ROLA BIAŁEK MODYFIKUJĄCYCH STRUKTURĘ ŚCIANY KOMÓRKOWEJ W REGULACJI KIEŁKOWANIA NASION

ROLE OF CELL WALL REMODELING PROTEINS IN THE REGULATION OF SEED GERMINATION

Julia ZDZIESZYŃSKA, Marlena STAWSKA, Krystyna ORACZ

Katedra Fizjologii Roślin, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Streszczenie: Ściana komórkowa jest bardzo dynamiczną strukturą, nieustannie modyfikowaną w trakcie całego cyklu życiowego roślin. Zmiany przebiegające w ścianie komórkowej odgrywają istotne znaczenie również w procesach zachodzących w kiełkujących nasionach. Modulowanie struktury ściany komórek bielma okrywającego zarodek jak i wydłużającego się elongacyjnie korzenia zarodkowego ma decydujący wpływ na to czy proces kiełkowania zostanie pomyślnie zakończony. W przebudowie roślinnej ściany komórkowej biorą udział między innymi specyficzne białka modyfikujące polisacharydy (ang. *Cell Wall Remodeling Proteins*, CWRP), wchodzące w skład tej struktury komórkowej, takie jak: fibryle celulozowe, hemicelulozy oraz pektyny. W niniejszym artykule zgromadzono aktualne informacje na temat roli wybranych CWRP uczestniczących w modelowaniu struktury pierwotnej ściany komórkowej kiełkujących nasion, takich jak: 1) celulazy (CEL) – rozkładające celulozę, 2) hemicelulazy mannolityczne (np. mannanazy, MAN) oraz ksylanolityczne (np. endotransglikozylazy/hydrolazy ksyloglukanowe, XTH) – odpowiedzialne za hydrolizę hemiceluloz, 3) liazy pektynianowe (liazy PGA), a także metyloesterazy pektynowe (PME) i poligalakturonazy (PG), które wspólnie odpowiadają za rozkład pektyn. Omówiono również udział ekspansyn (EXP) – białek o niepotwierdzonej dotychczas aktywności enzymatycznej, ale mimo to istotnym znaczeniu w procesie rozluźniania i relaksacji ściany komórkowej podczas wzrostu komórek i tkanek roślin. Podano także przykłady wpływu hormonów roślinnych, takich jak: gibereliny (GA), kwas abscysynowy (ABA) i etylen (ET) na ekspresję i/lub aktywność niektórych z CWRP w kiełkujących nasionach. Informacje przedstawione w tym artykule przeglądowym podkreślają rolę modyfikacji struktury ściany komórkowej przez CWRP, jako jednego z kluczowych mechanizmów wpływających na zależne od sygnałów hormonalnych procesy zachodzące w nasionach.

Słowa kluczowe: białka modyfikujące ścianę komórkową, kiełkowanie nasion, polisacharydy, roślinna ściana komórkowa

Summary: The cell wall is a very dynamic structure, continuously modified through the life cycle of plants. Changes in the cell wall are crucial also for the processes occurring in germinating seeds. Modulation of the cell wall structure of the endosperm covering an embryo as well as of the elongating radicle has a decisive influence on that, if germination process will be successfully completed. In the reconstruction of the structure of plant cell wall are involved *inter alia* specific cell wall remodeling proteins (CWRP), modifying polysaccharides, such as: cellulose fibrils, hemicellulose and pectin. In this article are gathered up to date informations about the role of selected CWRP involved in the modeling of primary cell wall structure of germinating seeds, such as: 1) cellulases (CEL) – digesting cellulose, 2) hemicellulases such as: mannanases (MAN) and xyloglucan endotransglycosylases/hydrolases (XTH) – hydrolyzing hemicelluloses, 3) pectic lyases (PGA lyases), pectin methylesterases (PME) and polygalacturonases (PG), which are responsible for the breakdown of pectins. Herein, is also discussed the contribution of expansins (EXP) – proteins with not yet confirmed enzymatic activity, but with significant importance in the process of loosening and relaxation of the cell wall during the growth of plant cells and tissues. The examples of the influence of plant hormones, such as gibberellins (GA), abscisic acid (ABA) and ethylene (ET) on the expression and/or activity of some of the CWRP in germinating seeds are also indicated. The informations presented in this review article emphasize the role of modifications of the cell wall structure by CWRP as one of the key mechanisms influencing the hormonally regulated seed germination.

Key words: cell wall remodeling proteins, plant cell wall, polysaccharides, seed germination

WSTĘP

Ściana komórkowa jest najbardziej zewnętrzną strukturą otaczającą cytoplazmę komórek roślin, grzybów, bakterii, archebakterii oraz części protistów. Pełni ona różnorodne funkcje, między innymi: 1) stanowi ochronę przed czynnikami fizycznymi, chemicznymi i biologicznymi, 2) umożliwia oddziaływanie z bodźcami środowiskowymi oraz 3) decyduje o zdolności komórki roślinnej do utrzymania turgoru. Właściwości fizyczno-mechaniczne roślinnej ściany komórkowej determinują kształt, szybkość i kierunek wzrostu elongacyjnego pojedynczych komórek, a także zapewniają wytrzymałość mechaniczną całych tkanek. Co więcej, ze względu na swoje cechy ściana komórkowa w pewnym stopniu ogranicza wzrost wydłużeniowy komórek roślinnych, który jest napędzany przez pobór wody.

Zmiany zachodzące w strukturze ściany komórkowej mają istotne znaczenie na każdym etapie cyklu życiowego roślin, również w procesach zachodzących w nasionach. Kiełkowanie nasion jest kontrolowane przez dwie przeciwstawnie oddziałujące na siebie siły, takie jak: rosnący potencjał wydłużającego się korzenia zarodkowego i opór stawiany przez tkanki okrywające zarodek [49]. Mając to na uwadze, podczas kiełkowania nasion wielu gatunków roślin okrytozalążkowych, w tym rzodkiewnika pospolitego (*Arabidopsis thaliana*) i rzeżuchy siewnej (*Lepidium sativum*) wyróżnia się dwa etapy: 1) fazę, gdy w wyniku pobierania wody przez suche nasiona następuje pęknięcie łupiny (ang. *testa rupture*), a następnie 2) fazę, w której dochodzi do rozluźnienia struktury bielma (ang. *endosperm weakening*) umożliwiającego przebicie tej warstwy okrywającej przez wy-

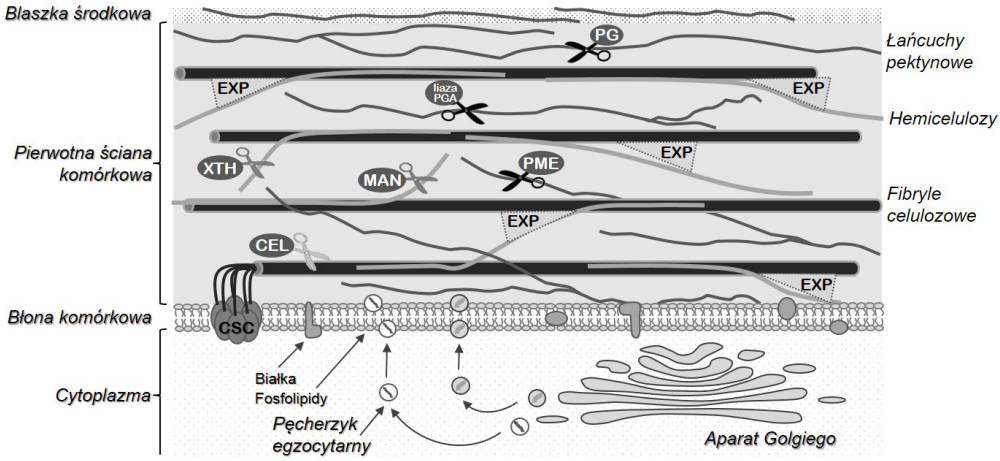
dłużający się elongacyjnie korzeń zarodkowy (ang. *endosperm rupture*) – moment uznawany za zakończenie kiełkowania [48, 65]. Zarówno wydłużanie komórek korzenia zarodkowego jak i rozluźnianie struktury bielma wymagają modyfikacji struktury ściany komórkowej [46, 58]. Wśród znanych mechanizmów modyfikacji ściany komórkowej można wyróżnić dwa rodzaje odziaływań: 1) reaktywnych form tlenu (ang. *Reactive Oxygen Species*, ROS) oraz 2) specyficznych białek modyfikujących – CWRP z polisacharydami, prowadzące do ich rozluźnienia i/lub rozerwania [50, 65]. Wykazano również, iż zmiany struktury ściany komórek zarodka i bielma podczas kiełkowania nasion są regulowane przez hormony roślinne, takie jak: GA, ABA i ET oraz czynniki środowiskowe np. światło [5, 37, 50, 60].

Wyniki badań z zakresu fizjologii roślin podkreśliły znaczenie nieustannej potrzeby przebudowy ściany komórkowej w rozwoju i funkcjonowaniu tych niemobilnych organizmów. Rola nieenzymatycznych modyfikacji tej struktury z udziałem ROS, takich jak np. rodnik hydroksylowy, podczas wzrostu elongacyjnego korzenia zarodkowego i rozluźniania bielma w kiełkujących nasionach jest opisana w niedawno opublikowanym artykule przeglądowym autorstwa Oracz [49]. Brakuje natomiast publikacji zawierających aktualne informacje na temat roli CWRP podczas kiełkowania. Z tego też względu w niniejszym artykule zostały omówione najnowsze odkrycia potwierdzające rolę modyfikacji struktury ściany komórkowej z udziałem ekspansyn oraz enzymów, takich jak: celulazy, endotransglikozylazy/hydrolazy ksyloglukanu, mannanazy, liazy pektynianowe, metyloesterazy pektynowe i poligalakturonazy, podczas procesów wzrostowych korzenia zarodkowego i rozluźniania bielma w kiełkujących nasionach.

BUDOWA I WŁAŚCIWOŚCI ŚCIANY KOMÓRKOWEJ

U roślin wyróżniamy dwa typy ścian komórkowych: pierwotne i wtórne, różniące się właściwościami fizycznymi i mechanicznymi. Pierwotna ściana komórkowa formuje się w trakcie wzrostu komórki. Jest plastyczną i jednocześnie bardzo wytrzymałą strukturą, tworzącą metabolicznie aktywny przedział komórkowy. Uczestniczy ona w kontroli wzrostu wydłużeniowego komórek intensywnie rosnących organów, jak np.: zarodki nasion, hypokotyle siewek, wierzchołki wzrostu korzeni i pędów [9]. Ścianę pierwotną tworzą nierozciągliwe i nierozpuszczalne w wodzie fibryle celulozowe (ang. *cellulose fibrils*), osadzone w matriks uwodnionych polisacharydów: hemiceluloz (ang. *hemicelluloses*) i pektyn (ang. *pectins*) [24] (ryc. 1). Pomiędzy pierwotnymi ścianami komórkowymi dwóch sąsiadujących ze sobą komórek występuje spajająca je warstwa substancji międzykomórkowej zawierającej głównie pektyny, zwana blaszką środkową. Natomiast wtórna ściana komórkowa jest wytwarzana w momencie, gdy komórka zakończy swój wzrost i/lub zaczyna się różnicować. Zbudowana jest ona głównie z celulozy oraz lignin. Powstaje poprzez obudowywanie pierwotnych ścian komórkowych i jest znacznie sztywniejsza, ponieważ zawie-

ra mniej wody niż ściana pierwotna [8]. Wiadomym jest, iż hemicelulozy i pektyny są wytwarzane w aparacie Golgiego. Natomiast, celuloza jest syntetyzowana na zewnątrz protoplastu, z udziałem kompleksu syntazy celulozowej (ang. *Cellulose Synthase Complex*, CSC), zlokalizowanego w błonie komórkowej [72] (ryc. 1).



RYCINA 1. Schemat przedstawia uproszczony model modyfikacji struktury pierwotnej ściany komórek roślinnych przez enzymy, takie jak: celulazy (CEL), mannanazy (MAN), endotransglikozylazy/hydrolazy ksyloglukanu (XTH), poligalakturonazy (PG), liazy pektynianowe (liazy PGA) i metyloesterazy pektynowe (PME) oraz ekspansynę (EXP) – o niepotwierdzonej dotychczas aktywności enzymatycznej, ale uczestniczącej w tym procesie. Pierwotna ściana komórkowa roślin zbudowana jest z fibryl celulozowych osadzonych pomiędzy uwodnionymi łańcuchami polisacharydów: hemiceluloz i pektyn. Biosynteza fibryl celulozowych przeprowadzana jest przez błonowy kompleks syntazy celulozowej (CSC). Składniki hemiceluloz i pektyn powstają na terenie cytoplazmy w aparacie Golgiego, a następnie transportowane są do ściany komórkowej w pęcherzykach egzocytarnych. Pierwotne ściany dwóch graniczących ze sobą komórek spaja tzw. blaszka środkowa, zawierająca duże ilości pektyn. Natomiast od wnętrza komórki ściana komórkowa graniczy z błoną komórkową zbudowaną z dwóch warstw fosfolipidów i białek. Modyfikacje pierwotnej ściany komórkowej determinują prawidłowy przebieg wielu procesów życiowych roślin i nasion

FIGURE 1. The diagram shows a simplified model of the primary plant cell wall structure modifications by enzymes, such as cellulases (CEL), mannanases (MAN), xyloglucan endotransglucosylase/hydrolases (XTH), polygalacturonases (PG), pectic lyases (PGA lyases) and pectic metylesterases (PME), as well as expansins (EXP) – with not yet defined enzymatic activity, but involved in the process. The primary plant cell wall is composed of cellulose fibrils embedded between the hydrated polysaccharide chains of hemicelluloses and pectins. The biosynthesis of cellulose fibrils is carried out by the membrane bound cellulose synthase complex (CSC). The components of hemicelluloses and pectins are generated in the cytoplasm in the Golgi apparatus, and then are transported to the cell wall in an exocytotic vesicles. The primary walls of two adjoining cells are connected by the middle lamella comprising of large amount of pectins. From the inner side of the cell, the cell wall abuts with the cellular membrane constructed of two layers of phospholipids and proteins. Modifications of the primary cell wall determine the correct course of many life processes of plants and seeds

Fibryle celulozowe, składają się z około 16-18 cząsteczek celulozy ułożonych równolegle [15, 22]. Celuloza występuje w postaci silnie odwodnionych oraz pozbawionych odgałęzień bocznych, sztywnych łańcuchów zbudowanych z 3000-14000 cząsteczek glukozy połączonych wiązaniami β-1,4-glikozydowymi, pełniąc rolę rusztowania dla pozostałych komponentów ściany komórkowej.

Do szkieletu celulozowego za pomocą wiązań wodorowych, przyłączone są cząsteczki hemiceluloz [15]. Hemicelulozy są złożonymi biopolimerami, w których skład mogą wchodzić monosacharydy, takie jak: kwas glukuronowy, ksyloza, arabinoza, mannoza, glukoza i galaktoza. Jedną z podstawowych grup hemiceluloz, występującą w znacznych ilościach w pierwotnych ścianach komórkowych roślin wyższych są ksyloglukany [24, 33, 59]. Cząsteczki te zbudowane są ze szkieletu tworzonego przez reszty glukozowe połączone wiązaniami β-1,4-glikozydowymi, który posiada dodatkowo odgałęzienia np. w postaci cząsteczek ksylozy lub galaktozy, połączonych wiązaniami β-1,6-glikozydowymi. Ksyloglukany pełnią rolę podporową, uczestniczą w stabilizowaniu szkieletu mikrotubularnego i syntezie celulozy w ścianach pierwotnych, a także co ciekawe mogą stanowić źródło energii podczas kiełkowania nasion [1, 51, 69]. Inne typy hemiceluloz obecne w ścianach komórkowych to między innymi: mannany i ksylany. Liniowo połączone cząsteczki mannanu usztywniają ścianę komórkową, nadając jej tym samym odporność na uszkodzenia mechaniczne. Natomiast ksylany występują w ścianach pierwotnych w niewielkich ilościach, a ich rola nie została dotychczas wyjaśniona. Wiadomo jednak, że ksylany są niezbędnym składnikiem, bez którego rośliny nie byłyby w stanie wykształcić w pełni funkcjonalnych naczyń [68].

Trzecią klasę składników ściany komórkowej stanowią pektyny. Są one mieszaniną długich, rozpuszczalnych w wodzie łańcuchów kwasu pektynowego, zbudowanych z cząsteczek kwasu D-galakturonowego, połączonych wiązaniami α-1,4-glikozydowymi. Do polisacharydów wchodzących w skład pektyn występujących w ścianach komórkowych i blaszkach środkowych roślin zaliczamy: homogalakturonan (ang. *HomoGalacturonan*, HG), ramnogalakturonan I oraz II (ang. *RhamnoGalacturonan-I*, RG-I; *RhamnoGalacturonan-II*, RG-II) [43, 54]. Spośród nich, HG jest najpowszechniej występującym polisacharydem, stanowiącym około 60-65 % zawartości pektyn. Ten wielocukier jest liniowym polimerem cząsteczek kwasu D-galakturonowego, który może być modyfikowany przez metylową estryfikację w pozycji C-6 grupy karboksylowej, z wytworzeniem zestryfikowanego metylu homogalakturonanu (Me-HG) [67]. Stopień estryfikacji metylu silnie wpływa na właściwości mechaniczne ścian komórkowych i zmienia się w zależności od stadium rozwojowego roślin, tkanek, a nawet fragmentów ściany pojedynczej komórki [2]. Drugim najczęściej występującym polisacharydem pektynowym jest RG-I, będący rozgałęzionym polimerem zbudowanym z reszt kwasu D-galakturonowego i L-ramnozy. W pierwotnych ścianach komórkowych pektyny odpowiadają za nadawanie im porowatości, gęstości i ładunku elektrycznego oraz regulują od-

ległość pomiędzy fibrylami celulozowymi, w związku z czym umożliwiają adhezję komórek oraz ich kontrolowany podział [4, 54]. Ponadto, są one także głównym składnikiem żelowej otoczki (ang. *mucilage*) tworzonej przez nasiona niektórych gatunków roślin (np. *A. thaliana*, *L. sativum*) podczas imbibicji [26].

Właściwości pierwotnej ściany komórek zarodka i bielma odgrywają istotną rolę w regulacji przebiegu procesu kiełkowania. Dlatego też w dalszej części niniejszego artykułu przeglądowego omówiono najnowsze odkrycia dotyczące roli specyficznych białek zaangażowanych w modulowanie właśnie tej struktury komórkowej.

BIAŁKA MODULUJĄCE STRUKTURĘ ŚCIANY KOMÓRKOWEJ W KIEŁKUJĄCYCH NASIONACH

CELULAZY

Grupę enzymów odpowiedzialnych za rozkład celulozy stanowią celulazy (ang. *cellulases*, CEL, EC 3.2.1.4). Mają one zdolność katalizowania reakcji hydrolizy wiązań β-1,4-glikozydowych, występujących pomiędzy cząsteczkami glukozy w łańcuchu celulozowym (ryc. 1). Produktem przejściowym rozkładu celulozy jest dwucukier celobioza, degradowany następnie do glukozy. Wyróżnia się trzy grupy celulaz: 1) endo-β-1,4-glukanazy (ang. *Endo-β-1,4-glucanases*, EC 3.2.1.6), które katalizują reakcję hydrolizy wewnątrzcząsteczkowych wiązań β-1,4-glikozydowych; 2) egzo-β-1,4-glukanazy (ang. *Exo-β-1,4-glucanases*, EC 3.2.1.155), odczepiające jednostki celobiozy lub glukozy od końców łańcucha celulozy oraz 3) β-glukozydazy (ang. *β-glucosidases*, EC 3.2.1.21), katalizujące reakcję rozkładu celobiozy do dwóch cząsteczek glukozy i odczepiające cząsteczki glukozy od niezredukowanych końców oligosacharydów. U *A. thaliana* CEL kodowane są przez liczącą ponad 12 przedstawicieli rodzinę genów [12].

Aktywność CEL umożliwia modyfikację struktury pierwotnej ściany komórkowej, w której sztywny szkielet celulozowy stanowi mechaniczną barierę dla zwiększających rozmiary komórek aktywnie rosnących tkanek roślinnych, takich jak np. kiełkujące nasiona oraz wykształcające się łagiewki pyłkowe [45]. W niniejszym artykule przeglądowym poświęcono szczególną uwagę roli CEL modyfikujących ścianę komórkową podczas procesów zachodzących w kiełkujących nasionach. Wykazano, iż aktywność CEL wzrasta w bielmie nasion bielunia kolczastego (*Datura ferox*) oraz kawy arabskiej (*Coffea arabica*) bezpośrednio przed przebiciem bielma przez wydłużający się korzeń zarodkowy [5, 11, 55]. Natomiast u nasion pomidora (*Solanum lycopersicum*) zaobserwowano, iż aktywność CEL utrzymuje się na stałym poziomie w trakcie kiełkowania aż do czasu przebicia bielma przez korzeń zarodkowy, gdzie następnie wzrasta w obydwu tych

strukturach nasienia [21]. Uzyskane wyniki sugerują, że rola CEL w kiełkowaniu zależy od cech gatunkowych nasion [5].

Kolejne pojawiające się dowody potwierdzają rolę CEL w kiełkowaniu nasion. Jednakże nie ma zbyt wielu informacji charakteryzujących wpływ np. hormonów roślinnych na działanie CEL w przebiegu powyższego procesu. W niedawno opublikowanej pracy autorstwa Chen i in. [5] wykazano, że hamowanie rozluźniania bielma podczas kiełkowania nasion sałaty (*Lactuca sativa*) przez podany egzogennie ABA, jest związane z obniżeniem poziomu transkryptów genów *CEL1* i *2* (ang. *Cellulase 1*, *2*) oraz zmniejszeniem ilości białka i aktywności CEL1 i 2 w bielmie. Udowodniono także, że traktowanie nasion etefonem (prekursor ET) stymuluje proces rozluźniania bielma, co jest skorelowane ze wzrostem ekspresji *CEL1* i *2*, a także ilością oraz aktywnością białek przez nie kodowanych w bielmie. Natomiast, w korzeniu zarodkowym nie zaobserwowano tego rodzaju zmian zarówno pod wpływem ABA jak i etefonu. Wyniki te sugerują, że ABA oraz ET regulują kiełkowanie poprzez tkankowo-specyficzne modulowanie ekspresji genów *CEL1* i *2* oraz ilości i aktywności białek przez nie kodowanych [5].

Rola CEL w biologii nasion wciąż nie jest dobrze poznana. Zasadniczą przyczyną jest fakt, iż dostępne na dzień dzisiejszy metody nie pozwalają w pełni scharakteryzować biologicznych funkcji poszczególnych CEL w specyficznych tkankach roślinnych. Szansą na uzyskanie wiarygodnych wyników badań charakteryzujących rolę CEL w procesie kiełkowania na pewno byłyby przyszłe eksperymenty wykorzystujące nasiona mutantów konkretnych genów *CEL* oraz nowoczesne narzędzia biologii molekularnej i pomiary biochemiczne.

MANNANAZY

Drugim obok celulozy, istotnym składnikiem ściany komórkowej są hemicelulozy, których struktura może być modyfikowana przez enzymy lityczne – hemicelulazy (ang. *hemicellulases*). Ze względu na rodzaj rozkładanego hemicelulozowego polisacharydu wyróżniamy między innymi: 1) hemicelulazy mannolityczne zwane mannanazami (ang. *Mannanases*, MAN), które rozkładają mannany oraz 2) hemicelulazy ksylanolityczne określane jako ksylanazy (ang. *Xylanases*, XYL), rozkładające ksyloglukan. Rola i funkcje pierwszej grupy w/w enzymów w procesach zachodzących w nasionach jest tematem niniejszego podrozdziału, natomiast druga grupa została omówiona w następnym podrozdziale.

Wśród MAN wyróżniamy: 1) endo-1,4-β-mannanazy (ang. endo-1,4-β-mannosidases, endo-1,4-β-mannanases, EC 3.2.1.78), tnące wiązania β-1,4-glikozydowe w łańcuchu głównym mannanu do manno-oligomerów, takich jak: mannobiozy i mannozy oraz 2) β-mannozydazy (ang. β-mannosidases, mannanases, EC 3.2.1.25) hydrolizujące oligomery powstałe w wyniku działania endo-1,4-β-man-

nanaz (ryc. 1). W genomie *A. thaliana* znajduje się 8 genów *MAN* kodujących endo-1,4-β-mannanazy [29]. Niestety, dostępne dane literaturowe nie podają konkretnej liczby genów kodujących β-mannozydazy u roślin.

Ściany komórkowe nasion, a w szczególności te budujące bielmo, zawierają duże ilości mannanów nadających im wytrzymałość mechaniczną. Ponieważ rozluźnianie struktury bielma jest jednym z kluczowych etapów kiełkowania nasion wielu gatunków roślin zaproponowano, iż enzymy hydrolizujące mannany mogą pełnić istotną rolę w tym procesie. Pomiary aktywności endo-1,4-β-mannanazy i β-mannozydazy, w pęczniejących nasionach mutantów *gib-1* (ang. *GA-deficient 1*) *L. esculentum,* charakteryzujących się zakłóconym szlakiem biosyntezy GA, wykazały, iż niższa aktywność obydwu enzymów w porównaniu do nasion typu dzikiego była skorelowana z zahamowanym kiełkowaniem [21]. Co więcej, podanie egzogennej GA stymulowało kiełkowanie *gib-1*, a także indukowało wzrost aktywności w/w enzymów mannolitycznych w bielmie kiełkujących nasion, w porównaniu do nasion pęczniejących na wodzie [21]. W oparciu o uzyskane wyniki analiz ekspresji genów *MAN* podczas pęcznienia nasion *A. thaliana* również zasugerowano, iż mogą one pełnić istotną rolę w procesie kiełkowania. W kiełkujących nasionach *A. thaliana* ekspresji ulega połowa ze wszystkich 8 genów *MAN* kodowanych przez genom tej rośliny, są to: *MAN7, 6, 2* i *5* (ang. *Endo-Beta-Mannosidase 7, 6, 2* i *5*) [28]. Hybrydyzacja *in situ* wykazała, iż transkrypty tych genów są zlokalizowane zarówno w korzeniu zarodkowym jak i bielmie go otaczającym. Nasiona pojedynczych mutantów insercyjnych *man7, 6* i *5* kiełkowały prawie dwa razy wolniej niż typ dziki. Zaobserwowany w początkowych etapach kiełkowania wysoki poziom ekspresji genów *MAN5*, *MAN7* oraz w szczególności *MAN6*, ulega obniżeniu w momencie przebicia warstwy bielma przez korzeń zarodkowy. W innych badaniach zidentyfikowano czynnik transkrypcyjny bZIP44 (ang. *basic leucine-zipper 44*), jako ten odpowiadający za aktywację ekspresji genu *MAN7*. Mutanty insercyjne genu *bZIP44 A. thaliana* charakteryzowały się obniżonym poziomem ekspresji *MAN7* i kiełkowały wolniej niż nasiona typu dzikiego. Natomiast w przypadku badanych linii wykazujących nadekspresję genu *bZIP44* zaobserwowano odwrotny fenotyp kiełkowania [30]. Wyniki te sugerują, iż białka kodowane przez geny *MAN* pełnią kluczową rolę w hydrolizie mannanów obecnych zarówno w ścianach komórek bielma – rozluźniając jego strukturę, jak również i korzenia – ułatwiając wzrost elongacyjny jego komórek.

Badania przeprowadzone na kiełkujących nasionach *C. arabica* wykazały, że nie tylko endo-1,4-β-mannanazy, ale także β-mannozydazy mogą pełnić istotną rolę w regulacji tego procesu. Ekspresja genów *MSIDE2* (ang. *β-mannosidase*) oraz *MANA* (ang. *endo-β-mannanaseA*) należących do β-mannozydaz wzrastała w bielmie kiełkujących nasion tego gatunku na etapach poprzedzających przebicie tej warstwy komórek przez korzeń zarodkowy [14]. Ci sami autorzy wykazali,

że podanie egzogennego ABA hamowało kiełkowanie nasion *C. arabica* co było skorelowane ze wzrostem ekspresji w/w analizowanych genów.

Przedstawione informacje podkreślają rolę MAN w modulacji struktury ściany komórkowej zarówno w obumierającej tkance bielma jak i w aktywnie rosnącym korzeniu zarodkowym podczas kontrolowanego przez hormony procesu kiełkowania.

ENDOTRANSGLIKOZYLAZY/HYDROLAZY KSYLOGLUKANOWE

Enzymami hydrolitycznymi specyficznie katalizującymi reakcje cięcia i/lub modyfikacji cząsteczek ksyloglukanu występującego w roślinnych ścianach komórkowych są hemicelulazy ksylanolityczne, takie jak: endotransglikozylazy ksyloglukanu (ang. *Xyloglucan EndoTransglycosylase*, XET; EC 2.4.1.207) i hydrolazy ksyloglukanu (ang. Xyloglucan EndoHydrolase, XEH; EC 3.2.1.151).

W komórkach roślinnych zidentyfikowano także hemicelulazy ksylanolityczne posiadające aktywność zarówno endotransglikozylazy jak i hydrolazy ksyloglukanu. Łańcuchy ksyloglukanu mogą być cięte również przez endo-β-1,4-glukanazy, należące do grupy celulaz, posiadających zdolność przecinania zarówno łańcuchów ksyloglukanu jak i celulozy [9]. Endo-β-1,4-glukanazy odpowiadają za degradację ksyloglukanu poprzez rozcięcie wiązań β-1,4-glikozydowych pomiędzy cząsteczkami glukozy budującymi łańcuch tego polisacharydu, w wyniku czego powstają oligomery cukrów o różnej długości i budowie. Ponieważ rola endo-β-1,4-glukanaz jak i XEH w kontekście degradacji ksyloglukanów w procesach zachodzących w nasionach nie została dotychczas scharakteryzowana, w niniejszej pracy skupiono się na omówieniu roli XTH.

Podobnie jak endo-β-1,4-glukanazy, także enzymy XTH przecinają łańcuch ksyloglukanu w miejscu wiązania β-1,4-glikozydowego. Z tą różnicą, że XTH po rozcięciu wiązania β-1,4-glikozydowego przyłączają do nowo powstałego redukującego końca łańcucha ksyloglukanu, nieredukujący koniec innego łańcucha ksyloglukanu lub krótki oligosacharyd – produkt innej reakcji cięcia hemiceluloz (aktywność transglikozylazy) (ryc. 1). XTH mogą również dołączać wodę do powstałego końca modyfikowanej cząsteczki ksyloglukanu (aktywność hydrolazy) [40, 56]. W ten sposób XTH głównie dzięki aktywności transglikozylazy przyczyniają się do rearanżacji struktury ksyloglukanów w ścianach komórkowych. Analizy w warunkach *in vitro* nie potwierdziły, aby XTH były odpowiedzialne za rozluźnianie struktury ściany komórkowej. Zaproponowano, iż uczestniczą one w procesie biogenezy i przebudowy ściany komórkowej w celu jej usztywnienia i/lub wzmocnienia [13].

W genomie *A. thaliana* zidentyfikowano 33 geny *XTH*, u ryżu (*Oryza sativa*) jest ich 29, a u topoli (*Populus trichocarpa*) – 41 [13, 23, 25]. Udowodniono, iż

XTH odgrywają rolę w procesach, w których dochodzi do przebudowy struktury ściany komórkowej, takich jak np.: wzrost korzeni i hypokotylu, kiełkowanie [9, 44]. W badaniach przeprowadzonych na kiełkujących nasionach *L. esculentum* zaobserwowano tkankowo specyficzną stymulację ekspresji genu *XTH4* (ang. *Xyloglucan endoTransglucosylase 4*) w bielmie [42]. Co więcej, w eksperymentach wykorzystujących nasiona *L. sativum* wykazano, że ekspresja genów *XTH* jest czasowo i tkankowo specyficznie regulowana podczas procesu kiełkowania. Zaobserwowano, iż ilość transkryptów *XTH19* we wczesnych etapach kiełkowania nasion tego gatunku była wyższa w bielmie niż zarodku, lecz zmniejszała się w późniejszych etapach tego procesu, poprzedzających przebicie bielma przez korzeń zarodkowy [64]. Ci sami autorzy udowodnili, że ekspresja *XTH19* i *XTH18* w bielmie nasion *L. sativum* jest negatywnie regulowana przez traktowanie egzogenną GA na wczesnych etapach kiełkowania, natomiast w późniejszych fazach aplikacja GA nie powodowała zmian ekspresji tych genów. Może to oznaczać, iż w/w *XTH* pełnią istotną funkcję szczególnie w pierwszych godzinach procesu kiełkowania, kiedy to modyfikacje struktury bielma decydują o tym czy rosnący korzeń zarodkowy zdoła przebić się przez tę strukturę okrywającą.

Niedawno opublikowane wyniki badań transkryptomicznych wykazały podwyższony poziom ekspresji m.in. genu *XTH31* w bielmie pęczniejących nasion *A. thaliana* [13]. Ponadto, informacje uzyskane w oparciu o analizy bioinformatyczne danych mikromacierzowych potwierdziły, iż ilość transkryptów *XTH31* jest ściśle skorelowana z dynamiką kiełkowania. Zaobserwowano, że ekspresja *XTH31* nie jest indukowana w niekiełkujących nasionach np. obarczonych spoczynkiem (spoczynek – zespół barier uniemożliwiających kiełkowanie nieuszkodzonych, żywych nasion, nawet w warunkach optymalnych dla tego procesu) lub pęczniejących w obecności inhibitorów kiełkowania [13]. Jednakże, biologiczne testy z wykorzystaniem nasion mutantów *xth31 A. thaliana* ujawniły, iż kiełkowały one szybciej w porównaniu do nasion typu dzikiego. Uzyskane wyniki potwierdziły, iż enzym kodowany przez tkankowo-specyficznie eksprymowany gen *XTH31* odgrywa rolę w usztywnianiu struktury ściany komórek bielma utrudniając przebicie się korzenia zarodkowego przez tę warstwę okrywającą [13].

Dotychczasowe doniesienia literaturowe podają przykłady XTH uczestniczących w regulacji procesu kiełkowania nasion. Jednakże, w odróżnieniu do wielu innych enzymów omawianych w tej pracy, XTH przebudowują ścianę komórkową w celu jej usztywnienia i/lub wzmocnienia i/lub rozluźnienia, hamując lub stymulując kiełkowanie, w zależności od tego w jakiej tkance, które geny *XTH* są eksprymowane. Ponadto, modyfikacje ściany komórkowej wymagają zaangażowania różnych enzymów XTH jak również wielu innych CWRP, dlatego też aby w pełni zrozumieć te skomplikowane przemiany potrzebne są bardziej kompleksowe analizy.

LIAZY PEKTYNIANOWE

Pektyny wchodzące w skład ściany komórkowej rozkładane są przez enzymy należące do klas, takich jak: 1) liazy pektynianowe = liazy pektatowe = liazy kwasu pektynowego = liazy kwasu galakturonowego (ang. *pectate lyase*, *PolyGalacturonic Acid lyases*, PGA lyases, EC 4.2.2.2), 2), liazy pektynowe (ang. *Pectin Lyase*, PNL, PL, EC 4.2.2.10), 3) metyloesterazy pektynowe (ang. *Pectin MethylEsterase*, PME, EC 3.1.1.11) oraz 4) poligalakturonazy (ang. *PolyGalacturonase*, PG, EC 3.2.1.15).

Liazy PGA są enzymami pektynolitycznymi katalizującymi rozkład wiązań α-1,4-glikozydowych pomiędzy resztami kwasu D-galakturonowego wewnątrz łańcucha tworzącego pektynę, co skutkuje powstawaniem krótszych łańcuchów kwasu D-galakturonowego (ryc. 1). Enzymy PNL również przecinają wiązanie α-1,4-glikozydowych jednak rozpoznają zestryfikowane cząsteczki kwasu D-galakturonowego wewnątrz łańcucha pektyn i tną wiązanie pomiędzy takimi cząsteczkami. W przeciwieństwie do pozostałych enzymów o aktywności pektynolitycznej, liazy PGA i PNL nie są enzymami hydrolitycznymi ponieważ w katalizowanej przez siebie reakcji nie wykorzystują cząsteczki wody. W genomie *A. thaliana* istnieje 26 genów kodujących enzymy o prawdopodobnej aktywności liaz PGA, wytypowanych w wyniku analiz bioinformatycznych ze względu na wysokie podobieństwo kodowanych przez nie białek do bakteryjnej liazy PGA z *Erwinia chrysanthemi* [39]. Ze względu na to, że rola PNL w nasionach jest bardzo słabo poznana, w rozdziale tym omawiana jest tylko rola liaz PGA. Natomiast dwa pozostałe enzymy: PME oraz PG są scharakteryzowane w kolejnych częściach tego artykułu.

Wyniki wielu badań wskazują na pozytywną rolę liaz PGA w regulacji poszczególnych procesów rozwojowych roślin, takich jak np.: dojrzewanie owoców, wzrost łagiewki pyłkowej, opadanie kwiatów i owoców, wzrost wydłużeniowy komórek hypokotylu [61, 74]. Zademonstrowano, że liazy PGA modulują budowę ściany komórek kiełkujących nasion *A. thaliana*. Wyniki analizy aktywności promotorów genów At1g67750 oraz At3g24670 kodujących prawdopodobne liazy PGA u tego gatunku wykazały, że były one aktywne w bielmie kiełkujących nasion [61]. Wykazano również, iż na etapie przebicia bielma przez korzeń zarodkowy zarówno w bielmie jak i zarodku ekspresja tych genów była negatywnie regulowana przez egzogennie aplikowany ABA [53]. Natomiast w późniejszych fazach kiełkowania zaobserwowano, iż poziom ekspresji genów kodujących liazy PGA w zarodku jest wyższy niż w bielmie. Z kolei w eksperymentach przeprowadzonych na nasionach *L. sativum* wykazano, iż na poziom ekspresji *LsPL1* (*L. sativum Pectate Lyase1*) będącego ortologiem genu At1g04680, kodującego liazę PGA, mają wpływ hormony roślinne, takie jak: ABA oraz ET, aplikowane we wczesnej fazie kiełkowania [37]. Zgodnie z tym co przedstawili Linkies i in. [37]

regulacja ekspresji *LsPL1* przez ABA w nasionach jest tkankowo-specyficzna: hormon ten hamuje ekspresję *LsPL1* w bielmie i stymuluje w korzeniu zarodkowym, podczas gdy ET stymulował ekspresję tego genu w obu tkankach. Wyniki te sugerują, iż poziom ekspresji *LsPL1* podczas kiełkowania nasion *L. sativum* zależy od fazy tego procesu oraz od rodzaju tkanki, w której jest eksprymowany.

Opisane powyżej przykłady literaturowe wskazują na to, iż liazy PGA pełnią istotną rolę w regulacji poszczególnych procesów rozwojowych. Niemniej jednak rola tych enzymów w regulacji przemian metabolicznych zachodzących w ścianach komórkowych w czasie kiełkowania nasion nadal jest bardzo słabo poznana. Większość dostępnych danych opiera się na analizach bioinformatycznych oraz wynikach pomiarów ekspresji genów, które jednak nie umożliwiają pełnej charakterystyki biologicznych funkcji poszczególnych białek przez nie kodowanych w procesach zachodzących w nasionach.

METYLOESTERAZY PEKTYNOWE

Właściwości biofizyczne ścian komórek roślinnych mogą być modulowane m.in. w wyniku zmian poziomu metyl-estryfikacji pektyn z udziałem PME. Tego rodzaju modyfikacje ściany są ważne dla zdrowej, aktywnie rosnącej tkanki, jak również procesów rozluźniania struktury ściany komórkowej np. podczas dojrzewania owoców i zmian zachodzących w obumierającym bielmie kiełkujących nasion. Enzymy PME katalizują reakcję demetyl-estryfikacji Me-HG, podczas której estry metylowe są usuwane z łańcuchów HG prowadząc do powstania wolnych grup karboksylowych i uwolnienia cząsteczek protonu oraz metanolu (ryc. 1). PME mogą działać liniowo (wzdłuż połączonych równolegle kilku łańcuchów HG) w celu de-estryfikacji fragmentów HG, powodując wzrost liczby wolnych grup karboksylowych, które następnie mogą łączyć się z jonami wapnia. PME mogą także działać w sposób nieliniowy, de-estryfikując tylko pojedyncze cząsteczki lub krótkie odcinki HG, co nie sprzyja powstawaniu długich łańcuchów HG połączonych mostkami wapniowymi, natomiast prowadzi do rozluźnienia struktury ściany komórkowej.

PME są kodowane przez dużą wielogenową rodzinę, która ze względu na różnice w strukturze pierwszorzędowej została podzielona na dwie grupy: 1) pierwsza obejmuje PME posiadające konserwatywną domenę pektynoesterazy (Pfam 01095), a 2) druga grupa PME charakteryzuje się obecnością domeny pektynoesterazy (Pfam 01095) oraz dodatkowo domeny hamującej (Pfam 04043). U *A. thaliana* zidentyfikowano 67 genów *PME*, z których do pierwszej grupy należy 22 a do drugiej 45 przedstawicieli. Aktywność wszystkich PME jest antagonistycznie regulowana przez białkowe inhibitory metyloesterazy pektynowej (ang. *Pectin MethylEsterase Inhibitor*, PMEI). Analizy bioinformatyczne ujawniły, iż

u *A. thaliana* liczebność *PMEI* jest zbliżona do liczby zidentyfikowanych *PME* i wynosi 69 genów [58].

Wykazano, iż PME uczestniczą w przebudowie pektyn na różnych etapach rozwoju rośliny, takich jak np.: wydłużanie korzenia i hypokotyla, dojrzewanie owoców oraz kiełkowanie [27, 52, 58, 71]. Przytoczone tu przykłady wskazują na różnorodność procesów w jakich uczestniczą PME oraz na potencjalną złożoność ich mechanizmów działania. Enzymy te z jednej strony zmiękczając i rozluźniając pektyny umożliwiają pęcznienie i stymulację wzrostu elongacyjnego. Z drugiej strony sprzyjają tworzeniu się mostków wapniowych w wyniku czego przyczyniają się do usztywnienia ściany komórkowej, spowalniającego procesy wzrostowe. Uczestniczą również w rozkładzie blaszki środkowej umożliwiającym separację komórek.

Niedawno opublikowane dane wskazują, iż pęczniejące nasiona mutantów *A. thaliana* wykazujące nadekspresję *PMEI5* charakteryzują się obniżoną aktywnością PME, objawiającą się szybszą dynamiką kiełkowania w porównaniu do nasion typu dzikiego [34]. Zaproponowano, iż wysoka aktywność PME jest skorelowana z indukowanym przez ABA hamowaniem wydłużania się korzenia zarodkowego i rozluźniania bielma, dwóch procesów wymaganych do zakończenia kiełkowania [34]. Jednak wyniki badań Scheler i in. [58] wykazały, iż mechanizm regulacji kiełkowania przez PME jest zdecydowanie bardziej złożony. Na podstawie analiz molekularnych, fizjologicznych, histochemicznych i biofizycznych potwierdzono, że podczas kiełkowania nasion *L. sativum*, zmiany w liczebności transkryptów poszczególnych *PME* i *PMEI* są skorelowane z czasowo-przestrzennymi zmianami w poziomie metyl-estryfikacji ściany komórkowej. Autorzy zasugerowali, że mechanizm regulacji kiełkowania nasion tego gatunku przez PME jest modulowany w sposób zależny zarówno od etapu kiełkowania, jak i części nasiona, tj.: inaczej przebiega on w bielmie, a inaczej w korzeniu zarodkowym [58].

Duża liczebność członków rodziny *PME* zdecydowanie utrudnia prowadzenie badań nad charakterystyką funkcji pełnionych przez poszczególne enzymy kodowane przez te geny w procesach zachodzących w nasionach. Odzwierciedla się to niestety w małej liczbie danych literaturowych dotyczących tego zagadnienia, a jednocześnie stanowi wyzwanie dla naukowców do kontynuacji badań w tym trudnym temacie.

POLIGALAKTURONAZY

Działalność aktywnych PME może sprzyjać późniejszym modyfikacjom ściany komórkowej z udziałem innych hydrolaz, takich jak np. PG, które w większym stopniu przyczyniają się do rozluźniania struktury ściany komórkowej i/lub rozdzielania się komórek [20]. U *A. thaliana* geny kodujące PG należą do dużej rodziny

liczącej 69 przedstawicieli. Wśród tego rodzaju enzymów wyróżniamy endo- i egzo-PG. Obydwie grupy PG różnią się miejscem przeprowadzenia reakcji hydrolizy. Wszystkie PG hydrolizują wiązania α-1,4-glikozydowe pomiędzy resztami kwasu D-galakturonowego wchodzącymi w skład łańcucha pektynowego [62] (ryc. 1). Jednakże endo-PG hydrolizują w sposób przypadkowy, wzdłuż sieci połączeń poligalakturonanu, co prowadzi do powstania cząsteczek oligo-galakturonanu. Natomiast egzo-PG hydrolizują poczynając od niezredukowanych końców polimerów, generując monomeryczny kwas D-galakturonowy. Szybkość hydrolizy z udziałem PG zależy od długości łańcucha polisacharydowego. Co więcej, zróżnicowanie PG funkcjonujących w określonym pH, ich specyficzność substratowa oraz inne czynniki mocno sprzyjają także grzybowym patogenom w atakowaniu organizmów roślinnych. Grzybowe patogeny roślin oddziałują na roślinną ścianę komórkową między innymi za pośrednictwem swoich specyficznych PG. W odpowiedzi na atak chorobotwórczych patogenów, rośliny wytwarzają specyficzne, białkowe inhibitory (ang. *PolyGalacturonase Inhibitor Protein*, PGIP) spowalniające i/lub hamujące aktywność patogenowych PG. Ponadto, inhibitory te sprzyjają akumulacji długich łańcuchów oligosacharydowych w celu inicjacji kaskady reakcji obronnych przed atakiem patogenów. PGIP są białkami bogatymi w powtórzenia leucynowe, o długości około 360 aminokwasów, wykazującymi kompetytywne i niekompetytywne właściwości hamujące aktywność PG. Aktywne miejsca PG oddziaływują z sekwencją zawierającą polarne aminokwasy (np.: glicyna, arginina, asparagina, tyrozyna, lizyna, itp.). Inhibitor zapobiega wiązaniu się substratu, konkurując i zajmując miejsce aktywne enzymu, skutkując kompetytywnym hamowaniem aktywności PG. Jednakże, dotychczas w roślinach nie zidentyfikowano wewnętrznych PGIP zdolnych do hamowania aktywności roślinnych PG. Małe oligosacharydy powstałe w wyniku działalności patogenowych PG funkcjonują jako cząsteczki sygnałowe indukujące syntezę roślinnych PGIP. Pomimo tego, że większość roślinnych PGIP ma podobną sekwencję aminokwasów, istnieje ścisła zależność pomiędzy specyficznością roślinnych PGIP a patogenowymi PG. Tego rodzaju zależność konkretnych PGIP i PG może wyjaśniać podatność różnych zbóż na infekcje ściśle określonymi gatunkami patogenów.

Wykazano, iż aktywność PG jest związana z szerokim spektrum procesów rozwojowych roślin jak np.: odcinanie/oddzielanie się owoców od rośliny macierzystej, pękanie dojrzałych strąków i pylników, dojrzewanie i psucie się owoców, wytwarzanie komórek ksylemu, wzrost łagiewki pyłkowej [18, 32]. Postuluje się, iż PG uczestniczą również w degradacji pektyn podczas kiełkowania oraz rozluźniania bielma poprzedzającego jego przebicie przez wydłużający się korzeń zarodkowy [31]. Jednakże ze względu na zróżnicowanie PG funkcjonujących w określonym pH oraz specyficzność substratu, dokładny mechanizm ich działania oraz funkcje większości przedstawicieli roślinnych PG w biologii nasion nadal pozostają tajemnicą.

EKSPANSYNY

Wspólną nazwą ekspansyny (ang. *Expansins*, EXP) określamy grupę białek zewnątrzkomórkowych uczestniczących w procesie rozluźniania i relaksacji ściany komórkowej podczas wzrostu komórek i tkanek roślin. Mechanizm działania EXP nie został jeszcze dobrze poznany. Wykazano, że białka te wykazują maksymalną aktywność przy pH ok. 4 w komórce roślinnej, uczestnicząc w tzw. wzroście kwasowym [9]. Przypuszcza się również, że EXP modyfikują strukturę ściany komórkowej poprzez rozrywanie wiązań między fibrylami celulozowymi i/lub łańcuchami hemicelulozowymi (ryc. 1). Na chwilę obecną nie ma jednak wystarczających dowodów, które potwierdzałyby enzymatyczną aktywność EXP i nie jest w pełni zrozumiałe w jaki sposób te białka modyfikują strukturę ściany komórkowej [10].

U *A. thaliana* EXP kodowane są przez dużą, wielogenową rodzinę liczącą 38 przedstawicieli, zaś u *O. sativa* – 40 [35, 36]. Cennych informacji dotyczących EXP dostarczyły badania filogenetyczne sekwencji aminokwasowych tych białek występujących u: *A. thaliana*, *O. sativa,* a także wybranych gatunków: paproci (np. *Regnellidium diphyllum, Marsilea quadrifolia*), sosny (np. *Pinus radiata, Pinus taeda*) oraz mszaków (np. *Physcomitrella patens*) [6]. Wykazano, że sekwencje aminokwasowe EXP nie są homologiczne do żadnych znanych sekwencji innych CWRP, jak również nie znaleziono motywów kodujących specyficzne domeny białkowe, które mogłyby sugerować ich funkcję enzymatyczną [7].

Wśród dotychczas zidentyfikowanych roślinnych EXP wyodrębniono 2 klasy białek: 1) α- ekspansyny (α-EXP) i 2) β-ekspansyny (β-EXP) [6, 9, 17]. Badania filogenetyczne sekwencji aminokwasowych EXP prowadzone m.in. na modelu *A. thaliana* przyczyniły się do odkrycia sekwencji białek „ekspansyno-podobnych" (ang. "expansin-like"), które nazwano γ-ekspansynami (γ-EXP) [35]. Następnie pojawiło się doniesienie o kolejnej klasie białek „ekspansyno-podobnych" nazwanych δ-ekspansynami (δ-EXP), specyficznych dla *O. sativa*, ale nieobecnych u *A. thaliana* [36]. Co ciekawe, niektóre z EXP występują również u bakterii będących patogenami roślin, np.: *Xanthomonas campestris, Clavibacter michiganensis, Ralstonia solanacearum, Aspergillus niger*, co wiąże się ze zjawiskiem horyzontalnego transferu genów [9].

Obecność EXP została potwierdzona w ścianach komórkowych wielu gatunków roślin, gdzie uczestniczą w regulacji procesów m.in.: rozwoju siewek, korzeni, liści, dojrzewania owoców, otwierania się aparatów szparkowych oraz w odpowiedzi na stres biotyczny i abiotyczny, zapylania kwiatów i kiełkowania nasion [3, 16, 19, 38, 46, 57, 63, 73]. Zarówno α- jak i β-EXP mają zdolność do modyfikowania ściany komórkowej roślin jedno- i dwuliściennych. Jednakże w odróżnieniu do α-EXP, u traw (rodzina *Poace*) tylko β-EXP obniżają wytrzymałość mechaniczną ściany komórkowej poprzez rozluźnianie blaszki środkowej między komórkami [9]. Nato-

miast u roślin dwuliściennych β-EXP mają niewielki udział w rozluźnianiu ściany komórkowej, za to α-EXP pełnią decydującą rolę w tym procesie. Geny kodujące β-EXP ulegają także wysokiej ekspresji w pyłku traw, ułatwiając penetrację łagiewki pyłkowej do komórki jajowej, co jest ewolucyjnym przystosowaniem i charakterystyczną właściwością rodziny *Poace* [9]. Biologiczne funkcje EXP z pozostałych klas nie zostały dotąd scharakteryzowane [45].

Liczne badania wskazują na zależność pomiędzy poziomem ekspresji poszczególnych genów kodujących białka EXP a procesem kiełkowania. Doświadczenia przeprowadzone na kiełkujących nasionach *S. lycopersicum* wykazały, iż ekspresja genu *EXP4* (ang. *Expansin 4*) kodującego białko EXP4, należące do klasy α-ekspansyn wzrasta w bielmie [47]. Natomiast, u *A. thaliana,* badano należącą również do klasy α-EXP – ekspansynę 2 (EXP2). Porównując poziom transkryptów *EXP2* (ang. *Expansin 2*) w różnych tkankach wykazano, że *EXP2* jest wysoko eksprymowany wyłącznie w pęczniejących nasionach [41, 70]. W badaniach z wykorzystaniem nasion mutantów *exp2 A. thaliana* zaobserwowano, że nasiona te pęczniejąc na wodzie kiełkowały wolniej niż nasiona typu dzikiego, co sugeruje istotną rolę *EXP2* w regulacji tego procesu. Co więcej, kiełkujące nasiona mutantów *exp2* wykazują większą wrażliwość na stres solny i osmotyczny, niż nasiona typu dzikiego *A. thaliana*, co objawia się wolniejszym kiełkowaniem, zaś mutanty z nadekspresją *EXP2* są bardziej odporne [70]. Wykazano również, iż traktowanie nasion typu dzikiego *A. thaliana* egzogenną GA zwiększa poziom ekspresji *EXP2*, natomiast podanie ABA nie wpływa na ilość jego transkryptów. Dodatkowo, analizy z wykorzystaniem nasion *A. thaliana* mutantów DELLA udowodniły, iż białka: RGL1 (ang. *RGA Like 1*), RGL2 (ang. *RGA Like 2*), RGA (ang. *Repressor of GA*), GAI (ang. *Gibberellic Acid Insensitive*) negatywnie regulują proces kiełkowania a spośród nich dominującą rolę w kontroli ekspresji *EXP2* pełni – RGL1 [66, 70].

Przytoczone tu przykłady wskazują na to, iż mimo niewystarczających dowodów potwierdzających enzymatyczną aktywność EXP to bez wątpienia białka te są ważne dla modulowania struktury ściany komórkowej kiełkujących nasion, a ich mechanizm działania w tym procesie jest kontrolowany przez hormony roślinne, takie jak ABA i GA.

PODSUMOWANIE I PRZYSZŁE PERSPEKTYWY

Modyfikacje struktury ściany komórek bielma i korzenia zarodkowego są jednym z kluczowych mechanizmów wpływających na przebieg procesu kiełkowania. Duża liczba członków rodzin poszczególnych CWRP jest czynnikiem utrudniającym poznanie ich roli i funkcji w kiełkujących nasionach. Nadal wiele

pytań pozostaje bez odpowiedzi np. jakie inne geny kodujące enzymy regulujące modyfikowanie ścian komórkowych odgrywają istotną rolę podczas rozluźniania bielma, a które są ważne dla wzrostu komórek zarodka? Jaki wpływ na biologiczne funkcje tychże genów w kiełkujących nasionach mają czynniki egzogenne (np. światło, temperatura) oraz endogenne (np. hormony roślinne, ROS)? Ograniczony zasób informacji dotyczących tych zagadnień powinien stanowić zachętę do kontynuowania badań w tak intrygującym temacie.

PODZIĘKOWANIA

Praca naukowa finansowana ze środków grantu *SONATA2 Narodowego Centrum Nauki* (no. 2011/03/D/NZ9/04059)

LITERATURA

[1] Baumann MJ, Eklöf JM, Michel G, Kallas AM, Teeri TT, Czjzek M, Brumer H. Structural evidence for the evolution of xyloglucanase activity from xyloglucan endo-transglycosylases: biological implications for cell wall metabolism. *Plant Cell* 2007; **19**: 1947-1963.

[2] Braybrook SA, Hofte H, Peaucelle A. Probing the mechanical contributions of the pectin matrix: insights for cell growth. *Plant Signal. Behav.* 2012; **7**: 1037-1041.

[3] Budzinski IGF, Santos TB, Sera T, Pot D, Vieira LGE, Pereira LFP. Expression patterns of three α-expansin isoforms in *Coffea arabica* during fruit development. *Plant Biol.* 2011; **13**: 462-471.

[4] Cao J. The pectin lyases in *Arabidopsis thaliana*: evolution, selection and expression profiles. *PloS One* 2012; **7**: e46944. DOI: 10.1371/journal.pone.0046944.

[5] Chen B, Ma J, Xu Z, Wang X. Abscisic acid and ethephon regulation of cellulase in the endosperm cap and radicle during lettuce seed germination. *J. Integr. Plant Biol.* 2016; DOI: 10.1111/jipb.12479.

[6] Choi D, Cho HT, Lee Y. Expansins: expanding importance in plant growth and development. *Phys Plant.* 2006; **126**: 511-518.

[7] Cosgrove DJ. Cell wall loosening by expansins. *Plant Physiol.* 1998; **188**: 333-339.

[8] Cosgrove DJ, Jarvis MC. Comparative structure and biomechanics of plant primary and secondary cell walls. *Front. Plant Sci.* 2012; **3**: 204.

[9] Cosgrove DJ. Catalysts of plant cell wall loosening. *F1000Research* 2016; **5**(F1000 Faculty Rev): 119. DOI: 10.12688/f1000research.7180.1.

[10] Cosgrove DJ. Plant Cell wall extensibility: connecting plant cell growth with cell wall structure, mechanics, and the action of wall modifying enzymes. *J Exp Bot.* 2016; **67**: 463-476.

[11] Da Silva EA, Toorop PE, Van Aelst AC, Hilhorst HW. Abscisic acid controls growth potential and endosperm cap weakening during coffee (*Coffea arabica* cv. Rubi) seed germination. *Planta* 2004; **220**: 251-261.

[12] Del Campillo E. Multiple endo-1,4-β-D-glucanase (cellulase) genes in *Arabidopsis*. *Curr Top Dev Biol.* 1999; **46**: 39-61.

[13] Endo A, Tatematsu K, Hanada K, Duermeyer L, Okamoto M, Yonekura-Sakakibara K, Saito K, Toyoda T, Kawakami N, Kamiya Y et all. Tissue-specific transcriptome analysis reveals cell wall metabolism, flavonol biosynthesis and defense responses are activated in the endosperm of germinating Arabidopsis thaliana seeds. *Plant Cell Physiol.* 2012; **53**: 16-27.

[14] Farias ET, De Silva EA, Toorop PE, Bewley JD, Hilhorst HWM. Expression studies in the embryo and in the micropylar endosperm of germinating coffee (*Coffea arabica* cv. Rubi) seeds. *Plant Growt. Regulat.* 2015; **75**: 575-581.

[15] Franková L, Fry SC. Biochemistry and physiological roles of enzymes that "cut and paste" plant cell-wall polysaccharides. *J. Exp. Bot.* 2013; **64**: 3519-3550.

[16] Gao Q, Zhao M, Li F, Guo Q, Xing S, Wang W. Expansins and coleoptile elongation in wheat. *Protoplasma* 2008; **233**: 73-81.

[17] Georgelis N, Nikolaidis N, Cosgrove DJ. Bacterial expansins and related proteins from the world of microbes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2015; **99**: 3807-3823.

[18] Ghiani A, Onelli E, Aina R, Cocucci M, Citterio S. A comparative study of melting and non-melting flesh peach cultivars reveals that during fruit ripening endo-polygalacturonase (endo-PG) is mainly involved in pericarp textural changes, not in firmness reduction. *J. Exp. Bot.* 2011; **62**: 4043-4054.

[19] Goh HH, Sloan J, Dorca-Fornell C, Fleming A. Inducible Repression of Multiple Expansin Genes Leads to Growth Suppression during Leaf Development. *Plant Physiol.* 2012; **159**: 1759-1770.

[20] González-Carranza ZH, Elliott KA, Roberts JA. Expression of polygalacturonases and evidence to support their role during cell separation processes in Arabidopsis thaliana. *J. Exp. Bot.* 2007; **58**: 3719-3730.

[21] Groot SPC, Kieliszewska-Rokicka B, Vermeer E, Karssen CM. Gibberellin-induced hydrolysis of endosperm cell walls in gibberellin-deficient tomato seeds prior to radicle protrusion. *Planta* 1988; **174**: 500-504.

[22] Guerriero G, Fugelstad J, Bulone V. What do we really know about cellulose biosynthesis in higher plants? *J. Integr. Plant Biol.* 2010; **52**: 161-175.

[23] Hara Y, Yokoyama R, Osakabe K, Toki S, Nishitani K. Function of xyloglucan endotransglucysylase/hydrolases in rice. *Ann Bot.* 2014; **114**: 1309-1318.

[24] Hayashi T, Kaida R. Functions of xyloglucan in plant cells. *Mol. Plant* 2011; **4**: 17-24.

[25] Hernández-Nistal J, Martín I, Labrador E, Dopico B. The immunolocation of XTH1 in embryonic axes during chickpea germination and seedling growth confirms its function in cell elongation and vascular differentiation. *J. Exp. Bot.* 2010; **61**: 4231-4238.

[26] Huang D, Wang C, Yuan J, Cao J, Lan H. Differentiation of the seed coat and composition of the mucilage of Lepidium perfoliatum L.: a desert annual with typical myxospermy. *Acta Biochim. Biophys. Sin.* 2015; **47**: 775-787.

[27] Hyodo H, Terao A, Furukawa J, Sakamoto N, Yurimoto H, Satoh S, Iwai H. Tissue Specific Localization of Pectin–Ca 2+ Cross-Linkages and Pectin Methyl-Esterification during Fruit Ripening in Tomato (*Solanum lycopersicum*). *PLOS ONE* 2013; **8**: e78949. DOI: 10.1371/journal.pone.0078949.

[28] Iglesias-Fernández R, Rodríguez-Gacio MC, Barrero-Sicilia C, Carbonero P, Matilla A. Three endo-β-mannanase genes expressed in the micropylar endosperm and in the radicle influence germination of *Arabidopsis* thaliana seeds. *Planta* 2011; **233**: 25-36.

[29] Iglesias-Fernández R, Del Carmen Rodríguez-Gacio M, Barrero-Sicilia C, Carbonero P, Matilla AJ. Molecular analysis of endo-β-mannanase genes upon seed imbibition suggest a cross-talk between radicle and micropylar endosperm during germination of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Signal. Behav.* 2011; **6**: 80-82.

[30] Iglesias-Fernández R, Barrero-Sicilia C, Carrillo-Barral N, Oñate-Sánchez L, Carbonero P. *Arabidopsis thaliana* bZIP44: a transcription factor affecting seed germination and expression of the mannanase-encoding gene *AtMAN7*. *Plant J. Cell Mol. Biol.* 2013; **74**: 767-780.

[31] Kanai M, Nishimura M, Hayashi M. A peroxisomal ABC transporter promotes seed germination by inducing pectin degradation under the control of ABI5. *Plant J. Cell Mol. Biol.* 2010; **62**: 936-947.

[32] Kim J, Shiu SH, Thoma S, Li WH, Patterson SE. Patterns of expansion and expression divergence in the plant polygalacturonase gene family. *Genome Biol*. 2006; **7**: R87. Doi: 10.1186/Gb-2006-7-9-R87.

[33] Lee KJD, Dekkers BJW, Steinbrecher T, Walsh CT, Bacic A, Bentsink L, Leubner-Metzger G, Knox JP. Distinct Cell Wall Architectures in Seed Endosperms in Representatives of the *Brassicaceae* and *Solanaceae*. *Plant Physiol.* 2012; **160**: 1551-1566.

[34] Levesque-Tremblay G, Pelloux J, Braybrook SA, Müller K. Tuning of pectin methylesterification: consequences for cell wall biomechanics and development. *Planta* 2015; **242**: 791-811.

[35] Li Y, Darley CP, Ongaro V, Fleming A, Schipper O, Baldauf SL, Mcqueen-Mason SJ. Plant Expansins Are a Complex Multigene Family with an Ancient Evolutionary Origin. *Plant Physiol.* 2002; **128**: 854-864.

[36] Li Y, Jones L, Mcqueen-Mason S. Expansins and cell growth. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2003; **6**: 603-610.

[37] Linkies A, Müller K, Morris K, Turecková V, Wenk M, Cadman CSC, Corbineau F, Strnad M, Lynn JR, Finch-Savage WE et all. Ethylene interacts with abscisic acid to regulate endosperm rupture during germination: a comparative approach using *Lepidium sativum* and *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 2009; **21**: 3803-3822.

[38] Ma N, Wang Y, Qiu S, Kang Z, Che S, Wang G, Huang J. Overexpression of OsEXPA8, a Root-Specific Gene, Improves Rice Growth and Root System Architecture by Facilitating Cell Extension. *PLoS ONE* 2013; **8**: e75997. DOI: 10.1371/journal.pone.0075997.

[39] Marín-Rodríguez MC, Orchard J, Seymour GB. Pectate lyases, cell wall degradation and fruit softening. *J. Exp. Bot.* 2002; **53**: 2115-2119.

[40] Maris A, Suslov D, Fry SC, Verbelen JP, Vissenberg K. Enzymic characterization of two recombinant xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase (XTH) proteins of *Arabidopsis* and their effect on root growth and cell wall extension. *J. Exp. Bot.* 2009; **60**: 3959-3972.

[41] Marowa P, Ding A, Kong Y. Expansins: roles in plant growth and potential applications in crop improvement. *Plant Cell Rep.* 2016; **35**: 949-965.

[42] Martínez-Andújar C, Pluskota WE, Bassel GW, Asahina M, Pupel P, Nguyen TT, Takeda-Kamiya N, Toubiana D, Bai B, Górecki RJ et all. Mechanisms of hormonal regulation of endosperm cap-specific gene expression in tomato seeds. *Plant J. Cell Mol. Biol.* 2012; **71**: 575-586.

[43] McCarthy TW, Der JP, Honaas LA, Depamphilis CW, Anderson CT. Phylogenetic analysis of pectin-related gene families in *Physcomitrella* patens and nine other plant species yields evolutionary insights into cell walls. *BMC Plant Biol.* 2014; **14**: 79. DOI: 10.1186/1471-2229-14-79.

[44] Miedes E, Suslov D, Vandenbussche F, Kenobi K, Ivakov A, Van Der Straeten D, Lorences EP, Mellerowicz EJ, Verbelen JP, Vissenberg K. Xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase (XTH) overexpression affects growth and cell wall mechanics in etiolated *Arabidopsis* hypocotyls. *J. Exp. Bot.* 2013; **64**: 2481-2497.

[45] Mollet JC, Leroux C, Dardelle F, Lehner A. Cell Wall Composition, Biosynthesis and Remodeling during Pollen Tube Growth. *Plants* 2013; **2**: 107-147.

[46] Morris K, Linkies A, Müller K, Oracz K, Wang X, Lynn JR, Leubner-Metzger G, Finch-Savage WE. Regulation of seed germination in the close *Arabidopsis* relative *Lepidium sativum*: a global tissue-specific transcript analysis. *Plant Physiol.* 2011; **155**: 1851-1870.

[47] Nakaune M, Hanada A, Yin YG, Matsukura C, Yamaguchi S, Ezura H. Molecular and physiological dissection of enhanced seed germination using short-term low-concentration salt seed priming in tomato. *Plant Physiol. Biochem. PPB Société Fr. Physiol. Végétale* 2012; **52**: 28-37.

[48] Oracz K, Voegele A, Tarkowská D, Jacquemoud D, Turečková V, Urbanová T, Strnad M, Sliwinska E, Leubner-Metzger G. Myrigalone A inhibits Lepidium sativum seed germination by interference with gibberellin metabolism and apoplastic superoxide production required for embryo extension growth and endosperm rupture. *Plant Cell Physiol.* 2012; **53**: 81-95.

[49] Oracz K. Rodnik hydroksylowy – mała cząsteczka o dużym znaczeniu. *Post. Biol. Kom.* 2015; **42**: 707-726.

[50] Oracz K, Karpiński S. Phytohormones signaling pathways and ROS involvement in seed germination. *Front. Plant Sci.* 2016; **7**: 864. DOI: 10.3389/fpls.2016.00864.

[51] Park YB, Cosgrove DJ. Changes in cell wall biomechanical properties in the xyloglucan-deficient xxt1/xxt2 mutant of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 2012; **158**: 465-475.

[52] Pelletier S, Van Orden J, Wolf S, Vissenberg K, Delacourt J, Ndong YA, Pelloux J, Bischoff V, Urbain A, Mouille G et all. A role for pectin de-methylesterification in a developmentally regulated growth acceleration in dark-grown *Arabidopsis* hypocotyls. *New Phytol.* 2010; **188**: 726-739.

[53] Penfield S, Li Y, Gilday AD, Graham S, Graham IA. Arabidopsis ABA INSENSITIVE4 Regulates Lipid Mobilization in the Embryo and Reveals Repression of Seed Germination by the Endosperm. *Plant Cell* 2006; **18**: 1887-1899.

[54] Pińkowska H, Złocińska A. Pektyny – występowanie, budowa chemiczna i właściwości. *Wiadomości chemiczne* 2014; **68**: 7-8.

[55] Sanchez RA, De Miguel L, Mercuri O. Phytochrome control of cellulase activity in *Datura ferox* L. seeds and its relationship with germination. *J Exp Bot* 1986; **37**: 1574-1580.

[56] Sandt VSTV, Suslov D, Verbelen JP, Vissenberg K. Xyloglucan Endotransglucosylase Activity Loosens a Plant Cell Wall. *Ann. Bot.* 2007; **100**: 1467-1473.

[57] Sasidharan R, Voesenek LA, Pierik R. Cell Wall Modifying Proteins Mediate Plant Acclimatization to Biotic and Abiotic Stresses. *Crit. Rev. Plant Sci.* 2011; **30**: 548-562.

[58] Scheler C, Weitbrecht K, Pearce SP, Hampstead A, Büttner-Mainik A, Lee KJD, Voegele A, Oracz K, Dekkers BJW, Wang X et all. Promotion of testa rupture during garden cress germination involves seed compartment-specific expression and activity of pectin methylesterases. *Plant Physiol.* 2015; **167**: 200-215.

[59] Scheller HV, Ulvskov P. Hemicelluloses. *Annu. Rev. Plant Biol.* 2010; **61**: 263-289.

[60] Stawska M, Oracz K. Sieć powiązań szlaków fitochromowych, kryptochromowych oraz indukowanych przez regulatory wzrostu i rozwoju w biologii nasion. *Post. Biol. Kom.* 2015; **42**: 687-706.

[61] Sun L, Van Nocker S. Analysis of promoter activity of members of the *PECTATE LYASE-LIKE* (*PLL*) gene family in cell separation in Arabidopsis. *BMC Plant Biol.* 2010; **10**: 152. **DOI:** 10.1186/1471-2229-10-152.

[62] Swain S, Kay P, Ogawa M. Preventing unwanted breakups: using polygalacturonases to regulate cell separation. *Plant Signal. Behav.* 2011; **6**: 93-97.

[63] Tabuchi A, Li Lc, Cosgrove DJ. Matrix solubilization and cell wall weakening by β-expansin (group-1 allergen) from maize pollen. *Plant J.* 2011; **68**: 546-559.

[64] Voegele A, Linkies A, Müller K, Leubner-Metzger G. Members of the gibberellin receptor gene family GID1 (GIBBERELLIN INSENSITIVE DWARF1) play distinct roles during *Lepidium sativum* and *Arabidopsis thaliana* seed germination. *J. Exp. Bot.* 2011; **62**: 5131-5147. DOI: 10.1093/jxb/err214.

[65] Voegele A, Graeber K, Oracz K, Tarkowská D, Jacquemoud D, Turečková V, Urbanová T, Strnad M, Leubner-Metzger G. Embryo growth, testa permeability, and endosperm weakening are major targets for the environmentally regulated inhibition of *Lepidium sativum* seed germination by myrigalone A. *J. Exp. Bot.* 2012; **63**: 5337-5350.

[66] Willige BC, Ghosh S, Nill C, Zourelidou M, Dohmann EM, Maier A, Schwechheimer C. The DELLA Domain of GA INSENSITIVE Mediates the Interaction with the GA INSENSITIVE DWARF1A Gibberellin Receptor of *Arabidopsis*. *Plant Cell* 2007; **19**: 1209-1220.

[67] Wolf S, Mouille G, Pelloux J. Homogalacturonan methyl-esterification and plant development. *Mol. Plant* 2009; **2**: 851-860.

[68] Wu AM, Rihouey C, Seveno M, Hörnblad E, Singh SK, Matsunaga T, Ishii T, Lerouge P, Marchant A. The *Arabidopsis* IRX10 and IRX10-LIKE glycosyltransferases are critical for glucuronoxylan biosynthesis during secondary cell wall formation. *Plant J. Cell Mol. Biol.* 2009; **57**: 718-731.

[69] Xiao C, Zhang T, Zheng Y, Cosgrove DJ, Anderson CT. Xyloglucan Deficiency Disrupts Microtubule Stability and Cellulose Biosynthesis in *Arabidopsis*, Altering Cell Growth and Morphogenesis. *Plant Physiol.* 2016; **170**: 234-249.

[70] Yan A, Minjie W, Limei Y, Rui H, Imran A, Yinbo G. *AtEXP2* is involved in seed germination and abiotic stress response in *Arabidopsis*. *PLOS One* 2014; **9**: e85208. DOI: 10.1371/journal.pone.0085208.

[71] Yang XY, Zeng ZH, Yan JY, Fan W, Bian HW, Zhu MY, Yang JL, Zheng SJ. Association of specific pectin methylesterases with Al-induced root elongation inhibition in rice. *Physiol. Plant.* 2013; **148**: 502-511.

[72] Zhang Q, Zhang X, Pettolino F, Zhou G, Li C. Changes in cell wall polysaccharide composition, gene transcription and alternative splicing in germinating barley embryos. *J. Plant Physiol.* 2016; **191**: 127-139.
[73] Zhang XQ, Wei PC, Xiong YM, Yang Y, Chen J, Wang XC. Overexpression of the *Arabidopsis* α-expansin gene AtEXPA1 accelerates stomatal opening by decreasing the volumetric elastic modulus. *Plant Cell Rep.* 2011; **30**: 27-36.
[74] Zhao Z, Liu H. Restoration of mature etiolated cucumber hypocotyl cell wall susceptibility to expansin by pretreatment with fungal pectinases and EGTA in vitro. *Plant Physiol.* 2008; **147**: 1874-1885.

Redaktor prowadzący – Janusz Maszewski

Otrzymano:20.09.2016
Przyjęto: 05.10.2016
Krystyna Oracz
Katedra Fizjologii Roślin
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie
ul. Nowoursynowska 159, 02-776, Warszawa, Polska
email: krystyna_oracz@sggw.pl
tel.: +48 22 593 25 33
fax: +48 22 593 25 21