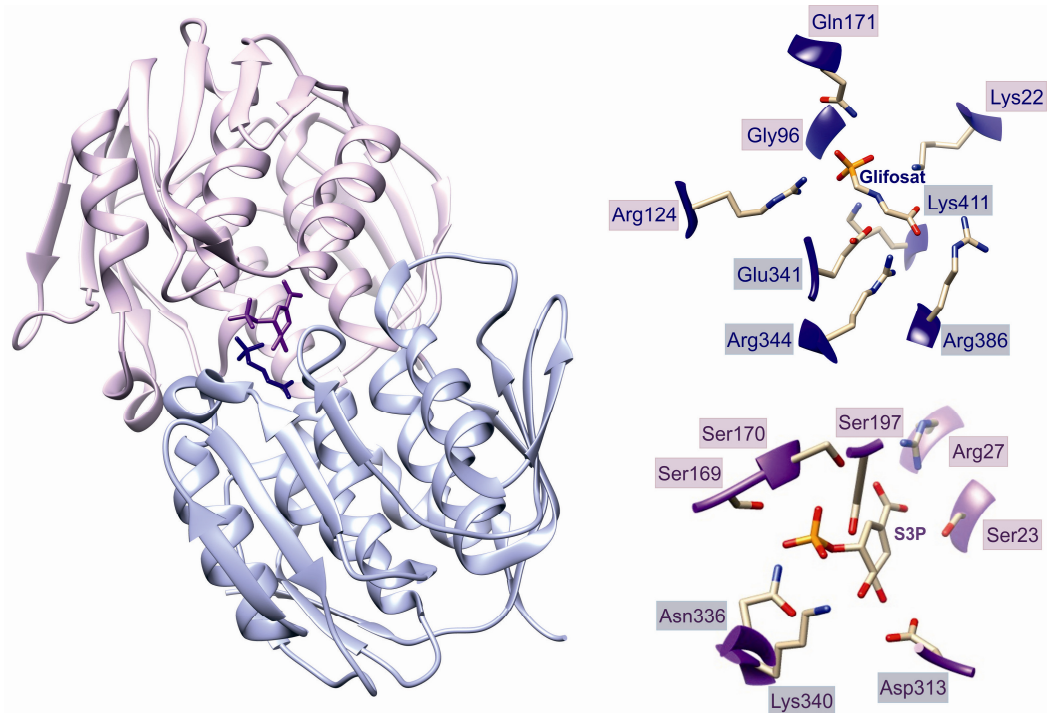
4.2. Charakterystyka herbicydów

Stopień i stan zachwaszczenia pola kukurydzy jest jednym z ważniejszych czynników decydujących o plonowaniu. Jedną z uznanych i powszechnie stosowanych metod usuwania zachwaszczenia jest metoda chemiczna z wykorzystaniem herbicydów. Należy podkreślić, że herbicydy poza pozytywną rolą związaną niszczeniem chwastów mogą stać się również źródłem uszkodzeń rośliny uprawnej. Zjawisko to występuje kiedy mamy do czynienia z przekroczeniem zalecanej przez producenta dawki środka chemicznego, niewłaściwym terminem zastosowania herbicydu, czy opryskiem przy niesprzyjających zabiegowi warunkach pogodowych oraz jeśli rośliny są uszkodzone przez szkodniki, choroby lub inne agrochemikalia. Przyczynę uszkodzeń mogą stanowić również uwarunkowania genetyczne mieszańców, które posiadają zakodowaną cechę odporności lub wrażliwości na dany herbicyd (Rola 2003). W świetle tych doniesień niezwykle istotne jest poznanie mechanizmów molekularnych kształtowania odporności i wrażliwości na działanie herbicydów i możliwość oznaczania tej cechy u roślin kukurydzy.

4.2.1. Herbicyd Roundup

W uprawach kukurydzy szeroko stosowany i zalecany jest Roundup, będący dolistnym herbicydem o nieselektywnym działaniu, którego czynnikiem aktywnym jest glifosat (Rysunek 3.) (Griffin i in. 2010; Shaner i in. 2012). Czynnikiem aktywnym herbicydu - glifosat zsyntezowany został po raz pierwszy przez H. Martina w firmie farmaceutycznej, w Szwajcarii w roku 1950. Glifosat otrzymano w trakcie badań poświęconych poszukiwaniu nowych leków, a ponieważ nie zauważono jego właściwości leczniczych, nie został on opublikowany i opatentowany (Székács i in. 2012). Historia herbicydu rozpoczęła się w roku 1974, kiedy to firma Monsanto wypuściła Roundup na rynek, jako herbicyd o szerokim spektrum działania i niezwykle wysokiej skuteczności w walce z chwastami, a w roku 1971 opublikowała wyniki jego skuteczności (Baird i in. 1971). Wielki sukces firma zawdzięcza J.E. Franz, który to w roku 1970 przeprowadził ponowną syntezę związku i zaproponował jego wykorzystanie jako herbicydu (Duke i in. 2008).

Glifosat pobierany jest przez zielone części roślin (liście, zielone pędy i niezdrewniałą korę), a następnie przemieszczany po całej roślinie i dociera do jej części podziemnych (korzeni, rozłogów itp.) powodując ich zamieranie. Pierwsze objawy działania środka (żółknięcie i więdnienie) są widoczne po upływie 7-10 dni od zabiegu. Całkowite zamieranie roślin następuje po około 3 tygodniach. Wysoka temperatura i wilgotność powietrza oraz silne nasłonecznienie przyspieszają działanie środka. W efekcie wykształcenia mechanizmu wzrostu odporności chwastów na używane herbicydy, konieczne jest zwiększenie dawek lub wprowadzanie nowych herbicydów. Stosowanie wysokich dawek herbicydu Roundup ma niekorzystny wpływ na środowisko naturalne. W uprawie kukurydzy herbicyd ten stosowany jest przedwschodowo oraz powschodowo na dojrzałe rośliny przed zbiorem w celu ich wysuszenia (Baerson i in. 2002; Pieniążek D. 2003; Griffin i in. 2010; Jaskulski i in. 2011). Pod względem chemicznym glifosat jest N-fosfonometyloglicyną i należy do grupy fosfonianów. Związek ten jest pochodną kwasu fosfonowego wykazującą niewielką rozpuszczalność w wodzie, ok. 1,16% w temperaturze pokojowej (Franz 1985).



Rysunek 4. Struktura krystalograficzna EPSPS oraz oddziaływanie glifosatu i S3P z enzymem w miejscu aktywnym. Model z *E.coli* (Schönbrunn i in. 2001). Po lewej stronie kolorami zaznaczono: różowy - domena górna EPSPS (zbudowana z aminokwasów 20-240), niebieski - domena dolna (zbudowana z aminokwasów 1-19 i 241-427), granatowy - glifosatu, fioletowy - S3P. Po prawej stronie przedstawiono oddziaływanie glifosatu i S3P z aminokwasami EPSPS w miejscu aktywnym enzymu.

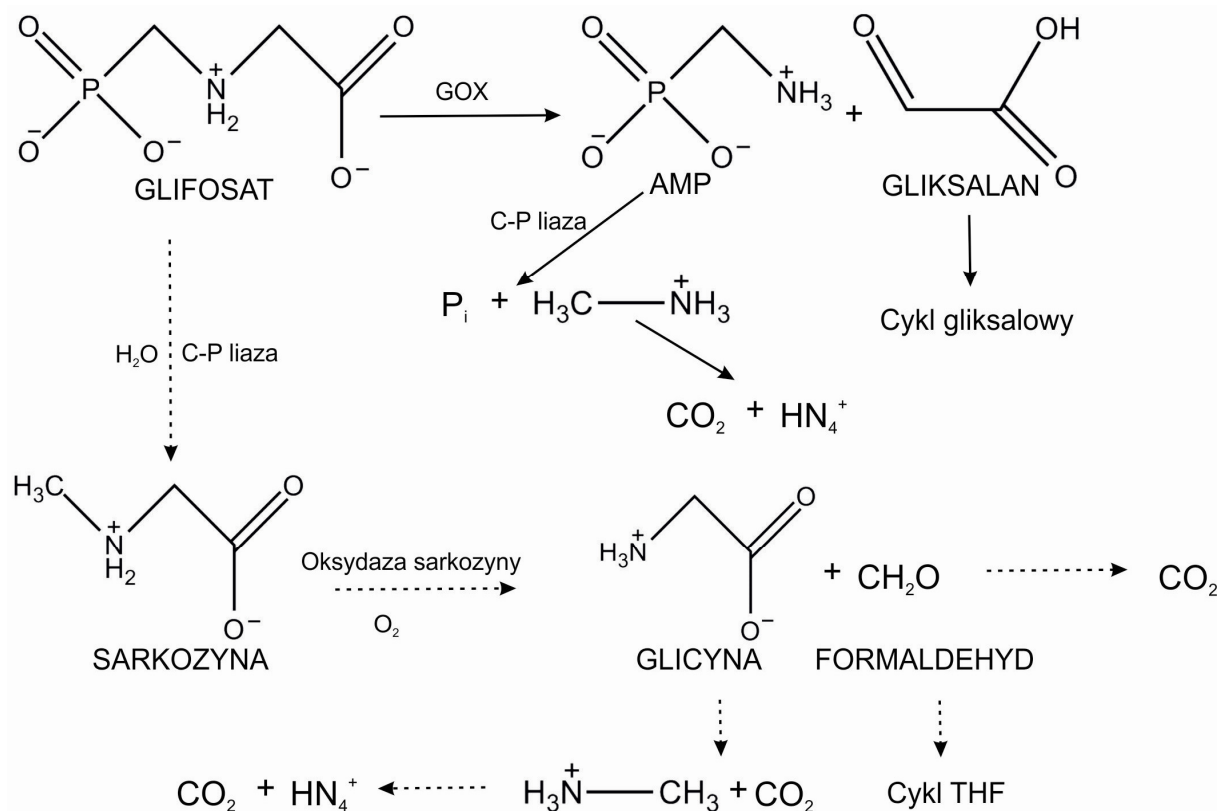
Zaproponowano, że glifosatu może działać jako analog PEP w stanie przejściowym (Székács i in. 2012). Jednocześnie stwierdzono, że glifosatu wiąże się niezwykle blisko S3P i może oddziaływać z nim poprzez wiązanie wodorowe (Schönbrunn i in. 2001). Inhibicja aktywności tego enzymu powoduje zahamowanie biosyntezy aminokwasów aromatycznych (fenyloalaniny, tryptofanu i tyrozyny) w roślinie. Aminokwasy te stanowią składniki niezbędne do rozwoju rośliny, wchodzi także w skład barwników roślinnych, takich jak antocyjaniny i flawonoidy (Franz i in. 1997; Pollegioni i in. 2011).

Stwierdzono również, że glifosatu działa na roślinę poprzez desykcję, czyli wysuszenie tkanek związane z zakłóceniem procesu fotosyntezy. Obecność glifosatu powodowała stopniowe hamowanie procesu fotosyntezy poprzez zamknięcie aparatów szparkowych i obniżenie procesu respiracji, a co za tym idzie zmniejszenie dostępności wody. Proces spowalniania fotosyntezy sprzyja przemieszczaniu się glifosatu do zamierających tkanek i powodowaniu kolejnych uszkodzeń prowadzących do śmierci rośliny (Fuchs i in. 2002; Pieniążek i in. 2003).

Postuluje się, że glifosat odpowiedzialny jest za wywołanie stresu oksydacyjnego. Analiza proteomiczna liści ryżu traktowanych glifosatem pozwoliła na zaobserwowanie zmian w ekspresji kilku antyoksydantów enzymatycznych, takich jak kinaza peroksydazy 1, peroksyredoksyna i prekursor chloroplastowy dysmutazy nadtlenkowej. Zanotowano również zwiększoną produkcję aktywnych form tlenu, utlenianie tłuszczu i związane z tym uszkodzenia błon komórkowych, a także obniżoną ilość białka rubisko (Ahsan i in. 2008). W algach *C. kessleri* zaobserwowano pod wpływem działania glifosatu, wzrost poziomu utlenienia tłuszczów, uszkodzenia błon, a także wzrost poziomu ekspresji S-transferazy glutationu, katalazy i dysmutazy nadtlenkowej – enzymów zaangażowanych w niwelowanie skutków stresu oksydacyjnego (Romero i in. 2011). W roślinach soi wrażliwych na działanie glifosatu wykazano zahamowanie procesu fotosyntezy, zmiany w profilu produkowanych aminokwasów, wzrost produkcji „białek związanych z głodem”, a także z odpornością na choroby i pamięcią szoku temperaturowego. U roślin soi odpornych na glifosat (Roundup Ready Soybean®) odnotowano pod wpływem jego działania wzrost poziomu białek zaangażowanych w fotosyntezę. Wnioskowano, że traktowanie glifosatem liści soi prowadzi do przejściowego stanu stresu oksydacyjnego, który skutkuje akumulacją antyoksydantów w komórkach i zaburzeniem równowagi komórkowej (Vivancos i in. 2011). Wykazano również związek stosowania glifosatu ze zmianami w metabolizmie węgla, jak również spadkiem zawartości Ca, Mn, Mg i Fe w liściach (Cakmak i in. 2009; Orcaray i in. 2012). Wykazano również na przykładzie pszenicy ozimej, że traktowanie glifosatem roślin dojrzałych powoduje mniejszą energię kiełkowania i wzrost kiełków z uzyskanego ziarna (Jaskulski i in. 2011).

Długoletnie stosowanie glifosatu na polach uprawnych doprowadziło do wykształcenia naturalnej odporności na jego działanie u chwastów. Odnotowano 24 gatunki roślin wykazujących cechę odporności na ten herbicyd w 19 krajach na całym świecie (Heap 2013). Podstawowym mechanizmem odpowiedzialnym za odporność na działanie herbicydu jest słabsze pochłanianie go przez powierzchnię liści, przez rośliny tolerancyjne w porównaniu do wrażliwych. Obecna na powierzchni liści kutikula może wpływać na zmniejszenie ilości glifosatu, który pochłaniany jest przez roślinę. Kolejnym z mechanizmów wpływających na obniżenie wrażliwości rośliny jest translokacja herbicydu i jego rozprowadzanie w roślinie (Gonzalez-Torralva i in. 2012; Rojano-Delgado i in. 2012). Zaobserwowano u chwastów odpornych na glifosat, że jest on obecny głównie w liściach i łodygach roślin, a w mniejszych ilościach w korzeniach. Stwierdzono również, że szybkość

transportu herbicydu u roślin wrażliwych jest dużo wyższa aniżeli u odpornych (Vila-Aiub i in. 2012). Opisano także, że sekwestracja herbicydu do wakuoli, które może w nich ulegać metabolizmowi stanowi inny mechanizm kształtowania odporności (Ge i in. 2012). Wykazano, że glifosat zarówno u roślin jak i w bakteriach może być metabolizowany w wakuolach komórek. Proponowane i możliwe ścieżki metabolizmu przedstawiono na schemacie 1. (Ge i in. 2010; Ge i in. 2011).



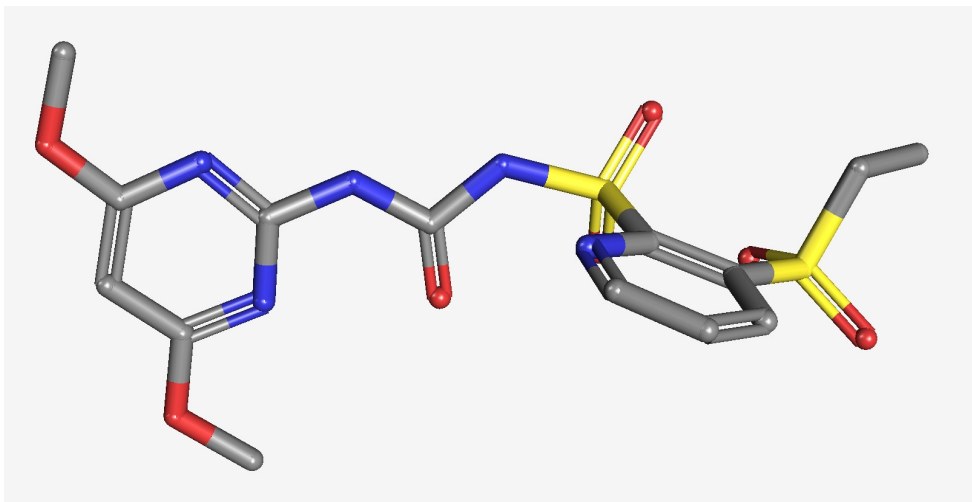
Schemat 1. Potencjalne szlaki metaboliczne degradacji glifosatu (de Carvalho i in. 2012; Rojano-Delgado i in. 2012). Linią ciągłą oznaczono szlaki metaboliczne obecne u roślin, linią przerywaną szlaki metaboliczne obecne u bakterii.

Stwierdzono również, że za kształtowanie odporności na działanie glifosatu u chwastów odpowiedzialne mogą być zmiany poziomu ekspresji EPSPS. Podwyższona ekspresja enzymu wiąże się z obecnością większej ilości kopii genu kodującego to białko w genomie. Zwiększona ilość białka EPSPS w komórce nawet przy zahamowaniu aktywności części z enzymów gwarantuje możliwość biosyntezy aminokwasów aromatycznych (Baerson i in. 2002). Wykazano, że obecność mutacji w sekwencji aminokwasowej EPSPS również skutkuje powstaniem białka o zwiększonej odporności na działanie herbicydu. Istnieje

możliwość, że opisane mechanizmy mogą być również obecne w komórkach roślin uprawnych, które posiadają cechę naturalnej odporności na glifosat (Perez-Jones i in. 2007; Yu i in. 2007; Kaundun i in. 2011). Nie można wykluczyć, że istnieją w komórce inne czynniki biorące udział w kształtowaniu tolerancji na działanie tego herbicydu. Nie wskazano też poszczególnych transporterów i czynników regulatorowych zaangażowanych w zmniejszony transport glifosatu po roślinie oraz jego sekwestrację do wakuoli.

4.2.2. Herbicyd Titus

Herbicyd Titus jest przeznaczony do powschodowego zwalczania perzu właściwego i jednorocznych chwastów jednoliściennych (chwasty prosowate) oraz niektórych chwastów dwuliściennych w uprawie kukurydzy i ziemniaka (Warzecha 2010). Środek ten jest herbicydem selektywnym o działaniu układowym. Stosowany nalistnie, pobierany jest głównie przez liście i szybko przemieszczany w roślinie. Efekt chwastobójczy jest widoczny w okresie 7-20 dni. Najlepiej działa na chwasty jednoroczne znajdujące się w fazie 2-3 liścia. Czynnikiem aktywnym herbicydu Titus jest rimsulfuron (Rysunek 6.) i został on wprowadzony na rynek przez firmę Du Pont De Nemours (Brown i in. 1994).



Rysunek 6. Wzór strukturalny rimsulfuronu. Kolorem szarym zaznaczono atomy węgla, żółtym – atomy siarki, czerwonym – atomy tlenu, niebieskim – atomy azotu.

Jest to związek z grupy pochodnych sulfonylomocznika, rozpuszczalny w wodzie. Na podstawie przeprowadzonych analiz można wnioskować, że jego stosowanie wiąże się z minimalnym ryzykiem toksyczności dla środowiska naturalnego. Zaobserwowano, że

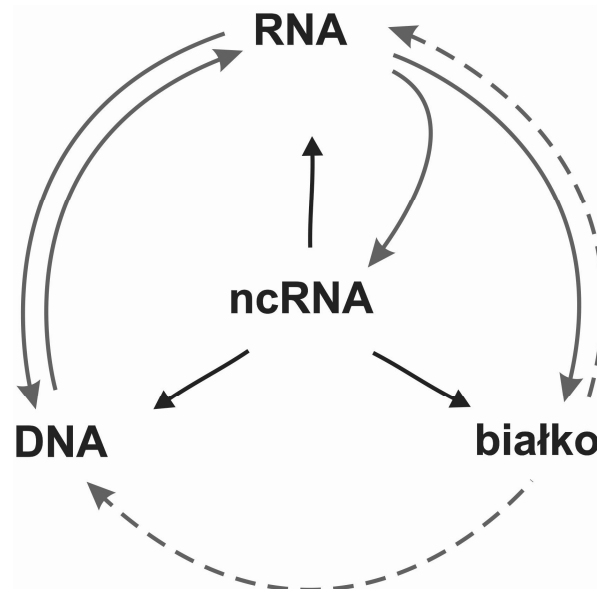
Glufosynat amonowy stanowi niejako „preherbicyd”, ponieważ jest on pobierany przez roślinę, a następnie przekształcany do rzadkiego aminokwasu fosfinotricyny (PT) (Gordon-Kamm i in. 1990). Fosfinotricyna jest analogiem strukturalnym kwasu glutaminowego i dzięki temu podobieństwu wiąże się z enzymem syntetazą glutaminy (GS), który bierze udział w metabolizmie amoniaku w roślinie. Wiązanie PT do GS powoduje nieodwracalne zahamowanie aktywności enzymatycznej syntetazy glutaminy. Inhibicja aktywności GS skutkuje obniżeniem poziomu kwasu glutaminowego w komórce i około stukrotnym podwyższeniu stężenia jonów amonowych w komórkach. Rosnące stężenie jonów amonowych prowadzi do postępujących zmian nekrotycznych, a potem śmierci rośliny (Diddens i in. 1976; Kishore i in. 1988; Wendler i in. 1992).

Sugeruje się, że ze względu na szerokie zastosowanie herbicydów zawierających glifosat i powstaniu zjawiska naturalnej odporności chwastów na ten związek, alternatywą może stać się stosowanie herbicydów zawierających glufosynat. Przewiduje się, że w najbliższych latach zastosowanie herbicydów zawierających glifosynat znacznie wzrośnie (Meme i in. 2009).

4.3. Przepływ informacji genetycznej

Najważniejsza tajemnica życia, która nurtowała ludzkość był sposób przekazywania informacji o cechach organizmu między pokoleniami, a następnie jak regulowany jest jego wzrost i rozwój (Barciszewski i in. 2010). Odkrycie mechanizmów rządzących tymi procesami stanowi jedno z największych dokonań XX wieku. Wyizolowanie DNA, RNA i białek doprowadziło do zaproponowanego w 1957 roku centralnego dogmatu biologii molekularnej. Początkowo koncentrowano uwagę na DNA jako na nośniku informacji genetycznej, a przez to najważniejszej istniejącej w komórce cząsteczce. Białka traktowano jako czynniki mające niejako funkcję wykonawczą informacji zawartej w DNA. RNA przypisywano drugoplanową rolę pośredniczenia pomiędzy DNA i białkami w procesie biosyntezy białka (tRNA, mRNA), czy spajanie kompleksów wielobiałkowych (rybosom) oraz traktowano jako pozostałość po praorganizmach i ich „świecie RNA” (Tyczewska i in. 2009). Wykrycie enzymu odwrotnej transkryptazy pozwoliło na stwierdzenie, że informacja zawarta w RNA może zostać przepisana na DNA. Sekwencjonowanie genomu pozwoliło na określenie, że tylko ok. 2% całej jego sekwencji u organizmów wyższych stanowi informację kodującą białko, czyli podlegającą proponowanemu, klasycznemu schematowi przepływu informacji genetycznej (Fire i in. 1998; Schmutz i in. 2004). Odkrycie niekodujących RNA

mających funkcje regulatorowe, dostarczyło kolejnych informacji komplikujących postrzeganie mechanizmów rządzących ekspresją genów w komórce (Fire i in. 1998). Wszystkie te doniesienia doprowadziły do konieczności zrewidowania poprzednio proponowanego centralnego dogmatu. Jego podstawowe założenie zostało zachowane, jednak został on rozszerzony o nowo poznane mechanizmy komórkowe (Rysunek 8.) (Barciszewski i in. 2010).



Rysunek 8. Schemat przepływu informacji genetycznej w komórce (Barciszewski i in. 2010).

4.3.1. DNA i epigenetyka

Epigenetyka jest nauką o dziedzicznych zmianach ekspresji genów, które nie są związane ze zmianami w sekwencji DNA. Pojęcia tego po raz pierwszy użył Conrad Waddington w 1942 roku twierdząc, że jest to gałąź biologii, która bada oddziaływania pomiędzy genami i produktami tych genów, decydujące o powstaniu fenotypu.

Podstawowymi cechami epigenetycznej regulacji komórkowej są somatyczne i rozrodcze dziedziczenie, możliwa odwracalność tego procesu, ciągła kontrola i zmiany zachodzące w modyfikacjach chromatyny oraz poziomie metylacji DNA. Zazwyczaj obserwowanym efektem modyfikacji epigenetycznych są zmiany w poziomie ekspresji genów, przede wszystkim na poziomie transkrypcji (Hoekenga i in. 2000).

W organizmach roślinnych bardzo wiele procesów podlega epigenetycznej regulacji, są to przede wszystkim: zmiany w aktywności elementów mających możliwość transpozycji, piętnowanie genomowe, paramutacje, wariegacja fenotypowa czy inaktywacja

transgeny zależna od homologii (Kermicle i in. 1990; Cocciolone i in. 1993; Vongs i in. 1993; Martienssen i in. 1994; Finnegan i in. 1996; Matzke i in. 1996; Hollick i in. 1997; Chinnusamy i in. 2009). We wszystkich wymienionych procesach oraz ich regulacji swój udział mają zarówno zmiany poziomu metylacji DNA, jak i modyfikacje białek histonowych.

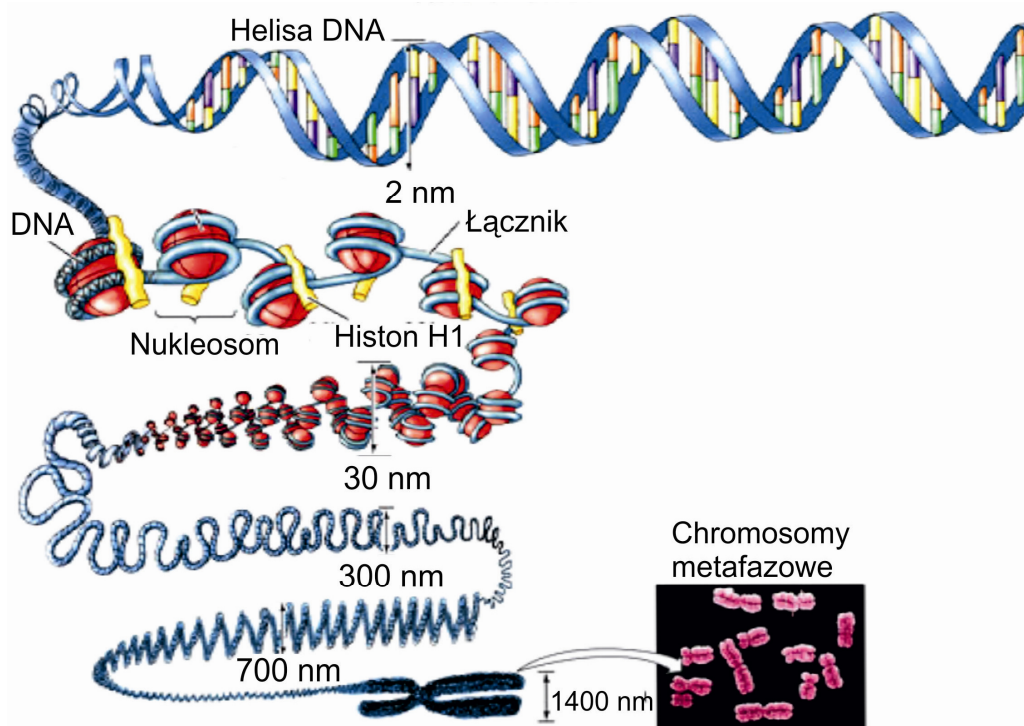
Wzajemna zależność pomiędzy metylacją, zmianami w strukturze chromatyny poprzez modyfikacje białek histonowych oraz wzrostem i rozwojem roślin zostały wykazane w badaniach wykorzystujących mutanty roślin. W *Arabidopsis thaliana* po wyciszeniu ekspresji genu metylotransferazy, zaobserwowano drastyczny spadek metylacji cytozyny, zmniejszenie pokroju rośliny, przemianę badanego regionu w heterochromatynę, zmiany w obrębie merystemów, zaburzenia kwitnienia, a także sterylność (Zhu 2008).

Na przykładzie mutacji w genie *dml1* u *A.thaliana*, która powodowała obniżenie poziomu metylacji cytozyny, wykazano, że epigenetyczne modyfikacje u roślin są dziedziczne w kolejnych pokoleniach (Thomashow 1999). W późniejszych badaniach wykazano dla *Zea mays*, że dziedziczenie poszczególnych modyfikacji zależy także od mechanizmu, który prowadzi do ich powstania (Cocciolone i in. 1993).

4.3.1.1. Chromatyna – budowa i funkcja

W przeszłości uważano, że chromatyna i jej struktura stanowią stabilną konstrukcję umożliwiającą upakowanie DNA w jądrze komórkowym w postaci chromosomów. Wykazano jednak, że jest to dynamiczna struktura mogąca ulegać rozluźnieniu lub kondensacji zależnie od czynników modulujących jej strukturę, przede wszystkim metylacji DNA i modyfikacji białek histonowych (Peterson i in. 2004).

Nici DNA mająca średnicę ok. 2 nm nawija się dwukrotnie na rdzeń histonowy zbudowany z ośmiu białek histonowych. Rozwinięcie się DNA z rdzenia uniemożliwia histon H1, który jak kłama spina poszczególne nukleosomy. Nukleosomy połączone są ze sobą wolną nicią DNA czyli tzw. łącznikiem. Pojedynczy nukleosom ma wielkość ok. 10 nm. Nukleosomy tworzą struktury heksameryczne, które umożliwiają jeszcze większe upakowanie DNA, zwane solenoidem o średnicy ok. 30 nm. Solenoidy ulegają kolejnym zwinięciom, aż tworzą strukturę chromosomu o szerokości 1400 nm. Taka struktura chromatyny umożliwia zgromadzenie na małej powierzchni dużej ilości materiału genetycznego, a zarazem gwarantuje jego dostępność transkrypcyjną (Rysunek 9.) (Bender 2004).



Rysunek 9. Schemat przedstawiający ustrukturalizowanie chromatyny (Qiu 2006; Sadva i in. 2008).

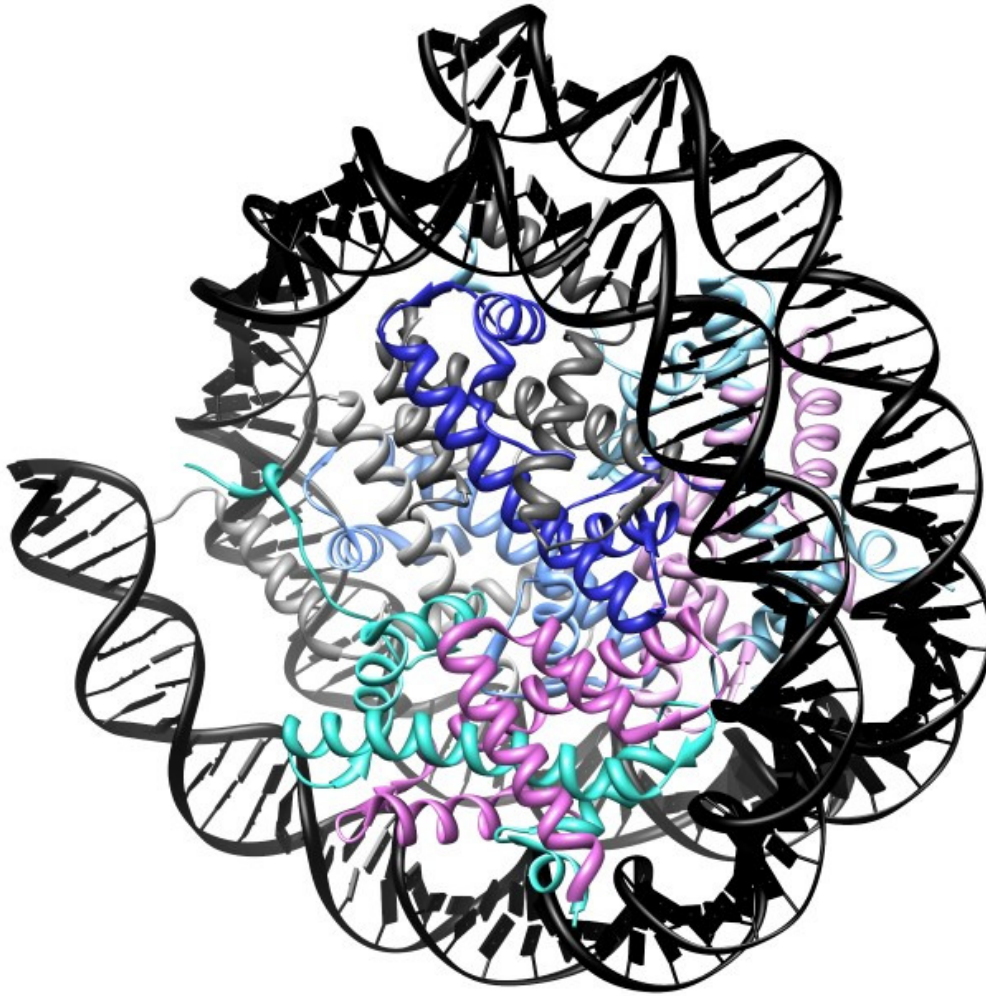
Chromatynę dzieli się ze względu na jej upakowanie i dostępność transkrypcyjną na euchromatynę o luźnej strukturze i dużej dostępności transkrypcyjnej oraz heterochromatynę, która charakteryzuje się wyjątkowo zwartą strukturą i z reguły nie ulega procesowi transkrypcji. Proces przechodzenia chromatyny pomiędzy wymienionymi stanami nazwano remodelowaniem chromatyny. Wykazano, że proces remodelowania chromatyny związany jest z transkrypcją, replikacją, procesami naprawczymi, specyficzną dla apoptozy fragmentacją jądra i organizacją genomu (Meyer 2001; Fransz i in. 2002). Zaproponowano teorię zgodnie, z którą to właśnie remodelowanie chromatyny bierze udział w regulacji ekspresji genów, oddziaływaniu promotorów i sekwencji wyciszających czy wzmacniających, pomimo ich oddalenia o setki tysięcy par zasad w sekwencji DNA (Kadauke i in. 2009). Wykazano istnienie związku między położeniem sekwencji poszczególnych genów w chromatinie, a poziomem ich ekspresji. Włókna laminy znajdujące się w sąsiedztwie błony jądrowej oddziałują z białkami LAD (*ang. lamina associated-domains*), a te z genami, które wykazują niski poziom ekspresji. Potwierdzono, że oddziaływania genom-lamina mają charakter dynamiczny i odgrywają rolę w kształtowaniu poziomu ekspresji genów oraz różnicowanie komórek (Guelen i in. 2008; Schermelleh i in. 2008; Peric-Hupkes i in. 2010). Wykazano również, że sekwencje genów położone w pobliżu laminy, na obrzeżach jądra,

mogą powodować wyciszenie genów (Brickner i in. 2007). Dokonano interesującej obserwacji zjawiska pamięci umiejscowienia danej sekwencji w jądrze. Nawet w kolejnych pokoleniach lub po całkowitym wyciszeniu ekspresji danego genu znajduje się on w danej „zapamiętanej” lokalizacji (Li i in. 2011) Głównie jednak proces ten kojarzony jest z transkrypcją oraz modyfikacjami białek histonowych, które bezpośrednio powodują remodelowanie chromatyny. Modyfikacje histonów wpływają na siłę wiązania DNA do białek histonowych i zarazem wpływają na siłę oddziaływania sąsiadujących ze sobą nukleosomów (Meyer 2001; Fransz i in. 2002).

4.3.1.2. Białka histonowe

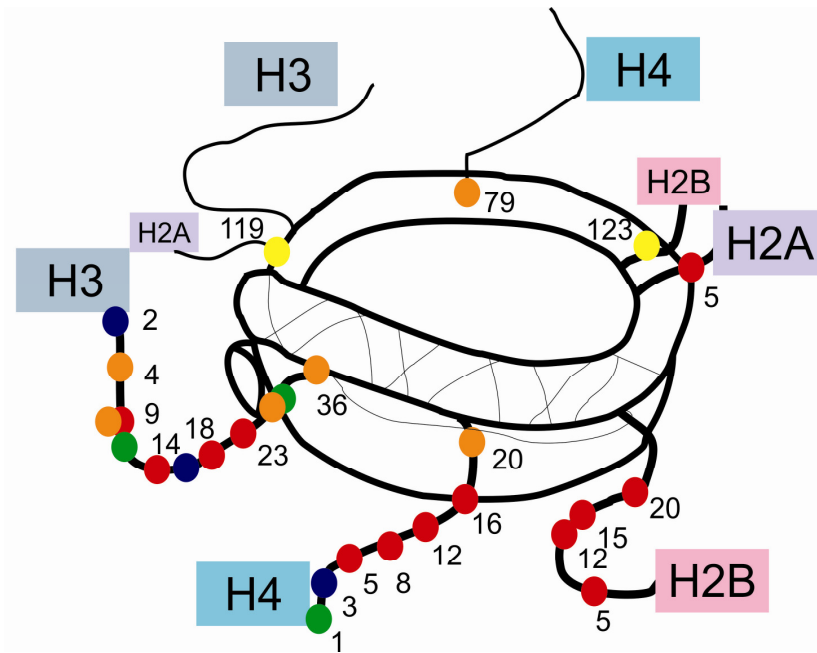
Histony są białkami o charakterze zasadowym i niewielkiej masie cząsteczkowej (poniżej 23 kDa), które wchodzi w skład chromatyny. Białka te są bardzo bogate w aminokwasy zasadowe, przede wszystkim argininę i lizynę, które nadają im charakter zasadowy i polikationowy, który umożliwia oddziaływanie z ujemnie naładowaną cząsteczką DNA. Wszystkie białka histonowe wykazują podobną budowę, posiadają rdzeń tworzący niepolarną domenę, z której wystają N- i C-końce, odpowiadające za zasadowy charakter białka (Wade i in. 1997).

Białka histonowe tworzą oktamerowy rdzeń, wokół którego nawinięta jest prawie dwukrotnie cząsteczka DNA. Rdzeń zbudowany jest z heterotetrameru białek histonowych H3 i H4, które otoczone są dwoma heterodimerami białek H2A i H2B. Rdzeń wraz z nawiniętym na nim DNA tworzy chromatosomal. Chromatosomy połączone są tzw. „łącznikiem”- nicią DNA o długości ok. 56 pz. Opisaną strukturę „spina” para białek histonowych H1 i tak powstała struktura ma zwarty charakter i nazywana jest nukleosomem (Rysunek 10.).



Rysunek 10. Model budowy nukleosomu (Tachiwana i in. 2011). Na rysunku kolorami oznaczono: czarny – dsDNA nawinięty na rdzeń histonowy, szary – białka histonowe H3, niebieski – białka histonowe H4, zielony – białka histonowe H2A, różowy – białka histonowe H2B.

Białka histonowe ulegają znacznym modyfikacjom potranslacyjnym, które przede wszystkim dotyczą C- i N- końcowej domeny białka. Modyfikacje wprowadzane są do aminokwasów: lizyny (K), argininy (R), seryny (S) i treoniny (T) (Rysunek 11.).



Rysunek 11. Model budowy nukleonu (Muller i in. 2002). Przedstawiono ważniejsze modyfikacje białek histonowych: kropka czerwona - acetylacja lizyny, zielona - fosforylacja lizyny, pomarańczowa - metylacja lizyny, niebieska - metylacja argininy, żółta - ubikwitynacja lizyny.

Metylacja jest częstą modyfikacją, która może być wprowadzana zarówno do lizyny jak i argininy, polega ona na przyłączeniu grupy metylowej do aminokwasu. Lizyna ma możliwość przyłączenia aż czterech grup metylowych, ale występuje tylko jako metylo-, dimetylo-, trimetylolizyna, natomiast arginina może występować w formie metylo- i dimetyloargininy (Pontvianne i in. 2010). Wprowadzona metylacja może wywoływać bardzo różnorodne zmiany w poziomie ekspresji genów zależnie od tego, którego białka histonowego i którego aminokwasu ona dotyczy. Proces metylacji prowadzony jest przez metylotransferazy lizyny histonów (HKMT, *ang. Histone Lysine Methyltransferases*). Ta grupa białek klasyfikowana jest w pięć grup zależnie od miejsca wprowadzania modyfikacji (Luo i in. 2012). Proces metylacji arginin prowadzony jest przez metylotransferazę 5 białkowej argininy (PRMT5, *ang. Protein Arginine Methyltransferase*) (Luo i in. 2012). Metylacja białek histonowych usuwana jest przez dwa typy enzymów: lizyno-specyficzną demetylazę 1 (KDM1/LSD1, *ang. Lysine-Specific Demethylase 1*) i białka zawierające domenę Jumonij C (JmjC domain proteins, *ang. Jumonij C domain-containing proteins*). KDM1/ LSD1 mają zdolność do usuwania grupy metylowej z mono- i dimetylowanej lizyny, a białka z domeną JmjC z mono-, di- i trimetylolizyny (Lan i in. 2008; Liu i in. 2010). Metylacja białka histonowego H3 w pozycji K4 powoduje rozluźnienie struktury chromatyny (powstanie euchromatyny) oraz aktywację procesu transkrypcji, a w pozycji K9 wiąże się

z wyciszeniem transkrypcji i podwyższeniem poziomu metylacji DNA, w pozycji R17 prowadzi do aktywacji transkrypcji, w pozycji K27 powoduje wyciszenie transkrypcji, w pozycji K36 powoduje wydłużenie transkrypcji, w pozycji K79 powoduje powstanie euchromatyny oraz wydłużenie procesu transkrypcji. Metylacja histonu H4 w pozycji R3 prowadzi do aktywacji procesu transkrypcji, podczas gdy w pozycji K20 metylacja powoduje wyciszenie transkrypcji, trimetylacja wywołuje powstanie zwartej struktury heterochromatyny, a u *D. melanogaster* metylacja w tej pozycji prowadzi do wzmożenia tempa transkrypcji (Bender 2004; Peterson i in. 2004; Luo i in. 2012).

Acetylacja jest częstą modyfikacją białek histonowych, której ulega aminokwas lizyna. Proces modyfikacji polega na przyłączeniu grupy acetylowej do aminokwasu. Acetylacja jest wprowadzana do białek histonowych przez enzymy acetylotransferazy histonów (HAT, *ang. Histone Acetylase*). Wykazano istnienie 12 enzymów sklasyfikowanych w czterech rodzinach acetylotransferaz, do których należą: GNAT (*ang. GCN5-related N-terminal acetyltransferase*), MYST, CBP/p300 (*ang. CREB-binding protein*) i TAF1/TAF_{II}250 (*ang. TATA binding protein-associated factors*). Usuwanie acetylacji z białek histonowych przeprowadzane jest przez deacetylasy histonów (HDAC, *ang. Histone Deacetylase*), które podzielono na trzy główne rodziny: RPD3/HDA1, SIR2 i HD2 (Pandey i in. 2002). W większości przypadków modyfikacji tej przypisuje się funkcję podczas aktywacji transkrypcji, czyli zwiększenia aktywności transkrypcyjnej danego regionu DNA i tak jest w przypadku modyfikacji histonu H2A w pozycjach K4, K5 i K7, histonu H2B w pozycjach K5, K11, K12, K16, K15 i K20, histonu H3 w pozycjach K4, K9, K14, K18, K23 i K27, histonu H4 w pozycjach K5, K8, K12 i K16. Modyfikacja ta może także pełnić inne role, takie jak: depozycja histonów H3K9, H4K5; procesy naprawcze DNA H3K14, H3K18, H3K23, H4K5, H4K8, H4K12, H4K16; wydłużanie procesu transkrypcji H3K14, H3K23, H4K8, oraz wyciszenie telomerów H4K12 (Bender 2004; Peterson i in. 2004; Luo i in. 2012). Wykazano dynamiczne zmiany poziomu acetylacji w odpowiedzi na stres oraz ich rolę w zwiększeniu transkrypcyjnej dostępności genów (Benhamed i in. 2008; Berr i in. 2011).

Kolejnym typem modyfikacji potranslacyjnej wprowadzanej do białek histonowych jest fosforylacja polegająca na przyłączeniu reszty fosforanowej do aminokwasu seryny lub treoniny. Modyfikacja ta związana jest z cyklem komórkowym i w największym nasileniu pojawia się w późnej fazie mitozy. Fosforylacja białka histonowego H2A w pozycji S1 jest związana z procesem mitozy i kształtowaniem struktury chromatyny oraz mechanizmami

naprawczymi DNA, w pozycji T119 odpowiada za mitozę i mechanizmy naprawcze DNA, w pozycjach S129 i S139 związana jest z naprawą DNA. Modyfikacja fosforanowa histonu H2B w pozycji S14 łączona jest z mechanizmem apoptozy, a w pozycji S33 z aktywacją transkrypcji. Fosforylacja histonu H3 w pozycjach T3 i T11 łączona jest z procesem mitozy, w pozycji S10 z procesami mitozy i mejozy oraz wczesnej, natychmiastowej aktywacji transkrypcji (Bender 2004; Peterson i in. 2004).

Ubikwitynacja jest modyfikacją, która polega na przyłączeniu cząsteczki ubikwityny do aminokwasu lizyny (Pickart 2001). Modyfikacji tej przypisuje się udział w regulowaniu bardzo różnorodnych procesów np. modyfikacja histonu H2A w pozycji K119 odpowiada za spermatogenezę podobnie jak w histonie H3. Modyfikacji H2B w pozycji K120 przypisuje się rolę modulacji procesu mejozy, a w pozycji K123 aktywację transkrypcji. Znana jest także rola ubikwityny jako znacznika białek do proteosomowej degradacji oraz określającego ich funkcję i lokalizację komórkową (Hicke 2001; Zhang 2003).

Sumoilacja jest modyfikacją polegającą na przyłączeniu do aminokwasu małego białka będącego częścią ubikwityny (*ang. Small Ubiquitin-like Modifier or SUMO*). Sugeruje się, że modyfikacja tego typu powoduje represję translacji, ale może też kontrolować transport jądro - cytozol, regulować apoptozę, stabilność białek, brać udział w odpowiedzi na stres oraz w kolejnych etapach cyklu komórkowego. Modyfikacja ta dotyczy histonu H4.

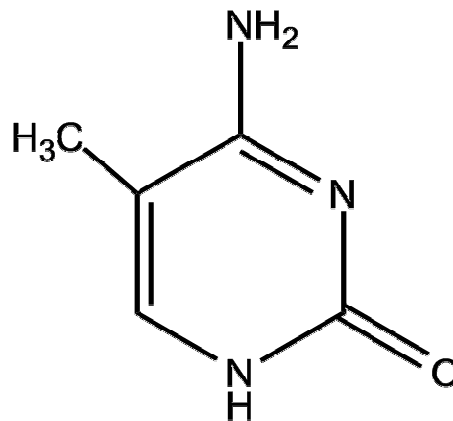
ADP-rybozylacja jest modyfikacją białek histonowych polegającą na przyłączeniu kilku reszt cukrowych do aminokwasu i powoduje ona rozluźnianie struktury chromatyny, co wiąże się z większą dostępnością sąsiadujących regionów DNA do procesu transkrypcji. Postuluje się także, że modyfikacja ta może mieć związek ze stabilizowaniem struktur III-rzędowych chromatyny (Bender 2004; Peterson i in. 2004).

Odkrycie licznych modyfikacji białek histonowych obecnych w chromatynie doprowadziło do zaproponowania teorii tzw. „kodu histonowego”, który miałby być uzupełnieniem kodu genetycznego zawartego w DNA i warunkować ekspresję danych genów w określonych warunkach. Dowiedziono, że nawet jeśli kod histonowy faktycznie funkcjonuje, to nie jest on uniwersalny, a ewentualnie specyficzny dla danego królestwa (Fransz i in. 2002).

4.3.1.3. Metylacja DNA

Już ponad 60 lat temu prowadząc analizę zawartości zasad w roślinnym DNA wykazano obecność metylowanej cytozyny (m^5C) (Rysunek 12.) jako „piątej zasady” obok A,

C, T i G (Wyatt 1950). W kolejnych latach stwierdzono, że jest to modyfikacja obecna w DNA wszystkich roślin wyższych (Vanyushin i in. 1959). Późniejsze odkrycie enzymów odpowiedzialnych za metylację zasad w DNA, najpierw u bakterii, a potem u Eukariota, potwierdziło przypuszczenia, że nie są to zasady wbudowywane do DNA jak pozostałe w procesie replikacji, a modyfikacja wprowadzana jest do gotowej nici. Pierwotnie, mylnie sądzono również, że zasada naprzeciw zasady metylowanej nie odgrywa żadnej istotnej roli w procesie modyfikacji (Gold i in. 1963; Gold i in. 1963).



Rysunek 12. Wzór strukturalny 5-metylo-cytozyny.

Metylacja DNA jest modyfikacją polegającą na przyłączeniu do cytozyny w pozycji C 5 lub do adeniny w pozycji N 6, grupy metylowej. Wprowadzona modyfikacja może znajdować się na obu lub tylko na jednej nici DNA i w trakcie procesów komórkowych w reakcji enzymatycznej jest usuwana lub ponownie włączana. W przypadku komórek roślinnych metylacji podlegają nie tylko regiony wysp CpG, ale również regiony CHG i CHH (gdzie H jest dowolnym nukleotydem z wyłączeniem G). Organizmy roślinne posiadają zdecydowanie wyższy w porównaniu do ssaków, poziom metylacji cytozyn, który może wynosić nawet 30% i więcej, a w głównym stopniu zależy on od gatunku i stanu fizjologicznego rośliny (Vaillant i in. 2007). Około 30% wszystkich metylacji znajdujących się w genomie roślinnym są to m⁵C w sekwencji odmiennej od kontekstu CG. Poziom i wzór metylacji DNA u roślin jest gatunkowo-, tkankowo-, kompartmentowo- i wiekowo-zależny.

Metylacja cytozyny odpowiedzialna jest w komórce za kontrolę wszystkich funkcji genetycznych włączając transkrypcję, replikację, naprawę DNA, transpozycję genów oraz różnicowanie komórek. Zanotowano, iż m⁵C jest również zaangażowana w zjawisko wyciszania genów, piętnowanie rodzicielskie, kontrolę ekspresji transgenów oraz obcego

DNA w komórkach. Procesy komórki roślinnej odpowiedzialne za metylację i demetylację DNA są dużo bardziej skomplikowane i wyszukane aniżeli u organizmów zwierzęcych (Vanyushin 2006). W procesie metylacji DNA u roślin bierze udział skomplikowana maszyna enzymatyczna, przy czym niektóre z jej składników nie posiadają odpowiedników u zwierząt (Finnegan i in. 2000; Luo i in. 2012). Metylacja i utrzymanie symetrycznego wzoru metylacji w obrębie sekwencji CG prowadzone są przez metylotransferazę 1 (MET1, ang. *methyltransferase 1*) zarówno podczas replikacji jak i po jej zakończeniu. Wykazano również, iż enzym ten odpowiedzialny jest za metylację *de novo* w obrębie sekwencji CG w sposób zależny od RNA (RdDM, ang. *RNA-Directed DNA Methylation*) (Aufsatz i in. 2004). Enzym chromometylaza (CMT1, ang. *chromomethylase*), specyficzny dla roślin, odpowiada za metylację cytozyny w kontekście sekwencyjnym CHG oraz utrzymanie niesymetrycznego wzoru metylacji na niciach DNA (Bartee i in. 2001). Kontekst CHH sekwencji DNA jest metylowany w dzielących się komórkach *de novo* dzięki aktywności metylotransferazy DRM przy pomocy CMT3, a następnie utrzymywany dzięki RdDM. Prawdopodobnie metylotransferazy DRM (DRM1 i DRM2) są odpowiedzialne za metylację *de novo* wszystkich kontekstów sekwencyjnych CG i mogą się przyczyniać do powstawania nowych miejsc metylacji w obrębie sekwencji DNA (Cao i in. 2002; Cao i in. 2003; Vanyushin i in. 2011). Wykazano również związek aktywności enzymatycznej DRM2 z utrzymaniem symetrycznego wzoru metylacji DNA (Cao i in. 2002).

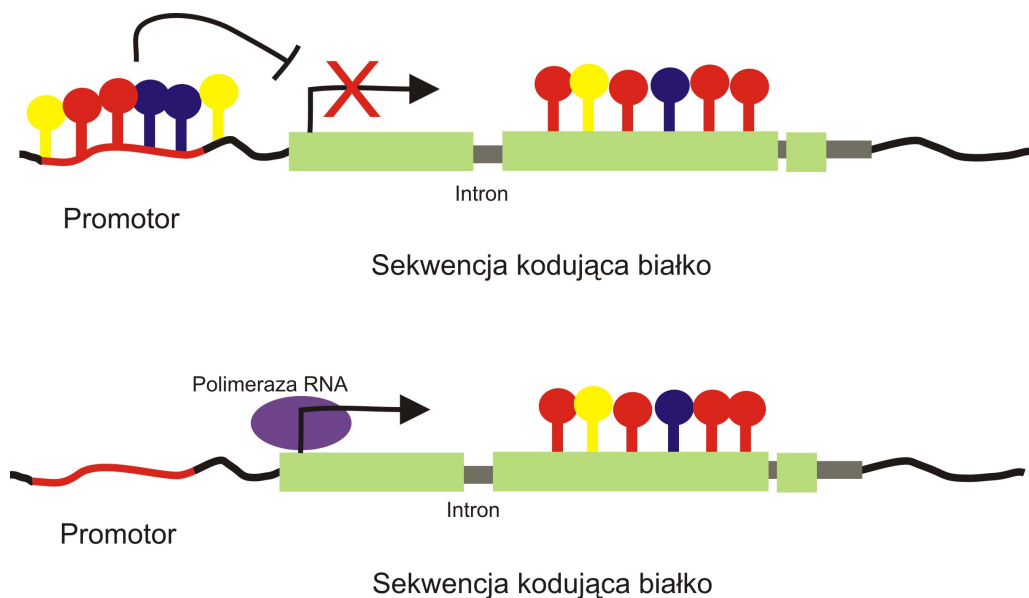
Dowodzono, że poziom i wzór metylacji mogą być odmienne w różnych typach komórek w obrębie jednego organizmu (Vanyushin i in. 1970). Odkrycie to pozwoliło na wnioskowanie, że metylacja DNA stanowi mechanizm regulujący ekspresję genów i różnicowanie komórek (Vanyushin i in. 2011). Wykazano, że w wyniku procesu replikacji podwójnej helisy DNA, która posiada metylację tylko na jednej z nici powstają dokładnie takie same nici DNA, o tym samym poziomie metylacji. Jednocześnie odnotowano przejściowy spadek poziomu metylacji na nici potomnej w trakcie tego procesu, a następnie ustąpienie zjawiska. Zasugerowano, że wzór metylacji musi być odbudowywany w nowo powstającym DNA, na wzór DNA matrycowego. Eksperymenty te doprowadziły do tego, że początkowo twierdzono, iż istnieje mechanizm pasywnej demetylacji DNA. W 2000 roku jednak odnotowano istnienie selektywnych mechanizmów demetylacji (Mayer i in. 2000). Zasugerowano istnienie mechanizmu enzymatycznego usuwania metylacji w DNA. Pierwszym odkrytym genem był Demeter (DME), kodujący duże białko zawierające domeny glikozylazy i lokalizacji jądrowej. Odkryto, że DME jest m⁵C specyficzną DNA-glikozylazo-

liażą (Choi i in. 2002; Gehring i in. 2006). Kolejnym odkrytym enzymem była glikozylaza specyficzna względem DNA ROS1 (*ang. repressor of silencing 1*) (Gong i in. 2002). Podobnie jak DME, gen ROS1 kodował białko zawierające domeny glikozylazy i liazy, ale w przeciwieństwie do DME jego ekspresja była obecna we wszystkich komórkach roślinnych. Wykazano, że oba enzymy są glikozylazami uwalniającymi zasadę m^5C z oligonukleotydu w kontekstach sekwencyjnych (Morales-Ruiz i in. 2006). Preferują one demetylację miejsc CG, ale wykazują również dużą aktywność względem kontekstu sekwencyjnego CHG i CHH. Obydwa białka odpowiadają również za uwalnianie tyminy z niesparowań T - G w DNA, jednak reakcja ta zachodzi z dużo mniejszą szybkością. Stwierdzono również obecność kolejnych glikozylaz z rodziny DME, nazwanych DML2 (*ang. DEMETER-Like 2*) i DML3 (*ang. DEMETER-Like3*), które są niezbędne dla właściwej metylacji wielu genów (Penterman i in. 2007; Ortega-Galisteo i in. 2008).

Wprowadzona metylacja przyczynia się do obniżenia ekspresji genów kodowanych w tym regionie. Proces ten powodowany jest przez przyłączanie się do metylowanych regionów białek specyficznie wiążących 5-metylocytozynę i wywołujących ściśle upakowanie chromatyny. Powstaje heterochromatyna nieaktywna transkrypcyjnie i całkowitemu wyłączeniu ekspresji danego genu leżącego w jej obrębie. Stwierdzono, że poziom metylacji w komórce ulega zmianie w zależności od warunków zewnętrznych oraz fazy cyklu, w której znajduje się komórka (Lippman i in. 2003). Takie stwierdzenie nadal funkcjonuje w literaturze, lecz obecnie odnosi się ono jedynie do regionów paromotorowych genów, w których potwierdzono, że wysoki poziom metylacji cytozyny skorelowany jest z obniżeniem lub całkowitym zahamowaniem aktywności danego genu (Rysunek 13.) (Feng i in. 2010; Ndlovu i in. 2011).

Rozwój metod badawczych w ostatnim czasie pozwolił na dokładniejsze badanie poziomu i miejsc metylacji w genomach roślinnych oraz ich porównywanie (Ndlovu i in. 2011). Przeprowadzone analizy pozwoliły na stwierdzenie, że istotny poziom metylacji obecny jest również w sekwencji genu. Co zaskakujące, dla większości genów zaobserwowano pozytywną korelację poziomu metylacji w obrębie sekwencji genu z poziomem jego ekspresji (Takuno i in. 2012). Obserwację tę próbuje się tłumaczyć faktem, że obecność metylacji w obrębie sekwencji genu może skutkować spowolnieniem pracy polimerazy w procesie transkrypcji, a tym samym dokładniejszym przepisywaniem sekwencji DNA. Przypuszczenia te potwierdza fakt, że szczególnie w obrębie sekwencji genów poziom m^5C jest wyższy aniżeli na jej początku i końcu (Zilberman i in. 2007). Podjęto również próbę

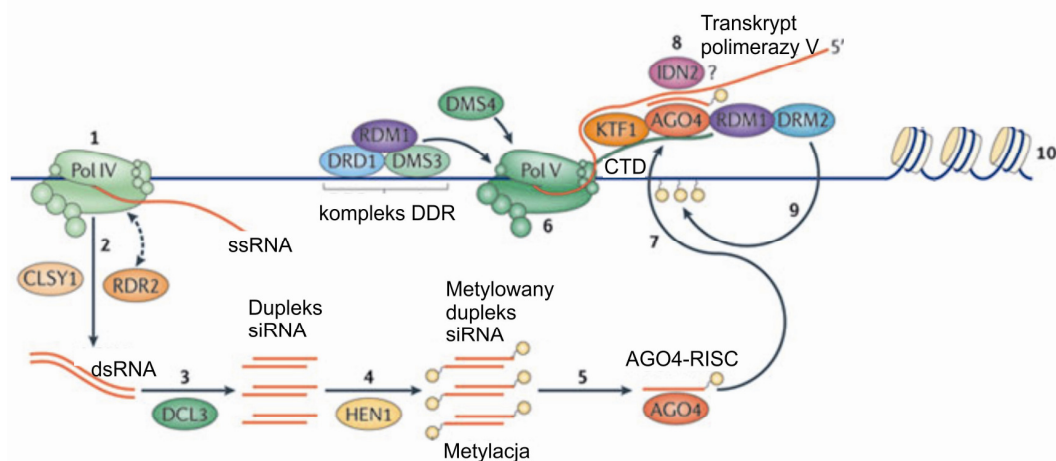
charakterystyki rozmieszczenia metylacji w obrębie sekwencji genu. Stwierdzono, że w miejscu inicjacji transkrypcji poziom metylacji DNA jest istotnie niższy i ulega podwyższeniu w obrębie sekwencji kodującej białko (Takuno i in. 2012). Obecnie prowadzone są szczegółowe badania mające na celu skorelowanie poziomu metylowanej cytozyny w DNA w poszczególnych kontekstach sekwencyjnych z rozmieszczeniem genów w chromosomie, ich funkcją, długością sekwencji czy zachowawczością ewolucyjną (Zilberman i in. 2007; Takuno i in. 2012; Schmitz i in. 2013; Wang i in. 2013). Zagadnienie związane z badaniem poziomu metylacji w sekwencji DNA często porównywane jest do góry lodowej, której tylko wierzchołek został poznany (Ndlovu i in. 2011).



Rysunek 13. Model obrazujący działanie metylacji w obszarze promotorowym i kodującym (Dowen i in. 2012). Na rysunku zaznaczono kolorami: czerwony - cytozyna metylowana w kontekście CG, niebiesko - cytozyna metylowana w kontekście CHG, żółto - cytozyna metylowana w kontekście CHH.

Innym, dobrze opisanym mechanizmem metylacji DNA u roślin jest metylacja DNA kierowana przez RNA (RdDM, *ang. RNA-directed DNA methylation*) (Rysunek 14.) (Kanno i in. 2011). Dla rozpoczęcia produkcji siRNA (*ang. short interfering RNA*) konieczna jest obecność dsRNA, który syntezowany jest przez polimerazę RNA zależną od RNA (RdRp). Dwuniciowy RNA hydrolizowany jest następnie przez rybonukleazę rodziny III czyli białka DCL (*ang. Dicer-like*), głównie DCL3, w wyniku czego powstają siRNA o długości 20-24 nukleotydów (Jones-Rhoades i in. 2006; Mallory i in. 2006; Henderson i in. 2007). Małe RNA wiązane są do białek AGO zawierających domeny PAZ (rozpoznaje koniec 3' małego

RNA), MID (wiąże się do 5' końca małego RNA) i PIWI (posiada aktywność podobną do RNazy H i hydrolizuje jednoniciowy docelowy RNA) (Vaucheret 2008). Małe RNA włączane są do indukowanego przez RNA kompleksu wyciszającego geny RISC (*ang. RNA-induced silencing complex*) (Matzke i in. 2005). Metylotransferazy DNA mające zdolność metylowania *de novo* z małą specyficznością w stosunku do sekwencji innych niż typowe konteksty posiadają CG, CHG i CHH. Małe RNA, poprzez pośrednictwo innych białek lub bezpośrednio przez oddziaływanie z DNA, w obrębie ich sekwencji docelowej są zdolne do rekrutowania metylotransferaz (Gendrel i in. 2005; Kanno i in. 2005). Wykazano, że ten typ metylacji DNA jest niezwykle istotny dla zajścia paramutacji, piętnowania rodzicielskiego, regulacji genów, a także rozwoju roślin. Odnotowano zaangażowanie tego procesu w aktywację i dezaktywację transpozonów oraz odpowiedź roślin na warunki stresowe. Sugeruje się, że RdDM stanowi dodatkowy mechanizm regulacyjny poziomu metylacji w DNA (Chinnusamy i in. 2009).

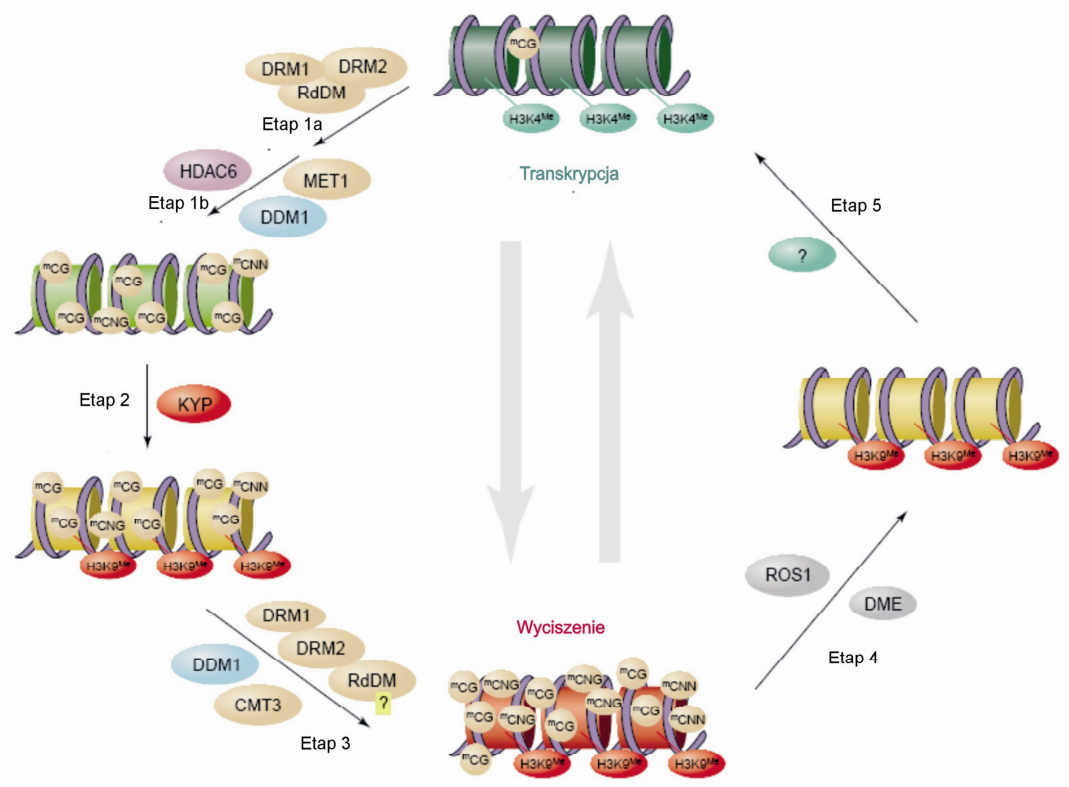


Rysunek 14. Model ścieżki metylacji DNA zależnej od RNA (Haag i in. 2011). Cyframi oznaczono kolejne etapy procesu RdDM: 1 - polimeraza IV rozpoczyna ścieżkę RdDM, 2 - transkrypt jest przekształcany w dsRNA, 3 - DCL3 hydrolizuje dsRNA na siRNA, 4 - HEN1 metyluje siRNA na końcu 3', 5 - jedna z nici siRNA włączana jest do kompleksu AGO-RISC, 6 - polimeraza V w asyście DRD1, DMS3, RDM1 i DMS4 transkrybuje DNA, 7 - nici siRNA w kompleksie AGO4-RISC wiążą się do transkryptu, 8 - prawdopodobnie IDN2 stabilizuje oddziaływanie siRNA z transkryptem, 9 - metylacja DNA następuje w rejonie transkrybowanym przez polimerazę V poprzez wiązanie kompleksu RDM1, AGO4 i DRM2, 10 - modyfikacja białek histonowych na skutek metylacji DNA (głównie deacetylacja lizyn, demetylacja H3K4, metylacja H3K9 i H3K27).

4.3.1.4. Współzależność mechanizmów epigenetycznych

Aktywność i wyciszenie genów wynika z formowania i rozprzestrzeniania się specyficznych stanów chromatyny, które ograniczają lub umożliwiają zajście ekspresji genów, a zmiany te mają charakter dziedziczny. U roślin heterochromatynę łączy się z hipermetylacją DNA i wcześniej wspomnianymi modyfikacjami białek histonowych. Funkcjonalny związek pomiędzy remodelowaniem chromatyny, metylacją DNA, modyfikacją histonów oraz interferencją RNA od kilku lat jest wnikliwie badany.

Na podstawie przeprowadzonych analiz zaproponowano prosty model zależności zjawisk epigenetycznych u *A. thaliana* (Rysunek 15.).



Rysunek 15. Schemat modelu zależności funkcjonalnej pomiędzy metylacją DNA i modyfikacjami białek histonowych w kontekście wyciszenia ekspresji genów u *A. thaliana* (Tariq i in. 2004).

Początkowo występuje pojedyncza metylacja DNA w obrębie wyspy CpG i jednoczesna metylacja histonu H3 w pozycji K4. Pod wpływem aktywnych metylotransferaz DRM1 i DRM2 oraz RdDM, MET1, deacetylazy histonów HDAC oraz oddziaływania na gen DDM1 (ang. *Decrease in DNA methylation 1*) następuje metylacja DNA nie tylko w obrębie wysp CpG, ale także w miejscach CNN i CNG oraz usunięcie metylacji w obrębie histonów. Tak zmodyfikowany nukleosom poddawany jest działaniu metylazy histonów KYP, która

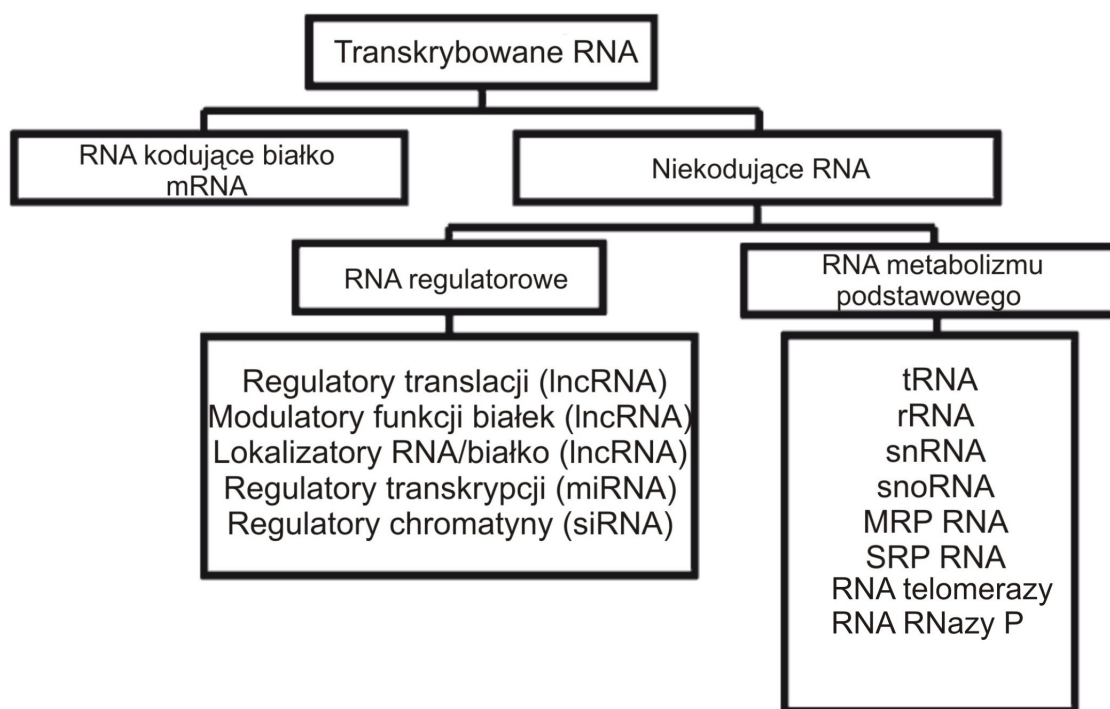
powoduje metylację H3 w pozycji K9. W kolejnym etapie grupa metylotransferaz CMT3, DRM1 i DRM2 wraz z czynnikami DDM1 i RdDM rozpoznaje metylowany DNA i modyfikację histonów i zwiększa ilość metylacji, co prowadzi do remodelowania chromatyny w heterochromatynę i wyciszenia ekspresji genów. W celu przywrócenia danego genu do procesu transkrypcji, sekwencja rozpoznawana jest przez specyficzną glikozydazę ROS1 wspólnie z DME, co prowadzi do usunięcia metylacji w obrębie DNA. Kolejnym etapem koniecznym, aby gen był aktywny transkrypcyjnie, jest usunięcie metylacji w obrębie H3K9 i metylacja w H3K4. Enzymy zaangażowane w ten proces nie zostały jeszcze poznane.

Przeprowadzone badania wskazują na duży związek pomiędzy modyfikacją histonów, metylacją DNA, procesami interferencji RNA i aktywnością transkrypcyjną genów. Interesujące jest poznanie jak wzajemna regulacja procesów związana jest z sygnałami odbieranymi przez organizm (komórkę) ze środowiska, przykładowo w warunkach stresowych (Tariq i in. 2004).

4.3.2. Niekodujące RNA

Dokładna analiza genomu eukariotycznego pozwoliła na stwierdzenie, że tylko bardzo niewielka jego część to geny kodujące białka (Yamada i in. 2003; Birney i in. 2007; Kapranov i in. 2007). Jednocześnie dowiedziono, że około 90% genomu ulega transkrypcji i przepisywane jest na RNA kodujące białka lub RNA nie kodujące białek (ncRNA, *ang. noncoding RNA*). Z transkrybowanych sekwencji u organizmów wyższych tylko około 1-2% są to RNA kodujące białka (Lander i in. 2001; Collins 2004). Początkowo identyfikowane transkrypty nie kodujące białek postrzegane były jako błędy komórki i marnotrawstwo energii. Domyślano się jednak, że ncRNA muszą pełnić jakąś rolę w komórce i elementy je kodujące często nazywano „czarną materią” genomu (Yamada i in. 2003; van Bakel i in. 2010). Niekodujące RNA są bardzo liczną grupą, do której zalicza się nie tylko produkty genów metabolizmu podstawowego jak, rybosomalny RNA (rRNA, *ang. ribosomal RNA*), transferowe RNA (tRNA, *ang. transfer RNA*) czy mały jądrowy (snRNA, *ang. small nuclear RNA*) i jąderkowy (snoRNA, *ang. mall nucleolar RNA*) RNA, ale również liczną grupę regulatorowych ncRNA. Niezwykle dużą rolę w badaniach ostatnimi czasy odegrały małe regulatorowe RNA takie jak małe interferujące RNA (miRNA, , *ang. micro RNA*) i krótkie interferujące RNA (siRNA, , *ang. small interfering RNA*), które pełnią istotną rolę w transkrypcyjnej i potranskrypcyjnej regulacji ekspresji genów (Zhu i in. 2012). Ostatnio wiele uwagi poświęca się również dłuższym niekodującym cząsteczkom RNA zwanych

długimi niekodującymi RNA (lncRNA, *ang. long noncoding RNA*), które również pełnią skomplikowane funkcje regulatorowe w komórce (Kim i in. 2012). Istnieje duża różnorodność siRNA w komórce i są to: heterochromatyczne siRNA (hc-siRNA, *ang. heterochromatic RNA*), działające *in trans* siRNA (tasiRNA, *ang. trans-acting RNA*), i naturalne antysensowe siRNA (natsiRNA, *ang. natural antisense short interfering RNA*) (Vaucheret 2006). Sugeruje się, iż w tak licznej grupie ncRNA kryje się olbrzymi potencjał regulatorowy i przekąźnikowy, którego tylko niewielki fragment został poznany (Shah i in. 2013). Ogólny schemat podziału niekodujących RNA przedstawiłam na rysunku 16.



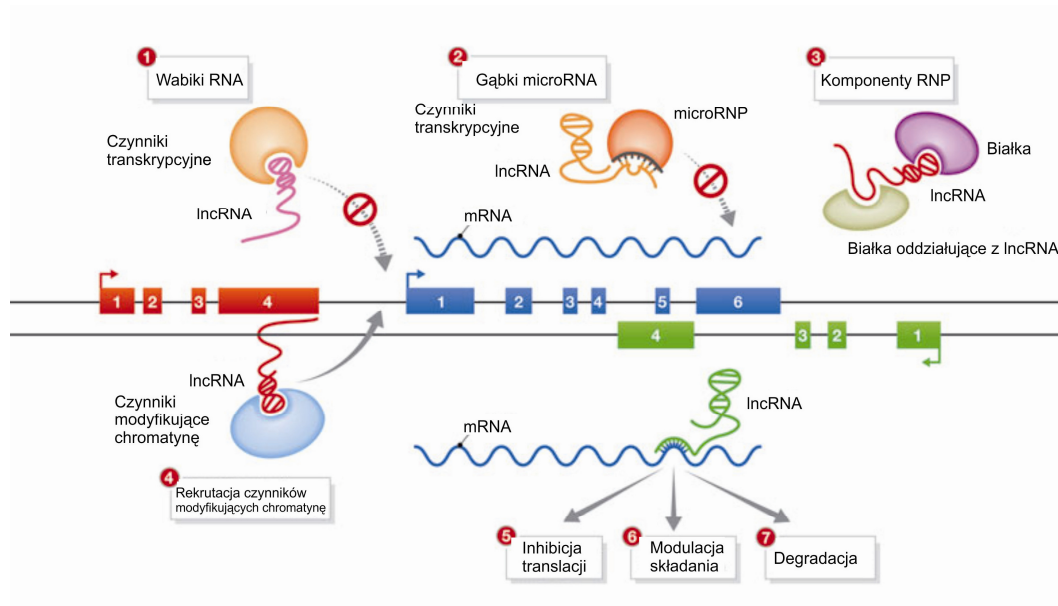
Rysunek 16. Model klasyfikacji ncRNA (Kavanaugh i in. 2009).

4.3.2.1. Długie niekodujące RNA

Termin „długie niekodujące RNA” został wprowadzony w celu odróżnienia cząsteczek małych i dużych RNA, przy czym za wartość graniczną uznano długość 200 nukleotydów. Cząsteczki RNA dłuższe niż 200 nukleotydów zaliczane są zazwyczaj do lncRNA (Jia i in. 2010; Orom i in. 2010). Niektóre z lncRNA znane były od dawna, ale dopiero ostatnio zainteresowanie tą tematyką wzrosło i zostały one okrzyknięte nowymi regulatorami komórkowymi. Przykład klasycznej regulacji z udziałem lncRNA stanowi Xist (*ang. X-inactive specific transcript*), Air i Kcnq1ot1 obecne u ssaków, które zaangażowane są w epigenetyczną regulację ekspresji genów (Nagano i in. 2008; Pandey i in. 2008; Lee 2010).

Niektóre z cząsteczek mają zdolność działania *in cis*, jak np. w procesie inaktywacji chromosomu X przy udziale Tsini i Repa poprzez rekrutowanie czynników kompleksów modyfikujących chromatynę (Lee 2010). ncRNA, jak np. linc-p21 mają zdolność wiązania się do wielu sekwencji w genomie i ich wyciszania. Są to cząsteczki działające *in trans* i także wiele z nich zaangażowanych jest w regulację szlaku białka p53 (Huarte i in. 2010). Ponadto niektóre z niekodujących RNA mają zdolność regulacji *in cis* i *in trans* jednocześnie lub tylko na jeden ze sposobów. Takie możliwości oddziaływania lncRNA wydają się niezwykle interesujące w kontekście regulowania przez nie zmian poziomu ekspresji genów w procesie epigenetycznych modyfikacji chromatyny (Khalil i in. 2009). U roślin wykazano, że lncRNA pełnią istotną rolę w sterowaniu procesami modyfikacji chromatyny, a także w rozwoju roślin oraz procesie kwitnienia i embriogenezy (Wang i in. 2008; Swiezewski i in. 2009; Liu i in. 2010; Wierzbicki 2012). Długie niekodujące RNA mogą być transkrybowane zarówno z regionów kodujących białka, jak i intronów czy rejonów międzygenowych. Mogą być one usytuowane w sekwencjach w orientacji sens lub antysens, pokrywać cały fragment danego intronu, czy sekwencji kodującej lub tylko część tych sekwencji. Inne cząsteczki zaliczane do lncRNA często stanowią pierwotny transkrypt, który w wyniku działania maszynerii komórkowej jest przycinany i stanowi źródło sncRNA jak miRNA (Xie i in. 2005; Chen 2009).

Długie niekodujące RNA produkowane są przez polimerazę II i mogą ulegać procesowi przyłączania czapeczki i ogona poliA (Rysunek 17.). Wykazano, że takie RNA mogą pełnić funkcje regulatorowe w komórce głównie przypisaną regulacji ekspresji genów, również w kontekście odpowiedzi na warunki stresowe (Ben Amor i in. 2009). Istnieją jednak doniesienia sugerujące, że w proces ten zaangażowane mogą być również polimerazy IV i V (Ben Amor i in. 2009; Wierzbicki 2012). Stwierdzono, że powstające jednoniciowe RNA transkrybowane przez polimerazę IV, niezwłocznie przy udziale polimerazy RNA zależnej od RNA 2 (RDR2, *ang. RNA-dependent RNA-polymerase 2*) przekształcane są w dsRNA. Dwuniciowy RNA rekrutowany jest do szlaku miRNA i cięty przez białko podobne do Dicer (DCL4, *ang. Dicer-like 4*) (Xie i in. 2004; Howell i in. 2007). W wyniku tego procesu powstaje miRNA, który po połączeniu z AGO4 specyficznie rozpoznaje sekwencję docelową w RNA i wiąże się do niej (Wierzbicki i in. 2009). Opisane lncRNA powstające w wyniku działania polimerazy V pełnią rolę w wyciszaniu ekspresji genów poprzez tworzenie rusztowania, do którego wiązać mogą się czynniki białkowe oddziałujące z chromatyną (Zilberman i in. 2003).



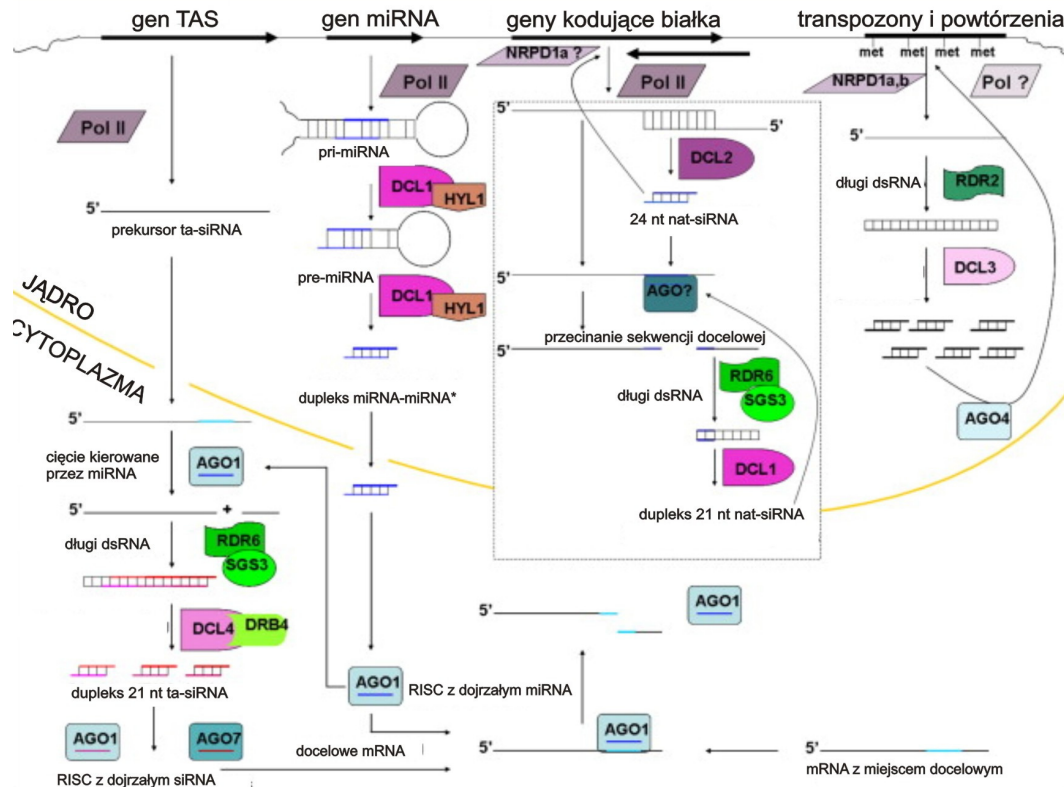
Rysunek 17. Mechanizm działania lncRNA w komórce (Hu i in. 2012). Cyframi oznaczono poszczególne mechanizmy działania: 1 - wabiki RNA (lncRNA odciąga czynniki białkowe od ich docelowych miejsc działania w DNA), 2 - gąbki RNA (lncRNA i czynniki białkowe wiążą miRNA odciągając je od docelowej sekwencji w RNA), 3 - komponenty rybonukleoprotein (lncRNA często wchodzi w skład kompleksów RNP działając niczym rusztowanie), 4 - rekrutacja czynników modyfikujących chromatynę (lncRNA oddziałując in cis ułatwiają przyłączanie czynników modyfikujących chromatynę), 5 - modulowanie translacji (lncRNA przyłączając się do mRNA są w stanie regulować proces translacji), 6 - modulacja składania mRNA przez lncRNA, 7 - wprowadzanie mRNA na drogę degradacji.

Wydaje się, że lncRNA pomimo że są stosunkowo nieliczne, w komórce pełnią niezwykle ważną rolę regulacyjną w sterowaniu ekspresją genów. Sugeruje się, że pełnią one rolę łączników pomiędzy czynnikami białkowymi wiążącymi się do chromatyny oraz nicią DNA i białkami histonowymi (De Lucia i in. 2011).

4.3.2.2. Małe niekodujące RNA

Małe niekodujące RNA pierwszy raz w literaturze opisano w 1993 roku w organizmie *C. elegans* (Lee i in. 1993). Od tego czasu badania w tej dziedzinie nabrały szybkiego tempa i okazało się, że są to cząsteczki biorące udział w regulacji prawie wszystkich procesów komórkowych. Endogenne małe niekodujące RNA można podzielić na dwie główne grupy: mikro RNA (miRNA) i krótkie interferencyjne RNA (siRNA). miRNA roślinne opisano w 2002 roku na przykładzie *A. thaliana*; są to jednoniciowe cząsteczki RNA o długości 20-24

nukleotydów. Częsteczki te kodowane są w genomie i transkrybowane na RNA (Rysunek 18.).



Rysunek 18. Schemat obrazujący biogenezę i działanie małych niekodujących RNA w komórce (Phillips i in. 2007).

Transkrypty miRNA, zwane pri-miRNA, mają sekwencję o długości ponad 100 nukleotydów i strukturę spinki do włosów, a proces transkrypcji prowadzony jest przez polimerazę II. Częsteczka pri-miRNA jest przycinana przez enzym DCL1 (ang. *Dicer Like 1*) do krótszej formy również o strukturze spinki do włosów o długości około 50 nukleotydów, która nazywana jest pre-miRNA. Pod wpływem powtórnego działania enzymu DCL1 z formy pre-miRNA powstaje dupleks miRNA:miRNA*. Dupleks rozpoznawany jest przez metylotransferazę HEN1 (ang. *HUA Enhancer 1*) zależną od S-adenozylometioniny, która przeprowadza metylację 2'-O na końcu 3' RNA (prawdopodobnie ma to na celu zwiększenie stabilności cząsteczki i zapobieżenie innym modyfikacjom). Dupleks transportowany jest za pomocą białka HASTY z jądra do cytoplazmy, a następnie dysocjuje podczas selektywnego włączenia dojrzałego miRNA do kompleksu wyciszającego RISC, zawierającego białko AGO o aktywności nukleolitycznej. Regulacja ekspresji genu może zachodzić na dwa sposoby. W przypadku pełnej komplementarności sekwencji miRNA do sekwencji docelowego mRNA

wyciszonego genu następuje proces hydrolitycznego cięcia mRNA, a w przypadku niepełnej komplementarności sekwencji mamy do czynienia z zahamowaniem procesu translacji. W wyniku zintensyfikowania badań nad miRNA i ich rolą w komórce stworzono bazę danych w której deponowane są sekwencje miRNA dla danego gatunku wraz z genem docelowym. Dla kukurydzy dostępnych jest obecnie 207 sekwencji miRNA, z czego tylko 2 zostały zbadane eksperymentalnie (Zhang i in. 2006; Lu i in. 2008; Zhang i in. 2010).

Cząsteczki miRNA, pomimo swoich niewielkich rozmiarów, odgrywają niezmiernie dużą rolę w procesie ekspresji informacji genetycznej w komórce. Wykazano, że biorą one udział w regulacji wzrostu rośliny, rozwoju poszczególnych organów, regulują proces kwitnienia oraz przejście do fazy wegetatywnej. Potwierdzono również ich związek z procesami przekazywania sygnału w roślinie, sterowaniem procesami epigenetycznymi, a także regulacją biogenezy innych miRNA i siRNA. Wykazano również bezpośrednią rolę miRNA w kształtowaniu odpowiedzi rośliny na warunki stresu abiotycznego (Tariq i in. 2004).

4.3.3. Degradom

Pomimo szybko rozwijającej się biochemii i biologii molekularnej dopiero od niedawna w literaturze można znaleźć określenie degradomu jako cząsteczek, w tym wypadku RNA, które powstają w różnych procesach katabolicznych w komórce w sposób ukierunkowany, są w niej magazynowane i pełnią ważne funkcje, postulowane jako regulatorowe.

Degradacja RNA jest procesem znanym i do niedawna uważano, że jej jedyną funkcją jest degradacja błędnie złożonych transkryptów i tym samym umożliwienie obiegu nukleotydów w komórce, a w sytuacjach wyjątkowych (podwyższone zapotrzebowanie komórki) również poszczególnych pierwiastków budujących nukleotydy (Deutscher 2003; Houseley i in. 2009; Zhang i in. 2009). Proces degradacji RNA w komórce prowadzony jest przez trzy klasy enzymów: egzonukleazy 3' i 5' oraz endonukleazy. Egzonukleazy 3' mają zdolność hydrolitycznego cięcia RNA od końca 3', a egzonukleazy 5' rozpoczynają proces cięcia od końca 5'. Endonukleazy przecinają wiązanie fosfodiesterowe wewnątrz cząsteczki RNA w dowolnym miejscu. Działalność RNaz w dużym stopniu związana jest z kofaktorami, takimi jak helikazy, polimerazy czy niekodujące RNA (Houseley i in. 2009).

Każda z cząsteczek RNA w komórce ma przypisaną określoną funkcję np. kodującą (mRNA), transportującą (tRNA), rybosomalne RNA (rRNA) lub regulatorową (m.in.

miRNA) oraz określony czas aktywności, dość długi dla rRNA i wyjątkowo krótki dla np. sekwencji intronowych. Badania degradomu są w fazie początkowej i mało jest doniesień literaturowych na temat jego funkcji w komórce.

Przeprowadzono analizę degradomu *A. thaliana*, scharakteryzowano i opisano cząsteczki budujące degradom oraz ich potencjalną rolę jako cząsteczek sygnałnych i regulatorowych w roślinie. Wskazano również na znaczne zmiany w „mapie” degradomu pod wpływem stresu zasolenia, co wydaje się być naturalną odpowiedzią rośliny na warunki stresowe. Stwierdzono, iż główny udział w grupie zidentyfikowanych cząsteczek stanowiły produkty degradacji rRNA i tRNA (Nowacka i in. 2012).

Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, że proces cięcia RNA dotyczy przede wszystkim cząsteczek tRNA i rRNA oraz jest on uniwersalny dla drożdży, ssaków i roślin. Zaobserwowano, że opisany proces dotyczy odpowiedzi na stres oksydacyjny, który również wywoływany jest przez herbicyd Roundup. Postuluje się, że cząsteczki pociętego tRNA i rRNA mogą brać udział w hamowaniu procesu translacji. Zjawisko to może występować poprzez zmniejszenie puli dostępnych tRNA w komórce, jak i poprzez wiązanie się zdegradowanych cząsteczek do maszynerii translacyjnej, uniemożliwiając przeprowadzenie tego procesu. Sugeruje się również rolę fragmentów tRNA jako cząsteczek sygnałnych; przykładowo wykazano, że wprowadzenie angiogeniny, która prowadzi do cięcia tRNA, może skutkować zmianami tempa wzrostu komórek. Opisano także możliwość udziału fragmentów tRNA w znanych już szlakach komórkowych jako nowe substraty, z sugerowaną funkcją działania jako cząsteczki regulatorowe i uczestnictwa w powstawaniu cząsteczek siRNA i miRNA. Wykazano, że cząsteczki degradomu były izolowane w kompleksach z białkami PIWI i AGO, co może sugerować, że pełnią rolę podobną do siRNA i miRNA. Inną proponowaną w literaturze funkcją jest udział fragmentów tRNA w degradowaniu mRNA poprzez asocjację z komplementarną sekwencją mRNA i przyłączenie RNazy P lub RNazy Z (Thompson i in. 2008; Thompson i in. 2009; Zhang i in. 2009).

4.3.4. Translacja

Translacja jest procesem, w którym informacja zawarta w RNA tłumaczona jest na język aminokwasów. Jest to ostatni etap procesu biosyntezy białka, w którym powstają polipeptydy. Pomimo, że translacja i jej produkty mają ogromny wpływ na prawidłowe funkcjonowanie komórki, nie jest to proces do końca poznany (Horiguchi i in. 2012). Proces translacji zaczyna się od inicjacji. Kompleks trójskładnikowy złożony z Met-tRNA_i^{Met}, GTP

i eIF2 łączy się z małą podjednostką rybosomalną i w asyście czynników eIF-1, -1A i -3 skanują, sekwencję mRNA w poszukiwaniu sekwencji kodonu START czyli miejsca rozpoczęcia translacji. Skanowanie rozpoczyna się od rozpoznania i przyłączenia kompleksu preinicjacyjnego do mRNA przy udziale kompleksu wiążącego czapkę (eIF-4), rozpoczynając od końca 5'. Po rozpoznaniu sekwencji kodonu inicjacyjnego przyłączona zostaje duża podjednostka rybosomalna, następuje hydroliza ATP i odłączenie czynników inicjacyjnych (Spahn i in. 2004; Lopez-Lastra i in. 2005). Jednocześnie opisano, że istnieje możliwość przyłączenia podjednostki rybosomu do mRNA niezależnie od obecności czapki. Obecne w sekwencji mRNA miejsca wewnętrznego wiązania rybosomu (IRES, *ang. internal ribosome entry site*) poprzez swoją strukturę umożliwiają związanie rybosomu (Hellen i in. 2001). W wyniku połączenia podjednostek rybosomalnych wykształcają się wewnątrz rybosomu trzy miejsca, które mogą być obsadzone przez tRNA: miejsce A, do którego wiązany jest aminoacylo-tRNA (aa-tRNA); miejsce P, gdzie wiązany jest peptydylo-tRNA (p-tRNA) oraz miejsce E, w którym znajduje się deacylo-tRNA (d-tRNA). W miejscu P znajduje się Met-tRNA_i^{Met}, a do miejsca A związany zostaje specyficzny (niosący aminokwas zakodowany w trójce kodonowej sekwencji mRNA obecnej w miejscu A) aa-tRNA doprowadzany do rybosomu w kompleksie z eEF-1 i GTP. GTP ulega hydrolizie, czynnik eEF1 oddysocjowuje i w wyniku aktywności peptydylotransferazowej rybosomu zachodzi synteza wiązania peptydowego pomiędzy aminokwasami. Kolejno z udziałem GTP i czynnika eEF-2 następuje translakcja, czyli przesunięcie wewnątrz rybosomu d-tRNA z miejsca P do E i odpowiednio p-tRNA z miejsca A do P. Kolejno w miejsce A ponownie wiązany jest specyficzny aa-tRNA i cały proces powtarzany (Spahn i in. 2004). Synteza łańcucha następuje do momentu napotkania przez rybosom sekwencji kodonu STOP. Przy udziale czynników terminacyjnych (eRF) następuje z udziałem cząsteczki wody uwolnienie łańcucha peptydowego, a następnie z pomocą czynnika „rybosomalnego powtórnego wykorzystania” (RRF) podjednostki rybosomalne oddysocjowują od mRNA (Pisarev i in. 2007; Jackson i in. 2012).

Do tej pory słabo poznane są powiązania procesu translacji z innymi mechanizmami i procesami komórkowymi, jak transkrypcja, wyciszanie RNA, modyfikacje białek czy docelowa degradacja białek. Jednakże zgromadzone dane doświadczalne pozwalają na wnioskowanie, że zmienność sekwencji białek rybosomalnych i rRNA prawdopodobnie odgrywają istotną rolę w rozwoju komórek (Horiguchi i in. 2012).

4.4. Rośliny w warunkach stresowych

Wszystkie organizmy (w tym rośliny w trakcie rozwoju) napotykają niesprzyjające, warunki powodujące tzw. stres biotyczny lub abiotyczny, zależnie od jego źródła (Rysunek 19.). Dla przetrwania organizmu konieczna jest jego reakcja na warunki stresowe mająca na celu dostosowanie procesów komórkowych w taki sposób, aby skutki stresu były niwelowane. Informacja genetyczna zakodowana w DNA i poziom ekspresji odpowiednich genów gwarantuje roślinie przetrwanie warunków stresowych.



Rysunek 19. Schemat przedstawiający możliwe warunki stresowe na jakie narażona jest roślina w warunkach polowych.

Strategiczne znaczenie w procesie odpowiedzi na warunki stresowe mają zmiany epigenetyczne zachodzące w obrębie chromatyny, polegające na modyfikacji białek histonowych i metylacji DNA. Wszystkie te mechanizmy regulowane są w komórce z wykorzystaniem procesów, w które zaangażowane są cząsteczki małych niekodujących RNA. Udowodniono, że sygnały powstające w trakcie wzrostu rośliny oraz pochodzące ze środowiska mają zdolność indukowania mechanizmów odpowiedzi rośliny na poziomie regulatorowych RNA i degradomu, a także mechanizmów epigenetycznej odpowiedzi rośliny (Thomashow 1999; Scippa i in. 2004; Zhu 2008; Chinnusamy i in. 2009). Zidentyfikowano mechanizmy powodujące powstanie krótkotrwałej „pamięci stresu”, która umożliwia

roślinie przetrwanie w niekorzystnych warunkach geo-środowiskowych. Zachowanie takiej pamięci zapewniało odporność rośliny tylko przez krótki okres, kiedy obecne były w jej organizmie białka, RNA i metabolity, których powstanie indukował czynnik stresowy (Thomashow 1999; Iba 2002; Scippa i in. 2004). Zajście w obrębie rośliny modyfikacji o charakterze epigenetycznym umożliwia utrwalenie zmian w ekspresji genów, mających na celu obronę rośliny przed warunkami wywołującymi stres, a mechanizmy te sterowane są bezpośrednio przez małe niekodujące RNA (Kim i in. 2008). Wykazano, że w wyniku zmian środowiskowych zmienia się charakterystyka degradacji RNA. Świadczyć to może o ukierunkowanej hydrolizie RNA w komórce mającej na celu wykorzystanie produktów degradacji w procesach regulatorowych (Thompson i in. 2009; Nowacka i in. 2012).

Badania mające na celu poznanie mechanizmów zaangażowanych w odpowiedź rośliny na stres na różnych poziomach przepływu informacji genetycznej w komórce są prowadzone w bardzo wielu zespołach. Poniższe podsumowanie przedstawia wybrane zagadnienia dotyczące odpowiedzi na warunki stresowe u roślin z naciskiem na analizowaną w pracy tematykę. W warunkach suszy postulowano, że modyfikacje w obrębie histonu 1 (H1) mogą być zaangażowane w negatywną regulację przepuszczalności błon oraz poziomu transpiracji (Scippa i in. 2004). Zaobserwowano też związek suszy ze wzrostem trimetylacji białka histonu 3 w pozycji K4 oraz acetylacji histonu 3 w pozycji K9 u *A. thaliana* (Kim i in. 2008). Susza powodowała także hipermetylację DNA u grochu (Labra i in. 2002). Dla ryżu w warunkach zanurzenia rozsady, powodującego stres, zaobserwowano trimetylację H3K4 oraz acetylację H3 w genach dekarboksylazy alkoholowej i dekarboksylazy pirogronianu (Tsuji i in. 2006). W roślinie modelowej *A. thaliana* wykazano, że stres wywołany wysokim zasoleniem, zimnem oraz obecnością kwasu abscysynowego powoduje szybki i nietrwały wzrost fosforylacji H3S10 i fosfoacetylacji H3 oraz acetylacji H4, powodując typową dla danego stresu odpowiedź obronną rośliny (Zhu i in. 2008). W kukurydzy stwierdzono, że pod wpływem stresu zimna zmniejszył się poziom metylacji DNA w obrębie genu *ZmMII* (Steward i in. 2002), a w *Antirrhinum majus* hipometylację i tranzycję transpozonu *Mam-3* (Hashida i in. 2006). Stres wywołany przez jony glinu, herbicyd parakwat, zasolenie oraz zimno u tytoniu powodował demetylację DNA w obrębie genu *NtGPD*L (Choi i in. 2007). Wykazano również hipermetylację heterochromatyny w hodowlach komórkowych tytoniu pod wpływem stresu osmotycznego (Kovarik i in. 1997).

Niezwykle ważna dla rozwoju roślin jest właściwa zawartość składników mineralnych w podłożu. Wykazano, że przy stresie związanym z niskim poziomem fosforanów

nadekspresji ulegał miR399, którego genem docelowym jest sekwencja kodująca enzym UBC (*ang. ubiquitin-conjugating*) u *A. thaliana*. Przy niskim stężeniu siarczanów w podłożu stwierdzono podwyższoną ekspresję miR395, którego genem docelowym jest sulfurylaza ATP. U *A.thaliana* i u ryżu zaobserwowano ekspresję cząsteczki miR398, która zaangażowana jest w degradację mRNA kodującego dysmutazę nadtlenkową Cu/Zn, która bierze udział w dopowiedzi na stres oksydacyjny rośliny wywołany obecnością jonów Cu^{2+} , Fe^{3+} oraz światła o wysokim natężeniu.

Kwas abscysynowy (ABA) odpowiada za wiele ważnych procesów w roślinie, takich jak kiełkowanie, dojrzewanie, wytwarzanie w nasionach substancji zapasowych, odpowiedzi na patogeny i wykształcanie tolerancji. Wykazano, iż w nasionach następuje podwyższona ekspresja miR159 pod wpływem ABA, które oddziałuje na transkrypty MYB33 i MYB101. Stwierdzono, że miR393 ulega wyraźnie podwyższonej ekspresji pod wpływem ABA, podczas gdy miR397b i miR402 ulegają nieznacznie podwyższonej ekspresji, a miR389a obniżonej ekspresji u *A. thaliana*.

W warunkach stresu mechanicznego, podwyższonego ciśnienia i naprężeń wykazano dla *P. trichcarpa* obniżoną ekspresję miR156, 162, 164, 475, 480 i 481, z kolei miR408 ulegał podwyższonej ekspresji.

Udowodniono u *A.thaliana* podwyższoną ekspresję miR393 oraz nieznacznie podwyższoną ekspresję miR397b i miR402 w warunkach stresu zimna, odwodnienia i podwyższonego stężenia NaCl. W tych samych warunkach zaobserwowano obniżoną ekspresję miR389a. Również miR319c ulegał podwyższonej ekspresji w warunkach stresu zimna. W warunkach wysokiego zasolenia wykazano, iż miR417 odgrywa rolę w opóźnianiu kiełkowania nasion. Z kolei stres suszy powodował podwyższoną ekspresję miR169g i miR393 (Zhang i in. 2006; Phillips i in. 2007; Lu i in. 2008; Shukla i in. 2008).

Opisano dla *Z. mays* zaangażowanie cząsteczek miR168, 162, 164, 167, 156, 395 i 396 w proces odpowiedzi na warunki stresu zasolenia i zaproponowano potencjalną sieć reakcji korzeni rośliny na zastosowane w badaniach warunki stresowe (Zhang i in. 2009). Zmiany zachodzące w roślinach pod wpływem warunków stresowych i kształtowanie odporności to procesy wieloetapowe, w które zaangażowane są mechanizmy komórkowe obecne na wszystkich etapach przepływu informacji genetycznej w komórce. Tylko ich dokładne zbadanie pozwoli na wnioskowanie o mechanizmach kształtujących odporność na stres.

5. Materiały i metody

5.1. Hodowla, ocena fenotypowa i zbiór materiału roślinnego

Celem doświadczeń szklarniowych była ocena zmian fenotypowych, a przez to będących wskaźnikiem wrażliwości linii hodowlanych kukurydzy na zastosowany czynnik stresowy.

5.1.1. Materiał roślinny

Do badań wykorzystywałam linie hodowlane z kolekcji HR Smolice: *Zea mays* L. S245, S79757, S40620 i S41336. Materiał roślinny zbierałam w trzykrotnych powtórzeniach biologicznych w latach 2009 i 2012.

5.1.2. Warunki hodowli

Do wazonów hodowlanych o pojemności 1,5 l wypełnionych glebą ogrodniczą wysiewano po 10 ziaren danej linii hodowlanej. W jednym powtórzeniu biologicznym hodowano po trzy wazony kukurydzy każdej linii poddawane warunkom stresowym i trzy wazony z roślinami kontrolnymi. Hodowlę prowadzono w warunkach szklarniowych przy zastosowaniu naprzemiennie faz 16 h oświetlenie i 8 h ciemności, temperatury 22°C i stałej wilgotności. Zabieg oprysku herbicydem wykonano w fazie 4-5 liści kukurydzy opryskiwaczem szklarniowym zaopatrzone w rozpylacze płaskostrumieniowe TeeJet TT 11002 przy zastosowaniu ciśnienia 3 bary, ilość wody wykorzystanej do zabiegu wynosiła 250 l/ha. Rośliny poddawane były natryskowi herbicydów: glifosat w dawce subletalnej 300g (1 l/ha Roundup 360 SL + 4 l/ha AS 500 SL) linie S79757 i S245; rimsulfuron w dawce 75 g (Titus 25 WG 300 g/ha) linie S40620 i S245, glufosynat amonowy w dawce: 150 g (Basta 150 SL 1,0 l/ha) linie S41336 i S245. Rośliny hodowano po zabiegu oprysku przez 21 dni utrzymując te same warunki szklarniowe, jak opisano powyżej.

5.1.3. Ocena fenotypowa roślin i zbiór materiału

Rośliny poddawałam ocenie fenotypowej w celu ustalenia zmian na powierzchni liści i w pokroju całego organizmu w odpowiedzi na zastosowane warunki stresowe. Ocena i dokumentację fotograficzną prowadziłam w dniu zabiegu oraz po 7, 14 i 21 dniach od zabiegu.

Liście z poszczególnych roślin odcinałam, umieszczałam w opakowaniu z tworzywa sztucznego i mroziłam w ciekłym azocie. Reprezentatywne próbki liści na potrzeby izolacji RNA i DNA poddawałam homogenizacji w ciekłym azocie. Zamrożone liście oraz zhomogenizowane próbki liści przechowywałam w stanie głębokiego zamrożenia w -80°C .

5.2. Stosowane odczynniki chemiczne

5.2.1. Odczynniki i materiały

Tabela 1. Wykorzystywane w pracy odczynniki i materiały.

L.p.	Producent	Nazwa odczynnika lub materiału	
1.	Sigma Aldrich	sacharoza ($\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$)	POPOP ($\text{C}_{24}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_2$)
		maślan sodu ($\text{C}_4\text{H}_7\text{NaO}_2$)	PPO ($\text{C}_{15}\text{H}_{11}\text{NO}$)
		deoksyholan sodu ($\text{C}_{24}\text{H}_{39}\text{NaO}_4$)	poli(U) ($(\text{C}_9\text{H}_{13}\text{N}_2\text{O}_9\text{P})_x$)
		wodorowęglan sodu (CHNaO_3)	ksylencjanol ($\text{C}_{25}\text{H}_{27}\text{N}_2\text{NaO}_6\text{S}_2$)
		triton X-100 ($t\text{-Oct-C}_8\text{H}_8\text{O}_9\text{OH}$)	bromofenol ($\text{C}_{19}\text{H}_{10}\text{Br}_4\text{O}_5\text{S}$)
		NP-40 ($\text{C}_{18}\text{H}_{30}\text{O}_3$)	pomarańcz G ($\text{C}_{16}\text{H}_{10}\text{N}_2\text{Na}_2\text{O}_7\text{S}_2$)
		1 $\mu\text{g/ml}$ inhibitor proteinaz (tabletki)	piasek (SiO_2)
		Protein A Agarose	PMSF ($\text{C}_7\text{H}_7\text{FO}_2\text{S}$)
		tris HCl ($\text{C}_4\text{H}_5\text{NO}_3$)	ATPNa ₂ ($\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_5\text{Na}_2\text{O}_{13}\text{P}_3$)
		GTPLi ($\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_5\text{O}_{14}\text{P}_3 \times \text{Li}^+$)	DEAE-celuloza ($\text{C}_{20}\text{H}_{23}\text{NO}_5$)
		fenol ($\text{C}_6\text{H}_6\text{O}$)	chloroform (CHCl_3)
		akrylamid ($\text{C}_3\text{H}_5\text{NO}$)	DTT ($\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}_2\text{S}_2$)
		bis-akrylamid ($\text{H}_{10}\text{C}_6\text{N}_2\text{O}_2$)	chloroform:alkohol izoamylowy (24:1)
		chlorowodorek hydroksylaminy ($\text{NH}_3\text{O}\cdot\text{HCl}$)	APS ($\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_8\text{S}_2$)
2.	Bio Shop	37% formaldehyd (CH_2O)	wodorofosforan sodu ($\text{HNa}_2\text{O}_4\text{P}$)
		chlorek potasu (KCl)	dwuwodorofosforan sodu ($\text{H}_2\text{NaO}_4\text{P}$)
		BSA (albumina serum bydlęcego)	kwaz borowy (BH_3O_3)
		0,5M EDTA pH 8,0 ($\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_8$)	glicerol ($\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$)
		chlorek magnezu (MgCl_2)	octan magnezu ($\text{C}_4\text{H}_6\text{MgO}_4$)
		chlorek sodu (NaCl)	octan sodu ($\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$)
		glicyna ($\text{C}_2\text{H}_5\text{NO}_2$)	wodorotlenek sodu (NaOH)
		SDS ($\text{C}_{12}\text{H}_{24}\text{SNaO}_4$)	bicyna ($\text{C}_6\text{H}_{13}\text{NO}_4$)
		siarczan amonu ($\text{H}_8\text{N}_4\text{O}_4\text{S}$)	kwaz bursztynowy ($\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_4$)
		octan potasu ($\text{C}_2\text{H}_3\text{KO}_2$)	azydek sodu (N_3Na)
3.	Fluka	13,4M β -mercaptoetanol ($\text{C}_2\text{H}_6\text{OS}$)	spermina ($\text{C}_{10}\text{H}_{26}\text{N}_4$)
		TCA ($\text{C}_2\text{Cl}_3\text{NaO}_2$)	TEMED ($\text{C}_6\text{H}_{16}\text{N}_2$)

L.p.	Producent	Nazwa odczynnika lub materiału
4.	Boehringer MannheimGmbH	Salmon sperm DNA (sonicated) – DNA ze spermy śledzia (sonikowane)
		BD-celuloza (C ₂₀ H ₂₃ NO ₅)
5.	Polmos	alkohol etylowy (C ₂ H ₅ OH)
6.	Invitrogen	octan sodu pH 5,2 (C ₂ H ₃ NaO ₂)
		SYBR® Safe DNA gel stain – czynnik wiążący się do kwasów nukleinowych i umożliwiający ich detekcję w rozdziale elektroforetycznym
7.	Ambion	woda wolna od nukleaz (H ₂ O)
		SlideHyb #3 Buffer
		SSC Buffer
8.	Celbiochem	miracloth
9.	Whatmann	sączki z włókna szklanego
10	Merck	płytki z celulozą do TLC
11.	Sartorius	sączki z nitrocelulozy
12.	GE Healthcare	barwnik fluorescencyjny Cy3
		barwnik fluorescencyjny Cy5
13.	Thermo Scientific	GeneRuler 50 bp DNA Ladder – marker wielkości DNA
		GeneRuler 100 bp DNA Ladder – marker wielkości DNA
		RiboRuler Low Range RNA Ladder – marker wielkości RNA
14.	POCH	kwasy octowe (C ₂ H ₄ O ₂)
		kwasy solne (HCl)
		chlorek wapnia (CaCl ₂)
		toluen (C ₇ H ₈)
		woda amoniakalna (NH ₅ O)
		n-propanol (C ₃ H ₈ O)
15.	University of Arizona	mikromacierze z sondami specyficznymi dla <i>Zea mays</i>

5.2.2. Enzymy

Tabela 2. Wykorzystywane w pracy enzymy.

L.p.	Nazwa enzymu	Stężenie/aktywność	Producent
1.	polimeraza Taq	5 U/μl	Fermentas
2.	proteinaza K	20 mg/ml	A&A Bioch
3.	RNaza A	10 U/μl	Fermentas
4.	nukleaza z <i>Micrococcus</i>	1 U/μl	Sigma Aldrich
5.	fosfodiesteraza II ze śledziony	0,1 U/μl	Sigma Aldrich
6.	kinaza polinukleotydowa T4	30 U/μl	USB

L.p.	Nazwa enzymu	Stężenie/aktywność	Producent
7.	apyraza	0,5 U/ μ l	Sigma Aldrich
8.	nukleaza P1	1 mg/ml	Sigma Aldrich
9.	Hind III	10 U/ μ l	Fermentas

5.2.3. Przeciwciała

Tabela 3. Wykorzystywane w pracy przeciwciała.

L.p.	Nazwa przeciwciała	Producent
1.	Mouse monoclonal to Histone H3 tri metyl K4 (przeciwciało monoklonalne przeciw trimetylowanej lizynie 4. białka histonowego 3)	Abcam
2.	Rabbit polyclonal to Histone H3 acetyl K9 (przeciwciało poliklonalne przeciw acetylowanej lizynie 9. białka histonowego 3)	Abcam
3.	Rabbit polyclonal to Histone H3 (przeciwciało poliklonalne przeciw białku histonowemu 3)	Abcam

5.2.4. Izotopy

Tabela 4. Wykorzystywane w pracy izotopy.

L.p.	Nazwa izotopu	Specyficzna aktywność	Producent
1.	ATP	6000 Ci/mmol	ICN
2.	L-(2,4-3H) fenyloalanina	55 Ci/mmol	ICN

5.2.5. Oligonukleotydy

Tabela 5. Wykorzystywane w pracy oligonukleotydy.

L.p.	Nazwa oligonukleotydu	Sekwencja oligonukleotydu	Producent
1.	Tub α 1_F	CATCAACTACCAGCCTCCTAGC	Genomed
2.	Tub α 1_R	AGAGAACTCACCTTCCTCCATACC	Genomed
3.	AGLP_F	CGCTCACTACGCGACCGCT	Genomed
4.	AGLP_R	GCGCCTCGCCATTGGGGATT	Genomed
5.	SCP_F	GCCCAGCTACCAGCCGAAGC	Genomed
6.	SCP_R	GCGTGCTGCTTCCAAACGCT	Genomed
7.	IMP_F	GGAGTACCCTCCCTGGGCCAC	Genomed
8.	IMP_R	TCGAGCGCGGTGATGACGAC	Genomed
9.	PRP_F	GCGTGCCTCCTAGCTCTGGC	Genomed

L.p.	Nazwa oligonukleotydu	Sekwencja oligonukleotydu	Producent
10.	PRP_R	GCGTTGTGCGGGTCCACGTA	Genomed
11.	RLK_F	AAGGCTTGTGATTGCCGTGT	Genomed
12.	RLK_R	GTTTCGTATGCACCTTCCACG	Genomed
13.	HPS_F	GTAACCTGATCGTGCAGCCT	Genomed
14.	HPS_R	TGGCCCTTTGCATGACTTGA	Genomed
15.	WIPI_F	AGCAAGGCCATCGACATCAA	Genomed
16.	WIPI_R	CCTGAACTTGTGTTGCCCG	Genomed
17.	UP2_F	ATGCTTCCCTTGCCCAGTT	Genomed
18.	UP2_R	GCAGCTTTTGCTGCTTTGTAATC	Genomed
19.	NA2_F	TTGAGTTCACAACCCCGAT	Genomed
20.	NA2_R	TCCTGTTTGCCTAGGGAGC	Genomed
21.	NA4_F	TTGTTGCCCATGATCACGC	Genomed
22.	NA4_R	ACTGGTTCCTTCATGCCAG	Genomed
23.	AGLP_1_F	GAAAYATGGATYYGAAAAATGGAATAG	Genomed
24.	AGLP_1_R	TCCTRCTCCCTCAARTRATCC	Genomed
25.	AGLP_2_F	TAGGATYAYTTGAGGGAGYAGGA	Genomed
26.	AGLP_2_R	CACCATRACCTTRATCTCTATRACAC	Genomed
27.	AGLP_3_F	GTGYATAGAGATYAAGGTYATGGTG	Genomed
28.	AGLP_3_R	CTCTRRATATRCCTCACCTGTCACA	Genomed
29.	AGLP_4_F	TGTGAYAGGTGAGGYATATYYAG	Genomed
30.	AGLP_4_R	CTTCACTCRRRATTCACCAAARC	Genomed
31.	AGLP_5_F	GATAAYTYTGTYTGGTTAGTGAAYG	Genomed
32.	AGLP_5_R	RCTCCATCACCTTCRRCTR	Genomed
33.	AGLP_6_F	YGGAYYYGGTGGAGTAGTAG	Genomed
34.	AGLP_6_R	CRARATCCTTRCCCRAACAAAAACC	Genomed

5.2.6. Zestawy komercyjne

Tabela 6. Wykorzystywane w pracy zestawy odczynników.

L.p.	Nazwa zestawu komercyjnego	Producent
1.	RNAqueus™	Ambion
2.	TURBO DNA-free™	Ambion
3.	Agilent RNA 6000 Nano	Agilent
4.	SuperScript™ Indirect cDNA Labeling System	Invitrogen
5.	MiniElute® Reaction Cleanup Kit	Qiagen
6.	RevertAid First Stand cDNA Synthesis Kit	Fermentas
7.	SG qPCR Master Mix	EURX

L.p.	Nazwa zestawu komercyjnego	Producent
8.	Genomie Mini	A&A Bioch
9.	PCR Purification Kit	Qiagen
10.	EpiTech® Bisulfite	Qiagen

5.2.7. Bufory i roztwory

Tabela 7. Wykorzystywane w pracy bufory i roztwory.

L.p.	Nazwa buforu lub roztworu	Skład
1.	Bufor TB 1x, pH 8,0	10,8% w/v trisHCl 5,5% w/v kwas borowy
2.	Roztwór do nakładania próbek na żele agarozowe i poliakrylamidowe	0,05% w/v bromofenol 0,05% w/v ksylencjanol 0,05% w/v pomarańcz G 30% v/v glicerol
3.	2x Bufor bursztynianowy, pH 6,3	4 mM bursztynian sodu, pH 6,3 20 mM CaCl ₂
4.	10x Bufor bicynowy, pH 9,7	100 mM bicyna 100 mM CaCl ₂ 100 mM DTT 10 mM spermina
5.	I Faza do rozdzielania DNA metodą TLC	78,6% v/v kwas izomasłowy 0,3% v/v woda amoniakalna
6.	II Faza do rozdzielania DNA i RNA metodą TLC	0,1 M bufor fosforanowy, pH 6,8 60% w/v (NH ₄) ₂ SO ₄ 2% v/v n-propanol
7.	10x Buffer B, pH 7,5 w 37°C	100 mM trisHCl, pH 7,5 w 37°C 100 mM MgCl ₂ 1 mg/ml BSA
8.	Bufor do izolacji A	10 mM trisHCl, pH 8,0 400 mM sacharoza 10 mM maślan sodu 3,7% w/v formaldehyd 0,1 mM PMSF 5 mM β-merkaptotanol

L.p.	Nazwa buforu lub roztworu	Skład
9.	Bufor do izolacji B	10 mM trisHCl, pH 8,0 400 mM sacharoza 10 mM maślan sodu 0,1 mM PMSF 5 mM β-merkaptioetanol 1 μg/ml inhibitor proteinaz
10.	Bufor do izolacji C	10 mM trisHCl pH, 8,0 250 mM sacharoza 10 mM maślan sodu 10 mM MgCl ₂ 1% v/v triton X-100 0,1 mM PMSF 5 mM β-merkaptioetanol 1 μg/ml inhibitor proteinaz
11.	Bufor do izolacji D	10 mM trisHCl, pH 8,0 1,7 M sacharoza 10 mM maślan sodu 2 mM MgCl ₂ 0,15% v/v triton X-100 0,1 mM PMSF 5 mM β-merkaptioetanol 1 μg/ml inhibitor proteinaz
12.	Bufor do lizy jąder komórkowych	50 mM trisHCl, pH 8,0 10 mM EDTA 0,4% w/v SDS 0,1 mM PMSF 1 μg/ml inhibitor proteinaz
13.	Bufor do inkubacji Ab ChIP	50 mM trisHCl, pH 8,0 1 mM EDTA 0,1% v/v triton X-100 150 mM NaCl 10 μg/ml BSA
14.	Bufor o niskim stężeniu soli	20 mM trisHCl, pH 8,0 2 mM EDTA 0,1% w/v SDS 1% v/v triton X-100 150 mM NaCl

L.p.	Nazwa buforu lub roztworu	Skład
15.	Bufor o wysokim stężeniu soli	20 mM trisHCl, pH 8,0 2 mM EDTA 0,1% w/v SDS 1% v/v triton X-100 500 mM NaCl
16.	Bufor LiCl	20 mM trisHCl, pH 8,0 1 mM EDTA 1% v/v NP-40 1% w/v deoksychołan sodu 250 mM NaCl
17.	Bufor TE	10 mM trisHCl, pH 8,0 1 mM EDTA
18.	Bufor elucyjny ChIP	1% w/v SDS 0,1 M wodorowęglan sodu
19.	Żel poliakrylamidowy 8%	7,6% w/v akrylamid 0,4% w/v bis-akrylamid 10,8% w/v trisHCl 5,5% w/v kwas borowy 0,2% v/v APS 0,03% v/v TEMED
20.	I Faza do rozdzielania RNA metodą TLC	62,5% v/v kwas izomasłowy 0,35% v/v woda amoniakalna
21.	II HCl faza do rozdzielania RNA metodą TLC	70% v/v n-propanol 5% v/v HCl
22.	Bufor do ekstrakcji tRNA	100 mM trisHCl, pH 7,5 100 mM NaCl 10 mM MgCl ₂ 0,1% v/v SDS 2 mM EDTA 5 mM β-merkaptioetanol
23.	Bufor do oczyszczania tRNA na kolumnie z BD-celulozy I	350 mM NaCl 10 mM octan sodu, pH 4,5 10 mM MgCl ₂
24.	Bufor do oczyszczania tRNA na kolumnie z BD-celulozy II	1 M NaCl 10 mM octan sodu, pH 4,5 10 mM MgCl ₂

L.p.	Nazwa buforu lub roztworu	Skład
25.	Bufor do oczyszczania tRNA na kolumnie z BD-celulozy III	1,5 M NaCl 10 mM octan sodu, pH 4,5 10 mM MgCl ₂ 15% v/v C ₂ H ₅ OH
26.	Bufor do izolacji rybosomów	50 mM trisHCl, pH 7,5 50 mM KCl 5 mM MgCl ₂ 2,5 mM β-merkaptioetanol
27.	Bufor do izolacji rybosomów (poduszka sacharozowa)	50 mM trisHCl, pH 7,5 100 mM KCl 5 mM MgCl ₂ 2,5 mM β-merkaptioetanol 17,5% w/v sacharoza
28.	Bufor do przechowywania rybosomów	50 mM trisHCl, pH 7,5 50 mM KCl 5 mM MgCl ₂ 1 mM DTT 50% v/v glicerol
29.	Bufor do izolacji frakcji enzymatycznej S100	50 mM trisHCl, pH 7,5 10 mM KCl 1 mM MgCl ₂ 5 mM β-merkaptioetanol 10% v/v glicerol
30.	Bufor do reakcji aminoacylacji	100 mM trisHCl, pH 7,5 10 mM MgCl ₂ 4 mM β-merkaptioetanol 4 mM ATP
31.	Bufor A do reakcji wiązania aa-tRNA do rybosomu	50 mM trisHCl, pH 7,5 70 mM KCl 5 mM MgCl ₂ 3 mM DTT
32.	Bufor B do reakcji wiązania aa-tRNA do rybosomu	1 mM GTP, pH 7,5 5 μg poliU 6000 dpm [3H]uug aa-tRNA
33.	Bufor płuczący do reakcji wiązania aa-tRNA do rybosomu	10 mM trisHCl, pH 7,5 80 mM KCl 10 mM MgCl ₂

L.p.	Nazwa buforu lub roztworu	Skład
34.	Scyntylator toluenowy	99,5% toluen 0,4% w/v PPO 0.02% w/v POPOP

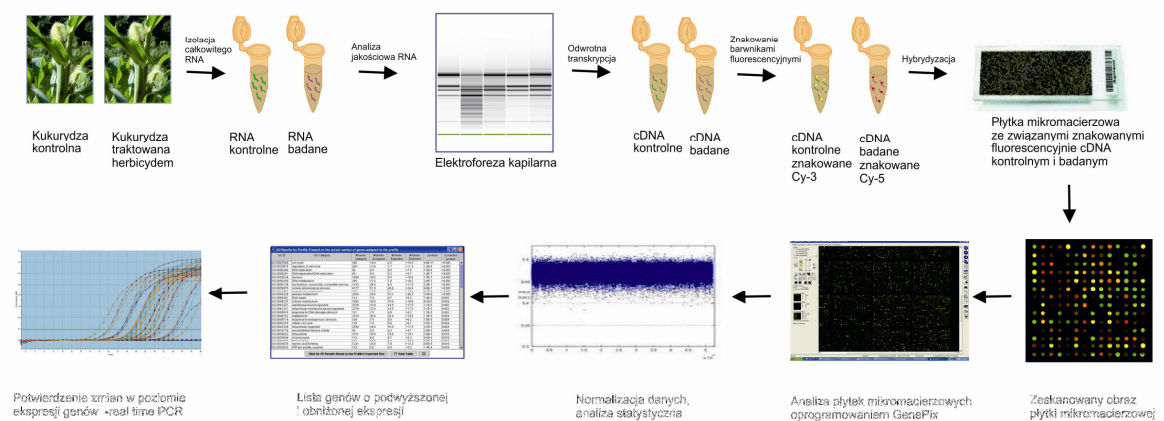
5.2.8. Wykorzystane bazy danych

Tabela 8. Wykorzystywane w pracy bazy danych.

L.p.	Nazwa bazy danych
1.	Plants For A Future
2.	The PLANTS Database
3.	PlantGDB
4.	MaizeSequence
5.	European Nucleotide Archive

5.3. Analiza ekspresji genów z wykorzystaniem mikromacierzy oligonukleotydowych

W celu oznaczenia zmian w poziomie ekspresji genów w odpowiedzi na stres herbicydowy wykorzystałam technikę mikromacierzy oligonukleotydowych z sondami specyficznymi dla kukurydzy zwyczajnej.



Rysunek 20. Schemat analizy zmian w poziomie ekspresji genów w odpowiedzi na warunki stresowe.

5.3.1. Izolacja całkowitego RNA

W celu uzyskania z liści kukurydzy całkowitego RNA, o wysokiej jakości i czystości, przeprowadziłam izolację z wykorzystaniem komercyjnie dostępnego zestawu RNAqueus™ i odczynnika Plant Isolation Aid zgodnie z zaleceniami producenta z modyfikacjami.

- 150 mg zhomogenizowanych liści dokładnie roztarłam z ciekłym azotem w moździerzu;
- dodałam 1 ml buforu Lysis/Binding Solution i ponownie zhomogenizowałam;
- zawiesinę przenieśliam do probówki na 1,5 ml i wirowałam przez 3 min., 13 000 g, temperatura pokojowa;
- zmierzyłam objętość klarownego supernatantu i przenieśliam do nowej probówki na 2 ml;
- dodałam jedną objętość 64% etanolu i delikatnie zmieszałam;
- roztwór w porcjach po 650 µl przenosiłam na kolumnę z filtrem umieszczoną w probówce o objętości 1,5 ml i wirowałam 30 s, 13 000 g, temperatura pokojowa;
- przesącz usuwałam i czynność powtarzałam z kolejnymi porcjami supernatant;
- przesącz usuwałam, a na kolumnę nakładałam 700 µl Wash Solution #1, wirowałam 30 s, 13 000 g, temperatura pokojowa;
- przesącz usuwałam i na kolumnę nakładałam 500 µl Wash Solution #2, wirowałam 30 s, 13 000 g, temperatura pokojowa;
- czynność powtarzałam;
- kolumnę umieszczałam w czystej probówce na 1,5 ml i wirowałam 1 min., 13 000 g, temperatura pokojowa;
- na kolumnę nakładałam 50 µl Elution Solution o temperaturze 75°C i inkubowałam przez 5 min. w temperaturze pokojowej;
- wirowałam 1 min., 13 000 g, temperatura pokojowa;
- na kolumnę nakładałam 40 µl Elution Solution o temperaturze 75°C i wirowałam 1 min., 13 000 g, temperatura pokojowa;
- uzyskany przesącz poddawałam ocenie ilościowej i jakościowej z wykorzystaniem analizy spektrofotometrycznej przy długości fali $\lambda = 260$ nm i obliczałam stężenie RNA.

5.3.2. Analiza ilościowa i jakościowa całkowitego RNA

W celu oceny ilości i jakości uzyskanego w procesie izolacji całkowitego RNA przeprowadziłam jego pomiar spektrofotometryczny przy użyciu spektrofotometru typu Nano Drop 2000c przy długości fali $\lambda = 260$ nm i obliczałam stężenie RNA wg przelicznika dla ssRNA: 1 OD/ml = 40 μ g/ml. Wstępnej oceny jakościowej dokonywałam na podstawie oceny wyglądu krzywej zależności absorbancji od długości fali w spektrum λ : 190-840 nm.

W celu dokładnego oznaczenia jakości uzyskanego całkowitego RNA przeprowadzałam elektroforezę kapilarną RNA z wykorzystaniem aparatu Agilent 2100 Bioanalyzer i zestawu komercyjnego Agilent RNA 6000 Nano oraz oprogramowania do analizy próbek roślinnych Plant RNA Nano. Poszczególne roztwory wyizolowanego RNA nakładałam do wcześniej przygotowanych, zgodnie z protokołem producenta, studzienek znajdujących się na płytce elektroforetycznej. Przez czas 30 min. prowadziłam rozdział elektroforetyczny, a następnie analizowałam uzyskany obraz rozdziału i określony przez aparat współczynnik RIN (*ang. RNA Integrity Number*).

5.3.3. Trawienie całkowitego RNA DNazą

Stosowałam trawienie pozostałości DNA w wyizolowanym całkowitym RNA aby uzyskać preparat wysokiej czystości z wykorzystaniem komercyjnego zestawu TURBO DNA - free™ zgodnie z procedurą załączoną przez producenta z modyfikacjami:

- Sporządziłam mieszaninę reakcyjną, zmieszałam składniki i inkubowałam zgodnie z tabelą;

Tabela 9. Skład mieszaniny reakcyjnej do trawienia RNA z wykorzystaniem DNazy.

Składniki	Ilości	Warunki
Całkowity RNA	20 μ g	37°C, 30 min.
10x Turbo DNase Buffer	5 μ l	
H ₂ O wolna od nukleaz	do 50 μ l	

- dodałam 7,5 μ l DNase Inactivation Reagent i intensywnie wytrząsałam przez 5 min., 1000 rpm, temperatura pokojowa;
- następnie wirowałam 2 min., 13 000 g, temperatura pokojowa;

- zebrałam supernatant i dodałam 1/10 objętości octanu sodu oraz trzy objętości 96% etanolu, zmieszałam;
- strącanie RNA etanolem prowadziłam przez 16 h, -80°C;
- wirowałam 30 min., 18 000 g, 4°C;
- osad przemywałam 75% zimnym etanolem i wirowałam 5 min., 18 000 g, temperatura pokojowa;
- osad dokładnie osuszyłam i rozpuściłam w 20 µl wody wolnej od nukleaz;
- uzyskany roztwór całkowitego RNA poddawałam opisanej w punkcie 5.3.2 analizie ilościowej i jakościowej.

5.3.4. Odwrotna transkrypcja

W celu przepisania RNA na cDNA przeprowadziłam reakcję odwrotnej transkrypcji z wykorzystaniem zestawu komercyjnego SuperScript™ Indirect cDNA Labeling System i postępowałam zgodnie z procedurą producenta z modyfikacjami:

- Sporządziłam mieszaninę reakcyjną, zmieszałam składniki i inkubowałam zgodnie z tabelą;

Tabela 10. Skład mieszaniny reakcyjnej do odwrotnej transkrypcji.

Nr etapu	Składniki	Ilości	Warunki
Etap I	Anchored Oligo dT20 [2,5 µg/µl]	2 µl	70°C, 2 min.; 70°C, 2 min.
	H ₂ O wolna od nukleaz	do 18 µl	
Etap II	5x First Stand Buffer	6 µl	46°C, 2 h
	DTT [0,1 M]	1,5 µl	
	RNaseOUT [40 U/µl]	1 µl	
	SuperScript III RT [400 U/µl]	1 µl	
Etap III	SuperScript III RT [400 U/µl]	1 µl	46°C, 2 h
Etap IV	NaOH [1 N]	15 µl	70°C, 20 min.
Etap IV	HCl [1 M]	15 µl	zmieszać

- dodałam 40 µl wody wolnej od nukleaz, 1/10 objętości 3 M octanu sodu pH 5,2 oraz trzy objętości 96% etanolu, zmieszałam;
- strącanie cDNA w etanolu prowadziłam przez 16 h, -20°C;
- wirowałam 30 min., 18 000 g, 4°C;

- osad przemywałam 75% etanolem i wirowałam 5 min., 18 000 g, temperatura pokojowa;
- osad dokładnie osuszyłam i rozpuściłam w 4,5 µl Coupling Buffer;
- uzyskany roztwór całkowitego cDNA poddawałam analizie ilościowej przy użyciu spektrofotometru typu Nano Drop 2000c przy długości fali $\lambda = 260$ nm i obliczałam stężenie cDNA wg przelicznika dla ssDNA: 1 OD/ml = 33 µg/ml.

5.3.5. Znakowanie barwnikami fluorescencyjnymi cDNA

W celu oznaczenia cDNA wyizolowanego z linii kontrolnej i badanej kukurydzy przeprowadziłam znakowanie barwnikami fluorescencyjnymi. Próbkę cDNA uzyskanego z linii kontrolnej kukurydzy znakowałam barwnikiem Cy3, a próbkę uzyskaną z rośliny poddawanej warunkom stresowym barwnikiem Cy5. W celu oczyszczenia wyznakowanego cDNA wykorzystałam zestaw komercyjny MiniElute® Reaction Cleanup Kit.

Znakowanie fluorescencyjne wykonywano zgodnie z procedurą:

- próbkę rozpuszczoną w Coupling Buffer inkubowałam 10 min., 37°C;
- dodałam 4,5 µl barwnika fluorescencyjnego (Cy3 lub Cy5) rozpuszczonego w DMSO [1000 pM/µl] i inkubowałam 3 h, 37°C przy ciągłym mieszaniu 500 rpm;
- do mieszaniny dodałam 6 µl 4 M chlorowodoru hydroksylaminy, inkubowałam 15 min., 37°C przy ciągłym mieszaniu 500 rpm;
- dodałam 1,16 µl octanu sodu i 500 µl buforu PB, zmieszałam i nałożyłam na kolumnę do oczyszczania;
- wirowałam 1 min., 13 000 g, temperatura pokojowa, przesącz odrzuciłam;
- na kolumnę nałożyłam 700 µl buforu PE;
- wirowałam 1 min., 13 000 g, temperatura pokojowa, przesącz odrzuciłam;
- na kolumnę nałożyłam 20 µl buforu EB o temperaturze 50°C;
- wirowałam 1 min., 13 000 g, temperatura pokojowa;
- na kolumnę ponownie nałożyłam 20 µl buforu EB o temperaturze 50°C;
- wirowałam 1 min., 13 000 g, temperatura pokojowa;
- przesącze połączyłam, zmieszałam i poddawałam analizie ilościowej przy użyciu spektrofotometru typu Nano Drop 2000c przy długości fali $\lambda = 260$ nm

i obliczałam stężenie cDNA wg przelicznika dla cDNA: 1 OD/ml = 37 μ g/ml oraz przy długości fali emisji $\lambda = 550$ nm i $\lambda = 650$ nm, odpowiednio dla Cy3 i Cy5.

5.3.6. Hybrydyzacja do płytek mikromacierzowych

W celu oznaczenia zmian w poziomie ekspresji genów dla linii kontrolnej i badanej kukurydzy przeprowadziłam hybrydyzację wyznakowanego barwnikami cDNA do płytek mikromacierzowych z sondami specyficznymi dla *Zea mays*.

Postępowano zgodnie z protokołem:

- rehydratowano DNA poprzez umieszczenie mikromacierzy nad łaźnią z czystą wodą o temp. 50°C;
- następnie wysuszono szkiełko poprzez ułożenie na 5 s na metalowej płytce w bloku grzejnym o temperaturze 45°C;
- sondy z podłożem związano w „fotoczyszczaku UV”, światłem o energii 180 mJ;
- następnie szkiełka mikromacierzowe moczo w roztworze 1% SDS, 5 min., temperatura pokojowa;
- każde szkiełko zanurzano 10 razy w wodzie destylowanej;
- następnie zanurzano szkiełka 5 razy w 96% etanolu, po czym zostawiano zanurzone w etanolu przez 3 min.;
- każde szkiełko wirowano przez 5 s w wirówce do mikromacierzy Microarray High Speed Centrifuge;
- wyznakowany cDNA zawieszano w buforze do elucji i łączono parami (próbka kontrolna z badaną), a następnie suszono na SpeedVac do całkowitego odparowania buforu;
- zawieszono próby cDNA w 10 μ l 10 mM EDTA;
- denaturowano przygotowane próbki w 95°C przez 5 min.;
- następnie dodawano do każdej próbki 115 μ l buforu SlideHyb buffer #3, o temperaturze 68°C;
- mikromacierze umieszczono w komorach hybrydyzacyjnych sondami do góry i włożono do hybrydyzatora HybArray 12 ;
- podano po 115 μ l odpowiedniej próbki w buforze hybrydyzacyjnym do wskazanych komór;
- prowadzono program hybrydyzacji zgodnie z tabelą:

Tabela 11. Przebieg procesu hybrydyzacji wyznakowanego cDNA do sond na płytce mikromacierzowej.

Nr etapu	Nazwa etapu procesu (w j. ang.)	Ilość cykli	Warunki
Etap I	Set Slide Temperature	1	70°C, 2 min.
Etap II	Introduce Probe	1	42°C
Etap III	Set Slide Temperature	1	42°C, mieszanie
Etap IV	Wash Slides	5	42°C, 20 s przepływu
			42°C, 40 s przerwa
Etap V	Wash Slides	5	30°C, 20 s przepływu
			42°C, 40 s przerwa
Etap VI	Wash Slides	5	25°C, 20 s przepływu
			25°C, 40 s przerwa

- po zakończeniu programu hybrydyzacji każdą płytkę mikromacierzową zanurzano 6 razy w buforze 0,05x SSC;
- wirowano 5 s w wirówce do mikromacierzy Microarray High Speed Centrifuge;
- zeskanowano płytki mikromacierzowe z rozdzielczością 5 μm z użyciem skanera ScanArray Express scanner PerkinElmer przy 100% intensywności lasera.

5.3.7. Analiza bioinformatyczna i statystyczna

Przeprowadziłam analizę mikromacierzy z wykorzystaniem oprogramowania GenePix 6,1 firmy Molecular Devices przy użyciu metody odejmowanie tła „morphological opening background subtraction”. Punkty z wartością przesycenia wyższą niż 10% w obu kanałach, zanieczyszczone lub uszkodzone oznaczałam ręcznie jako „-100”. Punkty wewnętrznych kontroli i „spików” oznaczałam jako „-50”. Następnie analizę statystyczną wykonywano posługując się oprogramowaniem R i Biodonductor przy użyciu zestawu limma (Smyth i in. 2003; Smyth 2004; Ritchie i in. 2007). Intensywność tła i punktów była szczytywana z wykorzystaniem funkcji „genepix.custom”. Po odjęciu tła i zastosowaniu normalizacji typu „printtip-loess” podjęto skalowanie wartości MAD (median-absolute-deviation)

w obrębie macierzy aby miały tę samą wartość oraz dopasowano model liniowy w celu wychwycenia różnic w ekspresji. Różnice w poziomie ekspresji oceniane były z użyciem umiarkowanej t-statystyki oraz korygowane przez wielokrotne testowanie FDR (Benjamini i in. 1995). Jako punkt odcięcia przyjęto wartość p równą 0,1.

5.4. Analiza ekspresji genów z wykorzystaniem techniki real time PCR

5.4.1. Odwrotna transkrypcja, otrzymywanie cDNA do reakcji real time PCR

Reakcję odwrotnej transkrypcji przeprowadzałam z wykorzystaniem zestawu odczynników RevertAid First Stand cDNA Synthesis Kit firmy Fermentas zgodnie z opisem załączonym przez producenta. Skład mieszaniny reakcyjnej i poszczególne etapy reakcji przedstawiłam w tabeli 11. Matrycę stanowił całkowity RNA wyizolowany z liści opisany w pkt. 5.3.1.

Tabela 12. Skład mieszaniny reakcyjnej i warunki odwrotnej transkrypcji.

Nr etapu	Składniki	Ilości	Warunki
Etap I	Matryca (całkowity RNA)	1 µg	5 min., 70°C; 2 min., 0°C
	Random hexamer primer [0,2 ug/ul]	1 µl	
	H ₂ O wolna od nukleaz	do 12 µl	
Etap II	Reaction Buffer 5x	4 µl	5 min., 25°C
	RNAse Inhibitor RiboLock [20 U/µl]	1 µl	
	dNTP mix [10 mM]	2 µl	
Etap III	M-MuLV RT [200 U/µl]	1 µl	1 h, 42°C; 5 min., 70°C

Uzyskany w wyniku reakcji odwrotnej transkrypcji materiał cDNA wykorzystałam jako matrycę do łańcuchowej reakcji polimeryzacji (PCR).

5.4.2. PCR w gradiencie temperatur

W celu określenia czy zaprojektowana para starterów specyficznie wiąże się do danej matrycy DNA lub cDNA oraz aby określić poziom ekspresji danego genu przeprowadzałam łańcuchową reakcję polimeryzacji (PCR, *ang. polymerase chain reaction*). Łańcuchową reakcję polimeryzacji przeprowadzałam według protokołu producenta stosowanych odczynników - ogólny schemat podano w tabeli 13.

Tabela 13. Skład typowej reakcji PCR.

Składniki	Ilości
Matryca DNA lub cDNA	1-100 ng
dNTP mix [10 mM]	0,2 µl
MgCl ₂ [25 mM]	0,5 µl
Reaction Buffer 10x	1 µl
Starter komplementarny do końca 5' powielanego fragmentu [7,5 µM]	0,75 µl
Starter komplementarny do końca 3' powielanego fragmentu [7,5 µM]	0,75 µl
Polimeraza Taq [5U/µl]	1 µl
H ₂ O wolna od nukleaz	do 10 µl

Przygotowane wg powyżej opisanego schematu substraty reakcji PCR umieszczałam w termocyklerze w celu umożliwienia właściwego jej zajścia. W celu zoptymalizowania temperatury wiązania starterów do matrycy stosowałam gradient temperatury. Warunki prowadzenia reakcji PCR przedstawiałam poniżej.

Tabela 14. Ogólne warunki reakcji PCR.

Etap		Temperatura	Czas	Ilość powtórzeń
Etap I	Denaturacja	94°C	5 min.	1
	Wiązanie starterów	50-66°C	30 s	
	Wydłużanie łańcucha DNA	72°C	30 s	
Etap II	Denaturacja	94°C	30 s	40
	Wiązanie starterów	55°C/66°C	30 s	
	Wydłużanie łańcucha DNA	72°C	30 s	
Etap III	Synteza końcowa	72°C	5 min.	1

Produkty reakcji PCR poddawałam analizie metodą rozdziału elektroforetycznego w żelu agarozowym w celu zobrazowania specyficzności wiązania starterów do matrycy DNA i określenia poziomu ekspresji poszczególnych genów.

Ocenę ilości uzyskanego DNA dokonywałam przez pomiar UV przy długości fali $\lambda=260$ nm.

5.4.3. Analiza ilościowa i jakościowa całkowitego DNA

5.4.3.1. Analiza spektrofotometryczna DNA

W celu ocenienia ilości i jakości uzyskanego w procesie izolacji całkowitego DNA przeprowadziłam jego pomiar spektrofotometryczny przy użyciu spektrofotometru typu Nano Drop 2000c przy długości fali $\lambda = 260$ nm i obliczałam stężenie DNA wg przelicznika dla dsDNA: 1 OD/ml = 50 μ g/ml oraz ssDNA: 1 OD/ml = 30 μ g/ml.

5.4.3.2. Analiza DNA na żelu agarozowym

W celu dokładnego oznaczenia jakości uzyskanego DNA przeprowadzałam elektroforezę na żelu agarozowym (Ausubel i in. 1994). Całkowity DNA izolowany z tkanki liści lub produkty otrzymane metodą PCR analizowałam w 1,5 - 2% żelach agarozowych o wymiarach 15 cm x 15 cm i grubości 0.5 cm w buforze 1x TB w obecności SYBR® Safe DNA gel stain. Przed rozdziałem elektroforetycznym preparaty obciążałam 1/6 objętości buforu do nakładania próbek na żele agarozowe i poliakrylamidowe. Rozdział prowadziłam w buforze 1x TB przy natężeniu prądu 40-120 mA w temperaturze pokojowej w obecności markerów wielkości DNA. Obrazowania rozdziału elektroforetycznego dokonywałam z wykorzystaniem kamery UV Geldoc-It 310 Imaging System firmy UVP.

Tabela 15. Skład żeli agarozowych.

Składniki	1,5% żel agarozowy	2% żel agarozowy
agarozą	0,75 g	1 g
1x Bufor TB	50 ml	50 ml
SYBR® Safe DNA gel stain	0,1 μ l/ml	0,1 μ l/ml

5.4.4. Real time PCR

W celu określenia poziomu ekspresji danego genu przeprowadzałam reakcję łańcuchową polimeryzacji w czasie rzeczywistym (real time PCR, *ang. real time polymerase chain reaction*). Real time PCR przeprowadzałam z wykorzystaniem komercyjnego zestawu SG qPCR Master Mix, zgodnie z protokołem producenta wg opisu w tabeli.

Tabela 16. Skład typowej reakcji real time PCR.

Składniki	Ilości
Matryca DNA lub cDNA	1-500 ng
Master Mix 2x	10 µl
ROX [25 µM]	0,12 µl
Starter komplementarny do końca 5' powielanego fragmentu [7,5µM]	1,6 µl
Starter komplementarny do końca 3' powielanego fragmentu [7,5 µM]	1,6 µl
H ₂ O wolna od nukleaz	do 20 µl

Przygotowane wg powyżej opisanego schematu substraty reakcji real time PCR umieszczałam w termocyklerze Stratagene Mx3005P w celu właściwego umożliwienia jej zajścia i rejestracji przyrostu produktu reakcji w czasie rzeczywistym.

Tabela 17. Ogólne warunki reakcji PCR.

Etap		Temperatura	Czas	Ilość powtórzeń
Etap I	Denaturacja	94°C	5 min.	1
	Wiązanie starterów	60°C	30 s	
	Wydłużanie łańcucha DNA	72°C	30 s	
Etap II	Denaturacja	94°C	30 s	40
	Wiązanie starterów	60°C	30 s	
	Wydłużanie łańcucha DNA	72°C	30 s	
Etap III	Synteza końcowa	72°C	5 min.	1

Analiza w czasie rzeczywistym przyrostu produktów reakcji PCR rejestrowana była z użyciem programu komercyjnego Mx3005P v.4.10.

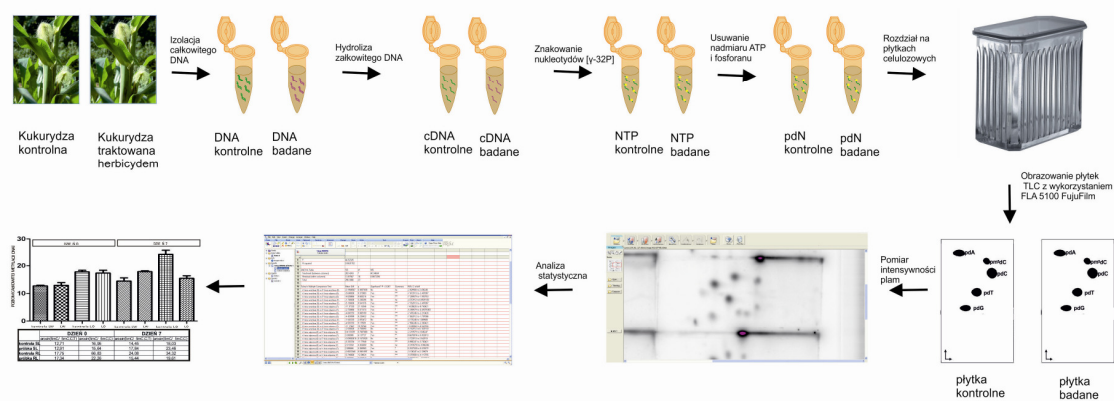
5.4.5. Analiza obliczeniowa i statystyczna wyników

Wyniki wszystkich analiz eksportowałam w postaci tabel do programu Excel pakietu Microsoft Office 2003, w którym dokonywałam operacje obliczeniowe. W celu dokonania analizy statystycznej dane liczbowe eksportowałam do programu Graph Prism Pro, a następnie oznaczałam istotność statystyczną wyników i przeprowadzałam

jednoczynnikową analizę wariancji ANOVA z wykorzystaniem testu Tukey’ a (Livak i in. 2001).

5.5. Analiza poziomu globalnej metylacji DNA

W celu oznaczenia zmian w poziomie globalnej metylacji cytozyny w DNA w odpowiedzi na warunki stresu herbicydowego wykorzystałam technikę cienkowarstwowej chromatografii cieczowej.



Rysunek 21. Schemat analizy zmian w poziomie globalnej metylacji cytozyny w odpowiedzi na warunki stresowe.

5.5.1. Izolacja całkowitego DNA

Genomowy DNA izolowałam z wykorzystaniem gotowego zestawu odczynników Genomic Mini zgodnie z protokołem producenta z modyfikacjami:

- 2 g liści homogenizowałam z 1,2 ml buforu Tris, 300 µl buforu LT;
- następnie dodawałam 40 µl proteinazy K [20mg/ml], 2 µl RNazy A [10U/ µl] i inkubowałam przez 1 h w 50°C, przy stałym mieszaniu 750 rpm;
- dodałam 600 µl buforu LT, zmieszałam;
- wirowałam 3 min., 13 000 g, temperatura pokojowa;
- supernatant przenieśliam do nowej probówki;
- 600 µl roztworu naniałem na kolumnę i wirowałam 1 min., 13 000 g, temperatura pokojowa;
- czynność powtórzyłam z kolejnymi porcjami, każdorazowo przesącz odrzuciłam;

- na kolumnę nałożyłam 500 µl bufor A1 i wirowałam 1 min., 13 000 g, temperatura pokojowa, przesącz odrzuciłam;
- na kolumnę nałożyłam 400 µl bufor A1 i wirowałam 1 min., 13 000 g, temperatura pokojowa, przesącz odrzuciłam;
- kolumnę przełożyłam do nowej probówki i nałożyłam 120 µl H₂O wolnej od nukleaz o temperaturze 50°C i wirowałam 2 min., 13 000 g, temperatura pokojowa;
- uzyskany przesącz zawierający DNA poddawałam analizie ilościowej i jakościowej spektrofotometrycznej przy długości fali $\lambda = 260$ nm i obliczałam stężenie DNA, a następnie rozdziałowi elektroforetycznemu w 1,5% żelu agarozowym.

5.5.2. Enzymatyczne trawienie DNA i znakowanie

Określenie poziomu zmetylowanej cytozyny polegało na poddaniu hydrolizie enzymatycznej wyizolowanego genomowego DNA, znakowaniu izotopowym nukleotydów i przebiegało według schematu przedstawionego w tabeli (Barciszewska i in. 2007).

Tabela 18. Etapy hydrolizy i znakowania DNA w celu analizy poziomu globalnej metylacji.

Nr etapu	Składniki	Ilości	Warunki
Etap I	nukleaza z <i>Micrococcus</i> [1U/µl]	0,07 µl	37°C, 6 h
	fosfodiesteraza II ze śledziona [0,5U/µl]	0,035 µl	
	2x bufor bursztynianowy, pH 6,3	1,75 µl	
	DNA	1 µg	
	H ₂ O wolna od nukleaz	do 3,5µl	
Etap II	roztwór z Etapu I	0,6 µl	37°C, 30 min.
	10x bufor bicynowy, pH 9,7	0,3 µl	
	ATP [1 mM]	0,45 µl	
	ATP [γ 32P]	0,02 µl	
	T4 PNK [30U/µl]	0,1 µl	
	H ₂ O wolna od nukleaz	do 3 µl	
Etap III	roztwór z Etapu II	3 µl	37°C, 30 min.
	1x bufor, pH 9,7	2 µl	
	apyraza [0,5 U/µl]	0,01 µl	

Nr etapu	Składniki	Ilości	Warunki
Etap IV	roztwór z Etapu III	6 μ l	37°C, 30 min.
	octan amonu, pH 4,5 [0,5 M]	1,4 μ l	
	nukleaza P1 [1mg/ml]	0,2 μ l	
	H ₂ O wolna od nukleaz	1,4 μ l	

W tabeli zawarto wykorzystywane w procesie trawienia DNA enzymy oraz pełnioną przez nie funkcję w celu przybliżenia roli poszczególnych etapów prowadzonej reakcji.

Tabela 19. Etapy hydrolizy i znakowania DNA w celu analizy poziomu globalnej metylacji – rola enzymów.

Nr etapu	Składniki	Rola enzymu
Etap I	nukleaza z <i>Micrococcus</i>	Hydroliza wiązania 5' fosforanowego
	fosfodiesteraza II ze śledziona	Hydroliza wiązania 5'fosforanowego
Etap II	T4 PNK	Znakowanie hydrolizatu; Fosforylacja grup 5'OH
Etap III	apyraza	Usuwanie nadmiaru [γ -32P]ATP; Hydroliza [γ -32P]ATP do ADP i Pi a następnie do AMP i Pii
Etap IV	nukleaza P1	Usuwanie 5'3'difosforanów nukleozydów; Hydroliza wiązania 3' fosforanowego

5.5.3. Rozdział dwukierunkowy TLC

Określenie poziomu globalnej metylacji DNA za pomocą chromatografii cienkowarstwowej (TLC, ang. *Thin Layer Chromatography*) polegało na rozdziale znakowanych radioizotopem fosforu [γ -32P] nukleotydu DNA na płytkach pokrytych celulozą w dwóch, prostopadłych kierunkach. Na płytkę nakładałam małymi porcjami po 0,8 μ l preparat zawierający nukleotydy otrzymane w wyniku strawienia 0,3 μ g DNA. Wysuszoną po nałożeniu preparatu płytkę umieszczałam w komorze chromatograficznej zawierającej pierwszą z faz ruchomych. Fazą pierwszego kierunku chromatografii była mieszanina „I Faza do rozdziału DNA metodą TLC”, a drugiego „II Faza do rozdziału DNA i RNA metodą TLC”. W pierwszym kierunku droga migracji fazy ruchomej wynosiła 40 cm (dwukrotny rozdział przez 16 h), natomiast w drugim 10 cm (rozdziel

przez 5,5 h). Po zakończeniu rozdziału płytki suszyłam w temperaturze 65°C przez 2 h. W zastosowanych warunkach rozdziału chromatograficznego cztery podstawowe fosforany 2'deoksyrybonukleozydów (G, A, C, T) ulegały wyraźnemu rozdziałowi, jednocześnie obserwowałam sygnał odpowiadający fosforanowi 5-metylo-2'deoksycytydyny (m⁵C). Intensywność radioaktywnych sygnałów odpowiadających poszczególnym nukleotydom oceniałam ilościowo przy pomocy aparatu do odwzorowania obrazów FLA- 5100 (FujiFilm). Naświetlanie ekranu do odwzorowania obrazu rozdziału prowadziłam przez 14 h. Otrzymany z pomocą aparatu FLA-5100 obraz opracowywałam ilościowo z wykorzystaniem programu MultiGauge V3.0.

5.5.4. Analiza obliczeniowa i statystyczna wyników

Wyniki wszystkich analiz uzyskane w programie MultiGauge V3.0 eksportowałam w postaci tabel do programu Excel pakietu Microsoft Office 2003, w którym dokonywałam operacje obliczeniowe.

Do ilościowej oceny m⁵C wykorzystałam produkty rozpadu m⁵C, dlatego w analizach uwzględniłam też ilościową zawartość C i T, a zawartość m⁵C obliczono według wzoru:

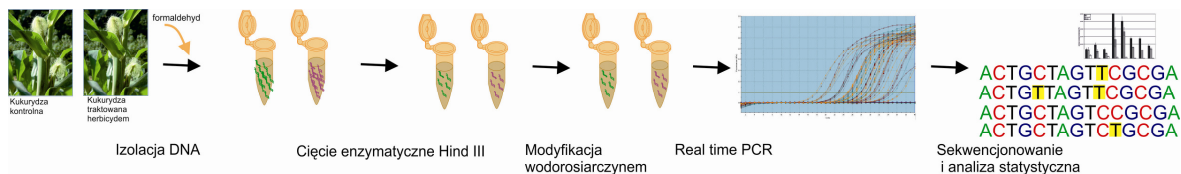
$$R = \frac{m^5C}{\Sigma (m^5C, C, T)} \times 100\%$$

gdzie m⁵C, C, T oznacza intensywność poszczególnych sygnałów odpowiadających analizowanym 2'deoksyrybonukleotydom.

W celu dokonania analizy statystycznej dane liczbowe eksportowałam do programu Graph Prism Pro, gdzie wykonałam transformację typu arcsin, a następnie oznaczenia istotności statystycznej wyników i analizy wariancji jednoczynnikowej ANOVA z wykorzystaniem testu Tukey'a.

5.6. Metoda badania miejsc metylacji w DNA z użyciem siarczanu (IV) sodu

W celu określenia miejsc, w których w obrębie sekwencji genu znajduje się zmetylowana cytozyna wykorzystałam metodę bisulfitową. Metoda opiera się o mechanizm reakcji chemicznej - w wyniku potraktowania wodorosiarczanem (IV) sodu DNA, cytozyny nie posiadające przyłączonej grupy metylowej ulegają przekształceniu do urydyn.



Rysunek 22. Schemat analizy zmian w poziomie metylacji cytozyny w DNA obrębie genu w odpowiedzi na warunki stresowe.

5.6.1. Modyfikacja DNA wodorosiarczanem (IV) sodu

W analizie wykorzystałam dostępny komercyjnie zestaw EpiTech® Bisulfite i postępowалаm zgodnie z protokołem producenta z modyfikacjami (Daxinger i in. 2009).

W pierwszym etapie przystąpiłam do enzymatycznego cięcia DNA z użyciem enzymu restrykcyjnego Hind III zgodnie z procedurą:

Tabela 20. Skład mieszaniny reakcyjnej cięcia enzymatycznego DNA.

Składniki	Ilości	Warunki
DNA	2,5 µg	37°C, 16h
10x Buffer B	10 µl	
Hind III [10U/µl]	2 µl	
H ₂ O wolna od nukleaz	do 100 µl	

Pocięty enzymatycznie DNA oczyściłam za pomocą zestawu komercyjnego PCR Purification Kit zgodnie z protokołem producenta. DNA eluowałam 20 µl wody wolnej od nukleaz i mierzyłam spektrofotometrycznie przy długości fali $\lambda=260$ nm. Następnie przygotowywałam mieszaninę reakcyjną do modyfikacji wodorosiarczanem (IV) sodu DNA zgodnie z tabelą 21.

Tabela 21. Skład mieszaniny reakcyjnej w metodzie z wodorosiarczanem (IV) sodu.

Składniki	Ilości	Warunki
DNA	0,5 µg	zmieszać
Bisulfite Mix	85 µl	
DNA Protect Buffer	35 µl	
H ₂ O wolna od nukleaz	do 140 µl	

Następnie mieszaninę reakcyjną umieszczalam w termocyklerze w celu przeprowadzenia reakcji zgodnie ze schematem:

Tabela 22. Warunki reakcji w metodzie z wodorosiarczanem (IV) sodu.

Etap	Temperatura	Czas	Ilość powtórzeń
Denaturacja	95°C	2 min.	1
Inkubacja	75°C	2 h	8
Denaturacja	95°C	1 min.	
Stopowanie	75°C	∞	1

Zmodyfikowany DNA oczyściłam za pomocą kolumn umieszczonych w zestawie Epithec Bisulfite sequencing Kit, a następnie mierzyłam ilość próbek spektrofotometrycznie przy długości fali 1 OD/ml = 33 µg/ml.

5.6.2. Reakcja PCR

W celu określenia czy zaprojektowana para zdegenerowanych starterów specyficznie wiąże się do danej matrycy DNA przeprowadzałam łańcuchową reakcję polimeryzacji. Reakcję PCR przeprowadzałam według protokołu zaproponowanego przez Tierlinga (Teierling i in. 2007) - ogólny schemat podano w tabeli 23.

Tabela 23. Skład reakcji PCR..

Składniki	Ilości
Matryca DNA	1-100 ng
dNTP mix [10 mM]	4 µl
MgCl ₂ [25 mM]	5 µl
Reaction Buffer 10x	5 µl
Starter komplementarny do końca 5' powielanego fragmentu [100 µM]	0,6 µl
Starter komplementarny do końca 3' powielanego fragmentu [100 µM]	0,6 µl
Polimeraza Taq [5U/µl]	0,6 µl
H ₂ O wolna od nukleaz	do 50 µl

Przygotowane wg powyżej opisanego schematu substraty reakcji PCR umieszczałam w termocyklerze w celu zapewnienia właściwych warunków temperaturowych. W celu zoptymalizowania temperatury wiązania starterów do matrycy stosowałam gradient temperatury. Warunki prowadzenia reakcji PCR przedstawiłam poniżej.

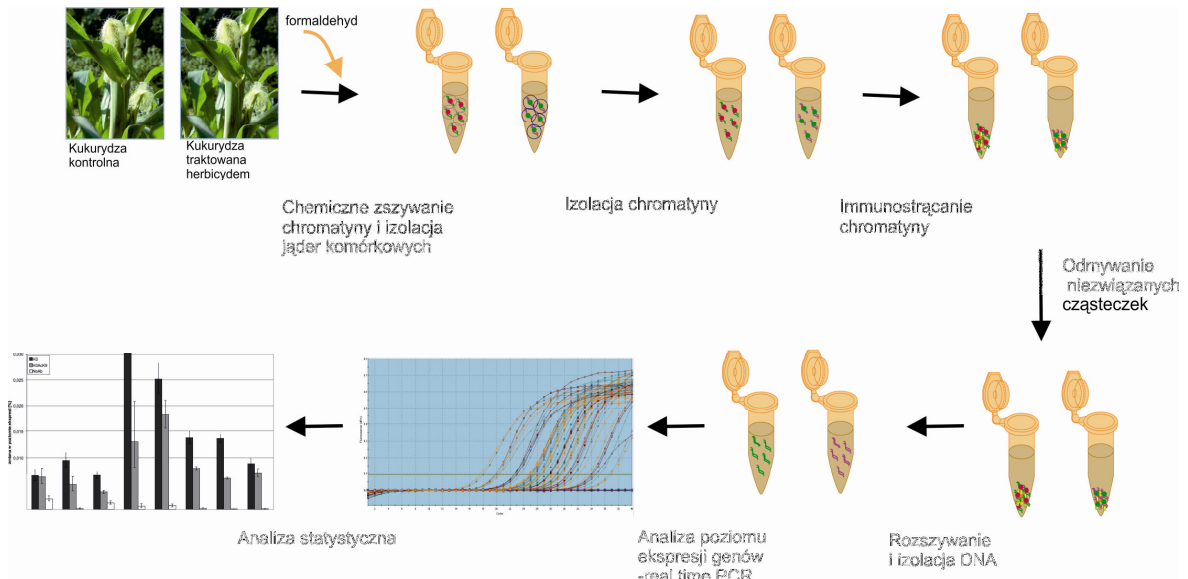
Tabela 24. Ogólne warunki reakcji PCR.

Etap		Temperatura	Czas	Ilość powtórzeń
Etap I	Denaturacja	97°C	5 min.	1
Etap II	Denaturacja	95°C	1 min.	40
	Wiązanie starterów	52°C/66°C	3 min.	
	Wydłużanie łańcucha DNA	72°C	3,5 min.	
Etap III	Synteza końcowa	72°C	10 min.	1
Etap IV	Stopowanie reakcji	8°C	∞	∞

Produkty reakcji PCR poddawałam analizie metodą rozdziału elektroforetycznego w 2% żelu agarozowym w celu zobrazowania specyficzności wiązania starterów do matrycy DNA.

5.7. Analiza modyfikacji epigenetycznych chromatyny w obrębie wybranych genów z wykorzystaniem techniki Chip – immunostrącanie chromatyny

W celu określenia zmian w poziomie modyfikacji epigenetycznych białek histonowych w obrębie poszczególnych genów, w odpowiedzi na stres herbicydowy posłużyłam się techniką ChIP (ChIP, *ang. Chromatin ImmunoPrecipitation*) (Haring i in. 2007).



Rysunek 23. Schemat analizy zmian w poziomie modyfikacji białek histonowych w obrębie genu w odpowiedzi na warunki stresowe.

5.7.1. Blokowanie białek Protein A Agarozy

- Pobrałam 1 ml komercyjnie dostępnej zawiesiny kulek agarozy zszytych z rekombinowanym białkiem A/G w formie 50% v/v zawiesiny;
- po tym jak kulki opadły usunęłam supernatant i przemyłam 1 ml buforem TE;
- ponownie poczekałam aż kulki opadną i zebrałam supernatant;
- czynność przemywania kulek agarozowych powtórzyłam jeszcze dwukrotnie;
- zawiesiłam kulki agarozowe w 1 ml buforu TE z BSA i DNA ze spermy śledzia o stężeniu 10 µg/ml każde;
- dodałam azydku sodu do końcowego stężenia 0,05% v/v i inkubowałam przez 16 h, 4°C, delikatnie mieszając (12 rpm);
- przechowywałam w 4°C.

5.7.2. Chemiczne zszywanie komponentów chromatyiny w materiale roślinnym

- 2 g materiału roślinnego (liście) umyłam z wykorzystaniem wody destylowanej;
- przeniosłam liście do probówek na 50 ml i dodałam 30 ml buforu do izolacji A i przykryłam gąbką tak, aby wszystkie liście były zanurzone;
- podłączyłam próżnię na 10 min., temperatura pokojowa;
- powoli zwalniałam próżnię, ciągle wytrząsając;

- usunęłam gąbkę i dodałam 2,5 ml 2 M glicyny dokładnie i delikatnie wymieszałam w celu zastopowania reakcji;
- podłączyłam próżnię na 5 min., temperatura pokojowa;
- powoli zwalniałam próżnię, ciągle wytrząsając;
- liście dokładnie, trzykrotnie przepłukałam na sitku z użyciem 0,5 l wody za każdym razem;
- liście dokładnie osuszyłam w ręczniku papierowym, a następnie umieściłam w probówce na 50 ml i szybko zamroziłam w ciekłym azocie;
- przechowywałam w -80°C .

5.7.3. Izolacja jąder komórkowych

- Liście zamrożone w -80°C zhomogenizowałam z użyciem piasku w moździerzu z ciekłym azotem;
- do zmrożonej probówki na 50 ml dodałam 30 ml (0°C) buforu do izolacji B i zhomogenizowany materiał roślinny;
- inkubowałam 15 min., 4°C , delikatnie mieszając;
- przefiltrowałam zawiesinę przez 4 warstwy Miracloth do nowej, zmrożonej probówki na 50 ml i wirowałam 20 min., 2 880 g, 4°C ;
- ostrożnie zdekantowałam, a osad ponownie zawiesiłam w 1 ml (0°C) buforu do izolacji C;
- przeniosłam zawiesinę do probówki na 1,5 ml i wirowałam 10 min., 12 000 g, 4°C ;
- zdekantowałam, a osad ponownie zawiesiłam w 300 μl (0°C) buforu do izolacji D;
- do nowej probówki na 2 ml dodałam 1500 μl (0°C) buforu do izolacji D i nałożyłam ostrożnie na jego powierzchnię powyżej opisaną zawiesinę;
- wirowałam 1 h, 16 000 g, 4°C .

5.7.4. Sonikacja chromatyny

- Zdekantowałam, po wirowaniu opisanym w poprzednim punkcie;
- osad zawiesiłam ponownie w 320 μl (0°C) buforu do lizy jąder komórkowych;
- pobierano 10 μl tej zawiesiny i przechowałam na lodzie, stanowi ona „nieokrojona” (*ang. unsheared*) chromatynę;

- pozostałą próbkę sonikowałam z wykorzystaniem sonikatora Sonics VibraCell VCX 130 na lodzie w pulsach po 15 s z amplitudą 40%, z przerwami na chłodzenie w lodzie po 30 s, 6 cykli, aby otrzymać fragmenty długości 500 - 1000 pz
- wirowałam 5 min., 16 000 g, 4°C w celu osadzenia nierozpuszczalnych fragmentów;
- przeniosłam supernatant do nowej probówki i pobrałam 10 µl w celu sprawdzenia wydajności sonikacji;
- do próbek „nieokrojonej” i „sonikowanej” chromatyny (10 µl każda) dodałam:
 - 140 µl TE
 - 5 µl 5 M NaCl
 - 5 µl 20% SDS
- następnie prowadziłam rozszywanie tych dwóch próbek 65°C, przez 16 h.

5.7.5. Oczyszczanie chromatyny

- Dodawałam kolejno do probówki na 2 ml na lodzie:
 - 300 µl chromatyny (uzyskanej w poprzednim etapie),
 - 1660 µl (0°C) buforu do inkubacji Ab ChIP,
 - 40 µl przepłukanych i blokowanych kulek Protein A Agarozy;
- z tak przygotowanego roztworu pobrałam 55 µl i przechowywałam na lodzie jako „próbkę wsadową” (*ang. input sample*);
- pozostałą chromatynę inkubowałam 1 h, 4°C, delikatnie mieszając (12 rpm).

5.7.6. Immunostrącanie

- Inkubowaną w poprzednim punkcie chromatynę wirowałam 1 min., 2 300 g, 4°C, w celu osadzenia kulek agarozowych;
- do 4 nowych probówek na 1,5 ml przeniosłam po 460 µl roztworu;
- jedna z nich stanowiła kontrolę „bez przeciwciała” (NoAb), pozostałe trzy służyły do strącania z przeciwciałem (IP);
- do każdej probówki dodałam:
 - 430 µl (0°C) buforu do inkubacji Ab ChIP,
 - 20 µl kulek Protein A Agarozy;
- do każdej z probówek IP dodałam 5-6 µl przeciwciała;

- proporcjonalnie dodałam objętość preimmunizowanego lub blokującego serum do próbówki NoAb;
- dodałam do wszystkich próbek 20 µl kulek Protein A Agarozy;
- inkubowałam przez 16 h, 4°C, delikatnie mieszając;
- wirowałam 2 min., 400 g, 4°C, w celu osadzenia kulek;
- przemyłam 1 raz buforem o niskim stężeniu soli i inkubowałam 10 min., 4°C, delikatnie mieszając;
- wirowałam 1 min., 400 g, 4°C, w celu osadzenia kulek i dekantowałam;
- przemyłam 1 raz buforem o wysokim stężeniu soli i inkubowałam 10 min., 4°C, delikatnie mieszając;
- wirowałam 1 min., 400 g, 4°C, w celu osadzenia kulek i dekantowałam;
- przemyłam 1 raz buforem LiCl i inkubowałam 10 min., 4°C, delikatnie mieszając;
- wirowałam 1 min., 400 g, 4°C, w celu osadzenia kulek i dekantowałam;
- przemyłam 1 raz buforem TE i inkubowałam 10 min., 4°C, delikatnie mieszając;
- wirowałam 1 min., 400 g, 4°C, w celu osadzenia kulek i dekantowałam;
- przemyłam ponownie 1 raz buforem TE i inkubowałam 10 min., 4°C, delikatnie mieszając;
- wirowałam 1 min., 400 g, 4°C, w celu osadzenia kulek i dekantowałam;
- dodałam 250 µl buforu elucyjnego ChIP;
- szybko zmieszałam i inkubowałam 15 min., 65°C, delikatnie mieszając;
- wirowałam 2 min., 3 500 g, temperatura pokojowa, w celu osadzenia kulek agarozowych;
- przeniosłam supernatant do nowej próbówki i dodałam 250 µl buforu elucyjnego ChIP;
- szybko zmieszałam i inkubowałam 15 min., 65°C, delikatnie mieszając;
- wirowałam 2 min., 3 500 g, temperatura pokojowa, w celu osadzenia kulek agarozowych i zebrałam supernatant;
- połączyłam zebrane supernatanty.

5.7.7. Rozszywanie chromatyny

- Do każdej z próbek nazwanej w poprzednich etapach IP i NoAb dodałam 20 µl 5 M NaCl;

- do próbki „wsadowej” (*ang. input* z punktu oczyszczenie chromatyny) dodałam:
 - 100 μ l buforu TE,
 - 6,5 μ l 5 M NaCl,
 - 8 μ l 20% SDS;
- inkubowałam w celu przeprowadzenia rozszycia chromatyny przez 16 h, 65°C.

5.7.8. Izolacja DNA

- Do uzyskanego w poprzednim etapie roztworu dodawałam 1 objętość fenolu i wytrząsałam 1 500 rpm, 2 min., temperatura pokojowa;
- wirowałam 2 min., 13 000 g, temperatura pokojowa;
- górną fazę, wodną przenieśliam do nowej próbki i ponownie dodałam 1 objętość fenolu i wytrząsałam 1 500 rpm, 2 min., temperatura pokojowa;
- wirowałam 2 min., 13 000 g, temperatura pokojowa;
- górną fazę, wodną przenieśliam do nowej próbki i dodałam 1 objętość chloroformu i alkoholu izoamylowego (w stosunku 24:1), wytrząsałam 1 500 rpm, 2 min., temperatura pokojowa;
- wirowałam 2 min., 13 000 g, temperatura pokojowa;
- zebrałam górną fazę wodną i przenieśliam do nowej próbki, a następnie dodałam o 1/10 objętości octanu sodu i 3 objętości 96% etanolu;
- DNA wytrącałam przez 16 h, -20°C
- wirowałam 30 min., 18 000 g, 4°C;
- osad przemywałam 75% etanolem i wirowałam 5 min., 18 000 g, temperatura pokojowa;
- osad dokładnie osuszyłam i rozpuściłam w 40 μ l wody wolnej od nukleaz;
- spektrofotometrycznie oznaczyłam stężenie roztworu DNA przy długości fali $\lambda=260$ nm;
- roztwór DNA rozporcyjowałam i wykonałam rozcieńczenia (1, 1:5, 1:10, 1:25, 1:50), a następnie zamroziłam w -20°C.

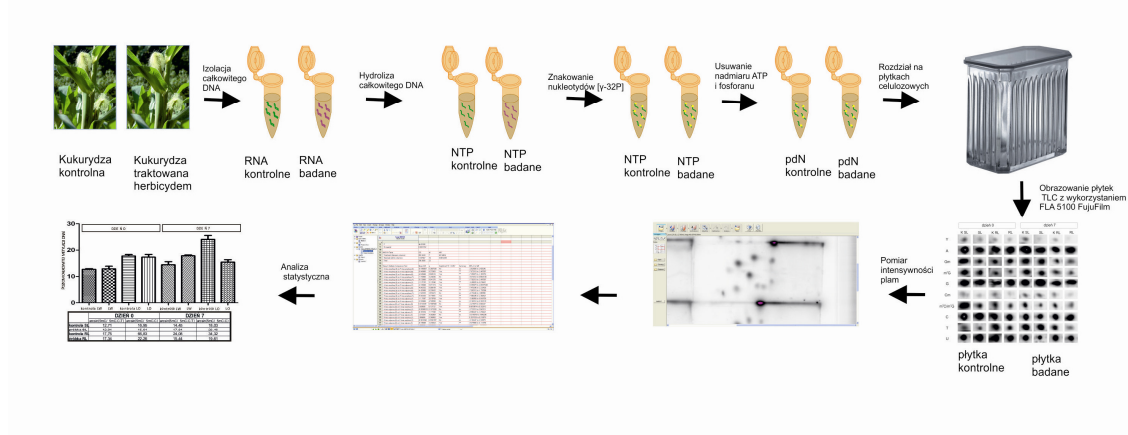
5.7.9. Analiza poziomu obecności znaczników epigenetycznych

W celu określenia ilości danego znacznika epigenetycznego w białkach histonowych w obrębie sekwencji badanego genu wykonałam analizę poziomu ekspresji tego genu

z wykorzystaniem techniki rtPCR zgodnie z opisem w punkcie 5.4.4. Analizy obliczeniowej i statystycznej uzyskanych poziomów ekspresji dokonałam zgodnie z opisem w punkcie 5.4.5 i z zaleceniami literaturowymi (Livak i in. 2001).

5.8. Analiza zmian ilościowych i jakościowych małych niekodujących RNA

W celu określenia zmian w ilości modyfikowanych nukleotydów w obrębie sekwencji małych RNA, w odpowiedzi na stres herbicydowy posłużyłam się techniką chromatografii cienkowarstwowej.



Rysunek 24. Schemat analizy zmian w poziomie modyfikacji nukleotydów w niekodujących RNA w odpowiedzi na warunki stresowe.

5.8.1. Izolacja całkowitego RNA

Izolację całkowitego RNA przeprowadziłam tak jak opisano w punkcie 5.3.1, a następnie przeanalizowałam go pod względem ilościowym i jakościowym zgodnie z opisem w punkcie 5.3.2. W celu oczyszczenia RNA z zanieczyszczeń DNA przeprowadziłam trawienie DNazą tak jak w punkcie 5.3.3. i powtórnie przeprowadziłam analizę ilościową i jakościową każdej z próbek RNA.

5.8.2. Frakcjonowanie niekodujących RNA

W celu uzyskania frakcji niekodujących RNA o długości mniejszej niż 200 nukleotydów przeprowadziłam rozdział elektroforetyczny próbek całkowitego RNA w sąsiedztwie markera wielkości RiboRuler w 8% żelu poliakrylamidowym (Ausubel i in. 1994; Farrel 2005). Przed rozdziałem elektroforetycznym preparaty obciążałam 1/6 objętości buforu do nakładania próbek na żele agarozowe i poliakrylamidowe. Rozdział prowadziłam w buforze 1x TB przy natężeniu prądu 120 V w temperaturze pokojowej. Obserwację

poszczególnych frakcji RNA umożliwiła 15 minutowa inkubacja żelu, po zakończonym rozdziale elektroforetycznym, w roztworze zawierającym 0,01% stężenie SYBR® Safe DNA gel stain. Obrazowania rozdziału elektroforetycznego dokonywałam z wykorzystaniem kamery UV GelDoc. Posiłkując się tym obrazem z kamery UV i wskazaniem markera wielkości, wycięto fragmenty żelu zawierające RNA o masie mniejszej niż 200 nukleotydów dla każdej z próbek. Rozdrobniony żel zalewałam 500 µl wody wolnej od nukleaz i wytrząsałam przy 850 rpm przez 3 h w 4°C. Zwirowałam 3 min., 10 000 g, temperatura pokojowa i zdekantowałam. Do supernatantu dodałam 1/10 objętości octanu sodu, pH 5,2 i 3 objętości 96% etanolu, a następnie wytrącałam RNA przez 16 h w -20°C. Wirowałam 30 min., 18 000 g, 4°C. Osad RNA wysuszyłam i rozpuściłam w 40 µl wody wolnej od nukleaz. Roztwór RNA poddałam spektrofotometrycznej ocenie ilościowej i jakościowej.

5.8.3. Enzymatyczne cięcie i znakowanie RNA

Enzymatyczne cięcie RNA i znakowanie przeprowadziłam z wykorzystaniem procedury opisanej w punkcie 5.5.2 z modyfikacjami zgodnie z poniższą tabelą 25.

Tabela 25. Ogólne warunki reakcji enzymatycznego cięcia i znakowania RNA.

Nr etapu	Składniki	Ilości	Warunki
Etap I	nukleaza z <i>Micrococcus</i> [1U/µl]	0,07 µl	37°C, 16 h
	fosfodiesteraza II ze śledziona [0,5U/µl]	0,035 µl	
	2x bufor bursztynianowy, pH 6,3	1,75 µl	
	RNA	1 µg	
	H ₂ O wolna od nukleaz	do 3,5µl	
Etap II	roztwór z Etapu I	3,5 µl	37°C, 30 min.
	10x bufor bitynowy, pH 9,7	0,3 µl	
	ATP [1 mM]	0,45 µl	
	ATP [γ 32P]	0,05 µl	
	T4 PNK [30U/ µl]	0,1 µl	
	H ₂ O wolna od nukleaz	do 3 µl	
Etap III	roztwór z Etapu II	6,5 µl	37°C, 30 min.
	1x bufor, pH 9,7	2 µl	
	apyraza [0,5 U/µl]	0,01 µl	

Nr etapu	Składniki	Ilości	Warunki
Etap IV	roztwór z Etapu III	9,5 µl	37°C, 3 h
	octan amonu, pH 4,5 [0,5 M]	1,4 µl	
	nukleaza P1 [1mg/ml]	0,2 µl	
	H ₂ O wolna od nukleaz	1,4 µl	

5.8.4. Rozdział dwukierunkowy TLC

Rozdział dwukierunkowy przeprowadziłam podobnie jak opisano w punkcie 5.3.3 z modyfikacjami dotyczącymi faz ruchomych. Fazę pierwszą stanowiła I Faza do rozdziału RNA metodą TLC i rozdział prowadziłam przez 16 h, a droga migracji wynosiła 20 cm. W drugim kierunku zastosowałam dwie fazy rozdziału: „II Faza do rozdziału DNA i RNA metodą TLC” i „II HCl faza do rozdziału RNA metodą TLC”. Droga migracji dla poszczególnych faz wynosiła 20 cm, a czas migracji 5,5 h i 10 h, odpowiednio. Uzyskany obraz interpretowałam zgodnie z atlasem modyfikowanych nukleotydów obecnych w RNA (Keith 1995).

5.8.5. Analiza obliczeniowa i statystyczna

Stosowałam analizę obliczeniową i statystyczną analogicznie do opisanej w punkcie 5.5.4. Do ilościowej oceny poszczególnych nukleotydów wykorzystałam wzór:

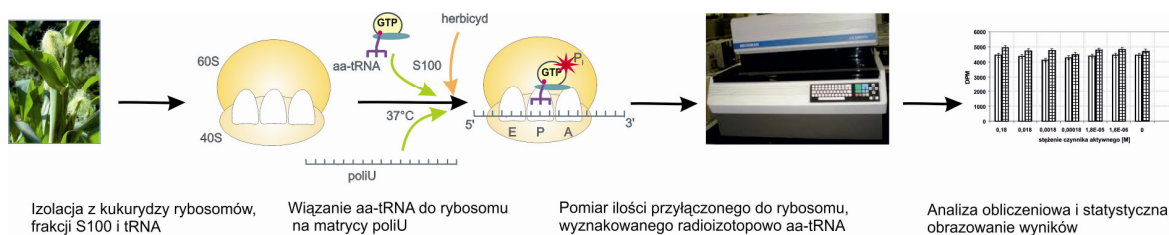
$$R = \frac{X}{\sum (Ni)} \times 100\%$$

gdzie X oznacza intensywność sygnału odpowiadającego danemu, analizowanemu nukleotydowi, a Ni oznacza poszczególne analizowane w badaniu nukleotydy

W celu dokonania analizy statystycznej dane liczbowe eksportowałam do programu Graph Prism Pro, gdzie wykonałam oznaczenia istotności statystycznej wyników.

5.9. Analiza wpływu czynników aktywnych herbicydów na wydajność wiązania aa-tRNA do rybosomu na matrycy poliU

Celem przeprowadzonych działań było uzyskanie aktywnego układu translacyjnego z badanego materiału roślinnego i analiza zmian jego aktywności pod wpływem czynnika stresowego (Bakowska-Zywicka i in. 2008).



Rysunek 25. Schemat analizy zmian w poziomie wiązania aa-tRNA do rybosomu na matrycy poliU w odpowiedzi na czynniki stresowe.

5.9.1. Izolacja tRNA

Celem metody było otrzymanie fenyloalaninowego transferowego kwasu rybonukleinowego (tRNA^{Phe}) pozbawionego zanieczyszczeń w postaci innych kwasów rybonukleinowych (RNA) i deoksyrybonukleinowych (DNA), białek i polisacharydów. Otrzymane tRNA powinno się cechować niskim stopniem degradacji i wysoką specyficznością mierzoną w reakcji aminoacylacji tRNA.

- 250 g liści kukurydzy zamrożonych w -70°C zmieliłam i dodałam 1 l buforu ekstrakcyjnego, 500 ml fenolu i 500 ml chloroformu;
- całość wytrząsałam kilka razy i pozostawiłam do odstania;
- zebrałam górną warstwę (wodną) i dodałam do niej mieszaninę fenol/chloroform w ilości 1/2 objętości fazy wodnej, a następnie wytrząsałam;
- ponownie zebrałam górną warstwę (wodną), dodałam chloroformu w ilości 1/2 objętości zebranej fazy wodnej i energicznie wytrząsałam;
- etap ekstrakcji z chloroformem powtarzałam kilkakrotnie do zaniku interfazy;
- zebraną wodną warstwę strąciłam 3 objętościami 96% etanolu i w obecności 1/10 objętości octanu potasu, pH 5,2;
- przechowywałam w -20°C przez 16 h;
- powstały osad wirowałam 8 000 g, 10 min. i wysuszyłam na lodzie;

- osad rozpuściłam w wodzie wolnej od nukleaz i ponownie wirowałam 8 000 g, 10 min., w celu oddzielenia nierozpuszczalnych zanieczyszczeń towarzyszących RNA;
- supernatant o znanym stężeniu i ilości NA, zawiesiłam w DEAE-Celulozie.

5.9.2. Oczyszczanie tRNA na DEAE-Celulozie

Przed rozpoczęciem procesu izolacji, DEAE-Celulozę, która jest wypełnieniem kolumny do oczyszczania tRNA, należy zregenerować. W tym celu umieściłam DEAE-Celulozę na lejku i przemywałam kolejno: wodą destylowaną (30 min.), 0,5 M HCl (20 min.), wodą destylowaną (doprowadzając do pH 7,0), 96% etanolem. Do przemywania ponownie zastosowałam wodę destylowaną, a następnie 0,5 M NaOH (20 min.) oraz wodą destylowaną (doprowadzając do pH 7,0). Tak przygotowaną DEAE-Celulozę zastosowałam do oczyszczania tRNA zgodnie z opisem:

- supernatant pochodzący z izolacji tRNA zawiesiłam w DEAE-Celulozie według proporcji 50-100 A_{260} /ml celulozy;
- po 24 h przełożyłam całość na lejek piankowy i zebrałam przesącz;
- przemyłam celulozę 0,25 M roztworem NaCl do wartości $A_{260} = 0,001$;
- celulozę zawiesiłam na 24 h w 1 M NaCl;
- całość ponownie przełożyłam na lejek piankowy, przesączyłam i przemyłam DEAE-Celulozę małymi porcjami (po 50 ml) 1 M NaCl;
- każdorazowo mierzyłam A_{260} i na tej podstawie zebrałam frakcje RNA (o najwyższej wartości A_{260});
- DEAE-Celulozę przemywałam dalej 1 M NaCl w celu jej regeneracji;
- zebrane frakcje strąciłam 3 objętościami 96% etanolu w obecności 1/10 objętości octanu potasu (pH 5,2) i pozostawiłam na 16h, -20°C ;
- osad, zawierający surowy niskocząsteczkowy RNA, odwirowałam, wysuszyłam na lodzie i rozpuściłam w jak najmniejszej objętości wody wolnej od nukleaz, a następnie nanosiłam na kolumnę z BD-Celulozy.

5.9.3. Oczyszczanie tRNA na BD-Celulozie

Oczyszczanie na BD-Celulozie ma na celu rozdział otrzymanej mieszaniny tRNA na poszczególne frakcje odpowiadające specyficznym transferowym RNA.

- Kolumnę o wymiarach 2,6 x 90 cm wypełnioną BD-Celulozą; przemywałam buforem Bufor do oczyszczania tRNA na kolumnie z BD-celulozy I i naniałam ok. 6000 A₂₆₀ (10 μmoli) preparatu oczyszczonego wcześniej na DEAE-celulozie;
- w celu rozdziału tRNA wykorzystywałam liniowy gradient stężenia NaCl w następującej kolejności stosowanych buforów:
 - bufor do oczyszczania tRNA na kolumnie z BD-celulozy I i bufor do oczyszczania tRNA na kolumnie z BD-celulozy II w ilości 10 razy większej niż objętość robocza kolumny,
 - bufor do oczyszczania tRNA na kolumnie z BD-celulozy II i bufor do oczyszczania tRNA na kolumnie z BD-celulozy III w ilości 5 razy większej niż objętość robocza kolumny;
- objętość zbieranych frakcji wynosiła 1 ml przy prędkości przepływu przez kolumnę 1 ml/10 min;
- zawartość tRNA śledziłam w co dziesiątej frakcji przez pomiar absorbancji przy długości fali $\lambda = 260$ nm;
- specyficzność oczyszczonego tRNA sprawdziłam przeprowadzając reakcję aminoacylacji co dziesiątej frakcji;
- frakcje o najwyższej zawartości tRNA^{Phe} strącałam 3 objętościami 96% etanolu, odwirowałam 8000 g, 10 min. i rozpuściłam w jak najmniejszej ilości wody wolnej od nukleaz.

5.9.4. Izolacja rybosomów 80S z *Zea mays*

- 150 g liści kukurydzy zamrożonych w -80°C, zhomogenizowałam w 250 ml buforu do izolacji rybosomów;
- mieszaninę doprowadziłam do pH 7,5 nieadjustowanym 1 M tris-em HCl (pH 10,5);
- preparat i otrzymany z niego supernatant wirowałam 30 000 g, 15 min., 4°C;
- roztwór zdekantowałam;
- poddałam roztwór wirowaniu 140 000 g, 3 h, 4°C;
- otrzymany supernatant poddawałam dalszej obróbce do otrzymania aktywnych biologicznie czynników eEF1 i eEF2, w dalszej części pracy określanych jako S100;

- osad homogenizowałam w buforze do izolacji rybosomów do otrzymania jednorodnego, klarownego, mlecznego roztworu rybosomów;
- rybosomy wirowałam przez tzw. poduszkę sacharozową (po 5 ml), nakładając je bardzo ostrożnie na jej powierzchnię;
- wirowanie prowadziłam w probówkach typu *Quick-Seal* (kubki wirówkowe 13,5 ml), 330 000 g, 2 h, 4°C;
- osad rybosomów powtórnie homogenizowałam w buforze do izolacji rybosomów i powtórzyłam proces wirowania przez poduszkę sacharozową;
- otrzymany osad rybosomów homogenizowałam w buforze do przechowywania rybosomów i wirowałam 2000 g, 5 min., 4°C;
- otrzymany supernatant przechowywałam w temp. -80°C.

5.9.5. Izolacja frakcji enzymatycznej S100

Celem procedury było uzyskanie aktywnej frakcji enzymatycznej układu biosyntezy białka:

- Zawiesinę S100, otrzymaną w czasie izolacji rybosomów, o znanej objętości, poddałam frakcjonowanemu wysalaniu siarczanem amonu w dwóch etapach, w temperaturze 0°C;
- w pierwszym etapie dodawałam siarczanu amonu do uzyskania 35% stężenia (194 g soli na 1000 ml roztworu), proces prowadziłam powoli dodając sól małymi porcjami w czasie 30 min. przy stałym mieszaniu i pH (powinno być 7,5);
- preparat wirowałam 30 000 g, 30 min., 4°C;
- supernatant o znanej objętości, poddałam drugiemu etapowi wysalania do uzyskania 60 % stężenia siarczanu amonu w roztworze (184 g na 1000 ml roztworu), również powoli dodając porcje soli przy ciągłym mieszaniu;
- otrzymany osad rozpuściłam w minimalnej ilości buforu do izolacji frakcji enzymatycznej S100 i poddałam dializie w czasie 3,5 h, trzykrotnie zmieniając bufor do izolacji frakcji enzymatycznej S100;
- preparat wirowałam 6000 g, 5 min., 4°C, zebrałam supernatant, zmierzyłam spektrofotometrycznie przy długości fali $\lambda = 280$ nm i obliczyłam stężenie białek;
- przechowywałam w temperaturze -80°C.

5.9.6. Reakcja aminoacylacji tRNA

- Mieszaninę reakcyjną (50 µl) zawierającą: bufor do reakcji aminoacylacji, 300 pmoli [³H]-fenyloalaniny oraz zoptymalizowaną ilość tRNA i frakcji enzymatycznej (S100) o znanym stężeniu, inkubowałam 15 min., 37°C;
- mieszaninę przemywałam: jednokrotnie 10% roztworem kwasu trichlorooctowego (TCA), trzykrotnie 5% roztworem TCA i jednokrotnie 96% etanolem, jednocześnie przefiltrowując przez sączek z włókna szklanego Whatman GF/C;
- zatrzymaną na sączkach radioaktywność zmierzyłam na liczniku scyntylicyjnym w scyntylicyjnym toluenowym na liczniku Beckmann LS 7000.

5.9.7. Preparatywna reakcja aminoacylacji

- Mieszaninę reakcyjną (5 ml) zawierającą: bufor do reakcji aminoacylacji, 300 nmoli [³H]-fenyloalaniny i 9,8 nmoli tRNA^{Phe} inkubowałam 5 min., 37°C;
- następnie dodałam 150 µl frakcji enzymatycznej S100 o stężeniu 244,5 A₂₈₀/ml i prowadziłam właściwą reakcję aminoacylacji przez 15 min., 37°C;
- po inkubacji próbę wytrząsałam z fenolem o temperaturze 4°C przez 15 min. w celu usunięcia syntetaz aminoacylo-tRNA, wirowałam 12 000 g, 20 min., temperatura pokojowa;
- do warstwy wodnej dodałam 3 objętości 96% etanolu w obecności 1/10 objętości octanu potasu (pH 5,2) i całość pozostawiłam w temperaturze -20°C na 1 h, w celu wytrącenia ze środowiska zsyntetyzowanego [³H]-Phe-tRNA^{Phe} oraz usunięcia fenolu;
- wytrącony osad odwirowałam 12 000 g, 20 min., temperatura pokojowa i rozpuściłam w wodzie wolnej od nukleaz;
- procedurę wytrącania z użyciem etanolu opisaną powyżej powtarzałam kilkakrotnie w tych samych warunkach;
- ostatecznie osad [³H]-Phe-tRNA^{Phe} rozpuściłam w wodzie wolnej od nukleaz (300 µl) i przechowywałam w temperaturze -80°C.

5.9.8. Reakcja enzymatycznego wiązania Phe-tRNA^{Phe} do poli(U) rybosomów (RW)

- Mieszanina inkubacyjna (50 µl) zawierała : 5 µl buforu A do reakcji wiązania aa-tRNA do rybosomu, 10 µl buforu B do reakcji wiązania aa-tRNA do rybosomu, 12 pmoli rybosomów i zoptymalizowaną ilość frakcji enzymatycznej S100;

- próbę kontrolną stanowiła mieszanina reakcyjna o takim samym składzie, niezawierająca S100;
- inkubację prowadziłam przez 5 min., 37°C;
- następnie do mieszaniny inkubacyjnej dodałam 1 ml schłodzonego buforu płuczającego i sączyłam przez sączki nitrocelulozowe o średnicy porów 0,45 µm;
- filtr nitrocelulozowy płukałam trzykrotnie tym samym buforem, suszyłam i zliczałam poziom radioaktywności w scyntylatorze toluenowym na liczniku Beckmann LS 7000.

6. Wyniki i dyskusja

6.1. Hodowla, ocena fenotypowa i zbiór materiału roślinnego

W literaturze opisano zmiany fenotypowe u roślin wykazujących cechę odporności i wrażliwości na działanie herbicydu Roundup (Ge i in. 2010; Ge i in. 2011; Ge i in. 2012). Nie zostały jednak scharakteryzowane fenotypy kukurydzy wykazującej naturalną tolerancję na działanie tego herbicydu i dlatego dokładnie opisałam przeprowadzone obserwacje. Zmiany fenotypowe dają możliwość zaobserwowania reakcji rośliny na określone warunki środowiskowe oraz stres biotyczny i abiotyczny. Od lat za pomocą fenotypu określano rośliny pod względem ich wrażliwości na dane warunki klimatyczne oraz charakteryzowano ich plonowanie (Nickson 2008). Pierwszym etapem prowadzonych badań była ocena zmian fenotypowych linii kukurydzy poddanych stresowi herbicydowemu. W tym celu zastosowano herbicydy zalecane w uprawach kukurydzy (Roundup i Titus) oraz dla porównania reakcji rośliny herbicyd Basta zalecany w uprawach innych roślin. W przypadku herbicydu Roundup użyto dawki 1 l/ha przy czym przez producenta do stosowania polowego zalecane są dawki 1-3 l/ha zależnie od charakterystyki chwastów rosnących na polu (Monsanto Europe 2004). Badania mające na celu wyłonienie chwastów odpornych na działanie Roundup prowadzone były zwykle z zastosowaniem spektrum dawek tego środka w celu określenia dawki letalnej (Adamczewski i in. 2011). Kukurydza jest rośliną naturalnie wykazującą niski stopień tolerancji na Roundup, a zastosowana w moich badaniach dawka jest porównywalna z tymi stosowanymi w eksperymentach testujących wrażliwość roślin na ten herbicyd (Zhou i in. 1995; Cebeci i in. 2009). Z kolei herbicyd Titus zastosowano w dawce 75 g/ha, a proponowana przez producenta przy zabiegu jednokrotnym to 60 g/ha (Du Pont de Nemours 2005). Opisywane w literaturze dawki stosowania tego herbicydu zwykle były nieco niższe lub porównywalne z tym zastosowanym w badaniu (Metzger i in. 1996). Natomiast środek ochrony roślin Basta stosowano w dawce 1 l/ha (zalecana przez producenta dawka to około 3 l/ha) (Aventis CropScience 1999). W analizach mających na celu wyłonienie roślin odpornych na działanie tego środka stosowano spektrum dawek od 2 do 20 l/ha (Block i in. 1987). Herbicydy zalecane jako przedwschodowe zastosowano w dawkach mniejszych niż zalecają producenci, a powschodowo w dawce zbliżonej do polecanej. Taki wybór można tłumaczyć faktem, że herbicydy stosowane przedwschodowo nie mają w normalnych warunkach kontaktu z rośliną uprawną, a ich zadaniem jest spowodowanie śmierci chwastów obecnych na polu. Zastosowane subletalne dawki dla

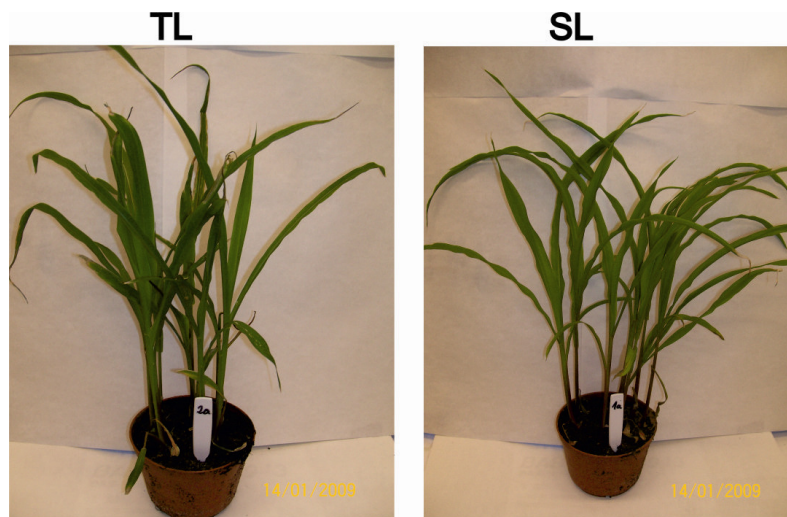
kukurydzy pozwoliły na selekcję linii wykazującej tolerancję na herbicyd. Titus, który może być stosowany w uprawie kukurydzy, nie powinien uszkadzać rośliny. Wykazano, że silna reakcja na ten środek występuje tylko w przypadku uszkodzenia roślin lub genetycznie uwarunkowanej wrażliwości (Rola 2003). Zastosowana dawka środka ochrony roślin pozwoliła na wytypowanie linii wrażliwej oraz tolerancyjnej na jego działanie.

Wyhodowane rośliny fotografowałam w celu zobrazowania zmian fenotypowych zachodzących od momentu zastosowania warunków stresowych przez 21 dni, kiedy to powinien pojawić się efekt letalny. Jednocześnie obserwowałam wzrost roślin kontrolnych, które nie były narażone na warunki stresowe. Prowadzone obserwacje pozwoliły mi stwierdzić kiedy występują istotne zmiany na liściach, będące reakcją na zastosowane warunki stresowe oraz do którego momentu nie występowały żadne zmiany. Dokładne analizy fenotypów pozwoliły na określenie momentów czasowych, z których materiał biologiczny był szczegółowo analizowany z użyciem technik biologii molekularnej. Równocześnie w tych samych warunkach szklarniowych co rośliny poddane stresowi hodowałam rośliny kontrolne. Porównywałam każdorazowo rośliny każdej z linii poddane stresowi do właściwej im kontroli, a następnie pomiędzy liniami.

6.1.1. Ocena działania herbicydu Roundup

Jako linia tolerancyjna na działanie herbicydu Roundup we wcześniejszych badaniach szklarniowych przeprowadzonych w Zespole prof. Kazimierza Adamczewskiego w Instytucie Ochrony Roślin w Poznaniu została wytypowana S245 (TL). Jako linia wrażliwa na działanie herbicydu została wytypowana linia S79757 (SL). Zaobserwowałam, że linia S245 charakteryzuje się większym pokrojem rośliny niż linia S79757. Linia wykazująca wysoką tolerancję na działanie stresu herbicydowego miała liście średnio o 5 cm dłuższe od linii wrażliwej. Różnicę zaobserwowałam również w kolorze liści: linia tolerancyjna posiadała ciemnozielone liście, dość odporne na uszkodzenia i stosunkowo sztywne. Liście linii wrażliwej były jaśniejsze, mniejsze, a dodatkowo delikatniejsze i tym samym wrażliwsze na uszkodzenia mechaniczne. Obserwacja ta jest niezwykle istotna w obliczu badań chwastów odpornych na glifosat. Stwierdzono, że rośliny mniej wrażliwe na zranienia i uszkodzenia mechaniczne oraz z liśćmi pokrytymi kutikulą wykazują wyższą tolerancję na działanie herbicydu (Nalewaja i in. 1996; Hall i in. 2000). Wnioskuje, że podobny mechanizm związany z budową liści mógł wpływać na obniżenie ilości glifosatu, jaka wnikała do liści kukurydzy.

W dniu zerowym, 5 godzin po zastosowaniu warunków stresowych przeprowadziłam pierwszą analizę porównawczą roślin w celu stwierdzenia czy wystąpiła jakakolwiek wczesna reakcja fenotypowa na zastosowany natrysk herbicydu. W dniu 0 nie zaobserwowałam zmian na powierzchni liści roślin żadnej z linii (Zdjęcie 1.), w porównaniu do roślin kontrolnych.



Zdjęcie 1. Linie kukurydzy w dniu 0, poddane działaniu herbicydu Roundup. Linie tolerancyjną oznaczono jako TL, a wrażliwą jako SL.

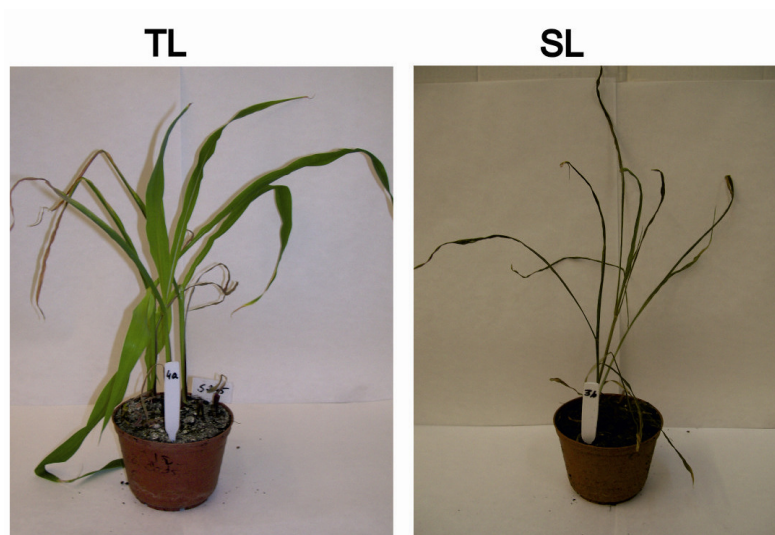
Kolejną obserwację przeprowadziłam w dniu 2. w celu określenia czy zaszły zmiany fenotypowe wywołane warunkami stresowymi. Zaobserwowałam pojawienie się pierwszych plamek koloru pomarańczowego na liściach u linii wrażliwej na działanie Roundup oraz lekkie usychanie końcówek niektórych z liści. U linii tolerancyjnej nie zaobserwowałam widocznych zmian fenotypowych.

W dniu 7. (Zdjęcie 2.) po traktowaniu herbicydem przeprowadziłam kolejną analizę stanu fenotypowego roślin. U linii wrażliwej kukurydzy zaobserwowałam duże natężenie rudych plamek na liściach. Widoczne było również usychanie liści na ich końcach postępujące w kierunku podstawy. U linii tolerancyjnej zaobserwowałam pojawienie się małych, rudych plamek na liściach i delikatne podsychanie końców niektórych z liści.



Zdjęcie 2. Linie kukurydzy w dniu 7., poddane działaniu herbicydu Roundup. Linie tolerancyjną oznaczono jako TL, a wrażliwą jako SL.

Analiza fenotypowa w dniu 14. (Zdjęcie 3.) pozwoliła mi na stwierdzenie rozległej nekrozy liści u linii wrażliwej, ponieważ około połowa z liści uschła. Wcześniej obserwowane plamki zlały się w duże obszary, w których następowało usychanie liścia. U linii tolerancyjnej zaobserwowałam utrzymanie się wcześniej opisanych zmian w postaci usychania końców liści oraz występowanie pojedynczych pomarańczowych plamek.



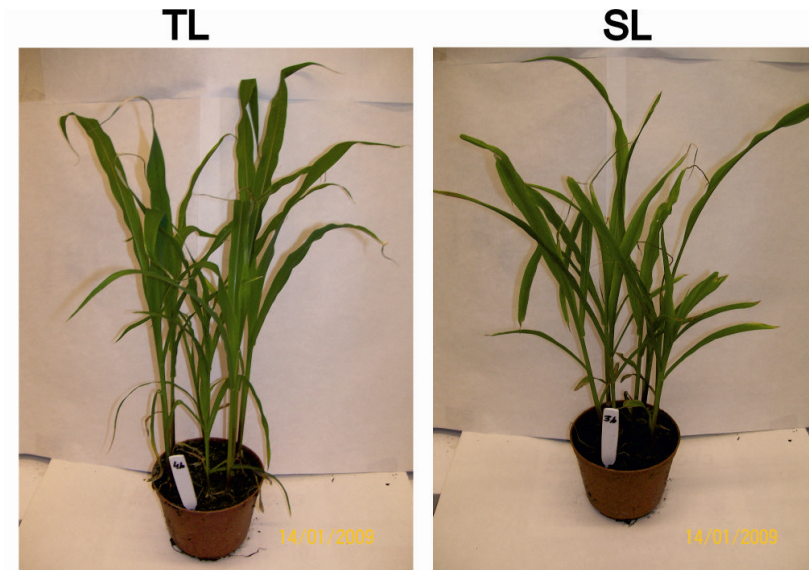
Zdjęcie 3. Linie kukurydzy w dniu 14. poddane działaniu herbicydu Roundup. Linie tolerancyjną oznaczono jako TL, a wrażliwą jako SL.

W ostatnim, 21. dniu analizy u linii wrażliwej zanotowałam prawie całkowite uschnięcie rośliny. Liście przybrały kolor brunatno-pomarańczowy i uległy wysuszeniu. U kilku liści, blisko podstawy, zachowały się nieliczne części zielone, których kolor znacznie ściemniał. Rozwój i wzrost rośliny zostały całkowicie zahamowane. U linii tolerancyjnej zaobserwowałam nasilenie objawów usychania końców liści, jednakże roślina utrzymała swój pierwotny pokrój i nadal rosła. Pomimo widocznych zmian na liściach nie zmieniły one koloru w częściach zielonych. Aczkolwiek wzrost rośliny w porównaniu do rośliny kontrolnej uległ spowolnieniu.

6.1.2. Ocena działania herbicydu Titus

Jako linia odporna na działanie herbicydu Titus we wcześniejszych badaniach szklarniowych przeprowadzonych w Zespole prof. Kazimierza Adamczewskiego w Instytucie Ochrony Roślin w Poznaniu została wytypowana S245 (TL). Jako linia wrażliwa na działanie herbicydu została wytypowana linia S40620 (SL). Zaobserwowałam, że linia S245 charakteryzuje się pokrojem podobnym do linii S40620. Linia wykazująca wysoką tolerancję na działanie stresu herbicydowego miała liście nieco szersze od linii wrażliwej. Różnicę zaobserwowałam również w kolorze liści: linia tolerancyjna posiadała ciemnozielone liście, stosunkowo odporne na uszkodzenia. Liście linii wrażliwej były koloru nieco jaśniejszego i były wrażliwsze na uszkodzenia mechaniczne.

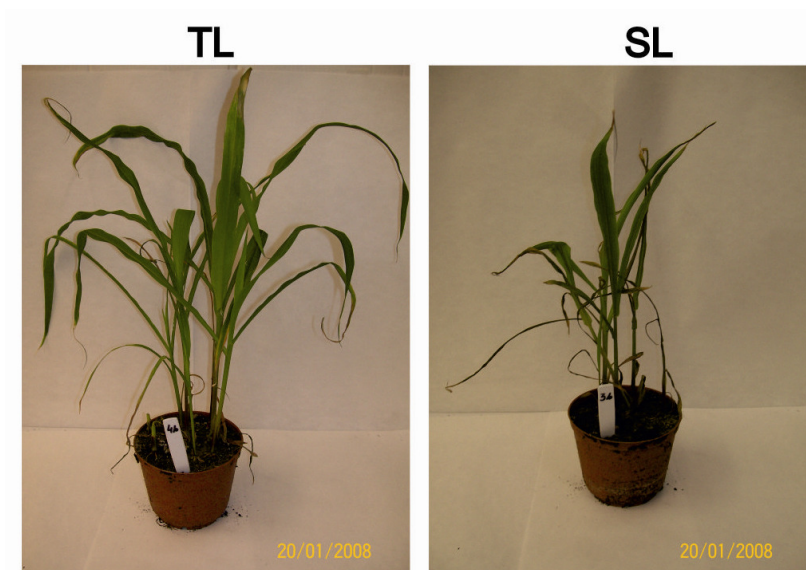
W dniu 0 (Zdjęcie 4.) w około 5 godzin po zastosowanych warunkach stresowych przeprowadziłam pierwszą analizę porównawczą roślin w celu stwierdzenia czy wystąpiła reakcja fenotypowa na zastosowany zabieg. W dniu 0 nie zaobserwowałam zmian na powierzchni liści żadnej z roślin.



Zdjęcie 4. Linie kukurydzy w dniu 0 poddane działaniu herbicydu Titus. Linie tolerancyjną oznaczono jako TL, a wrażliwą jako SL.

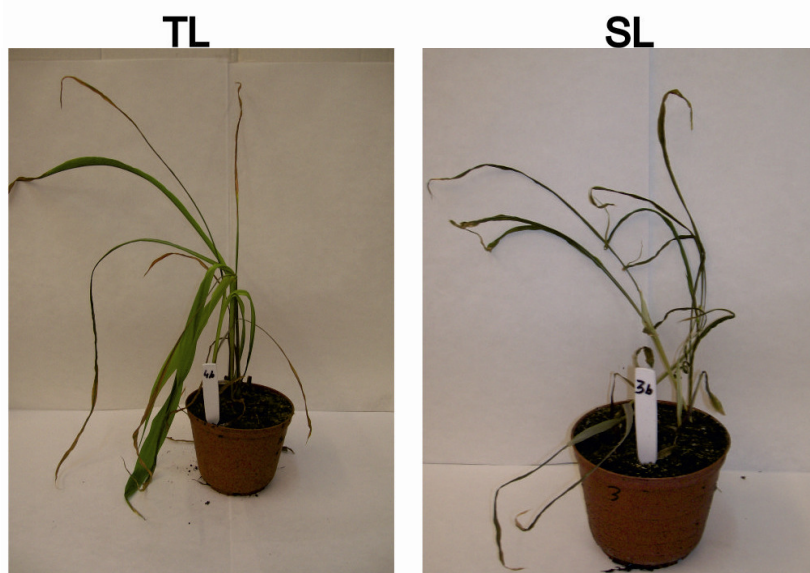
Kolejnej obserwacji dokonałam w dniu 2., w celu określenia zmian fenotypowych, wywołanych warunkami stresowymi. Zaobserwowałam pojawienie się pierwszych plamek koloru pomarańczowego na liściach u linii wrażliwej na działanie herbicydu Titus. U linii tolerancyjnej nie były widoczne zmiany fenotypowe.

W dniu 7. (Zdjęcie 5.), po traktowaniu herbicydem przeprowadziłam kolejną analizę stanu fenotypowego roślin. U linii wrażliwej kukurydzy pojawiło się wiele rudych plamek na liściach i lekkie usychanie liści na ich końcach. U linii tolerancyjnej zauważyłam pojawienie się małych plamek na liściach, jednakże w porównaniu z linią wrażliwą było ich bardzo mało.



Zdjęcie 5. Linie kukurydzy w dniu 7. poddane działaniu herbicydu Titus. Linie tolerancyjną oznaczono jako TL, a wrażliwą jako SL.

Analiza fenotypowa w dniu 14. (Zdjęcie 6.) pozwoliła mi na stwierdzenie rozległej nekrozy liści. U linii wrażliwej objawiała się ona wystąpieniem plamek w kolorze rudym, które zlewały się i widoczne było miejscowe usychanie liści. U linii tolerancyjnej zaobserwowałam utrzymanie się wcześniej opisanych zmian w postaci pojedynczych pomarańczowych plamek, które uległy nieznacznemu nasileniu oraz usychanie niektórych z liści.



Zdjęcie 6. Linie kukurydzy w dniu 14. poddane działaniu herbicydu Titus. Linie tolerancyjną oznaczono jako TL, a wrażliwą jako SL.

W ostatnim, 21. dniu analizy fenotypowej, u linii wrażliwej zanotowałam prawie całkowite uschnięcie rośliny. Przybrały one kolor brunatno-pomarańczowy i uległy wysuszeniu. U kilku liści zachowały się nieliczne części zielone, których kolor zmienił się na zielono-brunatny. Rozwój i wzrost rośliny zostały całkowicie zahamowane. U linii tolerancyjnej zaobserwowałam nasilenie występowania ciemnych plamek oraz usychanie niektórych liści, jednakże roślina utrzymała swój pierwotny pokrój i nadal rosła. Pomimo widocznych zmian na liściach nie zmienił się odcień ich zieleni. Wzrost rośliny w porównaniu do rośliny kontrolnej przebiegał podobnie.

6.1.3. Ocena działania herbicydu Basta

Jako linia tolerancyjna na działanie herbicydu Basta we wcześniejszych badaniach szklarniowych przeprowadzonych w Zespole prof. Kazimierza Adamczewskiego w Instytucie Ochrony Roślin w Poznaniu została wytypowana S245 (TL). Jako linia wrażliwa na działanie herbicydu została wytypowana linia S41336 (SL). Zaobserwowałam, iż linia S245 charakteryzuje się pokrojem zbliżonym do linii S41336. Linia wykazująca wysoką tolerancję na działanie stresu herbicydowego miała liście nieco szersze i dłuższe od linii wrażliwej. Różnicę zaobserwowałam również w kolorze liści, linia tolerancyjna posiadała ciemnozielone liście, dość odporne na uszkodzenia i stosunkowo sztywne. Liście linii wrażliwej były nieco jaśniejsze, mniejsze i wykazywały większą podatność na uszkodzenia mechaniczne.

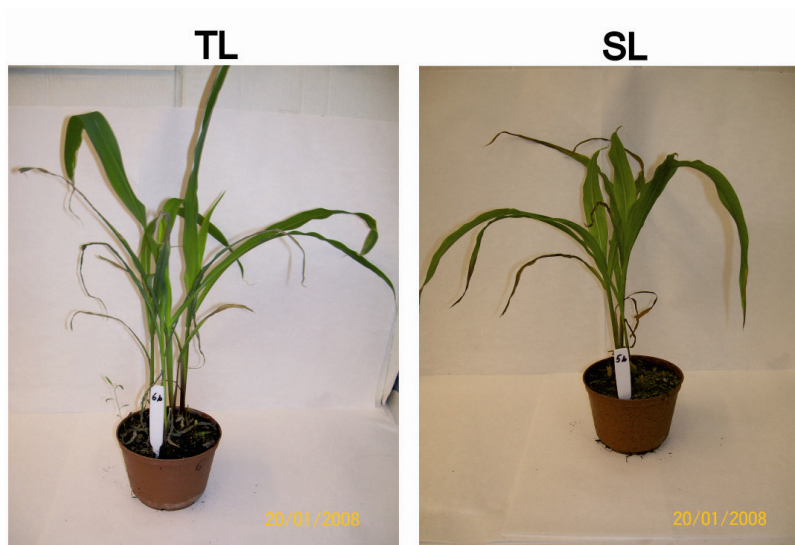
W dniu zerowym (Zdjęcie 7.) po około 5 godzinach po zastosowaniu czynnika stresowego przeprowadziłam pierwszą analizę porównawczą roślin w celu stwierdzenia czy wystąpiła reakcja fenotypowa na herbicyd. W dniu 0 nie zaobserwowałam, w porównaniu do roślin kontrolnych, zmian na powierzchni liści roślin żadnej z linii.



Zdjęcie 7. Linie kukurydzy w dniu 0 poddane działaniu herbicydu Basta. Linie tolerancyjną oznaczono jako TL, a wrażliwą jako SL.

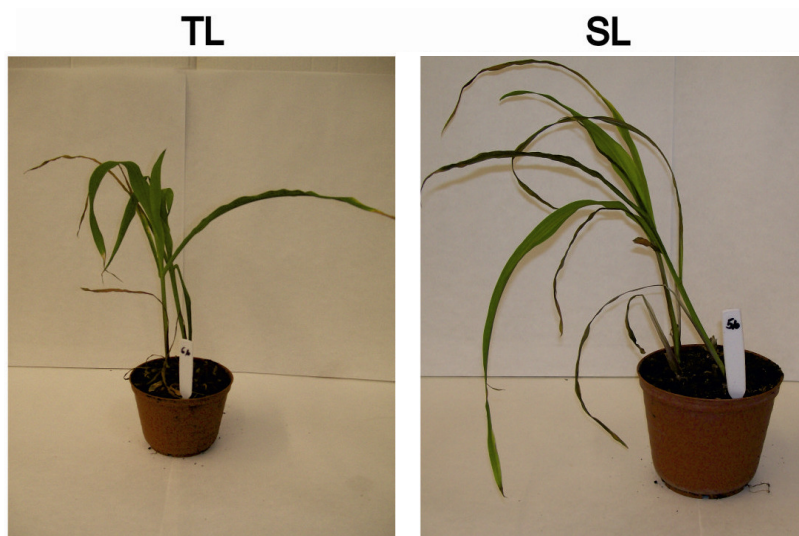
Kolejną obserwację przeprowadziłam w dniu 2., w celu określenia czy zaszły zmiany fenotypowe wywołane warunkami stresowymi. Zaobserwowałam pojawienie się lekkiego uschnięcia końców liści w odpowiedzi na działanie herbicydu Basta u linii wrażliwej na jego działanie. Z kolei u linii tolerancyjnej nie zaobserwowałam widocznych zmian fenotypowych.

W dniu 7. (Zdjęcie 8.) po traktowaniu herbicydem przeprowadziłam kolejną analizę stanu fenotypowego roślin. U linii wrażliwej kukurydzy odnotowałam postępujące usychanie końców liści w kierunku ich podstawy. U linii tolerancyjnej dochodziło do delikatnego podsychania końców niektórych z liści.



Zdjęcie 8. Linie kukurydzy w dniu 7. poddane działaniu herbicydu Basta. Linie tolerancyjną oznaczono jako TL, a wrażliwą jako SL.

Na podstawie analizy fenotypowej stwierdziłam w dniu 14. (Zdjęcie 9.) obecność rozległej nekrozy liści u linii tolerancyjnej, jednakże w porównaniu z reakcją na herbicyd Roundup u roślin wrażliwych była ona mniejsza. Oszacowałam, że około połowa liści uschła, a zjawisko usychania było szczególnie intensywne na końcach liści. U linii tolerancyjnej utrzymywały się wcześniej opisane zmiany w postaci usychania końców liści.



Zdjęcie 9. Linie kukurydzy w dniu 14. poddane działaniu herbicydu Basta. Linie tolerancyjną oznaczono jako TL, a wrażliwą jako SL.

W ostatnim dniu analizy fenotypowej – 21., u linii wrażliwej zanotowałam uschnięcie ponad połowy liści. Przybrały kolor brunatno-pomarańczowy i uległy wysuszeniu. Rozwój i wzrost rośliny, podobnie jak w przypadku zastosowania innych herbicydów, zostały znacznie zahamowane. U linii tolerancyjnej uschły głównie końce liści, jednakże roślina utrzymała swój pierwotny pokrój i nadal rosła. Pomimo widocznych zmian na liściach nie zmieniły one swojego koloru. Wzrost rośliny w porównaniu do rośliny kontrolnej został nieco spowolniony.

Przeprowadzone obserwacje zmian fenotypowych pozwoliły mi na stwierdzenie, że w dniu stosowania herbicydu nie obserwowałam zmian fenotypowych w żadnym przypadku. Zdecydowałam, że zgodnie z danymi literaturowymi w czasie 5 godzin po zabiegu oprysku, herbicyd powinien przeniknąć do liści i zacząć działać na roślinę (Ge i in. 2011). Jeśli wystąpiła wczesna reakcja obronna w komórkach roślinnych to powinna być ona widoczna w zebranych w tym czasie materiale. Po 7 dniach od zastosowania stresu herbicydowego widoczne były zmiany nekrotyczne na liściach kukurydzy. Stwierdziłam, że mechanizmy odpowiedzialne za kształtowanie odporności na działanie stresu powinny być w pełni aktywne, ponieważ obserwowałam wyraźne różnice w poziomie plam nekrotycznych u linii wrażliwej i tolerancyjnej. W późniejszych dniach nieliczne zmiany nekrotyczne pojawiały się również u linii tolerancyjnej. Jednocześnie zmiany widoczne u linii wrażliwej były już bardzo intensywne. Nasilone zmiany nekrotyczne na liściach świadczą o silnej reakcji rośliny na stres i śmierci komórek, co bezpośrednio przekłada się na jakość materiału biologicznego, szczególnie RNA uzyskiwanego z takiej rośliny. Zaplanowane przeze mnie analizy wymagały materiału biologicznego wysokiej czystości i jakości, przez co należy rozumieć niezdegradowane RNA, DNA i chromatynę. Zastosowanie materiału roślinnego w skrajnym stadium nekrozy mogło wpłynąć na wykazanie zmian obecnych podczas procesów śmierci komórek, a nie mechanizmów obronnych zaangażowanych w reakcję na stres herbicydowy.

W przypadku herbicydu Roundup odnotowano różne mechanizmy kształtowania cechy odporności i tolerancji na jego działanie u roślin. Należą do nich mutacja w obrębie sekwencji enzymu EPSPS lub większa ilość jego kopii obecna w komórce (Dill i in. 2000; Baerson i in. 2002). Wykazano również, że u niektórych roślin możliwe jest zajęcie metabolizmu glifosatu, a tym samym jego unieszkodliwienie. Odnotowano również, że cecha odporności może być skorelowana z mechanizmami komórkowymi związanymi z transportem i magazynowaniem glifosatu w tkankach rośliny (Franz i in. 1997). Rośliny

L. rigidum wykazujące cechę odporności na glifosat transportowały herbicyd do końców liści, co powodowało ich usychanie. Taki mechanizm umożliwił wzrost i dalszy rozwój pozostałej części rośliny. Rośliny wrażliwe magazynowały czynnik aktywny herbicydu u podstawy liści, co skutkowało powolnym ich usychaniem i śmiercią rośliny (Lorraine-Colwill i in. 2003). W przypadku obserwowanych przeze mnie zmian fenotypowych u linii kukurydzy wykazującej tolerancję na Roundup można wykazać ich podobieństwo do opisywanych w literaturze u roślin odpornych. Zannotowałam usychanie końców liści rośliny tolerancyjnej, a pozostała część dalej się rozwijała i rosła. Linia wrażliwa wykazywała zmiany nekrotyczne na całej powierzchni liści i powoli zamierała. Zaobserwowane przeze mnie zmiany fenotypowe mogą wskazywać na związek cechy tolerancji na działanie glifosatu z jego ukierunkowanym transportem do końców liści podobnie jak obserwowano to u *L. rigidum* (Lorraine-Colwill i in. 2003). W trakcie prowadzonych badań odnotowałam, że linia tolerancyjna posiada liście bardziej odporne na uszkodzenia mechaniczne. Później przeprowadzony proces mycia liści (na potrzeby eksperymentu ChIP) pozwolił mi na stwierdzenie, że są one również silniej pokryte kutikulą. Obserwacje te korelują z wynikami innych badaczy, którzy również wykazali związek pomiędzy poziomem kutikuli i wrażliwością liści na uszkodzenia z możliwością wnikania herbicydu przez liście (Luo i in. 2012). Postuluję, że linia tolerancyjna posiadała liście mniej wrażliwe na uszkodzenia i pokryte woskami co mogło wpływać na obniżenie ilości wchłanianego glifosatu poprzez ich powierzchnię.

6.2. Analiza zmian poziomu ekspresji genów w warunkach stresowych

Kukurydza jest rośliną często i chętnie uprawianą na terenie całego świata. W związku z tak dużym rozpowszechnieniem tej rośliny istnieje wiele różnych jej odmian. Różnorodność genetyczna poszczególnych odmian kukurydzy jest o wiele większa niż u innych organizmów eukariotycznych (Luo i in. 2010). Tak duża zmienność powodowana jest obecnością sekwencji transpozonowych, które u niektórych odmian stanowią nawet 85% całego genomu (Vicent 2010). Duża zmienność genetyczna kukurydzy znacznie utrudnia porównywanie cech poszczególnych odmian na poziomie genetycznym, ale pozytywnie wpływa na zdolności przystosowawcze rośliny do warunków stresowych. Najlepszą metodą pozwalającą na zgrubne porównanie profili ekspresji genów w badanych liniach kukurydzy jest metoda mikromacierzowa. Ze względu na wysoką zmienność należało mieć na uwadze, że uzyskane dane mogą mieć charakter przesiewowy i będą

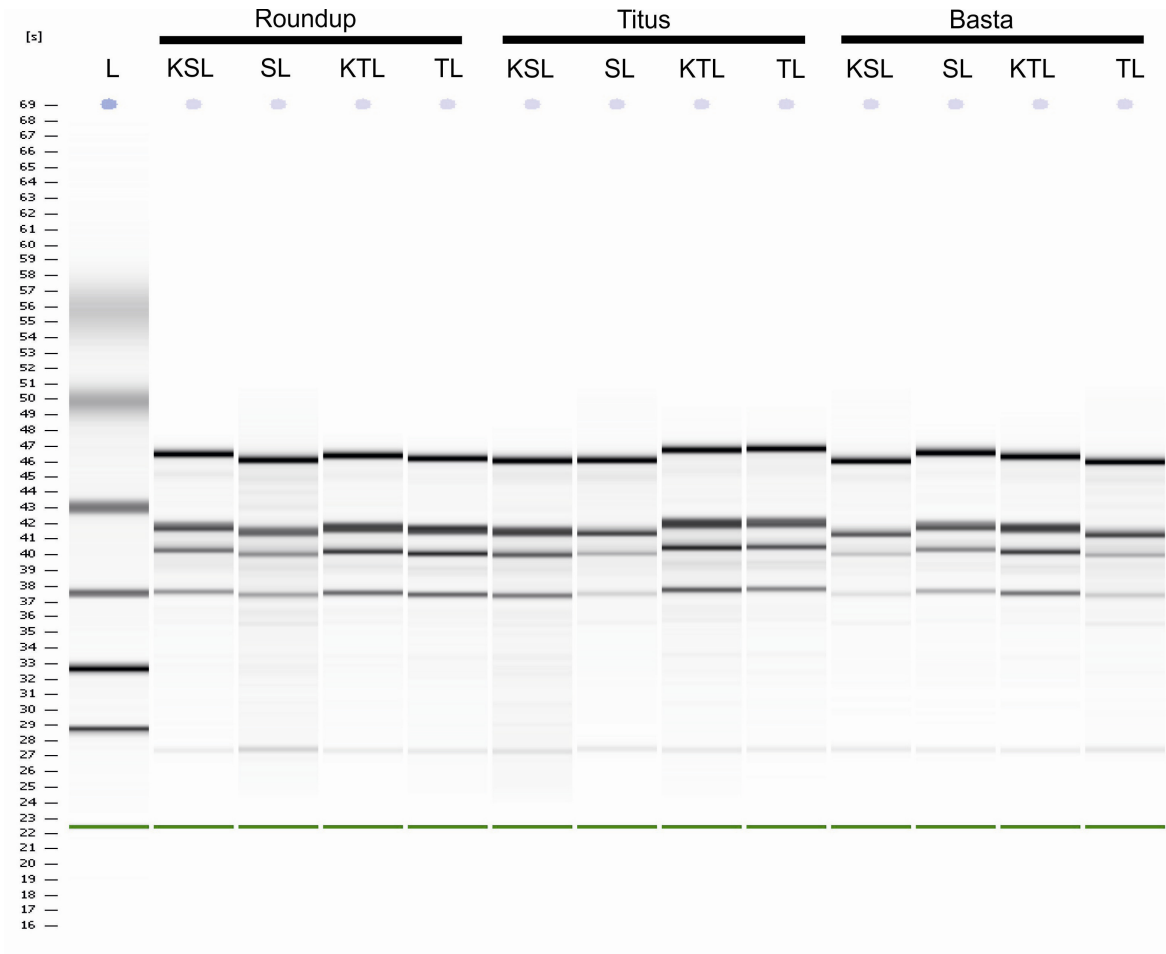
wymagały potwierdzenia inną techniką (Kirst i in. 2006). Potwierdzenie to wykonałam z wykorzystaniem PCR w czasie rzeczywistym. W celu określenia zmian w poziomie ekspresji genów kukurydzy pod wpływem herbicydów Roundup, Titus i Basta przeprowadziłam eksperymenty mikromacierzowe z wykorzystaniem macierzy oligonukleotydowych z sondami specyficznymi dla *Zea mays* (Galbraith i in. 2010).

6.2.1. Przygotowanie materiału biologicznego do analizy zmian poziomu ekspresji genów techniką mikromacierzową

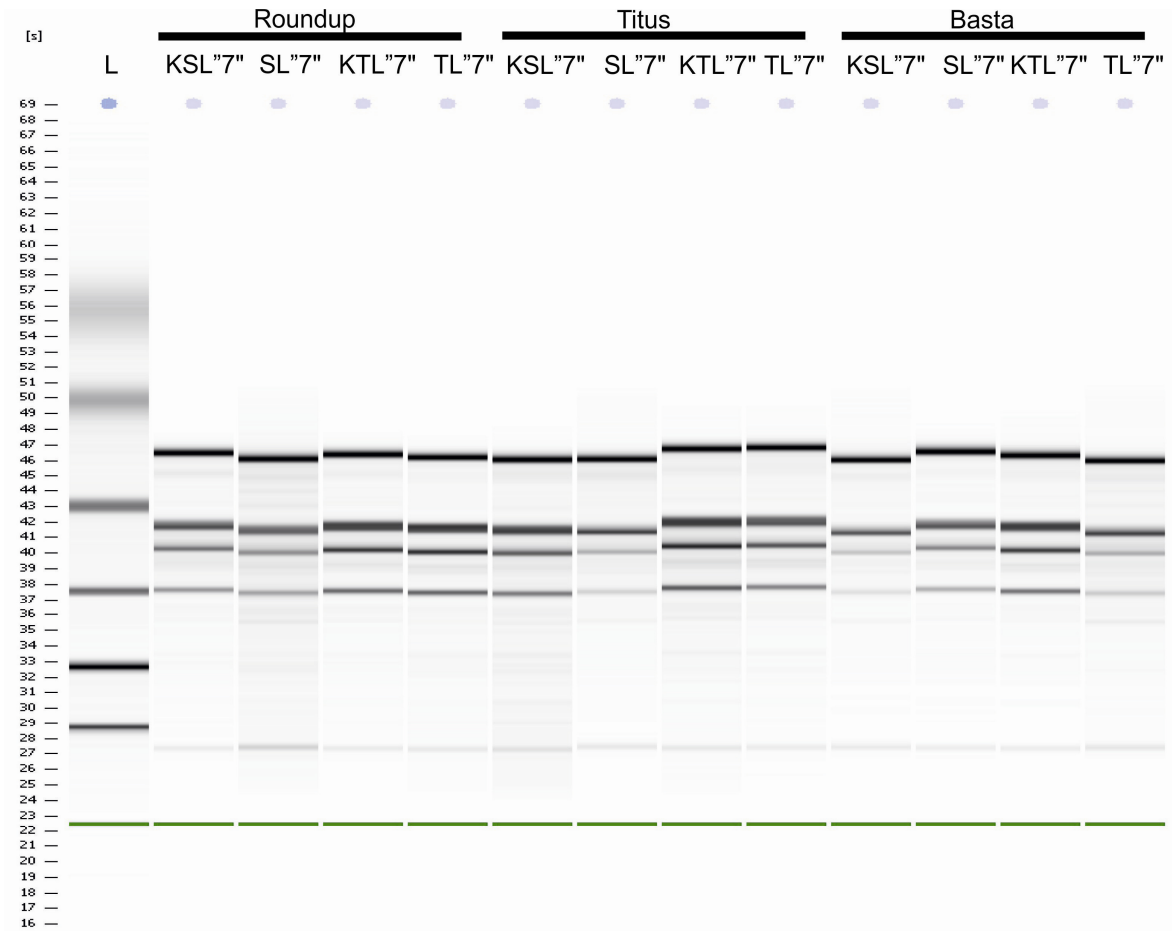
Pierwszym etapem analizy zmian poziomu ekspresji genów pod wpływem warunków stresowych była izolacja całkowitego RNA ze wszystkich badanych roślin. Z opisanych roślin kontrolnych i traktowanych herbicydami zbierałam materiał roślinny w dniu 0 i 7., homogenizowałam i zamrażałam w ciekłym azocie. Z tak przygotowanych, homogennych próbek materiału biologicznego izolowałam całkowity RNA na potrzeby eksperymentu mikromacierzowego. Następnie oczyszczałam całkowity RNA za pomocą DNazy I w celu usunięcia DNA z próbek. Średnia wydajność izolacji całkowitego RNA wynosiła 250µg z grama liści. Zauważyłam, że materiał izolowany z liści roślin poddawanych warunkom stresowym wykazywał nieco gorszą jakość, poziom degradacji RNA był zauważalnie wyższy. Zjawisko to mogło wynikać z faktu, że całkowity RNA był izolowany również z liści ze zmianami, w których następowała śmierć komórek i co za tym idzie intensywna degradacja RNA. Ze względu na obniżoną jakość izolowanego całkowitego RNA z materiału roślinnego kukurydzy poddawanej warunkom stresowym postanowiłam nie analizować zmian w poziomie ekspresji genów metodą mikromacierzową, w dniu 14. po zastosowanym zabiegu traktowania herbicydem. Podjęłam próby uzyskania całkowitego RNA z liści linii wrażliwej w dniu 14., w wyniku których otrzymałam próbki o wysokim poziomie degradacji. Uzyskiwany materiał RNA nie kwalifikował się do wykorzystania w eksperymencie mikromacierzowym (Solinska i in. 2004).

W pierwszej kolejności, oczyszczony całkowity RNA poddawałam pomiarowi spektrofotometrycznemu w celu oznaczenia stężenia próbki. Następnie rozdzielałam je z wykorzystaniem techniki elektroforezy kapilarnej. Poniżej przedstawiłam wygenerowane przez aparat Agilent2000 elektroforogramy rozdziału dla poszczególnych próbek całkowitego RNA (Rysunki 26-29). Do dalszej analizy zakwalifikowałam próbki, które osiągały współczynnik RIN powyżej 7 w skali 1 do 10, gdzie 10 oznacza najwyższą jakość

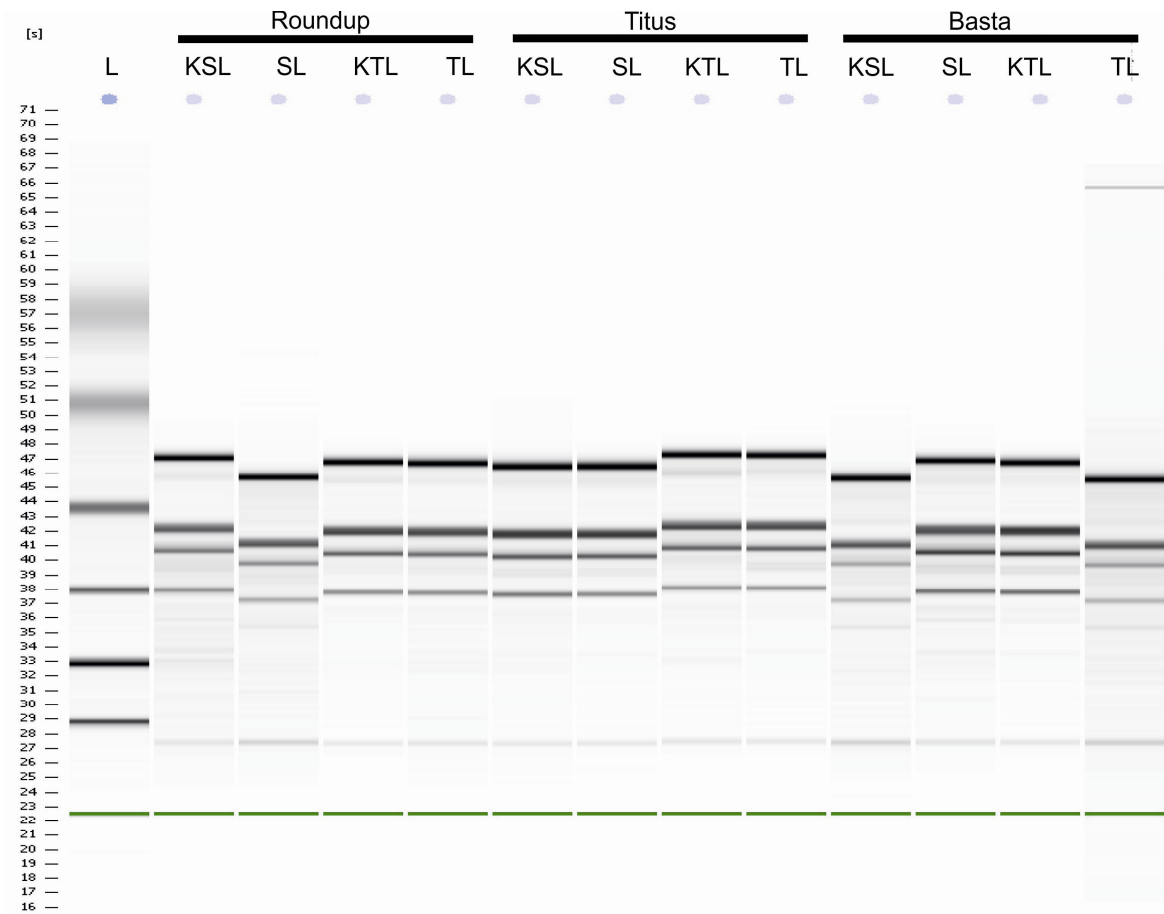
RNA (próbka niezdegradowana). Zalecana do stosowania w eksperymentach mikromacierzowych jakość RNA powinna mieć wartość RIN powyżej 8. Wartość współczynnika $RIN > 8$ stosowana jest dla próbek eukariotycznych np. przy analizie transkryptomu człowieka, czy myszy. Komórki roślinne posiadają dużą ilość półautonomicznych organelli komórkowych, jak mitochondria i plastydy, które posiadają rRNA o niższej masie cząsteczkowej niż rRNA cytoplazmatyczny. Obecność rRNA pochodzenia plastydowego wpływa na obliczoną przez aparat wartość współczynnika RIN. rRNA plastydowe kwalifikowane są jako obraz degradacji RNA i tym samym obniżają jego wartość (Schroeder i in. 2006).



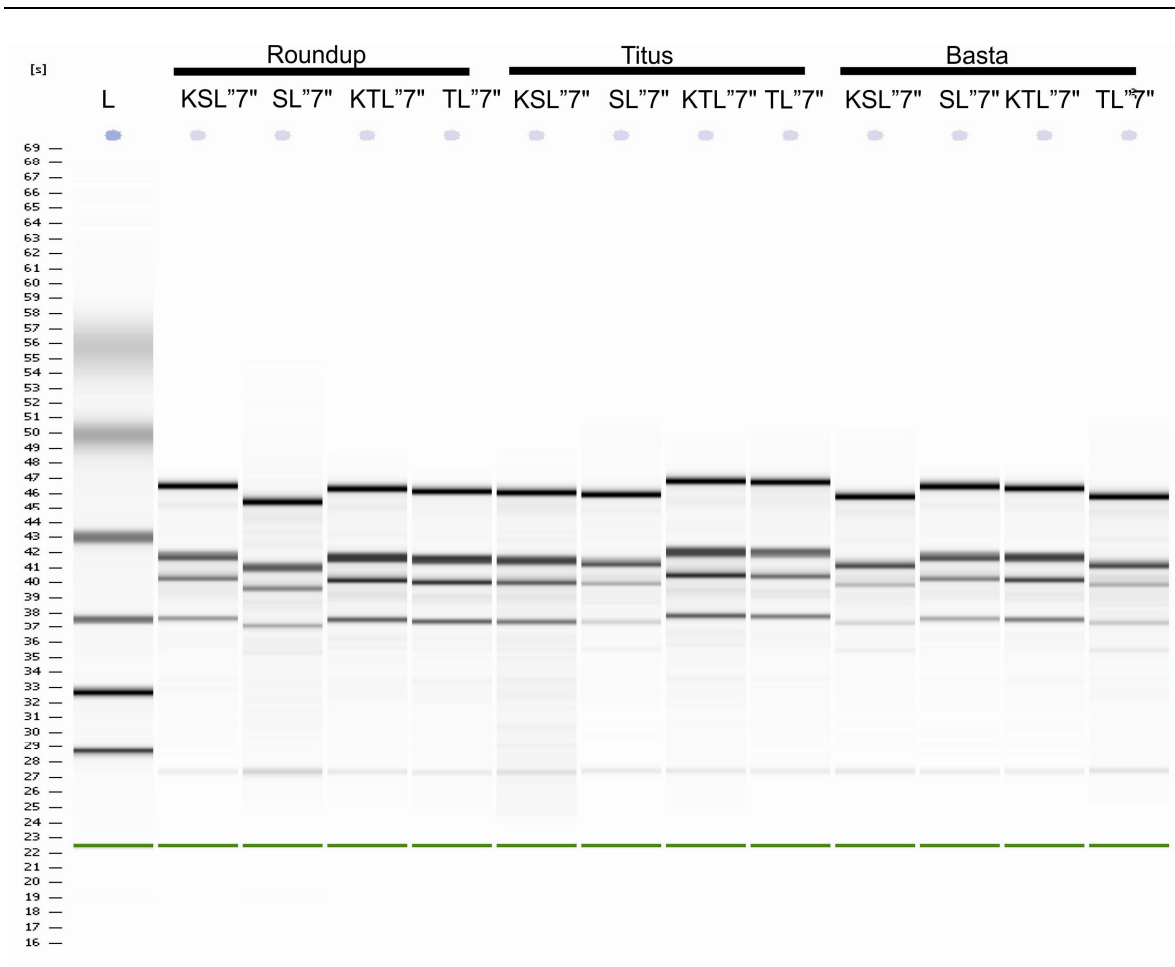
Rysunek 26. Obraz rozdziału z wykorzystaniem elektroforezy kapilarnej próbek całkowitego RNA, wykorzystanych w kolejnych etapach eksperymentu mikromacierzowego w dniu 0, pierwsze powtórzenie biologiczne. Od lewej: L – marker wielkości (od dołu prążki odpowiadają długościom cząsteczek RNA: 25 nt, 200 nt, 500 nt, 1000 nt, 2000 nt, 4000 nt), KSL – kontrolna linia wrażliwa na działanie Roundup, SL - linia wrażliwa na działanie Roundup poddana stresowi, KTL – kontrolna linia tolerancyjna na działanie Roundup, TL - linia tolerancyjna na działanie Roundup poddana stresowi, KSL – kontrolna linia wrażliwa na działanie Titus, SL - linia wrażliwa na działanie Titus poddana stresowi, KTL – kontrolna linia tolerancyjna na działanie Titus, TL - linia tolerancyjna na działanie Titus poddana stresowi, KSL – kontrolna linia wrażliwa na działanie Basta, SL - linia wrażliwa na działanie Basta poddana stresowi, KTL – kontrolna linia tolerancyjna na działanie Basta, TL - linia tolerancyjna na działanie Basta poddana stresowi.



Rysunek 27. Obraz rozdziału z wykorzystaniem elektroforezy kapilarnej próbek całkowitego RNA, wykorzystanych w kolejnych etapach eksperymentu mikromacierzowego w dniu 7., pierwsze powtórzenie biologiczne. Od lewej: L – marker wielkości (od dołu prążki odpowiadają długościom cząsteczek RNA: 25 nt, 200 nt, 500 nt, 1000 nt, 2000 nt, 4000 nt), KSL"7" – kontrolna linia wrażliwa na działanie Roundup, SL"7" - linia wrażliwa na działanie Roundup poddana stresowi, KTL"7" – kontrolna linia tolerancyjna na działanie Roundup, TL"7" - linia tolerancyjna na działanie Roundup poddana stresowi, KSL"7" – kontrolna linia wrażliwa na działanie Titus, SL"7" - linia wrażliwa na działanie Titus poddana stresowi, KTL"7" – kontrolna linia tolerancyjna na działanie Titus, TL"7" - linia tolerancyjna na działanie Titus poddana stresowi, KSL"7" – kontrolna linia wrażliwa na działanie Basta, SL"7" - linia wrażliwa na działanie Basta poddana stresowi, KTL"7" – kontrolna linia tolerancyjna na działanie Basta, TL"7" - linia tolerancyjna na działanie Basta poddana stresowi.



Rysunek 28. Obraz rozdziálu z wykorzystaniem elektroforezy kapilarnej próbek całkowitego RNA, wykorzystanych w kolejnych etapach eksperymentu mikromacierzowego w dniu 0, drugie powtórzenie biologiczne. Od lewej: L – marker wielkości (od dołu prążki odpowiadają długościom cząsteczek RNA: 25 nt, 200 nt, 500 nt, 1000 nt, 2000 nt, 4000 nt), KSL – kontrolna linia wrażliwa na działanie Roundup, SL - linia wrażliwa na działanie Roundup poddana stresowi, KTL – kontrolna linia tolerancyjna na działanie Roundup, TL - linia tolerancyjna na działanie Roundup poddana stresowi, KSL – kontrolna linia wrażliwa na działanie Titus, SL - linia wrażliwa na działanie Titus poddana stresowi, KTL – kontrolna linia tolerancyjna na działanie Titus, TL - linia tolerancyjna na działanie Titus poddana stresowi, KSL – kontrolna linia wrażliwa na działanie Basta, SL - linia wrażliwa na działanie Basta poddana stresowi, KTL – kontrolna linia tolerancyjna na działanie Basta, TL - linia tolerancyjna na działanie Basta poddana stresowi.



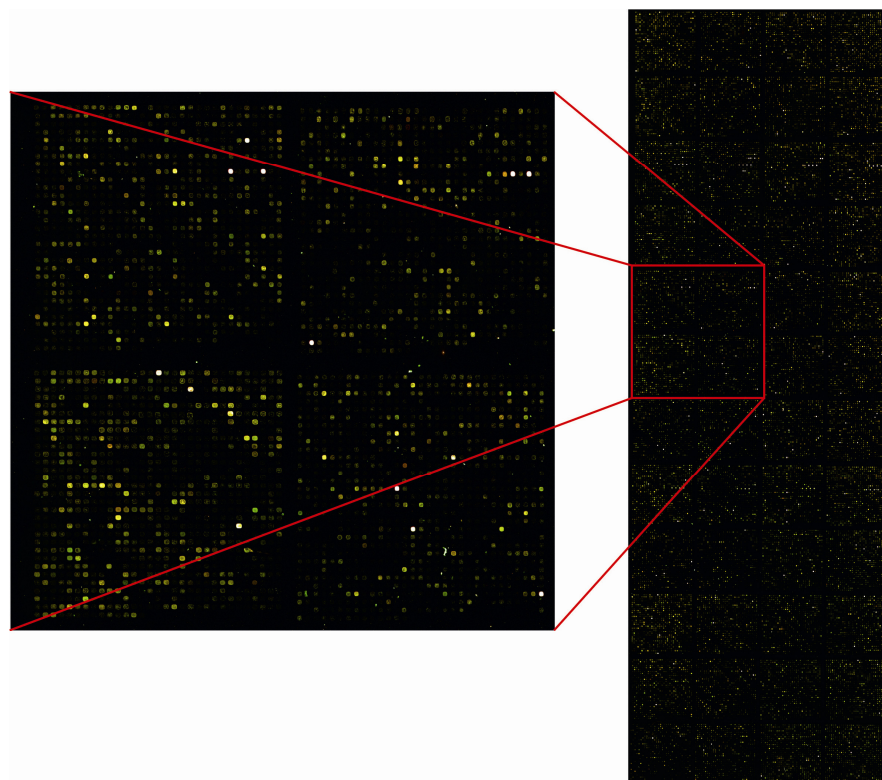
Rysunek 29. Obraz rozdziału z wykorzystaniem elektroforezy kapilarnej próbek całkowitego RNA, wykorzystanych w kolejnych etapach eksperymentu mikromacierzowego w dniu 7., drugie powtórzenie biologiczne. Od lewej: L – marker wielkości (od dołu prążki odpowiadają długościom cząsteczek RNA: 25 nt, 200 nt, 500 nt, 1000 nt, 2000 nt, 4000 nt), KSL"7" – kontrolna linia wrażliwa na działanie Roundup, SL"7" - linia wrażliwa na działanie Roundup poddana stresowi, KTL"7" – kontrolna linia tolerancyjna na działanie Roundup, TL"7" - linia tolerancyjna na działanie Roundup poddana stresowi, KSL"7" – kontrolna linia wrażliwa na działanie Titus, SL"7" - linia wrażliwa na działanie Titus poddana stresowi, KTL"7" – kontrolna linia tolerancyjna na działanie Titus, TL"7" - linia tolerancyjna na działanie Titus poddana stresowi, KSL"7" – kontrolna linia wrażliwa na działanie Basta, SL"7" - linia wrażliwa na działanie Basta poddana stresowi, KTL"7" – kontrolna linia tolerancyjna na działanie Basta, TL"7" - linia tolerancyjna na działanie Basta poddana stresowi.

Zgromadzony materiał wyizolowany z dwóch powtórzeń biologicznych w celu uzyskania cDNA, przepisałam RNA z wykorzystaniem odwrotnej transkryptazy na cDNA, które następnie znakowałam barwnikami fluorescencyjnymi Cy3 i Cy5. Po każdym z etapów analizowałam stężenie uzyskanego materiału, w celu użycia do reakcji takich

samych ilości znakowanego cDNA. Taka powtarzalność pozwalała mi na zminimalizowanie ryzyka wystąpienia zmienności w ekspresji genów, wynikającej z błędu technicznego - dodania różnych ilości wyznakowanego cDNA na płytkę macierzową (Hegde i in. 2000).

6.2.2. Analiza zmian w poziomie ekspresji genów z wykorzystaniem techniki mikromacierzowej

Analiza ekspresji genów z wykorzystaniem techniki mikromacierzowej pozwala na określenie profilu zmian poszczególnych genów w określonych warunkach środowiskowych oraz wytypowanie genów zaangażowanych w reakcję na zmiany środowiskowe rośliny (Uzarowska i in. 2009). Technika ta z powodzeniem stosowana jest do określania zmian w globalnej ekspresji genów w poszczególnych fazach rozwojowych rośliny, w różnorodnych warunkach stresowych i jako technika pozwalająca na poznanie charakterystyki transkryptomicznej odmiany (Schnable i in. 2004). Uzyskany materiał cDNA znakowany barwnikami fluorescencyjnymi Cy3 (kontrola) i Cy5 (próbka z rośliny w warunkach stresowych) w równych ilościach każdej z prób mieszano i hybrydyzowano z płytką mikromacierzową z sondami specyficznymi dla *Zea mays*.



Rysunek 30. Przykładowy obraz płytki macierzowej analizowanej z wykorzystaniem oprogramowania GenePix, linia tolerancyjna, poddana działaniu herbicydy Roundup, dzień 7.

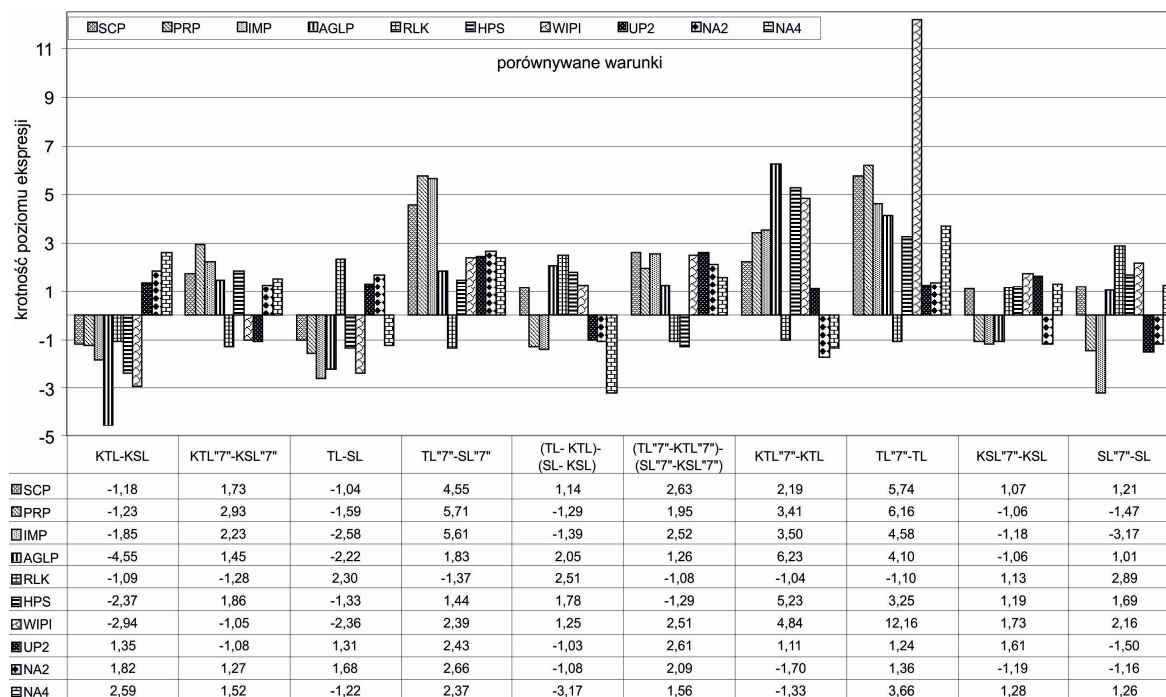
Wybrałam płytki mikromacierzowe z sondami oligonukleotydowymi dedykowanymi sekwencjom kukurydzy. Na płytkach mikromacierzowych znajdowało się 46 128 000 70-nukleotydowych sond DNA odpowiadających sekwencjom, wybranym z opublikowanych w bazach sekwencji ESTów (www.maizearray.org 2008). Po zakończeniu hybrydyzacji płytki suszono, skanowano, a następnie poddawałam je analizie z wykorzystaniem programu GenePix w celu określenia intensywności hybrydyzacji cDNA do każdej z nadrukowanych na płytce sond. Na podstawie różnic intensywności fluorescencji wynikającej ze zhybrydyzowania cDNA próbki kontrolnej i badanej do danej sondy wnioskowałam o zmianach w poziomie ekspresji genów, które były reprezentowane przez poszczególne sondy na płytce mikromacierzowej (Solinska i in. 2004).

W wyniku analizy porównawczej krotności zmian w poziomie ekspresji w poszczególnych punktach czasowych dla stosowanych herbicydów nie udało mi się wskazać genów „uniwersalnej odpowiedzi na stres herbicydowy”. Grupy, w których poziom ekspresji ulegał największej zmienności dla poszczególnych herbicydów zawierały całkowicie odmienne geny. Wnioskuje, że nie można mówić o warunkach uniwersalnego stresu herbicydowego, tylko o stresie powodowanym przez poszczególne środki ochrony roślin. Stosowane herbicydy różnią się składnikami aktywnymi i mechanizmami działania, co tłumaczy różną odpowiedź rośliny na warunki stresu na poziomie transkryptomu. W dalszych badaniach skupiałam się na analizie zmian w poziomie ekspresji w odpowiedzi na działanie herbicydu Roundup i próbie określenia mechanizmu kształtowania tej cechy.

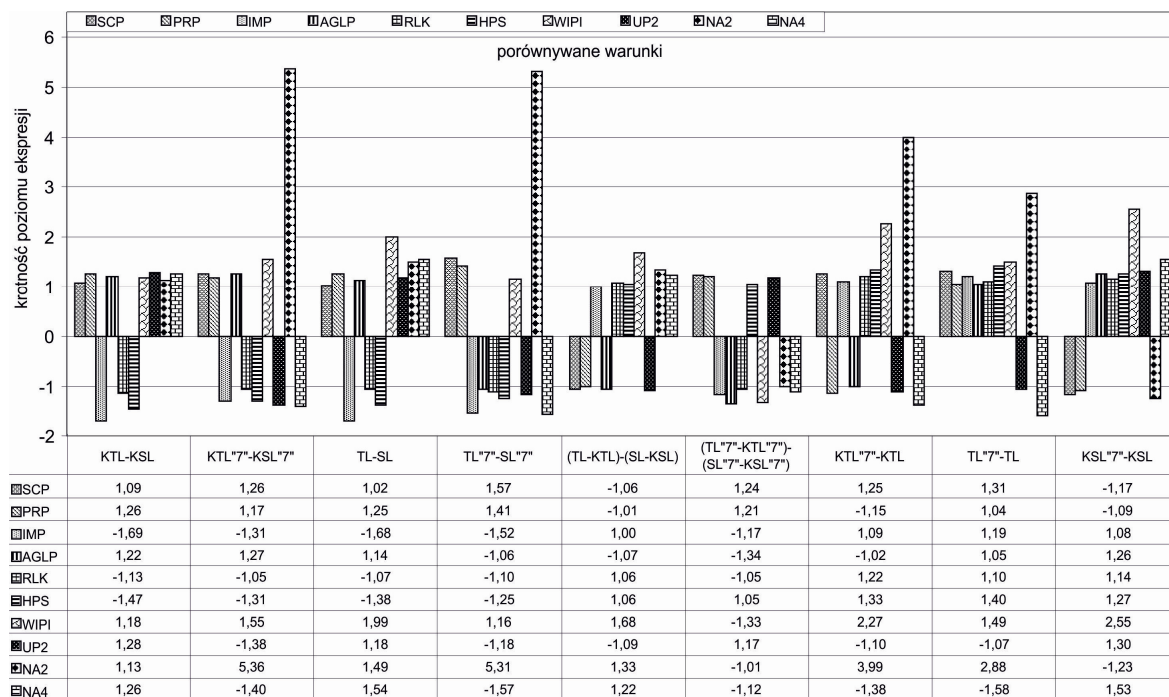
Zastosowanie analizy statystycznej umożliwiło mi wyłonienie grupy genów o największej zmienności w poziomie ekspresji w warunkach stresu wywołanego działaniem Roundup (Załącznik 1., Tabela 26.). Postanowiłam przeanalizować z uzyskanej grupy te geny, które wykazywały co najmniej 2-krotną zmianę ekspresji. W czasie przystępowania do prac badawczych nie była znana sekwencja genomu kukurydzy. Dopiero w roku 2009 został opublikowany genom linii kukurydzy B73, który prawdopodobnie znacznie różni się od genomów badanych linii (Ma i in. 2008; Schnable i in. 2009). W takiej sytuacji należało spodziewać się, że uzyskane wyniki zmian w poziomie ekspresji będą miały charakter przesiewowy i wskażą jedynie, których genów poziom ekspresji należy dokładnie zbadać z wykorzystaniem techniki rtPCR. Grupę genów wykazującą co najmniej 2-krotną zmianę w poziomie ekspresji zawężyłam do 10 genów

charakteryzujących się największą dynamiką zmian ekspresji, które postanowiłam przebadać z zastosowaniem techniki PCR w czasie rzeczywistym.

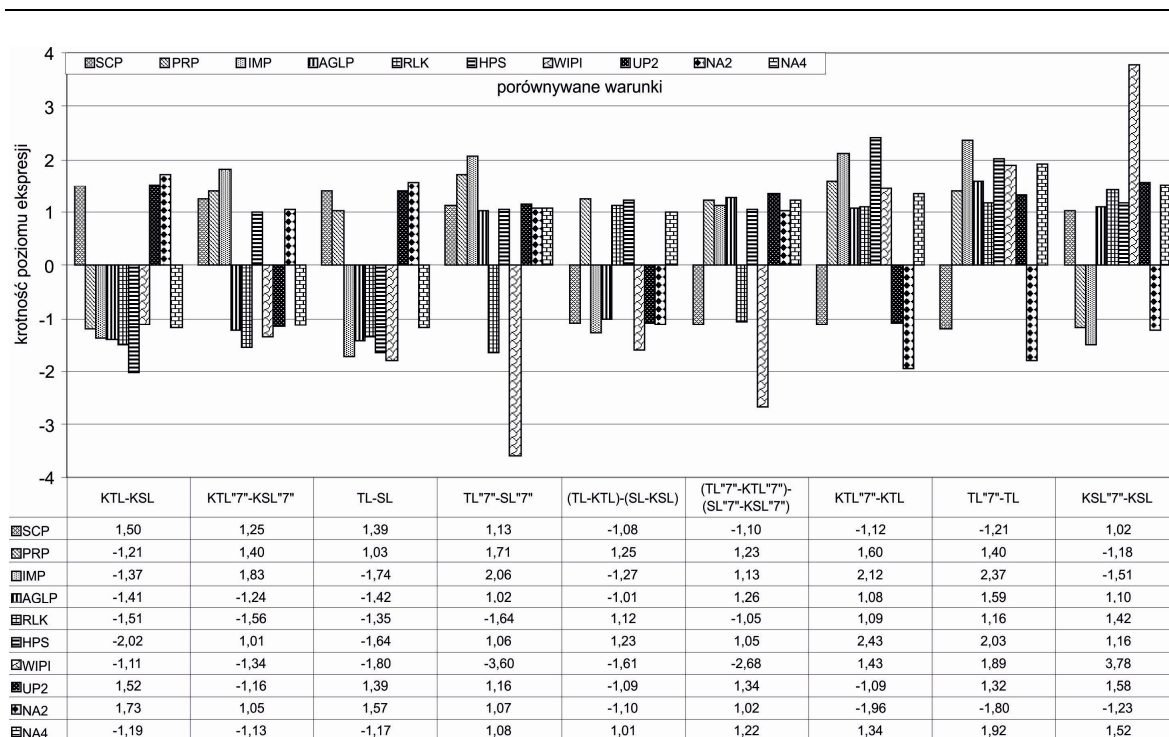
Analizując wytypowane geny zauważyłam największe zmiany w poziomie ekspresji porównując linię tolerancyjną i wrażliwą traktowane herbicydem w dniu 7. od zabiegu. Porównanie poziomu ekspresji dla linii kontrolnych pozwala stwierdzić, że nie następowały w ich obrębie istotne zmiany zarówno w dniu 0 jak i 7. Zmiany w poziomie ekspresji w czasie tygodnia od zastosowania warunków stresowych w liniach kontrolnych wywołane mogą być wzrostem rośliny i związanymi z tym różnicami w intensywności transkrypcji poszczególnych genów. W celu dokonania selekcji genów, których analiza będzie potwierdzana techniką rtPCR konieczne było porównanie warunków, w których wskazać można najsilniejsze zmiany ekspresji. Postanowiłam przeanalizować, jak zmienia się krotność ekspresji genów w czasie u linii tolerancyjnej i wrażliwej. Dla wytypowanych genów zauważyłam, że zmiany następujące w liniach wykazujących odmienną tolerancję na herbicyd są skrajnie różne. W przypadku większości genów ze wzrostem krotności zmian ekspresji u linii tolerancyjnej koreluje spadek ekspresji u roślin wrażliwych. Taka obserwacja pozwoliła mi na wnioskowanie, że właśnie te geny mogą być zaangażowane w odpowiedź na warunki stresu herbicydowego i kształtowanie cechy tolerancji. Dla porównania na wykresach 3. i 4. przedstawiłam jak kształtowały się zmiany poziomu ekspresji wybranych genów w odpowiedzi na zastosowanie herbicydów Titus i Basta. Analiza tych samych porównań warunków w czasie pozwala na stwierdzenie, że wcześniej zaobserwowana relacja zmian u linii tolerancyjnej i wrażliwej dla glifosatu nie zachodzi w przypadku działania rimsulfuronu i glufosynatu. W celu dokładnego określenia zmian w poziomie ekspresji wytypowanych genów przeprowadziłam analizę techniką real time PCR (rtPCR).



Wykres 2. Krotkość zmian poziomu ekspresji genów dla różnych porównań linii kukurydzy w przypadku zastosowania warunków stresowych wywołanych działaniem herbicydu Roundup, zmierzona techniką hybrydyzacji mikromacierzowej; $p \leq 0,1$. Na wykresie oznaczono: linię tolerancyjną oznaczono jako TL, wrażliwą jako SL, tolerancyjną w dniu 7. od zabiegu TL*7", a wrażliwą w dniu 7. od zabiegu SL*7". Skrótaami oznaczono: SCP - gen kodujący karboksypeptydazę seryny, PRP - gen kodujący białka związane z patogenezą, IMP - gen kodujący integralne białka membrany, AGLP - gen kodujący białka podobne do arabinoglikanu, RLK - gen kodujący białka kinaz podobnych do receptorowych, HPS - gen kodujący hipotetyczne białko, WIPI - gen kodujący inhibitory proteinaz indukowane zranieniem, UP2 - gen kodujący nieznane białko, NA2 - gen kodujący transkrypt 2. o nieznannej funkcji, NA4 - gen kodujący transkrypt 4. o nieznannej funkcji.



Wykres 3. Krotność zmian poziomu ekspresji genów dla różnych porównań linii kukurydzy w przypadku zastosowania warunków stresowych wywołanych działaniem herbicydu Titus, zmierzona techniką hybrydyzacji mikromacierzowej; $p \leq 0,1$. Na wykresie oznaczono: linię tolerancyjną oznaczono jako TL, wrażliwą jako SL, tolerancyjną w dniu 7. od zabiegu TL*7", a wrażliwą w dniu 7. od zabiegu SL*7". Skrótaami oznaczono: SCP - gen kodujący karboksypeptydazę seryny, PRP - gen kodujący białka związane z patogenezą, IMP - gen kodujący integralne białka membrany, AGLP - gen kodujący białka podobne do arabinoglikanu, RLK - gen kodujący białka kinaz podobnych do receptorowych, HPS - gen kodujący hipotetyczne białko, WIPI - gen kodujący inhibitory proteinaz indukowane zranieniem, UP2 - gen kodujący nieznane białko, NA2 - gen kodujący transkrypt 2. o nieznannej funkcji, NA4 - gen kodujący transkrypt 4. o nieznannej funkcji.



Wykres 4. Krotkość zmian poziomu ekspresji genów dla różnych porównań linii kukurydzy w przypadku zastosowania warunków stresowych wywołanych działaniem herbicydu Basta, zmierzona techniką hybrydyzacji mikromacierzowej; $p \leq 0,1$. Na wykresie oznaczono: linię tolerancyjną oznaczono jako TL, wrażliwą jako SL, tolerancyjną w dniu 7. od zabiegu TL*7*, a wrażliwą w dniu 7. od zabiegu SL*7*. Skrótaami oznaczono: SCP - gen kodujący karboksypeptydazę seryny, PRP - gen kodujący białka związane z patogenezą, IMP - gen kodujący integralne białka membrany, AGLP - gen kodujący białka podobne do arabinoglikanu, RLK - gen kodujący białka kinaz podobnych do receptorowych, HPS - gen kodujący hipotetyczne białko, WIPI - gen kodujący inhibitory proteinaz indukowane zranieniem, UP2 - gen kodujący nieznane białko, NA2 - gen kodujący transkrypt 2. o nieznannej funkcji, NA4 - gen kodujący transkrypt 4. o nieznannej funkcji.

6.2.3. Przygotowanie materiału biologicznego do analizy zmian w poziomie ekspresji genów techniką PCR w czasie rzeczywistym

Kukurydza jest powszechnie uprawianą rośliną o dużym znaczeniu gospodarczym, a bardzo niewiele wiadomo o genotypach poszczególnych odmian. Prowadzone są intensywne badania mające na celu zgłębienie tematyki pochodzenia i ewolucji *Z. mays*, jednak mnogość dostępnych odmian o nieznanach genotypach stanowi wyzwanie dla badaczy (Hufford i in. 2012). Przystąpiłam do analizy sekwencji genów wybranych z pomocą danych uzyskanych z eksperymentu mikromacierzowego. Pierwszy etap analizy polegał na określeniu czy sekwencja sondy obecnej na płycie mikromacierzowej odpowiadającej wytypowanemu genom może wiązać się niespecyficznie do sekwencji

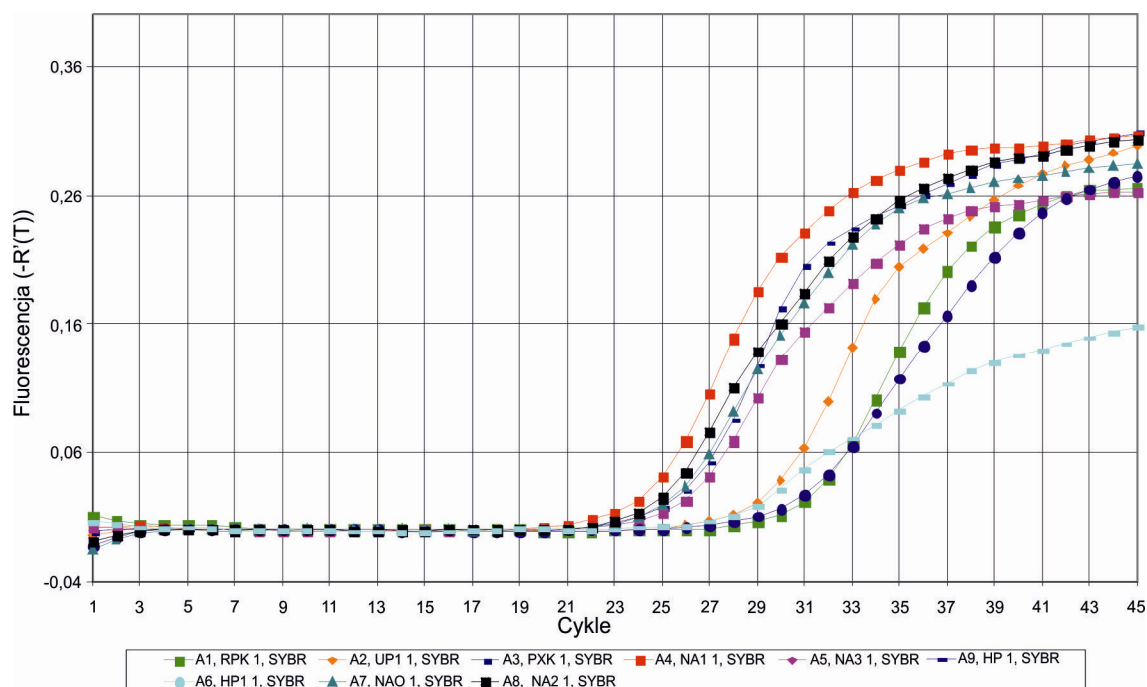
innych transkryptów. Tak jak wcześniej wspomniałam, macierze wykorzystywane w pracy projektowane były w oparciu o sekwencje cDNA, a nie genomu kukurydzy. W tym celu przeszukałam internetowe bazy danych i sprawdziłam czy faktycznie sekwencje sond odpowiadały przypisanym im na macierzy genom i czy istnieje ich podobieństwo do sekwencji genów u innych gatunków. Jednocześnie zapoznałam się z pełną, obecną w bazach sekwencją poszczególnych transkryptów i kodujących je genów. Stwierdziłam, że na temat większości sekwencji niewiele wiadomo, a ich długości zamieszczone i opisane w bazach danych znacznie się różnią. Na potrzeby projektowania par starterów do analizy ich ekspresji metodą rtPCR dla każdego z transkryptów, wykorzystałam sekwencję wspólną dla danego transkryptu obecną w poszczególnych bazach. Mając na uwadze dużą zmienność kukurydzy należało liczyć się z faktem, że sekwencje poszczególnych transkryptów w badanych liniach mogą się różnić od tych opisanych w bazach danych. Przypuszczenia te potwierdziły się w trakcie testowania par zaprojektowanych starterów, które wielokrotnie nie dawały produktu w reakcji rtPCR lub dawały produkty niespecyficzne. Po wielu próbach otrzymałam po parze specyficznych starterów dla genów wytypowanych z eksperymentów mikromacierzowych oraz dla genu referencyjnego kodującego Tubulinę 1. W poszukiwaniu odpowiedniego genu referencyjnego przetestowałam pary primerów zaprojektowane dla różnych genów, zalecane przez autorów publikacji dotyczących analiz techniką rtPCR u kukurydzy, ale większość z proponowanych sekwencji starterów nie dawała produktu w przypadku analizowanych przeze mnie linii. Zjawisko to można tłumaczyć różnicami obecnymi w sekwencji genów kukurydzy, dla których zaproponowano primery. Sekwencje starterów do reakcji real time PCR zaprojektowałam z wykorzystaniem programu Prim3 i nazwałam zgodnie z nazwą białka lub transkryptu kodowanego przez badany gen, do którego były one zaprojektowane.

Wyizolowany RNA poddałam odwrotnej transkrypcji w celu uzyskania cDNA, który stanowił matrycę do reakcji PCR w czasie rzeczywistym. Zaprojektowane startery do genów wytypowanych jako zaangażowane w odpowiedź na stres herbicydowy przetestowałam, aby sprawdzić jaka jest optymalna temperatura dla przebiegu reakcji rtPCR z zastosowaniem PCR w gradiencie temperatury oraz czy w wyniku reakcji powstaje jednorodny produkt o długości zgodnej z obliczeniami programu Prim3. Produkty reakcji rozdzielałam na 2% żelu agarozowym. Zoptymalizowane warunki analizy

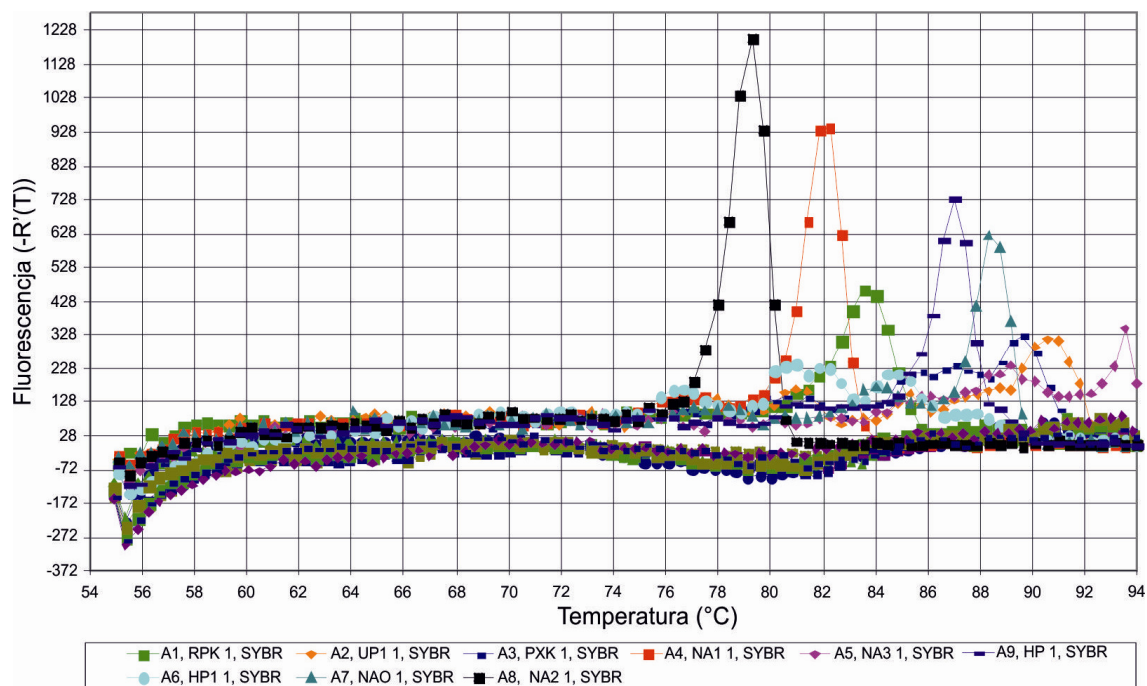
pozwołyły na przeprowadzenie reakcji rtPCR z możliwie największą dokładnością pozwalającą na wskazanie dynamiki zmian ekspresji wcześniej wytypowanych genów.

6.2.4. Analiza zmian w poziomie ekspresji genów z wykorzystaniem techniki PCR w czasie rzeczywistym

Z wykorzystaniem sprawdzonych starterów i zoptymalizowanej ilości składników reakcji przystąpiłam do analizy zmian w przyroście produktu PCR w czasie rzeczywistym. Dla każdego z genów wykreślono krzywą przyrostu produktu reakcji w zależności od czasu oraz krzywą temperatury topnienia dupleksu uzyskanego produktu. Krzywe, takie jak przykładowe wskazane na wykresach 5. i 6., poddałam analizie w celu stwierdzenia czy nie powstają dodatkowe, niespecyficzne produkty reakcji i czy nie zachodzi zjawisko powstawania dimerów starterów. Powstawanie dimerów starterów i niespecyficznych produktów reakcji wpływa na zafałszowanie wyników i uniemożliwia właściwą interpretację prowadzonych analiz. Produkty wszystkich reakcji rtPCR rozdzielane były elektroforetycznie na żelu agarozowym, w celu potwierdzenia czy uzyskany produkt był jednorodny i specyficzny.

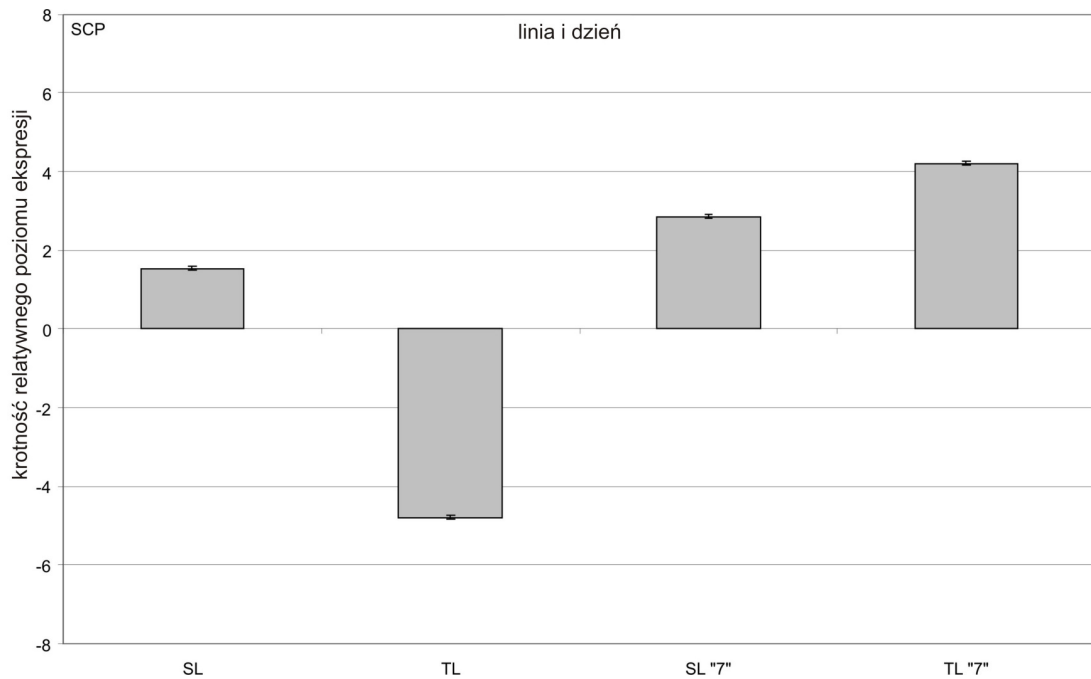


Wykres 5. Przykładowa analiza przyrostu produktu reakcji PCR w czasie rzeczywistym – krzywa obrazuje przyrost poziomu fluorescencji wraz ze wzrostem ilości produktu reakcji.



Wykres 6. Przykładowa krzywa topnienia produktu reakcji PCR w czasie rzeczywistym – krzywa obrazuje zmiany fluorescencji w funkcji temperatury i charakteryzuje temperaturę topnienia dupleksów poszczególnych produktów reakcji.

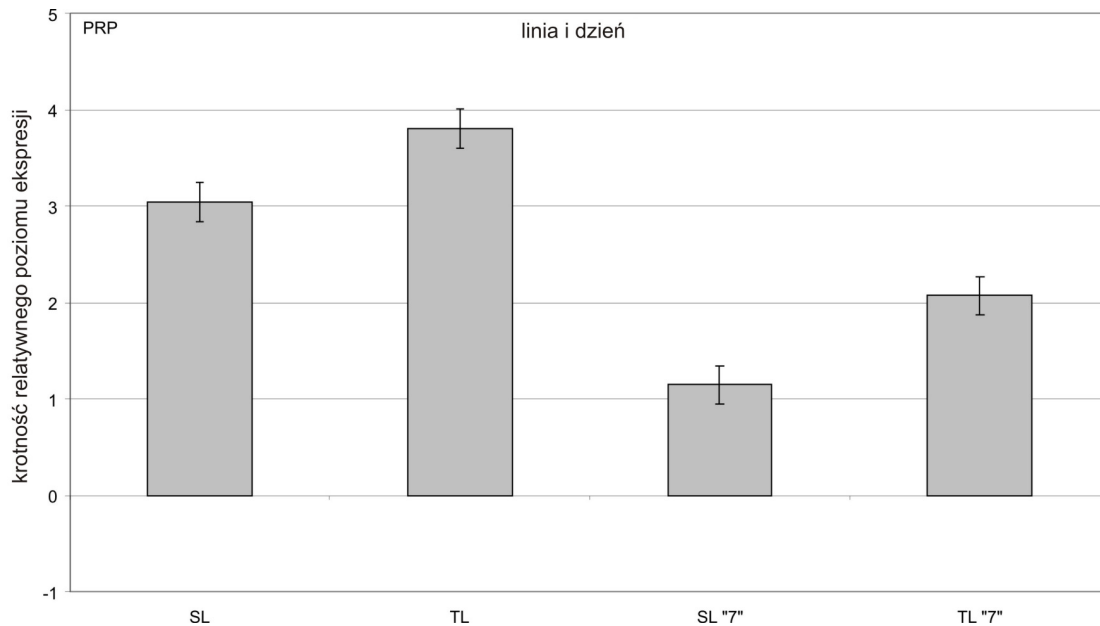
Wykreślone zostały krzywe stężeniowe (zależność ΔC_t od stężenia) aby ocenić, czy wybrany gen referencyjny Tubuliny 1 jest dobrze dobrany do genów badanych (Liu i in. 2008). Następnie przystąpiłam do analizy ekspresji genów wytypowanych w eksperymentach mikromacierzowych techniką rtPCR. Eksperyment prowadziłam w dwóch powtórzeniach biologicznych i dwóch technicznych. Określoną za pomocą techniki PCR w czasie rzeczywistym krotność zmian w relatywnym poziomie ekspresji genów przedstawiłam na wykresach 7-17.



Wykres 7. Analiza porównawcza zmian w relatywnym poziomie ekspresji genu kodującego białka SCP; $p \leq 0,05$; \pm SD. Linię tolerancyjną oznaczono jako TL, wrażliwą jako SL, tolerancyjną w dniu 7. od zabiegu TL "7", a wrażliwą w dniu 7. od zabiegu SL "7".

Pierwszym z analizowanych genów był gen odpowiedzialny za kodowanie białka podobnego do karboksypeptydazy seryny (SCP). Karboksypeptydazy to grupa białek zidentyfikowana u wielu roślin licząca ponad 50 przedstawicieli (Fraser i in. 2005; Feng i in. 2006). Opisano, że białka te są aktywne w odpowiedzi na zranienie rośliny i w metabolizmie ksenobiotyków. Białka SCP to egzopeptydazy katalizujące reakcję hydrolizy wiązania peptydowego na C–końcu białek i peptydów w środowisku kwasowym (Mahoney i in. 2001). Często grupa białek SCP nazywana jest też białkami podobnymi do karboksypeptydaz, ponieważ wykazano dla niektórych z nich również aktywność acetylotransferazową (Schaller 2004). Liczne analizy pozwoliły na poznanie roli niektórych białek SC, które jak się sugeruje zaangażowane są w procesy związane ze wzrostem i rozwojem rośliny, jak programowana śmierć komórki, rozwój nasion oraz ścieżki sygnałne związane ze wzrostem i rozwojem (Bienert i in. 2012). Niezwykle interesujące jest to, że wykazano, iż obecność karboksypeptydaz w wakuolach może być związana z katabolizmem alachloru będącego pierwszym etapem rozkładu tego herbicydu (Wolf i in. 1996). Aktywność tych enzymów wiązana jest często z wystąpieniem warunków stresowych dla rośliny. Wykazano, że po czasie 12 h od zranienia liścia u pomidora znacznie wzrasta ekspresja genów kodujących SCP (Feng i in. 2006).

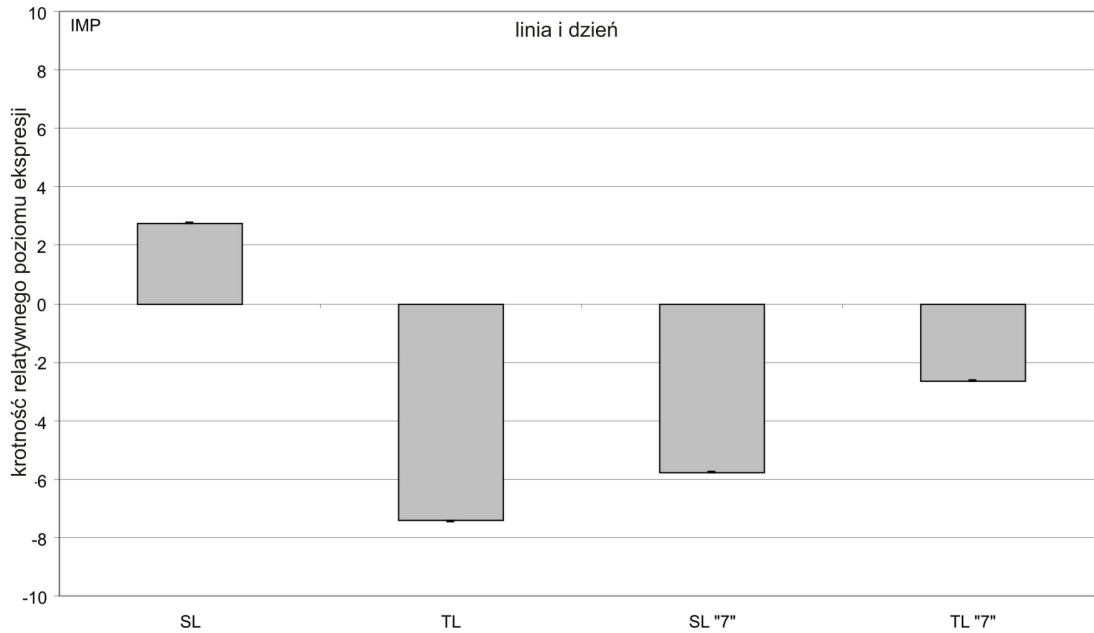
Po zastosowaniu herbicydu Roundup zauważyłam po 7 dniach u linii wrażliwej istotny (1,3-krotny) wzrost ekspresji genu kodującego białka SC. U linii tolerancyjnej zanotowałam podobną tendencję (5-krotny wzrost), jednak była ona dużo silniejsza. W dniu 0, u linii tolerancyjnej relatywny poziom ekspresji był dużo niższy aniżeli u SL. W 7. dniu od zabiegu oprysku herbicydem, relatywny poziom ekspresji SCP u linii tolerancyjnej był istotnie wyższy aniżeli u linii wrażliwej. Stwierdziłam, że warunki stresu herbicydowego silnie wpływają na zwiększenie poziomu ekspresji genów białek karboksypeptydazy seryny. Wykazano związek SCP z metabolizmem ksenobiotyków w komórce, a szczególnie duża aktywność tego procesu została opisana w warunkach obniżonego pH. Sugeruje się, że większość z tych procesów zachodzi w wakuolach (Li i in. 2001). W pracach poświęconych mechanizmom odpowiedzialnym za kształtowanie tolerancji na glifosat wykazano, że może on być gromadzony w wakuolach i w nich ulegać metabolizmowi (Zelaya i in. 2004). Postuluję, że białka SCP mogą być zaangażowane w gromadzenie glifosatu w wakuolach. Zaobserwowałam wyraźne zwiększenie ekspresji genów odpowiedzialnych za kodowanie białek karboksypeptydaz, a stosowany roztwór herbicydu cechuje niskie pH. Istnieje więc możliwość, że białka z grupy karboksypeptydaz biorą udział w ścieżce metabolicznej związanej z rozkładem składników herbicydu, w tym glifosatu. Sugeruje się, że białka te mogą brać udział w drugą po ścianie i błonie komórkowej linii obrony przed czynnikami stresowymi (van Loon i in. 2006). Podwyższony poziom SCP opisano u kukurydzy w wyniku ataku patogenu (Morris i in. 1998). Stwierdzono, że ekspresja genów kodujących białka SC wiąże się bezpośrednio ze stresem oksydacyjnym ścian komórkowych (Morris i in. 1998). Wykazano, że zastosowanie herbicydu Roundup wywołuje u rośliny stres oksydacyjny, tak więc wnioskuję, że zanotowane przeze mnie zmiany w poziomie ekspresji SCP u linii tolerancyjnej związane są z obroną przed działaniem glifosatu (Ahsan i in. 2008). Postuluję, że białka te zaangażowane są w procesy krzyżowego oddziaływania i komunikacji czynników sygnałnych w komórce, ponieważ często zmiany w poziomie ich ekspresji odnotowywano w kontekście kontaktu z patogenami i związanymi z tym zmianami hormonalnymi (De Vos i in. 2005).



Wykres 8. Analiza porównawcza zmian w relatywnym poziomie ekspresji genu kodującego białka SCP; $p \leq 0,05$; $\pm SD$. Linie Linie tolerancyjną oznaczono jako TL, wrażliwą jako SL, tolerancyjną w dniu 7. od zabiegu TL"7", a wrażliwą w dniu 7. od zabiegu SL"7".

Rośliny nie posiadają układu immunologicznego, ale wykształciły mechanizmy pozwalające im radzić sobie podczas narażenia na atak patogenów. Wytwarzanie substancji szkodliwych lub odstrasżających potencjalne patogeny, jak i programowana śmierć komórki pozwalają roślinie na walkę z stresem biotycznym (Kitajima i in. 1999). Białka związane z patogenezą (PRP) pojawiają się w roślinie pod wpływem ataku patogenu, jego wzrostu i mają na celu uruchomienie licznych szlaków komórkowych pozwalających roślinie na obronę (Bowles 1990). Wykazano również zwiększoną ekspresję genu kodującego PRP w trakcie osiągnięcia przez roślinę odporności na atakujący ją patogen. PRP to rodzina białek licząca 17 podrodzin. Białka te sklasyfikowano ze względu na ich aktywność enzymatyczną (van Loon i in. 2006). Grupa PRP 1, która jest proponowana w opisie do sondy reprezentującej ten gen na mikromacierzy, jest słabo poznana, a jej rola enzymatyczna nieznana (Van Loon i in. 1999). Białka te opisuje się jako małowzrostkowe, prawdopodobnie sygnałne, które pojawiają się w komórce (zarówno mRNA, jak i białko) po infekcji lub kontakcie z patogenem (Van Loon i in. 1994). Stwierdzono również, że niektóre z białek PR mogą być produkowane i magazynowane w wakuolach, co w razie ataku umożliwia ich szybki transport do błony i ściany komórkowej. Sugeruje się, że PRP mogą mieć znaczenie również dla roślin zdrowych, nie narażonych na stres (Van Loon i in. 1987).

W czasie 7 dni od zastosowania warunków stresowych u linii wrażliwej doszło do wyraźnego 2-krotnego obniżenia relatywnego poziomu ekspresji genu PRP. Do obniżenia relatywnego poziomu ekspresji doszło również u linii tolerancyjnej (1,8-krotny spadek). Odnotowałam, że w dniu 0 relatywny poziom ekspresji tego genu był wyższy u TL niż SL. Po siedmiu dniach od oprysku stosunek między poziomami ekspresji u linii tolerancyjnej i wrażliwej został zachowany. Białka związane z patogenezą zostały opisane u kukurydzy w kontekście indukowania odpowiedzi i odporności na choroby. Najwyższy poziom ekspresji genu PRP obserwowano po 8 i 16 godzinach od ataku patogenu, po czym po 7 dniach poziom transkryptu podobny był do tego prezentowanego w kontroli (Morris i in. 1998). Zbadano częstotliwość występowania tych białek i stwierdzono, że są one tkankowo-specyficzne, a wraz ze wzrostem i starzeniem rośliny mogą ulegać akumulacji w takich organach jak korzenie czy owoce (Fujimoto i in. 1998; Lanubile i in. 2010). Stwierdzono, że białka PR pełnią istotną rolę w obronie rośliny, szczególnie w procesie przekazywania sygnałów odpowiedzi na stres spowodowany atakiem pasożytów (Kitajima i in. 1999). U linii tolerancyjnej zanotowałam obniżenie poziomu ekspresji, wydaje się zatem że w wyniku stresu herbicydowego obserwowałam zjawisko przeciwne do opisywanych w literaturze w przypadku innych stresów. U kukurydzy odnotowano, że pod wpływem ataku grzyba podwyższeniu uległa ekspresja genu PR. Wysoką ekspresję odnotowano po 48h od zaistnienia warunku stresowego (Lanubile i in. 2010). Obserwowana przeze mnie ekspresja genu PRP również była wyższa w 5 godzin po zastosowaniu warunków stresowych aniżeli w dniu 7. Można wnioskować, że geny te biorą udział we wczesnej odpowiedzi na stres u kukurydzy, nie należy ich jednak wiązać z kształtowaniem cechy odporności na glifosat. Za wnioskiem tym przemawia fakt, że obserwowałam w dniu 0 podwyższony poziom ekspresji tych genów, jednak był on wyraźnie wyższy u linii wrażliwej kukurydzy.

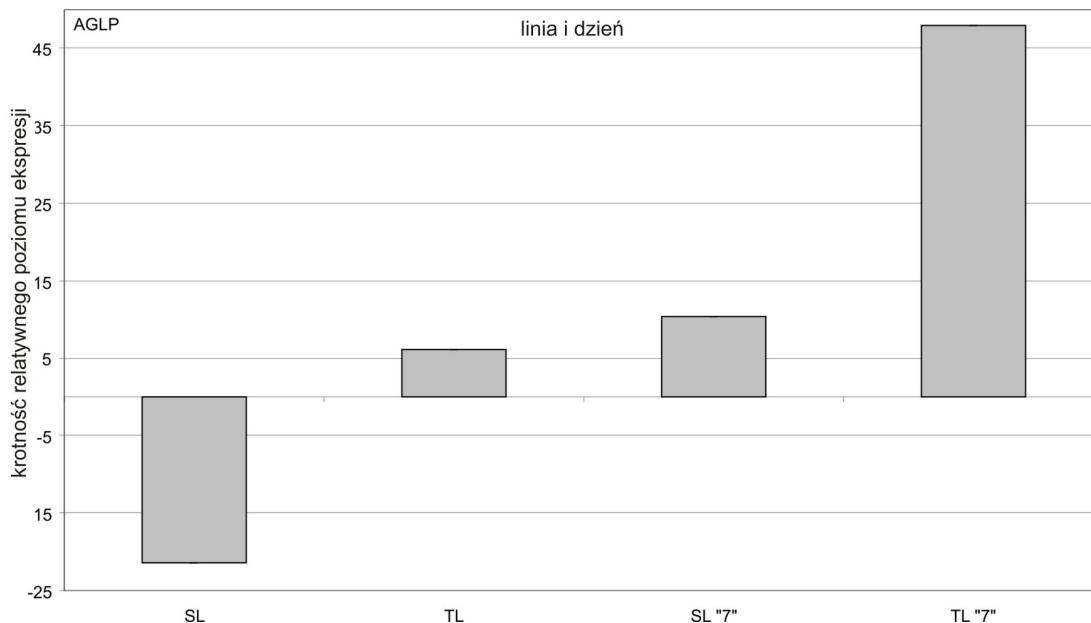


Wykres 9. Analiza porównawcza zmian w relatywnym poziomie ekspresji genu kodującego białka SCP; $p \leq 0,05$; $\pm SD$. Linie tolerancyjną oznaczono jako TL, wrażliwą jako SL, tolerancyjną w dniu 7. od zabiegu TL "7", a wrażliwą w dniu 7. od zabiegu SL "7".

Ściany i błony komórkowe stanowią naturalną barierę chroniącą komórkę przed czynnikami środowiskowymi i umożliwiają zachowanie w jej wnętrzu stabilnych warunków, optymalnych dla zachodzących procesów biochemicznych (Schwacke i in. 2003). Błony komórkowe stanowią miejsce zakotwiczenia różnorodnych białek, m.in. receptorowych biorących udział w odpowiedzi na ataki patogenów i ścieżki sygnałne, enzymów biorących udział w biosyntezie ścian komórkowych, transporterów biorących udział w eksporcie i imporcie jonów oraz rozpuszczonych substancji przez błonę pomagających w utrzymaniu odpowiedniego gradientu stężeń; łączą kompartmenty komórki i komórki oraz pośredniczą w przekazywaniu sygnałów pomiędzy nimi (Frommer i in. 1995). Takim białkiem jest IMP czyli produkt genu, który odpowiedzialny jest za kodowanie integralnego białka membrany, nierozłącznie związanego z umiejscowieniem i funkcją błon biologicznych (Schwacke i in. 2003; Kadauke i in. 2009). Zaproponowano, że białko to w roślinach może pełnić dodatkową rolę związaną z kontaktowaniem się komórki roślinnej z przestrzenią międzykomórkową. W warunkach stresu środowiskowego to ściana i błona komórkowa pierwsze mają z nim kontakt i stanowią najwcześniejszą linię obrony (Wakabayashi i in. 1997; Schwacke i in. 2003).

W efekcie zastosowanego stresu herbicydowego zauważyłam, że po upływie 7 dni u linii tolerancyjnej relatywny poziom ekspresji genu IMP wzrósł 5-krotnie. Przeciwnie

zjawisko zaobserwowałam dla linii wrażliwej, u której relatywny poziom ekspresji tego genu po 7 dniach istotnie, 8-krotnie się obniżył. Interesujące jest porównanie relatywnych poziomów ekspresji tego genu w dniu 0, u TL zaobserwowałam blisko 10-krotnie niższy poziom ekspresji niż u linii wrażliwej. Po 7 dniach zależność ta uległa zmianie i to SL wykazywała około 4-krotnie niższy poziom ekspresji. U kukurydzy odnotowano, że integralne białka membrany biorą udział w przekazywaniu sygnału w trakcie procesów odpowiedzi na warunki stresowe. Zostały one zlokalizowane w błonie cytoplazmatycznej i sugeruje się, że mogą one brać udział w procesach odpowiedzi na stres związanych z gromadzeniem kwasu abscysynowego (ABA) w komórce (Lu i in. 2007). Stwierdzono również, że białka IM obecne są w błonach plastydów w szczególności chloroplastów i wakuoli. IMP obecne w błonach wakuoli mogą brać udział w przekazywaniu sygnałów i tym samym regulacji procesów w nich zachodzących, szczególnie w niskim pH wywołanym czynnikami środowiskowymi (Jiang i in. 1998). W przypadku chloroplastów proponuje się rolę białek membranowych jako transporterów umożliwiających ich właściwe funkcjonowanie (Ferro i in. 2002). Interesujący wydaje się fakt, że u linii tolerancyjnej zanotowałam podwyższenie relatywnego poziomu ekspresji genu integralnych białek membranowych. Możliwe, że ich sugerowana rola związana z odpowiedzią na warunki stresowe w niskim pH, ze szczególnym naciskiem na przekazywanie sygnału i regulowanie procesów prowadzonych w wakuolach może mieć miejsce również w badanych przeze mnie roślinach. Wnioskuje, że białka te mogą brać udział w transporcie glifosatu do wakuoli, gdzie następnie może on ulegać matabolizmowi lub być magazynowany. Jednocześnie mogą one również brać udział w transporcie glifosatu w liściach u linii tolerancyjnej, czego objawem mogło być usychanie tylko ich końców.



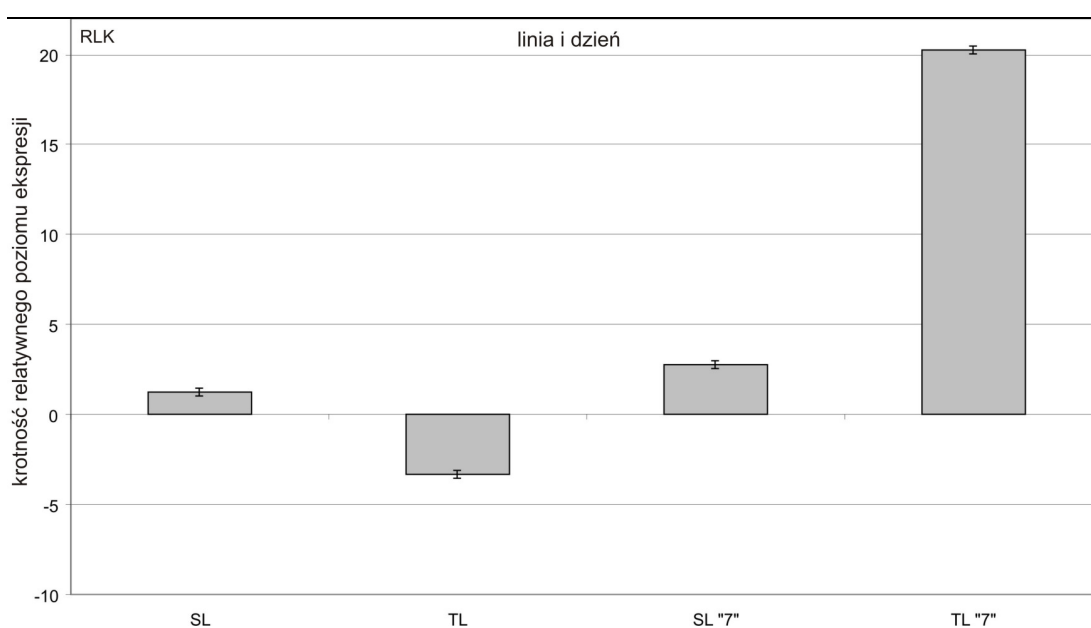
Wykres 10. Analiza porównawcza zmian w relatywnym poziomie ekspresji genu kodującego białka SCP; $p \leq 0,05$; $\pm SD$. Linie tolerancyjną oznaczono jako TL, wrażliwą jako SL, tolerancyjną w dniu 7. od zabiegu TL"7", a wrażliwą w dniu 7. od zabiegu SL"7".

Kolejnym badanym genem był kodujący białka podobne do arabinoglikanu gen AGLP. Białka AG należą do wysoko glikozylowanych bogatych w hydroksyprolinę glikoprotein, które są szeroko rozpowszechnione u roślin (Showalter 2001). U *A. thaliana* przewiduje się obecność ponad 100 genów kodujących białka AG, które sklasyfikowane są w 13 grup (Schultz i in. 2002). Usytuowane są one głównie na powierzchni i w ścianach komórki, aczkolwiek mogą być również obecne na powierzchni membran komórkowych, w przestrzeniach apoplastycznych i miejscach blizn po zranieniach (Borner i in. 2005). Białkom AG przypisywane jest pełnienie ważnej roli w procesie wzrostu i rozwoju rośliny, a także w procesach regulatorowych (Seifert i in. 2007). Wykazano ekspresję genów kodujących białka i białek w prawie wszystkich częściach rośliny, przy czym jej charakter jest tkankowo- i organospecyficzny (Showalter 2001). Jednoznaczne wskazanie roli tej grupy białek jest niezwykle trudne ze względu na jej dużą różnorodność i związaną z tym wielość pełnionych przez nie funkcji (Schaefer i in. 2010). Zasugerowano, że mogą być one zaangażowane we wczesne rozpoznanie i komunikację pomiędzy korzeniami rośliny i mikroorganizmami glebowymi (Samaj i in. 1999). Wykazano również zaangażowanie AGP w procesy odpowiedzi na różnorakie warunki stresowe (Showalter 2001).

Na podstawie przeprowadzonej analizy zaobserwowałam, że relatywny poziom ekspresji genu białka podobnego do arabinoglikanu pod wpływem stresu herbicydowego,

w dniu 7. ulega bardzo dużemu podwyższeniu u linii tolerancyjnej, aż 41-krotnie. U linii wrażliwej również odnotowałam podwyższenie relatywnego poziomu ekspresji genu kodującego te białko, jednak wzrost ten nie był tak duży jak u linii tolerancyjnej (31-krotny). W dniu 0 różnica w krotności ekspresji AGLP u linii tolerancyjnej i wrażliwej była bardzo duża, a po zastosowaniu warunków stresowych jeszcze się powiększyła. Geny kodujące grupę białek arbinoglikanu i podobnych do nich są uniwersalne dla większości królestw i ulegają stałej ekspresji (Showalter 2001). Odnotowano, że ich ekspresja jest tkankowo specyficzna a białko to może być magazynowane w tkankach. Jednak na przykładzie pomidora wykazano, że pomimo obecności zmagazynowanego białka, ekspresja genu AGLP w wyniku zranienia rośliny zanikała (Li i in. 1996). Podobny zanik ekspresji genu kodującego białka arabinoglikanu obserwowano po traktowaniu roślin elicytorem (Sheng i in. 1991). Interesującym jawi się fakt, że tylko w wyniku zranienia produkowane i obserwowane jest białko z grupy AGP, czyli powszechnie stosowana w przemyśle guma arabska (Clerke i in. 1979). Proponowany w literaturze zakres ról pełnionych przez białka AG w komórce roślinnej jest niezwykle szeroki. Opisano, że AGP mogą brać udział w przekazywaniu sygnałów lub poprzez uwalnianie oligosacharydów sygnałnych stymulować receptory w błonach i ścianach komórkowych (Kawaguchi i in. 1996). Wykazano również, że same białka arabinoglikanu mogą również oddziaływać z receptorami obecnymi w błonie komórkowej (Peles i in. 1997). Postuluje się również rolę AGP jako przekaźnika w procesach związanych i sterowanych przez wytwarzane w komórce aktywne formy tlenu (ROS, *ang. reactive oxygen species*), a także pośredniczenie w komunikacji międzykomórkowej (Kjellbom i in. 1997). Stwierdzono możliwość uczestnictwa białek AG w zjawisku pocieniania ściany komórkowej oraz często związanej z nim programowanej śmierci komórki (Schindler i in. 1995; Gao i in. 2000). Analiza wzrostu roślin pozwoliła na zaproponowanie, że białka tej grupy są zaangażowane w procesy związane z transportem wody, budowaniem cytoszkieletu, a także zdolne do modulowania macierzy komórkowej oraz odpowiedzialne za wzrost i rozwój tkanek (McCabe i in. 1997; Gao i in. 1999; Sardar i in. 2007). Zasadny wydaje się wyraźny wzrost ekspresji genów kodujących białka z tej grupy u linii wykazującej tolerancję na działanie glifosatu. U kukurydzy potwierdzono obecność białek AGP w sicie i korze, a wewnątrz komórek jego obecność w strukturach aparatu Golgiego i retikulum endoplazmatycznego (ER) oraz błonie komórkowej (Samaj i in. 1998). U obydwu linii obserwowałam wzrost relatywnego poziomu ekspresji AGLP, jednak u linii tolerancyjnej

początkowy poziom ekspresji był już dużo wyższy. Postuluję, że właśnie wysoka ekspresja genów kodujących białka zaangażowane w liczne procesy komórkowe, pozwalająca na sprawną odpowiedź na stres na wielu płaszczyznach, mogła wpłynąć na kształtowanie odporności na Roundup u kukurydzy. Również wzrost relatywnego poziomu ekspresji tego genu pozwala na stwierdzenie jego istotnej roli w odpowiedzi na stres (relatywny poziom ekspresji podniósł się u linii tolerancyjnej i wrażliwej). Wydawać się może, że zarówno rola sygnałowa, jak i związana z transportem wody, mogą być ważne dla reakcji rośliny na działanie herbicydu.



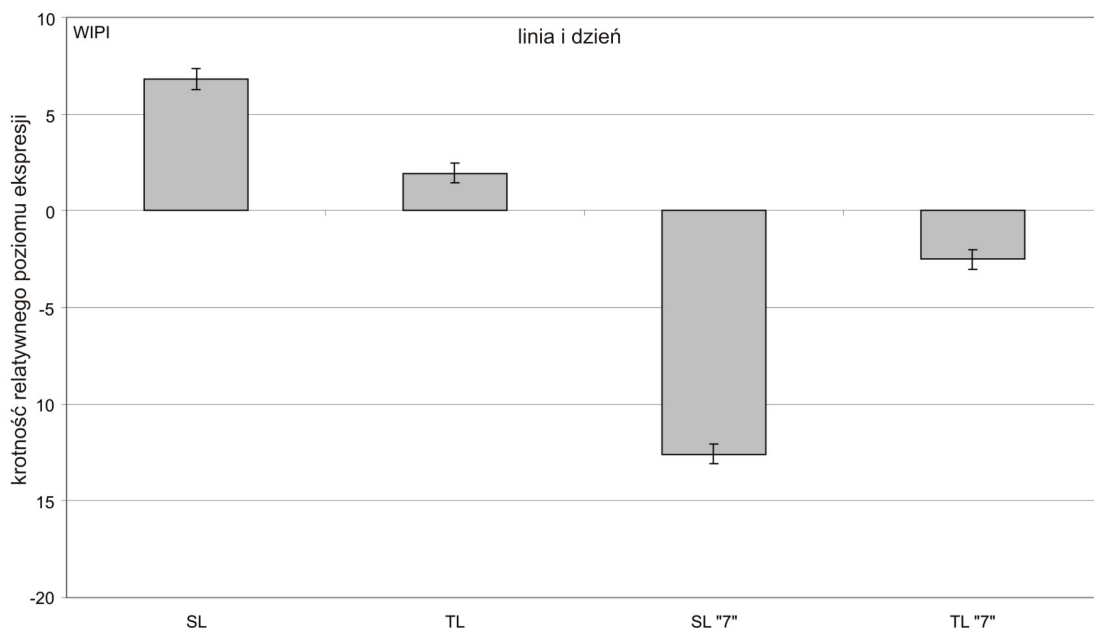
Wykres 11. Analiza porównawcza zmian w relatywnym poziomie ekspresji genu kodującego białka SCP; $p \leq 0,05$; $\pm SD$. Linię tolerancyjną oznaczono jako TL, wrażliwą jako SL, tolerancyjną w dniu 7. od zabiegu TL"7", a wrażliwą w dniu 7. od zabiegu SL"7".

Z pomocą eksperymentów mikromacierzowych wytypowano gen kodujący białko należące do rodziny białek podobnych do receptorowych kinaz (RLK), która kodowana jest przez ponad 600 genów u *A. thaliana*. Białka RLK zdolne są do wiązania wielu cząsteczek włączając węglowodany, polipeptydy, małe komponenty ścianowo-błonowe i steroidy zależnie od posiadanej domeny wiążącej (Shiu i in. 2001). RLK odpowiedzialne są za przekazywanie sygnałów, a ich działanie tłumaczy sposób komunikowania się komórek roślinnych między sobą oraz ze środowiskiem. Białka RLK zlokalizowane są w błonie cytoplazmatycznej komórki, gdzie jak wykazano pełnią istotną rolę we wzroście i rozwoju komórki oraz jej sprawniej odpowiedzi na stres (Morris i in. 2003). Przepuszcza

się, że duża ilość rozmieszczonych w błonie białek RLK pozwala komórce na odbieranie sygnałów środowiskowych i szybkie reagowanie na zaistniałe warunki (Shiu i in. 2001). Opisano zaangażowanie białek RLK w mechanizm odpowiedzi na suszę, stres solny czy atak patogenów (Bent i in. 2007; Marshall i in. 2012)

U linii wrażliwej nie odnotowałam dużych zmian w relatywnym poziomie ekspresji genów kodujących białka RLK po 7 dniach od zabiegu w porównaniu do dnia 0 (1,5-krotny wzrost). Natomiast gen ten u linii tolerancyjnej w 7 dniu od zastosowania warunków stresowych zwiększył relatywny poziom ekspresji aż o 24 razy. Obserwacja ta pozwala mi wnioskować, że podwyższony poziom transkryptów RLK może być związany z odpowiedzią rośliny na stres herbicydowy i skuteczną jej obroną. Białka należące do grupy kinaz receptorowych odgrywają bardzo ważną rolę w odpowiedzi na warunki stresowe u roślin. Wykazano ich zaangażowanie na stres suszy oraz stres wysokiego zasolenia (Koh i in. 2007; Skirycz i in. 2011). Odnotowano także zaangażowanie RLK w odpowiedź na zaistniały stres biotyczny szczególnie związany z atakami patogenów (Wrzaczek i in. 2010; Marshall i in. 2012). W warunkach stresów solnego i biotycznego oraz pod wpływem podwyższonego poziomu ABA i ROS w komórce podwyższeniu ulegała ekspresja genów kinaz podobnych do receptorowych (Scheer i in. 2002; Seki i in. 2002; Chen i in. 2010; Wrzaczek i in. 2010). Pod wpływem stresu wywołanego zastosowaniem Roundup zanotowałam istotny wzrost poziomu transkryptu RLK u linii tolerancyjnej, podczas gdy u SL taka zmiana nie wystąpiła. Postuluje się, że białka te w procesie odpowiedzi na patogeny pełnią rolę mediatorów w reakcji hormonalnej rośliny, a także w programowanej śmierci komórki (Osakabe i in. 2005). Sugeruje się także rolę kinaz receptorowych w procesy związane z ROS i transportem jonów w komórce, a także regulacją wzrostu rośliny (Afzal i in. 2008). Istotna w kontekście prowadzonych analiz wydaje się proponowana rola RLK w odpowiedzi na stres osmotyczny oraz przy podwyższonym stężeniu ABA (Maruyama i in. 2009). Stres osmotyczny podobnie jak stres wywołany działaniem Roundup wiąże się z pojawieniem się stresu oksydacyjnego w komórce. Należy więc stwierdzić, że obserwowane zmiany w ekspresji tego genu stanowią dowód na zaangażowanie białek RLK w kształtowanie tolerancji na działanie herbicydu. W literaturze sugeruje się również możliwą rolę RLK w odpowiedzi na stres poprzez udział w proteolizie membran kierowaną poprzez sygnały z ER (Che i in. 2010). W przypadku badanej kukurydzy wydaje się, że białka te raczej zaangażowane są w procesy związane ze ścieżkami sygnałnymi i transportem, aniżeli związane z lizą błon.

U linii wrażliwej nie obserwowałam zmian ekspresji pomimo stwierdzonych rozległych zmian nekrotycznych na liściach. Wykazano, że białka RLK podlegają podwyższonej ekspresji u kukurydzy w trakcie rozwoju liści oraz kłosów (Cahoon i in. 2008; Zhu i in. 2009). Nieznaczne podwyższenie relatywnego poziomu ekspresji genu RLK obserwowałam u linii wrażliwej na działanie Roundup i można przypuszczać, że była ona związana właśnie z rozwojem rośliny. Proces rozwoju rośliny następował właściwie tylko u linii tolerancyjnej dlatego można się spodziewać, że wzrost ekspresji był wywołany procesami związanymi właśnie ze wzrostem. Cahoon i współpracownicy wykazali zmiany relatywnego poziomu ekspresji RLK u kukurydzy na poziomie 2, a zaobserwowane przeze mnie u linii tolerancyjnej były na poziomie 20 (Cahoon i in. 2008). Wydaje się, że istnieje duże prawdopodobieństwo, iż geny te i produkty ich ekspresji faktycznie zaangażowane są w odpowiedź na stres wywołany Roundup.



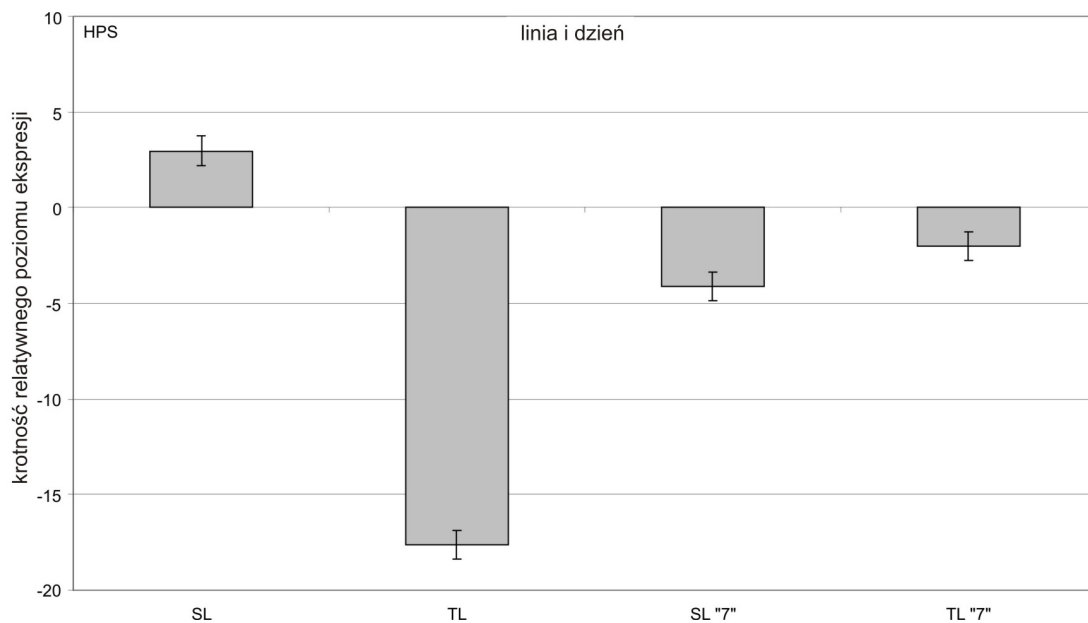
Wykres 12 Analiza porównawcza zmian w relatywnym poziomie ekspresji genu kodującego białka SCP; $p \leq 0,05$; $\pm SD$. Linie tolerancyjną oznaczono jako TL, wrażliwą jako SL, tolerancyjną w dniu 7. od zabiegu TL"7", a wrażliwą w dniu 7. od zabiegu SL"7".

Rośliny w środowisku naturalnym narażone są na różnorakie warunki stresowe, jednym z nich jest uszkodzenie mechaniczne. Zranienie może powodować reakcję miejscową lub systemową rośliny lub oba te typy, w które zaangażowany jest szereg ścieżek sygnałnych prowadzących do pobudzenia transkrypcji genów odpowiedzialnych za swoistą odpowiedź na stres (Leon i in. 2001). Najczęstszym sprawcą uszkodzeń u roślin są

patogeny, owady lub inne pasożytnicze zwierzęta i to przeciwko ich atakom zostały wykształcone mechanizmy obronne (Pena-Cortes i in. 1991). Wykazano, że inhibitory proteinaz są nadprodukowane i gromadzone w liściach pomidora w konsekwencji mechanicznego uszkodzenia lub ataku insektów (Peña-Cortes i in. 1988). Białka te nie są aktywne endogennie, a są jedynie magazynowane w roślinie, a następnie w kontakcie z agresorem, w jego komórkach, powodują hamowanie aktywności enzymatycznej proteinaz. Geny kodujące inhibitory proteinaz indukowane zranieniem (WIPI) należą do jednych z lepiej poznanych u roślin, a ich aktywność stwarza niezwykłą możliwość wykorzystania w ochronie roślin przed pasożytami i częściowym zastąpieniu nimi chemicznych środków ochrony (Lawrence i in.).

Poddanie roślin działaniu herbicydu zarówno u linii wrażliwej, jak i tolerancyjnej spowodowało obniżenie relatywnego poziomu ekspresji genu inhibitora proteinaz indukowanego zranieniem. Spadek ten u SL był na poziomie 18-krotnym, a u linii tolerancyjnej 5-krotnym. W warunkach dnia zerowego poziom ekspresji WIPI u linii wrażliwej był dużo wyższy niż u linii tolerancyjnej, a po 7 dniach od zabiegu istotnie niższy. Odnotowano podwyższenie poziomu transkryptów inhibitorów proteinaz w wyniku zranienia rośliny w przypadku pomidora i ziemniaka (Pena-Cortes i in. 1989). Jednocześnie wzrost poziomu ekspresji genów kodujących białka WIPI odnotowano również w przypadku stresu solnego oraz dużego stężenia ABA w roślinie (Chao i in. 1999; Dombrowski 2003). Wspomniana wcześniej przeze mnie szybkość zbierania i mrożenia materiału roślinnego miała na celu uniknięcie wywołania niespecyficznego wzrostu ekspresji białek WIPI, będącej efektem zranienia, a nie zastosowanych warunków stresowych. Wysoki poziom transkryptu obserwowano również pod wpływem ataków szkodników na roślinę, co często skutkowało akumulacją tych białek (Habib i in. 2007). Podwyższoną ekspresję genu WIPI odnotowano u kukurydzy w młodych liściach rosnących w atmosferze wzbogaconej w CO₂ (Prins i in. 2008). Wskazuje się na odwrotną zależność w zmianach ekspresji genów kodujących białka WIPI i PRP (Felton i in. 1999). W mojej analizie zaobserwowałam podobną zależność, dla obydwu grup genów kodujących białka relatywny poziom ekspresji pod wpływem stresu malał, jednak mniej wyraźnie u TL niż u SL. Sugeruje się, że białka WIPI mogą brać udział jako mediatory w krzyżowej regulacji procesów związanych z odpowiedzią i kształtowaniem odporności na stres. Wykazano, że wzrost odporności na stres wywołany zranieniem i aktywacja związanych z tym genów skutkuje również wzrostem odporności na wysokie zasolenie

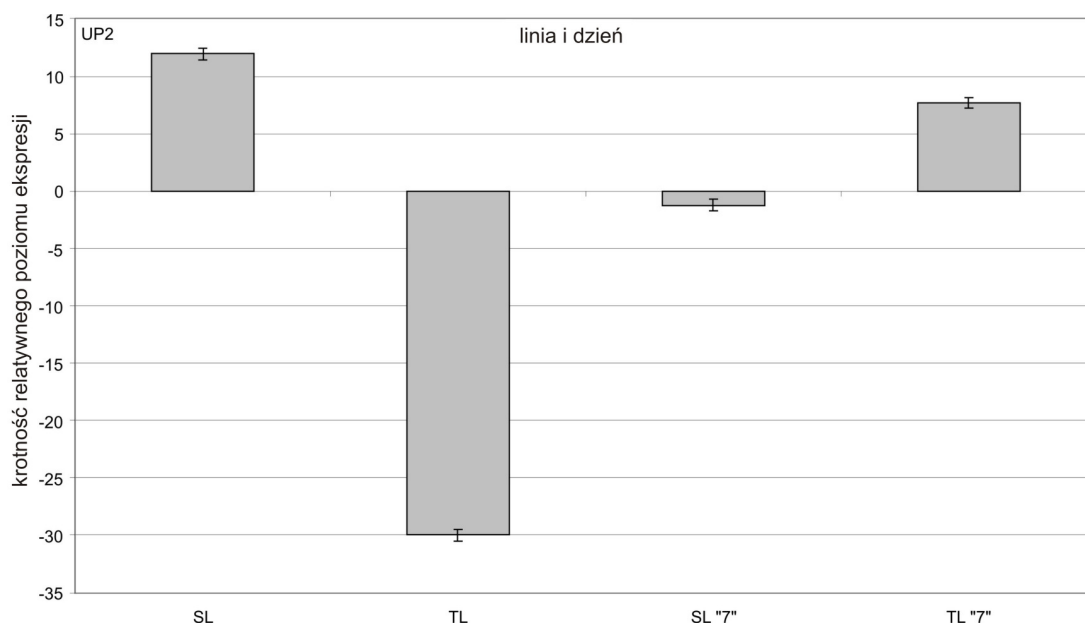
(Capiati i in. 2006). Dotychczas korelowano transkrypt genu WIPI i wzrost jego poziomu ze stresem. U badanej przez mnie kukurydzy w warunkach stresu herbicydowego odnotowałam istotne obniżenie ekspresji genu WIPI. Możliwe, że białka te biorą udział w odpowiedzi na stres, ponieważ obniżenie relatywnego poziomu ekspresji genu WIPI było mniejsze niż u linii wrażliwej.



Wykres 13. Analiza porównawcza zmian w relatywnym poziomie ekspresji genu kodującego białka SCP; $p \leq 0,05$; $\pm SD$. Linie tolerancyjną oznaczono jako TL, wrażliwą jako SL, tolerancyjną w dniu 7. od zabiegu TL"7", a wrażliwą w dniu 7. od zabiegu SL"7".

W prowadzonych badaniach zmian relatywnego poziomu ekspresji genów wytypowałam z pomocą danych z eksperymentu mikromacierzowego grupę genów, których poziom transkrypcji ulega istotnym zmianom pod wpływem stresu. Jednocześnie nie była znana ich nazwa i funkcja oraz czy kodują jakiegokolwiek białko. Przystąpiłam do przeszukiwania baz danych w poszukiwaniu sekwencji mogącej pomóc w wytypowaniu białek kodowanych przez te geny. Poszukiwania nie przyniosły informacji o funkcji tych transkryptów. Dla genu HPS czyli kodującego hipotetyczne białko stwierdziłam, że jego relatywny poziom ekspresji w warunkach początkowych w dniu 0 był dużo wyższy u linii wrażliwej. W wyniku zastosowania stresu herbicydowego, po 7 dniach od zabiegu zanotowałam 7-krotne obniżenie relatywnego poziomu ekspresji u linii wrażliwej i istotne 15-krotne podwyższenie u linii tolerancyjnej. W dniu 7. zaobserwowałam, że relatywny poziom ekspresji genu HPS u obu linii był na porównywalnym poziomie. Na podstawie

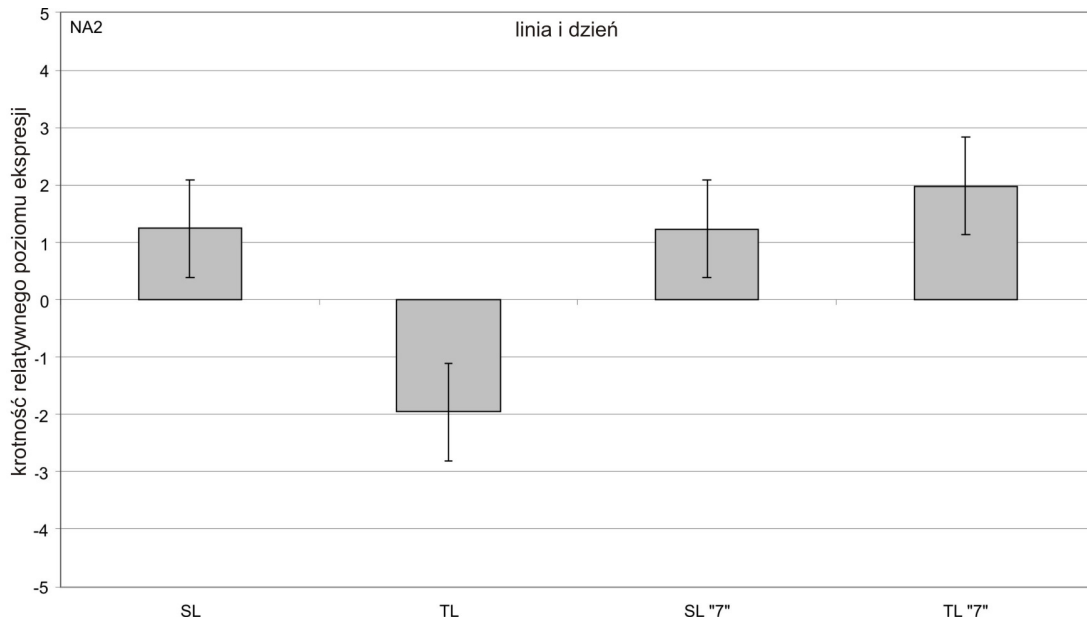
zmian poziomu ekspresji wnioskuje, że sekwencje te biorą udział w kształtowaniu reakcji na stres wywołany działaniem herbicydu Roundup. Wyraźne podwyższenie ekspresji genu HPS u linii tolerancyjnej może być związane z kształtowaniem tolerancji na Roundup, a tym samym białka HS mogą być zaangażowane w procesy sygnałowe lub związane z transportem i metabolizmem glifosatu.



Wykres 14. Analiza porównawcza zmian w relatywnym poziomie ekspresji genu kodującego białka SCP; $p \leq 0,05$; $\pm SD$. Linię tolerancyjną oznaczono jako TL, wrażliwą jako SL, tolerancyjną w dniu 7. od zabiegu TL"7", a wrażliwą w dniu 7. od zabiegu SL"7".

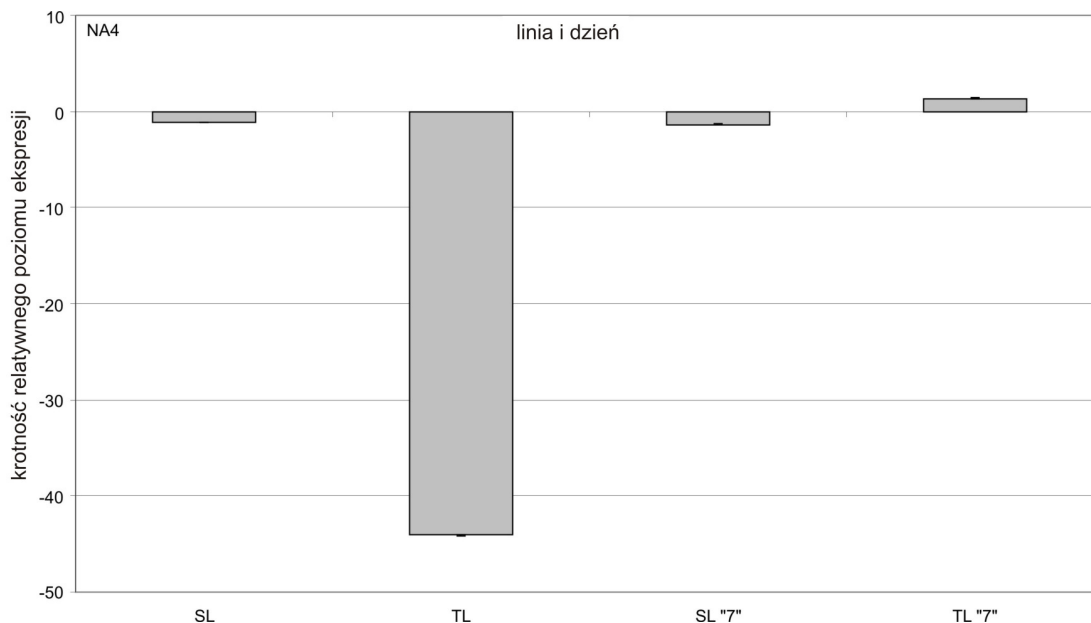
Gen UP2 koduje nieznane białko, którego funkcja nie została opisana. W dniu 0 relatywny poziom krotności ekspresji tego genu u linii tolerancyjnej był dużo niższy niż u linii wrażliwej. Po 7 dniach od zastosowania czynnika stresowego zaobserwowałam wyraźne 13-krotne obniżenie relatywnego poziomu ekspresji u linii wrażliwej i 37-krotne podwyższenie u linii tolerancyjnej. W 7 dni po zabiegu oprysku herbicydem poziom ekspresji u TL był istotnie wyższy, niż u linii wrażliwej. Podobnie, jak w przypadku genu HPS przystąpiłam do analizy mającej na celu odnalezienie białka, które mogłoby powstawać jako produkt ekspresji genu UP2. Nie udało mi się odnaleźć podobnego białka i jego funkcji. Na podstawie obserwacji zmian w relatywnym poziomie ekspresji postuluje, że produkt ekspresji genu UP2 może być zaangażowany w kształtowanie tolerancji na działanie herbicydu Roundup. Istnieje możliwość, że nieznane białko pełni rolę

regulatorową w komórce lub bierze udział w ścieżce zaangażowanej w transport i metabolizm glifosatu w komórce.



Wykres 15 Analiza porównawcza zmian w relatywnym poziomie ekspresji genu kodującego białka SCP; $p \leq 0,05$; $\pm SD$. Linie tolerancyjną oznaczono jako TL, wrażliwą jako SL, tolerancyjną w dniu 7. od zabiegu TL"7", a wrażliwą w dniu 7. od zabiegu SL"7".

Jak dotąd nie określono funkcji transkryptu NA2 w komórce i czy koduje on białko. Analiza porównawcza sekwencji sondy z danymi umieszczonymi w bazach danych nie pozwoliła mi na uzyskanie informacji na ten temat. Po zastosowaniu stresu herbicydowego, w dniu 7. zanotowałam, że poziom tego transkryptu u linii tolerancyjnej uległ wyraźnemu 4-krotnemu podwyższeniu, podczas gdy u linii wrażliwej nie uległ zmianie. W dniu 0 relatywny poziom ekspresji genu NA2 był wyższy u SL, a po 7 dniach zdecydowanie wyższa ekspresja tego genu cechowała linię tolerancyjną. Postuluję, że transkrypt ten zaangażowany jest w kształtowanie tolerancji na Roundup, ponieważ poziom jego ekspresji ulega zmianie (podwyższeniu) tylko u linii tolerancyjnej. Możliwe, że gen ten koduje białko biorące udział w kształtowaniu odporności na herbicyd Roundup. Jednocześnie może on również być źródłem niekodujących RNA w komórce, które biorą udział w procesach regulatorowych sterujących odpowiedzią komórki i kształtujących odporność na glifosat.



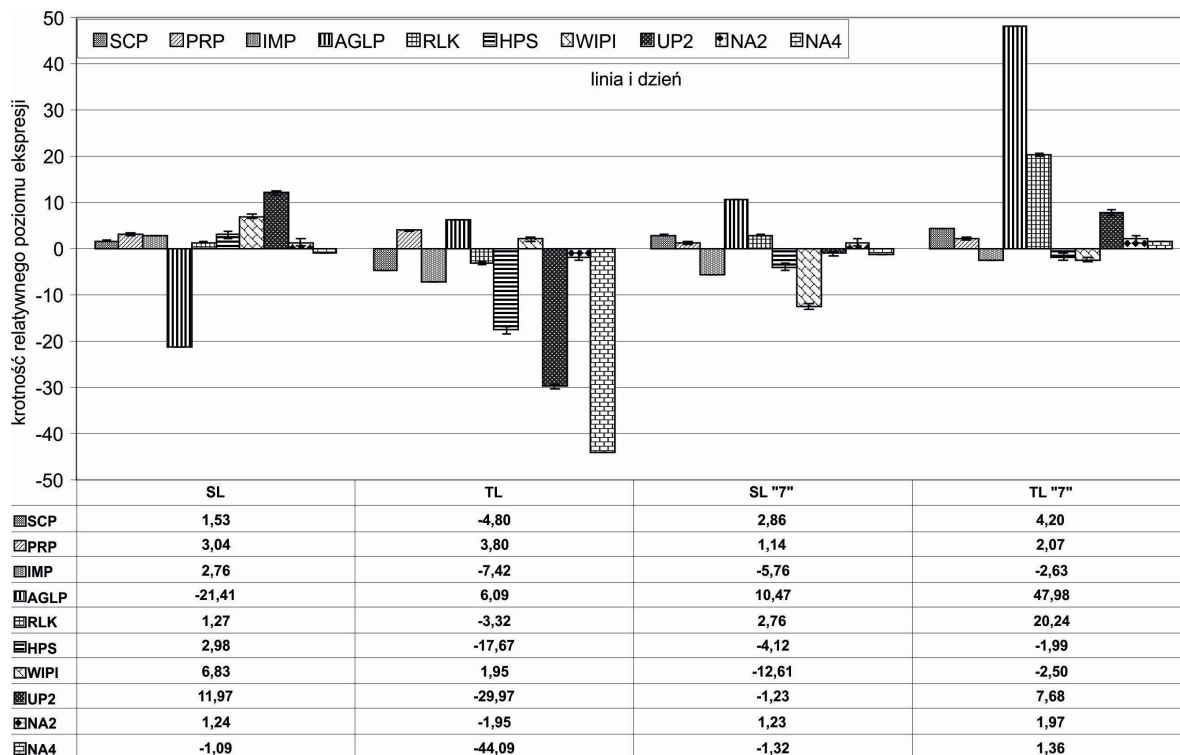
Wykres 16. Analiza porównawcza zmian w relatywnym poziomie ekspresji genu kodującego białka SCP; $p \leq 0,05$; $\pm SD$. Linie tolerancyjną oznaczono jako TL, wrażliwą jako SL, tolerancyjną w dniu 7. od zabiegu TL"7", a wrażliwą w dniu 7. od zabiegu SL"7".

Nie ma danych literaturowych opisujących transkrypt NA4, jego funkcję i nie zaproponowano białka, które mógłby on kodować. Wykonana analiza rtPCR umożliwiła mi stwierdzenie, że relatywny poziom ekspresji tego genu nie zmienia się pod wpływem warunków stresowych u linii wrażliwej. Wydaje się, że musi on pełnić istotną rolę w procesie odpowiedzi na stres u linii tolerancyjnej ponieważ zaobserwowałam podwyższenie jego ekspresji ponad 45-krotnie. Relatywny poziom ekspresji genu NA4 u TL w porównaniu do SL był bardzo niski, ale pod wpływem warunków stresowych i w czasie 7 dni przekroczył dwukrotnie wartość ekspresji u linii wrażliwej. Podobnie jak dla NA2 można wnioskować, że transkrypt ten może stanowić matrycę dla powstania białka zaangażowanego w odpowiedź na działanie glifosatu, jak i stanowić źródło regulatorowych RNA w komórce. Niezwykle istotny jest fakt, że gen ten ulega odmiennej ekspresji tylko u linii tolerancyjnej w wyniku zastosowania warunków stresu herbicydowego wywołanego działaniem Roundup. Analizę poziomu tego transkryptu można by zastosować jako marker pozwalający na typowanie linii kukurydzy pod względem wrażliwości i tolerancji na Roundup.

Analiza ekspresji genów z wykorzystaniem techniki rtPCR pozwoliła mi na dokładne określenie zmian w relatywnym poziomie ekspresji genów, które potencjalnie mogą brać udział w odpowiedzi na stres wywołany Roundup. W analizie

mikromacierzowej analizowałam relatywne zmiany w poziomie ekspresji, a w przypadku rtPCR relatywne zmiany w poziomie ekspresji w odniesieniu do genu referencyjnego. Na podstawie dokładnej analizy porównawczej wyników eksperymentów stwierdziłam, że większość trendów wzrostowych lub spadkowych poziomu ekspresji genów wyłonionych z użyciem techniki mikromacierzowej została potwierdzona z pomocą rtPCR. Również wzajemne proporcje zmian poziomu ekspresji poszczególnych genów są podobne dla danych uzyskanych z mikromacierzy i techniką rtPCR. Potwierdzenie tendencji w zmianach poziomu ekspresji genów z wykorzystaniem rtPCR pozwala na wnioskowanie właściwym wykonaniu i prawidłowej analizie statystycznej danych uzyskanych z eksperymentu mikromacierzowego. Podjęłam próbę analizy literatury w celu znalezienia potwierdzenia uzyskanych danych o zmienności na poziomie transkryptomu w zmianach w akumulacji białek w prowadzonych analizach proteomicznych. Analiza akumulacji białek ryżu pod wpływem glifosatu wykazała zmiany w innych białkach niż wytypowane w mojej pracy (Ahsan i in. 2008). Postuluję, że odpowiedź u kukurydzy jest swoista dla tej rośliny, albo zmiany w transkrypcji mogą nie mieć przełożenia na zmiany w poziomie akumulacji białek.

Na podstawie uzyskanych danych wnioskuję, że w kształtowaniu cechy tolerancji na działanie herbicydu Roundup najistotniejszą rolę zdają się pełnić geny kodujące białka podobne do arabinoglikanu oraz receptorów podobnych do kinazowych, a ich wzrosty relatywnego poziomu ekspresji są największe pod wpływem warunków stresowych. Niezwykle ważne wydają się geny kodujące integralne białka membranowe i karboksypeptydazy seryny, których ekspresja wzrasta, ale nieco słabiej, niż w przypadku RLK i AGLP pod wpływem stresu herbicydowego. Ciekawe, lecz wymagające dalszych analiz, jest zbadanie roli genów będących źródłem transkryptów NA2 i NA4. Ich poziom ekspresji zmienia się tylko u linii tolerancyjnej, co może wskazywać na ich bezpośredni związek z kształtowaniem cechy tolerancji na Roundup. Różnica w poziomie transkryptu NA4 jest tak wysoka w dniu 0, że mogłaby stanowić wskaźnik (biomarker) pozwalający na różnicowanie SL od TL. W celu potwierdzenia czy wysoki poziom tego transkryptu skorelowany jest z cechą tolerancji należy wykonać badania poziomu jego ekspresji w liniach kukurydzy wykazujących zróżnicowaną tolerancję na Roundup i spróbować odnieść te dwa czynniki.

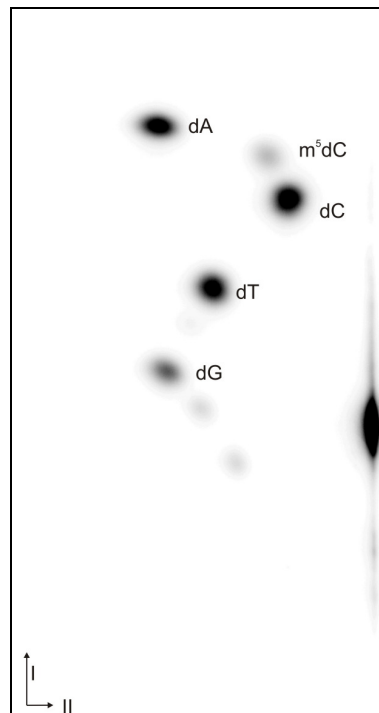


Wykres 17. Analiza porównawcza zmian w relatywnym poziomie ekspresji genów prawdopodobnie zaangażowanych w kształtowanie cechy odporności na działanie herbicydu Roundup, przygotowana z wykorzystaniem techniki real time PCR. ; $p \leq 0,05$; \pm SD. Linie tolerancyjną oznaczono jako TL, wrażliwą jako SL, tolerancyjną w dniu 7. od zabiegu TL"7", a wrażliwą w dniu 7. od zabiegu SL"7". Skródami oznaczono: SCP - gen kodujący karboksypeptydazę seryny, PRP - gen kodujący białka związane z patogenezą, IMP - gen kodujący integralne białka membrany, AGLP - gen kodujący białka podobne do arabinoglikanu, RLK - gen kodujący białka kinaz podobnych do receptorowych, HPS - gen kodujący hipotetyczne białko, WIPI - gen kodujący inhibitory proteinaz indukowane zranieniem, UP2 - gen kodujący nieznane białko, NA2 - gen kodujący transkrypt 2. o nieznannej funkcji, NA4 - gen kodujący transkrypt 4. o nieznannej funkcji.

6.3. Analiza zmian w poziomie globalnej metylacji DNA w warunkach stresowych

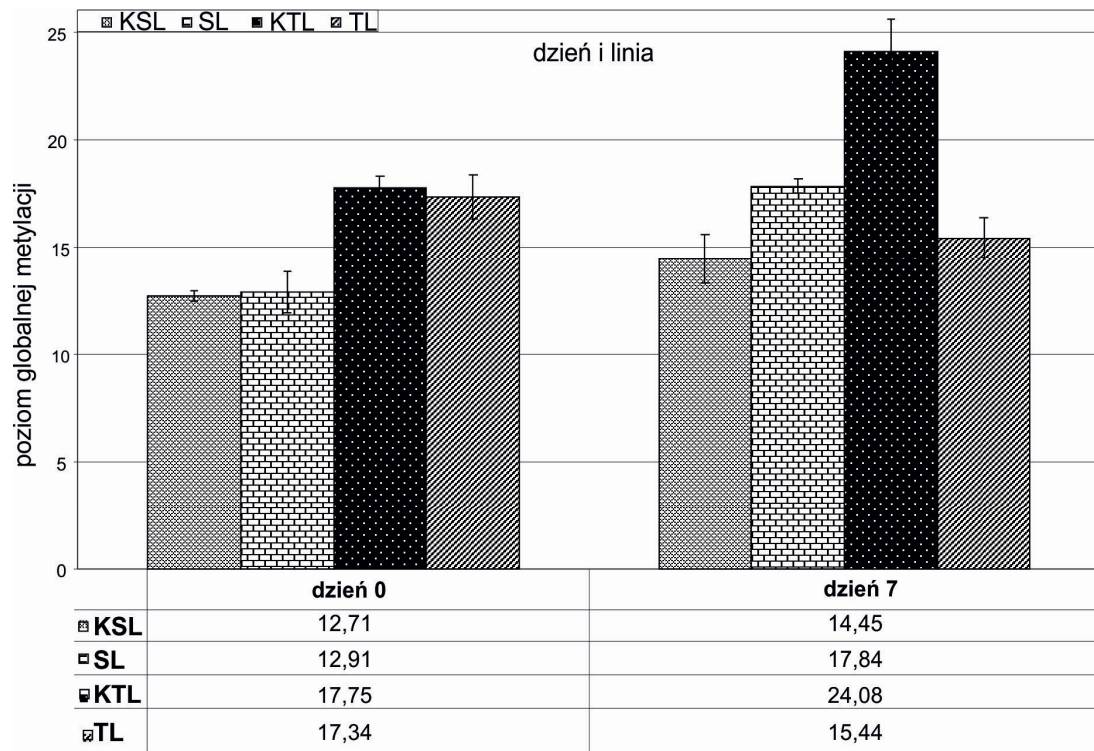
Metylacja cytozyny w DNA jest bardzo powszechną modyfikacją obecną w genomie roślin, u których może stanowić nawet 30% wszystkich cytozyn. Dzisiejsza technologia pozwala na analizę sekwencji genomu w poszukiwaniu m^5C z dokładnością do jednego nukleotydu (Li i in. 2012). Badania te mają na celu wskazanie, które z rejonów genomu są najbogatsze w metylovaną cytozynę oraz skorelowanie jej obecności z aktywnością transkrypcyjną DNA (Cokus i in. 2008; Lister i in. 2008; Xiang i in. 2010). Udowodniono, że m^5C zaangażowana jest w procesy związane z regulacją procesu dostępności chromatyny w komórce. W tym przypadku głównie skupiano się na rejonach promotorowych, które hipermetylowane nie ulegają transkrypcji (Suzuki i in. 2008). Wykazano również, że dynamiczne zmiany w poziomie i wzorze metylacji występują u roślin w warunkach stresowych (Dowen i in. 2012). Postanowiłam zbadać poziom globalnej metylacji z wykorzystaniem metody chromatografii cienkowarstwowej ze względu na jej szybkość wykonania i niewielkie koszty w porównaniu do nowoczesnych technologii (Barciszewska i in. 2007). Z powodzeniem technika ta była już stosowana do wykazania zmian w poziomie metylacji i korelowaniu tych zmian z zachorowaniami u ludzi (Smolarek i in. 2010).

W celu określenia zmian w poziomie całkowitej metylacji DNA u kukurydzy w warunkach stresu herbicydowego wyizolowałam całkowity DNA z wydajnością ok. 300 μg z 1 g liści. DNA poddałam trawieniu enzymatycznemu i znakowaniu radioizotopowemu. Uzyskane monofosforany nukleotydów poddawałam rozdzielaniu na płytkach TLC w dwóch kierunkach (Rysunek 31.).



Rysunek 31. Przykładowy obraz płytki TLC po rozdziale dwukierunkowym radioizotopowo znakowanych monofosforanów nukleotydów DNA. Linia tolerancyjna, rośliny kontrolne, dzień 7.

Uzyskany rozdział obrazowałam, a następnie za pomocą programu ImageGuage zliczałam intensywność poszczególnych plamek na płytce odpowiadających analizowanym nukleotydom m^5C , C i T. Dokonałam analizy obliczeniowej dla poszczególnych linii na kolejnych płytkach TLC. Analizowałam dwa powtórzenia biologiczne i trzy techniczne. W kolejnym etapie przystąpiłam do analizy statystycznej danych obliczeniowych w celu określenia istotności statystycznej zaobserwowanych różnic w poziomie całkowitej metylacji DNA. Wyniki przeprowadzonej analizy przedstawiłam na wykresie 18.



Wykres 18. Analiza zmian w poziomie globalnej metylacji DNA w poszczególnych liniach kukurydzy pod wpływem działania herbicydu Roundup; $p \leq 0,05$; $\pm SD$. Linie tolerancyjną poddaną zabiegowi oznaczono jako TL, linię wrażliwą poddaną zabiegowi jako SL, tolerancyjną linię kontrolną oznaczono jako KTL, a wrażliwą linię kontrolną jako KSL.

Na podstawie przeprowadzonej analizy stwierdziłam, że w wyniku wzrostu rośliny i braku warunków stresowych poziom całkowitej metylacji wzrasta u obydwu linii, przy czym u linii tolerancyjnej wzrost ten jest intensywniejszy. W dniu zerowym czyli w okresie 5 godzin po wprowadzeniu czynnika stresowego, nie zaobserwowałam statystycznie istotnych zmian w poziomie całkowitej metylacji cytozyny pomiędzy linią poddaną warunkom stresowym i linią kontrolną. Zależność ta była prawdziwa dla roślin tolerancyjnych i wrażliwych na działanie Roundup. Na podstawie tej obserwacji można wnioskować, że zmiany w poziomie metylacji następują w późniejszym okresie odpowiedzi na warunki stresowe.

W dniu 7. po zastosowaniu herbicydu zaobserwowałam odmienną reakcję w poziomie globalnej metylacji DNA u linii tolerancyjnej i wrażliwej na Roundup. W przypadku linii wrażliwej odnotowałam statystycznie istotny wzrost poziomu m^5C u linii poddanej działaniu czynnika stresowego w porównaniu z rośliną kontrolną. U linii tolerancyjnej w dniu 7. zaobserwowałam znaczne obniżenie poziomu całkowitej metylacji cytozyny, pod wpływem stresu, w porównaniu do linii kontrolnej. Globalny poziom m^5C

u linii wrażliwej w dniu 7. jest istotnie wyższy niż w dniu 0 u roślin kontrolnych i poddanych warunkom stresowym. W przypadku roślin poddanych działaniu herbicydu, wzrost ten był znacznie większy. U linii tolerancyjnej poziomu globalnej metylacji cytozyny po 7 dniach u roślin kontrolnych ulegał znacznemu wzrostowi. Poziom m^5C rośliny tolerancyjnej na Roundup poddanej jego działaniu w ciągu tygodnia, spadł poniżej poziomu obserwowanego w dniu 0. Poziom metylacji C w odpowiedzi na stres herbicydowy w SL w dniu 7. miał zbliżoną wartość do poziomu m^5C u linii tolerancyjnej w dniu 0. Odnotowany poziom globalnej metylacji u linii tolerancyjnej poddanej stresowi w dniu 7. był nieznacznie wyższy niż poziom m^5C u linii wrażliwej w dniu 0.

Wzrost poziomu globalnej metylacji cytozyny w przypadku linii kontrolnych w czasie tygodniowej hodowli może być skorelowany z procesem wzrostu rośliny i związanymi z tym procesami komórkowymi. Dowiedziono, że w procesie wzrostu zarówno wzór jak i poziom globalnej metylacji może się zmieniać. Zmiany te prawdopodobnie spowodowane są zmianą profilu ekspresji genów w procesach rozwojowych (Zhang i in. 2010).

Interesująca jest odmienna reakcja roślin wrażliwych i tolerancyjnych na działanie herbicydu na poziomie globalnej metylacji cytozyny. Obniżenie poziomu metylacji często koreluje się z procesami starzenia komórek oraz utratą kontroli przez komórkę nad ekspresją genów, jak np. w komórkach nowotworowych (Kulis i in. 2010). Taką reakcję obserwuję w linii tolerancyjnej i możliwe, że nie jest ona związana z utratą kontroli nad wzorem metylacji, a specyficzną odpowiedzią komórki. Ponadto, kukurydza w warunkach stresowych może uaktywniać dodatkowe geny, które umożliwiają roślinie zwiększenie tolerancji na stres. Dla linii wrażliwej obserwowałam przeciwne zjawisko, czyli wzrost globalnej metylacji pod wpływem stresu. Zachowanie takie można tłumaczyć jako próbę zahamowania aktywności genów w komórce do minimum w celu oszczędności energii dla transkrybowania tych genów, które biorą udział w odpowiedzi na stres. Często taka odpowiedź następuje w skrajnych przypadkach stresu, kiedy komórka jest na skraju szlaku apoptotycznego (Gopisettya i in. 2006).

6.4. Analiza obecności m⁵C w sekwencji genu białka podobnego do arabinoglikanu z zastosowaniem metody modyfikacji wodorosiarczanem (IV) sodu

Wykonane przeze mnie badania poziomu globalnej metylacji pod wpływem stresu herbicydowego pozwoliły na stwierdzenie, że istnieje zależność pomiędzy jego wartością a tolerancją na Roundup. Postanowiłam dokładniej zbadać tę zależność na przykładzie genu AGLP, który potencjalnie może być zaangażowany w odpowiedź na stres wywołany herbicydem. Wykorzystanie metody z użyciem wodorosiarczanu (IV) sodu pozwala na określenie wzoru metylacji w obrębie analizowanej sekwencji genu z dokładnością do jednego nukleotydu. Do analiz wykorzystałam DNA, który był izolowany na potrzeby określenia poziomu globalnej metylacji cytozyny.

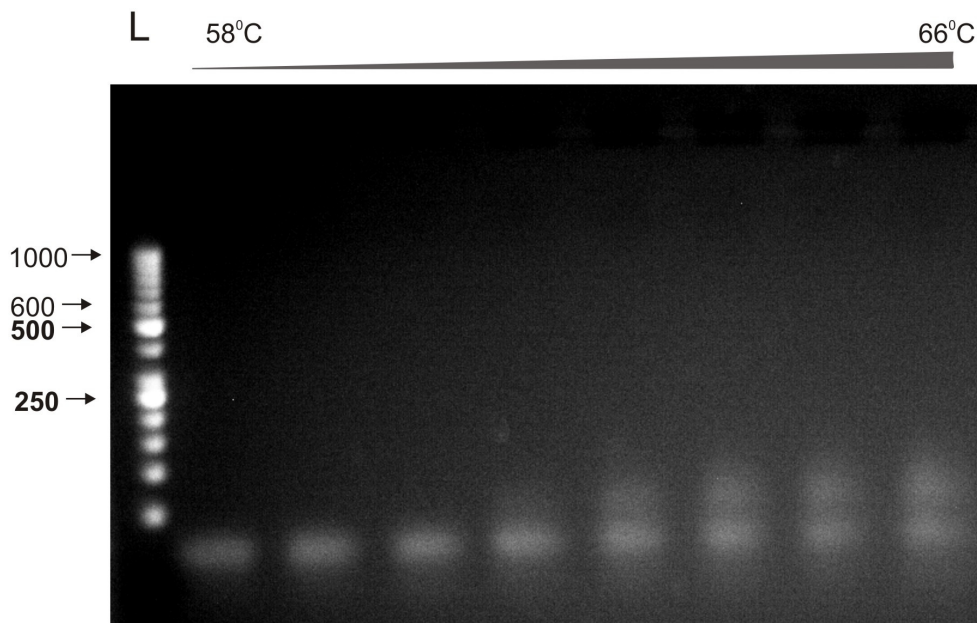
Pierwszym etapem pracy była dokładna analiza sekwencji genu AGLP dostępnych w bazach danych oraz ich porównanie. Równoległe prowadzone w naszym Zespole prace nad alternatywnym składaniem mRNA u kukurydzy z zastosowaniem głębokiego sekwencjonowania pozwoliły na uzyskanie sekwencji transkryptu AGLP linii tolerancyjnej i wrażliwej. Uzyskane sekwencje nie różniły się między sobą, co może wskazywać na ich dużą zachowawczość. W ich obrębie nie stwierdzono miejsc alternatywnego składania. Dostępne dane zarówno w bazach danych transkryptów, jak i sekwencji genomowych nie ujawniały obecności intronów w sekwencji genu AGLP. Wydaje się to mało prawdopodobne, aby w genomie występowała tak długa sekwencja eksonowa. Nie posiadając danych o obecności intronów posłużyłam się znaną sekwencją genu AGLP i zaprojektowałam do niej startery (6 par). Proces projektowania starterów przeprowadziłam zgodnie z wytycznymi, aby te bliżej końca 5' sekwencji genu były bogate w G, a 3' bogate w C. Pamiętając o możliwości zajścia przekształcenia C w U pod wpływem wodorosiarczanu (IV) sodu, konieczne było zastosowanie w reakcji PCR zdegradowanych sekwencji starterów oligonukleotydowych (Mette 2005). Przewidywane produkty reakcji PCR z wykorzystaniem zdegradowanych starterów powinny pozwolić mi na stworzenie mapy wzoru m⁵C w prawie całej sekwencji genu. Zgodnie z zaleceniami, oczekiwana długość zaprojektowanych produktów PCR oscylowała wokół 500 nukleotydów. Nieznajomość rejonu promotorowego dla analizowanego genu, nie pozwoliła mi na zaprojektowanie starterów umożliwiających zbadanie obecności metylowanej cytozyny w tym obszarze.

GRMZM2G156632 Nazwa transkryptu: GRMZM2G027420_T01 AGLP

ACCAAAAGGTAACAAGAAATCCTAAATCAAAACCCCAATACCTTTGCCAACCTGTTTAGTATCGTCTTTTCGTAT
 ACATGCACGGTGGTTTTTCGCTGCAACCAAGCACATTTGCAAAAAGAAACATGGATCCGAAAAATGGAATAGCT
 ATTTTTTAAAAAGTCTATAAGTAAACCTCCTCTACATTTCCCTTGCAATAACGATGTCAAGAACC GGCTATAA
 AAGCATTTTATATCCACTCGATTTTTCTTAAAGAGCTGGCCACGGAAACCATTTTCGTACTCTCTCGTCTCCTG
 TTCTTCGAACAGAGGAAGAAAGCTCCTCCGCGCCACTGCTGGAAGAAGAGGAGCGCCGACAGTAGCAGTGCTC
 CGCAAGGTATGACGATGTCCCAAGCGAGGCTGAAGAGGTCGTACCGAGGGCCTGCATACATGTAAGATGGTCT
 CAGGCTTGAAACAAAGTGCTGTCTCCTGAACACATCGTACACATGAGGCAGGACACGGATCAAGGTGCTTCCG
 ATGTAGAACCTTGGGGAGAGGGCTCTAACTTTGGAGTCTGAGAACACGTTTA GGATCACCTGAGGGAGCAG
GA ACCCATCGAGTATCAGTCCACAATAAGACACAAGGTCTCCAGAACGCATGCTGCTCAACTGGCTTCAA
 GTGTACAACCTGCCTTAGCATTTCTTCGGCTGTGGTTTGACCTCATGTGAACAACCCAAAGTAATAGCTCCGCCA
 ATGATGTACAGTGGCAGGCATATCCAGAGCACTTTCTTCTCGGCAGCCCATGACTCGGCTTTGCTTGCATCCA
 CGGACCGTGCAGGACCAGGCTGCTGAAGAAGCCGACGCTGCAGCAGAAAGGTTACCATGGTAATGATCCGCAC
 CATGACTTCGTTCACTCAAGCCATCCGCCACCTGAGAGTGGAAACGGTCTGCTTGTGCTGTTCTTGAAGAGA
 GCGTCAAAGTTTACGACGAGAGGGATCATGTAACCCAAAGCCAGAACCAGCAGCATGGTGATCGACATGGCGG
 GAAGTGCTTACGGGACCTTGTGACATGAAATAGCTGCACAGCAATGAAGACGCACGCCA GTGTATAGAGA
TAAAGGTATGGTG CTTTCTATGTCCATTCTCCAGATTGATGCATCCACTTGCTCTACGTACATCCCATATG
 AAGCAATGTCCAGCGTTTCAAAGAAAAGAGGGTCAGTCTTCTTCTCAAGCTTTTGTATCGCCCTTTTACATG
 CTGTGCAACTTTTGCATCTAAAGAAGAAAAC TGAGCAGTACCAGGATTTTCAATCTGACGAGACATTAAGC
 TCGCGACAAGCGATCATGCAAAAGGGAACCTGTCTTAGTATCATAAACACCTTCGGCAGAGATATGTCGACGAT
 GGAATGATTCTAGAGACCATTTCCCAACATAGTAGATATCATAGCTGACATTAAGCAGCCTTTGCTTCACTC
 GGCTGTGACATGGCGAGAAAAGGGATCTTGAACCACCAAAGAGTTACCATCAAACAACATTGACCCAAT TGT
TAGAGGTGAGGCATATCCAG ACCGCCTCCTCTCTTACGAAAAACGGAACACCAAGTCC TGGTATGAATT
 GCTATCTGGGAACCTTCCCTTTCCGTCTTGTTCATCCAGATTTCTCATAGTATTTTATAGCCTCGTCCACC
 TTTGTGTAATTATACTTCAAACCAGAAAGATTGCCCTATAGTTGGGAGTGATTGCCTAGAACCCGGCAGCGA
 CGGCTCACCACTTTTCAAGCTTGCATTCCAGACCAGACCAGCAGAAAAGCTCCGTTGCTGTAACGACCACAC
 TGCCGGGAACCAGAAGCTCATCCCAATTCCACACTACCTACTGCCAAATCTGCACGGGATGGCCCCGACTTC
 ACCACGTGACACCTTTGAGGCAAAGCCGGCTGCTCTTCTGATCCCAAGTCCATCCACCACGACGGCCTTCT
 CGCCAGCATGAAGTAGTACCTT GATAACTCTGTCTGGTTAGTGAACGCCACATAAGCAGGACAGCGCCGTC
 ATCGTTGCAGTGCATCCGGTTGACATACATGTA GCTTTGGTGAATCCCGAGTGAAG ATCGGTCGACTCGCT
 GCCACTCGGGTAGTCCAACCTGAACGGCGGATTGAGCATGGAACCTGAGATGGGCGCACGAGAAATTCCTATTC
 TCGAACACCTGGAGCGCATCAAGCCTCCCCGAGGCGGCGGGCAGGAGGCGCTCTCCCCGTACGCGTAGC
 CCTCCTGGGTGTAGGCGACGAGTGAATGGGCTCGATGGGCTGATGGTGTCAACGTTCTCGAGGCGACCGGT
 GACGAAGGGCCGCTACGTTGGCGGGCTGGGAAAGCCGAGACGGAGCACGACGGGGAGGAAGTGCACGGGC
 GAGCCGTCGGCGGCGCGCCCGACCCGGTGCCGACCATGCAGAGGTCCC CGGACCCGGTGGAGTAGTAC CCT
CAGGCCGAAGGTGATGGAGC CGCGCCGCCCGTGAAGCGCGGGAGGCGGGCGGAAGTGGCGCGCGGC
 CGTCTACTCGAAGAGGTTCCGGCCCGCGGTGCGGAAACGGGCGCCGCCCGCCGAGACGGTGAGAGTGGC
 GGAGACGTGGAGGAGCGAGGCGTTGGTGGTGCGGGCGACGGAGGAGGGGAGCAACGAGAAGGAGCGCGGCTGG
 GAGGAGGGGTCCGGGCCGAAAGATGCGGTCCCCGCCGACGAAGTACCCGGTGGAGACCTCGGGGACGGGGACAC
 GGGCGTCCGGCCGAGCGCCGAAACTTCGCCCGCGGGCAGGTGAGCGCGGACGGGAGGTTGGGGCAGTGGTG
 GGAGTAGGATAAGGTGGACAGGGAGGTATCTGCCCGCGTACCCGGATGCGGGGATCCGGATCAGGAGTAGG
 AGCAGGACCGGTAGGACGACGAGCTGCTGGTGGCTACGGTTAGCACCTCGGTGGCGCCATTTGAGAGGTGGAGA
 GGAAGCGGGGAGTGAGATCTCGTCTCCCCCTCCCCTCGCCCATCTTCT GGTTTTTGTTCGGGCAAGGATCTC
G TGCCGACGGGCGACGGGGGA

Rysunek 32. Sekwencja AGLP uzyskana z głębokiego sekwencjonowania badanych linii kukurydzy. Kolorami zaznaczono obszary sekwencji, do których zaprojektowano pary starterów; starter 5'(F) zaznaczony jest wypełnioną ramką, starter 3'(R) oznaczony jest ramką: kolor żółty - AGLP_1, niebieski - AGLP_2, czerwony - AGLP_3, zielony - AGLP_4, różowy - AGLP_5, szary - AGLP_6.

Procedurę modyfikacji DNA wodorosiarczanem (IV) sodu przeprowadziłam przez noc, na wstępnie pociętym DNA, co powinno zwiększyć wydajność reakcji. Następnie przeprowadziłam reakcję PCR w gradiencie temperatury w celu określenia jej optymalnej wartości dla uzyskania specyficznych produktów reakcji. Produkty PCR rozdzielałam elektroforetycznie na 1,5% żelu agarozowym i obrazowałam z zastosowaniem SYBRSafe i lampy UV (Zdjęcie 10.).

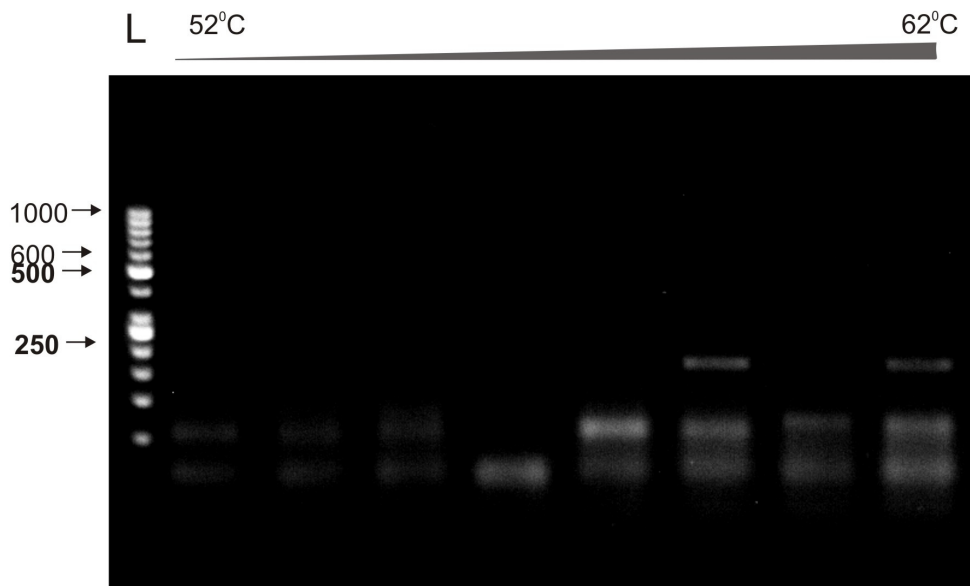


Zdjęcie 10. Obraz rozdziału elektroforetycznego produktów reakcji PCR w gradiencie temperatury (58-66°C) z użyciem pary starterów AGLP_4 i matrycy DNA uzyskanego z SL w dniu 0. Warunki rozdziału: 1,5% żel agarozowy, 120mA, 1h. Pierwsza ścieżka przedstawia marker wielkości (L) liczbami opisano wybrane wskaźniki długości cząsteczek DNA wyrażone w nukleotydach.

Rozdział produktów reakcji PCR mającej na celu optymalizację temperatury jej zajścia, wskazywał na wyraźny brak produktów. W dolnych częściach elektroforegramu obserwowałam prążki, które pochodziły od stosowanych starterów i prawdopodobnie produktów ich dimeryzacji. Reakcję tę przeprowadziłam dla wszystkich zaprojektowanych par starterów i za każdym razem nie zaobserwowałam oczekiwanych produktów reakcji PCR.

Zgodnie z omówionym powyżej schematem, przeprowadziłam również optymalizację temperatury reakcji PCR w celu otrzymania specyficznych produktów z zastosowaniem matrycy DNA poddanego modyfikacji wodorosiarczanem (IV) sodu. Badana sekwencja zawierała dużo reszt C, które nie będąc metylowane, powinny ulec

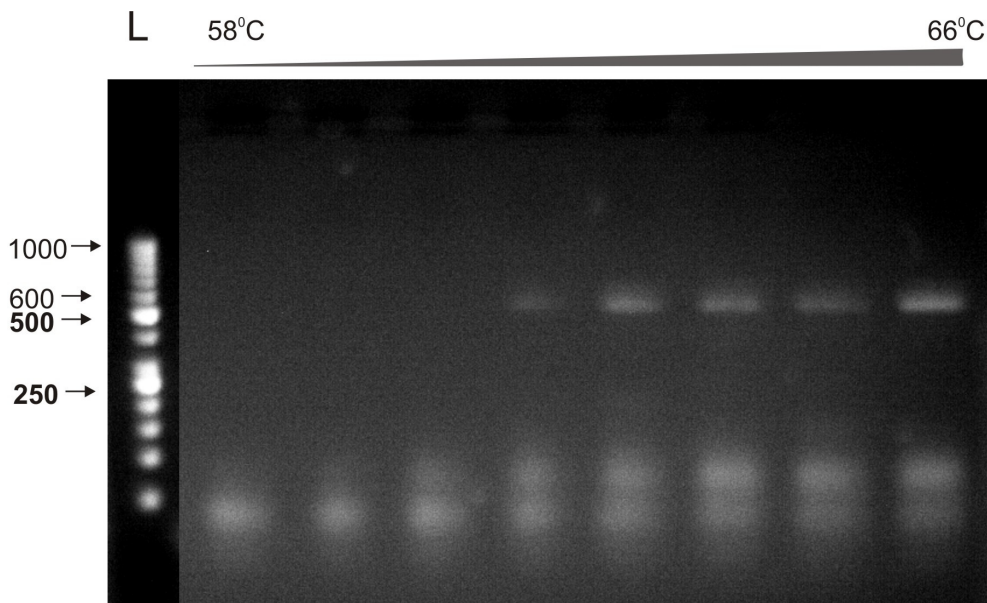
przekształceniu do U. Skutkiem modyfikacji wodorosiarczanem (IV) sodu jest wzbogacenie badanej sekwencji w T oraz związane z tym obniżeniem temperatury topnienia dupleksu DNA i wiązania starterów (Zdjęcie 11.).



Zdjęcie 11. Obraz rozdziatu elektroforetycznego produktów reakcji PCR w gradiencie temperatury (52-62°C) z użyciem pary starterów AGLP_4 i matrycy DNA uzyskanego z SL w dniu 0, poddanego reakcji modyfikacji wodorosiarczynem (IV) sodu. Warunki rozdziatu: 1,5% żel agarozowy, 120mA, 1h. Pierwsza ścieżka przedstawia marker wielkości (L) liczbami opisano wybrane wskaźniki długości cząsteczek DNA wyrażone w nukleotydach.

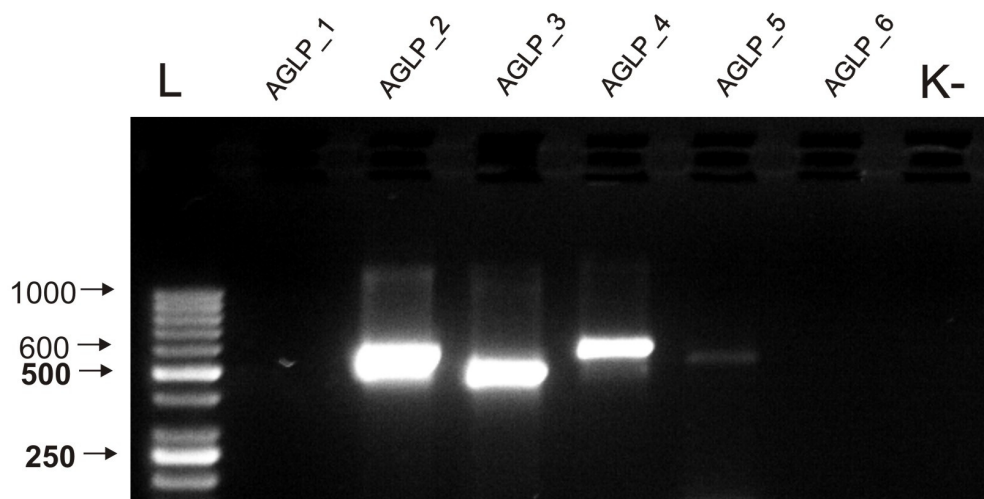
Zastosowanie matrycy DNA modyfikowanego wodorosiarczanem (IV) sodu do reakcji PCR w gradiencie temperatury, nie przyniosło oczekiwanych wyników. W żadnej z zastosowanych temperatur i dla żadnej z zaprojektowanych par starterów nie obserwowaliśmy specyficznych produktów reakcji PCR na elektroforegramie.

Przetestowałam zaprojektowane pary starterów i wcześniej stosowany gradient temperatury w reakcji PCR z użyciem jako matrycy cDNA, który używany był wcześniej do analizy zmian w poziomie ekspresji genów. Takie podejście pozwoliło mi na sprawdzenie czy zaprojektowane pary starterów działają w reakcji PCR prowadzonej na matrycy cDNA. Przeprowadzona reakcja, a następnie analiza elektroforegramu pozwoliła na stwierdzenie obecności specyficznych, oczekiwanych produktów PCR. Zanotowałam, że powyżej temperatury reakcji 63° C w reakcji PCR powstaje specyficzny produkt (Zdjęcie 12.).

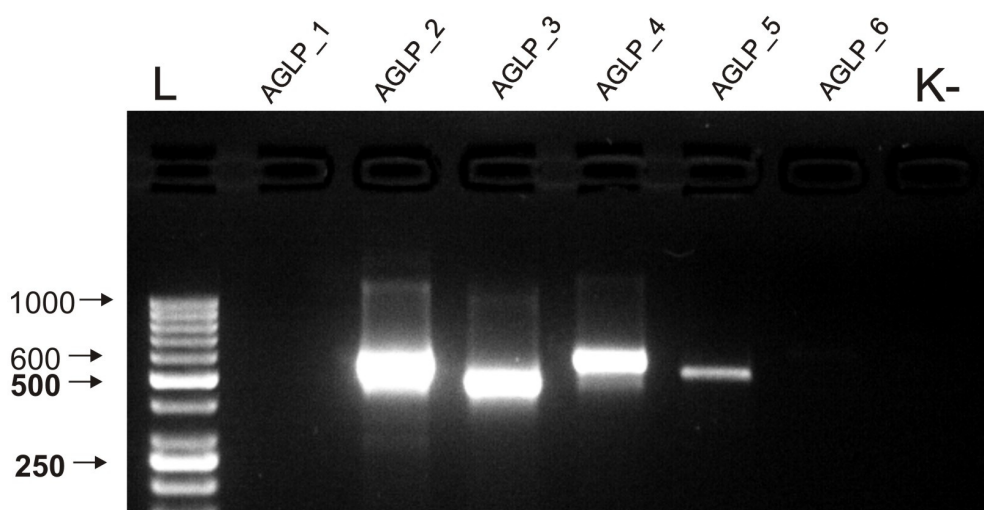


Zdjęcie 12. Obraz rozdziału elektroforetycznego produktów reakcji PCR w gradiencie temperatury (58-66°C) z użyciem pary starterów AGLP_4 i matrycy cDNA uzyskanego z SL w dniu 0. Warunki rozdziału: 1,5% żel agarozowy, 120mA, 1h. Pierwsza ścieżka przedstawia marker wielkości (L) liczbami opisano wybrane wskaźniki długości cząsteczek DNA wyrażone w nukleotydach.

Zaprojektowane pary starterów przetestowano w reakcji PCR w temperaturze 63°C z zastosowaniem matryc cDNA z obu badanych linii. Analiza uzyskanych elektroforegramów pozwala na stwierdzenie, że pary 2-4 pozwalają na uzyskanie specyficznego produktu, zgodnego z zaplanowanym w procesie projektowania starterów. Wydajność produktów reakcji uzyskiwanych z wykorzystaniem poszczególnych par starterów jest różna. Zjawisko to można tłumaczyć wydajnością ich wiązania do matrycy w zastosowanych warunkach reakcji (Zdjęcia 13. i 14.).



Zdjęcie 13. Obraz rozdziału elektroforetycznego produktów reakcji PCR z użyciem par starterów zaprojektowanych względem sekwencji genu AGLP i matrycy cDNA uzyskanego z SL w dniu 0. Warunki rozdziału: 1,5% żel agarozowe, 120mA, 1h. Pierwsza ścieżka przedstawia marker wielkości (L) liczbami opisano wybrane wskaźniki długości cząsteczek DNA wyrażone w nukleotydach, kolejne ścieżki ukazują produkty reakcji PCR dla kolejnych par starterów: AGLP_1, AGLP_2, AGLP_3, AGLP_4, AGLP_5, K- reakcja kontrolna bez dodatku starterów.



Zdjęcie 14. Obraz rozdziału elektroforetycznego produktów reakcji PCR z użyciem par starterów zaprojektowanych względem sekwencji genu AGLP i matrycy cDNA uzyskanego z TL w dniu 0. Warunki rozdziału: 1,5% żel agarozowe, 120mA, 1h. Pierwsza ścieżka przedstawia marker wielkości (L) liczbami opisano wybrane wskaźniki długości cząsteczek DNA wyrażone w nukleotydach, kolejne ścieżki ukazują produkty reakcji PCR dla kolejnych par starterów: AGLP_1, AGLP_2, AGLP_3, AGLP_4, AGLP_5, K- reakcja kontrolna bez dodatku starterów.

Przeprowadzone badania nie pozwoliły na kontynuowanie analizy wzoru metylacji w sekwencji genu AGLP. Uzyskane wyniki pozwalają mi na wnioskowanie, że dostępna

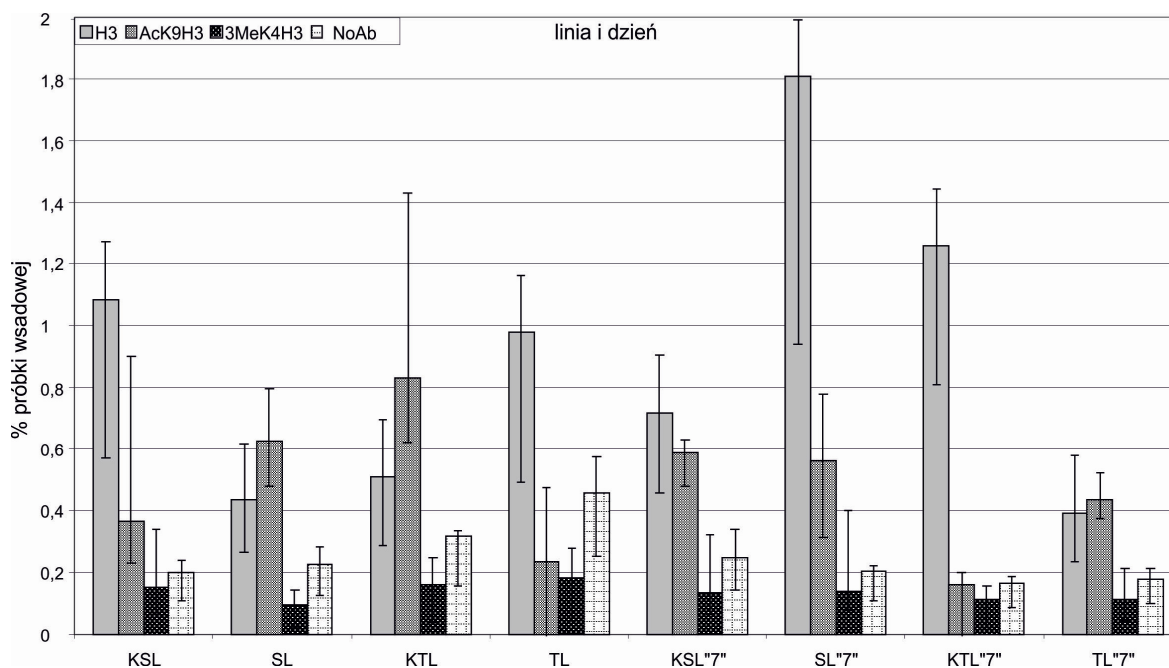
w bazach danych, jak i otrzymana w wyniku głębokiego sekwencjonowania sekwencja genu AGLP jest rozdzielana rejonami intronowymi, które nie zostały opisane. Brak produktu reakcji można tłumaczyć niemożliwością związania się starterów do badanej sekwencji, co wskazywałoby na istnienie wstawień sekwencyjnych w rejonach, do których zaprojektowano primery. Jednocześnie możliwe, że introny obecne są w rejonach pomiędzy tymi, do których zaprojektowano starter. Pomimo możliwości przyłączenia startera do sekwencji genu, czas wydłużania i aktywność zastosowanego enzymu nie pozwalają na uzyskanie bardzo długich produktów reakcji. Reasumując, w obrębie genu AGLP występują nieodnotowane w bazach danych sekwencje intronowe. Konieczne jest poznanie lokalizacji wstawionych sekwencji, co będzie możliwe po zsekwencjonowaniu genomów badanych linii kukurydzy. Brak tych danych uniemożliwił pracę nad oznaczeniem wzoru metylacji w obrębie sekwencji genu kodującego AGLP.

6.5. Analiza obecności modyfikacji epigenetycznych białek histonowych w obrębie sekwencji genów

Modyfikacje białek histonowych to zlokalizowane w chromatynie znaczniki pełniące kluczową rolę w procesie regulacji ekspresji genów w komórce. Epigenetyczna regulacja poziomu transkrypcji jest niezbędna dla normalnego wzrostu i rozwoju roślin (Turner 2002; Tariq i in. 2004). Duża zmienność czynników środowiskowych, na które narażona jest roślina wymusiła wykształcenie mechanizmów komórkowych pozwalających na sterowanie bioprocessami tak, aby możliwe było szybkie dostosowanie się do zaistniałych warunków. Stosunkowo dobrze opisanym mechanizmem zaangażowanym w odpowiedź na warunki stresowe u roślin jest zmiana modyfikacji białek histonowych. Chemiczna modyfikacja w obrębie reszt aminokwasów umożliwia regulację dostępności i aktywności transkrypcyjnej poszczególnych obszarów genomu (Verhage i in. 2010). Wykonałam analizę w celu określenia czy w obrębie sekwencji genu kodującego białka podobne do arabionoglikanu obecne są zmiany znaczników euchromatycznych białek histonu 3, warunkujące odmienną jego aktywność transkrypcyjną. Postanowiłam wykorzystać technikę immunoprecypitacji chromatyny przy użyciu przeciwciał specyficznie wiążących się do acetylacji lizyny 9. białka histonowego 3. (AcK9H3), trójmetylacji lizyny 4. białka histonowego 3. (3MeK4H3) oraz białka histonowego 3. (H3) (Haring i in. 2007). Modyfikacje AcK9H3 oraz 3MeK4H3 zostały scharakteryzowane jako typowe znaczniki euchromatyczne zarówno u *A. thaliana* jak i u kukurydzy. Stwierdzono, że obniżenie poziomu acetylacji w pozycji K9H3 w obrębie genu prowadzi do ograniczenia intensywności jego transkrypcji. Zaburzenia we wzorze AcK9H3 prowadziły do zmian we wzroście rośliny, a ich obecność była szczególnie widoczna w warunkach narażenia na stres wywołany zasoleniem, suszą i wysokim poziomem ABA. Zaobserwowano również, że obniżenie ilości tej modyfikacji może skutkować niewykształceniem nasion, represją transkrypcji w komórce, a także obniżeniem ilości rRNA (Chen i in. 2007). Modyfikację 3MeK4H3 stwierdzono u roślin narażonych na działanie patogenów, w których aktywowała transkrypcyjnie geny związane z odpowiedzią na ten rodzaj stresu. Obecność tej modyfikacji wykazano również w obrębie sekwencji niektórych nieaktywnych transkrypcyjnie genów i stwierdzono, że jej pojawienie się może wpływać na inicjację transkrypcji (Alvarez i in. 2010). W genomie ryżu i *A. thaliana* modyfikacja ta powiązana została z aktywacją genów w warunkach stresowych takich jak światło, susza czy zanurzenie roślin (Chen i in. 2013). Obecność trójmetylacji lizyny 4. H3

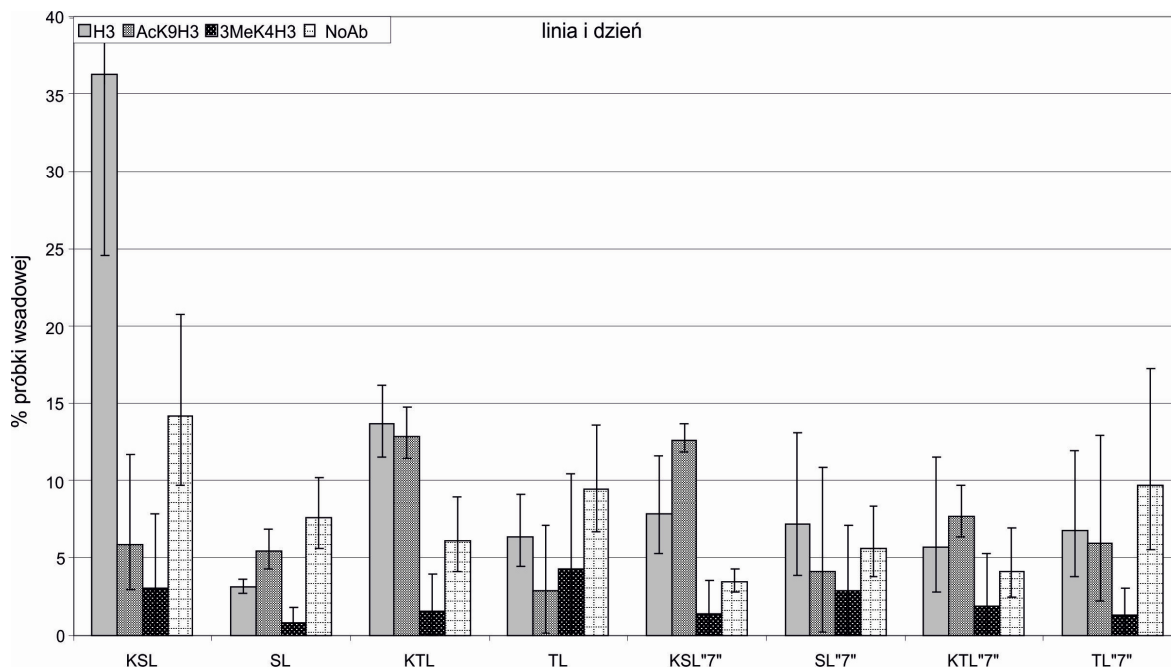
łączy się z istotną rolą pełnioną w regulacji procesów kwitnienia, morfogenezy liści i korzeni oraz kształtowaniu odporności na patogeny i stres suszy (Berr i in. 2011).

Dostępne w literaturze dane eksperymentalne dotyczące obrazowania wyników uzyskanych techniką immunoprecypitacji dają szeroki zakres możliwości ich przedstawienia i interpretacji. W wykonanych przeze mnie analizach posłużyłam się metodą zobrazowania wyników najczęściej stosowaną w literaturze (Haring i in. 2007). Na podstawie porównania ekspresji genów AGLP, RLK i NA4 w próbkach DNA uzyskanego z poszczególnych eksperymentów Chip (dla każdego z przeciwciał) do wartości ekspresji dla próbki wsadowej. Uzyskane wyniki zobrazowałam na wykresach 19-21. Zastosowanie przeze mnie tej metody było konieczne, aby porównać uzyskane wyniki ze zmianami w poziomie znaczników epigenetycznych opisywanymi przez innych badaczy (Livak i in. 2001; Haring i in. 2007).



Wykres 19. Zmiany procentowe zawartości euchromatycznych znaczników epigenetycznych w poszczególnych liniach w obrębie sekwencji genu AGLP; \pm SD. Na wykresie oznaczono: H3 – białka histonu 3., AcK9H3 – acetylacja lizyny 9 białka histonu 3., 3MeK4H3 – trójmetylacja lizyny 4 białka histonu 3., NoAb – brak przeciwciała. Linię tolerancyjną poddaną zabiegowi oznaczono jako TL, linię wrażliwą poddaną zabiegowi jako SL, tolerancyjną linię kontrolną oznaczono jako KTL, a wrażliwą linię kontrolną jako KSL. Linię tolerancyjną po 7 dniach od zabiegu oznaczono jako TL'7'', linię wrażliwą po 7 dniach od zabiegu jako SL'7'', tolerancyjną linię kontrolną po 7 dniach od zabiegu oznaczono jako KTL, a wrażliwą linię kontrolną po 7 dniach od zabiegu jako KSL.

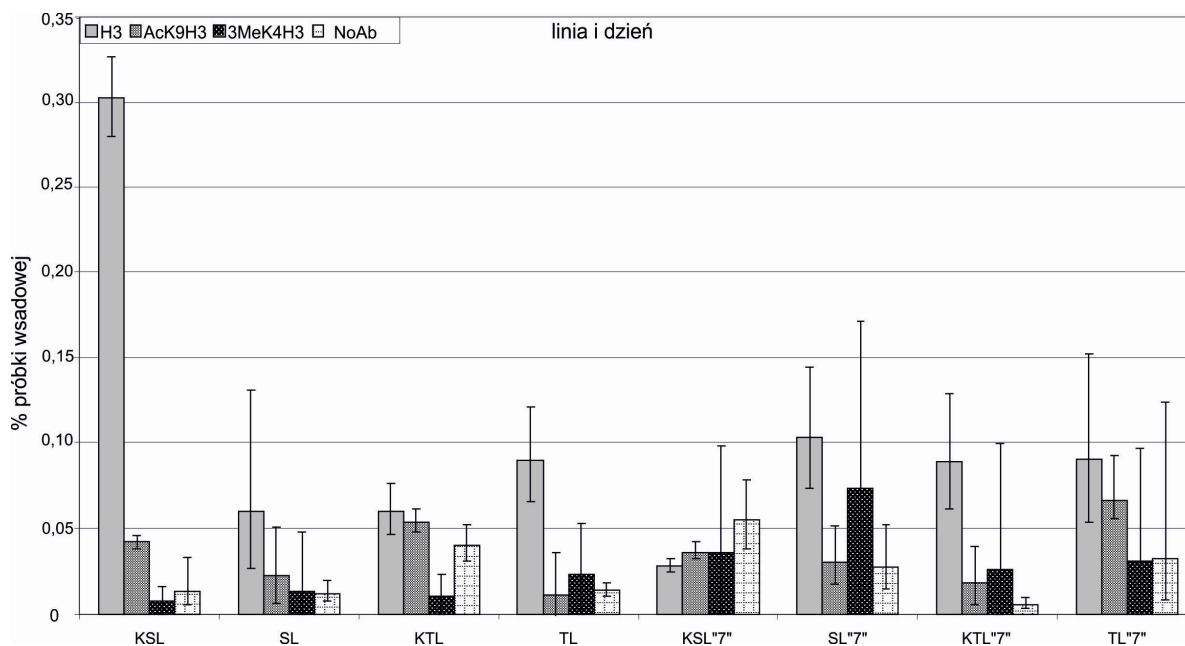
Na podstawie uzyskanych wyników wywnioskowałam, że modyfikacja epigenetyczna 3MeK4H3 nie była obecna w sekwencji genu AGLP. Sugerowana w literaturze rola tego znacznika jako aktywatora genów może tłumaczyć, że nie jest on obecny w sekwencji, która ulega stałej ekspresji w komórce. Obserwowane sygnały pochodzące od modyfikacji 3MeK4H3 były na poziomie próbek bez przeciwciała. W przypadku modyfikacji AcK9H3 uzyskałam dużą dynamikę zmian w jej poziomie w poszczególnych liniach i punktach czasowych. U linii wrażliwej w dniu 0 poziom AcK9H3 był zdecydowanie wyższy u roślin poddanych stresowi niż kontrolnych, u których był na poziomie nieznacznie wyższym od próby bez przeciwciała. U roślin tolerancyjnych w dniu 0 zaobserwowałam przeciwną zależność u linii kontrolnej, w przeciwieństwie do poddanej stresowi większość białek H3 posiadała acetylację w pozycji K9. Po siedmiu dniach od zastosowania glifosatu zaobserwowałam odwrócenie się obserwowanych poziomów acetylacji K9H3 u wszystkich linii. U roślin wrażliwych w warunkach kontrolnych poziom acetylacji był istotnie wyższy niż u kukurydzy poddanej działaniu herbicydu. W przypadku linii tolerancyjnej większość z białek H3 posiadała acetylację w pozycji K9 u roślin poddanych opryskowi Roundup, a u roślin kontrolnych nie wykrywano tej modyfikacji. Dane te korelują z wcześniej opisanymi przeze mnie zmianami w poziomie ekspresji genu AGLP w poszczególnych punktach czasowych (Wykres 10.). Wykazałam, że krotność relatywnego poziomu ekspresji była wyższa u linii tolerancyjnej aniżeli wrażliwej, a zjawisko to nasiliło się pod wpływem stresu w dniu 7. U kukurydzy wykazano, że obecność znacznika AcK9H3 w obrębie genu wiąże się z podniesieniem jego aktywności transkrypcyjnej, szczególnie w warunkach stresu (Hu i in. 2012). Wnioskuje, że z podobnym zjawiskiem wiąże się podwyższenie aktywności transkrypcyjnej genu AGLP w warunkach zastosowania herbicydu u linii tolerancyjnej. Postuluję, że mechanizmy epigenetyczne powodują nasilenie aktywności transkrypcyjnej tego genu co zdaje się wiązać z kształtowaniem cechy tolerancji na glifosat.



Wykres 20. Zmiany procentowe zawartości euchromatycznych znaczników epigenetycznych w poszczególnych liniach w obrębie sekwencji genu RLK; \pm SD. Na wykresie oznaczono: H3 – białka histonu 3., AcK9H3 – acetylacja lizyny 9 białka histonu 3., 3MeK4H3 – trójmetylacja lizyny 4 białka histonu 3., NoAb – brak przeciwciała. Linię tolerancyjną poddaną zabiegowi oznaczono jako TL, linię wrażliwą poddaną zabiegowi jako SL, tolerancyjną linię kontrolną oznaczono jako KTL, a wrażliwą linię kontrolną jako KSL. Linię tolerancyjną po 7 dniach od zabiegu oznaczono jako TL"7", linię wrażliwą po 7 dniach od zabiegu jako SL"7", tolerancyjną linię kontrolną po 7 dniach od zabiegu oznaczono jako KTL"7", a wrażliwą linię kontrolną po 7 dniach od zabiegu jako KSL"7".

Podobnie jak w przypadku genu AGLP, w obrębie sekwencji genu RLK nie zaobserwowałam obecności znacznika epigenetycznego 3MeK4H3. U roślin kontrolnych linii wrażliwej w czasie 7 dni ich hodowli zwiększył się istotnie poziom modyfikacji AcK9H3, która obecna jest w rejonach aktywnych transkrypcyjnie (Hu i in. 2012). Przeprowadzona analiza linii wrażliwej poddanej warunkom stresowym nie wykazała obecności acetylacji lizyny 9 białka histonu 3. Rośliny kontrolne linii tolerancyjnej zarówno w dniu 0, jak i 7. charakteryzował wysoki poziom AcK9H3 w obrębie sekwencji genu RLK. U linii tolerancyjnej poddanej działaniu herbicydu Roundup nie była obecna acetylacja lizyny 9. Analiza porównawcza obecności znaczników epigenetycznych i zmian w poziomie ekspresji genu RLK (Wykres 11.) zdają się nie korelować ze sobą. Wzrost poziomu acetylacji u roślin kontrolnych linii wrażliwej wiązać się może z procesem wzrostu

i rozwoju rośliny. Jednocześnie u kukurydzy kontrolnej linii tolerancyjnej acetylacja lizyny utrzymywana była na stałym, wysokim poziomie. Wnioskuje, że w wyniku zastosowania czynnika stresowego u linii tolerancyjnej mogło nastąpić usunięcie acetylacji lizyny 9 histonu 3. Proces ten widoczny był już w 5 godzinie od zabiegu oprysku herbicydem, więc należy go wiązać z wczesną odpowiedzią rośliny na warunki stresowe.



Wykres 21. Zmiany procentowe zawartości euchromatycznych znaczników epigenetycznych w poszczególnych liniach w obrębie sekwencji genu NA4; \pm SD. Na wykresie oznaczono: H3 – białka histonu 3., AcK9H3 – acetylacja lizyny 9 białka histonu 3., 3MeK4H3 – trójmetylacja lizyny 4 białka histonu 3., NoAb – brak przeciwciała. Linie tolerancyjną poddaną zabiegowi oznaczono jako TL, linię wrażliwą poddaną zabiegowi jako SL, tolerancyjną linię kontrolną oznaczono jako KTL, a wrażliwą linię kontrolną jako KSL. Linie tolerancyjną po 7 dniach od zabiegu oznaczono jako TL"7", linię wrażliwą po 7 dniach od zabiegu jako SL"7", tolerancyjną linię kontrolną po 7 dniach od zabiegu oznaczono jako KTL, a wrażliwą linię kontrolną po 7 dniach od zabiegu jako KSL.

We wcześniej opisanych badaniach zmian relatywnego poziomu ekspresji genu NA4 wykazałam, że może być ona stosowany jako marker pozwalający na różnicowanie linii kukurydzy pod względem tolerancji na herbicyd Roundup. Analiza znaczników epigenetycznych u linii wrażliwej poddanej działaniu warunków stresowych wykazuje na obecność 3MeK4H3 u roślin w dniu 7. od zabiegu. Modyfikacja ta wiązana jest z aktywacją transkrypcyjną rejonów,

w których się znajduje i fatycznie zaobserwowałam nieznaczny wzrost ekspresji genu NA4 u linii wrażliwej po 7 dniach (Wykres 16.) (Alvarez i in. 2010). U roślin kontrolnych linii wrażliwej w dniu 0 obecny był niski poziom acetylacji lizyny 9 białka histonu 3, która została usunięta i nie była obecna w dniu 7 dni. Rośliny kontrolne linii tolerancyjnej w dniu 0 charakteryzuje wysoki poziom AcK9H3, który uległ znacznemu obniżeniu w dniu 7. U roślin kontrolnych w dniu 7., w obrębie sekwencji genu NA4, obecna była również na niskim poziomie modyfikacja 3MeK4H3. W przypadku roślin linii tolerancyjnej poddanych warunkom stresowym, w 5 godzin od zabiegu obecna była na niskim poziomie trimetylacja lizyny 4 białka histonu 3, która nie była widoczna w dniu 7. Pod wpływem działania herbicydu Roundup u linii tolerancyjnej, w obrębie genu NA4 odnotowałam istotny wzrost poziomu AcK9H3 po 7 dniach od zabiegu. Wnioskuje, że obserwowany przeze mnie ponad 20-krotny wzrost poziomu ekspresji genu NA4 u roślin TL (Wykres 16.) może być skorelowany z obecnością znacznika epigenetycznego AcK9H3.

Wykazałam, że dla genów AGLP i NA4 istnieje korelacja pomiędzy obecnością znacznika epigenetycznego AcK9H3, a wzrostem ich relatywnego poziomu ekspresji.

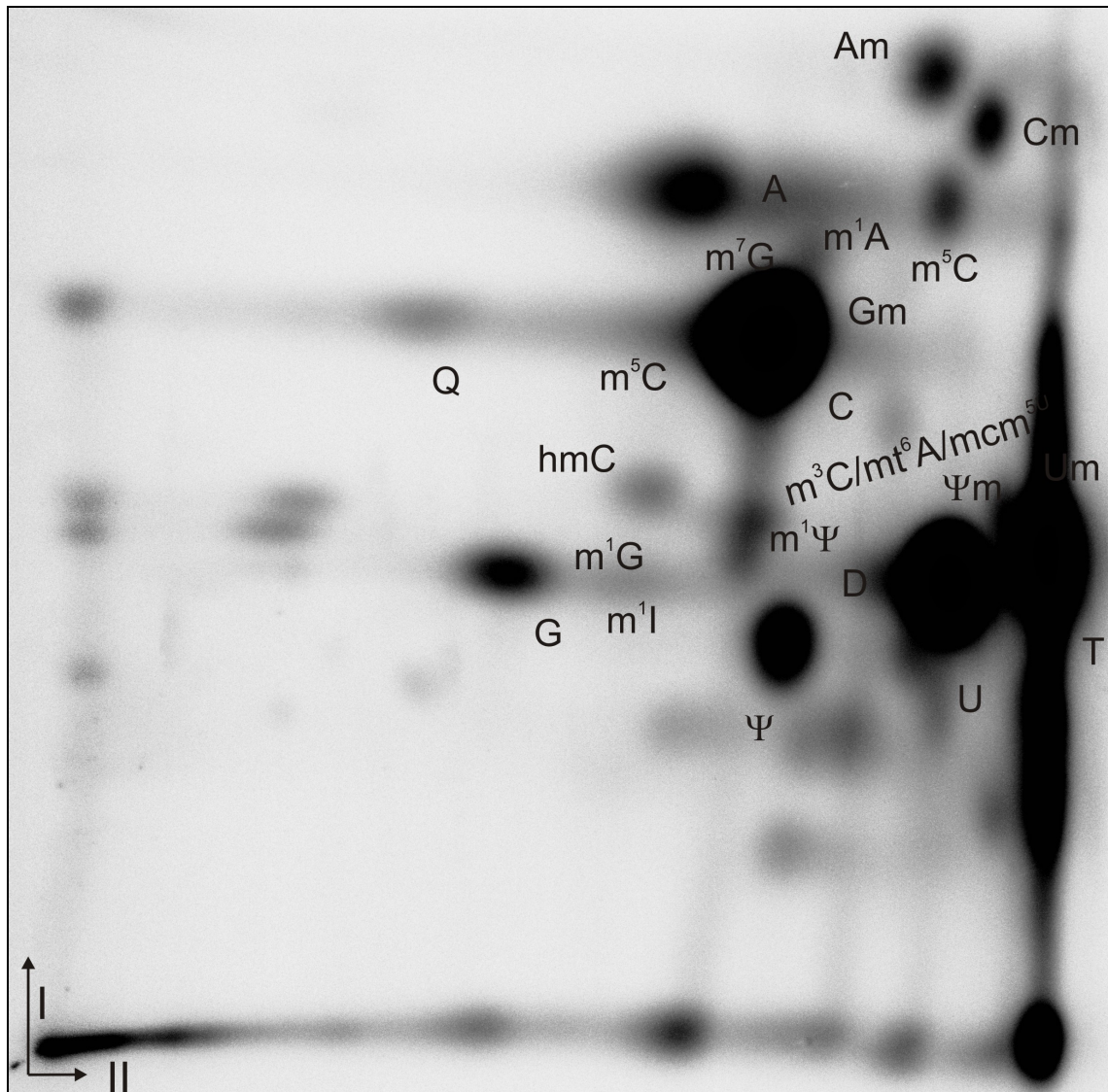
6.6. Analiza zmian w poziomie modyfikacji RNA w obrębie frakcji małych niekodujących RNA

Modyfikacje obecne w sekwencji DNA i białkach histonowych zostały stosunkowo dobrze opisane jako odpowiedzialne za regulację procesów związanych z ekspresją genów. Modyfikacji obecnych w DNA jest tylko kilka, są one intensywnie analizowane i korelowane z możliwymi pełnionymi przez nie funkcjami (Song i in. 2012). Od czasu kiedy odkryto pierwsze modyfikacje w sekwencji RNA minęło ponad 50 lat, w trakcie których zostało rozpoznanych i opisanych ponad 100 modyfikowanych nukleotydów (Grosjean 2005). Modyfikacje RNA obecne są w sekwencji wielu komórkowych cząsteczek RNA, takich jak rRNA, tRNA, mRNA, snRNA czy siRNA, miRNA i piRNA. W ostatnim czasie odkryto również modyfikację w sekwencji miRNA, w której pojawiają się inozyny. Postuluje się, że może mieć to duże znaczenie w szlaku biogenezy tych cząsteczek oraz ich aktywności biologicznej (Yang i in. 2006; Kawahara i in. 2007). Pomimo tak wielu zidentyfikowanych modyfikacji nukleotydów obecnych w komórkowych RNA ich wpływ regulatorowy na proces ekspresji informacji genetycznej jest często pomijany. Postanowiłam przeanalizować frakcję małych RNA o długości poniżej 200 nukleotydów pod kątem obecności modyfikowanych nukleotydów. Przeprowadziłam izolację całkowitego RNA, a następnie jego frakcjonowanie poprzez rozdział elektroforetyczny w żelu poliakryloamidowym. Zastosowanie markera wielkości pozwoliło mi na określenie zakresu, w którym, w żelu znajdowały się cząsteczki RNA o długości mniejszej niż 200 nukleotydów, które wyeluowałam z żelu i poddałam dalszej analizie.

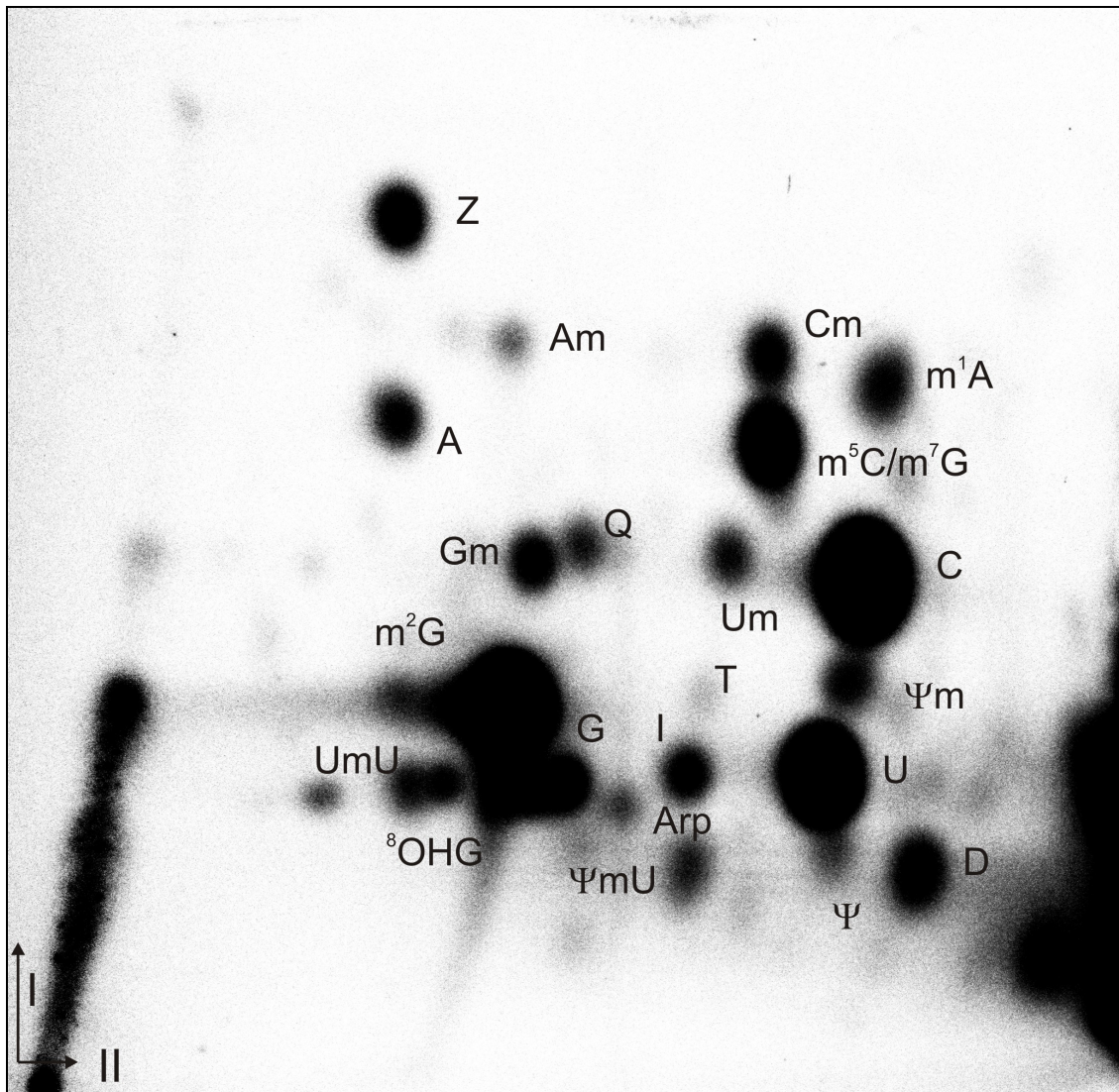
Na przykładzie ryżu dowiedziono, że działanie glifosatu w roślinie wiąże się z wywołaniem stresu oksydacyjnego (Ahsan i in. 2008). Prawdopodobnie również badane rośliny kukurydzy narażone były na stres oksydacyjny wywołany zastosowaniem Roundup. Wykazano, że w wyniku stresu oksydacyjnego możliwy jest w komórce proces ukierunkowanej degradacji RNA, szczególnie tRNA i rRNA, w wyniku którego powstają cząsteczki o nieznannej funkcji. Postuluje się, że powstające małe RNA mogą pełnić funkcję regulatorową w odpowiedzi na stres, a także stanowić długodystansowe przekaźniki informacji pomiędzy komórkami jednego organizmu (Nowacka i in. 2012; Shah i in. 2013). Autorzy doniesień literaturowych uważają, że największa ilość małych RNA pochodzi z ukierunkowanego cięcia tRNA. Postuluje się, że mogą one brać udział

jako regulatory procesów proliferacji komórek, ścieżki biogenezy miRNA i biosyntezy białka (Gebetsberger i in. 2012). Ponieważ cząsteczki tRNA są bardzo bogate w modyfikowane nukleotydy, mogą one stanowić doskonały wskaźnik zachodzących zmian w ich składzie i poziomie ekspresji w komórce w odpowiedzi na zmienne warunki środowiskowe.

Przeprowadziłam rozdział dwukierunkowy z wykorzystaniem techniki TLC radioizotopowo wyznakowanych monofosforanów nukleotydów. W celu zidentyfikowania poszczególnych nukleotydów sporządziłam zgodnie z opublikowaną metodyką atlasy rozdziału fosforanów nukleotydów techniką TLC z zastosowaniem w II kierunku rozdziału dwóch odmiennych faz ciekłych (Keith 1995). Wygenerowane obrazy odwzorowania płytek TLC porównywałam z opisanymi atlasami rozdziałów co pozwoliło mi na określenie lokalizacji plamek odpowiadających poszczególnym monofosforanom nukleotydów. Wygenerowane obrazy płytek zostały przedstawione na rysunkach 33. i 34.



Rysunek 33. Obraz rozdziału modyfikowanych monofosforanów nukleotydów pochodzących z frakcji małych RNA wykonany techniką chromatografii cienkowarstwowej. Zastosowano II fazę ciekłą z HCl. Do sporządzenia obrazu użyto mieszaniny monofosforanów nukleotydów uzyskanych ze wszystkich badanych próbek.

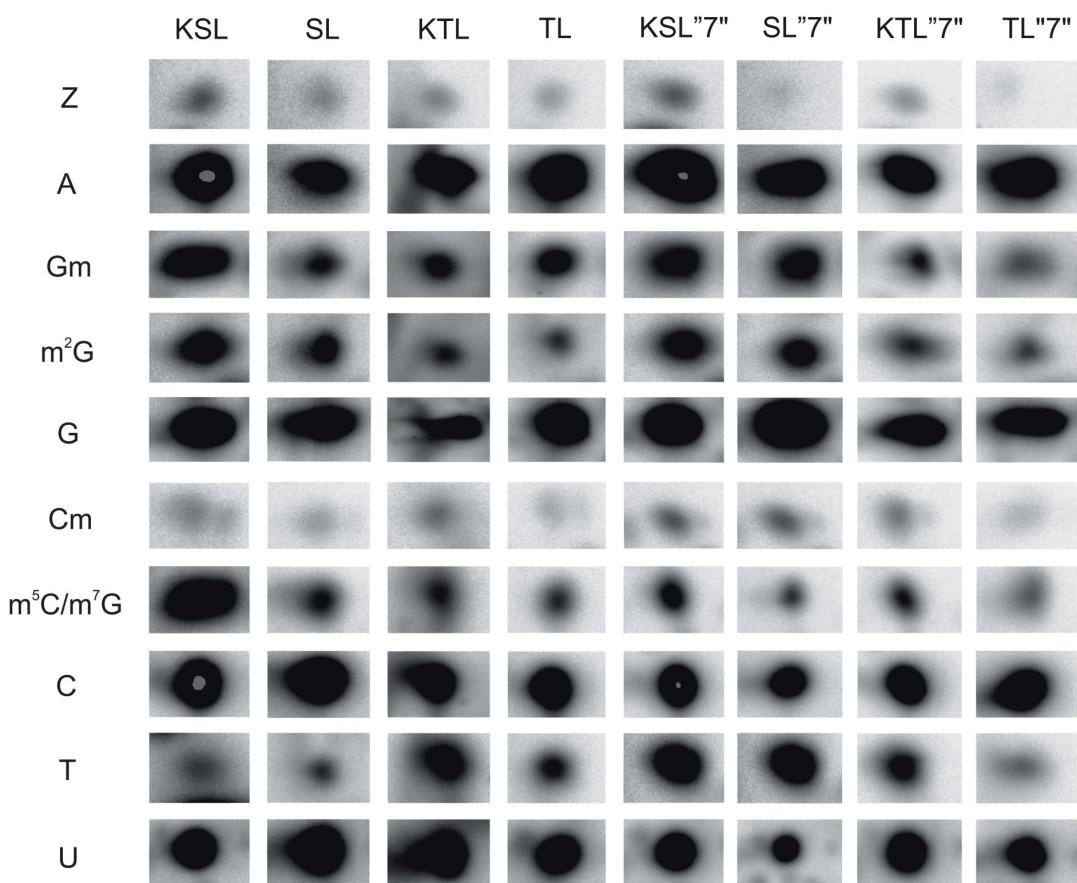


Rysunek 34. Obraz rozdziału modyfikowanych monofosforanów nukleotydów pochodzących z frakcji małych RNA wykonany techniką chromatografii cienkowarstwowej. Zastosowano II fazę ciekłą z fosforanem. Do sporządzenia obrazu użyto mieszaniny monofosforanów nukleotydów uzyskanych ze wszystkich badanych próbek.

W wyniku przeprowadzonych rozdziałów i prac związanych z oznaczeniem modyfikowanych monofosforanów nukleotydów zidentyfikowałam część z obecnych na płycie TLC plamek. Niektóre z obserwowanych plamek nie zostały opisane w literaturze i dlatego obecnie prowadzone są dalsze prace związane z ich identyfikacją. Możliwe, że są to nowe, modyfikowane nukleotydy, które powstają w wyniku narażenia komórek roślinnych na warunki stresowe. Istnieje też możliwość, że w wyniku działania związków

chemicznych zawartych w herbicydzie zachodzą reakcje chemicznej modyfikacji RNA i to ich produkty obserwuję w analizowanych na płytkach TLC rozdzielach.

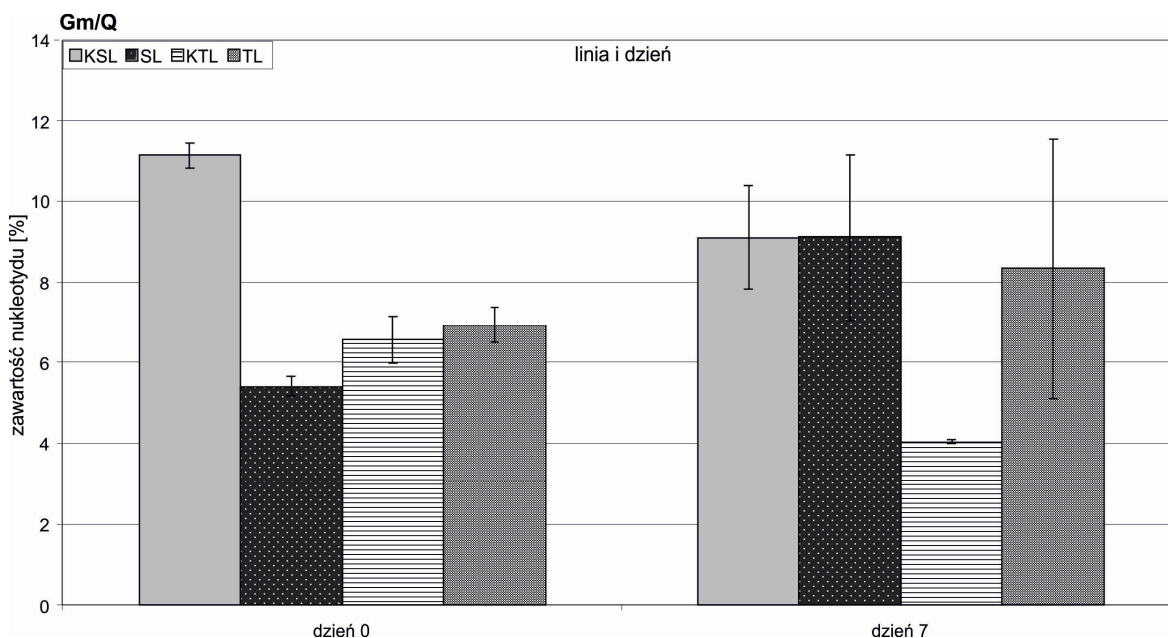
W celu dokładnego zobrazowania obserwowanych plamek odpowiadających poszczególne monofosforany nukleotydów wybranych do analizy ilościowej, sporządziłam zestawienie (Rysunek 35.).



Rysunek 35. Obraz przedstawia zebrane odwzorowania plam odpowiadających poszczególnym monofosforanom nukleotydów. Linie tolerancyjną poddaną zabiegowi oznaczono jako TL, linie wrażliwą poddaną zabiegowi jako SL, tolerancyjną linię kontrolną oznaczono jako KTL, a wrażliwą linię kontrolną jako KSL. Linie tolerancyjną po 7 dniach od zabiegu oznaczono jako TL"7", linie wrażliwą po 7 dniach od zabiegu jako SL"7", tolerancyjną linię kontrolną po 7 dniach od zabiegu oznaczono jako KTL, a wrażliwą linię kontrolną po 7 dniach od zabiegu jako KSL.

Wybrałam, nukleotydy obecne we wszystkich analizowanych liniach kukurydzy i które zostały zidentyfikowane na podstawie ich położenia na płytce TLC opisanego w literaturze. Określiłam również zmiany w poziomie niezidentyfikowanej modyfikacji nukleotydu nazwanej przeze mnie Z. Pozostałe nukleotydy będą dodatkowo

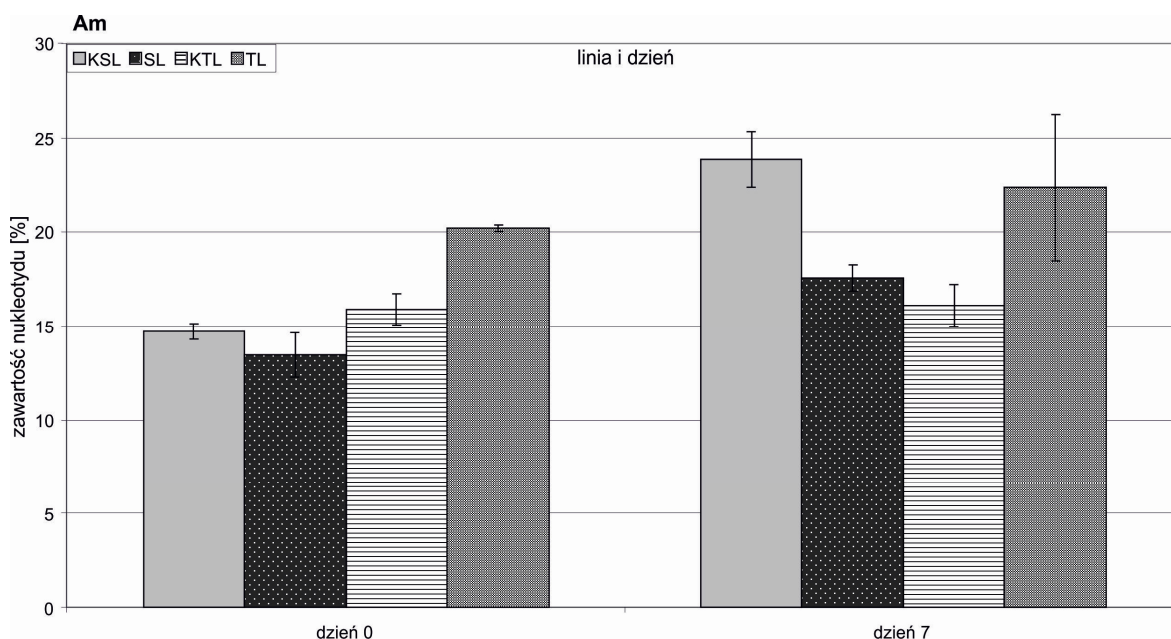
identyfikowane techniką spektrometrii mas w celu weryfikacji ich składu chemicznego. Dokładne porównania dla poszczególnych nukleotydów przedstawiłam na wykresach 22-32.



Wykres 22. Zawartość modyfikowanych monofosforanów nukleotydów Gm/Q pochodzących z frakcji małych RNA w poszczególnych liniach; \pm SD. Linie tolerancyjną poddaną zabiegowi oznaczono jako TL, linię wrażliwą poddaną zabiegowi jako SL, tolerancyjną linię kontrolną oznaczono jako KTL, a wrażliwą linię kontrolną jako KSL.

Fosforany nukleotydów Gm i Q wędrują na płycie TLC w podobny sposób i trudno jest rozdzielić prezentowane przez nie sygnały. Ze względu na ograniczoną rozdzielczość stosowanej metody postanowiłam te nukleotydy analizować wspólnie (oznaczono Gm/Q). Podobne podejście zastosowałam do pozostałych nukleotydów o podobnych współczynnikach rozdziału Rf. W dniu 0 u linii wrażliwej istniała istotna różnica pomiędzy ilością nukleotydów Gm/Q u rośliny poddanej warunkom stresowym i kontrolnej. Szczególnie interesująca jest obserwacja wzrostu zawartości tych nukleotydów w 7. dniu od zabiegu zastosowania Roundup u linii tolerancyjnej w porównaniu do warunków kontrolnych w dniu 0. W przypadku linii wrażliwej nie odnotowano zmian w dniu 7. pomiędzy linią kontrolną i poddaną stresowi. Quenozyna (Q) jest analogiem guanozyny często znajdowanym w pierwszej pozycji w pętli antykodonowej tRNA i jest to modyfikacja konserwatywna dla wszystkich królestw. Rośliny nie mają zdolności syntezy tego nukleotydu *de novo*, tylko czerpią go ze

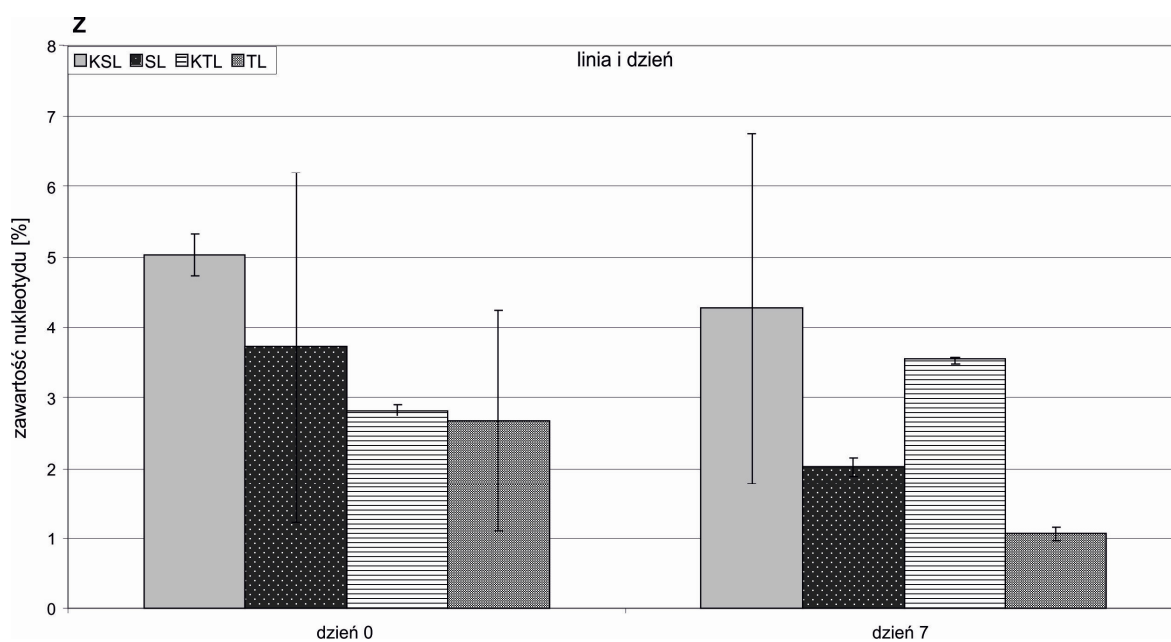
środowiska. Do tej pory nie wskazano jednoznacznie roli tej modyfikacji dla komórki poza rolą w oddziaływaniach kodon-antykodon. Wykazano, że wzrost poziomu Q jest związany z rozwojem u ludzi chłoniaka, białaczki, raka płuc, raka jajnika i guzów mózgu (Vinayak i in. 2010). Jednocześnie postuluje się, że poziom Q może być związany ze stopniem złośliwości zmian nowotworowych i próbuje się go traktować jako biomarker tego zjawiska. Sugeruje się również, że poziom tej modyfikacji może być związany z reakcją komórek na stres (Marks i in. 1997). W przypadku modyfikacji Gm stwierdzono, że jej występowanie na zmniejszonym poziomie skorelowane jest z występowaniem guzów Ehrlicha, nerwiaków, rakomięsaków i wątrobiaków Morrisa (Dirheimer i in. 1995). Znaczny wzrost poziomu modyfikowanych nukleotydów Q/Gm u linii tolerancyjnej poddanej stresowi (w porównaniu do kontroli) może potwierdzać sugestie innych autorów, że są one zaangażowane w odpowiedź na stres. Wniosuję, że wzrost poziomu tych modyfikacji u roślin związanych może być z mechanizmami kształtującymi tolerancję na warunki stresowe.



Wykres 23. Zawartość modyfikowanych monofosforanów nukleotydów Am pochodzących z frakcji małych RNA w poszczególnych liniach; \pm SD. Linię tolerancyjną poddaną zabiegowi oznaczono jako TL, linię wrażliwą poddaną zabiegowi jako SL, tolerancyjną linię kontrolną oznaczono jako KTL, a wrażliwą linię kontrolną jako KSL.

Analiza zawartości Am wskazuje na istotne zmiany w poziomie tej modyfikacji pod wpływem rozwoju rośliny kontrolnej linii wrażliwej. Jednocześnie u rośliny SL

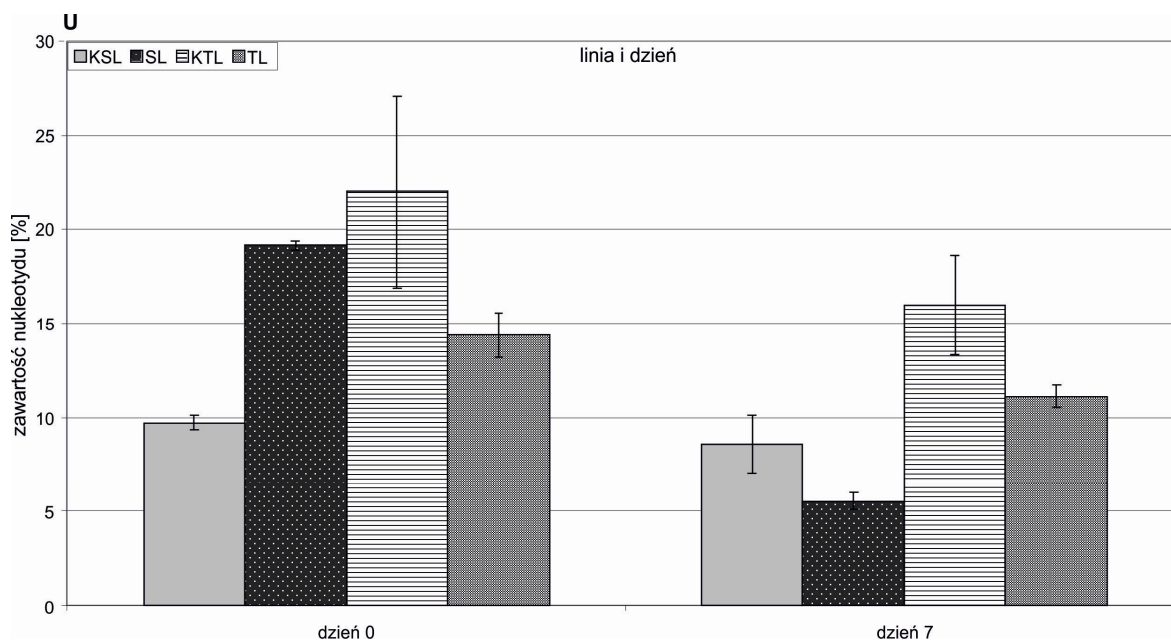
poddanej warunkom stresowym poziom Am był istotnie niższy niż u rośliny kontrolnej. Odwrotną zależność zaobserwowałam u linii tolerancyjnej, gdzie pod wpływem stresu dochodziło do istotnego wzrostu zawartości Am, w porównaniu do roślin kontrolnych w dniu 7. Modyfikacja ta jest stosunkowo rzadka u organizmów wyższych, a bliższa jej rola w sekwencji tRNA nie jest poznana. Jej obecność została potwierdzona również w sekwencjach rRNA i snRNA (Limbach i in. 1994; Guymon i in. 2006). Przeprowadzone przeze mnie obserwacje pozwalają na stwierdzenie, że istnieje pozytywna korelacja poziomu Am z cechą tolerancji na stres herbicydowy wywołany Roundup.



Wykres 24. Zawartość modyfikowanych monofosforanów nukleotydów Z pochodzących z frakcji małych RNA w poszczególnych liniach; \pm SD. Linie tolerancyjną poddaną zabiegowi oznaczono jako TL, linię wrażliwą poddaną zabiegowi jako SL, tolerancyjną linię kontrolną oznaczono jako KTL, a wrażliwą linię kontrolną jako KSL.

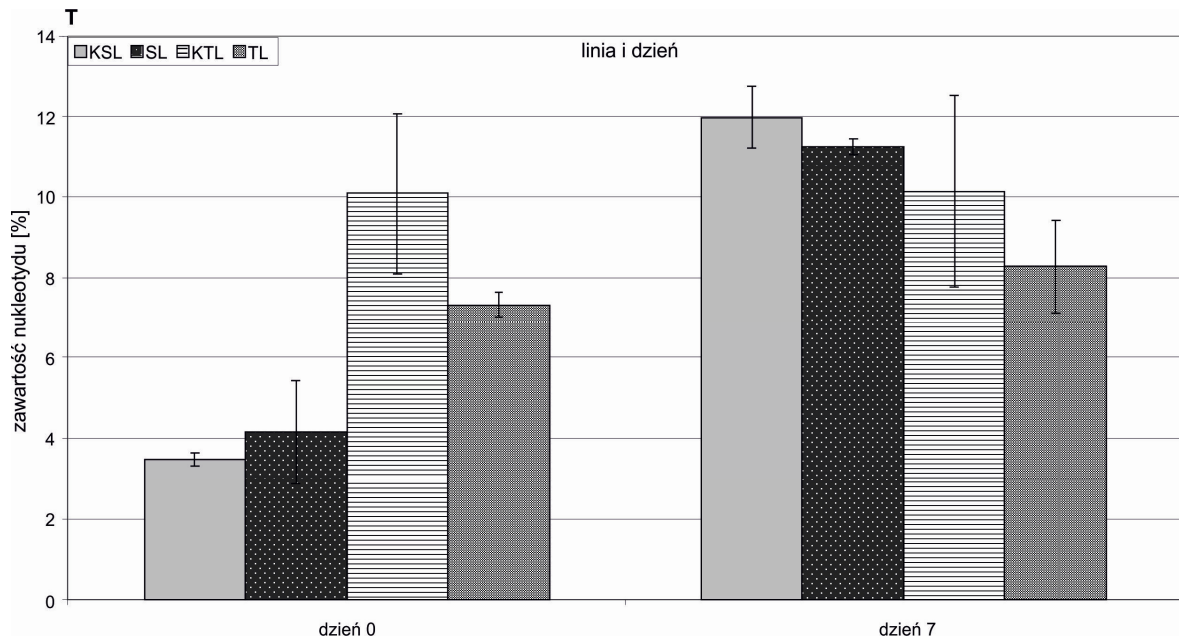
Obserwowana zmiana w poziomie modyfikacji opisanej przeze mnie jako Z wydaje się interesująca w kontekście odpowiedzi na stres wywołany Roundup. Zarówno dla linii tolerancyjnej, jak i wrażliwej zaobserwowałam istotne obniżenie zawartości tego nukleotydu po 7 dniach. Jednocześnie u roślin kontrolnych SL nie zanotowano istotnej zmiany zawartości Z, a u TL podniesienie jej ilości. Postuluję, że opisane zmiany w zawartości tej modyfikacji mogą być związane z pojawieniem się warunków stresowych i są one podobne dla SL i TL. Wydaje się, że skoro zmiany te mają podobny charakter w przypadku obu linii, to zmiana zawartości Z nie jest związana z cechą tolerancji na stres,

a jedynie jego skutkiem. Badana modyfikacja Z nie jest scharakteryzowana w atlasach nukleotydów, co wydaje się jeszcze ciekawsze. Obecnie poddawana jest ona dalszym analizom w celu jej identyfikacji, określenia składu i budowy chemicznej.



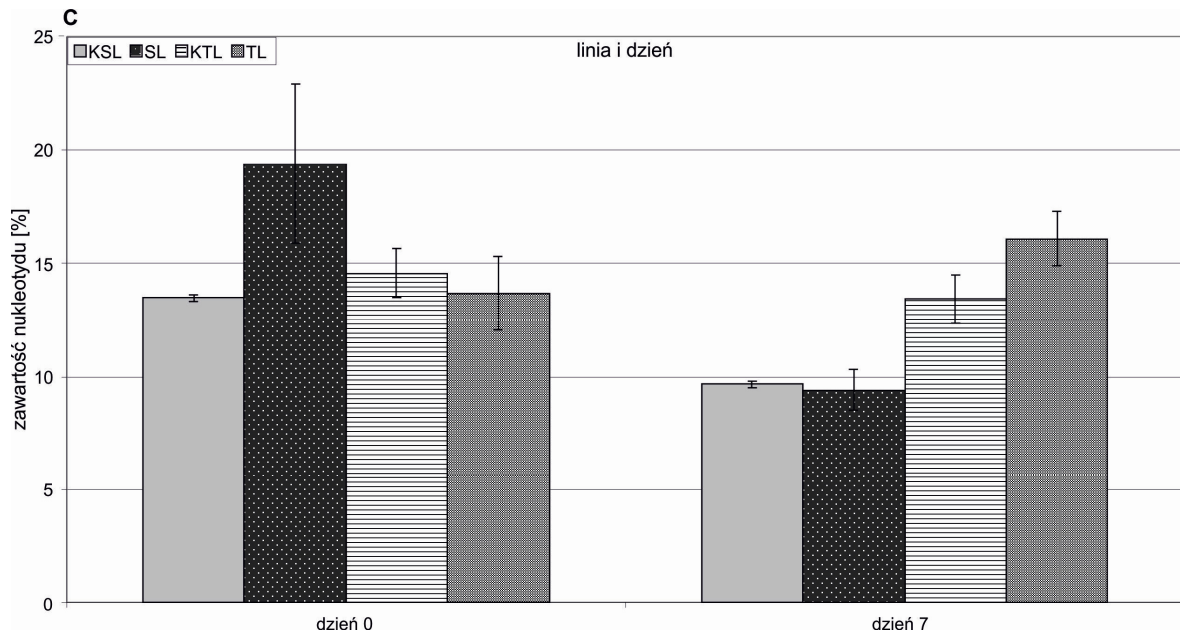
Wykres 253. Zawartość monofosforanów nukleotydów U pochodzących z frakcji małych RNA w poszczególnych liniach; \pm SD. Linie Linie tolerancyjną poddaną zabiegowi oznaczono jako TL, linię wrażliwą poddaną zabiegowi jako SL, tolerancyjną linię kontrolną oznaczono jako KTL, a wrażliwą linię kontrolną jako KSL.

Analiza zawartości nukleotydu U w analizowanych liniach pozwoliła na stwierdzenie, że jego poziom dynamicznie zmienia się w trakcie wzrostu rośliny. U linii tolerancyjnej zaobserwowałam po 7 dniach obniżenie zawartości U w przypadku linii kontrolnej i poddanej stresowi. Proporcja zawartości U w tych roślinach była podobna jak w dniu 0. U linii wrażliwej zanotowano istotne obniżenie poziomu U u roślin poddanych stresowi. Zauważyłam, że zjawisko to może być związane z obniżeniem pod wpływem stresu u linii wrażliwej na Roundup transkrypcji sekwencji bogatych w U. Możliwe, że zjawisko to związane jest z wrażliwością rośliny na zastosowane warunki stresowe lub wiązać się z kierowaniem komórek na drogę apoptozy i tym samym obniżeniem transkrypcji.



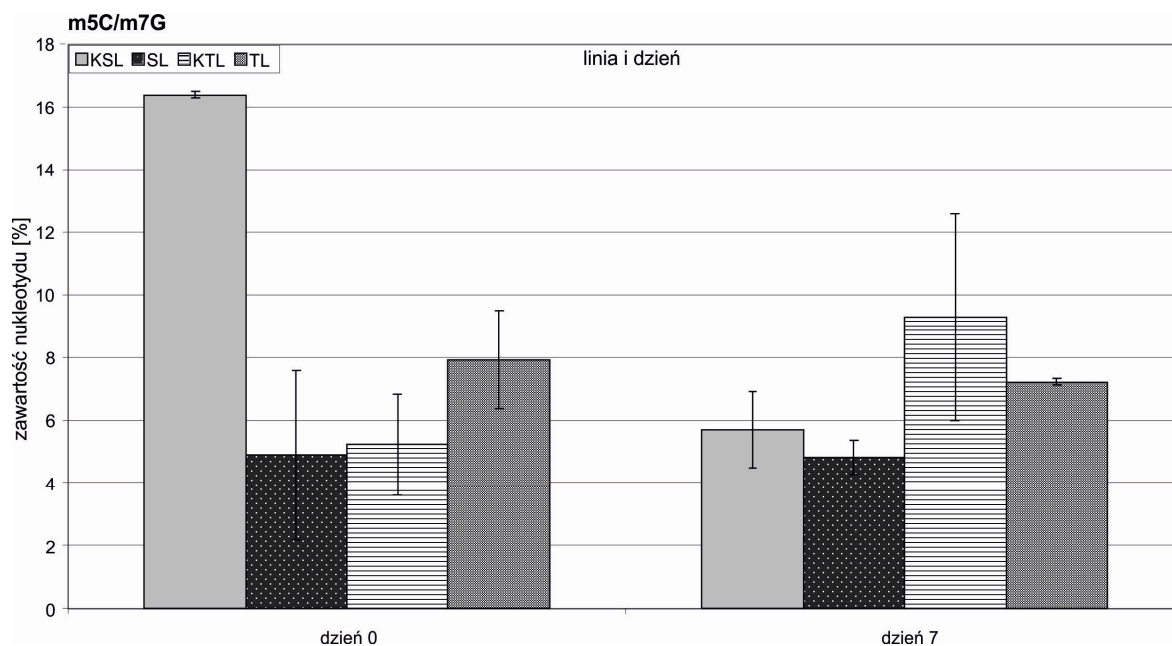
Wykres 26. Zawartość monofosforanów nukleotydów T pochodzących z frakcji małych RNA w poszczególnych liniach; \pm SD. Linie tolerancyjną poddaną zabiegowi oznaczono jako TL, linię wrażliwą poddaną zabiegowi jako SL, tolerancyjną linię kontrolną oznaczono jako KTL, a wrażliwą linię kontrolną jako KSL.

Tymina należy do podstawowych nukleotydów tworzących łańcuchy DNA, w RNA zaliczana jest do modyfikacji sekwencji. Zaistniałe warunki stresowe spowodowały istotny wzrost zawartości T w RNA w linii wrażliwej po 7 dniach. Podobnie zachowała się roślina kontrolna i roślina poddana stresowi, dlatego zmianę tę powinno się wiązać z procesem wzrostu i rozwoju tkanek roślinnych, a nie reakcją na stres. Jednocześnie należy zauważyć, że u linii wrażliwej ilość sekwencji RNA bogatych w T w dniu 7. była większa niż u linii tolerancyjnej. Zmiany te można wiązać ze specyfiką mechanizmów komórkowych i transkrybowanych sekwencji charakterystycznymi w danej linii. Pod wpływem stresu w czasie 7 dni nie zaobserwowałam istotnych zmian w zawartości T u linii tolerancyjnej.



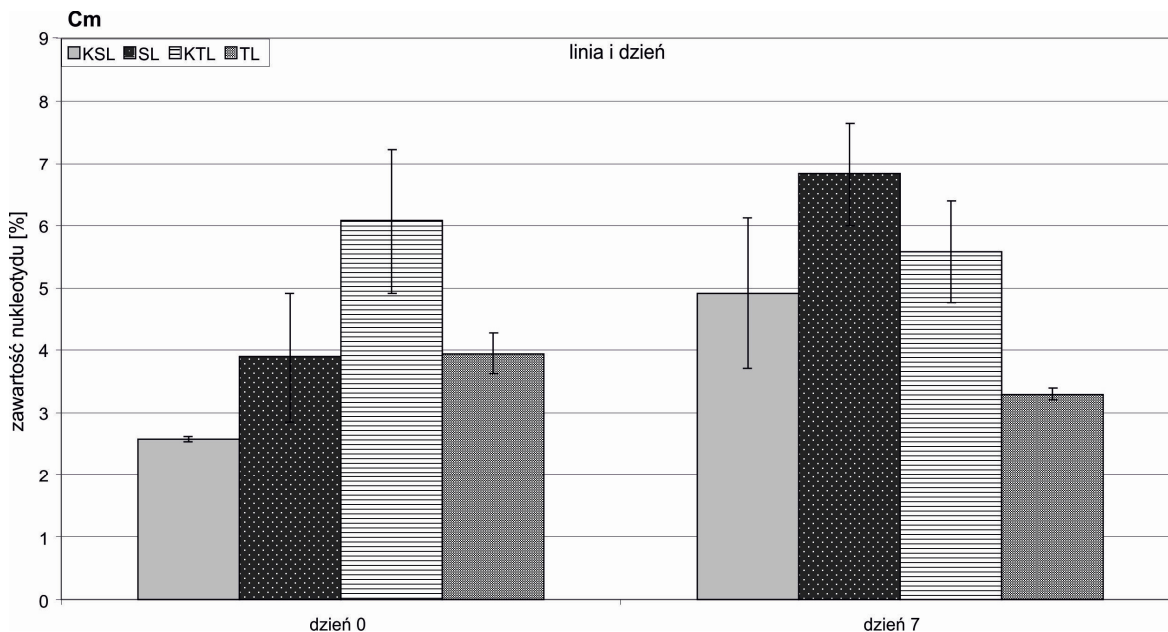
Wykres 27. Zawartość monofosforanów nukleotydów C pochodzących z frakcji małych RNA w poszczególnych liniach; \pm SD. Linie tolerancyjną poddaną zabiegowi oznaczono jako TL, linię wrażliwą poddaną zabiegowi jako SL, tolerancyjną linię kontrolną oznaczono jako KTL, a wrażliwą linię kontrolną jako KSL.

Cytozyna podobnie, jak U stanowi podstawowy nukleotyd budujący sekwencje komórkowych RNA. Na podstawie przeprowadzonych badań można wnioskować, że zawartość C w badanych RNA uległa nieznacznym zmianom u linii tolerancyjnej w okresie 7 dni od wprowadzenia warunków stresowych. U linii wrażliwej zaobserwowałam obniżenie zawartości C po 7 dniach, ale jej poziom był porównywalny u roślin kontrolnych i poddanych stresowi. Sądzę, że C jako podstawowy nukleotyd RNA nie bierze udziału w reakcji na stres wywołany działaniem Roundup. Obserwowane przeze mnie zmiany mogą być wywołane wzrostem i rozwojem rośliny, w przypadku linii tolerancyjnej. Obniżenie zawartości C u linii wrażliwej może być związane z powolną śmiercią rośliny i zmniejszeniem intensywności transkrypcji.



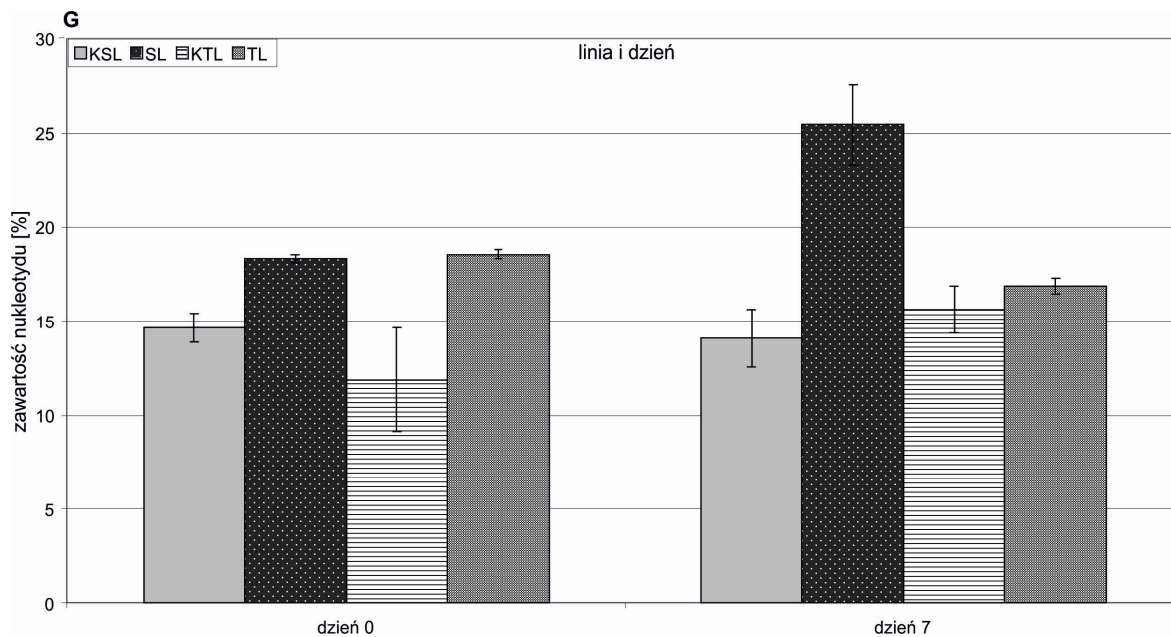
Wykres 28. Zawartość modyfikowanych monofosforanów nukleotydów m^5C/m^7G pochodzących z frakcji małych RNA w poszczególnych liniach; \pm SD. Linie tolerancyjną poddaną zabiegowi oznaczono jako TL, linię wrażliwą poddaną zabiegowi jako SL, tolerancyjną linię kontrolną oznaczono jako KTL, a wrażliwą linię kontrolną jako KSL.

Analiza zawartości m^5C i m^7G (oznaczono m^5C/m^7G) nie ukazała po 7 dniach od zabiegu natrysku herbicydem u linii tolerancyjnej dużych zmian w poziomie tych modyfikacji w porównaniu z dniem 0. Jednocześnie zmiana wystąpiła u roślin kontrolnych linii tolerancyjnej. W przypadku linii wrażliwej po 7 dniach obniżyła się zawartość m^5C/m^7G u roślin kontrolnych. Tak istotna zmiana może być wywołana zmianami zachodzącymi w metabolizmie wzrastającej rośliny. Postuluje się, że modyfikacje nukleotydów: Cm, m^5C i m^2G biorą udział w odpowiedzi na stres oksydacyjny (Chan i in. 2010). Stwierdzono również, że utrata m^5C prowadzi do obniżenia poziomu biosyntezy białek i może wiązać się z funkcją regulatorową w warunkach stresowych (Tuorto i in. 2012). Przeprowadzone przeze mnie analizy nie wskazują na zaangażowanie m^5C w odpowiedź i kształtowanie odporności na stres herbicydowy u kukurydzy. Obniżenie ilości metyloowanych nukleotydów w linii kontrolnej wrażliwej łączyć można z procesem rozwoju rośliny i związaną z tym ich aktywacją.



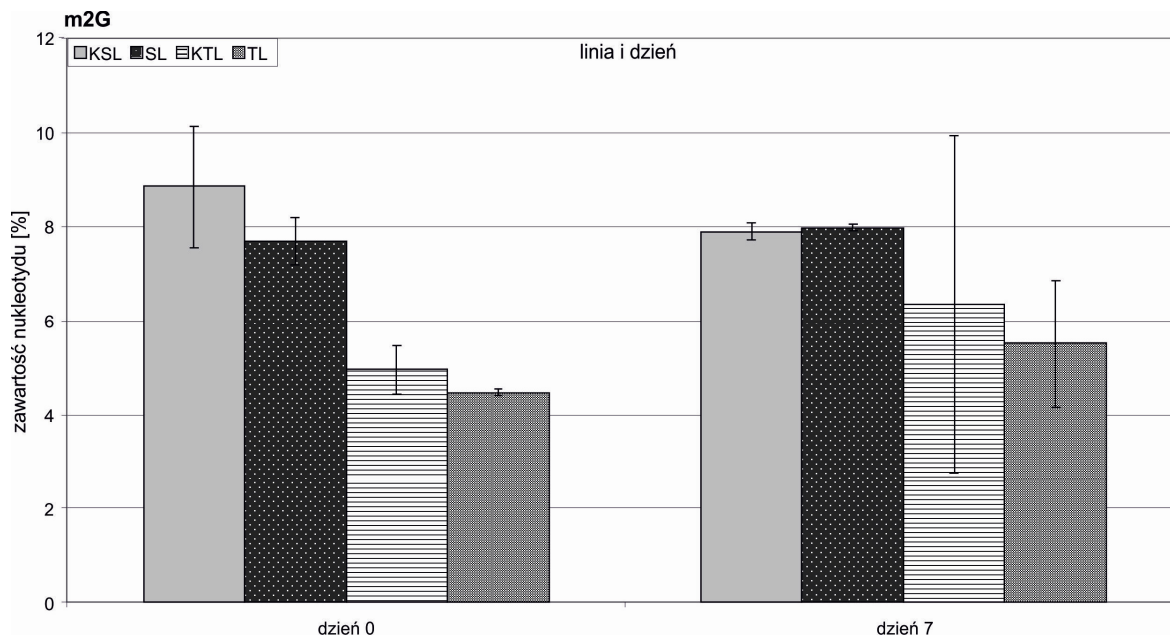
Wykres 29. Zawartość modyfikowanych monofosforanów nukleotydów Cm pochodzących z frakcji małych RNA w poszczególnych liniach; \pm SD. Linię tolerancyjną poddaną zabiegowi oznaczono jako TL, linię wrażliwą poddaną zabiegowi jako SL, tolerancyjną linię kontrolną oznaczono jako KTL, a wrażliwą linię kontrolną jako KSL.

Na podstawie obserwacji poziomu zawartości Cm u kukurydzy mogę stwierdzić, że w przypadku linii tolerancyjnej nie odnotowałam istotnych zmian u roślin kontrolnych i poddanych stresowi po 7 dniach. Zawartość Cm u linii tolerancyjnej obniżyła się nieznacznie po tygodniu od zastosowania zabiegu oprysku herbicydem. U roślin linii wrażliwej zauważyłam podniesienie zawartości Cm po tygodniu od zastosowania warunków stresowych u roślin traktowanych herbicydem i roślin kontrolnych. Jak wcześniej wspomniano obecność modyfikacji Cm wiązana jest z reakcją na stres oksydacyjny (Chan i in. 2010). Potwierdzony został również jej związek z powstawaniem nowotworów, jednak zależnie od rodzaju guza wskazuje się na wzrost lub spadek poziomu Cm w tkance (Dirheimer i in. 1995). W przypadku obserwowanych przeze mnie zmian są one zbyt niskie, aby na ich podstawie wnioskować o zaangażowaniu modyfikacji Cm w odpowiedź na zastosowany stres herbicydowy. Można jednak stwierdzić, że w procesie rozwoju roślin linii wrażliwej znacznie wzrosła ilość modyfikacji Cm.



Wykres 30. Zawartość modyfikowanych monofosforanów nukleotydów G pochodzących z frakcji małych RNA w poszczególnych liniach; \pm SD. Linię tolerancyjną poddaną zabiegowi oznaczono jako TL, linię wrażliwą poddaną zabiegowi jako SL, tolerancyjną linię kontrolną oznaczono jako KTL, a wrażliwą linię kontrolną jako KSL.

U linii wrażliwej po 7 dniach od zastosowania stresu herbicydowego zaobserwowałam zwiększenie zawartości nukleotydu G w analizowanej frakcji RNA. Dla linii tolerancyjnej po 7 dniach zanotowałam nieznaczne różnice w zawartości G u roślin kontrolnych i poddanych stresowi. Możliwe, że dużo większa ilość G związana jest z syntezą w komórce małych RNA o sekwencjach bogatych w G w odpowiedzi na zaistniałe warunki stresowe. Reakcja ta wydaje się mieć związek z wrażliwością linii na działanie herbicydu Roundup. Jednocześnie u linii tolerancyjnej widoczna jest przeciwna tendencja, czyli obniżenie ilości G pod wpływem warunków stresowych.

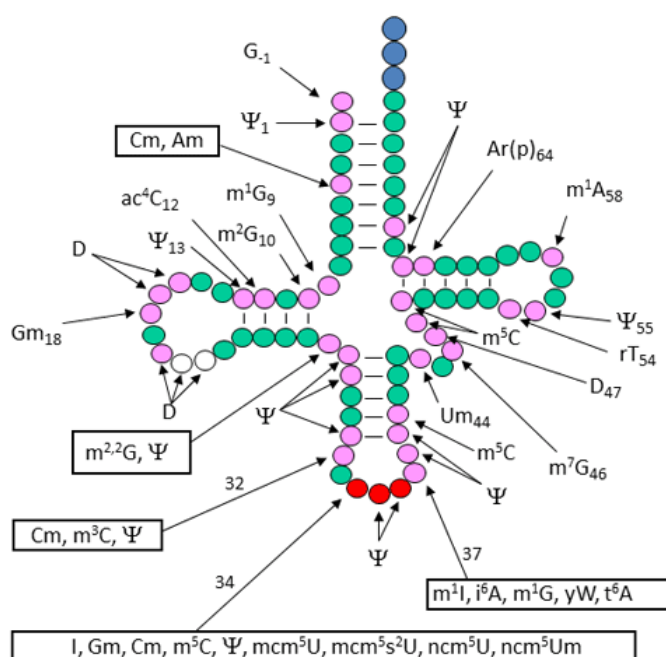


Wykres 31. Zawartość modyfikowanych monofosforanów nukleotydów m²G pochodzących z frakcji małych RNA w poszczególnych liniach; \pm SD. Linie tolerancyjną poddaną zabiegowi oznaczono jako TL, linię wrażliwą poddaną zabiegowi jako SL, tolerancyjną linię kontrolną oznaczono jako KTL, a wrażliwą linię kontrolną jako KSL.

Przeprowadzona przeze mnie analiza zmian zawartości m²G nie wykazała istotnych statystycznie zmian pomiędzy roślinami badanymi, a kontrolnymi danej linii w żadnym z punktów czasowych. Zaobserwowałam podniesienie zawartości tej modyfikacji w linii tolerancyjnej po tygodniu wzrostu roślin. Odnotowano, że pod wpływem stresu oksydacyjnego ilość m²G w komórkach bakteryjnych malała (Chan i in. 2010). Przeprowadzone badania pozwalają na wnioskowanie, że w przypadku kukurydzy nie były obecne istotne zmiany w poziomie m²G w odpowiedzi na stres herbicydowy.

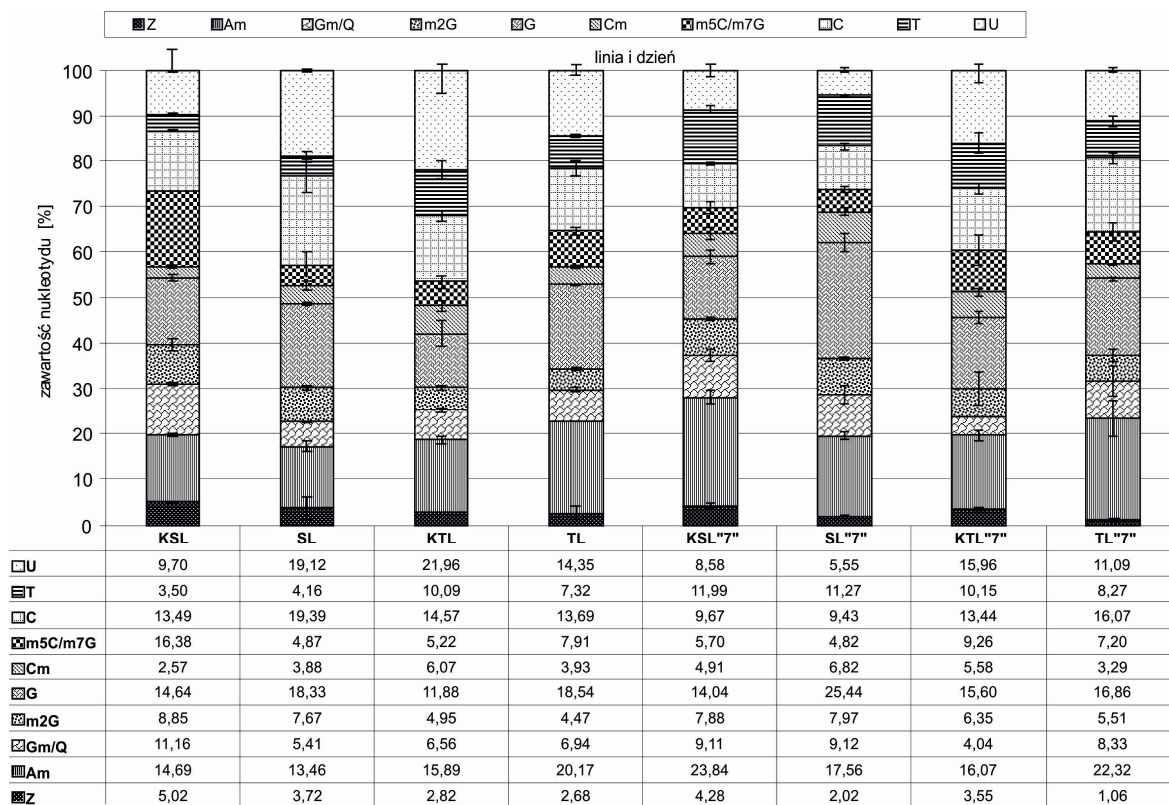
Do tej pory prowadzone były próby skorelowania obecności modyfikowanych nukleotydów w tRNA ze stanami chorobowymi u ludzi. Badano związek modyfikacji obecnych w sekwencji tRNA w kontekście zachorowania na raka. Odnotowano, że w komórkach rakowych sekwencje tRNA są hipermodyfikowane, w porównaniu z tymi pochodzącymi z tkanek zdrowych (Dirheimer i in. 1995). Wykazano również obecność m⁶A w sekwencji mRNA oraz odnotowano obecność białek specyficznie wiążących tę modyfikację, co może sugerować jej funkcję regulatorową. Zaobserwowano, że szczególnie częste występowanie m⁶A ma miejsce w pobliżu kodonu STOP przy końcu 3' – UTR oraz w rejonach intronowych genomu (Song i in. 2012). Pomimo prowadzonych analiz nie udało się definitywnie określić roli poszczególnych modyfikacji. Wydaje się, że

tak duża ich różnorodność odgrywa istotną rolę w kształtowaniu struktur RNA i związaną z nimi możliwość oddziaływania z innymi molekułami komórkowymi, jak białka i inne RNA. Postuluje się niezwykle duży potencjał regulatorowy małych RNA oraz istotny wpływ na ich aktywność obecnych w sekwencji modyfikacji (Kellner i in. 2010). Wnioskuje, że w odpowiedzi na stres zaangażowana jest niezidentyfikowana, opisana przeze mnie jako Z modyfikacja nukleotydu. Postuluję również zaangażowanie modyfikowanych nukleotydów Gm/Q i Am i ich pozytywną korelację z cechą tolerancji na stres wywołany działaniem Roundup.



Rysunek 36. II – rzędowa struktura tRNA z zaznaczonymi miejscami występowania modyfikowanych nukleotydów (Fields i in. 2013).

Na poniższym rysunku przedstawiłam strukturę tRNA w celu zobrazowania miejsc występowania w nim modyfikowanych nukleotydów (Rysunek 36.). Wykres przedstawia zbiorczą analizę zawartości poszczególnych nukleotydów badanej frakcji małych RNA (Wykres 32.).



Wykres 32. Zawartość modyfikowanych monofosforanów nukleotydów pochodzących z frakcji małych RNA w poszczególnych liniach; \pm SD. Linię tolerancyjną poddaną zabiegowi oznaczono jako TL, linię wrażliwą poddaną zabiegowi jako SL, tolerancyjną linię kontrolną oznaczono jako KTL, a wrażliwą linię kontrolną jako KSL. Linię tolerancyjną po 7 dniach od zabiegu oznaczono jako TL"7", linię wrażliwą po 7 dniach od zabiegu jako SL"7", tolerancyjną linię kontrolną po 7 dniach od zabiegu oznaczono jako KTL, a wrażliwą linię kontrolną po 7 dniach od zabiegu jako KSL.

6.7. Analiza wpływu czynników aktywnych herbicydów na wydajność wiązania aa-tRNA do rybosomu na matrycy poliU

Końcowym etapem ekspresji genów kodujących białka w komórce jest proces translacji, który prowadzi do powstania polipeptydów. Prawidłowe zwijanie łańcuchów polipeptydowych i ich modyfikacje potranslacyjne skutkują powstaniem zestawu aktywnych białek istniejącego w komórce w danych warunkach (Kozak 2005). Za syntezę polipeptydów na matrycy mRNA odpowiedzialny jest rybosom, niezwykle skomplikowana strukturalnie nukleoproteinowa makromolekuła. Wykazano, że w genomie organizmów wyższych tylko kilka procent genomu stanowią sekwencje kodujące, a maszyna translacyjna to około 30% suchej masy komórki (Błaszczak i in. 2007). W powstanie rybosomu, a następnie właściwe funkcjonowanie procesu translacji zaangażowanych jest ponad 200 czynników białkowych i są to procesy wysoce energochłonne. Procesy związane z powstawaniem maszyny translacyjnej oraz jej dojrzewaniem przebiegają z bardzo dużą dokładnością, prawdopodobnie ze względu na ilość energii konieczną dla ich prawidłowego zajścia (Kressler i in. 2010). Jednocześnie wykazano, że rybosom posiada umiejętność weryfikacji czy został związany właściwy aa-tRNA w miejscu A i jego ewentualnego uwolnienia w przypadku związania niewłaściwej cząsteczki (Pechmann i in. 2013). Tak duże zaangażowanie mechanizmów komórkowych w proces translacji dowodzi jego wielkiej wagi dla właściwego funkcjonowania komórek, a tym samym całych organizmów (Horiguchi i in. 2012). Na podstawie badań polegających na wprowadzaniu mutacji zarówno w sekwencje białek rybosomalnych, jak i rRNA stwierdzono, że ich właściwa, poprawna sekwencja jest bardzo ważna dla prawidłowego przeprowadzania przez rybosom biosyntezy białka. Stwierdzono, że mutacje w obrębie białek powodowały zmiany w rozwoju komórek i ich funkcjonowaniu (Horiguchi i in. 2011; Szakonyi i in. 2011). Analizowałam również ich wpływ na aktywność i lokalizację komórkową układów translacyjnych w warunkach stresowych (Baluska i in. 2000; Sormani i in. 2011). Stwierdzono bezpośredni związek pomiędzy zaistniałym stresem, również oksydacyjnym, a mechanizmami inicjacji translacji. W warunkach stresowych często mamy do czynienia z inicjacją z miejsca wewnętrznego wiązania rybosomu (IRES, *ang. internal ribosome entry site*) (Macejak i in. 1991; Dutkiewicz i in. 2006).

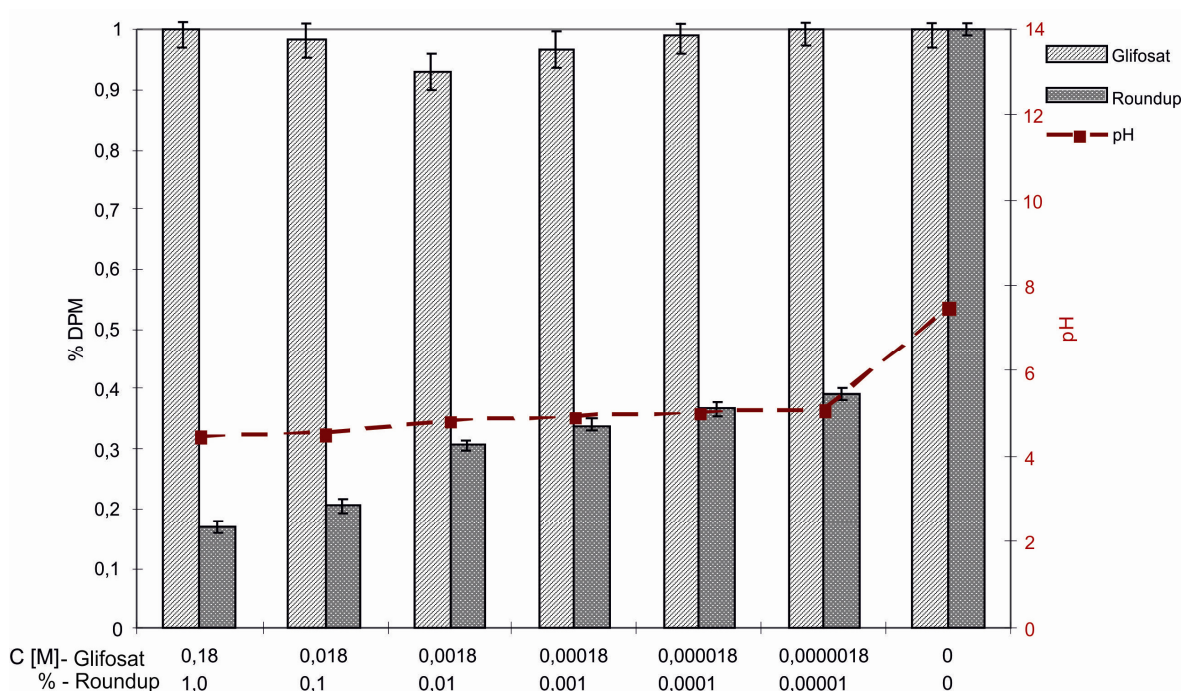
Dobrze poznane i często stosowane w badaniach struktury, jak i przebiegu procesu translacji są niskocząsteczkowe związki chemiczne – antybiotyki. Obecnie antybiotyki są bardzo szeroko stosowane w leczeniu zakażeń bakteryjnych, a także jako sondy

pomagające badać procesy biologiczne związane z translacją (Falconer i in. 2011). Antybiotyki wiążąc się w miejscach specyficznych dla wiązania cząsteczek tRNA lub miejscu katalitycznym rybosomu hamują jego aktywność (Yarmolinsky i in. 1959). Nie są to jednak jedyne cząsteczki mające wpływ na aktywność rybosomów. Dowiedziono, że naturalnie występujące związki pochodzenia roślinnego jak sarcyna i rycyna powodują specyficzne przecięcie rRNA w obrębie pętli sarcyny-rycyny powodując bezpowrotną utratę aktywności rybosomu (Garcia-Ortega i in. 2010).

Składniki aktywne stosowanych w pracy herbicydów również stanowią małowcząsteczkowe związki chemiczne. Ich aktywność w komórce i hamowane szlaki metaboliczne zostały dość dobrze opisane w literaturze. Brak jednak doniesień czy istnieje jakikolwiek wpływ herbicydów na aktywność układu translacyjnego. Pierwszym i bardzo ważnym etapem translacji jest wiązanie cząsteczki aminoacylowanego tRNA (aa-tRNA) do rybosomu na matrycy mRNA. Eksperymentalnie sprawdziłam czy czynniki aktywne stosowanych herbicydów, jak i same komercyjnie dostępne środki Roundup, Titus i Basta mają wpływ na wydajność wiązania aa-tRNA do rybosomu czyli reakcji wiązania (RW).

Dysponując aktywnym układem translacyjnym *in vitro*, uzyskanym z kontrolnej linii tolerancyjnej wprowadziłam do środowiska reakcyjnego czynnik aktywny danego herbicydu i badałam wydajność wiązania aminoacylowanego tRNA do rybosomu w tych warunkach. Uzyskane wydajności wiązania aa-tRNA do rybosomu przy udziale każdego z czynników aktywnych oraz dla reakcji kontrolnej przedstawiłam na wykresach 33-35.

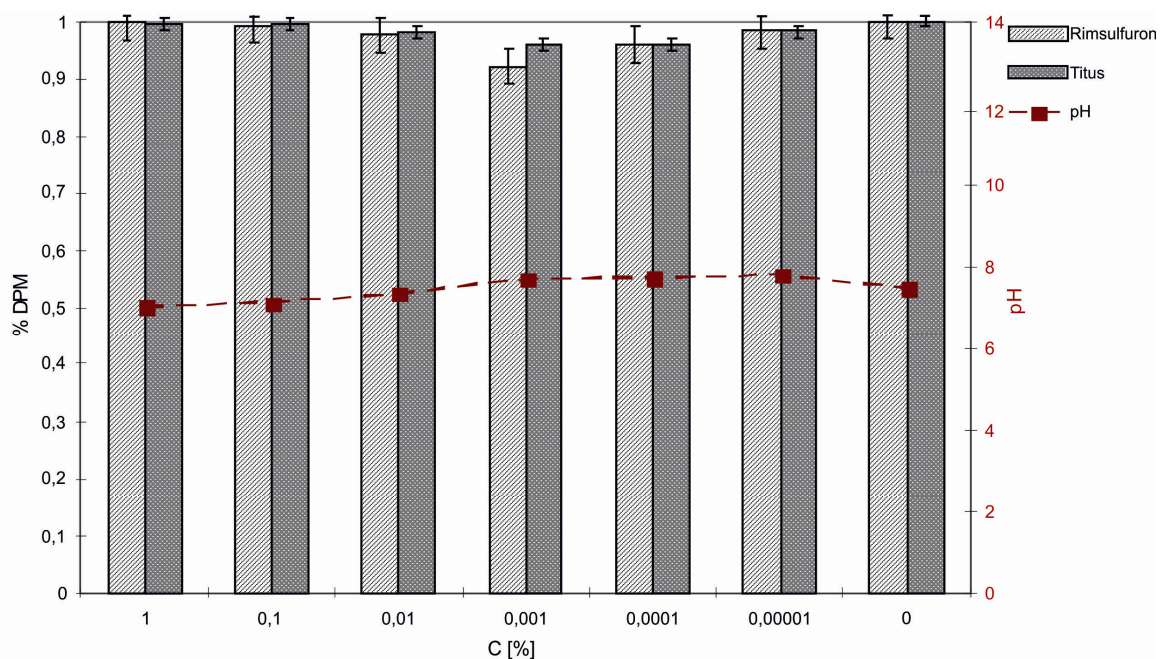
Dokonałam analizy statystycznej uzyskanych analiz wykonanych w trzech powtórzeniach technicznych. Na podstawie wykresu można wnioskować, że czynniki aktywne herbicydów nie wiążą się w żadnym z miejsc istotnych dla zajścia reakcji RW w jego centrach aktywnych. Sugeruję, że jeśli nawet czynniki aktywne reagują z poszczególnymi składnikami układu translacyjnego, to nie ma to wpływu na aktywność i wydajność pracy takiego układu.



Wykres 33. Analiza poziomu wiązania aa-tRNA do rybosomu na matrycy poliU pod wpływem glifosatu i Roundup; $p \leq 0,05$; $\pm SD$.

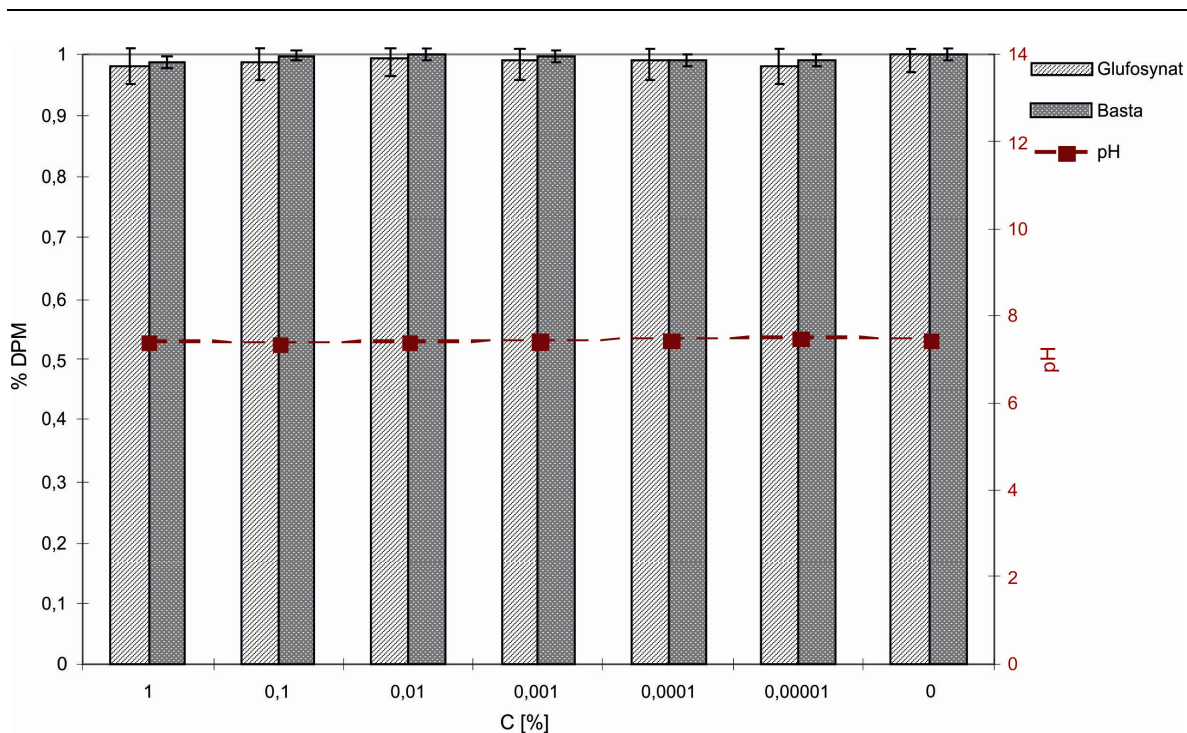
Dodanie przez mnie glifosatu (czynnika aktywnego herbicydu Roundup) w malejących stężeniach nie spowodowało statystycznie istotnych zmian w wydajności wiązania aa-tRNA do rybosomu. Zastosowanie w tych samych stężeniach herbicydu Roundup spowodowało wyraźny spadek wydajności reakcji wiązania. Wykazałam, że komercyjnie dostępny herbicyd cechuje duża kwasowość. Postanowiłam przeanalizować jak kształtowało się pH reakcji RW pod wpływem dodatku herbicydu i wykazałam, że wartość ta znacznie spadła i wynosiła około 4,6. Prowadzone przez innych badaczy eksperymenty pozwalają na wnioskowanie, że to właśnie wartość pH wpływa na obniżenie wydajności wiązania aa-tRNA do rybosomu. Opisano, że zmiany pH reakcji poniżej 7 wpływają na znaczne obniżenie jej wydajności. Postulowano, że zmiany kwasowości mogą wpływać na zmiany konformacyjne wewnątrz rybosomu oraz zakłócać powinowactwo aa-tRNA do rybosomu (Maden i in. 1968; Johansson i in. 2011). Wnioskuje, że opartą na podobnych zasadach inhibicję wydajności reakcji obserwowałam pod wpływem Roundup. Przeprowadzone analizy pozwalają mi na stwierdzenie, że prawdopodobnie czynnik aktywny herbicydu nie wiąże się z rybosomem w żadnym z miejsc będących kluczowymi dla zajścia reakcji RW. Nie mogę jednak wykluczyć, że cząsteczka glifosatu oddziałuje z rybosomem lub cząsteczką tRNA. W przypadku zastosowania środka komercyjnego, jego skład chemiczny nie został opublikowany, co nie pozwala mi na wnioskowanie

o wpływie poszczególnych składników na wydajność reakcji RW. Postuluję, że to właśnie substancje towarzyszące zawarte w herbicydzie wpływają na zaobserwowany efekt inhibicji RW. Szacuje się, że czynnik aktywny stanowi około 1-2% komercyjnie dostępnego środka ochrony roślin, a pozostała jego część to substancje towarzyszące ułatwiające jego rozpraszanie na polu, osadzanie na liściach i wnikanie do rośliny.



Wykres 34. Analiza poziomu wiązania aa-tRNA do rybosomu na matrycy poliU pod wpływem rimsulfuronu i Titus; $p \leq 0,05$; $\pm SD$.

Zastosowanie dodatku czynnika aktywnego herbicydu Titus (rimsulfuronu), jak i komercyjnego roztworu herbicydu nie wywołało istotnych zmian w wydajności zajęcia reakcji wiązania aa-tRNA do rybosomu. Analogicznie do badań przeprowadzonych dla glifosatu postanowiłam przeanalizować wpływ środka ochrony roślin na pH reakcji. Wykazałam brak zmian w wartości pH, które mogłyby wpłynąć na przebieg reakcji (Maden i in. 1968; Johansson i in. 2011). Obserwacja ta pozwala mi na stwierdzenie, że wcześniej zaproponowany zależny od pH mechanizm inhibicji reakcji RW wydaje się prawdopodobny.



Wykres 35. Analiza poziomego wiązania aa-tRNA do rybosomu na matrycy poliU pod wpływem glufosynatu i Basta; $p \leq 0,05$; $\pm SD$.

Analogiczną analizę wydajności reakcji wiązania aa-tRNA do rybosomu na matrycy poliU przeprowadziłam również dla czynnika aktywnego i herbicydu Basta. Uzyskano wyniki podobne, jak w przypadku herbicydu Titus. Nie zaobserwowałam istotnych zmian w wydajności reakcji RW. Postuluję, że czynnik aktywny, jak i pozostałe składniki herbicydu nie wiążą się w miejscach istotnych dla zajścia reakcji wiązania. Nie zanotowałam również zmian w poziomie pH reakcji.

Przeprowadzone analizy pozwalają na konkluzję, że czynniki aktywne zastosowanych w badaniach herbicydów nie oddziałują z rybosomem i tRNA w miejscach kluczowych dla ich aktywności. Jednocześnie nie można wykluczyć, że związki te mogą oddziaływać z tak dużą molekułą jak rybosom w innym miejscu i modulować jego aktywność w procesie translacji. Zweryfikowanie tej teorii wymaga dodatkowych analiz polegających na wykonaniu reakcji translacji *in vitro* w warunkach stresowych. Można wnioskować, że dodatek herbicydu Roundup wpływał na obniżenie pH reakcji, co korelowało z obniżeniem jej wydajności.

7. Wnioski

Podjęta przeze mnie praca eksperymentalna zmierzała do poznania mechanizmów molekularnych leżących u podłoża odporności kukurydzy na działanie herbicydu Roundup oraz ich wzajemne skorelowanie.

W wyniku przeprowadzonych prac badawczych:

- scharakteryzowałam zmiany fenotypowe roślin pod wpływem stresu wywołanego herbicydami Roundup, Titus i Basta;
- opisałam fenotyp kukurydzy wykazującej tolerancję na Roundup i powiązałam go z mechanizmem obronnym polegającym na kumulowaniu glifosatu w końcach liści;
- wytypowałam geny prawdopodobnie zaangażowane w kształtowanie cechy tolerancji na Roundup: RLK, AGLP, NA2, NA4, IMP i SCP oraz wyjaśniłam ich możliwą rolę pełnioną w kształtowaniu odporności;
- zaproponowałam pomiar poziomu transkryptu NA4 jako test pozwalający na różnicowanie kukurydzy pod względem odporności na glifosat;
- oznaczyłam poziom globalnej metylacji u badanych linii kukurydzy i stwierdziłam jego związek (obniżenie globalnej metylacji) z cechą odporności na stres herbicydowy;
- określiłam obecność znaczników epigenetycznych w obrębie sekwencji genu AGLP, RLK i NA4, które wskazują na ich obecność w euchromatynie;
- skorelowałam wzrost ekspresji genów AGLP i NA4 z obecnością znacznika AcK9H3 w obrębie ich sekwencji;
- scharakteryzowałam zmiany zawartości modyfikowanych nukleotydów w puli małych RNA i wskazałam na ich możliwą funkcję regulacyjną związaną z odpowiedzią na stres herbicydowy;
- zaobserwowałam nowe modyfikacje nukleotydów RNA;
- stwierdziłam, że czynniki aktywne herbicydów nie mają wpływu na wydajność wiązania aa-tRNA do rybosomów na matrycy poliA.

Reasumując, określiłam geny, które prawdopodobnie biorą udział w kształtowaniu cechy tolerancji na glifosat u kukurydzy i zaproponowałam, który z nich może zostać zastosowany jako biomarker różnicujący tę cechę. Wykazałam zmienność znaczników epigenetycznych i modyfikowanych nukleotydów RNA oraz skorelowałam je ze zmianami w poziomie ekspresji genów w reakcji na stres wywołany Roundup.

8. Wykaz literatury

- Adamczewski, K., Kierzek, R., Matysiak, K. (2011). "Przymiotno Kanadyjskie (CONYZA CANADENSIS L.) odporne na glifosat." Postępy w Ochronie Roślin **51**(4): 1675-1682.
- Adamczyk, J., J., R., Cygert, H. (2010). "Postęp w hodowli kukurydzy w Polsce." Acta Scient Polonorum **9**(4): 85-91.
- Afzal, A. J., Wood, A. J., Lightfoot, D. A. (2008). "Plant receptor-like serine threonine kinases: roles in signaling and plant defense." Mol Plant Microbe Interact **21**(5): 507-517.
- Ahsan, N., Lee, D. G., Lee, K. W., Alam, I., Lee, S. H., Bahk, J. D., Lee, B. H. (2008). "Glyphosate-induced oxidative stress in rice leaves revealed by proteomic approach." Plant Physiol Biochem **46**(12): 1062-1070.
- Alvarez, M. E., Nota, F., Cambiagno, D. A. (2010). "Epigenetic control of plant immunity." Mol Plant Pathol **11**(4): 563-576.
- Anderson, K. S., Sikorski, J. A., Johnson, K. A. (1988). "A tetrahedral intermediate in the EPSP synthase reaction observed by rapid quench kinetics." Biochemistry **27**(19): 7395-7406.
- Anioł, A., Bujak, H., Dalbiak, A., Giżyński, M., Głowacka, B., Linkiewicz, A., i in: Żarski, T. (2007). Organizmy genetycznie zmodyfikowane. Środowisku, M. Ś. i. C. I. o. Poznań, Polskie Zrzeszenie Inżynierów i Techników Sanitarnych Oddział Wielkopolski: 1-252.
- Areseniuk, E., Warzecha, R., Żurek, M., Siódmiak, J. (2012). Postęp genetyczny i hodowla odmian kukurydzy dla różnych kierunków wykorzystania. KUKURYDZA I SORGO – Produkcja, Wykorzystanie, Rynek; Postęp hodowlany i odmianowy plonowania kukurydzy. Michalski, T., Szymańska, G. Poznań - Dymaczewo Nowe, Kukurydza.
- Aufsatz, W., Mette, M. F., Matzke, A. J., Matzke, M. (2004). "The role of MET1 in RNA-directed de novo and maintenance methylation of CG dinucleotides." Plant Mol Biol **54**(6): 793-804.
- Ausubel, F. M., Brent, R. E., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., Struhl, K. (1994). Current protocols in molecular biology. New York, John Wiley and Sons. **1**: 4.7.1-4.7.6.
- Aventis CropScience, S. A. (1999). Etykieta i instrukcja stosowania środka ochrony roślin Basta 150 SL w celu ograniczenia ryzyka dla ludzi i środowiska, Aventis CropScience Polska Sp. z o.o.
- Ay, Z., Mihaly, R., Cserhati, M., Kotai, E., Pauk, J. (2012). "The effect of high concentrations of glufosinate ammonium on the yield components of transgenic spring wheat (*Triticum aestivum* L.) constitutively expressing the bar gene." Sci World J **2012**: 657945.
- Baerson, S. R., Rodriguez, D. J., Biest, N. A., Tran, M., You, J. S., Kreuger, R. W., i in: Gruys, K. J. (2002). "Investigating the mechanism of glyphosate resistance in rigid ryegrass (*Lolium rigidum*)." Weed Sci **50**(6): 721-730.
- Baerson, S. R., Rodriguez, D. J., Tran, M., Feng, Y., Biest, N. A., Dill, G. M. (2002). "Glyphosate-resistant goosegrass. Identification of a mutation in the target enzyme 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase." Plant Physiol **129**(3): 1265-1275.
- Baird, D. D., Upchurch, R. P., Homesley, W. B., Franz, J. E. (1971). Introduction of a new broad spectrum post emergence herbicide class with utility for herbaceous perennial weed control. Proceedings Norths Central Weed Control Conference.
- Bakowska-Zywicka, K., Kietrys, A. M., Twardowski, T. (2008). "Antisense oligonucleotides targeting universally conserved 26S rRNA domains of plant ribosomes at different steps of polypeptide elongation." Oligonucleotides **18**(2): 175-186.

-
- Baluska, F., Salaj, J., Mathur, J., Braun, M., Jasper, F., Samaj, J., i in.Volkman, D. (2000). "Root hair formation: F-actin-dependent tip growth is initiated by local assembly of profilin-supported F-actin meshworks accumulated within expansin-enriched bulges." *Dev Biol* **227**(2): 618-632.
 - Barciszewska, M. Z., Barciszewska, A. M., Rattan, S. I. (2007). "TLC-based detection of methylated cytosine: application to aging epigenetics." *Biogerontology* **8**(6): 673-678.
 - Barciszewski, J., Markiewicz, W. T. (2010). Kwasy nukleinowe. Kod genetyczny. *Polskie i światowe osiągnięcia nauki*, Fundacja Rozwoju Nauki 47-91.
 - Bartee, L., Malagnac, F., Bender, J. (2001). "Arabidopsis cmt3 chromomethylase mutations block non-CG methylation and silencing of an endogenous gene." *Genes Dev* **15**(14): 1753-1758.
 - Behrens, M. R., Mutlu, N., Chakraborty, S., Dumitru, R., Jiang, W. Z., Lavalley, B. J., i in.Weeks, D. P. (2007). "Dicamba resistance: enlarging and preserving biotechnology-based weed management strategies." *Science* **316**(5828): 1185-1188.
 - Ben Amor, B., Wirth, S., Merchan, F., Laporte, P., d'Aubenton-Carafa, Y., Hirsch, J., i in.Crespi, M. (2009). "Novel long non-protein coding RNAs involved in Arabidopsis differentiation and stress responses." *Genome Res* **19**(1): 57-69.
 - Bender, J. (2004). "Chromatin-based silencing mechanisms." *Curr Opin Plant Biol* **7**(5): 521-526.
 - Benhamed, M., Martin-Magniette, M. L., Taconnat, L., Bitton, F., Servet, C., De Clercq, R., i in.Hilson, P. (2008). "Genome-scale Arabidopsis promoter array identifies targets of the histone acetyltransferase GCN5." *Plant J* **56**(3): 493-504.
 - Benjamini, Y., Hochberg, Y. (1995). "Controlling the false discovery rate: a partical and powerful approach to multiple testing." *J Royal Statistical Soc* **B57**: 289-300.
 - Bent, A. F., Mackey, D. (2007). "Elicitors, effectors, and R genes: the new paradigm and a lifetime supply of questions." *Annu Rev Phytopathol* **45**: 399-436.
 - Bereś, P. K., Gaj, R., Grzebiesz, W., Kaniuczak, Z., Mrówczyński, M., Paradowski, A., i in.Wachowiak, H. (2007). Integrowana Produkcja Kukurydzy. Kaniuczak, Z.,Pruszyński, S. Poznań, PIORIN: 1-74.
 - Bereś, P. K., Gaj, R., Grzebiesz, W., Kaniuczak, Z., Mrówczyński, M., Paradowski, A., i in.Wachowiak, H. (2009). Integrowana Produkcja Urzędowo Kontrolowana. Państwowa Inspekcja Ochrony Roślin i Nasiennictwa, G. I. Warszawa, PIORIN: 1-47.
 - Bereś, P. K., Kaniuczak, Z., Tekiela, A., Mrówczyński, M., Pruszyński, G., Paradowski, A. (2007). "Ochrona kukurydzy przed agrofagami w integrowanej produkcji." *Postępy w Ochronie Roślin* **47**(4): 275-284.
 - Berr, A., Shafiq, S., Shen, W. H. (2011). "Histone modifications in transcriptional activation during plant development." *Biochim Biophys Acta* **1809**(10): 567-576.
 - Bienert, M. D., Delannoy, M., Navarre, C., Boutry, M. (2012). "NtSCP1 from tobacco is an extracellular serine carboxypeptidase III that has an impact on cell elongation." *Plant Physiol* **158**(3): 1220-1229.
 - Birney, E., Stamatoyannopoulos, J. A., Dutta, A., Guigo, R., Gingeras, T. R., Margulies, E. H., i in.de Jong, P. J. (2007). "Identification and analysis of functional elements in 1% of the human genome by the ENCODE pilot project." *Nature* **447**(7146): 799-816.
 - Blaszczyk, L., Dutkiewicz, M., Ciesiolka, J. (2007). "[Translation of eukaryotic mRNA in a cap-independent mode]." *Postępy Biochem* **53**(4): 400-412.

-
- Block, M. D., Botterman, J., Vandewiele, M., Dockx, J., Thoen, C., Gossele, V., i in Leemans, J. (1987). "Engineering herbicide resistance in plants by expression of a detoxifying enzyme." *EMBO J* **6**(9): 2513-2518.
 - Borner, G. H., Sherrier, D. J., Weimar, T., Michaelson, L. V., Hawkins, N. D., Macaskill, A., i in Dupree, P. (2005). "Analysis of detergent-resistant membranes in Arabidopsis. Evidence for plasma membrane lipid rafts." *Plant Physiol* **137**(1): 104-116.
 - Bowles, D. J. (1990). "Defense-related proteins in higher plants." *Annu Rev Biochem* **59**: 873-907.
 - Brickner, D. G., Cajigas, I., Fondufe-Mittendorf, Y., Ahmed, S., Lee, P. C., Widom, J., Brickner, J. H. (2007). "H2A.Z-mediated localization of genes at the nuclear periphery confers epigenetic memory of previous transcriptional state." *PLoS Biol* **5**(4): e81.
 - Brown, H. R., Cotterman, J. C. (1994). "Recent advances in sulfonylurea herbicides." *Chem Plant Protect* **10**: 47-81.
 - Cahoon, A. B., Takacs, E. M., Sharpe, R. M., Stern, D. B. (2008). "Nuclear, chloroplast, and mitochondrial transcript abundance along a maize leaf developmental gradient." *Plant Mol Biol* **66**(1-2): 33-46.
 - Cakmak, I., Yazici, A., Tutus, Y., Ozturk, L. (2009). "Glyphosate reduced seed and leaf concentrations of calcium, manganese, magnesium, and iron in non-glyphosate resistant soybean." *Europ J Agron*: 114-119.
 - Cao, X., Aufsatz, W., Zilberman, D., Mette, M. F., Huang, M. S., Matzke, M., Jacobsen, S. E. (2003). "Role of the DRM and CMT3 methyltransferases in RNA-directed DNA methylation." *Curr Biol* **13**(24): 2212-2217.
 - Cao, X., Jacobsen, S. E. (2002). "Locus-specific control of asymmetric and CpNpG methylation by the DRM and CMT3 methyltransferase genes." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99** Suppl 4: 16491-16498.
 - Cao, X., Jacobsen, S. E. (2002). "Role of the arabidopsis DRM methyltransferases in de novo DNA methylation and gene silencing." *Curr Biol* **12**(13): 1138-1144.
 - Capiati, D. A., Pais, S. M., Tellez-Inon, M. T. (2006). "Wounding increases salt tolerance in tomato plants: evidence on the participation of calmodulin-like activities in cross-tolerance signalling." *J Exp Bot* **57**(10): 2391-2400.
 - Cebeci, O., Budak, H. (2009). "Global Expression Patterns of Three Festuca Species Exposed to Different Doses of Glyphosate Using the Affymetrix GeneChip Wheat Genome Array." *Comp Funct Genomics*: 505701.
 - Chan, C. T., Dyavaiah, M., DeMott, M. S., Taghizadeh, K., Dedon, P. C., Begley, T. J. (2010). "A quantitative systems approach reveals dynamic control of tRNA modifications during cellular stress." *PLoS Genet* **6**(12): e1001247.
 - Chao, W. S., Gu, Y. Q., Pautot, V. V., Bray, E. A., Walling, L. L. (1999). "Leucine aminopeptidase RNAs, proteins, and activities increase in response to water deficit, salinity, and the wound signals systemin, methyl jasmonate, and abscisic acid." *Plant Physiol* **120**(4): 979-992.
 - Che, P., Bussell, J. D., Zhou, W., Estavillo, G. M., Pogson, B. J., Smith, S. M. (2010). "Signaling from the endoplasmic reticulum activates brassinosteroid signaling and promotes acclimation to stress in Arabidopsis." *Sci Signal* **3**(141): ra69.
 - Chen, L., Ren, F., Zhong, H., Feng, Y., Jiang, W., Li, X. (2010). "Identification and expression analysis of genes in response to high-salinity and drought stresses in Brassica napus." *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* **42**(2): 154-164.

-
- Chen, Q., Chen, X., Wang, Q., Zhang, F., Lou, Z., Zhang, Q., Zhou, D. X. (2013). "Structural basis of a histone H3 lysine 4 demethylase required for stem elongation in rice." *PLoS Genet* **9**(1): e1003239.
 - Chen, X. (2009). "Small RNAs and their roles in plant development." *Annu Rev Cell Dev Biol* **25**: 21-44.
 - Chen, Z. J., Tian, L. (2007). "Roles of dynamic and reversible histone acetylation in plant development and polyploidy." *Biochim Biophys Acta* **1769**(5-6): 295-307.
 - Chinnusamy, V., Zhu, J. K. (2009). "Epigenetic regulation of stress responses in plants." *Curr Opin Plant Biol* **12**(2): 133-139.
 - Chinnusamy, V., Zhu, J. K. (2009). "RNA-directed DNA methylation and demethylation in plants." *Sci China C Life Sci* **52**(4): 331-343.
 - Choi, C. S., Sano, H. (2007). "Abiotic-stress induces demethylation and transcriptional activation of a gene encoding a glycerophosphodiesterase-like protein in tobacco plants." *Mol Genet Genomics* **277**(5): 589-600.
 - Choi, Y., Gehring, M., Johnson, L., Hannon, M., Harada, J. J., Goldberg, R. B., i in.Fischer, R. L. (2002). "DEMETER, a DNA glycosylase domain protein, is required for endosperm gene imprinting and seed viability in arabidopsis." *Cell* **110**(1): 33-42.
 - Clerke, A. E., Anderson, A. L., Stone, B. A. (1979). "Form and function of arabinogalactans and arabinogalactan-proteins." *Phytochemistry* **18**: 521-540.
 - Cociolone, S. M., Cone, K. C. (1993). "PI-Bh, an Anthocyanin Regulatory Gene of Maize That Leads to Variegated Pigmentation." *Genetics* **135**(2): 575-588.
 - Cokus, S. J., Feng, S., Zhang, X., Chen, Z., Merriman, B., Haudenschild, C. D., i in.Jacobsen, S. E. (2008). "Shotgun bisulphite sequencing of the Arabidopsis genome reveals DNA methylation patterning." *Nature* **452**(7184): 215-219.
 - Collins, F. S. (2004). "Finishing the euchromatic sequence of the human genome." *Nature* **431**(7011): 931-945.
 - Daxinger, L., Kanno, T., Bucher, E., van der Winden, J., Naumann, U., Matzke, A. J., Matzke, M. (2009). "A stepwise pathway for biogenesis of 24-nt secondary siRNAs and spreading of DNA methylation." *EMBO J* **28**(1): 48-57.
 - de Carvalho, L. B., Alves, P. L., Gonzalez-Torralva, F., Cruz-Hipolito, H. E., Rojano-Delgado, A. M., De Prado, R., i in.de Castro, M. D. (2012). "Pool of resistance mechanisms to glyphosate in *Digitaria insularis*." *J Agric Food Chem* **60**(2): 615-622.
 - De Lucia, F., Dean, C. (2011). "Long non-coding RNAs and chromatin regulation." *Curr Opin Plant Biol* **14**(2): 168-173.
 - De Vos, M., Van Oosten, V. R., Van Poecke, R. M., Van Pelt, J. A., Pozo, M. J., Mueller, M. J., i in.Pieterse, C. M. (2005). "Signal signature and transcriptome changes of Arabidopsis during pathogen and insect attack." *Mol Plant Microbe Interact* **18**(9): 923-937.
 - Deutscher, M. P. (2003). "Degradation of stable RNA in bacteria." *J Biol Chem* **278**(46): 45041-45044.
 - Diddens, H., Zahner, H., Kraas, E., Gohring, W., Jung, G. (1976). "On the transport of tripeptide antibiotics in bacteria." *Eur J Biochem* **66**(1): 11-23.
 - Dill, G. M., Baerson, S., Casagrande, L., Feng, Y., Brinker, R., Reynolds, T. L., i in.Teng, Y. (2000). Characterization of glyphosate resistant *Eleusine indica* biotypes from Malaysia. *III International Weed Science Congress*: 150.

-
- Dirheimer, G., Baranowski, W., Keith, G. (1995). "Variations in tRNA modifications, particularly of their queuine content in higher eukaryotes. Its relation to malignancy grading." *Biochimie* **77**(1-2): 99-103.
 - Dombrowski, J. E. (2003). "Salt stress activation of wound-related genes in tomato plants." *Plant Physiol* **132**(4): 2098-2107.
 - Downen, R. H., Pelizzola, M., Schmitz, R. J., Lister, R., Downen, J. M., Nery, J. R., i in.Ecker, J. R. (2012). "Widespread dynamic DNA methylation in response to biotic stress." *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**(32): E2183-2191.
 - Du Pont de Nemours, S. A. S. (2005). Etykieta i instrukcja stosowania środka ochrony roślin Titus 25 WG w celu ograniczenia ryzyka dla ludzi i środowiska, DuPont Poland Sp. z o.o.
 - Duke, S. O., Powles, S. B. (2008). "Glyphosate: a once-in-a-century herbicide." *Pest Manag Sci* **64**(4): 319-325.
 - Dutkiewicz, M., Świątkowska, A., Ciesiolka, J. (2006). "[Structure and function of the non-coding regions of hepatitis C viral RNA]." *Postepy Biochem* **52**(1): 62-71.
 - Fabian, D., Bystriansky, J., Burkus, J., Rehak, P., Legath, J., Koppel, J. (2011). "The effect of herbicide BASTA 15 on the development of mouse preimplantation embryos in vivo and in vitro." *Toxicol In Vitro* **25**(1): 73-79.
 - Falconer, S. B., Czarny, T. L., Brown, E. D. (2011). "Antibiotics as probes of biological complexity." *Nat Chem Biol* **7**(7): 415-423.
 - Farrel, R. E. (2005). RNA methodologies. *A laboratory guide for isolation and characterization*. London, Elsevier Academic Press.
 - Felton, G. W., Korth, K. L., Bi, J. L., Wesley, S. V., Huhman, D. V., Mathews, M. C., i in.Dixon, R. A. (1999). "Inverse relationship between systemic resistance of plants to microorganisms and to insect herbivory." *Curr Biol* **9**(6): 317-320.
 - Feng, S., Cokus, S. J., Zhang, X., Chen, P. Y., Bostick, M., Goll, M. G., i in.Jacobsen, S. E. (2010). "Conservation and divergence of methylation patterning in plants and animals." *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**(19): 8689-8694.
 - Feng, Y., Xue, Q. (2006). "The serine carboxypeptidase like gene family of rice (*Oryza sativa* L. ssp. japonica)." *Funct Integr Genomics* **6**(1): 14-24.
 - Ferro, M., Salvi, D., Riviere-Rolland, H., Vermat, T., Seigneurin-Berny, D., Grunwald, D., i in.Rolland, N. (2002). "Integral membrane proteins of the chloroplast envelope: identification and subcellular localization of new transporters." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(17): 11487-11492.
 - Fields, S., Grayhack, E. (2013). "University of Rochester Medical Center." from http://www.urmc.rochester.edu/labs/phizicky-lab/projects/the_biological_roles_of_tRNA_modifications.
 - Finnegan, E. J., Kovac, K. A. (2000). "Plant DNA methyltransferases." *Plant Mol Biol* **43**(2-3): 189-201.
 - Finnegan, E. J., Peacock, W. J., Dennis, E. S. (1996). "Reduced DNA methylation in *Arabidopsis thaliana* results in abnormal plant development." *Proc Natl Acad Sci USA* **93**(16): 8449-8454.
 - Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E., Mello, C. C. (1998). "Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*." *Nature* **391**(6669): 806-811.
 - Fransz, P. F., de Jong, J. H. (2002). "Chromatin dynamics in plants." *Curr Opin Plant Biol* **5**(6): 560-567.

-
- Franz, J. E. (1985). Discovery, development and chemistry of gluphosate. The Hebicide Glyphosate. Grossbard, E., Atkinson, D. London, Butterworth & Co.: 3-17.
 - Franz, J. E., Mao, M. K., Sikorski, J. A. (1997). Glyphosate : a unique global herbicide. Washington, DC, American Chemical Society.
 - Fraser, C. M., Rider, L. W., Chapple, C. (2005). "An expression and bioinformatics analysis of the Arabidopsis serine carboxypeptidase-like gene family." Plant Physiol **138**(2): 1136-1148.
 - Frommer, W. B., Ninnemann, O. (1995). "Heterologous Expression of Genes in Bacterial, Fungal, Animal, and Plant Cells." Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol **46**: 419-444.
 - Fuchs, M. A., Geiger, D. R., Reynolds, T. L., Bourque, J. E. (2002). "Mechanisms of glyphosate toxicity in velvetleaf (*Abutilon theophrasti medikus*)." Pestic Biochem Phys **74**(1): 27-39.
 - Fujimoto, Y., Nagata, R., Fukasawa, H., Yano, K., Azuma, M., Iida, A., i in Hashimoto, Y. (1998). "Purification and cDNA cloning of cytokinin-specific binding protein from mung bean (*Vigna radiata*)." Eur J Biochem **258**(2): 794-802.
 - Galbraith, D. W., Edwards, J. (2010). "Applications of Microarrays for Crop Improvement: Here, There, and Everywhere." BioScience **60**: 337-348.
 - Gao, M., Showalter, A. M. (1999). "Yariv reagent treatment induces programmed cell death in Arabidopsis cell cultures and implicates arabinogalactan protein involvement." Plant J **19**(3): 321-331.
 - Gao, M., Showalter, A. M. (2000). "Immunolocalization of LeAGP-1, a modular arabinogalactan-protein, reveals its developmentally regulated expression in tomato." Planta **210**(6): 865-874.
 - Garcia-Ortega, L., Alvarez-Garcia, E., Gavilanes, J. G., Martinez-del-Pozo, A., Joseph, S. (2010). "Cleavage of the sarcin-ricin loop of 23S rRNA differentially affects EF-G and EF-Tu binding." Nucleic Acids Res **38**(12): 4108-4119.
 - Ge, X., d'Avignon, D. A., Ackerman, J. J., Collavo, A., Sattin, M., Ostrander, E. L., i in Preston, C. (2012). "Vacuolar glyphosate-sequestration correlates with glyphosate resistance in ryegrass (*Lolium* spp.) from Australia, South America, and Europe: a 31P NMR investigation." J Agric Food Chem **60**(5): 1243-1250.
 - Ge, X., d'Avignon, D. A., Ackerman, J. J., Duncan, B., Spaur, M. B., Sammons, R. D. (2011). "Glyphosate-resistant horseweed made sensitive to glyphosate: low-temperature suppression of glyphosate vacuolar sequestration revealed by 31P NMR." Pest Manag Sci **67**(10): 1215-1221.
 - Ge, X., d'Avignon, D. A., Ackerman, J. J. H., Sammons, R. D. (2010). "Rapid vacuolar sequestration: the horseweed glyphosate resistance mechanism." Pest Manag Sci **66**(4): 345-348.
 - Gebetsberger, J., Żywicki, M., Künzi, A., Polacek, N. (2012). "tRNA-Derived Fragments Target the Ribosome and Function as Regulatory Non-Coding RNA in *Haloferax volcanii*." Archaea **2012**: 1-11.
 - Gehring, M., Huh, J. H., Hsieh, T. F., Penterman, J., Choi, Y., Harada, J. J., i in Fischer, R. L. (2006). "DEMETER DNA glycosylase establishes MEDEA polycomb gene self-imprinting by allele-specific demethylation." Cell **124**(3): 495-506.
 - Gendrel, A. V., Colot, V. (2005). "Arabidopsis epigenetics: when RNA meets chromatin." Curr Opin Plant Biol **8**(2): 142-147.
 - Gold, M., Hurwitz, J., Anders, M. (1963). "The enzymatic methylation of RNA and DNA." Biochem Biophys Res Commun **11**: 107-114.

-
- Gold, M., Hurwitz, J., Anders, M. (1963). "The Enzymatic Methylation of Rna and DNA, Ii. On the Species Specificity of the Methylation Enzymes." Proc Natl Acad Sci U S A **50**(1): 164-169.
 - Gong, Z., Morales-Ruiz, T., Ariza, R. R., Roldan-Arjona, T., David, L., Zhu, J. K. (2002). "ROS1, a repressor of transcriptional gene silencing in Arabidopsis, encodes a DNA glycosylase/lyase." Cell **111**(6): 803-814.
 - Gonzalez-Torralva, F., Gil-Humanes, J., Barro, F., Brants, I., De Prado, R. (2012). "Target site mutation and reduced translocation are present in a glyphosate-resistant *Lolium multiflorum* Lam. biotype from Spain." Plant Physiol Biochem **58**: 16-22.
 - Gopisetty, G., Ramachandran, K., Singal, R. (2006). "DNA methylation and apoptosis." Mol Immunol **43**(11): 1729-1740.
 - Gordon-Kamm, W. J., Spencer, T. M., Mangano, M. L., Adams, T. R., Daines, R. J., Start, W. G., i in.Lemaux, P. G. (1990). "Transformation of Maize Cells and Regeneration of Fertile Transgenic Plants." Plant Cell **2**(7): 603-618.
 - Griffin, J. L., Boudreaux, J. M., Miller, D. K. (2010). "Herbicides As Harvest Aids." Weed Sci **58**(3): 355-358.
 - Grosjean, H. (2005). Modification and editing of RNA: historical overview and important facts to remember. Berlin, Springer Verlag.
 - Guelen, L., Pagie, L., Brasset, E., Meuleman, W., Faza, M. B., Talhout, W., i in.van Steensel, B. (2008). "Domain organization of human chromosomes revealed by mapping of nuclear lamina interactions." Nature **453**(7197): 948-951.
 - GUS (2012). Badania Produkcji Roślinnej, Przedwinykowy szacunek głównych ziemiołódów rolnych i ogrodnicych w 2012 r. Rolnictwa, D. Warszawa, Główny Urząd Statystyczny: 1-17.
 - Guymon, R., Pomerantz, S. C., Crain, P. F., McCloskey, J. A. (2006). "Influence of phylogeny on posttranscriptional modification of rRNA in thermophilic prokaryotes: the complete modification map of 16S rRNA of *Thermus thermophilus*." Biochemistry **45**(15): 4888-4899.
 - Haag, J. R., Pikaard, C. S. (2011). "Multisubunit RNA polymerases IV and V: purveyors of non-coding RNA for plant gene silencing." Nat Rev Mol Cell Biol **12**(8): 483-492.
 - Habib, H., Fazili, K. M. (2007). "Plant protease inhibitors: a defense strategy in plants." Biotechnol Mol Biol Rev **2**(3): 68-85.
 - Hall, G. J., Hart, C. A., Jones, C. A. (2000). "Plants as sources of cations antagonistic to glyphosate activity." Pest Manag Sci **56**(4): 351 - 358.
 - Haring, M., Offermann, S., Danker, T., Horst, I., Peterhansel, C., Stam, M. (2007). "Chromatin immunoprecipitation: optimization, quantitative analysis and data normalization." Plant Met **3**: 11.
 - Hashida, S. N., Uchiyama, T., Martin, C., Kishima, Y., Sano, Y., Mikami, T. (2006). "The Temperature-Dependent Change in Methylation of the Antirrhinum Transposon Tam3 Is Controlled by the Activity of Its Transposase." Plant Cell **18** (1): 104-118.
 - Heap, I. (2013, June 09, 2013). "The International Survey of Herbicide Resistant Weeds."
 - Hegde, P., Qi, R., Abernathy, K., Gay, C., Dharap, S., Gaspard, R., i in.Quackenbush, J. (2000). "A concise guide to cDNA microarray analysis." Biotechniques **29**(3): 548-550, 552-544, 556 passim.
 - Hellen, C. U., Sarnow, P. (2001). "Internal ribosome entry sites in eukaryotic mRNA molecules." Genes Dev **15**(13): 1593-1612.

-
- Henderson, I. R., Jacobsen, S. E. (2007). "Epigenetic inheritance in plants." Nature **447**(7143): 418-424.
 - Hicke, L. (2001). "Protein regulation by monoubiquitin." Nat Rev Mol Cell Biol **2**(3): 195-201.
 - Hoekenga, O. A., Muszynski, M. G., Cone, K. C. (2000). "Developmental patterns of chromatin structure and DNA methylation responsible for epigenetic expression of a maize regulatory gene." Genetics **155**(4): 1889-1902.
 - Hoerlein, G. (1994). "Glufosinate (phosphinothricin), a natural amino acid with unexpected herbicidal properties." Rev Environ Contam Toxicol **138**: 73-145.
 - Hollick, J. B., Dorweiler, J. E., Chandler, V. L. (1997). "Paramutation and related allelic interactions." Trends Genet **13**(8): 302-308.
 - Horiguchi, G., Molla-Morales, A., Perez-Perez, J. M., Kojima, K., Robles, P., Ponce, M. R., i in. Tsukaya, H. (2011). "Differential contributions of ribosomal protein genes to Arabidopsis thaliana leaf development." Plant J **65**(5): 724-736.
 - Horiguchi, G., Van Lijsebettens, M., Candela, H., Micol, J. L., Tsukaya, H. (2012). "Ribosomes and translation in plant developmental control." Plant Sci **191-192**: 24-34.
 - Houseley, J., Tollervey, D. (2009). "The many pathways of RNA degradation." Cell **136**(4): 763-776.
 - Howell, M. D., Fahlgren, N., Chapman, E. J., Cumbie, J. S., Sullivan, C. M., Givan, S. A., i in. Carrington, J. C. (2007). "Genome-wide analysis of the RNA-DEPENDENT RNA POLYMERASE6/DICER-LIKE4 pathway in Arabidopsis reveals dependency on miRNA- and tasiRNA-directed targeting." Plant Cell **19**(3): 926-942.
 - Hu, W., Alvarez-Dominguez, J. R., Lodish, H. F. (2012). "Regulation of mammalian cell differentiation by long non-coding RNAs." EMBO Rep **13**(11): 971-983.
 - Hu, Y., Zhang, L., He, S., Huang, M., Tan, J., Zhao, L., i in. Li, L. (2012). "Cold stress selectively unsilences tandem repeats in heterochromatin associated with accumulation of H3K9ac." Plant Cell Environ **35**(12): 2130-2142.
 - Huarte, M., Guttman, M., Feldser, D., Garber, M., Koziol, M. J., Kenzelmann-Broz, D., i in. Rinn, J. L. (2010). "A large intergenic noncoding RNA induced by p53 mediates global gene repression in the p53 response." Cell **142**(3): 409-419.
 - Hufford, M. B., Martinez-Meyer, E., Gaut, B. S., Eguiarte, L. E., Tenaillon, M. I. (2012). "Inferences from the historical distribution of wild and domesticated maize provide ecological and evolutionary insight." PLoS One **7**(11): e47659.
 - Iba, K. (2002). "Acclimative response to temperature stress in higher plants: Approaches of gene engineering for temperature tolerance." Annu Rev Plant Biol **53**: 225-245.
 - Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin, P. I. B. (2013). "Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin, Państwowy Instytut Badawczy."
 - Jackson, R. J., Hellen, C. U., Pestova, T. V. (2012). "Termination and post-termination events in eukaryotic translation." Adv Protein Chem Struct Biol **86**: 45-93.
 - Jaskulski, D., Jaskulska, I. (2011). "Wpływ glifosatu stosowanego przed zbiorem na kiełkowanie ziarna i wschody samosiewów pszenicy ozimej." Postępy w Ochronie Roślin **51**(2): 927-931.
 - Jia, H., Osak, M., Bogu, G. K., Stanton, L. W., Johnson, R., Lipovich, L. (2010). "Genome-wide computational identification and manual annotation of human long noncoding RNA genes." RNA **16**(8): 1478-1487.

-
- Jiang, L., Rogers, J. C. (1998). "Integral membrane protein sorting to vacuoles in plant cells: evidence for two pathways." *J Cell Biol* **143**(5): 1183-1199.
 - Johansson, M., Jeong, K. W., Trobro, S., Strazewski, P., Aqvist, J., Pavlov, M. Y., Ehrenberg, M. (2011). "pH-sensitivity of the ribosomal peptidyl transfer reaction dependent on the identity of the A-site aminoacyl-tRNA." *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**(1): 79-84.
 - Jones-Rhoades, M. W., Bartel, D. P., Bartel, B. (2006). "MicroRNAs and their regulatory roles in plants." *Annu Rev Plant Biol* **57**: 19-53.
 - Kadauke, S., Blobel, G. A. (2009). "Chromatin loops in gene regulation." *Biochim Biophys Acta* **1789**(1): 17-25.
 - Kanno, T., Habu, Y. (2011). "siRNA-mediated chromatin maintenance and its function in Arabidopsis thaliana." *Biochim Biophys Acta* **1809**(8): 444-451.
 - Kanno, T., Huettel, B., Mette, M. F., Aufsatz, W., Jaligot, E., Daxinger, L., i in.Matzke, A. J. (2005). "Atypical RNA polymerase subunits required for RNA-directed DNA methylation." *Nat Genet* **37**(7): 761-765.
 - Kapranov, P., Cheng, J., Dike, S., Nix, D. A., Duttagupta, R., Willingham, A. T., i in.Gingeras, T. R. (2007). "RNA maps reveal new RNA classes and a possible function for pervasive transcription." *Science* **316**(5830): 1484-1488.
 - Kaundun, S. S., Dale, R. P., Zelaya, I. A., Dinelli, G., Marotti, I., McIndoe, E., Cairns, A. (2011). "A novel P106L mutation in EPSPS and an unknown mechanism(s) act additively to confer resistance to glyphosate in a South African Lolium rigidum population." *J Agric Food Chem* **59**(7): 3227-3233.
 - Kavanaugh, L. A., Ohler, U. (2009). Predicting Non-coding RNA Transcripts. *Bioinformatics: Tools and Applications*. Edwards, D., Stajich, J., Hansen, D., Springer New York: 65-97.
 - Kawaguchi, K., Shibuya, N., Ishii, T. (1996). "A novel tetrasaccharide, with a structure similar to the terminal sequence of an arabinogalactan-protein, accumulates in rice anthers in a stage-specific manner." *Plant J* **9**(6): 777-785.
 - Kawahara, Y., Zinshteyn, B., Chendrimada, T. P., Shiekhattar, R., Nishikura, K. (2007). "RNA editing of the microRNA-151 precursor blocks cleavage by the Dicer-TRBP complex." *EMBO Rep* **8**(8): 763-769.
 - Keith, G. (1995). "Mobilities of modified ribonucleotides on two-dimensional cellulose thin-layer chromatography." *Biochimie* **77**(1-2): 142-144.
 - Kellner, S., Burhenne, J., Helm, M. (2010). "Detection of RNA modifications." *RNA Biol* **7**(2): 237-247.
 - Kermicle, J. L., Alleman, M. (1990). "Gametic imprinting in maize in relation to the angiosperm life cycle." *Dev Suppl*: 9-14.
 - Khalil, A. M., Guttman, M., Huarte, M., Garber, M., Raj, A., Rivea Morales, D., i in.Rinn, J. L. (2009). "Many human large intergenic noncoding RNAs associate with chromatin-modifying complexes and affect gene expression." *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(28): 11667-11672.
 - Kim, E. D., Sung, S. (2012). "Long noncoding RNA: unveiling hidden layer of gene regulatory networks." *Trends Plant Sci* **17**(1): 16-21.
 - Kim, J. M., To, T. K., Ishida, J., Morosawa, T., Kawashima, M., Matsui, A., i in.Seki, M. (2008). "Alterations of lysine modifications on the histone H3 N-tail under drought stress conditions in Arabidopsis thaliana." *Plant Cell Physiol* **49**(10): 1580-1588.

-
- Kirst, M., Caldo, R., Casati, P., Tanimoto, G., Walbot, V., Wise, R. P., Buckler, E. S. (2006). "Genetic diversity contribution to errors in short oligonucleotide microarray analysis." Plant Biotechnol J **4**(5): 489-498.
 - Kishore, G. M., Shah, D. M. (1988). "Amino acid biosynthesis inhibitors as herbicides." Annu Rev Biochem **57**: 627-663.
 - Kitajima, S., Sato, F. (1999). "Plant pathogenesis-related proteins: molecular mechanisms of gene expression and protein function." J Biochem **125**(1): 1-8.
 - Kjellbom, P., Snogerup, L., Stohr, C., Reuzeau, C., McCabe, P. F., Pennell, R. I. (1997). "Oxidative cross-linking of plasma membrane arabinogalactan proteins." Plant J **12**(5): 1189-1196.
 - Koeppe, M. K., Hirata, C. M., Brown, H. M., Kenyon, W. H., O'Keefe, D. P., Lau, S. C., i in.Green, J. M. (2000). "Basis of selectivity of the herbicide rimsulfuron in maize." Pestic Biochem Phys **66**(3): 170-181.
 - Koh, S., Lee, S. C., Kim, M. K., Koh, J. H., Lee, S., An, G., i in.Kim, S. R. (2007). "T-DNA tagged knockout mutation of rice OsGSK1, an orthologue of Arabidopsis BIN2, with enhanced tolerance to various abiotic stresses." Plant Mol Biol **65**(4): 453-466.
 - Korbin, M., Adamczewski, K., Twardowski, T. (2009). "Jak zbadać stres herbicydowy u roślin na poziomie molekularnym?" Nauka **2**: 143-150.
 - Kovarik, A., Koukalova, B., Bezdek, M., Opatrny, Z. (1997). "Hypermethylation of tobacco heterochromatic loci in response to osmotic stress." Theor Appl Genet **95**(1-2): 301-306.
 - Kozak, M. (2005). "Regulation of translation via mRNA structure in prokaryotes and eukaryotes." Gene **361**: 13-37.
 - Kressler, D., Hurt, E., Bassler, J. (2010). "Driving ribosome assembly." Biochim Biophys Acta **1803**(6): 673-683.
 - Kulis, M., Esteller, M. (2010). "DNA methylation and cancer." Adv Genet **70**: 27-56.
 - Labra, M., Ghiani, A., Citterio, S., Sgorbati, S., Sala, F., Vannini, C., i in.Bracale, M. (2002). "Analysis of cytosine methylation pattern in response to water deficit in pea root tips." Plant Biology **4**(6): 694-699.
 - Lan, F., Nottke, A. C., Shi, Y. (2008). "Mechanisms involved in the regulation of histone lysine demethylases." Curr Opin Cell Biol **20**(3): 316-325.
 - Lander, E. S., Linton, L. M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M. C., Baldwin, J., i in.Chen, Y. J. (2001). "Initial sequencing and analysis of the human genome." Nature **409**(6822): 860-921.
 - Lanubile, A., Pasini, L., Marocco, A. (2010). "Differential gene expression in kernels and silks of maize lines with contrasting levels of ear rot resistance after *Fusarium verticillioides* infection." J Plant Physiol **167**(16): 1398-1406.
 - Lawrence, P. K., Paulraj, K. "Plant protease inhibitors in control of phytophagous insects." Elect J Biotechnol **5** (1): 93-109.
 - Lee, J. T. (2010). "The X as model for RNA's niche in epigenomic regulation." Cold Spring Harb Perspect Biol **2**(9): a003749.
 - Lee, R. C., Feinbaum, R. L., Ambros, V. (1993). "The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*." Cell **75**(5): 843-854.
 - Leon, J., Rojo, E., Sanchez-Serrano, J. J. (2001). "Wound signalling in plants." J Exp Bot **52**(354): 1-9.

-
- Li, G., Reinberg, D. (2011). "Chromatin higher-order structures and gene regulation." Curr Opin Genet Dev **21**(2): 175-186.
 - Li, J., Lease, K. A., Tax, F. E., Walker, J. C. (2001). "BRS1, a serine carboxypeptidase, regulates BRI1 signaling in *Arabidopsis thaliana*." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(10): 5916-5921.
 - Li, S. X., Showalter, A. M. (1996). "Cloning and developmental/stress-regulated expression of a gene encoding a tomato arabinogalactan protein." Plant Mol Biol **32**(4): 641-652.
 - Li, X., Zhu, J., Hu, F., Ge, S., Ye, M., Xiang, H., i in.Wang, W. (2012). "Single-base resolution maps of cultivated and wild rice methylomes and regulatory roles of DNA methylation in plant gene expression." BMC Genomics **13**: 300.
 - Limbach, P. A., Crain, P. F., McCloskey, J. A. (1994). "Summary: the modified nucleosides of RNA." Nucleic Acids Res **22**(12): 2183-2196.
 - Lippman, Z., May, B., Yordan, C., Singer, T., Martienssen, R. (2003). "Distinct mechanisms determine transposon inheritance and methylation via small interfering RNA and histone modification." PLoS Biol **1**(3): E67.
 - Lister, R., O'Malley, R. C., Tonti-Filippini, J., Gregory, B. D., Berry, C. C., Millar, A. H., Ecker, J. R. (2008). "Highly integrated single-base resolution maps of the epigenome in *Arabidopsis*." Cell **133**(3): 523-536.
 - Liu, C., Lu, F., Cui, X., Cao, X. (2010). "Histone methylation in higher plants." Annu Rev Plant Biol **61**: 395-420.
 - Liu, F., Marquardt, S., Lister, C., Swiezewski, S., Dean, C. (2010). "Targeted 3' processing of antisense transcripts triggers *Arabidopsis* FLC chromatin silencing." Science **327**(5961): 94-97.
 - Liu, X., Fu, J., Gu, D., Liu, W., Liu, T., Peng, Y., i in.Wang, G. (2008). "Genome-wide analysis of gene expression profiles during the kernel development of maize (*Zea mays* L.)." Genomics **91**(4): 378-387.
 - Livak, K. J., Schmittgen, T. D. (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method." Methods **25**(4): 402-408.
 - Lopez-Lastra, M., Rivas, A., Barria, M. I. (2005). "Protein synthesis in eukaryotes: the growing biological relevance of cap-independent translation initiation." Biol Res **38**(2-3): 121-146.
 - Lorraine-Colwill, D. F., Powles, S. B., Hawkes, T. R., Hollinshead, P. H., Warner, S. A. J., Preston, C. (2003). "Investigation into the mechanism of glyphosate resistance in *Lolium rigidum*." Pestic Biochem Physiol **74**: 62-72.
 - Lu, B., Chen, F., Gong, Z. H., Xie, H., Zhang, J. H., Liang, J. S. (2007). "Intracellular localization of integrin-like protein and its roles in osmotic stress-induced abscisic acid biosynthesis in *Zea mays*." Protoplasma **232**(1-2): 35-43.
 - Lu, X. Y., Huang, X. L. (2008). "Plant miRNAs and abiotic stress responses." Biochem Biophys Res Commun **368**(3): 458-462.
 - Luo, M., Liu, J., Lee, R. D., Scully, B. T., Guo, B. (2010). "Monitoring the expression of maize genes in developing kernels under drought stress using oligo-microarray." J Integr Plant Biol **52**(12): 1059-1074.
 - Luo, M., Liu, X., Singh, P., Cui, Y., Zimmerli, L., Wu, K. (2012). "Chromatin modifications and remodeling in plant abiotic stress responses." Biochim Biophys Acta **1819**(2): 129-136.

-
- Ma, J., Skibbe, D. S., Fernandes, J., Walbot, V. (2008). "Male reproductive development: gene expression profiling of maize anther and pollen ontogeny." *Genome Biol* **9**(12): R181.
 - Macejak, D. G., Sarnow, P. (1991). "Internal initiation of translation mediated by the 5' leader of a cellular mRNA." *Nature* **353**(6339): 90-94.
 - Maden, B. E., Monro, R. E. (1968). "Ribosome-catalyzed peptidyl transfer. Effects of cations and pH value." *Eur J Biochem* **6**(2): 309-316.
 - Mahoney, J. A., Ntolosi, B., DaSilva, R. P., Gordon, S., McKnight, A. J. (2001). "Cloning and characterization of CPVL, a novel serine carboxypeptidase, from human macrophages." *Genomics* **72**(3): 243-251.
 - Mallory, A. C., Vaucheret, H. (2006). "Functions of microRNAs and related small RNAs in plants." *Nat Genet* **38 Suppl**: S31-36.
 - Marks, T., Farkas, W. R. (1997). "Effects of a diet deficient in tyrosine and queuine on germfree mice." *Biochem Biophys Res Commun* **230**(2): 233-237.
 - Marshall, A., Aalen, R. B., Audenaert, D., Beeckman, T., Broadley, M. R., Butenko, M. A., i in: De Smet, I. (2012). "Tackling drought stress: receptor-like kinases present new approaches." *Plant Cell* **24**(6): 2262-2278.
 - Martienssen, R., Baron, A. (1994). "Coordinate suppression of mutations caused by Robertson's mutator transposons in maize." *Genetics* **136**(3): 1157-1170.
 - Martins, J. M., Mermoud, A. (1999). "Transport of rimsulfuron and its metabolites in soil columns." *Chemosphere* **38**(3): 601-616.
 - Maruyama, K., Takeda, M., Kidokoro, S., Yamada, K., Sakuma, Y., Urano, K., i in: Yamaguchi-Shinozaki, K. (2009). "Metabolic pathways involved in cold acclimation identified by integrated analysis of metabolites and transcripts regulated by DREB1A and DREB2A." *Plant Physiol* **150**(4): 1972-1980.
 - Matzke, M. A., Birchler, J. A. (2005). "RNAi-mediated pathways in the nucleus." *Nat Rev Genet* **6**(1): 24-35.
 - Matzke, M. A., Matzke, A. J. M., Eggleston, W. B. (1996). "Paramutation and transgene silencing: A common response to invasive DNA?" *Trends Plant Sci* **1**(11): 382-388.
 - Mayer, W., Niveleau, A., Walter, J., Fundele, R., Haaf, T. (2000). "Demethylation of the zygotic paternal genome." *Nature* **403**(6769): 501-502.
 - McCabe, P. F., Levine, A., Meijer, P. J., Tapon, N. A., Pennell, R. I. (1997). "A programmed cell death pathway activated in carrot cells cultured at low cell density." *Plant J* **12**: 267-280.
 - Meme, S., Calas, A. G., Montecot, C., Richard, O., Gautier, H., Gefflaut, T., i in: Beloeil, J. C. (2009). "MRI characterization of structural mouse brain changes in response to chronic exposure to the glufosinate ammonium herbicide." *Toxicol Sci* **111**(2): 321-330.
 - Mette, M. (2005) "Plant DNA methylation analysis by "bisulfite genomic sequencing"." *The Epigenome*, 1-6.
 - Metzger, L. O. Y., Munier-Lamy, C., Choné, T., Belgy, M.-J., Andreux, F., Védy, J.-C. (1996). "Fate of a sulfonylurea herbicide in an alluvial soil, as shown by experimental degradation of pyrimidine-2-14C-labeled rimsulfuron." *Chemosphere* **33**(4): 625-633.
 - Meyer, P. (2001). "Chromatin remodelling." *Curr Opin Plant Biol* **4**(5): 457-462.

-
- Michalski, T. (2005). Z pola dla przemysłu. Kukurydza rośliną przyszłości. Poradnik dla producentów cz. 3. Warszawa, Agro Serwis Warszawa. **2005**: 7-13.
 - Monsanto Europe, S. A. (2004). Etykieta i instrukcja stosowania środka ochrony roślin Roundup 360 SLw celu ograniczenia ryzyka dla ludzi i środowiska, Monsanto Polska Sp. z o.o.
 - Morales-Ruiz, T., Ortega-Galisteo, A. P., Ponferrada-Marin, M. I., Martinez-Macias, M. I., Ariza, R. R., Roldan-Arjona, T. (2006). "DEMETER and REPRESSOR OF SILENCING 1 encode 5-methylcytosine DNA glycosylases." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(18): 6853-6858.
 - Morris, E. R., Walker, J. C. (2003). "Receptor-like protein kinases: the keys to response." Curr Opin Plant Biol **6**(4): 339-342.
 - Morris, S. W., Vernooij, B., Titatarn, S., Starrett, M., Thomas, S., Wiltse, C. C., i in.Uknes, S. (1998). "Induced resistance responses in maize." Mol Plant Microbe Interact **11**(7): 643-658.
 - Muller, J., Hart, C. M., Francis, N. J., Vargas, M. L., Sengupta, A., Wild, B., i in.Simon, J. A. (2002). "Histone methyltransferase activity of a Drosophila Polycomb group repressor complex." Cell **111**(2): 197-208.
 - Nagano, T., Mitchell, J. A., Sanz, L. A., Pauler, F. M., Ferguson-Smith, A. C., Feil, R., Fraser, P. (2008). "The Air noncoding RNA epigenetically silences transcription by targeting G9a to chromatin." Science **322**(5908): 1717-1720.
 - Nalewaja, J. D., Devilliers, B., Matysiak, R. (1996). "Surfactant and salt affect glyphosate retention and absorption." Weed Research **36**(3): 241-247.
 - Ndlovu, M. N., Denis, H., Fuks, F. (2011). "Exposing the DNA methylome iceberg." Trends Biochem Sci **36**(7): 381-387.
 - Nicholls, P. H., Evans, A. A. (1987). "The behaviour of chlorsulfuron and metsulfuron in solis in relation to incidents of injury to sugar beet." Proc Brit Crop Protect Conf - Weeds **2**: 549-556.
 - Nickson, T. E. (2008). "Planning environmental risk assessment for genetically modified crops: problem formulation for stress-tolerant crops." Plant Physiol **147**(2): 494-502.
 - Nowacka, M., Jackowiak, P., Rybarczyk, A., Magacz, T., Strozycki, P. M., Barciszewski, J., Figlerowicz, M. (2012). "2D-PAGE as an effective method of RNA degradome analysis." Mol Biol Rep **39**(1): 139-146.
 - Orcaray, L., Zulet, A., Zabalza, A., Royuela, M. (2012). "Impairment of carbon metabolism induced by the herbicide glyphosate." J Plant Physiol **169**(1): 27-33.
 - Orom, U. A., Derrien, T., Beringer, M., Gumireddy, K., Gardini, A., Bussotti, G., i in.Shiekhhattar, R. (2010). "Long noncoding RNAs with enhancer-like function in human cells." Cell **143**(1): 46-58.
 - Ortega-Galisteo, A. P., Morales-Ruiz, T., Ariza, R. R., Roldan-Arjona, T. (2008). "Arabidopsis DEMETER-LIKE proteins DML2 and DML3 are required for appropriate distribution of DNA methylation marks." Plant Mol Biol **67**(6): 671-681.
 - Osakabe, Y., Maruyama, K., Seki, M., Satou, M., Shinozaki, K., Yamaguchi-Shinozaki, K. (2005). "Leucine-rich repeat receptor-like kinase1 is a key membrane-bound regulator of abscisic acid early signaling in Arabidopsis." Plant Cell **17**(4): 1105-1119.
 - Pandey, R., Muller, A., Napoli, C. A., Selinger, D. A., Pikaard, C. S., Richards, E. J., i in.Jorgensen, R. A. (2002). "Analysis of histone acetyltransferase and histone deacetylase families of Arabidopsis thaliana suggests functional diversification of chromatin modification among multicellular eukaryotes." Nucleic Acids Res **30**(23): 5036-5055.

-
- Pandey, R. R., Mondal, T., Mohammad, F., Enroth, S., Redrup, L., Komorowski, J., i in. Kanduri, C. (2008). "Kcnq1ot1 antisense noncoding RNA mediates lineage-specific transcriptional silencing through chromatin-level regulation." *Mol Cell* **32**(2): 232-246.
 - Pechmann, S., Willmund, F., Frydman, J. (2013). "The ribosome as a hub for protein quality control." *Mol Cell* **49**(3): 411-421.
 - Peles, E., Nativ, M., Lustig, M., Grumet, M., Schilling, J., Martinez, R., i in. Schlessinger, J. (1997). "Identification of a novel contactin-associated transmembrane receptor with multiple domains implicated in protein-protein interactions." *EMBO J* **16**(5): 978-988.
 - Pena-Cortes, H., Sanchez-Serrano, J. J., Mertens, R., Willmitzer, L., Prat, S. (1989). "Abscisic acid is involved in the wound-induced expression of the proteinase inhibitor II gene in potato and tomato." *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**(24): 9851-9855.
 - Peña-Cortes, H., Sanchez-Serrano, J. J., Rocha-Sosa, M., Willmitzer, L. (1988). "Systemic induction of proteinase-inhibitor-II gene expression in potato plants by wounding." *Planta* **174**(1): 84-89
 - Pena-Cortes, H., Willmitzer, L., Sanchez-Serrano, J. J. (1991). "Abscisic Acid Mediates Wound Induction but Not Developmental-Specific Expression of the Proteinase Inhibitor II Gene Family." *Plant Cell* **3**(9): 963-972.
 - Penterman, J., Zilberman, D., Huh, J. H., Ballinger, T., Henikoff, S., Fischer, R. L. (2007). "DNA demethylation in the Arabidopsis genome." *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(16): 6752-6757.
 - Perez-Jones, A., Park, K. W., Polge, N., Colquhoun, J., Mallory-Smith, C. A. (2007). "Investigating the mechanisms of glyphosate resistance in *Lolium multiflorum*." *Planta* **226**(2): 395-404.
 - Peric-Hupkes, D., Meuleman, W., Pagie, L., Bruggeman, S. W., Solovei, I., Brugman, W., i in. van Steensel, B. (2010). "Molecular maps of the reorganization of genome-nuclear lamina interactions during differentiation." *Mol Cell* **38**(4): 603-613.
 - Peterson, C. L., Laniel, M. A. (2004). "Histones and histone modifications." *Current Biology* **14**: R546-R551.
 - Phillips, J. R., Dalmay, T., Bartels, D. (2007). "The role of small RNAs in abiotic stress." *FEBS Lett* **581**(19): 3592-3597.
 - Pickart, C. M. (2001). "Mechanisms underlying ubiquitination." *Annu Rev Biochem* **70**: 503-533.
 - Pieniążek, D., Bukowska, B., Duda, W. (2003). "Glifosat-nietoksyczny pestycyd?" *Medycyna Pracy* **54**(6): 579-583.
 - Pieniążek D., B. B., Duda W. (2003). "Glifosat-nietoksyczny pestycyd?" *Medycyna Pracy* **54**(6): 579-583.
 - Pietryga, J., Drzewiecki, S. (2011). "Mieszanki herbicydowo-nawozowe w integrowanej produkcji kukurydzy." *Postępy w Ochronie Roślin* **51**(3): 1371-1375.
 - Pisarev, A. V., Hellen, C. U., Pestova, T. V. (2007). "Recycling of eukaryotic posttermination ribosomal complexes." *Cell* **131**(2): 286-299.
 - Pollegioni, L., Schonbrunn, E., Siehl, D. (2011). "Molecular basis of glyphosate resistance-different approaches through protein engineering." *FEBS J* **278**(16): 2753-2766.
 - Pontvianne, F., Blevins, T., Pikaard, C. S. (2010). "Arabidopsis Histone Lysine Methyltransferases." *Adv Bot Res* **53**: 1-22.
 - Poślednik, W. (2005). Rok 2004 i co dalej z kukurydzą. *Kukurydza rośliną przyszłości. Poradnik dla producentów. Cz. 3*. Warszawa, Ago Serwis Warszawa: 3-6.

-
- Prins, A., Verrier, P., Kunert, K. J., Foyer, C. H. (2008). CO₂ enrichment modulates both proteases and protease inhibitors in maize. Photosynthesis. Energy from the Sun: 14th International Congress on Photosynthesis. Allen, J. F., Gantt, E., Golbeck, J. H., Osmond, B., Springer. **3**: 1379-1382.
 - Qiu, J. (2006). "Epigenetics: unfinished symphony." Nature **441**(7090): 143-145.
 - Ritchie, M. E., Silver, J., Oshlack, A., Holmes, M., Diyagama, D., Holloway, A., Smyth, G. K. (2007). "A comparison of background correction methods for two-colour microarrays." Bioinformatics **23**(20): 2700-2707.
 - Rojano-Delgado, A. M., Cruz-Hipolito, H., De Prado, R., Luque de Castro, M. D., Franco, A. R. (2012). "Limited uptake, translocation and enhanced metabolic degradation contribute to glyphosate tolerance in *Mucuna pruriens* var. utilis plants." Phytochemistry **73**(1): 34-41.
 - Rola, H. (2003). "Reakcja odmian kukurydzy na herbicydy sulfonocznikowe.": 1-5.
 - Romero, D. M., Rios de Molina, M. C., Juarez, A. B. (2011). "Oxidative stress induced by a commercial glyphosate formulation in a tolerant strain of *Chlorella kessleri*." Ecotoxicol Environ Saf **74**(4): 741-747.
 - Różański, L. (1998). Przemiany glifosatu. Poznań, Agra-Enviro Lab.
 - Sadva, D., Heller, C. H., Orians, G. H., Purves, W. K., Hillis, D. (2008). Life: the science of biology. DNA is Packed into a Mitotic Chromosome, Sinauer Associates, Inc.
 - Samaj, J., Baluska, F., Volkmann, D. D. (1998). "Cell-specific expression of two arabinogalactan protein epitopes recognized by monoclonal antibodies JIM8 and JIM13 in maize roots." Protoplasma **204**: 1-12.
 - Samaj, J., Braun, M., Baluska, F., Ensikat, H. J., Tsumuraya, Y., Volkmann, D. D. (1999). "Specific Localization of Arabinogalactan-Protein Epitopes at the Surface of Maize Root Hairs." Plant Cell Physiol **40**(8): 874-883.
 - Sardar, H. S., Showalter, A. M. (2007). "A Cellular Networking Model Involving Interactions Among Glycosyl-Phosphatidylinositol (GPI)-Anchored Plasma Membrane Arabinogalactan Proteins (AGPs), Microtubules and F-actin in Tobacco BY-2 Cells." Plant Signal Behav **2**(1): 8-9.
 - Schaefer, L., Schaefer, R. M. (2010). "Proteoglycans: from structural compounds to signaling molecules." Cell Tissue Res **339**(1): 237-246.
 - Schaller, A. (2004). "A cut above the rest: the regulatory function of plant proteases." Planta **220**(2): 183-197.
 - Scheer, J. M., Ryan, C. A., Jr. (2002). "The systemin receptor SR160 from *Lycopersicon peruvianum* is a member of the LRR receptor kinase family." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(14): 9585-9590.
 - Schermelleh, L., Carlton, P. M., Haase, S., Shao, L., Winoto, L., Kner, P., i in.Sedat, J. W. (2008). "Subdiffraction multicolor imaging of the nuclear periphery with 3D structured illumination microscopy." Science **320**(5881): 1332-1336.
 - Schindler, T., Bergfeld, R., Schopfer, P. (1995). "Arabinogalactan proteins in maize coleoptiles: developmental relationship to cell death during xylem differentiation but not to extension growth." Plant J **7**(1): 25-36.
 - Schmitz, R. J., Schultz, M. D., Urich, M. A., Nery, J. R., Pelizzola, M., Libiger, O., i in.Ecker, J. R. (2013). "Patterns of population epigenomic diversity." Nature **495**(7440): 193-198.
 - Schmutz, J., Wheeler, J., Grimwood, J., Dickson, M., Yang, J., Caoile, C., i in.Myers, R. M. (2004). "Quality assessment of the human genome sequence." Nature **429**(6990): 365-368.

-
- Schnable, P. S., Hochholdinger, F., Nakazono, M. (2004). "Global expression profiling applied to plant development." Curr Opin Plant Biol **7**(1): 50-56.
 - Schnable, P. S., Ware, D., Fulton, R. S., Stein, J. C., Wei, F., Pasternak, S., i in. Wilson, R. K. (2009). "The B73 maize genome: complexity, diversity, and dynamics." Science **326**(5956): 1112-1115.
 - Schneiders, G. E., Koeppe, M. K., Naidu, M. V., Horne, P., Brown, A. M., Mucha, C. F. (1993). "Fate of rimsulfuron in the environment." J Agricult Food Chem **41**(12): 2402-2410.
 - Schönbrunn, E., Eschenburg, S., Shuttleworth, W. A., Schloss, J. V., Amrhein, N., Evans, J. N. S., Kabsch, W. (2001). "Interaction of the herbicide glyphosate with its target enzyme 5-enolpyruvylshikimate 3-phosphate synthase in atomic detail." Proc Natl Acad Sci USA **98**(4): 1376-1380.
 - Schroeder, A., Mueller, O., Stocker, S., Salowsky, R., Leiber, M., Gassmann, M., i in. Ragg, T. (2006). "The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements." BMC Mol Biol **7**: 3.
 - Schultz, C. J., Rumsewicz, M. P., Johnson, K. L., Jones, B. J., Gaspar, Y. M., Bacic, A. (2002). "Using genomic resources to guide research directions. The arabinogalactan protein gene family as a test case." Plant Physiol **129**(4): 1448-1463.
 - Schwacke, R., Schneider, A., van der Graaff, E., Fischer, K., Catoni, E., Desimone, M., i in. Kunze, R. (2003). "ARAMEMNON, a novel database for Arabidopsis integral membrane proteins." Plant Physiol **131**(1): 16-26.
 - Scippa, G. S., Di Michele, M., Onelli, E., Patrignani, G., Chiatante, D., Bray, E. A. (2004). "The histone-like protein H1-S and the response of tomato leaves to water deficit." J Exp Bot **55**(394): 99-109.
 - Seifert, G. J., Roberts, K. (2007). "The biology of arabinogalactan proteins." Annu Rev Plant Biol **58**: 137-161.
 - Seki, M., Narusaka, M., Ishida, J., Nanjo, T., Fujita, M., Oono, Y., i in. Shinozaki, K. (2002). "Monitoring the expression profiles of 7000 Arabidopsis genes under drought, cold and high-salinity stresses using a full-length cDNA microarray." Plant J **31**(3): 279-292.
 - Shah, M. Y., Calin, G. A. (2013). "The mix of two worlds: non-coding RNAs and hormones." Nucleic Acid Ther **23**(1): 2-8.
 - Shaner, D. L., Lindenmeyer, R. B., Ostlie, M. H. (2012). "What have the mechanisms of resistance to glyphosate taught us?" Pest Manag Sci **68**(1): 3-9.
 - Sheng, J., D'Ovidio, R., Mehdy, M. C. (1991). "Negative and positive regulation of a novel proline-rich protein mRNA by fungal elicitor and wounding." Plant J **1**(3): 345-354.
 - Shiu, S. H., Bleecker, A. B. (2001). "Plant receptor-like kinase gene family: diversity, function, and signaling." Sci STKE **2001**(113): re22.
 - Showalter, A. M. (2001). "Arabinogalactan-proteins: structure, expression and function." Cell Mol Life Sci **58**(10): 1399-1417.
 - Shukla, L. I., Chinnusamy, V., Sunkar, R. (2008). "The role of microRNAs and other endogenous small RNAs in plant stress responses." Biochim Biophys Acta **1779**(11): 743-748.
 - Skirycz, A., Claeys, H., De Bodt, S., Oikawa, A., Shinoda, S., Andriankaja, M., i in. Inze, D. (2011). "Pause-and-stop: the effects of osmotic stress on cell proliferation during early leaf development in Arabidopsis and a role for ethylene signaling in cell cycle arrest." Plant Cell **23**(5): 1876-1888.

-
- Smolarek, I., Wyszko, E., Barciszewska, A. M., Nowak, S., Gawronska, I., Jablecka, A., Barciszewska, M. Z. (2010). "Global DNA methylation changes in blood of patients with essential hypertension." Med Sci Monit **16**(3): CR149-155.
 - Smyth, G. K. (2004). "Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments." Stat Appl Genet Mol Biol **3**: Article3.
 - Smyth, G. K., Speed, T. (2003). "Normalization of cDNA microarray data." Methods **31**(4): 265-273.
 - Snarska, K. (2012). Integrowana ochrona kukurydzy przed chwastami: zabiegi uprawowe i agrotechniczne oraz zabiegi chemiczne (biologia i rozprzestarczenie się najważniejszych chwastów; wybór substancji aktywnej i formy użytkowej środków ochrony roślin; terminy, liczba i częstotliwość zabiegów). Wybrane problemy integrowanej ochrony kukurydzy oraz zbóż w warunkach północno-wschodnich rejonów Polski. Instytut Ochrony Roślin, P. I. B. Poznań, IOR-PIB.
 - Solinska, M., Jasinska, A., Jackowski, G. (2004). "[DNA microarray technology in large-scale analysis of changes in plant gene expression profile in response to changing environmental conditions]." Postepy Biochem **50**(4): 371-382.
 - Song, C. X., Yi, C., He, C. (2012). "Mapping recently identified nucleotide variants in the genome and transcriptome." Nat Biotechnol **30**(11): 1107-1116.
 - Sormani, R., Masclaux-Daubresse, C., Daniel-Vedele, F., Chardon, F. (2011). "Transcriptional regulation of ribosome components are determined by stress according to cellular compartments in *Arabidopsis thaliana*." PLoS One **6**(12): e28070.
 - Spahn, C. M., Gomez-Lorenzo, M. G., Grassucci, R. A., Jorgensen, R., Andersen, G. R., Beckmann, R., i in.Frank, J. (2004). "Domain movements of elongation factor eEF2 and the eukaryotic 80S ribosome facilitate tRNA translocation." EMBO J **23**(5): 1008-1019.
 - Stallings, W. C., Abdel-Meguid, S. S., Lim, L. W., Shieh, H. S., Dayringer, H. E., Leimgruber, N. K., i in.Kishore, G. M. (1991). "Structure and topological symmetry of the glyphosate target 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase: a distinctive protein fold." Proc Natl Acad Sci U S A **88**(11): 5046-5050.
 - Steinrucken, H. C., Amrhein, N. (1980). "The herbicide glyphosate is a potent inhibitor of 5-enolpyruvylshikimic acid-3-phosphate synthase." Biochem Biophys Res Commun **94**(4): 1207-1212.
 - Steward, N., Ito, M., Yamaguchi, Y., Koizumi, N., Sano, H. (2002). "Periodic DNA Methylation in Maize Nucleosomes and Demethylation by Environmental Stress." J Biol Chem **277**(40): 37741-37746.
 - Suzuki, M. M., Bird, A. (2008). "DNA methylation landscapes: provocative insights from epigenomics." Nat Rev Genet **9**(6): 465-476.
 - Swiezewski, S., Liu, F., Magusin, A., Dean, C. (2009). "Cold-induced silencing by long antisense transcripts of an *Arabidopsis* Polycomb target." Nature **462**(7274): 799-802.
 - Szakonyi, D., Byrne, M. E. (2011). "Ribosomal protein L27a is required for growth and patterning in *Arabidopsis thaliana*." Plant J **65**(2): 269-281.
 - Székács, A., Darvas, B. (2012). Forty Years with Glyphosate. Herbicides - Properties, Synthesis and Control of Weeds. Naguib Abd El-Ghany Hasaneen, M., InTech: 247-284.
 - Tachiwana, H., Osakabe, A., Shiga, T., Miya, Y., Kimura, H., Kagawa, W., Kurumizaka, H. (2011). "Structures of human nucleosomes containing major histone H3 variants." Acta Crystallogr D Biol Crystallogr **67**(Pt 6): 578-583.
 - Takuno, S., Gaut, B. S. (2012). "Body-methylated genes in *Arabidopsis thaliana* are functionally important and evolve slowly." Mol Biol Evol **29**(1): 219-227.

-
- Tariq, M., Paszkowski, J. (2004). "DNA and histone methylation in plants." *Trends Genet* **20**(6): 244-251.
 - Teierling, S., Reither, S., Walter, J. (2007) "Bisulfite sequencing of small DNA/cell samples (PROT35)." *epigenesis*, 1-7.
 - Thomashow, M. F. (1999). "PLANT COLD ACCLIMATION: Freezing Tolerance Genes and Regulatory Mechanisms." *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **50**: 571-599.
 - Thompson, D. M., Lu, C., Green, P. J., Parker, R. (2008). "tRNA cleavage is a conserved response to oxidative stress in eukaryotes." *RNA* **14**(10): 2095-2103.
 - Thompson, D. M., Parker, R. (2009). "Stressing out over tRNA cleavage." *Cell* **138**(2): 215-219.
 - Tsuji, H., Saika, H., Tsutsumi, N., Hirai, A., Nakazono, M. (2006). "Dynamic and reversible changes in histone H3-Lys4 methylation and H3 acetylation occurring at submergence-inducible genes in rice." *Plant Cell Physiol* **47**(7): 995-1003.
 - Tuorto, F., Liebers, R., Musch, T., Schaefer, M., Hofmann, S., Kellner, S., i in.Lyko, F. (2012). "RNA cytosine methylation by Dnmt2 and NSun2 promotes tRNA stability and protein synthesis." *Nat Struct Mol Biol* **19**(9): 900-905.
 - Turner, B. M. (2002). "Cellular memory and the histone code." *Cell* **111**(3): 285-291.
 - Tyczewska, A., Figlerowicz, M. (2009). "Nowe oblicza "Swiata RNA"." *Nauka* **2**: 93-109.
 - Tzin, V., Galili, G. (2010). "New insights into the shikimate and aromatic amino acids biosynthesis pathways in plants." *Mol Plant* **3**(6): 956-972.
 - Uzarowska, A., Dionisio, G., Sarholz, B., Piepho, H. P., Xu, M., Ingvarsdn, C. R., i in.Lubberstedt, T. (2009). "Validation of candidate genes putatively associated with resistance to SCMV and MDMV in maize (*Zea mays* L.) by expression profiling." *BMC Plant Biol* **9**: 15.
 - Vaillant, I., Paszkowski, J. (2007). "Role of histone and DNA methylation in gene regulation." *Curr Opin Plant Biol* **10**(5): 528-533.
 - van Bakel, H., Nislow, C., Blencowe, B. J., Hughes, T. R. (2010). "Most "dark matter" transcripts are associated with known genes." *PLoS Biol* **8**(5): e1000371.
 - Van Loon, L. A., Van Strein, E. A. (1999). "The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins." *Physiol Mol Plant Pathol* **55** 85-97.
 - Van Loon, L. C., Gerritsen, Y. A. M., Ritter, C. E. (1987). "Identification, purification, and characterization of patho-genesis-related proteins from virus-infected Samsun NNftobacco leaves." *Plant Mol Biol Rep* **9**: 593-609.
 - Van Loon, L. C., Pierpoint, W. S., Boller, T., Conejero, V. (1994). "Recommendations for naming plant pathogenesis-related proteins." *Plant Mol Biol Rep* **12**: 245-264.
 - van Loon, L. C., Rep, M., Pieterse, C. M. (2006). "Significance of inducible defense-related proteins in infected plants." *Annu Rev Phytopathol* **44**: 135-162.
 - Vanyushin, B. F. (2006). "DNA methylation in plants." *Curr Top Microbiol Immunol* **301**: 67-122.
 - Vanyushin, B. F., Ashapkin, V. V. (2011). "DNA methylation in higher plants: past, present and future." *Biochim Biophys Acta* **1809**(8): 360-368.

-
- Vanyushin, B. F., Belozersky, A. N. (1959). "Nucleotide composition of deoxyribonucleic acid in higher plants." Dokl. Akad. Nauk SSSR **129**: 944-946.
 - Vanyushin, B. F., Tkacheva, S. G., Belozersky, A. N. (1970). "Rare bases in animal DNA." Nature **225**(5236): 948-949.
 - Vaucheret, H. (2006). "Post-transcriptional small RNA pathways in plants: mechanisms and regulations." Genes Dev **20**(7): 759-771.
 - Vaucheret, H. (2008). "Plant ARGONAUTES." Trends Plant Sci **13**(7): 350-358.
 - Verhage, A., van Wees, S. C., Pieterse, C. M. (2010). "Plant immunity: it's the hormones talking, but what do they say?" Plant Physiol **154**(2): 536-540.
 - Vicient, C. M. (2010). "Transcriptional activity of transposable elements in maize." BMC Genomics **11**: 601.
 - Vila-Aiub, M. M., Balbi, M. C., Distefano, A. J., Fernandez, L., Hopp, E., Yu, Q., Powles, S. B. (2012). "Glyphosate resistance in perennial Sorghum halepense (Johnsongrass), endowed by reduced glyphosate translocation and leaf uptake." Pest Manag Sci **68**(3): 430-436.
 - Vinayak, M., Pathak, C. (2010). "Queuosine modification of tRNA: its divergent role in cellular machinery." Biosci Rep **30**(2): 135-148.
 - Vivancos, P. D., Driscoll, S. P., Bulman, C. A., Ying, L., Emami, K., Treumann, A., i in.Foyer, C. H. (2011). "Perturbations of amino acid metabolism associated with glyphosate-dependent inhibition of shikimic acid metabolism affect cellular redox homeostasis and alter the abundance of proteins involved in photosynthesis and photorespiration." Plant Physiol **157**(1): 256-268.
 - Vongs, A., Kakutani, T., Martienssen, R. A., Richards, E. J. (1993). "Arabidopsis-Thaliana DNA Methylation Mutants." Science **260**(5116): 1926-1928.
 - Wade, P. A., Pruss, D., Wolffe, A. P. (1997). "Histone acetylation: chromatin in action." Trends Biochem Sci **22**(4): 128-132.
 - Wakabayashi, K., Hoson, T., Kamisaka, S. (1997). "Osmotic Stress Suppresses Cell Wall Stiffening and the Increase in Cell Wall-Bound Ferulic and Diferulic Acids in Wheat Coleoptiles." Plant Physiol **113**(3): 967-973.
 - Wang, X., Arai, S., Song, X., Reichart, D., Du, K., Pascual, G., i in.Kurokawa, R. (2008). "Induced ncRNAs allosterically modify RNA-binding proteins in cis to inhibit transcription." Nature **454**(7200): 126-130.
 - Wang, X., Weigel, D., Smith, L. M. (2013). "Transposon variants and their effects on gene expression in Arabidopsis." PLoS Genet **9**(2): e1003255.
 - Warzecha, R. (2010). "Nowe systemy ochrony kukurydzy przed zachwaszczeniem - ochrona przed wschodami." Nasza Rola **26**(2010): 22-23.
 - Warzecha, R. (2010). "Nowe systemy ochrony kukurydzy przed zachwaszczeniem – ochrona powszodowa." Nasza Rola **27**: 44-48.
 - Wendler, C., Putzer, A., Wild, A. (1992). "Efecto of glufosinate (phosphinotricin) and inhibitors of photorespiration on photosynthesis and ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase activity." J Plant Physiol **6**: 666-671.
 - Wierzbicki, A. T. (2012). "The role of long non-coding RNA in transcriptional gene silencing." Curr Opin Plant Biol **15**(5): 517-522.

-
- Wierzbicki, A. T., Ream, T. S., Haag, J. R., Pikaard, C. S. (2009). "RNA polymerase V transcription guides ARGONAUTE4 to chromatin." *Nat Genet* **41**(5): 630-634.
 - Wolf, A. E., Dietz, K. J., Schroder, P. (1996). "Degradation of glutathione S-conjugates by a carboxypeptidase in the plant vacuole." *FEBS Lett* **384**(1): 31-34.
 - Wrzaczek, M., Brosche, M., Salojarvi, J., Kangasjarvi, S., Idanheimo, N., Mersmann, S., i in.Kangasjarvi, J. (2010). "Transcriptional regulation of the CRK/DUF26 group of receptor-like protein kinases by ozone and plant hormones in Arabidopsis." *BMC Plant Biol* **10**: 95.
 - www.maizearray.org. (2008). "Maize Oligonucleotide Array Project."
 - Wyatt, G. R. (1950). "Occurrence of 5-methylcytosine in nucleic acids." *Nature* **166**(4214): 237-238.
 - Xiang, H., Zhu, J., Chen, Q., Dai, F., Li, X., Li, M., i in.Wang, J. (2010). "Single base-resolution methylome of the silkworm reveals a sparse epigenomic map." *Nat Biotechnol* **28**(5): 516-520.
 - Xie, Z., Allen, E., Fahlgren, N., Calamar, A., Givan, S. A., Carrington, J. C. (2005). "Expression of Arabidopsis MIRNA genes." *Plant Physiol* **138**(4): 2145-2154.
 - Xie, Z., Johansen, L. K., Gustafson, A. M., Kasschau, K. D., Lellis, A. D., Zilberman, D., i in.Carrington, J. C. (2004). "Genetic and functional diversification of small RNA pathways in plants." *PLoS Biol* **2**(5): E104.
 - Yamada, K., Lim, J., Dale, J. M., Chen, H., Shinn, P., Palm, C. J., i in.Ecker, J. R. (2003). "Empirical analysis of transcriptional activity in the Arabidopsis genome." *Science* **302**(5646): 842-846.
 - Yang, W., Chendrimada, T. P., Wang, Q., Higuchi, M., Seeburg, P. H., Shiekhattar, R., Nishikura, K. (2006). "Modulation of microRNA processing and expression through RNA editing by ADAR deaminases." *Nat Struct Mol Biol* **13**(1): 13-21.
 - Yarmolinsky, M. B., Haba, G. L. (1959). "Inhibition by Puromycin of Amino Acid Incorporation into Protein." *Proc Natl Acad Sci U S A* **45**(12): 1721-1729.
 - Yu, Q., Cairns, A., Powles, S. (2007). "Glyphosate, paraquat and ACCase multiple herbicide resistance evolved in a *Lolium rigidum* biotype." *Planta* **225**(2): 499-513.
 - Zelaya, I. A., Owen, M. D., Vangessel, M. J. (2004). "Inheritance of evolved glyphosate resistance in *Coryza canadensis* (L.) Cronq." *Theor Appl Genet* **110**(1): 58-70.
 - Zhang, B., Pan, X., Cobb, G. P., Anderson, T. A. (2006). "Plant microRNA: a small regulatory molecule with big impact." *Dev Biol* **289**(1): 3-16.
 - Zhang, L., Chia, J. M., Kumari, S., Stein, J. C., Liu, Z., Narechania, A., i in.Ware, D. (2009). "A genome-wide characterization of microRNA genes in maize." *PLoS Genet* **5**(11): e1000716.
 - Zhang, M., Kimatu, J. N., Xu, K., Liu, B. (2010). "DNA cytosine methylation in plant development." *J Genet Genomics* **37**(1): 1-12.
 - Zhang, S., Sun, L., Kragler, F. (2009). "The phloem-delivered RNA pool contains small noncoding RNAs and interferes with translation." *Plant Physiol* **150**(1): 378-387.
 - Zhang, Y. (2003). "Transcriptional regulation by histone ubiquitination and deubiquitination." *Genes Dev* **17**(22): 2733-2740.
 - Zhang, Z., Yu, J., Li, D., Liu, F., Zhou, X., Wang, T., i in.Su, Z. (2010). "PMRD: plant microRNA database." *Nucleic Acids Res* **38**(Database issue): D806-813.

- Zhou, H., Glimcher, L. H. (1995). "Human MHC class II gene transcription directed by the carboxyl terminus of CIITA, one of the defective genes in type II MHC combined immune deficiency." Immunity **2**(5): 545-553.
- Zhu, J., Jeong, J. C., Zhu, Y., Sokolchik, I., Miyazaki, S., Zhu, J. K., i in.Bressan, R. A. (2008). "Involvement of Arabidopsis HOS15 in histone deacetylation and cold tolerance." Proc Natl Acad Sci USA **105**(12): 4945-4950.
- Zhu, J. K. (2008). "Epigenome sequencing comes of age." Cell **133**(3): 395-397.
- Zhu, Q. H., Wang, M. B. (2012). "Molecular Functions of Long Non-Coding RNAs in Plants." Genes **3**: 176-190.
- Zhu, Y., Fu, J., Zhang, J., Liu, T., Jia, Z., Wang, J., i in.Wang, G. (2009). "Genome-wide analysis of gene expression profiles during ear development of maize." Plant Mol Biol **70**(1-2): 63-77.
- Zilberman, D., Cao, X., Jacobsen, S. E. (2003). "ARGONAUTE4 control of locus-specific siRNA accumulation and DNA and histone methylation." Science **299**(5607): 716-719.
- Zilberman, D., Gehring, M., Tran, R. K., Ballinger, T., Henikoff, S. (2007). "Genome-wide analysis of Arabidopsis thaliana DNA methylation uncovers an interdependence between methylation and transcription." Nat Genet **39**(1): 61-69.

9. Życiorys naukowy

EDUKACJA:	
2006-obecnie	doktorantka, Instytut Chemii Bioorganicznej PAN, Poznań Pracownia Biochemii tRNA, Zespół Biosyntezy Białka
2008	Magister inżynier Biotechnologii Żywności
2006	Magister inżynier Towaroznawstwa
2003-2008	Studentka Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu, Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu, Specjalizacja-Biotechnologia Żywności
2001-2006	Studentka Akademii Ekonomicznej w Poznaniu, Wydział Towaroznawstwa, Specjalizacja-Kształowanie Jakości Produktów Przemysłowych
PUBLIKACJE:	
	D. Gurda, A.M. Kietrys , A. Szopa, T. Twardowski Life with oxidative stress Chemical and Process Engineering 2012,33 (4), A. Tyczewska, A. Kurzyńska-Kokorniak, N. Koralewska, A. Szopa, A.M. Kietrys , J. Wrzeński, T. Twardowski, M. Figlerowicz "Selection of RNA oligonucleotides that can modulate human Dicer activity in vitro" Nucleic Acid Therapeutics, 2011,21(5), 333-46 D. Gurda, A.M. Kietrys , A. Szopa, T. Twardowski Czynniki elongacyjne wczoraj i dziś Od syntezy chemicznej do biologii syntetycznej, 2009, OWN PAN, Poznań, red. M. Figlerowicz A.M. Kietrys , A. Szopa, K. Bąkowska-Żywicka Structure and function of intersubunit bridges in procariotic ribosome Biotechnologia, 2009, 1(84), 48-58 K. Bąkowska-Żywicka, A.M. Kietrys , T. Twardowski Antisense oligonucleotides targeting universally conserved 26S rRNA domains of plant ribosomes at different steps of polypeptide elongation Oligonucleotides, 2008, 18(2), 175-86 K. Bąkowska-Żywicka, A. M. Kietrys Molekularne podstawy biosyntezy białka – funkcja 23S rRNA Biotechnologia, 2007, 1(76), 186-196

<p>PLAKATY:</p>	<p>A. M. Kietrys, M. Filipiak, K. Bąkowska-Żywicka, T. Twardowski Wykorzystanie mini-tRNA i strategii antysensu do badania zmian konformacji rybosomu w: Młodzi Towaroznawcy 2006, 2006, 29-32</p> <p>A.M. Kietrys, M. Góralski, A. Żmieńko, M. Figlerowicz, T. Twardowski Changes in epigenetic marks level in response to herbicide stress in <i>Zea mays</i> Structural Biology of Plants and Microbes, 2013, Poznań, 22.05.2013</p> <p>A.M. Kietrys, M. Góralski, A. Żmieńko, M. Figlerowicz, T. Twardowski Correlation of changes in total DNA methylation level and maize resistance to herbicide stress Polish-German Biochemical Societies Joint Meeting, Poznań, 11-14.9.2012</p> <p>A.M. Kietrys, M. Góralski, A. Żmienko, M. Figlerowicz, T. Twardowski Changes in gene expression level in maize in response to herbicide stress IV Congress of Polish Biotechnology and IV EUROBIOTECH 2011, Kraków, 12-15.10.2011</p> <p>A.M. Kietrys, A. Czaban, T. Twardowski Correlation of changes in global DNA methylation level and maize resistance to herbicide stress The 2nd Polish Congress of Biochemistry and Cell Biology, Kraków, 5-9.09.2011</p> <p>A. M. Kietrys, T. Twardowski Correlation of changes in gene expression in response on stress conditions in <i>Zea mays</i> XLIV Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, Łódź, 16-19.09.2009</p> <p>A. M. Kietrys, A. Szopa, T. Twardowski Eucaryotic ribosome in stress condition Central European Congress of Life Science Eurobiotech, Kraków, 17-19.10.2008</p> <p>A. M. Kietrys, A. Szopa, T. Twardowski Changes of interaction between ribosomal subunits in stress conditions XLIII Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, Olsztyn, 8-11.09.2008</p>
------------------------	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

	<p>A. M. Kietrys, K. Bąkowska-Żywicka, T. Twardowski The function of the translating ribosome: Conformational changes of large ribosomal subunit XLII Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, Szczecin, 18-21.09.2007</p> <p>A.M. Kietrys, K. Bąkowska-Żywicka, T. Twardowski Rybosom eukariotyczny jako dynamiczny makrokompleks molekularny XLI Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego, Białystok, 12-15.09.2006</p> <p>A.M. Kietrys, K. Bąkowska-Żywicka, T. Twardowski Antisense strategy in the investigation of ribosomal conformational changes 1st BioScience Partnering Event: Berlin-Brandenburg trifft Poznań, Poznań, 30-31.03.2006</p> <p>PATENTY: M. Figlerowicz, A. Tyczewska, T. Twardowski, A.M. Kietrys, A. Szopa „Sposób inhibowania rybonukleazy Dicer, inhibitor rybonukleazy Dicer oraz zastosowanie aptamerów RNA jako inhibitorów rybonukleazy Dicer” 2011/0207,197</p> <p>ZGOSZENIA PATENTOWE H. Jakubowski, T. Twardowski, M. Figlerowicz, L. Handschuh, A.M. Kietrys, D. Gurda, J. Syszyńska-Zajczyk Zgłoszony wniosek patentowy: 28.12.2012 P- 402289 w Urzędzie Patentowym RP „Biomarker molekularny, narzędzie diagnostyczne do określania ryzyka chorób układu krążenia, zastosowanie biomarkerów molekularnych” H. Jakubowski, T. Twardowski, M. Figlerowicz, L. Handschuh, A.M. Kietrys, D. Gurda, J. Syszyńska-Zajczyk Zgłoszony wniosek patentowy: 28.12.2012 P-402291 w Urzędzie Patentowym RP „Sposób określania ekspresji cząsteczek miRNA”</p>
--	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

<p>UDZIAŁ W PROJEKTACH:</p>	<p>M. Korbin, A. Kuras, S. Keller-Przybyłkiewicz, J. Adamczyk, T. Twardowski, A.M. Kietrys, A.Szopa, K. Adamczewski</p> <p>Zgłoszony wniosek patentowy: 11.01.2011 P 393620 w Urzędzie Patentowym RP</p> <p>"Sposób precyzyjnego odróżniania genotypów kukurydzy, uproszczony test molekularny oraz specyficzny biomarker Identyfikacyjny"</p> <p>T. Twardowski, A.M. Kietrys, A.Szopa, K. Adamczewski, J. Adamczyk, M. Korbin, P. Kuchta, A. Kuras, S. Keller-Przybyłkiewicz, M. Figlerowicz, A. Żmieńko, M. Góralski</p> <p>Zgłoszony wniosek patentowy: 31.08.2010 P 392284, [WIPO ST 10/C PL392284] w Urzędzie Patentowym RP</p> <p>„Sposób określania odporności linii kukurydzy na warunki stresu herbicydowego, zestaw diagnostyczny do określania odporności linii kukurydzy na warunki stresu herbicydowego oraz zastosowanie aptamerów RNA do detekcji odpornych i/lub wrażliwych linii kukurydzy”</p> <p>Projekt badawczy zamawiany przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego Nr PBZ-MNiSW-2/3/2006/7 „Opracowanie nowoczesnych genetyczno-molekularnych metod diagnostycznych służących do charakterystyki genetycznego podłoża cech odporności na stresy biotyczne i abiotyczne roślin uprawnych w Polsce, w szczególności metod przydatnych do wyznaczania zmienności form allelicznych genów ważnych dla selekcji udoskonalonych odmian, określania zakresu współdziałania genów, konstruowania nasyconych markerami map genetycznych oraz mapowania cech ilościowych” - Wykonawca</p> <p>Projekt promotorski Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego Nr N N310 043738 „Korelacja epigenetycznych modyfikacji DNA i białek histonowych jako mechanizm odpowiedzi rośliny na warunki stresu herbicydowego” – Wykonawca</p> <p>Projekt badawczy Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego Nr N N310 309839 „Alternatywny splicing u kukurydzy zwyczajnej indukowany w warunkach stresu herbicydowego” – Wykonawca</p>
----------------------------------------	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

	<p>Projekt badawczy MNiI 2654/B/PO1/2009/36 „Krótkie cząsteczki RNA jako regulatory aktywności enzymatycznej ludzkiej rybonukleazy Dicer” – Wykonawca</p> <p>Projekt w ramach Poddziałania 1.3.2 osi priorytetowej 1. Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka, 2007-2013, konkurs 1/2008 POIG.01.03.02-00-007/08 „Uzyskanie ochrony patentowej aptamerów RNA jako inhibitorów rybonukleazy Dicer” – Wykonawca</p> <p>Projekt badawczy narodowego Centrum Nauki Nr N N310 769040 „Małe niekodujące RNA i zmiany w degradacji roślinnym jako mechanizm odpowiedzi na warunki stresu herbicydowego” – Wykonawca</p> <p>KURSY I SZKOLENIA:</p> <p>28.9.2012 Poznańska Noc Naukowców prezentacja: „Szybko tak poznać dziedziczenia szlak”</p> <p>27.3.2012 Poznański Festiwalu Nauki i Sztuki, Poznań: prezentacja „Magia Światła i Barw”</p> <p>12-15.10.2011 Workshop on Intellectual Property ICGEB, Kraków</p> <p>23.09.2011 Poznańska Noc Naukowców prezentacja „Daj się opromienić”</p> <p>24.09.2010 Poznańska Noc Naukowców prezentacja „Architektura życia”</p> <p>27.07.2010 Poznań, Szkolenia: “Badania stosowane. Jak je komercjalizować?”, „Tworzenie spółek spin-off przez naukowców”</p> <p>25.09.2009 Poznańska Noc Naukowców prezentacja „Jak wyglądają geny?”</p> <p>7-10.04.2008 Triest, Kurs teoretyczny „RNA Structure and Function”</p> <p>NAGRODY I STYPENDIA:</p> <p>Stypendium w ramach programu "Wsparcie stypendialne dla doktorantów na kierunkach uznanych za strategiczne z punktu widzenia rozwoju Wielkopolski" -2010/2011</p> <p>Nagroda rektora Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu za „Wyniki w studiach” – 2009</p> <p>II miejsce w Konkursie na najlepszą pracę magisterską przygotowaną i obronioną na Akademii Ekonomicznej w Poznaniu w roku akademickim – 2005/2006</p>
--	------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

INNE AKTYWNOŚCI:	<p>2012-2013 Pełnomocnik ds. rozwoju regulaminu przy Radzie Samorządu Doktorantów Polskiej Akademii Nauk</p> <p>2012-2013 Członek Rady Samorządu Doktorantów Środowiskowego Studium Doktoranckiego przy IChB PAN, Zastępca Przewodniczącego Komisji Socjalnej</p> <p>2011-2012 Przewodnicząca Rady Samorządu Doktorantów Środowiskowego Studium Doktoranckiego przy IChB PAN</p> <p>2011 Członek Grupy Inicjatywnej organizującej Samorząd Doktorantów Środowiskowego Studium Doktoranckiego przy IChB PAN</p>
-------------------------	--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

10. Załączniki

Załącznik 1.

Tabela 26. Lista genów wykazujących największą zmienność ekspresji u kukurydzy pod wpływem herbicydu Roundup uzyskana w wyniku analizy ekspresji genów z wykorzystaniem mikromacierzy oligonukleotydowych z sondami specyficznymi dla *Zea mays*. Kolorami oznaczono: pomarańczowy - zmiana poziomu ekspresji na poziomie $\leq 0,5$, żółtym - zmiana poziomu ekspresji $\leq 1,0$ i $> 0,5$, jasnozielony - zmiana poziomu ekspresji $\leq 1,0$ i > 2 , ciemnozielony - zmiana poziomu ekspresji ≥ 2 .

Porównywane warunki Zmiana poziomu ekspresji										ID genu	Nazwa genu wg przypisania sondy na macierzy oligonukleotydowej (w j. ang.)
KTL-KSL	KTL ^{"7"} -KSL ^{"7"}	TL-SL	TL ^{"7"} -SL ^{"7"} &	(TL-KTL) - (SL-KSL)	(TL ^{"7"} -KTL ^{"7"}) - (SL ^{"7"} -KSL ^{"7"})	KTL ^{"7"} -KTL	TL ^{"7"} -TL	KSL ^{"7"} -KSL	SL ^{"7"} -SL		
0,7	0,9	8,3	1,2	11,1	1,2	1,5	0,2	1,2	1,1	MZ00030976	unknown protein
0,1	4,3	0,2	4,1	2,8	0,9	145,3	65,9	2,1	2,8	MZ00013307	hypothetical protein
0,9	0,8	2,3	0,7	2,5	0,9	1,0	0,9	1,1	2,9	MZ00030874	receptor-like kinase
0,4	1,6	0,9	1,8	2,5	1,1	4,9	2,5	1,1	1,3	MZ00017126	expressed protein, having alternative splicing product, putative RNA pol II accessory factor
0,5	3,0	1,3	1,2	2,4	0,4	3,5	0,8	0,6	0,8	MZ00039799	peroxisomal membrane protein OsPex14p
0,5	1,5	0,8	1,4	1,9	0,9	0,7	0,6	0,2	0,4	MZ00040755	translation factor-like
2,0	0,7	3,6	0,7	1,8	1,0	0,4	0,5	1,2	2,5	MZ00000632	NA
0,4	1,9	0,8	1,4	1,8	0,8	5,2	3,3	1,2	1,7	MZ00001442	hypothetical protein similar to Arabidopsis thaliana chromosome 2
0,3	2,1	0,5	2,9	1,8	1,4	5,4	4,6	0,7	0,8	MZ00039792	NA
0,3	1,7	0,5	0,9	1,7	0,5	6,7	2,3	1,2	1,5	MZ00031239	OSJNBa0072F16.6
2,7	1,1	4,3	0,9	1,6	0,8	0,7	0,5	1,8	2,6	MZ00015907	hypothetical protein
1,5	0,9	2,4	0,9	1,6	0,9	0,7	0,8	1,1	2,2	MZ00018341	unknown protein
0,4	1,4	0,6	1,2	1,6	0,9	4,9	3,4	1,3	1,7	MZ00046467	putative receptor protein kinase
0,5	2,5	0,8	2,7	1,6	1,1	4,3	4,3	0,9	1,3	MZ00037049	NA

Porównywane warunki Zmiana poziomu ekspresji										ID genu	Nazwa genu wg przypisania sondy na macierzy oligonukleotydowej (w j. ang.)
KTL-KSL	KTL ⁷ -KSL ⁷	TL-SL	TL ⁷ -SL ⁷ &	(TL-KTL) - (SL-KSL)	(TL ⁷ -KTL ⁷) - (SL ⁷ -KSL ⁷)	KTL ⁷ -KTL	TL ⁷ -TL	KSL ⁷ -KSL	SL ⁷ -SL		
0,6	0,6	1,0	0,5	1,5	0,7	1,7	1,2	1,7	2,5	MZ00050258	putative beige protein
0,7	1,4	1,0	1,2	1,5	0,9	3,8	2,7	1,9	2,3	MZ00040918	histone H2B.2.
0,4	1,7	0,6	1,4	1,5	0,8	5,7	3,7	1,3	1,5	MZ00028420	putative ATPase ATP1
0,3	1,2	0,5	0,9	1,5	0,8	4,6	2,8	1,3	1,5	MZ00052141	unknown protein
0,7	9,5	1,1	3,3	1,4	0,3	15,3	3,4	1,2	1,1	MZ00016059	hypothetical protein
0,3	1,5	0,4	1,2	1,4	0,8	5,3	3,9	1,1	1,3	MZ00016669	putative chelatase subunit
1,1	0,9	1,5	0,8	1,3	0,9	1,4	1,1	1,8	2,1	MZ00016237	putative pseudouridylate synthase
0,7	1,9	0,9	0,9	1,3	0,5	3,3	1,5	1,2	1,4	MZ00043814	NA
0,3	1,0	0,4	2,4	1,2	2,5	4,8	12,2	1,7	2,2	MZ00041513	wound-induced protease inhibitor
0,5	1,3	0,6	1,1	1,2	0,8	4,4	3,9	1,7	2,2	MZ00036338	unknown protein
1,2	0,8	1,5	0,8	1,2	0,9	1,1	1,1	1,7	2,2	MZ00041278	chitinase
1,1	1,1	1,4	0,9	1,2	0,8	2,1	1,8	2,1	2,6	MZ00030918	putative auxin response factor
1,7	0,6	2,0	0,6	1,2	1,0	0,6	0,6	1,6	2,2	MZ00016946	AT4g33900
0,7	1,2	0,9	3,1	1,2	2,5	3,6	2,9	2,3	0,9	MZ00020727	Oslre1p
0,9	1,0	1,1	1,6	1,2	1,5	3,2	4,0	2,9	2,7	MZ00041258	putative RNA-binding protein
0,6	0,9	0,8	2,3	1,2	2,4	1,8	1,9	1,2	0,6	MZ00031040	NA
0,8	1,6	1,0	0,8	1,2	0,5	1,9	0,8	1,0	1,0	MZ00037683	putative inosine monophosphate dehydrogenase
0,6	1,6	0,7	2,1	1,2	1,3	4,0	7,1	1,4	2,2	MZ00041235	putative transaldolase
0,9	0,8	1,0	0,5	1,1	0,6	1,7	1,2	1,9	2,4	MZ00030936	NA
0,8	1,7	1,0	4,6	1,1	2,6	2,2	5,7	1,1	1,2	MZ00028944	pathogenesis related protein-1 - maize
0,5	1,0	0,6	2,0	1,1	2,1	2,6	2,1	1,3	0,6	MZ00001466	NA
0,5	3,4	0,5	1,5	1,1	0,4	4,9	3,4	0,7	1,2	MZ00030899	unknown protein
2,4	0,5	2,7	0,4	1,1	0,7	0,4	0,4	2,0	2,9	MZ00024831	fructose-1,6-bisphosphatase, cytosolic

Porównywane warunki Zmiana poziomu ekspresji										ID genu	Nazwa genu wg przypisania sondy na macierzy oligonukleotydowej (w j. ang.)
KTL-KSL	KTL ⁷ -KSL ⁷	TL-SL	TL ⁷ -SL ⁷ &	(TL-KTL) - (SL-KSL)	(TL ⁷ -KTL ⁷) - (SL ⁷ -KSL ⁷)	KTL ⁷ -KTL	TL ⁷ -TL	KSL ⁷ -KSL	SL ⁷ -SL		
1,0	0,8	1,1	0,7	1,1	0,8	1,2	1,5	1,4	2,5	MZ00046892	kelch-like protein
0,8	3,2	0,9	1,5	1,1	0,5	5,0	2,1	1,3	1,2	MZ00028405	putative hydroxymethyltransferase
0,5	3,4	0,6	1,7	1,1	0,5	5,6	2,2	0,9	0,8	MZ00033278	hypothetical protein
0,8	3,0	0,9	1,2	1,1	0,4	3,0	1,2	0,8	0,9	MZ00048592	extensin-like protein
2,1	2,5	2,3	5,5	1,1	2,2	0,6	1,2	0,5	0,5	MZ00031167	putative antifungal zeamatin-like protein
1,3	5,2	1,4	2,3	1,1	0,4	3,5	1,7	0,9	1,1	MZ00019806	OSJNBa0043L09.29
0,8	0,6	0,9	0,4	1,1	0,6	1,0	0,9	1,3	2,2	MZ00003833	NA
1,1	1,2	1,1	3,4	1,1	2,7	1,0	2,5	0,8	0,8	MZ00036113	glucose starvation-induced protein precursor, defence-related protein
1,4	0,6	1,5	2,2	1,1	3,7	0,4	1,3	0,9	0,9	MZ00033799	NA
1,1	0,8	1,1	0,6	1,1	0,8	1,4	1,3	2,0	2,4	MZ00017000	putative splicing factor-like protein
1,0	0,6	1,0	1,1	1,1	2,0	0,8	0,7	1,4	0,6	MZ00033449	putative membrane associated protein
0,5	1,3	0,5	1,5	1,0	1,1	5,6	5,9	2,1	2,0	MZ00042049	putative PGPD14 protein
1,8	0,5	1,9	2,0	1,0	3,7	0,5	2,4	1,8	2,2	MZ00018360	putative xylulose kinase
1,1	0,3	1,2	0,2	1,0	0,7	0,5	0,6	1,7	3,2	MZ00015456	putative serine/threonine protein kinase
0,9	1,0	0,9	2,0	1,0	2,1	2,1	3,9	1,9	1,7	MZ00036325	NA
8,0	0,6	8,1	0,6	1,0	1,1	0,2	0,2	2,8	2,7	MZ00029171	unknown protein
1,5	0,5	1,5	1,3	1,0	2,6	0,5	0,6	1,4	0,7	MZ00015148	putative hASNA-I
5,7	0,6	5,6	0,6	1,0	1,0	0,2	0,2	2,1	2,3	MZ00023875	OSJNBb0006N15.13
2,8	0,4	2,8	0,5	1,0	1,2	0,5	0,5	3,9	3,3	MZ00038416	NA
1,7	0,7	1,7	0,7	1,0	1,1	0,8	0,9	2,1	2,0	MZ00026891	putative Calcineurin B subunit
1,3	0,9	1,3	2,4	1,0	2,6	1,1	1,2	1,6	0,7	MZ00031579	unknown protein
1,0	1,9	0,9	0,8	1,0	0,4	2,5	1,4	1,3	1,6	MZ00023783	OSJNBb0116K07.11

Porównywane warunki Zmiana poziomu ekspresji										ID genu	Nazwa genu wg przypisania sondy na macierzy oligonukleotydowej (w j. ang.)
KTL-KSL	KTL ⁷ -KSL ⁷	TL-SL	TL ⁷ -SL ⁷ &	(TL-KTL) - (SL-KSL)	(TL ⁷ -KTL ⁷) - (SL ⁷ -KSL ⁷)	KTL ⁷ -KTL	TL ⁷ -TL	KSL ⁷ -KSL	SL ⁷ -SL		
1,7	0,6	1,6	0,6	1,0	0,9	0,9	1,0	2,5	2,8	MZ00018579	hypothetical protein
1,2	1,3	1,2	3,0	1,0	2,4	1,3	2,2	1,3	0,8	MZ00031028	expressed protein
2,2	0,4	2,1	0,5	1,0	1,3	0,5	0,6	2,8	2,4	MZ00040583	transcription initiation factor tbp1, TATA-box binding protein
0,9	0,6	0,8	1,3	0,9	2,1	1,0	1,0	1,5	0,7	MZ00016801	unknown protein
3,2	0,8	3,0	0,8	0,9	1,0	0,5	0,6	1,8	2,3	MZ00023507	ubiquitin extension protein 2
1,2	2,2	1,1	0,9	0,9	0,4	2,0	0,9	1,1	1,1	MZ00055664	NA
6,6	0,5	6,1	0,6	0,9	1,1	0,2	0,3	2,8	2,7	MZ00021209	NA
2,3	0,2	2,2	0,3	0,9	1,2	0,3	0,4	3,2	2,8	MZ00013372	hypothetical protein
1,8	1,3	1,7	2,7	0,9	2,1	0,6	1,4	0,8	0,9	MZ00025825	NA
0,8	0,3	0,7	0,4	0,9	1,1	1,1	1,3	2,6	2,4	MZ00036872	NA
2,6	0,6	2,4	0,6	0,9	1,1	0,3	0,3	1,3	1,0	MZ00021857	unknown protein
2,2	0,5	2,0	0,6	0,9	1,1	0,3	0,3	1,2	1,0	MZ00024861	putative cdc21 protein
1,5	0,5	1,3	0,5	0,9	1,0	0,8	0,8	2,3	2,1	MZ00048441	glycosyl transferase family 8 protein
0,9	0,6	0,8	1,4	0,9	2,5	1,0	0,9	1,6	0,5	MZ00004910	NA
0,6	1,9	0,5	1,9	0,9	1,0	1,5	1,4	0,5	0,4	MZ00037261	MDR-like ABC transporter
3,1	0,4	2,8	0,4	0,9	1,0	0,3	0,4	2,1	2,3	MZ00014375	MAP kinase 2
3,2	0,3	2,9	0,3	0,9	1,0	0,3	0,3	2,8	2,7	MZ00041743	unknown
0,9	2,3	0,8	1,0	0,9	0,4	3,8	1,5	1,5	1,3	MZ00023554	heat shock protein 82
2,3	0,5	2,1	0,5	0,9	1,1	0,5	0,5	2,3	2,1	MZ00022023	lysine decarboxylase-like protein
2,4	3,2	2,2	1,4	0,9	0,5	2,0	1,1	1,5	1,6	MZ00042631	NA
2,4	0,5	2,1	0,5	0,9	1,0	0,5	0,6	2,4	2,3	MZ00038273	putative TIP120 protein
3,5	0,8	3,1	0,8	0,9	1,0	0,5	0,6	2,5	2,6	MZ00044721	NA
2,2	0,4	1,9	0,3	0,9	0,8	0,6	0,5	3,3	3,2	MZ00030751	NA

Porównywane warunki Zmiana poziomu ekspresji										ID genu	Nazwa genu wg przypisania sondy na macierzy oligonukleotydowej (w j. ang.)
KTL-KSL	KTL ⁷ -KSL ⁷	TL-SL	TL ⁷ -SL ⁷ &	(TL-KTL) - (SL-KSL)	(TL ⁷ -KTL ⁷) - (SL ⁷ -KSL ⁷)	KTL ⁷ -KTL	TL ⁷ -TL	KSL ⁷ -KSL	SL ⁷ -SL		
5,0	0,6	4,4	0,8	0,9	1,3	0,3	0,4	2,3	2,2	MZ00032289	putative speckle-type protein
1,2	2,1	1,0	0,9	0,9	0,4	1,5	1,0	0,8	1,1	MZ00039706	unknown protein
4,6	0,5	4,1	0,5	0,9	1,0	0,2	0,2	2,2	1,6	MZ00037567	zp22/6
0,9	2,0	0,8	2,6	0,9	1,3	4,2	5,1	2,0	1,6	MZ00040903	elongation factor 1-alpha
0,9	2,0	0,8	1,0	0,9	0,5	3,3	1,4	1,4	1,1	MZ00037881	water-stress protein
1,3	0,6	1,1	1,9	0,9	3,0	0,6	1,7	1,2	1,0	MZ00019253	NA
2,7	0,6	2,3	0,6	0,9	1,0	0,5	0,6	2,4	2,4	MZ00040209	NA
0,9	3,3	0,7	3,0	0,8	0,9	3,9	4,1	1,1	1,0	MZ00026804	putative gibberellin-induced protein
5,1	0,3	4,2	0,3	0,8	1,2	0,2	0,2	3,0	2,4	MZ00038327	NA
1,2	1,0	0,9	2,1	0,8	2,1	2,0	3,8	2,4	1,7	MZ00028707	hypothetical protein similar to Arabidopsis thaliana chromosome 1
1,7	0,4	1,4	0,9	0,8	2,1	0,3	0,5	1,4	0,7	MZ00055369	NA
5,8	0,4	4,6	0,4	0,8	1,0	0,2	0,2	3,4	2,6	MZ00037115	OSJNBb0059K02.4
2,1	0,8	1,7	1,7	0,8	2,0	0,5	0,6	1,2	0,6	MZ00003660	putative 3(2),5-bisphosphate nucleotidase
4,9	0,5	3,8	0,6	0,8	1,2	0,2	0,3	2,2	1,8	MZ00039413	zein
4,5	0,4	3,4	0,4	0,7	1,1	0,2	0,2	2,3	1,8	MZ00049796	unnamed protein product; strong similarity to unknown protein
4,1	0,4	3,1	0,5	0,7	1,1	0,3	0,4	2,8	2,8	MZ00044727	NA
3,8	0,6	2,8	0,7	0,7	1,2	0,2	0,3	1,4	1,0	MZ00038006	elongation factor 1-alpha
0,5	2,2	0,4	5,6	0,7	2,5	3,5	4,6	0,8	0,3	MZ00031137	putative serine carboxypeptidase II-3 precursor
4,4	0,5	3,1	0,5	0,7	1,0	0,3	0,3	2,2	1,8	MZ00019363	contains EST AU029306(E30132) unknown protein
5,3	0,5	3,7	0,5	0,7	0,9	0,3	0,4	2,8	2,8	MZ00030727	NA
0,6	2,1	0,4	2,2	0,7	1,0	3,4	4,6	1,0	0,9	MZ00024336	nucleic acid binding protein
1,2	2,0	0,8	3,3	0,7	1,6	3,1	5,4	1,9	1,4	MZ00031050	NA
16,4	1,1	11,2	0,9	0,7	0,8	0,1	0,1	1,5	1,7	MZ00031092	NA

Porównywane warunki Zmiana poziomu ekspresji										ID genu	Nazwa genu wg przypisania sondy na macierzy oligonukleotydowej (w j. ang.)
KTL-KSL	KTL ⁷ -KSL ⁷	TL-SL	TL ⁷ -SL ⁷ &	(TL-KTL) - (SL-KSL)	(TL ⁷ -KTL ⁷) - (SL ⁷ -KSL ⁷)	KTL ⁷ -KTL	TL ⁷ -TL	KSL ⁷ -KSL	SL ⁷ -SL		
0,9	5,5	0,6	5,0	0,7	0,9	13,7	13,8	2,3	1,7	MZ00013978	gigantea-like protein
0,7	2,8	0,3	2,7	0,5	1,0	3,4	4,1	0,9	0,5	MZ00031057	NA
2,6	1,5	0,8	2,4	0,3	1,6	0,8	3,7	1,3	1,3	MZ00029726	NA
1,2	1,0	0,9	2,1	0,8	2,1	2,0	3,8	2,4	1,7	MZ00028707	hypothetical protein similar to Arabidopsis thaliana chromosome 1
0,8	2,9	0,6	5,7	0,8	2,0	3,4	6,2	0,9	0,7	MZ00031103	probable integral membrane protein
0,2	1,4	0,5	1,8	2,0	1,3	6,2	4,1	0,9	1,0	MZ00043514	putative arabinogalactan-like protein

Załącznik 2.



KAPITAŁ LUDZKI
NARODOWA STRATEGIA SPÓJNOŚCI



Samorząd Województwa Wielkopolskiego
Wojewódzki Urząd Pracy
w Poznaniu

UNIA EUROPEJSKA
EUROPEJSKI
FUNDUSZ SPOŁECZNY



Oświadczam że jestem stypendystką w ramach projektu pt.: ”Wparcie stypendialne dla doktorantów na kierunkach uznanych za strategiczne z punktu widzenia rozwoju Wielkopolski”, Poddziałanie 8.2.2 Programu Operacyjnego Kapitał Ludzki, współfinansowanego ze środków Unii Europejskiej w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego.