

Rodzicom, Jackowi oraz
moim dwóm Promyczkom –
Weronice i Dorotce lub Maksiowi

Serdecznie dziękuję Promotorowi
Pani Prof. dr hab. Joannie Deckert
za niesamowitą życzliwość i serdeczność
oraz wszelką pomoc przy realizacji niniejszej rozprawy.

Dziękuję wszystkim osobom, które pomogły przy realizacji niniejszej rozprawy doktorskiej. W szczególności pragnę podziękować:

Wszystkim pracownikom Zakładu Ekofizjologii Roślin za przyjazną atmosferę i wszelką pomoc przy wykonywaniu doświadczeń laboratoryjnych.

Dr Witoldowi Nowakowi oraz pracownikom i doktorantom Zakładu Fizjologii i Biologii Rozwoju Zwierząt za pomoc przy wykonywaniu analiz z zastosowaniem techniki PCR w czasie rzeczywistym.

Pracownikom i doktorantom Zakładu Mikrobiologii oraz Zakładu Fizjologii Roślin za pomoc przy wykonywaniu zdjęć i wymianę doświadczeń dotyczących stosowanych technik laboratoryjnych.

Profesorowi Stanleyowi Luttsowi oraz Isabelle Lefèvre za umożliwienie odbycia stażu w Louvain-la-Nueve, przyjazną atmosferę oraz pomoc przy wykonywaniu pomiarów biosyntezy etylenu i zawartości kadmu w roślinach.

Uniwersytet im. Adama Mickiewicza
Wydział Biologii, Instytut Biologii Eksperymentalnej
Zakład Ekofizjologii Roślin

Regulacja ekspresji genów
kodujących białka uczestniczące
w szlakach przekazywania
sygnałów w siewkach soi (*Glycine
max* L.) traktowanych kadmem.

Jagna Chmielowska-Bąk

Rozprawa doktorska
wykonana pod kierunkiem
prof. dr hab. Joanny Deckert

Poznań, 2013

Poszczególne etapy badań wykonywanych w ramach rozprawy doktorskiej były finansowane przez:

- Dziekana Wydziału Biologii UAM w ramach grantu dziekańskiego przyznanego na realizację projektu PBWB-01/2010 zatytułowanego „Regulacja genów uczestniczących w szlakach przekazywania sygnałów w reakcji roślin na działanie metali ciężkich”
- Narodowe Centrum Nauki na podstawie decyzji numer DEC-2011/03/N/NZ9/00214, na realizację projektu zatytułowanego „Wpływ etylenu, tlenu azotu i generowanych przez oksydazę NADPH reaktywnych form tlenu na ekspresję genów indukowanych przez jony kadmu w siewkach soi (*Glycine max*)”

Autorka rozprawy doktorskiej, Jagna Chmielowska-Bąk, jest stypendystą w ramach projektu pt.: „Wsparcie 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



KAPITAŁ LUDZKI
NARODOWA STRATEGIA SPÓJNOŚCI



Samorząd Województwa Wielkopolskiego
Wojewódzki Urząd Pracy
w Poznaniu

UNIA EUROPEJSKA
EUROPEJSKI
FUNDUSZ SPOŁECZNY



SPIS TREŚCI

SPIS TREŚCI

WYKAZ NAJWAŻNIEJSZYCH SKRÓTÓW STOSOWANYCH W PRACY	4
SPIS ILUSTRACJI I TABEL	7
STRESZCZENIE	10
ABSTRACT	12
1. WSTĘP	14
1.1 Toksyczny wpływ kadmu na rośliny	15
1.2 Elementy sygnalizacji komórkowej uruchamiane w odpowiedzi na działanie kadmu	20
1.2.1 Sygnalizacja za pośrednictwem jonów wapnia	21
1.2.2 Reaktywne formy tlenu	23
1.2.3 Tlenek azotu	26
1.2.4 Hormony roślinne	29
1.2.4.1 Etylen	29
1.2.4.2 Kwas salicylowy i jasmonowy	31
1.2.4.3 Kwas abscysynowy	33
1.2.4.4 Auksyny	34
1.2.5 Sygnalne funkcje poliamin	35
1.2.6 Kaskady kinaz aktywowanych mitogenami	38
1.2.7 Czynniki transkrypcyjne	40
1.2.8 Sygnalna rola mikroRNA	42
1.2.9 Inne elementy pełniące funkcje sygnalne	45
2. CEL PRACY	48
3. MATERIAŁY I METODY	50
3.1 Stosowane odczynniki	50
3.2 Startery stosowane w reakcji PCR w czasie rzeczywistym	51
3.3 Materiał roślinny	53
3.4 Warunki hodowli i warianty doświadczalne	53
3.5 Pomiary wzrostu	56
3.6 Analizy zawartości kadmu w korzeniach siewek soi	56
3.7 Pomiary przeżywalności komórek	56
3.8 Izolacja RNA	57
3.9 Oczyszczanie RNA i reakcja odwrotnej transkrypcji	58
3.10 Pomiary poziomu mRNA przy zastosowaniu techniki PCR w czasie rzeczywistym	59
3.11 Bioinformatyczna analiza sekwencji promotorowych	60
3.12 Pomiary biosyntezy etylenu	60
3.13 Analizy aktywności reduktazy azotanowej	62

SPIS TREŚCI

3.14 Histochemiczne wykrywanie nadtlenu wodoru przy pomocy barwienia 3'3-diaminobenzodyną (DABem)	62
3.15 Pomiary poziomu substancji reagujących z kwasem tiobarbiturowym (TBARS)	63
3.16 Histochemiczne wykrywanie jonów kadmu z zastosowaniem odczynnika Dithizone	64
3.17 Obliczenia matematyczne i statystyczna analiza wyników	64
4. WYNIKI	65
4.1 Badania wstępne	65
4.1.1 Wybór genów, projektowanie starterów i doświadczenia optymalizacyjne	65
4.1.2 Wybór genu referencyjnego do przeprowadzenia reakcji PCR w czasie rzeczywistym	68
4.2 Pomiary zawartości kadmu w korzeniach siewek soi	69
4.3 Wpływ jonów kadmu na ekspresję genów na poziomie transkryptów	70
4.3.1 Geny kodujące białka zaangażowane w metabolizm etylenu i poliamin	70
4.3.2 Geny kodujące fosfolipazę C i kalmodulinę	72
4.3.3 Gen kodujący reduktazę azotanową	73
4.3.4 Gen kodujący małe białko wiążące GTP	74
4.3.5 Geny kodujące białka zaangażowane w kaskady kinaz	
4.3.6 aktywowanych mitogenami	74
4.3.7 Geny kodujące czynniki transkrypcyjne	76
4.4 Bioinformatyczna analiza sekwencji promotorowych	78
4.5 Wpływ kadmu na biosyntezę etylenu	94
4.6 Wpływ kadmu na aktywność reduktazy azotanowej	96
4.7 Wpływ inhibitora oksydazy NADPH, DPI, na odpowiedź siewek soi na działanie kadmu	97
4.7.1 Pomiary poziomu nadtlenu wodoru w siewkach soi traktowanych CdCl ₂ i DPI	97
4.7.2 Wpływ DPI na parametry wzrostowe i przeżywalność komórek	100
4.7.3 Wpływ DPI na poziom transkryptu genów indukowanych przez kadm	102
4.7.3.1 Geny indukowane przez kadm po trzech godzinach traktowania	102
4.7.3.2 Geny indukowane przez kadm po sześciu godzinach traktowania	104
4.7.4 Poziom substancji reagujących z kwasem tiobarbiturowym (TBARS)	105
4.8 Wpływ zmiataacza tlenu azotu, PTIO, na reakcję siewek soi traktowanych roztworem kadmu	106
4.8.1 Wpływ PTIO na przeżywalność komórek i parametry wzrostowe	106
4.8.2 Wpływ PTIO na poziom mRNA genów indukowanych przez kadm	108
4.8.2.1 Geny indukowane przez kadm po trzech godzinach działania CdCl ₂	108
4.8.2.2 Geny indukowane przez kadm po sześciu godzinach działania CdCl ₂	109
4.8.3 Akumulacja kadmu w siewkach soi traktowanych CdCl ₂ i PTIO	109

SPIS TREŚCI

4.9	Udział inhibitora syntezy etylenu, chlorku kobaltu, w odpowiedzi siewek soi na działanie kadmu	111
4.9.1	Biosynteza etylenu w siewkach traktowanych $CdCl_2$ i $CoCl_2$	111
4.9.2	Wpływ $CoCl_2$ na parametry wzrostowe i przeżywalność komórek	112
4.9.3	Wpływ $CoCl_2$ na ekspresję genów indukowanych przez kadm	113
4.9.3.1	Geny indukowane po trzech godzinach traktowania roztworem kadmu	113
4.9.3.2	Geny indukowane po sześciu godzinach działania kadmu	115
5.	DYSKUSJA	116
5.1	Pobieranie, akumulacja i translokacja kadmu w roślinach	116
5.2	Wpływ kadmu na ekspresję genów powiązanych ze szlakami przekazywani sygnałów	119
5.2.1	Geny powiązane z metabolizmem etylenu i poliamin	121
5.2.2	Geny zaangażowane w przekazywanie sygnału za pośrednictwem jonów wapnia	124
5.2.3	Geny kodujące białka zaangażowane w generowanie tlenku azotu	125
5.2.4	Geny powiązane z sygnalizacją za pośrednictwem GTP	127
5.2.5	Geny kodujące kinazy aktywowane mitogenam	129
5.2.6	Geny kodujące czynniki transkrypcyjne	130
5.3	Rola reaktywnych form tlenu generowanych przez oksydazę NADPH w odpowiedzi roślin na stres kadmowy	133
5.4	Sygnalna funkcja tlenku azotu w roślinach poddanych działaniu kadmu	135
5.5	Wpływ chlorku kobaltu na odpowiedź roślin na działanie kadmu	132
5.6	Podsumowanie: Model sygnalizacji komórkowej aktywowanej w komórkach roślinnych przez kadm	140
6.	WNIOSKI	144
7.	LITERATURA	146
8.	ANEKS	169

NAJWAŻNIEJSZE SKRÓTY

WYKAZ NAJWAŻNIEJSZYCH SKRÓTÓW STOSOWANYCH W PRACY

- 1-MCP – 1-metylocyklopropen (ang. *1-methylcyclopropane*)
- ABA – kwas abscysynowy (ang. *abscisic acid*)
- ABI – niewrażliwy na kwas abscysynowy (ang. *abscisic acid insensitive*)
- ACC – kwas 1-aminocyklopropano-1-karboksyłowy
(ang. *1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid*)
- ACS – syntaza kwasu 1-aminocyklopropano-1-karboksyłowego
(ang. *1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase*)
- AOA – kwas aminooksyctowy (ang. *aminoxyacetic acid*)
- APX – peroksydaza askorbinianowa (ang. *ascorbate peroxidase*)
- AVG – aminoetoksyglycyna (ang. *aminoethoxyvinylglycine*)
- bZIP – białka zawierające zamki leucynowe (ang. *basic leucine zipper protein*)
- CAT – katalaza (ang. *catalase*)
- DAB – 3,3'-diaminobenzidyna (ang. *3,3'-diaminobenzidine*)
- DACP – diazocyklopentadien (ang. *diazocyclopentadiene*)
- DAG – 1,2- diacyloglicerol (ang. *diacylglycerol*)
- DAO – diaminooksydaza (ang. *diamine oxidase*)
- DPI – difenylojodoniem (ang. *diphenylene iodonium*)
- CAM – kalmodulina (ang. *calmodulin*)
- CBL – kalcyneuryna B (ang. *calcineurin B-like*)
- CDK – kinaza zależna od cyklin (ang. *cyclin-dependent kinase*)
- CML – białka podobne do kalmoduliny (ang. *calmodulin-like proteins*)
- Cyc – cykliny (ang. *cyclins*)
- GEF – czynnik wymieniający nukleotydy guaniniowe (ang. *GTP exchange factor*)
- GEP – białko o aktywności wymiennika nukleotydów guaniniowych (ang. *GTP exchange protein*)
- GSH – glutation
- GR – reduktaza glutationowa (ang. *glutathione reductase*)
- GTP – deoksyguanozyno-5'-trifosforan, nukleotyd guaninowy
(ang. *guanosine-5'-triphosphate*)
- HSF – czynnik szoku cieplnego (ang. *heat shock factor*)

NAJWAŻNIEJSZE SKRÓTY

- IAA – kwas indolilo-3-octowy (ang. *indole-3-acetic acid*)
- IP₃ – inozytolo-1,4,5-trifosforan (ang. *inositol trisphosphate*)
- IRT1 – transporter regulowany przez żelazo (ang. *iron-regulated transporter*)
- JA – kwas jasmonowy (ang. *jasmonic acid*)
- MAPK – kinaza aktywowana mitogenami (ang. *mitogen-activated protein kinase*)
- MAPKK – kinaza kinazy aktywowanej mitogenami
(ang. *mitogen-activated protein kinase kinase*)
- MDA – dialdehyd malonowy (ang. *malondialdehyde*)
- MeJA – ester metylowy kwasu jasmonowego (ang. *methyl jasmonic acid*)
- miRNA – mikro RNA
- MRE – element odpowiedzi na metale (ang. *metal responsive element*)
- mRNA – matrycowe (informacyjne, przekaźnikowe) RNA (ang. *messenger RNA*)
- MTF-1 – czynnik transkrypcyjny odpowiedzi na metale (ang. *metal regulatory transcription factor*)
- MYB – czynnik transkrypcyjny należący do rodziny protoonkogenów myb
(*myeloblastosis*)
- NADPH – dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy
(ang. *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*)
- NBD – bicyklohepta-2,5-dien (ang. *cyclic olefin 2,5-norbornadiene*)
- ncRNA – niekodujące RNA (ang. *non-coding RNA*)
- NMR – jądrowy rezonans magnetyczny (ang. *nuclear magnetic resonance*)
- NOS – syntaza azotanowa (ang. *nitric oxide synthase*)
- NR – reduktaza azotanowa (ang. *nitrate reductase*)
- PAs – poliaminy (ang. *polyamines*)
- PAO – poliaminooksydaza (ang. *polyamine oxidase*)
- PCR – reakcja łańcuchowej polimerazy (ang. *polymerase chain reaction*)
- PCIB – kwas p-chlorofenyloksyizobutyłowy (ang. *p-chlorophenoxyisobutyric acid*)
- PIP₂ – fosfoinozytolo-4,5-difosforan (ang. *phosphatidylinositol biphosphate*)
- piRNA – RNA tworzące kompleksy z białkiem piwi (ang. *piwi-interacting RNA*)
- PR – białka powiązane z patogenezą (ang. *pathogenesis-related proteins*)
- PTIO – 3-tlenku 2-(4-fenyl)-4,4,5,5-tetrametyloimidazolu-1-oksylu
(ang. *2-(4-phenyl)-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl 3-oxide*)

NAJWAŻNIEJSZE SKRÓTY

RISC – kompleks wyciszający indukowany RNA (ang. *RNA induced silencing complex*)

RFT – reaktywne formy tlenu

RLK – kinaza białkowa podobna do receptora (ang. *receptor-like kinases*)

rRNA – rybosomowe (rybosomalne) RNA

RNS – reaktywne formy azotu (ang. *reactive nitrogen species*)

SA – kwas salicylowy (ang. *salicyli acid*)

SAMDC – dekarbosylaza S-adenozylometioniny

(ang. *S-adenosylmethionine decarboxylase*)

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

siRNA – małe interferujące RNA (ang. *small interfering RNA*)

SNP – nitroprusydek sodu (ang. *sodium nitroprusside*)

SOD – dysmutaza ponadtlenkowa (ang. *superoxide dismutase*)

STS – tiosiarczan srebra (ang. *silver thiosulphate*)

TBA – kwas tiobarbiturowy (ang. *thiobarbituric acid*)

TBARS – substancje reagujące z kwasem tiobarbiturowym

(ang. *thiobarbituric acid reactive substances*)

TCA – kwas trichlorooctowy (ang. *trichloroacetic acid*)

TF – czynnik transkrypcyjny (ang. *transcription factor*)

tRNA – transportujące RNA

XOR – oksydoreduktaza ksantynowa (ang. *xanthine oxidoreductase*)

SPIS ILUSTRACJI I TABEL

SPIS RYCIN ZAMIESZCZONYCH W PRACY

- Ryc.1: Przykład powiązań pomiędzy różnymi mechanizmami odpowiedzialnymi za toksyczność kadmu.
- Ryc.2: Model udziału kalmoduliny w przekazywaniu sygnału wewnątrz komórek.
- Ryc.3: Procesy, w które zaangażowana jest oksydaza NADPH .
- Ryc.4: Wpływ inhibitora kwasu indoliloctowego (IAA) na morfologię korzeni jęczmienia.
- Ryc.5: Szlaki syntezy i degradacji putrescyny, spermidyny i sperminy.
- Ryc.6: Modele czynnika Zn-SUP37 i Cd-SUP37 nałożone na siebie.
- Ryc.7: Rodzaje RNA.
- Ryc.8: Model regulacji heterotrimerycznego białka G u zwierząt i rzodkiewnika.
- Ryc.9: Sposób rozmieszczenia siewek soi w szalkach Petriego.
- Ryc.10: Detektor etylenu ETD-300.
- Ryc.11: Plastikowa kuweta z szalką Petriego zawierającą siewki soi.
- Ryc.12: Wartości Ct trzech potencjalnych genów referencyjnych kodujących ubikwitynę, cyklinę zależną od kinaz oraz 18S rRNA.
- Ryc.13: Zawartość kadmu w wierzchołkach korzeni siewek soi.
- Ryc.14: Względny poziom mRNA kodującego białka powiązane z metabolizmem etylenu i poliamin.
- Ryc.15: Względny poziom mRNA kodującego fosfolipazę i kalmodulinę.
- Ryc.16: Względny poziom mRNA kodującego reduktazę azotanową.
- Ryc.17: Względny poziom mRNA kodującego małe białko wiążące GTP.
- Ryc.18: Względny poziom mRNA kodującego kinazy aktywowane mitogenami.
- Ryc.19: Względny poziom mRNA kodującego czynniki transkrypcyjne.
- Ryc.20: Sekwencja regionu promotorowego genu kodującego syntazę kwasu 1-aminocyklopropano-1-karboksyłowego.
- Ryc.21: Sekwencja regionu promotorowego genu kodującego dekarboksylazę S-adenozylometioniny.
- Ryc.22: Sekwencja regionu promotorowego genu kodującego reduktazę azotanową.
- Ryc.23: Sekwencja regionu promotorowego genu kodującego kinazę kinazy aktywowanej mitogenami 2.
- Ryc.24: Sekwencja regionu promotorowego genu kodującego kinazę czynnik transkrypcyjny DOF1 (Glyma13g42820).
- Ryc.25: Sekwencja regionu promotorowego genu kodującego kinazę czynnik transkrypcyjny DOF1 (Glyma15g02620).

SPIS ILUSTRACJI I TABEL

- Ryc.26: Sekwencja regionu promotorowego genu kodującego czynnik transkrypcyjny MYBZ2.
- Ryc.27: Sekwencja regionu promotorowego genu kodującego czynnik transkrypcyjny bZIP62.
- Ryc.28: Biosynteza etylenu w kontrolnych siewkach soi i siewkach soi traktowanych roztworami kadmu.
- Ryc.29: Aktywność reduktazy azotanowej kontrolnych siewkach soi i siewkach soi traktowanych CdCl_2 .
- Ryc.30: Poziom nadtlenu wodoru w kontrolnych siewkach soi i siewkach traktowanych roztworami kadmu.
- Ryc.31: Poziom nadtlenu wodoru w siewkach soi traktowanych CdCl_2 i/lub DPI.
- Ryc.32: Pomiary ilości martwych komórek korzeni siewek soi traktowanych CdCl_2 i/lub DPI przy pomocy barwienia Błękitem Evansa.
- Ryc.33: Barwienie Błękitem Evansa korzeni kontrolnych siewek soi, siewek traktowanych DPI, roztworem kadmu oraz roztworem kadmu i DPI.
- Ryc.34: Wpływ DPI na ekspresję genów indukowanych przez trzygodzinne traktowanie roztworem kadmu.
- Ryc.35: Wpływ DPI na ekspresję genów indukowanych przez sześciogodzinne traktowanie roztworem kadmu.
- Ryc. 36: Poziom substancji reagujących z kwasem tiobarbiturowym.
- Ryc.37: Pomiary ilości martwych komórek korzeni siewek soi traktowanych traktowanych CdCl_2 i/lub PTIO przy pomocy barwienia Błękitem Evansa.
- Ryc.38: Barwienie Błękitem Evansa korzeni kontrolnych siewek soi, siewek traktowanych PTIO, roztworem kadmu oraz roztworem kadmu i PTIO.
- Ryc.39: Wpływ PTIO na ekspresję genów indukowanych przez trzygodzinne traktowanie roztworem kadmu.
- Ryc.40: Wpływ PTIO na ekspresję genów indukowanych przez sześciogodzinne traktowanie roztworem kadmu.
- Ryc.41: Akumulacja jonów kadmu, uwidaczniania przy pomocy barwienia odczynnikiem Dithizone, w wierzchołkach korzeni siewek soi traktowanych wodą destylowaną, wodą destylowaną i PTIO, roztworem kadmu lub roztworem i PTIO przez 3 lub 6 godzin.
- Ryc.42: Biosynteza etylenu w kontrolnych siewkach soi oraz siewkach soi traktowanych roztworem kadmu i/lub chlorkiem kobaltu.
- Ryc.43: Pomiary ilości martwych komórek korzeni siewek soi traktowanych CdCl_2 i/lub CoCl_2 przy pomocy barwienia Błękitem Evansa.
- Ryc.44: Barwienie Błękitem Evansa korzeni kontrolnych siewek soi, siewek traktowanych CoCl_2 , roztworem kadmu oraz roztworem kadmu i CoCl_2 .

SPIS ILUSTRACJI I TABEL

Ryc.45: Wpływ CoCl_2 na ekspresję genów indukowanych przez trzygodzinne traktowanie roztworem kadmu.

Ryc.46: Wpływ CoCl_2 na ekspresję genów indukowanych przez sześciogodzinne traktowanie roztworem kadmu.

Ryc.47: Przykładowe obrazy rozdziału na żelu agarozowym produktów RT-PCR.

Ryc.48: Szlaki syntezy etylenu i poliamin.

Ryc.49: Źródła tlenu azotu w komórce roślinnej.

Ryc.50: Wyniki algorytmu Blast dla genu kodującego małe białko GTP uzyskane w bazie danych NCBI.

Ryc.51: Schemat podsumowujący wyniki uzyskane w ramach rozprawy doktorskiej dotyczące sygnalizacji uruchamianej w odpowiedzi na działanie kadmu w siewkach soi.

SPIS TABEL ZAMIESZCZONYCH W PRACY

Tabela 1: Wpływ kadmu na poziom tlenu azotu w roślinach.

Tabela 2: Odczynniki stosowane w doświadczeniach.

Tabela 3: Startery stosowane w reakcjach PCR w czasie rzeczywistym.

Tabela 4: Warianty doświadczalne stosowane w badaniach.

Tabela 5: Analizowane geny, kodowane przez nie białka i powiązane szlaki przekazywania sygnałów.

Tabela 6: Motywy regulatorowe znajdujące się w sekwencjach promotorów badanych genów rozpoznawane przez czynniki transkrypcyjne należące do rodziny bZIP.

Tabela 7: Elementy regulatorowe znajdujące się w sekwencjach promotorów badanych genów powiązane z odpowiedzią roślin na działanie czynników stresowych.

Tabela 8: Elementy regulatorowe znajdujące się w sekwencjach promotorów badanych genów powiązane z przekazywaniem sygnału za pośrednictwem etylenu lub kwasu abscysynowego.

Tabela 9: Długość oraz świeża i sucha masa korzeni siewek soi CdCl_2 i/lub DPI.

Tabela 10: Długość oraz świeża i sucha masa korzeni siewek soi CdCl_2 i/lub PTIO.

Tabela 11: Długość oraz świeża i sucha masa korzeni siewek soi CdCl_2 i/lub CoCl_2 .

Tabela 12: Przykładowe wyniki badań dotyczących akumulacji kadmu w roślinach.

Tabela 13: Badania, w których zastosowano CoCl_2 jako inhibitor syntezy etylenu.

Tabela 14: Sekwencje promotorowe wraz z wyszukanymi elementami regulatorowymi.

STRESZCZENIE

Regulacja ekspresji genów kodujących białka uczestniczące w szlakach przekazywania sygnałów w siewkach soi (*Glycine max* L.) traktowanych kadmem.

Zanieczyszczenie środowiska substancjami toksycznymi takimi jak kadm stanowi poważny problem współczesnego świata. W przypadku roślin ekspozycja na kadm prowadzi do zahamowania wzrostu, zaburzeń w procesach fotosyntezy, indukcji stresu oksydacyjnego, uszkodzeń białek i DNA oraz inicjacji programowanej śmierci i nekrozy. Najwcześniejszą reakcją roślin na obecność kadmu w środowisku jest aktywacja szlaków przekazywania sygnałów, które prowadzą do mobilizacji mechanizmów obronnych. Celem niniejszej pracy jest kompleksowe zbadanie szlaków sygnałowych zaangażowanych w przekazywanie sygnału kadmowego w jednym gatunku rośliny – soi.

Przeprowadzone badania obejmują pomiary ekspresji piętnastu genów powiązanych z różnymi szlakami przekazywania sygnałów w młodych siewkach soi narażonych na działanie roztworów kadmu w dwóch stężeniach (10 mg L^{-1} i 25 mg L^{-1}) przez krótkie okresy czasu (3, 6 i 24 godziny).

Uzyskane wyniki pokazują, że kadm indukuje ekspresję genów kodujących białka zaangażowane w metabolizm etylenu (syntazę kwasu 1-aminocyklopropano-1-karboksylogowego - ACS), generowanie tlenu azotu (reduktazę azotanową – NR), kaskady kinaz aktywowanych mitogenami (MAPKK2) i regulację ekspresji innych genów (czynniki transkrypcyjne DOF1, MYBZ2 i bZIP62). Bioinformatyczna analiza sekwencji nukleotydowych w promotorach genów indukowanych przez kadm wykazała, że zawierają one szereg motywów regulatorowych powiązanych z odpowiedzią roślin na czynniki stresowe oraz z sygnalizacją za pośrednictwem kwasu abscysynowego i etylenu. Dalsze badania wykazały, że obserwowany wzrost ekspresji genu ACS jest skorelowany z indukcją biosyntezy etylenu, a indukcja ekspresji genu NR ze wzrostem aktywności reduktazy azotanowej.

Dane literaturowe sugerują, że reaktywne formy tlenu (RFT), tlenek azotu (NO) i etylen są zaangażowane w odpowiedź roślin na działanie kadmu. Ponadto uważa się, że przy krótkotrwałym stresie kadmowym głównym źródłem RFT jest oksydaza NADPH. W ramach niniejszej rozprawy doktorskiej sprawdzono, czy wymienione cząsteczki sygnałowe uczestniczą w obserwowanej, zależnej od kadmu indukcji genów

STRESZCZENIE

kodujących ACS, NR, MAPKK2 oraz czynniki transkrypcyjne DOF1, MYBZ2 i bZIP62. Przeprowadzone doświadczenia obejmowały zbadanie wpływu zmiatacza tlenu azotu (PTIO), inhibitora oksydazy NADPH (DPI), oraz inhibitora syntezy etylenu (CoCl_2) na ekspresję wymienionych genów. Traktowanie siewek soi zmiataczem tlenu azotu, PTIO, niwelowało zależną od kadmu indukcję wszystkich analizowanych genów po 3 godzinach aplikacji. Jednocześnie, w tym samym wariancie czasowym, DPI, zwiększało zależną od kadmu indukcję genów kodujących czynniki transkrypcyjne DOF1 i MYBZ2. Po 6 godzinach traktowania nie zaobserwowano wpływu PTIO, ani DPI na ekspresję analizowanych genów. Inhibitor syntezy etylenu, CoCl_2 , modulował ekspresję genów kodujących MAPKK2, NR oraz czynniki transkrypcyjne DOF1 i bZIP62 w siewkach soi traktowanych CdCl_2 . Jednakże, w zastosowanych warunkach doświadczalnych CoCl_2 nie hamował biosyntezy etylenu. Uzyskane wyniki sugerują, że wpływ jonów kobaltu na ekspresję genów jest niezależny od działania etylenu.

Podsumowując, uzyskane wyniki wskazują, że etylen, tlenek azotu, kinazy aktywowane mitogenami oraz czynniki transkrypcyjne DOF1, MYBZ2 i bZIP62 uczestniczą w przekazywaniu sygnału kadmowego w młodych siewkach soi narażonych na krótkotrwały stres kadmowy. Wyniki przeprowadzonych doświadczeń posłużyły do zaproponowania kompleksowego modelu sieci sygnałnych zaangażowanych w przekazywaniu sygnału kadmowego w roślinach.

ABSTRACT

ABSTRACT

Regulation of the expression of genes encoding proteins engaged in signal transduction pathways in soybean seedlings (*Glycine max* L.) treated with cadmium.

Contamination of the environment with toxic substances, such as cadmium, is a serious problem of modern world. In the case of plants exposure to cadmium leads to the inhibition of growth, disturbances in photosynthesis, induction of oxidative stress, alterations in ion homeostasis, protein and DNA damage and initiation of programmed cell death and necrotic processes. The earliest reaction of plants to the presence of the cadmium in their environment includes activation of signal transduction pathways, which in turn lead to the mobilization of plant defense systems. The aim of present study is a comprehensive examination of signaling pathways engaged in the transduction of cadmium signal in one plant specie – soybean.

The conducted research included measurements of the expression of fifteen genes involved in various signal transduction pathways in young soybean (*Glycine max*) seedlings exposed to cadmium at two concentrations (10 mg L^{-1} and 25 mg L^{-1}) for short time periods (3, 6 and 24 hours). The obtained results show that cadmium causes induction of genes encoding proteins involved in ethylene metabolism (1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase - ACS), nitric oxide generation (nitrate reductase - NR), MAPK cascades (MAPKK2) and regulation of other genes expression (DOF1, MYBZ2 and bZIP62 transcriptions factors). The bioinformatic analysis of promoter sequences of Cd-inducible genes revealed that their promoter possess several regulative motifs associated with plant response to stress factors and abscisic acid and ethylene signaling. Further studies showed that the observed increase in ACS expression was correlated with induction of ethylene biosynthesis, while induction of NR gene was correlated with increase in nitrate reductase activity.

Literature data suggest that reactive oxygen species (ROS), nitric oxide (NO) and ethylene are engaged in plant response to cadmium. Moreover, it is believed that under short term cadmium stress NADPH oxidase is the main source of ROS. The putative role of described signaling molecule in the mediation of the observed Cd-dependent induction of ACS, NR, MAPKKK2, DOF1, MYBZ2 and bZIP62 genes was examined. The conducted experiments covered examination of the influence of

ABSTRACT

nitric oxide scavenger (PTIO), NADPH oxidase inhibitor (DPI) and an inhibitor of ethylene synthesis, CoCl_2 on the expression levels of mentioned genes. Treatment with NO scavenger, PTIO, reversed the observed Cd-dependent induction of expression of all investigated genes after 3h of exposure to CdCl_2 . On the other hand, in the same time variant, DPI, caused augmentation of Cd-dependent induction of genes encoding DOF1 and MYBZ2 transcription factors. After 6 h of treatment none of the described effects was observed. Also inhibitor of ethylene synthesis, CoCl_2 , caused modulation of expression of genes encoding MAPKK2, NR, DOF1 and bZIP62 transcription factors in plants exposed to CdCl_2 . However, in the applied experimental conditions CoCl_2 did not inhibit ethylene production. These results suggest that the influence of cobalt ions on genes expression is independent from ethylene action.

Taken together the obtained results imply that ethylene, nitric oxide, mitogen-activated protein kinase cascades and DOF1, MYBZ2 and bZIP62 transcription factors are engaged in the transduction of cadmium signal in young soybean seedlings exposed to short term cadmium stress. A comprehensive model of signaling network engaged in transduction of cadmium signal in plants is proposed.

1. WSTĘP

„Mans attitude towards nature is today critically important simply because we have now acquired a fateful power to alter and destroy nature. But man is a part of nature and his war against nature is inevitably a war against himself”

“Stosunek człowieka do przyrody jest dzisiaj szczególnie istotny ze względu na fakt nabycia przez ludzi fatalnych w skutkach zdolności do zmieniania i niszczenia przyrody. Jednakże człowiek stanowi część przyrody i jego wojna z przyrodą nieuchronnie stanowi wojnę z samym sobą”

Rachel Carson 1964

Pomimo rosnącej uwagi jaką przywiązuje się do ochrony środowiska, zanieczyszczenie przyrody stanowi nadal jeden z najbardziej palących problemów współczesnego świata. Za przykłady najpoważniejszych katastrof spowodowanych skażeniem środowiska mogą posłużyć wyciek izocyjanianu metylu, do którego doszło w 1984 roku w hinduskim mieście Bhopal, wybuch reaktora jądrowego w Czarnobylu, który miał miejsce w 1986 roku, czy też rozwój u mieszkańców Japonii chorób, takich jak Itai Itai, Minamata i astma Yokaichci wynikających z gwałtownego skażenia środowiska kadmem, rtęcią oraz tlenkiem siarki i azotu. Mniej zauważalna, ale bardzo groźna w skutkach jest również chroniczna ekspozycja organizmów na działanie szkodliwych substancji chemicznych. Przedostające się do środowiska toksyczne substancje są pobierane przez rośliny prowadząc do zahamowania ich wzrostu i zmniejszenia uzyskiwanego plonu. Co ważniejsze zakumulowane w roślinach związki chemiczne i metale, takie jak kadm, mogą poprzez kolejne ogniwa łańcucha pokarmowego dostawać się do organizmu ludzi i przyczyniać do rozwoju groźnych chorób, między innymi nowotworów. Bardzo ważne wydaje się więc poznanie efektów wywoływanych przez toksyczne substancje w roślinach oraz sposobów w jaki radzą one sobie z ich niekorzystnym wpływem. Poznanie mechanizmów prowadzących do nabywania przez rośliny odporności ma również bardzo duże znaczenie w rozwijającej się dynamicznie w ostatnich latach metodzie oczyszczania środowiska przy użyciu roślin – fitoremediacji.

1.1. Toksyczny wpływ kadmu na rośliny

WSTĘP

Skażenie środowiska kadmem jest poważnym problemem współczesnego świata. Szacuje się, że rocznie do atmosfery przedostaje się 30 000 ton tego metalu ciężkiego, z czego 4 000-13 000 ton pochodzi z przemysłu [Gallego i in. 2012]. Kadm jest powszechnie wykorzystywany do produkcji baterii niklo-kadmowych, pomarańczowo-czerwonych barwników i stopów miedzi. Główne antropogeniczne źródła tego pierwiastka to spalarnie śmieci, cementownie, spaliny samochodowe, przemysł tekstylny, metalurgiczny i wydobywczy. Do skażenia gleb kadmem przyczynia się również stosowanie sztucznych nawozów [Gallego i in. 2012, Kabir i in. 2012, Toppi i Gabrielli 1999]. Do jednego z najlepiej udokumentowanych przypadków skażenia środowiska kadmem doszło w japońskiej prefekturze Toyama. Na początku XX wieku u osób zamieszkujących ten region rozpoznano dotąd nieznaną chorobę charakteryzującą się uszkodzeniem nerek i osteomalacją – rozmiękczeniem kości. Ze względu na dręczące pacjentów silne bóle całego ciała chorobę tą nazwano „Itai, itai” (w tłumaczeniu „boli, boli”). Po wnikliwych badaniach okazało się, że przyczyną rozwoju choroby było skażenie środowiska kadmem, wynikające z intensywnych prac wydobywczych rud cynku przeprowadzanych w kopalni Kamioka. Kadm, jako mniej użyteczny produkt uboczny, był deponowany w jednej z głównych rzek regionu – Jinzu. W rezultacie doszło do skażenia wód rzeki Jinzu oraz zasilanych przez nią pól ryżowych. Zanieczyszczenie środowiska kadmem doprowadziło do zmniejszenia połowu ryb, uzyskiwanych plonów ryżu oraz rozwoju u prawie 400 osób zamieszkujących tereny nad rzeką Jinzu choroby „Itai, itai”. W 1972 roku poszkodowane osoby wygrały proces z zarządem kopalni Kamioka i uzyskały odszkodowania oraz prawo do monitorowania generowanych przez kopalnię zanieczyszczeń. Choroba „Itai, itai” jest zaliczana do „Czterech Wielkich Chorób Japonii” wywołanych przez skażenie środowiska [Kaji 2012].

Przykładami innych silnie zanieczyszczonych regionów Ziemi, w których stężenie kadmu przekracza $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ gleby, mogą być tereny wokół kopalni w chińskich prowincjach Guangdong i Hanan, dolina Asiruri w Boliwii, prowincja Mae Sot w Tajlandii, czy też tereny wokół hut „Bolesław” i „Miasteczka Śląskie” w Polsce [Bednarska i Stachowicz 2013, Oporto i in. 2012, Panitlertumpai i in. 2013, Zhao i in. 2012a].

Zanieczyszczenie środowiska kadmem jest groźne dla wszystkich organizmów żywych. Toksyczność tego metalu ciężkiego zależy od jego stężenia, czasu działania, badanego gatunku i stadium rozwojowego. W przypadku roślin najbardziej

WSTĘP

narażonymi na działanie kadmu organami są korzenie, które jako pierwsze poddane są toksycznemu działaniu tego pierwiastka. Ponadto, liczne badania wykazały, że kadm jest gromadzony głównie w korzeniach, chociaż znaczne jego ilości mogą być również transportowane do wyższych części roślin [Akthter i in. 2012, Monteiro i in. 2012, Nedjimi i Daoud 2009, Panitlertumpai i in. 2013, Pourghasemian i in. 2013, Rascio i in. 2008, Vestena i in. 2011].

Do najważniejszych zmian morfologicznych wywołanych przez kadm należą zahamowanie wzrostu, brązowienie i zmiany kształtu korzeni, zmniejszenie powierzchni liści, chloroza i powstawanie plam nekrotycznych [Gill i in. 2008, Gonçalves i in. 2007, Küpper i in. 2007, Monteiro i in. 2012, Nedjimi i Daoud 2009, Rascio i in. 2008]. Na poziomie komórkowym, u roślin poddanych działaniu tego pierwiastka, zaobserwowano szereg zmian w ultrastrukturze obejmujących zmniejszoną ilość mitochondriów, diktiosomów i siateczki retikulum endoplazmatycznego (ER), pęcznienie szorstkiego ER oraz zwiększoną wakuolizację komórek. Chloroplasty roślin poddanych działaniu kadmu charakteryzowały się zmniejszonym zwarciem struktury lamelli, węższymi granami, a przy działaniu wyższych stężeń kadmu również pęcznieniem tylakoidów. W obrębie cytoplazmy, wakuoli i ściany komórkowej odnotowano pojawienie się gęstych elektronowo punktów [Ge i in. 2012, Rascio i in. 2008, Sun i in. 2012]. Przy wysokich stężeniach aplikowanego kadmu zaobserwowano zmiany w ultrastrukturze typowe dla procesu programowanej śmierci komórki (PCD) obejmujące obkurczanie się jądra komórkowego i uszkodzenia otoczki jądrowej, wyciek nukleoplazmy, kondensację chromatyny oraz pęcznienie i dezintegrację mitochondriów [Qian-qian i in. 2012].

Istnieje kilka głównych mechanizmów toksyczności kadmu, do których należą:

➤ **Zwiększona produkcja reaktywnych form tlenu.**

Jedną z najpowszechniejszych reakcji roślin na działanie kadmu jest zwiększona produkcja reaktywnych form tlenu (RFT) [Hsu i Kao 2007, Kopyra i Gwóźdź 2003, Lehotai i in. 2011, Vestena i in. 2011]. Wywołany nadprodukcją RFT stres oksydacyjny prowadzi do peroksydacji lipidów oraz uszkodzeń białek i DNA, co z kolei skutkuje zmianami w przepuszczalności błon komórkowych, zmniejszoną aktywnością szeregu enzymów oraz zwiększona częstością mutacji DNA [Scandalios 2002]. U różnych gatunkach roślin poddanych działaniu kadmu zaobserwowano peroksydację błon komórkowych objawiającą się zwiększoną ilością wykrytego dialdehydu

malonowego (MDA) lub substancji reagujących z kwasem tiobarbiturowym (TBARS) [Ge i in. 2012, Gill i in. 2012, Monteiro i in. 2012, Xu i in. 2012]. Nadprodukcja RFT może również prowadzić do modyfikacji oksydacyjnych białek obejmujących między innymi karbonylację, uważaną za jeden z markerów stresu oksydacyjnego [Braconi i in. 2011]. Zwiększoną zawartość karbonylowanych białek odnotowano w roślinach kukurydzy, ogórka, słonecznika, lucerny, grochu i ziemniaka poddanych działaniu kadmu [Gonçalves i in. 2007, Pena i in. 2006, Pena i in. 2007, Romero-Puertas i in. 2002].

➤ **Zaburzenia w homeostazie mineralnej roślin.**

Wykazano, że kadm prowadzi do zaburzeń w homeostazie mineralnej szeregu gatunków roślin [Gonçalves i in. 2009, Li i in. 2012, Liu i in. 2012]. Na zmianę równowagi mineralnej roślin poddanych działaniu jonów kadmu wpływ może mieć kilka czynników. Jony kadmu przedostają się do komórek roślinnych poprzez kanały przeznaczone do pobierania niezbędnych jonów takich jak Ca^{2+} , Fe^{2+} , Zn^{2+} [Chiang i in. 2006, Connolly i in. 2002, Kurtyka i in. 2011, Lee i An 2009, Li i in. 2012, Oomen i in. 2009, Takahashi i in. 2011]. W środowisku zanieczyszczonym kadmem może więc dojść do konkurencji pomiędzy Cd^{2+} , a innymi pierwiastkami o miejsca wiązania w transporterach. Ekspozycja na ten metal ciężki prowadzi również do peroksydacji lipidów prowadzącą do zmian w przepuszczalności błon komórkowych i wycieku jonów [Gill i in. 2012, Monteiro i in. 2012]. Kolejną przyczyną zaburzeń gospodarki mineralnej jest hamujący wpływ kadmu na aktywność niektórych enzymów. Wykazano między innymi, że rośliny traktowane roztworami kadmu charakteryzowały się spadkiem aktywności reduktazy azotanowej powiązanym ze zmniejszoną zawartością azotu [Gill i in. 2012]

➤ **Zahamowanie procesów fotosyntezy.**

Kolejnym powszechnym symptomem toksyczności kadmu jest zahamowanie procesów fotosyntezy, przy czym sugeruje się, że faza jasna fotosyntezy jest bardziej wrażliwa na toksyczne działanie tego metalu niż cykl Calvin-Bensona. Ekspozycja na kadm prowadzi do zmniejszenia ilości wydzielanego tlenu i asymilowanego dwutlenku węgla, spadku maksymalnej wydajności fotosystemu II (F_v/F_m) i obniżenia maksymalnej intensywności fotosyntetycznej (P_N) [Küpper i in. 2007, Rascio i in. 2008, Sun i in. 2012]. Jedną z przyczyn spadku wydajności fotosyntezy u roślin narażonych na działanie kadmu jest degradacja barwników fotosyntetycznych:

WSTĘP

chlorofilu a, chlorofilu b i karotenoidów [Gill i in. 2008, Küpper i in. 2007, Nedjimi i Daoud 2009, Rascio i in. 2008, Xu i in. 2012]. Ponadto wykazano, że kadm wpływa hamująco na aktywność kluczowego enzymu cyklu Calvina, karboksylazy/oksygenazy 1,5-bifosforanu (Rubisco). Sugeruje się, że jednym z ważniejszych mechanizmów prowadzących do spadku aktywności Rubisco pod wpływem stresu kadmowego są uszkodzenia oksydacyjnego tego enzymu [Liu i in. 2008a, Romero-Puertas i in. 2002].

➤ **Uszkodzenia DNA i zaburzenia cyklu komórkowego.**

Toksyczny wpływ kadmu na materiał genetyczny został udowodniony z zastosowaniem szeregu różnych metod, takich jak detekcja mikrojąder, RAPD PCR, metoda kometowa czy reakcja TUNEL [Arasimowicz-Jelonek i in. 2012, Liu i in. 2009, Monteiro i in. 2012, Únyayar i in. 2006]. Uszkodzenia DNA mogą prowadzić do zahamowania podziałów komórkowych. Wykazano, że ekspozycja na kadm wywołuje spadek indeksu mitotycznego oraz zaburzenia w cyklu komórkowym charakteryzujące się zahamowaniem fazy S i G₂ [Monterio i in. 2012, Únyayar i in. 2006]. Kadm może wpływać na częstość podziałów komórkowych również poprzez modulację aktywności białek regulujących cykl komórkowy, do których należą cykliny (Cyc) i kinazy zależne od cyklin (CDK) [Deckert 2000]. W badaniach z zastosowaniem zawiesiny komórkowej soi wykazano, że kadm hamuje ekspresję genu kodującego cyklinę B1 [Sobkowiak i Deckert 2003]. Również w roślinach ryżu zaobserwowano zmiany w ekspresji genów powiązanych z regulacją cyklu komórkowego pod wpływem kadmu. Traktowanie Cd(NO₃)₂ skutkowało obniżeniem poziomu mRNA dla genów kodujących cykliny CycA3;2, CycD6;1, CycL1;1 CycU3, kinazę zależną od cyklin CDKC;2, i inhibitor kinaz zależnych od cyklin, KRP5. Równocześnie odnotowano wzrost ekspresji genów kodujących cykliny CycB2;1, CycH1;1 oraz kinazy CDKC;3, CDKD;1 a także białko RB zaangażowane w inicjację replikacji DNA i białko DEL1 hamujące transkrypcję [Zhao i in. 2012b]. Z kolei w roślinach pszenicy ekspozycja na kadm prowadziła do uszkodzeń oksydacyjnych cykliny D i CDKA. Ponadto CdCl₂ hamował ekspresję genów powiązanych ze ścieżką E2F/retinoblastoma zaangażowaną w regulację podziałów komórkowe [Pena i in. 2012].

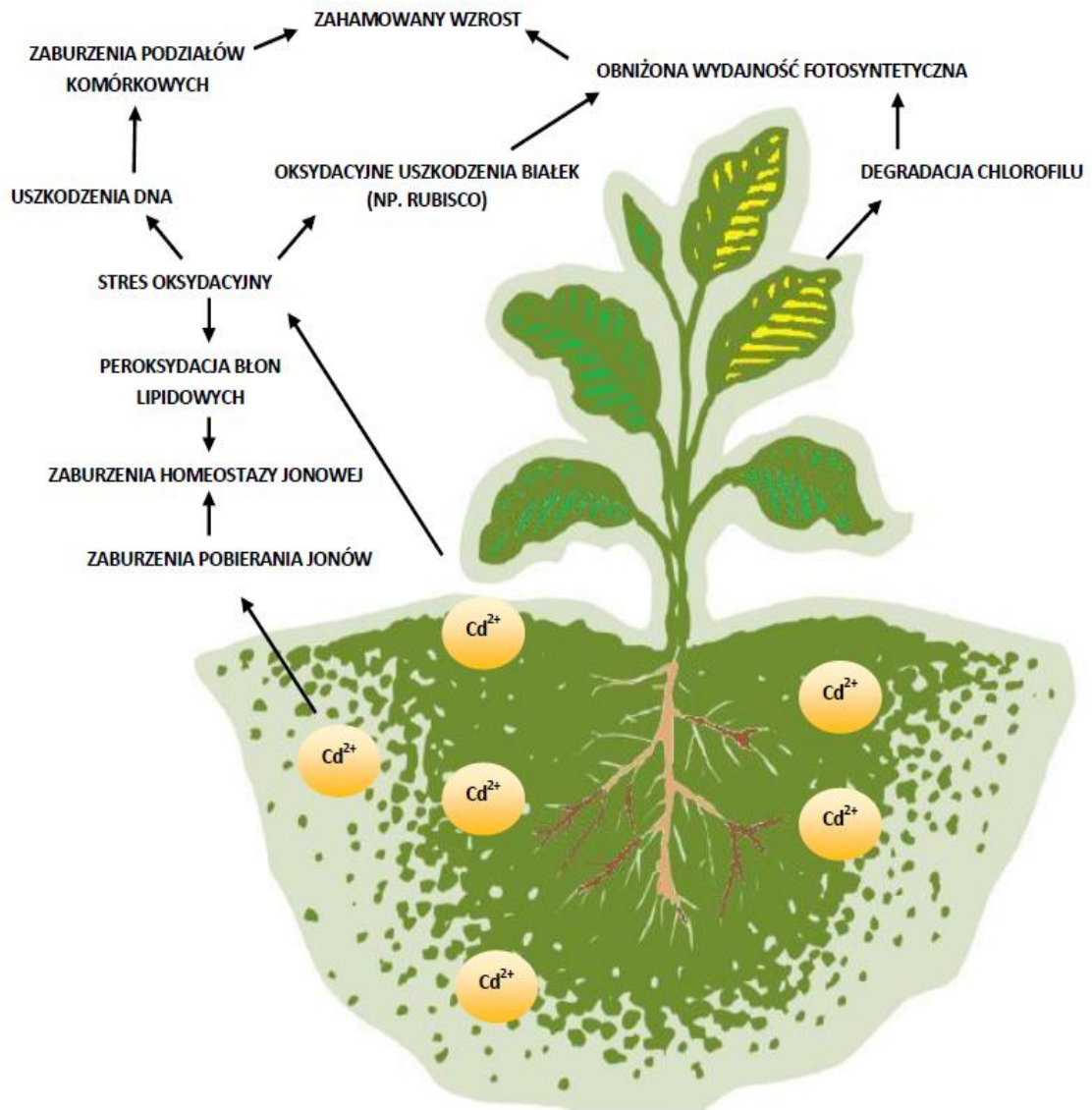
➤ **Molekularna mimikra jonów kadmu.**

WSTĘP

Jednym z mniej zbadanych mechanizmów toksyczności kadmu jest molekularna mimikra. Ze względu na podobieństwo fizyko-chemiczne do niektórych pierwiastków kadm, może zastępować je w cząsteczkach biologicznych. Zjawisko to jest dokładniej zbadane u zwierząt, u których molekularna mimikra kadmu prowadzi między innymi do zwiększonej produkcji RFT, nieprawidłowej aktywacji sygnalizacji Wnt/ β katenu, kalmoduliny i estrogenu oraz zaburzeń w neurotransmisji [Chmielowska-Bąk i in. 2013a]. W przypadku roślin konkurencja o miejsce w kanałach jonowych może prowadzić do zaburzeń w pobieraniu innych, niezbędnych jonów z podłoża. Postuluje się również, że hamujący wpływ Cd^{2+} na otwieranie aparatów szparkowych na światło, może wynikać z przenikania kadmu do cytozolu poprzez kanały wapniowe [Perfus-Barbeoch i in. 2002]. Ponadto molekularna mimikra kadmu może zaburzać procesy zależne od jonów wapnia. W doświadczeniach przeprowadzonych na rzodkiewce udowodniono, że kadm może zamieniać jony wapnia w cząsteczki kalmoduliny prowadząc do zmniejszenia jej aktywności [Rivetta i in. 1997].

Opisane mechanizmy toksyczności kadmu bardzo często są powiązane ze sobą. Dla przykładu stres oksydacyjny prowadzi do zmian w strukturze i przepuszczalności błon komórkowych, co skutkuje zaburzeniami w homeostazie jonowej. Nadmiar reaktywnych form tlenu powoduje również uszkodzenia białek i DNA, które mogą prowadzić do spadku wydajności fotosyntezy i zahamowania procesów podziału komórkowego. Spowolnienie podziałów komórkowych z kolei skutkuje zahamowaniem wzrostu roślin. Przykłady powiązań pomiędzy różnymi mechanizmami toksyczności kadmu zostały przedstawione na Ryc.1.

WSTĘP



Ryc.1: Przykład powiązań pomiędzy różnymi mechanizmami odpowiedzialnymi za toksyczność kadmu.

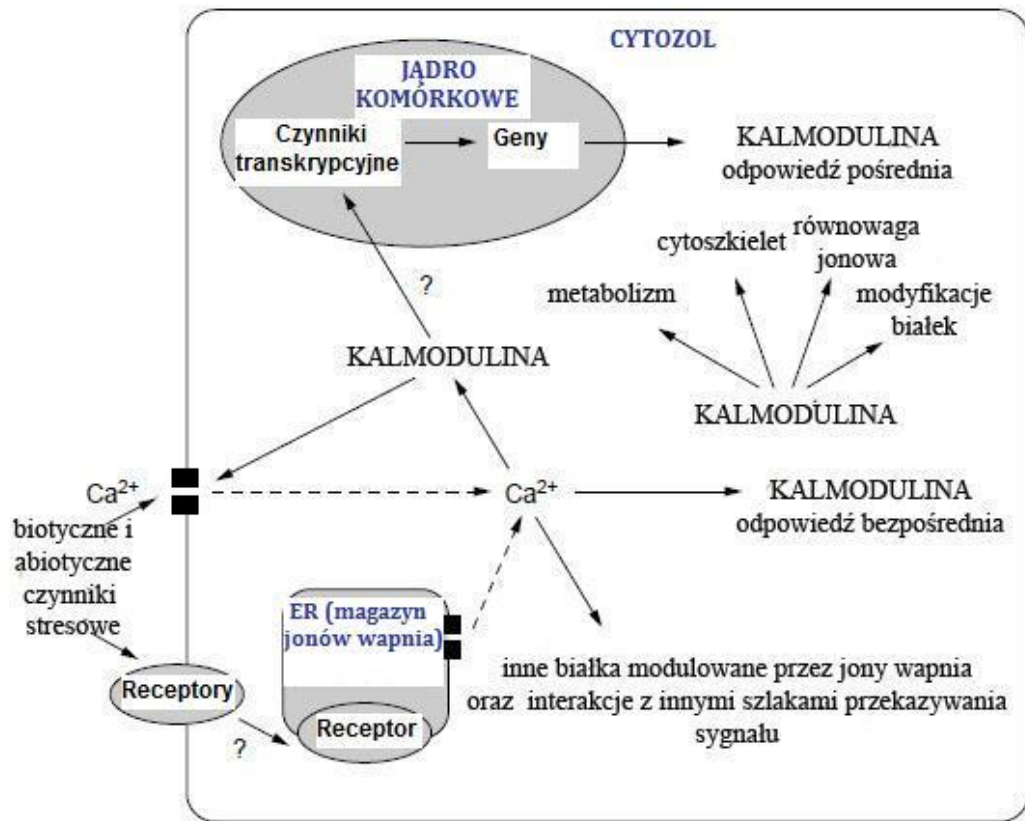
1.2 Elementy sygnalizacji komórkowej uruchamiane w odpowiedzi na działanie kadmu

Jedną z pierwszych reakcji organizmów na zmiany zachodzące w ich środowisku, w tym na obecność szkodliwych substancji takich jak kadm, jest uruchomienie sygnalizacji komórkowej. Aktywacja poszczególnych elementów sygnalnych prowadzi do przekazania informacji wewnątrz komórki, co skutkuje stymulacją lub represją ekspresji określonych genów, modulacją aktywności białek, zmianami w przepuszczalności kanałów jonowych i transporterów oraz

przekształceniami cytoszkieletu. Opisane zmiany umożliwiają przystosowanie się do nowych warunków. Sygnalizacja komórkowa składa się z ogromnej liczby powiązanych ze sobą elementów tworzących skomplikowane i jeszcze nie do końca poznane sieci sygnałowe. Dane literaturowe wskazują, że w przypadku roślin w przekazywanie sygnału o obecności kadmu w otoczeniu zaangażowana są jony wapnia, reaktywne formy tlenu, tlenek azotu, hormony roślinne, poliaminy, kaskady kinaz aktywowanych mitogenami, czynniki transkrypcyjne i mikroRNA. Dokładniejsza rola wymienionych elementów w odpowiedzi roślin na działanie kadmu została opisana w poszczególnych podrozdziałach.

1.2.1 Sygnalizacja za pośrednictwem jonów wapnia

Sygnalizacja za pośrednictwem jonów wapnia jest powiązana ze szlakiem fosfoinozitolowym. Aktywacja zlokalizowanej w błonie komórkowej fosfolipazy C katalizuje przekształcenie fosfoinozytolo-4,5-difosforanu (PIP_2) w 1,2-diacylglicerol (DAG) i inozytolo-1,4,5-trifosforan (IP_3). Inozytolo-1,4,5-trifosforan jest wtórnym przekaźnikiem komórkowym warunkującym otwieranie kanałów wapniowych w retikulum endoplazmatycznym, co prowadzi do uwalniania jonów wapnia do cytoplazmy. W cytoplazmie Ca^{2+} oddziałują z białkami sensorycznymi regulując liczne procesy komórkowe [Clapham 2007]. Jednym z najważniejszych białek uczestniczących w sygnalizacji za pośrednictwem jonów wapnia jest kalmodulina (CAM). Przyłączenie cząsteczek Ca^{2+} do kalmoduliny skutkuje zmianami w jej konformacji i aktywacją kolejnych elementów prowadzącą do zmian aktywności kinaz i fosfataz białkowych, przekształceniami cytoszkieletu, otwieraniem transporterów jonowych oraz modulacją ekspresji genów (Ryc.2). Wykazano, że CAM moduluje aktywność czynników transkrypcyjnych należących do rodzin HSF, CAMTA i WRKY [Hashimoto i Kudla 2011].



Ryc.2: Model udziału kalmoduliny w przekazywaniu sygnału wewnątrz komórek [Snedden i Fromm 1998, zmodyfikowany].

Roślinne białka sensoryczne wiążące się z jonami wapnia obejmują również białka podobne do kalmodulin (CML), kinazy białkowe zależne od Ca^{2+} oraz białka podobne do kalcyneuryny B (CBL) [Hashimoto i Kudla 2011]. Ze względu na zaangażowanie jonów wapnia w regulację wielu procesów komórkowych organizmy inwestują znaczna część energii w utrzymanie stałego poziomu Ca^{2+} w cytoplazmie, wynoszącego w optymalnych warunkach mniej niż 100 nM [Clapham 2007]. Poziom wolnych jonów wapnia może wzrastać w odpowiedzi na działanie różnych czynników stresowych, w tym kadmu.

Wzrost poziomu Ca^{2+} w cytoplazmie w odpowiedzi na działanie kadmu zaobserwowano w zawieszynie komórkowej tytoniu i korzeniach ryżu, przy czym odporna na metale odmiana ryżu charakteryzowała się wyższą akumulacją jonów wapnia. Warto zaznaczyć, że obserwowany wzrost poziomu Ca^{2+} następował bardzo szybko po zadziałaniu kadmu – w przypadku zawiesiny komórkowej tytoniu

WSTĘP

odnotowano go już po kilku minutach, zaś w korzeniach ryżu po 15 minutach działania CdCl_2 [Garnier i in. 2006, Olmos i in. 2003, Yeh i in. 2007]. Dalsze badania na zawieszynie komórkowej tytoniu wykazały, że akumulacja Ca^{2+} w cytoplazmie jest niezbędna do zależnego od kadmu wybuchu oksydacyjnego. Wyniki doświadczeń przeprowadzonych z użyciem inhibitorów fosfolipazy C i kalmoduliny sugerują, że kadm aktywuje PLC, co prowadzi do wzrostu poziomu inozytolo-3-fosforanu i otwierania zależnych od IP_3 kanałów wapniowych. Uwalniane jony wapnia są zaangażowane, najprawdopodobniej przy udziale kalmoduliny, w aktywację oksydazy NADPH katalizującej powstawanie anionorodnika ponadtlenkowego przekształconego następnie w nadtlenek wodoru [Garnier i in. 2006, Olmos i in. 2003]. Badania z zastosowaniem inhibitora kanałów wapniowych, LaCl_3 , sugerują, że Ca^{2+} pośredniczą w zależnej od kadmu akumulacji anionorodnika ponadtlenkowego także w korzeniach grochu [Rodriguez-Serrano i in. 2006]. Jony wapnia oraz kinazy zależne od jonów wapnia są również zaangażowane w stymulację kinaz aktywowanych mitogenami w korzeniach ryżu traktowanego roztowem kadmu [Yeh i in. 2007]. Pośrednich dowodów na udział jonów wapnia w przekazywaniu kadmowego sygnału dostarczają doświadczenia wykazujące, że Cd indukuje wzrost ekspresji białka podobnego do kalmoduliny w psiance czarnej i białka wiążącego jony wapnia HvC2d1 w jęczmieniu [Oulehadj i in. 2006, Xu i in. 2009]. Ekspozycja na kadm może jednak również prowadzić do zaburzeń w sygnalizacji za pośrednictwem jonów wapnia. W doświadczeniach przeprowadzanych na rzodkiewce pokazano, że jony kadmu mogą zamieniać jony wapniowe w kalmodulinie prowadząc do zahamowania jej aktywności [Rivetta i in. 1997].

1.2.2 Reaktywne formy tlenu

Akumulacja reaktywnych form tlenu (RFT) jest powszechną odpowiedzią na działanie kadmu zarówno w przypadku roślin jak i zwierząt [Hsu i Kao 2007, Kippler i in. 2012, Kopyra i Gwóźdź 2003, Lehotai i in. 2011, Pytharopoulou i in. 2011, Vestena i in. 2011, Wang i in. 2011]. Nadprodukcja RFT, do których zalicza się nadtlenek wodoru (H_2O_2), anionorodnik ponadtlenkowy (O_2^-), tlen singletowy (O_2^1) i rodnik hydroksylowy (HO^\cdot), skutkuje peroksydacją różnych cząsteczek biologicznych prowadzącą między innymi do uszkodzeń błon komórkowych,

WSTĘP

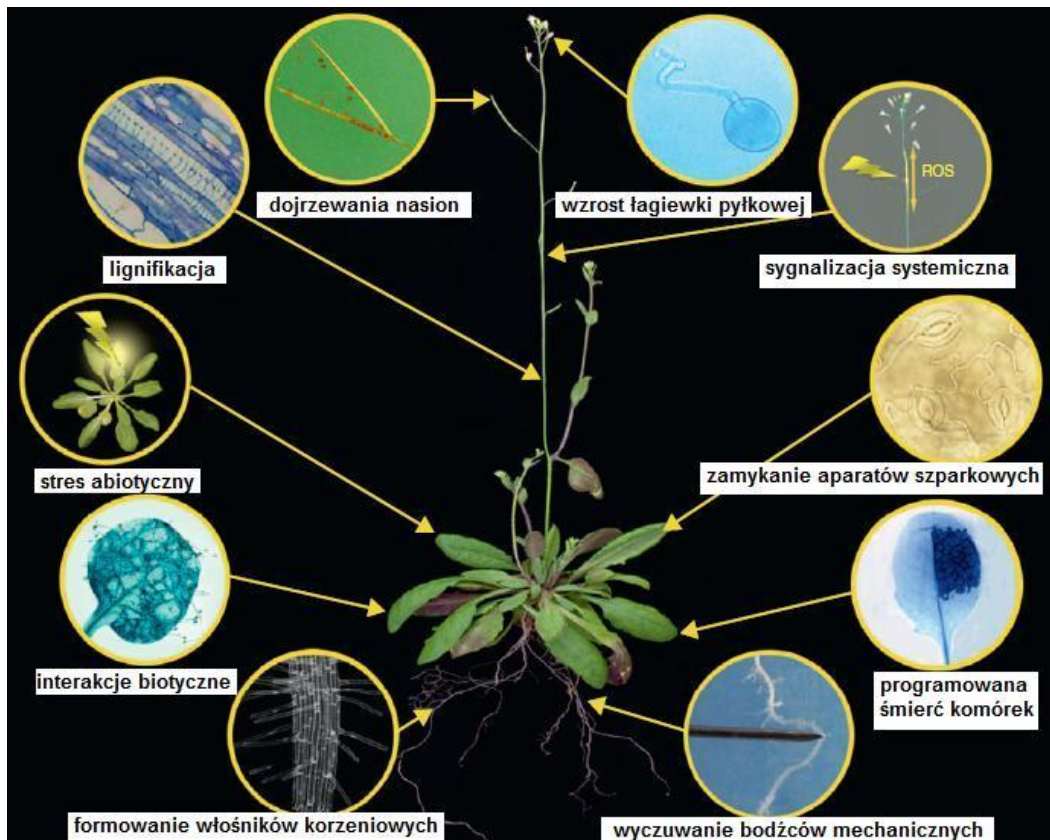
zahamowania aktywności enzymów oraz zwiększonej częstości mutacji DNA. Reaktywne formy tlenu mogą również pełnić funkcje sygnałowe i poprzez aktywację elementów szlaków przekazywani sygnałów przyczyniać się do nabywania przez rośliny odporności na działające czynniki stresowe [Bartosz 2003]. Postuluje się, że funkcje sygnałowe mogą pełnić także białka, które pod wpływem działania RFT uległy oksydacyjnym modyfikacją. Zmodyfikowane białka charakteryzują się większą specyficznością niż same reaktywne formy tlenu, ponieważ oprócz ogólnej informacji o stresie oksydacyjnym, przekazują również informacje o rodzaju nadproduktowanej cząsteczki RFT oraz organellach narażonych na stresujące warunki [Möller i Sweetlove 2010].

Obserwowana pod wpływem działania kadmu akumulacja reaktywnych form tlenu, może wynikać ze wzmożonej aktywności oksydazy NADPH, zaburzeń w funkcjonowaniu mitochondriów i chloroplastów, obniżenia aktywności systemu antyoksydacyjnego lub uwalniania z cząsteczek biologicznych metali o właściwościach oksydoredukcyjnych takich jak jony żelaza i miedzi [Casalino i in. 1997, Cho i in. 2012, Garnier i in. 2006, Gzyl i in. 2009, Romero-Puertas i in. 2007]. Badania przeprowadzone na zawieszynie komórkowej tytoniu wykazały, że zależny od kadmu wybuch oksydacyjny dzieli się na trzy fale. Najwcześniej, już w pierwszej godzinie działania kadmu, odnotowano akumulację nadtlenu wodoru zależną od wzrostu aktywności oksydazy NADPH. Tak jak opisano to już w rozdziale dotyczącym sygnalizacji za pośrednictwem jonów wapnia, stymulacja oksydazy NADPH jest uwarunkowana aktywacją fosfolipazy C, wzrostem produkcji IP_3 oraz uwalnianiem do cytoplazmy jonów wapnia. Zależność pomiędzy wzrostem poziomu IP_3 , a akumulacją nadtlenu wodoru w odpowiedzi na działanie kadmu wykazano również w roślinach ryżu [Garnier i in. 2006, Hsu i Kao 2007b]. Kolejnym źródłem RFT są mitochondria produkujące anionorodnik ponadtlenkowy. Na trzecią falę wybuchu oksydacyjnego składa się akumulacją peroksydowanych kwasów tłuszczowych [Garnier i in. 2006].

Liczne dane literaturowe wskazują, że istotną rolę w indukowanym kadmem stresie oksydacyjnym pełni oksydaza NADPH. Ten zlokalizowany w błonie komórkowej enzym katalizuje redukcję O_2 do $O_2^{\cdot -}$. Generowany przez oksydazę NADPH rodnik ponadtlenkowy oraz jego uprotonowana forma, rodnik wodoronadtlenkowy, mogą przenikać przez błonę komórkową i dyfundować na znaczne odległości do dalszych organelli. Anionorodnik ponadtlenkowy szybko, w wyniku spontanicznej dysmutacji lub przy udziale dysmutazy ponadtlenkowej, ulega

WSTĘP

przekształceniu w nadtlenek wodoru. Powstały H_2O_2 również, przynajmniej częściowo za pośrednictwem akwaporyn [Bienert i in. 2007], przedostaje się do wnętrza komórek. Obydwa typy reaktywnych form tlenu, $O_2^{\cdot-}$ i H_2O_2 , mogą utleniać różne związki biologiczne, zwłaszcza białka zawierające grupy tiolowe. Ponadto poprzez reakcję Fentona i Habera-Weissa uczestniczą w generowaniu jednej z najbardziej reaktywnych form tlenu, rodnika hydroksylogowego [Bartosz 2003]. Wykazano, że oksydaza NADPH, poprzez produkcję $O_2^{\cdot-}$ i pośrednio H_2O_2 , uczestniczy w procesach lignifikacji, formowania korzeni, dojrzewania owoców, zamykania aparatów szparkowych, a także odpowiedzi na różne czynniki stresowe, w tym w reakcji nadwrażliwości i procesie programowanej śmierci (Ryc.3). Aktywność tego enzymu jest regulowana przez fosforylację, jony wapnia, kinazy aktywowane mitogenami, kalmodulinę, generowany przez fosfolipazę D kwas fosfatydowy oraz małe białka wiążące GTP [Marino i in. 2012, Suzuki i in. 2011].



Ryc.3: Procesy, w które zaangażowana jest oksydaza NADPH [Suzuki i in. 2011, zmodyfikowany].

Aktywację oksydazy NADPH pod wpływem kadmu zaobserwowano w peroksymalnych i mitochondrialnych frakcji uzyskanych z osi zarodkowych grochu, oraz w korzeniach ryżu i łubinu [Arasimowicz-Jelonek i in. 2012, Smiri 2011, Yeh i in. 2007]. Ponadto badania z zastosowaniem inhibitorów oksydazy NADPH sugerują, że enzym ten jest źródłem reaktywnych form tlenu w roślinach łubinu, grochu, rzodkiewnika, ryżu i zawieszinie komórkowej tytoniu poddanych działaniu kadmu [Arasimowicz-Jelonek i in. 2012, Cho i in. 2012, Maksymiec i Krupa 2006, Olmos i in. 2003, Rodríguez-Serrano i in. 2006]. Reaktywne formy tlenu generowane w wyniku zwiększonej aktywności oksydazy NADPH uczestniczą w zależnych od Cd procesach zahamowania wzrostu korzeni i programowanej śmierci komórek [Cho i in. 2012, Maksymiec i Krupa 2006, Yakimova i in. 2006].

Wykazano, że akumulowane w wyniku działania kadmu RFT pośredniczą w indukcji kinaz aktywowanych mitogenami, MPK3 i MPK6, w rzodkiewniku i ryżu [Liu i in. 2010, Yeh i in. 2007]. Nadtlenek wodoru reguluje ekspresję szeregu genów powiązanych z sygnalizacją za pośrednictwem auksyn i regulacją cyklu komórkowego w roślinach ryżu poddanych działaniu $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ [Zhao i in. 2012b].

1.2.3 Tlenek azotu

W 1992 roku prestiżowe czasopismo naukowe „Science” ogłosiło tlenek azotu cząsteczką roku. Tytuł ten zawdzięcza swojemu wszechstronnemu działaniu. W organizmach zwierzęcych bierze udział w regulacji ciśnienia krwi, procesach odpornościowych, embriogenezie, regulacji podziałów komórkowych, działa także jako neurotransmitter [Hasanuzzaman i in. 2010, Moncada i Higgs 2006]. W przypadku roślin odgrywa rolę między innymi w fotosyntezie, wymianie gazowej, programowanej śmierci komórek, procesach kiełkowania, kwitnienia, starzenia oraz w odpowiedzi roślin na różne czynniki stresowe [Hasanuzzaman i in. 2010, Krasylenko i in. 2010]. Tlenek azotu może uczestniczyć w sygnalizacji komórkowej poprzez bezpośrednią regulację aktywności białek w wyniku reakcji S-nitrozylacji i nitrotyrozylacji oraz pośrednio poprzez modyfikację innych elementów szlaków przekazywania sygnałów takich jak sygnalizacja za pośrednictwem jonów wapnia, cGMP, cADPR, reaktywnych form tlenu i fitohormonów oraz kaskady kinaz aktywowanych mitogenami i [Gill i in. 2013, Krasylenko i in. 2010, Yun i in. 2011].

WSTĘP

Sygnalizacja za pośrednictwem NO jest również powiązana z metabolizmem poliamin (PA). Donor tlenu azotu, nitroprusydek sodu (SNP), wpływa na poziom PA w lucernie i ogórku poddanym stresowi solnemu, zaś traktowanie poliaminami moduluje poziom tlenu azotu w roślinach rzodkiewnika i ogórka narażonego na działanie suszy [Arasimowicz-Jelonek i in. 2009, Fan i in. 2013, Filippou i in. 2013, Wimalasekera i in. 2011]. Mechanizm generowania tlenu azotu pod wpływem działania PA nie jest do końca poznany. Wykazano, że poliaminy mogą regulować aktywność jednego z enzymów zaangażowanych w produkcję tlenu azotu, reduktazy azotanowej [Athwal i in. 2002, Rosales i in. 2012]. Sugeruje się również, że NO może powstawać w wyniku degradacji PA katalizowanej przez diaminooksydazę (DAO), poliaminooksydazę (PAO) lub inny, do tej pory niezidentyfikowany enzym [Wimalasekera i in. 2011].

Informacje dotyczące akumulacji tlenu azotu w roślinach poddanych działaniu kadmu nie są jednoznaczne. Wydaje się, że krótkotrwałe działanie kadmu powoduje wzrost poziomu tlenu azotu, podczas gdy przedłużający się stres kadmowy skutkuje obniżeniem poziomu tej cząsteczki sygnałnej (tabela 1). Pojawiają się jednak doniesienia zarówno o akumulacji NO po długotrwałym działaniu kadmu [Mahmood i in. 2009], jak i o spadku poziomu tlenu azotu zaledwie po 24 godzinach traktowania roztworami tego metalu ciężkiego [Xiong i in. 2009]. Również informacje dotyczące roli tlenu azotu w nabywaniu przez rośliny odporności na kadm nie są jednoznaczne. Wykazano, że tlenek azotu zwiększa pobieranie kadmu, najprawdopodobniej poprzez stymulację ekspresji genów *IRT1*, *FRO2* i *FIT* powiązanych z transportem żelaza [Besson-Bard i in. 2009]. Stymulujący wpływ NO na pobieranie kadmu potwierdzają również doświadczenia wykazujące, że traktowanie zmiataczem tlenu azotu, PTIO, zmniejsza akumulację Cd w roślinach łubinu, ryżu i psianki czarnej [Arasimowicz-Jelonek i in. 2012, Chang i in. 2012, Xu i in. 2011]. Zwiększone pobieranie kadmu jest skorelowane z nasileniem toksycznych symptomów wywołanych przez ten metal ciężki. Siewki łubinu traktowane kadmem i PTIO charakteryzowały się nie tylko obniżoną zawartością kadmu, ale również wyższym stopniem przeżywalności komórek w porównaniu z siewkami traktowanymi tylko Cd [Arasimowicz-Jelonek i in. 2012]. Z kolei traktowanie komórek zawiesiny tytoniu donorem tlenu azotu, SNP, skutkowało zwiększoną akumulacją Cd w komórkach powiązaną z przyspieszonym procesem programowanej śmierci [Ma i in. 2010]. Powiązanie działania tlenu azotu z inicjacją PCD zaobserwowano również w zawieszynie komórkowej rzodkiewnika oraz roślinach

WSTĘP

rzodkiewnika i łubinu. W przypadku roślin rzodkiewnika wykazano, że tlenek azotu pośredniczy w aktywacji kinazy aktywowanej mitogenami MPK6, która z kolei stymuluje proteazę podobną do kaspazy-3 niezbędną do rozpoczęcia PCD [Arasimowicz-Jelonek i in. 2012, De Michele i in. 2009, Ye i in. 2013].

Tabela 1: Wpływ kadmu na poziom tlenu azotu w roślinach.

Gatunek	Wywoływany efekt	Stężenie kadmu	Okres traktowania kadmem	Źródło
Zawiesina komórkowa topoli białej (<i>Populus alba</i>)	↑	150 μM	30 minut	Balestrazzi i in. 2009
Linia komórkowa tytoniu BY-2	↑	150 μM	2, 4, 6, 8 i 12 godzin	Ma i in. 2010
Korzenie pszenicy (<i>Triticum aestivum</i>)	↑	10 μM	3 godziny	Mahmood i in. 2009
Korzenie rzodkiewnika (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	↑	200 μM	7 godzin	Besson-Bard i in. 2009
Korzenie łubinu żółtego (<i>Lupinus luteus</i>)	↑	89 μM	12 i 24 godziny	Arasimowicz-Jelonek i in. 2012
Korzenie jęczmienia (<i>Hordeum vulgare</i>)	↑	1 mM	24 godziny	Valentovičová i in. 2010
Korzenie ryżu (<i>Oryza sativa</i>)	↓	100 μM	24 godziny	Xiong i in. 2009
Korzenie grochu (<i>Pisum sativum</i>)	↑	100 μM	24 i 48 godzin	Lehotai i in. 2011
Zawiesina komórkowa rzodkiewnika	↑	150 μM	48 godzin	De Michele i in. 2009
Zawiesina komórkowa soi (<i>Glycine max</i>)	↑	4 μM i 7 μM	72 godziny	Kopyra i in. 2006
Korzenie pszenicy (<i>Triticum aestivum</i>)	↑	100 μM	5 dni	Groppa i in. 2008
Liście grochu (<i>Pisum sativum</i>)	↓	50 μM	14 dni	Rodriguez-Serrano i in. 2009
Korzenie grochu (<i>Pisum sativum</i>)	↓	50 μM	14 dni	Rodriguez-Serrano i in. 2006
Liście grochu (<i>Pisum sativum</i>)	↓	50 μM	14 dni	Barroso i in. 2006
Korzenie pszenicy (<i>Triticum aestivum</i>)	↑	1 μM	28 dni	Mahmood i in. 2009

Z drugiej jednak strony istnieją doniesienia świadczące, o tym, że tlenek azotu może zwiększać odporność roślin na stres kadmowy. Wykazano, że donor tlenu azotu, SNP, stymuluje aktywność enzymów antyoksydacyjnych i obniża poziom reaktywnych form tlenu w roślinach poddanych działaniu kadmu. Traktowanie SNP skutkowało również mniejszą degradacją chlorofilu, obniżeniem stężenia MDA i zmniejszoną zawartością uszkodzonych oksydacyjnie białek [Chen i in. 2010, Kopyra i in. 2006]. Tlenek azotu wpływał na zwiększenie zawartości pektyn i hemiceluloz w ścianach komórkowych ryżu. Związki te mogą uczestniczyć w immobilizacji kadmu i w ten sposób zmniejszać jego toksyczne oddziaływanie [Xiong i in. 2009].

1.2.4 Hormony roślinne

Hormony roślinne to endogenne substancje regulujące większość procesów zachodzących w roślinach [Lewak 2012]. W przypadku odpowiedzi na działanie czynników stresowych mogą one odgrywać dwojaką rolę. Z jednej strony, jako cząsteczki sygnałowe, mogą być zaangażowane w przekazywanie sygnału o działaniu określonego czynnika stresowego. Z drugiej strony warunki stresowe mogą modulować poziom i aktywność hormonów, co wpływa na funkcjonowanie całej rośliny. Dane literaturowe wskazują, że spośród hormonów roślinnych najistotniejszą rolę w odpowiedzi roślin na działanie kadmu odgrywają etylen, kwas abscysynowy, salicylowy i jasmonowy oraz auksyny.

1.2.4.1 Etylen

Pierwsze wzmianki na temat biologicznych funkcji etylenu można odnaleźć w literaturze naukowej pochodzącej z połowy XIX wieku. W 1901 roku rosyjski naukowiec Neljubow zainteresował się przyczyną zaburzeń wzrostu siewek grochu rosnących w pobliżu lamp gazowych. Odkrył, że aktywnym biologicznie składnikiem gazu lampowego jest etylen. Doświadczenie Neljubowa zapoczątkowało serię badań dotyczących wpływu etylenu na rośliny. Wykazano, że ten prosty związek chemiczny wywołuje zaburzenia wzrostu siewek i kwiatów, wpływa na zmianę koloru i szybkość dojrzewania owoców [Joo i Kim 2007, Watada 1986]. Obecnie wiadomo, że etylen kontroluje również procesy kiełkowania nasion, wzrostu elongacyjnego hipokotyli, formowania włósników korzeniowych, opadania liści, apoptozy oraz odpowiedzi roślin na działanie szeregu biotycznych i abiotycznych czynników stresowych. Ze względu na

WSTĘP

udział w odpowiedzi roślin na szereg czynników stresowych etylen często nazywany jest hormonem stresu [Le i in. 2005, Locke i in. 2000, Lei i in. 2003, Nascimiento 2003, Zaid i in. 2003].

Istnieją dowody na to, że hormon ten odgrywa ważną rolę w reakcji roślin na działanie kadmu. Wzrost biosyntezy etylenu zaobserwowano w roślinach rzodkiewnika, grochu i kapusty sitowej traktowanych roztworami kadmu [Arteca i Arteca 2007, Masood i in. 2012, Rodriguez-Serrano i in. 2006]. Masood i in. wykazał, że zależna od kadmu nadprodukcja etylenu jest skorelowana ze wzrostem ekspresji genu kodującego kluczowy enzym szlaku biosyntezy tego hormonu - syntazę kwasu 1-aminocyklopropano-1-karboksyłowego (ACS) [Masood i in. 2012]. Tak jak w przypadku tlenku azotu, rola etylenu w odpowiedzi roślin na działanie kadmu nie jest jednoznaczna. Sugeruje się, że etylen może być odpowiedzialny za rozwój toksycznych symptomów wywoływanych przez ten metal ciężki. Wykazano, że w ten hormon jest zaangażowany w zhamowanie wzrostu, produkcję reaktywnych form tlenu oraz aktywację programowanej śmierci komórek w roślinach narażonych na stres kadmowy [Liu i in. 2008b, Maksymiec 2011, Masood i in. 2012, Yakimova i in. 2006]. Z drugiej jednak strony potraktowanie roślin kapusty sitowej donorem etylenu, etefonem, łagodziło hamujący wpływ kadmu na wydajność fotosyntetyczną i aktywność kluczowego enzymu fotosyntezy – Rubisco, a także stymulowało system antyoksydacyjny poprzez zwiększenie zawartości glutationu (GSH) i aktywności reduktazy glutationowej (GR) [Masood i in. 2012]. Informacji na temat funkcji pełnionych przez etylen podczas stresu kadmowego dostarczyły badania przeprowadzane na mutantach niewrażliwych na działanie tego hormonu. Doświadczenia mające na celu porównanie odpowiedzi pomidora odmiany Micro-Tom (MT) z odmianą Never ripe (NR) charakteryzującą się zmniejszoną wrażliwością na etylen pokazały, że obydwie odmiany wykazywały podobny poziom kadmu w tkankach, stopień zahamowania wzrostu oraz wzór odpowiedzi enzymów antyoksydacyjnych w liściach. Zaobserwowano wzrost aktywności katalazy (CAT), reduktazy glutationowej (GR), peroksydazy askorbinianowej (APX) i peroksydazy gwajakolowej (GPOX), przy jednoczesnym spadku aktywności dysmutazy ponadtlenkowej (SOD). Większość enzymów (CAT, GR, GPOX) wykazywała również zwiększoną aktywność w korzeniach, jednakże wzrost ten był mniejszy u odmiany NR. Odmiana ta charakteryzowała się również wyższym poziomem nadtlenu wodoru w owocach oraz mniejszym stopniem degradacji chlorofilu [Monteiro i in. 2011].

1.2.4.2 Kwas salicylowy i jasmonowy

Kwas salicylowy (SA) to hormon roślinny biorący udział w regulacji licznych procesów takich jak kiełkowanie, wzrost, kwitnienie i glikoliza. W przypadku warunków stresowych najlepiej poznano rolę SA w odpowiedzi na stresy biotyczne. Wykazano, że uczestniczy on w nabywaniu odporności na wirusy, bakterie i grzyby, indukcji systemicznej odporności nabytej (SAR) i reakcji nadwrażliwości, hamowaniu replikacji i rozprzestrzeniania się wirusów oraz stymulacji ekspresji białek powiązanych z patogenezą (białek PR). Oprócz udziału w odpowiedzi na stresy biotyczne, SA odgrywa również rolę w reakcji na abiotyczne czynniki stresowe takie jak stres solny, temperaturowy, wodny, promieniowanie UV i ekspozycje na działanie metali ciężkich. Ten fenolowy związek wpływa nie tylko na rośliny, ale również inne organizmy wliczając w to ludzi. Dzięki swoim właściwościom zyskał ogromną popularność w przemyśle farmaceutycznym. Już w roku 1878 był najczęściej sprzedawanym lekiem w Niemczech [Hayat i in. 2010]. Również aktywność kwasu jasmonowego (JA) jest silnie związana z odpowiedzią roślin na atak patogenów. Hormon ten stymuluje aktywność białek PR, defensyn i fitoaleksyn, a jego metylowa pochodna (MeJA), pośredniczy w przekazywaniu sygnału pomiędzy roślinami, przyczyniając się do uruchamiania reakcji obronnych. Szlaki syntezy i przekazywania sygnału za pośrednictwem JA są powiązane z sygnalizacją aktywowaną przez jony wapnia, tlenek azotu i reaktywne formy tlenu [Hu i in. 2009].

Akumulacja kwasu salicylowego i jasmonowego jest częstą reakcją roślin na działanie kadmu. Podwyższony poziom SA w odpowiedzi na działanie tego metalu ciężkiego zaobserwowano w roślinach grochu, kukurydzy, rzodkiewnika i halofitu *Kosteletzkya virginica*, a indukcję JA w grochu, rzodkiewniku i fasolce szparagowej [Han i in. 2013, Krantev i in. 2008, Maksymiec i in. 2005, Rodríguez-Serrano i in. 2006, Zawoznik i in. 2007]. Kwas salicylowy jest zaangażowany w regulację poziomu reaktywnych form tlenu w roślinach poddanych działaniu kadmu, przy czym sugeruje się, że SA indukuje produkcję RFT, które z kolei stymulują system antyoksydacyjny. Badania przeprowadzone na ryżu wykazały, że kwas salicylowy pośredniczy w aktywacji oksydazy NADPH i produkcji H_2O_2 niezbędnej do indukcji aktywności enzymów antyoksydacyjnych [Chao i in. 2010]. Stymulujący wpływ SA na system antyoksydacyjny powiązany z osłabieniem zależnego od kadmu stresu oksydacyjnego wykazano również w roślinach kukurydzy, ryżu, bobu i fasoli mung [Krantev i in. 2008,

WSTĘP

Panda i Patra 2007, Zhang i in. 2011]. Kwas salicylowy najprawdopodobniej uruchamia także inne mechanizmy wymiatające RFT – w kapuście sitowej poddanej działaniu kadmu obniżeniu poziomu nadtlenu wodoru w odpowiedzi na działanie SA towarzyszyła zahamowana aktywność enzymów antyoksydacyjnych [Ahmad i in. 2011]. Co ciekawe mutanty rzodkiewnika charakteryzujące się obniżoną produkcją kwasu salicylowego, wykazywały obniżony poziom nadtlenu wodoru i peroksydacji lipidów w odpowiedzi na działanie kadmu. Ponadto w odróżnieniu od roślin typu dzikiego, rośliny zmutowane charakteryzowały się zwiększoną aktywnością peroksydazy gwajakolowej i katalazy oraz słabszą redukcją aktywności innych enzymów antyoksydacyjnych [Zawoznik i in. 2007]. Hormon ten pełni również funkcje ochronne w stosunku do systemu fotosyntetycznego w roślinach narażonych na działanie kadmu. Rośliny grochu, kukurydzy i pszenicy traktowane SA, a następnie poddane działaniu Cd charakteryzowały się większą zawartością chlorofilu i wyższą aktywnością enzymów fotosyntetycznych w porównaniu do roślin traktowanych tylko kadmem [Krantev i in. 2008, Moussa and El-Gamal 2010, Popova i in. 2009]. Jednakże w roślinach rącznika pospolitego narażonego na działanie tego metalu, kwas salicylowy zaostrzał toksyczne symptomy, co wyrażało się silniejszym zahamowaniem wzrostu i obniżeniem parametrów fotosyntetycznych [Liu i in. 2011]. Powyższe przykłady świadczą o tym, że rola kwasu salicylowego w odpowiedzi na stres kadmowy nie jest jednoznaczna i może zależeć od stosowanego stężenia i badanego gatunku rośliny.

W przypadku kwasu jasmonowego sugeruje się, że niższe stężenia pełnią funkcje ochronne, podczas gdy wyższe mogą indukować zmiany typowe dla działania metali ciężkich, takie jak zahamowanie wzrostu, degradacja chlorofilu i obniżenie wydajności fotosyntetycznej [Maksymiec i Krupa 2002, Noriega i in. 2012]. Kwas jasmonowy może również uczestniczyć w regulacji poziomu RFT. Wykazano, że hormon ten pośredniczy w produkcji reaktywnych form tlenu w roślinach rzodkiewnika traktowanych $CdSO_4$ [Maksymiec i Krupa 2006].

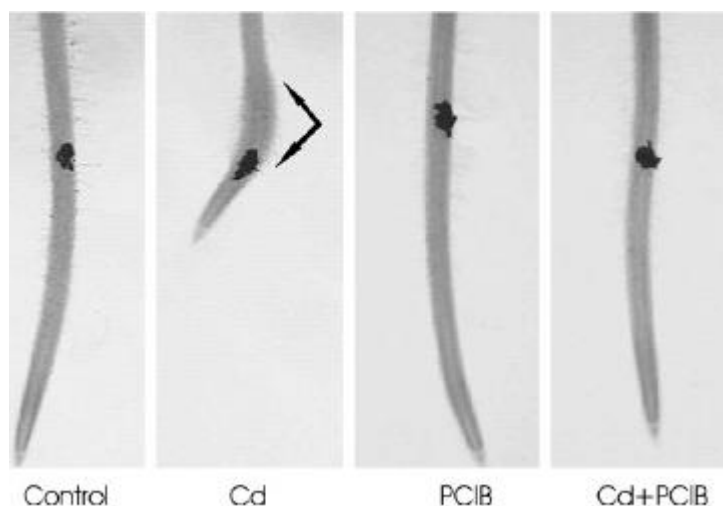
1.2.4.3 Kwas abscysynowy

Ze względu na udział kwasu abscysynowego (ABA) w odpowiedzi roślin na niekorzystne warunki środowiskowe, hormon ten jest tak jak i etylen, nazywany jest hormonem stresu. Najlepiej poznano rolę ABA w odpowiedzi roślin na susze i stres osmotyczny, jednakże wiadomo, że uczestniczy on również w reakcji na przechłodzenie, ekspozycje na metale ciężkie i stesy biotyczne. Podczas warunków stresowych ABA jest zaangażowany między innymi w zamykanie aparatów szparkowych, regulację ekspresji genów za pośrednictwem czynników transkrypcyjnych należących do rodzin AREB, ABI i MYB oraz modyfikacje epigenetyczne [Chinnusamy i in. 2008, Lee i Luan 2012, Tuteja 2007].

Dane literaturowe świadczą o tym, że kwas abscysynowy uczestniczy również w odpowiedzi roślin na działanie kadmu. Zaobserwowano wzrost poziomu ABA w odpowiedzi na ekspozycję na Cd w roślinach ziemniaka, haloficie *Kosteletzkya virginica* oraz dwóch odmianach ryżu, przy czym obserwowana indukcja była silniejsza w odmianie odpornej na ten metal [Han i in. 2013, Hsu i Kao 2003, Stroński i in. 2013]. Egzogenne podanie ABA skutkowało zwiększoną tolerancją na kadm i zmniejszonym pobieraniem tego metalu [Hsu i Kao 2003]. Kolejnych dowodów na ochronne funkcje pełnione przez kwas abscysynowy podczas stresu kadmowego dostarczyły badania porównujące odpowiedź na kadm mutantów rzodkiewnika charakteryzującymi się zaburzeniami w syntezie ABA lub zmniejszoną wrażliwością na ten hormon z roślinami typu dzikiego. Przeprowadzone doświadczenia wykazały, że mutanty były mniej odporne na kadm, co objawiało się zmniejszonym procentem kiełkowania oraz obniżoną masą roślin [Sharma i Kumar 2002]. W doświadczeniach przeprowadzonych na ziemniaku wykazano, że ABA pośredniczy w zależnej od kadmu indukcji genów kodujących białka powiązane z syntezą fitochelatyn [Stroński i in. 2013]. Przytoczone powyżej fakty sugerują, że kwas abscysynowy może być ważnym, chociaż jeszcze słabo poznanym elementem uczestniczącym w przekazywaniu sygnału podczas stresu kadmowego.

1.2.4.4 Auksyny

Auksyny, do których należą związki indolowe takie jak kwas indolilo-3-octowy (IAA) oraz rzadziej występujące związki nie indolowe np. kwas fenylooctowy, były pierwszymi odkrytymi hormonami roślinnymi. Doświadczenia z ich udziałem przeprowadzał już w 1880 roku Karol Darwin [Lewak 2012, Woodward i Bartle 2005]. Ze względu na fakt, że auksyny odgrywają kluczową rolę przy regulacji procesów wzrostowych oraz formowania korzeni, postuluje się, że zależne od działania kadmu zahamowanie wzrostu korzeni oraz zmiany w ich strukturze mogą być powiązane ze zmianami metabolizmu tych hormonów. Rzeczywiście, w badaniach przeprowadzonych na jęczmieniu wykazano, że przy niskich stężeniach kadmu, inhibitor IAA niwelował zależne od kadmu zahamowanie wzrostu i pogrubienie korzeni oraz akumulację H_2O_2 (Ryc.4) [Tamás i in. 2012].



Ryc.4: Wpływ inhibitora kwasu indoliloctowego (IAA) na morfologię korzeni jęczmienia. Control - kontrola, Cd - kadm, PCIB – kwas p-chlorofenyloksyizobutyłowy, inhibitor sygnalizacji za pośrednictwem auksyn [Tamás i in. 2012].

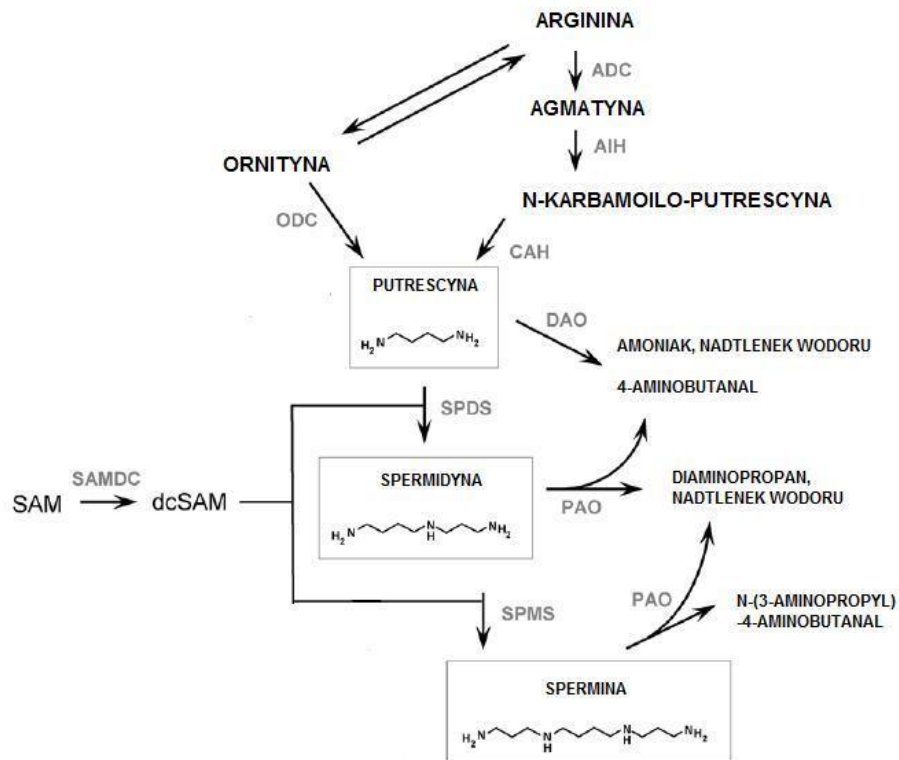
Ponadto, w roślinach ryżu, rzodkiewnika, topoli i halofita *Kosteletzkya virginica* poddanych działaniu kadmu zaobserwowano zmiany w poziomie i redystrybucji IAA. Jednakże, należy zauważyć, że nie wykazano jednoznacznej tendencji opisanych zmian - zależnie od gatunku, stosowanego stężenia i czasu ekspozycji kadm powodował spadek lub wzrost zawartości kwasu indolilo-3-ocowego [Elobeid 2012, Han i in. 2013, Hu i in. 2013, Vitti i in. 2013, Zhao i in. 2012]. Modulacja poziomu IAA może wynikać z wpływu kadmu na ekspresję szeregu genów powiązanych z metabolizmem auksyn [Hu i in. 2013, Zhao i in. 2013] lub ze zwiększonej aktywności enzymów uczestniczących w inaktywacji i degradacji IAA [Elobeid 2012, Hu i in. 2013].

1.2.5 Sygnalne funkcje poliamin

Poliaminy (PA) to występujące zarówno w eukariotycznych jak i prokariotycznych organizmach związki organiczne zawierające zmienną liczbę grup aminowych: dwie (putrescyna, kadaweryna), trzy (spermidyna) lub cztery (spermina, termospermina). W fizjologicznym pH obdarzone są dodatnim ładunkiem, co umożliwia im łączenia się z ujemnie naładowanymi cząsteczkami biologicznymi takimi jak DNA, RNA, białka i fosfolipidy. O tym jak ważne funkcje pełnią w różnych organizmach świadczy fakt, że pozbawione przy pomocy metod chemicznych lub genetycznych poliamin drożdże, pierwotniaki i rośliny umierały. W roślinach poliaminy są zaangażowane w regulację takich procesów jak embriogeneza, organogeneza, rozwój kwiatów, starzenie się liści, dojrzewanie owoców oraz odpowiedź na biotyczne i abiotyczne czynniki stresowe [Groppa i in. 2008, Alcázar i in. 2010]. Najpowszechniej występującymi poliaminami w organizmach są putrescyna (Put), spermidyna (Spd) i spermina (Spm). Na poziom wolnych PA mają wpływ szybkość ich syntezy, degradacji, a także tworzenie koniugatów z innymi cząsteczkami. Schemat syntezy i degradacji poliamin został przedstawiony na Ryc.5. Putrescyna może być syntetyzowana z ornityny przy udziale dekarboksylazy ornityny (ODC) lub z argininy przy udziale dekarboksylazy argininy (ADC), przy czym drugi opisany szlak syntezy jest specyficzny dla roślin i bakterii. Putrescyna może następnie, przy udziale syntazy spermidyny (SPDS), zostać przekształcona w Spd. Spermidyna zaś służy jako substrat do syntezy Spm w reakcji katalizowanej przez syntazę sperminy (SPMS). W obydwu opisanych reakcjach do Put lub Spd dołączana jest grupa aminopropylowa przenoszona

WSTĘP

z dekarboksylowanej S-adenozynometioniny (dcSAMDC). Główne enzymy uczestniczące w degradacji PA to oksydaza diaminowa (DAO) degradująca Put i oksydaza poliaminowa (PAO) uczestnicząca w katabolizmie Spd i Spm. Warto zauważyć, że jednym z produktów degradacji poliamin jest nadtlenek wodoru [Alcázar i in. 2010]. Opisane szlaki metabolizmu PA są powiązane ze szlakami biosyntezy etylenu, nadtlenu wodoru i tlenku azotu. Związki te mogą więc stanowić istotny element integrujący różne szlaki sygnalizacyjne [Alcázar i in. 2010, Groppa i Benavides 2008]. Wzajemne powiązania pomiędzy PA i NO zostały dokładniej opisane w podrozdziale dotyczącym funkcji sygnalnych tlenku azotu (1.2.3).



Ryc.5: Szlaki syntezy i degradacji putrescyny, spermidyny i sperminy. ADC- dekarboksylaza argininy, AIH – iminohydrolaza agmatyny, CAH – hydrolaza N-karbomoilo-putrescyny, ODC- dekarboksylaza ornityny, SAM- S-adenozynometionina, dcSAM – dekarboksylowana S-adenozynometionina, SAMDC – dekarboksylaza S-adenozynometioniny, DAO – oksydaza diaminowa, PAO – oksydaza poliaminowa. Przygotowany na podstawie Alcázar i in. 2010, Carbonell i Blázquez 2009.

WSTĘP

Poliaminy występują w wolnej formie, albo w postaci koniugatów z małymi cząsteczkami np. kwasem fenolowym lub makromolekułami takimi jak białka, przy czym sugeruje się, że skoniugowane PA mogą pełnić ochronne funkcje poprzez stabilizowanie cząsteczek biologicznych [Liu i in. 2007, Yang i in. 2010].

Wpływ kadmu na poziom poszczególnych poliamin w roślinach zależy od badanego gatunku, stosowanego stężenia Cd oraz czasu ekspozycji. Traktowanie przez trzy tygodnie roztworem kadmu o stężeniu 50 μM powodowało wzrost zawartości Put, Spd i Spm w korzeniach wierzby, ale w tych samych warunkach doświadczalnych w korzeniach topoli wzrastał poziom tylko Put [Zacchini i in. 2011]. Wzrost zawartości Put, zarówno w wolnej jak i skoniugowanej postaci, w odpowiedzi na działanie Cd zaobserwowano również w wodnej bylinie, rdestnicy kędzierzawej. W tym przypadku ekspozycja na Cd prowadziła jednak równocześnie do spadku poziomu Spd i Spm, powiązanego ze wzrostem aktywności PAO [Yang 2010]. Podobną tendencję zaobserwowano w korzeniach roślin soi traktowanych stosunkowo niskim stężeniem kadmu (50 μM). Jednakże ekspozycja roślin na wyższe stężenie (200 μM) prowadziła do spadku zawartości wszystkich badanych poliamin, Put, Spm i Spd [Balestrasse 2005]. Modulujący wpływ kadmu na zawartość poliamin zaobserwowano również w pszenicy, słoneczniku, fasoli mung, zawieszynie komórkowej tytoniu i goździków [Choudhary i Singh 2000, Groppa i in. 2003, Kuthanová i in. 2004, Serrano-Martínez i Casas 2011].

Sugeruje się, że podczas warunków stresowych poliaminy pełnią szereg funkcji ochronnych: stabilizują błonę komórkową, mają działanie antyoksydacyjne, chronią DNA przed uszkodzeniami oksydacyjnymi, regulują aktywność kanałów jonowych, integrują różne szlaki sygnalizacyjne obejmujące sygnalizację za pośrednictwem RFT, NO i ABA, a także są zaangażowane w inicjację procesów programowanej śmierci i reakcji nadwrażliwości przez co zapobiegają rozprzestrzenianiu się patogenów [Hussain i in. 2011]. W przypadku działania kadmu wykazano, że poliaminy mogą pełnić funkcje antyoksydacyjne. Traktowanie liści pszenicy oraz krasnorostu *Gracilaria dura* sperminą skutkowało osłabieniem zależnej od Cd peroksydacji błon komórkowych i zmniejszoną akumulacją RFT, powiązaną ze stymulacją układu antyoksydacyjnego [Groppa i in. 2007, Kumar i in. 2012]. O istotnej roli odgrywanej przez PA w łagodzeniu zależnego od kadmu stresu oksydacyjnego świadczy również fakt, że transgeniczne rośliny gruszy z wprowadzoną antysensowną sekwencją syntazy sperminy charakteryzowały się zwiększoną zawartością MDA oraz obniżoną

aktywnością reduktazy glutationowej i dysmutazy ponadtlenkowej w porównaniu do roślin typu dzikiego poddanych działaniu kadmu [Wen i in. 2011]. Egzogenne podanie poliamin modulowało również zawartość kwasów tłuszczowych i poziom metylacji DNA w krasnorosie *Gracilaria dura* traktowanym roztworami kadmu, przy czym putrescyna zwiększała zależną od Cd demetylację DNA, podczas gdy spermina wykazywała odwrotne działanie - zwiększała poziom metylovanego DNA [Kumar i in. 2012].

Zmiany metabolizmu poliamin wywołane przez stres kadmowy mogą być powiązane z procesem programowanej śmierci komórek. Sugeruje się, że proces ten może być inicjowany przez akumulację nadtlenu wodoru wynikającą ze stymulującego wpływu kadmu na aktywność enzymów uczestniczących w degradacji poliamin (DAO i PAO) [Jiang i in. 2012].

1.2.6 Kaskady kinaz aktywowanych mitogenami

Kaskady kinaz aktywowanych mitogenami (MAPK) tworzą konserwatywny mechanizm przekazywania sygnału występujący u wszystkich organizmów eukariotycznych. Kaskady MAPK składają się z przynajmniej trzech elementów: kinazy kinazy kinazy aktywowanej mitogenami (MAPKKK), kinazy kinazy aktywowanej mitogenami (MAPKK) i kinazy aktywowanej mitogenami (MAPK). Aktywacja MAPKKK prowadzi do fosforylacji MAPKK, która z kolei uczestniczy w fosforylacji MAPK. Kinazy aktywowane mitogenami mają zdolność do fosforylacji wielu składników komórkowych takich jak inne kinazy białkowe, białka powiązanych z cytoszkieletem i czynniki transkrypcyjne. W genomie rzodkiewnika odnaleziono 60 białek MAPKKK, 10 MAPKK i 20 MAPK. Biorąc pod uwagę fakt, że poszczególne białka MAPKKK mogą fosforylować różne MAPKK, a MAPKK mogą wchodzić w reakcję z różnymi MAPK, kaskady kinaz aktywowanych mitogenami tworzą rozległą i skomplikowaną sieć sygnałną. Białka te są zaangażowane w regulację licznych procesów zachodzących w komórkach, w tym w odpowiedź na działanie czynników stresowych [Chang i Karin 2001, Nakagami i in. 2005].

WSTĘP

Nomenklatura roślinnych kinaz aktywowanych mitogenami może być myląca, chociaż pojawiały się próby wyklarowania systemu nazewnictwa. Generalnie przyjmuje się nadawanie nazwy MPK na roślinne białka MAPK oraz nazwy MKK na roślinne białka MAPKK. Do grupy MPK zalicza się SIPK, WIPK i NTF zidentyfikowane w tytoniu, SAMK i SIMK w lucernie oraz kinazy BWMK w ryżu. Przykładami białek MKK są MEK w tytoniu i PRKK i SIMKK w lucernie [Ichimura i in. 2002].

Badania wykazały, że elementy kaskad MAPK są stymulowane przez kadm. Ekspozycja na ten metal ciężki skutkowałą aktywacją MPK3 i MPK6 w rzodkiewniku oraz SIMK, MKK2, MKK3 i SAMK w lucernie [Jonak i in. 2004, Liu i in 2010, Ye i in. 2013]. Ponadto rośliny ryżu poddane działaniu kadmu charakteryzowały się wzrostem ekspresji genów *OsBWMK1*, *OsMSMRK1* i *OsEDR1*, a rośliny rzodkiewnika wzrostem ekspresji genów kodujących MPK3 i MPK6 obserwowanym zarówno w korzeniach jak i liściach [Agrawal i in. 2002, Agrawal i in. 2003, Kim i in 2003, Opendakker i in. 2012]. Elementy kaskad MAPK są stymulowane przez kadm bardzo szybko. Indukcję genu kodującego MAPKKK odnotowano już po 15 minutach działania tego metalu ciężkiego, zaś zwiększona fosforylację białek MAPK po 10 minutach traktowania roztworem kadmu [Jonak i in. 2004, Kim i in 2003]. W zależności od kadmu aktywacji białek należących do kaskad MAPK pośredniczą reaktywne formy tlenu. Taktowanie wymiataczem RFT, glutationem, skutkowało osłabieniem fosforylacji MPK3 i MPK6 w roślinach rzodkiewnika poddanych działaniu kadmu [Liu i in. 2010]. Również w roślinach ryżu zależny od kadmu wzrost aktywności dwóch białek MAPK był niwelowany poprzez traktowanie wymiataczem RFT lub inhibitorem oksydazy NADPH. W przeprowadzonych badaniach wykazano również, że obserwowana stymulacja białek MAPK jest powiązana z aktywnością kinaz zależnych od jonów wapnia, inozytolo-1,4,5-trifosforanem i funkcjonalnym stanem mitochondriów [Yeh i in. 2007]. Z kolei doświadczenia wykonane na rzodkiewniku dowiodły, że do zależności od kadmu aktywacji kinazy MPK6 niezbędna jest akumulacja tlenu azotu. Wykazano również, że aktywacja MPK6 prowadzi do stymulacji proteazy podobnej do kaspazy-3 i inicjacji programowanej śmierci komórek [Ye i in. 2013].

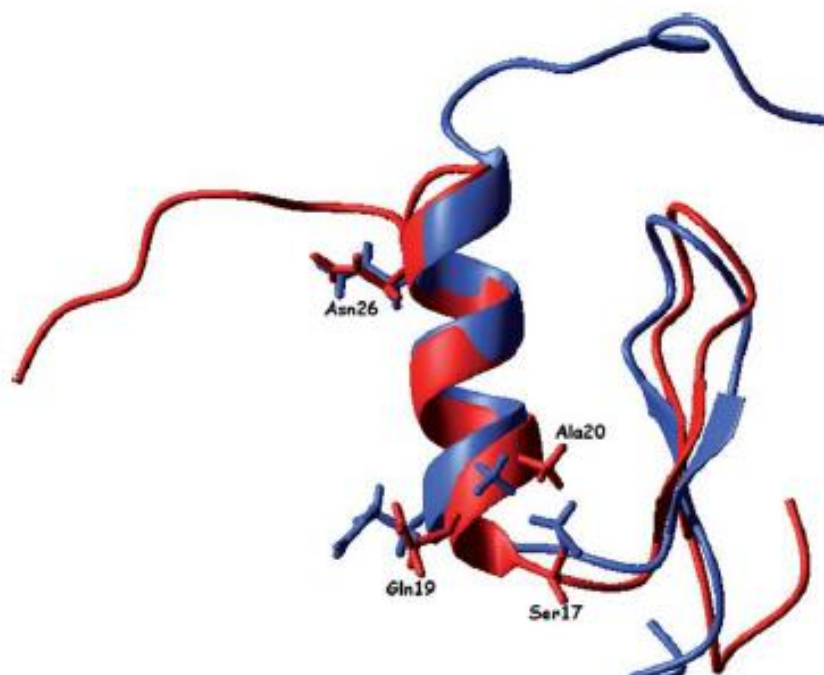
1.2.7 Czynniki transkrypcyjne

Ekspozycja na kadm prowadzi do zmian w ekspresji ogromnej liczny genów. Badania z zastosowaniem mikromacierzy wykazały, że kadm moduluje poziom mRNA dla prawie 400 genów w rzodkiewniku i ponad 1700 w ryżu [Kovalchuk i in. 2005, Ogawa i in. 2009]. Ekspresja genów jest regulowana przez czynniki transkrypcyjne (TF). Są to białka, które poprzez oddziaływania ze specyficznymi sekwencjami DNA (nazywanymi elementami *cis*), znajdującymi się najczęściej w sekwencjach promotorowych określonych genów, uczestniczą w aktywacji lub wyciszeniu ich ekspresji. Szacuje się, że na jeden gatunek rośliny przypada mniej więcej 590 różnych TF, a geny je kodujące stanowią prawie 2.12% genomu. Czynniki transkrypcyjne są dzielone na szereg różnych rodzin, najczęściej ze względu na nazwy domen łączących się z DNA. W roślinach wyróżnia się około 68 rodzin czynników transkrypcyjnych, przy czym 14 z nich uczestniczy w odpowiedzi roślin na działanie czynników stresowych [Charoensawan i in. 2010, Deckert i in. 2009].

W komórkach zwierzęcych zidentyfikowano element *cis* powiązany z odpowiedzią na działanie metali ciężkich, MRE, który jest rozpoznawany przez czynnik transkrypcyjny MTF-1 [Lichtlen i Shaffner 2001]. Sekwencję podobną do zwierzęcych sekwencji MRE. nazwaną PvSr2 zidentyfikowano w fasoli. Transgeniczne rośliny tytoniu zawierające w promotorze sekwencję PvSr2 charakteryzowały się wzrostem ekspresji reporterowego genu pod wpływem Cu^{2+} , Zn^{2+} , Hg^{2+} i Cd^{2+} [Qi i in. 2007]. Do tej pory nie udało się jednak zidentyfikować czynnika transkrypcyjnego łączącego się z roślinnymi elementami *cis* podobnymi do MRE. Wiadomo natomiast, że w odpowiedzi roślin na działanie kadmu zaangażowane są czynniki transkrypcyjne należące do rodzin AP2/EREBP, MYB, WRKY i bZIP [DalCorso i in. 2010]. Pomiar ekspresji 163 TF należących do rodziny MYB w roślinach rzodkiewnika poddanych działaniu różnych czynników stresowych i hormonów wykazały, że około 20% z nich ulega zmianom ekspresji pod wpływem działania kadmu i stresu solnego [Yanhui i in. 2006]. Inne badania przeprowadzone na rzodkiewniku pokazały, że traktowanie roztworem kadmu prowadzi do wzrostu ekspresji czynników transkrypcyjnych WRKY25 i WRKY29 w korzeniach oraz WRKY25 w liściach [Opdenakker i in. 2012]. Przykładami czynników transkrypcyjnych należących do rodziny bZIP uczestniczących w odpowiedzi na działanie kadmu są wyizolowany z kapusty sitowej BjCdR15 i zidentyfikowany w roślinie *Tamarix hispida* ThbZIP1 [Farinati i in. 2010, Wang i in.

WSTĘP

2010]. Transgeniczne rośliny rzodkiewnika charakteryzujące się nadekspresją BjCdR15 akumulowały więcej kadmu w liściach i jednocześnie wykazywały większą tolerancją na ten metal ciężki. Sugeruje się, że BjCdR15 warunkuje zwiększoną odporność na kadm poprzez regulację biosyntezy fitochelatyn oraz modulowanie translokacji Cd z korzeni do pędu [Farinati i in. 2010]. Traktowanie rośliny *Tamarix hispida* roztworem kadmu prowadziło do wzrostu ekspresji czynnika transkrypcyjnego ThbZIP1. Transgeniczne rośliny tytoniu wykazujące nadekspresję ThbZIP1 charakteryzowały się wyższą odpornością na stres solny, podwyższoną aktywnością peroksydazy i dysmutazy ponadtlenkowej oraz zmniejszoną zawartością MDA w odpowiedzi na działanie NaCl, co sugeruje, że ThbZIP1 może zwiększać tolerancję roślin na stresy abiotyczne poprzez stymulację układu antyoksydacyjnego [Wang i in. 2010]. Doświadczenia przeprowadzone na pszenicy i ryżu sugerują, że również czynniki transkrypcyjne należące do rodziny HSF uczestniczą w regulacji ekspresji genów w roślinach traktowanych roztworami kadmu. W obydwu gatunkach roślin zaobserwowano wzrost poziomu mRNA kodującego HsfA4 pod wpływem działania CdCl₂ powiązany ze wzrostem ekspresji genów kodujących metalotioneiny. Ponadto transgeniczne rośliny ryżu charakteryzujące się nadekspresją *HsfA* wykazywały zwiększoną tolerancję na kadm, zaś rośliny, w których przy pomocy narzędzi genetycznych obniżono ekspresję *HsfA* były mniej odporne na ten metal [Shim i in. 2009]. Bogatym źródłem informacji o czynnikach transkrypcyjnych, które mogą uczestniczyć w przekazywaniu sygnału o obecności kadmu w otoczeniu są globalne analizy ekspresji genów. Wykazały one, że traktowanie kadmem powoduje wzrost ekspresji genów *OsDREB1A*, *OsDREB1B* i *WKRY09* w ryżu i genów kodujących czynniki transkrypcyjne należące do rodzin ATAF, DREB2A, bZIP i WRKY w rzodkiewniku. W opozycji do tych wyników traktowanie roztworami kadmu roślinę *Solanum torvum* skutkowało spadkiem ekspresji dwóch genów kodujących czynniki transkrypcyjny DREB oraz pięciu genów kodujących czynniki transkrypcyjne należące do rodziny AP2/ERF i DREB [Ogawa et al 2009, Suzuki et al. 2001, Yamaguchi et al. 2009]. Wiele czynników transkrypcyjnych zawiera motywy palców cynkowych. Kadm może modulować ich aktywność poprzez substytucję jonów cynku. Przy zastosowaniu techniki NMR wykazano, że Cd²⁺ zamienia Zn²⁺ w motywie palców cynkowych w wyizolowanym z rzodkiewnika czynnikiem transkrypcyjnym SUPERMAN (SUP37). Opisana substytucja skutkowała zmianami w konformacji SUP37 mogącymi prowadzić do zaburzeń w łączeniu się z DNA (Ryc.6) [Malgieri i in. 2001].



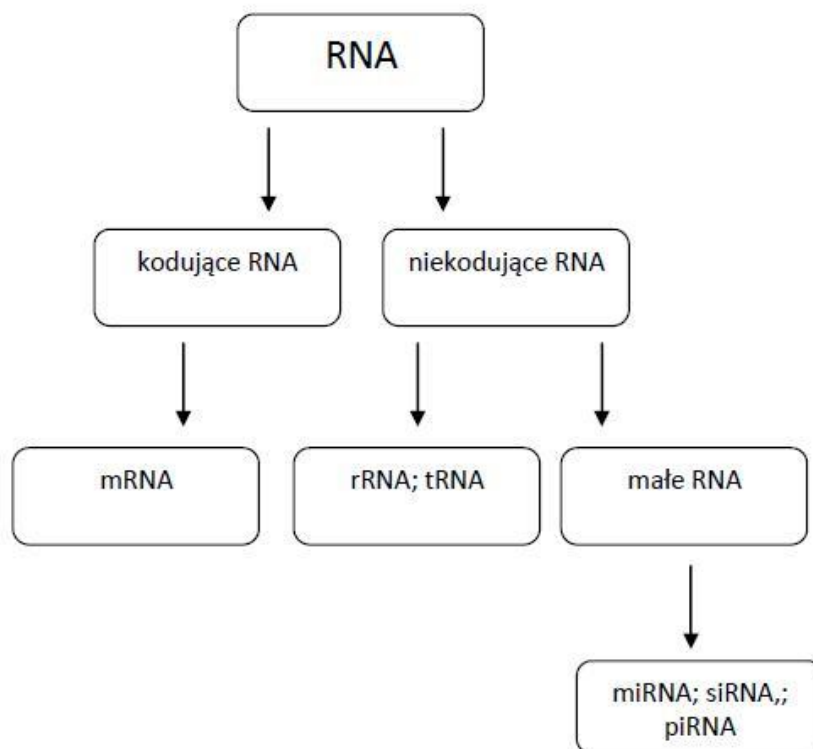
Ryc.6: Modele czynników Zn-SUP37 (czerwony) i Cd-SUP37 (niebieski) nałożone na siebie z zaznaczonymi pozycjami aminokwasów: Ala20, Asn26, Gln19 i Ser17. Ser17 odgrywa główną rolę przy rozpoznawaniu elementów *cis* na nici DNA [Malgieri i in. 2001].

1.2.8 Sygnalna rola mikroRNA

W genomie wszystkich organizmów żywych oprócz sekwencji kodujących białka istnieją także sekwencje nukleotydowe, które ulegają transkrypcji, ale nie podlegają translacji. Wspomniane sekwencje służą jako matryca do syntezy niekodującego RNA (ncRNA). Do ncRNA należą rRNA, tRNA, a także małe RNA zaangażowane w regulację ekspresji genów. Podział różnych rodzajów RNA został przedstawiony na Ryc.7. Wydaje się, że spośród małych RNA, najistotniejszą rolę w odpowiedzi roślin na warunki stresowe pełnią mikroRNA (miRNA). Ten typ RNA jest kodowany przez geny MIR i wykazują się dużą konserwatywnością w obrębie poszczególnych królestw.

WSTĘP

Dojrzałe miRNA składa się z pojedynczej nici o długości 20-22 nukleotydów, która wiąże się z kompleksem RISC (kompleks wyciszający indukowany RNA) i uczestniczy w degradacji docelowych mRNA oraz represji transkrypcji. MikroRNA odgrywają rolę w regulacji licznych procesów takich jak morfogeneza liści, rozwój korzeni, czas kwitnienia, polarność organów, metabolizmie innych małych RNA oraz odpowiedź roślin na czynniki stresowe [Guleria i in. 2011, Yang i in. 2007].



Ryc.7: Rodzaje RNA [Guleria i in. 2011, zmodyfikowany]. Skróty: mRNA – matrycowy (przebieżnikowy, informacyjny) RNA; rRNA – rybosomalny (rybosomowy) RNA; miRNA – mikro RNA; siRNA – małe interferujące RNA; piRNA – RNA tworzące kompleksy z białkiem piwi.

WSTĘP

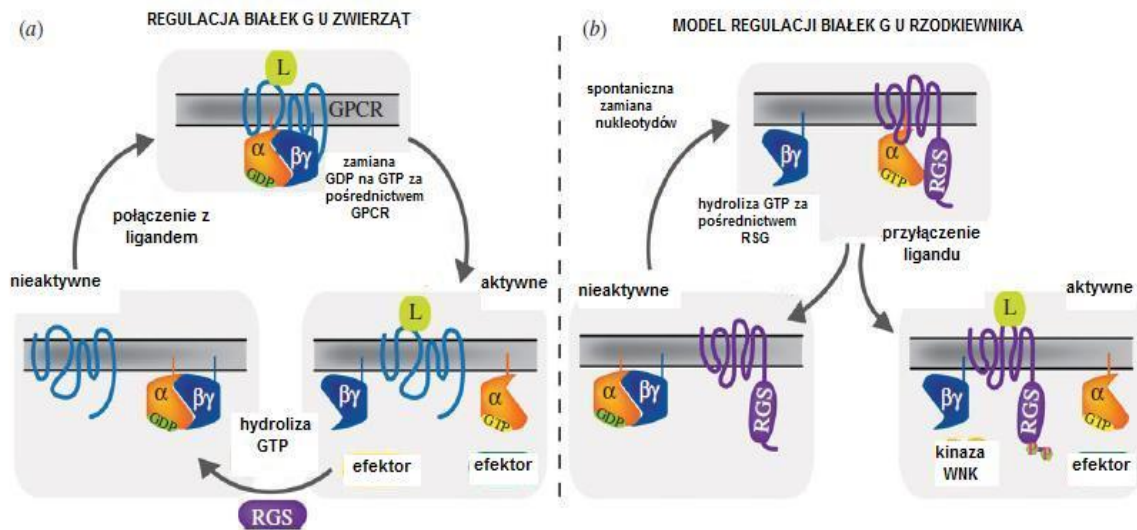
Badania przeprowadzone w ostatnich latach dowodzą, że miRNA mogą odgrywać również ważną rolę w odpowiedzi roślin na działanie kadmu. W ryżu zidentyfikowano 19 miRNA wrażliwych na działanie tego metalu ciężkiego, przy czym tylko jedno z nich, miR528 wykazywało wzrost ekspresji w odpowiedzi na działanie CdCl₂, podczas gdy pozostałych 18 charakteryzowało się spadkiem poziomu ekspresji. Analizy bioinformatyczne wykazały, że modulowane przez kadm miRNA uczestniczy w regulacji poziomu mRNA kodującego czynniki transkrypcyjne oraz inne białka powiązane z przekazywaniem sygnału i przetwarzaniem miRNA. Dalsze doświadczenia wykazały, że poziom trzech miRNA, miR168, miR166 i miR390, jest negatywnie skorelowany z poziomem regulowanego mRNA kodującego odpowiednio białko AGO wchodzące w skład kompleksu RISC, czynnik transkrypcyjny HD-Zip i kinazę białkową podobną do receptorów bogatych w powtórzenia leucytowe (RLK) [Ding i in. 2011]. Również badania wykonane na rzepaku dowodzą, że miRNA mogą odgrywać istotną rolę w regulacji ekspresji genów w odpowiedzi na działanie kadmu. Traktowanie tym metalem ciężkim skutkowało wzrostem ekspresji miR398, miR857, miR172f, oraz równoczesnym spadkiem poziomu miR159, miR394, miR2111, miR319d i miR398b w korzeniach. W pędach rzepaku zaobserwowano wzrost poziomu miR156m i miR158a oraz miRNA należących do rodzin miR158, miR161, miR400 i miR1885. Z kolei miRNA należące do rodzin miR159, miR162, miR164, miR171, miR319, miR394, miR395 i miR858, a także miRNA miR167f-i i miR319c charakteryzowało się obniżoną ekspresją pod wpływem działania kadmu [Zhou i in. 2012]. W późniejszych badaniach przeprowadzonych na rzepaku poznano dokładniej funkcje miR395 w odpowiedzi tego gatunku na stres kadmowy. Transgeniczne rośliny charakteryzujące się nadekspresją miR395 akumulowały większe ilości kadmu, ale jednocześnie wykazywały mniejszy współczynnik translokacji Cd z korzeni do pędu. Ponadto u transgenicznych roślin zaobserwowano większą zawartość chlorofilu przy jednoczesnej mniejszej zawartości TBARS, świadczącej o zmniejszonym nasileniu stresu oksydacyjnego. Transgeniczne rośliny charakteryzowały się również wyższą ekspresją genów kodujących fitochelatyny i genu kodującego jeden z transporterów siarczanów, Sultr1;1 [Zhang i in. 2013].

1.2.9 Inne elementy pełniące funkcje sygnałowe

W organizmach zwierzęcych bardzo istotną rolę w szlakach przekazywania sygnałów odgrywają białka G, czyli białka łączące się z guanozynotrifosforanem (GTP). Białka te dzieli się na dwie grupy: monomeryczne i heterotrimeryczne. Heterotrimeryczne białka G są złożone z trzech podjednostek G_α , G_β i G_γ . W stanie nieaktywnym wszystkie trzy podjednostki są połączone ze sobą, a do podjednostki G_α przyłączona jest również cząsteczka GDP. Zamiana cząsteczki GDP na cząsteczkę GTP, zachodząca za pośrednictwem receptorów sprzężonych z białkiem G (receptory GCPR) lub innych białek o aktywności wymiennika nukletydów guaninowych (GEP), skutkuje aktywacją białka G, odłączeniem się podjednostek G_β i G_γ i stymulacją kolejnych elementów przekazywania sygnałów takich jak fosfolipaza C_β i cyklaza adenyloza. Inaktywacja białka G następuje po hydrolizie GTP do GDP. W procesie tym uczestniczą białka RSG. Warto wspomnieć, że za odkrycie białek G i ich roli w przekazywaniu sygnału Alfred Gilman i Martin Rodbell otrzymali w 1994 roku nagrodę Nobla, zaś za badania nad receptorami GCPR tą samą nagrodę otrzymał w 2012 roku Robert Lefkowitz [Tuteja i Sopory 2008, Urano i in. 2013].

Funkcjonowanie i rola heterotrimerycznych białek G w roślinach jest słabiej poznana. Badania dotyczące tego zagadnienia były przeprowadzane głównie na dwóch gatunkach roślin modelowych: rzodkiewniku i ryżu. W genomie obydwu wspomnianych gatunków roślin zidentyfikowano kilka pojedynczych genów kodujących podjednostki G_α , G_β i G_γ . Wykazano, że podjednostka G_α ma zdolność spontanicznego wiązania GTP, nie wymaga do tego procesu dodatkowych białek. Odkrycie to sugeruje, że sposób regulacji aktywności heterotrimerycznych białek G jest inny w organizmach zwierzęcych i roślinnych [Urano i in. 2013]. Modele regulacji aktywności białka G u zwierząt i w rzodkiewniku przedstawiono na Ryc.8.

WSTĘP



Ryc.8: Model regulacji heterotrimerycznego białka G u zwierząt (a) i rzodkiewnika (b). W przypadku organizmów zwierzęcych połączenie receptora GPCR z ligandem powoduje zamianę GDP na GTP, odłączenie się podjednostek G_β i G_γ oraz aktywację kolejnych elementów sygnałnych (a). W rzodkiewniku GTP jest spontanicznie przyłączane do G_α , co skutkuje aktywacją białka G. Białko RSG uczestniczy w hydrolizie GTP do GDP. Aktywność białka RSG jest hamowana poprzez przyłączenie ligandu (b) [Urano i in. 2013, zmodyfikowany]

Dotychczas wykazano, że aktywność roślinnych heterotrimerycznych białek G jest powiązana z regulacją procesów kiełkowania, formowania się korzeni, sygnalizacji hormonalnej, otwierania aparatów szparkowych, a także odpowiedzi na atak patogenów oraz stres osmotyczny i temperaturowy [Tuteja i Sopory 2008, Urano i in. 2013].

Również monomeryczne białka G, nazywane małymi białkami wiążącymi GTP, są istotnymi elementami zaangażowanymi w sygnalizację komórkową. Białka te występują u wszystkich organizmów eukariotycznych i są dzielone na przynajmniej pięć rodzin: Ras, Rho, Rab, Sar1/Arf i Ran, przy czym w roślinach jak dotąd nie zidentyfikowano białek należących do rodziny Ras. Małe białka wiążące GTP są zaangażowane w liczne procesy komórkowe takie jak transport pęcherzyków w obrębie cytoplazmy, rearanżacja cytoszkieletu, transport jądrowy, organizacja mikrotubul podczas podziałów oraz sygnalizacja komórkową. Podobnie jak podjednostka G_α heterotrimerycznego białka G, małe białka wiążące GTP w swojej nieaktywnej formie są połączone z GDP. Zamiana GDP na GTP, zachodząca przy udziale białek o aktywności wymiennika nukleotydów guaninowych (GEP), prowadzi do zmiany konformacji i aktywacji małych białek wiążących GTP. Aktywne białka

WSTĘP

stymulują kolejne elementy do których należą kaskady kinaz aktywowanych mitogenami, kinaza fosfatydyloinozytolowa i czynniki transkrypcyjne [Ma 2009, Takai i in. 2001].

Istotną rolę w szlakach przekazywania sygnałów odgrywają również cykliczne monofosforany: adenylowy (cAMP) i guanozynowy (cGMP). Ich funkcje zostały dokładnie poznane w organizmach zwierzęcych, chociaż w ostatnich latach pojawiły się również badania sugerujące, że cAMP i cGMP odgrywają rolę w sygnalizacji komórkowej roślin. Wykazano, że związki te, poprzez regulację aktywności kanałów jonowych, uczestniczą w generowaniu tlenku azotu oraz w odpowiedzi roślin na biotyczne i abiotyczne czynniki stresowe [Gehring 2010].

Postuluje się, że również cukry proste, takie jak sacharoza i glukoza, mogą oprócz funkcji metabolicznych, pełnić funkcje sygnałowe. Świadczy o tym kilka faktów. Cukry uczestniczą w regulacji ekspresji licznych genów niekoniecznie powiązanych z ich metabolizmem. Do regulowanych genów należą między innymi geny kodujące reduktazę azotanową, fosfolipazę D, syntazę chalkonową, invertazę ściany komórkowej oraz białka PR. Zidentyfikowano również szereg elementów *cis* powiązanych z zależną od cukrów regulacją transkrypcji. Ponadto wykazano, że przekazywanie sygnału za pośrednictwem cukrów może być niezależne od statusu energetycznego komórki wyrażonego jako stosunek ATP/AMP oraz od poziomu innych metabolitów. Kolejne przekonujący dowód, to fakt, że heskokinazę, która jest potencjalnym sensorem glukozy, wykryto we frakcji jądrowej kukurydzy [Sheen i in. 1999].

Pomimo istotnej roli jaką pełnią wyżej wymienione elementy w sygnalizacji komórkowej ich zaangażowanie w odpowiedzi roślin na działanie kadmu jest słabo poznana. Istnieją jedynie pojedyncze doniesienia o możliwym udziale cGMP w regulacji ekspresji genów kodujących enzymy antyoksydacyjne w roślinach grochu traktowanych roztworem kadmu [Romero-Puertas i in. 2007]. We wcześniejszych pracach wykonywanych Zakładzie Ekofizjologii Roślin UAM wykazano również, że traktowanie siewek soi kadmem skutkuje wzrostem ekspresji i aktywności syntazy sacharozowej, jednakże rola pełniona przez ten enzym w odpowiedzi na działanie kadmu i jego ewentualne powiązanie z sygnalizacją za pośrednictwem cukrów nie została jeszcze wyjaśniona [Pawlak-Sprada 2010].

2. CEL PRACY

Organizmy są narażone na działanie wielu czynników stresowych: wahania temperatury, niedobór składników pokarmowych i wody, zatopienie, stres mechaniczny, działanie substancji toksycznych. Rośliny, w odróżnieniu od zwierząt, nie mają zdolności poruszania się. W związku z tym nie potrafią aktywnie przemieszczać się w celu uniknięcia niekorzystnych warunków środowiskowych. Ich jedyną szansą na przetrwanie jest uruchomienie mechanizmów obronnych. Wspomniane mechanizmy obejmują między innymi aktywację odpowiednich genów prowadzącą do syntezy białek pełniących funkcje ochronne. W ostatnich latach duży nacisk w naukach biologicznych kładzie się na, jak to ujęto w książce „Fizjologia roślin” pod redakcją Taiza i Zeigera (2006): „molekularne wydarzenia łączące odbiór bodźca stresowego z odpowiedzią genetyczną”, czyli mówiąc innymi słowami na sygnalizację komórkową uruchamianą przez czynniki stresowe. **Głównym celem niniejszej pracy doktorskiej jest poznanie szlaków przekazywania sygnałów aktywowanych w siewkach soi w odpowiedzi na działanie kadmu.** Dotychczasowe informacje dotyczące tego tematu skupiały się na pojedynczych elementach sygnalizacyjnych uruchamianych w kilku gatunkach roślin modelowych takich jak rzodkiewnik i ryż. Badania wykonywane w ramach niniejszej pracy doktorskiej zakładają kompleksowe poznanie sieci sygnałnych zaangażowanych w przekazywanie sygnału o obecności kadmu w środowisku w jednym gatunku rośliny, soi. Do badań wybrano soję ze względu na szereg zalet:

- Soja jest ważną rośliną gospodarczą zajmującą czwartą miejsce na świecie pod względem powierzchni przeznaczonych na uprawę. Nasiona soi zawierają łatwo przyswajalne białko oraz nienasycone oleje, które są wykorzystywane do produkcji biopaliwa [Dobek i Dobek 2008, Masuda i Goldsmith 2009].
- W 2010 roku całkowicie zsekwencjonowano genom tego gatunku, co umożliwiło dostęp do wszystkich przydatnych w badaniach sekwencji nukleotydowych oraz ułatwiło analizy bioinformatyczne [Schmutz et al. 2010]
- W Zakładzie Ekofizjologii Roślin Wydziału Biologii UAM soja od wielu lat jest wykorzystywana do doświadczeń jako roślina modelowa. Opracowano szczegółowe metody prowadzenia hodowli siewek soi oraz inkubacji w roztworach kadmu i wybranych inhibitorów.

CEL PRACY

W celu uzyskania kompleksowego obrazu sieci sygnałnych zaangażowanych w przekazywanie informacji o obecności w środowisku kadmu, wyodrębniono pięć głównych zadań:

- 1) Zbadanie wpływu jonów kadmu na poziom mRNA kilkunastu genów kodujących białka powiązane z roślinnymi szlakami przekazywania sygnałów.
- 2) Analiza korelacji pomiędzy zmianami w ekspresji badanych genów na poziomie transkryptu, a zmianami aktywności kodowanych przez nie białek enzymatycznych.
- 3) Określenie potencjalnej roli oksydazy NADPH w regulacji ekspresji genów indukowanych przez kadm.
- 4) Analiza udziału tlenu azotu w zależnej od kadmu indukcji genów powiązanych ze szlakami przekazywania sygnałów.
- 5) Zbadanie, wpływu etylenu na ekspresję genów indukowanych przez kadm.

W trakcie prowadzenia badań pojawiały się nowe pytania, na które starano się znaleźć odpowiedź: Czy sekwencje promotorowe genów indukowanych przez jony kadmu mają wspólne elementy *cis*, mogące wskazywać na wspólny mechanizm regulacji? Czy stosowany zmiatacz tlenu azotu, PTIO, wpływa na szybkość pobierania kadmu z otoczenia? Jaki udział w odpowiedzi siewek soi na działanie jonów kadmu ma potencjalny inhibitor syntezy etylenu, chlorek kobaltu? Czy jego wpływ jest faktycznie zależny od hamującego działania na produkcję etylenu?

Wyniki badań pozwolą na zaproponowanie kompleksowego modelu sieci sygnałnych zaangażowanych w przekazywanie sygnału kadmowego w siewkach soi. Przyczynią się również do lepszego poznania mechanizmów prowadzących do nabywania przez siewki odporności na ten metal ciężki.

MATERIAŁY I METODY

3. MATERIAŁY I METODY

3.1 Stosowane odczynniki

Odczynniki stosowane w doświadczeniach zostały przedstawione w tabeli 2.

Tabela 2: Odczynniki stosowane w doświadczeniach.

Nazwa odczynnika	Producent	Numer katalogowy
Odczynniki stosowane do prowadzenia hodowli		
CdCl ₂	Polskie Odczynniki Chemiczne Gliwice	
CoCl ₂	Lubuskie Przedsiębiorstwo Przemysłowo-Handlowe „Och”	
DPI	BioShop	DPI250.25
PTIO	Sigma-Aldrich	P5084
Odczynniki stosowane do pomiarów przeżywalności komórek		
Błękit Evansa	Sigma-Aldrich	
Dodecylosiarczan sodu (SDS)	Sigma-Aldrich	
Etanol	Chempur	WE:2000-578-6
Odczynniki stosowane do izolacji RNA		
Alkohol izopropylowy	Sigma-Aldrich	I9030
Chloroform	Sigma-Aldrich	C2432
Etanol	Chempur	WE:2000-578-6
TriReagent	Sigma-Aldrich	T9424
Odczynniki stosowane do oczyszczania RNA i reakcji odwrotnej transkrypcji		
Deoxyribonuclease Kit	Sigma-Aldrich	AMP-D1
Reverse Transcription Kit	Thermo Scientific Fermentas	#K1622
Odczynniki stosowane do przeprowadzenia reakcji PCR w czasie rzeczywistym		
PowerSYBR Green Master Mix	Applied Biosystems	4368577

MATERIAŁY I METODY

Odczynniki stosowane do pomiarów aktywności reduktazy azotanowej		
Azotyn sodowy		
Dwuchlorowodorek N-(-1-naftylo-etylenodwuaminy)	Sigma-Aldrich	N-5889
Kwas solny	Chempur	WE:231-595-7
Sulfanilamid	Sigma-Aldrich	S-9251
Odczynniki stosowane do barwień histochemicznych		
3,3'-diaminobenzzydina (DAB)	Sigma-Aldrich	D8001
Dithizone	Sigma-Aldrich	D5130
Odczynniki stosowane do pomiaru poziomu TBARS		
Kwas trichlorooctowy (TCA)	Merck	UN1839
Kwas tiobarbiturowy (TBA)	Sigma-Aldrich	T-5500
Inne stosowane odczynniki		
Sterylna woda wolna od nukleaz	BioShop	WAT222.1

3.2 Startery stosowane w reakcji PCR w czasie rzeczywistym

Stosowane w reakcjach startery były projektowane przy pomocy programu Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/>) i zamawiane w Instytucie Sekwencjonowania DNA IBB PAN, za wyjątkiem starterów do genów kodujących kinazę aktywowaną mitogenami (Glyma07g32750), fosfolipazę (Glyma02g42430), czynnik transkrypcyjny bZIP62 (Glyma06g08390) i obydwu genów kodujących czynniki transkrypcyjne DOF1 (Glyma13g42820; Glyma15g02620), które zostały zamówione w firmie Genomed. Sekwencje starterów są przedstawione w tabeli 3.

MATERIAŁY I METODY

Tabela 3: Startery stosowane w reakcjach PCR w czasie rzeczywistym.

Numer genu w bazie danych Soybase.org	Startery	Kodowane białko
Glyma05g37410	Lewy: TGTGCTATGCCAACATGGAT Prawy: GAGGTATGGGGGAGTGAGGT	Syntaza kwasu 1-aminocyklopropano-1-karboksylowego (ACS)
Glyma03g00640	Lewy: GGGACTGTTATGCGTTCGTT Prawy: CAAGGTTGGTCATCACATGG	kalmodulina (CAM)
Glyma17g02260	Lewy: TCCTTGCAAGCAGTTGTGTC Prawy: TGGTTTGATGGATTCCCATT	Oksydaza diaminowa (DAO)
Glyma13g34410	Lewy: GTGCCATCACCAGTGCATAC Prawy: TCCAGAGCTGAGGTTTCCAT	Małe białko wiążące GTP
Glyma13g02510	Lewy: AAATCCCATGCAAGCTCATC Prawy: GGTGCACCCCTTTGAAGTAA	Reduktaza azotanowa (NR)
Glyma07g32750	Lewy: TTGACCAAAACCCCTCACAACACAT Prawy: CCGCGTCGGACATCACGGT	Kinaza aktywowana mitogenami 2 (MAPK2)
Glyma17g06020	Lewy: AGCAGGTGCTGAAGGGTCTA Prawy: TTCCTGGCTTCCATTGATTC	Kinaza kinazy aktywowanej mitogenami 2 (MAPKK2)
Glyma11g11450	Lewy: GAATCGACCCTGCAACTCAT Prawy: ACCCAAACCTGCAAACGAAAC	Czynnik transkrypcyjny MYBZ 2 (MYBZ2)
Glyma02g42430	Lewy: TCCACAACCTCTCTCTCCTGTTCC Prawy: CGTCGCCAGCAGAAGCACAC	fosfolipaza C (PLC)
Glyma02g14180	Lewy: GCGGTGAATCTGAACGAAAT Prawy: GTGGCTCCTCTCTTACGAC	Dekarboksylaza S-adenozylometioniny (SAMDC)
Glyma04g03200	Lewy: GAAATCCTCGCCACCATAGA Prawy: CGTAGGTGGTGGTTGTGTTG	Czynnik transkrypcyjny bZIP44
Glyma06g08390	Lewy: GCCCATGCTGTTCCCTCATGT Prawy: GCTGAGACTGGGCTCCAACA	Czynnik transkrypcyjny bZIP62
Glyma19g44190	Lewy: AAGCCAATCAGACCAACCAG Prawy: CTGCATAAGGAGGCCATAA	Czynnik transkrypcyjny bZIP78
Glyma13g42820	Lewy: AAGCCAAAACCTTGAGCAGA Prawy: CCTTGTCGACGGAGGAATTA	DOF1 transcription factor
Glyma15g02620	Lewy: GGTGGTGCCTTGAGAAACAT Prawy: GATGCCAAAAGGGAACGTAA	DOF1 transcription factor
Glyma20g27950	Lewy: GAAGTCGAAAGCTCCGACAC Prawy: TGTT TTGGGAACACATCCAA	Ubikwityna

MATERIAŁY I METODY

We wstępnych badaniach dotyczących wyboru odpowiedniego genu referencyjnego wykorzystano również startery genu kodującego kinazę zależną od cyklin typu A zastosowane we wcześniejszych badaniach wykonywanych przez pracowników Zakładu Ekofizjologii Roślin (Sobkowiak i Deckert 2003) oraz startery dla genu kodującego S18 rRNA zaprojektowane w programie primer3 i zamówione w firmie Genomed (Lewy: AGACGAACAACTGCGAAAGC; Prawy: CAGCGGAGTCCTAAAAGCAA).

3.3 Materiał roślinny

Doświadczenia były przeprowadzane na siewkach soi (*Glycine max*) odmiany Nawiko. Nasiona otrzymano z eksperymentalnych upraw Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu.

3.4 Warunki hodowli i warianty doświadczalne

Nasiona soi były poddawane sterylizacji powierzchniowej poprzez moczenie przez 5 minut w 70% etanolu, a następnie przez 10 min w 1% roztworze podchlorynu sodu (20% wybielacz ACE). Po sterylizacji nasiona płukano przez 30 min pod bieżącą wodą i pozostawiono na 2 godziny w destylowanej wodzie do spęcznienia. Wysterylizowane nasiona umieszczano na plastikowych kuwetach lub, w przypadku hodowli zakładanych do badań ekspresji genów, na szklanych szalkach o średnicy 50 cm, wyłożonych dwoma warstwami wilgotnej lignin i jedną warstwą wilgotnej bibuły. Kuwety lub szlaki zakrywano folią aluminiową i pozostawiano w pokoju hodowlanym w temperaturze pokojowej. Po 48 godzinach skielkowane nasiona, wyselekcjonowane pod względem długości korzonków, były umieszczane na szalkach Petriego wyłożonych dwoma krążkami bibuły. Korzenie siewek umieszczano w dziurkach wyciętych w górnym krążku bibuły, tak aby znajdowały się one pomiędzy dwoma warstwami bibuły (Ryc.9). Na każdej szalce umieszczano po 10 siewek. Siewki zalewano 5 ml odpowiednich roztworów zależnie od wariantu doświadczalnego (tabela 4).



Ryc.9: Sposób rozmieszczenia siewek soi na szalkach Petriego.

W przypadku hodowli zakładanych do pomiarów ekspresji genów stosowano sterylne szalki, roztwory i końcówki do pipet. W hodowlach zakładanych do pomiarów wydzielanego etylenu skielkowane nasiona soi przekładano na szalki Petriego wyłożone podwójną warstwą bibuły. Korzeni nie wkładano w dziurki pod wierzchnią warstwę bibuły, aby nie ograniczać przepływu etylenu.

MATERIAŁY I METODY

Tabela 4: Warianty doświadczalne stosowane w badaniach.

Wariant doświadczalny	Stosowany skrót	Stosowane roztwory
Kontrola	K	Woda destylowana
Roztwór kadmu o stężeniu kadmu 10 mg L ⁻¹	Cd10	Roztwór CdCl ₂ o stężeniu kadmu wynoszącym 10 mg L ⁻¹ (89 μM)
Roztwór kadmu o stężeniu kadmu 25 mg L ⁻¹	Cd25	Roztwór CdCl ₂ o stężeniu kadmu 25 mg L ⁻¹ (223 μM)
Kontrola z inhibitorem oksydazy NADPH	K+DPI	50 μM difenylojodonium (DPI) rozpuszczony w wodzie destylowanej
Kontrola ze zmiataczem tlenu azotu	K+PTIO	50 μM 3-tlenek 2-(4-fenilo)-4,4,5,5-tetrametyloimidazolu-1-oksylu (PTIO) rozpuszczony w wodzie destylowanej
Kontrola z inhibitorem syntezy etylenu	K+CoCl ₂	10 μM CoCl ₂ rozpuszczony w wodzie destylowanej
Roztwór kadmu o stężeniu kadmu 25 mg L ⁻¹ z inhibitorem NADPH oksydazy	Cd25+DPI	50 μM difenylojodonium (DPI) rozpuszczony w roztworze CdCl ₂ o stężeniu kadmu 25 mg L ⁻¹ (223 μM)
Roztwór kadmu o stężeniu kadmu 25 mg L ⁻¹ ze zmiataczem tlenu azotu	Cd25+PTIO	50 μM 3-tlenek-2-(4-fenilo)-4,4,5,5-tetrametyloimidazolu-1-oksylu (PTIO) rozpuszczony w roztworze CdCl ₂ o stężeniu kadmu 25 mg L ⁻¹ (223 μM)
Roztwór kadmu o stężeniu kadmu 25 mg L ⁻¹ z inhibitorem syntezy etylenu	Cd25+CoCl ₂	10 μM CoCl ₂ w rozpuszczony w roztworze CdCl ₂ o stężeniu kadmu wynoszącym 25 mg L ⁻¹ (223 μM)

Stosowane stężenia kadmu zostały wybrane na podstawie indeksu tolerancji soi [Pawlak i in. 2009], a stężenia PTIO, DPI i CoCl₂ na podstawie dostępnej literatury oraz prac wykonywanych wcześniej w Zakładzie Ekofizjologii Roślin [Arasimowicz-Jelonek i in. 2012, Chmielowska i Deckert 2008].

3.5 Pomiary wzrostu

Długość korzeni mierzono przy pomocy linijki. Świeżą masę ważono bezpośrednio po odcięciu korzeni na lodzie. Odcięte korzenie przenoszono do ciepłarki o temperaturze 55°C. Po trzech dniach określano ich suchą masę.

3.6 Pomiary zawartości kadmu w korzeniach siewek soi

Korzenie siewek soi były odcinane, opłukiwane w wodzie dejonizowanej i suszone przez 3 dni w 72°C. Pomiary zawartości kadmu zostały przeprowadzone w laboratorium Fizjologii Roślin w Louvain-la-Nueve (Belgia) według metody opisanej przez Vromman et al. 2011 [Vromman i in. 2011]. Pomiary całkowitej zawartości kadmu były przeprowadzone przy użyciu spektrofotometru absorpcji atomowej (Thermo Scientific, S series).

3.7 Pomiary przeżywalności komórek

Pomiary przeżywalności komórek korzeni siewek soi przeprowadzono według zmodyfikowanej metody Lehotai [Lehotai i in.. 2011]. Po 24 godzinnej inkubacji z odpowiednimi roztworami odcinano 200 mg korzeni siewek soi o długości około 1 cm. Do probówek typu Eppendorf zawierających odcięte wierzchołki korzeni dodawano 1 ml roztworu Błękitu Evansa i inkubowano w temperaturze pokojowej przez 20 min. Próby płukano dwukrotnie przez 15 min wodą dejonizowaną. Wierzchołki korzeni rozcierano w moździerzu z 1.2 ml roztworu odbarwiającego i po przeniesieniu do probówek typu Eppendorf, inkubowano przez 15 minut w 50°C. Następnie próby wirowano przez 15 min przy 12000xg. Zawartość Błękitu Evansa świadcząca o obecności martwych komórek mierzono spektrofotometrycznie w 1 ml supernatantu przy długości fali $\lambda=600$ nm na spektrofotometrze BioMate 3S (ThermoSCIENTIFIC). Pobieranie Błękitu Evansa przez korzenie siewek dokumentowano również przy pomocy zdjęć. Korzenie siewek soi barwiono przez 20 min w 2 ml roztworu Błękitu Evansa, płukano przez 15 minut w wodzie dejonizowanej, a następnie fotografowano przy użyciu aparatu Canon EOS550D.

MATERIAŁY I METODY

Stosowane roztwory:

Roztwór barwiący: 50 mg Błękitu Evansa, woda destylowana do 20 ml

Roztwór odbarwiający: 50 ml czystego etanolu, 1 ml 10% roztworu SDS, woda destylowana do 100 ml

3.8 Izolacja RNA

Do izolacji RNA wykorzystywano około 100 mg wierzchołków korzeni, które były odcinane na lodzie, zamrażane w ciekłym azocie, a następnie przechowywane w -80°C . Izolację przeprowadzano przy zastosowaniu odczynnika TriReagent zgodnie z instrukcjami zamieszczonymi przez producenta. Procedura obejmowała:

- 1) Homogenizację zamrożonego materiału w probówkach typu Eppendorf przy użyciu plastikowych tłoczków z dodatkiem 1ml odczynnika TriReagent.
- 2) Inkubację przez 10 min w temperaturze pokojowej.
- 3) Dodanie 200 μl chloroformu.
- 4) Mieszanie zawartości probówek przez inwersję i na wortexie.
- 5) Inkubację przez 3 min w temperaturze pokojowej.
- 6) Wirowanie przez 15 min przy 12 000 rpm i temperaturze 4°C .
- 7) Przeniesienie wodnej warstwy do nowych probówek typu Eppendorf.
- 8) Dodanie 500 μl izopropanolu.
- 9) Mieszanie zawartości probówek przez inwersję i na wortexie.
- 10) Inkubację przez 10 min w temperaturze pokojowej.
- 11) Wirowanie przez 10 min przy 12 000 rpm i temperaturze 4°C .
- 12) Przemycie osadu 70% etanolem.
- 13) Mieszanie na wortexie.
- 14) Wirowanie przez 5 min przy 7 500 rpm i 4°C .
- 15) Odrzucenie supernatantu i osuszenie osadu przez około 10 min (osad nie był całkowicie wysuszany).

MATERIAŁY I METODY

16) Rozpuszczenie osadu w 50 μ l wody destylowanej oczyszczonej z RNAaz przez traktowanie odczynnikiem DEPC.

Ilość i czystość uzyskanego RNA oznaczano przy pomocy pomiarów spektrofotometrycznych przeprowadzanych przy dwóch długościach fali $\lambda=260$ nm i $\lambda=280$ nm na spektrofotometrze Biomate 3S (Thermo Scientific) na przystawce do pomiarów małych objętości próbek NanoCell (Thermo Scientific). Ilość RNA wyliczano na podstawie wzoru $1 \text{ OD}=40 \mu\text{g RNA}$, a czystość z proporcji $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$. Próby uważano za wystarczająco czyste jeżeli opisany stosunek wynosił >1.8 . Otrzymane RNA było przechowywane w -80°C .

3.9 Oczyszczanie RNA i reakcja odwrotnej transkrypcji

Do reakcji oczyszczania i odwrotnej transkrypcji używano 1 μg RNA rozpuszczonego w 7 μl $\text{H}_2\text{O}_{\text{DEPC}}$. RNA oczyszczano przy zastosowaniu zestawu Deoxyribonuclease Kit. Procedura oczyszczania obejmowała:

- 1) Dodanie 1 μl buforu i 1 μl DNAzy.
- 2) Inkubację przez 15 min w temperaturze pokojowej.
- 3) Dodanie 1 μl odczynnika STOP Solution.
- 4) Inkubację przez 10 min w 70°C .
- 5) Ochładzanie na lodzie.

Reakcja odwrotnej transkrypcji była przeprowadzana przy wykorzystaniu zestawu Reverse Transcription Kit i obejmowała następujące etapy:

- 1) Dodanie 1 μg starterów oligo dT.
- 2) Wymieszanie i wirowanie przez 1 min przy 3000 rpm i 4°C .
- 3) Inkubację przez 5 min w 65°C .
- 4) Dodanie kolejno: 4 μl buforu, 1 μl odczynnika Ribolock, 2 μl NTP i 1 μl odwrotnej transkryptazy.
- 5) Wymieszanie i wirowanie przez 1 min przy 3000 rpm i 4°C .
- 6) Inkubację przez 60 min w 42°C .
- 7) Reakcję przerywano przez 10-minutową inkubację w 70°C .

MATERIAŁY I METODY

Do pomiarów ekspresji genów przy zastosowaniu techniki PCR w czasie rzeczywistym uzyskane cDNA pięciokrotnie rozcieńczano. Próby przechowywano w -80°C.

3.10 Pomiary poziomu mRNA przy zastosowaniu techniki PCR w czasie rzeczywistym

Reakcje PCR w czasie rzeczywistym były przeprowadzane na termocyklerze RotorGene 6000 (Corbett). Mieszanina reakcyjna zawierała 0.1 μM każdego ze starterów, 1 μl pięciokrotnie rozcieńzonego cDNA, 10 μl odczynnika Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) i H₂O_{DEPC} do uzyskanie końcowej objętości 20 μl.

Reakcję PCR zapoczątkowywała 5 minutowa denaturacja w 95°C. Kolejne etapy reakcji obejmowały

- 13 cykli touchdown PCR: 15 s w 95°C, 20 s w temperaturze 68°C-55°C (zmniejszającej się o 1°C w każdym cyklu 68°C) oraz 30 s w 72°C
- 45 cykli złożonych z 10 s w 95°C, 20 s w 55°C i 30 s w 72°C.

Końcowy etap obejmował denaturację w temperaturze podnoszącej się z 72°C do 95°C o jeden stopień Celsjusza co 5 s.

Specyficzność reakcji była potwierdzana poprzez uzyskiwanie jednego piku w analizie krzywych topnienia (melting curve analysis). Każdą reakcję przeprowadzano również na negatywnej kontroli zawierającej wszystkie odczynniki z wyjątkiem cDNA. Wartości punktów Ct i wydajność reakcji, były wyznaczone przy pomocy programu Real-time PCR Miner dostępnego na stronie internetowej <http://www.ewindup.info> [Zhao i Fernald 2005]. Względna ekspresję genów wyliczano ze wzoru Pfaffla [Pfaffl 2001]:

Względna ekspresja = $E_{\text{bad}}^{\Delta\text{CT}_{\text{bad}}} / E_{\text{ref}}^{\Delta\text{CT}_{\text{ref}}}$, gdzie:

$\Delta\text{CT} = \text{CT}_{\text{kontroli}} - \text{CT}_{\text{próby}}$

E – wydajność reakcji PCR

bad – gen badany

ref – gen referencyjny

Po przeprowadzeniu wstępnych badań jako gen referencyjny wybrano ubikwitynę.

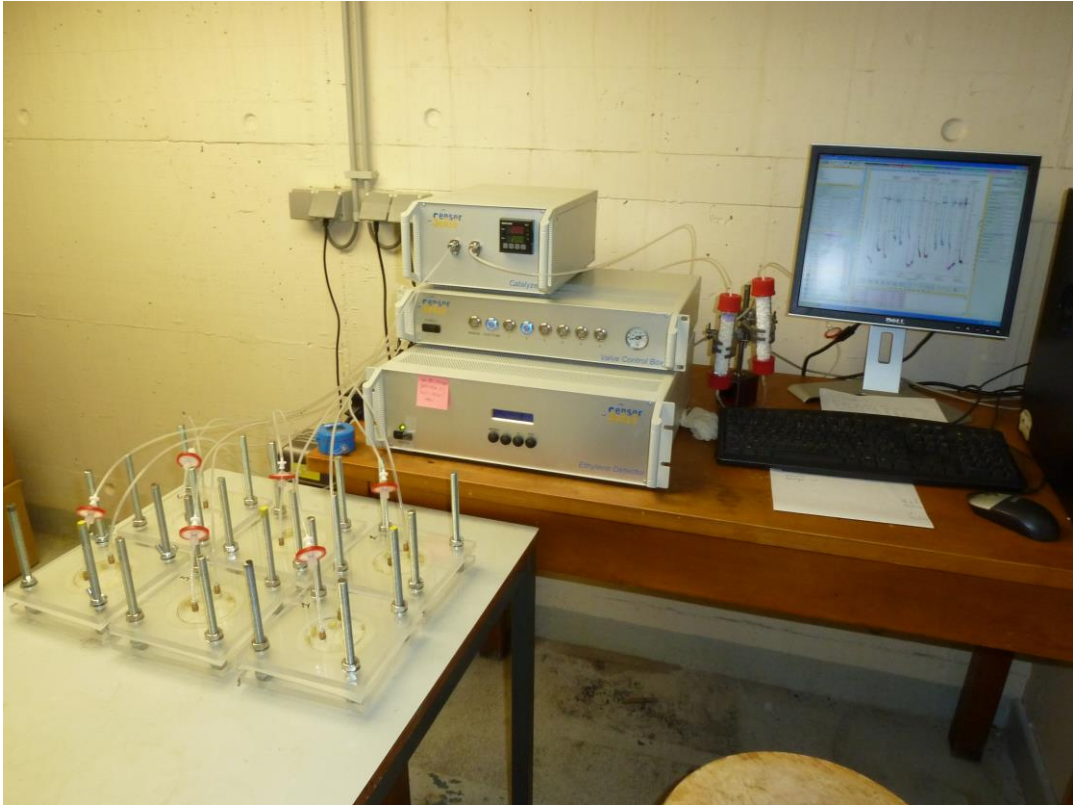
3.11 Bioinformatyczna analiza sekwencji promotorowych

Geny wykazujące ponad dwukrotny wzrost ekspresji w odpowiedzi na działanie jonów kadmu zostały wybrane do bioinformatycznej analizy sekwencji promotorów przeprowadzoną przy współpracy z firmą VitaInSilica. Sekwencje promotorów, o długości 1000 pz, uzyskan z bazy danych Soybase.org. Miejsca regulatorowe wyszukano przy użyciu programów TSSP, NSITE-PL i NSITE dostępnych na platformie internetowej Softberry (<http://linux1.softberry.com>).

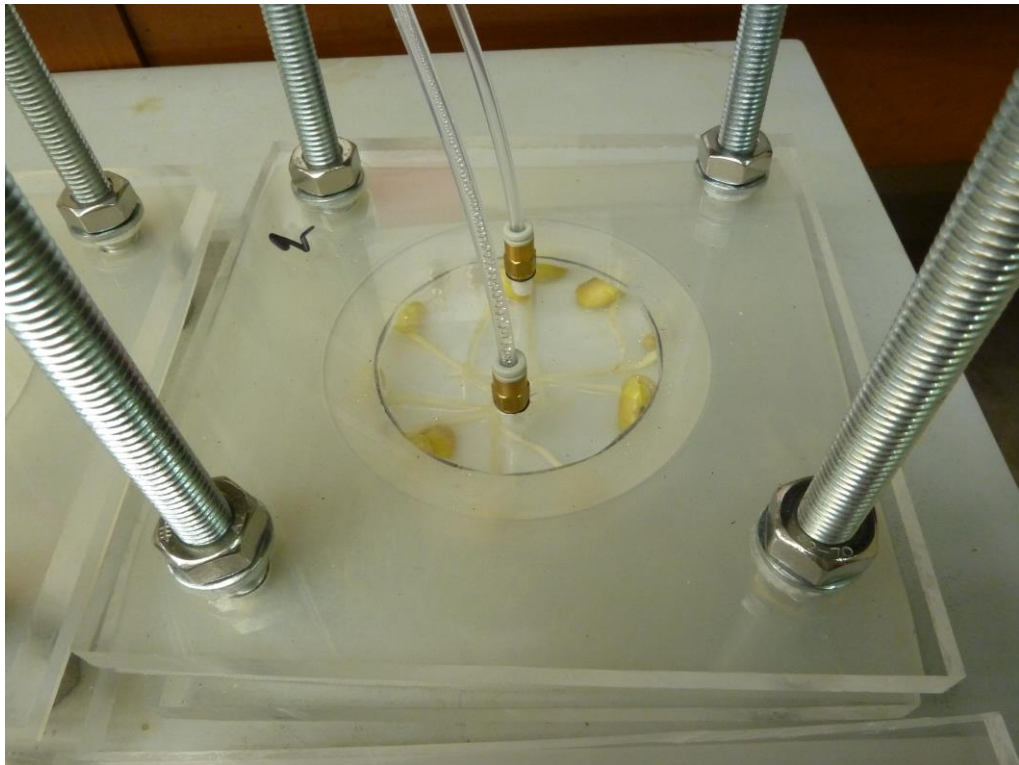
3.12 Pomiary biosyntezy etylenu

Poziom etylenu zmierzono przy użyciu detektora etylenu ETD-300 zaopatrzonego w kontroler przepływu (VC-1) i katalizator (CAT-1) wyprodukowanego przez firmę Sensor Sense przedstawionego na Ryc.10. Siewki soi umieszczano na plastikowych szalkach Petriego wyłożonych podwójną warstwą bibuły i zalewano 5 ml odpowiednich do stosowanego wariantu doświadczalnego roztworów (tabela 4). Następnie szalki Petriego umieszczano w plastikowych kuwetach i szczelnie zamykano (Ryc.11). Przy każdym pomiarze stosowano również negatywną kontrolę, którą stanowiła kuweta z szalką wyłożoną podwójną warstwą bibuły, ale nie zawierająca nasion. Pomiarów dokonywano w ciemności w trybie stop-and-flow w 12 minutowych odstępach przy przepływie powietrza ustawionym na 3 L h^{-1} .

Opisane doświadczenia przeprowadzono w laboratorium Fizjologii Roślin w Louvain-la-Nueve (Belgia) w ramach miesięcznego stażu doktoranckiego finansowanego przez Wallonia-Brussels International Excellence Grants.



Ryc.10: Detektor etylenu ETD-300 wraz z kontrolerem przepływu (VC-1), katalizatorem (CAT-1) i kuwetami z umieszczonymi szalkami zawierającymi siewki soi.



Ryc.11: Plastikowa kuweta z szalką Petriego zawierającą siewki soi.

3.13 Analizy aktywności reduktazy azotanowej

Aktywność reduktazy azotanowej oznacza według metody Gniazdowska-Skoczek [Gniazdowska-Skoczek 2000]. Około 200 mg odciętych na lodzie wierzchołków korzeni o długości 1 cm rozcierano w moździerzu na lodzie z dodatkiem 5 ml roztworu inkubacyjnego, przenoszono do plastikowych probówek, szczelnie zakręcano i inkubowano przez godzinę w 30°C kilkukrotnie mieszając zawartość probówek. Następnie próby wirowano przez 5 min przy 5000 rpm. Do 0.5 ml przeniesionego do szklanych probówek supernatantu dodawano 1 ml 1% sulfanilamidu rozpuszczonego w 1N kwasie solnym, 1 ml 0.01% dwuchlorowodoru N-(1-naftyloetylenodwuaminy i 0.2 ml H₂O. Równolegle przygotowywano próbę ślepa zawierającą zamiast supernatantu 0.5 ml roztworu inkubacyjnego. Zawartość probówek mieszano na wortexie i pozostawiano na 15 min w temperaturze pokojowej. Następnie mierzono absorbancję przygotowanych prób przy długości fali $\lambda=540$ nm na spektrofotometrze Biomate 3S (Thermo Scientific). Aktywność reduktazy azotanowej wyrażano w molach NO₂⁻ uwalnianych przez 1 g świeżej masy korzeni. Zawartość azotynów odczytywano z przygotowanej wcześniej krzywej wzorcowej.

Stosowane bufory:

Bufor inkubacyjny: 0.1 M bufor fosforanowy pH=7.5; 0.1 M KNO₃; 2% propanol

3.14 Histochemiczne wykrywanie nadtlenu wodoru przy pomocy barwienia 3,3'-diaminobenzyny (DABem)

Nadtlenek wodoru wykrywano histochemicznie według metody Thordal-Christensena [Thordal-Christensen i in. 1997]. Korzenie siewek soi były odcinane na lodzie i umieszczone w probówkach typu Eppendorf zawierających roztwór 3,3'-diaminobenzyny (DAB). Korzenie inkubowano w zamkniętych probówkach przez 8 godzin, płukano w wodzie destylowanej i fotografowano przy użyciu aparatu fotograficznego Canon EOS550D. Pojawienie się czerwono-brązowych plam świadczyło o obecności nadtlenu wodoru.

MATERIAŁY I METODY

Stosowane roztwory:

Roztwór 3,3'-diaminobenzyny: 1 mg DABu rozpuszczano w 1 ml wody destylowanej; w celu ułatwienia rozpuszczenia DABu do roztworu dodawano HCl do uzyskania pH 3.7

3.15 Pomiary poziomu substancji reagujących z kwasem tiobarbiturowym (TBARS)

Poziom substancji reagujących z kwasem tiobarbiturowym był oznaczany według metody opisanej przez Heath i Packer [Heath i Packer 1968]. Odcięte wierzchołki korzenie siewek soi (300 mg) o długości około 1 cm homogenizowano w móżdżerku w 2 ml 10% TCA (w przypadku ślepej próby) lub 0,25% TBA rozpuszczonego w 10% TCA (dla próby badanej). Zhomogenizowane próby inkubowano przez 15 min w 100°C, chłodzono na lodzi i wirowano przez 10 min przy 10 000 rpm. Następnie mierzono absorbancje supernatantu z prób badanych wobec prób ślepych przy długości fali $\lambda=535$ nm. Od absorbancji przy $\lambda=535$ nm odejmowano absorbancję nieswoistych substancji mierzoną przy długości fali $\lambda=600$ nm. Poziom TBARS wyliczano ze współczynnika ekstynkcji równego $155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Stosowane roztwory:

TCA: 100% kwas trichlorooctowy (TCA) przygotowywano rozpuszczając 250 g TCA w 113.5 ml wody dejonizowanej, a następnie rozcieńczano wodą dejonizowaną do uzyskania 10% TCA

TBA: 25 mg kwasu tiobarbiturowego (TBA) rozpuszczano w 100 ml 10% TCA

3.16 Histochemiczne wykrywanie jonów kadmu przy zastosowaniu odczynnika Dithizone

Wierzchołki korzeni o długości około 1 cm odcinano i płukano przez 10 minut w wodzie dejonizowanej na wytrząsarce. Następnie odcięte wierzchołki inkubowano przez 30 minut w roztworze Dithizone. Po inkubacji wierzchołki korzeni były płukane w wodzie dejonizowanej przez około 15 s, suszone na bibule i fotografowane przy użyciu aparatu fotograficznego Canon EOS550D.

Stosowane roztwory:

Roztwór Dithizone: 30 mg odczynnika Dithizone rozpuszczano w 80 ml mieszaniny wody dejonizowanej i acetonu w stosunku 1:4, w celu zwiększenia specyficzności reakcji do roztworu dodawano 0.5 ml lodowego kwasu octowego

3.17 Obliczenia matematyczne i statystyczna analiza wyników

Średnie i odchylenia standardowe były obliczane przy pomocy programu Microsoft Office Excel 2007. Błąd standardowy był wyliczany ze wzoru:

$$SE=SD/\sqrt{n}$$

SE – błąd standardowy

SD – odchylenie standardowe

n – liczba niezależnych powtórzeń eksperymentalnych (Cumming i in. 2007)

Wyniki względnej ekspresji genów były analizowane przy pomocy testu Mann-Whitney'a przy użyciu programu Statistica 10. W przypadku badań dotyczących zmian ekspresji w korzeniach siewek soi traktowanych kadmem w stężeniu 10 mg L⁻¹ i 25 mg L⁻¹ przez 3, 6 i 24 godziny, istotnie statystycznie różnice w stosunku do kontroli z 3 godziny zostały oznaczone przy pomocy gwiazdki (*). W przypadku pomiarów względnej ekspresji genów w siewkach soi traktowanych PTIO, DPI i CoCl₂ wyniki nie wykazujące różnic statystycznych były oznaczane tą samą literą.

Wyniki uzyskane w rezultacie pomiarów zawartości kadmu w korzeniach, parametrów wzrostowych, przeżywalności komórek i zawartości TBARS były analizowane przy pomocy testu ANOVA przy użyciu programu Statistica 10. Wyniki nie wykazujące różnic statystycznych były oznaczane tą samą literą.

4. WYNIKI

Wyniki badań opisane w podrozdziałach 4.2, 4.3, 4.4 oraz 4.5.1 zostały zamieszczone w artykule „Short term signaling responses in roots of young soybean seedlings exposed to cadmium stress” [Chmielowska-Bąk i in. 2013].

4.1 Badania wstępne

4.1.1 Wybór genów, projektowanie starterów i doświadczenia optymalizacyjne

Na początkowym etapie pracy wybrano 20 genów kodujących białka zaangażowane w różne szlaki przekazywania sygnałów. Kryteriami wyboru genów była dostępność sekwencji nukleotydowych w bazie danych NCBI oraz informacje literaturowe wskazujące na udział kodowanych białek w odpowiedzi roślin na działanie różnych czynników stresowych. Wybrane geny kodowały białka uczestniczące w regulacji poziomu etylenu, kwasu jasmonowego, kwasu salicylowego i poliamin, sygnalizacji zależnej od jonów wapnia, tlenu azotu, reaktywnych form tlenu, ATP i GTP, szlaku fosfoinozitolowym, kaskadach kinaz aktywowanych mitogenami oraz regulacji ekspresji genów (czynniki transkrypcyjne). Po przeprowadzeniu reakcji optymalizacyjnych udało się uzyskać produkty PCR w czasie rzeczywistym dla 15 genów. Ich listę wraz z kodowanymi białkami i powiązаныmi szlakami przekazywania sygnałów zamieszczono w tabeli 5.

WYNIKI

Tabela5: Analizowane geny, kodowane przez nie białka i powiązane szlaki przekazywania sygnałów.

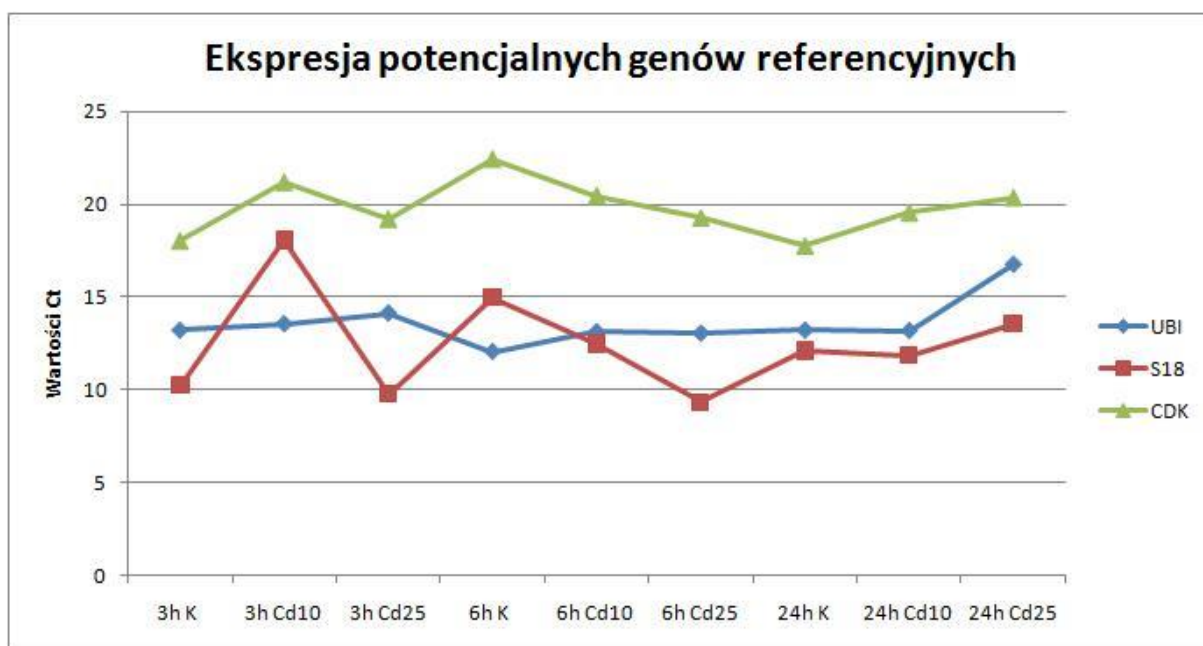
Numer genu w bazie danych Soybase.org	Kodowane białko	Funkcje kodowanego białka w szlakach przekazywania sygnałów
Glyma05g37410	Syntaza kwasu 1-aminocyklopropano-1-karboksyłowego (ACS)	ACS jest kluczowym enzymem w szlaku biosyntezy etylenu [Kumar i in. 1997].
Glyma02g14180	Dekarboksylaza S-adenozylometioniny (SAMDC)	SAMDC uczestniczy w syntezie poliamin: sperminy i spermidyny [Alcázar i in. 2010].
Glyma17g02260	Oksydaza diaminowa (DAO)	Oksydaza diaminowa bierze udział w degradacji jednej z poliamin, putrescyny. W wyniku tej reakcji powstaje nadtlenuk wodoru, mogący pełnić funkcje sygnałowe [Alcázar i in. 2010].
Glyma03g00640	Kalmodulina (CAM)	Kalmoduliny odgrywają kluczową rolę w sygnalizacji za pośrednictwem jonów wapnia [Hashimoto i Kudla 2011].
Glyma13g02510	Reduktaza azotanowa (NR)	Reduktaza azotanowa jest jednym z enzymów uczestniczących w generowaniu tlenu azotu [Gupta i in. 2011].
Glyma13g34410	Małe białko wiążące GTP	Małe białka GTP są zaangażowane w sygnalizację komórkową i regulację ekspresji genów [Ma 2009, Takai i in. 2001].
Glyma02g42430.1	fosfolipaza C (PLC)	Fosfolipaza C rozkłada bifosforan fosfatidyloinozytolu (PIP ₂) do trifosforanu inozytolu (IP ₃) i diacyloglicerolu (DAG). Obydwa uwalniane cząsteczki pełnią funkcje sygnałowe [Clapham 2007].

WYNIKI

Glyma07g32750.	Kinaza aktywowana mitogenami2 (MAPK2)	MAPK2 i MAPKK2 należą do kaskad kinaz aktywowanych mitogenami, które stanowią istotny element sygnalizacji komórkowej [Nakagami i in. 2005].
Glyma17g06020	Kinaza kinazy aktywowanej mitogenami2 (MAPKK2)	
Glyma13g42820	Czynnik transkrypcyjny DOF1	Czynniki transkrypcyjne uczestniczą w regulacji ekspresji genów [Deckert i in. 2009].
Glyma15g02620	Czynnik transkrypcyjny DOF1	
Glyma11g11450	Czynnik transkrypcyjny MYBZ 2	
Glyma04g03200	Czynnik transkrypcyjny bZIP44	
Glyma06g08390	Czynnik transkrypcyjny bZIP62	
Glyma19g44190	Czynnik transkrypcyjny bZIP78	

4.1.2 Wybór genu referencyjnego do przeprowadzenia reakcji PCR w czasie rzeczywistym

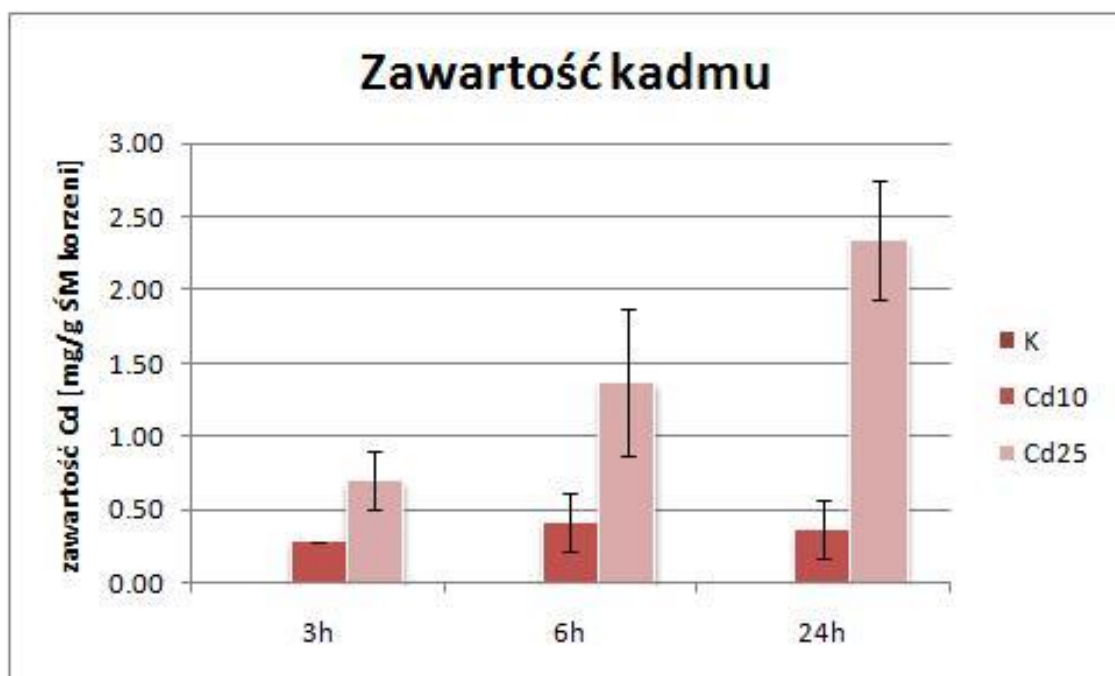
Dla prawidłowo wykonanych pomiarów ekspresji genów przy zastosowaniu techniki PCR w czasie rzeczywistym bardzo ważny jest dobór odpowiedniego genu referencyjnego, charakteryzującego się stałą ekspresją we wszystkich stosowanych wariantach eksperymentalnych. Na podstawie dostępnej literatury oraz badań przeprowadzonych wcześniej w Zakładzie Ekofizjologii Roślin (Pawlak-Sprada i in. 2011, Sobkowiak i Deckert 2003) wytypowano trzy potencjalne geny referencyjne kodujące: ubikwitynę (UBI), kinazę zależną od cyklin typu A (CDK-A) i 18S rRNA. Spośród wymienionych genów najbardziej stabilną ekspresję w stosowanych wariantach doświadczalnych wykazywał gen kodujący ubikwitynę (Ryc.12). Gen ten został wybrany jako gen referencyjny do dalszych etapów badań.



Ryc.12: Wartości Ct trzech potencjalnych genów referencyjnych kodujących ubikwitynę (UBI), kinazę zależną od cyklin typu A (CDK-A) oraz 18S rRNA (S18).

4.2 Pomiary zawartości kadmu w korzeniach siewek soi

Wierzchołki korzeni kontrolnych siewek soi nie zawierały kadmu. Wierzchołki korzeni siewki soi traktowane roztworem kadmu w stężeniu 10 mg L^{-1} zawierały mniej więcej stałą ilość kadmu we wszystkich punktach czasowych wahającą się w granicach $0.3\text{-}0.4 \text{ mg g}^{-1}$ świeżej masy. W przypadku wierzchołków korzeni siewek soi traktowanych roztworem kadmu w stężeniu 25 mg L^{-1} ilość akumulowanego kadmu wzrastała wraz z czasem i wynosiła ponad 2 mg g^{-1} świeżej masy po 24 godzinach ekspozycji na CdCl_2 (Ryc.13).



Ryc.13: Zawartość kadmu w wierzchołkach korzeni siewek soi traktowanych CdCl_2 o stężeniu kadmu 10 mg L^{-1} i 25 mg L^{-1} . Wyniki przedstawiono jako średnią z 3 eksperymentów \pm błąd standardowy.

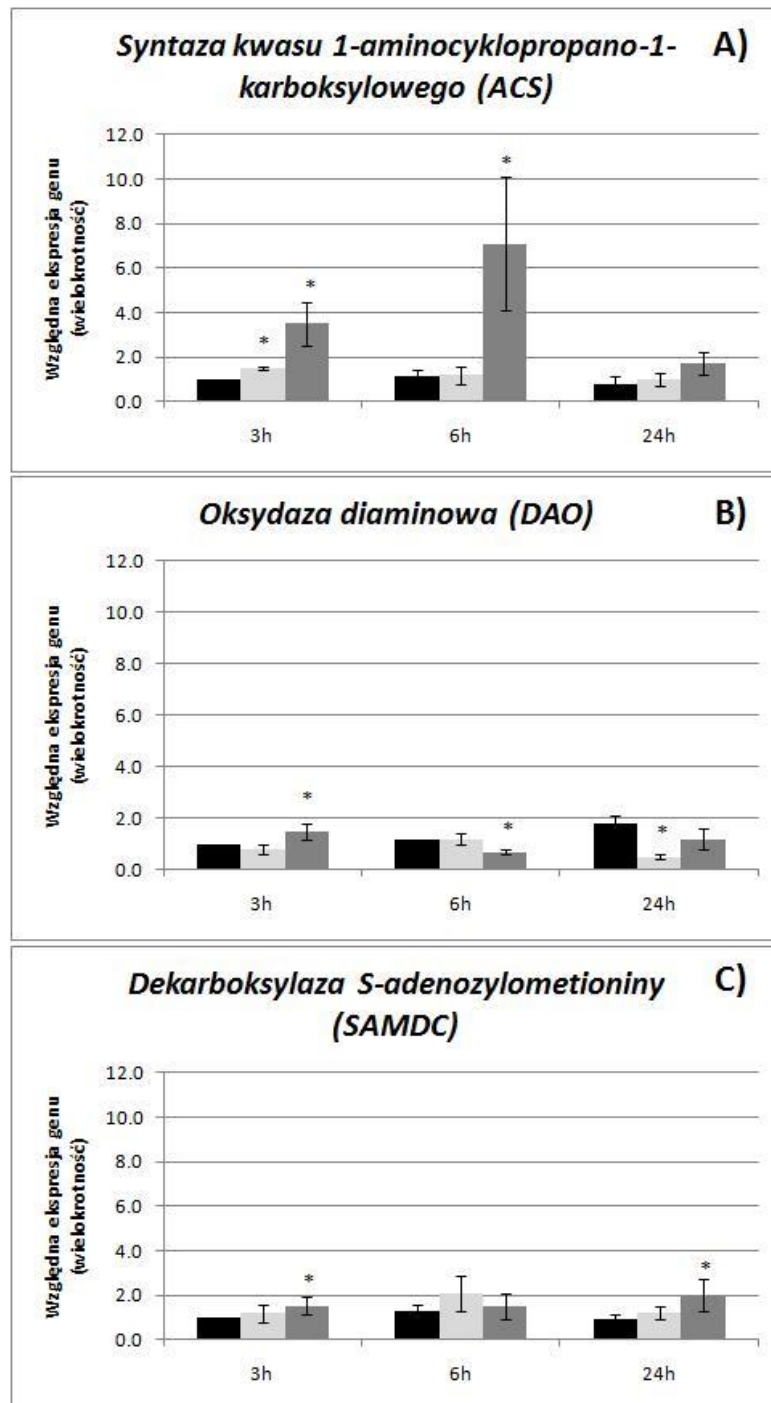
4.3 Wpływ jonów kadmu na ekspresję genów na poziomie transkryptu

4.3.1 Geny kodujące białka zaangażowane w metabolizm etylenu i poliamin

Gen kodujący kluczowy enzym szlaku biosyntezy etylenu, syntazę kwasu 1-aminocyklopropano-1-karboksylowego (ACS), charakteryzowała się wzrostem ekspresji po 3 i 6 godzinach traktowania roztworem kadmu w stężeniu 25 mg L^{-1} (Ryc.14A). Po 24 godzinach zależna od kadmu indukcja genu zanikała. W przypadku traktowania siewek soi roztworem kadmu w stężeniu 10 mg L^{-1} zaobserwowano nieznaczny wzrost ekspresji po 3 godzinach ekspozycji na CdCl_2 .

Ekspresja genów kodujące białka zaangażowane w metabolizm poliamin, oksydazę diaminową (DAO) i dekarboksylazę S-adenozylometioniny (SAMDC), była modulowana przez kadm w słabym stopniu, z wyjątkiem ponad dwukrotnego wzrostu ekspresji *SAMDC* po 24 godzinach (Ryc.14B i C).

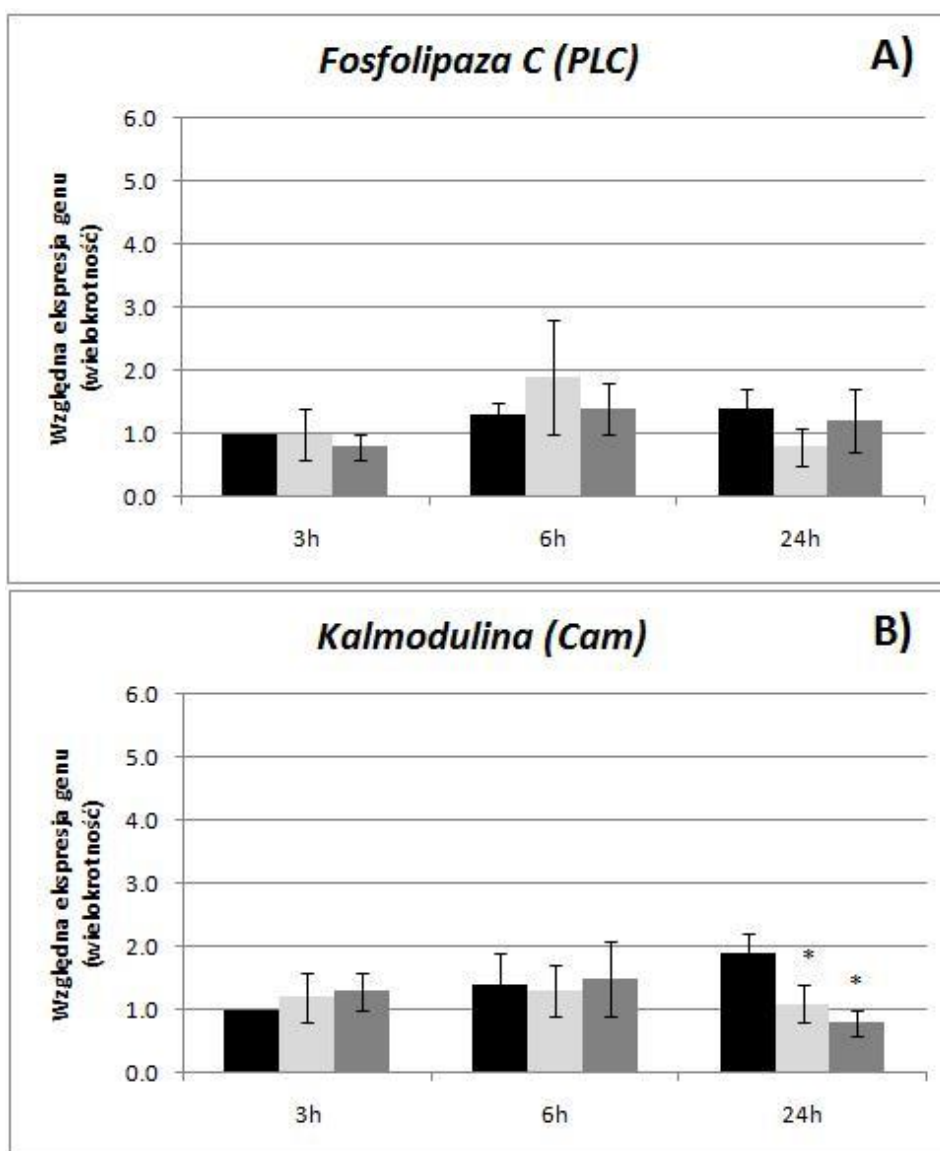
WYNIKI



Ryc.14: Względny poziom mRNA kodującego białka powiązane z metabolizmem etylenu i poliamin, ACS (A), DAO (B) i SAMDC (C), w kontrolnych siewkach (czarne słupki) i siewkach traktowanych roztworem kadmu w stężeniu 10 mg L^{-1} (jasnoszare słupki) i 25 mg L^{-1} (ciemnoszare słupki). Wyniki przedstawiono jako średnią z 4 eksperymentów \pm błąd standardowy.

4.3.2 Geny kodujące fosfolipazę C i kalmodulinę

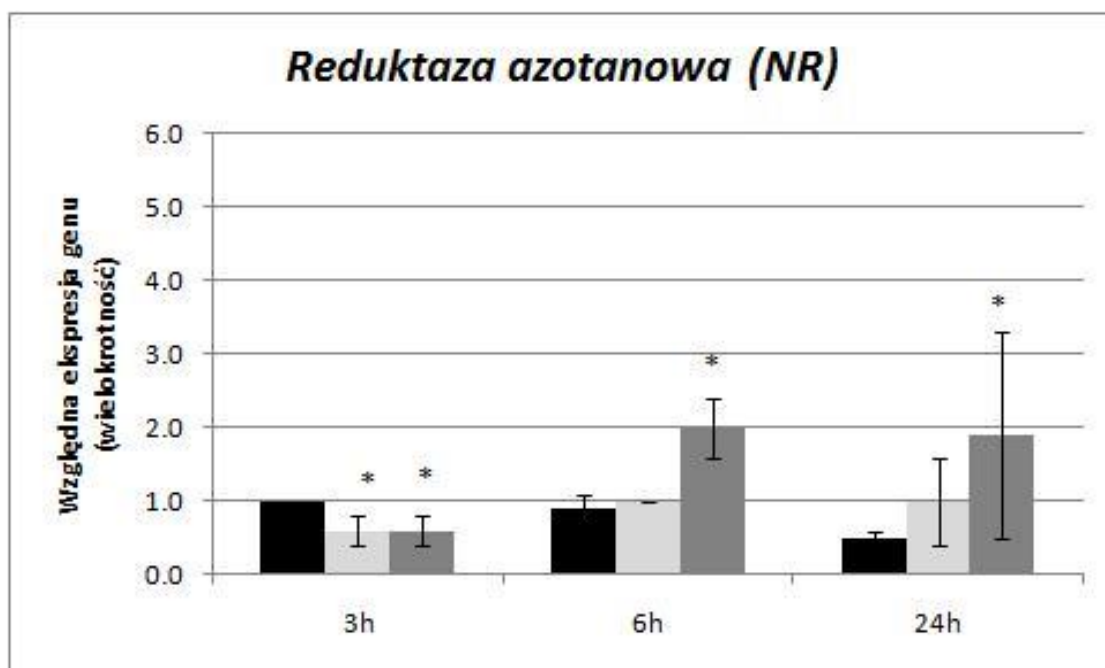
Traktowanie roztworem kadmu nie wpływało na ekspresję genu kodującego fosfolipazę C (PLC) w żadnym stosowanym wariantcie eksperymentalnym (Ryc.15A). Gen kodujący kalmodulinę (Cam) charakteryzował się spadkiem ekspresji pod wpływem działania kadmu w obydwu stosowanych stężeniach po 24 godzinach traktowania CdCl₂ (Ryc.15B).



Ryc.15: Względny poziom mRNA kodującego fosfolipazę C (A) i kalmodulinę (B), w kontrolnych siewkach (czarne słupki) i siewkach traktowanych roztworem kadmu w stężeniu 10 mg L⁻¹ (jasnoszare słupki) i 25 mg L⁻¹ (ciemnoszare słupki). Wyniki przedstawiono jako średnią z 3-5 eksperymentów ± błąd standardowy.

4.3.3 Gen kodujący reduktazę azotanową

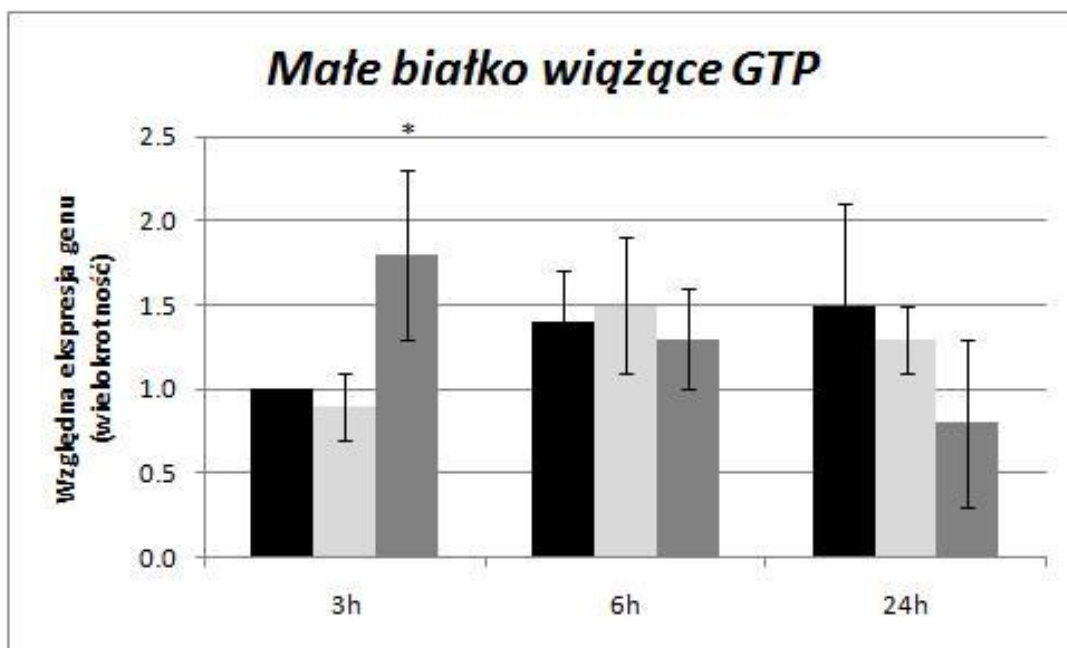
Ekspresja genu kodującego reduktazę azotanową (NR) wykazywała zróżnicowaną odpowiedź na działanie kadmu (Ryc.16). Po 3 godzinach obydwie stosowane stężenia Cd powodowały spadek ekspresji genu. Po 6 i 24 godzinie zaobserwowano ponad dwukrotny wzrost ekspresji NR w odpowiedzi na działanie kadmu w stężeniu 25 mg L⁻¹.



Ryc.16: Względny poziom mRNA kodującego reduktazę azotanową w kontrolnych siewkach (czarne słupki) i siewkach traktowanych roztworem kadmu w stężeniu 10 mg L⁻¹ (jasnoszare słupki) i 25 mg L⁻¹ (ciemnoszare słupki). Wyniki przedstawiono jako średnią z 3-4 eksperymentów ± błąd standardowy.

4.3.4 Gen kodujący małe białko wiążące GTP

Kadm nie wywierał wpływu na ekspresję genu kodującego małe białko wiążące GTP z wyjątkiem niewielkiego wzrostu ekspresji po 3 godzinach traktowania roztworem kadmu w stężeniu 25 mg L^{-1} (Ryc.17).

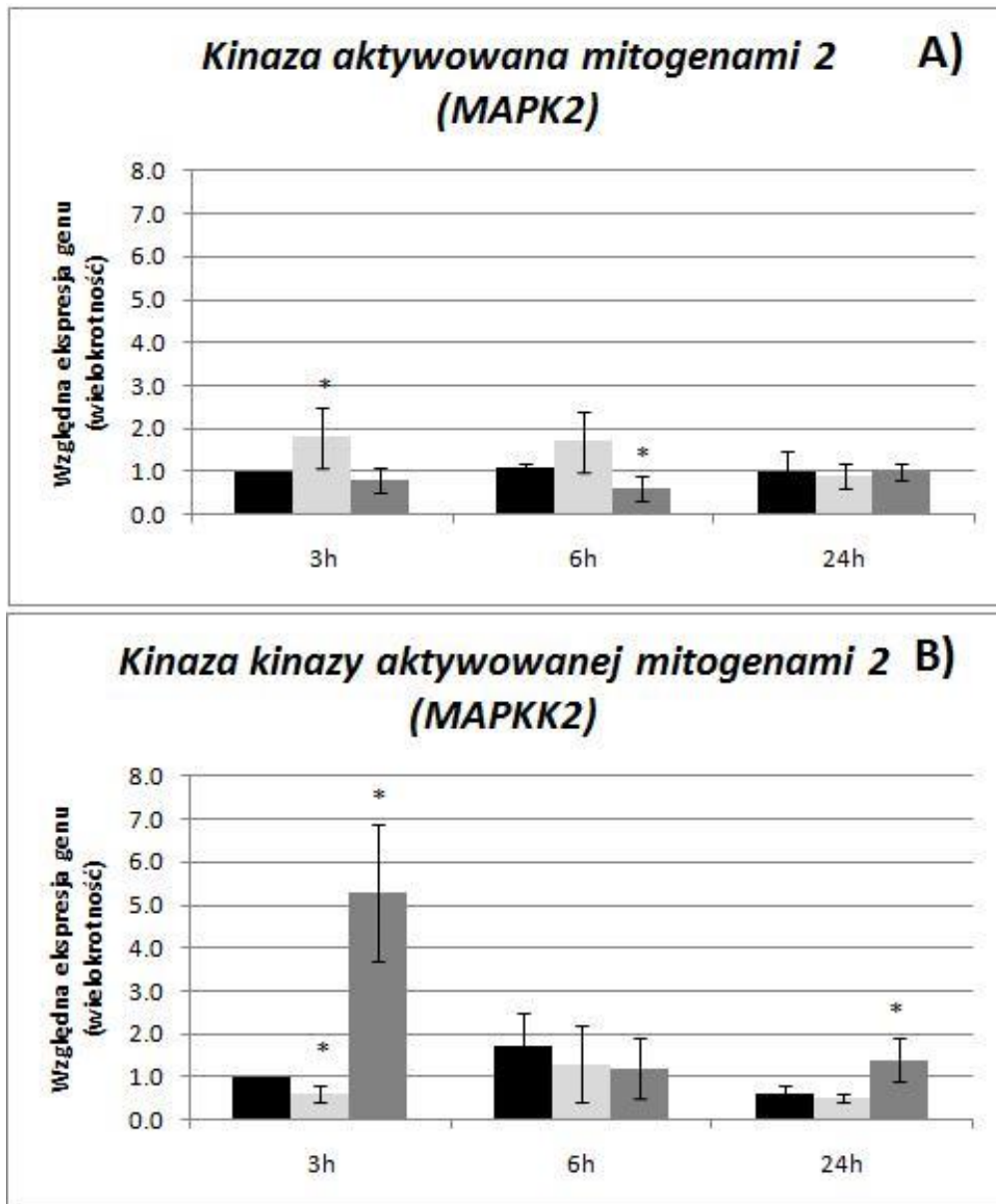


Ryc.17: Względny poziom mRNA kodującego małe białko wiążące GTP w kontrolnych siewkach (czarne słupki) i siewkach traktowanych roztworem kadmu w stężeniu 10 mg L^{-1} (jasnoszare słupki) i 25 mg L^{-1} (ciemnoszare słupki). Wyniki przedstawiono jako średnią z 3 eksperymentów \pm błąd standardowy.

4.3.5 Geny kodujące białka zaangażowane w kaskady kinaz aktywowanych mitogenami

Spośród genów kodujących białka zaangażowane w kaskady kinaz aktywowanych mitogenami, gen kodujący kinazę kinazy aktywowanej mitogenami2 (MAPKK2) charakteryzował się silną indukcją pod wpływem działania kadmu w stężeniu 25 mg L^{-1} przez 3 godziny (Ryc.18B).

W przypadku genu kodującego kinazę aktywowaną mitogenami2 (MAPK2) zaobserwowano jedynie niewielką indukcję pod wpływem traktowania roztworem kadmu w stężeniu 10 mg L^{-1} przez 3 godziny oraz nieznaczny spadek ekspresji po 6 godzinach traktowania roztworem kadmu w stężeniu 25 mg L^{-1} (Ryc.18A).



Ryc.18: Względny poziom mRNA kodującego kinazę aktywowaną mitogenami2 (A) i kinazę kinazy aktywowanej mitogenami2 (B) w kontrolnych siewkach (czarne słupki) i siewkach traktowanych roztworem kadmu w stężeniu 10 mg L^{-1} (jasnoszare słupki) i 25 mg L^{-1} (ciemnoszare słupki). Wyniki przedstawiono jako średnią z 4 eksperymentów \pm błąd standardowy.

4.3.6 Geny kodujące czynniki transkrypcyjne

Gen *Glyma13g4282* kodujący czynnik transkrypcyjny DOF1 charakteryzował się wzrostem ekspresji w odpowiedzi na działanie kadmu w obydwu stosowanych stężeniach po 3 i 24 godzinach traktowania (Ryc.19A). Obserwowana indukcja była najsilniejsza po trzygodzinnej ekspozycji na wyższe stężenie kadmu (25 mg L^{-1}).

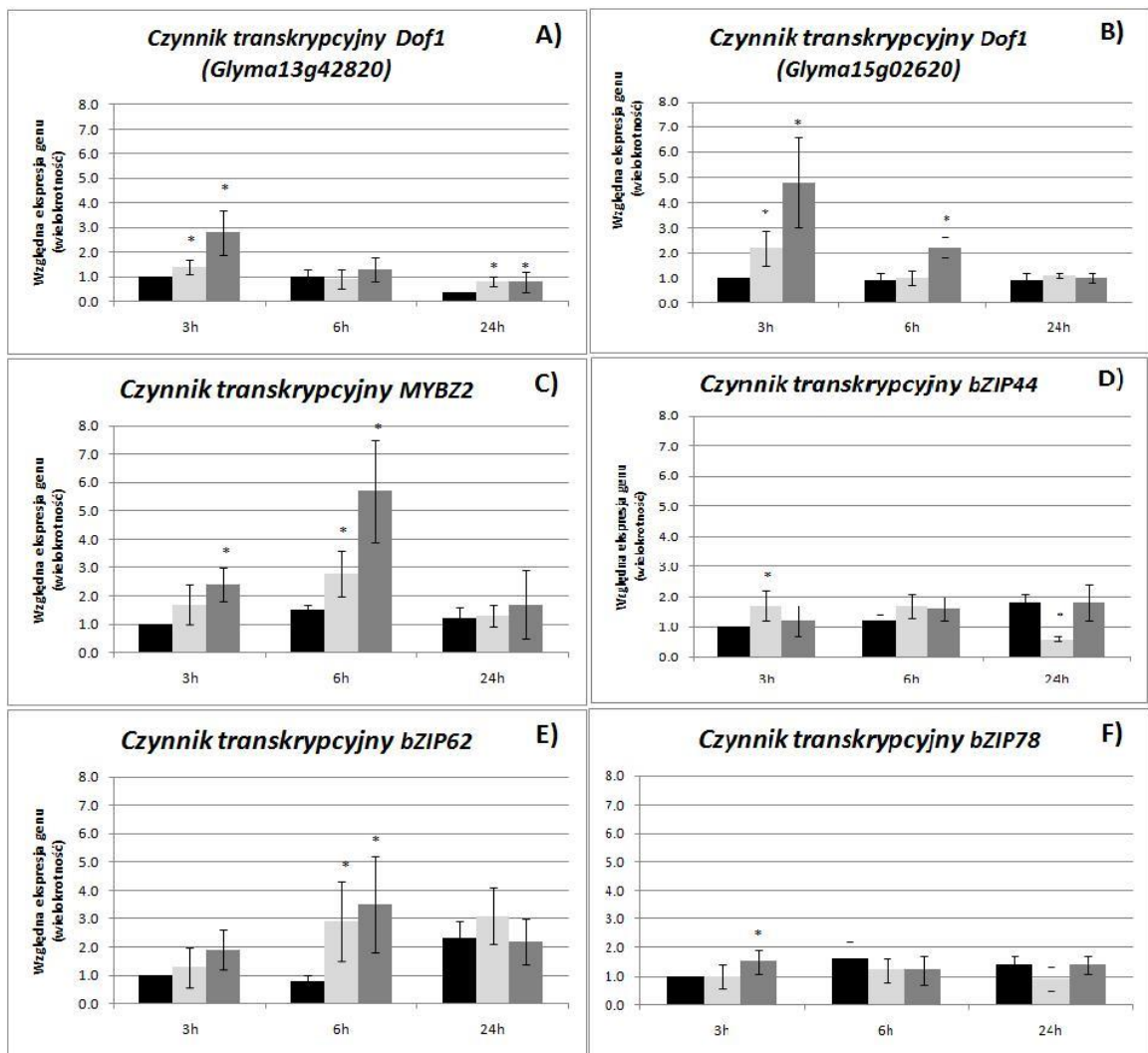
Również drugi badany gen kodujący czynnik transkrypcyjny DOF1 (*Glyma15g0262*) wykazywał wzrost ekspresji pod wpływem trzygodzinnego traktowania roztworami kadmu w obydwu stosowanych stężeniach (Ryc.19B). Ekspresja tego genu była prawie 5-krotnie wyższa w siewkach traktowanych przez 3 godziny roztworem kadmu w stężeniu 25 mg L^{-1} niż w siewkach kontrolnych. Gen *Glyma15g026* był indukowany przez kadm także po 6 godzinach traktowania.

Gen kodujący czynnik transkrypcyjny MYBZ2 charakteryzował się wzrostem ekspresji pod wpływem roztworu kadmu w stężeniu 25 mg L^{-1} po 3 godzinach oraz pod wpływem obydwu stosowanych stężeń po 6 godzinach traktowania (Ryc.19C).

Również gen kodujący czynnik transkrypcyjny bZIP62 wykazywał wzrost ekspresji w odpowiedzi na sześciogodzinne działanie kadmu w obydwu stosowanych stężeniach (Ryc.19E).

Kadm nie wywoływał silnego efektu na ekspresję genów kodujących czynniki transkrypcyjne bZIP44 i bZIP78 (Ryc.19D i F).

WYNIKI



Ryc.19: Względny poziom mRNA kodującego czynniki transkrypcyjne, DOF1 gen Glyma13g42820 (A) i Glyma15g02620 (B), MYBZ2 (C), bZIP44 (D), bZIP62 (E) i bZIP78 (F), w kontrolnych siewkach (czarne słupki) i siewkach traktowanych roztworem kadmu w stężeniu 10 mg L⁻¹ (jasnoszare słupki) i 25 mg L⁻¹ (ciemnoszare słupki). Wyniki przedstawiono jako średnią z 3-5 eksperymentów ± błąd standardowy.

4.4 Bioinformatyczna analiza sekwencji promotorowych

Najsilniejszy wzrost ekspresji zaobserwowano w przypadku genów kodujących syntazę kwasu 1-aminocyklopropano-1-karboksyłowego (ACS), dekarboksylazę S-adenozylometioniny (SAMDC), reduktazę azotanową (NR), kinazę kinazy aktywowanej mitogenami2 (MAPKK2), czynniki transkrypcyjne MYBZ2 i bZIP62 oraz w przypadku dwóch genów kodujących czynnik transkrypcyjny DOF1 (*Glyma13g42820* i *Glyma1502620*). Dla wymienionych genów przeprowadzono bioinformatyczną analizę sekwencji promotorów. Sekwencje promotorów o długości 1000 pz zostały wyszukane w bazie danych Soybase.org i potwierdzone przy użyciu programu TSSP. Miejsca regulatorowe wraz z łączącymi się z nimi czynnikami transkrypcyjnymi wytypowano przy użyciu programów TSSP, NSITE i NSITE-PL. Graficzne przedstawienie sekwencji regionów promotorowych wraz z zaznaczonymi elementami *cis* zaprezentowano na Ryc.20-27. Spis wszystkich elementów *cis* wraz z ich pozycją i łączącymi się z nimi czynnikami transkrypcyjnymi został zamieszczony w tabeli 14 w aneksie dołączonym do niniejszej rozprawy doktorskiej.

WYNIKI

-999 TATTAATATGATCTCAGTAAAAAATCAGTATTACTATGATATCTTGATTATCAATTAATATCTTGATTTATTATTATTCAAATATAA

-910 TTTAATAAAAAATACATAATTTATATAATTATAAATTATAATGTAATATTATTATGAGAACAAGAGTAATAAAAAGTAATAAAAATTAC

-821 AACTAACATAATTTCAATTCATTTGTCAACCAGTGATATTAATAATTTATCCATTTTGTATAAAATAGGCAAACAATGAACAACCTTA

-732 TCCAACCAAAATCATGATGTAGACCTAATTTTATACTCGTTTTCTTCCTCTTGTGTAATCTACAAATCAAATACACGTTTTCTTCCT

-643 CTAGTTTACAATCACATTTAATTTTTTAAAAAAAATTGAAAAAAGGAGCTATTATTTTCACCAGATTTTTTTTGAATAACCAG

-554 ATCTTC**TTTGCCGC**GGCTAAGTAAAAGAAAAATAAAACAATAAAATAAAATAAAATCAAATAAAACAGTTTCAATCGAAAG

-456 AACTGTTTCTCTCTAAAAAATA**AAAAG**AACTA**ACTTTA**TGAGCGAGATAGAATCCCTGGCGTATATTC**GTTTATTATGACATTAA**

-376 **TTAA**AAAAATCAA**AAAAG**AAAAACATTTATTATGCA**CTATTTTTTTAT**T**ATAAATAATTC****GATTTTA****TTTCTTGAT**AAAAATTTAT

-287 CT**TTTAA****TTATTAGCCA****TATTTTATCA****ACTAC**TTATCA**TTTAA**TGC**CTTTA****TTTA**AACTAAACCT**CTGGCCCACC**CGAAAGG

-198 ATATTATAGTAAAAACGGTCGTCAGCTGCAACACCAATCACTAGAATAATGATGAAACGTCCCGGAAACTAGGCAAGGGCAAGACTGTC

-109 AATTCATCGATCATCACACTAGTCACGGACGGCCCTAACAAACCTTCCCACAACACACACCCCGCCACCCTATAAATGGCACCTT

-20 AACCGCATCATTCAAACCAC⁺¹**ACGCACCTCTTTCTGATTGCTTCAAAATCACACACTCTCTTCAATTTCTAGGGTTTGTCTATTGCTT**

Ryc.21: Sekwencja regionu promotorowego genu kodującego dekarboksylazę S-adenozylometioniny (SAMDC) wraz z zaznaczonymi elementami *cis*.

WYNIKI

-998 GAATTGCTTAAGATAACCAAACAACTAAAC TTAT TATT TATATGAAAAATAGTT GGTT GATCTTCA TTTATCCATTGGGGTACTTGT TTTCT

-909 TTATGTTT TATA TATT TCTGTCAC TCTC TCTAATTT TCTT TACACGGATACT TTTT ACTT TTTATTGAAAAACATAGGATATGTATGAA

RY4; Soh; Legumin box

-820 TACATCACTTGCAC TTACT **TCA TGCAT GGA** TATT GTTCTAAT TTCT TAATAGAA TTTATCACAGACCAACACCCAAAC TTGCTTAGT

-731 AACCTAAACTAATTTAATAAAAATAAAAAAAAATCCCTATTACAT TGAT TTTT GTTT GAGGAATAACTA TTTT TTTCTTTTACATTGATT

-642 TTATTTTATTAGTATTAGTTAAACTTGGATTCAATT TTTTCAGTTAAAAAACTGGGATTCAATT TTCAATCT TAAATTAATATCCTTA

-553 ATATTAAGAGTCTAACTCAATTAATTTAATAATGT GTAAGATATTATAAGT TTTT TGAT TAAGTTCAATTCATACAATAAAATAAATA

-464 AGATAATGACAAGAGATGTT GAAATATG TAAATCTAACCTAATT TAAT GCAACTCGTCA T CATAAAA **AAAAG** GAT TGGATTGGGTTAG

SEF3 BS Dof1 BSopt

-375 AAATCTAATGT **AACCCA** AT CCTGATATAAAT TTGT GGGT TACGATAGGATGGCAAAC TTATA **AATGCAACTATTTT TTTT TATTGTTA**

AT-1 (1) SEF3 BS; SEF4 BS

AT-1*; SEF4 BS; SEF4 Bscans; S-box

-286 **AAAATGATATTTT TATTTT TAAAAATATAAAAT** TATAAATATAATAAAA TAAATACATAAATAAGT TTATAAAA **TTTAAAAATGATATTTT**

AT-1*; SEF4 BS; SEF4 Bscans; S-box S-box TATA Box; SEF4 BS; SEF4 BScans

-197 **TATTTTAAGAAACAAAATCCTAAATTAGT** GAGAATGCAAAACT **TTTAA**ATACTACTCCAT **TTACTATAATTTTGGAA**TATAAT

CArG3 (AGL3)

-108 TGGTCTGACATAGCCATAGTACACAGTCTTTT TCTCGATACTTGGTTT GGTTACGTCTCT TTCCCACGACGCCTCTATA TAACTCGCC

+1

-19 CAATCCCTCCATCTTTCAC **TCGTTCAAAAACAAAACATTCTACCTTCTCCAAAACCATCCAAC TCTCATGTTCGAAGAAAACA TACAC**

+71 **AACTCTTCAAAC TCTAATTTTCTTTTCTTTT CATTAAATTTCTCAATG**

Ryc.22: Sekwencja regionu promotorowego genu kodującego reduktazę azotanową (NR) wraz z zaznaczonymi elementami *cis*.

WYNIKI

ACE1-like

-998 TTAGCAATAGCAATTATTCTCTTTTCAATTTTGATATCATATTAGTTTAATTTTCATAAGATCGAGT ATAT TGCT GAAT CATATGTTA

-909 CCTGAAACAATT TAACAAACGCAACATT AATCACTGTTAAACATGATATCTGGGTATTAGCAGAGTCGCAAAAAACGATGGAGAAATG

-820 AGAAAAATCAATATTGCCAACTTACTCTCTTTGTTAATGTCAATAGGCTTCCTTTTCTTTGTTAATAGAAAACTAGCTGAAAGAATCT

-731 TAAGAGACGGCAATAAACTTTTGCAAAATTTAAAAAGGAAGAGAATGACAGTGACACATTAGATAAGGGATTGAGGAGCTAGTCTCTGC

-642 TTAAAAAATAATGGCAGCAAAACACATAAATCTCCATCATCTTATGAACCGTCCAATCCCAACAATTTATAGACACCATCATACAG

MRE-like

-553 TTGCACAC TCACATACAATTTCACGAATATCAATTAATTTAGCCATTATATAAATAATGAGTTTGTGT TTTT TATGCAATGTATCATT

SEF4 BS

-464 GGCATTTTGTCTATATTAATGTTGGTATATGTGAGAAAGAATATTGAAATGCTTTTATTAAAAAGTGTGCGTTGAT TAATTTTTTTAT

S-box

SEF4 BS

AT-1; AT-1(2); Dof1; Bsopt; AtMYB77 BS

Myba

Dof1 BSopt

-375 TTTAA GTATATGATTAAGCAT CAATTTTTTATATA TGATATAAAAAATA TAACAAAAGAGTAA CGTTG AAAAG CGTCTCCTTG

Alfin1 BS2

WB; Zf-box

Dof1 BSopt

C2b-BS; G-box motif; G-box; Motif j/k; Em1a; Em1b; G/A-box

-286 AATAACTTTGATAT GTGGAG AATTAGA ATTTGACT CATGACT AAAAG AATCCAAATGTTTAT TGATACGTG TTGAAGATTCAAT

TATA Box; AT-1*; SEF4 BS; ECE2

ABRE-like

-197 TTTTAGGTATATAT AAGAGTAAGTATCGAAAAATCATCTCCTTAAATAAATTTTATACACAAAGAAATTAGTATTTTACTCTTGACA

-108 ATAAAAATAATCCAGATTTAGAAGGATTTTTTTTTT TAGAAAAAGAAGAAATGTGGAGCCGGGATAAATGGCTACAAAGTCTGAAAAGT

+1

-19 CAACAACAGTTCATCTTC AAGCTGCTCTTTCTTCAATCTTCAGTTCGTCAATAGTGACTGCTCTCTTTGTCAACCAATCACAATT

Ryc.23: Sekwencja regionu promotorowego genu kodującego kinazę kinazy aktywowanej mitogenami2 (MAPKK2) wraz z zaznaczonymi elementami *cis*.

WYNIKI

```

-999   ATAGTTGCATGTCTTTAGCTGCATGGCCAGGGGAACAACATAATTTCCAGCATAAAAATAATGGACAAACTCTTGTGTCAATCCAA
-935   ATATTGTGAGTTTATTTATTTTTCTTTGGCATATATCACATCACATCTTTTACATTTTTGCAAAACATATATT CCTTTTTTGG CArG Box: EM1TT
-830   AAAAAAGAAGAAGAAAGAAGTAAGATTATTTTCATCTTAGTTGAAGTAGGAAGGTCATTTACTAACAGGATGCGTGTAATTCA
-745   AGCACTAGTCATGTGACTCACGGGTGGATGGCAACCAGTCAAGTTGCGTTGAGTCAGATTTCTTTTGA TGCATATTATTATTATT AT-rich FF1
-660   ATATGTGTCTCATTGGAGGAATGATATTTGTAGAGTTTGAAATGAAAGATATAGGAAATGTATTTGTAGGTATATAGTATCGCGG
-575   TAGGCGAAGCCATGCATGGGTGGCGTGTTGCACGGGGAAGAGACACCGACATGACTCGACGGTGGTGATACACACATGCACACGC
-490   ACGCTGGCTGTTGAAATTGAGTTTGAAGGACACATAGACACACTTCCTTCTCTTTGTAATTTTTAGATTTGATTTTTATGA
-405   TGTCTTTATTTTTTTTTTTTTTTGCTTTTCAAACGATTTAGTCACAACTTTTCA AAACGAGATCGTTT Box BTAAAGAGACAGTACA
-340   GAAACAGCATAAAAAAAGATAGAAGAGAAGCCAAATTGGTAATTTTGG GGTCCCAT NBE box 3TCCCATGACACTCTTCTCATGCAACAT
-235   CCCACCAATGTATACTCA GAATAATTC HSE4ATTATCAGCG CACACGTGT Em1b; GboxCATCAAGTAGTCC TACGTGG GGC BoxIII; ABRECACCTAATGACTCATG
-150   TATGTGCAGGAGGACGGTGGCTCTCTTGAATTATAATCCATCAGGGCCTTGGTTACACATGCTCCCTTACCATTTCCACATCACA
-65   GCCACACCAGTCGACTATCAAGACTCGAAACAGCCAAT AAAAAG Dof1 BSoptGCAAACCCGTGGGACCATCT ATTGAGTGTGTAATT +1GACT
AGTTTATGATTATTTTTTAAATTCAAATGTTTTAGATATGCAATTGTACTGAATTGAAA

```

Ryc.24: Sekwencja regionu promotorowego genu kodującego kinazę czynnik transkrypcyjny DOF1 (Glyma13g42820) wraz z zaznaczonymi elementami *cis*.

WYNIKI

```

-999      AATTATGTTTTGAATTAATATTTGTTTTAAATTTTCTAATAGTAAATCATATCTCTAATTTTATCCATGAAATAAATAATAAATA
-935      TTTTTTAACTTACTATTTATTAAATAAATTACTTATTAAAGTTCAAATAAATTATGTAAAAATATTGATCCATCCTTTGATATGAA
-830      ACCATAAATTACAAGTAGCTTTAAAATATGGCCGAGTATACCGTGGGGGAAATGAGATCAGAAGTTAAATTCAAACCTATGAAA
                                     At-TCP20      Alfin1 BS2; PacC BS1
                                               At-TCP20
-745      ACTATATGCAGATTCATAAGTACTTATAATAATATGCTCTGATTAGAATTGAAATTTCACTTACATTAATGAAATATAACCCTAA
-660      ATCTCTAATGCTCATTGAAGATCAACACCAAAAACACTTAAGGACTTGCATCCAATTTTGACTTTGTCAAACCTGACCCAGCAAC
-575      CCAACATATGTGTTGCATAAATGATATTGAAACTTGTGGATAGCAGAGTGGTCCAGTATTAACACAGCATCAGCAATGTATATG
-490      GTCCACAAGAGCTCACTTTGAGAGTTCATTTAAGATGATCACACATCAAGCAGACAGACACAACTTGATCGACCAATAATAAGAC
-405      AACTAGTTCAAATTGAAATTAGTTATGGTGCATCCGATGCTTTCTTTTAGGCTGATTCCCAAATATTCATATCTAGAATGAAC
-320      ACAACAAAATCCTAGATTTTCTGGTAGAAATCCACTGAAAGAACTAAATATTCTAGAATGAGGAGGACCAGTGGA AAAACAATG
-235      GCCAAGTTGAAACTTAAGAATAAAATATAACAAACATGCATTATAGGTTTTTTTTTCTTTGAACCTTGTGAACTCCATTGA
Dof1 BSopt      Dof1 BSopt
-150      AAAGGTATATTA AAAATTTAAAAGTCTACAATTTGTGTATAGTGCAGTCTGGATCTCAACCAAATTC AACGAAACCTCACTCCA
Dof1 BSopt      ABRE      B2      +1
-65      TCCACTACCAAAGTATTTAATTAAGCAACTTGTCGTCAGTAGGGCACTACCATAACATACATACATACATACATACAGCCATAGATAC
TCGAAAAAGCTATTATTAAAAAAGCATATGACAAACTGCGCGTGTA AAATACACATATATAGATTAAATAAATTAGA
  
```

Ryc.25: Sekwencja regionu promotorowego genu kodującego kinazę czynnik transkrypcyjny DOF1 (Glyma15g02620) wraz z zaznaczonymi elementami *cis*.

WYNIKI

-885 AATAGCCAACTACTGATACATTTCTTTTCAGGAATTGCCCGTTGCGACTAACTTACC GAAATTGCTAATTTTGTTAAGGGAAATTATTAA

-796 ACCCACATGAAAGCTCTTATGTTTAAGGCATGGTATGACTGGTATCCACATGTTAATTCTGCATTGTACTATTACTGTATTTCTACA

-707 TTAATTAAGTGGTGATTTTCACTGAACTAGTAAAAATAAACTAGTGAATAATTGTTAGTGCCGTAAAACGTACTATTATTAGAGTAT

-618 ATCAAATTATGTTAATCATTGATGATAAAATTGATGTCAGAACTGTTGGACATGTAACATTTTTTATA TATAATTAGAAACAATG

SEF4 BS A1

-529 TTTGAAAGATGAGAGGTTGTAACATTCCAAGATAATAATAAGAAATCAAACCTCAACGTTTAAAGTAGGTAGATCCTGCTAATTAGGTC

CHR T-box S-box ERE1; ERE2; WA

-440 AAATCAAATAATAAAAGTCTCTCTAACTTCAATTTGATCCATGTACATGCAGGTAATGAAAGGCCAATTTTTTAACTCCAAA

A/T-rich BOX1; Dof1 Bspot E-region ATMYC BS; RY SEF4 BS S-box

-351 TGATTAATAATAGAGGTAGCTTACTCCTTACTTAAACACAGCTTGACATTTTCATTGATCAATTATTGAAGAAAGAACTGATGGAGA

TATA Box -141 sequence

-262 GATTTTTTTTTTACCTAGCACAAAGATAGT TAGTAACCAGGTTGGGTTTTATATTAGGGGTAAGCATATGAGATTATATAAATA

-173 TGTTCTCTTTTTCTAAAAGAGGCAAGAGATCACATCTTGTCTTGCCCTACCATACTTTAATACATATTCTACTTTACACCAACCTGAAG

CRA1-III

-84 GTTACCCATAGTTAATGTCTTTTAACTAGTTATATCATTGATGCAAATACAGTAGTATAAATATATCATCAGACAGGGGATGAGAGAGA⁺¹

+6 GACAAGAGGCAC TCTCTTTAACCTGTCTCACCAACTCGCATCTAGAAGCAATAGGGTCTCCCTTTTCTCTCTATGTCTCCTTTGGAGT

Ryc.26: Sekwencja regionu promotorowego genu kodującego czynnik transkrypcyjny MYBZ2 wraz z zaznaczonymi elementami *cis*.

WYNIKI

hex3; CE3

-999 TTCAATTTTGGACGGGTGTCGGGT GAAT CCTATTCCCATCCCTTAT TCCCCTT TGTT CAAATCTATTTT GAATATGTATTAGAAT T

-910 ATTCTAATGTTT TTTTATTGATAACAATAACAT CATATTGCAAGAGAAAATTA TATAAAGA CAAGATTAATAAATTT TACACAAATATAA

AT-1 (4)

-821 TAACAAAACATATTAATTCT TTTT GAGT TTAA TACACGATATTGTAAATATTTTTATCTATT GTTCAATCATAAATCATTTT TAATA

-732 ATATTTAAAATAATTATCATAGAAAATTAATAAATTTATTT TATA TGAT TGAA TGAT GTAAGATT TTATACACTATTATTA TATAATCAT

S-box

-643 TTTTTCATTCTTTTATAATACAATTA TACTCCCTTATGTTTAAATACAAGATTTTCTTTAGAAATTCGTTTGTCTTGTTATAAGATGT

SEF4 BS S-box SEF4 BS AT-1* S-box

-554 TTTTAAATTTTAGATGTATTAATTTATTTTTTTTTATATTTTTATTAAATTTTAAATATTAATGAGAAATAAA TAAGTGAAT

S-box

-465 AAAAAAAAAAATTTAAATAATTATAATAATAAATAAT TGATAAATTTAACTAATAATTTATTTTCAAGAAATATAAATTAGTTAAGA

AT-rich G TATA Box Dof1 BSopt

-377 GTATTTTAAATTATAATAATTA AAAAGGAGGGAGTATAACTAACAAAGGACCCAAATCCAAATATTT TACAGAAATCAACGGCGAAAT

BC-2

-288 CAAGAGGAATTTAATTTAGCCCCAACC GTAATTTTCACTATACTACGTGTAGTTCACGAGCGGTTCCACGATT CGTAGATAAACGG

ABRE-like; GBF1 BS7

-199 TCAAGATTCATCAGGTTCAAACACGTAATTTACACGTGACGGATTAGGTCACTTTCGTAATTTTCAGTCACCAAAAACTTTT TCTGG

ABRE-3; G-box

Reg: GCC box; MBSII; GCCGCC-ERE

-110 TACGTTTTAATGTTCAAGTCCCGCCATACTTTTCCATTT TTTT TTTCCGAAGCACACGTTCATGCACATTGGCTTCTTCATTTATAC

Reg: 3'-Ill element +1

-21 CCCACAAGCTGCTGCTCTCATTCCCTTTTCCCTCCCTATTCTCTCTCTACTGTTAACGTTTTC TGTT TTTCTTTAAGATGGCGATGAC

+69 GACAACGACGGAG...

Ryc.27: Sekwencja regionu promotorowego genu kodującego czynnik transkrypcyjny bZIP62 wraz z zaznaczonymi elementami cis.

WYNIKI

Analiza wykazała, że badane geny zawierają szereg *cis*-elementów rozpoznawanych przez czynniki transkrypcyjne, które ze względu na posiadanie zasadowego regionu suwaka leucytowego, zaliczane są do rodziny czynników transkrypcyjnych bZIP (tabela 6). Wiele białek należących do tej rodziny odgrywa rolę w roślinnej sygnalizacji hormonalnej oraz w odpowiedzi roślin na działanie czynników stresowych (Jakoby et al. 2002). Analizowane sekwencje promotorowe zawierały również inne element regulatorowe powiązane z odpowiedzią roślin na działanie czynników stresowych (tabela 7). Kolejnym wynikiem bioinformatycznej analizy sekwencji promotorowych było odnalezienie szeregu miejsc regulatorowych związanych z przekazywaniem sygnału za pośrednictwem etylenu lub kwasu abscysynowego (tabela 8).

WYNIKI

Tabela 6: Motywy regulatorowe znajdujące się w sekwencjach promotorów badanych genów rozpoznawane przez czynniki transkrypcyjne należące do rodziny bZIP. Litery zapisane małym drukiem oznaczają nie dopasowane nukleotydy. Skrót literowy: A – adenina, C – cytozyna, G – guanina, T – tymina.

Element <i>cis</i>	Badany gen	Sekwencja nukleotydowa element regulatorowego	Wiążący się czynnik transkrypcyjny	Udział w sygnalizacji hormonalnej lub odpowiedzi na czynniki stresowe
Em1a	<i>ACS, MAPKK2</i>	ACGTGgcg	EmBP-1	Czynnik transkrypcyjny EmBP-1 jest powiązany z odpowiedzią roślin jęczmieniu na działanie stresu osmotycznego i z sygnalizacją za pośrednictwem kwasu abscysynowego (Hollung i in. 1997).
Em1b		ACGTGccgc		
Em1b		<i>DOF1</i> (Soybase: <i>Glyma13g42820</i>)		
ABRE	<i>DOF1</i> (Soybase: <i>Glyma15g02620</i>)	tGGTCAatTc	ABI3	Czynniki transkrypcyjne należące do rodziny ABI uczestniczą w sygnalizacji za pośrednictwem ABA (Fujita i in. 2011)
bZIP28 BS	<i>DOF1</i> (Soybase: <i>Glyma13g42820</i>)	GACACGTG	bZIP28	Rodzina czynników transkrypcyjnych bZIP uczestniczy w regulacji wielu procesów w tym w odpowiedzi roślin na działanie hormonów roślinnych oraz biotycznych i abiotycznych czynników stresowych (Jakoby i in. 2002).
T-box	<i>MYBZ2</i>	AACGTT	bZIP factor	
G-box,	<i>ACS, MAPKK</i>	cACGTG	TAF-1	Elementy G-box są zaangażowane w odpowiedź roślin na działanie różnych czynników, w tym hormonów roślinnych (Menkes i in. 1997).
Motyw G-box	<i>bZIP62</i>	ACACGTGaC	GBF	
Sekwencja -141	<i>MYBZ2, SAMDC</i>	gcttttgaTGACtTcaaacac	TGA1a; PG13;	Czynnik transkrypcyjny TGA1a pośredniczy w indukcji dwóch S-transferaz glutationowych w roślinach tytoniu poddanych działaniu ksenobiotyków (Johnson i in. 2001).

WYNIKI

G/A-box	<i>MAPKK2</i>	tGATACGTGGTt	STF1/HY5	Czynnik transkrypcyjny HY5 jest zaangażowany w sygnalizację aktywowaną przez światło UVB, akumulację antycjanów w odpowiedzi na działanie niskiej temperatury oraz zależną od ABA regulację syntezy etylenu (Li i in. 2011, Ulm i Nagy 2005)
CE3	<i>bZIP62</i>	GACGgGTGTC	TRAB-1	Czynnik transkrypcyjny TRAB-1 pośredniczy w sygnalizacji zależnej od ABA w ryżu (Kagaya i in. 2002)
Element 3'-III	<i>bZIP62</i>	ATaCCCCACA	GBF	Czynniki transkrypcyjne GBF tworzą liczną rodzinę czynników transkrypcyjnych łączących się z elementami G-box powiązanymi z odpowiedzią roślin na działanie różnych bodźców, w tym hormonów roślinnych (Menkes i in. 1997, Sibérl i in. 2001)

WYNIKI

Tabela 7: Elementy regulatorowe znajdujące się w sekwencjach promotorów badanych genów powiązane z odpowiedzią roślin na działanie czynników stresowych. Litery zapisane małym drukiem oznaczają nie dopasowane nukleotydy. Skrótów literowe: A – adenina, C – cytozyna, G – guanina, T – tymina, R – puryna, Y – pirymidyna, W – adenina lub tymina, D - adenina tymina lub guanina, N – jakkolwiek nukleotyd.

Element <i>cis</i>	Badany gen	Sekwencja nukleotydowa element regulatorowego	Wiążący się czynnik transkrypcyjny	Udział w odpowiedzi na czynniki stresowe
Dof1 BSopt	Obecny we wszystkich badanych genach	WAAAG	Dof1	Zaobserwowano indukcję genu kodującego czynnik transkrypcyjny w korzeniach amarantu poddanego działaniu suszy (Huerta-Ocampo i in. 2010).
ACTTA" motif	<i>SAMDC</i>	gcttttgaTGACtTcaaacac	NtBBF1, DOF	
G-box	<i>ACS, MAPKK</i>	cTACGTGgcca	nieznany czynnik jądrowy	Elementy regulatorowe G-box są zaangażowane w odpowiedź na działanie wiele bodźców, również hormonów roślinnych (Menkes i in. 1997).
CARg box	<i>DOF1</i> (Soybase: Glyma13g42820)	CCTTTTTTGG	FLC	Czynnik transkrypcyjny Flower locus C (FLC) jest represorem kwitnienia. Zmiany ekspresji FLC zaobserwowane pod wpływem działania zimna i stresu kadmowego mogą być przyczyną anomalii w czasie kwitnienia (Kim i in. 2004; Wang i in. 2012).
HSE4	<i>DOF1</i> (Soybase: Glyma13g42820)	GAATAATTC	HsfA2	Czynnik transkrypcyjny HsfA2 odgrywa rolę w odporności rzodkiewnika na wysoką temperaturę oraz stres solny i osmotyczny (Ogawa i in. 2007)

WYNIKI

AtMYB77 BS	<i>MAPKK2</i>	rdygRCRGTTTRs	AtMYB77	Ekspresja genu kodującego AtMYB77 wzrastała w odpowiedzi na działanie etylenu, kwasu salicylowego oraz kwasu indolo-3-octowego (Yanhui i in. 2006)
myba	<i>MAPKK2</i>	CGGTTG	Myb	Czynniki transkrypcyjne należące do rodziny MYB są zaangażowane w odpowiedź na wiele biotycznych i abiotycznych czynników stresowych (Dubos i in. 2010, Yanhui i in. 2006)
WB	<i>MAPKK2, MYBZ</i>	TTTGACT, GGTCAAA	WRKY1	Ekspresja czynnika transkrypcyjnego WRKY1 wzrastała w rzodkiewniku w odpowiedzi na działanie czynników genotoksycznych (Chen i in. 2003)
Alfin1 BS2	<i>MAPKK2</i>	GTGGNG	Alfin1	Czynnik transkrypcyjny Alfin1 może odgrywać rolę w odporności na zasolenie (Bastola i in. 1998, Winicov 2000)
MRE-like	<i>MAPKK2</i>	TGCRCNC	Nieznany czynnik transkrypcyjny	Elementy regulatorowe MRE uczestniczą w odpowiedzi roślin na działanie metali ciężkich (Qi i in. 2007)

WYNIKI

Tabela 8: Elementy regulatorowe znajdujące się w sekwencjach promotorów badanych genów powiązane z przekazywaniem sygnału za pośrednictwem etylenu lub kwasu abscysynowego. Litery zapisane małym drukiem oznaczają nie dopasowane nukleotydy. Skróty literowe: A – adenina, C – cytozyna, G – guanina, T – tymina.

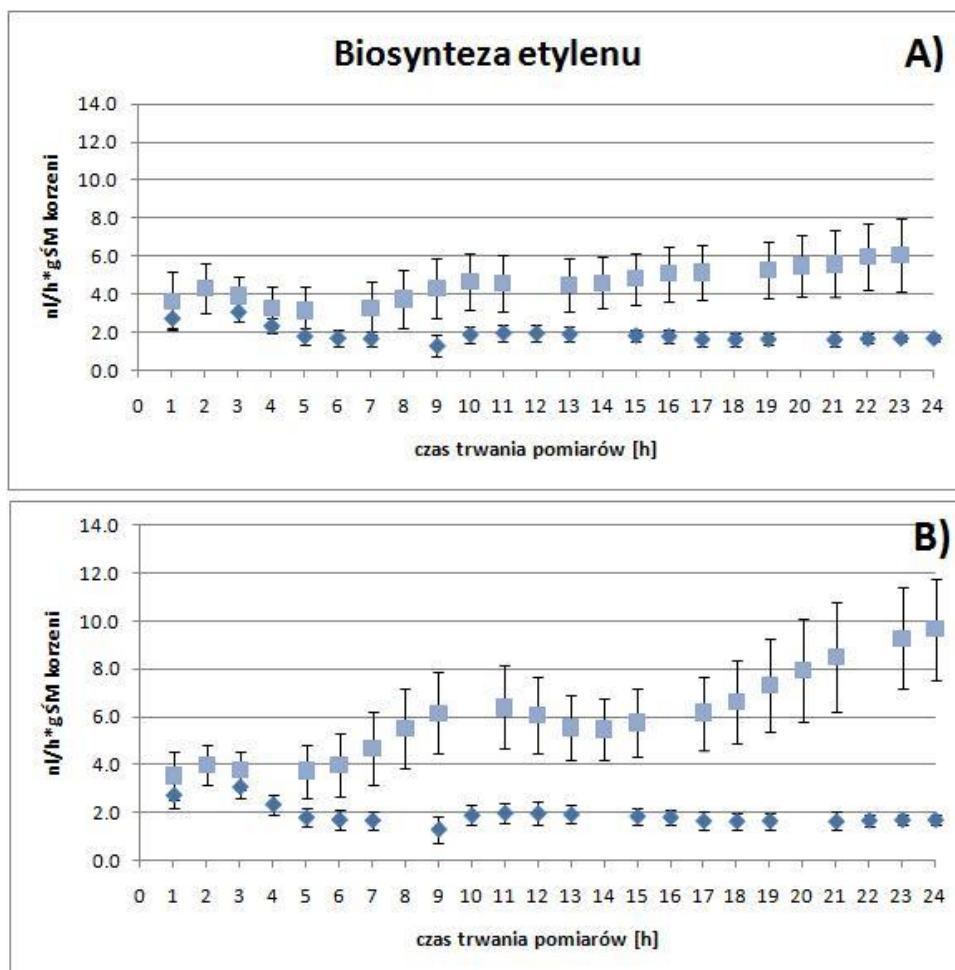
Element <i>cis</i>	Badany gen	Sekwencja nukleotydowa element regulatorowego	Wiążący się czynnik transkrypcyjny	Udział w sygnalizacji hormonalnej
ABRE	<i>DOF1</i> (Soybase: Glyma13g42820)	GTACGTGGgGC	Nieznany czynnik jądrowy	Elementy <i>cis</i> ABRE są komponentami sygnalizacji ABA (Maruyama i in. 2012, Agrawal i Jha 2010)
ABRE-3	<i>bZIP62</i>	ACACGTGaC	B.napus białkowy czynnik embrionalny	
ERE1	<i>MYBZ2</i>	tGGTCAatTc	Nieznany czynnik jądrowy	Niektóre z elementów ERE (ethylene response elements-ERE) pośredniczą w odpowiedzi na etylen (Rawat i in. 2005)
ERE2	<i>MYBZ2</i>	ttGGTCAatTc	Nieznany czynnik jądrowy	
GCC box/ MBSII	<i>bZIP62</i>	GCCGCC	Pti4/5/6	Czynniki transkrypcyjne Pti4, Pti5 i Pti6 uczestniczą w odpowiedzi na atak patogenów i regulacji ekspresji genów kodujących białka PR. Wzrost ekspresji genu <i>Pti4</i> zaobserwowano w odpowiedzi na zranienie oraz działanie etylenu, kwasu jasmonowego i kwasu salicylowego (Thara i in. 1999, Zhou i in. 1997).

WYNIKI

GCC box	<i>bZIP62</i>	cAAGtGCCGCC	AtEBP	Czynnik transkrypcyjny AtEBP uczestniczy w sygnalizacji etylenu oraz warunkuje odporność na nadtlenek wodoru i stres temperaturowy w transgenicznym roślaku tytoniu (Ogawa i in. 2005).
GCC box	<i>bZIP62</i>	tGCCGCC	OsEREBP1	Czynniki transkrypcyjne EREBP (ethylene response binding elements) odgrywają rolę w sygnalizacji za pośrednictwem etylenu i odpowiedzi na różne czynniki stresowe (Fujimoto et al. 2000). Transgeniczne rośliny ziemniaka charakteryzujące się nadekspresją StEREBP wykazywały zwiększoną odporność na chłód i stres solny (Lee i in. 2007).

4.5 Wpływ kadmu na biosyntezę etylenu

Zależny od działania kadmu wzrost ekspresji genu kodującego syntazę kwasu 1-aminocyklopropano-1-karboksyłowego (Ryc.14A) oraz obecność w regionach promotorowych genów indukowanych przez kadm elementów *cis* charakterystycznych dla sygnalizacji etylenu, sugeruje, że hormon ten może odgrywać istotną rolę w odpowiedzi roślin na działanie kadmu. W celu sprawdzenia wpływu kadmu na biosyntezę etylenu zmierzono zmiany poziomu tego hormonu pod wpływem CdCl_2 w przeciągu 24 godzin (Ryc.28). Biosyntezę etylenu przeliczano na jeden gram świeżej masy korzeni ponieważ wstępne badania wykazały, że w danym układzie doświadczalnym to korzenie są głównym źródłem etylenu.



Ryc.28: Biosynteza etylenu wyrażona w nanolitrach na godzinę na gram świeżej masy korzeni zmierzona w korzeniach kontrolnych siewek soi (niebieskie koła) i siewek soi traktowanych roztworami kadmu (niebieskie kwadraty) w stężeniu 10 mg L^{-1} (A) lub 25 mg L^{-1} (B). Wyniki przedstawiono jako średnią uzyskaną z 4 niezależnych eksperymentów \pm błąd standardowy.

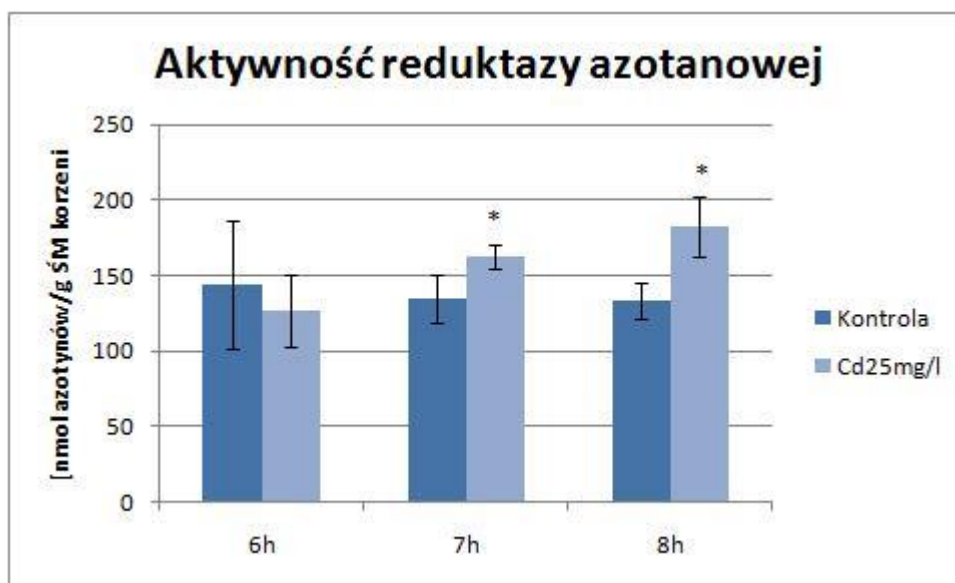
WYNIKI

W kontrolnych siewkach soi poziom wytwarzanego etylenu był stały we wszystkich punktach czasowych i wynosił mniej więcej $2 \text{ nL h}^{-1} \text{ g}^{-1}$. Obydwa stosowane stężenia kadmu wywoływały wzrost biosyntezy etylenu. W przypadku działania kadmu w stężeniu 10 mg L^{-1} wzrost ten był widoczny po 9 godzinach traktowania CdCl_2 (Ryc.28A). W kolejnych godzinach synteza etylenu nadal wzrastała osiągając najwyższą wartość ($6 \text{ nL h}^{-1} \text{ g}^{-1}$) po 23 godzinach traktowania roztworem CdCl_2 . W przypadku roztworu kadmu w stężeniu 25 mg L^{-1} wzrost ilości wytwarzanego etylenu był zauważalny już po 5 godzinach traktowania CdCl_2 (Ryc.28B). Między 9 i 17 godziną trwania pomiarów, ilość syntetyzowanego etylenu utrzymywała się na mniej więcej stałym poziomie $6 \text{ nL h}^{-1} \text{ g}^{-1}$. W kolejnych godzinach zaobserwowano dalszą indukcję biosyntezy etylenu. Po 24 godzinach traktowania CdCl_2 poziom etylenu wynosił $10 \text{ nL h}^{-1} \text{ g}^{-1}$ i był pięć razy wyższy niż w kontrolnych siewkach.

Podsumowując można stwierdzić, że kadm wywoływał znaczący wzrost ilości wytwarzanego etylenu, przy czym indukcja syntezy tego hormonu wzrastała wraz z czasem. Opisany efekt był wyraźniejszy w przypadku działania kadmu w wyższym stężeniu.

4.6 Wpływ kadmu na aktywność reduktazy azotanowej

Ekspresja genu kodującego reduktazę azotanową wzrastała po 6 godzinach traktowania roztworem kadmu w stężeniu 25 mg L^{-1} (Ryc.16). W celu zbadania, czy wzrost ekspresji na poziomie transkryptu jest skorelowany ze wzrostem aktywności NR, zmierzono zmiany aktywności tego enzymu po 6, 7 i 8 godzinach traktowania CdCl_2 (Ryc.29).



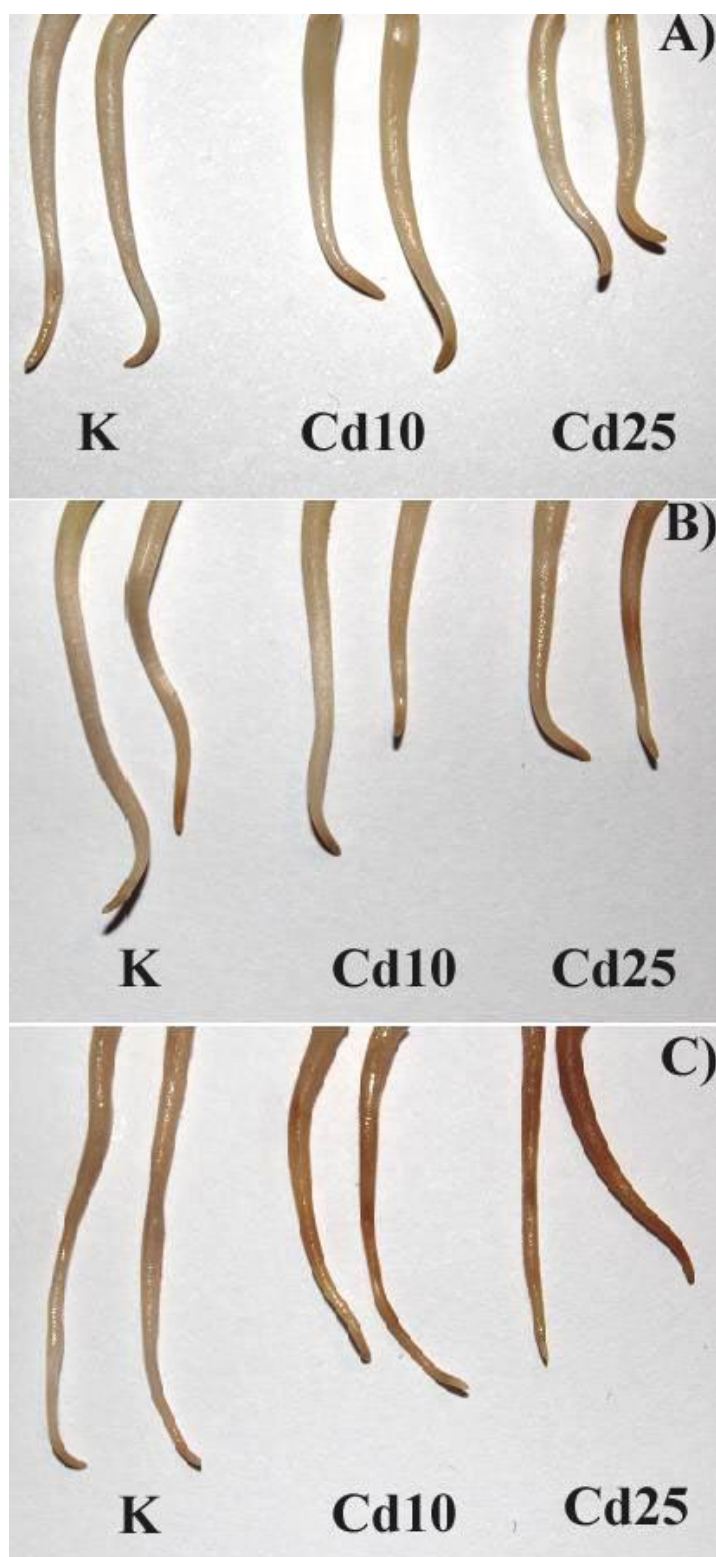
Ryc.29: Aktywność reduktazy azotanowej wyrażona w nmol NO_2^- na 1g świeżej masy korzeni kontrolnych siewek soi i siewek soi traktowanych roztworem kadmu w stężeniu 25 mg L^{-1} przez 6, 7 lub 8 godzin. Wyniki przedstawiono jako średnią uzyskaną z 3 niezależnych eksperymentów \pm błąd standardowy.

Po 6 godzinach traktowania roztworem kadmu nie zaobserwowano znaczących różnic pomiędzy aktywnością reduktazy azotanowej w kontrolnych siewkach i siewkach poddanych działaniu CdCl_2 . Jednakże, po 7 i 8 godzinach odnotowano podwyższą aktywność NR w przypadku siewek traktowanych chlorkiem kadmu. Uzyskane wyniki wskazują, że wzrost poziomu mRNA kodującego reduktazę azotanową (Ryc.16) jest skorelowany ze wzrostem aktywności tego enzymu.

4.7 Wpływ inhibitora NADPH oksydazy, DPI, na odpowiedź siewek soi na działanie kadmu

4.7.1 Pomiary poziomu nadtlenku wodoru w siewkach soi traktowanych CdCl₂ i DPI

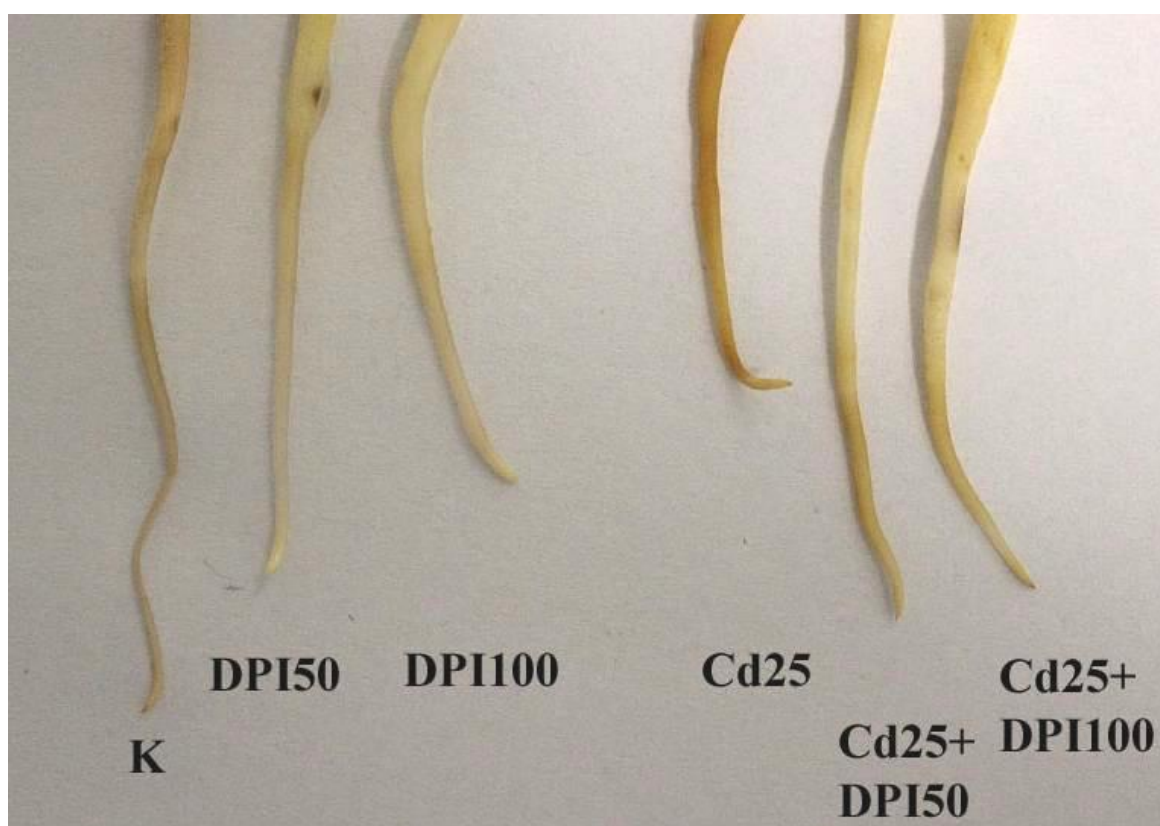
Nadtlenek wodoru wykrywano histochemicznie przy pomocy barwienia 3'3-diaminobenzodyną (DAB), która w wyniku reakcji z H₂O₂ daje czerwono-brązowe zabarwienie. Na korzeniach siewek traktowanych CdCl₂ przez 3 godziny nie zaobserwowano pojawienia się brązowo-czerwonych plam wskazujących na akumulację nadtlenku wodoru (Ryc.27A). Po 6 godzinach odnotowano pojawienie się brązowego zabarwienia, jednakże było ono widoczne tylko na korzeniach niektórych siewek traktowanych wyższym stężeniem kadmu (Ryc.27B). Po 24 godzinach traktowania siewek soi obydwoma stosowanymi stężeniami kadmu, zaobserwowano silne zabarwienie się korzeni na brązowy kolor wskazujące na akumulację H₂O₂ (Ryc.30C).



Ryc.30: Poziom nadtlenku wodoru w kontrolnych siewkach soi (K) oraz siewkach soi traktowanych przez 3 (A), 6 (B) i 24 (C) godziny CdCl₂ o stężeniu kadmu wynoszącym 10 mg L⁻¹ (Cd10) i 25 mg L⁻¹ (Cd25).

WYNIKI

Dane literaturowe wskazują, że ważnym źródłem nadtlenu wodoru w roślinach poddanych działaniu kadmu jest oksydaza NADPH. W celu sprawdzenia, czy inhibitor oksydazy NADPH, DPI, hamuje akumulację nadtlenu wodoru, siewki soi traktowano przez 24 godziny chlorkiem kadmu w stężeniu 25 mg L^{-1} oraz DPI w dwóch stężeniach: $50 \text{ }\mu\text{M}$ i $100 \text{ }\mu\text{M}$. Korzenie siewek soi traktowane roztworem kadmu charakteryzowały się brązowym zabarwieniem, podczas gdy korzenie siewek soi traktowane roztworem kadmu i DPI w obydwu testowanych stężeniach przypominały barwą korzenie kontrolnych siewek (Ryc.31). Na podstawie uzyskanych wyników można wnioskować, że DPI skutecznie hamuje zależną od działania kadmu produkcję nadtlenu wodoru.



Ryc.31: Poziom nadtlenu wodoru w siewkach soi traktowanych przez 24 godziny wodą destylowaną, CdCl_2 o stężeniu kadmu wynoszącym 25 mg L^{-1} i/lub DPI w stężeniu $50 \text{ }\mu\text{M}$ (DPI50) lub $100 \text{ }\mu\text{M}$ (DPI100).

4.7.2 Wpływ DPI na parametry wzrostowe i przeżywalność komórek

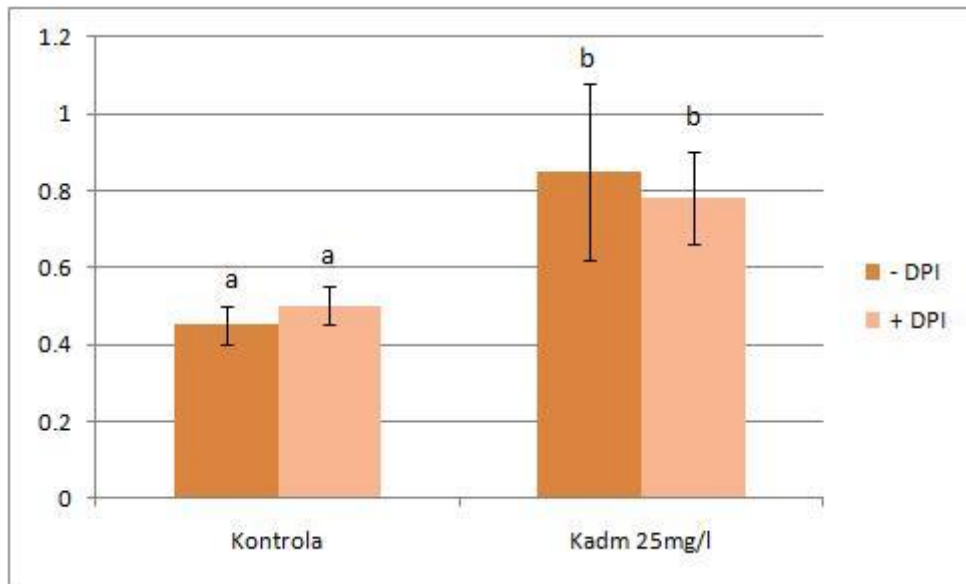
W celu zbadania wpływu inhibitora oksydazy NADPH, DPI, na parametry wzrostowe siewek soi, kontrolne siewki oraz siewki soi poddane działaniu CdCl₂ traktowano przez 24 godziny 50 μM DPI. Inhibitor nie wpływał w znaczący sposób na długość, świeżą ani suchą masę korzeni siewek w żadnym wariantcie doświadczalnym (tabela 9)

Tabela 9: Długość oraz świeża i sucha masa korzeni siewek soi. Wyniki przedstawione jako średnią uzyskaną z 3 eksperymentów ±błąd standardowy.

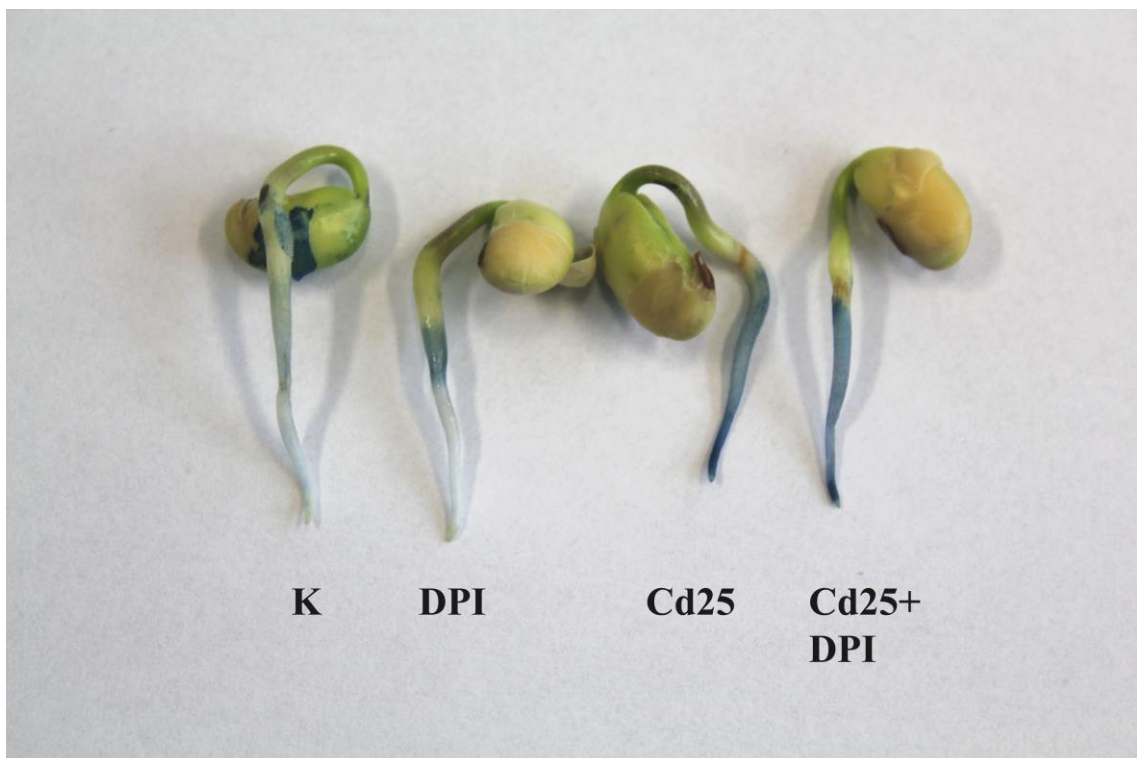
Wariant doświadczalny	Długość korzeni [mm]	Świeża masa [mg]	Sucha masa [mg]
Kontrola	41±2 ^a	72±4 ^a	4.1±0.3 ^a
Kontrola+DPI	42±2 ^a	69±2 ^{ab}	3.5±0.7 ^a
Kadm w stężeniu 25 mg L ⁻¹	36±3 ^{ab}	67±2 ^b	3.9±0.7 ^a
Kadm w stężeniu 25 mg L ⁻¹ +DPI	34±0 ^b	67±5 ^{ab}	3.8±0.4 ^a

Również w przypadku pomiarów ilości martwych komórek, nie odnotowano istotnego wpływu DPI na korzenie siewek soi, chociaż traktowanie samym roztworem kadmu w znaczący sposób obniżało przeżywalność komórek korzeni siewek (Ryc.32 i 33).

WYNIKI



Ryc.32: Pomiary ilości martwych komórek korzeni siewek soi przy pomocy barwienia Błękitem Evansa. Wyniki przedstawiono jako średnią uzyskaną z 4 niezależnych eksperymentów \pm błąd standardowy.



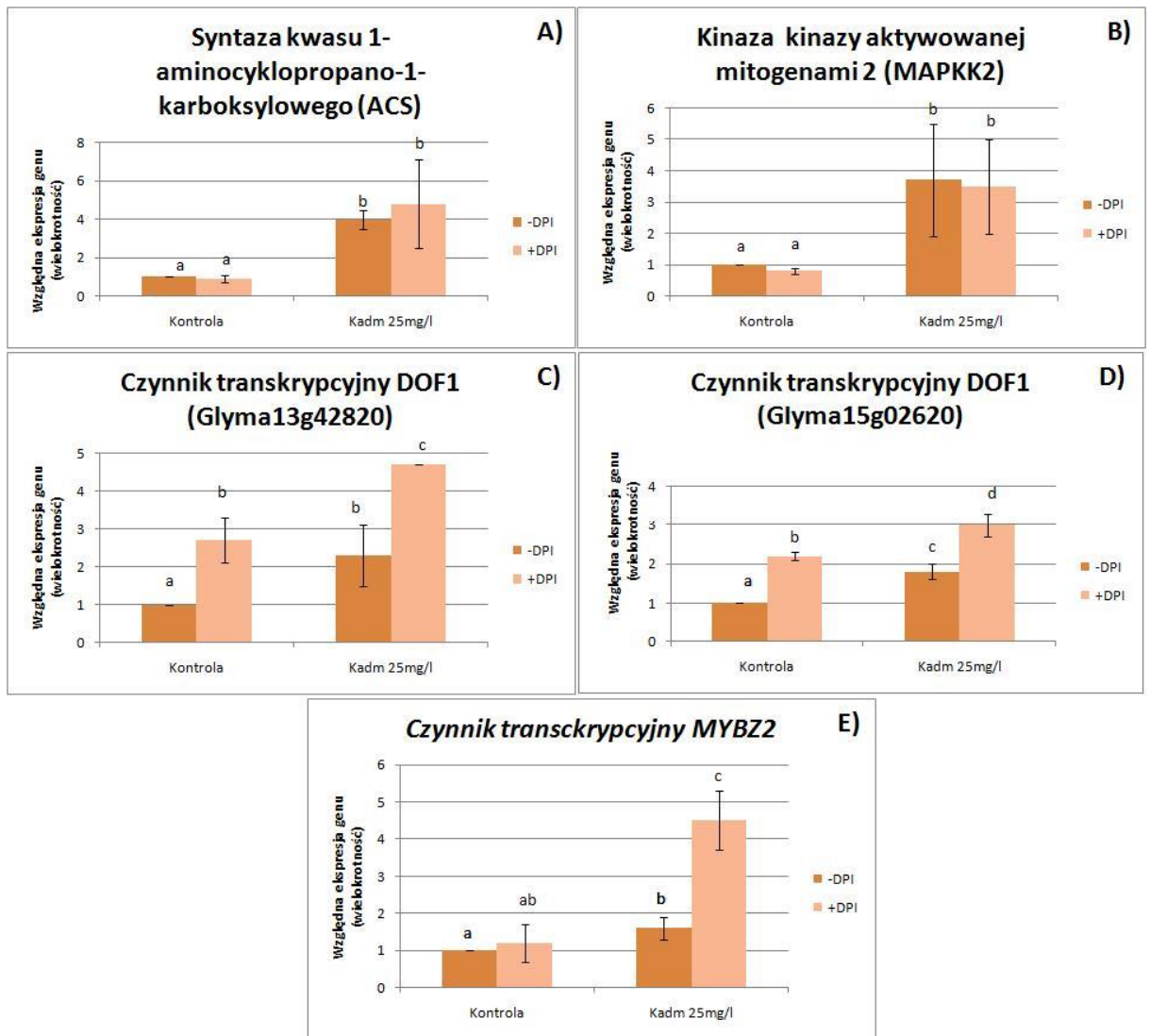
Ryc.33: Barwienie Błękitem Evansa korzeni kontrolnych siewek soi (K), siewek traktowanych 50 μ M DPI (DPI), roztworem kadmu w stężeniu 25 mg L⁻¹ (Cd25) oraz roztworem kadmu w stężeniu 25 mg L⁻¹ i 50 μ M DPI (Cd25+DPI).

4.7.3 Wpływ DPI na poziom transkrypty genów indukowanych przez kadm

4.7.3.1 Geny indukowane przez kadm po trzech godzinach traktowania

Traktowanie kontrolnych siewek soi 50 μM DPI powodowało wzrost ekspresji obydwu genów kodujących czynnik transkrypcyjny DOF1 zarówno w kontrolnych siewkach soi jak i w siewkach soi traktowanych kadmem (Ryc.34C-D). Aplikacja DPI skutkowała również spotęgowaniem zależnej od kadmu indukcji genu kodującego czynnik transkrypcyjny MYBZ2 (Ryc.34E). Ekspresja genów kodujących syntazę kwasu 1-aminocyklopropano-1-karboksłowego (ACS) i kinazę kinazy aktywowanej mitogenami nie ulegała zmianom pod wpływem działania inhibitora oksydazy NADPH (Ryc.34A-B, E).

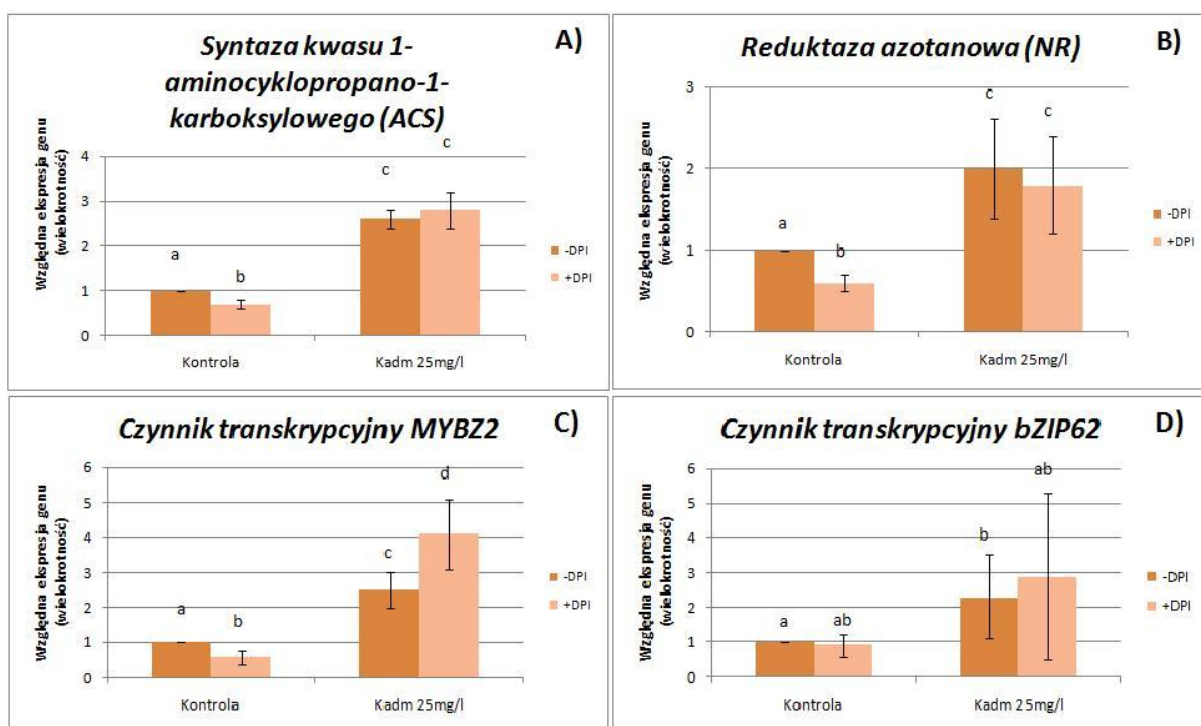
WYNIKI



Ryc.34: Wpływ DPI na ekspresję genów indukowanych przez trzygodzinnie traktowanie roztworem kadmu: ACS (A), MAPKK2 (B), DOF1- *Glyma13g42820* (C), DOF1- *Glyma15g02620* (D), czynn timeranskrypcyjny MYBZ2 (E). Wyniki przedstawiono jako średnią z 2-3 niezależnych eksperymentów \pm błąd standardowy.

4.7.3.2 Geny indukowane przez kadm po sześciu godzinach traktowania

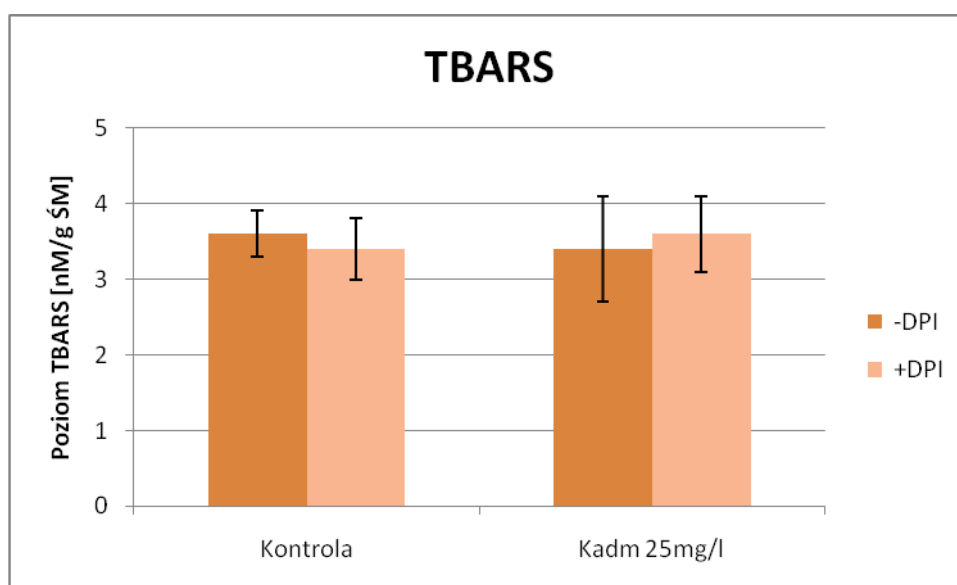
Nie zaobserwowano znaczących zmian w ekspresji badanych genów pod wpływem działania DPI (Ryc.35), z wyjątkiem niewielkiego spadku ekspresji genów kodujących syntazę kwasu 1-aminocyklopropano-1-karboksyłowego, reduktazę azotanową i czynnik transkrypcyjny MYBZ2 w kontrolnych siewkach soi (Ryc.35A-C) oraz słabej indukcji genu kodującego czynnik transkrypcyjny MYBZ2 w siewkach soi traktowanych roztworem kadmu (Ryc.35C).



Ryc.35: Wpływ DPI na ekspresję genów indukowanych przez sześciogodzinne traktowanie roztworem kadmu. ACS (A), NR (B), czynnik transkrypcyjny MYBZ2 (C), czynnik transkrypcyjny bZIP62 (D). Wyniki przedstawiono jako średnią z 2-4 niezależnych eksperymentów \pm błąd standardowy.

4.7.4 Poziom substancji reagujących z kwasem tiobarbiturowym (TBARS)

W celu sprawdzenia, czy obserwowane zmiany w ekspresji genów kodujących czynniki transkrypcyjne DOF1 i MYBZ2 pod wpływem działania DPI są zależne od wpływu tego inhibitora na poziom stresu oksydacyjnego wykonano pomiary poziomu substancji reagujących z kwasem tiobarbiturowym (TBARS) będących wskaźnikiem poziomu peroksydacji błon komórkowych. Wyniki pokazują, że trzygodzinne traktowanie roztworem kadmu i/lub DPI nie wpływa na poziom TBARS w korzeniach siewek soi (Ryc.36).



Ryc. 36: Poziom substancji reagujących z kwasem tiobarbiturowym w korzeniach kontrolnych siewek soi oraz w korzeniach siewek soi traktowanych 50 μM DPI, CdCl_2 o stężeniu Cd 25 mg L^{-1} , albo 50 μM DPI i CdCl_2 o stężeniu Cd 25 mg L^{-1} przez 3 godziny. Wyniki przedstawiono jako średnią z 3 niezależnych eksperymentów \pm błąd standardowy.

4.8 Wpływ zmiatacza tlenu azotu, PTIO, na reakcję siewek soi traktowanych roztworem kadmu

4.8.1 Wpływ PTIO na przeżywalność komórek i parametry wzrostowe

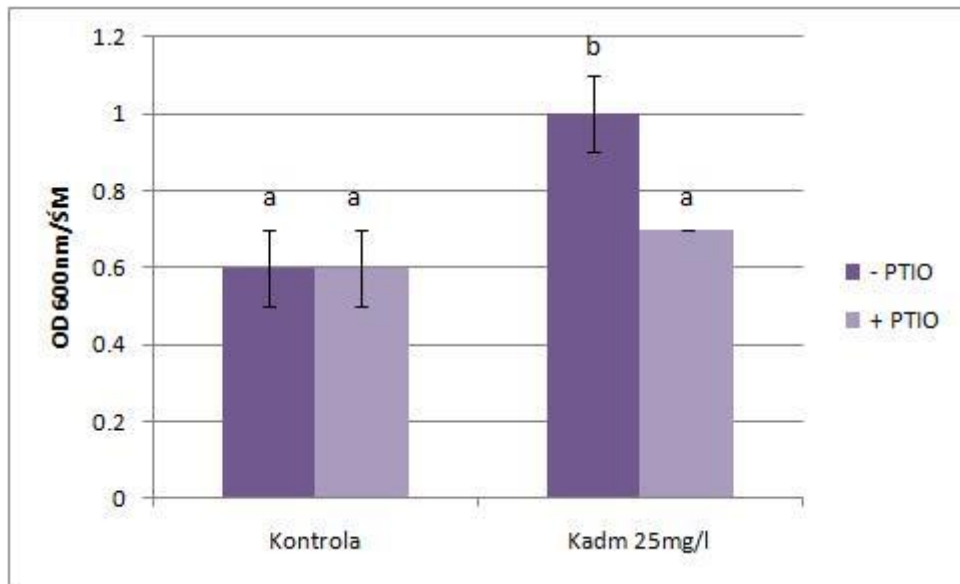
Kadm hamował wzrost korzeni siewek soi o około 23%. Traktowanie siewek soi CdCl_2 powodowało również zmniejszenie świeżej i suchej masy korzeni. Zmiatacz tlenu azotu nie wykazywał wpływu na wymienione parametry wzrostowe (tabela 10).

Tabela 10: Długość oraz świeża i sucha masa korzeni siewek soi. Wyniki przedstawione jako średnią uzyskaną z 4 eksperymentów \pm błąd standardowy.

Wariant doświadczalny	Długość korzeni [mm]	Świeża masa [mg]	Sucha masa [mg]
Kontrola	48 ± 3^a	65 ± 3^a	$4.1 \pm 0,3^{ab}$
Kontrola+PTIO	48 ± 3^a	67 ± 1^a	$4.3 \pm 0,1^a$
Kadm w stężeniu 25mg L^{-1}	37 ± 3^b	56 ± 1^b	$3.8 \pm 0,1^b$
Kadm w stężeniu 25mg L^{-1} +PTIO	36 ± 4^b	57 ± 2^b	$3.8 \pm 0,1^b$

W przypadku pomiarów przeżywalności, korzenie siewek soi traktowanych roztworem kadmu charakteryzowały się wyższym OD przy długości fali światła 600 nm, co świadczyło o większej zawartości Błękitu Evansa i większej ilości martwych komórek. Zmiatacz tlenu azotu, PTIO, nie wpływał na przeżywalność komórek w korzeniach kontrolnych siewek, jednakże, w znaczący sposób zwiększał przeżywalność komórek w korzeniach siewek traktowanych CdCl_2 (Ryc.37). Wyniki są zgodne z obrazami fotograficznymi siewek barwionych Błękitem Evansa (Ryc.38)

WYNIKI



Ryc.37: Pomiary ilości martwych komórek korzeni siewek soi przy pomocy barwienia Błękitem Evansa. Wyniki przedstawiono jako średnią uzyskaną z 2-3 niezależnych eksperymentów±błąd standardowy.



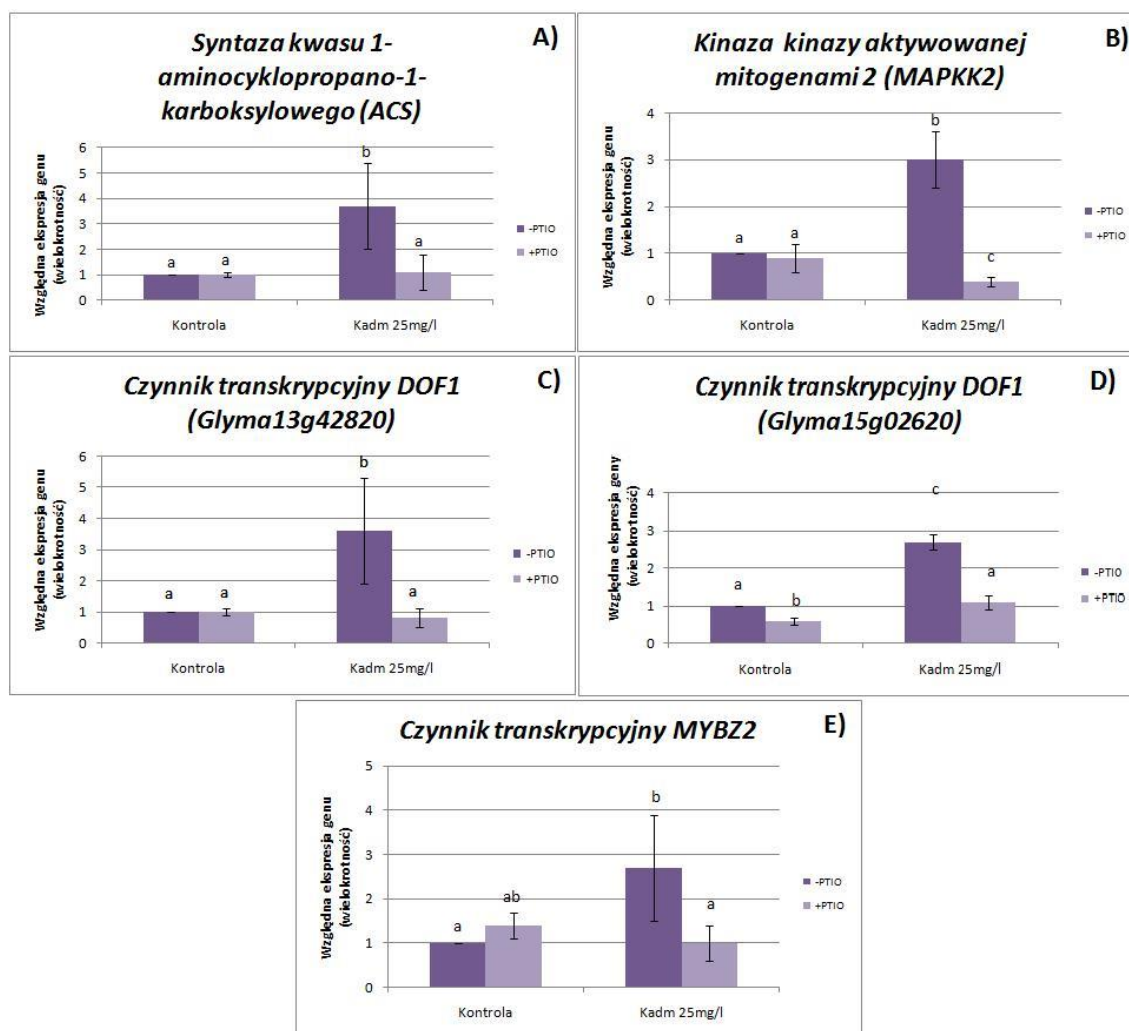
Ryc.38: Barwienie Błękitem Evansa korzeni kontrolnych siewek soi (K), siewek traktowanych 50 μM PTIO (K+PTIO), roztworem kadmu w stężeniu 25 mg L^{-1} (Cd25) oraz roztworem kadmu w stężeniu 25 mg L^{-1} i 50 μM PTIO (Cd25+PTIO).

WYNIKI

4.8.2 Wpływ PTIO na poziom mRNA genów indukowanych przez kadm

4.8.2.1 Geny indukowane przez kadm po trzech godzinach działania CdCl₂

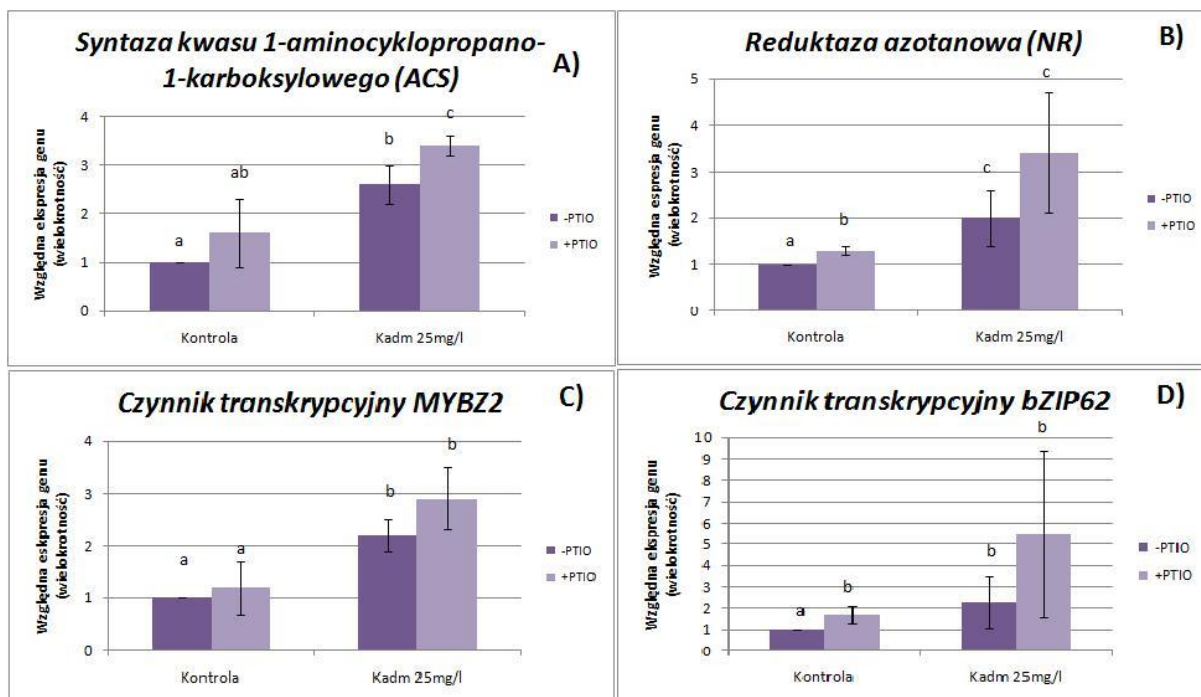
Traktowanie kontrolnych siewek soi PTIO nie wpływało w znaczący sposób na ekspresję wybranych genów, z wyjątkiem niewielkiego spadku ekspresji genu *Glyma15g02620* kodującego czynnik transkrypcyjny DOF1 (Ryc.35D). W przypadku siewek soi traktowanych roztworem kadmu, PTIO, niwelowało zależną od kadmu indukcję ekspresji wszystkich badanych genów. Poziom ekspresji genów w siewkach traktowanych CdCl₂ i PTIO nie różnił się w istotny sposób od poziomu ekspresji tych genów w siewkach kontrolnych (Ryc.39A-E).



Ryc.39: Wpływ PTIO na ekspresję genów indukowanych przez trzygodzinne traktowanie roztworem kadmu. ACS (A), MAPKK2 (B), DOF1- *Glyma13g42820* (C), DOF1- *Glyma15g02620* (D), czynnik transkrypcyjny MYBZ2 (E). Wyniki przedstawiono jako średnią z 2-3 niezależnych eksperymentów \pm błąd standardowy.

4.8.2.2 Geny indukowane przez kadm po sześciu godzinach działania CdCl₂

Zmiatacz tlenu azotu, PTIO, nie wpływał w istotny sposób na ekspresję badanych genów (Ryc.40). Odnotowano jedynie niewielki wzrost ekspresji genu kodującego syntazę kwasu 1-aminocyklopropano-1-karboksyłowego w siewkach traktowanych kadmem, oraz genów kodujących reduktazę azotanową i czynnik transkrypcyjny bZIP62 w kontrolnych siewkach (Ryc.40A-B, D)



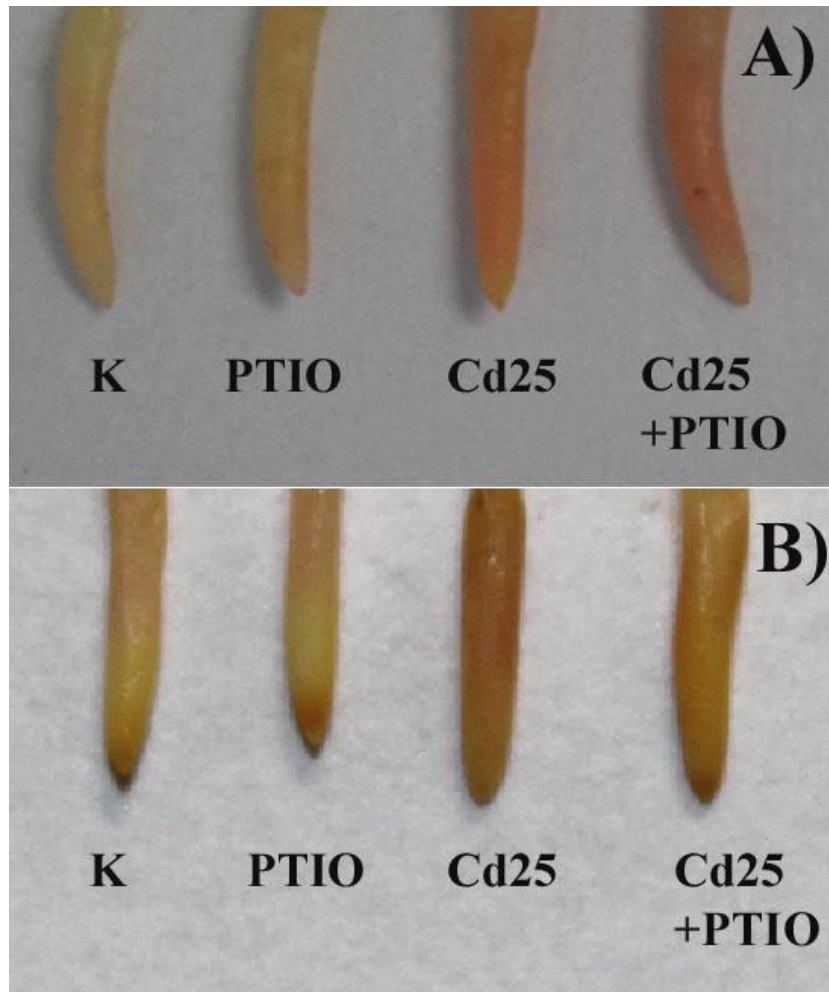
Ryc.40: Wpływ PTIO na ekspresję genów indukowanych przez sześciogodzinne traktowanie roztworem kadmu. ACS (A), NR (B), czynnik transkrypcyjny MYB22 (C), czynnik transkrypcyjny bZIP62 (D). Wyniki przedstawiono jako średnią z 2-4 niezależnych eksperymentów ±błąd standardowy.

4.8.3 Akumulacja kadmu w siewkach soi traktowanych CdCl₂ i PTIO

W celu sprawdzenia, czy obserwowany po 3 godzinach niwelujący wpływ PTIO na ekspresję genów indukowanych przez kadm wynika z zahamowania pobierania Cd, oznaczano zawartość tego pierwiastka w korzeniach siewek soi przy pomocy barwienia odczynnikami Dithizone. Po 3 godzinach zarówno korzenie siewek soi traktowanych CdCl₂ jak i korzenie siewek traktowane CdCl₂ i PTIO charakteryzowały się silnie czerwonym zabarwieniem świadczącym o akumulacji kadmu (Ryc.41A).

WYNIKI

Po 6 godzinach korzenie siewek traktowane roztworem kadmu odznaczały się brązowo-czerwona barwą, podczas gdy barwa korzeni siewek traktowanych kadmem i PTIO była wyraźnie mniej intensywna (Ryc.37B). Podsumowując można stwierdzić, że PTIO hamuje pobieranie kadmu, jednakże efekt ten można zaobserwować dopiero po 6 godzinach.

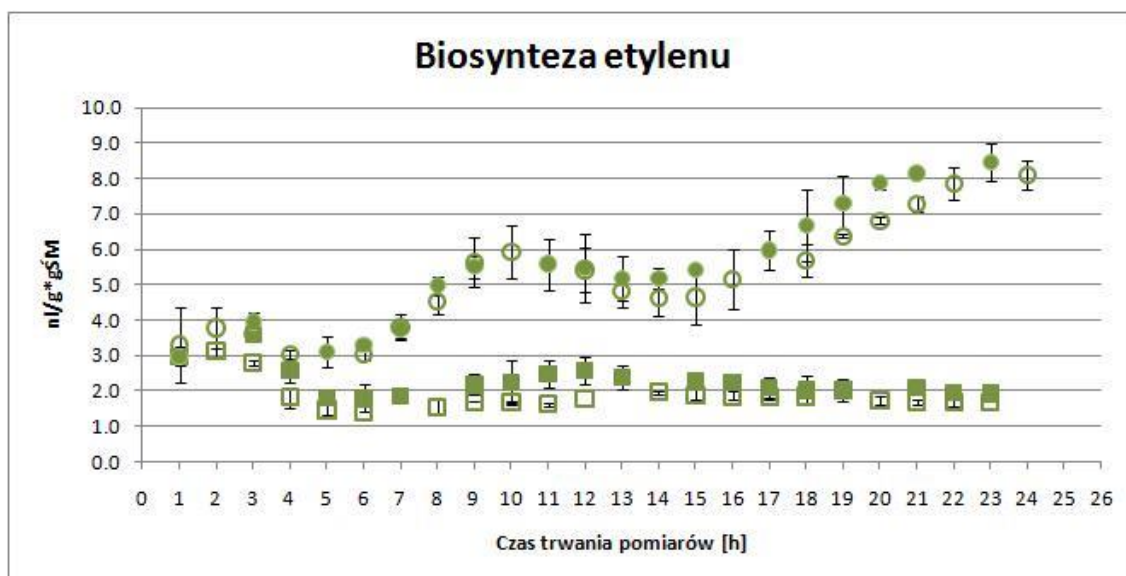


Ryc.41: Akumulacja kadmu, uwidaczniana przy pomocy barwienia odczynnikiem Dithizone, w wierzchołkach korzeni siewek soi traktowanych wodą destylowaną (K), wodą destylowaną i PTIO (PTIO), roztworem kadmu o stężeniu kadmu 25 mg L^{-1} (Cd25) lub roztworem kadmu o stężeniu 25 mg L^{-1} i PTIO (Cd25+PTIO) przez 3 (A) lub 6 godzin (B).

4.9 Udział inhibitora syntezy etylenu, chlorku kobaltu, w odpowiedzi siewek soi na działanie kadmu

4.9.1 Biosynteza etylenu w siewkach traktowanych CdCl_2 i CoCl_2

Traktowanie w przeciągu 24 godzin $10 \mu\text{M}$ CoCl_2 nie wpływało na poziom wytwarzanego etylenu ani w kontrolnych siewkach soi, ani w siewkach soi traktowanych kadmem (Ryc.42).



Ryc.42: Produkcja etylenu wyrażona w nanolitrach na godzinę na gram świeżej masy korzeni w korzeniach kontrolnych siewek soi (zielone kwadraty), siewek soi traktowanych $10 \mu\text{M}$ CoCl_2 (puste kwadraty), siewek soi traktowanych roztworem kadmu w stężeniu 25 mg L^{-1} (zielone koła) oraz siewek soi traktowanych roztworem kadmu w stężeniu 25 mg L^{-1} i $10 \mu\text{M}$ CoCl_2 (puste koła). Wyniki przedstawiono jako średnią uzyskaną z 3 niezależnych eksperymentów ± błąd standardowy.

WYNIKI

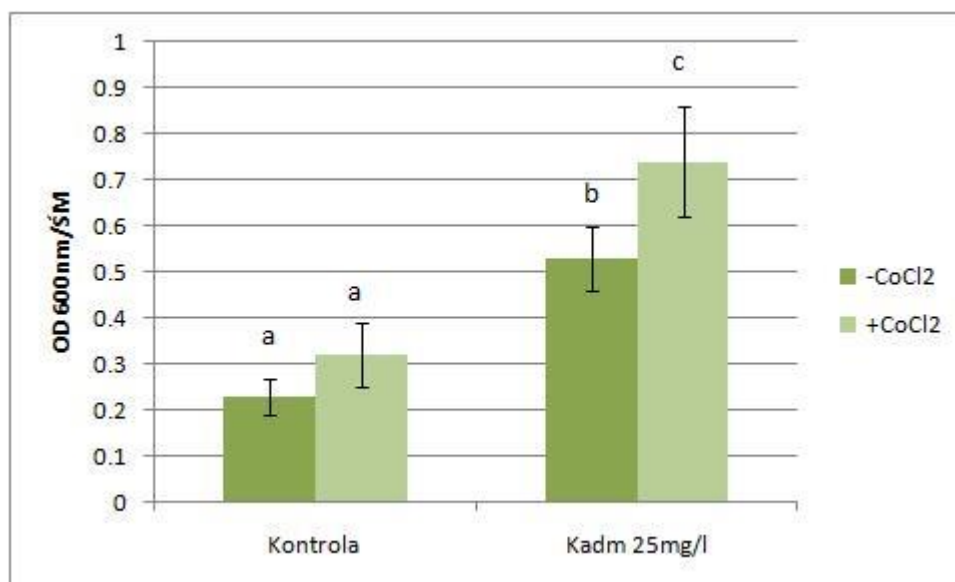
4.9.2 Wpływ CoCl_2 na parametry wzrostowe i przeżywalność komórek

Chlorek kobaltu nie wpływał na badane parametry wzrostowe korzeni siewek soi (Tabela 11).

Tabela 11: Długość oraz świeża i sucha masa korzeni siewek soi. Wyniki przedstawione jako średnią uzyskaną z 3 eksperymentów \pm błąd standardowy.

Wariant doświadczalny	Długość korzeni [mm]	Świeża masa [mg]	Sucha masa [mg]
Kontrola	43 \pm 1 ^a	54 \pm 4 ^a	2.9 \pm 0.2 ^{ab}
Kontrola+ CoCl_2	47 \pm 5 ^a	62 \pm 8 ^a	3.3 \pm 0.3 ^a
Kadm w stężeniu 25mg L ⁻¹	30 \pm 2 ^b	53 \pm 3 ^a	2.7 \pm 0.1 ^b
Kadm w stężeniu 25mg L ⁻¹ + CoCl_2	28 \pm 1 ^b	50 \pm 3 ^a	2.7 \pm 0.2 ^b

Kadm w znaczący sposób obniżał przeżywalność komórek korzeni siewek soi. Komórki w korzeniach siewek soi traktowanych CdCl_2 i CoCl_2 charakteryzowały się jeszcze niższą przeżywalnością niż komórki korzeni siewek soi traktowanych tylko CdCl_2 (Ryc.43 i 44).



Ryc.43: Pomiary ilości martwych komórek korzeni siewek soi przy pomocy barwienia Błękitem Evansa. Wyniki przedstawiono jako średnią uzyskaną z 4-5 niezależnych eksperymentów \pm błąd standardowy.



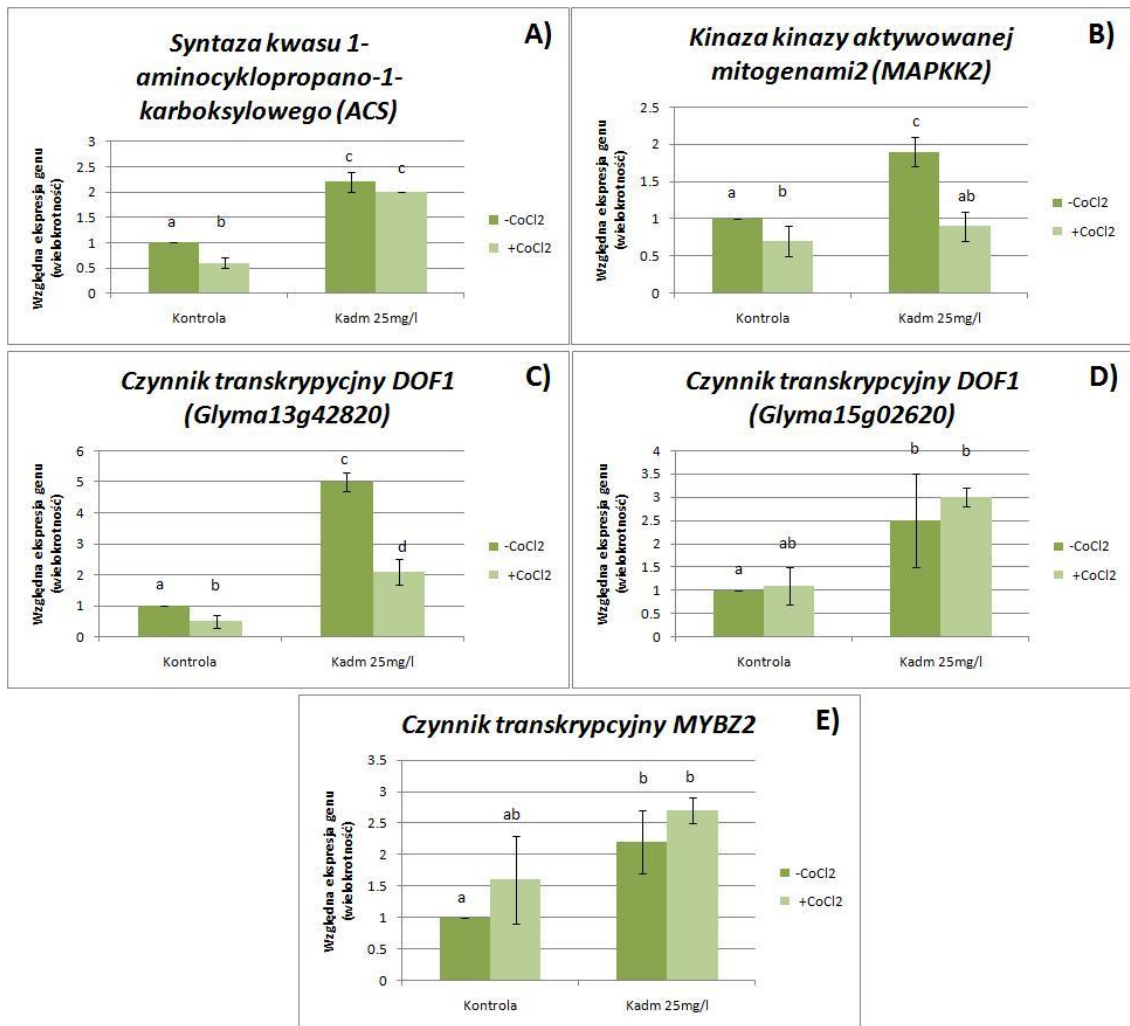
Ryc.44: Barwienie Błękitem Evansa korzeni kontrolnych siewek soi (K), siewek traktowanych $10 \mu\text{M}$ CoCl_2 (K+Co), roztworem kadmu w stężeniu 25 mg L^{-1} (Cd25) oraz roztworem kadmu w stężeniu 25 mg L^{-1} i $10 \mu\text{M}$ CoCl_2 (Cd25+Co).

4.9.3 Wpływ CoCl_2 na ekspresję genów indukowanych przez kadm

4.9.3.1 Geny indukowane po trzech godzinach traktowania kadmem

Traktowanie siewek CoCl_2 przez 3 godziny powodowało spadek ekspresji genów kodujących syntazę kwasu-1aminocyklopropano-1-karboksylowego (Ryc.45A), kinazę kinazy aktywowanej mitogenami2 (Ryc.45B) oraz jednego z genów kodujących czynnik transkrypcyjny DOF1 (Ryc.45C) w siewkach kontrolnych, a także osłabienie zależnej od kadmu indukcji ekspresji genów kodujących kinazę kinazy aktywowanej mitogenami2 (Ryc.45B) i jednego z genów kodujący czynnik transkrypcyjny DOF1 (Ryc.45C). Pozostałe geny nie wykazywały zmian w ekspresji pod wpływem CoCl_2 w danym wariancie czasowym (Ryc.45D-E).

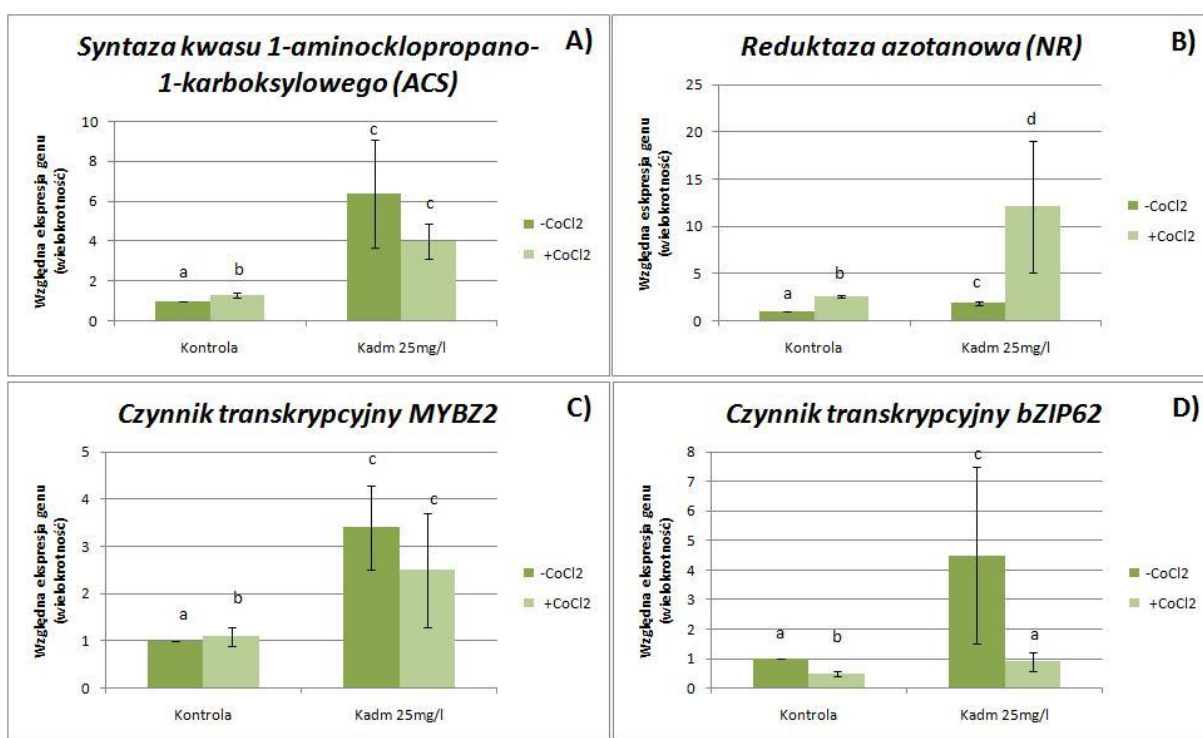
WYNIKI



Ryc.45: Wpływ CoCl₂ na ekspresję genów indukowanych przez trzygodzinne traktowanie roztworem kadmu. ACS (A), MAPKK2 (B), DOF1- *Glyma13g42820* (C), DOF1- *Glyma15g02620* (D), czynnik transkrypcyjny MYBZ2 (E). Wyniki przedstawiono jako średnią z 2-3 niezależnych eksperymentów ± błąd standardowy.

4.9.3.2 Geny indukowane po sześciu godzinach działania kadmu

W siewkach traktowanych tylko chlorkiem kobaltu zaobserwowano nieznaczny wzrost ekspresji genów kodujących syntazę kwasu 1-aminocyklopropano-1-karboksyowego (Ryc.46A), reduktazę azotanową (Ryc.46B) i czynnik transkrypcyjny MYBZ2 (Ryc.46C) oraz niewielki spadek ekspresji genu kodującego czynnik transkrypcyjny bZIP62 (Ryc.46D). W siewkach traktowanych chlorkiem kobaltu i roztworem kadmu odnotowano wzrost ekspresji genu kodującego reduktazę azotanową (Ryc.46B) oraz osłabienie zależnej od kadmu indukcji genu kodującego czynnik transkrypcyjny bZIP62 (Ryc.46D).



Ryc.46: Wpływ CoCl_2 na ekspresję genów indukowanych przez sześciogodzinne traktowanie roztworem kadmu. ACS (A), NR (B), czynnik transkrypcyjny MYBZ2 (C), czynnik transkrypcyjny bZIP62 (D)

5. DYSKUSJA

5.1 Pobieranie, akumulacja i translokacja kadmu w roślinach

W szeregu prac wykazano, że kadm zachowuje się jak „oportunistyczny autostopowicz” i przedostaje do organizmów roślinnych poprzez transportery przeznaczone do pobierania niezbędnych pierwiastków takich jak jony wapnia, cynku, żelaza i manganu [Connolly i in. 2002, Kurtyka i in. 2011, Lee i Ann 2009, Li i in. 2012, Mizuno i in. 2005]. Należy jednak zaznaczyć, że Lombi i in. wykazali, iż tobołki (*Thlaspi caerulescens*) posiadają transportery charakteryzujące się wysoką powinowactwem do kadmu, co może wskazywać na istnienie w świecie roślin transporterów specyficznych dla tego metalu ciężkiego, chociaż ich rola i ewolucyjne znaczenie jest trudna do odgadnięcia [Lombi in. 2001]. Pobrany kadm jest akumulowany głównie w korzeniach, ale może być również transportowany do wyższych partii roślin [Akthter i in. 2012, Monteiro i in. 2012, Nedjimi i Daoud 2009, Panitlertumpai i in. 2013, Pourghasemian i in. 2013, Rascio i in 2008, Vestena i in. 2011]. Zawartość kadmu w organach różnych gatunków roślin traktowanych roztworami tego metalu ciężkiego została przedstawiona w tabeli 12. Warto zauważyć, że w przypadku większości przeprowadzonych doświadczeń, badane rośliny traktowano roztworami kadmu przez długie okresy czasu. Wyniki doświadczeń przeprowadzonych w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej wykazały, że kadm jest akumulowany w korzeniach siewek soi bardzo wcześnie. Już po 3 godzinach traktowania $CdCl_2$ zawartość tego metalu w korzeniach wynosiła około 300 μg w przypadku siewek traktowanych roztworem kadmu w stężeniu 10 $mg L^{-1}$ i około 500 μg w przypadku siewek traktowanych roztworem w stężeniu 25 $mg L^{-1}$ (Ryc.13).

DYSKUSJA

Tabela 12: Przykładowe wyniki badań dotyczących akumulacji kadmu w roślinach.

Gatunek	Organ	Zawartość kadmu [µg/g suchej masy]	Stężenie aplikowanego roztworu kadmu	Czas ekspozycji na roztwór kadmu	Źródło
Łubin (<i>Luteus luteus</i>)	korzeń	≈210	89 µM	24 godziny	Arasimowicz-Jelonek i in. 2012
Ryż (<i>Oryza sativa</i>)	korzeń	1,27	50 µM	10 dni	Rascio i in 2008
		2,85	100 µM		
		4,02	250 µM		
Ginura (<i>Gynura pseudochina</i>)	korzeń	42	0.5 mg L ⁻¹	14 dni	Panitlertumpai i in. 2013
	pęd	63			
	korzeń	140	2 mg L ⁻¹		
	pęd	170			
	korzeń	290	5 mg L ⁻¹		
	pęd	270			
	korzeń	710	10 mg L ⁻¹		
	pęd	580			
	korzeń	910	15mg L ⁻¹		
pęd	530				
Krokosz (<i>Carthamus</i>)	korzeń	≈12-37	1 µM	14 dni	Pourghasemian i in. 2013
	pęd	≈7-17			
Łodoba (<i>Atriplex halimus</i>)	korzeń	198	50 µM	15 dni	Nedjimi i Daoud 2009
	pęd	58			
	korzeń	243	100 µM		
	pęd	92			
	korzeń	508	200 µM		
	pęd	126			
	korzeń	606	400 µM		
pęd	217				
Jęczmień (<i>Hordeum vulgare</i>)	korzeń	1177	1 µM	28 dni	Akhter i in. 2012
	pęd	85			
Sałata (<i>Lactuca sativa</i>)	korzeń	326			
	pęd	206			

DYSKUSJA

Interesującym wydaje się fakt, że w przypadku kadmu o stężeniu 10 mg L^{-1} zawartość tego pierwiastka w korzeniach była stała we wszystkich wariantach czasowych i wynosiła $300\text{-}400 \text{ }\mu\text{g}$ na gram świeżej masy korzeni, zaś w przypadku siewek traktowanych roztworem kadmu o stężeniu 25 mg L^{-1} zawartość kadmu wzrastała wraz z czasem i po 24 godzinie wynosiła ponad 2 mg na gram świeżej masy korzeni. Być może przy działaniu wyższych stężeń kadmu dochodzi do zaburzenia transportu tego metalu do wyższych partii roślin, co skutkuje jego akumulacją w korzeniach. Kadm jest transportowany do pędów roślin w postaci kompleksów z glutationem (GSH) [Mendoza-Cózadl i in. 2011]. Związek ten jest jednak zaangażowany również w wiele innych mechanizmów obronnych: stanowi ważny element systemu antyoksydacyjnego, główny składnik fitochelatyn, bierze udział w sekwestracji metali ciężkich do wakuoli i w szlakach przekazywania sygnałów [Mendoza-Cózadl i in. 2011, Rausch i in. 2008]. Wydaje się prawdopodobne, że podczas działania wysokich stężeń kadmu pula glutationu może być niewystarczająca, co prowadzi do zahamowanego tworzenia kompleksów Cd-GSH i spowolnienia transportu kadmu do wyższych partii roślin.

Stres kadmowy może również hamować transport dystalny poprzez indukcję depozycji kalozy. Zwiększoną zawartość kalozy w wiązkach naczyniowych tytoniu poddanego działaniu kadmu skutkowało zahamowanym rozprzestrzenianiem się tobamowirusa rzepy (TVCV) do dalszych tkanek roślin [Ueki i Citovsky 2002].

Innym wyjaśnieniem obserwowanego zjawiska jest możliwość regulacji pobierania kadmu przez rośliny. Wykazano, że bardziej odporna na działanie tego metalu ciężkiego odmiana pomidora charakteryzuje się wyższą sekrecją kwasu szczawiowego powiązaną ze zmniejszoną akumulacją kadmu niż odmiana wrażliwa. W dalszych badaniach pokazano, że zablokowanie wydzielania kwasu szczawiowego do otoczenia łączyło się ze zwiększonym pobieraniem kadmu i obniżoną tolerancją na ten metal ciężki [Zhu i in. 2011]. Zdolność kwasów organicznych do ograniczenia pobierania kadmu z otoczenia został wykazany również w roślinach kukurydzy i sorga [Pinto i in. 2008]. Możliwe jest, że również w siewkach soi istnieją mechanizmy regulujące pobieranie kadmu, które w przypadku stosowania niższych stężeń hamują przedostawanie się tego pierwiastka do rośliny, zaś przy działaniu zbyt wysokich stężeń ulega spowolnieniu lub uszkodzeniu.

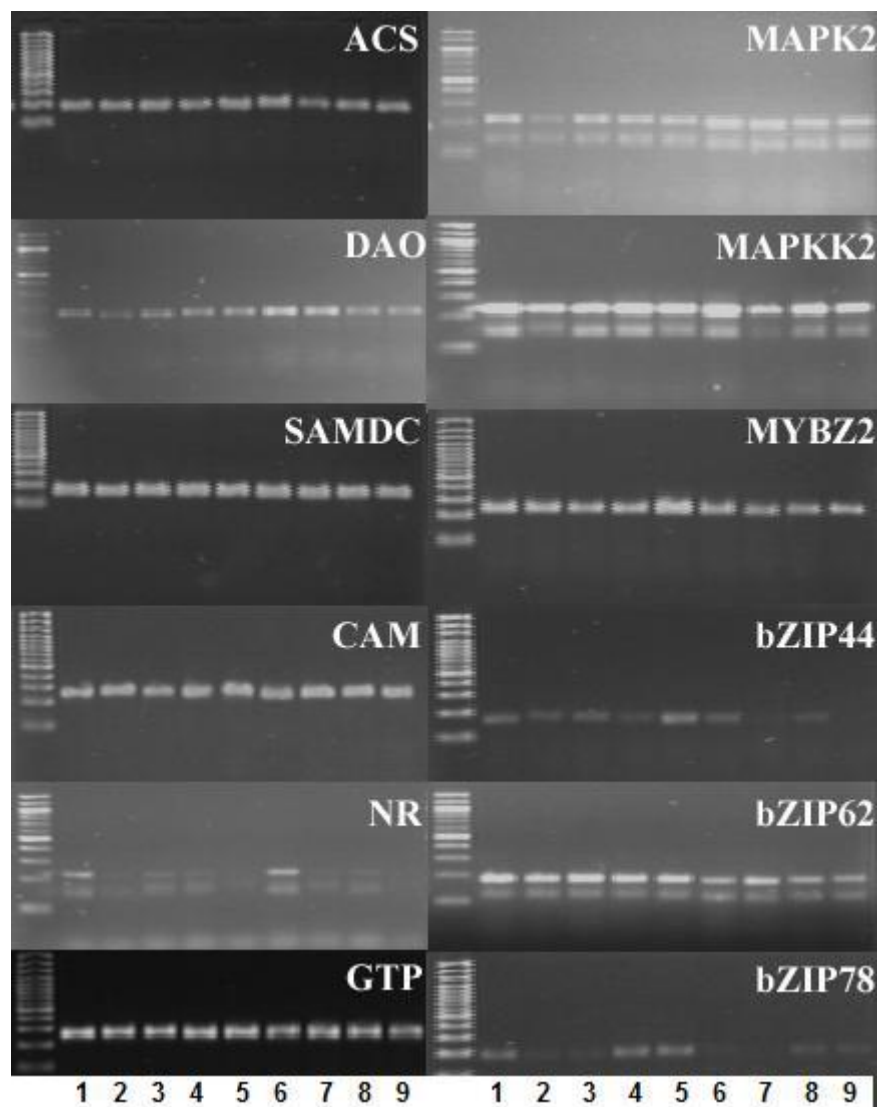
5.2 Wpływ kadmu na ekspresję genów powiązanych ze szlakami przekazywania sygnału

Dotychczas opracowano wiele różnych metod pomiaru poziomu mRNA w komórkach. Do najpowszechniej stosowanych metod należą Northern Blotting, RT-PCR, PCR w czasie rzeczywistym oraz analizy z wykorzystaniem mikromacierzy. Zastosowanie mikromacierzy umożliwia analizę zmian w poziomie mRNA nawet kilkuset genów. Ze względu na ogromną ilość uzyskiwanych danych, otrzymywane przy użyciu tej metody wyniki są najczęściej przedstawiane w postaci zespołów genów, np. kodujących białka zaangażowane w metabolizm cukrów, fotosyntezę, czy też sygnalizację komórkową, które ulegają zwiększonej lub zmniejszonej ekspresji [Ogawa et al 2009, Suzuki et al. 2001, Yamaguchi et al. 2009]. Zmiany w poziomie ekspresji pojedynczego, interesującego genu są potwierdzane przy użyciu technik RT-PCR lub PCR w czasie rzeczywistym. Głównym celem niniejszej rozprawy doktorskiej było zmierzenie poziomu mRNA kilkunastu konkretnych genów powiązanych ze szlakami przekazywania sygnału. Do pomiarów wybrano więc techniki PCR. Na początkowym etapie badań ekspresję genów określano przy pomocy techniki RT-PCR. Jednakże, pomimo przeprowadzenia licznych reakcji optymalizacyjnych, nie dla wszystkich analizowanych genów udało się uzyskać zadawalające obrazy rozdziału produktów PCR na żelu agarozowym (Ryc.47). Dlatego też ostatecznie poziom mRNA mierzono przy zastosowaniu dokładniejszej i czulszej metody PCR w czasie rzeczywistym.

Bardzo istotnym elementem przy stosowaniu tej techniki jest dobór odpowiedniego genu referencyjnego charakteryzującego się stałą ekspresją we wszystkich wariantach doświadczalnych. W przypadku badań dotyczących wpływu abiotycznych czynników stresowych na rośliny najczęściej wybieranymi genami referencyjnymi są geny kodujące aktynę, tubulinę, ubikwitynę, 18S rRNA oraz czynnik elongacyjny EF [Basa i in. 2009, Nicot i in. 2005, Olbrich i in. 2008]. W badaniach przeprowadzanych wcześniej w Zakładzie Ekofizjologii Roślin wykazano, że w przypadku soi roztwór kadmu nie wpływa w istotny sposób na ekspresję genu kodującego ubikwitynę i kinazę zależną od cyklin, CDK-A [Pawlak-Sprada i in. 2011, Sobkowiak i Deckert 2003]. Na podstawie przytoczonych informacji wybrano trzy potencjalne geny referencyjne kodujące: ubikwitynę, kinazę zależną od cyklin CDK-A oraz 18S rRNA.

DYSKUSJA

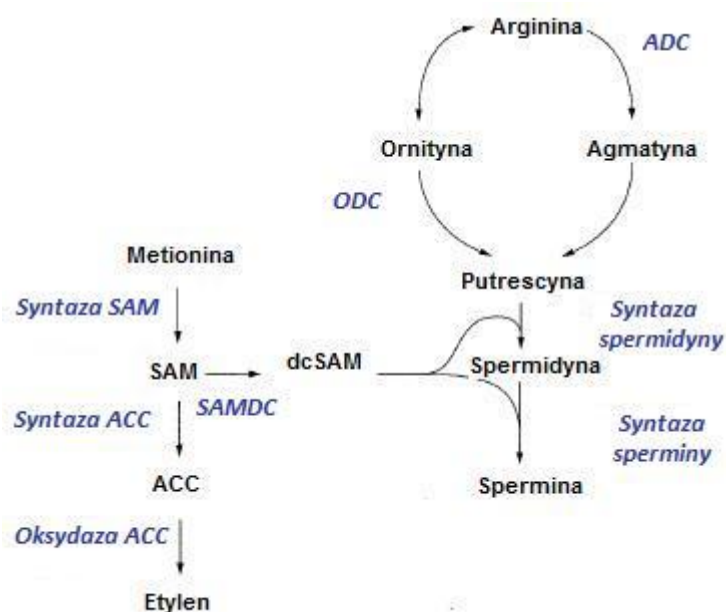
Najbardziej stałą ekspresję we wszystkich stosowanych wariantach doświadczalnych charakteryzował się gen kodujący ubikwitynę (Ryc.12). Został on wybrany jako gen referencyjny do dalszych badań.



Ryc.47: Przykładowe obrazy rozdziału na żelu agarozowym produktów RT-PCR dla genów kodujących syntazę kwasu 1-aminocyklopropano-1-karboxylowego (ACS), oksydazę diaminową (DAO), dekarboksylazę S-adenozylometioniny (SAMDC), kalmodulinę (CAM), reduktazę azotanową (NR), małe białko wiążące GTP (GTP), kinazę aktywowaną mitogenami2 (MAPK2), kinazę kinazy aktywowanej mitogenami2 (MAPKK2) oraz czynniki transkrypcyjne MYBZ2, bZIP44, bZIP62 i bZIP78. Kontrolne siewki z 3 godziny (1), siewki traktowane przez 3 godziny roztworem kadmu w stężeniu 10 mg L⁻¹ (2) lub 25 mg/l (3), kontrolne siewki z 6 godziny (4), siewki traktowane przez 6 godzin roztworem kadmu w stężeniu 10 mg L⁻¹ (5) lub 25 mg L⁻¹ (6), kontrolne siewki z 24 godziny (7), siewki traktowane przez 24 godziny roztworem kadmu w stężeniu 10 mg L⁻¹ (8) lub 25 mg L⁻¹ (9).

5.2.1 Geny powiązane z metabolizmem etylenu i poliamin

Zarówno etylen jak i poliaminy należą do regulatorów wzrostu uczestniczących w odpowiedzi roślin na działanie szeregu różnych czynników stresowych. Ponadto szlaki syntezy tych związków chemicznych, przedstawione na Ryc.48, są ze sobą powiązane. Substratem do biosyntezy zarówno etylenu jak i poliamin jest S-adenozylometionina (SAM). Związek ten może zostać przekształcony w kwas-1-aminocyklopropano-1-karboksylowego (ACC) w reakcji katalizowanej przez syntazę ACC (ACS), a następnie utleniony przy udziale oksydazy ACC (ACO) do etylenu. S-adenozylometionina może również ulegać dekarboksylacji i służyć jako substrat do syntezy spermidyny i sperminy za pośrednictwem, odpowiednio, syntazy spermidyny lub syntazy sperminy. Wpływ na poziom poliamin mają również enzymy uczestniczące w ich degradacji: oksydazy diaminowe (DAO) i poliaminowe (PAO). Warto zauważyć, że do produktów reakcji katalizowanych przez DAO i PAO należy nadtlenek wodoru, co wskazuje na powiązanie pomiędzy metabolizmem poliamin, a poziomem reaktywnych form tlenu w komórkach [Alcázar i in. 2010, Kumar i in. 1997]. W ramach prowadzonych badań zmierzono ekspresję trzech genów powiązanych z opisanymi szlakami metabolicznymi. Wybrane geny kodują syntazę ACC (ACS), dekarboksylazę S-adenozylometioniny (SAMDC) oraz oksydazę diaminową (DAO).



Ryc.48: Szlaki syntezy etylenu i poliamin [Kumar i in. 1997, zmodyfikowany]. ACC – kwas 1-aminocyklopropano-1-kraboksylowey, ADC – dekarboksylaza argininy, dcSAM – dekarboksylowana S-adenozylometionina, ODC – dekarboksylaza ornintyny, SAM – S-adenozylometionina.

Najsilniejszymi zmianami w ekspresji w odpowiedzi na działanie kadmu charakteryzował się gen kodujący ACS, wykazujący silną indukcję pod wpływem działania kadmu w stężeniu 25 mg L^{-1} odnotowaną po 3 i 6 godzin traktowania CdCl_2 (Ryc.14A). Wzrost ekspresji genu był skorelowany ze zwiększoną biosyntezą etylenu (Ryc.28). W przypadku roztworu kadmu o stężeniu 10 mg L^{-1} indukcja biosyntezy etylenu rozpoczynała się po 9 godzinach ekspozycji (Ryc.28A), zaś w przypadku roztworu o stężeniu 25 mg L^{-1} już po 5 godzinach działania tego metalu ciężkiego (Ryc.28B). Uzyskane wyniki sugerują, że etylen odgrywa istotną rolę w odpowiedzi roślin na działanie kadmu.

Wzrost produkcji etylenu wydaje się być powszechną reakcją roślin na działanie tego metalu ciężkiego [Arteca i Arteca 2007, Masood i in. 2012, Rodriguez-Serrano i in. 2006]. Sugeruje się, że działanie etylenu jest powiązane z rozwojem symptomów toksyczności kadmu. Wykazano, że hormon ten pośredniczy w zależnej od kadmu produkcji reaktywnych form tlenu, hamowaniu wzrostu korzeni oraz w procesach programowanej śmierci komórek [Liu i in. 2008b, Maksymiec 2011, Masood i in. 2012, Yakimova i in. 2006]. Etylen jest również ważną cząsteczką sygnałną mogącą uczestniczyć w regulacji ekspresji genów. Badania z zastosowaniem mikromacierzy

DYSKUSJA

pokazały, że egzogenne traktowanie etylenem prowadziło do zmian w ekspresji 184 genów w roślinach rzodkiewnika. Wiele z modulowanych genów kodowało białka zaangażowane w szlaki przekazywania sygnałów i odpowiedź na działanie czynników stresowych [Zhong i Burns 2003]. Liczną grupą genów stymulowanych przez etylen są geny kodujące czynniki transkrypcyjne, w tym czynnik JERF3 [Zhong i Burns 2003, Wu i in. 2008]. Transgeniczne rośliny tytoniu z wprowadzonym genem *JERF3* charakteryzowały się wyższą ekspresją genów kodujących białka zaangażowane w odpowiedź na stres osmotyczny i oksydacyjny oraz zwiększoną tolerancją na stres osmotyczny, solny, suszę i przechłodzenie [Wu i in. 2008]. Jest więc prawdopodobne, że również zależny od kadmu wzrost biosyntezy etylenu wpływa na ekspresję genów w roślinach narażonych na działanie tego metalu.

Jak to opisano na początku podrozdziału szlaki biosyntezy etylenu i poliamin są ze sobą powiązane. Co ciekawe transgeniczne rośliny tytoniu z wprowadzonymi w antysensownej orientacji genami kodującymi kluczowe enzymy biosyntezy etylenu, ACS i ACO, charakteryzowały się wyższą zawartością poliamin i zwiększoną odpornością na stresse abiotyczne [Wi and Park 2002]. Udział poliamin w odpowiedzi na działanie kadmu jest zróżnicowana i zależy od stosowanego stężenia oraz badanego gatunku. Generalnie jednak, tak jak to opisano w podrozdziale 1.2.5 przyjmuje się, że poliaminy pełnią funkcje ochronne, uczestniczą w regulacji poziomu RFT oraz procesach metylacji DNA [Groppa i in. 2007, Kumar i in. 2012, Wen i in. 2011]. Ponadto zwiększona degradacja poliamin może przyczyniać się do inicjacji procesów programowanej śmierci poprzez zwiększoną produkcję nadtlenu wodoru [Jiang i in. 2012].

W siewkach soi geny kodujące białka powiązane z metabolizmem poliamin wykazywały niewielkie zmiany w ekspresji pod wpływem działania kadmu (Ryc.14B i C), z wyjątkiem dwukrotnego wzrostu ekspresji genu kodującego SAMDC po 24 godzinach traktowania roztworem kadmu w stężeniu 25 mg L⁻¹. Być może we wczesnych godzinach trwania stresu kadmowego wspólny substrat do syntezy etylenu i poliamin, S-adenozylometionina (SAM), jest wykorzystywany do zwiększonej produkcji etylenu, zaś po 24 godzinie służy do syntezy sperminy i spermidyny w reakcji katalizowanej przez SAMDC.

Jednakże potwierdzenie zaproponowanej hipotezy wymagałoby zmierzenia zmian w poziomie poszczególnych poliamin w siewkach soi w różnych okresach ekspozycji na roztwory kadmu.

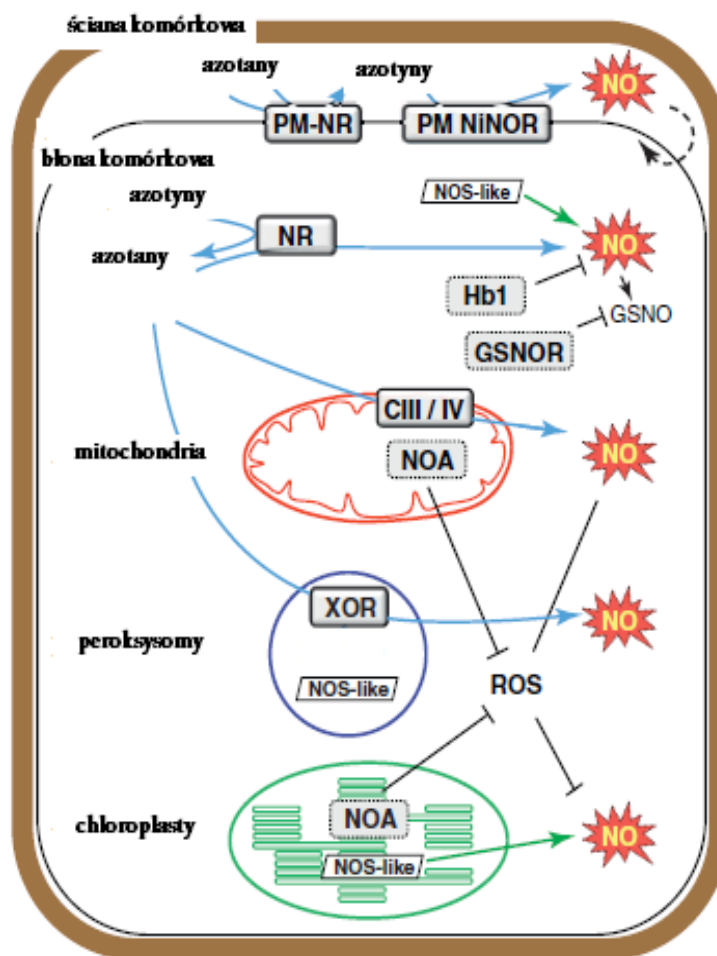
5.2.2 Geny zaangażowane w przekazywanie sygnału za pośrednictwem jonów wapnia

Pomimo, że we wstępie niniejszej rozprawy doktorskiej (podrozdział 1.2.1) opisano przekonujące dowody na to, że sygnalizacja za pośrednictwem jonów wapnia odgrywa istotną rolę w sygnalizacji komórkowej aktywowanej przez kadm, w prowadzonych doświadczeniach nie zaobserwowano indukcji żadnego z dwóch genów powiązanych z sygnalizacją zależną od Ca^{2+} . Gen kodujący fosfolipazę C (Ryc.15A) nie wykazywał zmian w ekspresji pod wpływem działania kadmu, zaś gen kodujący kalmodulinę charakteryzował się spadkiem ekspresji w siewkach soi traktowanych obydwoma stężeniami kadmu przez 24 godziny (Ryc.15B). Na podstawie uzyskanych wyników nie można jednak wykluczyć zaangażowania sygnalizacji za pośrednictwem Ca^{2+} w odpowiedź siewek soi na działanie kadmu. Zarówno fosfolipaza C jak i kalmodulina są kodowane przez rodziny wielogenowe. W bazie danych NCBI odnaleziono 25 sekwencji mRNA kodujących podjednostki fosfolipazy C oraz 10 sekwencji kodujących kalmodulinę. Jest więc możliwe, że kadm reguluje ekspresję innych niż wybrane geny kodujących te białka. Ponadto fosfolipaza C i kalmodulina mogą być aktywowane przez kadm na poziomie białka, a nie transkryptu. Wprawdzie brak bezpośrednich dowodów na stymulację aktywności PLC przez kadm, jednakże doświadczenia, w których stosowano inhibitory tego enzymu sugerują, że jest on zaangażowany w zależną od kadmu akumulację inozytolo-3-fosforanu prowadzącą do uwalniania Ca^{2+} do cytoplazmy oraz w inicjację programowanej śmierci komórek [Garnier i in. 2006, Olmos i in. 2003, Yakimva i in. 2006]. W przypadku kalmoduliny, w roślinach rzodkiewki zaobserwowano, że jony kadmu mogą zamieniać w tym białku jony wapnia, co prowadzi do obniżenia jego aktywności [Rivetta i in. 1997]. Co ciekawe utworzenie podobnych kompleksów Cd^{2+} -kalmodulina *in vitro* wywierało odwrotny efekt - prowadziło do stymulacji aktywności tego białka sensorycznego [Ouyang and Vogel 1998].

5.2.3 Geny kodujące białka zaangażowane w generowanie tlenku azotu

W komórkach roślinnych istnieje kilka potencjalnych źródeł tlenku azotu przedstawionych na Ryc.47. Ta cząsteczka sygnałowa może powstawać w wyniku reakcji utleniania lub redukcji. Reakcje utleniania obejmują produkcję tlenku azotu przez enzym wykazujący aktywność syntazy tlenku azotu (NOS), a także powstawanie NO w wyniku metabolizmu poliamin lub hydroskylaminy. Badania, w których stosowano inhibitory syntazy tlenku azotu sugerują, że produkcja NO może być katalizowana przez ten enzym, jednakże, chociaż NOS dobrze poznano w komórkach zwierzęcych, jak dotąd nie udało się zidentyfikować tego białka w roślinach. Również w przypadku generowania NO za pośrednictwem poliamin lub hydroksylaminy, nie zidentyfikowano jeszcze z całą pewnością zaangażowanych w ten proces enzymów. Lepiej poznane zostały reakcje redukcji, w wyniku których może powstawać NO. Tlenek azotu może być generowany przez reduktazę azotanową związaną z plazmolemmą (NiNOR), a w warunkach obniżonego dostępu tlenu, również przez oksydoreduktazę kasntynową (XOR) i mitochondria. Jednakże głównym źródłem NO jest zlokalizowana w cytoplazmie reduktaza azotanowa (NR). Enzym ten katalizuje redukcję azotanów do azotynów, a w sprzyjających warunkach może również redukować azotyny do NO. Donorem elektronów w opisanej reakcji jest cząsteczka NAD(P)H. Generowanie tlenku azotu przez NO zachodzi szybciej przy dużym stężeniu azotynów i niskim pH. Aktywność reduktazy azotanowej jest również regulowana przez fosforylację i poliaminy. Udział NR w produkcji tlenku azotu wykazano między innymi w przypadku formowania się korzeni bocznych, działaniu elicytorów grzybowych, a także w odpowiedzi na stres osmotyczny, wodny i tlenowy [Gupta i in. 2011, Rosales i in. 2012].

DYSKUSJA



Ryc.49: Źródła tlenu azotu w komórce roślinnej. Skróty: Hb1 – hemoglobina, GSNO – S-nitrozoglutation, GSNOR- reduktaza S-nitrozoglutationu, NO – tlenek azotu, NOA – białko powiązane z NO, NOS-like – enzym wykazujący aktywność syntazy azotanowej, NR – reduktaza azotanowa, PM-NiNOR – oksydoreduktaza azotynowo-NO związana z błoną komórkową, PM-NR – reduktaza azotanowa związana z błoną komórkową, XOR – oksydoreduktaza ksantynowa, [Gupta i in. 2011, zmodyfikowany].

W przypadku działania stresu kadmowego nie uzyskano jeszcze jednoznacznej odpowiedzi, które z wymienionych elementów są zaangażowane w generowanie NO. Badania przeprowadzone na rzodkiewniku wykazały, że zależna od kadmu akumulacja NO jest hamowana przez inhibitory syntazy tlenu azotu [Besson-Bard i in. 2009]. Z drugiej strony zastosowanie inhibitora reduktazy azotanowej całkowicie niwelowało zależną od kadmu i miedzi akumulację tlenu azotu w zawieszynie komórkowej topoli białej [Balestrazzi i in. 2009]. W siewkach soi kadm powodował indukcję ekspresji genu kodującego NR (Ryc.16) oraz wzrost aktywności kodowanego enzymu (Ryc.29). Opisane zjawisko może być powiązane z nadprodukcją tlenu azotu odnotowaną u licznych gatunków roślin w odpowiedzi na krótkotrwały stres kadmowy (tabela 1).

DYSKUSJA

Obserwowana stymulacja reduktazy azotanowej może mieć jednak również związek ze zmianami w metabolizmie azotu zachodzącymi pod wpływem działania kadmu. Wykazano, że długotrwała ekspozycja na ten metal ciężki prowadzi do zahamowania pobierania azotynów ze środowiska, spadku zawartości azotu w roślinach, a także obniżenia aktywności licznych enzymów zaangażowanych w metabolizm azotu, w tym reduktazy azotanowej [Dguimi i in. 2009, Gill i in. 2012, Huang i Xiong 2009, Wang i in. 2008]. Być może krótkotrwała ekspozycja na kadm stymuluje NR, co prowadzi do zwiększonej produkcji NO lub też ma na celu utrzymania równowagi azotanowej, zaś przedłużający się stres kadmowy skutkuje spadkiem aktywności tego enzymu przyczyniającym się do zaburzenia gospodarki azotowej. Potwierdzenie zaproponowanej hipotezy wymagałoby jednak przeprowadzenia dalszych badań.

5.2.4 Geny powiązane z sygnalizacją za pośrednictwem GTP

Tak jak to opisano we wstępie niniejszej rozprawy doktorskiej małe białka wiążące GTP odgrywają rolę w wielu procesach zachodzących w komórkach wszystkich organizmów eukariotycznych (rozdział 1.2.9). Wybrany do analizy ekspresji gen wykazuje największe podobieństwo do genów kodujących małe białka wiążące GTP należące do rodziny Rab (Ryc.50).

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> Glycine max GTP-binding protein (LOC547654), mRNA >qbjAF532625.1 Glycine max GTF	1753	1753	100%	0.0	100%	NM_001249030.1
<input type="checkbox"/> Glycine max ras-related protein RABA1b-like (LOC100810759), mRNA	1243	1243	85%	0.0	94%	NM_001252726.1
<input type="checkbox"/> Soybean clone JCVI-FLGm-12P4 unknown mRNA	1243	1243	85%	0.0	94%	BT098755.1
<input type="checkbox"/> Soybean clone JCVI-FLGm-16K15 unknown mRNA	1212	1212	70%	0.0	99%	BT097430.1
<input type="checkbox"/> Pisum sativum mRNA for GTP-binding protein, complete cds, clone:pra6	900	900	85%	0.0	87%	D12545.1
<input type="checkbox"/> M.sativa Rab mRNA	889	889	89%	0.0	86%	X79278.1
<input type="checkbox"/> PREDICTED: Cicer arietinum ras-related protein RABA1b-like (LOC101493366), mRNA	881	881	87%	0.0	86%	XM_004488958.1
<input type="checkbox"/> Medicago truncatula Ras-related protein Rab-11B (MTR_2q075950) mRNA, complete cds	881	881	87%	0.0	86%	XM_003596278.1

Ryc.50: Wyniki algorytmu blast dla genu kodującego małe białko GTP uzyskane w bazie danych NCBI.

DYSKUSJA

Tak jak w przypadku innych małych białek wiążących GTP, białka Rab są aktywowane poprzez wymianę GDP na GTP zachodzącą przy udziale czynników wymieniających nukleotydy guaninowe (GEF). Dezaktywacja białek Rab zachodzi po hydrolizie GTP do GDP. Roślinne białka Rab stanowią liczną grupę białek, w rzodkiewniku zidentyfikowano 57 a w ryżu 52 białka należące do tej rodziny. Chociaż dokładne funkcje poszczególnych białek Rab są słabo poznane, uważa się, że uczestniczą one w transporcie wewnątrzkomórkowym. Ponadto sugeruje się, że aktywność białek Rab jest powiązana z formowaniem włóśników korzeniowych, łagiewki pyłkowej, brodawek korzeniowych u roślin motylkowych, embriogenezą, dojrzewaniem owoców, a także sygnalizacją za pośrednictwem hormonów oraz odpowiedzią na czynniki stresowe [Agarawal i in. 2009]. Wykazano, że białko należące do rodziny Rab2 jest indukowane przez stres solny w trawie *Lolium temulentum* i stres suszy w trawie *Sporobolus stapfianus*. Natomiast białko z rodziny Rab5 przez stres solny w przypołudniku kryształkowym (*Mesembryanthemum crystallinum*), zaś jedno z białek Rab7 przez przechłodzenie, suszę i traktowanie wysokimi stężeniami NaCl w ryżu [Bolte i in. 2000, Dombrowski i in. 2008, Nahm i in. 2003, O'mahony i Oliver 1999]. Ponadto transgeniczne rośliny rzodkiewnika charakteryzujące się nadekspresją *AtRab7* wykazywały zwiększoną odporność na stres solny i osmotyczny [Mazel i in. 2004], zaś transgeniczne rośliny tytoniu o zwiększonej ekspresji *PgRab7* były bardziej odporne na stres solny i dehydratację [Agarawal i in. 2008]. Jak dotąd nie poznano udziału małych białek wiążących GTP w odpowiedzi roślin na działanie metali ciężkich.

Badany gen kodujący jedno z małych białek wiążących GTP podobne do białek Rab, wykazywał jedynie bardzo słabą indukcję w odpowiedzi na trzygodzinne traktowanie roztworem kadmu o stężeniu 25 mg L^{-1} (Ryc.17). Jednakże, tak jak to zostało opisane na początku rozdziału, poszczególne gatunki roślin mogą posiadać kilkadziesiąt różnych białek Rab. Istnieje więc możliwość, że ekspresja lub aktywność innych białek należących do tej rodziny jest modulowana przez kadm. Wykluczenie lub potwierdzenie udziału białek Rab w odpowiedzi roślin na działanie tego metalu ciężkiego wymagało by dalszych badań.

5.2.5 Geny kodujące kinazy aktywowane mitogenami

Wydaje się, że stymulacja kaskad kinaz aktywowanych mitogenami (MAPK), zarówno na poziomie transkryptu jak i białka, jest konserwatywną odpowiedzią na działanie kadmu odnotowaną zarówno u szeregu gatunku roślin jak i zwierząt [Agrawal i in. 2002, Agrawal i in. 2003, Chen i in. 2008, Jing i in. 2012, Jonak i in. 2004, Kalaryia i in. 2009, Kim i in. 2003, Kim i in. 2005, , Liu i in. 2010, Opdenakker i in. 2012, Valbonesi i in. 2008, Ye i in. 2013]. Aktywacja MAPK stanowi bardzo wczesną odpowiedź na działanie kadmu obserwowaną już po 10-15 minutach traktowania tym metalem ciężkim [Jonak i in. 2004, Kim i in. 2003]. Również w badaniach przeprowadzonych w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej wykazano, że indukcja genu kodującego kinazę kinazy aktywowanej mitogenami2 (MAPKK2) zachodzi bardzo wcześnie, już po 3 godzinach traktowania $CdCl_2$ i zanika przy dłuższych czasach traktowania (Ryc.18B). Gen kodujący kinazę aktywowaną mitogenami2 (MAPK2) nie wykazywał zmian w ekspresji pod wpływem kadmu (Ryc.18A), jednakże jest możliwe, że gen ten jest indukowany w innych niż wybrane czasookresach działania $CdCl_2$. Zarówno w przypadku roślin jak i zwierząt aktywacja MAPK jest zależna od akumulacji reaktywnych form tlenu [Chen i in. 2008, Jing i in. 2012, Kalaryia i in. 2009, Kim i in. 2005, Liu i in. 2010, Yeh i in. 2007]. Kolejną wspólną cechą dla organizmów roślinnych i zwierzęcych jest pośrednictwo białek MAPK w zależnej od kadmu programowanej śmierci komórek [Chen et al. 2011, Ye i in. 2013]. Również ten fakt jest spójny z uzyskanymi wynikami, ponieważ gen kodujący MAPKK2 charakteryzował się wzrostem ekspresji tylko w odpowiedzi na działanie wyższego stężenia kadmu. Badania wykazują, że wraz ze wzrostem stosowanych stężeń kadmu wzrasta również ilość martwych komórek, co może być wynikiem intensyfikacji procesów programowanej śmierci [De Michele i in. 2009].

Ze względu na zaangażowanie kaskad MAPK w ogromną liczbę procesów zachodzących w komórkach ciężko jest oszacować ich dokładną rolę w odpowiedzi na działanie kadmu. Jak już wspomniano powyżej wykazano że pośredniczą one w zależnej od kadmu programowanej śmierci komórek. Udowodniono również, że kinazy aktywowane mitogenami uczestniczą w fosforylacji kluczowego enzymu w szlakach syntezy etylenu, ACS, zwiększając stabilizację tego białka i przyczyniając się do szybszej produkcji etylenu [Chae i Kieber 2005]. Jest więc możliwe, że

DYSKUSJA

obserwowana w przeprowadzonych badaniach stymulacja ekspresji genu *MAPKK2* (Ryc.18B) jest powiązana ze zwiększoną produkcją etylenu w odpowiedzi na działanie kadmu (Ryc.28). Białka należące do kinaz aktywowanych mitogenami takie jak CTR1, MPK3, MPK6 i MPK9 zidentyfikowane w rzodkiewniku, uczestniczą również w przekazywaniu sygnału z receptorów etylenu na dalsze elementy sygnałowe [Cho i Yoo 2009]. Kaskady kinaz aktywowane mitogenami mogą stanowić ważny element integrujący różne szlaki przekazywania sygnału aktywowane pod wpływem kadmu. Oprócz opisanego udziału w sygnalizacji etylenu, MAPK są zaangażowane również w sygnalizację za pośrednictwem reaktywnych form tlenu, jonów wapnia, auksyn oraz kwasu abscysynowego, jasmonowego i salicylowego [Nakagami i in. 2005, Ye i in. 2013]. Ponadto, w badaniach dotyczących udziału MAPK w odpowiedzi na patogeny wykazano, że białka te pośredniczą w regulacji ekspresji czynników transkrypcyjnych należących do rodzin MYB, WRKY i EREBP oraz białek powiązanych z patogenezą (PR) [Nakagami i in. 2005]. Fakt, że większość z wymienionych białek jest indukowanych również przez kadm [DalCorso i in. 2010, Opendakker i in. 2012, Yanhui i in. 2006] nasuwa przypuszczenie, że kaskady MAPK mogą uczestniczyć w regulacji ekspresji genów aktywowanych pod wpływem tego metalu ciężkiego.

5.2.6 Geny kodujące czynniki transkrypcyjne

Do analizy zmian ekspresji genów pod wpływem działania kadmu wybrano sześć genów kodujących czynniki transkrypcyjne: MYBZ2, bZIP44, bZIP62 i bZIP78 oraz dwa geny kodujące czynnik transkrypcyjny DOF1. Geny kodujące czynnik transkrypcyjny DOF1 zostały wybrane ze względu na fakt, że sekwencje promotorowe wszystkich genów indukowanych przez kadm zawierały miejsca wiążące ten czynnik transkrypcyjny (tabela 7). Należy jednak zaznaczyć, że miejsce rozpoznawane przez DOF1 jest stosunkowo krótkie (WAAAG) i może występować w genomie soi z dużą częstotliwością. Obydwa geny kodujące czynnik transkrypcyjny DOF1, *Glyma13g42820* i *Glyma15g02620*, charakteryzowały się wzrostem ekspresji w odpowiedzi na krótkotrwały (3 godzinny) stres kadmowy (Ryc.19A i B). Gen *Glyma15g0262* wykazywał także niewielką indukcję po sześciogodzinnym traktowaniu roztworem kadmu w stężeniu 25 mg L⁻¹. Gen kodujący czynnik transkrypcyjny DOF1 został również zidentyfikowany jako jeden z genów indukowanych przez stres suszy

DYSKUSJA

w korzeniach amarantu [Huerto-Ocampo i in. 2010], co sugeruje, że białko to może uczestniczyć w odpowiedzi roślin na różne warunki stresowe.

Analiza ekspresji kilkuset genów należących do rodziny MYB w rzodkiewniku wykazała, że około 20% z badanych genów charakteryzowało się wzrostem ekspresji w odpowiedzi na działanie kadmu i stresu solnego [Yanhui i in. 2006]. Również w siewkach soi poziom mRNA kodującego jeden z czynników transkrypcyjnych należących do rodziny MYB, MYBZ2, wzrastał po 3 i 6 godzinach traktowania chlorkiem kadmu (Ryc.19C). Obserwowana indukcja była najsilniejsza w odpowiedzi na sześciogodzinna ekspozycję na wyższe stężenie kadmu.

Geny kodujące czynniki transkrypcyjne bZIP44, bZIP62 i bZIP78 zostały wybrane ze względu na fakt, że transgeniczne rośliny rzodkiewnika z wprowadzonymi sekwencjami kodującymi wymienione czynniki transkrypcyjne wykazywały zwiększoną tolerancją na działanie stresu solnego i niskiej temperatury [Liao i in. 2008]. W przypadku siewek soi tylko czynnik transkrypcyjny bZIP62 charakteryzował się wzrostem ekspresji w odpowiedzi na działanie kadmu (Ryc.19F).

Wyniki prowadzonych badań sugerują, że cztery spośród sześciu wybranych genów kodujących czynniki transkrypcyjne charakteryzują się wzrostem ekspresji w odpowiedzi na działanie kadmu. Do indukowanych genów należą dwa geny kodujące czynnik transkrypcyjny DOF1 oraz geny kodujące czynniki transkrypcyjne MYZB2 i bZIP62. Dane literaturowe pokazują, że czynniki transkrypcyjne DOF1 i bZIP62 są zaangażowane również w odpowiedź na inne warunki stresowe, co sugeruje, że opisane białka mogą odgrywać rolę w regulacji ekspresji genów podczas ekspozycji na różne stresy środowiskowe. Interesującym byłoby wyodrębnienie genów regulowanych przez wspomniane czynniki transkrypcyjne, gdyż jak dotąd w literaturze brak informacji dotyczących tego zagadnienia.

Czynniki transkrypcyjne łączą się z DNA w specyficznych sekwencjach nazywanych elementami regulatorowymi lub elementami *cis*, co prowadzi do aktywacji lub represji danego genu np. poprzez rearanżację chromatyny ułatwiające przyłączenie się białek niezbędnych do rozpoczęcia procesu transkrypcji. Elementy *cis* są najczęściej umiejscowione w sekwencjach promotorowych genów obejmujących kilkadziesiąt zasad przed miejscem rozpoczęcia transkrypcji. Dzięki dynamicznemu rozwojowi bioinformatyki możliwa jest identyfikacja licznych elementów *cis* w sekwencjach promotorowych interesujących genów. W ramach prowadzonych badań, przy współpracy z firmą VitainSilica, określono sekwencje promotorowe o długości 1000 pz

DYSKUSJA

dla genów wykazujących najsilniejszą indukcję w odpowiedzi na działanie kadmu, kodujących syntezę kwasu 1-aminocyklopropano-1-karboxyowego (ACS), dekarboksylazę S-adenozylometioniny (SAMDC), reduktazę azotanową (NR), kinazę kinazy aktywowanej mitogenami2 (MAPKK2) oraz czynniki transkrypcyjne DOF1, MYBZ2 i bZIP62. Następnie zidentyfikowano umiejscowione w nich elementy regulatorowe. Odnalezione elementy *cis* zostały zaprezentowane w tabeli 14 zamieszczonej w aneksie niniejszej rozprawy doktorskiej. Analizy wykazały, że badane geny zawierały liczne elementy *cis* powiązane z odpowiedzią roślin na działanie stresów środowiskowych (tabela 6 i 7). W sekwencjach promotorowych wszystkich badanych genów odnaleziono miejsce wiązania czynnika transkrypcyjnego DOF1. Fakt ten, razem z obserwowaną zależną od kadmu indukcją dwóch genów kodujących czynnik transkrypcyjny DOF1 (Ryc.19A i B) oraz wykazaną indukcją genu DOF1 w korzeniach amarantu w odpowiedzi na stres suszy [Huerto-Ocampo i in. 2010] sugerują, że wymieniony czynnik transkrypcyjny może odgrywać istotną rolę w odpowiedzi roślin na niekorzystne warunki środowiskowe.

Kolejnym interesującym wynikiem jest odnalezienie w sekwencji promotorowej genu kodującego MAPKK2 elementu regulatorowego odpowiedzi na metale – MRE (tabela 7). Element ten zidentyfikowano wcześniej w roślinach fasoli. Wykazano, że wprowadzenie do roślin tytoniu konstruktów zawierających promotor z sekwencją MRE przyłączony do genu reporterowego kodującego β -glukuronidazę (GUS) skutkuje aktywacją genu reporterowego w odpowiedzi na działanie metali ciężkich [Qi i in. 2007].

Ponadto sekwencje promotorowe genów kodujących czynniki transkrypcyjne DOF1, MYBZ2 i bZIP62 zawierały elementy regulatorowe powiązane z sygnalizacją za pośrednictwem etylenu i kwasu abscysynowego (tabela 8). Opisany fakt razem z obserwowaną zależną od kadmu indukcją genu kodującego ACS (Ryc.14A) oraz wzrostem biosyntezy etylenu w odpowiedzi na działanie kadmu (Ryc.28) wskazują na ważną rolę pełnioną przez etylen w odpowiedzi siewek soi na działanie kadmu. Potencjalne funkcje pełnione przez ten hormon w roślinach narażonych na działanie kadmu zostały opisane w podrozdziale 5.2.1. Co ciekawe wzrost ekspresji genów kodujących czynniki transkrypcyjne DOF1, MYBZ2 i bZIP62 był skorelowany czasowo ze wzrostem produkcji etylenu. Wzrost produkcji etylenu następował po 5 godzinach traktowania roztworem kadmu w stężeniu 25 mg L^{-1} , podczas gdy indukcję genów *DOF1*, *MYBZ2* i *bZIP62* odnotowano po 6 godzinach działania chlorku kadmu.

Również kwas abscysynowy może odgrywać istotną funkcję w sygnalizacji uruchamianej w odpowiedzi na działanie kadmu, na co wskazuje oprócz odnalezionych elementów regulatorowych powiązanych z działaniem ABA w sekwencjach promotorowych genów indukowanych przez kadm, również obserwowany wzrost poziomu tego hormonu w różnych gatunkach roślin poddanych działaniu stresu kadmowego [Han i in. 2013, Hsu i Kao 2003, Stroiński i in. 2013].

5.3 Rola reaktywnych form tlenu generowanych przez oksydazę NADPH w odpowiedzi roślin na stres kadmowy

Jedną z najpowszechniejszych odpowiedzi organizmów na działanie kadmu jest akumulacja reaktywnych form tlenu [Hsu i Kao 2007, Kippler i in. 2012, Kopyra i Gwóźdź 2003, Lehotai i in. 2011, Pytharopoulou i in. 2011, Vestena i in. 2011, Wang i in. 2011]. Istnieje kilka źródeł RFT podczas stresu kadmowego, jednakże dane literaturowe wskazują, że główną rolę w nadprodukcji tych cząsteczek we wczesnej odpowiedzi roślin na działanie kadmu pełni oksydaza NADPH [Arasimowicz-Jelonek i in. 2012, Cho i in. 2012, Maksymiec i Krupa 2006, Olmos i in. 2003, Rodríguez-Serrano i in. 2006, Smiri 2011, Yeh i in. 2007]. Również w badaniach prowadzonych w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej wykazano, że oksydaza NADPH jest zaangażowana w zależną od kadmu akumulację RFT. Wstępne badania wykazały, że w trzech stosowanych czasookresach traktowania chlorkiem kadmu (3, 6 i 24 godziny) najsilniejsza akumulacja nadtlenu wodoru zachodzi po 24 godzinach (Ryc.30). Po 3 godzinach ekspozycji na kadm praktycznie nie zaobserwowano zbrązowienia korzeni w odpowiedzi na barwienie 3'3'-diaminobenzzydynam świadczącego o akumulacji H_2O_2 (Ryc.30A), zaś po 6 godzinach poziom nadtlenu wodoru wzrastał jedynie w pojedynczych korzeniach siewek soi traktowanych roztworem kadmu o wyższym stężeniu (Ryc.30B). Traktowanie siewek soi inhibitorem oksydazy NADPH, DPI, skutkowało całkowitym zniwelowaniem akumulacji H_2O_2 odnotowaną po 24 godzinach traktowania $CdCl_2$ (Ryc.31). Opisany efekt był obserwowany w odpowiedzi na działanie obydwu stosowanych stężeń DPI (50 i 100 μM). Produkowane za pośrednictwem oksydazy NADPH reaktywne formy tlenu, przedostają się do wnętrza komórki, gdzie mogą przyczyniać się do nasilanie stresu oksydacyjnego i/lub uczestniczyć w szlakach przekazywania sygnału.

DYSKUSJA

W ramach prowadzonych badań postanowiono sprawdzić, czy generowane przez oksydazę NADPH reaktywne formy tlenu pośredniczą w obserwowanej, zależnej od kadmu indukcji genów kodujących ACS, MAPKK2, NR oraz czynniki transkrypcyjne DOF1, MYBZ2 i bZIP62. Co ciekawe zastosowanie DPI skutkowało zwiększeniem zależnej od kadmu indukcji genów kodujących czynniki transkrypcyjne DOF1 i MYBZ2 (Ryc.34C-E). Uzyskane wyniki sugerują, że aktywność oksydazy NADPH w jakiś sposób osłabia indukcję opisanych genów w odpowiedzi na działanie kadmu. Można zaproponować dwie hipotezy wyjaśniające opisane zjawisko. Produkowane za pośrednictwem oksydazy NADPH reaktywne formy tlenu mogą modulować szlaki przekazywania sygnału uczestniczące w regulacji ekspresji genów *DOF1* i *MYBZ2*. Faktycznie, meta-analiza zmian ekspresji genów w odpowiedzi na działanie nadtlenu wodoru w organizmach należących do różnych królestw wykazała, że H_2O_2 wpływa na ekspresję szeregu genów kodujących elementy sygnałne. Wydaje się, że konserwatywną odpowiedzią u organizmów eukariotycznych jest zależna od H_2O_2 indukcja genów kodujących małe białka wiążące GTP i kinazy zależne od cyklin. Ponadto u rzodkiewnika i drożdży wykazano wzrost ekspresji genów kodujących kinazy aktywowane mitogenami, kinazy serynowo-treoninowe oraz białka łączące się z kalmoduliną [Vandenbroucke i in. 2008]. Inne badania prowadzone na rzodkiewniku pokazały, że H_2O_2 pośredniczy w indukcji ekspresji 21 i represji ekspresji 5 genów powiązanych ze szlakami przekazywania sygnału [Wang i in. 2005]. Być może któreś z wymienionych białek uczestniczy w aktywacji lub represji genów *DOF1* i *MYBZ2*.

Innym możliwym wyjaśnieniem jest udział generowanych za pośrednictwem oksydazy NADPH reaktywnych form tlenu w nasileniu stresu oksydacyjnego. Nadprodukcja RFT prowadzi do oksydacyjnych uszkodzeń cząsteczek biologicznych, w tym RNA. Sugeruje się, że oksydacyjne modyfikacje RNA mogą być jednym z mechanizmów regulujących szlaki przekazywania sygnału. Co ciekawe, wykazano, że w nasionach słonecznika oksydacyjne modyfikacje dotyczą mRNA kodującego określone białka, co sugeruje, że proces ten jest selektywny, a nie losowy. Jak do tej pory nie znany jest jednak mechanizm predysponujący określone mRNA do zwiększonej częstości zmian oksydacyjnych [Bazin i in. 2011]. Być może RNA kodujące czynniki transkrypcyjne DOF1 i MYBZ2 jest również bardziej podatne na uszkodzenia oksydacyjne, co może prowadzić do zmniejszonej ekspresji kodowanych białek np. poprzez szybszą degradację mRNA lub szybsze zakończenie procesów translacji.

DYSKUSJA

W celu sprawdzenia, czy wpływ generowanych przez NADPH oksydaza reaktywnych form tlenu na ekspresję genów jest powiązany z nasileniem objawów stresu oksydacyjnego zmierzono poziom produkowanych w wyniku peroksydacji lipidów substancji reagujących z kwasem tiobarbiturowym (TBARS) w kontrolnych siewkach soi, a także w siewkach traktowanych przez 3 godziny DPI i/lub roztworem kadmu. Zawartość TBARS pozostawała jednak na takim samym poziomie we wszystkich opisanych wariantach eksperymentalnych (Ryc.36). Należy jednak zaznaczyć, że RFT mogą być indukowane przez kadm jeszcze przed 3 godziną działania tego metalu ciężkiego. Dane literaturowe wskazują, że kadm może wywoływać kilka fal generowania RFT, przy czym najwcześniejsza ma miejsce już w pierwszej godzinie działania tego czynnika stresowego [Garnier i in. 2006]. Wykrycie wzrostu RFT może być trudne również ze względu na fakt, że cząsteczki te są wysoce reaktywne. W przypadku słabej, ale biologicznie istotnej indukcji, generowane RFT mogą szybko przereagowywać z docelowymi elementami, którymi mogą być nie tylko lipidy, ale także białka, kwasy nukleinowe, czy też tlenek azotu.

5.4 Sygnalna funkcja tlenu azotu w roślinach poddanych działaniu kadmu

Tlenek azotu może wpływać na regulację ekspresji licznych genów [Ahlfors i in. 2009, Badri i in. 2008, Besson-Bard i in. 2009]. W celu zbadania, czy ta cząsteczka sygnalna pośredniczy również w zależnej od kadmu indukcji badanych genów (*ACS*, *MAPKK2*, *NR*, *DOF1*, *MYBZ2* i *bZIP62*), siewki soi traktowano zamiastem tlenu azotu, PTIO. Aplikacja PTIO skutkowała obniżeniem poziomu ekspresji wszystkich genów indukowanych przez kadm po 3 godzinach traktowania $CdCl_2$ do poziomu obserwowanego w kontrolnych siewkach soi (Ryc.39). Po 6 godzinach traktowania PTIO nie zaobserwowano już opisanego efektu - zamiastem tlenu azotu nie wpływał w istotny sposób na ekspresję badanych genów ani w kontrolnych siewkach soi, ani w siewkach soi poddanych działaniu kadmu (Ryc.40).

Dostępne informacje sugerują, że NO zwiększa pobieranie kadmu, najprawdopodobniej przez stymulację ekspresji genów powiązanych z transportem żelaza [Arasimowicz-Jelonek i in. 2012, Besson-Bard i in. 2009, Chang i in. 2012, Ma i in. 2010, Xu i in. 2011]. W celu sprawdzenia, czy obserwowany po 3 godzinach niwelujący wpływ PTIO na indukcję badanych genów jest związane z zahamowanym

DYSKUSJA

pobieraniem kadmu, oznaczono akumulację tego metalu ciężkiego w korzeniach siewek soi przy pomocy barwienia odczynnikami Dithizone. Po 3 godzinach traktowania zarówno korzenie siewek soi traktowane kadmem jak i korzenie siewek soi traktowane kadmem i PTIO charakteryzowały się brązowo-czerwonym zabarwieniem o podobnym odcieniu (Ryc.41A), co świadczy o porównywalnej akumulacji kadmu w przypadku obydwu wariantów eksperymentalnych. Po 6 godzinach korzenie siewek soi traktowanych roztworem kadmu oraz korzenie siewek soi traktowane roztworem kadmu i PTIO barwiły się na brązowy kolor, jednakże w tym przypadku korzenie siewek traktowanych roztworem kadmu i PTIO charakteryzowały się wyraźnie jaśniejszym odcieniem (Ryc.41B). Uzyskane wyniki świadczą o tym, że po 3 godzinach NO nie wpływa na akumulację kadmu w korzeniach siewek soi, jednakże po 6 godzinach zwiększa pobieranie tego metalu ciężkiego z otoczenia. Ponadto siewki soi traktowane przez 24 godziny roztworem kadmu i PTIO charakteryzowały się wyższą przeżywalnością, niż siewki soi traktowane tylko roztworem kadmu (Ryc.37 i 38).

Podsumowując, wyniki przeprowadzonych badań pokazują, że w bardzo wczesnych godzinach trwania stresu kadmowego tlenek azotu pośredniczy w indukcji szeregu genów powiązanych ze szlakami przekazywania sygnału, zaś w późniejszym czasie zwiększa pobieranie kadmu ze środowiska przyczyniając się do rozwoju toksycznych symptomów działania tego metalu ciężkiego, objawiających się zmniejszoną przeżywalnością komórek. Wpływ tlenu azotu na zwiększenie pobierania kadmu oraz jego udział w procesach programowanej śmierci został już opisany w różnych gatunkach roślin narażonych na działanie tego metalu ciężkiego [Arasimowicz-Jelonek i in. 2012, Besson-Bard i in. 2009, Chang i in. 2012, De Michele i in. 2009, Ma i in 2010, Xu i in. 2011, Ye i in. 2013]. Natomiast niewiele wiadomo na temat roli NO w regulacji ekspresji genów modulowanych przez kadm. Istnieje kilka mechanizmów, poprzez które tlenek azotu może wpływać na ekspresję genów. Do bezpośrednich efektów akumulacji NO należy nitrozylacja reszt cysteinowych białek, w tym czynników transkrypcyjnych, mogąca przyczyniać się do zahamowania ich aktywności [Baudouin 2011]. Wykazano, że nitrozylacja reszty cysteinowej w czynniku transkrypcyjnym AtMYB2 prowadziła do zahamowania wiązania się tego białka do DNA [Serpa i in. 2007]. Ponadto tlenek azotu może reagować z tlenem lub anionorodnikiem ponadtlenkowym, prowadzącego do powstawania reaktywne formy azotu (RNS): NO_2^- , NO_3^- i OONO^- . Postuluje się, że spośród wymienionych RNS, przynajmniej OONO^- może pełnić funkcje sygnałne [Corpas i in. 2008]. Interesujących

informacji dotyczących regulacji ekspresji genów przez NO dostarczyły analizy bioinformatyczne danych uzyskanych z doświadczeń przeprowadzonych na rzodkiewniku. Wykazano, że geny regulowane przez tlenek azotu częściej zawierają w sekwencjach promotorowych miejsca wiązania specyficznych czynników transkrypcyjnych należących do ośmiu różnych rodzin, w tym do rodziny bZIP i WRKY. Wyniki analiz sugerują więc, że tlenek azotu może regulować ekspresję genów za pośrednictwem wymienionych czynników transkrypcyjnych [Palmieri i in. 2008].

5.5 Wpływ chlorku kobaltu na odpowiedź roślin na działanie kadmu

Tak jak to opisano w podrozdziale 5.2.1 etylen jest cząsteczką sygnałną mogącą regulować ekspresję genów. W niniejszej pracy postanowiono sprawdzić, czy hormon ten pośredniczy w zależnej od kadmu indukcji genów kodujących syntezę kwasu 1-aminocyklopropano-1-karboksyłowego (ACS), kinazę kinazy aktywowanej mitogenami2 (MAPKK2), reduktazę azotanową (NR) oraz czynniki transkrypcyjne DOF1, MYBZ2 i bZIP62.

Ze względu na duże znaczenie ekonomiczne etylenu, powiązane z jego udziałem w regulacji kwitnienia i dojrzewania owoców, opracowano szereg inhibitorów działania tego hormonu. Dzieli się je na inhibitory syntezy hamujące aktywność kluczowych enzymów szlaku biosyntezy etylenu oraz inhibitory percepcji, które blokują receptory tego hormonu. Do pierwszej grupy inhibitorów zalicza aminoetoksyglicynę (AVG) i kwas aminooksoctowy (AOA) hamujące aktywność syntazy kwasu 1-aminocyklopropano-1-karboksyłowego (ACS) oraz jony kobaltu hamujące aktywność oksydazy kwasu 1-aminocyklopropano-1-karboksyłowego (ACO). Przykładami inhibitorów percepcji etylenu są 1-metylocyklopropen (1-MCP), tiosiarczan srebra (STS), bicyklohepta-2,5-dien (NBD) i diazocyklopentadien (DACP) [Serek i in. 2006]. Do badań przeprowadzanych w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej wybrano chlorek kobaltu. Zaletami tego inhibitora są niskie koszty i łatwość stosowania. Ponadto chlorek kobaltu był stosowany we wcześniejszych doświadczeniach wykonywanych w Zakładzie Ekofizjologii Roślin [Chmielowska i Deckert 2008], jak również w wielu badaniach przeprowadzonych w innych laboratoriach na różnych gatunkach roślin, przy zastosowaniu różnych stężeń i okresów traktowania (tabela 13).

DYSKUSJA

Tabela 13: Badania, w których zastosowano CoCl_2 jako inhibitor syntezy etylenu.

Gatunek rośliny	Stężenie CoCl_2	Okres traktowania CoCl_2	Źródło
Fasola (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	5, 10, 15, 20 25 μM	6 dni	Tamimi i Timko 2003
Ogórek (<i>Cucumis sativus</i> L.)	10 μM	48 godziny	Chang i in. 2010
Jęczmień (<i>Hordeum vulgare</i> L.)	10 μM	4 dni	Locke i in.2000
Kultury <i>in vitro</i> papryki (<i>Capsicum chinense</i> Jacq)	50, 300, 500 μM	10-60 dni	Santana-Buzzy i in. 2006
Zawiesina kultur komórkowych tytoniu (<i>Nicotiana tabacum</i> L.)	100 μM	3, 9 i 24 godziny	Koehl i in. 2007
Goździki (<i>Dianthus caryophyllus</i> L.)	1.5 i 3 mM	1 i 2 dni	Kazemi i in. 2012
Fasola mung (<i>Vigna radiate</i> L.)	1, 10 i 50 mM	12, 24 i 48 godziny	Chaudhuri i Kar 2008

Zaskakującym wydaje się fakt, że w stosowanych w niniejszej pracy warunkach doświadczalnych CoCl_2 nie hamuje biosyntezy etylenu ani w kontrolnych siewkach soi, ani siewkach traktowanych roztworem kadmu w przeciągu 24 godzin (Ryc.42). Prawdopodobnie hamujące działanie jonów kobaltu wymaga zastosowania wyższych stężeń lub dłuższych czasów działania. W większości badań przeprowadzonych w innych laboratoriach CoCl_2 był aplikowany przez wiele dni [Chang i in. 2010, Locke i in. 2000, Tamimi i Timko 2003, Santana-Buzzy i in. 2006]. Krótkie czasy traktowania (3, 9 i 24 godziny) zastosowano w doświadczeniach przeprowadzonych na zawieszynie komórkowej tytoniu, jednakże w tym przypadku aplikowano CoCl_2 w dużo wyższym stężeniu (100 μM), a hamujący wpływ jonów kobaltu na syntezę etylenu zaobserwowano dopiero po 9 godzinach [Koehl i in. 2007]. Jest również możliwe, że w zastosowanych warunkach etylen jest syntetyzowany z pominięciem udziału hamowanego przez jony kobaltu enzymu - oksydazy kwasu 1-aminocyklopropano-1-karboksyłowego (ACC). Wykazano, że w przypadku zranienia ACC może być utleniany nieenzymatycznie przez generowany w wyniku działania tego czynnika stresowego anionorodnik ponadtlenkowy [Kumar i Knowles 2003].

DYSKUSJA

Przeprowadzone w ramach niniejszej pracy badania wykazały, że CoCl_2 nie wpływał również na parametry wzrostowe siewek soi (tabela 11), ale przyczynia się do nasilenia toksycznych symptomów działania kadmu, co objawiało się zmniejszoną przeżywalnością komórek (Ryc.43-44). Obserwowane zjawisko może wynikać z faktu, że kobalt jest metalem ciężkim i może również, tak jak i kadm, wywierać toksyczne efekty w roślinach. Wykazano, że ekspozycja na ten metal prowadzi do zahamowania wzrostu, degradacji barwników fotosyntetycznych, stresu oksydacyjnego i uszkodzeń DNA [Jaleeli in. 2009, Rastgoo i Alemzadeh 2011, Yildiz i in. 2009].

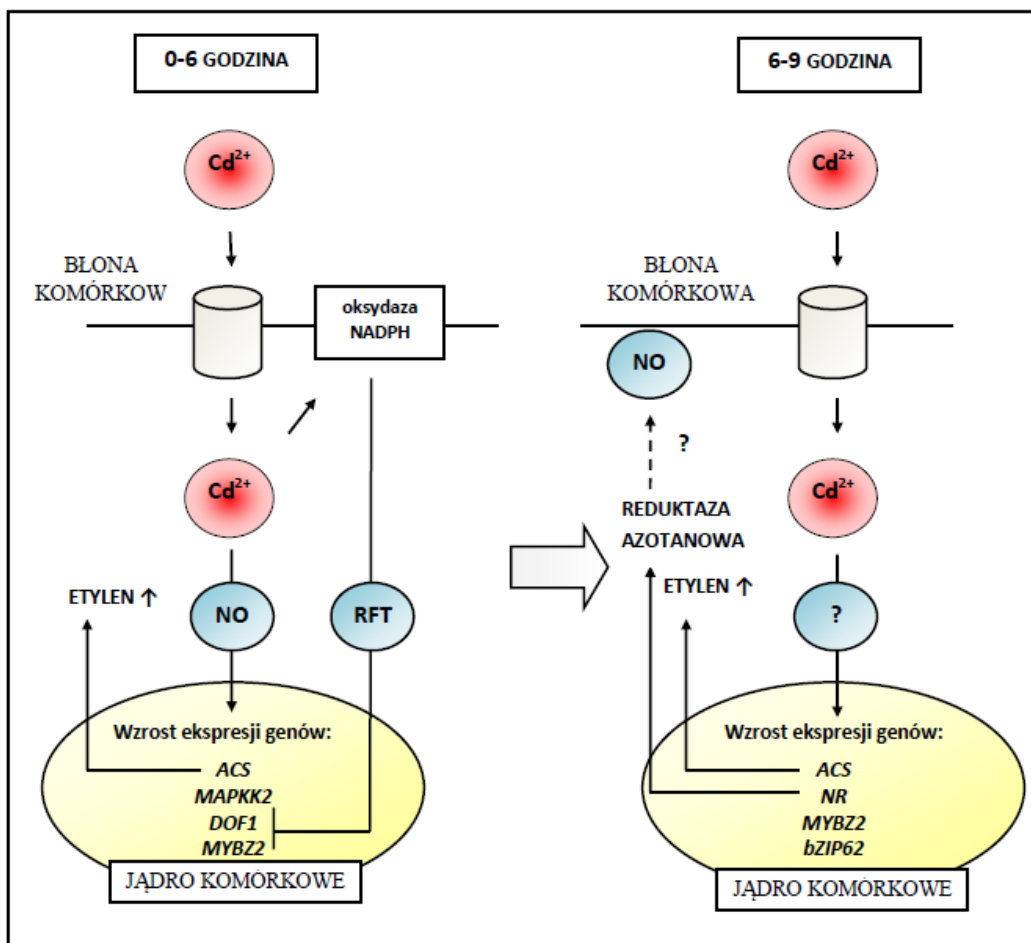
Traktowanie siewek CoCl_2 moduluje także ekspresję szeregu genów powiązanych ze szlakami przekazywania sygnałów zarówno w kontrolnych siewkach soi jak i siewkach traktowanych roztworem kadmu (Ryc.45-46). Zaobserwowano, że trzygodzinne traktowanie CdCl_2 i CoCl_2 prowadzi do niwelowania zależnej od Cd indukcji genu kodującego kinazę kinazy aktywowanej mitogenami (Ryc.45B). Tak jak to opisano w poprzednich rozdziałach białka należące do MAPK stanowią ważny element sygnalizacji komórkowej [Nakagami i in. 2005], a ich stymulację w odpowiedzi na kadm zaobserwowano u kilku gatunków roślin [Agrawal i in. 2002, Agrawal i in. 2003, Jonak i in. 2004, Liu i in. 2010, Ye i in. 2013]. Ponadto, wykazano, że kinaza aktywowana mitogenami MPK6, zidentyfikowana w rzodkiewniku, uczestniczy w inicjacji zależnej od kadmu programowanej śmierci komórek [Ye i in. 2013]. Zaobserwowane osłabienie indukcji genu *MAPKK2* w odpowiedzi na działanie CoCl_2 może więc prowadzić do zaburzeń szlaków przekazywania sygnału aktywowanych przez kadm i zaostrzać toksyczność tego metalu ciężkiego. Traktowanie siewek CoCl_2 potęgowało także zależną od kadmu indukcję genu kodującego reduktazę azotawną (NR) (Ryc.46B). Wzrost ekspresji genu *NR* może prowadzić do wzrostu produkcji tlenku azotu. Nadmierna produkcja NO może zaś nasilać toksyczne symptomy działania kadmu poprzez zwiększenie pobierania tego metalu z podłoża [Arasimowicz-Jelonek i in. 2012, Besson-Bard i in. 2009]. Aplikacja CoCl_2 osłabiała również zależną od kadmu indukcję genów kodujących czynniki transkrypcyjne *DOF1* i *bZIP62* (Ryc.45C i 46D). Dane literaturowe opisane dokładniej w podrozdziale 5.2.6 sugerują, że wspomniane czynniki transkrypcyjne mogą być zaangażowane w regulację ekspresji genów w odpowiedzi na działanie różnych warunków stresowych. Osłabienie zależnej od Cd indukcji genów *DOF1* i *bZIP62* może więc prowadzić do zaburzeń w ekspresji innych genów indukowanych przez kadm.

Podsumowując można stwierdzić, że CoCl_2 przyczynia się do spotęgowania toksyczności kadmu, przynajmniej częściowo poprzez modulację sygnalizacji za pośrednictwem MAPK, NO i czynników transkrypcyjnych DOF1 i bZIP62. Wywołane efekty są niezależne od wpływu na biosyntezę etylenu. Ważnym wnioskiem prowadzonych badań, jest stwierdzenie, że CoCl_2 powinien być stosowany jako inhibitor syntezy etylenu z dużą ostrożnością, ponieważ trudno stwierdzić, czy wywoływane przez niego efekty są zależne od hamującego wpływu na produkcję etylenu, czy też od działania samych jonów kobaltu.

5.6 Podsumowanie: Model sygnalizacji komórkowej aktywowanej w komórkach roślinnych przez kadm.

Wyniki badań prowadzonych w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej dostarczają nowych elementów do modelu sygnalizacji komórkowej uruchamianej w roślinach pod wpływem działania kadmu. W przeciągu 3 pierwszych godzin działania tego metalu ciężkiego dochodzi do wzrostu ekspresji genów kodujących: syntazę kwasu-1-aminocyklopropano-1-karboksyłowego (ACS), kinazę kinazy aktywowanej mitogenami2 (MAPKK2) oraz czynniki transkrypcyjne DOF1 i MYBZ2. W indukcji wszystkich wymienionych genów pośredniczy tlenek azotu, zaś generowane przez oksydazę NADPH reaktywne formy tlenu wpływają hamująco na indukcję genów kodujących czynniki transkrypcyjne DOF1 i MYBZ2. Wzrost ekspresji ACS skutkuje zwiększoną produkcją etylenu zauważalna już po 5 godzinach działania CdCl_2 . W nadprodukcji tego hormonu może również uczestniczyć obserwowana w odpowiedzi na działanie kadmu stymulacja genu *MAPKK2*. Wykazano, że kinazy aktywowane mitogenami wpływają stabilizująco na cząsteczkę ACS. Po 6 godzinach traktowania kadmem nadal obserwowany jest wzrost ekspresji genów ACS i DOF1 oraz zwiększona produkcja etylenu. Ponadto sześciogodzinna ekspozycja na kadm skutkuje indukcją ekspresji genów kodujących reduktazę azotanową (NR) i czynnik transkrypcyjny bZIP62. Stymulacja genu NR jest skorelowana ze wzrostem aktywności reduktazy azotanowej odnotowanym po 7 i 8 godzinach traktowania CdCl_2 . Opisane zdarzenia zostały przedstawione na Ryc.51.

DYSKUSJA



Ryc.51: Schemat podsumowujący wyniki uzyskane w ramach rozprawy doktorskiej. Opis schematu znajduje się w tekście.

Na podstawie przedstawionych powyżej wyników oraz opisanych w niniejszej rozprawie doktorskiej wyników uzyskanych w innych laboratoriach, można zaproponować kompleksowy model sygnalizacji komórkowej uruchamianej w roślinach we wczesnych godzinach odpowiedzi na działanie kadmu. Kadm przedostaje się do komórek poprzez transportery dla niezbędnych pierwiastków takich jak Ca^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} i Fe^{2+} . Akumulacja tego metalu ciężkiego w komórkach prowadzi do aktywacji fosfolipazy C, co skutkuje wzrostem poziomu inozytolo-3-fosforanu i uwalnianiem z magazynów wewnątrzkomórkowych Ca^{2+} . Uwolnione jony wapnia oddziałują z takimi białkami jak kalmodulina i kinazy zależne od Ca^{2+} (CDPK), a także pośredniczą w aktywacji oksydazy NADPH. Wzrost aktywności oksydazy NADPH prowadzi do zwiększonej produkcji reaktywnych form tlenu (RFT) przyczyniających się do stresu oksydacyjnego, ale również uczestniczących w szlakach przekazywania sygnałów. W zależnym od kadmu generowaniu RFT udział mają również uszkodzenia

DYSKUSJA

mitochondriów, zaburzenia w systemie antyoksydacyjnym i uwalniane przez Cd^{2+} z cząsteczek biologicznych metale aktywne oksydo-redukcyjnie takie jak Cu^{2+} i Fe^{2+} . Zarówno RFT jak i aktywowane przez jony wapnia CDPK pośredniczą w stymulacji kaskad kinaz aktywowanych mitogenami (MAPK). Wymienione zdarzenia zachodzą bardzo wczesnie w odpowiedzi na działanie kadmu. Wzrost poziomu cytozolowego Ca^{2+} oraz RFT zaobserwowano już po kilku minutach działania tego metalu ciężkiego, a aktywację kaskad MAPK po 10-15 minutach. Kadm powoduje również wzrost produkcji tlenu azotu. W badaniach przeprowadzonych w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej wykazano, że również ta reakcja może zachodzić bardzo szybko, ponieważ inhibitor NO wpływał na ekspresję genów indukowanych przez kadm już po 3 godzinach traktowania. W zależności od stężenia w jakim obecny jest kadm w środowisku po około 5-9 godzinach dochodzi do zwiększonej produkcji etylenu, która nadal wzrasta w przeciągu kolejnych kilkunastu godzin. Wszystkie wymienione elementy, Ca^{2+} , RFT, MAPK, NO i etylen, mogą uczestniczyć w regulacji ekspresji genów, między innymi poprzez modulację aktywności czynników transkrypcyjnych. Dane literaturowe świadczą o tym, że w regulacji ekspresji genów pod wpływem kadmu uczestniczą czynniki transkrypcyjne należące do rodzin AP2/EREBP, MYB, WRKY i bZIP. Również w niniejszej rozprawie doktorskiej wykazano, że kadm indukuje ekspresję czynników transkrypcyjnych MYBZ2 i bZIP62. Ponadto po raz pierwszy udowodniono, że kadm stymuluje ekspresję czynnika transkrypcyjnego DOF1. W regulację ekspresji genów w roślinach eksponowanych na kadm zaangażowanych jest również kilkanaście różnych cząsteczek miRNA.

DYSKUSJA

Pomimo, że dostępnych jest coraz więcej informacji dotyczących roślinnych sieci sygnałnych zaangażowanych w przekazywanie „kadmowego sygnału” nadal istnieje szereg intrygujących, ale jak dotąd słabo poznanych zagadnień:

- Ważną rolę w sygnalizacji komórkowej uruchamianej pod wpływem kadmu mogą odgrywać, oprócz etylenu, także inne hormony roślinne i regulatory wzrostu takie jak kwas abscysynowy, jasmonowy i salicylowy, a także auksyny i poliaminy. Jednakże ich rola nie została jeszcze dobrze poznana. Również doświadczenia dotyczące funkcji etylenu podczas stresu kadmowego skupiały się na kilku aspektach takich jak udział tego hormonu w generowaniu reaktywnych form tlenu i programowanej śmierci. Interesującym byłoby zbadanie wpływu etylenu na ekspresję genów i białek.
- Doświadczenia przeprowadzone na modelach zwierzęcych wykazały, że istotną rolę w sygnalizacji komórkowej uruchamianej przez kadm mogą odgrywać cykliczne nukleotydy oraz białka wiążące GTP. Rola tych elementów sygnałnych w odpowiedzi roślin na działanie kadmu nie została jeszcze zbadana.
- Wykonane w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej doświadczenia sugerują, że na ekspresję genów w siewkach soi traktowanych kadmem mogą wpływać oksydacyjne modyfikacje RNA. Obecnie w Zakładzie Ekofizjologii Roślin prowadzone są prace mające na celu potwierdzenie postawionej hipotezy. Tematyka ta wydaje się być intrygująca również ze względu na fakt, że pierwsze doniesienia o możliwym udziale oksydacyjnie uszkodzonych mRNA w regulacji ekspresji genów w roślinach pojawiły się zaledwie dwa lata temu [Bazin i in. 2011].
- Zidentyfikowano szereg czynników transkrypcyjnych indukowanych przez stres kadmowy, jednakże, nieznane są regulowane przez nie geny. Zmiany w aktywności pojedynczego czynnika transkrypcyjnego mogą wpływać na ekspresję wielu genów powiązanych z nabywaniem przez rośliny odporności. Ciekawym byłoby więc również sprawdzenie wpływu indukowanych czynników transkrypcyjnych na tolerancję roślin na działanie kadmu.

6. WNIOSKI

1. W ramach pracy doktorskiej zbadano wpływ dwóch stężeń jonów kadmu (10 mg L^{-1} i 25 mg L^{-1}) na ekspresję piętnastu genów powiązanych z różnymi szlakami przekazywania sygnału. Uzyskane wyniki wskazują, że kadm moduluje ekspresję większości badanych genów. Do genów charakteryzujących się najsilniejszą wzrostem ekspresji w odpowiedzi na działanie kadmu należą geny kodujące syntazę kwasu 1-aminocyklopropano-1-karboksyłowego (ACS), kinazę kinazy aktywowanej mitogenami (MAPKK2), reduktazę azotanową (NR) oraz czynniki transkrypcyjne DOF1, MYBZ2 i bZIP62. Większość indukowanych genów wykazywała wzrost ekspresji pod wpływem działania wyższego stężenia kadmu (25 mg L^{-1}) po krótkich okresach ekspozycji (3 i 6 godziny).
2. Sekwencje promotorowe genów indukowanych przez kadm zawierają szereg elementów *cis* powiązanych z odpowiedzią na czynniki stresowe oraz sygnalizacją za pośrednictwem etylenu i kwasu abscysynowego. Wszystkie indukowane przez kadm geny zawierają w sekwencjach promotorowych miejsca rozpoznawane przez czynnik transkrypcyjny DOF1. Promotor genu kodującego MAPKK2 zawiera elementy *cis* ACE i MRE powiązane z odpowiedzią roślin na metale ciężkie.
3. Obydwa stosowane stężenia kadmu powodują wzrost biosyntezy etylenu, co wskazuje na korelację pomiędzy wzrostem ekspresji syntazy kwasu 1-aminocyklopropano-1-karboksyłowego (ACS) i aktywnością tego enzymu. Zaobserwowano również pozytywną korelację pomiędzy wzrostem ekspresji genu kodującego reduktazę azotanową i aktywnością kodowanego enzymu.

WNIOSKI

4. Badania przy zastosowaniu inhibitora tlenu azotu, PTIO wykazały, że NO pośredniczy w stymulacji ekspresji wszystkich genów indukowanych przez kadm po 3 godzinach działania CdCl_2 , czyli genów kodujących ACS, MAPKK2 oraz czynniki transkrypcyjne DOF1 i MYBZ2. Tlenek azotu wpływa również na zwiększenie pobierania kadmu po 6 godzinach traktowania roztworem kadmu i zmniejsza przeżywalność komórek siewek soi traktowanych roztworem kadmu przez 24 godziny.
5. Generowane przez oksydazę NADPH reaktywne formy tlenu osłabiają zależną od kadmu indukcję genów kodujących czynniki transkrypcyjne DOF1 i MYBZ2 po 3 godzinach traktowania.
6. W stosowanym układzie doświadczalnym chlorek kobaltu nie hamuje biosyntezy etylenu, ale moduluje ekspresję genów kodujących kinazę kinazy aktywowanej mitogenami 2, reduktazę azotanową oraz czynniki transkrypcyjne DOF1 i bZIP62, a także zmniejsza przeżywalność komórek siewek soi poddanych działaniu kadmu.
7. Uzyskane wyniki świadczą o tym, że etylen, tlenek azotu, kaskady kinaz aktywowanych mitogenami oraz czynniki transkrypcyjne DOF1, MYBZ2 i bZIP62 odgrywają istotną rolę w szlakach przekazywania sygnału aktywowanych przez kadm w siewkach soi.

Literatura

- 1) Agarawal P., Reddy M.K., Sopory S.K., Agarawal P.K., 2009. Plant Rabs: Characterization, functional diversity, and role in stress tolerance. *Plant Mol Biol Rep* 27: 417-430.
- 2) Agarawal P.K., Agarawal P., Jain P., Jha B., Reddy M.K., Sopory S.K., 2008. Constitutive overexpression of a stress-inducible small GTP-binding protein PgRab7 from *Pennisetum glaucum* enhances abiotic stress tolerance in transgenic tobacco. *Plant Cell Rep* 27: 105-115.
- 3) Agrawal G.K., Rakwal R. i Iwahashi H., 2002. Isolation of novel rice (*Oryza sativa* L.) multiple stress responsive MAP kinase gene, *OsMSRMK2*, whose mRNA accumulates rapidly in response to environmental cues. *Biochem Biophys Res Commun* 294: 1009-1016.
- 4) Agrawal G.K., Tamogami S., Iwahashi H., Agrawal V.P., Rakwal R., 2003. Transient regulation of jasmonic acid-inducible rice MAP kinase gene (*OsBWMK1*) by diverse biotic and abiotic stresses. *Plant Physiol Bioch* 41: 355-361.
- 5) Agrawal P.K. i Jha B., 2010. Transcription factors in plants and ABA dependent and independent abiotic stress signaling. *Biologia Plantarum* 54: 201-212.
- 6) Ahlfors R., Brosché M., Kollist H., Kangasjärvi J., 2009. Nitric oxide modulates ozone-induced cell death, hormone biosynthesis and gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 58: 1-12.
- 7) Ahmad P., Nabi G. i Ashraf M., 2011. Cadmium-induced oxidative damage in mustard [*Brassica juncea* (L) Czern.&Coss.] can be alleviated by salicylic acid. *S Afr J Bot* 77: 36-44.
- 8) Akhter M.F., McGarvey B. i Macfie S.M., 2012. Reduced translocation of cadmium from roots is associated with increased production of phytochelatins and their precursors. *J Plant Physiol* 169: 1821-1829.
- 9) Alcázar R., Altabella T., Marco F., Bortolotti C., Reymond M., Koncz C., Carrasco P., Tiburcio A.F., 2010. Polyamines: molecules with regulatory functions in plant abiotic stress tolerance. *Planta* 231: 1237-1249.
- 10) Arasimowicz-Jelonek M., Floryszak-Wieczorek J. i Kubiś J., 2009. Interaction between polyamine and nitric oxide signaling in adaptive response to drought in cucumber. *J Plant Growth Regul* 28: 177-86.
- 11) Arasimowicz-Jelonek M., Floryszak-Wieczorek J., Deckert J., Rucińska-Sobkowiak R., Gzyl J., Pawlak-Sprada S., Abramowski D., Jelonek T., Gwóźdź E.A., 2012. Nitric oxide implication in cadmium-induced programmed cell death in roots and signaling response of yellow lupine plants. *J Plant Physiol Bioch* 58: 124-34.

LITERATURA

- 12) Arteca R.N. i Arteca J.M., 2007. Heavy-metal- induced ethylene production in *Arabidopsis thaliana*. *J Plant Physiol* 164: 1480-1488.
- 13) Athwal G.S. i Huber S.C., 2002. Divalent cations and polyamines bind to loop 8 of 14-3-3 proteins, modulating their interaction with phosphorylated nitrate reductase. *Plant J* 29: 119-29.
- 14) Badri D.V., Loyola-Vargas V.M., Du J., Stermitz F.R., Broeckling C.D., Iglesias-Andreu L., Vivanco J.M., 2008. Transcriptome analysis of *Arabidopsis* roots treated with signaling compounds: a focus on signal transduction, metabolic regulation and secretion. *New Phytol* 179: 209-223.
- 15) Balestrasse K.B., Gallego S.M., Benavides M.P., Tomaro M.L., 2005. Polyamines and proline are affected by cadmium stress in nodules and roots of soybean plants. *Plant Soil* 270: 343-353.
- 16) Balestrazzi A., Macovei A., Testoni C., Raimondi E., Donà M., Carbonera D., 2009. Nitric oxide biosynthesis in white poplar (*Populus alba* L.) suspension cultures challenged with heavy metals. *Plant Stress* 3: 1-6.
- 17) Barroso J.B., Corpas F.J., Carreras A., Rodriguez-Serrano M., Estaban F.J., Fernández-Ocaña A., Chaki M., Romero-Puertas M.C., Valderrama R., Sandalio L.M., del Río L.D., 2006. Localization of S-nitrosoglutathione and expression of S-nitrosoglutathione reductase in pea plants under cadmium stress. *J Exp Bot* 57: 1785-1793.
- 18) Bartosz G., 2003. Druga twarz tlenu. Wolne rodniki w przyrodzie. Wydawnictwo Naukowe PWN. Warszawa 2003.
- 19) Basa B., Solti Á., Sárvári É., Tamás L., 2009. Housekeeping gene selection in poplar plants under Cd-stress: comparative study for real-time PCR normalisation. *Funct Plant Biol* 36: 1079-1087.
- 20) Bastola D.R., Pethe V.V. i Winicov I., 1998. Alfin1, a novel zinc-finger protein in alfalfa roots that binds to promoter elements in the salt-inducible *MsPRP2* gene. *Plant Mol Biol* 38: 1123-1135.
- 21) Baudouin E., 2011. The language of nitric oxide signalling. *Plant Biol* 13: 233-242.
- 22) Bazin J., Langlade N., Vincourt P., Arribat S., Balzergue S., El-Maarouf-Bouteau H., Bailly C., 2011. Targeted mRNA oxidation regulates sunflower seed dormancy alleviation during dry after-ripening. *Plant Cell* 23: 2196-2208.
- 23) Bednarska A.J. i Stachowicz I., 2013. Cost of living in metal polluted areas: respiration rate of the ground beetle *Pterostichus oblongopunctatus* from two gradients of metal pollution. *Ecotoxicology* 22: 118-124.
- 24) Besson-Bard A., Gravot A., Richaud P., Auroy P., Duc C., Gaymard F., Taconnat L., Renou J.-P., Pugin A., Wendehenne D., 2009. Nitric oxide contributes to cadmium

LITERATURA

- toxicity in *Arabidopsis* by promoting cadmium accumulation in roots and by up-regulating genes related to cadmium uptake. *Plant Physiol* 149: 1302-1315.
- 25) Bienert G.P., Møller A.L.B., Kristiansen K.A., Schultz A., Møller I.M., Schjoerring J.K., Jahn T.P., 2007. Specific aquaporins facilitate the diffusion of hydrogen peroxide across membranes. *J Biol Chem* 282: 1183-1192.
- 26) Bolte S., Schiene K. i Dietz K.-J., 2000. Characterization of a small GTP-binding protein of the rab 5 family in *Mesembryanthemum crystallinum* with increased level of expression during early salt stress. *Plant Mol Biol* 42: 923-936.
- 27) Braconi D., Bernardini G. i Santucci A., 2011. Linking protein oxidation to environmental pollutants: Redox proteomic approaches. *J Proteomics* 74: 2324-2337.
- 28) Carbonell J. i Blázquez M.A., 2009. Regulatory mechanisms of polyamine biosynthesis in plants. *Genes Genom* 31: 107-118.
- 29) Casalino E., Sblano C. i Landriscina C., 1997. Enzyme activity alteration by cadmium administration to rats: the possibility of iron involvement in lipid peroxidation. *Arch Biochem Biophys* 346: 171-179.
- 30) Chae H.S. i Kieber J.J., 2005. *Eto Brute?* Role of ACS turnover in regulating ethylene biosynthesis. *Trends Plant Sci* 10: 291-296.
- 31) Chang L. i Karin M., 2001. Mammalian MAP kinase cascades. *Nature* 410: 37-40.
- 32) Chang C., Wang B., Shi L., Li Y., Duo L., Zhang W., 2010. Alleviation of salt stress-induced inhibition of seed germination in cucumber (*Cucumis sativus* L.) by ethylene and glutamate. *J Plant Physiol* 167: 1152-1156.
- 33) Chang Y.-C., Chao Y.-Y. i Kao C.H., 2012. Involvement of nitric oxide in iron deficiency-enhanced accumulation of cadmium and expression of *OsIRT1* in rice. *Crop Environ Bioinform* 9: 81-88.
- 34) Chao Y.-Y., Chen C.-Y., Huang W.-D., Kao C.H., 2010. Salicylic acid-mediated hydrogen peroxide accumulation and protection against Cd toxicity in rice leaves. *Plant Soil* 329: 327-337.
- 35) Charoensawan V., Wilson D. i Teichman S.A., 2010. Genomic repertoires of DNA-binding transcription factors across the tree of life. *Nucleic Acids Res* 38: 7264-7377.
- 36) Chaudhuri A. i Kar R.K., 2008. Effect of ethylene synthesis and perception inhibitor and ABA on seed germination of *Vigna radiata*, *World J Agr Sci* 4: 879-883.
- 37) Chen I.-P., Haehnel U., Altschmied L., Schubert I., Puchta H., 2003. The transcriptional response of *Arabidopsis* to genotoxic stress- a high-density colony array study (HDCA). *Plant J* 35: 771-786.
- 38) Chen L., Liu L. i Huang S., 2008. Cadmium activates the mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathways via induction of reactive oxygen species and inhibition of protein phosphatases 2A and 5. *Free Radical Biol Med* 45: 1035-1044.

LITERATURA

- 39) Chen F., Wang F., Sun H., Cai Y., Mao W., Zhang G., Vincze E., Wu F., 2010. Genotype-dependent effect of exogenous nitric oxide on Cd-induced changes in antioxidative metabolism, ultrastructure, and photosynthetic performance in barley seedlings (*Hordeum vulgare*). *J Plant Growth Regul* 29: 394-408.
- 40) Chen S., Xu Y., Xu B., Guo M., Zhang Z., Liu L., Ma H., Chen Z., Luo Y., Huang Sh., Chen L., 2011. CaMKII is involved in cadmium activation of MAPK and mTOR pathways leading to neuronal cell death. *J Neurochem* 119:1108-1118.
- 41) Chiang H.-Ch., Lo J.-Ch. i Yeh K.-Ch., 2006. Genes associated with heavy metal tolerance and accumulation in Zn/Cd hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*: A genomic survey with cDNA microarray. *Envir Sci Tech* 40: 6792-6798.
- 42) Chinnusamy V., Gong Z. i Zhu J.-K., 2008. Abscisic acid-mediated epigenetic processes in plant development and stress responses. *J Integr Plant Biol* 50: 1187-1195.
- 43) Chmielowska J. i Deckert J., 2008. Activity of peroxidases and phenylalanine amonia-lyase in lupine and soybean seedlings treated with copper and an ethylene inhibitor. *Biological Lett* 45: 59-67.
- 44) Chmielowska-Bąk J., Izbiańska K. i Deckert J., 2013a. The toxic doppelgänger – the phenomenon of cadmium ioninc and molecular mimicry. *Acta Biochim Pol* - zaakceptowane do druku.
- 45) Chmielowska-Bąk J., Lefèvre I., Lutts S., Deckert J., 2013b. Short term signaling resposnes in roots of young soybean seedlings exposed to cadmium stress. *J Plant Physiol*: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jplph.2013.06.019>
- 46) Cho Y.-H. i Yoo S.-D., 2009. Emerging complexity of ethylene signal transduction. *J Plant Biol* 52: 283-288.
- 47) Cho S.-C., Chao Y.-Y., Hong C.-Y., Kao C.H., 2012. The role of hydrogen peroxide in cadmium-inhibited root growth of rice seedlings. *Plant Growth Regul* 66: 27-35
- 48) Choudhary A. i Singh R.P., 2000. Cadmium-induced changes in diamine oxidase activity and polyamine levels in *Vigna radiata* Wilczek Seedlings. *J Plan Physiol* 156: 704-710.
- 49) Clapham D.E., 2007. Calcium signaling. *Cell* 131: 1047-1058.
- 50) Connolly E.L., Fett J.P. i Guerinot M.L., 2002. Expression of the IRT1 metal transporter is controlled by metals at the levels of transcript and protein accumulation. *Plant Cell* 14: 1347-1357.
- 51) Corpas F.J., Río L.A. i Barosso J.B., 2008. Post-translational modifications mediated by reactive nitrogen species. *Plant Signal Behav* 3:5: 301-303.
- 52) Cumming G., Fidler F. i Vaux D.L., 2007. Error bars in experimental biology. *J Cell Biol* 177: 7-11.

LITERATURA

- 53) DalCorso G., Farinati S. i Furini A., 2010. Regulatory networks of cadmium stress in plants. *Plant Signal Behav* 5:6; 663-667.
- 54) Deckert J., 2000. Regulacja genów cyklu komórkowego roślin. Wydawnictwo Naukowe Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu.
- 55) Deckert J., Pawlak S. i Rybaczek D., 2009. The nucleus as a „headquarters” and target in plant cell stress reactions. Rozdział w: *Compartmentation of responses to stresses in higher plants, true or false 2009*: 61-90. Editor: Waldemar Maksymiec. Transworld Research Network. India.
- 56) De Michele R., Vurro E., Rigo C., Costa A., Elviri L., di Valentin M., Careri M., Zottini M., di Toppi L.S., Schiavo F.L., 2009. Nitric oxide is involved in cadmium-induced cell death in *Arabidopsis* suspension cultures. *Plant Physiol* 150: 217-228.
- 57) Dguimi H.M., Debouba M., Ghorbel M.H., Gouia H., 2009. Tissue-specific cadmium accumulation and its effect on nitrogen metabolism in tobacco (*Nicotiana tabacum*, *Bureley v. Fb9*). *C.R. Biologies* 322: 58-68.
- 58) Ding Y., Chen Z. i Zhu C., 2011. Microarray-based analysis of cadmium-responsive mircoRNAs in rice (*Oryza sativa*). *J Exp Bot* 62: 3563-3573.
- 59) Dobek T.K. i Dobek M., 2008. Efektywność produkcji soi w polskich warunkach. *Inżynieria Rolnicza* 4: 233-240.
- 60) Dombrowski J.E., Baldwin J.C. i Martin R.C., 2008. Cloning and characterization of salt stress-inducible small GTPase gene from the model Grass species *Lolium temulentum*. *J Plant Physiol* 165: 651-661.
- 61) Dubos C., Stracke R., Grotewold E., Weisshaar B., Martin C., Lepiniec L., 2010. MYB transcription factors in *Arabidopsis*. *Trends Plant Sci* 15: 573-581.
- 62) Elobeid M., Göbel C., Feussner I., Polle A., 2012. Cadmium interferes with auxin physiology and lignifications in poplar. *J Exp Bot* 63: 1413-1421.
- 63) Fan H.-F., Du C.-X. i Guo S.-R., 2012. Nitric oxide enhances salt tolerance in cucumber seedlings by regulating free polyamine content. *Environ Exp Bot* 86: 52-59.
- 64) Farinati S., DalCorso G., Verotto S., Furini A., 2010. The *Brassica juncea* BjCdR15, an ortholog of *Arabidopsis* TGA3, is a regulator of cadmium uptake, transport and accumulation in shoots and confers cadmium tolerance in transgenic plants. *New Phytol* 185: 974-978.
- 65) Filippou P., Antoniou C. i Fotopoulus V., 2013. The nitric oxide donor sodium nitroprusside regulates polyamine and proline metabolism in leaves of *Medicago truncatula* plants. *Free Radical Biol Med* 56: 172-83.
- 66) Fujimoto S.Y., Ohta M., Usui A., Shinshi H., Ohme-Tekagi M., 2000. *Arabidopsis* ethylene-responsive binding factors act as transcriptional activators or repressors of GCC-box mediated gene expression. *Plant Cell*. 12: 393-404.

LITERATURA

- 67) Fujita Y., Fujita M., Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K., 2011. ABA-mediated transcriptional regulation in response to osmotic stress in plants. *J. Plant Res.* 124: 509-525.
- 68) Gallego S.M., Rena L.B., Barcia R.A., Azpilicueta C.E., Iannone M.F., Rosales P.E., Zawoznik M.S., Groppa M.D., Benavides M.P., 2012. Unravelling cadmium toxicity and tolerance in plants: Insight into regulatory mechanism. *Environ Exp Bot* 83: 33-46.
- 69) Garnier L, Simon-Plas F, Thuleau P, Agnel J-P, Blein J-P, Ranjeva R, Montillet J-L., 2006. Cadmium affects tobacco cells by a series of three waves of reactive oxygen species that contribute to cytotoxicity. *Plant Cell Environ* 29: 1956-69.
- 70) Ge W., Jiao Y.Q., Sun B.L., Qin R., Jiang W.S., Liu D.H., 2012. Cadmium-mediated oxidative stress and ultrastructure changes in root cells of poplar cultivars. *S Afr J Bot* 83: 98-108.
- 71) Gehring C., 2010. Adenyl cyclases and cAMP in plant signaling – past and present. *Cell Commun Signal* 8:15.
- 72) Gill S.S., Khan N.A. i Tuteja N., 2012. Cadmium at high dose perturbs growth, photosynthesis and nitrogen metabolism while at low dose it up regulates sulfur assimilation and antioxidant machinery in garden cress (*Lepidum sativum* L.). *Plant Sci* 182: 112-120.
- 73) Gill S.S., Hassanuzaman M., Nahar K., Macovei A., Tuteja N., 2013. Importance of nitric oxide in cadmium stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol Bioch* 63: 254-261.
- 74) Gniazdowska-Skoczek H., 2000. Indukcja reduktazy azotanowej. Rozdział w “Ćwiczenia z fizjologii roślin”. Wydawnictwo Akademii Rolniczej im. Augusta Cieszkowskiego w Poznaniu. Poznań 2000.
- 75) Gonçalves J.F., Antes F.G., Maldaner J., Pereira L.B., Tabaldi L.A., Rauber R., Rossato L.V., Bisognin D.A., Dressler V., Flores E.M., Nicoloso F.T., 2009. Cadmium and mineral nutrient accumulation in in potato plantlets grown under cadmium stress in two different experimental culture conditions. *Plant Physiol Bioch* 47: 814-821.
- 76) Gonçalves J.F., Becker A.G., Cargnelutti D., Tabaldi L.A., Pereira L.B., Battisti V., Spanevello R.M., Morsch V.M., Nicoloso F.T., Schetinger M.R.C., 2007. Cadmium toxicity causes oxidative stress and induces response of the antioxidant system in cucumber seedlings. *Braz J Plan Physiol* 19: 223-232.
- 77) Groppa M.D., Benavides M.P. i Tomaro M.L., 2003. Polyamine metabolism in sunflower and wheat leaf discs under cadmium or copper stress. *Plant Sci* 164: 293-299.
- 78) Groppa M.D., Tomaro M.L. i Benavides M.P., 2007. Polyamines and heavy metal stress: the antioxidant behavior of spermine in cadmium- and copper-treated wheat leaves. *Biometals* 20: 185- 195.

LITERATURA

- 79) Groppa M.D. i Benavides M.P., 2008. Polyamines and abiotic stress: recent advances. *Amino Acids* 34: 35-45.
- 80) Groppa M.D., Rosales E.P., Iannone M.F., Benavides M.P., 2008. Nitric oxide, polyamines and Cd-induced phytotoxicity in wheat roots. *Phytochemistry* 69: 2609-2615.
- 81) Gzyl J., Rymer K. i Gwóźdź E.A., 2009. Differential response of antioxidant enzymes to cadmium stress in tolerant and sensitive cell line of cucumber (*Cucumis sativus* L.). *Acta Biochim Pol* 56: 723-727.
- 82) Guleria P., Mahajan M., Bhardwaj J., Yadav 2011. Plan small RNAs: biogenesis, mode of action and their role in abiotic stresses. *Genom Proteom Bioinformat* 9: 183-199.
- 83) Gupta K.J., Fernie A.R., Kaiser W.M., Dongen J.T., 2011. On the origins of nitric oxide. *Trends Plant Sci* 16: 161-168.
- 84) Han R.-M., Lefèvre I., Albacete A., Pérez-Alfocea F., Barba-Espín G., Díaz-Vivancos P., Quinet M., Ruan C.-J., Hernández J.A., Cantero-Navarro E., Lutts S., 2013. Antioxidant enzyme activities and hormonal status in response to Cd stress in wetland halophyte *Kosteletzkya virginica* under saline conditions. *Physiol Plantarum* 147: 352-368.
- 85) Hasanuzzaman M., Hossain M.A. i Fujita M., 2010. Physiological and biochemical mechanisms of nitric oxide induced abiotic stress tolerance in plants. *Am J Plant Physiol* 5: 295-324.
- 86) Hayat Q., Hayat S., Irfan M. i Ahmad A., 2010. Effect of exogenous salicylic acid under changing environment: A review. *Eviron Exp Bot* 68: 14-25.
- 87) Hashimoto K. i Kudla J., 2011. Calcium decoding mechanisms in plants. *Biochimie* 93: 2054-2059.
- 88) Heath R. i Packer L., 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplasts. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Arch Biochem Biophys* 196: 385-395.
- 89) Hollung K., Espelund M., Chou K., Jacobsen K.S., 1997. Developmental, stress and ABA modulation of mRNA levels for bZIP transcription factors and Vp1 in barley embryos and embryo derived suspension cultures. *Plant Mol Biol* 35: 561-571.
- 90) Hsu Y.T. i Kao C.H., 2007a. Heat shock-mediated H₂O₂ accumulation and protection against Cd toxicity in rice seedlings. *Plant Soil* 300: 137-147.
- 91) Hsu Y.T. i Kao C.H., 2007b. Toxicity in leaves of rice exposed to cadmium is due to hydrogen peroxide accumulation. *Plant Soil* 298: 231-241
- 92) Hsu Y.T. i Kao C.H., 2003. Role of abscisic acid in cadmium tolerance of rice (*Oryza sativa* L.) seedlings. *Plant Cell Environ* 26: 867-874.
- 93) Hu X., Li W., Chen Q. i Yang Y., 2009. Early signal transduction linking the synthesis of jasmonic acid in plants. *Plant Signal Behavior* 4:8: 696-697.

LITERATURA

- 94) Hu Y.F., Zhou G., Na X.F., Yang L., Nan W.B., Liu X., Zhan Y.Q., Li J.L., Bi Y.R., 2013. Cadmium interference with maintenance of auxin homeostasis in *Arabidopsis* seedlings. *J Plant Physiol* 170: 965-975.
- 95) Huang H. i Xiong Z.-T., 2009. Toxic effects of cadmium, acetochlor and bensulfuron-methyl on nitrogoen metabolism and plant grwoth in rice seedlings. *Pestic biochem Phys* 94: 64-67.
- 96) Huerto-Ocampo J.A., León-Galván M.F., Ortega-Cruz L.B., Barrera-Pacheco A., De León-Rodríguez A., Mendoza-Hernández G., de la Rosa B.A.P., 2010. Water stress induces up-regulation of DOF1 and MIF1 transcription factors and down-regulation of proteins involved in secondary metabolism in amaranth roots (*Amaranthus hypochondriacus* L.). *Plant Biol* 13: 472-482.
- 97) Hussain S.S., Ali M., Ahmed M., Siddique K.H.M., 2011. Polyamines: Natural and engineered abiotic and biotic stress tolerance in plants. *Biotechnol Adv* 29: 300-311.
- 98) Ichimura K., MAPK Group., 2002. Mitogen-activated protein kinase cascades in plants: a new nomenclature. *Trends Plant Sci* 7: 301-308.
- 99) Jakoby M., Weisshaar B., Dröge-Laser W., Vincente-Carbajosa J., Tiederman J., Kroj T., Parcy F. (The bZIP reseaech group), 2002. bZIP transcription factors in *Arabidopsis*. *Trends Plant Sci* 7: 106-111.
- 100) Jaleel C.A., Jayakumar K., Chang-Xing Z., Azooz M.M., 2009. Antioxidant properties protect *Vigna radiate* (L.) Wilczek plants from soil cobalt stress and improve growth and pigment composition. *Plant Omnics J* 2,3: 120-126.
- 101) Jiang Q.-Q., Yang H.-Q., Sun X.-L., Ran K., Zhang X.-R., 2012. Relationship between polyamines metabolism and cell death in roots of *Malus hupehensis* Rehd. Under cadmium stress. *J Integral Agr* 11: 1129-1136.
- 102) Jing Y., Liu L.-Z., Jiang Y., Zhu Y., Guo N.L., Barnett G., Rojanasakul Y., Agani F., Jiang B.-H., 2012. Cadmium induced HIF-1 and VEGF expression through ROS, ERK, and AKT signaling pathways and induced malignant transformation of human bronchial epithelial cells. *Toxicol Sci* 125: 10-19.
- 103) Johnson C., Boden E., Desai M., Pascuzzi P., Aries J., 2001. *In vivo* target promoter-binding activities of a xenobiotic stress-activated TGA factor. *Plant J* 28: 237-243.
- 104) Jonak C., Nakagami H. i Hirt H., 2004. Heavy metal stress. Activation of distinct miogen-ativated protein kinase pathways by copper and cadmium. *Plant Physiol* 136: 3276-3283.
- 105) Joo S. i Kim W.T., 2007. A gaseous plant hormone ethylene: the signaling pathway. *J Plant Biol* 50: 109-116.

LITERATURA

- 106) Kabir E., Ray S., Kim K.-H., Yoon H.-O., Jeon E.C., Kim Y.S., Cho Y.-S., Yun S.-T., Brown R.J.C., 2012. Current status of trace metal pollution in soil affected by industrial activities. *The Scientific World Journal* ID: 916705
- 107) Kagaya Y., Hobo T., Murata M., Ban A., Hattori T., 2002. Abscisic acid-induced transcription is mediated by phosphorylation of an abscisic acid response element binding factor, TRAB1. *Plant Cell* 14: 3177-3189.
- 108) Kaji M., 2012. Role of experts and public participation in pollution control: the case of Itai-itai disease in Japan. *Ethics Sci Environ Polit* 12: 99-111.
- 109) Kalariya N.M., Wills N.K., Ramana K.V., Srivastava S.K., van Kuijk F.J.G.M., 2009. Cadmium-induced apoptotic death of human retinal pigment epithelial cells is mediated by MAPK pathway. *Exp Eye Res* 89: 494-502.
- 110) Kazemi M., Bahmanipour F. i Lotfi H., 2012. Effect of cobalt, acetylsalicylic acid and glutamine to extend the vase-life of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) flowers. *Res J Bot* 7: 8-13.
- 111) Kim J.-A., Agrawal G.K., Rakwal R., Han K.-S., Kim K.-N., Yun Ch.-H., Heu S., Park S.-Y., Lee Y.-H., Jwa N.-S., 2003. Molecular cloning and mRNA expression analysis of novel rice (*Oryza sativa* L.) MAPK kinase kinase, *OsEDR1*, an ortholog of *Arabidopsis AtEDR1*, reveal its role in defense/stress signaling pathways and development. *Bioch Bioph Res Co* 300: 868-876.
- 112) Kim J., Kim S.H., Johnson V.J. i Sharma R.P., 2005. Extracellular signal-regulated kinase-signaling-dependent G2/M arrest and cell death in murine macrophages by cadmium. *Environ Toxicol and Chem* 24: 3069-3077.
- 113) Kuthanová A., Gemperlová L., Zelenková S., Eder J., Macháčková I., Opatrný Z., Cvikrová M., 2004. Cytological changes and alterations in polyamine contents induced by cadmium in tobacco BY-2 cells. *Plant Physiol Bioch* 42: 149-156.
- 114) Kim J.-A., Agrawal G.K., Rakwal R., Han K.-S., Kim K.-N., Yun Ch.-H., Heu S., Park S.-Y., Lee Y.-H., Jwa N.-S., 2003. Molecular cloning and mRNA expression analysis of novel rice (*Oryza sativa* L.) MAPK kinase kinase, *OsEDR1*, an ortholog of *Arabidopsis AtEDR1*, reveal its role in defense/stress signaling pathways and development. *Bioch Bioph Res Co* 300: 868-876.
- 115) Kim H.-J., Hyun Y., Park J.-Y., Park M.-J., Park M.-K., Kim M.D., Kim H.-J., Lee, J., Moon M.H., Lee I., Kim J., 2004. A genetic link between cold responses and flowering time through *FVE* in *Arabidopsis thaliana*. *Nat. Genet.* 36: 167-171.
- 116) Kippler M., Hossain M.B., Lindh C., Morre S.E., Kabir I., Vahter M., Broberg K., 2012. Early life low-level cadmium exposure is positively associated with increased oxidative stress. *Environ Res* 112: 164-170.

LITERATURA

- 117) Koehl J., Djulic A., Kirner V., Nguyen T.T., Heiser I., 2007. Ethylene is required for elicitor-induced oxidative burst but not for cell death induction of tobacco cell suspension cultures. *J Plant Physiol* 164: 1555-1563.
- 118) Kopyra M. i Gwóźdź E.A., 2003. Nitric oxide stimulates seed germination and counteracts the inhibitory effect of heavy metals and salinity on root growth of *Lupinus luteus*. *Plant Physiol Bioch* 41: 1011-1017.
- 119) Kopyra M., Stachoń-Wilk M. i Gwóźdź A.E., 2006. Effects of exogenous nitric oxide on the antioxidant capacity of cadmium-treated soybean cell suspension. *Acta Physiol Plant* 28: 525-536.
- 120) Kovalchuk I., Titov V., Hohn B., Kovalchuk O., 2005 Transcriptome profiling reveals similarities and differences in plant responses to cadmium and lead. *Mutat Res* 570: 149-161.
- 121) Krantev A., Yordanova R., Janda T., Szalai G., Popova L., 2008. Treatment with salicylic acid decreases the effect of cadmium on photosynthesis in maize plants. *J Plant Physiol* 165: 920-931.
- 122) Krasylenko Y.A., Yemets A.I. i Blume Y.B., 2010. Functional role of nitric oxide in plants. *Rus J of Plant Physiol* 57: 451-461.
- 123) Kumar G.N.M. i Knowles N.R., 2003. Wound-induced superoxide production and PAL activity decline with potato tuber age and wound healing ability. *Physiol Plantarum* 117: 108-117.
- 124) Kumar A., Altabella T., Taylor M.A. i Tiburcio A., 1997. Recent advances in polyamine research. *Trend Plant Sci* 2: 124-130.
- 125) Kumar M., Bijo R.S., Baghel R.S., Reddy C.R.K., Jha B., 2012. Selenium and spermine alleviate cadmium induced toxicity in the red seaweed *Gracilaria dura* by regulating antioxidants and DNA methylation. *Plant Physiol Bioch* 51: 129-138.
- 126) Kurtyka R., Kita A. i Karcz W., 2011. Fusaric acid counteracts the toxic effect of cadmium on the growth of maize root segments. *Arch Environ Contam Toxicol* 61: 568-577.
- 127) Küpper H., Parameswaran A., Leitenmaier B., Trilek M., Šetlik I., 2007. Cadmium-induced inhibition of photosynthesis and long-term acclimation to cadmium stress in the hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *New Phytol* 175: 655-674.
- 128) Le J., Vandenbussche F., Cnodder T.D., Van Der Straeten D., Verbelen J.-P., 2005. Cell elongation and microtubule behavior in the *Arabidopsis* hypocotyls: responses to ethylene and auxin. *J Plant Growth Regul* 24: 166-178.
- 129) Lee S. i An., 2009. Over-expression of OsIRT1 leads to increased iron and zinc accumulation in rice. *Plant Cell Environ* 32: 408-416.

LITERATURA

- 130) Lee S.C. i Luan S., 2012. ABA signal transduction at the crossroad of biotic and abiotic stress responses. *Plant Cell Environ* 35: 53-60.
- 131) Lee H.E., Shin D., Park S.R., Han S.-E., Jeong M.-J., Kwon T.-R., Lee S.-K., Park S.-C., Yi B.Y., Kwon H.-B., Byun M.-O., 2007. Ethylene responsive binding protein 1 (StEREBP1) from *Solanum tuberosum* increases tolerance to abiotic stress in transgenic potato plants. *Biochem Bioph Res Co* 353: 863-868.
- 132) Lehotai N., Pető A., Bajkán S. Erdei L., Tari I., Kolbert Z., 2011. In vivo and in situ visualization of early physiological events induced by heavy metals in pea root meristem. *Acta Physiol Plant* 33: 2199-2207.
- 133) Lewak S., 2012. Regulacja procesów fizjologicznych przez czynniki endogenne, str. 145-148. Rozdział w „Fizjologia roślin” pod redakcją Kopcewicz J. i Lewaka S. Wydawnictwo Naukowe PWN. Warszawa.
- 134) Lei X.-Y., Zhu R.-Y., Zhang G.-Y., Dai Y.-R., 2003. Possible involvement of the mitochondrial alternative pathways in ethylene-induced apoptosis in tomato protoplasts. *Plant Growth Regulation* 41: 111-116.
- 135) Li R., Zhou Y., Wang L., Ren G., 2011. Low-molecular-weight-chitosane ameliorates cadmium-induced toxicity in freshwater crab, *Sinopotamon yangtsekiense*. *Ecotox Environ Safe* 74: 1164-1170.
- 136) Li Z., Zhang L., Yu Y., Quan R., Zhang Z., Zhang H., Huang R., 2011. The ethylene response factor AtERF11 that is transcriptionally modulated by the bZIP transcription factor HY5 is a crucial repressor of ethylene biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant J* 68: 88-99.
- 137) Li L., Liu X., Peijnenburg W.J.G.M., Zhao J., Chen X., Yu J., Wu H., 2012. Pathways of cadmium fluxes in the root of halophyte *Suaeda salsa*. *Ecotox Environ Safe* 75: 1-7.
- 138) Liao Y., Zoi H.-F., Wei W., Hao Y.-J., Tian A.-G., Huang J., Liu Y.-F., Zhang J.-S., Chen S.-Y., 2008. Soybean GmbZIP44, GmbZIP62 and GmbZIP78 genes function as negative regulator of ABA signaling and confer salt and freezing tolerance in transgenic *Arabidopsis*. *Planta* 228: 225-240.
- 139) Li S., Yu J., Zhu M., Zhao F., Luan S., 2012. Cadmium impairs ion homeostasis by altering K^+ and Ca^{2+} channel activities in rice root hair cells. *Plant Cell Environ* 35: 1998-2013.
- 140) Lichtlen P. i Schaffner W., 2001. Putting its fingers on stressful situations: the heavy-metal regulatory transcription factor MTF-1. *BioEssays* 23: 1010-1017.
- 141) Liu J.-H., Kitashiba H., Wang J., Ban Y., Moriguchi T., 2007. Polyamines and their ability to provide environmental stress tolerance to plants. *Plant Biotechnol* 24: 117-126.

LITERATURA

- 142) Liu K.-L., Shen L., Wang J.-Q. i Sheng J.-P., 2008a. Rapid inactivation of chloroplastic ascorbate peroxidase is responsible for oxidative modification to Rubisco in tomato (*Lycopersicon esculentum*) under cadmium stress. *J Integr Plant Biol* 50: 415-426.
- 143) Liu K., Shen L. i Sheng J., 2008b. Improvement in cadmium tolerance in tomato seedlings with antisense DNA for 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase. *J Plant Nutr* 31: 809-827.
- 144) Liu W., Yang Y.S., Li P.J., Zhou Q.X., Xie L.J., Han Y.P., 2009. Risk assessment of cadmium-contaminated soil on plant DNA damage using RAPD and physiological indices. *J Hazard Mater* 161: 878-883.
- 145) Liu X.-M., Kim K.E., Kim K.-Ch., Nguyen X.C., Han H.J., Jung M.S., Kim H.S., Kim S.H., Parl H.C., Yun D.-J., Chung W.S., 2010. Cadmium activates *Arabidopsis* MPK3 and MPK6 via accumulation of reactive oxygen species. *Phytochemistry* 71: 614-618.
- 146) Liu C., Guo J., Cui Y., Lü T., Zhang X., Shi G., 2011. Effects of cadmium and salicylic acid on growth, spectral reflectance and photosynthesis of castor bean seedlings. *Plant Soil* 344: 131-141.
- 147) Liu C.-H., Huang W.D. i Kao C.H., 2012. The decline in potassium concentration is associated with cadmium toxicity in rice seedlings. *Acta Physiol Plant* 34: 495-502.
- 148) Locke J.M., Bryce J.H. i Morris P.C., 2000. Contrasting effect of ethylene perception and biosynthesis inhibitors on germination and seedling growth of barley (*Hordeum vulgare* L.). *J Exp Bot* 51: 1843-1849.
- 149) Lombi E., Zhao F.J., Young S.D., Sacchi G.A., 2001. Physiological evidence for high-affinity cadmium transporter highly expressed in a *Thlaspi caerulescens* ecotype. *New Phytol* 149: 53-60.
- 150) Ma Q.-H., 2007. Small GTP-binding proteins and their functions in plants. *J Plant Growth Regul* 26: 369-388.
- 151) Ma W., Xu W., Xu H., Chen Y., He Z., Ma M., 2010. Nitric oxide modulates cadmium influx during cadmium-induced programmed cell death in tobacco BY-2 cells. *Planta* 232: 325-335.
- 152) Mahmood T., Gupta K.J. i Kaiser W.M., 2009. Cadmium stress stimulates nitric oxide production in wheat roots. *Pak J Bot* 41: 1285-1290.
- 153) Maksymiec W., 2011. Effect of jasmonate and some other signaling factors on bean and onion growth during the initial phase of cadmium action. *Biologia Plantarum* 55: 112-118.
- 154) Maksymiec W., Wianowska D., Dawidowicz A.L., Radkiewicz S., Mardarowicz M., Krupa Z., 2005. The levels of jasmonic acid in *Arabidopsis thaliana* and *Phaseolus coccineus* plants under heavy metals stress. *J Plant Physiol* 182: 1338-1346.

LITERATURA

- 155) Maksymie W. i Krupa Z., 2002. Jasmonic acid and heavy metals in *Arabidopsis thaliana* – a similar physiological response to both stressors? *J Plant Physiol.* 159: 509-515.
- 156) Maksymiec W. i Krupa Z., 2006. The effect of short-term exposition to Cd, excess Cu ions and jasmonate on oxidative stress appearing in *Arabidopsis thaliana*. *Environ Exp Bot* 57: 187-194.
- 157) Malgieri G., Zaccaro L., Leone M., Bucci E., Esposito S., Baglivo I., Del Gatto A., Russo L., Scandurra R., Pedone P.V., Fattorusso R., Iserina C., 2011. Zinc to cadmium replacement in the *A. thaliana* SUPERAN Cys₂His₂ Zinc finger induces structural rearrangements of typical DNA base determinant positions. *Biopolymers* 95: 801-810.
- 158) Masood A., Iqbal N. i Khan N.A., 2012. Role of ethylene in alleviation of cadmium-induced photosynthetic capacity inhibition by sulphur in mustard. *Plant, Cell and Environment* 35: 524-533.
- 159) Masuda T. i Goldsmith P.D., 2009. World soybean production: area harvested, yield and long-term projections. *International Food and Agribuisness Management Review* 12: 143-162.
- 160) Marino D., Dunand C., Puppo A., Pauly N., 2012. A burst of plant NADPH oxidases. *Trend Plant Sci* 17: 9-15.
- 161) Maruyama K., Todaka D., Mizoi J., Yoshida T., Kidokoro S., Matsukura S., Tasaki H., Sakurai T., Yamamoto Y.Y., Yoshiwara K., Kojima M., Sakakibara H., Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K., 2012. Identification of *cis*-acting promoter elements in cold- and dehydration-induced transcriptional pathways in *Arabidopsis*, rice, and soybean. *DNA Res* 19: 37-49.
- 162) Mazel A., Leshem Y., Tiwari B.S., Levine A., 2004. Induction of salt and osmotic stress tolerance by overexpression of an intracellular vesicle trafficking protein AtRab7 (AtRabG3e). *Plant Physiol* 134: 118-128.
- 163) Mendoza-Cózadl D.G., Jobe T.O., Hauser F., Scellular hroeder J.I., 2011. Long-distance transport, vacuolar sequestration, tolerance and transcriptional response induced by cadmium and arsenic. *Curr Opin Plant Biol* 14: 554-562.
- 164) Menkens A.E., Schindler U. i Cashmore A.R., 1997. The G-box: a ubiquitous regulatory DNA element in plants bound by the GBF family of bZIP proteins. *Trend Biochem Sci* 20: 506-510.
- 165) Mizuno T., Usui K., Horie K., Nosaka Sh., Mizuno N., Obata H., 2005. Cloning of three ZIP/Nramp transporter genes from Ni hyperaccumulator *Thlaspi japonicum* and their Ni²⁺-transport abilities. *Plant Physiol Bioch* 43: 793-801.
- 166) Møller M.I. i Sweetlove L.J., 2010. ROS signalling – specificity is required. *Trends Plant Sci* 15: 370-374.

LITERATURA

- 167) Moncada S. i Higgs E.A., 2006. The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology. *Brit J Pharmacol* 147: S193-S201.
- 168) Monteiro C.C, Carvalho R.F., Gratão P.L., Carvalho G., Tezotto T., Medici L.O., Peres L.E.P., Azevedo R.A., 2011. Biochemical responses of the ethylene-insensitive Never ripe tomato mutant subjected to cadmium and sodium stress. *Environ Exp Bot* 71: 306-320.
- 169) Monteiro C., Santos C., Pinho S., Oliveira H., Pedrosa T., Dias C.D., 2012. Cadmium-induced cyto- and genotoxicity are organ-dependent in lettuce. *Chem Res Toxicol* 25: 1423-1434.
- 170) Moussa H.R. i El-Gamal S.M, 2010. Effect of salicylic acid pretreatment on cadmium toxicity in wheat. *Biol Plantarum* 54: 315-320.
- 171) Nahm M.Y., Kim S.W., Yun D., Lee S.Y., Cho M.J., Bahk J.D., 2003. Molecular and biochemical analysis of *OsRab7*, a rice *Rab7* homolog. *Plant Cell Physiol* 44: 1341-1349.
- 172) Nakagami H., Pitzscke A. and Hirt H., 2005. Emerging MAP kinase pathways in plant stress signaling. *Trends Plant Sci* 10: 339-346.
- 173) Nascimento W.M., 2003. Ethylene and lettuce seed germination. *Scientia Agricola* 60: 601-606.
- 174) Nedjimi B. i Daoud Y., 2009. Cadmium accumulation in *Atriplex halimus* subsp. *shweinfurthii* and its influence on growth, proline, root hydraulic conductivity and nutrient uptake. *Flora* 24: 316-324.
- 175) Nicot N., Hausman J.-F., Hoffmann L., Evers D., 2005. Housekeeping gene selection for real-time RT-PCR normalization in potato biotic and abiotic stress. *J Exp Bot* 56: 2907-2914.
- 176) Noriega G., Cruz D.S., Batlle A., Tomaro M., Balestrasse K., 2012. Heme oxygenase is involved in the protection exerted by jasmonic acid against cadmium stress in soybean roots. *J Plant Growth Reg* 31: 79-89.
- 177) Ogawa T., Pan L., Kawai-Yamada M., Yu L.-H., Yamamura S., Koyama T., Kitajima S., Ohme-Takagi M., Sato F., Uchimiya H., 2005. Functional analysis of Arabidopsis ethylene-responsive element binding protein conferring resistance to bax and abiotic stress-induced plant cell death. *Plant Physiol* 138: 1436-1445.
- 178) Ogawa D., Yamaguchi K. i Nishiuchi T., 2007. High-level overexpression of the Arabidopsis HsfA2 gene confers not only increased thermotolerance but also salt/osmotic stress tolerance and enhanced callus growth. *J Exp Bot* 58: 3373-3383.
- 179) Ogawa I., Nakanishi H., Mori S., Nishizawa N.K., 2009. Time course analysis of gene regulation under cadmium stress in rice. *Plant Soil* 325: 97-108.

LITERATURA

- 180) Olbrich M., Gerstner E., Welzl G., Fleischmann F., Oßwald W., Bahnweg G., Ernst D., 2008. Quantification of mRNAs and housekeeping gene selection for quantitative real-time RT-PCR normalization in Europe Beech (*Fagus sylvatica* L.) during abiotic and biotic stress. *Z Naturforsch* 63c: 574-582.
- 181) Olmos E., Martínez-Solano J.R., Piqueras A., Hellín E., 2003. Early steps in the oxidative burst induced by cadmium in cultured tobacco cells (BY-2 line). *J Exp Bot* 54: 291-301.
- 182) O'Mahony P.J. i Oliver M.J., 1999. Characterization of a desiccation-responsive small GTP binding protein (Rab2) from the desiccation-tolerant grass *Sporobolus stapfianus*. *Plant Mol Biol* 39: 809-821.
- 183) Oomen R.J.F., Wu J., Lelièvre F., Blanchet S., Richaud P., Barbier-Brygoo H., Aarts M.G.M., Thomine S., 2009. Functional characterization of NRAMP3 and NRAMP4 from the metal hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens*. *New Phytol* 181: 637-650.
- 184) Opdenakker K., Remans T., Keunen E., Vangronsveld J., Cuypers A., 2012. Exposure of *Arabidopsis thaliana* to Cd or Cu excess leads to oxidative stress mediated alterations in MAPK kinase transcript levels. *Environ Exp Bot* 83: 53-61.
- 185) Oporto C., Smolder E. i Vandecasteele C., 2012. Identifying the case of cadmium contamination with Monte Carlo mass balance modeling: a case study from Potosi, Bolivia. *Environ Technol* 33: 555-561.
- 186) Oulhajd A., Kusch P. i Humback K., 2006. Heavy metal stress and leaf senescence induce the barley gene *HvC2d1* encoding a calcium-dependent novel C2 domain-like protein. *New Phytol* 170: 261-273.
- 187) Ouyang H. i Vogel H.J., 1998. Metal ion binding to calmodulin: NMR and fluorescence studies. *BioMetals* 11: 213-222.
- 188) Palmieri M.C., Sell S., Huang X., Scherf M., Werner T., Durner J., Lindermayr C., 2008. Nitric oxide-responsive genes and promoters in *Arabidopsis thaliana*: a bioinformatics approach. *J Exp Bot* 59: 177-186.
- 189) Panda S.K. i Patra H.K., 2007. Effect of salicylic acid potentiates cadmium-induced oxidative damage in *Oryza sativa* L. leaves. *Acta Physiol Plant* 29: 567-575.
- 190) Panitlertumpai N., Nakbanpote W., Sangdee A., Thumanu K., Naki I., Hokura A., 2013. Zinc and/or cadmium accumulation in *Gynura pseudochina* (L.) DC. studied *in vitro* and the effect on crude protein. *J Mol Struct* 1036: 279-291.
- 191) Pawlak-Sprada S., 2010. Modulacja ekspresji genów w korzeniach siewek łubinu (*Lupinus luteus*) i soi (*Glycine max*) traktowanych metalami ciężkimi. Praca doktorska wykonana w Zakładzie Ekofizjologii Roślin Wydziału Biologii UAM.

LITERATURA

- 192) Pawlak S., Firych A., Rymer K., Deckert J., 2009. Cu,Zn-superoxide dismutase is differently regulated by cadmium and lead in roots of soybean seedlings *Acta Physiol Plant* 31: 741-47.
- 193) Pawlak-Sprada S., Arasimowicz-Jelonek M., Podgórska M., Deckert J., 2011. Activation of phenylpropanoid pathway in legume plants exposed to heavy-metals. Part I. Effect of cadmium and lead on phenylalanine ammonia-lyase gene expression, enzyme activity and lignin content. *Acta Biochim Pol* 58: 211-216.
- 194) Pena L.B., Pasquini L.A., Tomaro M.L., Gallego S.M., 2006. Proteolytic system in sunflower (*Heliathus annus* L.) leaves under cadmium stress. *Plant Sci* 171: 531-537.
- 195) Pena L.B., Pasquini L.A., Tomaro M.L., Gallego S.M., 2007. 20S Proteosome and accumulation of oxidized and ubiquitinated proteins in maize leaves subjected to cadmium stress. *Phytochemistry* 68: 1139-1146.
- 196) Pena L.B., Barcia R.A., Azpilicueta C.E., Méndez A.A.E., Gallego S.M., 2012. Oxidative post translation modifications of proteins related to cell cycle are involved in cadmium toxicity in wheat seedlings. *Plant Sci* 196: 1-7.
- 197) Perfus-Barbeoch L., Leonhardt N., Vavasseur A., Forestier C., 2002. Heavy metal toxicity: cadmium permeates through calcium channel and disturbs the plant water status. *Plant J* 32: 539-548.
- 198) Pfaffl M.W., 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29, 2002-2007.
- 199) Pinto A.P., Simões I. i Mota A.M., 2008. Cadmium impact on root exudates of sorghum and maize plants: a speciation study. *J Plant Nutr* 31: 1746-1755.
- 200) Popova L.P., Maslenkova L.T., Yordanova R.Y., Ivanova A.P., Krantev A.P., Szalai G., Janda T., 2009. Exogenous treatment with salicylic acid attenuates cadmium toxicity in pea seedlings. *Plant Physiol Bioch* 47: 224-231.
- 201) Pourghasemian N., Ehsanzadeh P. i Greger M., 2013. Genotypic variation in safflower (*Carthamus* spp.) cadmium accumulation and tolerance by temperature and cadmium levels. *Environ Exp Bot* 87: 218-226.
- 202) Pytharopoulou S., Grintzalis K., Sazakli E., Leotsindis M., Georgiou Ch.D., Kalpaxis D.L., 2011. Translation responses and oxidative stress of mussels experimentally exposed to Hg, Cu and Cd: pattern does not fit at all. *Aquat Toxicol* 105: 157-165.
- 203) Qi X., Zhang Y. i Chai T., 2007. Characterization of a novel plant promoter specifically induced by heavy metal and identification of the promoter regions conferring heavy metal responsiveness. *Plant Physiol* 143: 50-59.
- 204) Qian-qian J., Hong-quiang Y., Xiao-li S., Quiang L., Kun R., Xin-ron Z., 2012. Relation between polyamines metabolism and cell death in roots of *Malus hupehensis* Rehd. under cadmium stress. *J Integr Agr* 11: 1129-1136.

LITERATURA

- 205) Rastgoo L. i Alemzadeh A., 2011. Biochemical responses of Gouan (*Aeluropus littoralis*) to heavy metal stress. *Aust J Crop Sci* 5: 375-383.
- 206) Rascio N., Vecchia F.D., Rocca N.L., Barbato R., Pagliano C., Raviolo M., Gonnelli C., Gabrielli R., 2008. Metal accumulation and damage in rice (cv. *Vialone nano*) seedlings exposed to cadmium. *Environ Exp Bot* 62: 267-278.
- 207) Rausch T., Gromes R., Liedschulte V., Müller I., Bogs J., Galovic V., Wachter A., 2008. Novel insights into the regulation of GSH biosynthesis in higher plants. *Plant Biol* 5: 565-572.
- 208) Rawat R., Xu Z.-F., Yao K.-M., Chye M.-L., 2005. Identification of *cis*-elements for ethylene and circadian regulation of the *Solanum melongena* gene encoding cysteine proteinase. *Plant Mol Biol* 57: 629-643.
- 209) Rivetta A., Negrini N. i Cocucci M., 1997. Involvement of Ca²⁺-calmodulin in Cd²⁺ toxicity during the early phases of radish (*Raphanus sativus* L.) seed germination. *Plant Cell Environ* 20: 600-608.
- 210) Rodríguez-Serrano M., Romero-Puertas M.C., Zabalza A., Corpas F., Gómez M., del Río L.A., Sandalio L., M., 2006. Cadmium effect on oxidative metabolism of pea (*Pisum sativum* L.) roots. Imaging of reactive oxygen species and nitric oxide accumulation in vivo. *Plant Cell Environ* 29: 1532-1544.
- 211) Rodríguez-Serrano M., Romero-Puertas M.C., Pazmiño D.M., Testillano P.S., Risueño M.C., del Río L.D., Sandalio L.M., 2009. Cellular response of pea plants to cadmium toxicity: cross talk between reactive oxygen species, nitric oxide, and calcium. *Plant Physiol* 150: 229-243.
- 212) Romero-Puertas M.C., Palma J.M., Gómez M., del Río L.A., Sandalio L.M., 2002. Cadmium causes the oxidative modification of proteins in pea plants. *Plant Cell Environ* 25: 677-686.
- 213) Romero-Puertas M.C., Corpas F., Rodríguez-Serrano M., Gómez M., del Río L.A., Sandalio L., M., 2007. Differential expression and regulation of antioxidant enzymes by cadmium in pea plants. *J Plant Physiol* 164: 1346-1357.
- 214) Rosales E.P., Iannone M.F., Groppa M.D., Benavides M.P., 2012. Polyamines modulate nitrate reductase activity in wheat leaves: involvement of nitric oxide. *Amino Acids* 42 857-65.
- 215) Santana-Buzzy N., Canto-Flick A., Inglesias-Andreu L.G., Montalvo-Peniche M.C., López-Puc G., Barahona-Pérez F., 2006. Improvement of in vitro culturing of habanero pepper by inhibition of ethylene effects. *HortScience* 41: 405-409.
- 216) Scandalios J.G., 2002. The rise of ROS. *Trends Biochem Sci* 27: 483-486.
- 217) Scheen J., Zhou L. i Jang J.-C., 1999. Sugars as signaling molecules. *Curr Opin Plant Biol* 2: 410-418.

LITERATURA

- 218) Schmutz J., Cannon S.B., Schlueter J., Ma J., Mitros T., Nelson W., Hyten D.L., Song Q., Thelen J.J., Cheng J., Xu D., Hellsten U., May G.D., Yu Y., Sakurai T., Umezawa T., Bhattacharyya M.K., Sandhu D., Valliyodan B., Lindquist E., Peto M., Grant D., Shu S., Goodstein D., Barry K., Futrell-Griggs M., Abernathy B., Du J., Tain Z., Zhu L., Gill N., Trupti Joshi T., Libault M., Sethuraman A., Zhang X.-C., Shinozaki K., Nguyen H.T., Wing R.A., Cregan P., Specht J., Grimwood J., Rokhsar D., Stacey G., Shoemaker R.C., Scott A. Jackson S.A., 2010. Genome sequence of the paleopolyploid soybean. *Nature* 463: 178-183.
- 219) Serek M., Woltering E.J., Sisler E.C., Frello S., Srisikandarajah S., 2006. Controlling ethylene responses in flowers at the receptor levels. *Biotechnol Adv* 24: 368-381.
- 220) Serpa V., Vernal J., Lamattina L., Grotewold E., Cassia R., Terenzi H., 2007. Inhibition of AtMYB2 DNA-binding by nitric oxide involves cysteine S-nitrosylation. *Biochem Bioph Res Co* 361: 1048-1053.
- 221) Serrano-Martínez F. i Casas J.L., 2011. Effects of extended exposure to cadmium and subsequent recovery period on growth, antioxidant status and polyamine pattern in in vitro cultured carnation. *Physiol Mol Biol Plants* 17: 327-338.
- 222) Sharma S.S. i Kumar V., 2002. Responses of wild type and abscisic acid mutants of *Arabidopsis thaliana* to cadmium. *J Plant Physiol* 159: 1323-1327.
- 223) Shim D., Hwang J.-U., Lee J., Lee S., Choi Y., An G., Martinoia E., Lee Y., 2009. Orthologs of the class A4 heat shock transcription factor HsfA4 confer cadmium tolerance in wheat and rice. *Plant Cell* 21: 4031-4043.
- 224) Sibérlil Y., Doireau P. and Gantet P., 2001. Plant bZIP G-box binding factors. Modular structure and activation mechanisms. *Eur J Biochem* 268: 5655-5666.
- 225) Smiri M., 2011. Effect of cadmium on germination, growth, redox and oxidative properties in *Pisum sativa* seeds. *J Environ Chem Ecotox* 3: 52-59.
- 226) Snedden W.A. i Fromm H., 1998. Calmodulin, calmodulin-related proteins and plant responses to the environment. *Trends Plant Sci* 3: 299-304.
- 227) Sobkowiak R. i Deckert J., 2003. Cadmium-induced changes in growth and cell cycle gene expression in suspension-culture cell of soybean. *Plant Physiol Bioch* 41: 767-772.
- 228) Stroiński A., Gizewska K. i Zielezińska M., 2013. Abscisic acid is required in transduction of cadmium signal to potato roots. *Biol Plantarum* 57: 121-127.
- 229) Sun Z., Wang L., Chen M., Wang L., Liang C., Zhou Q., Huang X., 2012. Interactive effects of cadmium and acid rain on photosynthetic light reaction in soybean seedlings. *Ecotox Environ Safe* 79: 62-68.
- 230) Suzuki N., Koizumi N., and Sano H., 2001. Screening of cadmium-responsive genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Environ* 24: 1177-1188

LITERATURA

- 231) Suzuki N., Miller G., Morales J., Shulaev V., Torres M.A., Mittler R., 2011. Respiratory burst oxidases: the engines of ROS signaling. *Curr Opin Plant Biol* 14: 691-699.
- 232) Taiz L. i Zeiger E., 2006. *Stress physiology*, str. 672. Rozdział w "Plant Physiology". Sinauer Associates, Inc. Publisher, Sunderland, Massachusetts, USA.
- 233) Takai Y., Sasaki T. i Matozaki T., 2001. Small GTP Winding proteins. *Physiol Rev* 81: 153-208.
- 234) Takahashi R., Ishimura Y., Senoura T., Shimo H., Ishiwaka S., Arao T., Nakanishi H., Nishizawa N.K., 2011. The OsNRAMP1 iron transporter is involved in Cd accumulation in rice. *J Exp Bot* 62: 4843-4850.
- 235) Tamás L., Bočova B., Huttová J., Liptáková L., Mistrik I., Valentovičova K., Zelinová V., 2012. Impact of the auxin signaling inhibitor p-chlorophenoxyisobutyric acid on short-term Cd-induced hydrogen peroxide production and growth response in barley root tips. *J Plant Physiol* 169: 1375-1381.
- 236) Tamimi S.M. i Timko M.P., 2003. Effects of ethylene and inhibitors of ethylene synthesis and action on nodulation in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Soil* 257: 125-131.
- 237) Thara V.K., Tang X., Gu Y.Q., Martin G.B., Zhou J.-M., 1999. *Pseudomonas syringae* pv *tomato* induces the expression of tomato EREBP-like genes Pti4 and Pti5 independent of ethylene, salicylate and jasmonate. *Plant J* 20: 475-483.
- 238) Thordal-Christensen H., Zhang Z., Wei Y., Collinge D.B., 1997. Subcellular localization of H₂O₂ in plants. H₂O₂ accumulation in papillae and hypersensitive response during the barley-powdery mildew interaction. *Plant J* 11: 1187-1194.
- 239) Toppi L.S. i Gabbriellini R., 1999. Response to cadmium in higher plants. *Environ Exp Bot* 41: 105-130.
- 240) Tuteja N., 2007. Abscisic acid and abiotic stress signaling. *Plant Signal Behav* 2:3: 135-138.
- 241) Tuteja N. i Sopory S.K., 2008. Plant signaling in stress. *Plant Signal Behav* 3:2: 79-86.
- 242) Ueki S. i Citovsky V., 2002. The systemic movement of tobamovirus is inhibited by a cadmium-ion-induced glycine-rich protein. *Nature Cell Biol* 4: 478-486.
- 243) Ulm R. and Nagy F., 2005. Signaling and gene regulation in response to ultraviolet light. *Curr Opin Plant Biol* 8: 477-482.
- 244) Ünyayar S., Celik A., Cekic F.Ö., Gözel A., 2006. Cadmium-induced genotoxicity, cytotoxicity and lipid peroxidation in *Allium sativa* and *Vicia faba*. *Mutagenesis* 21: 77-81.

LITERATURA

- 245) Urano D., Chen J.-G., Botella J.R., Jones A.M., 2013. Heterotrimeric G protein signaling in plant kingdom. *Open Biol* 3: 120186., <http://dx.doi.org/10.1098/rsob.120186>
- 246) Valbonesi P., Ricci L., Franzellitti S., Bondi C., Fabbri E., 2008. Effect of cadmium on MAPK signaling pathway and HSP70 expression in human trophoblast cell line. *Placenta* 2009: 725-733.
- 247) Valentovičová K., Halušková L., Huttová J., Mistrík I., Tamás L., 2010. Effect of cadmium on diaphorase activity and nitric oxide production in barley root tips. *J Plant Physiol* 167: 10-14.
- 248) Vandenbroucke K., Robbens S., Vandepoele K., Inzé D., de Peer Y.V., Breusegem F.V., 2008. Hydrogen peroxide-induced gene expression across kingdoms: a comparative analysis. *Mol Biol Evol* 25: 507-516.
- 249) Vestena S., Cambraia J., Ribeiro C., Oliveira J.A., Oliva M.A., 2011. Cadmium induced oxidative stress and antioxidative enzyme response in Water Hyacinth and *Salvinia*. *Braz J Plant Physiol* 23: 131-139.
- 250) Vitti A., Nuzacci M., Scopa A., Tataranni G., Remans T., Vangronsveld J., Sofo A., 2013. Auxin and cytokinin metabolism and root morphological modifications in *Arabidopsis thaliana* seedlings infected with cucumber mosaic virus (CMV) or exposed to cadmium. *Int J Mol Sci* 14: 6889-6902.
- 251) Vromman D., Flores-Bavestresllo A., Šlejkovec Z., Lapaille S., Teixeira-Cardoso C., Briceño M., Kumar M., Martínez J.-P., Lutts S., 2011. Arsenic accumulation and distribution in relation to young seedling growth in *Atriplex acatamensis* Phil., *Sci Total Environ.* 412-413: 286-295.
- 252) Wang P.-C., Du Y.-Y., An G.-Y., Zhou Y., Miao C., Song C.-P., 2006. Analysis of global expression profiles of *Arabidopsis* genes under abscisic acid and H₂O₂ applications. *J Integr Plant Biol* 48: 62-74.
- 253) Wang L., Zhou Q., Ding L., Sun Y., 2008. Effect of cadmium on nitrogen metabolism in leaves of *Solanum nigrum* L. as a newly found cadmium hyperaccumulator. *J Hazard Mater* 154: 818-825.
- 254) Wang Y., Gao C., Liang Y., Wang C., Yang C., Liu G., 2010. A novel bZIP gene from *Tamarix hispida* mediates physiological responses to salt stress in tobacco plants. *J Plant Physiol* 167: 222-230.
- 255) Wang L., Wang H., Li J., Chen D., Liu Z., 2011. Simultaneous effect of lead and cadmium on primary cultures of rat proximal tubular cells : interaction of apoptosis and oxidative stress. *Arch Environ Contam Toxicol* 61: 500-511.
- 256) Wang W.Y., Xu J., Liu X.J., Yu Y., Ge Q., 2012. Cadmium induces early flowering in *Arabidopsis*. *Biol. Plant.* 56: 117-120.

LITERATURA

- 257) Watada A.E., 1986. Effect of ethylene on quality of the fruits and vegetables. Food Technology, May 82-85.
- 258) Wen X.-P., Ban Y., Inoue H., Matsuda N., Kita M., Moriguchi T., 2011. Antisense inhibition of a spermine synthase gene highlights the role of polyamines for stress alleviation in pear shoots subjected to salinity and cadmium. *Environ Exp Bot* 72: 157-166,
- 259) Wmalasekera R., Tebartz F. i Scherera G.F.E., 2011. Polyamines, polyamine oxidases and nitric oxide in development, abiotic and biotic stresses. *Plant Sci* 181: 593-603.
- 260) Wi S.J. i Park K.Y., 2002. Antisense expression of carnation cDNA encoding ACC synthase and ACC oxidase enhances polyamine content and abiotic stress tolerance in transgenic tobacco plants. *Mol Cells* 13: 209-220.
- 261) Winicov I., 2000. Alfin1 transcription factor overexpression enhances plant root growth under normal and saline conditions and improves salt tolerance in alfalfa. *Planta* 210: 416-422.
- 262) Woodward A.W. i Bartel B., 2005. Auxin: regulation, action and interaction. *Ann Bot* 95: 707-735.
- 263) Wu L., Zhang Z., Zhang H., Wang X.-C., Huang R., 2008. Transcriptional modulation of ethylene response factor protein JERF3 in the oxidative stress response enhances tolerance of tobacco seedlings to salt, drought, and freezing. *Plant Physiol* 148: 1953-1963.
- 264) Xiong J., Lu H., Lu K., Duan Y., An L., Xhu Ch., 2009. Cadmium decreases crown root number by decreasing endogenous nitric oxide, which is indispensable for crown root primordial initiation in rice seedlings. *Planta* 230: 599-610
- 265) Xu J., Yin H., Wang W., Mi Q., Liao X., Li X., 2009. Identification of Cd-responsive genes of *Solanum nigrum* seedlings through differential display. *Plant Mol Biol Rep* 27: 563-569.
- 266) Xu J., Wang W., Sun J., Zhang Y., Ge Q., Du L., Yin H., Liu X., 2011. Involvement of auxin and nitric oxide in plant Cd-stress responses. *Plant Soil* 346: 107-119.
- 267) Xu Q., Min H., Cai S., Fu Y., Sha S., Xie K., Du K., 2012. Subcellular distribution and toxicity of cadmium in *Potamogeton crispus* L. *Chemosphere* 89: 114-120.
- 268) Yang T., Xue L. i An L., 2007. Functional diversity of miRNA in plants. *Plant Sci* 172: 423-432.
- 269) Yakimova E.T., Kapchina-Toteva V.M., Laarhoven L.-J., Harren F.M., Woltering E.J., 2006. Involvement of ethylene and lipid signaling in cadmium-induced cell death in tomato suspension cultures. *Plant Physiol Bioch* 44: 581-589.

LITERATURA

- 270) Yamaguchi H., Fukuoka H., Arao T., Ohya A., Nunome T., Miyatake K., Negoro S., 2009. Gene expression analysis in cadmium-stressed roots of low cadmium-accumulating solanaceous plant, *Solanum torvum*. J Expl Bot 61: 423-437.
- 271) Yang H., Shi G., Wang H., Xu Q., 2010. Involvement of polyamines in adaptation of *Potamogeton crispus* L. to cadmium stress. Aquat Toxicol 100: 282-288.
- 272) Yanhui Ch., Xiaoyuan Y., Kun H., Meihua L., Jigang L., Zhaofeng G., Zhiqiang L., Yunfei Z., Xiaoxiao W., Xiaoming Q., Yunping Sh., Li Z., Xiaohui D., Jingchu L., Xing-Wang D., Zhangliang Ch., Hongya G., Li-Jia Q., 2006. The MYB transcription factor superfamily of Arabidopsis: expression analysis and phylogenetic comparison with the rice MYB family. Plant Mol Biol 60: 107-124.
- 273) Ye Y., Li Z. i Xing D., 2013. Nitric oxide promotes MPK6-mediated caspase-3-like activation in cadmium-induced *Arabidopsis thaliana* programmed cell death. Plant Cell Environ 36: 1-15.
- 274) Yeh C.-M., Chien P.-S. i Huang J., 2007. Distinct signaling pathways for induction of MAP kinase activities by cadmium and copper in rice roots. J Exp Bot 58: 659-71.
- 275) Yildiz M., Ciğerci İ.H., Konuk M., Fidan A.F., Terzi H., 2009. Determination of genotoxic effect of copper sulphate and cobalt chloride in *Allium cepa* root by chromosome aberration and comet assays. Chemosphere 75: 934-938.
- 276) Yun B.-W., Feechan A.F., Yin M., Saidi N.B.B., Bihan T.L., Yu M., Moore J.W., Kang J.-G., Kwon E., Spoel S.H., Pallas J.A., Loeke G.J., 2011. S-nitrosylation of NADPH oxidase regulates cell death in plant immunity. Nature 478: 264-268.
- 277) Zacchini M., Iori V., Mugnozza G.S., Pietrini F., Massacci A., 2011. Cadmium accumulaton and tolerance in *Populus nigra* and *Salix alba*. Biol Plantarum 55: 383-386.
- 278) Zaid H., Morabet el R., Diem H.G., Arhau M., 2003. Does ethylene mediate cluster root formation under iron deficiency? Annals of Botany 92: 673-677.
- 279) Zawoznik M.S., Groppa M.D., Tomaro M.L., Benavides M.P., 2007. Endogenous salicylic acid potentiates cadmium-induced oxidative stress in *Arabidopsis thaliana*. Plant Sci 173: 190-197.
- 280) Zhang F., Zhang H., Xia Y., Wang G., Xu L., Shen Z., 2011. Exogenous application of salicylic acid alleviates cadmium toxicity and reduces hydrogen peroxide accumulation in root apoplasts of *Phaseolus aureus* and *Vicia sativa*. Plant Cell Rep 30: 1475-1483.
- 281) Zhao S. i Fernald R.S., 2005. Comprehensive algorithm for quantitative real-time polymerase chain reaction. J Comput Biol 12: 1047-1064.
- 282) Zhao H., Xia B., Fan C., Zhao P., Shen S., 2012a. Human health risk from soil heavy metal contamination under different land uses near Dabaoshan Miner, Soouthern China. Sci Total Environ 417-418: 45-54.

LITERATURA

- 283) Zhao F.-Y., Han M.-M., Zhang S.-Y., Wang K., Zhang C.-R., Liu T., Liu W., 2012b. Hydrogen peroxide- mediated growth of the root system occurs via auxin signaling modification and variations in the expression of cell-cycle genes in rice seedlings exposed to cadmium stress. *Plant Integr Biol* 54: 991-1006.
- 284) Zhang L.W., Song J.B., Shu X.X, Zhang Y., Wang Z.M., 2013. miR395 is involved in detoxification of cadmium in *Brassica napus*. *J Hazard Mater* 250-251: 204-2011.
- 285) Zhong G.V. i Burns J.K., 2003. Profiling ethylene-regulating gene expression in *Arabidopsis thaliana* by microarray analysis. *Plant Mol Biol* 53: 117-131.
- 286) Zhou J., Tang X. and Martin G.B., 1997. The Pto kinase conferring resistance to tomato bacterial speck disease interacts with proteins that bind a *cis*-element of pathogenesis-related genes. *EMBO J* 16: 3207-3218.
- 287) Zhou Z.S., Sng J.B. i Yang Z.M., 2012. Genome-wide identification of *Brassica napus* microRNAs and their targets in response to cadmium. *J Exp Bot* 63: 4597-4613.
- 288) Zhu X.F., Zheng C., Hu Y.T., Jiang T., Dong N.Y., Yang J.L., Zheng S.J., 2011. Cadmium-induced oxalate secretion from root apex is associated with cadmium exclusion and resistance in *Lycopersicon esculentum*. *Plant Cell Environ* 34: 1055-1064.

ANEKS

Elementy *cis* w sekwencjach promotorowych genów indukowanych przez kadm.

Tabela 14: Sekwencje promotorowe oraz wyszukane elementy *cis*. Elementy *cis* zaznaczone pogrubioną czcionką są zaangażowane w odpowiedź roślin na działanie hormonów roślinnych lub czynników stresowych. Litery zapisane małym drukiem oznaczają nie dopasowane nukleotydy. Skróty literowe: A – adenine, C – cytozyna, G – guanine, T – tymina, R – puryna, Y – pirymidyna, W – adenina lub tymina, D- adenina tymina lub guanina, H – nie guanina, N – jakikolwiek nukleotydy.

Element <i>cis</i>	Sekwencja	Pozycja	Powiązany czynnik transkrypcyjny
<u>Gen kodujący syntazę kwasu 1-aminocyklopropano-1-karboksyłowego (ACS), Soybase: <i>Glyma05g37410</i></u>			
RAV1a	CAACA	-952	RAV1
Dof1 BSopt	WAAAG	-935	DOF1
S-box	TTTAA	-910	nieznany czynnik jądrowy
TAACAAA box	TAACAAA	-900	GAmyb
CHR	TTTGAA	-891	nieznany czynnik jądrowy
S-box	TTTAA	-873	nieznany czynnik jądrowy
S-box	TTTAA	-866	nieznany czynnik jądrowy
OBF5 BS	atcttatgtcattgaTGACGacctcc	-851	OBF5
as-1 LM	aaaTGACGaaaatgc	-839	nieznany czynnik jądrowy
as-1 LM	tAATGACGAAAaCaC	-836	nieznany czynnik jądrowy

ANEKS

Dof1 BSopt	WAAAG	-810	DOF1
ATHB-2 BE	TAATRATTA	-756	Białko ATHB-2
C2b-BS	ctccACGTGgt	-672	czynnik jądrowy specyficzny dla korzeni (root-specific nuclear factor)
G-box motif	cTACGTGgcca	-670	nieznany czynnik jądrowy
G-box	cACGTG	-669	TAF-1
Motif j/k	tACGTG	-669	czynnik jądrowy specyficzny dla epikotylu (epicotyl-specific nuclear factor)
Em1a	ACGTGgcgc	-668	EmBP-1
Em1b	ACGTGccgc	-668	EmBP-1
Box 1 homolog	TCTCACtACTA	-532	czynnik jądrowy specyficzny dla epikotylu (epicotyl-specific nuclear factor)
<u>Gen kodujący dekarboksylazę S-adenozylometioniny (SAMDC), Soybase: <i>Glyma02g14180</i></u>			
E2fb	TTTGCCGC	-547	E2F
Dof1 BSopt	WAAAG	-441	DOF1
"ACTTA" motif	ACTTTA	-430	NtBBF1, DOF transcriptiob factor
-141 sequence	gcttttgaTGACtTcaaacac	-393	TGA1a; PG13;

ANEKS

Dof1 BSopt	WAAAG	-364	DOF1
SEF4 BS	gcaTTTTTatca	-340	SEF4
SEF4 BS	gcaTTTTTatca	-339	SEF4
SEF4 BS	gcaTTTTTatca	-338	SEF4
SEF4 BS	gcaTTTTTatca	-337	SEF4
AT-1 (1)	gaaaattttaatATTTTTAttagtatt	-327	nieznany czynnik jądrowy
AT-1	cttaatatATTTTTAattattttattctcttaa	-323	AT-1
AT-1 (3)	aattATTTTTAaa	-319	nieznany czynnik jądrowy
AT-1 (2)	aattATTTTTAtt	-319	AT-1
AT-1 (4)	aatATTTTTAtc	-318	nieznany czynnik jądrowy
SEF4 BScons	RTTTTTTR	-315	SEF4
S-box	TTTAA	-285	nieznany czynnik jądrowy
AT-1 (1)	gaaaattttaatATTTTTAttagtatt	-278	nieznany czynnik jądrowy
AT-1	cttaatatATTTTTAattattttattctcttaa	-274	AT-1
AT-1 (3)	aattATTTTTAaa	-270	nieznany czynnik jądrowy

ANEKS

AT-1 (2)	aattATTTTTAtt	-270	AT-1
AT-1 (4)	aatATTTTTAtc	-269	nieznany czynnik jądrowy
SEF4 BS	gcaTTTTTatca	-268	SEF4
SEF4 BScons	RTTTTTTR	-266	SEF4
S-box	TTTAA	-244	nieznany czynnik jądrowy
S-box	TTTAA	-231	nieznany czynnik jądrowy
DNase I footprint	CTGGcCCCaCC	-216	CPRF1
<u>Gen kodujący reduktazę azotanową (NR), Sybase: <i>Glyma06g11430</i></u>			
Sph	tCATGCATGg	-799	PvAlf
Legumin box; RY4; A flowering promoting gene from <i>Oryza sativa</i>	CATGCATG	-798	nieznany czynnik jądrowy; OsLFL1
Dof1 BSopt	WAAAG	-396	DOF1
SEF3 BS	AACCCA	-363	SEF3
SEF4 BS	gcaTTTTTatca	-306	SEF4
SEF4 BS	gcaTTTTTatca	-305	SEF4
SEF4 BS	gcaTTTTTatca	-304	SEF4
SEF4 BS	gcaTTTTTatca	-303	SEF4
SEF4 BS	gcaTTTTTatca	-302	SEF4

ANEKS

AT-1 (1)	gaaaattttaatATTTTTTAtttagtatt	-290	nieznany czynnik jądrowy
AT-1	cttaatatATTTTTTAattattttattctcttaa	-286	AT-1
AT-1 (1)	gaaaattttaatATTTTTTAtttagtatt	-284	nieznany czynnik jądrowy
AT-1	aattATTTTTTAtt	-282	AT-1
AT-1 (2)	aattATTTTTTAaa	-282	nieznany czynnik jądrowy
AT-1 (3)	aatATTTTTTAtt	-281	nieznany czynnik jądrowy
AT-1 (4)	aatATTTTTTAtc	-281	nieznany czynnik jądrowy
AT-1	cttaatatATTTTTTAattattttattctcttaa	-280	AT-1
SEF4 BS	gcaTTTTTatca	-280	SEF4
SEF4 BScons	RTTTTTTR	-278	SEF4
AT-1	aattATTTTTTAtt	-276	AT-1
AT-1 (2)	aattATTTTTTAaa	-276	nieznany czynnik jądrowy
AT-1 (3)	aatATTTTTTAtt	-275	nieznany czynnik jądrowy
AT-1 (4)	aatATTTTTTAtc	-275	nieznany czynnik jądrowy
SEF4 BS	gcaTTTTTatca	-274	SEF4
SEF4 BScons	RTTTTTTR	-272	SEF4
S-box	TTTAA	-269	nieznany czynnik jądrowy
AT-1 (1)	gaaaattttaatATTTTTTAtttagtatt	-214	nieznany czynnik jądrowy
S-box	TTTAA	-214	nieznany czynnik jądrowy
AT-1	cttaatatATTTTTTAattattttattctcttaa	-210	AT-1

ANEKS

AT-1 (1)	gaaaattttaatATTTTTTAtttagtatt	-208	nieznany czynnik jądrowy
AT-1	aattATTTTTAtt	-206	AT-1
AT-1 (2)	aattATTTTTAaa	-206	nieznany czynnik jądrowy
AT-1 (3)	aatATTTTTAtt	-205	nieznany czynnik jądrowy
AT-1 (4)	aatATTTTTAtc	-205	nieznany czynnik jądrowy
AT-1	cttaatatATTTTTAattattttattctcttaa	-204	AT-1
SEF4 BS	gcaTTTTTatca	-204	SEF4
SEF4 BScons	RTTTTTTR	-202	SEF4
AT-1	aattATTTTTAtt	-200	AT-1
AT-1 (2)	aattATTTTTAaa	-200	nieznany czynnik jądrowy
AT-1 (3)	aatATTTTTAtt	-199	nieznany czynnik jądrowy
AT-1 (4)	aatATTTTTAtc	-199	nieznany czynnik jądrowy
SEF4 BS	gcaTTTTTatca	-198	SEF4
SEF4 BScons	RTTTTTTR	-196	SEF4
S-box	TTTAA	-193	nieznany czynnik jądrowy
CArg3 (AGL3)	CTWWWWWWGT	-176	AGL3; MADS-box containing positively transcription factor
S-box	TTTAA	-151	nieznany czynnik jądrowy
SEF4 BS	gcaTTTTTatca	-127	SEF4
SEF4 BScons	RTTTTTTR	-125	SEF4

ANEKS

<u>Gen kodujący kinazę kinazy aktywowanej mitogenami2 (MAPKK2), Soybase: Glyma17g06020</u>			
ACE1-like	HTHNNGCTGD	-930	nieznany czynnik jądrowy
MRE-like	TGCRNC	-552	nieznany czynnik jądrowy
SEF4 BS	gcaTTTTTatca	-387	SEF4
SEF4 BS	gcaTTTTTatca	-386	SEF4
SEF4 BS	gcaTTTTTatca	-385	SEF4
S-box	TTTAA	-375	nieznany czynnik jądrowy
SEF4 BS	gcaTTTTTatca	-353	SEF4
SEF4 BS	gcaTTTTTatca	-352	SEF4
TAACAAA box	TAACAAA	-324	GAmyb
AT-1 (2)	aattATTTTTAaa	-323	nieznany czynnik jądrowy
Dof1 BSopt	WAAAG	-320	DOF1
AT-1	cttaatatATTTTTAattattttattctctaa	-319	AT-1
AtMYB77 BS	rdygRCRGTTTRs	-315	AtMYB77
Myba	CGGTTG	-310	Myb
Dof1 BSopt	WAAAG	-302	DOF1
Alfin1 BS2	GTGGNG	-272	Alfin1
WB	TTTGACT	-257	WRKY1
Zf-box	TTGACT	-256	nieznany czynnik jądrowy

ANEKS

Dof1 BSopt	WAAAG	-243	DOF1
C2b-BS	ctccACGTGgt	-220	root-sprcific nuclear factor(s)
G/A-box	tGATACGTGGTt	-220	STF1/HY5
G-box motif	cTACGTGgcca	-218	nieznany czynnik jądrowy
G-box	cACGTG	-217	TAF-1
Motif j/k	tACGTG	-217	epicotyl-specific nuclear factor
Motif j/k	TACGTG	-217	epicotyl-specific nuclear factor
Em1a	ACGTGgccc	-216	EmBP-1
Em1b	ACGTGccc	-216	EmBP-1
AT-1 (1)	gaaaatttaaatATTTTTAtttagtatt	-211	nieznany czynnik jądrowy
SEF4 BS	gcaTTTTTatca	-210	SEF4
AT-1	cttaatatATTTTTAattattttattctcttaa	-207	AT-1
AT-1 (2)	aattATTTTTAtt	-203	AT-1
AT-1 (2)	aattATTTTTAaa	-203	nieznany czynnik jądrowy
AT-1 (3)	aatATTTTTAtt	-202	nieznany czynnik jądrowy
AT-1 (4)	aatATTTTTAtc	-202	nieznany czynnik jądrowy
SEF4 Bscons	RTTTTTTR	-199	SEF4
ECE2	atccattcTATATAAGaacata	-196	nieznany czynnik jądrowy

ANEKS

<u>Gen kodujący czynnik transkrypcyjny, Soybase: DOF1 <i>Glyma13g42820</i></u>			
Dof1 BSopt	WAAAG	-27	DOF1
ABRE	GTACGTGGgGC	-176	nieznany czynnik jądrowy
Box III	GTACGTGG	-176	unknown noncooperative nuclear factor
Em1b	CACACGTGtC	-197	EmBP-1 (+VP1)
G-box	cACACGTGTC	-197	nieznany czynnik jądrowy
HSE4	GAATAATTC	-216	HsfA2
NDE Box 3	GGTCCCAT	-320	nieznany czynnik jądrowy
Box B	AAACGAgAtCGTTT	-348	unknown nuclear protein
AT-rich FF1	TgcATaTtATTATTATTATA	-676	nieznany czynnik jądrowy
CArG box; EM1 (CArG box 1)	CCTTTTTTGG	-841	FLC; MADS box proteins
<u>Gen kodujący czynnik transkrypcyjny DOF1, Soybase:<i>Glyma15g02620</i></u>			
B2	CTTGTCGTCA	-35	nieznany czynnik jądrowy
ABRE	GCaACTTGTC	-39	ABI3

ANEKS

Dof1 BSopt	WAAAG	-56	DOF1
Dof1 BSopt	WAAAG	-132	DOF1
Dof1 BSopt	WAAAG	-151	DOF1
PacC BS1	AAcGTGGGGGgA	-790	PacC
Alfin1 BS2	AAcGTGGGGGgA	-790	Alfin1
At-TCP20 ("TCP domain" transcription factor)	GGCCgA---ACCCTAA	-800	Box II/telo-box (motifs 2 & 3)
<u>Gen kodujący czynnik transkrypcyjny MYBZ2, Soybase: <i>Glyma11g11450</i></u>			
CRA1-III	AtGTCTTTTaACTaG	-930	CRA1-III
A1	aaggtgatcatagacgcaTATTATAagagagtgaaaactaatgg	-680	nieznany czynnik jądrowy
SEF4 BS	gcaTTTTTatca	-674	SEF4
SEF4 BS	gcaTTTTTatca	-673	SEF4
SEF4 BS	gcaTTTTTatca	-672	SEF4
CHR	TTTGAA	-643	nieznany czynnik jądrowy
T-box	AACGTT	-590	bZIP factor
S-box	TTTAA	-585	nieznany czynnik jądrowy
ERE2	ttGGTCAatTc	-560	nieznany czynnik jądrowy
ERE1	tGGTCAatTc	-559	nieznany czynnik jądrowy

ANEKS

WA	GGTCAAA	-558	WRKY1
A/T-rich BOX1	ATAATAAAA	-546	PCF1
Dof1 BSopt	WAAAG	-541	DOF1
E-region	aagccaagccccaagTTGatccgtTTGatcgc	-536	CCA1
ATMYC BS	CACATG	-507	rd22BP1 (MYC)
RY	caTGCAC	-505	nieznany czynnik jądrowy
RY	CATGCA	-505	ABI3
SEF4 BS	gcaTTTTTatca	-483	SEF4
SEF4 BS	gcaTTTTTatca	-482	SEF4
S-box	TTTAA	-477	nieznany czynnik jądrowy
-141 sequence	gcttttgaTGACtTcaaacac	-430	TGA1a; PG13
<u>Gen kodujący czynnik transkrypcyjny bZIP62, Soybase: <i>Glyma06g08390</i></u>			
hex3	GGACGgGTGtC	-990	(activating sequence factor 1); hex-1-specific binding factor of tob
CE3	GACGgGTGTC	-989	TRAB1
AT-1 (4)	AATATTTTTATC	-774	nieznany czynnik jądrowy
S-box	TTTAA	-604	nieznany czynnik jądrowy
SEF4 BS	gcaTTTTTatca	-558	SEF4
SEF4 BS	gcaTTTTTatca	-557	SEF4
SEF4 BS	gcaTTTTTatca	-556	SEF4
S-box	TTTAA	-551	nieznany czynnik jądrowy

ANEKS

SEF4 BS	gcaTTTTTatca	-530	SEF4
SEF4 BS	gcaTTTTTatca	-529	SEF4
AT-1 (1)	gaaaattttaatATTTTTAAttagtatt	-528	nieznany czynnik jądrowy
SEF4 BS	gcaTTTTTatca	-528	SEF4
SEF4 BS	gcaTTTTTatca	-527	SEF4
SEF4 BS	gcaTTTTTatca	-526	SEF4
AT-1	cttaatatATTTTTAattattttctcttaa	-524	AT-1
AT-1 (2)	aattATTTTTAaa	-520	nieznany czynnik jądrowy
AT-1 (2)	aattATTTTTAtt	-520	AT-1
AT-1 (3)	aatATTTTTAtt	-519	nieznany czynnik jądrowy
AT-1 (4)	aatATTTTTAtc	-519	nieznany czynnik jądrowy
SEF4 BS	gcaTTTTTatca	-518	SEF4
SEF4 BScons	RTTTTTTR	-516	SEF4
SEF4 BS	gcaTTTTTatca	-504	SEF4
SEF4 BS	gcaTTTTTatca	-503	SEF4
S-box	TTTAA	-498	nieznany czynnik jądrowy
S-box	TTTAA	-453	nieznany czynnik jądrowy
S-box	TTTAA	-422	nieznany czynnik jądrowy
ATHB-2 BE	TAATRATTA	-415	ATHB-2 protein
SEF4 BS	gcaTTTTTatca	-409	SEF4

ANEKS

SEF4 BS	gcaTTTTTatca	-408	SEF4
AT-rich G	GTATTTT	-377	nieznany czynnik jądrowy
Dof1 BSopt	WAAAG	-353	DOF1
BC-2	AaTTtAGCCcAACC	-275	Unknown transcription factor
GBF1 BS7	CTACGTGT	-244	GBF1
G-box	ACACGTGaC	-169	GBF
ABRE-3	ACACGTGaC	-168	B.napus embryo protein factor
GCC box	cAAGtGCCGCC	-97	AtEBP
GCC box	tGCCGCC	-93	OsEREBP1; StEREBP1
GCC box; MBSII; GCCGCC-ERE	GCCGCC	-92	Pti4; Pti4/5/6
3'-III element	ATaCCCCACA	-25	CBF