



UNIVERSITAS JAGELLONICA  
CRACOVIENSIS

**Modulacja odpowiedzi roślin na UV  
pod wpływem światła widzialnego i cukrów**

Piotr Zglobicki

Praca doktorska  
wykonana w Zakładzie Biotechnologii Roślin  
Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii  
Uniwersytetu Jagiellońskiego  
pod opieką  
prof. dr hab. Haliny Gabryś  
dr Agnieszki Katarzyny Banaś

**Kraków, 2019**

Pragnę złożyć serdeczne podziękowania moim Promotorom:  
Profesor Halinie Gabryś za umożliwienie mi wykonania niniejszej pracy  
oraz za wszystkie lata opieki naukowej  
Dr Kasi Banaś za cały poświęcony czas, nadzór merytoryczny  
i nieskończoną cierpliwość

Bardzo dziękuję Profesorowi Jerzemu Krukowi za wykonanie oznaczeń  
tokochromanoli oraz Dr hab. Joannie Grzyb za pomoc w oznaczeniu  
barwników fotosyntetycznych i związków polifenolowych oraz analizie  
uzyskanych wyników

Serdecznie dziękuję Dr Justynie Łabuz za merytoryczne dyskusje  
i nieustającą życzliwość, Dr. Pawłowi Hermanowiczowi za pomoc  
w analizie statystycznej, Mgr inż. Annie Kozłowskiej za wsparcie  
przy prowadzeniu hodowli ziemnych i *in vitro*

Dziękuję Dominice Jagiełło-Flasińskiej i Carolinie Borghetti  
za lata wspólnej pracy i przyjaźń, dzięki której miały zbyt szybko

Dziękuję również wszystkim członkom Zakładu Biotechnologii Roślin  
za wszelką pomoc, życzliwość i dobrą atmosferę

Szczególne podziękowania składam moim Rodzicom,  
którzy wspierali mnie podczas całych studiów doktoranckich, a  
nawet  
wcześniej

## Streszczenie

Promieniowanie ultrafioletowe jest jedną ze składowych widma światła słonecznego i ważnym czynnikiem stresowym szczególnie dla organizmów fotoautotroficznych. Ochrona przed jego szkodliwym działaniem zachodzi na wielu różnych poziomach: unikania ekspozycji, pochłaniania promieniowania i, jeśli powyższe zawiodą, naprawy powstających uszkodzeń. Rośliny używają licznych mechanizmów fotoprotekcyjnych, sterowanych przez receptory światła. Wiele z nich, jak na przykład ruchy chloroplastów, jest modulowanych przez zależne od cukrów ścieżki sygnałowe. W roślinnych szlakach sygnału pochodzącego od cukrów kluczową rolę pełni glukoza, której receptorem jest heksokinaza. Receptor sacharozy pozostaje nieznany, jednak istnieją dowody, że jest ona odbierana jako odrębny sygnał.

Celem tej pracy było zbadanie roli światła widzialnego oraz cukrów w ochronie roślin przed skutkami promieniowania UV. Pierwszym etapem było określenie wpływu sterowanych światłem niebieskim ruchów organelli komórkowych zawierających DNA - jąder komórkowych i chloroplastów na unikanie ekspozycji na UV. Badanie przeprowadzono na *Arabidopsis thaliana* typu dzikiego oraz mutantach z zaburzonym ruchem organelli. Liście roślin naświetlano lub zaciemniano warunkując określone położenie chloroplastów i jąder komórkowych, a następnie poddawano działaniu UV ( $2,5 \text{ kJ}\cdot\text{m}^{-2}$ ). Poziom dimerów pirymidynowych w DNA izolowanym z różnych frakcji subkomórkowych oznaczano metodą ELISA z użyciem specyficznych przeciwciał. W dalszej części analizowano wpływ cukrów dodanych do pożywki na kolejne poziomy ochrony *Arabidopsis* przed UV. Badano rośliny hodowane *in vitro* na podłożach z różnymi stężeniami glukozy i sacharozy oraz odpowiadającymi im osmotycznie stężeniami mannitolu, a także na pożywce kontrolnej bez dodatkowych składników. Wysokosprawna chromatografia cieczowa (HPLC) posłużyła do zmierzenia poziomu związków pochłaniających UV i przeciwutleniaczy. Następnie określano poziomy dimerów pirymidynowych w DNA bezpośrednio po naświetleniu UV ( $2,5 \text{ kJ}\cdot\text{m}^{-2}$ ) oraz naprawę tych dimerów w roślinach przeniesionych do różnych warunków świetlnych. Stosując technikę PCR w czasie rzeczywistym zmierzono poziom transkryptów genów zaangażowanych w różne szlaki naprawy DNA. Określono także wydajność fotosyntetyczną roślin rosnących na różnych podłożach po naświetleniu UV używając metody fluorymetrycznej. Dodatkowo prowadzono obserwacje wpływu cukrów

w pożywce na przeżywanie, wzrost i rozwój roślin traktowanych różnymi dawkami UV ( $2,5 \text{ kJ}\cdot\text{m}^{-2}$ ,  $28 \text{ kJ}\cdot\text{m}^{-2}$ ).

W wyniku przeprowadzonych badań nie stwierdzono ochrony przed uszkodzeniami wywoływanymi UV w genomie chloroplastowym i jądrowym dzięki sterowanym światłem niebieskim ruchom organelli. Zaobserwowano wzrost przeżywalności po naświetlaniu dużą dawką UV ( $28 \text{ kJ}\cdot\text{m}^{-2}$ ) roślin hodowanych na sacharozie lub glukozie. Wzrost ten jest skorelowany z mniejszym spadkiem wydajności fotosyntetycznej oraz z niższym poziomem uszkodzeń w DNA. Efekt ten nie jest związany z różnicami w naprawie DNA, ponieważ jej poziom nie zależał od cukrów. Prawdopodobnie wynikał on ze zmniejszonej penetracji promieniowania w głąb tkanki dzięki zwiększonej ilości polifenolowych związków absorbujących UV. Wśród nich największy wzrost obserwowano w przypadku kemferytyny i jabłczanu sinapoilu w roślinach rosnących na pożywce z wysokim stężeniem glukozy. Przeciwną tendencję stwierdzono w przypadku odpowiedzialnych za redukcję wolnych rodników związków poliprenowych, takich jak tokoferole czy plastochromanol-8, których poziom był niższy w roślinach hodowanych na badanych cukrach. Stwierdzono wpływ cukrów (sacharozy i glukozy) w medium hodowlanym na poziom transkryptów niektórych genów uczestniczących w naprawie błędnie sparowanych nukleotydów, naprawie przez wycięcie nukleotydów, a także markerów jądrowych proliferujących komórek (PCNA) i gyrazy DNA. Ostatnim etapem badań było sprawdzenie długoterminowych efektów dodatku do pożywki cukrów na wzrost i rozwój roślin po naświetlaniu UV. Przy niskich dawkach UV ( $2,5 \text{ kJ}\cdot\text{m}^{-2}$ ) zaobserwowano przyspieszone kwitnienie roślin na pożywce z sacharozą. Efekt ten nie był obserwowany ani przy traktowaniu UV roślin rosnących na innych podłożach, ani dla roślin rosnących na podłożu z sacharozą nie naświetlonych. Efekt przyspieszonego kwitnienia nie był jednak zależny od receptora UV-B – UVR8, gdyż nie obserwowano różnic między roślinami typu dzikiego a mutantem *uvr8*.

Uzyskane wyniki świadczą o ważnej roli sygnału pochodzącego od cukrów w ochronie roślin przed UV. Wykazano, że dodatek cukrów do pożywki zwiększa przeżywalność roślin po stresie UV i moduluje procesy rozwojowe. Cukry wpływają m.in. na poziom ekspresji genów zaangażowanych w naprawę DNA i produkcję związków absorbujących UV.

## Abstract

Ultraviolet radiation is a part of the solar radiation spectrum and an important stressor for photosynthetic organisms. There are several levels of protection from detrimental UV effects: avoidance, absorption and repair of occurring damage. Plants have numerous photoprotective mechanisms, controlled by photoreceptors. Many of them, like chloroplast movements, are modulated by sugar dependent signalling pathways. In the sugar signalling network in plants the central role is played by glucose and its receptor – hexokinase. Sucrose receptor remains unknown, although it appears that it is perceived as a distinct signal.

The aim of this study was to determine the role of visible light and different sugars in the modulation of plant UV-protection mechanisms. The role of blue light triggered organelle movements in avoiding UV exposure has been tested in wild type *Arabidopsis* and chloroplast movement mutants. Plant leaves were blue light illuminated to position the organelles and subsequently UV-irradiated ( $2.5 \text{ kJ}\cdot\text{m}^{-2}$ ). Pyrimidine dimer levels in DNA isolated from cellular fractions: nuclei and chloroplasts were measured by ELISA.

In the next part of the study, the influence of sugars in growth medium on *Arabidopsis* UV-protection has been checked. Plants were grown *in vitro* on media with various concentrations of glucose, sucrose or osmotically equivalent mannitol concentrations and a control medium with no additions. High-performance liquid chromatography (HPLC) served to measure UV-absorbing compounds and antioxidants level. The amount of pyrimidine dimers in DNA immediately after UV-irradiation ( $2.5 \text{ kJ}\cdot\text{m}^{-2}$ ) and after further incubation of plants in various light conditions has been checked. Using the fluorometric method, the maximum quantum yield of photosystem II was measured. In addition, the medium effect on plant growth and development after UV-treatment ( $2.5 \text{ kJ}\cdot\text{m}^{-2}$ ,  $28 \text{ kJ}\cdot\text{m}^{-2}$ ) has been observed.

No effect of chloroplast and nuclear movements on UV-induced DNA damage has been noticed. Sucrose and glucose increased survival of plants irradiated with high UV dose ( $28 \text{ kJ}\cdot\text{m}^{-2}$ ). This correlated with a smaller decrease in photosynthetic quantum yield and lower levels of pyrimidine dimers in DNA. The DNA damage repair rate was not sugar-dependent. Plants grown on media with sugar had higher levels of UV-absorbing phenolic compounds, especially of sinapoyl malate and kaempferitin. Surprisingly, the

levels of chloroplast antioxidants, such as tocopherols and plastochromanol-8 were significantly lower in plants grown on media with sugar. Sucrose and glucose affected the transcript level of some genes participating in nucleotide excision repair, mismatch repair, proliferating cell nuclear antigens (PCNA) and DNA gyrase. An interesting effect of UV on plants grown on medium with sucrose has been observed, as they showed an early flowering phenotype. It was not dependent on UV-B receptor, UVR8, as no difference was observed between wild type and *uvr8* mutant plants.

The obtained results prove the importance of sugar signalling in plant UV-protective mechanisms. Sugar addition to media was shown to increase plant survival rate after UV-irradiation and modulates developmental processes. Sugars influence DNA repair gene expression and UV-absorbing compounds biosynthesis.

#### **Wykaz stosowanych skrótów:**

3'PUA –  $\alpha/\beta$ -nienasycony 3'fosfoaldehyd (ang. 3'phospho  $\alpha/\beta$ -unsaturated aldehyde)

6-4 PP – pirymidyno [6-4]pirymidony, 6-4 fotoprodukty (ang. 6-4 photoproducts; pyrimidine[6-4]pyrimidinone dimers)

8-HDF – 8-hydroksy-5-deazaryboflawina (ang. 8-hydroxy-5-deazariboflavin)

AP – [miejsce] apurynowe/apiryimidynowe (ang. apurinic/apyrimidinic [site])

AP1 – białko APETALA1

APE – endonukleaza AP (AP ENDONUCLEASE)

ARP – endonukleaza AP (APURINIC ENDONUCLEASE-REDOX PROTEIN)

AtHXK1 – heksokinaza *A. thaliana* 1 (ARABIDOPSIS THALIANA HEXOKINASE 1)

ATM – homolog ludzkiego białka ATM (ATAXIA-TELANGIECTASIA-MUTATED)

AtMYB4 – czynnik transkrypcyjny z domeną MYB (MYB DOMAIN PROTEIN 4)

AtPol $\lambda$  – polimeraza DNA  $\lambda$  *A. thaliana* (DNA POLYMERASE  $\lambda$ )

ATR – ortolog białka ATM (ATAXIA-TELANGIECTASIA-MUTATED AND RAD3-RELATED)

AtRBOHD – oksydaza NADPH (ARABIDOPSIS THALIANA RESPIRATORY BURST OXIDASE HOMOLOGUE D)

AtRBOHF – oksydaza NADPH (ARABIDOPSIS THALIANA RESPIRATORY BURST OXIDASE HOMOLOG F)

B5 $\emptyset$  – podłoże B5 bez dodatków

BER – naprawa przez wycięcie nukleotydów (ang. base excision repair)

bHLH – podstawowy motyw helisa-pętla-helisa (basic HELIX LOOP HELIX)

CAT – katalaza (CATALASE)

CCA1 – białko związane z cyklem dobowym (CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1)

CDF – czynnik transkrypcyjny (CYCLING DOF FACTOR)

cDNA – komplementarny DNA (ang. complementary DNA)

CEN2 – centryna 2 (CENTRIN 2)

CHI – izomeraza chalkonowa (CHALCONE ISOMERASE)

CHS – syntaza chalkonowa (CHALCONE SYNTHASE)

CHUP1 – białko wiążące aktyne (CHLOROPLAST UNUSUAL POSITIONING1)

CIB – czynnik transkrypcyjny oddziałujący z kryptochromami (CRYPTOCHROME-INTERACTING BASIC HELIX-LOOP-HELIX)

CO – białko regulujące czas kwitnienia (CONSTANS)

COP1 – ligaza ubikwityny (CONSTITUTIVELY PHOTOMORPHOGENETIC 1)

CPD – dimer cyklobutyłowyy (ang. cyclobutane pyrimidine dimer)

CRY – kryptochrom (CRYPTOCHROME)

CSA – białko zespołu Cockayne'a A (COCKAYNE SYNDROME A)

CSB – białko zespołu Cockayne'a B (COCKAYNE SYNDROME B)

Ct – cykl progowy (ang. threshold cycle)

CUL4 – białko wchodzące w skład kompleksu ligazy ubikwityny (CULLIN4)

DCMU – 3-(3,4-dichlorofenyl)-1,1-dimetylomocznik (ang. 3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea)

DDB – białko wiążące uszkodzone DNA (DAMAGED DNA BINDING)

DFR – reduktaza dihydroflawonoli (DIHYDROFLAVONOL REDUCTASE)

DNA-PKcs – zależna od DNA podjednostka katalityczna kinazy białkowej (ang. DNA-dependent protein kinase catalytic subunit)

dNTP – trifosforan deoksyrybonukleotydu (ang. deoxyribonucleoside triphosphate)

DRT100 – homolog białka RecA (DNA-DAMAGE REPAIR/TOLERATION 100)

DSB – pęknięcia dwuniciowe (ang. double strand breaks)

EDTA – kwas wersenowy (ang. ethylenediaminetetraacetic acid)

ELF3 – białko związane z cyklem dobowym (EARLY FLOWERING 3)

ELISA – test immunoenzymatyczny (ang. enzyme-linked immunosorbent assay)

ERCC1 – endonukleaza DNA (EXCISION REPAIR CROSS COMPLEMENTING 1)

ERF – czynniki transkrypcyjne (ETHYLENE RESPONSE FACTOR)

ExoI, ExoVII, ExoX – egzonukleazy DNA (Exonuclease I, VII, X)

FADH<sup>-</sup> – zredukowany dinukleotyd flawinoadeninowy (ang. reduced flavin adenine dinucleotide)

FAH – hydroksylaza kwasu ferulowego (ang. ferulic acid hydroxylase)

FBH – czynniki transkrypcyjne z domeną BHLH (FLOWERING BHLH1)

FD – czynnik transkrypcyjny (FLOWERING LOCUS D)

FKF1 – receptor światła niebieskiego o aktywności ligazy ubikwityny E3 (FLAVIN-BINDING, KELCH REPEAT, F-BOX 1)

FLS – syntaza flawonoli (FLAVONOL SYNTHASE)

FMN – mononukleotyd flawinowy (ang. flavin mononucleotide)

FT – białko regulujące czas kwitnienia (FLOWERING TIME)

$F_v/F_m$  – maksymalna wydajność kwantowa fotosystemu II

GG-NER – ogólnogenomowa naprawa przez wycięcie nukleotydów (ang. global genome nucleotide excision repair)

GI – białko regulujące czas kwitnienia (GIGANTEA)

GLC1 – podłoże B5 z dodatkiem 1% glukozy

GLC3 – podłoże B5 z dodatkiem 3% glukozy

GPX – peroksydaza glutationu (GLUTATHIONE PEROXIDASE)

HOS1 – ligaza ubikwityny (HIGH EXPRESSION OF OSMOTICALLY RESPONSIVE GENES 1)

HPLC – wysokosprawna chromatografia cieczowa (ang. high-performance liquid chromatography)

HR – rekombinacja homologiczna (ang. homologous recombination)

HRP – peroksydaza chrzanowa (ang. horseradish peroxidase)

HXK – heksokinaza (HEXOKINASE)

HY5 – czynnik transkrypcyjny zaangażowany w odpowiedź na UV (ELONGATED HYPOCOTYL 5)

HYH – czynnik transkrypcyjny, homolog HY5 (HY5 HOMOLOG)

JA – kwas jasmonowy (ang. jasmonic acid)

kbp – tysiące par zasad (ang. kilo base pairs)

KIN10/11 – kinazy białkowe

LFY – czynnik transkrypcyjny (LEAFY)

LHY – czynnik transkrypcyjny (LATE ELONGATED HYPOCOTYL)

LIG4 – ligaza DNA 4 (DNA LIGASE IV)

MAN0,53 – podłoże B5 z 0,53% mannitolu, izoosmotyczne względem SUC1

MAN1 – podłoże B5 z 1% mannitolu, izoosmotyczne względem GLC1

MAN1,6 – podłoże B5 z 1,6% mannitolu, izoosmotyczne względem SUC3

MAN3 – podłoże B5 z 3% mannitolu, izoosmotyczne względem GLC3

MLH – homologi bakteryjnego MutL (MutL HOMOLOG)

MMEJ – łączenie końców przez mikrohomologie (ang. microhomology mediated end joining)

MMR – naprawa błędnie sparowanych nukleotydów (ang. mismatch repair)



MMS – metanosulfonian metylu (ang. methyl methanesulfonate)

MRE11 – białko wchodzące w skład kompleksu MRN (MEIOTIC RECOMBINATION 11)

MRN – kompleks MRE11-Rad50-NBS1

mRNA – matrycowy RNA (ang. messenger RNA)

MSH – homologi bakteryjnego MutS (MutS HOMOLOG)

MutH, L, S, U – bakteryjne białka naprawcze

MYB75/ATPAP1 – czynnik transkrypcyjny (MYELOBLASTOSIS PROTEIN 75; ARABIDOPSIS THALIANA PRODUCTION OF ANTHOCYANIN PIGMENT 1)

NADPH – fosforan dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego (ang. nicotinamide adenine dinucleotide phosphate)

NBS1 – białko, składnik kompleksu MRN (NIJMEGEN BREAKAGE SYNDROME 1)

NER – naprawa przez wycięcie nukleotydów (ang. nucleotide excision repair)

NHEJ – łączenie końców niehomologicznych (ang. non-homologous end joining)

PARP – polimeraza poli-ADP-rybozy (POLY-ADP-RIBOSE POLYMERASE)

PBS – buforowany roztwór soli fizjologicznej (ang. phosphate buffered saline)

PC-8 – plastochromanol-8 (ang. plastochromanol-8)

PCD – programowana śmierć komórki (ang. programmed cell death)

PCNA – jądrowy marker proliferującej komórki (PROLIFERATING CELL NUCLEAR ANTIGEN)

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

PDF – podjednostka fosfatazy białkowej 2A (PROTEIN PHOSPHATASE 2A SUBUNIT)

PHOT1 – fototropina 1 (PHOTOTROPIN 1)

PHOT2 – fototropina 2 (PHOTOTROPIN2)

PHR1 – fotoliza CPD (PHOTOREACTIVATING 1)

PHYA – fitochrom A (PHYTOCHROME A)

PHYB – fitochrom B (PHYTOCHROME B)

PMS1 – białko tworzące kompleks MUTL $\alpha$  (POSTMEIOTIC SEGREGATION1)

PMSF – fluorek fenylometylosulfonylu (ang. phenylmethylsulfonyl fluoride)

PUFA – wielonienasycone kwasy tłuszczowe (ang. polyunsaturated fatty acid)

PRR – czynniki transkrypcyjne (PSEUDO-RESPONSE REGULATOR)

PQ-9 – plastochinon-9 (ang. plastoquinone-9)

RAD23 – homologi drożdżowego RAD23 (RADIATION SENSITIVE 23)

RAD50 – homologi drożdżowego RAD50 (RADIATION SENSITIVE 50)

RAD51 – homologi drożdżowego RAD51 (RADIATION SENSITIVE 51)

RECA – homologi bakteryjnego RecA (RECA HOMOLOG)

RFC – białko kompleksu polimerazy DNA (REPLICATION FACTOR C)

RGS1 – regulator przekazu sygnału białek G (REGULATOR OF G-PROTEIN SIGNALING 1)

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

RPA – białko kompleksu polimerazy DNA (REPLICATION PROTEIN A)

rRNA – rybosomalny RNA (ang. ribosomal RNA)

RUP2 – represor receptora UV-B (REPRESSOR OF UV-B MORPHOGENESIS)

SA – kwas salicylowy (ang. salicylic acid)

SAND – białko z rodziny białek SAND (SAND *Protein Family Member*)

SNRK1 – kinaza białkowa (SUCROSE NONFERMENTING-1-RELATED KINASE)

SOD – dysmutaza ponadtlenkowa (SUPEROXIDE DYSMUTASE)

SSB – białko wiążące pojedynczą nić DNA (SINGLE STRAND BINDING)

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

SUC1 – podłoże B5 z dodatkiem 1% sacharozy

SUC3 – podłoże B5 z dodatkiem 3% sacharozy

SUS – syntaza sacharozy (SUCROSE SYNTHASE)

SUT – transporter sacharozy (SUCROSE TRANSPORTER)

T6P – 6-fosforan trehalozy (ang. trehalose-6-phosphate)

TC-NER – naprawa przez wycięcie nukleotydów sprzęgnięta z transkrypcją (ang. transcription coupled nucleotide excision repair)

TFIIH – czynnik transkrypcyjny II H (TRANSCRIPTION FACTOR II H)

TOC1 – białko związane z cyklem dobowym (TIMING OF CAB EXPRESSION 1)

TOR – kinaza białkowa (TARGET OF RAPAMYCIN)

TPS1 – syntaza 6-fosforanu trehalozy (TREHALOSE-6-PHOSPHATE SYNTHASE 1)

TT5 – izomeraza chalkonowa (TRANSPARENT TESTA 5; CHI)

UBC – enzym przyłączający ubikwitynę (UBIQUITIN-CONJUGATING ENZYME)

UV – promieniowanie ultrafioletowe (ang. ultraviolet)

UV-A – ultrafiolet A, 315-400 nm

UV-B – ultrafiolet B, 280-315 nm

UV-C – ultrafiolet C, 100-280 nm

UVH6 – białko uczestniczące w NER (ULTRAVIOLET HYPERSENSITIVE, AtXPD)

UVR3 – fotoliaza 6-4 PP (UV REPAIR DEFECTIVE 3)

UVR8 – receptor UV-B (UV-B RESISTANCE 8)

VTC1 – fosforylaza GDP-mannozy (VITAMIN C DEFECTIVE 1)

WNK8 – kinaza białkowa (WITH NO LYSINE (K) KINASE 8)

WT – dziki typ (ang. wild type)

XPB,C,D,F,G – białka uczestniczące w NER (XERODERMA PIGMENTOSUM GROUP B,C,D,F,G)

XRCC2,3 – homologi drożdżowego RAD50 (X-RAY REPAIR CROSS COMPLEMENTING)

XRCC4 – białko uczestniczące w NHEJ (X-RAY REPAIR CROSS COMPLEMENTING 4)

## Spis treści

1.	Wstęp.....	14
1.1.	Wpływ promieniowania ultrafioletowego na organizmy żywe .....	14
1.2.	Ochrona przed działaniem UV .....	17
1.2.1.	Unikanie UV .....	17
1.2.2.	Wewnątrzkomórkowe ruchy organelli .....	18
1.2.2.1.	Ruchy chloroplastów.....	18
1.2.2.1.1.	Ruchy jąder komórkowych .....	19
1.2.3.	Ochrona składników komórki: absorpcja UV .....	20
1.2.4.	Ochrona antyoksydacyjna .....	22
1.2.5.	Naprawa DNA.....	24
1.2.5.1.	Naprawa przez fotoreaktywację .....	24
1.2.5.2.	Mechanizmy naprawy DNA niezależne od światła .....	26
1.2.5.2.1.	Naprawa przez wycięcie zasad (BER) .....	26
1.2.5.2.2.	Naprawa przez wycięcie nukleotydów (NER) .....	27
1.2.5.2.3.	Naprawa pęknięć dwuniciowych .....	29
1.2.5.2.3.1.	Naprawa przez łączenie końców niehomologicznych (NHEJ) .....	30
1.2.5.2.3.2.	Naprawa przez rekombinację homologiczną (HR) .....	31
1.2.5.2.4.	Naprawa błędnie sparowanych zasad (MMR) .....	31
1.3.	Rola cukrów w rozwoju roślin .....	33
1.3.1.	Cukry jako cząsteczki sygnałowe .....	33
1.3.2.	Detekcja poziomu cukrów przez sensory energetyczne.....	35
1.4.	Regulacja kwitnienia u roślin.....	36
1.4.1.	Fotoperiodyzm w regulacji kwitnienia.....	36
1.4.1.1.	Rola CO i FT w regulacji kwitnienia .....	37
1.4.1.2.	Rola fotosyntezy w indukcji kwitnienia.....	39
1.5.	Rola sygnalizacyjna ultrafioletu w organizmach roślinnych .....	40
1.5.1.	Regulacja przez niespecyficzne sygnały pochodzące od UV-B .....	42
1.5.2.	Odpowiedź na reaktywne formy tlenu .....	43
1.5.3.	Odpowiedź na zranienie .....	43
1.5.4.	Specyficzna percepcja UV-B .....	44
1.5.4.1.	UVR8 – specyficzny fotoreceptor UV-B .....	45
2.	Cele pracy .....	47
3.	Materiały i metody .....	48
3.1.	Materiał roślinny .....	48
3.1.1.	Uzyskanie podwójnych mutantów <i>phot1phot2</i> .....	49

3.2.	Podłoża do hodowli <i>in vitro</i> .....	50
3.3.	Warunki hodowli roślin.....	50
3.4.	Naświetlanie UV .....	51
3.5.	Oświetlenie do badania zależnej od światła naprawy DNA.....	52
3.6.	Określenie wpływu cukrów w pożywce na wzrost i rozwój roślin po działaniu UV..	53
3.7.	Oznaczenie maksymalnej wydajności kwantowej fotosystemu II .....	53
3.8.	Analiza HPLC .....	53
3.9.	Pomiar poziomu uszkodzeń DNA i ich naprawy .....	54
3.10.	Określenie wpływu ustawienia chloroplastów i jąder komórkowych na poziom uszkodzeń DNA .....	54
3.11.	Izolacja jąder komórkowych .....	55
3.12.	Izolacja chloroplastów .....	56
3.13.	Izolacja DNA .....	56
3.14.	Pomiar ilości dimerów pirymidynowych w DNA za pomocą testu immunoenzymatycznego (ELISA).....	57
3.15.	Oznaczenie poziomu ekspresji genów .....	58
4.	Wyniki .....	61
4.1.	Wpływ cukrów dodanych do pożywki na wzrost i rozwój roślin naświetlanych UV.	61
4.2.	Wpływ cukrów na poziom barwników fotosyntetycznych .....	68
4.3.	Wpływ cukrów na wywołaną UV utratę sprawności fotosystemu II.....	71
4.4.	Wpływ cukrów na poziom chloroplastowych przeciwutleniaczy .....	73
4.5.	Wpływ cukrów na poziom związków polifenolowych .....	75
4.6.	Wpływ cukrów na ekspresję genów zaangażowanych w naprawę DNA.....	79
4.7.	Wpływ cukrów dodanych do pożywki na powstawanie uszkodzeń DNA wywoływanych UV.....	85
4.8.	Wpływ cukrów w pożywkach na naprawę uszkodzeń DNA .....	86
4.9.	Wpływ ruchów organelli na poziom uszkodzeń DNA wywołanych przez UV .....	88
5.	Dyskusja .....	90
5.1.	Cukry w podłożu wspomagają przeżywanie roślin narażonych na UV .....	90
5.1.1.	Cukry i mannitol w podłożu obniżają akumulację uszkodzeń DNA .....	90
5.1.2.	Wpływ cukrów w podłożu na poziom barwników fotosyntetycznych .....	91
5.1.3.	Wpływ cukrów w podłożu na produkcję chloroplastowych przeciwutleniaczy .	91
5.1.4.	Wpływ cukrów w podłożu na zawartość związków polifenolowych .....	92
5.2.	UV indukuje kwitnienie w roślinach rosnących na podłożu z sacharozą .....	94
5.2.1.	Rola UVR8 w regulacji kwitnienia .....	94
5.2.2.	Analiza poziomu ekspresji genów związanych z indukcją kwitnienia .....	95

5.3.	Wpływ stresu osmotycznego na wyniki doświadczeń .....	95
5.4.	Wpływ cukrów w podłożu na wywołane UV uszkodzenie fotosytemu II.....	96
5.4.1.	Wpływ stosowanej hodowli na $F_v/F_m$ .....	96
5.4.2.	Niskie dawki UV nieznacznie wpływają na $F_v/F_m$ .....	96
5.4.3.	Obecność substancji osmotycznie czynnych w podłożu pomaga chronić aparat fotosyntetyczny przed UV.....	97
5.5.	Wpływ cukrów w podłożu na naprawę DNA .....	97
5.5.1.	Ekspresja genów zaangażowanych w różne szlaki naprawy DNA.....	97
5.5.2.	Wpływ cukrów na fotoreaktywację i naprawę ciemnościową .....	100
5.6.	Udział ruchów organelli komórkowych w ochronie przed UV .....	101
5.7.	Podsumowanie .....	101
6.	Literatura .....	103
7.	Dodatek.....	124

## 1. Wstęp

### 1.1. Wpływ promieniowania ultrafioletowego na organizmy żywe

Promieniowanie ultrafioletowe (UV) to fale elektromagnetyczne o długościach mniejszych niż promieniowanie w zakresie widzialnym, zaś większych niż promieniowanie Roentgena. W związku z ich różnym oddziaływaniem na organizmy żywe przyjęto jego umowny podział na UV-A (315–400 nm), UV-B (280–315 nm) i UV-C (100–280 nm). Im mniejsza długość fali promieniowania tym większą niesie ono energię i potencjalnie może silniej oddziaływać z materią, jest również mniej przenikliwe. Wszystkie trzy rodzaje UV są składowymi widma emisji Słońca, jednak całość UV-C, większa część UV-B i niewielki procent UV-A są pochłaniane przez ziemską atmosferę (głównie ozon stratosferyczny). W rezultacie promieniowanie ultrafioletowe docierające do powierzchni ziemi składa się w większości z UV-A z niewielkim dodatkiem UV-B. Promieniowanie to jest absorbowane przez wszystkie rodzaje biomolekuł. Pochłonięta energia może prowadzić do uszkodzenia cząsteczek białek, kwasów nukleinowych czy lipidów.

Absorpcja UV przez DNA może prowadzić do oksydacji reszt pirymidynowych i powstania ich hydratów, a także do sieciowania sąsiadujących ze sobą cząsteczek DNA lub DNA i białek (Britt, 1999). Najczęściej powstającymi w wyniku bezpośredniego działania UV uszkodzeniami DNA są różnego typu dimery pirymidynowe. Pośród nich przeważają dimery cyklobutyłowe (ang. cyclobutane pyrimidine dimers; CPDs), stanowiące około 75% wszystkich dimerów i dimery pirymidyno[6-4]pirymidonowe, znane jako 6-4 fotoprodukty (ang. pyrimidine [6-4]pyrimidone dimers; 6-4 photoproducts; 6-4 PPs) (Britt, 1999).

Oba rodzaje dimerów mogą przyczyniać się do powstawania mutacji. Na przykład dimery zawierające cytydynę podczas replikacji stosunkowo łatwo są przekształcane w dwie tymidyny w procesie ominięcia dimeru (ang. dimer bypass), w którym dochodzi do wbudowania adeniny jako pary dla cytozyny (Thomas & Kunkel, 1993). Jednak przede wszystkim powodują one hamowanie transkrypcji i replikacji poprzez blokowanie postępu polimeraz i z tego powodu ich naprawa jest kluczowa dla prawidłowego funkcjonowania organizmu.

W cząsteczkach białek promieniowanie UV jest absorbowane głównie przez wiązania peptydowe oraz reszty aminokwasów aromatycznych: tryptofanu, tyrozyny i histydyny. Wiązania peptydowe absorbują w zakresie UV-C, natomiast dla reszt aromatycznych maksimum absorpcji znajduje się około 280 nm. Wzbudzone reszty aromatyczne mogą przekazać elektron na mostek disiarczkowy, co prowadzi do powstawania wolnych grup tiolowych, które następnie mogą utworzyć nowe wiązania prowadząc do zmiany konformacji i utraty funkcji białka. Wolne grupy tiolowe mogą również wchodzić w reakcje z innymi składnikami komórki, tworząc na przykład wiązania z kwasami nukleinowymi.

UV może również działać w sposób pośredni, powodując powstawanie reaktywnych form tlenu (ang. reactive oxygen species; ROS), które mają wysoką energię i są niebezpieczne dla żywych organizmów, ponieważ mogą prowadzić do uszkodzenia innych cząsteczek. ROS powstają naturalnie w aktywnej metabolicznie komórce, a ponieważ pełnią też funkcje sygnalizacyjne (Neill et al., 2002; Yan et al., 2007), istotna jest precyzyjna kontrola ich poziomu. Jednym z czynników stresowych, które mogą zaburzyć równowagę między wytwarzaniem i neutralizacją ROS jest UV. Może ono wzbudzać cząsteczki fotouczulaczy, takich jak chlorofile, które następnie przekazują energię np. cząsteczkom wody lub tlenu powodując powstanie ROS. Wykazano również wzrost ich poziomu w wyniku wywołanego przez UV-B zwiększenia aktywności oksydazy NADPH (Rao, Yang et al., 1996).

Najpowszechniej występującymi ROS są tlen singletowy, rodnik tlenowy, nadtlenuk wodoru i rodnik hydroksylowy (Sharma et al., 2012). Tlen singletowy jest głównym czynnikiem prowadzącym do utraty aktywności fotosystemu II (Krieger-Liszkay et al., 2008). Jest on wygaszany przez  $\beta$ -karoten i  $\alpha$ - tokoferol, w przeciwnym razie może prowadzić do uszkodzenia białka D1, znajdującego się w centrum fotosystemu II (Krieger-Liszkay, 2005). Zmniejszona asymilacja CO<sub>2</sub> spowodowana uszkodzeniem aparatu fotosyntetycznego przez UV-B również prowadzi do nadmiernej produkcji ROS (Asada, 2006; Sharma et al., 2012).

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> w wysokim stężeniu może utleniać łańcuchy boczne metioniny, a także cysteiny, w efekcie prowadząc do inaktywacji enzymów zawierających w centrum reakcji grupy tiolowe, np. enzymów cyklu Calvina, czy dysmutaz ponadtlenkowych (ang. superoxide dismutase; SOD) (Halliwell & Gutteridge, 1999). Rodnik tlenowy powoduje

nieodwracalne utlenianie centrów żelazowo-siarkowych i inaktywację zawierających je enzymów (Gardner & Fridovich, 1991). Jednak zarówno rodnik tlenowy jak i  $H_2O_2$  są stosunkowo mało reaktywnymi ROS. Ich powstanie jest niebezpieczne głównie z powodu przekształcania ich w rodnik hydroksylowy w katalizowanej jonami żelaza ureakcji Habera-Weissa (Rigo et al., 1977). Rodnik ten jest najbardziej reaktywnym spośród ROS, reaguje ze wszystkimi biomolekułami, powodując uszkodzenia białek, peroksydację lipidów i w konsekwencji zwiększenie płynności i przepuszczalności błon lipidowych, co zaburza ich funkcję (Sharma et al., 2012). W białkach, oprócz wymienionych wcześniej uszkodzeń centrów aktywnych, ROS mogą powodować modyfikacje łańcuchów bocznych aminokwasów, prowadząc np. do ich nitrozylacji, karbonylacji czy oksydacji (Pisoschi & Pop, 2015).

ROS w dużym stopniu przyczyniają się do powstawania uszkodzeń DNA (Imlay & Linn, 1988). Zarówno reszty cukrowe jak i zasady azotowe są podatne na utlenianie przez ROS. W przypadku zasad zwykle jest to addycja rodnikowa  $\bullet OH$  do wiązania podwójnego. Do najczęściej obserwowanych produktów należą: 8-hydroksyguanina, 7-hydro-8-hydroksyguanina, 5-hydroksycytozyna, 5-hydroksyuracyl, hipoksantyna, 8-hydroksyadenina i 3-metyloadenina (Evans et al., 2004). Tlen singletowy reaguje wyłącznie z guaniną, a nadtlenuk wodoru i rodnik tlenowy nie reagują bezpośrednio z zasadami w DNA (Halliwell & Aruoma, 1991). Uszkodzenie reszt cukrowych polega głównie na oderwaniu przez rodnik hydroksylowy protonu w pozycji C4' deoksyrybozy, w wyniku którego powstaje rodnik deoksyrybozowy. Ulega on dalszym reakcjom, w wyniku których może dojść do uwolnienia reszty fosforanowej i jednoniciowego pęknięcia cząsteczki DNA z powstaniem zmodyfikowanych reszt cukrowych na końcu 3' lub 5' (Evans et al., 2004). ROS mogą również powodować uszkodzenia w DNA pośrednio, przez działanie produktów powstałych w reakcji z innymi cząsteczkami, na przykład lipidami.

Przy wysokim poziomie ROS następuje zaburzająca funkcjonowanie komórek peroksydacja lipidów w błonach komórkowych i błonach organelli. Dodatkowo w jej wyniku powstają nowe rodniki lipidowe, które mogą dalej uszkadzać białka i DNA. Wzrost peroksydacji lipidów stwierdzono u roślin rosnących w różnych warunkach stresowych, na przykład podczas suszy (Sharma & Dubey, 2005), stresu solnego (Tanou et al., 2009), w obecności metali ciężkich (Mishra et al., 2011), lub pod wpływem



UV-B (Han et al., 2009). W lipidach na uszkodzenie przez ROS narażone są wiązania estrowe między kwasem tłuszczowym i glicerolem i wiązania nienasycone, szczególnie w wielonienasyconych kwasach tłuszczowych (ang. polyunsaturated fatty acids; PUFA) (Sharma et al., 2012). Pojedynczy rodnik hydroksylowy lub tlenowy może prowadzić do uszkodzenia wielu PUFA, ponieważ uruchamia łańcuchową reakcję rodnikową. W jej fazie propagacji z kolejnych cząsteczek lipidów tworzone są rodniki lipidowe, rodniki nadtlenkowe i hydroksynadtlenki lipidów. Reakcja ta może być zatrzymana przez komórkowe przeciwutleniacze, na przykład tokoferole (Nogala-Kałucka et al., 2007), albo w enzymatycznej reakcji, na przykład utlenienia glutationu przez peroksydazę (Sharma et al., 2012).

## **1.2. Ochrona przed działaniem UV**

Większość organizmów żywych jest narażonych na promieniowanie ultrafioletowe emitowane przez słońce. Wyjątkami są te, które całe życie spędzają bez dostępu do światła słonecznego, na przykład w głębinach morskich czy jaskiniach. Można zasadniczo wyróżnić trzy poziomy ochrony przed jego szkodliwym działaniem. Pierwszym jest ucieczka lub unikanie promieniowania. Drugi to wytwarzanie ochronnych barwników pochłaniających UV. Trzeci polega na naprawie powstałych uszkodzeń.

### **1.2.1. Unikanie UV**

Zwierzęta mogą łatwo unikać ekspozycji na UV prowadząc nocny tryb życia lub ukrywając się w środku dnia, kiedy ze względu na największy kąt padania promieni słonecznych na ziemię i tym samym krótszą drogę pokonywaną przez promieniowanie w atmosferze, jego poziom jest najwyższy. Poza niewielką grupą heterotrofów, rośliny będąc uzależnione od światła nie mogą całkowicie uniknąć ekspozycji na UV, które w naturze zawsze towarzyszy światłu widzialnemu. W ich przypadku mechanizm ucieczki może obejmować ruchy całych organów. Na przykład eukaliptusy zmieniają ułożenie liści w godzinach największego nasłonecznienia. Błazka liściowa jest wówczas ułożona równoległe do kierunku padania promieni słonecznych, co minimalizuje absorpcję promieniowania.

## 1.2.2. Wewnątrzkomórkowe ruchy organelli

### 1.2.2.1. Ruchy chloroplastów

Zależne od natężenia światła kierunkowe ruchy chloroplastów znane są od ponad stulecia (Senn, 1908). Zostały opisane u glonów, mszaków, paprotników oraz roślin nasiennych. U glonów i roślin niższych ruchy chloroplastów mogą być kontrolowane przez światło niebieskie lub czerwone, jednak u roślin wyższych reakcja ta aktywowana jest wyłącznie przez światło niebieskie. W słabym świetle chloroplasty układają się przy ścianach komórkowych prostopadłych do kierunku padania promieni słonecznych, przyjmując tzw. pozycję płaską (ang. face position). Takie przemieszczenie chloroplastów nazwano reakcją akumulacji. Zwiększa ona absorpcję światła przez chloroplasty w warunkach słabego oświetlenia służąc maksymalizacji fotosyntezy i uważa się, że jest to główna funkcja tej reakcji (Zurzycki, 1955). W silnym świetle z kolei obserwuje się reakcję ucieczki, w której chloroplasty ustawiają się przy ścianach komórkowych równoległych do kierunku padania światła, w tzw. pozycji profilowej (ang. profile position). Badania z użyciem mutantów ruchowych pozwoliły na udowodnienie, że takie ustawienie ma na celu ochronę aparatu fotosyntetycznego przed nadmiernym naświetleniem, mogącym prowadzić do powstawania reaktywnych form tlenu oraz uszkodzenia barwników fotosyntetycznych i białek (Kasahara et al., 2002; Sztatelman et al., 2010). Za ruchy chloroplastów sterowane światłem niebieskim odpowiadają fotoreceptory światła niebieskiego – fototropiny. U *Arabidopsis* odkryto dwa takie białka, nazwane fototropiną 1 (phototropin 1; phot1) (Liscum i Briggs, 1995) i fototropiną 2 (phototropin 2; phot2) (Jarillo et al., 2001; Kagawa et al., 2001). Różnią się one wrażliwością na światło i, oprócz ruchów chloroplastów, pośredniczą m. in. w otwieraniu aparatów szparkowych (Kinoshita et al., 2001) i fototropizmie (Sakai et al., 2001). Oba te receptory współdziałają w regulacji reakcji akumulacji chloroplastów w słabym świetle niebieskim ( $2-4 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , 470 nm). Fototropina 1 jest bardziej wrażliwa na światło i wywołuje reakcję akumulacji już od ok.  $0,4 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  (Sakai et al., 2001). W konsekwencji chloroplasty mutantu *phot1* nie przeprowadzają reakcji akumulacji poniżej ok.  $2 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  światła niebieskiego, inaczej niż dziki typ. Za reakcję ucieczki w silnym świetle niebieskim (od ok.  $16 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , 470 nm) odpowiada wyłącznie fototropina 2 (Jarillo et al., 2001; Sakai et al., 2001). W mutancie *phot2* obserwuje się akumulację chloroplastów, jednak nie są one zdolne do reakcji

ucieczki. Przeciwnie, w silnym świetle niebieskim chloroplasty roślin pozbawionych *phot2* również przyjmują pozycję płaską, w wyniku reakcji kontrolowanej przez *phot1* (Jarillo et al., 2001; Kagawa et al., 2001). W podwójnych mutantach *phot1phot2*, niezależnie od intensywności światła, nie obserwuje się kierunkowych ruchów chloroplastów. Podobny fenotyp obserwuje się również w mutancie *chup1* (ang. *chloroplast unusual positioning 1*). Białko CHUP1 znajduje się w zewnętrznej otoczce chloroplastu i jest niezbędne do polimeryzacji krótkich chloroplastowych filamentów aktynowych (ang. cp-actin filaments), umożliwiającej kierunkowy ruch. Chloroplasty w mutantach *chup1* znajdują się w dolnej części komórki niezależnie od warunków świetlnych (Kasahara et al., 2002). W roślinach dzikiego typu chloroplasty przyjmują podobną pozycję po adaptacji do ciemności, migrując powoli do niższej części ścian peryklinalnych lub ściany antyklinalnej. Fizjologiczna funkcja tego mechanizmu nie została dotychczas wyjaśniona. Porównując rozmieszczenie chloroplastów w mutancie *phot2* i dzikim typie *A. thaliana* stwierdzono, że ich położenie ciemnościowe jest kontrolowane przez *phot2* (Suetsugu et al., 2005).

#### **1.2.2.1.1. Ruchy jąder komórkowych**

U roślin, oprócz kierunkowych ruchów chloroplastów, odkryto również zależną od światła niebieskiego ucieczkę jąder komórkowych. Po raz pierwszy opisano ją u *Adiantum capillus-veneri* (Kagawa & Wada 1993), później została stwierdzona również u *Arabidopsis thaliana* (Iwabuchi et al., 2007). Reakcja ta zachodzi w silnym świetle niebieskim i jest sterowana wyłącznie przez fototropinę 2 (Iwabuchi et al., 2007; Iwabuchi et al., 2010). Ucieczka jąder komórkowych zależna jest także od ruchu chloroplastów, ponieważ jądra poruszają się w kierunku ścian peryklinalnych ciągnięte przez połączone z nimi za pomocą filamentów aktynowych plastydy. W roślinach nie wykazujących ruchów chloroplastów (np. w mutancie *chup1*) lub w komórkach pozbawionych chloroplastów reakcja ucieczki jąder nie zachodzi (Higa et al. 2014).

Reakcja ucieczki jąder chroni genom jądrowy przed uszkodzeniami wywołwanymi przez UV. Zostało udowodnione, że rośliny traktowane UV akumulowały mniej uszkodzeń w jądrach komórkowych jeśli wcześniej były naświetlone silnym światłem niebieskim, niż gdy były adaptowane do ciemności (Iwabuchi et al., 2016). Idąc tym tropem można sądzić, że również sam ruch chloroplastów, oprócz działania

fotoprotekcyjnego dla aparatu fotosyntetycznego może dodatkowo służyć ochronie genomu chloroplastowego przed uszkodzeniami wywołwanymi UV.

### 1.2.3. Ochrona składników komórki: absorpcja UV

Promieniowanie UV absorbowane jest przez większość komponentów żywych komórek. Istotnym sposobem ochrony szczególnie istotnych i narażonych na działanie UV składników komórki jest pochłanianie tego promieniowania przez inne cząsteczki. W tym celu organizmy żywe produkują związki silnie absorbujące w zakresie UV, takie jak na przykład melanina u człowieka. Rośliny produkują wiele metabolitów wtórnych, zdolnych do absorpcji UV. W efekcie około 85–95% tego promieniowania jest absorbowane przez liść, pozostała część ulega transmisji (Gausman et al. 1975; Robberecht and Caldwell 1978). Barwniki, takie jak flawonoidy (flawonole, izoflawonoidy, flawony i antocyjany), a także estry kwasu synapinowego lub innych kwasów hydroksycynamonowych (HCAs, hydroxycinnamic acids), są cząsteczkami pochłaniającymi UV-B (Robberecht and Caldwell 1978; Koes et al. 1994; Dixon and Paiva 1995; Bieza and Lois 2001; Winkel-Shirley 2002; Schmitz-Hoerner & Weissenböck, 2003). W szczególności flawonole i kwasy hydroksycynamonowe są uważane za ważne z punktu widzenia ochrony wskutek pochłaniania UV-B. Silnie absorbują fale w tym zakresie, a ich ilość w warstwie epidermalnej rośnie znacząco po zadziałaniu UV (Tevini et al., 1991; Olsson et al., 1998). W badaniach prowadzonych na kukurydzy wykazano podwyższony poziom uszkodzeń DNA po naświetlaniu UV w mutantach szlaku syntezy flawonoidów w porównaniu z roślinami dzikiego typu (Stapleton & Walbot, 1994). W doświadczeniu z mutantami *A. thaliana* niezdolnymi do syntezy flawonoidów, *tt5* (*transparent testa 5; chi*) albo estrów kwasu synapinowego, *fah* (*ferulic acid hydroxylase 1*) wykazano, że mutacje obu tych genów powodują zwiększoną wrażliwość roślin na UV-B. Pomimo akumulacji flawonoidów, mutant *fah* wykazywał silniejsze zahamowanie wzrostu, a także najwyższe poziomy produktów oksydacji lipidów i białek, w porównaniu nie tylko z WT ale też z *tt5*. Wskazuje to na istotniejszą rolę estrów kwasu synapinowego niż flawonoidów w ochronie przed UV (Landry et al., 1995). Stosunek ilości flawonoidów do kwasów hydroksycynamonowych wzrasta znacznie po ekspozycji roślin na UV-B albo silne światło słoneczne (Burchard et al., 2000; Agati et al., 2002; Kotilainen et al., 2008).

Dihydroksy-flawonole, takie jak kwercetyna, są właściwie nieobecne w liściach roślin rosnących w cieniu. Inne flawonoidy i kwasy hydroksycynamonowe są stale obecne w wyższych stężeniach niż flawonole i znajdują się głównie w epidermie. Ich stężenia w komórkach epidermy są rzędu milimolowych, co jest wystarczające żeby efektywnie pochłaniać promieniowanie UV-B (Edwards et al., 2008).

Wykazano, że w roślinach naświetlanych UV-B zwiększona jest produkcja flawonoidów *orto*-dihydroksylowanych przy pierścieniu B, w porównaniu z monohydroksylowanymi (na przykład kwercetyny w stosunku do kemferolu) (Ryan et al., 1998; Markham et al., 1998; Olsson et al., 1998). Absorpcja UV-B przez te związki jest podobna, nieznacznie spada ze wzrostem ilości grup hydroksylowych (Lavola et al., 1997). Postulowano, że zwiększona akumulacja *orto*-dihydroksylowanych flawonoidów może wynikać z ich większej zdolności do nieszkodliwego rozproszenia pochłanianej energii (Smith & Markham 1998) lub wyższej efektywności jako zmiataczy wolnych rodników i przeciwutleniaczy (Landry et al., 1995; Montesinos et al., 1995; Lillo et al., 2008; Agati et al., 2009). Wielu badaczy uważa, że główną rolą flawonoidów jest ochrona antyoksydacyjna, a nie pochłanianie promieniowania UV (Agati et al., 2012; Hernández et al., 2012).

Flawonoidy są obecne w wakuolach i ścianach komórkowych komórek epidermy, trichomach (Wollenweber & Dietz, 1981; Strack et al., 1988; Hutzler et al., 1998; Tattini et al., 2007), ale także w wakuolach komórek mezofilu (Kytridis & Manetas, 2006; Agati et al., 2009) i chloroplastach (Saunders & McClure, 1976; Takahama, 1982; Agati et al., 2007). Po odkryciu jądrowej lokalizacji ortodihydroksylowanych flawonoidów, zaproponowano ich udział w ochronie antyoksydacyjnej jądrowego DNA (Feucht et al., 2004; Polster et al., 2006).

W *Arabidopsis thaliana* zidentyfikowano już co najmniej 54 różne flawonoidy, w tym 35 glikozydów flawonoli, 11 antocyjanów i 8 proantocyjanidyn (Saito et al., 2013). Dla antocyjanów najczęstszym aglikonem jest cyjanidyna, a dla proantocyjanidyn – epikatechina. Głównymi flawonolami są kemferol, kwercetyna i izoramnetyna. Większość z nich jest glikozylowana resztami glukozy lub ramnozy, i dodatkowo metylowana (Saito et al., 2013).

Flawonoidy, których poziom biosyntezy rośnie pod wpływem UV-B, mogą zmniejszać ilość uszkodzeń oksydacyjnych powodowanych przez to promieniowanie, a także ograniczać ilość powstających ROS poprzez zmniejszanie ilości UV-B docierającego w głąb tkanek roślinnych (Kytridis & Manetas, 2006; Kotilainen et al., 2008; Owens et al., 2008; Agati et al., 2009).

W silnym świetle (na poziomie maksymalnego nasłonecznienia w letni dzień w umiarkowanym klimacie) w różnych roślinach znacząco wzrasta stosunek ilości glikozydów kwercetyny i luteoliny (będących wydajnymi antyoksydantami) do ilości glikozydów kemferolu i apigeniny (słabych antyoksydantów) (Ryan et al., 1998; Markham et al., 1998; Ryan et al., 2001; Tattini et al., 2004). Rola fotoprotekcyjna flawonoidów nie może być związana z pochłanianiem światła widzialnego, jako że ich absorpcja powyżej 420 nm jest znikoma (Agati et al., 2009).

Niektórzy badacze sądzą, że główną rolą flawonoidów jest ochrona antyoksydacyjna, a nie pochłanianie szkodliwego promieniowania. Wskazywać na to mógłby fakt, że zmiany komórkowego stanu redoks aktywują biosyntezę flawonoidów, szczególnie flawonoli (Taylor & Grotewold, 2005). Biosynteza flawonoli jest kontrolowana przez czynniki transkrypcyjne MYB, które z kolei są regulowane przez potencjał redoks komórki (Heine et al., 2004; Dubos et al., 2010; Falcone Ferreyra et al., 2010). W roślinach z wyższym wyjściowym poziomem flawonoli wzrost aktywności enzymów antyoksydacyjnych po naświetlaniu UV-B jest mniejszy, co zaobserwowano porównując mutanty szlaku syntezy flawonoli i dziki typ *Arabidopsis* (Landry et al., 1995) oraz odmiany soi w różnym stopniu akumulujące flawonole (Xu et al., 2008). Z kolei podwyższona akumulacja dihydroksyflawonoidów w porównaniu z monohydroksyflawonoidami w odpowiedzi na silne światło może służyć ochronie przed uszkodzeniami fotooksydacyjnymi. Flawonoidy mogą dodatkowo chronić przed powstawaniem ROS przez chelatowanie jonów metali, szczególnie żelaza i miedzi (Brown et al., 1998; Melidou et al., 2005; Smyk et al., 2008; Mladěnka et al., 2010).

#### **1.2.4. Ochrona antyoksydacyjna**

Jak wspomniano wcześniej, UV jest również jednym z czynników powodujących powstawanie nadmiaru ROS. System ochrony antyoksydacyjnej nie jest specyficzny względem UV, ale uczestniczy również w ochronie przed skutkami działania tego

czynnika. U roślin system ten jest złożony z enzymów i przeciwutleniaczy nieenzymatycznych (Sharma et al., 2012). Do enzymatycznych antyoksydantów należą dysmutazy ponadtlenkowe (SOD), katalaza (CAT) oraz enzymy cyklu askorbinianowo-glutationowego: peroksydaza askorbinianu (APX), peroksydaza glutationu (GPX), reduktaza monodehydroaskorbinianu (MDHAR), reduktaza dehydroaskorbinianu (DHAR) i reduktaza glutationu (GR) (Noctor & Foyer, 1998). Do nieenzymatycznych przeciwutleniaczy zaliczają się: askorbinian, glutation, karotenoidy, tokoferole oraz związki fenolowe (Sharma et al., 2012).

Askorbinian odpowiada za ochronę błon w komórce poprzez bezpośrednie reagowanie z rodnikiem tlenowym i nadtlenkiem wodoru. Poza tym chroni centra aktywne enzymów zawierające jony metali przejściowych (Noctor & Foyer, 1998). Glutation może chemicznie reagować z rodnikami tlenowym i hydroksylowym oraz nadtlenkiem wodoru, w ten sposób bezpośrednio usuwając ROS. Poza tym może chronić makromolekuły albo przez glutationylację, czyli tworzenie adduktów z reaktywnymi elektrofilami albo jako donor elektronu i protonu, w wyniku czego powstaje utleniona forma glutationu (Chew et al., 2003). Tokoferole to grupa lipofilowych przeciwutleniaczy, występujących w chloroplastach. Są one zaangażowane w pochłanianie rodników tlenowych i peroksy lipidowych oraz tlenu singletowego (Diplock et al., 1989). Aktywność tokoferoli jako przeciwutleniaczy zależy od ilości grup metylowych przy pierścieniu fenolowym polarnej części, więc ich uszeregowanie w kolejności od najsilniejszego do najslabszego przeciwutleniacza wygląda następująco: tokoferol  $\alpha > \beta > \gamma > \delta$  (Fukuzawa et al., 1982; Kamal-Eldin & Appelqvist, 1996). Ich działanie polega na chemicznym reagowaniu z tlenem singletowym w chloroplastach lub jego fizycznym wygaszaniu (Ivanov & Khorobrykh, 2003). Tokoferole przeciwdziałają propagacji łańcuchowej reakcji autooksydacji lipidów, dzięki czemu są wydajnym wygaszaczem rodników. Zarówno pierścień jak i nienasycony ogon fitylowy tokoferolu działają jako przeciwutleniacze wchodząc w reakcje redoks z tlenem singletowym (Halliwell & Gutteridge, 1999; Fryer, 1992). Wygaszanie tlenu singletowego przez tokoferole jest wysoce wydajne. Szacuje się, że pojedyncza cząsteczka  $\alpha$ -tokoferolu może zneutralizować nawet 220 cząsteczek tlenu singletowego zanim zostanie zdegradowana (Fukuzawa et al., 1982). Za regenerację tokoferolu z rodnika tokoferylowego odpowiedzialne są askorbinian i glutation (Fryer, 1992) a także koenzym Q (Kagan et al., 2000). Karotenoidy również należą do grupy

przeciwutleniaczy lipofilowych (Young, 1991). Mogą wygaszać bezpośrednio tlen singletowy, albo przeciwdziałać jego tworzeniu przez wygaszanie wzbudzonych cząsteczek chlorofilu. Poliizoprenowy ogon karotenoidów zawiera liczne wiązania nienasycone, co umożliwia przejmowanie energii wzbudzonych cząsteczek i rozproszenie jej w postaci ciepła (Mittler, 2002).

### **1.2.5. Naprawa DNA**

Jeżeli, pomimo działania opisanych wyżej mechanizmów ochronnych, dojdzie do uszkodzenia biomolekuł przez promieniowanie UV, większość z nich jest syntetyzowana na nowo. Inaczej jest w przypadku DNA, którego synteza zachodzi na matrycy już istniejącej cząsteczki. Uszkodzenie DNA, na przykład modyfikacja zasad azotowych, może powodować błędy podczas replikacji, których wynikiem są mutacje. Pojawienie się większych uszkodzeń, jak dimery pirymidynowe, skutkuje blokowaniem polimeraz, uniemożliwiając zarówno replikację jak i transkrypcję. Z tego powodu kluczowa dla prawidłowego funkcjonowania żywych organizmów jest naprawa uszkodzeń DNA. Ze względu na rodzaj usuwanych uszkodzeń i sposób działania mechanizmy naprawy DNA dzieli się na fotoreaktywację, naprawę przez wycięcie, naprawę błędnie sparowanych nukleotydów i naprawę pęknięć dwuniciowych.

#### **1.2.5.1. Naprawa przez fotoreaktywację**

Fotoreaktywacja jest jedynym mechanizmem naprawy DNA zależnym od światła i jedynym bezpośrednio odwracającym indukowaną przez UV reakcję powstania dimerów pirymidynowych. Zachodzi ona przy udziale fotoliaz. Są to enzymy specyficznie rozpoznające konkretny typ dimeru i naprawiające je z wykorzystaniem energii światła w zakresie dalekiego niebieskiego i bliskiego UV-A (ok. 360–420 nm). Fotoliazы posiadają dwa kofaktory: zbierający światło i katalityczny. Pierwszy różni się w zależności od enzymu, może nim być 5,10-metylenotetrahydrofolian (5,10-methenyltetrahydrofolate, MTHF; Johnson et al., 1988), 8-hydrokso-5-deazaryboflawina (8-hydroxy-5-deazariboflavin, 8-HDF; Eker et al., 1990) albo mononukleotyd flawinowy (flavin mononucleotide, FMN; Ueda et al., 2005). Rolą kofaktora zbierającego światło jest absorpcja energii i przekazanie jej na kofaktor katalityczny, którym we wszystkich dotychczas zbadanych fotoliazach jest deprotonowany, zredukowany dinukleotyd flawinoadeninowy (FADH<sup>-</sup>). Dzięki



przekazaniu wzbudzonego elektronu, FADH<sup>-</sup> służy jako katalizator rozszczepienia wiązania pomiędzy sąsiadującymi resztami pirymidynowymi, po którym elektron wraca na FADH. Od kofaktora zbierającego światło zależą właściwości spektralne enzymu. Fotolizy zawierające MTHF mają maksimum absorpcji około 384 nm, a te które zawierają 8-HDF – przy 438 nm (Sancar, 1994). Dzięki prostemu odwróceniu reakcji prowadzącej do uszkodzenia przez UV naprawa dimerów pirymidynowych przez fotolizy jest bardzo wydajna i wolna od błędów, które mogą się pojawić przy innych typach naprawy. Głównym ograniczeniem fotoreaktywacji jest specyficzność każdej fotolizy względem tylko jednego typu uszkodzeń: CPD lub 6-4 PP. W ich naprawie są jednak tak skuteczne, że na przykład u *Arabidopsis* są one głównymi enzymami naprawiającymi oba typy dimerów pirymidynowych (Chen et al., 1994; Pang & Hays, 1991).

Odkryte dotychczas fotolizy specyficzne względem CPD na podstawie stopnia homologii podzielono na dwie klasy. Klasa I występuje u bakterii oraz drożdży. Przedstawicielei klasy II znaleziono u zwierząt, w tym ssaków z podgromady torbaczy (ale nie u ssaków łożyskowych), niektórych *Archaea*, bakterii oraz roślin. Fotolizy naprawiające 6-4 fotoprodukty są bliżej spokrewnione z fotolizami CPD klasy I. Ich homologi, których funkcji enzymatycznej nie stwierdzono, występują również u ssaków łożyskowych, w tym ludzi. U *Arabidopsis* scharakteryzowano dotychczas fotolizę specyficzną wobec CPD, PHOTOREACTIVATING 1 (PHR1)/UV REPAIR DEFECTIVE 2 (UVR2) oraz 6-4 PP – UV REPAIR DEFECTIVE 3 (UVR3). Białko CRY3 (CRYPTOCHROME 3) ma aktywność fotolizy CPD w jednoniciowym DNA (ang. single-stranded DNA; ssDNA) (Selby & Sancar, 2006). Wykazano, że CRY3 rozpoznaje i naprawia również CPD w dwuniciowym DNA, jeżeli znajdują się one w strukturach jednoniciowej pętli (Pokorny et al., 2008). Dwa białka w wysokim stopniu homologiczne do fotoliaz klasy I – CRY1 i CRY2 (CRYPTOCHROME 1 i 2) pełnią w *Arabidopsis* funkcję fotoreceptorów światła niebieskiego.

PHR1 jest kodowana przez gen w locus *At1g12370*. Została ona odkryta pod koniec zeszłego stulecia dzięki wysokiej homologii z konserwatywnym regionem genów zwierzęcych fotoliaz (Ahmad et al., 1997). Udowodniono również komplementację przez PHR1 aktywności fotolizy CPD w szczepie *E. coli* pozbawionym własnych fotoliaz (Ahmad et al., 1997). Równocześnie inna grupa zidentyfikowała to locus jako

odpowiedzialne za nadwrażliwość na UV mutantów uzyskanych w wyniku chemicznej mutagenyzy (Jiang et al. 1997). Na podstawie homologii sekwencji została ona sklasyfikowana jako fotoliza typu II. W eksperymencie z użyciem PHR1 połączonej z białkiem zielonej fluorescencji (Green Fluorescent Protein, GFP) wykazano, że jest ona zlokalizowana wyłącznie w jądrze komórkowym (Kaiser et al., 2009).

Gen *UVR3* kodujący fotolizę 6-4 PP *Arabidopsis*, został odkryty w tym samym eksperymencie, który doprowadził do zidentyfikowania PHR1 jako fotolizy CPD (Jiang et al. 1997). Zaobserwowano, że mutanty *uvr3* nie naprawiają 6-4 PP, przy pełni funkcjonalnej naprawie CPD. Podobnie, w *phr1* nie zachodzi naprawa CPD, ale nie ma różnicy w naprawie drugiego typu fotoproduktów. Dzięki temu udowodniono specyficzność substratów tych dwóch fotoliaz. Obecnie wiadomo, że białko UVR3 jest zlokalizowane we wszystkich organellach zawierających DNA – w jądrach, mitochondriach i chloroplastach (Banaś et al., 2017). Potwierdzono też bardzo wydajną zależną od światła naprawę DNA w jądrach i chloroplastach mutantów z nadekspresją AtUVR3:GFP (Zgłobicki i Banaś, nieopublikowane wyniki). Ekspresja *UVR3* jest obniżana przez światło w sposób zależny od fotosyntezy (Banaś et al., 2017), a rośnie pod wpływem UV-B (Jiang et al., 2009; Banaś et al., 2017).

#### **1.2.5.2. Mechanizmy naprawy DNA niezależne od światła**

Z wyjątkiem fotoreaktywacji wszystkie mechanizmy naprawy DNA są niezależne od światła. Należy do nich naprawa przez wycięcie zasad (ang. base excision repair, BER) lub nukleotydów (ang. nucleotide excision repair, NER), naprawa błędnie dopasowanych nukleotydów (ang. mismatch repair, MMR) oraz naprawa pęknięć dwuniciowych (ang. double strand breaks, DSB) – rekombinacja homologiczna (ang. homologous recombination, HR) i łączenie końców niehomologicznych (ang. non-homologous end joining, NHEJ).

##### **1.2.5.2.1. Naprawa przez wycięcie zasad (BER)**

Naprawa przez wycięcie zasad służy do usuwania niewielkich modyfikacji w obrębie pojedynczej zasady azotowej. Są to najczęściej deaminacja, oksydacja albo alkilacja. (Barnes & Lindahl, 2004; Fortini & Dogliotti, 2007). BER jest odpowiedzialna za naprawę m.in.: 8-oksoguaniny, 3-metyloadeniny, 7-metyloguaniny, hipoksantyny, ksantyny oraz powstałego przez deaminację cytozyny uracylu. BER rozpoczyna się od

usunięcia zmodyfikowanej zasady poprzez hydrolizę wiązania N-glikozydowego przez glikozylazę, w wyniku czego powstaje miejsce apurynowe lub apirymidynowe (miejsce AP). Glikozylazy DNA mają specyficzność względem określonych rodzajów uszkodzeń. Niektóre są dwufunkcyjne i dodatkowo mają aktywność liazy, przecinającej wiązanie fosfodiesterowe w miejscu AP z wytworzeniem grupy 3' fosfoaldehydowej  $\alpha/\beta$ -nienasyconej (3'phospho  $\alpha/\beta$ -unsaturated aldehyde, 3'PUA), a na końcu 5' wolnej reszty fosforanowej. Po zadziałaniu glikozylazy, endonukleaza AP wycina miejsce AP, a w powstałej luce polimeraza DNA wbudowuje pojedynczy nukleotyd (single nucleotide BER, SN-BER) lub 2-10-nukleotydowy fragment (long-patch repair, LP-BER), zastępujący kolejne nukleotydy w kierunku 3'. Naprawę kończy ligacja nowo wprowadzonego nukleotydu (lub ostatniego z nukleotydów dłuższego fragmentu) z końcem 5' naprawianej nici DNA.

*Arabidopsis* posiada trzy potencjalne endonukleazy AP, z których jedna (APE2, kodowana przez *At4g36050*) jest homologiczna z ludzką APE2, a dwie pozostałe (APE1L i ARP) – z ludzką APE1. Używając ekstraktów białkowych z frakcji jądrowej *Arabidopsis* dzikiego typu i mutantu *arp* w eksperymencie *in vitro* wykazano, że głównym białkiem o aktywności endonukleazy AP jest ARP – Apurinic Endonuclease-Redox Protein (Cordoba-Canero et al., 2011). Inna grupa badaczy wykazała z kolei, że aktywność przynajmniej jednej z pozostałych endonukleaz: APE1L lub APE2, jest konieczna do zajścia embriogenezy w *Arabidopsis* i nie może być zastąpiona przez ARP (Murphy et al., 2009).

#### **1.2.5.2.2. Naprawa przez wycięcie nukleotydów (NER)**

Naprawa przez wycięcie nukleotydów służy do usuwania dużych uszkodzeń zaburzających helisę DNA, w tym uszkodzeń powstających w wyniku działania UV dimerów pirymidynowych. W roślinach można znaleźć homologi białek naprawczych ze szlaku NER charakterystycznych zarówno dla innych *Eukaryota*, jak i *Prokaryota*. Białka uczestniczące w szlaku NER u roślin wykazują wyższą homologię sekwencji aminokwasowej z białkami zwierzęcymi, drożdżowymi i bakteryjnymi, niż białka uczestniczące w innych szlakach naprawczych (Singh et al., 2010).

Ze względu na mechanizm rozpoznania uszkodzenia wyróżnia się dwa podtypy NER, jednak w obu przypadkach te same białka służą naprawie DNA.

Pierwszy z nich to naprawa połączona z transkrypcją (ang. transcription-coupled; TC-NER), która służy usuwaniu uszkodzeń powstałych w obrębie genów ulegających aktywnej transkrypcji (Conconi et al., 2002). Jest ona aktywowana w przypadku zatrzymania polimerazy RNA podczas transkrypcji i rozpoczyna się przyłączeniem białek CSA i CSB (COCKAYNE SYNDROME A i B) do miejsca uszkodzenia. CSB oddziałuje z kompleksem CSA-DDB1-CUL4 (DAMAGED DNA BINDING PROTEIN 1; CULLIN 4) (Shuck et al., 2008), regulującym jego ubikwitynację. W *Arabidopsis* zidentyfikowano dwa homologi *DDB1* – *DDB1A* i *DDB1B*. Znalezione również dwa białka podobne do CSA (*AtCSA1A* i *AtCSA1B*), które tworzą heterotetramer, ale nie jest pewne czy u roślin w ogóle powstaje kompleks CSA-DDB1-CUL4 (Zhang et al., 2010).

Regiony DNA nie ulegające aktywnej transkrypcji są naprawiane przez naprawę ogólnogenomową (z ang. Global Genome; GG-NER). Uszkodzenie DNA jest rozpoznawane przez kompleks DDB2(DAMAGED-DNA BINDING 2)-DDB1-CUL4, który z kolei rekrutuje kompleks złożony z XPC (XERODERMA PIGMENTOSUM GROUP C), RAD23 (RADIATION SENSITIVE 23) i CEN2 (CENTRIN2) (Balestrazzi et al., 2011; Molinier et al., 2008).

Następujące dalsze reakcje są wspólne dla obu szlaków NER. Kompleks czynnika transkrypcyjnego TFIIH (TRANSCRIPTION FACTOR IIH), którego składnikami są m. in. XPB i XPD (XERODERMA PIGMENTOSUM GROUP B, D) rozplata cząsteczkę DNA w pobliżu miejsca uszkodzenia. Dwa białka XPB (*XPB1* i *XPB2*) zidentyfikowane w genomie *Arabidopsis* mają około 95% identycznych aminokwasów i mogą komplementować fenotyp wrażliwego na UV mutanta drożdżowego Rad25 (Costa et al., 2002). XPD (*UVH6* – ULTRAVIOLET HYPERSENSITIVE 6) jest ważny także dla rozwoju *Arabidopsis*, jego mutanty mają żółknące liście i są mniejsze w porównaniu z roślinami dzikiego typu. Są one ponadto bardzo wrażliwe na działanie UV (Liu et al., 2003).

W przypadku rozpoznania uszkodzenia następuje przecięcie nici DNA przez endonukleazy ERCC1 (EXCISION REPAIR CROSS COMPLEMENTING 1), XPF (XERODERMA PIGMENTOSUM GROUP F) i XPG (XERODERMA PIGMENTOSUM GROUP G). Pierwsze dwie odpowiadają za przecięcie wiązania po stronie 5', a ostatnia po stronie 3', kilka nukleotydów od miejsca uszkodzenia.

U *Arabidopsis* homologi tych białek są kodowane przez geny oznaczone odpowiednio: *AtERCC1/UVR7*; *XPF/AtRAD1*; *XPG/AtRAD2/UVH3*. Wycięty fragment DNA jest usuwany, a ubytek uzupełniany na matrycy drugiej nici. U człowieka synteza nowego fragmentu DNA zachodzi przy udziale kompleksu polimerazy złożonego z Pol $\delta/\epsilon$ , PCNA (PROLIFERATING CELLS NUCLEAR ANTIGEN), RFC (REPLICATION FACTOR C), i RPA (REPLICATION PROTEIN A) (Bray & West, 2005, Kimura & Sakaguchi, 2006). W *Arabidopsis* synteza nowego fragmentu DNA zachodzi z udziałem AtPol $\lambda$ , należącej do rodziny polimeraz DNA X. Jej udział w NER został potwierdzony (Roy et al., 2011). Autorzy pracy wykazali mniejszą wydajność naprawy CPD w naświetlanych UV-B, a następnie inkubowanych w ciemności mutantach *atpol $\lambda$ -1* w porównaniu z WT. W eksperymencie *in vitro* z użyciem ekstraktów białkowych siewek WT i *atpol $\lambda$ -1*, zaobserwowali znacznie wyższy poziom wyznakowanych izotopowo nukleotydów wprowadzonych do naświetlonego UV-B plazmidu przez ekstrakt WT, a także wzrost ich ilości jeżeli do ekstraktu *atpol $\lambda$ -1* dodano rekombinowanego białka AtPol $\lambda$ .

U człowieka naprawa przez wycięcie nukleotydów to główny mechanizm napraw uszkodzeń DNA wywołanych UV, takich jak dimery pirymidynowe. Jednak wydaje się, że ten typ naprawy ma niewielkie znaczenie u organizmów posiadających aktywne fotolizazy. Jak wspomniano wcześniej, w badaniach prowadzonych na *Arabidopsis* udowodniono, że w przypadku naprawy 6-4 PP i CPD główną rolę odgrywa fotoreaktywacja (Pang & Hays, 1991; Chen et al., 1994). U takich organizmów NER może służyć naprawie uszkodzeń DNA innych niż dimery pirymidynowe.

#### **1.2.5.2.3. Naprawa pęknięć dwuniciowych**

Wynikiem działania wielu czynników, w tym promieniowania UV oraz ROS, może być powstanie dwuniciowych pęknięć DNA (DSB) (Weterings & Chen, 2008; Knoll et al., 2014). Ich wykrycie powoduje zatrzymanie cyklu komórkowego do czasu ich naprawienia (Weterings & Chen, 2008). Naprawa DSB może przebiegać na dwa odmienne sposoby. Pierwszym z nich jest naprawa przez rekombinację homologiczną (HR, homologous recombination), w której nić DNA jest naprawiana z wykorzystaniem siostrzanej chromatydy lub innej sekwencji homologicznej (Britt, 1999). Drugi to łączenie końców niehomologicznych (NHEJ, non-homologous end joining), które – zgodnie z nazwą – mogą w ogóle nie wykazywać homologii. Ponieważ nie ma

mechanizmu warunkującego połączenie oryginalnie sparowanych fragmentów cząsteczki DNA, jeżeli pojawi się równocześnie więcej niż jedno takie pęknięcie, w wyniku naprawy na drodze NHEJ może dojść do inwersji, delecji, translokacji i częściowych duplikacji w obrębie chromosomów (Britt, 1999). Wszystkie dotychczas zbadane organizmy wykorzystują oba opisane powyżej mechanizmy naprawy DSB, zaobserwowano jednak różnice w częstości ich używania. U organizmów o mniej skomplikowanym genomie (bakterii i drożdży), o ile tylko dostępna jest wystarczająca homologia, naprawa DSB zachodzi przeważnie z użyciem rekombinacji homologicznej. U organizmów z większym, bardziej skomplikowanym genomem naprawa DSB zachodzi zazwyczaj za pomocą NHEJ (Britt, 1999).

#### **1.2.5.2.3.1. Naprawa przez łączenie końców niehomologicznych (NHEJ)**

W naprawie przez NHEJ bierze udział kompleks białek KU70/KU80, który rekrutuje podjednostkę katalityczną kinazy białkowej zależnej od DNA (DNA-PKcs z ang. DNA-dependent protein kinase catalytic subunit). Kinazy te następnie w miejscu uszkodzenia aktywują nukleazy, polimerazy DNA ( $\mu$  i  $\lambda$ ) i kompleks XRCC4-LIG4 (X-RAY REPAIR CROSS COMPLEMENTING 4; DNA LIGASE IV) (Lieber, 2010; Roy et al., 2013).

Na podstawie analizy produktów naprawy DSB u roślin określono kilka prawidłowości. Zazwyczaj na łączonych końcach następuje degradacja kilku nukleotydów, a w miejscu pęknięcia często wprowadzany jest „wypełniacz”. Mogą nim być: fragment DNA pochodzący z zupełnie innego miejsca genomu, duplikacja lub inwersja sąsiadujących sekwencji a nawet nowa sekwencja, wydająca się zupełnie losową (Gorbunova & Levy, 1997). Często w procesie naprawy wykorzystywane są też mikrohomologie w obrębie 5-25 zasad, które prawdopodobnie służą do stabilizacji struktury podczas ligacji i nie mają związku z prawdziwymi homologiami wykorzystywanymi przy naprawie przez rekombinację homologiczną (McVey & Lee, 2008). W tym rodzaju naprawy (MMEJ, microhomology mediated end joining) nie są wykorzystywane białka KU, udowodniono natomiast udział białek PARP (ang. Poly-ADP-ribose polymerase). U *Arabidopsis* są to białka PARP1 i PARP2 (Babiyuchuk et al., 1998). Ich mutanty wykazują 2 do 20-krotnie zmniejszoną ilość produktów MMEJ w naprawie indukowanych chemicznie dwuniciowych pęknięć DNA. Z kolei w mutantach *ku70* i *ku80* zaobserwowano 4-krotny wzrost ilości napraw przeprowadzanych na drodze MMEJ (Jia et al., 2013).

Może to wskazywać na konkurencję między białkami PARP i KU, która określa jaką drogą zostanie przeprowadzona naprawa uszkodzonego DNA (de Medeiros et al., 2015).

#### **1.2.5.2.3.2. Naprawa przez rekombinację homologiczną (HR)**

Rekombinacja homologiczna jest niemutagenną metodą naprawy DSB, ponieważ wykorzystuje sekwencję homologiczną. Dzięki temu nie prowadzi do utraty informacji genetycznej, pod warunkiem że sekwencja użyta jako matryca była identyczna z uszkodzoną cząsteczką DNA. Za wykrycie DSB w naprawie przez HR odpowiadają białka PARP1 i PARP2, które następnie rekrutują kompleks MRN (MRE11-Rad50-NBS1; MEIOTIC RECOMBINATION 11; RADIATION SENSITIVE 50; NIJMEGEN BREAKAGE SYNDROME 1) (Haince et al., 2007). Aby mogła zajść rekombinacja, dzięki działaniu nukleaz i helikaz następuje degradacja fragmentu jednej nici DNA na obu wolnych końcach w kierunku 5' do 3'. W proces rekombinacji homologicznej u ssaków zaangażowane jest 5 homologów bakteryjnego RecA i drożdżowego RAD51: RAD51B, RAD51C, RAD51D, XRCC2 i XRCC3 (RADIATION SENSITIVE 51B/C/D; X-RAY REPAIR CROSS COMPLEMENTING 2/3), które mogą składać się w dwa kompleksy: RAD51C-XRCC3 oraz RAD51B-RAD51C-RAD51D-XRCC2. U *Arabidopsis* i ryżu, oprócz homologów wymienionych powyżej genów, zidentyfikowano kolejne 4 geny podobne do RecA: RECA1 (HOMOLOG OF BACTERIAL RECA), RECA2 (*A. thaliana* RECA HOMOLOG 2), RECA3 (RECA HOMOLOG 3) oraz DRT100 (DNA-DAMAGE REPAIR/TOLERATION 100) (Cerutti et al., 1992; Khazi et al., 2003; Lin et al., 2006). RAD51 jest kluczowy podczas naprawy DSB. Jego mutanty u *Arabidopsis* wykazują większą wrażliwość na promieniowanie UV i zmniejszoną częstość przeprowadzania naprawy przez HR (Abe et al., 2005).

#### **1.2.5.2.4. Naprawa błędnie sparowanych zasad (MMR)**

Naprawa błędnie sparowanych zasad służy przede wszystkim wyeliminowaniu błędów powstałych w procesie replikacji, ale może być także wykorzystana do naprawy fotoproduktów (Jun et al., 2006; Lario et al., 2011). W odróżnieniu od innych rodzajów naprawy rozpoznawane są niezmodyfikowane, ale nieprawidłowo sparowane nukleotydy. U *E. coli* odpowiada za to białko MutS. Następnie wiąże się z nim białko

MutL, które wspomaga rozpoznanie i jest istotne dla rekrutacji i aktywacji MutH. To ostatnie białko odpowiada za znalezienie najbliższej sekwencji GATC, w której metylacja znajduje się tylko na jednej z nici DNA (hemimetylowanej). Ponieważ adenina w takiej sekwencji jest metylowana po pewnym czasie od replikacji, znalezienie sekwencji hemimetylowanej umożliwia rozróżnienie między nicią macierzystą (czyli prawidłową) i potomną (wymagającą naprawy). MutH jest endonukleazą, która przecina niemetylowaną nić DNA. Następnie w proces naprawy zaangażowane są: helikaza DNA II (MutU), egzonukleazy (ExoI, ExoVII, ExoX, RecJ), białko SSB (ang. SINGLE STRAND BINDING) wiążące pojedynczą nić, jądrowy marker proliferujących komórek (PCNA, proliferating cells nuclear antigen) oraz polimeraza i ligaza DNA (Spampinato et al., 2009; Li, 2008). Powstała w DNA luka zostaje ponownie uzupełniona z wykorzystaniem jako matrycy metylowanej, a więc prawidłowej nici. U *Eukaryota* zidentyfikowano wiele homologów genów *mutS* i *mutL*. Nie udało się odnaleźć homologów *mutH*, ale podobnie jak u bakterii istotne jest przecięcie pojedynczej nici, która następnie jest degradowana przez egzonukleazę do miejsca błędnego sparowania, aby umożliwić ponowną syntezę DNA. Nie jest wiadome jaki mechanizm odpowiada za wyznakowanie, a następnie rozpoznanie nici macierzystej u *Eukaryota* (Modrich, 2006; Li, 2008).

U *Arabidopsis* zidentyfikowano 7 homologów genu *mutS*: *MSH1*, *MSH2*, *MSH3*, *MSH4*, *MSH5*, *MSH6* i *MSH7*, przy czym sekwencja ostatniego z nich jest specyficzna wyłącznie dla roślin (Culligan & Hays, 2000). Poza tym istnieją przynajmniej cztery homologi *mutL*: *MLH1*, *MLH2*, *MLH3* i *MLH6*. Białka MSH łączą się w rozpoznające błędne sparowanie kompleksy:  $MSH\alpha$  (*MSH2-MSH6*)  $MSH\beta$  (*MSH2-MSH3*) i  $MSH\gamma$  (*MSH2-MSH7*). Poziom transkryptów *MSH2* i *MSH6* wzrasta pod wpływem UV-B, a kompleks  $MSH\alpha$  może uczestniczyć w naprawie wywołanych UV-B uszkodzeń (Lario et al., 2011), podobnie jak *MSH7* (Lario et al., 2014).  $MSH\gamma$ , obecny tylko u roślin, może rozpoznawać błędne pary: G/T oraz A/C, które powstają przez deaminację cytozyny lub działanie UV i ROS (Gómez & Spampinato, 2013). *MLH1* łączy się z *PMS1* (POSTMEIOTIC SEGREGATION1) tworząc kompleks  $MUTL\alpha$  o aktywności endonukleazowej.

Mechanizmy chroniące rośliny przed UV często są wspólne z ochroną przed silnym światłem. Ochrona przed nadmiarem światła przez produkcję antocyjanów jest



indukowana między innymi przez cukry, szczególnie przez sacharozę (Tsukaya et al., 1991; Ohto et al., 2001; Solfanelli et al., 2006). Z kolei służące optymalizacji ilości światła docierającego do aparatu fotosyntetycznego ruchy chloroplastów są hamowane przez glukozę i sacharozę (Banaś & Gabryś, 2007; Eckstein et al., 2012). Rola cukrów w większości mechanizmów ochronnych przed UV pozostaje nieznaną.

### **1.3. Rola cukrów w rozwoju roślin**

Wszystkie związki organiczne w organizmach żywych zawierają węgiel związany w cyklu Calvina-Bensona. Bezpośrednim produktem tego cyklu jest aldehyd 3-fosfoglicerynowy, który w kilku następnych reakcjach przekształcany jest do dwucukru – sacharozy. U roślin jest ona podstawowym cukrem, który jest transportowany i magazynowany. Gdy zachodzi potrzeba wykorzystania energii związanej podczas fotosyntezy sacharoza jest hydrolizowana przez inwertazę do fruktozy i glukozy, która z kolei stanowi substrat dla glikolizy i jest najważniejszym cukrem w metabolizmie komórki. Poziom zarówno glukozy jak i sacharozy jest w komórce ściśle kontrolowany, a one same mogą pełnić funkcję sygnałową. Ich poziom może być odbierany na dwa sposoby – bezpośrednio, poprzez specyficznie wiążące je receptory oraz pośrednio, przez sensory komórkowego poziomu związków energetycznych, odbierające informację o stanie energetycznym komórki.

#### **1.3.1. Cukry jako cząsteczki sygnałowe**

Bardzo ważną grupą białek zaangażowaną w metabolizm glukozy są heksokinazy, które katalizują pierwszą reakcję szlaku glikolizy. Oprócz funkcji katalitycznej pełnią również rolę receptorów glukozy, co po raz pierwszy zostało zbadane u drożdży (Entian & Fröhlich, 1984). Używając szczepu *Saccharomyces cerevisiae* pozbawionego heksokinazy 1 (HXK1, HEXOKINASE 1) autorzy pracy znaleźli linie z mutacjami w obrębie genu heksokinazy 2 (HXK2, HEXOKINASE 2), u których stwierdzili normalny metabolizm glukozy, ale brak represji katabolicznej. Ten proces, w którym wysoka dostępność glukozy wywołuje zahamowanie ekspresji genów odpowiedzialnych za metabolizm innych źródeł węgla, jest typową reakcją komórek drożdży. Zmutowana HXK2 nie różniła się od dzikiej formy białka stałymi katalitycznymi czy kinetyką reakcji (Entian et al., 1985), co potwierdziło, że mutacja nastąpiła wyłącznie w części białka odpowiedzialnej za jego funkcję receptorową.

Heksokinazy były również pierwszymi wewnątrzkomórkowymi receptorami glukozy poznanymi u roślin (Jang et al., 1997). U *Arabidopsis thaliana* najlepiej poznana jest heksokinaza 1 (AtHXK1, *A. thaliana* HEXOKINASE 1). Podobnie jak drożdżowa heksokinaza, pełni ona rolę receptora i enzymu. Wykazano, że obie te funkcje są niezależne. AtHXK1 z punktową mutacją S177A jest pozbawiona aktywności enzymatycznej, ale posiada pełną funkcjonalność jako sensor glukozy, co wykazano badając odpowiedź rośliny z tak zmutowanym białkiem na cukry (Granot et al., 2014; Sheen, 2014; Moore et al., 2003; Cho et al., 2006). Pokazano również komplementację funkcji katalitycznej, ale nie sensorowej, AtHXK1 przez drożdżowe białko HXK2 w transgenicznym *Arabidopsis* (Jang et al., 1997; Moore et al., 2003). Ta podwójna aktywność heksokinazy jest konserwatywna ewolucyjnie, a podobne białka odkryto u wielu innych gatunków roślin: mchu *Physcomitrella patens*, widliczki *Selaginella moellendorffi*, kukurydzy, ryżu, topoli, pomidora i tytoniu (Li & Sheen, 2016). Niedawno wykazano również, że zarówno AtHXK1 jak i AtHXK1 z mutacją S177A kokryształuje z glukozą, która w przypadku obu wersji białka powoduje takie same zmiany konformacyjne, co dodatkowo potwierdza rolę AtHXK1 jako receptora (Feng et al., 2015).

Sacharoza jest odbierana w komórce roślinnej jako sygnał niezależny od innych cukrów. Zostało udowodnione, że jej funkcja w regulacji kwitnienia, rozwoju nasion, rozwoju pędów bocznych i produkcji barwników jest niezależna od poziomów glukozy czy fruktozy (Pontis & Martinez-Noel, 2013; Lastdrager et al., 2014; Ruan, 2014). Sacharoza aktywuje m.in. ekspresję czynnika transkrypcyjnego *MYB75/ATPAP1* (MYELOBLASTOSIS PROTEIN 75; ARABIDOPSIS THALIANA PRODUCTION OF ANTHOCYANIN PIGMENT 1) i szlak biosyntezy antocyjanów. Roślinny receptor sacharozy pozostaje dotąd nieznany (Li & Sheen, 2016), być może funkcję tę pełni jeden z symporterów protonów SUT (SUCROSE TRANSPORTER), związana z błoną komórkową syntaza sacharozy (SUS; SUCROSE SYNTHASE) lub bramkowane napięciem kanały wapniowe (Barker et al., 2000; Duncan et al., 2007).

Istotną rolę w regulacji wewnątrzkomórkowego poziomu sacharozy odgrywa trehalozo-6-fosforan (trehaloso-6-phosphate, T6P), który uważa się za wskaźnik dostępności sacharozy. Odkryto, że związek ten hamuje aktywność kompleksu SNRK1 (SUCROSE NON FERMENTING1-RELATED KINASE1) odpowiedzialnego za

percepcję stanu energetycznego komórki (Zhang et al., 2009; Nunes et al., 2013). Przypuszcza się, że za takie działanie T6P mogą być odpowiedzialne białka z rodziny, do której należą syntazy i fosfatazy trehalozy, których zaskakująco wiele nie posiada aktywności enzymatycznej (Cookson et al., 2016; Li & Sheen, 2016).

Pozakomórkowa glukoza jest wiązana przez RGS1 (ang. REGULATOR OF G-PROTEIN SIGNALING 1) – regulator przekazu sygnału białek G. RGS1 ma 7 transbłonowych domen, jego fosforylacja przez WNK8 (WITH NO LYSINE (K) KINASE 8) prowadzi do endocytozy i aktywacji kaskady sygnału prowadzącej do podziałów i elongacji komórek w siewkach *A. thaliana* (Urano et al., 2012). Wykazano, że zależna od RGS1 indukcja ekspresji genów jest wywoływana przez podawane w medium glukozę, fruktozę i sacharozę, ale nie inne cukry i analogi cukrów (Grigston et al., 2008).

### **1.3.2. Detekcja poziomu cukrów przez sensory energetyczne**

Cukry są wiązane przez specyficzne receptory, a oprócz tego zmiany ich poziomu są wykrywane przez sensory komórkowego poziomu energetycznego. Najważniejszym z nich jest ewolucyjnie konserwatywna kinaza białkowa TOR (ang. TARGET OF RAPAMYCIN). Badania prowadzone na *Arabidopsis* z użyciem chemicznych inhibitorów wykazały, że jej aktywacja jest zależna od aktywnej glikolizy oraz mitochondrialnego łańcucha transportu elektronów (Xiong et al., 2013). Wykazano również, że egzogenna glukoza podana w stężeniu już 1 mM aktywuje przekaz sygnału z udziałem TOR w 3-dniowych siewkach *Arabidopsis* indukując wzrost korzenia, podobnie jak cukry powstające w procesie fotosyntezy (Xiong et al., 2013; Li & Sheen, 2016).

W warunkach niedoboru cukrów istotną rolę regulatorową w metabolizmie, odpowiedzi na stres i regulacji rozwoju rośliny odgrywa kompleks SNRK1. Kinazy białkowe KIN10/11 *Arabidopsis* wchodzące w skład SNRK1 odpowiadają za hamowanie ekspresji genów związanych z anabolizmem i indukcję ekspresji genów związanych z procesami katabolicznymi. W ciągu kilku ostatnich lat zidentyfikowano wiele białek fosforylowanych przez KIN10, między innymi czynniki transkrypcyjne bZIP63, MYC2, ATAF1, FUS3 i IDD8 (INDETERMINATE DOMAIN 8), które są zaangażowane w regulację procesów metabolicznych w stanach zwiększonego zapotrzebowania na

energię lub jej niedoboru, na przykład w ciemności, podczas hipoksji, stresu solnego lub kwitnienia (Tsai & Gazzarini, 2012; Im et al., 2014; Mair et al., 2015; Garapati et al., 2015; Jeong et al., 2015).

#### **1.4. Regulacja kwitnienia u roślin**

Kwitnienie roślin jest indukowane przez czynniki wewnętrzne oraz środowiskowe tak, aby umożliwić osiągnięcie sukcesu reprodukcyjnego. Zidentyfikowano szlaki genetyczne uczestniczące w regulacji kwitnienia w odpowiedzi na zmiany długości dnia i temperatury otoczenia, na przedłużony okres chłodu, czy stopień rozwoju rośliny. Szlaki te nie mogą być rozdzielone, jako że łączy je niewielka grupa wspólnych genów, których ekspresja jest kluczowa dla regulacji indukcji kwitnienia.

Morfologicznie przejście z fazy wegetatywnej do fazy generatywnej polega na zmianie w merystemie wierzchołkowym pędu, prowadzącej do powstania merystemu pędu kwiatowego i zawiązków kwiatów. Przekształcony merystem u *Arabidopsis* zamiast liści w rozecie produkuje liście łodygowe.

##### **1.4.1. Fotoperiodyzm w regulacji kwitnienia**

Jednym z najważniejszych czynników uruchamiających generatywną fazę rozwoju roślin jest długość dnia i nocy (fotoperiod). Zjawisko to zostało po raz pierwszy opisane jeszcze na początku ubiegłego stulecia z użyciem jako modelu soi (Garner & Allard, 1920). Dla jego określenia zaproponowano termin „fotoperiodyzm”, dokonano też podziału na rośliny dnia długiego (kwitnące późną wiosną wraz z wydłużaniem się dnia), dnia krótkiego (kwitnące jesienią, kiedy dzień ulega skróceniu) i rośliny neutralne (niewrażliwe na długość dnia). Później udowodniono, że indukcja kwitnienia zachodzi w liściach, z których następuje przekazanie sygnału do merystemu wierzchołkowego. Okazało się również, że indukcja kwitnienia jest, przynajmniej do pewnego stopnia, uniwersalna, jako że zaindukowany liść rośliny dnia długiego przeszczepiony na roślinę dnia krótkiego wywoływał jej kwitnienie (i na odwrót). Odkrycie genu *Arabidopsis FLOWERING LOCUS T (FT)*, którego produkt jest mobilny w obrębie rośliny, a także potwierdzenie jego konserwatywnej funkcji w odlegle spokrewnionych gatunkach roślin pozwoliło na uznanie go za uniwersalny sygnał kwitnienia. Kolejno zostały odkryte inne geny zaangażowane w kontrolę czasu kwitnienia: *GIGANTEA (GI)* i *CONSTANS (CO)*. W warunkach długiego dnia mutanty *gi* i *co Arabidopsis* kwitną

później niż dziki typ, jednak w warunkach krótkiego dnia ich czas kwitnienia nie różni się od typu dzikiego. Dowiedziono, że w *Arabidopsis* rosnących w krótkim dniu to właśnie brak CO uniemożliwia kwitnienie, a indukowana nadekspresja tego genu wywołuje kwitnienie roślin niezależnie od warunków świetlnych. Uzyskanie mutantów genów związanych z cyklem okołodobowym i przekazem sygnału świetlnego (np. *LATE ELONGATED HYPOCOTYL (LHY)*, *CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1 (CCA1)*, *EARLY FLOWERING 3 (ELF3)*, *TIMING OF CAB EXPRESSION 1 (TOC1)*, *FLAVIN-BINDING, KELCH REPEAT, F-BOX 1 (FKF1)*, *CRYPTOCHROME 2 (CRY2)*) pozwoliło na wykazanie, że także te geny zaangażowane są w regulację kwitnienia.

#### **1.4.1.1. Rola CO i FT w regulacji kwitnienia**

W *Arabidopsis*, będącym dobrym modelem dla roślin długiego dnia, poziom transkryptu *CO* w warunkach długiego fotoperiodu wykazuje wahania w cyklu dobowym, które utrzymują się po przeniesieniu roślin do ciągłego światła (Yanovsky & Kay, 2002). Ten wzór ekspresji jest zależny od zegara komórkowego. Mutant *toc1* wykazuje przyspieszone kwitnienie w warunkach krótkiego dnia. Mutant ten ma cykl dobowy równy 21 godzinom (Strayer et al., 2000). Po wyrównaniu cyklu światła i ciemności do 21 godzin, zostaje przywrócony prawidłowy wzór ekspresji *CO*, a przedwczesne kwitnienie w warunkach krótkiego dnia jest zahamowane. Poziom transkryptu *CO* wykazuje wahania w cyklu dobowym także w roślinach rosnących w krótkim dniu, jednak ponieważ białkowy produkt tego genu jest niestabilny i degradowany w ciemności, indukcja kwitnienia nie zachodzi (Valverde et al., 2004; Yanovsky & Kay, 2002). Transkrypcja *CO* jest regulowana przez grupę białek związanych z cyklem dobowym - *CCA1*, *LHY* i rodzinę *PRR* (*PSEUDO-RESPONSE REGULATORS*) (Imaizumi, 2010), które bezpośrednio lub pośrednio regulują ekspresję białek *CDF* (*CYCLING DOF FACTORS*), transkrypcyjnych represorów *CO* (Nakamichi et al., 2007; Song et al., 2012). *CDF1*, podobnie jak *CDF2*, *CDF3* i *CDF5* wiążą się z promotorem *CO* uniemożliwiając jego transkrypcję. Ekspresja *CDF1* jest indukowana przez *CCA1* i *LHY*, których poziom jest najwyższy rano. Również ekspresja pozostałych *CDF* jest wtedy najwyższa. Później, w ciągu dnia, ich poziom jest obniżany w wyniku działania białek z rodziny *PRR*. Białka *TOC1*, *PRR5*, *PRR7* i *PRR9* oddziałują z promotorami genów *CCA1* i *LHY*, obniżając ich ekspresję i w efekcie również poziom *CDF1* (Nakamichi et al., 2010; Liu et al., 2013). *PRR5*

i PRR7 zmniejszają również transkrypcję *CDF2* i *CDF5* poprzez bezpośrednie oddziaływanie z ich promotorami (Liu et al., 2013).

W warunkach długiego dnia kompleks FKF1-GI usuwa represję transkrypcji *CO* przez CDF (Sawa et al., 2007). FKF1 jest receptorem światła niebieskiego i ma aktywność ligazy ubikwityny E3 (Imaizumi et al., 2003; Sawa et al., 2007). Po aktywacji przez światło FKF1 formuje kompleks z GI i rozpoznaje związane z promotorem *CO* białka represora, do których następnie przyłącza ubikwitynę kierując je na drogę degradacji z udziałem proteasomu (Imaizumi et al., 2005).

Przeciwnie do sytuacji opisanej dla długiego dnia, w krótkim dniu, maksymalna ekspresja FKF1 i GI przypada na okres ciemności, gdy nie zachodzi aktywacja FKF1 i w rezultacie nie dochodzi do uruchomienia ekspresji *CO* (Sawa et al., 2007).

Po usunięciu represji transkrypcji *CO*, jego ekspresja jest aktywowana przez czynniki transkrypcyjne z podstawową domeną helisa-pętla-helisa (ang. basic Helix-loop-helix; bHLH): FBH1 (FLOWERING BHLH1), FBH2, FBH3 i FBH4 (Ito et al., 2012). Białka te wiążą się z sekwencją wzmacniacza (ang. enhancer, E-box) promotora i indukują ekspresję *CO* po południu oraz w ciemności, zarówno w warunkach długiego jak i krótkiego dnia. Ta zależna od FBH aktywacja transkrypcji jest konserwatywna w świecie roślin; odkryto że nadekspresja homologów tego białka z topoli i ryżu istotnie zwiększa poziom mRNA *CO* także u *Arabidopsis* (Ito et al., 2012).

Oprócz regulacji transkrypcji, istotny wpływ na poziom białka CO ma jego potranslacyjna regulacja. Mechanizmy zależnej od światła degradacji w proteasomach warunkują jego wysoki poziom wyłącznie pod koniec długiego dnia, co odpowiada za zależną od długości dnia ekspresję *FT*. Światło czerwone destabilizuje białko CO, powodując opóźnienie kwitnienia, podczas gdy daleka czerwień i światło niebieskie działają stabilizująco (Valverde et al., 2004). Odpowiedzialne za to są odpowiednio: fitochrom B (PHYB), fitochrom A (PHYA) oraz kryptochrom 2 (CRY2) i FKF1. Za kierującą do degradacji w proteasomie ubikwitynację CO odpowiadają dwie ligazy ubikwityny E3: COP1 (CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC 1) i HOS1 (HIGH EXPRESSION OF OSMOTICALLY RESPONSIVE GENES 1) (Liu et al., 2008; Jang et al., 2008; Lazaro et al., 2012).

CO jest czynnikiem transkrypcyjnym należącym do rodziny B-box, który aktywuje transkrypcję *FT*. Po związaniu z jego promotorem może działać na dwa sposoby: albo bezpośrednio oddziałując z DNA przez N-końcowy motyw CCT (CO, CO-like i TOC1) (Tiwari et al., 2010) albo oddziałując z trimerycznym czynnikiem transkrypcyjnym wiążącym motyw CCAAT (Wenkel et al., 2006). Inne czynniki transkrypcyjne indukujące ekspresję *FT*: CIB1 (CRYPTOCHROME-INTERACTING BASIC HELIX-LOOP-HELIX 1), CIB2, CIB4 i CIB5 są stabilizowane oddziaływaniem z CRY2. Białko CDF1, będące represorem transkrypcji *CO*, wiąże się również z promotorem *FT* i hamuje jego ekspresję (Song et al., 2012). Jak wspomniano wcześniej, FKF1 pod wpływem światła niebieskiego tworzy kompleks z GI i kieruje białka CDF do degradacji. W ten sposób sygnał światła niebieskiego pełni podwójną rolę – wpływa na degradację represorów *FT* (CDF) oraz stabilizuje jego aktywatory (CIB).

Przez długi czas zastanawiano się w jakiej formie sygnał indukujący kwitnienie wędruje z liścia do wierzchołka wzrostu. Obecnie wiadomo, że białko FT jest syntetyzowane w komórkach towarzyszących floemu liści, a następnie transportowane do merystemu wierzchołkowego. W merystemie tym uruchamia szereg oddziaływań, aktywujących geny inicjujące tworzenie merystemu kwiatowego. FT oddziałuje z czynnikiem transkrypcyjnym FD (FLOWERING LOCUS D), aktywując transkrypcję genów *API* (*APETALA*) i *LFY* (*LEAFY*), w wyniku czego powstają zawiązki kwiatów (Corbesier et al., 2007). Czas kwitnienia koreluje z ilością białka FT. Im dłuższy fotoperiod, a w konsekwencji wyższy poziom tego białka, tym szybciej zachodzi indukcja kwitnienia. Jak wspomniano wyżej CO indukuje ekspresję *FT* bezpośrednio, w sposób zależny od długości dnia, dzięki czemu ekspresja *FT* również jest skorelowana z cyklem dobowym (Suárez-López et al., 2001).

#### **1.4.1.2. Rola fotosyntezy w indukcji kwitnienia**

Oprócz fotoperiodu liczne inne czynniki mogą wpływać na czas kwitnienia. Jednym z nich jest fotosynteza i jej produkty. Już ponad pół wieku temu wykazano, że inhibitor fotosyntezy, DCMU (3-(3,4-dichlorofenylo)-1,1-dimetylomocznik), opóźnia kwitnienie u rośliny długiego dnia, życicy rocznej (*Lolium temulentum*) (Evans & Wardlaw, 1966). Dodatek DCMU nie ma jednak wpływu na kwitnienie wielu (choć nie wszystkich) roślin krótkiego dnia (Evans, 1971). Podwyższone stężenie dwutlenku węgla

w indukującym fotoperiodzie może przyspieszyć kwitnienie u niektórych roślin dnia długiego (Reekie et al., 1994). Wykazano jednak, że efekt ten obserwuje się również u rosnących *in vitro* bezzieleniowych mutantów *Arabidopsis*, co wskazuje, że czynnikiem inicjującym kwitnienie jest sama dostępność CO<sub>2</sub>, a nie fotosynteza (Brown & Klein, 1971).

Niedawno dowiedziono, że również T6P uczestniczy w indukcji kwitnienia. Jego ilość zwiększa się proporcjonalnie do powstającej w liściach sacharozy (Lunn et al., 2006). Pod koniec długiego dnia jego zwiększony poziom koreluje z podniesionym poziomem transkryptu *FT*. Wykazano, że mutanty syntazy trehalozo-6-fosforanu (TPS1, ang. trehalose-6-phosphate synthase) *Arabidopsis* mają obniżony poziom *FT* i opóźnione kwitnienie w warunkach długiego dnia. Co ciekawe, w mutantach tych nie zaobserwowano znaczącej zmiany w poziomie CO (Wahl et al., 2013).

### **1.5. Rola sygnalizacyjna ultrafioletu w organizmach roślinnych**

Oprócz szkodliwego działania na składniki żywych komórek, UV jest też ważnym sygnałem informującym o otoczeniu. Inicjuje ono u roślin szereg odpowiedzi, modulując metabolizm a także wzrost i rozwój. Odpowiedź na UV zależy od rodzaju promieniowania, jego dawki, gatunku rośliny, stopnia jej adaptacji i innych, współdziałających czynników. Część z tych odpowiedzi jest kontrolowana przez niespecyficzne szlaki sygnałowe – aktywowane przez uszkodzenia DNA, ROS czy zranienie, inne są specyficzne tylko dla UV-B. Za odpowiedź na niskie dawki UV-B odpowiada jego receptor – UVR8 (ULTRAVIOLET RESISTANCE 8). UVR8 wraz z COP1 są konieczne do zależnej od UV-B transkrypcji *HY5* (ELONGATED HYPOCOTYL5, *HY5*). *HY5* jest czynnikiem transkrypcyjnym odgrywającym kluczową rolę między innymi w regulacji ekspresji genów odpowiedzialnych za fotomorfogenetyczną odpowiedź na UV-B (Ulm et al., 2004; Brown et al., 2005; Oravec et al., 2006). Innym ważnym czynnikiem transkrypcyjnym biorącym udział w odpowiedzi na UV-B jest blisko z nim spokrewniony *HYH* (*HY5* HOMOLOG), o podobnej funkcji. Mutanty genów kodujących oba te czynniki transkrypcyjne charakteryzuje zwiększona wrażliwość na UV-B. Mutant *hy5* jest podobnie wrażliwy na UV-B jak *uvr8*, a *hyh* wykazuje mniejszą wrażliwość, co wskazuje na jego drugorzędną rolę w przekazaniu sygnału (Brown & Jenkins, 2008).



W warunkach naturalnych bardzo rzadko obserwuje się skutki uszkodzenia roślin spowodowanego działaniem UV (Jenkins, 2009), często natomiast można zaobserwować efekty adaptacji zwiększającej tolerancję na ten czynnik środowiskowy. Typowe przykłady adaptacji to zahamowanie wydłużania pędów, otwieranie hipokotyli, zwiększona akumulacja flawonoidów (Kim et al., 1998; Boccalandro et al., 2001; Suesslin & Frohnmeier, 2003). Rośliny, które nie były wcześniej narażone na działanie UV wykazują silniejszą reakcję stresową, te które miały możliwość adaptacji, ze względu na podwyższoną tolerancję, reagują słabiej. W zaaklimatyzowanych roślinach zachodzi ekspresja genów, które utrzymują ten stan. Odpowiedź na UV współdziała z odpowiedzią na inne czynniki, jak susza, stres osmotyczny, niska temperatura (Bilger et al., 2007; Fasano et al., 2014).

Wysokie dawki UV-B i promieniowanie bardziej krótkofalowe aktywują geny związane z reakcją obronną, odpowiedzią na zranienie i stres (Brosché & Strid, 2003; Stratmann, 2003; Kilian et al., 2007). Niższe dawki oraz dłuższe fale UV-B regulują ekspresję licznych genów związanych z odpornością na promieniowanie UV i naprawą wywołanych przez nie uszkodzeń (Frohnmeier et al., 1999; Jenkins et al., 2001; Ulm et al., 2004; Brown & Jenkins, 2008). U *Arabidopsis* krótkofalowe UV-B powoduje represję niektórych genów aktywowanych przez dłuższe fale UV-B (Ulm et al., 2004). Odkryto, że m.in. u *Arabidopsis* i kukurydzy, działanie UV wpływa na ekspresję genów również w tkankach nie poddanych jego działaniu, na przykład w korzeniach. Wskazuje to, że sygnał inicjowany przez UV może być przekazywany również do nienaświetlanych części organizmu (Casati & Walbot, 2004; Kilian et al., 2007). Znaczna część genów ulegających szybkiej indukcji przez UV to czynniki transkrypcyjne, odgrywające niewątpliwie kluczową rolę w odpowiedzi na to promieniowanie. Część z nich uczestniczy w regulacji produkcji związków fenolowych (Cloix & Jenkins, 2008; Cominelli et al., 2008). I tak na przykład ekspresja AtMYB4, czynnika transkrypcyjnego zaangażowanego w zahamowanie biosyntezy estrów sinapoilu, ulega obniżeniu pod wpływem UV-B (Jin et al., 2000).

Istotną rolę w regulacji transkrypcji odgrywają wywoływane przez UV zmiany w strukturze chromatyny. Zaobserwowano, że odmiany kukurydzy rosnące na dużych wysokościach, a więc narażone na wyższe natężenie UV, mają podwyższoną ekspresję genów związanych z remodelowaniem chromatyny. Wyciszenie ich przy pomocy iRNA

skutkowało spowodowanymi UV uszkodzeniami liści oraz zmianami w transkrypcji genów zaangażowanych w ochronę przed UV (Casati et al., 2006).

U *Eukaryota* UV-B wpływa także na modyfikacje histonów. Histony pełnią ważną funkcję w rekrutacji białek regulatorowych, w związku z czym ich modyfikacje mogą skutkować zmianami w transkrypcji. Wykazano, że w *Arabidopsis* po zadziałaniu UV-B chromatyna zawierała więcej podwójnie acetylowanych (w pozycjach K9 i K14) histonów H3 w regionach promotorowych wielu genów związanych z ochroną przed UV (Cloix & Jenkins, 2008). Również acetylacja histonu H4 koreluje ze zwiększoną ekspresją m.in. genu *HY5* po zadziałaniu UV-B (Cloix & Jenkins, 2008). Wydaje się, że acetylacja histonów służy rozluźnieniu struktury chromatyny co ułatwia interakcję z DNA białek biorących udział w transkrypcji.

Jak wspomniano powyżej, UV może w różny sposób oddziaływać na rośliny – od roli regulatorowej w fotomorfogenezie przez wywoływanie odpowiedzi stresowej aż do programowanej śmierci komórki (programmed cell death, PCD). (Krasylenko et al., 2013). Odpowiedzi te trudno precyzyjnie rozdzielić, ale ogólnie można przyjąć, że reakcja stresowa jest regulowana przez ścieżki przekazu sygnału niespecyficzne względem UV, a wiele z indukowanych genów jest zaangażowanych również w odpowiedzi na inne czynniki stresowe (Mackerness, 2000; Brosché & Strid, 2003; Izaguirre et al., 2007; Kilian et al., 2007; Stratmann, 2003). Z kolei specyficzne ścieżki przekazu sygnału indukowanego przez UV-B są na ogół odpowiedzialne za regulację fotomorfogenezy i aklimatyzację (Jenkins, 2009). Jednakże nie wszystkie reakcje na UV można w ten sposób ściśle podzielić; na przykład aktywacja reakcji obronnych przez UV-B może wpływać na morfogenezę poprzez wzrost produkcji etylenu (Predieri et al., 1993; Mackerness et al., 1999). Także powstające pod wpływem UV ROS mogą powodować zmiany w morfologii roślin (Gerhardt et al., 2005).

#### **1.5.1. Regulacja przez niespecyficzne sygnały pochodzące od UV-B**

Niespecyficzne działanie UV-B związane jest z odpowiedzią na uszkodzenia DNA, akumulację ROS, oraz aktywacją szlaków sygnałowych związanych z obroną/zranieniem. Niewiele wiadomo na temat szlaku przekazu sygnału indukowanego uszkodzeniem DNA u roślin, znane są jednak ortologi ludzkich białek: ATM (Ataxia-Telangiectasia-Mutated) i ATR (Ataxia-Telangiectasia-Mutated and

Rad3-related) uczestniczących w zatrzymaniu cyklu komórkowego w reakcji na wykrycie pęknięć dwuniciowych oraz DNA jednoniciowego. Mutanty tych genów u *Arabidopsis* wykazują zwiększoną wrażliwość na UV w teście wzrostu korzeni (Culligan et al., 2004). Potwierdza to rolę tych białek w zatrzymywaniu podziałów komórkowych w odpowiedzi na uszkodzenie DNA u roślin. Wykazano, że w ogórku i fasoli, światło aktywujące fotoreaktywację odwraca niektóre efekty działania krótkofalowego UV-B, jak indukcja produkcji izoflawonoidów (Beggs et al., 1985), ekspresja genu  $\beta$ -1,3-glukanazy (Kucera et al., 2003), czy hamowanie wydłużania hipokotylu (Shinkle et al., 2005). Autorzy powyższych prac sugerują udział dimerów pirymidynowych w aktywacji tych odpowiedzi, jednak mechanizm przekazu sygnału nie jest znany.

### **1.5.2. Odpowiedź na reaktywne formy tlenu**

Jak wspomniano wcześniej UV-B powoduje powstawanie ROS także w organizmach roślinnych (Allan & Fluhr, 1997; Barta et al., 2004; Dai et al., 1997; Hideg et al., 2002; Hideg & Vass, 1996). Są to głównie rodniki nadtlenkowe, które następnie są szybko przekształcane w nadtlenek wodoru. Wzrost poziomu ROS może być spowodowany uszkodzeniem fotosyntetycznego szlaku transportu elektronów przez działanie UV (Bjorn, 1996; Jansen et al., 1998; Jordan, 1996) i w konsekwencji obniżoną sprawnością rozpraszania energii wzbudzenia. Wykazano jednak, że u *Arabidopsis* w powstawaniu nadtlenku wodoru po zadziałaniu UV udział mają również oksydazy NADPH kodowane przez *AtRBOHD* (*ARABIDOPSIS THALIANA RESPIRATORY BURST OXIDASE HOMOLOGUE D*) i *AtRBOHF* (*ARABIDOPSIS THALIANA RESPIRATORY BURST OXIDASE HOMOLOG F*), jako że w mutantach tych genów stwierdzono niższą akumulację H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> po naświetleniu UV-B (Kalbina & Strid, 2006). W odpowiedzi na podwyższony poziom ROS rośliny zwiększają ekspresję białek biorących udział w odpowiedzi na stres oksydacyjny m.in. peroksydazy askorbinianowej czy dysmutaz nadtlenkowych. Jednak efekt ten obserwowany jest po zastosowaniu wysokich dawek UV-B (Dai et al., 1997; Landry et al., 1995; Rao, Paliyath et al., 1996; Yannarelli et al., 2006). Niezdolny do syntezy askorbinianu mutant *Arabidopsis vtc1* jest wrażliwy na UV-B co wskazuje na istotną rolę przeciwutleniaczy w ochronie przed tym promieniowaniem (Conklin et al., 1997; Gao & Zhang, 2008).

### **1.5.3. Odpowiedź na zranienie**

Ekspozycja na UV-B indukuje ekspresję genów uruchamianą w odpowiedzi na zranienie i atak patogenów, w tym genów związanych z patogenezą (ang. pathogenesis-related; PR) i inhibitorów proteinaz. Wykazano, że wcześniejsza ekspozycja na UV-B pomaga w obronie przeciw roślinożernym owadom, przypuszczalnie dzięki podwyższeniu zawartości wtórnych metabolitów, inhibitorów proteinaz i innych związków powstrzymujących żerowanie owadów (Caldwell et al., 2007; Izaguirre et al., 2007; Stratmann, 2003). Wy tłumaczeniem takiego działania UV jest zwiększenie akumulacji cząsteczek sygnałowych pośredniczących w odpowiedzi na zranienie, jak kwas jasmonowy (JA), etylen, kwas salicylowy (SA) oraz ROS. Wysokie dawki UV-B powodują szybki wzrost poziomów JA i etylenu (Allan & Fluhr, 1997) oraz wolniejszy wzrost poziomu SA.

#### **1.5.4. Specyficzna percepcja UV-B**

Niektóre z odpowiedzi na UV obejmują typowe reakcje fotomorfo-genetyczne. Są wywoływane przez niższe dawki UV-B niż te, które wywołują powstawanie wykrywalnych poziomów uszkodzeń DNA czy odpowiedź typową dla stresu/obrony/zranienia. Przykładami takiego działania UV jest hamowanie wzrostu hipokotyli i indukcja ekspresji syntazy chalkonowej (CHS, CHALCONE SYNTHASE), enzymu kluczowego dla syntezy flawonoidów. Odpowiedzi te zachodzą u *Arabidopsis* już przy naświetlaniu UV-B o natężeniu zaledwie  $0,1 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . Indukcja ekspresji genów związanych z odpowiedzią na stres wymaga przynajmniej 10-krotnie silniejszego natężenia UV-B. Już 5-minutowa ekspozycja na  $3 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  UV-B zwiększa ilość transkryptu *CHS* u *Arabidopsis* (Jenkins et al., 2001), a poniżej sekundy UV-B o natężeniu  $13 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  wystarcza do indukcji transkrypcji spod kontroli promotora *CHS* w komórkach pietruszki (Frohnmeier et al., 1999). Ta indukcja ekspresji nie jest skorelowana z uszkodzeniem DNA (Frohnmeier et al., 1999; Kalbin et al., 2001). Nie zaobserwowano też zwiększonego wpływu UV-B na ekspresję *CHS* w mutantach pozbawionych enzymów naprawiających DNA. Co ciekawe równoczesne naświetlanie tych mutantów światłem indukującym fotoreaktywację nie tylko nie zmniejszało, ale nawet zwiększało ekspresję tego genu pod wpływem UV-B. Związane jest to prawdopodobnie z synergistycznym działaniem światła niebieskiego (Fuglevand et al., 1996).

Mutant jedyne dotąd opisanego receptora UV-B u *Arabidopsis* został odkryty przy poszukiwaniu mutantów o zmienionej zawartości związków fenolowych absorbujących w zakresie UV (Kliebenstein et al., 2002) i nazwany UV RESISTANCE LOCUS 8 (UVR8). Ma on obniżoną zawartość flawonoidów i ekspresję *CHS* po zadziałaniu UV-B w porównaniu z dzikim typem. Pokazano udział UVR8 w przekazie sygnału pochodzącego od UV-B, jądrową lokalizację tego białka stymulowaną UV-B i jego oddziaływanie z chromatyną w regionie promotorowym *HY5* (Brown et al., 2005). Jednak dopiero prawie 10 lat po opisanie mutantu udowodniono funkcjonowanie białka UVR8 jako receptora UV-B (Rizzini et al., 2011). Drugim białkiem istotnym w fotomorfogenezie zależnej od UV-B jest COP1 (ang. CONSTITUTIVELY PHOTOMORPHOGENETIC). Jest to ważny negatywny regulator fotomorfogenezy siewek (Osterlund et al., 2000; Yi & Deng, 2005). Białko to jest ligazą ubikwityny E3 i w ciemności kieruje *HY5* i inne pozytywne regulatory fotomorfogenezy do degradacji w proteasomie. W odpowiedzi na UV-B pełni rolę przeciwną, stymulując fotomorfogenezę (Oravec et al., 2006). Zarówno akumulacja flawonoidów jak i elongacja hipokotyli po UV są zahamowane w mutantach *cop1*. Również ekspresja wielu genów, w tym *HY5*, w odpowiedzi na UV-B jest niższa w *cop1* (Oravec et al., 2006).

#### **1.5.4.1. UVR8 – specyficzny fotoreceptor UV-B**

Choć udowodniono rolę UVR8 w odpowiedzi na stres osmotyczny (Fasano et al., 2014), wydaje się, że główną funkcją tego białka jest kontrolowanie odpowiedzi na UV-B. U mutantu *uvr8* brak jest indukcji *CHS* pod wpływem UV-B, jednak nie zmienia się indukcja ekspresji tego genu pod wpływem innych czynników. Podobnie, w mutancie *uvr8* nie ma podwyższonej ekspresji *HY5* w wyniku działania UV-B, ale jego indukcja jego ekspresji w odpowiedzi na UV-A lub daleką czerwień pozostaje jak w dzikim typie (Brown et al., 2005). UVR8 wywołuje zmiany w ekspresji wielu genów już przy naświetleniu UV-B o natężeniu  $0,1 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  i jest jedynym znanym jak dotąd receptorem, który działa specyficznie w fotomorfogenezie zależnej od UV-B. Analiza transkryptomu pozwoliła na identyfikację około 70 genów regulowanych specyficznie przez UVR8 pod wpływem UV-B (Brown et al., 2005). UVR8 przy braku UV-B jest dimerem, który lokalizuje się w jądrze komórkowym i cytoplazmie (Rizzini et al., 2011). Po naświetleniu UV-B w krótkim czasie monomeryzuje i wchodzi

w interakcję z COP1 (Rizzini et al., 2011), a także zwiększa się jego ilość w jądrze komórkowym (Kaiserli & Jenkins, 2007), gdzie reguluje ekspresję czynników transkrypcyjnych HY5 i HYH.

## 2. Cele pracy

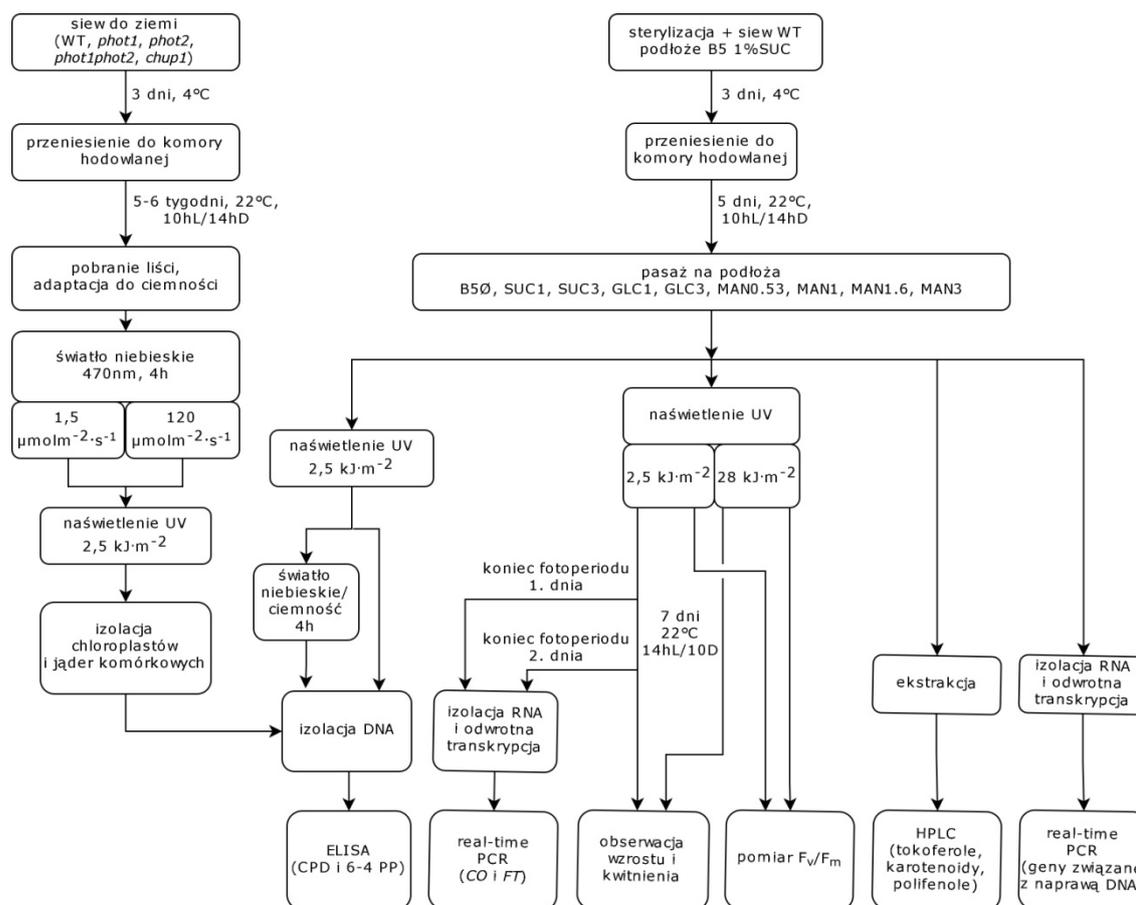
Praca miała na celu sprawdzenie wpływu cukrów na roślinne mechanizmy chroniące przed promieniowaniem ultrafioletowym oraz określenie roli ruchów organelli w ochronie materiału genetycznego przed uszkodzeniem wywołanym UV.

Pierwszą częścią pracy było określenie wpływu cukrów na ogólną odporność na UV. Ponieważ w trakcie doświadczeń stwierdzono wpływ promieniowania krótkofalowego na kwitnienie roślin hodowanych na podłożu z sacharozą, podjęto próbę charakterystyki zależnej od sacharozy i UV indukcji kwitnienia. W drugiej części przeanalizowano wpływ cukrów na różne poziomy ochrony roślin przed UV: absorpcję promieniowania, ochronę przed stresem oksydacyjnym i naprawę uszkodzeń powstałych w DNA. Trzecia część miała na celu sprawdzenie czy ruchy jądra komórkowego i chloroplastów mogą służyć ochronie przed uszkodzeniem zawartego w tych organellach materiału genetycznego.

W przeprowadzonych doświadczeniach testowano następujące hipotezy badawcze:

- Egzogenne cukry wspomagają ochronę roślin przed promieniowaniem UV poprzez wpływ na:
  - produkcję barwników pochłaniających UV
  - produkcję roślinnych przeciwutleniaczy
  - ekspresję genów zaangażowanych w naprawę DNA
  - wydajność naprawy uszkodzeń DNA
- Ruchy chloroplastów i jądra komórkowego służą ochronie DNA przed uszkodzeniami wywoływanymi przez UV

### 3. Materiały i metody



**Rysunek 1.** Schemat przeprowadzonych doświadczeń. Dokładny opis procedur zamieszczono w tekście.

#### 3.1. Materiał roślinny

W badaniach wykorzystywano *Arabidopsis thaliana* typu dzikiego (WT) ekotypu Columbia (Col-0), mutanty ruchów chloroplastów: *phot1* (SALK\_088841, Lehmann et al., 2011), *phot2* (*npl1-1*, Jarillo et al., 2001), *phot1phot2* i *chup1* (SALK\_129128, Oikawa et al., 2003) oraz fotoreceptora UV-B: *uvr8* (*uvr8-6*, SALK\_033468, Favory et al., 2009). Nasiona pojedynczych mutantów pochodziły z kolekcji Zakładu Biotechnologii Roślin, podwójny mutant *phot1phot2* został uzyskany w ramach niniejszej pracy doktorskiej przez skrzyżowanie *phot1* i *phot2*. Wszystkie mutanty były ekotypu Columbia.



### 3.1.1. Uzyskanie podwójnych mutantów *phot1phot2*

Mutanty *phot1* oraz *phot2* hodowano do pojawienia się pędów kwiatowych. Z pędów mutantów *phot2* usunięto wszystkie otwarte kwiaty i pąki, za wyjątkiem trzech najstarszych. Pąki te otwierano pod lupą binokularną za pomocą pęsety i usuwano z nich całe pręciki. Następnie pobierano pojedyncze pylniki z rozwiniętych kwiatów *phot1* i umieszczano na znamieniu słupka *phot2*. Każdy wierzchołek pędu kwiatowego zabezpieczano przed wysychaniem folią. Zawiązane łuszczyzny zbierano po utracie przez nie zielonej barwy. Nasiona wysiano na koreczki torfowe, a po pojawieniu się pierwszych liści sprawdzano reakcję ucieczki chloroplastów. Zgodnie z oczekiwaniem rośliny pokolenia F1 miały przywróconą reakcję ucieczki (której pozbawione były rodzicielskie rośliny *phot2*). Rośliny hodowano pojedynczo do uzyskania nasion. Podwójne mutanty w pokoleniu F2 rozpoznawano zaraz po wykiełkowaniu na podstawie fenotypu – podwiniętych liścieni (Sakamoto & Briggs, 2002), a następnie testowano za pomocą PCR homozygotyczność pod względem mutacji w *PHOT1* i *PHOT2* wg standardowej procedury. Przeprowadzono PCR ze starterami For i Rev oraz dodatkowym starterem LBa1, specyficznym względem T-DNA w mutantach (Tabela 1). Dodatkowo sprawdzano reakcję ucieczki i akumulacji chloroplastów, poprzez obserwację różnic w transmitancji części liści po naświetlaniu światłem niebieskim o różnym natężeniu. W tym celu użyto metody fotometrycznej (Walczak & Gabryś, 1980). Ponieważ stwierdzono brak obu reakcji ruchowych, a wyniki PCR potwierdziły obecność obu mutacji i brak dzikich form genów, ze sprawdzonych roślin zebrano nasiona, których używano do eksperymentów.

Nazwa genu	Starter	Sekwencja 5' – 3'	Temperatura topnienia [°C]	Temperatura przyłączenia użyta w PCR [°C]
<i>PHOT1</i>	For	GAGTTTGTACAAAAAAGCAGGC	51,1	50
	Rev	TGGGTCAAAAACATTTGTTTGCAG	52,8	
	LBa1	TGGTTCACGTAGTGGGCCATCG	58,6	
<i>PHOT2</i>	For	GACGCTACACAGCCTCACTGTCCC	62,5	55
	Rev	GTCCCAACTGTCCCTCTGCCCTATT	61,0	
	LBa1	TGGTTCACGTAGTGGGCCATCG	58,6	

Tabela 1. Startery użyte do sprawdzenia mutacji w obrębie *PHOT1* i *PHOT2*

### 3.2. Podłoża do hodowli *in vitro*

Do hodowli roślin używano podłoża Gamborga B-5. Wszystkie podłoża zawierały 3,1 g/l mieszaniny soli Gamborga B-5 (Sigma-Aldrich), 1 ml/l 1000-krotnie stężonego roztworu mieszaniny witamin Gamborga (Sigma-Aldrich). Poza tym zawierały glukozę (Sigma-Aldrich) o stężeniu 1 lub 3% m/V (GLC1; GLC3) lub sacharozę (POCH) o stężeniu 1 lub 3% m/V (SUC1; SUC3). Jako kontrolę przygotowano pożywki z mannitolem (POCH) zamiast cukru, których osmotyczność była równa osmotyczności podłoży z glukozą (1% m/V mannitolu, MAN1; 3% m/V mannitolu, MAN3) lub sacharozą (0,53% m/V mannitolu, MAN0,53; 1,6% m/V mannitolu, MAN1,6) i dodatkowe podłoże bez dodatku cukru (B5Ø). Podłoża doprowadzano do pH 5,8 z użyciem roztworu NaOH. Osmotyczność wszystkich przygotowanych pożywek mierzono za pomocą osmometru Wesco Vapro, a wyniki zestawiono w Tabeli 3 w Dodatku. Pożywki w objętości 300 ml z dodatkiem 2,1 g agaru (BTL) sterylizowano w autoklawie.

### 3.3. Warunki hodowli roślin

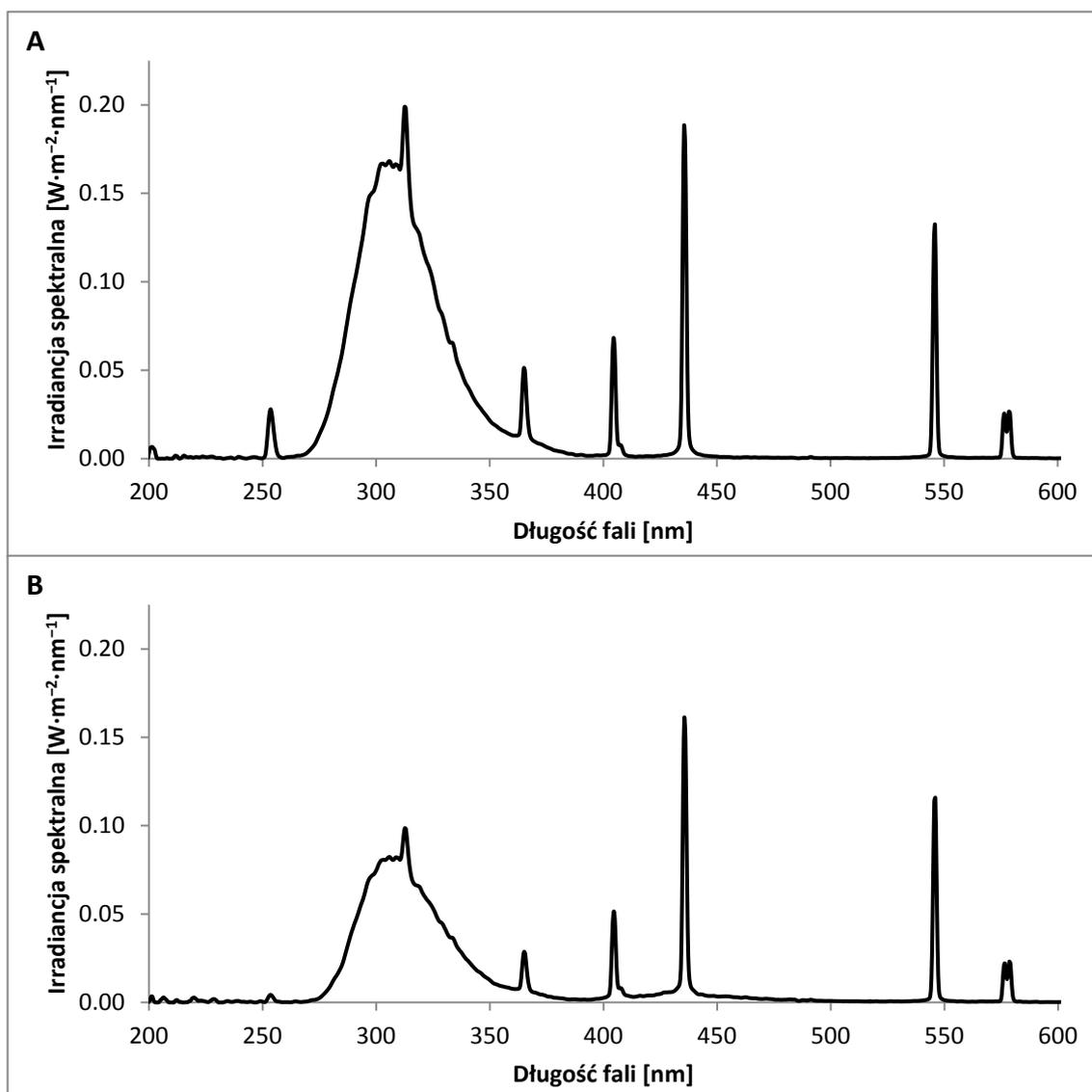
Do wszystkich eksperymentów, oprócz tych związanych z ruchami chloroplastów i jąder komórkowych, używano roślin hodowanych *in vitro*. Nasiona sterylizowano powierzchniowo: inkubowano 10 min w 1 ml wody z kroplą Tween-20 jako surfaktantu. Następnie inkubowano 5 min w 70% roztworze etanolu i kolejne 5 min w 5% podchlorynu sodu (50% Ace), kilkakrotnie płukano w jałowej wodzie destylowanej. Sterylne nasiona wysiewano na plastikowe szalki z podłożem B5 z 1% sacharozy, zestalonym 0,7% agarem. Nasiona stratyfikowano przez 2 dni w temperaturze 4°C, następnie przenoszono do komory hodowlanej z fotoperiodem 10 h światła/14 godzin ciemności, ze światłem fluorescencyjnym (Philips Master TL-D 36W/840) o natężeniu 60-100  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  i stałą temperaturą 22°C. Po upływie 5 dni siewki przenoszono w warunkach jałowych do pojemników polipropylenowych (średnica: 100 mm, wysokość: 40 mm, SPL Life Sciences, Korea) zawierających jedno z podłoży: GLC1; GLC3; SUC1; SUC3; MAN0,53; MAN1; MAN1,6; MAN3 i B5Ø. W każdym pojemniku równomiernie rozmieszczano po 25 siewek.

Rośliny do hodowli ziemnych wysiewano na nasączone wodą koreczki torfowe (Jiffy Products International AS, Norwegia), następnie stratyfikowano przez 2 dni

w temperaturze 4°C, po czym hodowano w komorze fitotronowej (Sanyo MLR-351H, Japonia) w fotoperiodzie 10 godzin światła ( $60-100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , świetlówki: Philips Master TL-D 36W/840 i Osram Fluora 36W/77) i 14 godzin ciemności w stałej temperaturze 22°C. Rośliny hodowano przez 5-6 tygodni, po czym zaciemniano na noc (>8 h) przed właściwym eksperymentem.

### **3.4. Naświetlanie UV**

Do naświetlania UV wykorzystywano komorę (P.H.U. Chłodnictwo FD-12) z zamontowanymi świetlówkami Ushio G8T5E. Rośliny naświetlano w odległości 14 cm od lamp, dzięki czemu docierało do nich UV-B o natężeniu ok.  $8 \text{ W}\cdot\text{m}^{-2}$ . Naświetlanie prowadzono przez 5 minut do wszystkich testów, a oprócz tego przez 60 minut do pomiaru  $F_v/F_m$  oraz do obserwacji wzrostu i rozwoju roślin. 5-minutowe naświetlania były prowadzone na odkrytych szalkach, a widmo promieniowania mierzone na poziomie naświetlanych próbek przedstawiono na Rysunku 2A. Dłuższe naświetlania prowadzono w zamkniętych pojemnikach hodowlanych. Widmo światła transmitowanego do próbek przez wieczko przedstawiono na Rysunku 2B. Uzyskano w ten sposób dawki UV-B odpowiednio: około 2,5 i  $28 \text{ kJ}\cdot\text{m}^{-2}$ .



**Rysunek 2.** Widmo światła ze świetlówek Ushio G8T5E mierzone na poziomie naświetlanych próbek A) w otwartych szalkach hodowlanych; B) w zamkniętych szalkach hodowlanych.

### 3.5. Oświetlenie do badania zależnej od światła naprawy DNA

W celu zbadania zależnej od światła naprawy DNA używano światła monochromatycznego niebieskiego o długości fali 470 nm i natężeniu  $100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . Fotoreaktywację prowadzono przez 4 godziny w stałej temperaturze  $22^\circ\text{C}$ . Kontrolę stanowiły rośliny, które po naświetleniu UV inkubowano przez 4 godziny w ciemności.

### **3.6. Określenie wpływu cukrów w pożywce na wzrost i rozwój roślin po działaniu UV**

Rośliny hodowane *in vitro* przez 5 dni na pożywce SUC1 i kolejne 7 dni na wszystkich testowych pożywkach naświetlano dawką UV równą: 2,5 lub 28 kJ·m<sup>-2</sup>, następnie dalej hodowano w tych samych warunkach. Obserwacji dokonywano po 7 i 14 dniach od naświetlenia, zliczano rośliny zielone, posiadające widoczne chlorozy i nekrozy oraz kwitnące (widoczny pęd kwiatowy).

### **3.7. Oznaczenie maksymalnej wydajności kwantowej fotosystemu II**

W celu określenia maksymalnej wydajności kwantowej fotosystemu II, będącego wyznacznikiem stanu fizjologicznego roślin wykorzystano fluorometr FluorCam. Rośliny hodowane na testowanych pożywkach naświetlano różnymi dawkami UV, a następnie adaptowano do ciemności przez 10 minut. Szalki umieszczano w aparacie i uruchamiano pomiar. Program składał się z 27 sekund ciemności, po których następował błysk białego światła. Mierzonym parametrem było natężenie fluorescencji chlorofilu, z którego następnie wyznaczono maksymalną wydajność kwantową PSII ( $F_v/F_m$ ).

### **3.8. Analiza HPLC**

Analizę barwników za pomocą HPLC prowadzono we współpracy z dr hab. Joanną Grzyb z Uniwersytetu Warszawskiego metodą opisaną w pracy Sztatelman et al., 2015. Ekstrakcję barwników prowadzono w 0,5 ml metanolu w ceramicznym moździerz, następnie moździerz i tłuczek przemywano dodatkowo 1 ml metanolu. Ekstrakt wirowano (14 tys. g, 1 min). Nadsącz zbierano i używano do analizy HPLC. 100 µl ekstraktu barwników ładowano na kolumnę podłączoną do chromatografu Akta Purifier (GE Healthcare). Kolumna była zrównoważona 5 ml solwentu A (90% acetonitrylu, 10% wody), a elucję prowadzono za pomocą gradientu z solwentem B (100% octan etylu) w następujących etapach: 1-5 ml, od 100% do 80% A; 5-20 ml, od 80% do 50% A; 20-25 ml, od 50% do 30% A; 25-30 ml, 30% A; 40-45 ml, 30% do 100% A. Prędkość przepływu wynosiła 1 ml·min<sup>-1</sup>. Mierzono absorbancję eluentu przy trzech długościach fali (405 nm, 436 nm i 280 nm). Analizę chromatogramu i integrację krzywej wykonano za pomocą programu Unicorn (GE Healthcare). Do obliczenia zawartości chlorofili i karotenoidów wykorzystano współczynniki ekstynkcji

(Sztatelman et al., 2015). Zawartość związków polifenolowych przedstawiono w jednostkach względnych.

Analiza tokochromanoli została przeprowadzona przez prof. dr. hab. Jerzego Kruka z Uniwersytetu Jagiellońskiego metodą opisaną w pracy: Szymańska & Kruk, 2010.

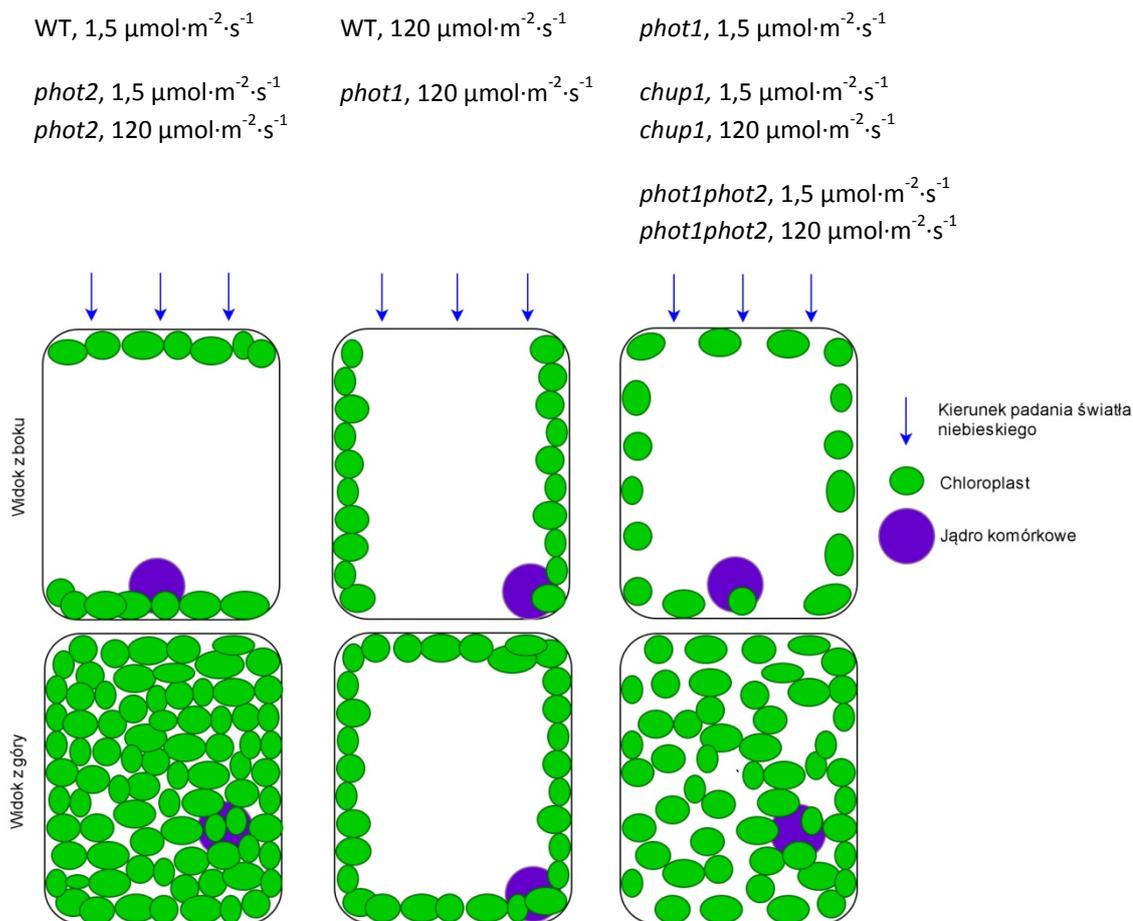
### **3.9. Pomiar poziomu uszkodzeń DNA i ich naprawy**

Rośliny po 7 dniach od przeniesienia na pożywki z cukrami/mannitolem naświetlano dawką UV równą  $2,5 \text{ kJ}\cdot\text{m}^{-2}$ , a następnie ok. połowę (12–13) roślin z każdej szalki natychmiast zbierano i w całości zamrażano w ciekłym azocie, a pozostałe przez 4 godziny pozostawiano w ciemności lub oświetlano niebieskim światłem (470 nm;  $100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ). Kolejne próbki zbierano i zamrażano w ciekłym azocie po 4-godzinnej inkubacji.

#### **3.10. Określenie wpływu ustawienia chloroplastów i jąder komórkowych na poziom uszkodzeń DNA**

5- lub 6-tygodniowe rośliny z hodowli ziemnej adaptowano do ciemności przez noc, a następnie w słabym zielonym świetle przygotowywano do eksperymentu. Z roślin pobierano liście, które następnie układano płasko na szalkach plastikowych z papierowym ręcznikiem nasączonym wodą. Tak przygotowane liście umieszczano w słabym ( $1,5 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) lub silnym ( $120 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) monochromatycznym świetle niebieskim (470 nm) na 4 godziny. Następnie liście na szalkach naświetlano dawką UV równą  $2,5 \text{ kJ}\cdot\text{m}^{-2}$ , po czym zbierano i zamrażano w ciekłym azocie (do izolacji DNA jądrowego) lub umieszczano w łaźni wodno-lodowej i od razu przeprowadzano izolację chloroplastów.

Spodziewane rozmieszczenie organelli w zależności od natężenia użytego światła



**Rysunek 3.** Schematyczne przedstawienie spodziewanego rozmieszczenia chloroplastów i jądra komórkowego w dzikim typie i mutantach genów związanych z ruchami chloroplastów *A. thaliana* w zależności od natężenia światła niebieskiego użytego do naświetlania.

### 3.11. Izolacja jąder komórkowych

Jądra komórkowe izolowano opisaną wcześniej metodą (Xu & Copeland, 2012). Głęboko zamrożony materiał roślinny (po ok 50 liści na jedną próbkę) homogenizowano w moździerzu ceramicznym schłodzonym za pomocą ciekłego azotu. Następnie próbkę przenoszono do 5 ml buforu lizującego (skład umieszczono w Dodatku) i intensywnie mieszano. Wszystkie kolejne etapy izolacji prowadzono w łaźni wodno-lodowej. Zawiesinę sączono przez filtry nylonowe o średnicy otworów kolejno: 100  $\mu\text{m}$ , 70  $\mu\text{m}$  i 30  $\mu\text{m}$ , następnie wirowano (1500g, 10 min, 4°C). Nadsącz zebrano pipetą, a osad zawieszono w 2 ml buforu do zawieszania (skład zamieszczono w Dodatku) i ponownie wirowano w tych samych warunkach. Tę procedurę powtarzano

5-krotnie, aż do uzyskania białej barwy osadu, który następnie zamrażano w ciekłym azocie i przechowywano w  $-80^{\circ}\text{C}$  do czasu izolacji DNA.

### **3.12. Izolacja chloroplastów**

Izolację chloroplastów prowadzono za pomocą zestawu Minute Chloroplast Isolation Kit (Invent Biotechnologies, Inc.) według protokołu dostarczonego przez producenta. 4–5 świeżych liści umieszczano w probówce z filtrem z zestawu do izolacji, następnie zgniatano końcówką od pipety, żeby zmniejszyć objętość. Dodano 200  $\mu\text{l}$  zimnego Buforu A, ucierano przez około 2 minuty plastikowym patyczkiem dołączonym do zestawu do izolacji, następnie wirowano (2000 g, 3 min,  $4^{\circ}\text{C}$ ). Nadsącz zebrano pipetą, a osad zawieszono w 500  $\mu\text{l}$  zimnego Buforu B i ponownie wirowano (2000 g, 3 min,  $4^{\circ}\text{C}$ ). Uzyskany osad zamrażano i przechowywano w  $-80^{\circ}\text{C}$  do czasu izolacji DNA.

### **3.13. Izolacja DNA**

Próbki homogenizowano w ciekłym azocie (dla wyizolowanych wcześniej jąder komórkowych i chloroplastów ten krok pominięto), następnie izolowano DNA z użyciem zestawu DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) wg instrukcji załączonej przez producenta z niewielkimi zmianami. Do próbek dodawano 400  $\mu\text{l}$  Buforu AP1 i 3  $\mu\text{l}$  RNase A, następnie intensywnie mieszano i inkubowano w temperaturze  $65^{\circ}\text{C}$  przez 10 minut. Do próbek dodawano 130  $\mu\text{l}$  Buforu P3, po czym mieszano i inkubowano na lodzie przez 5 minut. Całość próbki przeniesiono na kolumny QIAshredder i wirowano przy 20 tys. g przez 2 minuty w temperaturze pokojowej. Przesącz (ok. 500  $\mu\text{l}$ ) przenoszono do nowej probówki i zmieszano z 750  $\mu\text{l}$  Buforu AW1, dokładnie mieszano przez pipetowanie po czym w dwóch porcjach nakładano na kolumnę DNeasy Mini spin i wirowano (10 tys. g, 1 min). Kolumnę płukano 500  $\mu\text{l}$  Buforu AW2, wirowano (10 tys. g, 1 min), następnie płukano ponownie 500  $\mu\text{l}$  Buforu AW2 i wirowano (20 tys. g, 2 min). Suchą kolumnę przenoszono do nowej probówki, po czym prowadzono elucję: dodano 100  $\mu\text{l}$  Buforu AE, inkubowano w temperaturze pokojowej przez 5 minut i wirowano przez 1 minutę przy 10 tys. g. Stężenie uzyskanego DNA mierzono przy użyciu Quant-iT™ PicoGreen™ dsDNA Assay Kit (Invitrogen). W tym celu po 5  $\mu\text{l}$  próbki nakładano na czarną, polistyrenową płytkę 96-dołkową (Grenier) i rozcieńczano 95  $\mu\text{l}$  buforu TE. Do wyznaczenia krzywej standardowej użyto serii rozcieńczeń  $\lambda\text{DNA}$  w buforze TE o stężeniach od 2 ng/ml do



2 µg/ml i nakładano po 100 µl do dołków. Jako próby ślepej używano czystego buforu TE. Następnie roztwór PicoGreen rozcieńczano 200-krotnie w TE i nakładano po 100 µl do każdego dołka. Płytkę inkubowano w ciemności przez 5 minut. Mierzono fluorescencję o długości fali emisji 535 nm, wzbudzaną światłem o długości fali 485 nm, używając czytnika mikroplatek Infinite F200 PRO (TECAN). Stężenia próbek wyliczano na podstawie wzoru dla krzywej regresji wyznaczonej z pomiarów próbek o znanym stężeniu po odjęciu wartości próby ślepej. DNA przechowywano zamrożone w -20°C i wykorzystywano do oznaczeń poziomu uszkodzeń za pomocą ELISA.

### **3.14. Pomiar ilości dimerów pirymidynowych w DNA za pomocą testu immunoenzymatycznego (ELISA)**

Na transparentne, polistyrenowe płytki 96-dołkowe o wysokim wiązaniu białek (Grenier) nakładano po 50 µl/dołek wodnego roztworu 0,003% siarczanu protaminy (Sigma-Aldrich) i inkubowano przez noc w 37°C. Płytki płukano następnie trzykrotnie wodą destylowaną (50 µl na dołek) i przechowywano w ciemności do czasu wykonywania oznaczeń.

Z wyizolowanego DNA przygotowywano próbki o stężeniu 0,1 ng/µl w roztworze soli buforowanym fosforanem (PBS; ang. Phosphate-buffered saline), po czym kontrolnie mierzono ich stężenie z użyciem Quant-iT™ PicoGreen™ dsDNA Assay Kit (Invitrogen). Próbki inkubowano w 98°C przez 10 minut, następnie szybko przenoszono do łaźni wodno-lodowej i inkubowano kolejne 15 minut, uzyskując w ten sposób jednoniciowe DNA (ang. single stranded DNA, ssDNA). Tak przygotowane próbki nakładano w trzech powtórzeniach po 50 µl do opłaszczonych wcześniej siarczanem protaminy dołków i inkubowano przez noc w 37°C. Wszystkie kolejne inkubacje przed nałożeniem substratu prowadzono przez 30 minut w 37°C, a pomiędzy każdymi dwoma krokami wykonywano 4-krotne płukanie 150 µl PBS z 0,05% Tween-20 na dołek. W celu uniknięcia bezpośredniego wiązania przeciwciał do powierzchni płytki, dodawano 150 µl/dołek PBS z dodatkiem 5% odtłuszczonego mleka w proszku. Używano rozcieńczonych 1:2000 w PBS mysich przeciwciał monoklonalnych TDM-2 lub 64M-2 (do wykrywania odpowiednio CPD i 6-4 PPs; CosmoBio; Mori et al., 1991). Następnie nakładano fragmenty F(ab')<sub>2</sub> poliklonalnych kozich IgG skierowane przeciwko mysim IgG sprzężone z biotyną (Novex), rozcieńczone w PBS 1:4000. Kolejnym krokiem było nałożenie streptawidyny sprzężonej z peroksydazą chrzanową

(ang. horseradish peroxidase, HRP; R&D Systems) rozcieńczonej w PBS wg zaleceń producenta (1:200). W celu detekcji związanego HRP używano mieszaniny substratów firmy R&D Systems – po zmieszaniu roztworu A (zawierającego stabilizowany nadtlenek wodoru) i B (zawierającego stabilizowaną 3,3',5,5'-tetrametylobenzydynę, TMB) nakładano po 100 µl do dołków, a reakcję zatrzymywano po 4 minutach przez dodanie po 50 µl 1 M roztworu kwasu siarkowego (VI) do każdego dołka. Pomiar absorbancji prowadzono przy pomocy czytnika do mikropłytek Infinite F200 PRO (TECAN) przy długości fali 450 nm.

### 3.15. Oznaczenie poziomu ekspresji genów

W celu oznaczenia ekspresji genów związanych z naprawą DNA rośliny hodowane *in vitro* przez 7 dni od pasażu na podłożach B5Ø, GLC1, GLC3, SUC1, SUC3, MAN0,53, MAN1, MAN1,6 i MAN3 (patrz: Warunki hodowli roślin) zbierano i zamrażano w ciekłym azocie. Aby oznaczyć poziom ekspresji genów *CO* i *FT* uczestniczących w indukcji kwitnienia, zebrano rośliny naświetlone UV (2,5 kJ·m<sup>-2</sup>) i nienaświetloną kontrolę (ze wszystkich podłoży) tuż przed końcem fotoperiodu (po 10 godzinach światła) w 1. i 2. dniu po naświetleniu. Zbiór pod koniec fotoperiodu miał na celu zmierzenie maksymalnych poziomów transkryptów *CO* i *FT*, które przypadają na koniec fotoperiodu (Yanovsky & Kay, 2002). Na każdą pojedynczą próbkę składało się ok. 25 siewek zebranych z pojedynczej szalki hodowlanej. Następnie wszystkie próbki roślinne homogenizowano w temperaturze ciekłego azotu i izolowano RNA za pomocą zestawu Spectrum Plant Total RNA (Sigma) według dołączonej instrukcji wraz z etapem trawienia DNA za pomocą On-Column DNase I Digestion Set (Sigma). W celu sprawdzenia integralności uzyskanego RNA prowadzono każdorazowo elektroforezę w buforze TAE (40 mM Tris, 0,15% kwas octowy, 1 mM EDTA) w żelu agarozowym (2% agarozy w TAE, z dodatkiem 2 µl/100 ml Midori Green Advance, Nippon Genetics). Wyraźnie widoczne prążki, m. in o wielkości ok. 4 kbp i 2 kbp (odpowiadające 25S i 28S rRNA *A. thaliana*) w obrazie elektroforetycznym wszystkich próbek potwierdzały obecność niezdegradowanego RNA we wszystkich próbkach. Stężenia otrzymanego RNA oraz współczynniki A280/A260 oraz A230/A260 mierzono na aparacie NanoPhotometer (Implen, Niemcy). Wszystkie uzyskane próbki miały współczynniki A280/A260 zawierające się pomiędzy 1,8 a 2,0 oraz A230/A260 pomiędzy 2,0 i 2,2.

Reakcję odwrotnej transkrypcji prowadzono używając odczynników firmy ThermoScientific i protokołu producenta. Do 1 µg RNA dodawano 1 µl roztworu startera oligo(dT)18 i sterylnej wody wolnej od nukleaz (Sigma) do objętości 12,5 µl. Następnie mieszano i inkubowano w termocyklerze (Bio-Rad T100 Thermal Cycler) 65°C przez 5 minut, po czym schładzano do 4°C. Próbkę umieszczano w łaźni wodnolodowej po czym dodawano 4 µl 5-krotnie stężonego buforu reakcyjnego, 0,5 µl inhibitora RNaz RiboLock (40 U/µl), 2 µl mieszaniny dNTP (10 mM każdego nukleotydu) i 1 µl odwrotnej transkryptazy RevertAid (200 U/µl). Całość dokładnie mieszano przez pipetowanie, krótko wirowano i inkubowano w termocyklerze (Bio-Rad T100 Thermal Cycler) w 42°C przez 60 minut, po czym w 70°C przez 5 minut. Uzyskane cDNA rozcieńczano dwukrotnie sterylną wodą wolną od RNaz (Sigma). Do oznaczenia poziomu ekspresji genów używano SYBR Green JumpStart Taq ReadyMix (Sigma) i aparatu Rotor-Gene Q (Qiagen). Mieszaniny reakcyjne przygotowywano przez zmieszanie 570 µl SYBR Green JumpStart Taq ReadyMix, po 57 µl starterów i 304 µl wody wolnej od nukleaz (Sigma), a następnie rozdzielano po 13 µl i dodawano po 2 µl rozcieńczonego cDNA, co odpowiadało 50 ng RNA. Reakcję PCR w czasie rzeczywistym prowadzono w trzech powtórzeniach dla każdej próbki. W celu normalizacji uzyskanych wyników przeprowadzono dodatkowe reakcje ze starterami specyficznymi dla genów referencyjnych – *PDF*, *SAND* i *UBC* (Czechowski et al. 2005). Wszystkie używane startery wraz z używanymi temperaturami przyłączenia i temperaturami topnienia podanymi przez producenta (Genomed S.A.) zestawiono w Tabeli 2. Reakcję prowadzono w następujących warunkach: 10 min w 95°C, 15 s w 95°C, 15 s w temperaturze przyłączenia zależnej od użytych starterów (patrz: Tabela 2) i 20 s w 72°C; wszystkie etapy, oprócz początkowej denaturacji, powtórzono 40 razy. Następnie próbki były grzane w tempie 1°C/5 s w celu uzyskania krzywych topnienia, których analiza posłużyła do sprawdzenia specyficzności przeprowadzonych reakcji. Względą ekspresję genu określano przy użyciu jako odnośnika średniej wartości cyklu granicznego (*Ct*, ang. threshold cycle) dla wszystkich badanych próbek. Współczynniki do normalizacji obliczono na podstawie wartości uzyskanych dla genów referencyjnych za pomocą programu geNorm v3.4 (Vandesompele et al., 2002). Każda wartość względnej ekspresji stanowi średnią z 6 powtórzeń dla próbek z pożywek GLC1, GLC3, SUC1, SUC3, B5Ø lub 4 powtórzeń dla próbek z pożywek MAN0,53, MAN1, MAN1,6, MAN3.

Nazwa genu	Starter	Sekwencja 5' - 3'	Temperatura topnienia [°C]	Temperatura przyłączenia użyta w real-time PCR [°C]
<i>UVR3</i>	For	TCCGGTTCTTGCTTGAGAGT	51.8	55
	Rev	CAAAGCAAAGCCTCTTCACC	51.8	
<i>APE1L</i>	For	ATGTCATCGCCATACAGGAAG	52.4	55
	Rev	GACTTGAGAGAGCCCGTGTC	55.9	
<i>APE2</i>	For	CCATCAAAGCACTTGAGCCATTCTT	56.0	55
	Rev	GAAACCGAGCCAGTTGAATGATAGC	57.7	
<i>DDB1A</i>	For	TCCGCGTAGTTCGCAATGGAATAG	57.4	53
	Rev	CACAGCATCATGGCAAAATAACGTC	56.0	
<i>DDB1B</i>	For	CTCGTATCTGGACAATGCTGTCGTC	59.3	53
	Rev	TGCGAACTATGCGAAGAGAACCATC	57.7	
<i>RAD1</i>	For	TGCAGCTTGAAGATTGCATCACA	53.5	53
	Rev	CCGGAACAACCTCCATCAAGAATCC	57.4	
<i>RAD23A</i>	For	TCCCTCTGGAGGCCCTAATTCAT	57.1	55
	Rev	AGAATCTGGGGTTGGAATTGACC	57.4	
<i>UVH6</i>	For	AGAGAATGCCCCATATTCCAGATCC	57.7	53
	Rev	TGATCACTCCCCGAGTTAGAACCA	57.7	
<i>BRCA1</i>	For	CCATGTATTTGCAATGCGTG	50.5	55
	Rev	TGTGGAGCACCTCGAATCTCT	54.4	
<i>RAD51</i>	For	CGAGGAAGGATCTCTTGAG	53.8	55
	Rev	GCACTAGTGAACCCAGAGG	55.9	
<i>KU70</i>	For	CCCTTTATAGTGCTCTCTGGGTTG	57.4	55
	Rev	GAGATGCCAAGGTCTTGTGCAT	54.8	
<i>MLH1</i>	For	GGCACAACGTGAATGGTCAATCC	57.1	53
	Rev	GCGGTTTCAGTTAGCATCGTTCCG	57.1	
<i>MSH7</i>	For	GGCTTGGCGCATCTGATAGAATC	57.1	53
	Rev	GCAATGGCGTATCCATCGAAAGT	55.3	
<i>GYRA</i>	For	ACGGGTCCATGGCTATTATTCGTG	57.4	53
	Rev	CGGCATGATCTAGCCGCATAAGA	57.1	
<i>GYRB1</i>	For	ACGATGCTGGGATACGCGAATAG	57.1	53
	Rev	TGCAATTCCAAGTACTCCGTGAGG	57.4	
<i>PCNA1</i>	For	CAGAACACAACCTGTAGACAAG	50.5	53
	Rev	CATTTTAGAATGAAGAGAAATTGTGG	51.7	
<i>PCNA2</i>	For	TCAGGCAGAATACTACCGTC	51.8	53
	Rev	AACGAAGACTATCAAACATTCATC	50.6	
<i>PDF</i>	For	TAACGTGGCCAAAATGATGC	49.7	56
	Rev	GTTCTCCACAACCGCTTGGT	53.8	
<i>SAND</i>	For	AACTCTATGCAGCATTGATCCACT	54.4	56
	Rev	TGATTGCATATCTTTATCGCCATC	52.3	
<i>UBC</i>	For	CTGCGACTCAGGGAATCTTCTAA	55.3	56
	Rev	TTGTGCCATTGAATTGAACCC	50.5	
<i>CO</i>	For	CAACGACAATGGTTCCATTAACC	53.5	53
	Rev	GCTGTTGTGACACATGCTGTTGAC	57.4	
<i>FT</i>	For	GGATCTAAGGCCTTCTCAGG	53.8	53
	Rev	GACTTGGAACATCTGGATCC	51.8	

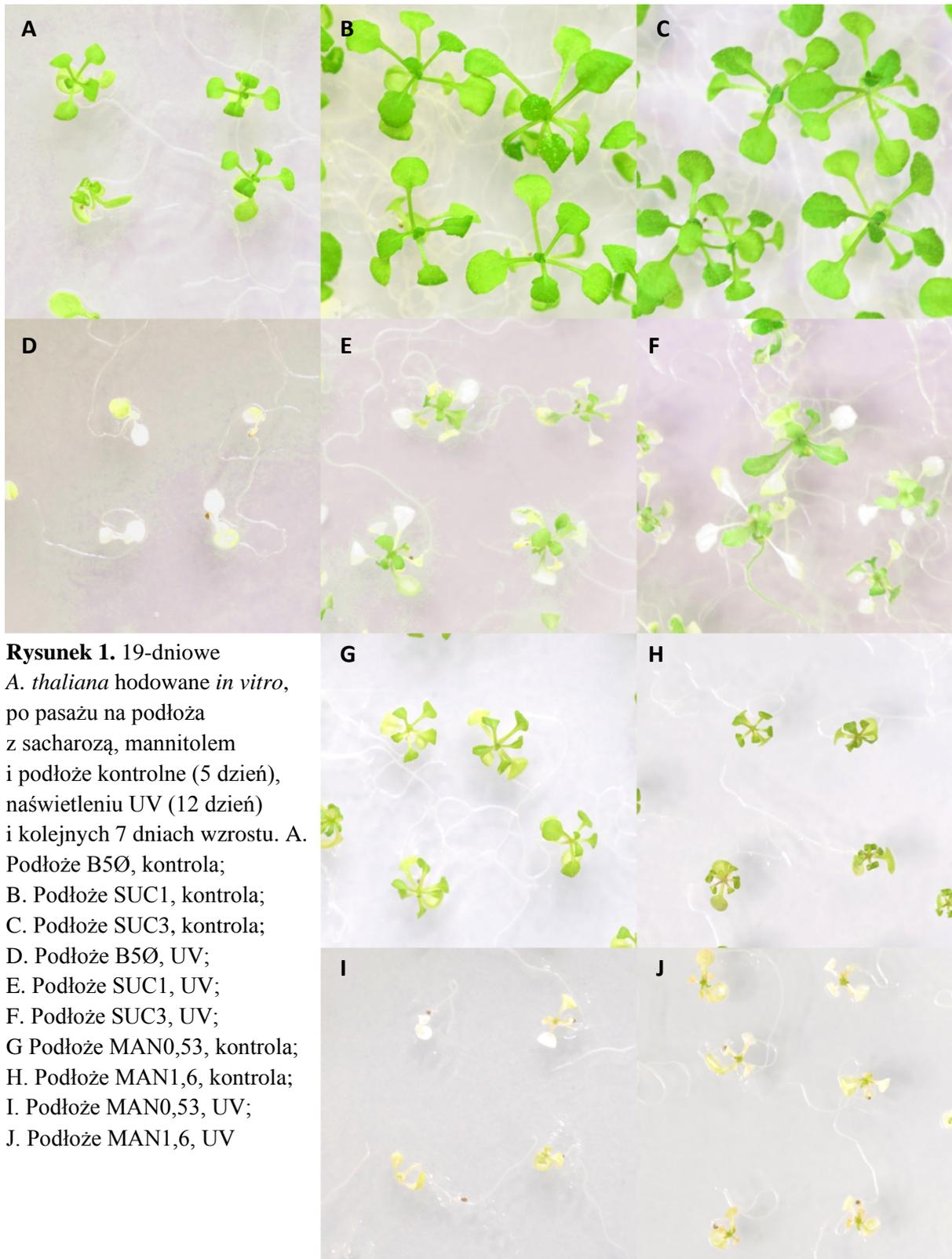
**Tabela 2.** Sekwencje starterów używanych do real-time PCR w celu oznaczenia poziomów transkryptów genów związanych z naprawą DNA i indukcją kwitnienia oraz genów referencyjnych.

## 4. Wyniki

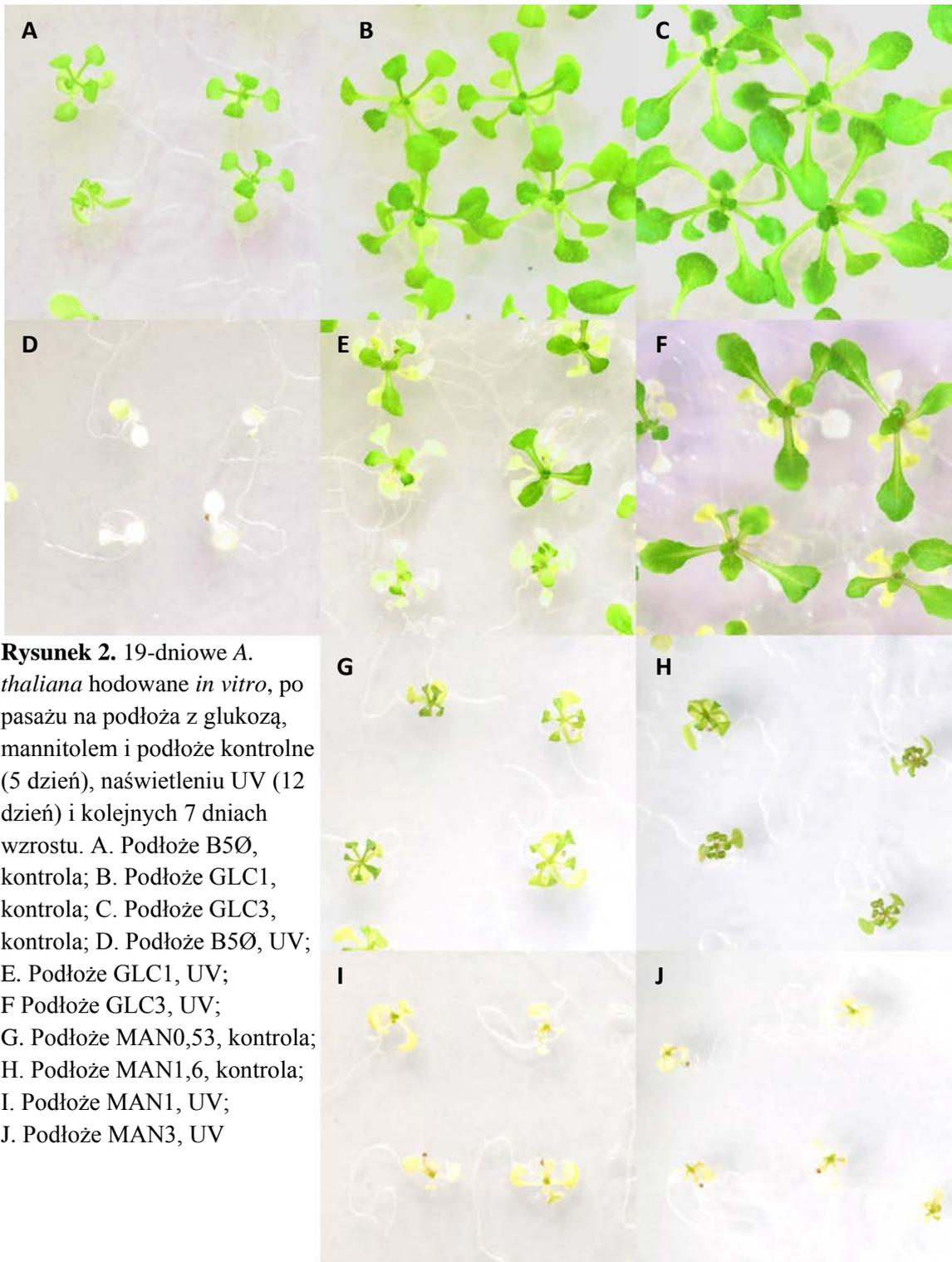
### 4.1. Wpływ cukrów dodanych do pożywki na wzrost i rozwój roślin naświetlanych UV

W celu określenia wpływu cukrów na odporność roślin na działanie UV, siewki po 5 dniach wzrostu *in vitro* na podłożu B5 z 1% sacharozy (SUC1) pasażowano na pożywkę z dodatkiem cukrów lub mannitolu oraz kontrolną pożywkę B5 bez dodatków. Hodowle prowadzono przez 7 dni po czym rośliny naświetlano UV i umieszczano na powrót w komorze hodowlanej wraz z nienaświetlanymi roślinami kontrolnymi (patrz: Rysunek 1). Po 7 dniach od naświetlenia wykonano fotografie, których reprezentatywne fragmenty przedstawiono na Rysunkach 4 i 5, a także policzono rośliny i) zdrowe, których większość liści było zielonych, ii) silnie uszkodzone, wykazujące objawy chlorozy oraz iii) martwe, z nekrozami obejmującymi całe liście. Policzono też rośliny z widocznym pędem kwiatowym. Wyniki przedstawiono na Rysunku 6.

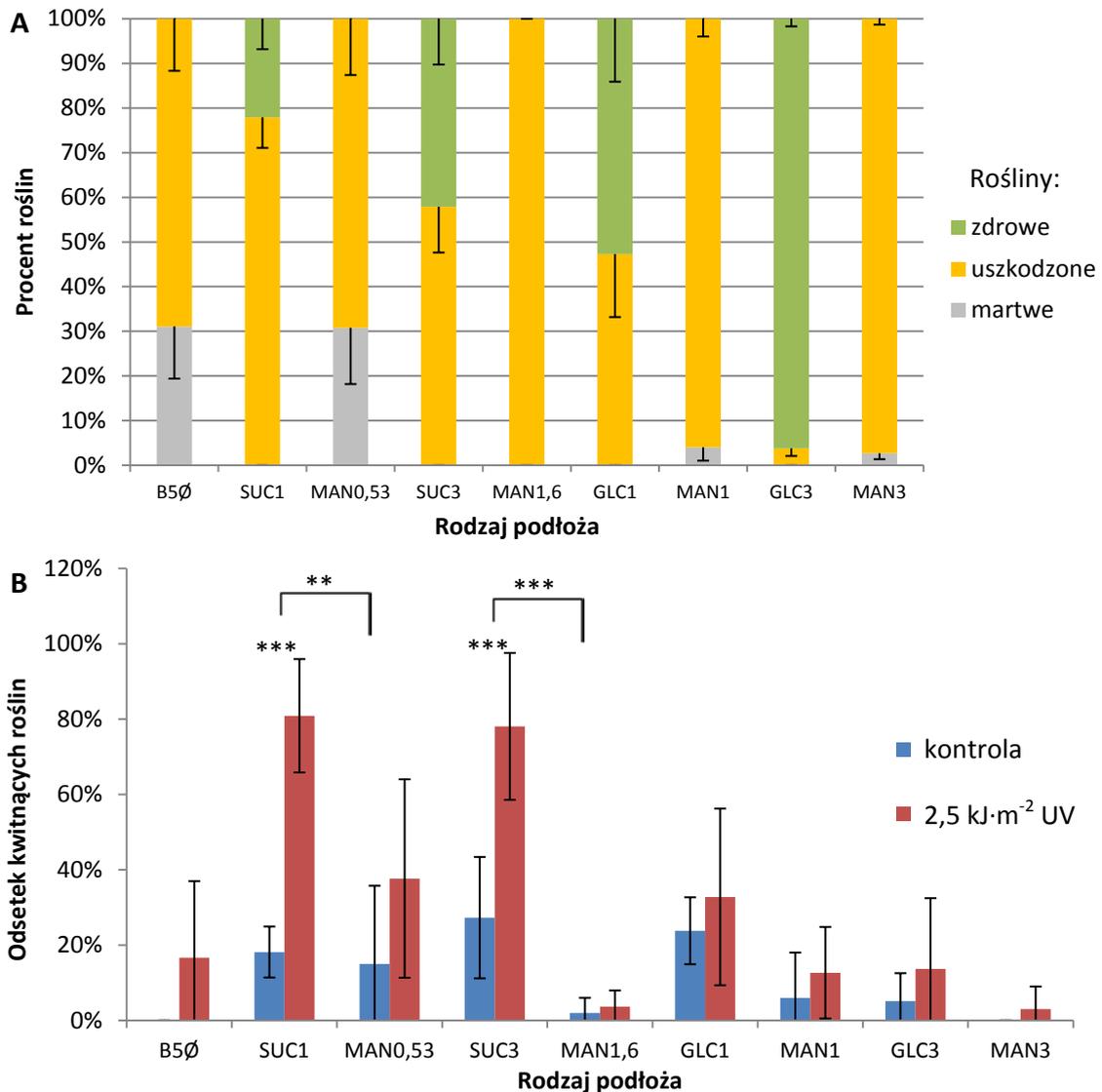
Aby sprawdzić czy przyspieszona indukcja kwitnienia zależy od receptora UV – UVR8, powtórzono doświadczenie z roślinami dzikiego typu i mutantami *uvr8*. Rośliny hodowano tak samo jak poprzednio, ale na połowę każdej szalki pasażowano 5-dniowe siewki WT a na połowę *uvr8*. Po 7 dniach od naświetlenia policzono widoczne pędy kwiatowe. Wyniki przedstawiono na Rysunku 7.



**Rysunek 1.** 19-dniowe *A. thaliana* hodowane *in vitro*, po pasażu na podłoża z sacharozą, mannitolem i podłoża kontrolne (5 dzień), naświetleniu UV (12 dzień) i kolejnych 7 dniach wzrostu. A. Podłoże B5Ø, kontrola; B. Podłoże SUC1, kontrola; C. Podłoże SUC3, kontrola; D. Podłoże B5Ø, UV; E. Podłoże SUC1, UV; F. Podłoże SUC3, UV; G Podłoże MAN0,53, kontrola; H. Podłoże MAN1,6, kontrola; I. Podłoże MAN0,53, UV; J. Podłoże MAN1,6, UV

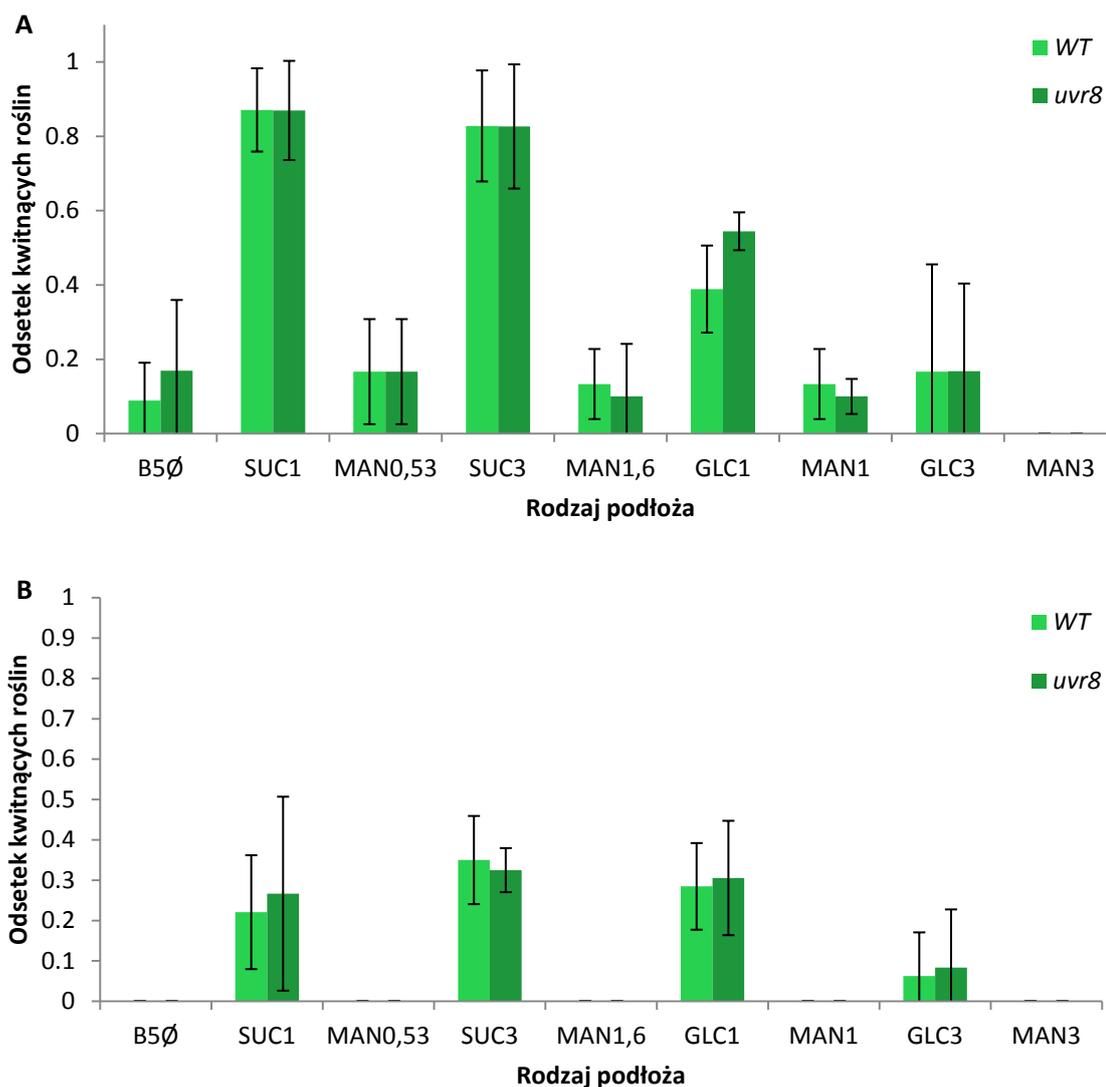


**Rysunek 2.** 19-dniowe *A. thaliana* hodowane *in vitro*, po pasażu na podłoża z glukozą, mannitem i podłoże kontrolne (5 dzień), naświetleniu UV (12 dzień) i kolejnych 7 dniach wzrostu. A. Podłoże B50, kontrola; B. Podłoże GLC1, kontrola; C. Podłoże GLC3, kontrola; D. Podłoże B50, UV; E. Podłoże GLC1, UV; F. Podłoże GLC3, UV; G. Podłoże MAN0,53, kontrola; H. Podłoże MAN1,6, kontrola; I. Podłoże MAN1, UV; J. Podłoże MAN3, UV

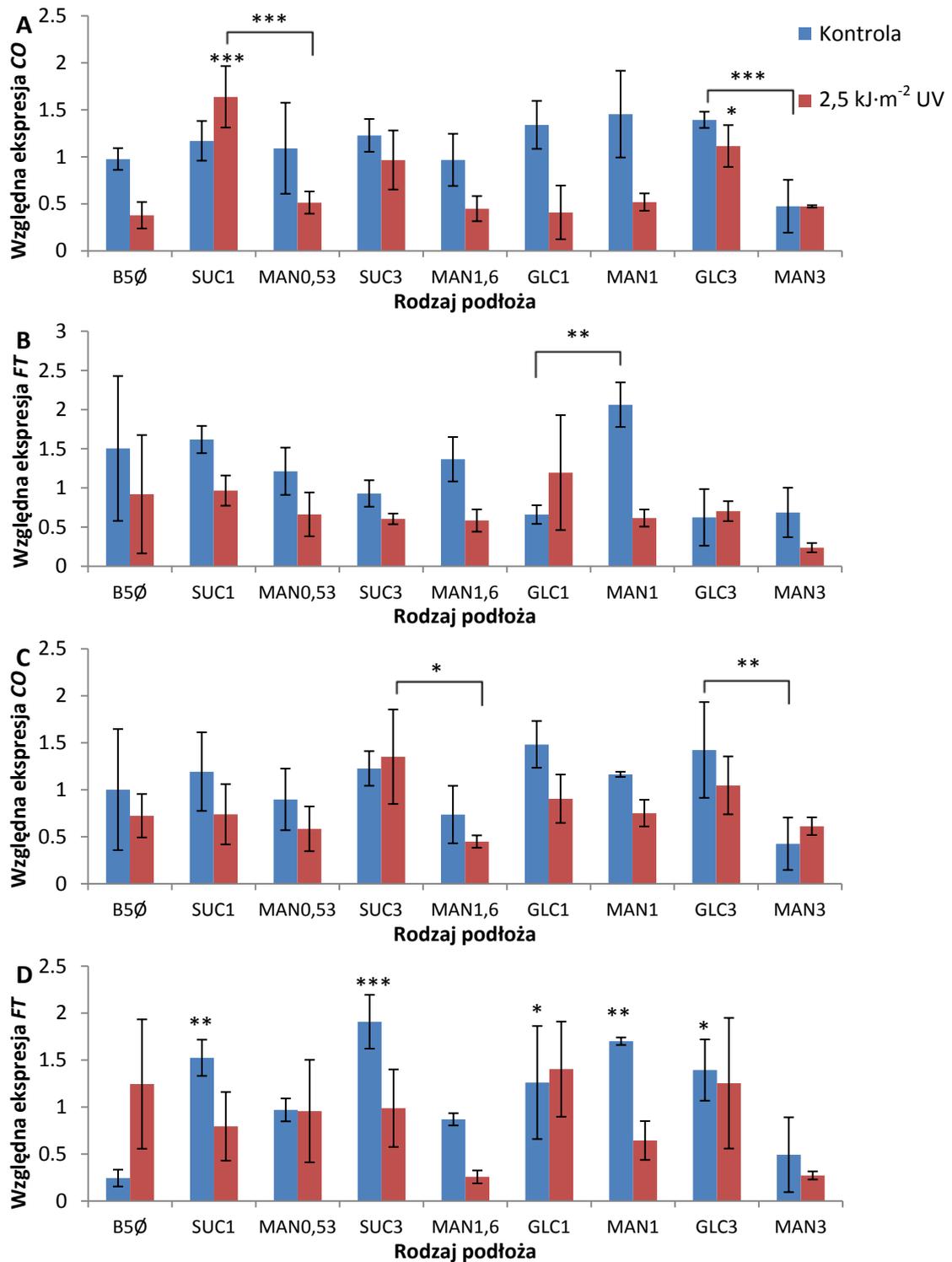


**Rysunek 6.** Wpływ cukrów w podłożu na przeżywanie i kwitnienie roślin naświetlanych UV. A) Udział roślin zdrowych, wykazujących chlorozy i nekrozy 7 dni po naświetleniu UV ( $28 \text{ kJ}\cdot\text{m}^{-2}$ ) wśród roślin rosnących *in vitro* na podłożu B5 z dodatkiem glukozy, sacharozy albo mannitolu oraz podłożu kontrolnym. Uśredniono wartości z 3 szalek dla podłoży z mannitolem lub 7 szalek dla podłoży z cukrami i podłoża kontrolnego. B) Indukcja kwitnienia po 7 dniach od naświetlenia UV ( $2,5 \text{ kJ}\cdot\text{m}^{-2}$ ) wśród roślin rosnących *in vitro* na podłożu B5 z różną zawartością glukozy, sacharozy lub mannitolu oraz na podłożu kontrolnym. Słupki przedstawiają procent roślin z widocznym pędem kwiatowym i stanowią średnią z 4 szalek dla podłoży z mannitolem lub 6 szalek dla pozostałych podłoży. Każda szalka zawierała 25 roślin i stanowiła niezależne powtórzenie biologiczne. Słupki błędów odpowiadają odchyleniom standardowym średnich wartości. Gwiazdkami oznaczono istotność statystyczną różnicy między odsetkiem roślin zaindukowanych do kwitnienia na danym podłożu i na podłożu kontrolnym B5∅, sprawdzoną testem Tukeya: \*,  $0,05 > P > 0,01$ ; \*\*,  $0,01 > P > 0,001$ ; \*\*\*,  $0,001 > P$ .





**Rysunek 7.** Indukcja kwitnienia w *Arabidopsis* typu dzikiego i *uvr8* rosnących na podłożu B5 z dodatkiem glukozy, sacharozy albo mannitolu oraz na podłożu kontrolnym. 5-dniowe siewki rosnące na podłożu B5 z 1% sacharozy przenoszono na odpowiednie podłoża, następnie po 7 dniach hodowli A) naświetlono dawką UV równą  $2,5 \text{ kJ} \cdot \text{m}^{-2}$  lub B) nie naświetlano. Liczono rośliny z widocznym pędem kwiatowym po kolejnych 7 dniach hodowli. Słupki odpowiadają średniej z 3 szalek, z których każda zawierała po 16 roślin każdej linii i stanowiła niezależne powtórzenie biologiczne. Słupki błędów reprezentują odchylenie standardowe średniej.



**Rysunek 8.** Względna ekspresja genów zaangażowanych w indukcję kwitnienia: A) *CO* i B) *FT*. *A. thaliana* hodowano *in vitro* przez 5 dni na podłożu B5 z 1% sacharozą, następnie pasażowano na podłoża B5 z różną zawartością glukozy, sacharozy lub mannitolu oraz podłoże kontrolne B5Ø. Po 7 dniach hodowli część roślin naświetlono UV (2,5 kJ·m<sup>-2</sup>). Rośliny zbierano przez kolejne dwa dni blisko końca fotoperiodu (po 10 h światła). Słupki odpowiadają wartościom średnim uzyskanym w 4 niezależnych

pomiarach. Słupki błędów reprezentują odchylenie standardowe. Gwiazdkami oznaczono istotność statystyczną różnicy między poziomem ekspresji genu w roślinach hodowanych na danym podłożu (naświetlanych UV albo kontrolnych) i w roślinach z podłoża B5Ø, lub pomiędzy roślinami z izoosmotycznymi podłożami (zaznaczono klamrą). Istotność statystyczną sprawdzono testem Tukeya: \*,  $0.05 > P > 0.01$ ; \*\*,  $0.01 > P > 0.001$ ; \*\*\*,  $0.001 > P$ .

Obecność cukru w pożywce zwiększała przeżywalność roślin po naświetleniu UV, zarówno w porównaniu z pożywką z mannitolem o tej samej osmotyczności jak i z kontrolną pożywką bez dodatku cukru. Efekt ten był silniejszy dla glukozy niż dla sacharozy oraz dla wyższego z badanych stężeń cukrów (Rysunek 6). Nienaświetlane rośliny hodowane na podłożach z dodatkiem sacharozy (Rysunek 4B,C) oraz glukozy (Rysunek 5B,C) są znacznie większe niż hodowane na podłożach z mannitolem (Rysunek 4G,H; 5G,H) lub podłożu kontrolnym (Rysunek 4A; 5A). U wszystkich roślin naświetlanych UV (Rys 4D,E,F,I,J; 5D,E,F,I,J) widoczne są uszkodzenia, obejmujące liścienie i starsze liście, jednak tylko w przypadku roślin hodowanych na pożywkach z cukrami pojawiły się nowe, zdrowe liście (Rys 4E,F; 5E,F). Liście te mają nieco zmienioną morfologię, są bardziej wydłużone i węższe niż w nienaświetlonej kontroli (Rys 4B,C; 5B,C). Po naświetleniu UV ( $28 \text{ kJ} \cdot \text{m}^{-2}$ ) obumarły niemal wszystkie rośliny na podłożu kontrolnym (Rys 4D; 5D; 6). Na podłożach z mannitolem większość roślin była mocno uszkodzona (Rys 4I,J; 5I,J).

Zaobserwowano silniejszą indukcję kwitnienia roślin rosnących na pożywce z dodatkiem zarówno 1 jak i 3% sacharozy, naświetlonych UV (Rysunek 6B). Spośród roślin nienaświetlonych UV pędy kwiatowe pojawiły się u nielicznych roślin, z wyjątkiem rosnących na podłożach B5Ø i MAN3, u których nie było ich w ogóle. Wśród roślin rosnących na podłożach z glukozą i mannitolem, średnio więcej było zaindukowanych do kwitnienia wśród roślin naświetlonych, niż nienaświetlonych, jednak różnice były niewielkie i nie były istotne statystycznie.

Nie zaobserwowano różnic w indukcji kwitnienia w badanych warunkach między dzikim typem i mutantem receptora UV-B, *uvr8* (Rysunek 7).

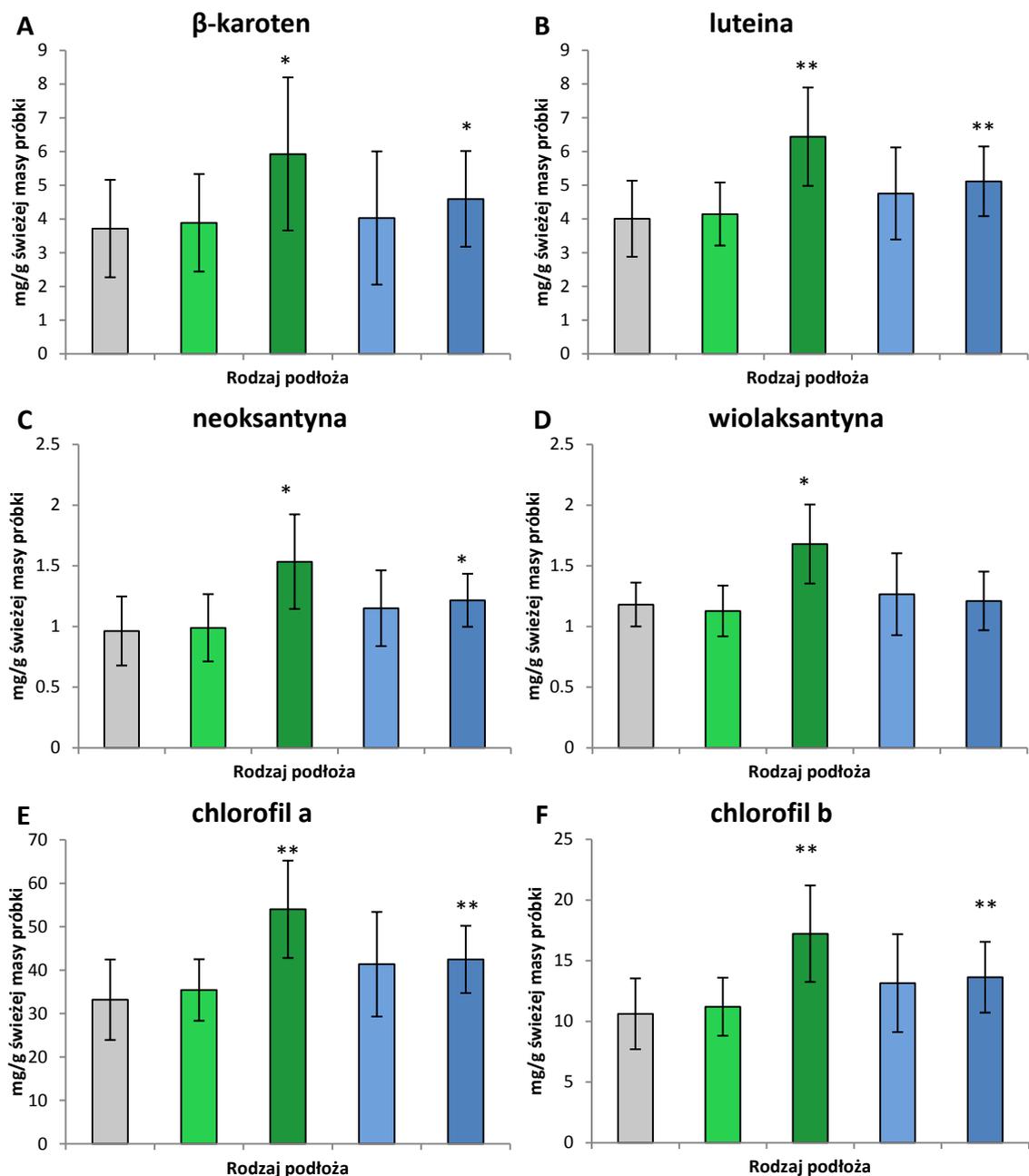
Poziom transkryptu *CO* po 1 dniu od naświetlenia UV jest nieznacznie obniżony w porównaniu z poziomem zmierzonym dla roślin nienaświetlanych w większości grup roślin, z kolei podwyższony w roślinach rosnących na podłożu SUC1 (Rysunek 8A).

Różnica ta jest istotna statystycznie w porównaniu z kontrolą z podłoża bez cukru i kontrolą z podłoża MAN0,53. W 2. dniu od naświetlenia UV poziom transkryptu *CO* w roślinach na podłożu SUC3 był istotnie wyższy niż w roślinach rosnących na podłożu MAN1,6 (Rysunek 8C). Nienaświetlane rośliny z podłoża GLC3 miały wyższy poziom transkryptu *CO* niż rośliny z odpowiadającego mu osmotycznie podłoża MAN3 (Rysunek 8C). Nie stwierdzono jednak statystycznie istotnych różnic w porównaniu z kontrolą hodowaną na B5Ø (Rysunek 8C).

W 1. dniu po naświetleniu UV poziom transkryptu *FT* nie różnił się istotnie pomiędzy większością badanych grup roślin. Jedynie pomiędzy roślinami nienaświetlonymi z podłoża GLC1 i MAN1 zaobserwowano istotną statystycznie różnicę (Rysunek 8B). W 2. dniu rośliny nienaświetlane z podłoża SUC1, SUC3, GLC1, MAN1 i MAN3 miały wyższy poziom tego transkryptu niż rośliny z podłoża kontrolnego B5Ø. Pomędzy grupami naświetlanych roślin oraz między naświetlanymi i nienaświetlanymi nie było istotnych statystycznie różnic (Rysunek 8D).

#### **4.2. Wpływ cukrów na poziom barwników fotosyntetycznych**

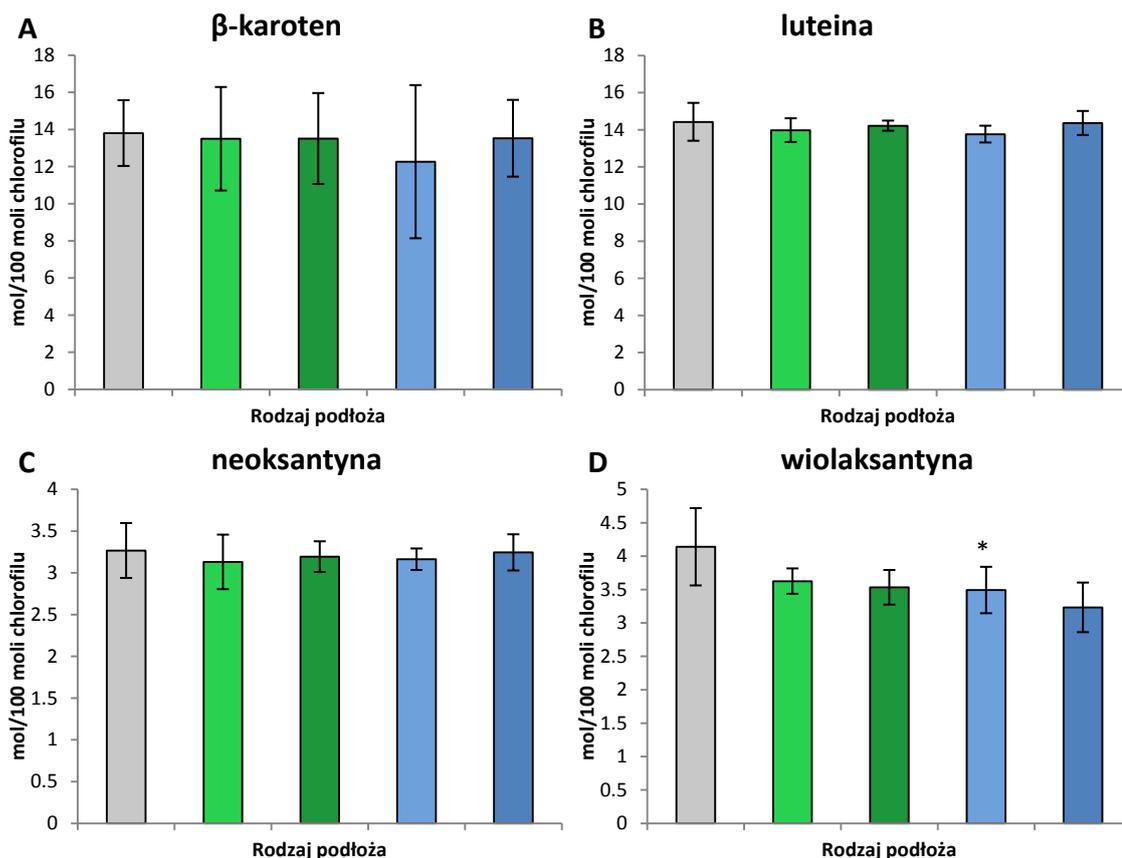
Aby określić w jaki sposób egzogenne cukry wpływają na kondycję roślin i mogą przygotowywać je na stres UV, siewki hodowane na różnych stężeniach cukrów zebrano i przeprowadzono analizę zawartości barwników fotosyntetycznych metodą HPLC. Wyniki przedstawiono na Rysunkach 9 i 10.



**Rysunek 9.** Zawartość A)  $\beta$ -karotenu; B) luteiny; C) neoksantyny; D) wiolaksantyny; E) chlorofilu a; F) chlorofilu b w siewkach *A. thaliana*, po 7 dniach wzrostu *in vitro* na podłożu B5Ø oraz B5 z dodatkiem 1 i 3% glukozy lub sacharozy. Przedstawiono wartości średnie z pomiarów 4 niezależnych próbek, składających się z 25 roślin każda, zebranych z pojedynczej szalki. Słupki błędów reprezentują odchylenia standardowe. Gwiazdkami oznaczono istotność statystyczną różnicy zawartości danego karotenoidu między roślinami z danego podłoża z cukrem i z podłoża kontrolnego B5Ø, sprawdzoną testem t-Studenta: \*,  $0.05 > P > 0.01$ ; \*\*,  $0.01 > P > 0.001$ ; \*\*\*,  $0.001 > P$ . Wyniki zostały uzyskane we współpracy z dr hab. Joanną Grzyb z Uniwersytetu Wrocławskiego.

Legenda

- B5Ø
- SUC1
- SUC3
- GLC1
- GLC3



**Rysunek 10.** Zawartość karotenoidów: A)  $\beta$ -karotenu; B) luteiny; C) neoksantyny; D) wiolaksantyny w siewkach *A. thaliana* po 7 dniach wzrostu *in vitro* na podłożu B5 z dodatkiem 1 i 3% glukozy lub sacharozy. Przedstawiono wartości średnie z 4 niezależnych pomiarów, wyrażone w molach na 100 moli sumy chlorofilu a i b. Słupki błędę reprezentują odchylenia standardowe. Gwiazdkami oznaczono istotność statystyczną różnicy między zawartością danego związku w roślinach z danego podłoża z cukrem i w roślinach z podłoża kontrolnego B5Ø sprawdzoną testem t-Studenta: \*,  $0.05 > P > 0.01$ ; \*\*,  $0.01 > P > 0.001$ ; \*\*\*,  $0.001 > P$ . Wyniki zostały uzyskane we współpracy z dr hab. Joanną Grzyb z Uniwersytetu Wrocławskiego.

Legenda

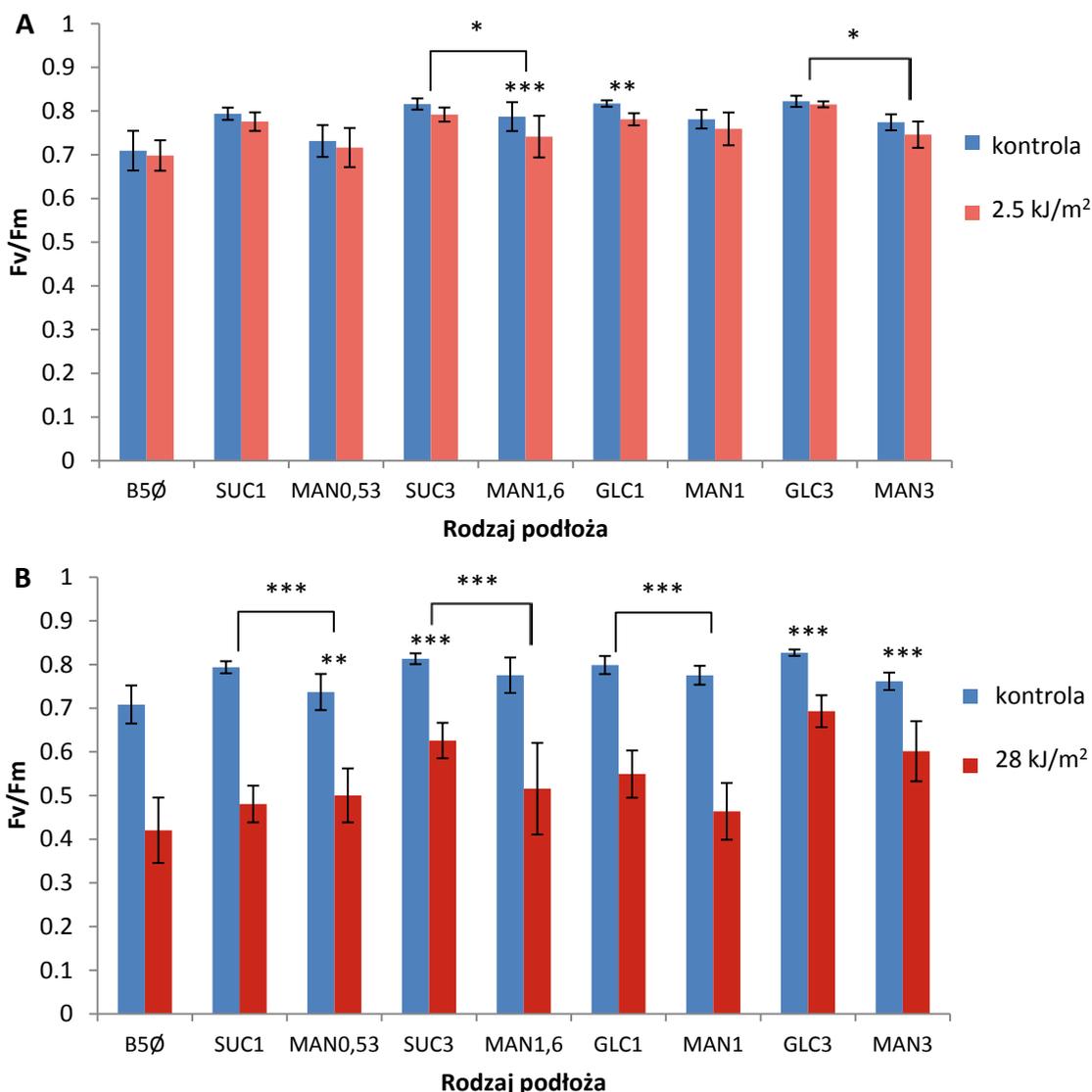
- B5Ø
- SUC1
- SUC3
- GLC1
- GLC3

Zaobserwowano podwyższony poziom wszystkich czterech oznaczonych karotenoidów: karotenu, luteiny, neoksantyny i wiolaksantyny w roślinach rosnących na podłożach z 3% stężeniem zarówno glukozy jak i sacharozy (Rysunek 9A,B,C,D). W roślinach hodowanych na podłożu SUC3 poziom karotenu, luteiny i neoksantyny był o ok. 60% większy, a wiolaksantyny o ok. 40% większy w porównaniu z hodowanymi na podłożu B5Ø (Rysunek 9A,B,C). Rośliny z podłoża GLC3 miały o ok. 25% wyższe poziomy karotenu, luteiny i neoksantyny w porównaniu z kontrolą (Rysunek 9A,B,C). Ich wyższa zawartość była jednak skorelowana ze zwiększoną ilością chlorofili. Poziom

zarówno chlorofilu a jak i chlorofilu b był o 60% większy dla roślin hodowanych na SUC3 i o 30% większy dla roślin hodowanych na GLC3 w porównaniu z kontrolą (Rysunek 9E,F). Wartości znormalizowane na zawartość chlorofilu nie wykazały istotnych statystycznie różnic między roślinami hodowanymi na podłożach z cukrami i podłożu kontrolnym (Rysunek 10). Wyjątkiem jest wiolaksantyna, której poziom w roślinach z podłoża GLC1 wynosi ok. 0,85 zmierzonego dla kontroli, a różnica ta jest istotna statystycznie (Rysunek 10D).

#### **4.3. Wpływ cukrów na wywołaną UV utratę sprawności fotosystemu II**

Rośliny po 7 dniach od przeniesienia na podłoża z sacharozą, glukozą, mannitolem i podłożu kontrolne naświetlano przez 5 minut lub 1 godzinę UV o natężeniu  $0,8 \text{ W} \cdot \text{m}^{-2}$ , uzyskując dawkę odpowiednio  $2,5 \text{ kJ} \cdot \text{m}^{-2}$  oraz  $28 \text{ kJ} \cdot \text{m}^{-2}$ . Następnie rośliny adaptowano do ciemności przez 15 minut i mierzono wydajność kwantową fotosystemu II ( $F_v/F_m$ ) roślin naświetlonych oraz nienaświetlonej kontroli za pomocą fluorymetru FluorCam. Wyniki zestawiono na Rysunku 11.



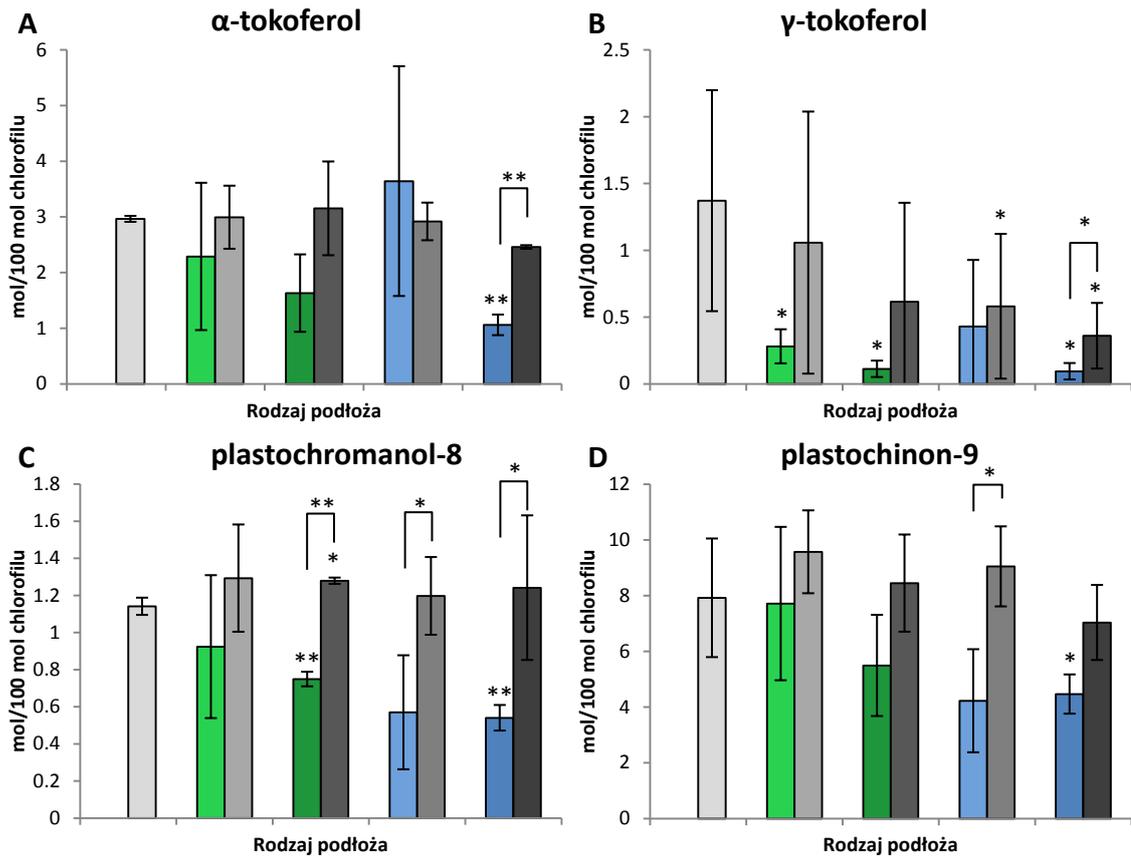
**Rysunek 11.** Wydajność kwantowa fotosystemu II *A. thaliana*. Rośliny hodowane *in vitro* na podłożu B5 z 1% sacharozy przez 5 dni, a następnie na podłożach B5 z różnymi stężeniami glukozy, sacharozy i mannitolu lub kontrolnym podłożu B5 bez dodatków były naświetlane A) 2,5kJ·m<sup>-2</sup> UV lub B) 28 kJ·m<sup>-2</sup> UV. Każdy słupek przedstawia średnią z pomiaru 40-50 pojedynczych roślin w trzech niezależnych powtórzeniach biologicznych. Słupki błędów reprezentują odchylenia standardowe średnich. Gwiazdkami oznaczono istotność statystyczną różnicy spadku wydajności kwantowej fotosystemu II po naświetleniu UV między roślinami z danego podłoża z cukrem i podłoża kontrolnego B5Ø lub między roślinami z izoosmotycznych par podłoży (zaznaczono klamrą). Istotność statystyczną sprawdzono za pomocą testu Tukeya: \*, 0.05>P>0.01; \*\*, 0.01>P>0.001; \*\*\*, 0.001>P.



Krótką ekspozycja na UV ( $2,5 \text{ kJ}\cdot\text{m}^{-2}$ ) w niewielkim stopniu obniża wydajność kwantową fotosystemu II w przypadku roślin hodowanych na 1% glukozie, 1% i 3% sacharozy oraz wszystkich używanych stężeniach mannitolu (0,53%, 1%, 1,6% i 3%) (Rysunek 11A). Przy dłuższym, 1-godzinnym naświetlaniu ( $28 \text{ kJ}\cdot\text{m}^{-2}$ ) zaobserwowano znaczny spadek wartości  $F_v/F_m$ . Wartości, które przed naświetlaniem wynosiły od 0,71 dla roślin hodowanych na B5Ø do 0,83 dla hodowanych GLC3, po naświetleniu wynosiły od 0,42 (B5Ø) do 0,7 (GLC3) (Rysunek 11B). Wszystkie różnice między roślinami naświetlanymi i nienaświetlanymi były istotne statystycznie przy  $P < 0,001$ . Aby określić wpływ obecności w podłożu cukru lub izoosmotycznego mannitolu na ochronę PSII przed UV, różnice wartości uzyskanych dla roślin nienaświetlanych i naświetlanych rosnących na tym samym podłożu porównywano z różnicą tych wartości dla podłoża kontrolnego B5Ø. Dla podłoży GLC3, SUC3, MAN0,53, MAN3, GLC1, MAN1,6 spadek wydajności kwantowej PSII był mniejszy niż dla podłoża kontrolnego (Rysunek 11B). Różnice były istotne statystycznie. Spadki wartości  $F_v/F_m$  dla podłoży SUC1 i MAN1 były wyższe niż dla podłoża B5Ø i istotne statystycznie. W ten sam sposób porównano parami różnice między wartościami  $F_v/F_m$  przed i po naświetlaniu UV uzyskane dla roślin rosnących na podłożach z cukrami i ich osmotycznych odpowiednikach z dodatkiem mannitolu. Mniejszy spadek  $F_v/F_m$  był zaobserwowany dla podłoża z cukrem niż dla podłoża z mannitolem w przypadku par SUC3 – MAN1,6; GLC1 – MAN1 i GLC3 – MAN3. Dla pary SUC1 – MAN0,53 zaobserwowano efekt przeciwny, spadek  $F_v/F_m$  był mniejszy dla roślin z podłoża z mannitolem (Rysunek 11B). Powyższe różnice były istotne statystycznie.

#### **4.4. Wpływ cukrów na poziom chloroplastowych przeciwutleniaczy**

Oznaczono zawartość tokoferoli oraz plastochromanolu-8 (PC-8) i plastochinonu-9 (PQ-9) w *A. thaliana* rosnących *in vitro* przez 7 dni na podłożu B5 z dodatkiem 1 i 3% glukozy oraz sacharozy lub mannitolu w stężeniu odpowiadającym osmotycznie stężeniom cukrów. Wyniki przeliczone na zawartość chlorofilu w próbkach przedstawiono na Rysunku 12.



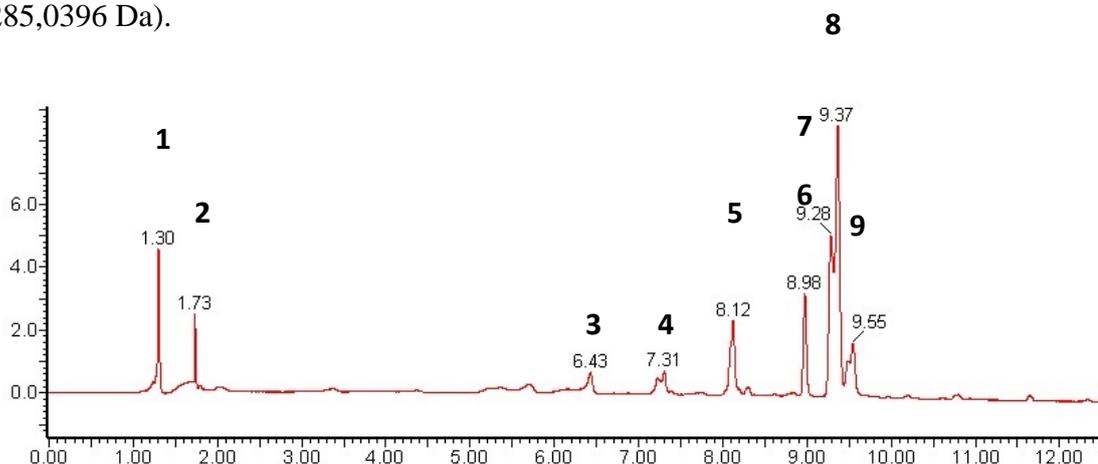
**Rysunek 12.** Zawartość: A)  $\alpha$ -tokoferolu; B)  $\gamma$ -tokoferolu; C) plastochromanolu-8; D) plastochinonu-9 w ekstraktach siewek *A. thaliana* po 7 dniach hodowli *in vitro* na podłożu B5 bez dodatków oraz podłożach B5 z różnymi stężeniami glukozy, sacharozy lub mannitolu. Wartości stanowią średnie z trzech niezależnych powtórzeń biologicznych, wyrażone w molach na 100 moli sumy chlorofilu a i b. Na każde powtórzenie biologiczne składało się 25 siewek zebranych z pojedynczej szalki. Pary sąsiadujących słupków odpowiadają parom izoosmotycznych podłoży. Słupki błędów reprezentują odchylenie standardowe. Gwiazdki oznaczają istotność statystyczną różnicy zawartości związku między roślinami z danego podłoża z cukrem/mannitolem i podłoża kontrolnego B5Ø lub między roślinami z izoosmotycznych par podłoży (zaznaczono klamrą). Istotność statystyczną sprawdzono testem t-Studenta: \*,  $0.05 > P > 0.01$ ; \*\*,  $0.01 > P > 0.001$ ; \*\*\*,  $0.001 > P$ . Wyniki zostały uzyskane przez prof. dr. hab. Jerzego Kruka z Wydziału Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego.

Stwierdzono obniżenie poziomu tokoferoli, plastochromanolu-8 i plastochinonu-9 w roślinach hodowanych na podłożach z dodatkiem cukrów. Średni poziom  $\alpha$ -tokoferolu w porównaniu z roślinami hodowanymi bez cukru jest 3-krotnie niższy dla roślin hodowanych na GLC3 i 2-krotnie niższy dla roślin hodowanych na SUC3 (Rysunek 12A). Różnica między poziomem zmierzonym dla roślin z GLC3 była statystycznie istotna w porównaniu z kontrolą hodowaną bez cukru oraz na podłożu z 3% mannitolu. Średni poziom  $\gamma$ -tokoferolu w porównaniu z kontrolą B5Ø był obniżony w roślinach hodowanych na podłożu SUC1, SUC3 i GLC3 odpowiednio ok. 5-, 12- i 14-krotnie (Rysunek 12B), a różnice te były istotne statystycznie. Średnia zawartość PC-8 była 2-krotnie niższa w roślinach hodowanych na GLC1 i GLC3 oraz o ok. 35% niższa w roślinach hodowanych na SUC3 w porównaniu z roślinami hodowanymi na B5Ø (Rysunek 12C). Różnice te oraz różnice pomiędzy poziomami zmierzonymi dla podłoży z cukrem i odpowiadających im osmotycznie podłoży z mannitolem były istotne statystycznie (Rysunek 12C). Poziom PQ-9 w porównaniu z kontrolą był średnio o połowę niższy w roślinach z podłoża GLC1 i GLC3 oraz o ok. 30% niższy w roślinach z podłoża SUC3 (Rysunek 12D). Statystycznie istotne były różnice między poziomem PQ-9 zmierzonym dla roślin z GLC3 i B5Ø oraz z GLC1 i MAN1. Rośliny hodowane na podłożach z różnymi stężeniami mannitolu miały podobną zawartość  $\alpha$ -tokoferolu, PC-8 i PQ-9 jak kontrolne, hodowane na B5Ø (Rysunek 12A,C,D). Zawartość  $\gamma$ -tokoferolu w roślinach z MAN1 i MAN3 była odpowiednio ok. 2,5- i 4-krotnie obniżona w porównaniu z kontrolą B5Ø, a różnice były istotne statystycznie.

#### **4.5. Wpływ cukrów na poziom związków polifenolowych**

Przeprowadzono oznaczenie związków polifenolowych w ekstraktach z siewek *Arabidopsis*. Przykładowy chromatogram przedstawiono na Rysunku 13. Podczas rozdzału zbierano frakcje odpowiadające czasom retencji z najwyższą absorbancją fal o długości 270 nm. Zebrane podczas rozdzału próbki 5 związków (3, 4, 5, 6, 8 na Rysunku 13) poddano hydrolizie kwasowej w roztworze kwasu solnego, a następnie zmierzono ich widma absorpcji. Dla związków 3, 5 i 6 maksimum absorpcji przypadające ok. 365 nm odpowiadało maksimum widma absorpcji wzorca kemferolu. Maksimum absorpcji związku 8 było poniżej 300 nm i nie zostało zarejestrowane. Próbkę niehydrolizowaną posłużyły do oznaczenia związków za pomocą spektrometrii masowej. Widma masowe przedstawiono w Dodatku na Rysunku 22. Na widmach

masowych związków 3, 5 i 6 obecny jest sygnał pochodzący od cząstki o masie 285,0357 Da, co jest bliskie przewidywanej masie kemferolu pozbawionego protonu (285,0396 Da).



**Rysunek 13.** Fragment chromatogramu z rozdziału ekstraktu siewek *Arabidopsis* hodowanych na podłożu B5Ø. Mierzono absorbancję przy 340 nm.

Pik molekularny związku 3 odpowiadał masie 739,2105 Da, wśród pików rozbiciowych najsilniejszy był przy 593,1512 Da. Jest to masa, która pojawiła się jako główny sygnał na spektrogramie związku 5. Odpowiada ona masie cząsteczki kemferolu podwójnie glikozylowanego. Różnica masy pomiędzy tym pikiem (593,1512 Da), a kolejnym (430,0967 Da) wynosi 163,0545 Da. Taka masa pochodzi od reszty heksozy, prawdopodobnie glukozy, pozbawionej jednego protonu oraz atomu tlenu, który pozostał przy kemferolu po rozbiciu wiązania glikozydowego. Obecny był również silny pik dla masy 146,9678 Da, pochodzący od ramnozy. Masa glikozylowanego i ramnozylowanego kemferolu, a także brak pików dla cząstek o masie kemferolu podwójnie ramnozylowanego (ok. 577 Da) sugeruje, że jedna z reszt ramnozy była przyłączona do glukozy.

Pik molekularny związku 5 odpowiadał masie 593,1406 Da. Różnica między nim i kolejnymi dwoma pikami: 447,0872 Da i 430,0785 Da wynosi odpowiednio: 146,0534 Da i 163,0621 Da. Te wartości odpowiadają resztom glukozy i ramnozy. Oba te cukry były połączone wiązaniem glikozydowym bezpośrednio z cząsteczką kemferolu.

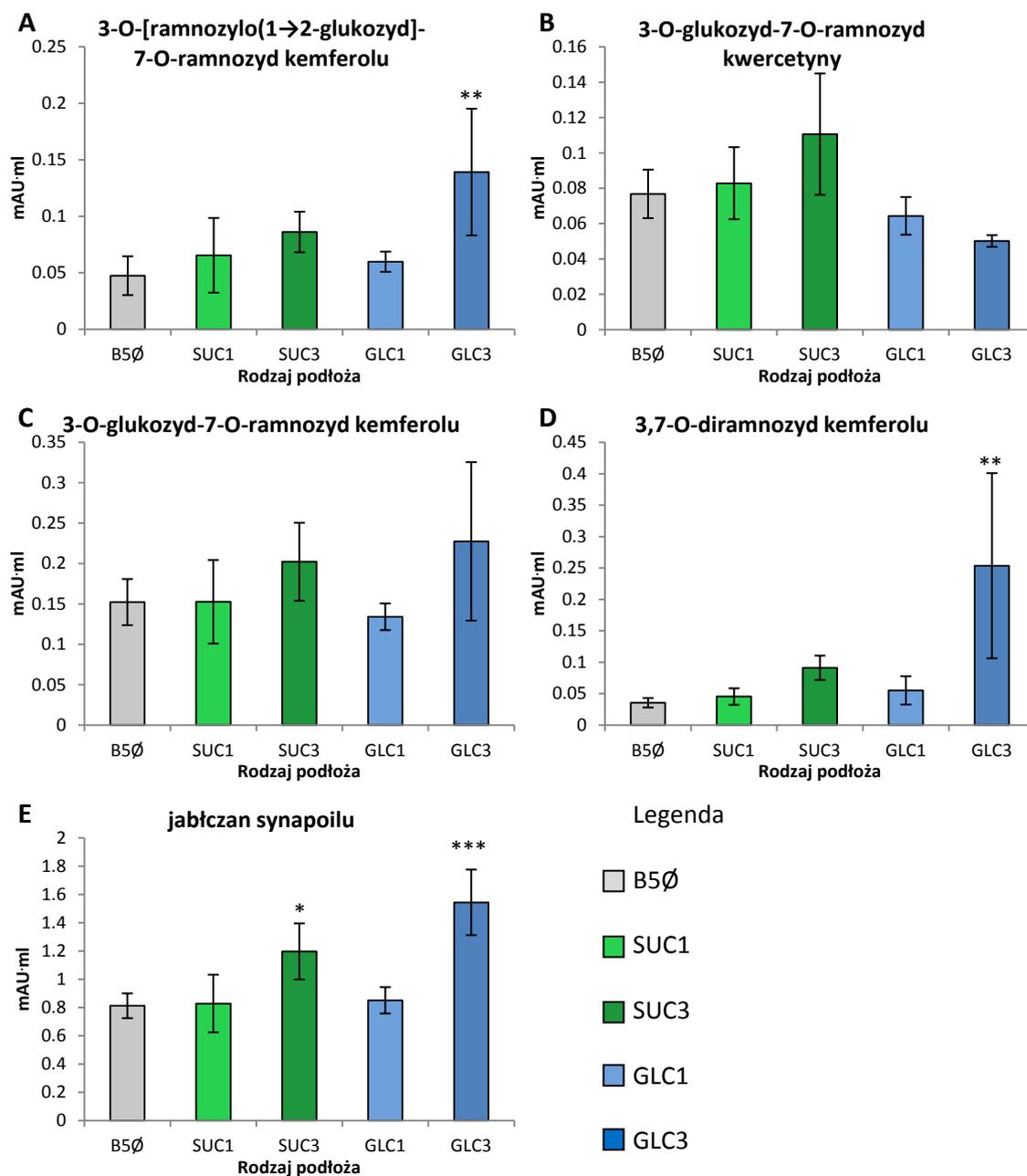
Dla związku nr 6 pik molekularny znajdował się przy 577,1499 Da. Wśród pików rozbiciowych najsilniejsze znalazły się przy masie 431,0699 Da, 285,0357 Da oraz 146,9678 Da. Odpowiadają one masie monoramnozydu kemferolu, kemferolu i odłączonej reszty ramnozy. Związek ten był podwójnym glikozydem kemferolu.

Pik molekularny związku nr 4 ma masę 609,1442 Da. Wśród pików rozbiciowych pojawia się masa 301,0375 Da, która może odpowiadać pozbawionej protonu kwercetynie (302,0426 Da). Obecny jest również pik przy 146,9624 Da, który może pochodzić od deoksycukru o szkielecie sześciowęglowym, takiego jak ramnoza. Różnica między masą całej cząsteczki i masą dwóch kolejnych pików: 463,0860 i 446,0873, wynosi odpowiednio: 146,0474 i 163,0461, co odpowiada masie reszty ramnozy i glukozy, które musiały być połączone wiązaniem glikozydowym z kwercetyną.

Porównując zebrane dane z dostępnymi danymi na temat glikozydów flawonoli w *Arabidopsis* (Kerhoas et al., 2006; Saito et al., 2013; Yin et al., 2012) stwierdzono, że związki 3, 4, 5, 6 to kolejno: 3-O-[ramnozylo(1→2-glukozyd)]-7-O-ramnozyd kemferolu; 3-glukozyd-7-ramnozyd kwercetyny; 3-glukozyd-7-ramnozyd kemferolu oraz 3,7-diramnozyd kemferolu (kemferytyna).

W widmie związku nr 8 główne piki rozbiciowe pochodzą od cząstek o masie 223,0629 Da, 193,0120 Da, 164,0440 Da. Ich masy odpowiadają (pozbawionym jednego protonu) kolejno: kwasowi synapinowemu, kwasowi ferulowemu oraz kwasowi kumarowemu, stąd najprawdopodobniej wszystkie pochodziły z rozbicia reszty kwasu synapinowego. Różnica między pikiem molekularnym (339,0708 Da) i masą kwasu synapinowego wynosi 116,0145 Da, co odpowiada cząstce o wzorze sumarycznym:  $C_4H_4O_4$ , a więc prawdopodobnie dikarboksyłowemu kwasowi organicznemu, który mógł powstać przez rozbicie cząsteczki estru kwasu synapinowego i jabłkowego. Badanym związkiem jest więc jabłczan synapoilu.

Względną zawartość poszczególnych związków obliczono na podstawie powierzchni pod krzywą chromatogramu uzyskanego podczas rozdziału HPLC w paśmie absorpcji pochodzącym od związków o różnym czasie retencji. Wyniki przedstawiono na Rysunku 14.

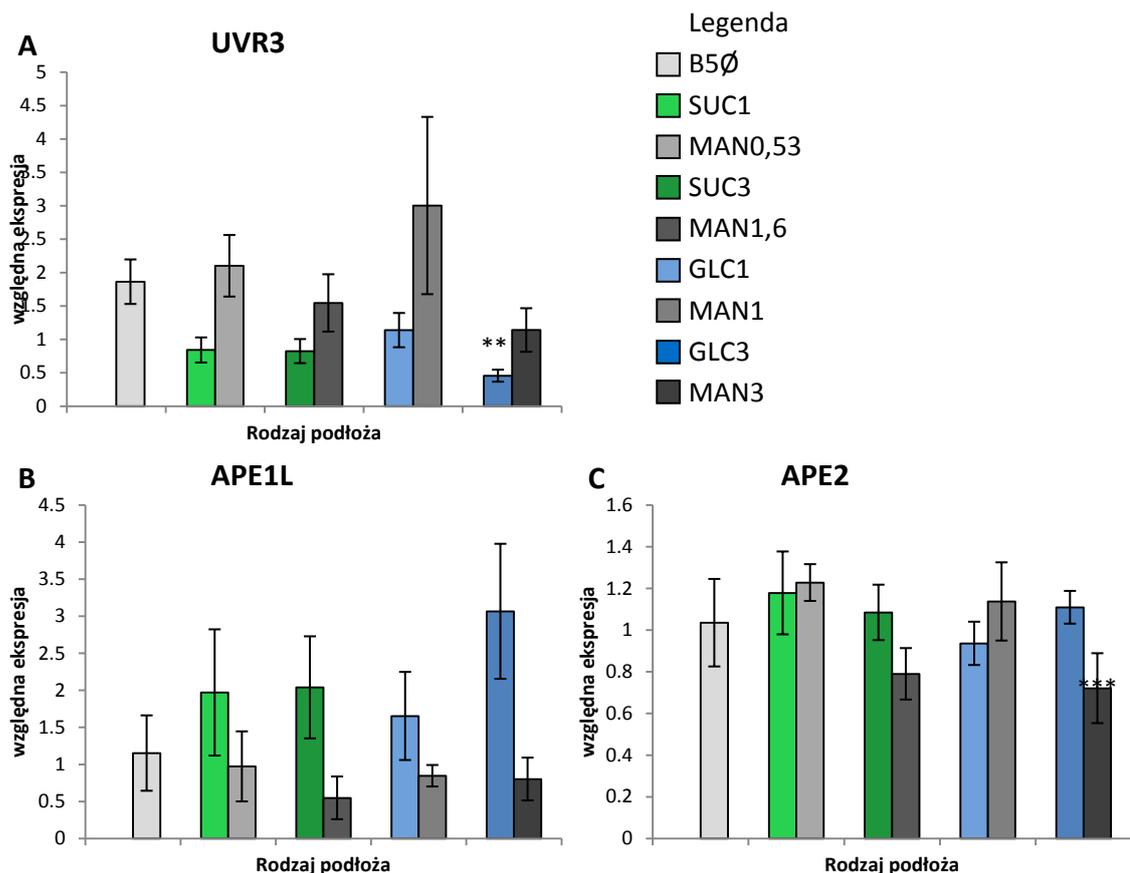


**Rysunek 14.** Względna zawartość pięciu głównych związków polifenolowych: A) 3-O-[ramnozylo(1→2-glukozydu)]-7-O-ramnozydu kemferolu; B) 3-glukozydu-7-ramnozydu kwercetyny; C) 3-glukozydu-7-ramnozydu kemferolu; D) 3,7-diramnozydu kemferolu; E) jabłczanu synapoilu w siewkach *A. thaliana* po 7 dniach hodowli *in vitro* na podłożu B5 z dodatkiem 1 i 3% glukozy albo sacharozy oraz na podłożu kontrolnym. Słupki reprezentują wartości średnie z czterech niezależnych powtórzeń biologicznych, z których każde stanowiło 25 siewek zebranych z pojedynczej szalki. Słupki błędów przedstawiają odchylenie standardowe średniej. Gwiazdkami oznaczono istotność statystyczną różnicy między zawartością związku w roślinach z danego podłoża z cukrem i z podłoża kontrolnego B5Ø, sprawdzoną testem Tukeya: \*, 0.05 > P > 0.01; \*\*, 0.01 > P > 0.001; \*\*\*, 0.001 > P.

Wszystkie zmierzone poziomy związków fenolowych porównywano z ich poziomami w ekstraktach roślin hodowanych na podłożu kontrolnym B5Ø. W przypadku glikozydów kemferolu obecnych w ekstraktach z siewek *A. thaliana* stwierdzono ich zwiększoną zawartość w roślinach z podłoża zawierających sacharozę lub glukozę w stężeniu 3%. Poziom ramnozylo(1→2-glukozydu]-7-O-ramnozydu kemferolu był podwyższony w roślinach rosnących na podłożu z 3% glukozą około 3-krotnie, a z 3% sacharozą prawie 2-krotnie (Rysunek 14A). Poziom 3-O-glukozydu-7-O-ramnozydu kemferolu był wyższy ok. 1,5-krotnie w roślinach z podłoża SUC3 i GLC3 (Rysunek 14C), a poziom kemferytyny był podwyższony odpowiednio około 2,5-krotnie i ponad 7-krotnie w roślinach hodowanych na podłożach SUC3 i GLC3 (Rysunek 14D). Poziom 3-O-glukozydu-7-O-ramnozydu kwercetyny w porównaniu z roślinami z podłoża kontrolnego był podwyższony w roślinach rosnących na podłożu SUC3 o około połowę, ale obniżony w roślinach z podłoża GLC3 o ok. 40% (Rysunek 11B). Spośród wymienionych wyżej różnic tylko wzrost zawartości triglikozydu kemferolu (Rysunek 14A) oraz kemferytyny (Rysunek 14D) w roślinach z podłoża GLC3 był istotny statystycznie w teście Tukeya. Poziom jedyne stwierdzonego związku nie będącego glikozydem, jabłczanu synapoilu był o połowę wyższy w roślinach z podłoża SUC3 i 2-krotnie wyższy w roślinach z podłoża GLC3 w porównaniu z roślinami z podłoża B5Ø (Rysunek 14E). Obie te różnice były istotne statystycznie. Poziomy wszystkich zmierzonych związków fenolowych w roślinach z podłoża z 1% cukrów różniły się nieznacznie w porównaniu z kontrolą.

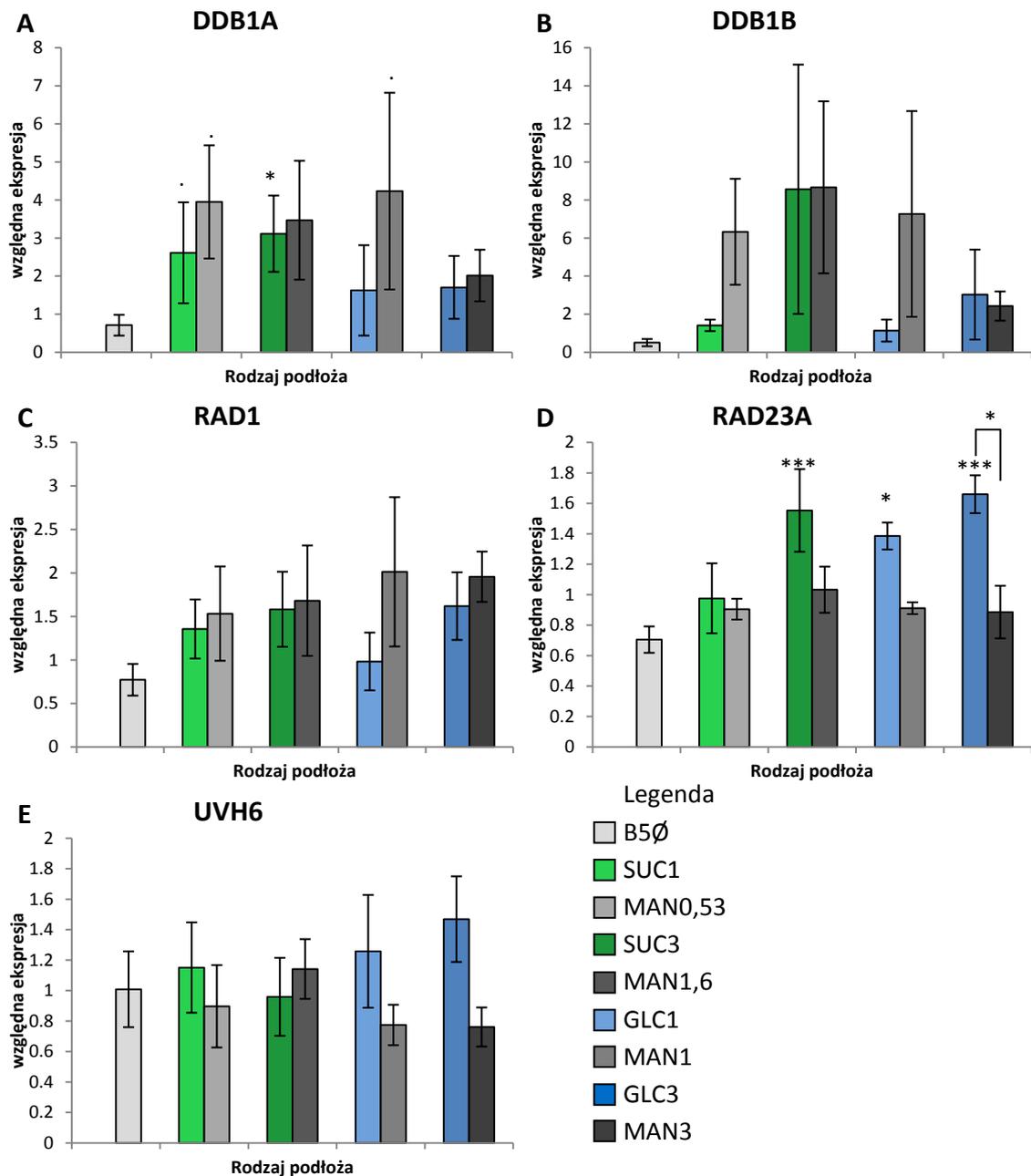
#### **4.6. Wpływ cukrów na ekspresję genów zaangażowanych w naprawę DNA**

W celu określenia roli cukrów w odpowiedzi roślin na promieniowanie ultrafioletowe, wykonano pomiary poziomów ekspresji genów zaangażowanych w różne szlaki naprawy uszkodzeń DNA stosując PCR w czasie rzeczywistym. Wyniki przedstawiono na Rysunkach 15 – 18.

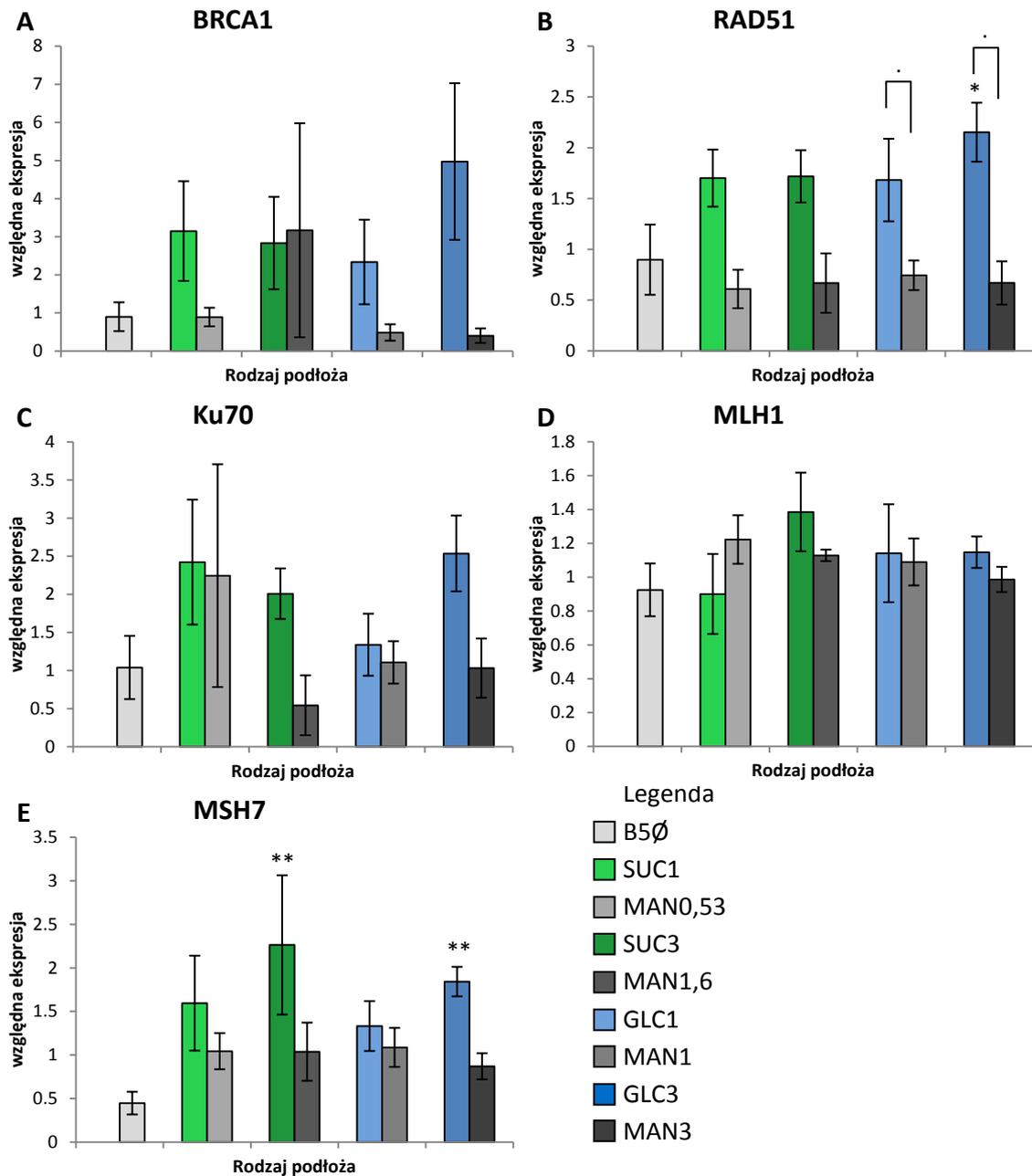


**Rysunek 15.** Względna ekspresja A) genu *UVR3*, kodującego fotoliazę 6-4 fotoproduktów oraz genów zaangażowanych w BER: B) *APE1L* i C) *APE2*. *A. thaliana* hodowano *in vitro* przez 5 dni na podłożu B5 z 1% sacharozą, następnie pasażowano na podłoża B5 z różną zawartością glukozy, sacharozy i mannitolu oraz podłoże kontrolne B5Ø. Słupki odpowiadają wartościom średnim uzyskanym z 4-6 niezależnych powtórzeń biologicznych. Każde z nich składało się z 25 siewek zebranych z pojedynczej szalki i było mierzone w 3 powtórzeniach technicznych. Słupki błędów reprezentują błąd standardowy. Gwiazdkami oznaczono istotność statystyczną różnicy między poziomem ekspresji danego genu w roślinach z danego podłoża i podłoża kontrolnego B5Ø, sprawdzoną testem Tukeya: \*,  $0.05 > P > 0.01$ ; \*\*,  $0.01 > P > 0.001$ ; \*\*\*,  $0.001 > P$ .

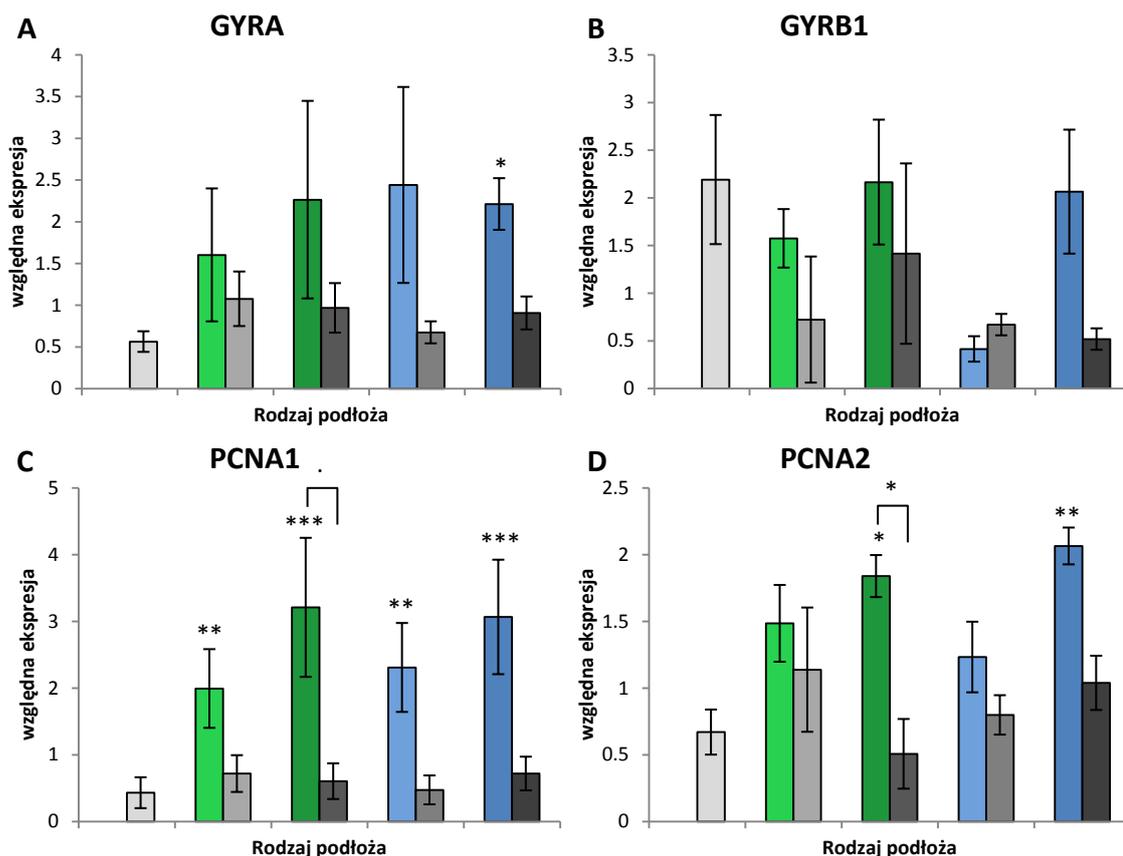




**Rysunek 16.** Względna ekspresja genów kodujących białka zaangażowane w NER. A) *DDB1A*, B) *DDB1B*, C) *RAD1*, D) *RAD23A*, E) *UVH6*. *A. thaliana* hodowano *in vitro* przez 5 dni na podłożu B5 z 1% sacharozą, następnie pasażowano na podłoża B5 z różną zawartością glukozy, sacharozy i mannitolu oraz podłoże kontrolne B5Ø. Słupki odpowiadają wartościom średnim uzyskanym w 4-6 niezależnych powtórzeniach biologicznych. Każde z nich składało się z 25 siewek zebranych z pojedynczej szalki i było mierzone w 3 powtórzeniach technicznych. Słupki błędów reprezentują błąd standardowy. Gwiazdkami oznaczono istotność statystyczną różnicy między poziomem ekspresji danego genu w roślinach z danego podłoża i podłoża kontrolnego B5Ø, sprawdzoną testem Tukeya: \*, 0.05>P>0.01; \*\*, 0.01>P>0.001; \*\*\*, 0.001>P.



**Rysunek 17.** Względna ekspresja genów kodujących białka zaangażowane w HR: A) *BRCA1*, B) *RAD51*; NHEJ: C) *Ku70*; MMR: D) *MLH1*, E) *MSH7*. *A. thaliana* hodowano *in vitro* przez 5 dni na podłożu B5 z 1% sacharozą, następnie pasażowano na podłoża B5 z różną zawartością glukozy, sacharozy i mannitolu oraz podłoże kontrolne B5Ø. Słupki odpowiadają wartościom średnim uzyskanym w 4-6 niezależnych powtórzeniach biologicznych. Każde z nich składało się z 25 siewek zebranych z pojedynczej szalki i było mierzone w 3 powtórzeniach technicznych. Słupki błędów reprezentują błąd standardowy. Gwiazdkami oznaczono istotność statystyczną różnicy między poziomem ekspresji danego genu w roślinach z danego podłoża i podłoża kontrolnego B5Ø, sprawdzoną testem Tukeya: \*,  $0.05 > P > 0.01$ ; \*\*,  $0.01 > P > 0.001$ ; \*\*\*,  $0.001 > P$ .



**Rysunek 18.** Względna ekspresja genów A) *GYRA*, B) *GYRB1*, C) *PCNA1*, D) *PCNA2*. *A. thaliana* hodowano *in vitro* przez 5 dni na podłożu B5 z 1% sacharozą, następnie pasażowano na podłoża B5 z różną zawartością glukozy, sacharozы i mannitolu oraz podłoża kontrolne B5Ø. Słupki odpowiadają wartościom średnim uzyskanym w 4-6 niezależnych powtórzeniach biologicznych. Każde z nich składało się z 25 siewek zebranych z pojedynczej szalki i było mierzone w 3 powtórzeniach technicznych. Słupki błędów reprezentują błąd standardowy. Gwiazdkami oznaczono istotność statystyczną różnicy między poziomem ekspresji danego genu w roślinach z danego podłoża i podłoża kontrolnego B5Ø, sprawdzoną testem Tukeya: \*, 0.05>P>0.01; \*\*, 0.01>P>0.001; \*\*\*, 0.001>P.

Legenda

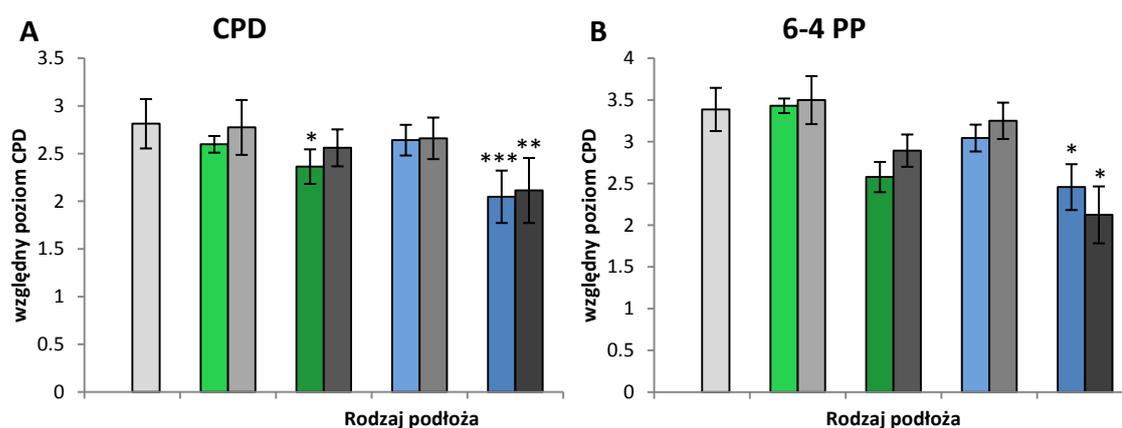
- B5Ø
- SUC1
- MAN0,53
- SUC3
- MAN1,6
- GLC1
- MAN1
- GLC3
- MAN3

Poziom transkryptu *UVR3* jest niższy w roślinach rosnących na pożywkach zawierających sacharozę lub glukozę w porównaniu z roślinami z podłoży kontrolnych z mannitolem i z podłoża B5Ø. Różnica ta była istotna statystycznie dla roślin hodowanych na pożywce z 3% glukozy (Rysunek 15A). Poziom transkryptów genów *APE1L* i *APE2*, których produkty są endonukleazami AP uczestniczącymi w BER, nie różni się w badanych roślinach (Rysunek 15B,C). Zaobserwowano wzrost poziomu mRNA *DDB1A* na podłożach z dodatkiem 0,53% i 1% mannitolu oraz 1% i 3%

sacharozy (Rysunek 16A). Spośród genów zaangażowanych w NER, różnice poziomów transkryptów *RAD1* i *UVH6* między roślinami hodowanymi z dodatkiem cukru i mannitolu lub na pożywce kontrolnej bez dodatku cukrów i mannitolu nie wykazały istotnych statystycznie różnic (Rysunek 16C,E). Poziom transkryptu *RAD23A* był wyższy w roślinach na podłożach z 1 i 3% glukozy oraz z 3% sacharozy (Rysunek 16D) w porównaniu z roślinami z podłoża B5Ø. Zaobserwowano również istotną statystycznie różnicę między poziomem transkryptu *RAD23A* w roślinach rosnących na podłożu GLC3 i odpowiadającym mu osmotycznie podłożu MAN3 (Rysunek 16D). Poziom transkryptu *RAD51*, genu zaangażowanego w rekombinację homologiczną, był wyższy w roślinach hodowanych na podłożach zarówno z 1 jak i 3% sacharozy oraz glukozy w porównaniu z podłożem kontrolnym. Różnica poziomu mRNA tego genu była statystycznie istotna dla próbek z wyższego stężenia glukozy w porównaniu z odpowiadającym mu stężeniem mannitolu oraz z podłożem kontrolnym (Rysunek 17B). Prawdopodobieństwo, że różnica między poziomami transkryptu *RAD51* w roślinach z podłoża SUC3 i MAN1,6 jest statystycznie istotna wyniosło pomiędzy 0,1 a 0,05 w teście Tukeya, a więc nieznacznie poniżej przyjętego poziomu istotności 0,05. Spośród zbadanych genów uczestniczących w MMR, poziom transkryptu *MLH1* nie wykazał istotnych statystycznie różnic pomiędzy badanymi grupami roślin, natomiast poziom mRNA *MSH7* był wyższy w roślinach rosnących na obu stężeniach glukozy oraz na 3% sacharozie (Rysunek 17D,E). Wyższy poziom transkryptu *GYRA* w roślinach z podłoża GLC3 w porównaniu z B5Ø był istotny statystycznie (Rysunek 18A). Nie zaobserwowano istotnych statystycznie różnic pomiędzy poziomami transkryptów w roślinach z różnych podłoży, w przypadku genów *DDB1B* (Rysunek 16B), *BRCA1* (Rysunek 17A), *KU70* (Rysunek 17C) i *GYRBI* (Rysunek 18B). Najwięcej różnic stwierdzono dla genów *PCNA Arabidopsis* (Rysunek 18C,D). W przypadku *PCNA2* statystycznie istotna była różnica poziomu mRNA w roślinach rosnących na pożywkach z 3% sacharozą i glukozą w porównaniu z roślinami z pożywki kontrolnej, a dla rosnących na podłożu z 3% sacharozą także w porównaniu z roślinami z jej osmotycznego odpowiednika (MAN1,6) (Rysunek 18D). Zaobserwowano również wyższy poziom transkryptu *PCNA1* w roślinach hodowanych na podłożach z oboma stężeniami sacharozy i glukozy, a różnice między roślinami z izoosmotycznych par SUC3 i MAN1,6 oraz GLC1 i MAN1 były istotne statystycznie (Rysunek 18C).

#### 4.7. Wpływ cukrów dodanych do pożywki na powstawanie uszkodzeń DNA wywoływanych UV

Rośliny hodowane *in vitro* na kontrolnym podłożu B5 oraz podłożach z dodatkiem glukozy, sacharozy i mannitolu naświetlono UV ( $2,5 \text{ kJ}\cdot\text{m}^{-2}$ ), po czym natychmiast zebrano. Przeprowadzono test ELISA na wyizolowanym z roślin całkowitym DNA. Porównywano średnie wyniki uzyskane w pomiarze absorbancji przy 450 nm, po zatrzymaniu reakcji enzymatycznej przez dodanie kwasu siarkowego. Wyniki przedstawiono na Rysunku 19.



**Rysunek 19.** Względny poziom A) CPD i B) 6-4 PP w DNA *A. thaliana* hodowanych *in vitro* na podłożu B5 z różnymi stężeniami glukozy, sacharozy i mannitolu oraz podłożu kontrolnym, naświetlonych dawką UV równą  $2,5 \text{ kJ}\cdot\text{m}^{-2}$ . Wartości reprezentują średnie z 3-5 niezależnych powtórzeń biologicznych, normalizowanych względem średniej wartości uzyskanej dla standardu na każdej płytce. Słupki błędów odpowiadają odchyleniom standardowym. Gwiazdkami oznaczono istotność statystyczną różnicy między poziomem CPD lub 6-4 PP w roślinach z danego podłoża i podłoża kontrolnego B5Ø albo dla pary podłoży z różnym stężeniem glukozy (zaznaczono klamrą), sprawdzoną testem Tukeya: \*,  $0,05 > P > 0,01$ ; \*\*,  $0,01 > P > 0,001$ ; \*\*\*,  $0,001 > P$ .

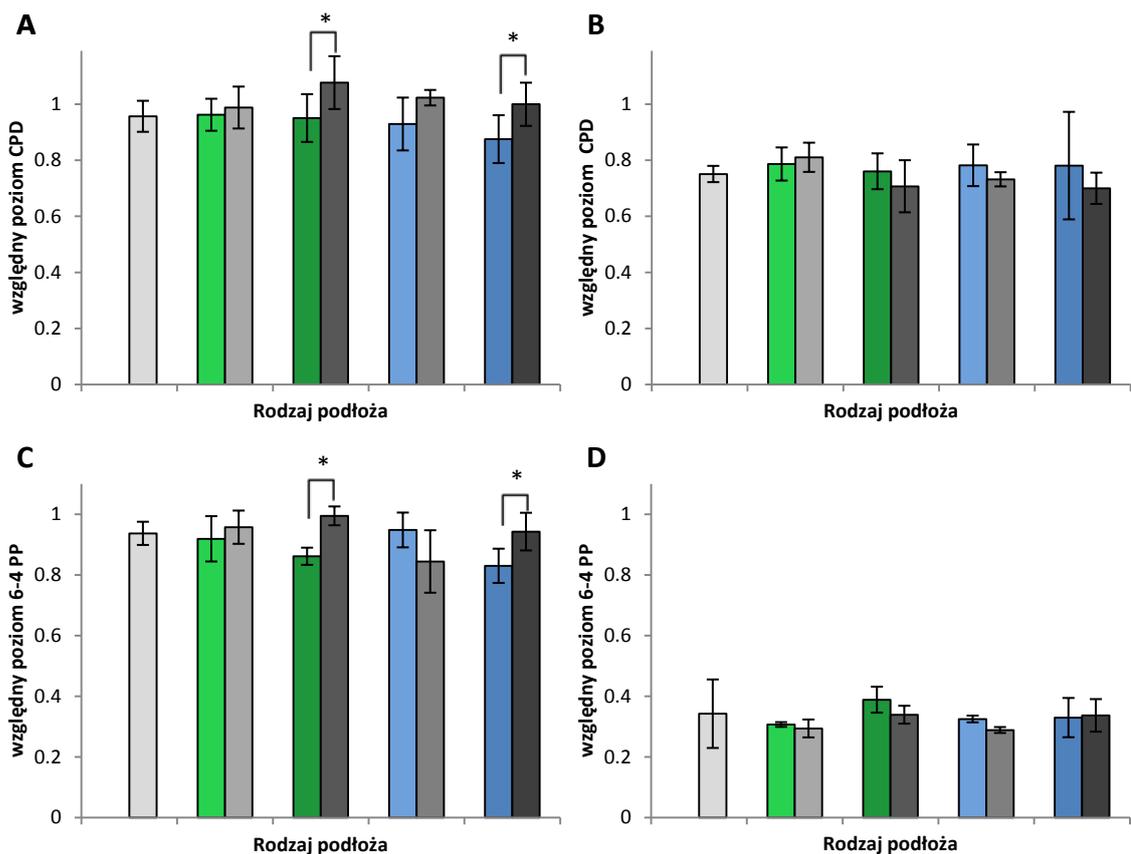
Legenda	
□	B5Ø
■	SUC1
■	MAN0,53
■	SUC3
■	MAN1,6
■	GLC1
■	MAN1
■	GLC3
■	MAN3

Stwierdzono spadek indukowanych UV poziomów CPD oraz 6-4 PP ze wzrostem stężenia zarówno glukozy, sacharozy jak i mannitolu. Poziom CPD w porównaniu ze zmierzonym dla roślin z podłoża B5Ø był o mniej niż 10% niższy dla roślin z podłoży SUC1, MAN0,53, GLC1, MAN1 i MAN1,6, o ok. 15% niższy dla roślin z podłoża SUC3 i ok. 25% niższy dla roślin hodowanych na GLC3 i MAN3 (Rysunek 19A). Poziom 6-4 PP w DNA roślin hodowanych na SUC1 i MAN0,53 był podobny do zmierzonego dla roślin z podłoża kontrolnego B5Ø, a dla roślin hodowanych na GLC1 i MAN1 o odpowiednio 5 i 10% niższy (Rysunek 19B). W DNA roślin hodowanych na MAN1,6 było o ok. 15% mniej 6-4 PP, a w DNA roślin hodowanych na SUC3 i GLC3

– ok. 25% mniej 6-4 PP w porównaniu z kontrolą (Rysunek 19B). Najniższy poziom 6-4 PP stwierdzono w DNA roślin z podłoża MAN3, wynosił on nieco ponad 60% poziomu zmierzonego dla kontroli B5Ø (Rysunek 19B). Różnice w porównaniu z wartościami zmierzonymi dla podłoża B5Ø były istotnie statystyczne w przypadku CPD dla 3% sacharozy, glukozy i mannitolu (Rysunek 19A) oraz w przypadku 6-4 PP dla podłoża z 3% glukozy i mannitolu (Rysunek 19B). Nie zaobserwowano statystycznie istotnych różnic w poziomie dimerów pirymidynowych między izoosmotycznymi parami podłoża cukier – mannitol.

#### **4.8. Wpływ cukrów w pożywkach na naprawę uszkodzeń DNA**

Rośliny hodowane *in vitro* na kontrolnej pożywce B5 oraz na pożywkach z dodatkiem 1 i 3% glukozy lub sacharozy lub odpowiadającymi im osmotycznie stężeniami mannitolu naświetlono dawką UV równą  $2,5 \text{ kJ}\cdot\text{m}^{-2}$ . Część roślin zebrano, a pozostałe umieszczono w monochromatycznym świetle niebieskim o długości fali 470 nm i natężeniu  $100 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , lub w ciemności na 4 godziny. Po upływie tego czasu zebrano próbki, które posłużyły do analizy poziomu CPD i 6-4 PP w całkowitym DNA metodą ELISA. Uzyskane wyniki porównano z wyjściowym poziomem uszkodzeń zmierzonym w próbkach zebranych natychmiast po naświetleniu UV. Wyniki przedstawiono na Rysunku 20.



**Rysunek 20.** Względny poziom dimerów pirymidynowych w DNA roślin hodowanych *in vitro* na podłożu B5 z różnymi stężeniami glukozy, sacharozy i mannitolu po naświetleniu UV ( $2,5 \text{ kJ}\cdot\text{m}^{-2}$ ) i 4 godzinach naprawy w ciemności lub świetle niebieskim ( $100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , 470 nm). A) CPD po naprawie w ciemności; B) CPD po naprawie w świetle niebieskim; 6-4 PP po naprawie w ciemności; D) 6-4 PP po naprawie w świetle niebieskim. Wartości reprezentują średnią proporcję między wynikiem uzyskanym w teście immunoenzymatycznym dla roślin po 4-godzinnej inkubacji w ciemności lub w niebieskim świetle ( $100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , 470 nm) i roślin zebranych bezpośrednio po naświetleniu UV. Każdy słupek odpowiada średniej z 6 niezależnych powtórzeń biologicznych, z których na każde zebrano po 25 siewek z pojedynczej szalki hodowlanej. Słupki błędów reprezentują odchylenie standardowe. Gwiazdki oznaczają sprawdzoną testem Tukeya istotność statystyczną różnicy między poziomem CPD lub 6-4 PP w roślinach z danego podłoża i podłoża kontrolnego B5Ø albo dla izoosmotycznych par podłoży cukier/mannitol (zaznaczono klamrą): \*,  $0,05 > P > 0,01$ ; \*\*,  $0,01 > P > 0,001$ ; \*\*\*,  $0,001 > P$ .

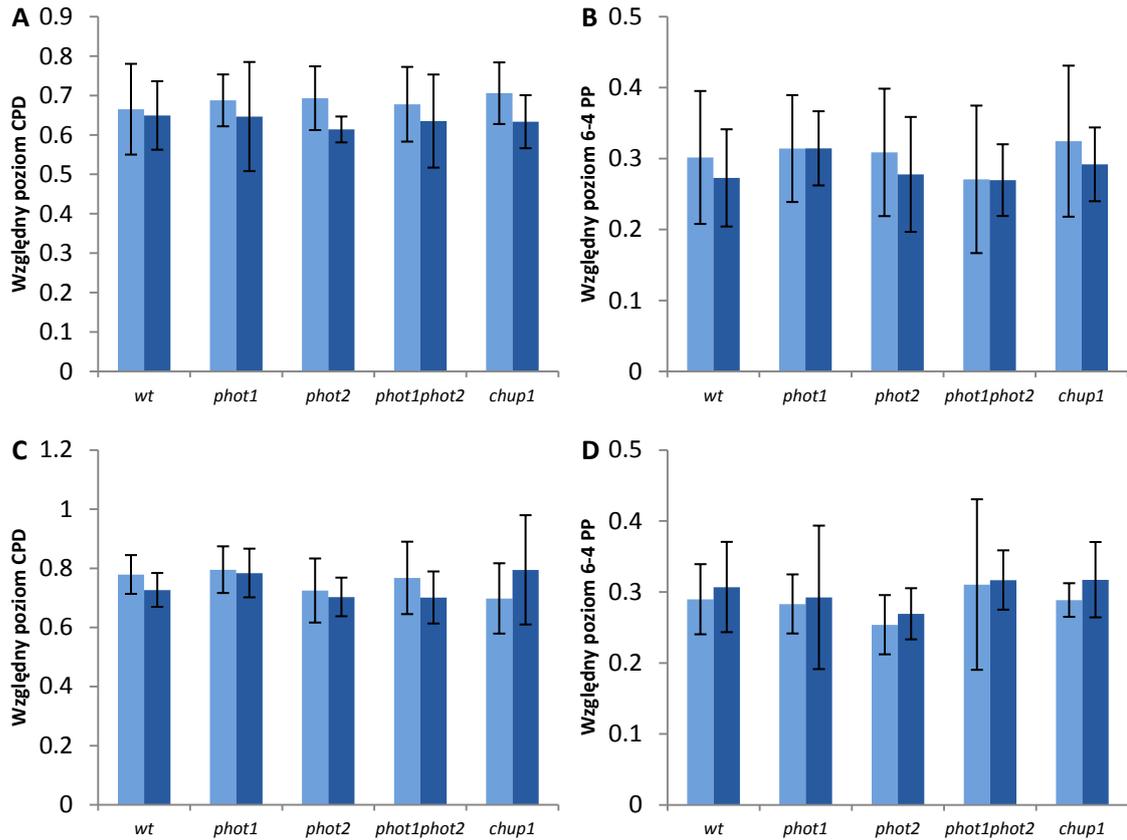
Wszystkie rośliny inkubowane na świetle niebieskim po naświetleniu UV miały znacznie obniżony poziom obu typów uszkodzeń w porównaniu ze zmierzonym zaraz po naświetleniu. Poziom CPD spadł w tym czasie o ok. 20-30% (Rysunek 20B),

a poziom 6-4 PP o ok. 60-70% (Rysunek 20D). Dla próbek inkubowanych w ciemności różnica pomiędzy poziomem uszkodzeń w porównaniu z poziomem mierzonym od razu po naświetleniu była mniejsza, pozostało od 80 do 100% nienaprawionych dimerów obu typów (Rysunek 20A,C). W DNA roślin, które po naświetleniu UV były inkubowane na świetle, nie zaobserwowano statystycznie istotnych różnic między poziomami uszkodzeń w roślinach rosnących na różnych podłożach. Z kolei rośliny hodowane na podłożach SUC3 i GLC3, które po naświetleniu UV były inkubowane w ciemności, miały niższy poziom obu typów uszkodzeń niż te hodowane na odpowiadających im osmotycznie podłożach z mannitolem: MAN1,6 i MAN3 (Rysunek 20A,C).

#### **4.9. Wpływ ruchów organelli na poziom uszkodzeń DNA wywołanych przez UV**

Aby określić czy sterowane światłem niebieskim ruchy chloroplastów i jądra komórkowego mają wpływ na ochronę materiału genetycznego przed UV, wykonano serię eksperymentów, w których liście roślin poddawano naświetlaniu silnym lub słabym światłem niebieskim, aby uzyskać pożądane ustawienie organelli (patrz: Rysunek 3), a następnie naświetlano dawką UV równą  $2,5 \text{ kJ} \cdot \text{m}^{-2}$ . Analizowano poziom dimerów pirymidynowych w DNA izolowanym osobno z chloroplastów i jąder komórkowych. Wyniki dla DNA jądrowego przedstawiono na Rysunku 21A i 21B, a dla DNA chloroplastowego na Rysunku 21C i 21D.





**Rysunek 21.** Względny poziom w DNA jądrowym: A) CPD; B) 6-4 PP i w DNA chloroplastowym: C) CPD; D) 6-4 PP. DNA izolowano z odpowiednich frakcji liści *A. thaliana* dzikiego typu i mutantów genów zaangażowanych w kierunkowe ruchy organelli. Adaptowane do ciemności liście pobrane z 5–6-tygodniowych roślin były naświetlane przez 4 godziny monochromatycznym światłem niebieskim (470 nm) o natężeniu  $1,5\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  (słabe światło, WB) lub  $120\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  (silne światło, SB), a następnie  $2,5\text{kJ}\cdot\text{m}^{-2}$  UV. Każdy słupek reprezentuje średnią z 5 niezależnych powtórzeń biologicznych. Słupki błędów odpowiadają odchyleniom standardowym średnich.

Warunki świetlne stosowane przed naświetleniem UV

- 4 h WB ( $1,5\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ )
- 4 h SB ( $120\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ )

W przeprowadzonych eksperymentach nie zaobserwowano żadnych statystycznie istotnych różnic w poziomach dimerów pirymidynowych pomiędzy DNA (zarówno chloroplastowym jak i jądrowym) izolowanym z roślin naświetlanych silnym lub słabym światłem niebieskim przed ekspozycją na UV. Nie zaobserwowano również różnic między dzikim typem oraz poszczególnymi liniami mutantów z zaburzonymi ruchami organelli.

## 5. Dyskusja

### 5.1. Cukry w podłożu wspomagają przeżywanie roślin narażonych na UV

Jednym z głównych celów pracy było zbadanie wpływu egzogennych cukrów na ochronę roślin przed promieniowaniem UV. Został on zrealizowany dzięki zastosowaniu hodowli *in vitro*, która która umożliwiła podawanie kontrolowanej ilości cukrów w podłożu. Ponieważ znane jest hamujące działanie glukozy na kiełkowanie *Arabidopsis* (Dekkers et al., 2004), zdecydowano się zastosować do kiełkowania wszystkich roślin jednakowe podłoże B5 z 1% sacharozą. Rośliny hodowano na podłożu z sacharozą przez 5 dni, żeby uzyskać ich równy wzrost. Po tym czasie przenoszono je w warunkach jałowych na nowe podłoże B5 z 1 lub 3% sacharozy albo glukozy, następnie hodowano przez 7 dni i poddawano działaniu UV o natężeniu  $8 \text{ W}\cdot\text{m}^{-2}$  przez 1 godzinę, co odpowiada dawce około  $28 \text{ kJ}\cdot\text{m}^{-2}$ . Zaobserwowano, że rośliny hodowane na podłożu z cukrami mają zwiększoną odporność na naświetlanie UV (Rysunek 4; 5; 6A). Rośliny z podłoża bez cukru mają zupełnie wybielone liścienie i liście, a większość z nich jest martwa. Rośliny hodowane z dodatkiem sacharozy lub glukozy zachowują w większości zielone liście, przy czym zielonych roślin jest więcej na 3% stężeniach cukrów oraz więcej na podłożu z glukozą niż z sacharozą (Rysunek 4; 5).

#### 5.1.1. Cukry i mannitol w podłożu obniżają akumulację uszkodzeń DNA

Poziom obu mierzonych typów uszkodzeń DNA, czyli CPD i 6-4 PP, był niższy w roślinach hodowanych na podłożu z 3% glukozy i mannitolu (Rysunek 19). Poziom CPD w roślinach hodowanych na SUC3 był również obniżony w porównaniu z kontrolą (Rysunek 19A). Prawdopodobnie niższy poziom uszkodzeń zmierzony w DNA roślin hodowanych na podłożu z cukrami jest spowodowany podwyższonym poziomem związków absorbujących UV, szczególnie jabłczanu sinapoilu oraz glikozydów kemferolu (Rysunek 14). Ponieważ nie zmierzono poziomu związków fenolowych w roślinach hodowanych na podłożach z mannitolem, nie można stwierdzić, czy też mogły być lepiej chronione przed UV poprzez jego pochłanianie. Z pewnością w tych roślinach wpływ na niski zmierzony poziom dimerów w DNA mogła mieć inna morfologia roślin, w szczególności drobne i pozwijane liście (Rysunek 4G,H; 5G,H), które otrzymują w rezultacie niższą dawkę UV.

### **5.1.2. Wpływ cukrów w podłożu na poziom barwników fotosyntetycznych**

Analiza poziomów barwników fotosyntetycznych wykazała wzrost zawartości chlorofili a i b na podłożach z 3% sacharozą i na podłożach z 3% glukozą (Rysunek 9E,F). Również średnie poziomy karotenoidów:  $\beta$ -karotenu, luteiny, wiolaksantyny i neoksantyny były podwyższone w tych roślinach w porównaniu z kontrolą rosnącą bez cukrów (Rysunek 9A,B,C,D). Wzrost poziomów tych związków był skorelowany ze wzrostem poziomu chlorofili. Przy przeliczeniu ich zawartości na zawartość chlorofilu (wyrażoną w molach) powyższe różnice zanikają. Jedyną istotną statystycznie różnicą był obniżony poziom wiolaksantyny w roślinach hodowanych na podłożu GLC3 w porównaniu z roślinami z podłoża kontrolnego (Rysunek 10D). Pozytywny wpływ cukrów na aparat fotosyntetyczny, mierzony m.in. jako wpływ na wydajność transportu elektronów (ETR, electron transport rate), maksymalną wydajność kwantowa PSII czy wydajność fotochemiczną PSII był już opisany (Tichá et al., 1998; Kadleček et al., 2003; Eckstein et al., 2012). Inni badacze zwracali też uwagę na przeciwny efekt – wywołane egzogennymi cukrami osłabienie fotosyntezy u hodowanych *in vitro* skrzydłokwiatów - *Spathiphyllum* (Van Huylbroeck & Debergh, 1996) oraz goryczki – *Gentiana kurroo* (Rybczyński et al., 2007). W naszych warunkach 3% stężenia cukrów podawane w pożywce wpływały na wzrost zawartości barwników fotosyntetycznych bez istotnych zmian w ich wzajemnych proporcjach (Rysunek 9). Wzrost poziomu chlorofili, z zachowaniem niezmiennego stosunku ilości chlorofilu a do chlorofilu b, zaobserwowano również u *N. tabacum* hodowanych na podłożu z sacharozą (Kadleček et al., 2003). Podobnie, nie zaobserwowano znaczących różnic w proporcjach pomiędzy karotenoidami w tych samych warunkach (Tichá et al., 1998), ani w stosunku ilości karotenoidów do chlorofili (Kadleček et al., 2003). Lepsza kondycja roślin mogła niespecyficznie wpływać na ich odporność na czynniki stresowe, w tym promieniowanie UV, na przykład poprzez resyntezę uszkodzonych białek czy szybszą naprawę uszkodzeń DNA, która została zbadana dla dimerów pirymidynowych i jest omówiona w dalszej części Dyskusji.

### **5.1.3. Wpływ cukrów w podłożu na produkcję chloroplastowych przeciwutleniaczy**

Interesujących wyników dostarczyła analiza poziomów tokoferoli, plastochofanolu-8 i plastochofanonu-9. W roślinach hodowanych na podłożu z 3% glukozą poziom

wszystkich tych związków był obniżony w porównaniu do kontroli bez cukru. Średnia zawartość  $\gamma$ -tokoferolu była aż ponad 14-krotnie niższa,  $\alpha$ -tokoferolu prawie 3-krotnie niższa, a PC-8 i PQ-9 ok. 2-krotnie niższa (Rysunek 12). Średni poziom  $\gamma$ -tokoferolu był obniżony również w roślinach hodowanych na podłożu SUC1 i SUC3, odpowiednio ok. 5 i 12-krotnie w porównaniu z kontrolą (Rysunek 12B). Poziom PC-8 w roślinach z podłoża SUC3 był o około połowę niższy (Rysunek 12C). Te cztery związki uczestniczą w ochronie antyoksydacyjnej roślin, przede wszystkim chronią przez peroksydacją lipidów błonowych w chloroplastach i zmiatają ROS powstające w PSI i PSII. Ich zmniejszona ilość w roślinach hodowanych na podłożu z dodatkiem glukozy albo sacharozy jest zaskakująca, ponieważ przy zwiększonej zawartości chlorofili (Rysunek 9E,F) można spodziewać się zwiększonej produkcji ROS. Wpływ cukrów na poziomy tokochromanoli nie był dotychczas badany. Wzrost zawartości tokoferoli jest obserwowany w różnych warunkach stresowych, takich jak silne światło (Havaux et al., 2000; Szymańska & Kruk, 2010), promieniowanie UV czy niedobór wody (Munné-Bosch & Alegre, 2002). Silne światło powoduje też podwyższenie poziomu plastochinonu-9, ale nie plastochromanolu-8 (Szymańska & Kruk, 2010). Zarówno ilość tokoferoli jak i PC-8 oraz PQ-9 rośnie podczas starzenia się *Arabidopsis* hodowanych w umiarkowanym świetle (Szymańska & Kruk, 2010).

#### **5.1.4. Wpływ cukrów w podłożu na zawartość związków polifenolowych**

Pomiar zawartości związków polifenolowych za pomocą HPLC wykazał obecność kilku silnie absorbujących w zakresie UV związków. Poziom czterech spośród nich był podwyższony w roślinach rosnących na podłożu z 3% glukozą, a jednego – także na podłożu z 3% sacharozą (Rysunek 14). Na podstawie analizy wyników spektrometrii masowej stwierdzono, że wśród związków polifenolowych najwięcej było glikozydów kemferolu: 3-O-[ramnozylo(1→2-glukozydu)]-7-O-ramnozydu; 3,7-diramnozydu i 3-glukozydu-7-ramnozydu, poza tym stwierdzono obecność 3-glukozydu-7-ramnozydu kwercetyny i jabłczanu sinapoilu.

Znany jest wpływ sacharozy na produkcję antocyjanów, wykazano też, że ten cukier wywołuje bardzo silną indukcję wielu genów ze szlaku ich biosyntezy, w tym genów kodujących białka wspólne dla szlaku syntezy flawonoli i antocyjanów, jak syntaza chalkonowa (CHS) czy izomeraza chalkonowa (CHI), a także genów specyficznych dla szlaku syntezy antocyjanów, np. genu *DFR* kodującego reduktazę dihydroflawonoli

(*DIHYDROFLAVONOL REDUCTASE*) (Solfanelli et al., 2006). Autorzy pracy wykazali, że również glukoza może indukować ekspresję niektórych z tych genów, ale nie *DFR*, którego produkt jest pierwszym enzymem oddzielającym szlaki syntezy antocyjanów i flawonoli. Być może jest to wytłumaczenie znacznie wyższych poziomów flawonoidów zmierzonych w ekstraktach z roślin hodowanych na podłożu z glukozą niż z sacharozą (Rysunek 14A,D). Przy niższym poziomie *DFR*, dihydrokemferol i dihydrokwercetyna, mogły być preferencyjnie przekształcane w odpowiednio: kemferol i kwercetynę przez syntazę flawonoli, *FLS* (*FLAVONOL SYNTHASE*).

3-krotnie wyższa zawartość triglukozydu kemferolu w porównaniu z kontrolnymi roślinami, 2-krotnie wyższa zawartość jabłczanu sinapoilu oraz aż 7-krotnie wyższa zawartość diramnozydu kemferolu w roślinach rosnących na *GLC3*, podobnie jak 1,5-krotnie wyższa zawartość jabłczanu sinapoilu w roślinach rosnących na podłożu *SUC3* (Rysunek 14) może odpowiadać za zmniejszenie ilości UV docierającego w głąb tkanek liścia. W roślinach rosnących na podłożu z 1 i 3% glukożą zawartość jedyne go stwierdzonego glikozydu kwercetyny jest nieznacznie niższa niż w kontroli (Rysunek 14B). Stosunek zawartości kwercetyny do kemferolu wzrasta w silnym świetle, a także pod wpływem UV-B w wielu zbadanych roślinach, w tym *Arabidopsis* (Ryan et al., 2001). Zwracano uwagę, że może to być wynikiem silniejszego działania przeciwutleniającego flawonoidów z większą ilością grup hydroksylowych (Agati et al., 2012). Na przykład aktywność przeciwutleniająca mierzona jako stężenie związku konieczne do zmniejszenia ilości wolnego rodnika o połowę jest o ponad rząd wielkości większa dla 3-O-glukozydu kwercetyny niż dla 3-O-glukozydu kemferolu (Agati et al., 2012). W naszym doświadczeniu zaobserwowano wzrost ilości związków fenolowych, który prawdopodobnie powodował zwiększenie pochłaniania promieniowania w zakresie UV. Wydaje się, że z kolei ochrona antyoksydacyjna jest słabsza w przypadku roślin hodowanych na podłożach z sacharozą i glukożą niż na podłożu kontrolnym (Rysunek 12). Być może równowaga w powstawaniu i pochłanianiu ROS jest utrzymana np. przez enzymatyczne przeciwutleniacze. Niskie poziomy tokochromanoli oraz glikozydów kwercetyny mogą jednak oznaczać, że nagły wzrost produkcji wolnych rodników może spowodować silniejszy stres oksydacyjny niż w przypadku roślin rosnących na podłożu bez cukrów.

## 5.2. UV indukuje kwitnienie w roślinach rosnących na podłożu z sacharozą

Zaobserwowano również pojawienie się pędów kwiatowych u roślin hodowanych na podłożu z sacharozą naświetlonych UV (Rysunek 6B). Dotychczas opisano indukcję kwitnienia pod wpływem UV, prawdopodobnie będącą wynikiem stresu (Martínez et al., 2003; Llorens et al., 2015), ale również zależną od UVR8 (Arongaus et al., 2018). Znany jest też wpływ sacharozy na kwitnienie *Arabidopsis* m.in. przez indukcję genów takich jak *LFY* (Eriksson et al., 2006; Matsoukas et al., 2012). Działanie sacharozy w regulacji kwitnienia jest jednak silnie zależne od jej stężenia oraz wielu innych czynników. Wykazano, że rośliny na podłożu z 5% sacharozą kwitną o 8 dni później w porównaniu z hodowanymi na 1% i 2% sacharozie (Ohto et al., 2001). W warunkach zastosowanych w naszym doświadczeniu wpływ samego UV albo samej sacharozy nie był istotny statystycznie, natomiast zaobserwowano synergistyczne działanie obu tych czynników.

### 5.2.1. Rola UVR8 w regulacji kwitnienia

Aby określić czy wpływ UV w połączeniu z sacharozą na przyspieszone kwitnienie *Arabidopsis* może być zależny od receptora UV-B, kodowanego przez *UVR8*, przeprowadzono doświadczenie z mutantami tego genu. W mutantach *uvr8* indukcja kwitnienia zachodziła we wszystkich badanych warunkach na podobnym poziomie jak obserwowany u dzikiego typu (Rysunek 7). UVR8 uczestniczy w zależnej od UV-B indukcji kwitnienia zarówno w warunkach długiego jak i krótkiego dnia. Wykazano to badając mutanty *uvr8* oraz jego represora – *rup2* (REPRESSOR OF UV-B MORPHOGENESIS 1, 2) (Arongaus et al., 2018). Przy braku represji UVR8, mutanty *rup2* naświetlane UV-B kwitły w krótkim fotoperiodzie w tym samym czasie co WT w warunkach długiego dnia. Efekt ten nie występował w mutancie podwójnym *uvr8 rup2* (Arongaus et al., 2018). W naszych warunkach indukcja kwitnienia nie była zależna od UVR8. W doświadczeniu przeprowadzonym przez Arongaus i współautorów stosowano niższą dawkę UV (ok.  $0,3 \text{ W}\cdot\text{m}^{-2}$ ) przez 6 godzin czyli ok.  $0,648 \text{ kJ}\cdot\text{m}^{-2}$ . Można więc przypuszczać, że mechanizm indukcji kwitnienia w naszym doświadczeniu był inny, być może zależny był on od kwasu salicylowego (Martínez et al., 2003).

### 5.2.2. Analiza poziomu ekspresji genów związanych z indukcją kwitnienia

Przeanalizowano poziomy transkryptów *CO* i *FT* – dwóch genów istotnych podczas indukcji kwitnienia. Poziom transkryptu *CO* był podwyższony wyłącznie w roślinach rosnących na podłożu SUC1 w pierwszym dniu po naświetleniu UV (Rysunek 8A), a w roślinach rosnących na podłożu SUC3 w drugim dniu po naświetleniu, w porównaniu z innymi roślinami naświetlanymi UV (Rysunek 8C). Te różnice nie przekładały się na różnice w poziomie transkryptu *FT*, który był najwyższy w roślinach nie naświetlanych UV (Rysunek 8B,D). Poza tym poziom transkryptu *CO* nie różnił się w tych roślinach znacząco od poziomu obserwowanego w nienaświetlanych roślinach z tych samych podłoży. Obserwacje te nie pokrywają się ze spodziewanymi. Silniejsza indukcja kwitnienia obserwowana u roślin naświetlonych UV rosnących na podłożach z sacharozą wskazywała, że efekt ten będzie widoczny dla transkryptu *FT*, który może być też indukowany niezależnie od *CO*, na przykład przez ścieżkę sygnału zależną od T6P (Wahl et al., 2013). Sacharoza podawana do nadziemnej części roślin rosnących na pionowych szalkach może przyspieszać kwitnienie mutantów o opóźnionym kwitnieniu takich jak *gi* czy *co*, nawet jeśli są hodowane w całkowitej ciemności (Roldán et al., 1999). Podobnego efektu nie zaobserwowano dla mutantów *ft* (Roldán et al., 1999). Działanie sacharozy w indukcji kwitnienia w zastosowanych w tamtym doświadczeniu warunkach zachodziło więc z udziałem produktu genu *FT*. Sprawdzenie indukcji kwitnienia mutantów *ft* naświetlanych UV-B na podłożu z sacharozą mogłoby przynieść odpowiedź, czy w proces ten również zaangażowane jest *FT*, nawet jeśli poziom jego mRNA nie ulega zmianie.

### 5.3. Wpływ stresu osmotycznego na wyniki doświadczeń

Cukry są ważnymi cząsteczkami sygnałowymi regulującymi wiele procesów oraz informującymi o stanie energetycznym komórki. Jednak ich obecność w podłożu mogła również uruchomić mechanizmy odpowiedzi na stres osmotyczny. Aby rozróżnić te efekty wprowadzono kontrolne podłoża z mannitolem, którego stężenia molowe odpowiadały stężeniom cukrów w podłożach z sacharozą i glukozą. Mannitol jest często używany do badania stresu osmotycznego (Perruc et al., 2004; Dodd et al., 2007), a także jako kontrola osmotyczności przy sprawdzaniu działania cukrów (Sulmon et al., 2004, Ramel et al., 2007). Uważa się, że nie jest on pobierany z podłoża ani transportowany przez *Arabidopsis* (Klepek et al., 2005). Stosowanie mannitolu jako

kontroli osmotyczności dla podłoża z cukrami niesie jednak pewne ograniczenia. Mannitol dodany do podłoża jest czynnikiem stresowym wywołującym m. in. zahamowanie wzrostu liści i uruchomienie genów związanych z odpowiedzią na stres (Kreps et al., 2002; Trontin et al., 2014), regulowanych przez czynniki transkrypcyjne ERF (ETHYLENE RESPONSE FACTORS) (Dubois et al., 2015). Rośliny rosnące na podłożu z mannitolem są znacznie mniejsze w porównaniu z rosnącymi na podłożu B5 bez dodatków oraz z cukrami, a ich liście są drobne i pozwijane (Rysunek 4G,H; 5G,H). Takie zmiany w morfologii mogły z kolei przekładać się na różnice w penetracji tkanki przez UV.

#### **5.4. Wpływ cukrów w podłożu na wywołane UV uszkodzenie fotosytemu II**

##### **5.4.1. Wpływ stosowanej hodowli na $F_v/F_m$**

Dobrym wyznacznikiem ogólnego stanu fizjologicznego roślin jest maksymalna wydajność kwantowa fotosystemu II ( $F_v/F_m$ ), która u zdrowych roślin wynosi powyżej 0,8. Pomiar tego parametru jest szeroko stosowany podczas badania stresu u roślin (Maxwell & Johnson, 2000). Mierzono  $F_v/F_m$  roślin naświetlanych UV, hodowanych na różnych podłożach. Zwraca uwagę fakt, że średnia  $F_v/F_m$  jest obniżona do wartości około 0,71 u roślin hodowanych na podłożu kontrolnym B5 oraz do 0,73 na podłożu z 0,53% mannitolu (Rysunek 11). Przy stężeniu mannitolu równym 1, 1,6 oraz 3% średnia zmierzonych  $F_v/F_m$  była nieco wyższa i wynosiła 0,77 (Rysunek 11). Dla roślin z podłoża z sacharozą i glukozą parametr ten wynosił około 0,8 (Rysunek 11). Obniżenie wydajności kwantowej PSII było wcześniej stwierdzone podczas badań odpowiedzi *Arabidopsis* na stres solny i osmotyczny (Li et al., 2013; Dong et al., 2014; Singh et al., 2015). Rośliny pasażowane na podłożu z 300 mM mannitolem (ok. 5,5%) miały  $F_v/F_m$  obniżone do 0,52 (Li et al., 2013), a na podłożu z 400 mM mannitolem (ok. 7,2%) nawet do ok. 0,2 (Singh et al., 2015).

##### **5.4.2. Niskie dawki UV nieznacznie wpływają na $F_v/F_m$**

Krótką, 5-minutową ekspozycją na UV o natężeniu  $8 \text{ W}\cdot\text{m}^{-2}$  (dawka ok.  $2,5 \text{ kJ}\cdot\text{m}^{-2}$ ) powodowała nieznaczny spadek  $F_v/F_m$  we wszystkich badanych grupach roślin (Rysunek 11A). Zaobserwowano niewielki wpływ stosowanego podłoża na utratę wydajności kwantowej fotosystemu II w tych warunkach. Obniżenie tego parametru było większe w przypadku roślin hodowanych na podłożach GLC1 i MAN1,6 niż dla



kontroli B5Ø. Porównując izoosmotyczne pary podłoży zaobserwowano większy spadek  $F_v/F_m$  dla roślin rosnących na GLC1 niż MAN1, a mniejszy – na SUC3 niż na MAN1,6 (Rysunek 11A).

#### **5.4.3. Obecność substancji osmotycznie czynnych w podłożu pomaga chronić aparat fotosyntetyczny przed UV**

Przy godzinnej ekspozycji na UV, skutkującej dawką ok.  $28 \text{ kJ}\cdot\text{m}^{-2}$  zaobserwowano znacznie większy spadek  $F_v/F_m$  (Rysunek 11B). Dla roślin z kontrolnej pożywki B5Ø średnia z pomiarów wynosiła 0,4 i była to najniższa uzyskana wartość. Najwyższe średnie  $F_v/F_m$  miały rośliny z podłoża GLC3. Spadek tego parametru był mniejszy w przypadku podłoży MAN0,53, SUC3, GLC3 i MAN3. Porównanie wyników uzyskanych dla roślin z pary izoosmotycznych podłoży: SUC1 i MAN0,53 wykazało, że utrata  $F_v/F_m$  była mniejsza dla podłoża z mannitolem. Odwrotnie było w parach SUC3 i MAN1,6 oraz GLC1 i MAN1, w których to rośliny na podłożu z cukrem miały średnio mniejszy spadek  $F_v/F_m$  (Rysunek 11B). Wpływ UV-B na maksymalną wydajność kwantową PSII był już badany (Jansen et al., 2010; Davey et al., 2012). Wyniki różnią się w zależności od ekotypu *Arabidopsis* oraz warunków hodowli przez naświetleniem UV-B (Jansen et al., 2010). Dla ekotypu Columbia hodowanego w komorze hodowlanej zmierzono  $F_v/F_m$  na poziomie 0,49 (Col-2) i 0,64 (Col-9) przy nieco wyższej niż stosowana przez nas dawce UV-B (Jansen et al., 2010). Dla ekotypu Col-0 zmierzono  $F_v/F_m$  średnio ok. 0,65 (Davey et al., 2012) przy dawce UV-B porównywalnej ze stosowaną w naszym eksperymencie. Nie ma dostępnych w literaturze danych dotyczących wpływu egzogennych cukrów na maksymalną wydajność kwantową PSII po naświetlaniu UV. Nasze wyniki wskazują na zmniejszone uszkodzenie przez UV fotosystemu II zarówno w roślinach na podłożach z sacharozą, glukozą jak i mannitolem. Ochrona aparatu fotosyntetycznego zależała od osmotyczności stosowanego podłoża, a w mniejszym stopniu od obecności cukru.

### **5.5. Wpływ cukrów w podłożu na naprawę DNA**

#### **5.5.1. Ekspresja genów zaangażowanych w różne szlaki naprawy DNA**

Bardzo ważnym mechanizmem odpowiedzialnym za odporność na UV jest naprawa uszkodzeń DNA. Pomiar poziomu transkryptów genów kodujących białka zaangażowane w różne szlaki naprawy DNA w *Arabidopsis* dostarczył ciekawych

wyników. Zaobserwowany niższy poziom mRNA genu kodującego fotoliazę 6-4 PP, *UVR3* na podłożu z glukozą zgadza się z dostępnymi w literaturze danymi (Li et al., 2006). Niski poziom mRNA nie przekładał się jednak na aktywność białka, lub w badanych warunkach szybkość naprawy nie była ograniczana przez ilość enzymu, a na przykład przez utrudniony dostęp do dimerów w DNA przy ich znacznym nagromadzeniu. Wskazuje na to brak zaobserwowanych różnic w poziomie naprawy 6-4 PP na świetle (Rysunek 20D), za którą u roślin odpowiadają głównie fotoliazы (Pang & Hays, 1991; Chen et al., 1994).

Wpływ cukrów na ekspresję genów szlaku BER i NER w roślinach nie był dotychczas badany. W literaturze niewiele jest danych dotyczących regulacji ekspresji tych genów. Wykazano m.in., że ekspresja *APE2* jest obniżona przez L-DOPA (Golisz et al., 2011) W naszym eksperymencie zaobserwowano nieznaczny wzrost poziomu transkryptu *APE1L* w roślinach hodowanych *in vitro* na podłożu z glukozą lub sacharozą. Nie obserwowano podobnego efektu w przypadku dodatku mannitolu (Rysunek 15B). Poziomy transkryptu *APE2* były podobne we wszystkich badanych próbkach (Rysunek 15C).

Cukry i mannitol w niewielkim stopniu wpływają także na poziom transkryptów wybranych genów zaangażowanych w NER. Zaobserwowano wzrost poziomu transkryptów genów kodujących białka wiążące uszkodzone DNA – *DDB1A* i *DDB1B* – na podłożach z sacharozą i mannitolem, ale nie z glukozą (Rysunek 16A,B). Poziom transkryptu *RAD23A* był około 2-krotnie wyższy w roślinach hodowanych na podłożach z 1 i 3% glukozą lub 3% sacharozą, zarówno w porównaniu do mannitolu jak i podłoża kontrolnego (Rysunek 16D). Nie zaobserwowano znaczących różnic w przypadku genów *RAD1* i *UVH6* (Rysunek 16C,E).

Wpływ cukrów na ekspresję wybranych genów zaangażowanych w naprawę pęknięć dwuniciowych różni się dla dwóch głównych szlaków tej naprawy. Cukry około 2-3-krotnie zwiększają ekspresję genów *BRCA1* i *RAD51* zaangażowanych w HR (Rysunek 17A,B), ale nie mają istotnego wpływu na gen kodujący KU70, jedno z białek uczestniczących w NHEJ (Rysunek 17C). Znany jest indukujący wpływ na ekspresję tych genów czynników powodujących uszkodzenia DNA takich jak promieniowanie gamma (Lafarge & Montané, 2003), metanosulfonian metylu (MMS, methyl methanesulfonate) (Yin et al., 2009) czy jony kadmu (Cao et al., 2018). Ich ekspresja

jest ponadto obniżana przez ABA (Yin et al., 2009), a w przypadku *KU70* także przez podwyższoną temperaturę (Liu et al., 2008).

Wysokie stężenia cukrów pozytywnie regulują niektóre geny ze szlaku naprawy błędnie sparowanych nukleotydów. Rośliny na 3% glukozie i sacharozie miały 4-5-krotnie podwyższony poziom transkryptu *MSH7* w porównaniu z kontrolą (Rysunek 17E). Podobnego efektu nie zaobserwowano dla transkryptu *MLH1*, którego poziomy były zbliżone u wszystkich badanych grup roślin (Rysunek 17D). Rola cukrów w MMR nie była wcześniej badana. Poziom ekspresji wielu genów tego szlaku naprawy jest podwyższany przez nanocząsteczki srebra (Nair & Chung, 2014), a także kadm (Liu et al., 2009) i MMS (Yin et al., 2009).

Cukry wpływają różnie na ekspresję dwóch gyraz *Arabidopsis*. Poziom transkryptu *GYRA* był wyższy w roślinach hodowanych na podłożach zarówno z glukozą jak i sacharozą (Rysunek 18A). Poziom transkryptu *GYRBI* był obniżony tylko w przypadku 1% glukozy i wszystkich używanych stężeń mannitolu (Rysunek 18B). *GYRA* i *GYRBI* kodują podjednostki kompleksu gyrazy *Arabidopsis*, które są kierowane do mitochondriów i chloroplastów (Wall et al., 2004). Są one topoizomerazami typu II i są konieczne do utrzymania integralności genomu chloroplastowego podczas replikacji (Yang et al., 2017).

Ekspresja genów *PCNA* jest indukowana przez cukry w podłożu. Poziom transkryptów *PCNA1* i *PCNA2* wzrósł znacząco w roślinach hodowanych na wysokim stężeniu obu cukrów, a poziom *PCNA1* również na niższych ich stężeniach (Rysunek 18C,D). W przypadku *PCNA1* zaobserwowano 4-6-krotną różnicę w stosunku do roślin hodowanych podłożu bez cukru oraz na podłożach z mannitolem (Rysunek 18C). Dla *PCNA2* te różnice były mniejsze, około 2-krotne (Rysunek 18D). Białka PCNA uczestniczą w wielu procesach, są aktywne nie tylko w naprawie ale też poprzedzającej podziały komórkowe replikacji DNA. Ich zwiększony poziom w roślinach rosnących na podłożach z dodatkiem cukrów mógł być związany z ich bardziej intensywnym rozwojem i zwiększoną ilością dzielących się komórek. Poziom transkryptów *PCNA* rośnie również w odpowiedzi na jony kadmu (Liu et al., 2009) oraz nanocząsteczki srebra (Nair & Chung, 2014).

### 5.5.2. Wpływ cukrów na fotoreaktywację i naprawę ciemnościową

Warunki zastosowane do naprawy uszkodzeń po ekspozycji na UV miały posłużyć w szczególności do określenia wpływu cukrów na naprawę zależną od światła, która jest głównym mechanizmem naprawczym dimerów pirymidynowych w DNA *Arabidopsis* (Chen et al., 1994; Pang & Hays, 1991). Nie zaobserwowano wpływu podłoża hodowlanego na poziom obu typów dimerów po 4-godzinnej naprawie w świetle niebieskim (470 nm, 100  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ). W tym czasie poziom CPD spadł o ok. 20-30% (Rysunek 20B), a 6-4 PP o ok. 60-70% (Rysunek 20D) w porównaniu z poziomem zmierzonym zaraz po naświetlaniu, nie zaobserwowano jednak istotnych statystycznie różnic pomiędzy grupami roślin rosnących na różnych podłożach. Naprawa w ciemności była znacznie mniej wydajna i po 4 godzinach inkubacji w DNA pozostało od 80 do nawet 100% zarówno CPD jak i 6-4 PP w porównaniu do poziomu wyjściowego (Rysunek 20A,C). Najniższe poziomy CPD i 6-4 PP po inkubacji w ciemności stwierdzono dla roślin z podłoży GLC3 i SUC3. Różnice pomiędzy nimi i poziomami zmierzonymi w DNA roślin z podłoży MAN3 i MAN1,6 były istotne statystycznie (Rysunek 20A,C). Za naprawę dimerów pirymidynowych bez udziału światła odpowiada szlak NER. Z przeanalizowanych genów, których produkty uczestniczą w NER istotne różnice w ekspresji w roślinach hodowanych na podłożu SUC3 i GLC3 zaobserwowano w przypadku *RAD23A*, a także *PCNA1* i *PCNA2* (Rysunek 16D; 18C,D). *RAD23A* należy do jednego z kompleksów odpowiedzialnych za rozpoznanie uszkodzenia i rekrutację innych białek. *PCNA1* i *PCNA2* uczestniczą w formowaniu kompleksu polimerazy podczas NER, ale także w BER (Matsumoto, 2001). Ponadto wykazano, że ludzkie i drożdżowe PCNA oddziałują z wieloma białkami uczestniczącymi we wcześniejszych etapach BER jak np. endonukleaza AP1 (Dianova et al., 2001), endonukleaza AP2 (Tsuchimoto et al., 2001), a także NER: np. z endonukleazą XPG (Gary et al., 1997). Można przypuszczać, że podwyższona ekspresja genów *RAD23A*, *PCNA1* i *PCNA2* – o ile będzie miała przełożenie również na poziom białka - ułatwia rozpoznanie uszkodzenia i rekrutację pozostałych białek kompleksów naprawczych, m. in. *RAD1* i *UVH6*, przyczyniając się do wydajniejszej naprawy DNA.

## 5.6. Udział ruchów organelli komórkowych w ochronie przed UV

Badanie wpływu sterowanych światłem niebieskim ruchów chloroplastów i jąder komórkowych na poziom uszkodzeń w DNA nie potwierdziło hipotezy, że przemieszczanie organelli może pełnić rolę ochronną dla materiału genetycznego przed uszkodzeniami wywołanymi UV. Nie zaobserwowano znaczących różnic w poziomie uszkodzeń między DNA roślin dzikiego typu, w których wywołano reakcję akumulacji chloroplastów przez naświetlanie światłem słabym lub ucieczkę zarówno jąder komórkowych jak i chloroplastów przez naświetlanie światłem silnym (Rysunek 21). W trzech spośród zastosowanych mutantów – *phot2*, *phot1phot2* i *chup1* nie obserwuje się reakcji ucieczki chloroplastów, a w *phot1phot2* i *chup1* także reakcji akumulacji. Mimo tego ani po naświetlaniu silnym ani słabym światłem niebieskim nie obserwowano różnic między poziomem uszkodzeń w DNA tych mutantów i dzikiego typu. Wynik ten nie pokrywa się z opublikowanymi niedawno danymi dotyczącymi ochrony jąder komórkowych przez reakcję ucieczki (Iwabuchi et al., 2016). W tamtym doświadczeniu analizowano jednak pojedyncze jądra komórkowe, a nie całe liście, których w tym przypadku używano ok. 50 do każdej izolacji jąder komórkowych. W doświadczeniu Iwabuchi i współpracowników zaobserwowano największą różnicę w poziomie uszkodzeń w komórkach epidermy, które stanowią niewielką część wszystkich komórek. Ucieczka jąder komórkowych i chloroplastów w kierunku ścian równoległych do kierunku padania światła mogła spowodować zwiększenie transmisji promieniowania do głębszych warstw liści. Poza tym w pracy zespołu kierowanego przez Iwabuchi porównywane są rośliny, które przed zastosowaniem UV były naświetlane silnym światłem niebieskim lub adaptowane do ciemności.

## 5.7. Podsumowanie

Wyniki przeprowadzonych doświadczeń wskazują na zwiększoną ochronę przed promieniowaniem UV roślin hodowanych na podłożach z dodatkiem cukrów. Rośliny te lepiej przeżywały naświetlenie (Rysunek 4; 5; 6A) i akumulowały mniej uszkodzeń DNA (Rysunek 19). Prawdopodobnie głównym mechanizmem za to odpowiedzialnym jest zwiększona akumulacja związków fenolowych absorbujących w zakresie UV (Rysunek 14). Cukry w podłożu nie wpływały na naprawę dimerów pirymidynowych zachodzącą na świetle, ale poprawiały wydajność naprawy prowadzonej w ciemności (Rysunek 20). Być może miała na to wpływ podwyższona ekspresja niektórych genów

uczestniczących w NER (Rysunek 16; 18). Obecność cukrów w podłożu zmniejszała zawartość chloroplastowych przeciwutleniaczy (Rysunek 12). Ciekawym uzupełnieniem tego wyniku mogłoby być sprawdzenie innych (np. enzymatycznych) składników systemu ochrony antyoksydacyjnej.

W trakcie realizacji pracy zaobserwowano wpływ obecnej w podłożu sacharozy na kwitnienie roślin po naświetleniu UV (Rysunek 6B). Efekt ten nie jest zależny od jedyne go znanego receptora UV-B, UVR8 (Rysunek 7), więc prawdopodobnie jest reakcją na czynnik stresowy. W kolejnych badaniach należałoby zbadać udział kwasu salicylowego w indukcji kwitnienia w tych warunkach, a także sprawdzić fenotyp mutantu *ft*.

## 6. Literatura

- Abe K, Osakabe K, Nakayama S, Endo M, Tagiri A, Todoriki S, Ichikawa H, Toki S** (2005) Arabidopsis RAD51C Gene Is Important for Homologous Recombination in Meiosis and Mitosis. *Plant Physiol*, 139: 896–908
- Agati G, Galardi C, Gravano E, Romani A, Tattini M** (2002) Flavonoid Distribution in Tissues of *Phillyrea latifolia* L. Leaves as Estimated by Microspectrofluorometry and Multispectral Fluorescence Microimaging. *Photochem Photobiol*, 76: 350–360
- Agati G, Matteini P, Goti A, Tattini M** (2007) Chloroplast-located flavonoids can scavenge singlet oxygen. *New Phytol*, 174: 77–89
- Agati G, Stefano G, Biricolti S, Tattini M** (2009) Mesophyll distribution of ‘antioxidant’ flavonoid glycosides in *Ligustrum vulgare* leaves under contrasting sunlight irradiance. *Ann Bot-London*, 104: 853–861
- Agati G, Azzarello E, Pollastri S, Tattini M** (2012) Flavonoids as antioxidants in plants: Location and functional significance. *Plant Sci*, 196: 67–76
- Ahmad M, Jarillo JA, Klimczak LJ, Landry LG, Peng T, Last RL, Cashmore AR** (1997) An enzyme similar to animal type II photolyases mediates photoreactivation in Arabidopsis. *Plant Cell*, 9: 199–207
- Allan AC, Fluhr R** (1997) Two Distinct Sources of Elicited Reactive Oxygen Species in Tobacco Epidermal Cells. *Plant Cell*, 9: 1559–1572
- Arongaus AB, Chen S, Pireyre M, Glöckner N, Galvao VC, Albert A, Winkler JB, Fankhauser C, Harter K, Ulm R** (2018) Arabidopsis RUP2 represses UVR8-mediated flowering in noninductive photoperiods. *Gene Dev*, 32: 1332–1343
- Asada K** (2006) Production and Scavenging of Reactive Oxygen Species in Chloroplasts and Their Functions. *Plant Physiol*, 141(2): 391–396
- Babyichuk E, Phillipa B, Cottrill PB, Storozhenko S, Fuangthong M, Chen Y, O’Farrell MK, Van Montagu M, Inze D, Kushnir S** (1998) Higher plants possess two structurally different poly(ADP-ribose) polymerases. *Plant J*, 15(5): 635–645
- Balestrazzi A, Confalonieri M, Macovei A, Dona M, Carbonera D** (2011) Genotoxic stress and DNA repair in plants: emerging functions and tools for improving crop productivity. *Plant Cell Rep*, 30(3): 287–295
- Banaś AK, Gabryś H** (2007) Influence of sugars on blue light-induced chloroplast movements. *Plant Signal Behav* 4:221–230
- Banaś AK, Hermanowicz P, Sztatelman O, Łabuz J, Aggarwal C, Zglobicki P, Jagiello-Flasińska D, Strzałka W** (2017) 6,4-PP Photolyase Encoded by AtUVR3 is Localized in Nuclei, Chloroplasts and Mitochondria and its Expression is Down-Regulated by Light in a Photosynthesis-Dependent Manner. *Plant Cell Physiol*, 59(1): 44–57

- Barker L, Kühn C, Weise A, Schulz A, Gebhardt C, Hirner B, Hellmann H, Schulze W, Ward JM, Frommer WB** (2000) SUT2, a putative sucrose sensor in sieve elements. *Plant Cell*, 12: 1153–1164
- Barnes DE, Lindahl T** (2004) Repair and Genetic Consequences of Endogenous DNA Base Damage in Mammalian Cells. *Annu Rev Genet*, 38(1): 445–476
- Barta C, Kálai T, Hideg K, Vass I, Hideg É** (2004) Differences in the ROS-generating efficacy of various ultraviolet wavelengths in detached spinach leaves. *Funct Plant Biol*, 31(1): 23–28
- Beggs CJ, Stolzer-Jehle A, Wellmann E** (1985) Isoflavonoid Formation as an Indicator of UV Stress in Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Leaves : The Significance of Photorepair in Assessing Potential Damage by Increased Solar UV-B Radiation. *Plant Physiol*, 79(3): 630–634
- Bieza K, Lois R** (2001) An Arabidopsis Mutant Tolerant to Lethal Ultraviolet-B Levels Shows Constitutively Elevated Accumulation of Flavonoids and Other Phenolics. *Plant Physiol*, 126: 1105–1115
- Bilger W, Rolland M, Nybakken L** (2007) UV screening in higher plants induced by low temperature in the absence of UV-B radiation. *Photochem Photobiol Sci*, 6: 190–195
- Björn LO** (1996) Effects of ozone depletion and increased UV-B on terrestrial ecosystems. *Internat J Environ Stud*, 51(3): 217–243
- Boccalandro HE, Mazza CA, Mazzella MA, Casal JJ, Ballaré CL** (2001) Ultraviolet B radiation enhances a phytochrome-B-mediated photomorphogenic response in Arabidopsis. *Plant Physiol*, 126: 780–788
- Bray C, West C** (2005) DNA repair mechanisms in plants: crucial sensors and effectors for the maintenance of genome integrity. *New Phytol*, 168: 511–528
- Britt AB** (1999) Molecular genetics of DNA repair in higher plants. *Trends Plant Sci*, 4: 20–25
- Brosché M, Strid A** (2003) Molecular events following perception of ultraviolet-B radiation by plants. *Physiol Plantarum*, 117(1): 1–10
- Brown B, Jenkins GI** (2008) UV-B Signaling Pathways with Different Fluence-Rate Response Profiles Are Distinguished in Mature Arabidopsis Leaf Tissue by Requirement for UVR8, HY5, and HYH. *Plant Physiol*, 146: 576–588
- Brown JAM, Klein WH** (1971) Photomorphogenesis in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant Physiol*, 47: 393–399
- Brown JE, Khodr H, Hider RC, Rice-Evans CA** (1998) Structural dependence of flavonoid interactions with Cu(II) ions: implication for their antioxidant properties. *Biochem J*, 339: 1173–1178
- Brown BA, Cloix C, Jiang GH, Kaiserli E, Herzyk P, Kliebenstein DJ, Jenkins GI** (2005) A UV-B-specific signaling component orchestrates plant UV protection. *P Natl Acad Sci USA*, 102: 18225–30



- Burchard P, Bilger W, Weissenböck G** (2000) Contribution of hydroxycinnamates and flavonoids to epidermal shielding of UV-A and UV-B radiation in developing rye primary leaves as assessed by ultraviolet-induced chlorophyll fluorescence measurements. *Plant Cell Environ*, 23: 1373–1380
- Caldwell MM, Bornman JF, Ballaré CL, Flint S D, Kulandaivelu G** (2007) Terrestrial ecosystems, increased solar ultraviolet radiation, and interactions with other climate change factors. *Photochem Photobio Sci*, 6(3), 252–266
- Cao X, Wang H, Zhuang D, Zhu H, Du Y, Cheng Z, Cui W, Rogers HJ, Zhang Q, Jia C, Yang Y, Tai P, Xie F, Liu W** (2018) Roles of MSH2 and MSH6 in cadmium-induced G2/M checkpoint arrest in Arabidopsis roots. *Chemosphere*, 201: 586–594
- Casati P, Walbot V** (2004) Crosslinking of ribosomal proteins to RNA in maize ribosomes by UV-B and its effects on translation. *Plant Physiol* 13: 3319–3332
- Casati P, Stapleton AE, Blum JE, Walbot V** (2006) Genome-wide analysis of high-altitude maize and gene knockdown stocks implicates chromatin remodeling proteins in response to UV-B. *Plant J*, 46(4): 613–627
- Cerutti H, Osman M, Grandoni P, Jagendorf AT** (1992) A homolog of *Escherichia coli* RecA protein in plastids of higher plants. *P Natl Acad Sci USA*, 89: 8068–8072
- Chen JJ, Mitchell DL, Britt AB** (1994) A Light-Dependent Pathway for the Elimination of UV-Induced Pyrimidine (6-4) Pyrimidinone Photoproducts in Arabidopsis. *Plant Cell*, 6(9): 1311–1317
- Chew O, Whelan J, Millar AH** (2003) Molecular definition of the ascorbate-glutathione cycle in Arabidopsis mitochondria dual targeting of antioxidant defenses in plants. *J Biol Chem* 278: 46869–46877
- Cho YH, Yoo SD, Sheen J** (2006) Regulatory functions of nuclear hexokinase1 complex in glucose signaling. *Cell*, 127: 579–589
- Cloix C, Jenkins, GI** (2008) Interaction of the Arabidopsis UV-B-Specific Signaling Component UVR8 with Chromatin. *Mol Plant*, 1(1): 118–128
- Cominelli E, Gusmaroli G, Allegra D, Galbiati M, Wade HK, Jenkins GI, Tonelli C** (2008) Expression analysis of anthocyanin regulatory genes in response to different light qualities in *Arabidopsis thaliana*. *J Plant Physiol*, 165(8): 886–894
- Conconi A, Bespalov VA, Smerdon MJ** (2002) Transcription-coupled repair in RNA polymerase I-transcribed genes of yeast. *P Natl Acad Sci USA*, 99(2): 649–654
- Conklin PL, Pallanca JE, Last RL, Smirnof N** (1997) L-Ascorbic Acid Metabolism in the Ascorbate-Deficient Arabidopsis Mutant vtc1. *Plant Physiol*, 115(3): 1277–1285
- Cookson SJ, Yadav UP, Klie S, Morcuende R, Usadel B, Lunn JE, Stitt M** (2016) Temporal kinetics of the transcriptional response to carbon depletion and sucrose readdition in Arabidopsis seedlings. *Plant Cell Environ*, 39: 768–786

- Corbesier L, Vincent C, Jang S, Fornara F, Fan Q, Searle I, Giakountis A, Farrona S, Gissot L, Turnbull C** (2007) FT protein movement contributes to long-distance signaling in floral induction of *Arabidopsis*, *Science* 316: 1030–1033
- Córdoba-Canero D, Roldán-Arjona T, Ariza RR** (2011) *Arabidopsis* ARP endonuclease functions in a branched base excision DNA repair pathway completed by LIG1. *Plant J*, 68(4) 693–702
- Costa RMA, Morgante PG, Berra CM, Nakabashi M, Bruneau D, Bouchez D, Sweder KS, Van Sluys MA, Menck CFM** (2002) The participation of *AtXPB1*, the *XPB/RAD25* homologue gene from *Arabidopsis thaliana*, in DNA repair and plant development. *Plant J*, 28(4): 385–395
- Culligan KM, Hays JB** (2000) *Arabidopsis* MutS Homologs—AtMSH2, AtMSH3, AtMSH6, and a Novel AtMSH7—Form Three Distinct Protein Heterodimers with Different Specificities for Mismatched DNA. *Plant Cell*, 12: 991–1002
- Culligan KM, Tissier A, Britt AB** (2004) ATR regulates a G2-phase cell-cycle checkpoint in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*, 16: 1091–1104
- Czechowski T, Stitt M, Altmann T, Udvardi MK, Scheible WR** (2005) Genomewide identification and testing of superior reference genes for transcript normalisation in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 139: 5–17
- Dai Q, Yan B, Huang S, Liu X, Peng S, Miranda MLL, Chavez AQ, Vergara BS, Olszyk DM** (1997) Response of oxidative stress defence systems in rice (*Oryza sativa*) leaves with supplemental UV-B radiation. *Physiol Plant* 101: 301–308
- Davey MP, Susanti NI, Wargent JJ, Findlay JE, Quick WP, Paul ND, Jenkins GI** (2012) The UV-B photoreceptor UVR8 promotes photosynthetic efficiency in *Arabidopsis thaliana* exposed to elevated levels of UV-B. *Photosynth Res*, 114(2), 121–131
- Dekkers BJW, Schuurmans JAMJ, Smeekens SCM** (2004) Glucose delays seed germination in *Arabidopsis thaliana*. *Planta*, 218(4): 579–588
- Dianova II, Bohr VA, Dianov GL** (2001) Interaction of Human AP Endonuclease 1 with Flap Endonuclease 1 and Proliferating Cell Nuclear Antigen Involved in Long-Patch Base Excision Repair. *Biochemistry*, 40(42): 12639–12644
- Diplock AT, Machlin LJ, Packer L, Pryor WA** (1989) Vitamin E: Biochemistry and health implications. *Ann N Y Acad Sci*, 570: 555–555
- Dixon RA, Paiva NL** (1995) Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell*, 7(7): 1085–1097
- Dodd AN, Gardner MJ, Hotta CT, Hubbard KE, Dalchau N, Love J, Assie JM, Robertson FC, Jakobsen MK, Gonçalves J, Sanders D, Webb AAR** (2007) The *Arabidopsis* Circadian Clock Incorporates a cADPR-Based Feedback Loop. *Science*, 318(5857): 1789–1792
- Dong Y, Wang C, Han X, Tang S, Liu S, Xia X, Yin W** (2014) A novel bHLH transcription factor *PebHLH35* from *Populus euphratica* confers drought tolerance through regulating

stomatal development, photosynthesis and growth in Arabidopsis. *Biochem Bioph Res Co*, 450(1): 453–458

**Dubois M, Van den Broeck L, Claeys H, Van Vlierberghe K, Matsui M, Inzé D** (2015) The ETHYLENE RESPONSE FACTORS ERF6 and ERF11 Antagonistically Regulate Mannitol-Induced Growth Inhibition in Arabidopsis, *Plant Physiol*, 169: 166-179

**Dubos C, Stracke R, Grotewold E, Weisshaar B, Martin C, Lepiniec L** (2010) MYB transcription factors in Arabidopsis. *Trends Plant Sci*, 15: 573–581

**Duncan KA, Huber SC** (2007) Sucrose synthase oligomerization and F-actin association are regulated by sucrose concentration and phosphorylation. *Plant Cell Physiol*, 8: 1612–1623

**Eckstein A, Zięba P, Gabryś H** (2012) Sugar and light effects on the condition of the photosynthetic apparatus of *Arabidopsis thaliana* cultured *in vitro*. *J Plant Growth Regul*, 31(1): 90–101

**Edwards WR, Hall JA, Rowlan AR, Schneider-Barfield T, Sun TJ, Patil MA, Pierce ML, Fulcher RG, Bell AA, Essenberg M** (2008) Light filtering by epidermal flavonoids during the resistant response of cotton to *Xanthomonas* protects leaf tissues from light-dependent phytoalexin toxicity. *Phytochemistry*, 69: 2320–2328

**Eker APM, Kooiman P, Hessels JKC, Yasui A** (1990) DNA photoreactivating enzyme from the cyanobacterium *Anacystis nidulans*. *J Biol Chem*, 265: 8009–8015

**Entian KD, Fröhlich K** (1984) *Saccharomyces cerevisiae* mutants provide evidence of hexokinase PII as a bifunctional enzyme with catalytic and regulatory domains for triggering carbon catabolite repression. *J Bacteriol*, 158: 29–35

**Eriksson S, Bo'hlenius H, Moritz T, Nilsson O** (2006) GA4 is the active gibberellin in the regulation of LEAFY transcription and Arabidopsis floral initiation. *Plant Cell* 18: 2172–2181

**Evans LT, Wardlaw IF** (1966) Independent translocation of <sup>14</sup>C-labelled assimilates and of the floral stimulus in *Lolium temulentum*. *Planta*, 68(4): 310–326

**Evans MD, Dizdaroglu M, Cooke MS** (2004) Oxidative DNA damage and disease: induction, repair and significance. *Mutat Res*, 567(1): 1–61

**Evans LT** (1971) Flower induction and the florigen concept. *Annu Rev Plant Physio*, 22: 365–394

**Falcone Ferreira ML, Rius S, Emiliani J, Pourcel L, Feller A, Moroshani K, Casati P, Grotewold E** (2010) Cloning and characterization of a UV-B-inducible maize flavonol synthase. *Plant J*, 62: 77–91

**Fasano R, Gonzalez N, Tosco A, Dal Piaz F, Docimo T, Serrano R, Grillo S, Leone A, Inzé D** (2014) Role of Arabidopsis UV RESISTANCE LOCUS 8 in Plant Growth Reduction under Osmotic Stress and Low Levels of UV-B. *Mol Plant*, 7(5): 773–791

- Favory JJ, Stec A, Gruber H, Rizzini L, Oravec A, Funk M, Albert A, Cloix C, Jenkins GI, Oakeley EJ** (2009) Interaction of COP1 and UVR8 regulates UV-B-induced photomorphogenesis and stress acclimation in Arabidopsis. *EMBO J*, 28: 591–601
- Feng J, Zhao S, Chen X, Wang W, Dong W, Chen J, Shen JR, Liu L, Kuang T** (2015) Biochemical and structural study of Arabidopsis hexokinase 1. *Acta Crystallogr, D71*: 367–375
- Feucht W, Treutter D, Polster J** (2004) Flavanol binding of nuclei from tree species. *Plant Cell Rep*, 22: 430–436
- Fortini P, Dogliotti E** (2007) Base damage and single-strand break repair: Mechanisms and functional significance of short- and long-patch repair subpathways. *DNA Repair*, 6(4): 398–409
- Frohmeyer H, Loyall L, Blatt MR, Grabov A** (1999) Millisecond UV-B irradiation evokes prolonged elevation of cytosolic-free Ca<sup>2+</sup> and stimulates gene expression in transgenic parsley cell cultures. *Plant J*, 20(1): 109–117
- Fryer MJ** (1992) The antioxidant effects of thylakoid vitamin E ( $\alpha$ -tocopherol). *Plant Cell Environ*, 15(4): 381–392
- Fuglevand G, Jackson JA, Jenkins GI** (1996) UV-B, UV-A, and blue light signal transduction pathways interact synergistically to regulate chalcone synthase gene expression in Arabidopsis. *Plant Cell*, 8: 2347–2357
- Fukuzawa K, Tokumura A, Ouchi S, Tsukatani H** (1982) Antioxidant activities of tocopherols on Fe<sup>2+</sup>-ascorbate-induced lipid peroxidation in lecithin liposomes. *Lipids*, 17(7): 511–513
- Gao Q, Zhang L** (2008) Ultraviolet-B-induced oxidative stress and antioxidant defense system responses in ascorbate-deficient *vtc1* mutants of *Arabidopsis thaliana*. *J Plant Physiol*, 165: 138–148
- Garapati P, Feil R, John EL, Van Dijck P, Balazadeh S, Mueller-Roeber B** (2015) Transcription factor ATAF1 integrates carbon starvation responses with trehalose metabolism. *Plant Physiol*, 169: 379–390
- Gardner PR, Fridovich I** (1991) Superoxide sensitivity of the *Escherichia coli* 6-phosphogluconate dehydratase. *J Biol Chem*, 266(3): 1478–1483
- Garner W, Allard H** (1920) Effect of the relative length of day and night and other factors of the environment on growth and reproduction in plants. *J Agric Res* 18: 553–606
- Gausman HW, Rodriguez RR, Escobar DE** (1975) Ultraviolet Radiation Reflectance, Transmittance, and Absorptance by Plant Leaf Epidermises. *Agron J*, 67(5): 720–724
- Gerhardt KE, Wilson MI, Greenberg BM** (2005) Ultraviolet Wavelength Dependence of Photomorphological and Photosynthetic Responses in *Brassica napus* and *Arabidopsis thaliana*. *Photochem Photobiol*, 81(5): 1061–1068

- Gómez R, Spampinato C** (2013) Mismatch recognition function of *Arabidopsis thaliana* MutSγ. *DNA Repair*, 12(4): 257–264
- Gorbunova V, Levy AA** (1997) Non-homologous DNA end joining in plant cells is associated with deletions and filler DNA insertions. *Nucleic Acids Res*, 25(22): 4650–4657
- Granot D, Kelly G, Stein O, David-Schwartz R** (2014) Substantial roles of hexokinase and fructokinase in the effects of sugars on plant physiology and development. *J Exp Bot*, 65: 809–819
- Grigston JC, Osuna D, Scheible WR, Liu C, Stitt M, Jones AM** (2008) D-Glucose sensing by a plasma membrane regulator of G signaling protein, AtRGS1. *FEBS Lett*, 582: 3577–3584
- Haince JF, Kozlov S, Dawson VL, Dawson TM, Hendzel MJ, Lavin MF, Poirier GG** (2007) Ataxia Telangiectasia Mutated (ATM) Signaling Network Is Modulated by a Novel Poly(ADP-ribose)-dependent Pathway in the Early Response to DNA-damaging Agents. *J Biol Chem*, 282(22): 16441–16453
- Halliwell B, Aruoma OI** (1991) DNA damage by oxygen-derived species. Its mechanism and measurement in mammalian systems. *FEBS Letters*, 281(1–2): 9–19
- Halliwell B, Gutteridge JMC** (1999) *Free Radicals in Biology and Medicine*, Oxford University Press, Oxford, UK, 3rd edition
- Han C, Liu Q, Yang Y** (2009) Short-term effects of experimental warming and enhanced ultraviolet-B radiation on photosynthesis and antioxidant defense of *Picea asperata* seedlings. *Plant Growth Regul*, 58: 153–162
- Havaux M, Eymery F, Porfirova S, Rey P, Dörmann P** (2005) Vitamin E protects against photoinhibition and photooxidative stress in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*, 17: 3451–3469
- Heine GF, Hernandez JM, Grotewold E** (2004) Two cysteines in plant R2R3 MYB domains participate REDOX-dependent DNA binding. *J Biol Chem*, 279: 37878–37885
- Hernández I, Alegre L, van Breusegem F, Munné-Bosch S** (2009) How relevant are flavonoids as antioxidants in plants, *Trends Plant Sci*. 14: 125–132
- Hideg É, Vass I** (1996) UV-B induced free radical production in plant leaves and isolated thylakoid membranes. *Plant Sci*, 115(2): 251–260
- Hideg É, Barta C, Kálai T, Vass I, Hideg K, Asada K** (2002) Detection of Singlet Oxygen and Superoxide with Fluorescent Sensors in Leaves Under Stress by Photoinhibition or UV Radiation. *Plant Cell Physiol*, 43(10): 1154–1164
- Higa T, Suetsugu N, Kong SG, Wada M** (2014) Actin-dependent plastid movement is required for motive force generation in directional nuclear movement in plants. *P Natl Acad Sci USA* 111: 4327–4331
- Hutzler P, Fischbach R, Heller W, Jungblut TP, Reuber S, Schmitz R, Veit M, Weissenböck G, Schnitzler JP** (1998) Tissue localization of phenolic compounds in plants by confocal laser scanning microscopy. *J Exp Bot*, 49(323): 953–965

- Im JH, Cho YH, Kim GD, Kang GH, Hong JW, Yoo SD** (2014) Inverse modulation of the energy sensor Snf1-related protein kinase 1 on hypoxia adaptation and salt stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Environ*, 37: 2303–2312
- Imaizumi T, Tran, HG, Swartz TE, Briggs WR, Kay SA** (2003) FKF1 is essential for photoperiodic-specific light signalling in *Arabidopsis*. *Nature*, 426(6964): 302–306
- Imaizumi T, Schultz TF, Harmon FG, Ho LA, Kay SA** (2005) FKF1 F-Box Protein Mediates Cyclic Degradation of a Repressor of CONSTANS in *Arabidopsis*. *Science*, 309(5732): 293–297
- Imaizumi T** (2010) *Arabidopsis* circadian clock and photoperiodism: time to think about location. *Curr Opin Plant Biol*, 13(1): 83–89
- Imlay JA, Linn S** (1988) DNA damage and oxygen radical toxicity. *Science*, 240(4857): 1302–1309
- Ito S, Song YH, Josephson-Day AR, Miller RJ, Breton G, Olmstead RG, Imaizumi T** (2012) FLOWERING BHLH transcriptional activators control expression of the photoperiodic flowering regulator CONSTANS in *Arabidopsis*. *P Natl Acad Sci USA*, 109(9): 3582–3587
- Ivanov BN, Khorobrykh S** (2003) Participation of photosynthetic electron transport in production and scavenging of reactive oxygen species. *Antiox Redox Sign*, 5(1): 43–53
- Iwabuchi K, Minamino R, Takagi S** (2010) Actin reorganization underlies phototropin-dependent positioning of nuclei in *Arabidopsis* leaf cells. *Plant Physiol* 152: 1309–1319
- Iwabuchi K, Sakai T, Takagi S** (2007) Blue light-dependent nuclear positioning in *Arabidopsis thaliana* leaf cells. *Plant Cell Physiol* 48: 1291–1298
- Iwabuchi K, Hidema J, Tamura K, Takagi S, Hara-Nishimura I** (2016) Plant Nuclei Move to Escape Ultraviolet-Induced DNA Damage and Cell Death. *Plant Physiol*, 170: 678–685
- Izaguirre MM, Mazza CA, Svatoš A, Baldwin IT, Ballaré CL** (2007) Solar Ultraviolet-B Radiation and Insect Herbivory Trigger Partially Overlapping Phenolic Responses in *Nicotiana attenuata* and *Nicotiana longiflora*. *Ann Bot-London*, 99(1): 103–109
- Jang JC, León P, Zhou L, Sheen J** (1997) Hexokinase as a sugar sensor in higher plants. *Plant Cell*, 9: 5–19
- Jang S, Marchal V, Panigrahi KCS, Wenkel S, Soppe W, Deng X-W, Valverde F, Coupland G** (2008) *Arabidopsis* COP1 shapes the temporal pattern of CO accumulation conferring a photoperiodic flowering response. *The EMBO Journal*, 27(8): 1277–1288
- Jansen MAK, Gaba V, Greenberg BM** (1998) Higher plants and UV-B radiation: Balancing damage, repair and acclimation. *Trends Plant Sci*. 3: 131–135
- Jansen MAK, Martret BL, Koornneef M** (2010) Variations in constitutive and inducible UV-B tolerance; dissecting photosystem II protection in *Arabidopsis thaliana* accessions. *Physiol Plantarum*, 138(1): 22–34

- Jarillo JA, Gabryś H, Capel J, Alonso JM, Ecker JR, Cashmore AR** (2001) Phototropin-related NPL1 controls chloroplast relocation induced by blue light. *Nature* 410: 952–954
- Jenkins GI** (2009) Signal transduction in responses to UV-B radiation. *Annu Rev Plant Biol*, 60: 407–431
- Jenkins GI, Long JC, Wade HK, Shenton MR, Bibikova TN** (2001) UV and blue light signalling: pathways regulating chalcone synthase gene expression in *Arabidopsis*. *New Phytol*, 151: 121–131
- Jeong E-Y, Seo PJ, Woo JC, Park C-M** (2015) AKIN10 delays flowering by inactivating IDD8 transcription factor through protein phosphorylation in *Arabidopsis*. *BMC Plant Biol*, 15: 110
- Jia Q, den Dulk-Ras A, Shen H, Hooykaas PJJ, de Pater S** (2013) Poly(ADP-ribose)polymerases are involved in microhomology mediated back-up non-homologous end joining in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol*, 82(4–5): 339–351
- Jiang CZ, Yee J, Mitchell DL, Britt AB** (1997) Photorepair mutants of *Arabidopsis*. *P Natl Acad Sci USA*, 94: 7441–7445
- Jiang L, Wang Y, Björn LO, Li S** (2009) *Arabidopsis* RADICAL-INDUCED CELL DEATH1 is involved in UV-B signaling. *Photoch Photobio Sci*, 8(6): 838–846
- Jin H, Cominelli E, Bailey P, Parr A, Mehrrens F, Jones J, Tonelli C, Weisshaar B, Martin C** (2000) Transcriptional repression by AtMYB4 controls production of UV-protecting sunscreens in *Arabidopsis*. *The EMBO Journal*, 19(22): 6150–6161
- Johnson JL, Hamm-Alvarez S, Payne G, Sancar GB, Rajagopalan KV, Sancar A** (1988) Identification of the second chromophore of *Escherichia coli* and yeast DNA photolyases as 5,10-methenyltetrahydrofolate. *P Natl Acad Sci USA*, 85: 2046–2050
- Jordan BR** (1996) The effects of UV-B radiation on plants: a molecular perspective. *Adv Bot Res*, 22: 97–162
- Jun SH, Kim TG, Ban C** (2006) DNA mismatch repair system. Classical and fresh roles. *FEBS Journal* 2006, 273(8) 1609–1619
- Kadleček P, Rank B, Tichá I** (2003) Photosynthesis and photoprotection in *Nicotiana tabacum* L. *in vitro*-grown plantlets. *J Plant Physiol*, 160(9): 1017–1024
- Kagan VE, Fabisiak JP, Quinn PJ** (2000) Coenzyme Q and vitamin E need each other as antioxidants. *Protoplasma*, 214(1–2): 11–18
- Kagawa T, Sakai T, Suetsugu N, Oikawa K, Ishiguro S, Kato T, Tabata S, Okada K, Wada M** (2001) *Arabidopsis* NPL1: a phototropin homolog controlling the chloroplast high light avoidance response. *Science*, 291: 2138–2141
- Kagawa T, Wada M** (1993) Light-dependent nuclear positioning in prothallial cells of *Adiantum capillus-veneris*. *Protoplasma*, 177(1–2): 82–85

- Kaiser G, Kleiner O, Beisswenger C, Batschauer A** (2009) Increased DNA repair in *Arabidopsis* plants overexpressing CPD photolyase. *Planta*, 230 (3): 505–515
- Kaiserli E, Jenkins GI** (2007) UV-B promotes rapid nuclear translocation of the UV-B-specific signalling component UVR8 and activates its function in the nucleus. *Plant Cell*, 19: 2662–2673
- Kalbin G, Hidema J, Brosché M, Kumagai T, Bornman JF, Strid A** (2001) UV-B-induced DNA damage and expression of defence genes under UV-B stress: tissue-specific molecular marker analysis in leaves. *Plant Cell Environ*, 24: 983–990
- Kalbina I, Strid A** (2006) Supplementary UV-B irradiation reveals differences in stress responses between *Arabidopsis thaliana* ecotypes. *Plant Cell Environ*. 29: 754–763
- Kamal-Eldin A, Appelqvist LÅ** (1996) The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols. *Lipids*, 31(7): 671–701
- Kasahara M, Kagawa T, Oikawa K, Suetsugu N, Miyao M, Wada M** (2002) Chloroplast avoidance movement reduces photodamage in plants. *Nature* 420: 829–832
- Kerhoas L, Aouak D, Cingöz A, Routaboul J-M, Lepiniec L, Einhorn J, Birlirakis N** (2006) Structural Characterization of the Major Flavonoid Glycosides from *Arabidopsis thaliana* Seeds. *J Agric Food Chem* 54(18): 6603–6612
- Khazi FR, Edmondson AC, Nielsen BL** (2003) An *Arabidopsis* homologue of bacterial RecA that complements an *E. coli* recA deletion is targeted to plant mitochondria. *Mol Genet Genomics*, 269(4): 454–463
- Kilian J, Whitehead D, Horak J, Wanke D, Weigl S, Batistic O, D'Angelo C, Bornberg-Bauer E, Kudla J, Harter K** (2007) The AtGenExpress global stress expression data set: protocols, evaluation and model data analysis of UV-B light, drought and cold stress responses. *Plant J*, 50: 347–363
- Kim BC, Tennessen DJ, Last RL** (1998) UV-B-induced photomorphogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, 15: 667–674
- Kimura S, Sakaguchi K** (2006) DNA Repair in Plants. *Chem Rev*, 106(2): 753–766
- Kinoshita T, Doi M, Suetsugu N, Kagawa T, Wada M, Shimazaki K** (2001) Phot1 and phot2 mediate blue light regulation of stomatal opening. *Nature*, 414: 656–660
- Klepek YS, Geiger D, Stadler R, Klebl F, Landouar-Arsivaud L, Lemoine R, Hedrich R, Sauer N** (2005) *Arabidopsis* POLYOL TRANSPORTER5, a New Member of the Monosaccharide Transporter-Like Superfamily, Mediates Symport of Numerous Substrates, Including myo-Inositol, Glycerol, and Ribose. *Plant Cell*, 17: 204–21
- Kliebenstein DJ, Lim JE, Landry LG, Last RL** (2002) *Arabidopsis* UVR8 regulates ultraviolet-B signal transduction and tolerance and contains sequence similarity to human regulator of chromatin condensation 1. *Plant Physiol*, 130(1): 234–243



- Knoll A, Fauser F, Puchta H** (2014) DNA recombination in somatic plant cells: mechanisms and evolutionary consequences. *Chromosome Res*, 22(2): 191–201
- Koes RE, Quattrocchio F, Mol JNM** (1994) The flavonoid biosynthetic pathway in plants: function and evolution. *BioEssays*, 16(2): 123–132
- Kotilainen T, Tegelberg R, Julkunen-Tiitto R, Lindfors A, Aphalo PJ** (2008) Metabolite specific effects of solar UV-A and UV-B on alder and birch leaf phenolics. *Glob Change Biol*, 14: 1294–1304
- Krasylenko YA, Yemets AI, Blume YB** (2013) Plant microtubules reorganization under the indirect UV-B exposure and during UV-B-induced programmed cell death. *Plant Signaling & Behavior*, 8(5), e24031
- Kreps JA, Wu Y, Chang HS, Zhu T, Wang X, Harper JF** (2002) Transcriptome changes for *Arabidopsis* in response to salt, osmotic, and cold stress. *Plant Physiol*, 130: 2129–2141
- Krieger-Liszkay A** (2005) Singlet oxygen production in photosynthesis. *J Exp Bot*, 56: 337–346
- Krieger-Liszkay A, Fufezan C, Trebst A** (2008) Singlet oxygen production in photosystem II and related protection mechanism. *Photosynth Res*, 98: 551–564
- Kucera B, Leubner-Metzger G, Wellmann E** (2003) Distinct ultraviolet-signaling pathways in bean leaves. DNA damage is associated with  $\beta$ -1, 3-glucanase gene induction, but not with flavonoid formation. *Plant Physiol*, 133(4): 1445–1452
- Kytridis VP, Manetas Y** (2006) Mesophyll versus epidermal anthocyanins as potential in vivo antioxidants: evidence linking the putative antioxidant role to the proximity of oxy-radical source. *J Exp Bot*, 57(10): 2203–2210
- Landry LG, Chapple CCS, Last RL** (1995) *Arabidopsis* mutants lacking phenolic sunscreens exhibit enhanced ultraviolet-B injury and oxidative damage. *Plant Physiol*, 109: 1159–1166
- Lario LD, Ramirez-Parra E, Gutierrez C, Casati P, Spampinato CP** (2011) Regulation of plant MSH2 and MSH6 genes in the UV-B-induced DNA damage response. *J Exp Bot*, 62(8): 2925–2937
- Lario LD, Botta P, Casati P, Spampinato CP** (2014) Role of AtMSH7 in UV-B-induced DNA damage recognition and recombination. *J Exp Bot*, 66(11): 3019–3026
- Lastdrager J, Hanson J, Smeekens S** (2014) Sugar signals and the control of plant growth and development. *J Exp Bot*, 65(3): 799–807
- Lavola A, Julkunen-Tiitto R, Aphalo P, de la Rosa T, Lehto T** (1997) The effect of u.v.-B radiation on u.v.-absorbing secondary metabolites in birch seedlings grown under simulated forest soil conditions. *New Phytol*, 137: 617–621
- Lazaro A, Valverde F, Pineiro M, Jarillo JA** (2012) The *Arabidopsis* E3 Ubiquitin Ligase HOS1 Negatively Regulates CONSTANS Abundance in the Photoperiodic Control of Flowering. *Plant Cell*, 24(3): 982–999

- Lehmann P, Nöthen J, Schmidt von Braun S, Bohnsack MT, Mirus O, Schleiff E** (2011) Transitions of gene expression induced by short-term blue light. *Plant Biology*, 13(2): 349–361
- Li L, Sheen J** (2016) Dynamic and diverse sugar signaling. *Curr Opin Plant Biol*, 33: 116–125
- Li Y, Lee KK, Walsh S, Smith C, Hadingham S, Sorefan K, Cawley G, Bevan MW** (2006) Establishing glucose- and ABA-regulated transcription networks in *Arabidopsis* by microarray analysis and promoter classification using a Relevance Vector Machine. *Genome Res*, 16(3): 414–427
- Li GM** (2008) Mechanisms and functions of DNA mismatch repair. *Cell Research*, 18: 85–98
- Li DD, Xia XL, Yin WL, Zhang HC** (2013) Two poplar calcineurin B-like proteins confer enhanced tolerance to abiotic stresses in transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Biol Plantarum*, 57(1): 70–78
- Lieber MR** (2010) The Mechanism of Double-Strand DNA Break Repair by the Nonhomologous DNA End-Joining Pathway. *Annu Rev Biochem*, 79(1): 181–211
- Lillo C, Lea US, Ruoff P** (2008) Nutrient depletion as a key factor for manipulating gene expression and product formation in different branches of the flavonoid pathway. *Plant Cell Environ*, 31: 587–601
- Lin Z, Kong H, Nei M, Ma H** (2006) Origins and evolution of the recA/RAD51 gene family: Evidence for ancient gene duplication and endosymbiotic gene transfer. *P Natl Acad Sci USA*, 103(27): 10328–10333
- Liscum E, Briggs WR** (1995) Mutations in the NPH1 locus of *Arabidopsis* disrupt the perception of phototropic stimuli. *Plant Cell* 7: 473–485
- Liu Z, Hong S-W, Escobar M, Vierling E, Mitchell DL, Mount DW, Hall JD** (2003) *Arabidopsis* UVH6, a Homolog of Human XPD and Yeast RAD3 DNA Repair Genes, Functions in DNA Repair and Is Essential for Plant Growth. *Plant Physiol*, 132(3): 1405–1414
- Liu L-J, Zhang Y-C, Li Q-H, Sang Y, Mao J, Lian H-L, Wang L, Yang HQ** (2008) COP1-Mediated Ubiquitination of CONSTANS Is Implicated in Cryptochrome Regulation of Flowering in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 20(2): 292–306
- Liu W, Zhou Q, Li P, Gao H, Han YP, Li XJ, Yang YS, Li Y** (2009) DNA mismatch repair related gene expression as potential biomarkers to assess cadmium exposure in *Arabidopsis* seedlings. *J Hazard Mater*, 167(1–3): 1007–1013
- Liu T, Carlsson J, Takeuchi T, Newton L, Farr EM** (2013) Direct regulation of abiotic responses by the *Arabidopsis* circadian clock component PRR7. *Plant J*, 76: 101–114
- Llorens L, Badenes-Pérez FR, Julkunen-Tiitto R, Zidorn C, Fereres A, Jansen MAK** (2015) The role of UV-B radiation in plant sexual reproduction. *Perspec Plant Ecol*, 17(3): 243–254
- Lunn JE, Feil R, Hendriks JHM, Gibon Y, Morcuende R, Osuna D, Scheible WR, Carillo P, Hajirezaei MR, Stitt M** (2006) Sugar-induced increases in trehalose 6-phosphate are

correlated with redox activation of ADP-glucose pyrophosphorylase and higher rates of starch synthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Biochem J*, 397: 139–148

**Mackerness SA-H, Surplus SL, Blake P, John CF, Buchanan-Wollaston V, Jordan BR, Thomas B** (1999) Ultraviolet-B-induced stress and changes in gene expression in *Arabidopsis thaliana*: role of signalling pathways controlled by jasmonic acid, ethylene and reactive oxygen species. *Plant Cell Environ*, 22(11): 1413–1423

**Mackerness SA-H** (2000) Plant responses to ultraviolet-B (UV-B: 280–320 nm) stress: what are the key regulators? *Plant Growth Regul* 32: 27–29

**Mair A, Pedrotti L, Wurzinger B, Anrather D, Simeunovic A, Weiste C, Valerio C, Dietrich K, Kirchler T, Nägele T, Carbajosa JV, Hanson J, Baena-González E, Chaban C, Weckwerth W, Dröge-Laser W, Teige M** (2015) SnRK1-triggered switch of bZIP63 dimerization mediates the lowenergy response in plants. *Elife*, 4:e05828

**Markham KR, Ryan KG, Bloor SJ, Mitchell KA** (1998) An increase in luteolin: apigenin ratio in *Marchantia polymorpha* on UV-B enhancement. *Phytochemistry*, 48: 791–794

**Martínez C, Pons E, Prats G León J** (2003) Salicylic acid regulates flowering time and links defense responses and reproductive development. *Plant J*, 37: 209–217

**Matsoukas IG, Massiah AJ, Thomas B** (2012) Florigenic and antiflorigenic signaling in plants. *Plant Cell Physiol*, 53: 1827–1842

**Matsumoto Y** (2001) Molecular mechanism of PCNA-dependent base excision repair. *Prog Nucleic Acid Re*, 68: 129–138

**Maxwell K, Johnson GN** (2000) Chlorophyll fluorescence—a practical guide. *J Exp Bot* 51: 659–668

**Melidou M, Riganakos K, Galaris D** (2005) Protection against nuclear DNA damage offered by flavonoids in cells exposed to hydrogen peroxide: the role of iron chelation. *Free Radic Biol Med*, 39: 1591–1600

**McVey M, Lee SE** (2008) MMEJ repair of double-strand breaks (director's cut): deleted sequences and alternative endings. *Trends Genet*, 24(11): 529–538

**Mishra S, Jha AB, Dubey RS** (2011) Arsenite treatment induces oxidative stress, upregulates antioxidant system, and causes phytochelatin synthesis in rice seedlings. *Protoplasma*, 248: 565–577

**Mittler R** (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci*, 7(9): 405–410

**Mladěnka P, Zatloukalová F, Filipský T, Hrdina R** (2010) Cardiovascular effects of flavonoids are not caused only by direct antioxidant activity. *Free Radical Bio Med*, 49: 963–975

**Modrich P** (2006) Mechanisms in eukaryotic mismatch repair. *J Biol Chem* 281: 30305–30309

- Molinier J, Lechner E, Dumbliauskas E, Genschik P** (2008) Regulation and role of Arabidopsis CUL4–DDB1A–DDB2 in maintaining genome integrity upon UV stress. *PLoS Genet* 4(6): e1000093
- Montesinos MC, Ubeda A, Terencio MC, Payá M, Alcaraz MJ** (1995) Antioxidant Profile of Mono- and Dihydroxylated Flavone Derivatives in Free Radical Generating Systems. *Zeitschrift Für Naturforschung C*, 50(7–8): 552–560
- Moore B, Zhou L, Rolland F, Hall Q, Cheng W-H, Liu Y-X, Hwang I, Jones T, Sheen J** (2003) Role of the Arabidopsis glucose sensor HXK1 in nutrient, light, and hormonal signaling. *Science*, 300: 332–336
- Mori T, Nakane M, Hattori T, Matsunaga T, Ihara M, Nikaido O** (1991) Simultaneous establishment of monoclonal antibodies specific for either cyclobutane pyrimidine dimer or (6-4)photoproduct from the same mouse immunized with ultraviolet-irradiated DNA. *Photochem Photobiol*, 54(2): 225–232
- Munné-Bosch S, Alegre L** (2002) The function of tocopherols and tocotrienols in plants. *Crit Rev Plant Sci*, 21(1): 31–57
- Murphy TM, Belmonte M, Shu S, Britt AB, Hatteroth H** (2009) Requirement for Abasic Endonuclease Gene Homologues in Arabidopsis Seed Development. *PLoS ONE* 4(1): e4297
- Nair PMG, Chung IM** (2015) Study on the correlation between copper oxide nanoparticles induced growth suppression and enhanced lignification in Indian mustard. *Ecotox Environ Safe*, 113: 302–313
- Nakamichi N, Kiba T, Henriques R, Mizuno T, Chua NH, Sakakibara H** (2010) PSEUDO-RESPONSE REGULATORS 9, 7, and 5 are transcriptional repressors in the arabidopsis circadian clock. *Plant Cell*, 22: 594–605
- Nakamichi N, Kita M, Niinuma K, Ito S, Yamashino T, Mizoguchi T, Mizuno T** (2007) Arabidopsis clock-associated pseudo-response regulators PRR9, PRR7 and PRR5 coordinately and positively regulate flowering time through the canonical CONSTANS-dependent photoperiodic pathway. *Plant Cell Physiol*, 48(6): 822–832
- Neill SJ, Desikan R, Clarke A, Hurst RD, Hancock JT** (2002) Hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules in plants. *J Exp Bot*, 53(372): 1237–1247
- Noctor G, Foyer CH** (1998) Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annu Rev Plant Phys*, 49: 249–279
- Ohto M, Onai K, Furukawa Y, Aoki E, Araki T, Nakamura K** (2001) Effects of sugar on vegetative development and floral transition in Arabidopsis, *Plant Physiol*, 127: 252–261
- Nogala-Kalucka M, Dwiecki K, Siger A, Górnaś P, Polewski K, Ciosek S** (2013) Antioxidant synergism and antagonism between tocotrienols, quercetin and rutin in model system. *Acta Aliment*, 42(3): 360–370

- Nunes C, Primavesi LF, Patel MK, Martinez-Barajas E, Powers SJ, Sagar R, Fevereiro PS, Davis BG, Paul MJ** (2013) Inhibition of SnRK1 by metabolites: tissue-dependent effects and cooperative inhibition by glucose 1-phosphate in combination with trehalose 6-phosphate. *Plant Physiol Bioch*, 63: 89–98
- Ohto M, Onai K, Furukawa Y, Aoki E, Araki T, Nakamura K** (2001) Effects of Sugar on Vegetative Development and Floral Transition in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 127: 252–261
- Oikawa K, Kasahara M, Kiyosue T, Kagawa T, Suetsugu N, Takahashi F, Kanegae T, Niwa Y, Kadota A, Wada M** (2003) CHLOROPLAST UNUSUAL POSITIONING1 Is Essential for Proper Chloroplast Positioning. *Plant Cell*, 15(12): 2805–2815
- Olsson LC, Veit M, Weissenböck G, Bornman JF** (1998) Differential flavonoid response to enhanced UV-B radiation in *Brassica napus*. *Phytochemistry* 49: 1021–1028
- Oravecz A, Baumann A, Máté Z, Brzezinska A, Molinier J, Oakeley EJ, Ádám E, Schäfer E, Nagy F, Ulm R** (2006) CONSTITUTIVELY PHOTOMORPHOGENIC1 is required for the UV-B response in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 18: 1975–1990
- Osterlund MT, Wei N, Deng XW** (2000) The Roles of Photoreceptor Systems and the COP1-Targeted Destabilization of HY5 in Light Control of *Arabidopsis* Seedling Development. *Plant Physiol*, 124(4): 1520–1524
- Owens DK, Crosby KC, Runac J, Howard BA, Winkel BSJ** (2008) Biochemical and genetic characterization of *Arabidopsis* flavanone 3 $\beta$ -hydroxylase. *Plant Physiol Bioch*, 46(10): 833–843
- Pang Q, Hays JB** (1991) UV-B-Inducible and Temperature-Sensitive Photoreactivation of Cyclobutane Pyrimidine Dimers in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol*, 536–543
- Perruc E, Charpentreau M, Ramirez BC, Jauneau A, Galaud JP, Ranjeva R, Ranty B** (2004) A novel calmodulin-binding protein functions as a negative regulator of osmotic stress tolerance in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Plant J*, 38: 410–420
- Pisoschi AM, Pop A** (2015) The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *Eur J Med Chem*, 97: 55–74
- Pokorny R, Klar T, Hennecke U, Carell T, Batschauer A, Essen LO** (2008) Recognition and repair of UV lesions in loop structures of duplex DNA by DASH-type cryptochrome. *P Natl Acad Sci USA*, 105(52): 21023–21027
- Polster J, Dithmar H, Burgemeister R, Friedemann G, Feucht W** (2006) Flavonoids in plant nuclei: detection by laser microdissection and pressure catapulting (LMPC), *in vivo* staining, and UV-visible spectroscopic titration. *Physiol Plant* 128: 163–174
- Pontis HG, Martinez-Noel GM** (2013) Sucrose signaling in plants: a world yet to be explored. *Plant Signal Behav*, 8:e23316

- Predieri S, Krizek DT, Wang CY, Mirecki RM, Zimmerman RH** (1993) Influence of UV-B radiation on developmental changes, ethylene, CO<sub>2</sub> flux and polyamines in cv. Doyenne d'Hiver pear shoots grown *in vitro*. *Physiol Plantarum*, 87(2): 109–117
- Rao DN, Yang MX, JM Lasker JM, Cederbaum AI** (1996) 1-Hydroxyethyl radical formation during NADPH- and NADH-dependent oxidation of ethanol by human liver microsomes. *Mol Pharmacol*, 49(5): 814–821
- Rao MV, Paliyath G, Ormrod DP** (1996) Ultraviolet-B-and Ozone-Induced Biochemical Changes in Antioxidant Enzymes of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol*, 110: 125–136
- Reekie JYC, Hicklenton PR, Reekie EG** (1994) Effects of elevated CO<sub>2</sub> on time of flowering in four short-day and four long-day species. *Can J Botany*, 72(4): 533–538
- Rigo A, Stevanato R, Finazzi-Agro A, Rotilio G** (1977) An attempt to evaluate the rate of the Haber Weiss reaction by using •OH radical scavengers. *FEBS Letters*, 80(1): 130–132
- Rizzini L, Favory JJ, Cloix C, Faggionato D, O'Hara A, Kaiserli E, Baumeister R, Schäfer E, Nagy F, Jenkins GI, Ulm R** (2011) Perception of UV-B by the *Arabidopsis* UVR8 protein. *Science* 332: 103–106
- Robberecht R, Caldwell MM** (1978) Leaf epidermal transmittance of ultraviolet radiation and its implications for plant sensitivity to ultraviolet-radiation induced injury. *Oecologia*, 32: 277–287
- Roldán M, Gomez-Mena C, Ruiz-Garcia L, Salinas J, Martinez-Zapater JM** (1999) Sucrose availability on the aerial part of the plant promotes morphogenesis and flowering of *Arabidopsis* in the dark. *Plant J*, 20(5), 581–590.
- Roy S, Choudhury SR, Singh SK, Das KP** (2011) AtPol $\lambda$ , A Homolog of Mammalian DNA Polymerase in *Arabidopsis thaliana*, is Involved in the Repair of UV-B Induced DNA Damage Through the Dark Repair Pathway, *Plant Cell Physiol*, 52(2): 448–467
- Roy S, Choudhury SR, Sengupta DN, Das KP** (2013) Involvement of AtPol $\lambda$  in the Repair of High Salt- and DNA Cross-Linking Agent-Induced Double Strand Breaks in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 162: 1195–1210
- Ruan Y-L** (2014) Sucrose metabolism: gateway to diverse carbon use and sugar signaling. *Annu Rev Plant Biol*, 65: 33–67
- Ryan KG, Markham KR, Bloor SJ, Bradley JM, Mitchell KA, Jordan BR** (1998) UV-B radiation induces increase in quercetin: kaempferol ratio in wild-type and transgenic lines of *Petunia*. *Photochem Photobiol*, 68: 323–330
- Ryan KG, Swinny EE, Markham KR, Winefield C** (2001) Flavonoid gene expression and UV photoprotection in transgenic and mutant *Petunia* leaves. *Phytochemistry*, 59: 23–32
- Rybczyński JJ, Borkowska B, Fiuk A, Gawrońska H, Śliwińska E, Mikula A** (2007) Effect of sucrose concentration on photosynthetic activity of *in vitro* cultures *Gentiana kuroo* (Royle) germlings. *Acta Physiol Plant* 29: 445–453

- Saito K, Yonekura-Sakakibara K, Nakabayashi R, Higashi Y, Yamazaki M, Tohge T, Fernie AR** (2013) The flavonoid biosynthetic pathway in Arabidopsis: Structural and genetic diversity. *Plant Physiol Bioch*, 72: 21–34
- Sakai T, Kagawa T, Kasahara M, Swartz TE, Christie JM, Briggs WR, Wada M, Okada K** (2001) Arabidopsis nph1 and npl1: blue light receptors that mediate both phototropism and chloroplast relocation. *P Natl Acad Sci USA* 98: 6969–6974
- Sakamoto K, Briggs WR** (2002) Cellular and Subcellular Localization of Phototropin 1. *Plant Cell*, 14(8): 1723–1735
- Sancar A** (1994) Structure and function of DNA photolyase. *Biochemistry* 33: 2–9
- Saunders JA, McClure JW (1976) The distribution of flavonoids in chloroplasts of twenty five species of vascular plants. *Phytochemistry*, 15(5): 809–810
- Sawa M, Nusinow DA, Kay SA, Imaizumi T** (2007) FKF1 and GIGANTEA Complex Formation Is Required for Day-Length Measurement in Arabidopsis. *Science*, 318: 261–265
- Schmitz-Hoerner R, Weissenböck G** (2003) Contribution of phenolic compounds to the UV-B screening capacity of developing barley primary leaves in relation to DNA damage and repair under elevated UV-B levels. *Phytochemistry*, 64(1): 243–255
- Selby CP, Sancar A** (2006) A cryptochrome/photolyase class of enzymes with single-stranded DNA-specific photolyase activity. *P NATL ACAD SCI USA*, 103 (47): 17696–17700
- Senn G** (1908) Die Gestalts und Lageveränderung der Pflanzen Chromatophoren. Wilhelm-Engelmann
- Sharma P, Dubey RS** (2005) Drought induces oxidative stress and enhances the activities of antioxidant enzymes in growing rice seedlings. *Plant Growth Regul*, 46: 209–221
- Sharma P, Jha AB, Dubey RS, Pessarakli M** (2012) Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions. *Journal of Botany*, 2012: Article ID 217037
- Sheen J** (2014) Master regulators in plant glucose signaling networks. *J Plant Biol* 57(2): 57–67
- Shinkle JR, Derickson DL, Barnes PW** (2005) Comparative Photobiology of Growth Responses to Two UV-B Wavebands and UV-C in Dim-red-light- and White-light-grown Cucumber (*Cucumis sativus*) Seedlings: Physiological Evidence for Photoreactivation. *Photochem Photobiol*, 81(5): 1069–1074
- Shuck SC, Short EA, Turchi JJ** (2008) Eukaryotic nucleotide excision repair: from understanding mechanisms to influencing biology. *Cell Res*, 18: 64–72
- Singh SK, Roy S, Choudhury SR, Sengupta DN** (2010) DNA repair and recombination in higher plants: insights from comparative genomics of Arabidopsis and rice. *BMC Genomics*, 11: 443

- Singh A, Jha SK, Bagri J, Pandey GK** (2015) ABA Inducible Rice Protein Phosphatase 2C Confers ABA Insensitivity and Abiotic Stress Tolerance in Arabidopsis. *PLOS ONE*, 10(4), e0125168
- Smith GJ, Markham KR** (1998) Tautomerism of flavonol glucosides: relevance to plant UV protection and flower colour. *J Photoch Photobio A*, 118(2): 99–105
- Smyk B, Pliszka B, Drabent R** (2008) Interaction between cyanidin 3-O-glucoside and Cu(II) ions. *Food Chem*, 107: 1616–1622
- Solfanelli C, Poggi A, Loreti E, Alpi A, Perata P** (2006) Sucrose-specific induction of the anthocyanin biosynthetic pathway in Arabidopsis. *Plant Physiol*, 140: 637–646
- Song YH, Smith RW, To BJ, Millar AJ, Imaizumi T** (2012) FKF1 Conveys Timing Information for CONSTANS Stabilization in Photoperiodic Flowering. *Science*, 336(6084): 1045–1049
- Spampinato CP, Gomez RL, Galles C, Lario LD** (2009) From bacteria to plants: A compendium of mismatch repair assays. *Mutat Res*, 682(2–3): 110–128
- Stapleton AE, Walbot V** (1994) Flavonoids Can Protect Maize DNA from the Induction of Ultraviolet Radiation Damage. *Plant Physiol*, 105: 881–889
- Strack D, Heilemann J, Klinkott E-S, Wray V** (1988) Cell wall-bound phenolics from Norway spruce (*Picea abies*) needles. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 43(1–2): 37–41
- Stratmann J** (2003) Ultraviolet-B radiation co-opts defense signaling pathways. *Trends Plant Sci*, 8(11): 526–533
- Strayer C, Oyama T, Schultz TF, Raman R, Somers DE, Más P, Panda S, Kreps JA, Kay SA** (2000) Cloning of the Arabidopsis clock gene TOC1, an autoregulatory response regulator homolog. *Science*, 289: 768–771
- Suárez-López P, Wheatley K, Robson F, Onouchi H, Valverde F, Coupland G** (2001) CONSTANS mediates between the circadian clock and the control of flowering in Arabidopsis. *Nature*, 410: 1116–1120
- Suesslin C, Frohnmeyer H** (2003) An Arabidopsis mutant defective in UV-B light-mediated responses. *Plant J*, 33: 591–601
- Suetsugu N, Kagawa T, Wada M** (2005) An auxilin-like J-domain protein, JAC1, regulates phototropin-mediated chloroplast movement in Arabidopsis. *Plant Physiol* 139: 151–162
- Sztatelman O, Grzyb J, Gabryś H, Banaś AK** (2015) The effect of UV-B on Arabidopsis leaves depends on light conditions after treatment. *BMC Plant Biol*, 15: 281
- Sztatelman O, Waloszek A, Banaś AK, Gabryś H** (2010) Photoprotective function of chloroplast avoidance movement: in vivo chlorophyll fluorescence study. *J Plant Physiol* 167, 709–716



- Szymańska R, Kruk J (2010)** Plastoquinol is the main prenyllipid synthesized during acclimation to high light conditions in *Arabidopsis* and is converted to plastochromanol by tocopherol cyclase. *Plant Cell Physiol*, 51(4): 537–545
- Takahama U (1982)** Suppression of carotenoid photobleaching by kaempferol in isolated chloroplasts. *Plant Cell Physiol*, 23(5): 859–864
- Tanou G, A. Molassiotis A, Diamantidis G (2009)** Induction of reactive oxygen species and necrotic death-like destruction in strawberry leaves by salinity. *Environ Exp Bot*, 65: 270–281
- Tattini M, Galardi C, Pinelli P, Massai R, Remorini D, Agati G (2004)** Differential accumulation of flavonoids and hydroxycinnamates in leaves of *Ligustrum vulgare* under excess light and drought stress. *New Phytol*, 163: 547–561
- Tattini M, Matteini P, Saracini E, Traversi ML, Giordano C, Agati G (2007)** Morphology and biochemistry of on-glandular trichomes in *Cistus salvifolius* leaves growing in extreme habitats of the Mediterranean basin. *Plant Biol*, 9: 411–419
- Taylor LP, Grotewold E (2005)** Flavonoids as developmental regulators. *Curr Opin Plant Biol*, 8: 317–323
- Tevini M, Braun J, Fieser G (1991)** The protective function of the epidermal layer of rye seedlings against ultraviolet-B radiation. *Photochem Photobiol*, 53: 329–333
- Thomas DC, Kunkel TA (1993)** Replication of UV-irradiated DNA in human cell extracts: evidence for mutagenic bypass of pyrimidine dimers. *P Natl Acad Sci USA*, 90(16): 7744–7748
- Tichá I, Čáp F, Pacovská D, Hofman P, Haisel D, Čapková V, Schäfer C (1998)** Culture on sugar medium enhances photosynthetic capacity and high light resistance of plantlets grown *in vitro*. *Physiol Plantarum*, 102(2): 155–162
- Tiwari SB, Shen Y, Chang HC, Hou Y, Harris A, Ma SF, McPartland M, Hymus GJ, Adam L, Marion C, Belachew A, Repetti PP, Reuber TL, Ratcliffe OJ (2010)** The flowering time regulator CONSTANS is recruited to the FLOWERING LOCUS T promoter via a unique cis-element. *New Phytol*, 187: 57–66
- Trontin C, Kiani S, Corwin JA, Hématy K, Yansouni J, Kliebenstein DJ, Loudet O (2014)** A pair of receptor-like kinases is responsible for natural variation in shoot growth response to mannitol treatment in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, 78: 121–133
- Tsai AY, Gazzarrini S (2012)** AKIN10 and FUSCA3 interact to control lateral organ development and phase transitions in *Arabidopsis*. *Plant J*, 69: 809–821
- Tsuchimoto D, Sakai Y, Sakumi K, Nishioka K, Sasaki M, Fujiwara T, Nakabeppu Y (2001)** Human APE2 protein is mostly localized in the nuclei and to some extent in the mitochondria, while nuclear APE2 is partly associated with proliferating cell nuclear antigen. *Nucleic Acids Res*, 29(11): 2349–2360

- Tsukaya H, Ohshima T, Naito S, Chino M, Komeda Y** (1991) Sugar-dependent expression of the CHS-A gene for chalcone synthase from petunia in transgenic *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 97: 1414–1421
- Ueda T, Kato A, Kuramitsu S, Terasawa H, Shimada I** (2005) Identification and characterization of a second chromophore of DNA photolyase from *Thermus thermophilus* HB27. *J Biol Chem*, 280: 36237–36243
- Ulm R, Baumann A, Oravecz A, Máté Z, Ádám E, Oakeley EJ, Schäfer E, Nagy F** (2004) Genome-wide analysis of gene expression reveals function of the bZIP transcription factor HY5 in the UV-B response of *Arabidopsis*. *P Natl Acad Sci USA*, 101: 1397–402
- Urano D, Phan N, Jones JC, Yang J, Huang J, Grigston J, Taylor JP, Jones AM** (2012) Endocytosis of the seven-transmembrane RGS1 protein activates G-protein-coupled signalling in *Arabidopsis*. *Nat Cell Biol*, 14: 1079–1088
- Valverde F, Mouradov A, Soppe W, Ravenscroft D, Samach A, Coupland G** (2004) Photoreceptor Regulation of CONSTANS Protein in Photoperiodic Flowering. *Science*, 303(5660): 1003–1006
- Van Huylenbroeck JM, Debergh PC** (1996) Impact of sugar concentration in vitro on photosynthesis and carbon metabolism during ex vitro acclimatization of *Spathiphyllum* plantlets. *Physiol Plant* 96: 298–304
- Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F** (2002) Accurate normalisation of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology* 3, research0034.1–0034.11
- Wahl V, Ponnu J, Schlereth A, Arrivault S, Langenecker T, Franke A, Feil R, Lunn JE, Stitt M, Schmid M** (2013) Regulation of flowering by trehalose-6-phosphate signaling in *Arabidopsis thaliana*. *Science*, 339: 704–707
- Walczak T, Gabryś H** (1980) New type of photometer for measurements of transmission changes corresponding to chloroplast movements in leaves. *Photosynthetica* 14:65–72
- Wall MK, Mitchenall LA, Maxwell A** (2004) *Arabidopsis thaliana* DNA gyrase is targeted to chloroplasts and mitochondria. *P Natl Acad Sci USA*, 101(20): 7821–7826
- Wenkel S, Turck F, Singer K, Gissot L, Le Gourrierec J, Samach A, Coupland G** (2006) CONSTANS and the CCAAT box binding complex share a functionally important domain and interact to regulate flowering of *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 18: 2971–2984
- Weterings E, Chen DJ** (2008) The endless tale of non-homologous end-joining. *Cell Research*, 18: 114–124
- Winkel-Shirley B** (2002) Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. *Curr Opin Plant Biol*, 5: 218–223
- Wollenweber C, Dietz VH** (1981) Occurrence and distribution of free flavonoid aglycones in plants. *Phytochemistry*, 20(5): 869–932

- Xiong Y, McCormack M, Li L, Hall Q, Xiang C, Sheen J** (2013) Glucose-TOR signalling reprograms the transcriptome and activates meristems. *Nature*, 496: 181–186
- Xu C, Sullivan JH, Garret WM, Caperna TJ, Natarajan S** (2008) Impact of solar ultraviolet-B on the proteome in soybean lines differing in flavonoid contents. *Phytochemistry* 69: 38–48
- Xu F, Copeland C** (2012) Nuclear Extraction from *Arabidopsis thaliana*. *Bio-protocol* 2(24): e306
- Yan J, Tsuchihara N, Etoh T, Iwai S** (2007) Reactive oxygen species and nitric oxide are involved in ABA inhibition of stomatal opening. *Plant Cell Environ*, 30: 1320–1325
- Yang Z, Hou Q, Cheng L, Xu W, Hong Y, Li S, Sun Q** (2017) RNase H1 Cooperates with DNA Gyrases to Restrict R-Loops and Maintain Genome Integrity in Arabidopsis Chloroplasts. *Plant Cell*, 29: 2478–2497
- Yannarelli GG, Gallego SM, Tomaro ML** (2006) Effect of UV-B radiation on the activity and isoforms of enzymes with peroxidase activity in sunflower cotyledons. *Environ Exp Bot*, 56(2): 174–181
- Yanovsky MJ, Kay SA** (2002) Molecular basis of seasonal time measurement in Arabidopsis. *Nature*, 419(6904): 308–312
- Yi C, Deng XW** (2005) COP1 – from plant photomorphogenesis to mammalian tumorigenesis. *Trends Cell Biol*, 15(11): 618–625
- Yin R, Messner B, Faus-Kessler T, Hoffmann T, Schwab W, Hajirezaei M-R, von Saint Paul V, Heller W, Schäffner AR** (2012) Feedback inhibition of the general phenylpropanoid and flavonol biosynthetic pathways upon a compromised flavonol-3-O-glycosylation. *J Exp Bot*, 63(7): 2465–2478
- Young AJ** (1991) The photoprotective role of carotenoids in higher plants. *Physiol Plantarum*, vol. 83(4): 702–708
- Zhang C, Guo H, Zhang J, Guo G, Schumaker KS, Guo Y** (2010) Arabidopsis Cockayne Syndrome A-like Proteins 1A and 1B Form a Complex with CULLIN4 and Damage DNA Binding Protein 1A and Regulate the Response to UV Irradiation. *Plant Cell*, 22(7): 2353–2369
- Zhang Y, Primavesi LF, Jhurrea D, Andralojc PJ, Mitchell RA, Powers SJ, Schlupepmann H, Delatte T, Wingler A, Paul MJ** (2009) Inhibition of SNF1-related protein kinase1 activity and regulation of metabolic pathways by trehalose-6-phosphate. *Plant Physiol*, 149: 1860–1871
- Zurzycki J** (1955) Chloroplast arrangements as a factor in photosynthesis. *Acta Soc Bot Pol*, 24: 27–63

## 7. Dodatek

### Bufory:

Bufor lizujący (Lysis buffer)

- 20 mM Tris-HCl (pH 7.4)
- 25% glicerol
- 20 mM KCl
- 2 mM EDTA
- 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>
- 250 mM sacharozy
- 1mM PMSF, dodany tuż przed użyciem.

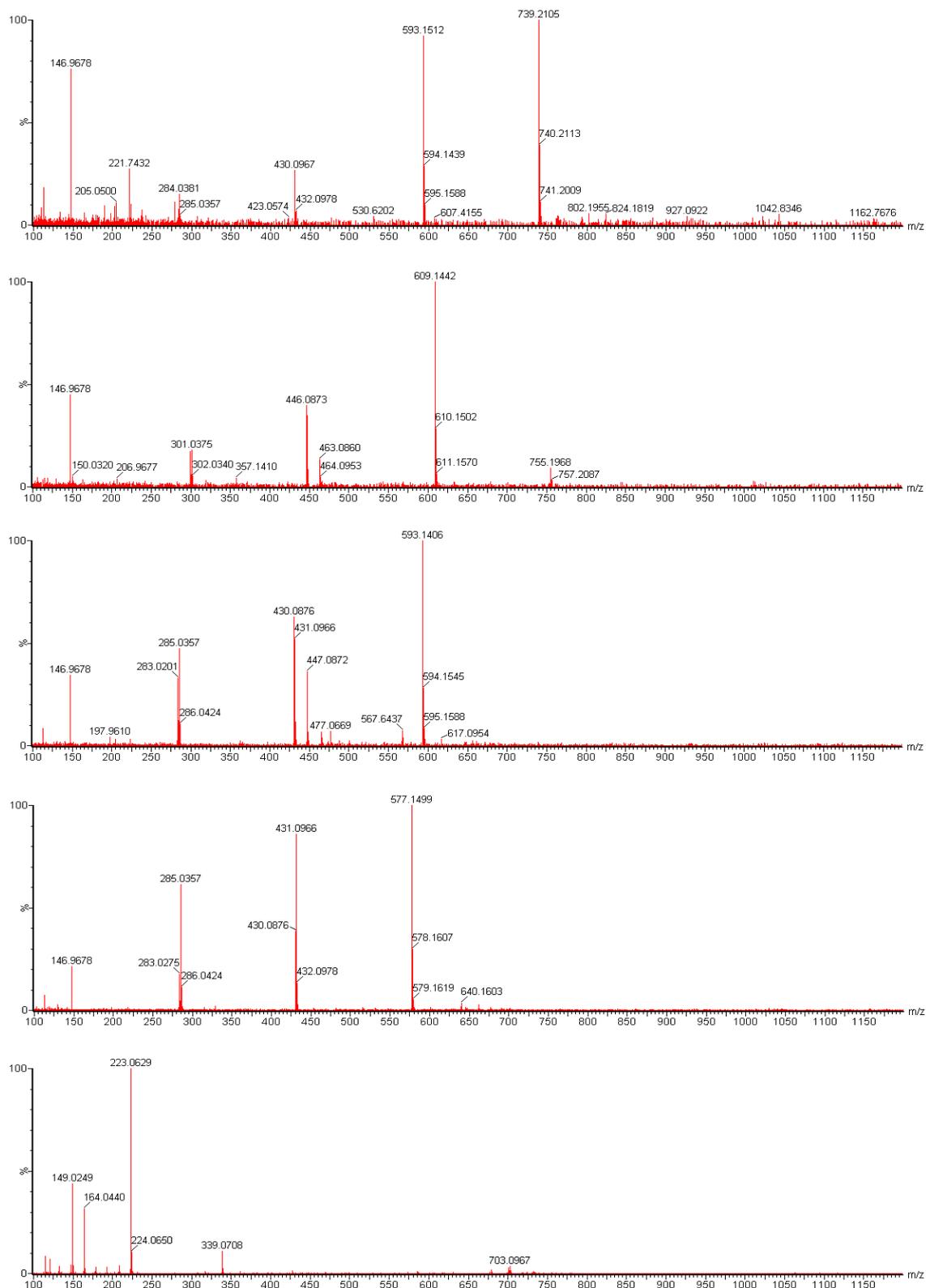
Bufor do zawieszania jąder (Nuclei resuspension buffer with 0.2% Triton X-100)

- 20 mM Tris-HCl (pH 7.4)
- 25% glicerolu
- 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>
- 0.2% Triton X-100

### Pożywki:

Pożywka	Osmotyczność [mOsm·l <sup>-1</sup> ]
B5Ø	49,75±1,71
SUC1	77,75±1,26
MAN0,53	79,0±1,83
SUC3	141,75±1,50
MAN1,6	141,25±1,71
GLC1	109,25±1,26
MAN1	106,5±3,00
GLC3	211,0±1,41
MAN3	212,25±0,96

**Tabela 3.** Osmotyczność przygotowanych pożywek. Przedstawione dane stanowią średnie obliczone z 4 pomiarów wykonanych dla kolejnych przygotowanych pożywek wraz z odchyleniami standardowymi.



**Rysunek 22.** Widma masowe związków polifenolowych uzyskanych w rozdiale chromatograficznym. Widma odpowiadają próbkom zebranych podczas HPLC: A) próbka 3, zidentyfikowana jako 3-O-[ramnozylo(1→2-glukozyd)]-7-O-ramnozyd kemferolu; B) próbka 6, zidentyfikowana jako 3-glukozyd-7-ramnozyd kwercetyny; C) próbka 7 zidentyfikowana jako 3-glukozyd-7-ramnozyd kemferolu; D) próbka 8, zidentyfikowana jako 3,7-diramnozyd kemferolu (kemferytyna); E) próbka 9, zidentyfikowana jako jabłczan synapoilu.