

RODNIK HYDROKSYLOWY – MAŁA CZĄSTECZKA O DUŻYM ZNACZENIU W BIOLOGII KOMÓRKI ROŚLINNEJ

Hydroxyl radical – small molecule of a great importance in plant cell biology

Krystyna ORACZ

Katedra Fizjologii Roślin, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Streszczenie: Rodnik hydroksylowy (OH^\bullet) posiadający niesparowany elektron i charakteryzujący się bardzo krótkim okresem półtrwania (10^{-9} s) jest najbardziej reaktywną formą tlenu (*ang.* Reactive Oxygen Species, ROS), zdolną do wchodzenia w reakcje ze wszystkimi substancjami w komórce. Do niedawna uznawany był głównie za produkt uboczny metabolizmu tlenowego, wykazujący niezwykle szkodliwy wpływ na życie organizmów. Jednakże, coraz więcej nowych dowodów potwierdza istotną, pozytywną rolę OH^\bullet w prawidłowym funkcjonowaniu komórek roślinnych. Jego silne właściwości utleniające mają istotne znaczenie w regulacji kiełkowania, wzrostu, otwierania i zamykania aparatów szparkowych, reprodukcji, indukowania reakcji odporności, czy też aklimatyzacji do warunków stresowych. W apoplacie i we wnętrzu komórek OH^\bullet jest produkowany przez szereg peroksydaz, dysmutaz ponadtlenkowych i oksydaz NADPH, jak również może powstawać na drodze nieenzymatycznej. Poziom komórkowego OH^\bullet i jego działanie muszą być ściśle kontrolowane, zarówno w celu uniknięcia uszkodzeń komórek, jak i ze względu na zdolność dyfuzji tego rodnika. Niniejszy artykuł przedstawia najnowsze odkrycia dotyczące powstawania i mechanizmów działania OH^\bullet oraz szereg dowodów na to, że cząsteczka ta jest ważnym regulatorem wzrostu i rozwoju roślin.

Słowa kluczowe: kiełkowanie, reaktywne formy tlenu, rodnik hydroksylowy, stresy biotyczne i abiotyczne, transdukcja sygnału, wzrost elongacyjny

Summary: Hydroxyl radical (OH^\bullet) having an unpaired electron and a very short half-life (10^{-9} s) is the most reactive oxygen species (ROS), capable of entering into reactions with all cellular substances. Until now, it was regarded mainly as a co-product of oxygen metabolism, showing an extremely harmful effect on living organisms. However, more new evidences confirm its significant, positive role for the proper functioning of plant cells. Its strong oxidizing properties play an important role in the regulation of germination, growth, opening and closing of stomata, reproduction and

responses or acclimation to stress conditions. In the apoplast and inside cells OH^\bullet is produced by a variety of peroxidases, superoxide dismutases and NADPH oxidases, as well as may be formed in non-enzymatic reactions. The cellular level of OH^\bullet and its mode of action must be strictly controlled, both to avoid damages of cells and due to its diffusion ability. This particular article presents recent discoveries concerning sources and mechanisms of action of OH^\bullet and a range of new evidences indicating that this molecule is an important regulator of plant growth and development.

Key words: biotic and abiotic stresses, elongation growth, germination, hydroxyl radical, reactive oxygen species, signal transduction

WSTĘP

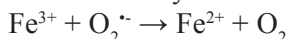
Tlen, powszechnie występujący na Ziemi pierwiastek, choć jest niezbędny do utrzymania funkcji życiowych, to paradoksalnie ze względu na wysoką reaktywność powstających z niego form może także wykazywać szkodliwy wpływ na życie komórek roślinnych. Wśród najważniejszych ROS wymienia się m.in.: anionorodnik nadadtlenkowy ($\text{O}_2^{\bullet-}$), nadtlenek wodoru (H_2O_2), rodnik hydroksylowy (OH^\bullet) oraz tlen singletowy ($^1\text{O}_2$). Przez wiele lat ROS uważane były głównie za cząsteczki o destrukcyjnym działaniu. Jednak od niedawna zwraca się uwagę na fakt, że ROS są także istotnymi regulatorami wzrostu i rozwoju roślin, odgrywającymi ważną rolę w adaptacji tych niemobilnych organizmów do zmieniających się i nieprzewidywalnych warunków środowiska [40, 53, 72]. W badaniach dotyczących metabolizmu tlenowego i stresu oksydacyjnego u roślin, spośród wszystkich ROS dużo uwagi poświęcono H_2O_2 i $\text{O}_2^{\bullet-}$, natomiast stosunkowo niewiele informacji można znaleźć na temat roli OH^\bullet . Inspirację do napisania niniejszego artykułu przeglądowego stanowiła niedawno opublikowana publikacja autorstwa Richards i współpracowników [53], w której omówiono wybrane dowody potwierdzające pozytywną rolę OH^\bullet . Coraz więcej dowodów wskazuje bowiem na to, że OH^\bullet uznany za najbardziej reaktywny z ROS i zdolny do oddziaływania z wszystkimi cząsteczkami znajdującymi się w jego bezpośrednim otoczeniu, odgrywa również istotną rolę w regulacji różnych procesów zachodzących w organizmach roślinnych. Dowiedziono, iż OH^\bullet jest jednym z kluczowych czynników regulujących homeostazę wapnia oraz pełni istotną funkcję w transdukcji sygnału indukowanego w warunkach stresowych. Ponadto wykazano, że OH^\bullet uczestniczy w regulacji reprodukcji, ustępowania spoczynku nasion, kiełkowania, wzrostu elongacyjnego, ruchów komórek aparatów szparkowych, jak również pełni ważną funkcję w indukcji programowanej śmierci komórki [9, 11, 30, 31, 49, 53, 60, 71, 74] (ryc. 1). W kolejnych rozdziałach tej publikacji są omówione nowe fakty dotyczące miejsc powstawania, sposobów detoksykacji i roli OH^\bullet w biologii komórki roślinnej.

POWSTAWANIE I DETOKSYKACJA OH[•] W KOMÓRCE ROŚLINNEJ

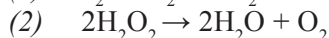
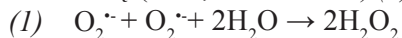
W komórkach roślinnych OH[•] jest wytwarzany głównie w takich organellach jak chloroplasty, mitochondria, peroksysomy, błona i ściana komórkowa (ryc. 1). Rodnik ten może być generowany w wyniku przemian enzymatycznych, jak i nieenzymatycznych. Wykazano, iż obecność jonów metali grup przejściowych (np.: żelaza, Fe²⁺; miedzi, Cu²⁺) sprzyja powstawaniu OH[•], tak jak to ma miejsce w reakcji Fentona, gdzie rodnik ten powstaje w wyniku katalizy H₂O₂:



W reakcji tej dochodzi do utlenienia jonu Fe²⁺ do Fe³⁺, który następnie w obecności O₂^{•-} może zostać ponownie zredukowany:



Znanych jest wiele mechanizmów utrzymujących homeostazę ROS w żywych komórkach, chroniących przed ich negatywnym działaniem, jak również umożliwiających sprawowanie pozytywnych funkcji przez te cząsteczki. Strategia obrony przed prekursorami OH[•], tj. O₂^{•-} i H₂O₂, obejmuje reakcję dysmutacji O₂^{•-} z udziałem dysmutazy ponadtlenkowej (SOD, EC 1.15.1.1) (1), a następnie hydrolizy powstałego H₂O₂ przez katalazę (CAT, EC 1.11.1.6) (2):

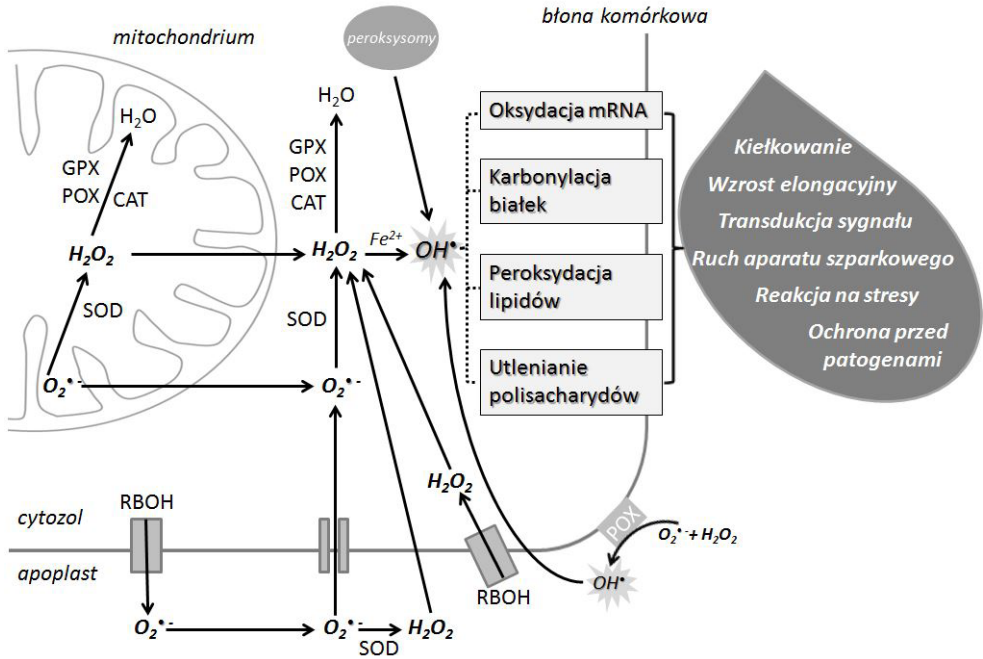


Natomiast w przypadku OH[•] dotychczas nie zidentyfikowano enzymów odpowiedzialnych za jego detoksykację. Przypuszcza się, iż rośliny wyewoluowały raczej w kierunku, aby przy pomocy różnych cząsteczkowych przeciwutleniaczy (np.: glutationu, kwasu askorbinowego, tokoferolu, karotenoidów i związków fenolowych) nie dopuszczać do wzrostu poziomu OH[•] oraz przeciwdziałać powstawaniu możliwych uszkodzeń powodowanych przez ten rodnik. Coraz więcej dowodów wskazuje na to, iż mechanizmem ochronnym przed negatywnym działaniem OH[•], jest gromadzenie proliny i poliamin w komórkach roślinnych [7, 63]. Najnowsze doniesienia naukowe sugerują także, że reakcje nieenzymatyczne węglowodanów z OH[•] mogą stanowić integralną część mechanizmów antyoksydacyjnych przyczyniających się do utrzymania homeostazy ROS w komórkach roślinnych [38]. Właściwości ochronne przed negatywnym działaniem OH[•] wykazują również alkohole cukrowe (tzw. cukrole) takie jak np.: sorbitol, mannitol, *myo*-inositol. Oprócz bezpośredniego uczestnictwa w detoksykacji OH[•], cukrole mogą być zaangażowane w ochronę struktur komórkowych i transdukcję sygnału indukowanego przez ten rodnik [7, 68].

U różnych gatunków roślin zidentyfikowano rodzinę genów kodujących peroksydazy (POX, EC 1.11.1.7) zawierające jony żelaza, które zlokalizowane w ścianie komórkowej mogą uczestniczyć nie tylko w katalizie H₂O₂, ale również w wytwarzaniu OH[•] [42]. Wykazano również, iż poszczególne POX mogą różnić

się swoimi właściwościami. Dowody wskazują na to, że OH^\bullet jest częściej wytwarzany przy udziale POX charakteryzujących się stałym, dynamicznym działaniem, niż przez enzymy o oscylacyjnie zmieniającej się aktywności, a niskie pH w apoplacie może dodatkowo zwiększać ich aktywność i tym samym produkcję OH^\bullet [53]. Z drugiej jednak strony, wysoki poziom OH^\bullet wynikający z zachwiania równowagi pomiędzy powstawaniem tego rodnika, a jego usuwaniem przez nieenzymatyczne antyoksydanty, może prowadzić do inaktywacji POX [17, 53]. U roślin, za wytwarzanie H_2O_2 , który następnie może być przekształcony w OH^\bullet są odpowiedzialne także apoplastyczne oksydazy poliaminowe (PAO, EC 1.5.3.3). Enzymy te uczestniczą w reakcji utleniania spermidyny w wyniku, której powstaje 1,3-diaminopropan i H_2O_2 i/lub alternatywnie putrescyna i H_2O_2 [73]. Z kolei, badania prowadzone na fragmentach ścian komórkowych wyizolowanych ze strąków grochu wykazały, iż jednym z produktów reakcji autooksydacji kwasu hydroksycynamonowego, będącego składnikiem tej organelli, może być $\text{O}_2^{\bullet-}$. Powstały $\text{O}_2^{\bullet-}$ może być następnie przekształcony w H_2O_2 przez związaną ze ścianą komórkową manganową SOD, a ten z kolei – służąc jako substrat dla enzymu POX – przyczynić się do powstawania OH^\bullet [29]. Udowodniono także, że zlokalizowana w ścianach komórkowych miedziowo-cynkowa SOD wykorzystująca jony Cu^{2+} jako katalizator, wytwarza OH^\bullet z H_2O_2 [2]. Co więcej, zgromadzone na terenie apoplastu jony Cu^+ sprzyjają wytwarzaniu OH^\bullet , w konsekwencji prowadząc między innymi do utlenienia lipidów i uszkodzeń błon komórkowych. Aby zapobiec szkodliwemu oddziaływaniu OH^\bullet z innymi cząsteczkami znajdującymi się w jego bezpośrednim otoczeniu istotne jest wiązanie jonów Cu^{2+} przez specyficzne białka ochronne, np. CCH (ang. *Cooper Chaperone Protein I*) [57].

Źródłem apoplastycznego OH^\bullet mogą również być enzymy zlokalizowane w błonie komórkowej [19] (ryc. 1). W niewielkim stopniu OH^\bullet może być wytwarzany poprzez związane z błoną POX. Jak wykazały badania przeprowadzone w warunkach *in vitro*, aktywność błonowych POX jest stosunkowo niska w porównaniu do ich odpowiedników zlokalizowanych w ścianie komórkowej. Zwrócono także uwagę na fakt, iż w błonach intensywnie rosnących części roślin, OH^\bullet raczej nie powstaje z udziałem błonowych POX, ale na drodze nieenzymatycznych przemian w obecności jonów metali grup przejściowych (np. w reakcji Fentona). Natomiast w innych, mniej aktywnych tkankach źródłem tego rodnika są także niewielkie ilości błonowych POX [19]. Zdecydowanie większą rolę w wytwarzaniu apoplastycznego OH^\bullet odgrywają NADPH oksydazy (ang. *Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Oxidase*) zlokalizowane w nierozpuszczalnych mikrodomenach błony komórkowej, tzw. „tratwach lipidowych” [19, 28] (ryc. 1). Roślinne NADPH oksydazy w części N-końcowej mają zbudowany z około 300 reszt aminokwasowych cytoplazmatyczny fragment, z dwoma motywami *EF-hand* wiążącymi Ca^{2+} , z którym mogą oddziaływać monomeryczne białka G z rodziny Rop oraz kinaza CDPK (ang. *Calcium-Dependent Protein Kinase*) fos-



RYCINA 1. Schemat przedstawia potencjalne źródła reaktywnych form tlenu (ROS) w komórce roślinnej, ze szczególnym uwzględnieniem rodnika hydroksylowego (OH^\bullet). W apoplacie i we wnętrzu komórek OH^\bullet jest produkowany przez szereg enzymów, takich jak peroksydazy (POX), dysmutazy ponadtlenkowe (SOD) i oksydazy NADPH (RBOH), jak również może powstawać na drodze nieenzymatycznej w obecności jonów metali (np. Fe^{2+}). Inne enzymy uczestniczące w metabolizmie ROS, np.: katalaza (CAT) i peroksydaza glutationowa (GPX) także są uwzględnione. Zaproponowano możliwe mechanizmy działania i funkcje OH^\bullet , który reagując ze składnikami komórkowymi, takimi jak mRNA, białka, lipidy i polisacharydy, powoduje ich modyfikacje wyzwalając tym samym kaskadę reakcji umożliwiających przebieg wielu procesów w roślinach i nasionach

FIGURE 1. The scheme shows potential sources of reactive oxygen species (ROS) in a plant cell with a particular focus on hydroxyl radical (OH^\bullet). In the apoplast and in the cytosol OH^\bullet is generated by several enzymes, such as peroxidases (POX), superoxide dismutases (SOD) and NADPH oxidases (RBOH), as well as in nonenzymatic reactions in the presence of metal ions (e.g. Fe^{2+}). The other enzymes involved in ROS metabolism, such as catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX) are also indicated. The possible mechanisms of action and functions of OH^\bullet are presented. It is suggested that OH^\bullet reacts with cellular components, such as mRNA, proteins, lipids and polysaccharides, causes their modifications, thus, triggering a cascade of reactions that allow the course of many processes in plants and seeds

forylująca położone w tym samym odcinku dwie reszty seryny [32]. Działanie NADPH oksydaz polega na utlenieniu NADPH (dinukleotyd nikotynoamidoadeeninowy), a następnie przeniesieniu elektronów na tlen wytwarzając w rezultacie O_2^\bullet . W czasie tej reakcji w komórkach obserwuje się tzw. „wybuch tlenowy”, charakteryzujący się dużym zużyciem tlenu [44]. Wykorzystanie tak ogromnej

ilości tlenu wiąże się bezpośrednio z pojawieniem $O_2^{\cdot-}$, który bardzo szybko jest dysmutowany do H_2O_2 . U *A. thaliana* zidentyfikowano 10 genów *RBOH* (ang. *Respiratory Burst Oxidase Homologue*) oznaczonych kolejno od *RBOHA* do *RBOHJ*, kodujące specyficzne NADPH oksydazy *RBOH* [32, 44]. Dotychczasowe analizy transkryptomyczne sugerują, iż wszystkie dziesięć genów *RBOH* może wykazywać swoiste profile ekspresji w specyficznych tkankach i organach, zmieniające się pod wpływem różnego rodzaju czynników [40, 72]. Lokalizacja białka *RBOH* w błonie komórkowej potencjalnie umożliwia kontrolę wytwarzania OH^{\cdot} w ściśle określonych miejscach, co ma kluczowe znaczenie dla regulacji wielu procesów zachodzących w komórkach. Zagadnienie to jest omówione w dalszej części tego artykułu.

Rozpatrując wewnątrzkomórkowe źródła OH^{\cdot} należy zwrócić uwagę na rolę organelli, takich jak chloroplasty, mitochondria i peroksosomy, które wytwarzając $O_2^{\cdot-}$ i H_2O_2 , pośrednio mogą przyczyniać się do wzrostu poziomu OH^{\cdot} we wnętrzu tych organelli oraz w cytozolu [55]. W chloroplastach OH^{\cdot} wytwarzany jest podczas fotolizy wody z wydzieleniem tlenu w fotosystemie II (PSII), a jony Mn^{2+} i Fe^{2+} pełnią funkcję katalizatorów w tym procesie. Wzmoczona produkcja OH^{\cdot} i jego prekursorów ma miejsce podczas stresu świetlnego i/lub termicznego, gdy reakcje fazy ciemnej są wolniejsze niż te zachodzące podczas fazy jasnej. W konsekwencji dochodzi do nadmiernej redukcji elementów łańcucha fotosyntetycznego, a wysoki poziom OH^{\cdot} we wnętrzu chloroplastów prowadzi do fotoinhibicji [50]. Natomiast w przypadku mitochondriów, głównym miejscem powstawania OH^{\cdot} i innych ROS jest łańcuch oddechowy, podczas którego ma miejsce transport elektronów z NADH na atom tlenu [25, 55]. Do wzmożonego „wycieku” elektronów z mitochondrialnego łańcucha oddechowego dochodzi w warunkach nadmiernej redukcji jego elementów. Z taką sytuacją mamy do czynienia, gdy w mitochondriach przy obecności substratu oddechowego, obserwuje się deficyt akceptora fosforanu ADP (adenozyno-5'-difosforan) oraz spadek aktywności oksydazy cytochromowej. Mitochondria roślinne, w odróżnieniu od zwierzęcych, charakteryzują się występowaniem alternatywnej drogi oddechowej, która katalizując przeniesienie elektronów z puli ubichinonu na tlen, z pominięciem drogi cytochromowej ogranicza powstawanie ROS [55]. Kolejnym źródłem wewnątrzkomórkowych ROS, w tym i OH^{\cdot} , są peroksosomy. Organelle te uczestniczą w licznych szlakach metabolicznych wytwarzają ROS jako produkt uboczny. Peroksosomalny proces β -oksydacji rozpoczyna się od wprowadzenia cząsteczki nasyconych kwasów tłuszczowych jako acyloCoA (acylokoenzym A) do peroksosomów za pomocą błonowego białka transportującego ALDP, należącego do nadrodziny białkowych transporterów błonowych ABC (ang. *ATP-Binding Cassette Transporters*), zawierających kasetę wiążącą ATP (adenozyno-5'-trifosforan). Uaktywniona cząsteczka kwasu tłuszczowego ulega następnie reakcjom procesu utleniania. Ostatnie wyniki badań przyczyniły się do zmiany oceny statusu peroksosomów jako autonomicznych organelli komórkowych. Wykazano, że

peroksysomy współpracując z mitochondriami i retikulum endoplazmatycznym, często są miejscem, w którym zachodzi jeden lub kilka etapów z wieloetapowych, metabolicznych procesów komórkowych [62]. W peroksysomach znajduje się kompleks antyoksydacyjnych enzymów (m.in.: CAT, SOD, POX), które kontrolują poziom ROS. Jednakże w sytuacjach zachwiania homeostazy ROS, może dojść do silnego utlenienia peroksysomów, przez co stają się one podatne na autofagiczną degradację [53].

Przedstawione tu przykłady różnych sposobów i miejsc powstawania OH^\bullet , podkreślają powszechność występowania tego rodnika w żywych komórkach roślinnych. Liczne argumenty na to, że OH^\bullet jest ważnym regulatorem wzrostu i rozwoju roślin są omówione w kolejnych częściach tej publikacji.

ROLA OH^\bullet I INNYCH ROS W BIOLOGII NASION

Znanych jest szereg czynników egzogennych (światło, temperatura, wilgotność) i endogennych (fitohormony, ROS), biorących udział w regulacji procesów zachodzących w nasionach. Kolejne wyniki badań dostarczają dowodów potwierdzających pozytywne działanie ROS, takich jak: OH^\bullet , $\text{O}_2^{\bullet-}$, H_2O_2 w biologii nasion. Cząsteczki te w sposób pośredni – inicjując kaskadę sygnałów komórkowych, lub bezpośredni – oddziałując ze specyficznymi składnikami komórkowymi, decydują m.in. o tym czy nastąpi przełamanie spoczynku, a nasiono wykiełkuje i rozwine się w zdrową roślinę [12, 43, 45, 48, 49] (ryc. 1). ROS powstają w sposób ciągły, a zmiany w ich metabolizmie towarzyszą wszelkim procesom zachodzącym w nasionach. Rozpoczęcie kiełkowania nasion jest możliwe w sytuacji, gdy apoplastyczny i wewnątrzkomórkowy poziom ROS osiągnie wartość optymalną dla tego procesu [3]. W przypadku nasion spoczynkowych charakteryzujących się niewystarczającym dla stymulacji kiełkowania poziomem ROS, egzogenna aplikacja związków będących ich źródłem i/lub wzmagających ich wytwarzanie (np.: parakwat, menadion, nadtlenuk wodoru) przełamuje spoczynek i pobudza kiełkowanie wielu gatunków nasion, takich jak np.: *Helianthus annuus*, *A. thaliana* i *Malus domestica* [6, 33, 45, 47, 48]. W specyficznych organach, jakimi są nasiona, ROS generowane są na drodze nieenzymatycznej oksydacji lipidów, przez łańcuch oddechowy znajdujący się w mitochondriach, ale także w peroksysomach i z udziałem błonowej oksydazy RBOH [3] (ryc. 1). Wykazano, iż imbibicja nasion w obecności DPI (jodonian dwufenylenowy), inhibitora RBOH zmniejsza wytwarzanie $\text{O}_2^{\bullet-}$ i hamuje kiełkowanie nasion *Hordeum vulgare* i *Helianthus annuus* [22, 48]. Badania na kiełkujących nasionach *Lepidium sativum* wykazały, iż znajdujący się w apoplaście OH^\bullet oddziałując bezpośrednio z polisacharydami (takimi jak np. pektyny i ksyloglukany), wchodzącymi w skład ściany komórkowej komórek korzonka zarodkowego i bielma modyfikuje jej strukturę, a w konsekwencji sprzyja

intensyfikacji wzrostu elongacyjnego i przebicium bielma przez wydłużającą się oś zarodkową [43, 49, 71] (ryc. 1). Sprzyjające kiełkowaniu modyfikacje struktury i właściwości ściany komórkowej w wyniku bezpośredniego oddziaływania OH^{\cdot} są narażone na zakłócenia wywołane obecnością metanolu powstającego w wyniku aktywności metyloesteraz pektynowych. W oparciu o uzyskane wyniki badań zaproponowano model, w którym mechanizm regulacji kiełkowania nasion *L. sativum* jest ściśle związany z czasowo-przestrzenną kontrolą zmian w poziomie esteryfikacji pektyny oraz wytwarzaniu OH^{\cdot} [49, 56]. Wykazano także, iż produkcja OH^{\cdot} i skorelowane z nią rozluźnianie bielma są hamowane przez podawany egzogenne kwas absycynowy (ABA), podczas gdy efekt ten jest odwracany po zastosowaniu gibereliny (GA) lub etylenu (ET), które w odróżnieniu do ABA promują powstawanie OH^{\cdot} . W regulacji wydłużania komórek podczas pęcznienia nasion uczestniczą także auksyny (IAA), które podobnie jak GA i ET dodatkowo przyczyniają się do produkcji apoplastycznych ROS. Dane te wskazują na to, że hormony roślinne pełnią ważną funkcję w kontroli produkcji apoplastycznego OH^{\cdot} i skorelowanymi z tym modyfikacjami ściany komórkowej w kiełkujących nasionach [15].

W dziedzinie badań nad mechanizmem działania ROS w biologii nasion przełomowe okazały się analizy na poziomie proteomicznym, które dowiodły, iż potranslacyjne modyfikacje białek, takie jak karbonylacja, mogą pełnić pozytywną rolę w regulacji wielu procesów zachodzących w nasionach [12, 45] (ryc. 1). Podczas karbonylacji białek, w wyniku oddziaływań ROS (np. OH^{\cdot}) lub produktów ubocznych reakcji utleniania lipidów, aminokwasów lub węglowodanów z resztami aminokwasów, takimi jak: lizyna, prolina, treonina czy arginina, dochodzi do utworzenia grupy karbonylowej (ketonowej lub aldehydowej) [12]. W wyniku utlenienia białka może dojść do zmiany jego konformacji, co z kolei wpływa na jego funkcję. Tego rodzaju potranslacyjna modyfikacja jest nieodwracalna, a utlenione białko staje się bardziej podatne na proteosomalną degradację. W badaniach nad regulacją ustępowania spoczynku i kiełkowania nasion *H. annuus* dowiedziono, że zwiększanie poziomu karbonylacji białek, takich jak: EF2 (ang. *Elongation Factor 2*), PPK (ang. *Pyruvate Orthophosphate Dikinase*) i globulina 7S skorelowane jest z postępującym procesem dojrzewania posprzętowego [45]. Autorzy zaproponowali, że karbonylacja EF2 podczas przechowywania suchych nasion może zakończyć syntezę tych białek, które są ściśle związane z procesami rozwojowymi. Ponieważ uznaje się, że białko PPK zaangażowane jest bardziej w rozwój nasion niż procesy kiełkowania, jego karbonylowanie podczas dojrzewania posprzętowego może obniżać pozostałą aktywność tego enzymu [45]. Karbonylacja białek zapasowych ma miejsce także w kiełkujących nasionach *Pisum sativum*, co może sugerować, że proces ten sprzyja mobilizacji tego rodzaju materiałów zapasowych podczas imbibicji i umożliwia szybszą ich degradację i wykorzystanie jako źródeł energetycznych niezbędnych dla kiełkującego nasienia i rozwijającej się siewki [4]. Ponadto, mając na uwadze względnie dużą ilość białek zapasowych występujących w na-

sionach można również uznać, iż ich karbonylacja stanowi doskonały mechanizm obronny komórek przed ROS intensywnie powstającymi np. podczas kiełkowania.

Rodniki tlenowe takie jak OH^\bullet mogą bezpośrednio oddziaływać także z guaniną będącą składnikiem kwasów nukleinowych, co prowadzi do powstawania zmodyfikowanej zasady zwanej 8-hydroksyguanozyną (8-OHG) [12] (ryc. 1). Ostatnie doniesienia wskazują na to, że selektywne utlenianie mRNA zmagazynowanego w suchych nasionach *H. annuus* jest związane z ustępowaniem spoczynku podczas posprzętnego dojrzewania [5]. Zmodyfikowane w ten sposób mRNA nie może być wykorzystane w procesie translacji, co w konsekwencji przyczynia się do obniżenia syntezy określonych rodzajów białek podczas imbibicji nasion. Co ciekawe, selektywnemu utlenianiu podlegają transkrypty genów zaangażowanych w reakcję na stres oksydacyjny oraz w sygnalizację komórkową, jak np. fosfataza 2C PPH1. W związku z tym postuluje się, iż mechanizm ten jest rodzajem modulowania transdukcji sygnału indukowanego przez ROS, uczestniczącym w ustępowaniu spoczynku i stymulacji kiełkowania [5, 12] (ryc. 1).

Modulowanie poziomu ROS jest niezbędne dla właściwego przebiegu dojrzewania nasion, przełamывania spoczynku, czy też stymulacji kiełkowania, gdyż występowanie tych cząsteczek w nadmiarze może przyspieszać starzenie się tych organów, obniżać ich wigor i żywotność. Wyniki badań wskazują na to, że warunki stresowe mogą hamować kiełkowanie właśnie poprzez nadprodukcję ROS [46]. Z drugiej jednak strony istnieją także dowody na to, iż starzejące się nasiona, o niskim wigorze charakteryzują się ograniczoną zdolnością do generowania O_2^\bullet podczas kiełkowania [27]. Przedstawione tu przykłady dobrze wkomponują się w koncepcję tzw. „okna oksydacyjnego”, w którym odpowiedni poziom ROS jest niezbędny do stymulacji procesów zachodzących w nasionach, jednak nadmiar ROS prowadzi do powstawania uszkodzeń, a w skrajnych przypadkach do śmierci nasion [3].

REGULACJA WZROSTU ELONGACYJNEGO Z UDZIAŁEM OH^\bullet I JEGO PREKURSÓRÓW

Intensywny wzrost elongacyjny determinuje kształt i rozmiar roślin, jak również decyduje o wielu ich innych cechach. W poprzednim rozdziale omówiona została m.in. rola OH^\bullet w rozluźnianiu struktury bielma, ułatwiającego jego przebicie przez zwiększający rozmiary korzonek zarodkowy podczas kiełkowania. O tym, czy nasiono wykiełkuje, decydują różnego rodzaju oddziaływania pomiędzy warstwami okrywającymi zarodek (bielmo, okrywa nasienna) a wydłużającym się elongacyjnie korzonkiem zarodkowym. Ze względu na fakt, iż podczas kiełkowania nie następują podziały komórkowe, to zwiększanie się rozmiarów pęczniejącego zarodka jest w głównej mierze wynikiem aktywnego wzrostu wydłużeniowego. Ten rodzaj

wzrostu towarzyszy roślinie w trakcie całego cyklu życiowego, a rola ROS jest niezwykle ważna dla przebiegu tego procesu. Wykazano, że wytwarzane w apopląście $O_2^{\cdot-}$ i OH^{\cdot} uczestniczą w regulacji wzrostu elongacyjnego korzonka zarodkowego kiełkujących nasion *Lepidium sativum* i *Lactuca sativa* [49, 71, 75]. Intensywne wytwarzanie $O_2^{\cdot-}$ w apopląście przez RBOH, POX i na drodze lipoksygenazy jest skorelowane także z wydłużaniem komórek korzenia podczas kiełkowania i w fazie rozwoju siewek *P. sativum* [27]. W ciemności wzrost elongacyjny komórek rozwijającej się etiolowanej siewki *A. thaliana* tylko początkowo dominuje w strefie korzeniowej, po czym zaczyna przeważać w części hypokotylowej. Tego rodzaju zjawiska nie obserwuje się natomiast w obecności światła. Udowodniono także, że siewki *A. thaliana* rozwijające się w ciemności, w obecności glutationu i dithiothreitolu wykazują specyficzne zmiany w morfologii. Zastosowanie wyższych stężeń w/w przeciwutleniaczy skutkowało odpowiednio większym zahamowaniem wzrostu hypokotyli. Na podstawie uzyskanych wyników zaproponowano, iż mechanizm regulacji wzrostu elongacyjnego przez światło ma związek z wpływem szlaków sygnałowych indukowanych przez ATP oraz tlenek azotu na dystrybucję i wytwarzanie $O_2^{\cdot-}$ przez NADPH oksydazę [65]. Inne doniesienia naukowe sugerują, iż elongacja zarodków kiełkujących nasion *L. sativum* może być zakłócona przez substancje allelopatyczne, jak np. MyA (ang. *Myrigalone A*). Wykazano, iż związek ten wykazuje właściwości antyoksydacyjne i hamuje kiełkowanie nasion *L. sativum* poprzez obniżenie poziomu oraz perturbacje w dystrybucji $O_2^{\cdot-}$ i OH^{\cdot} , wymaganych do stymulacji wzrostu elongacyjnego zarodka i przebiccia bielma przez wydłużającą się korzonek zarodkowy. Co więcej, negatywny efekt MyA spotęgowany był bardziej w ciemności niż na świetle [45, 71].

W badaniach *in vitro* i *in vivo* wykazano, iż wytwarzanie OH^{\cdot} w obecności jonów Cu^+ i/lub Fe^{2+} , kwasu askorbinowego i H_2O_2 może pozytywnie wpływać na rozluźnianie struktury ściany komórkowej i zwiększanie rozmiarów komórek, a niskie pH w apopląście dodatkowo sprzyja temu procesowi [53]. Uważa się, iż nie tylko poziom, ale także i lokalizacja askorbinianu w apopląście odgrywają kluczową rolę w regulacji wzrostu wydłużeniowego. Ten cząsteczkowy przeciwutleniacz może detoksykować OH^{\cdot} wytwarzany w ścianie komórkowej, przy czym w aktywnie rosnących organach roślin obserwuje się jego niski poziom [70]. Sugeruje się również, że indukowany przez IAA wzrost poziomu OH^{\cdot} może być zaangażowany w modyfikacje ściany komórkowej, prowadzące – w zależności od stężenia IAA – do jej wydłużenia, usztywnienia i drewnienia. Udowodniono, iż wzrost poziomu OH^{\cdot} indukowanego przez IAA w wydłużających się koleoptylach *Zea mays* może być hamowany przez aplikowane egzogenne cząsteczkowe „zmiatacze” ROS. Co więcej, wykazano, iż aktywnie rosnące strefy korzeni *Z. mays* i *H. vulgare* produkują więcej zewnątrzkomórkowego OH^{\cdot} niż dojrzałe regiony. Natomiast zahamowanie wydłużania korzenia *P. sativum* przez odpowiednie stężenie IAA skorelowane jest ze wzrostem poziomu OH^{\cdot} [53, 64].

W innych pracach zademonstrowano, iż pojawienie się $O_2^{\cdot-}$ częściej obserwuje się wzdłuż strefy wydłużeniowej korzenia, podczas gdy obecność H_2O_2 stwierdza się głównie w strefie różnicowania i włosników korzeniowych. Badania z wykorzystaniem mutanta *upbeat1 (upb1) A. thaliana* dostarczyły dowodów na to, iż wzrost stężenia $O_2^{\cdot-}$ przy jednocześnie obniżonym poziomie H_2O_2 w wierzchołku korzenia stymuluje wzrost elongacyjny merystemu, jak i innych komórek korzenia [23]. Nadal jednak nie jest jasne, czy indukowane przez IAA zmiany poziomu $O_2^{\cdot-}$ i H_2O_2 przyczyniają się do zwiększenia wytwarzania OH^{\cdot} .

Z obserwacji wynika również, że stymulacja aktywności błonowej H^+ ATP-azy sprzyja zwiększaniu poziomu OH^{\cdot} w rosnących korzeniach *Z. mays*. Wyrzut protonów przez H^+ ATP-azę zakwaszając apoplast, w obecności jonów Cu^+ i/lub Fe^{2+} sprzyja powstawaniu OH^{\cdot} [34]. Wzrost ilości apoplastowego H^+ może również prowadzić do hyperpolaryzacji błony komórkowej i stymulacji wytwarzania elektronów, a co za tym idzie także produkcję pozakomórkowego $O_2^{\cdot-}$ przez oksydazę RBOH [41]. W wyniku aktywności H^+ ATP-azy asymetrycznie rozmieszczone H^+ generują gradient elektrochemiczny, który jest wykorzystywany w komórce w podstawowych procesach fizjologicznych, takich jak regulacja wewnątrzkomórkowego pH, ruchy komórek aparatów szparkowych, czy też wzrost elongacyjny [76].

Zaobserwowano również, że kanały formowane przez aneksyny (ANN1) aktywowane przez zewnątrzkomórkowy OH^{\cdot} (powstający w obecności Cu^+ , askorbinianu i H_2O_2), mogą uczestniczyć w regulacji napływu jonów Ca^{2+} i K^+ [31]. Kanały te są zlokalizowane w błonach komórkowych wierzchołków włosników korzeniowych oraz komórek głównych epidermy korzenia i wykazują większą aktywność w rejonach aktywnie wydłużających się komórek. Mutanty *ann1 A. thaliana* charakteryzują się brakiem zdolności błonowego przewodnictwa Ca^{2+} i K^+ w komórkach włosników korzeniowych oraz komórek głównych epidermy korzenia w odpowiedzi na sygnał indukowany przez OH^{\cdot} . W konsekwencji wzrost korzenia i włosników w mutantach *ann1* jest silnie zahamowany [31]. Kanały jonowe o zbliżonej do ANN1 strukturze i funkcjach zostały zidentyfikowane także w błonie komórek epidermy korzeni *P. sativum* i *H. vulgare*. Wykazano, że ich aktywność może być stymulowana poprzez przyłączenie poliamin, w wyniku czego następuje uwrażliwienie kanału na obecność OH^{\cdot} [69, 74].

Rodnik OH^{\cdot} pełni istotną rolę w procesie wytwarzania pylników kwiatowych i ziaren pyłku oraz wzrostu łagiewki pyłkowej. Choć źródła i miejsce oddziaływania OH^{\cdot} w gametoficie męskim nie są jeszcze poznane to istnieją dowody na to, że bogate w cysteinę białko MT-1-4b, zdolne do wiązania jonów metali jest kluczowym regulatorem wytwarzania OH^{\cdot} podczas rozwoju męskich narządów generatywnych. Wykazano bowiem, że w przypadku braku tego białka wykształcane są pylniki i pyłek o nieprawidłowej strukturze [21]. Ostatnio zaproponowano również, iż OH^{\cdot} i H_2O_2 mogą pełnić przeciwstawne role w regulacji kiełkowania ziaren pyłku tytoniu [60]. Zademonstrowano, że podczas gdy OH^{\cdot} w wyniku bezpośrednio

go oddziaływania z polisacharydami przyczynia się do rozluźnienia wewnętrznej ściany komórkowej kiełkujących ziaren pyłku, przez którą przedziera się rozwijająca łagiewka, to H_2O_2 wzmacnia i usztywnia pozostałą część ściany. Podobnie jak w przypadku elongacyjnego wzrostu włósników, tak i w przypadku wydłużania łagiewki pyłkowej ważną rolę odgrywają również $O_2^{\cdot -}$ wytwarzane przez białko RBOH oraz H_2O_2 generowany z udziałem enzymu PAO [51, 73]. Nadal jednak rola zewnątrzkomórkowego OH^{\cdot} w procesie wydłużania łagiewki pyłkowej nie jest dobrze poznana. Wiadomo tylko, że w momencie gdy łagiewka dotrze do wejścia żeńskiego gametofitu, OH^{\cdot} zaczyna być dominującym ROS wytwarzanym przez żeński gametofit, co zapewne umożliwi rozluźnienie ściany komórkowej łagiewki i jej pęknięcie prowadzące do zapłodnienia. Proces ten zależy także od obecności jonów Ca^{2+} i aktywowanych przez OH^{\cdot} błonowych kanałów wapniowych, jednak mechanizm działania nie jest jeszcze scharakteryzowany [11].

Zaprezentowane w/w przykłady stanowią niezbite dowody na to, że OH^{\cdot} oraz jego prekursorzy pełnią pozytywną rolę w modulowaniu wzrostu elongacyjnego (ryc. 1), a ich funkcja nie zawsze związana jest z niszczycielskim w skutkach działaniem.

ZNACZENIE OH^{\cdot} I INNYCH ROS W REAKCJI ROŚLINY NA STRESY

W życiu niemobilnych organizmów, jakimi są rośliny, szybka reakcja na zmieniające się warunki środowiska, a w szczególności w sytuacji zagrożenia wywołanego przez biotyczne i/lub abiotyczne czynniki stresowe, może decydować o ich przetrwaniu. ROS odgrywają niewątpliwie ważną rolę w transdukcji sygnału komórkowego inicjującego kaskadę reakcji w odpowiedzi na docierające bodźce. Komórki roślinne mogą rejestrować zmiany dotyczące miejsca, ilości, rodzaju i szybkości wytwarzania ROS w celu indukcji specyficznej odpowiedzi [10]. Nadal jednak nie są zidentyfikowane typowe receptory ROS. Postuluje się, że nie tylko stosunek ilości poszczególnych form ROS, ale i czasowo-przestrzenna dynamika metabolizmu konkretnego ROS decyduje o tym, czy i jakie reakcje obronne zostaną zainicjowane w roślinie w odpowiedzi na niekorzystne warunki środowiskowe [54]. W pierwszych etapach reakcji na działanie szkodliwego czynnika, ROS – jako cząsteczki sygnałowe – indukują kaskadę zdarzeń mającą na celu ochronę organizmu. Natomiast pod wpływem długotrwałego, nasilającego się stresu, gdy zostaje zachwiana homeostaza ROS, dojść może do uszkodzenia komórek, a nawet ich śmierci [46]. W przypadku OH^{\cdot} istnieją dowody na to, iż w reakcji rośliny na stresy może on pełnić także pozytywną rolę i występować w roli przekaźnika sygnału komórkowego, a nie jak dotychczas sądzono, że jest on tylko jednym z głównych sprawców uszkodzeń komórkowych. Rośliny są nieustannie narażone na oddziaływanie w tym samym czasie różnych stresów biotycznych i abiotycznych. Postuluje

się, iż OH[•] indukowany podczas jednego rodzaju stresu może jednocześnie modyfikować odpowiedzi komórkowe indukowane w wyniku oddziałującego innego typu czynnika stresogennego. Jednakże odpowiedź na pytanie, czy tego rodzaju interakcja wywołuje efekt pozytywny czy negatywny, powinna uwzględniać zawsze konkretny problem badawczy [10]. Analizując oddziaływania biotyczne wykazano, iż korzenie roślin *Z. mays*, *P. sativum* i *Raphanus sativus* narażone na działanie związków allelopatycznych, takich jak: kwas ferulowy i p-kumarowy wytwarzają zwiększone ilości OH[•] [13]. Podobnie, w wyniku ataku grzybowych patogenów, takich jak *Rhizoctonia solani*, *Aspergillus*, *Alternaria* i/lub pod wpływem działania ich elicytorów również obserwuje się wzrost poziomu OH[•] w komórkach roślinnych [8, 36, 59]. Znalaziono dowody na to, że OH[•] mogą negatywnie regulować reakcję nadwrażliwości HR (ang. *Hypersensitive Response*) u *Nicotiana tabacum* wywołanej atakiem bakterii *Xanthomonas* spp. i obecnością jej toksyn. Indukowana za pośrednictwem OH[•] programowana śmierć komórki jest charakterystyczna również dla ataku grzybów nekrotroficznych. Wykazano, że nekrozy indukowane podczas HR w odpowiedzi na zakażenie *Botrytis* mogą być zmniejszone poprzez chelatację jonów żelaza, co sugeruje, że OH[•] pełni w tym procesie funkcję sygnałową [14].

Oddziaływaniu czynników stresowych często towarzyszy wzrost poziomu poliamin, które mają za zadanie chronić komórki przed stresem oksydacyjnym. Paradoksalnie, ich katabolizm z udziałem oksydazy aminowej AOX stanowi źródło H₂O₂ i innych ROS (w tym także OH[•]). Istnieją dowody, iż sygnał indukowany przez produkty pośrednie rozkładu poliamin (H₂O₂, OH[•]), aktywując kanały jonowe K⁺, uczestniczy w regulacji rozwoju rośliny, programowanej śmierci komórkowej, a także odpowiedziach obronnych, generowanych na skutek oddziaływania stresów biotycznych i abiotycznych. Wykazano, że zarówno OH[•] jak i poliaminy mogą aktywować Ca²⁺-ATPazę, zaburzać przepływ H⁺ oraz transdukcję sygnału indukowanego przez jony Ca²⁺. Co więcej, tego rodzaju efekt częściej występuje u odmian wrażliwych na stres solny niż u odpornych [52].

W większości przypadków brak lub zmniejszona ekspresja *RBOH* skorelowana jest z obniżeniem poziomu produkcji ROS, wynikającym ze zmian reakcji roślin w zakresie śmierci komórkowej i odporności na patogeny [37]. Badania na mutantach genów kodujących poszczególne białka *RBOH* (u *A. thaliana* geny od *RBOHA* do *RBOHJ*) wykazały, że u każdego z mutantów *rboh* *A. thaliana* określony rodzaj patogenu może wywołać różne reakcje. Wyniki te potwierdzają złożoność i specyficzność mechanizmów kontrolujących zależną od aktywności NADPH oksydazy odpowiedź komórkową, w trakcie oddziaływań patogenów na organizm roślinny. Stanowią też istotny argument przemawiający za tym, że ROS generowane przez ten enzym nie działają tylko jako toksyczne związki prowadzące do śmierci komórki, ale są również ważnym elementem systemu obronnego żywych organizmów [37, 66].

Zmiany w poziomie OH[•] towarzyszą także podczas oddziaływania stresowych czynników abiotycznych na roślinę. Wywołane nagłą ekspozycją na światło

więdnienie roślin *P. sativum* pierwotnie uprawianych w ciemności, skorelowane jest z wytwarzaniem dużych ilości OH[•] w epikotylach [20]. Sugeruje się, że OH[•] może negatywnie regulować przepływ wody w tkankach roślinnych. Jak wykazano u zielonych glonów z rodzaju *Chara*, wytwarzany OH[•] powodował zamykanie wodnych kanałów (akwaporyn) i zmniejszenie przepływu wody podczas ekspozycji na światło o wysokim natężeniu, a efekt ten był podobny do tego indukowanego przez metale przejściowe uczestniczące w reakcji Fentona w liściach *Z. mays* [26]. Tę pozorną sprzeczność można wyjaśnić tym, iż tkanki etiolowane mając słabiej rozwinięty system antyoksydacyjny są bardziej wrażliwe na negatywne działanie ROS, a utrata wody może być wynikiem powodowanych przez ROS uszkodzeń błon komórkowych. Wiadomo również, iż UV może stymulować wytwarzanie apoplastycznego OH[•], powodującego tymczasowe zmiany kształtu peroksyosomów, które w postaci wydłużonych, spłaszczonych kanalików układają się w jednej linii wraz z pęcherzykami retikulum endoplazmatycznego wokół chloroplastów [39]. Tego rodzaju modyfikacja kształtu peroksyosomów poprzedza etap ich rozszczepiania, prowadząc do zwiększenia populacji peroksyosomów i stanowiąc tym samym dodatkowy mechanizm zabezpieczający przed stresem oksydacyjnym [58].

Ekspozycja roślin na gazowy ozon (O₃) także zwiększa wytwarzanie ROS (w tym OH[•]) w apoplaście wokół komórek przysparkowych [24]. Ozon wnika przez aparaty szparkowe inicjuje szkodliwy stres oksydacyjny, który może przypominać sytuację, jaka ma miejsce podczas ataku patogenów, chociażby ze względu na fakt, że uczestniczy w nim także RBOH [67]. Wytwarzane ROS regulują ruch komórek aparatów szparkowych, a u *A. thaliana* ma to związek z występującymi w ich błonie selektywnie działającymi kanałami K⁺ (ang. *Guard Cell Outwardly Rectifying K⁺*, GORK) [67]. Wykazano, że podobne do tego rodzaju kanały jonowe występujące w komórkach korzeni są aktywowane przez zewnątrzkomórkowy OH[•] [9]. Mechanizm ten nie został jeszcze potwierdzony *in vivo* w przypadku kanałów występujących w błonie komórek aparatu szparkowego. Niemniej jednak, niski poziom egzogenego OH[•] wygenerowanego w obecności jonów metali przejściowych reakcji Fentona promuje otwieranie aparatów szparkowych, podczas gdy wysoki poziom OH[•] stymuluje ich zamykanie [18]. Warunki glebo-we mogą mieć istotny wpływ na wytwarzanie OH[•] w komórkach korzeni roślinnych. Susza zwiększa dostępność jonów Fe²⁺ i Cu²⁺, co może powodować wzrost wytwarzania OH[•] w reakcji Fentona. Z kolei, niedobór azotu może stymulować powstawanie OH[•], prowadząc w konsekwencji do peroksydacji lipidów i starzenia się *Triticum aestivum* [61]. Pobieranie metali ciężkich przez rośliny również powoduje wytwarzanie zwiększonych ilości OH[•]. Aluminium może indukować stres oksydacyjny, poprzez aktywację związanych ze ścianą komórkową POX [1]. Obecność manganu (Mn) może wyrządzić poważne szkody przez jego zdolność do katalizowania OH[•], chociaż jak to wykazano w przypadku *Cucumis sativus*

jego negatywne w skutkach działanie może być złagodzone obecnością krzemu, który zmniejsza aktywność POX i poziom Mn [35]. Także kadm (Cd) powoduje wzrost wytwarzania H_2O_2 w korzeniach *C. sativus*, *Glycine max* i *H. vulgare*, hamuje produkcję OH^\bullet , a efekt ten może być łagodzony przez obecność jonów Ca^{2+} [64]. Częściowo wynika to z hamującego wpływu Cd na ekspresję *RBOH*, jak i na aktywność białka kodowanego przez ten gen [16]. Ponadto wykazano, iż stres solny promuje powstawanie OH^\bullet w korzeniach *A. thaliana* [9]. Reakcja ta zależy od aktywności *RBOH* oraz pełni rolę sygnałową, aktywując napływ Ca^{2+} do apoplastu poprzez ANN1-zależny transport, do czasu wywołania odpowiednich reakcji adaptacyjnych [30]. Może to również prowadzić do indukcji programowanej śmierci komórki, na skutek utraty jonów K^+ we wnętrzu komórki, wypompowywanych przez aktywowane OH^\bullet kanały GORK [9]. Stres solny również powoduje akumulację zewnątrzkomórkowych poliamin, co może nasilać wytwarzanie OH^\bullet i w konsekwencji utratę K^+ w komórkach korzeniowych.

Opisane tu wybrane przykłady dowodzą, iż OH^\bullet i inne ROS są istotnymi cząsteczkami sygnałowymi zaangażowanymi w indukcję i transdukcję sygnału komórkowego podczas reakcji odpornościowych, odpowiedzi na warunki stresowe oraz programowanej śmierci komórki.

PODSUMOWANIE I PRZYSZŁE PERSPEKTYWY

Dotychczasowe badania pozwoliły lepiej zrozumieć znaczenie i mechanizmy działania ROS. Chociaż wiadomo, że OH^\bullet modyfikuje składniki komórkowe, takie jak kwasy nukleinowe, białka, lipidy, polisacharydy i pełni ważną funkcję sygnałową, to nadal nie są znane szczegóły dotyczące jego mechanizmu działania. Bez odpowiedzi nadal pozostają liczne pytania np.: jakie są kluczowe elementy szlaku sygnałowego OH^\bullet i ekspresja których genów jest modyfikowana w odpowiedzi na sygnał wzbudzany przez ten rodnik? Czy sygnał indukowany przez OH^\bullet wchodzi w interakcje ze szlakami sygnałowymi światła, hormonów roślinnych i innych cząsteczek sygnałowych oraz jaki jest mechanizm tych oddziaływań? Te i inne zagadnienia będą ciekawym tematem badań realizowanych w najbliższej przyszłości, a nowe wyniki dostarczą kolejnych argumentów na to, że OH^\bullet paradoksalnie uznany za najszkodliwszy z ROS, jest także ważnym regulatorem wzrostu i rozwoju roślin.

PODZIĘKOWANIA

Praca finansowana ze środków grantu *SONATA2 Narodowego Centrum Nauki* (nr UMO-2011/03/D/NZ9/04059)

LITERATURA

- [1] ACHARY VMM, PARINANDI NL, PANDA BB. Aluminum induces oxidative burst, cell wall NADH peroxidase activity, and DNA damage in root cells of *Allium cepa* L. *Environ Mol Mutagen* 2012; **53**: 550-560.
- [2] AHMAD P, PRASAD MNV. Abiotic stress responses in plants: metabolism, productivity and sustainability. Ed: Ahmad P, Prasad MNV. 2011; Springer.
- [3] BAILLY C, EL-MAROUF-BOUTEAU H, ORACZ K. From intracellular signaling networks to cell death: the dual role of reactive oxygen species in seed physiology. *C R Biol* 2008; **331**: 806-814.
- [4] BARBARA-ESPÍN G, DIAZ-VIVANCOS P, JOB D, BELGHAZI M, JOB C, HERNÁNDEZ JA. Understanding the role of H₂O₂ during pea seed germination: a combined proteomic and hormone profiling approach. *Plant Cell Environ* 2011; **34**: 1907-1919.
- [5] BAZIN J, LANGLADE N, VINCOURT P, ARRIBAT S, BALZERGUE S, EL-MAAROUF-BOUTEAU H, BAILLY C. Targeted mRNA oxidation regulates sunflower seed dormancy alleviation during dry after-ripening. *Plant Cell* 2011; **23**: 2196-2208.
- [6] BOGATEK R, GAWROŃSKA H, ORACZ K. Involvement of oxidative stress and ABA in CN-mediated elimination of embryonic dormancy in apple. W Nicolas G; Bradford KJ; Côme D; Pritchard HW (Ed) *The biology of seeds: Recent research advances*. Wallingford, CABI Publishing. 2003; pp. 211-216.
- [7] BOSE J, RODRIGO-MORENO A, SHABALA S. ROS homeostasis in halophytes in the context of salinity stress tolerance. *J Exp Bot* 2014; **65**: 1241-1257.
- [8] CHEN S, YIN C, QIANG S, ZHOU FY, DAI X. Chloroplastic oxidative burst induced by tenuazonic acid, a natural photosynthesis inhibitor, triggers cell necrosis in *Eupatorium adenophorum* Spreng. *Biochim Biophys Acta* 2010; **1797**: 391-405.
- [9] DEMIDCHIK V, CUIN TA, SVISTUNENKO D, SMITH SJ, MILLER AJ, SHABALA S, SOKOLIK A, YURIN V. *Arabidopsis* root K⁺-efflux conductance activated by hydroxyl radicals: single-channel properties, genetic basis and involvement in stress-induced death. *J Cell Sci* 2010; **123**: 1468-1479.
- [10] DENG S, YU M, WANG Y, JIA Q, LIN L, DONG H. The antagonistic effect of hydroxyl radical on the development of a hypersensitive response in tobacco. *FEBS J* 2010; **277**: 5097-5111.
- [11] DUAN Q, KITA D, JOHNSON EA, AGGARWAL M, GATES L, WU H-M, CHEUNG AY. Reactive oxygen species mediate pollen tube rupture to release sperm for fertilization in *Arabidopsis*. *Nat Commun* 2014; **5**: 3129.
- [12] EL-MAAROUF-BOUTEAU H, MEIMOUN P, JOB C, JOB D, BAILLY C. Role of protein and mRNA oxidation in seed dormancy and germination. *Front Plant Sci* 2013; **4**: 77.
- [13] GMEREK J, POLITYCKA B. Generation of active oxygen species in roots of maize, pea and radish in response to exogenous ferulic and p-coumaric acids. *Allelopathy J* 2010; **25**: 475-484.
- [14] GOVRIN EM, RACHMILEVITCH S, TIWARI BS, SOLOMON M, LEVINE A. An elicitor from *Botrytis cinerea* induces the hypersensitive response in *Arabidopsis thaliana* and other plants and promotes the gray mold disease. *Phytopathology* 2006; **96**: 299-307.
- [15] GRAEBER K, LINKIES A, MÜLLER K, WUNCHOVA A, ROTT A, LEUBNER-METZGER G. Cross-species approaches to seed dormancy and germination: conservation and biodiversity of ABA-regulated mechanisms and the *Brassicaceae* *DOG1* genes. *Plant Mol Biol* 2010; **73**: 67-87.
- [16] GROPPA MD, IANUZZO MP, ROSALES EP, VAZQUEZ SC, BENAVIDES MP. Cadmium modulates NADPH oxidase activity and expression in sunflower leaves. *Biol Plant* 2012; **56**: 167-171.
- [17] HADŽI-TAŠKOVIĆ ŠUKALOVIĆ V, VULETIĆ M, VELJOVIĆ-JOVANOVIĆ S, VUČINIĆ Z. The effects of manganese and copper in vitro and in vivo on peroxidase catalytic cycles. *J Plant Physiol* 2010; **167**: 1550-1557.
- [18] HAO L-H, WANG W-X, CHEN C, WANG Y-F, LIU T, LI X, SHANG Z-L. Extracellular ATP promotes stomatal opening of *Arabidopsis thaliana* through heterotrimeric G protein α subunit and reactive oxygen species. *Mol Plant* 2012; **5**: 852-864.

- [19] HEYNO E, MARY V, SCHOPFER P, KRIEGER-LISZKAY A. Oxygen activation at the plasma membrane: relation between superoxide and hydroxyl radical production by isolated membranes. *Planta* 2011; **234**: 35-45.
- [20] HIDEG E, VITÁNYI B, KÓSA A, SOLYMOŠI K, BÓKA K, WON S, INOUE Y, RIDGE RW, BÓDDI B. Reactive oxygen species from type-I photosensitized reactions contribute to the light-induced wilting of dark-grown pea (*Pisum sativum*) epicotyls. *Physiol Plant* 2010; **138**: 485-492.
- [21] HU L, LIANG W, YIN C, CUI X, ZONG J, WANG X, HU J, ZHANG D. Rice MADS3 regulates ROS homeostasis during late anther development. *Plant Cell* 2011; **23**: 515-533.
- [22] ISHIBASHI Y, TAWARATSUMIDA T, ZHENG S-H, YUASA T, IWAYA-INOUE M. NADPH oxidases act as key enzyme on germination and seedling growth in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Prod Sci* 2010; **13**: 45-52.
- [23] IVANCHENKO MG, DEN OS D, MONSHAUSEN GB, DUBROVSKY JG, BEDNÁROVÁ A, KRISHNAN N. Auxin increases the hydrogen peroxide (H₂O₂) concentration in tomato (*Solanum lycopersicum*) root tips while inhibiting root growth. *Ann Bot* 2013; **112**: 1107-1116.
- [24] KADONO T, YAMAGUCHI Y, FURUICHI T, HIRONO M, GARREC JP, KAWANO T. Ozone-induced cell death mediated with oxidative and calcium signaling pathways in tobacco bel-w3 and bel-B cell suspension cultures. *Plant Signal Behav* 2006; **1**: 312-322.
- [25] KEUNEN E, REMANS T, BOHLER S, VANGRONSVELD J, CUYPERS A. Metal-induced oxidative stress and plant mitochondria. *Int J Mol Sci* 2011; **12**: 6894-6918.
- [26] KIM YX, STEUDLE E. Gating of aquaporins by light and reactive oxygen species in leaf parenchyma cells of the midrib of *Zea mays*. *J Exp Bot* 2009; **60**: 547-556.
- [27] KRANNER I, ROACH T, BECKETT RP, WHITAKER C, MINIBAYEVA FV. Extracellular production of reactive oxygen species during seed germination and early seedling growth in *Pisum sativum*. *J Plant Physiol* 2010; **167**: 805-811.
- [28] KUDO H, KUDO K, AMBO H, UEMURA M, KAWAI S. Cadmium sorption to plasma membrane isolated from barley roots is impeded by copper association onto membranes. *Plant Sci* 2011; **180**: 300-305.
- [29] KUKAVICA B, MOJOVIĆ M, VUCCINIĆ Z, MAKŠIMOVIĆ V, TAKAHAMA U, VELJOVIĆ-JOVNOVIĆ S. Generation of hydroxyl radical in isolated pea root cell wall, and the role of cell wall-bound peroxidase, Mn-SOD and phenolics in their production. *Plant Cell Physiol* 2009; **50**: 304-317.
- [30] LAOHAVISIT A, RICHARDS SL, SHABALA L, CHEN C, COLAÇO RDDR, SWARBRECK SM, SHAW E, DARK A, SHABALA S, SHANG Z, DAVIES JM. Salinity-induced calcium signaling and root adaptation in *Arabidopsis* require the calcium regulatory protein annexin1. *Plant Physiol* 2013; **163**: 253-262.
- [31] LAOHAVISIT A, SHANG Z, RUBIO L, CUIN TA, VÉRY AA, WANG A, MORTIMER JC, MACPHERSON N, COXON KM, BATTEY NH, BROWNLEE C, PARK OK, SENTENAC H, SHABALA S, WEBB AA, DAVIES JM. *Arabidopsis* annexin 1 mediates the radical-activated plasma membrane Ca²⁺- and K⁺-permeable conductance in root cells. *Plant Cell* 2012; **24**: 1522-1533.
- [32] LASSING R, GUTERMUTH T, BEY TD, KONRAD KR, ROMEIS T. Pollen tube NAD(P)H oxidases act as a speed control to dampen growth rate oscillations during polarized cell growth. *Plant J* 2014; **78**: 94-106.
- [33] LEYMARIE J, VITKAUSKAITĖ G, HOANG HH, GENDREAU E, CHAZOULE V, MEIMOUN P, CORBINEAU F, EL-MAAROUF-BOUTEAU H, BAILLY C. Role of reactive oxygen species in the regulation of *Arabidopsis* seed dormancy. *Plant Cell Physiol* 2012; **53**: 96-106.
- [34] LISZKAY A, VAN DER ZALM E, SCHOPFER P. Production of reactive oxygen intermediates (O₂⁻, H₂O₂ and OH⁻) by maize roots and their role in wall loosening and elongation growth. *Plant Physiol* 2004; **136**: 3114-3123.
- [35] MAKŠIMOVIĆ DJ, MOJOVIĆ M, MAKŠIMOVIĆ V, RÖMHELD V, NIKOLIĆ M. Silicon ameliorates manganese toxicity in cucumber by decreasing hydroxyl radical accumulation in the leaf apoplast. *J Exp Bot* 2012; **63**: 2411-2420.

- [36] MALENCIĆ D, KEVREŠAN S, POPOVIĆ M, ŠTAJNER D, POPOVIĆ B, KIPROVSKI B, DJURIĆ S. Cholic acid changes defense response to oxidative stress in soybean induced by *Aspergillus niger*. *Cent Eur J Biol* 2012; **7**: 132-137.
- [37] MARINO D, ANDRIO E, DANCHIN EGJ, OGER E, GUCCIARDO S, LAMBERT A, PUPPO A, PAULY N. A *Medicago truncatula* NADPH oxidase is involved in symbiotic nodule functioning. *New Phytol* 2011; **189**: 580-592.
- [38] MATROS A, PESHEV D, PEUKERT M, MOCK HP, VAN DEN ENDE W. Sugars as hydroxyl radical scavengers: proof-of-concept by studying the fate of sucralose in *Arabidopsis*. *Plant J* 2015; **82**: 822-839.
- [39] MESSENGER DJ, MCLEOD AR, FRY SC. The role of ultraviolet radiation, photosensitizers, reactive oxygen species and ester groups in mechanisms of methane formation from pectin. *Plant Cell Environ* 2009; **32**: 1-9.
- [40] MITTLER R, VANDERAUWERA S, SUZUKI N, MILLER G, TOGNETTI VB, VANDEPOELE K, GOLLERY M, SHUALEV V, VAN BREUSEGEM F. ROS signaling: the new wave? *Trends Plant Sci* 2011; **16**: 300-309.
- [41] MORTIMER JC, LAOHAVISIT A, MIEDEMA H, DAVIES JM. Voltage, reactive oxygen species and the influx of calcium. *Plant Sign Behav* 2008; **3**: 698-699.
- [42] MIURA T. A mechanistic study of the formation of hydroxyl radicals induced by horseradish peroxidase with NADH. *J Biochem* 2012; **152**: 199-206.
- [43] MÜLLER K, LINKIES A, VREEBURG RA, FRY SC, KRIEGER-LISZKAY A, LEUBNER-METZGER G. *In vivo* cell wall loosening by hydroxyl radicals during cress seed germination and elongation growth. *Plant Physiol* 2009; **150**: 1855-1865.
- [44] ODA T, HASHIMOTO H, KUWABARA N, AKASHI S, HAYASHI K, KOJIMA C, WONG HL, KAWASAKI T, SHIMAMOTO K, SATO M, SHIMIZU T. Structure of the N-terminal regulatory domain of a plant NADPH oxidase and its functional implications. *J Biol Chem* 2010; **285**: 1435-1445.
- [45] ORACZ K, EL-MAAROUF BOUTEAU H, FARRANT JM, COOPER K, BELGHAZI M, JOB C, JOB D, CORBINEAU F, BAILLY C. ROS production and protein oxidation as a novel mechanism of seed dormancy alleviation. *Plant J* 2007; **50**: 452-465.
- [46] ORACZ K, BAILLY C, GNIAZDOWSKA A, CÔME D, CORBINEAU F, BOGATEK R. Induction of oxidative stress by sunflower phytotoxins in germinating mustard seeds. *J Chem Ecol* 2007; **33**: 251-264.
- [47] ORACZ K, EL-MAAROUF-BOUTEAU H, BOGATEK R, CORBINEAU F, BAILLY C. Release of sunflower seed dormancy by cyanide: crosstalk with ethylene signalling pathway. *J Exp Bot* 2008; **59**: 2241-2251.
- [48] ORACZ K, EL-MAAROUF-BOUTEAU H, KRANNER I, BOGATEK R, CORBINEAU F, BAILLY C. The mechanisms involved in seed dormancy alleviation by hydrogen cyanide unravel the role of reactive oxygen species as key actors of cellular signaling during germination. *Plant Physiol* 2009; **150**: 494-505.
- [49] ORACZ K, VOEGELE A, TARKOWSKÁ D, JACQUEMOUD D, TUREČKOVÁ V, URBANOWÁ T, STRNAD M, SLIWINSKA E, LEUBNER-METZGER G. Myrtilone 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.
- [50] POSPIŠIL P. Production of reactive oxygen species by photosystem II. *Biochim Biophys Acta* 2009; **1787**: 1151-1160.
- [51] POTOCKY M, PEJCHAR P, GUTKOWSKA M, JIMENEZ-QUESADA JM, POTOCKA A, DE DIOS ALCHE J, KOST B, ZARSKY V. NADPH oxidase activity in pollen tubes is affected by calcium ions, signaling phospholipids and Rac/Rop GTPases. *J Plant Physiol* 2012; **169**: 1654-1663.
- [52] POTTOSIN I, VELARDE-BUENDÍA AM, BOSE J, ZEPEDA-JAZO I, SHABALA S, DOBROVINSKAYA O. Cross-talk between reactive oxygen species and polyamines in regulation of ion transport across the plasma membrane: implications for plant adaptive responses. *J Exp Bot* 2014; **65**: 1271-1283.
- [53] RICHARDS SL, WILKINS KA, SWARBRECK SM, ANDERSON AA, HABIB N, SMITH AG, MCAINSH M, DAVIES JM. The hydroxyl radical in plants: from seed to seed. *J Exp Bot* 2015; **66**: 37-46.

- [54] SABATER B, MARTIN M. Hypothesis: increase of the ratio singlet oxygen plus superoxide radical to hydrogen peroxide changes stress defense response to programmed leaf death. *Front Plant Sci* 2013; **4**: 479.
- [55] SCHWARTZLÄNDER M, FINKEMEIER I. Mitochondrial energy and redox signaling in plants. *Antioxid Redox Signal* 2013; **18**: 2122-2144.
- [56] SCHELER C, WEITBRECHT K, PEARCE SP, HAMPSTEAD A, BÜTTNER-MAINIK A, LEE KJ, VOEGELE A, ORACZ K, DEKKERS BJW, WANG X, WOOD AT, BENTSINK L, KING JR, KNOX JP, HOLDSWORTH MJ, MÜLLER K, LEUBNER-METZGER G. Promotion of testa rupture during garden cress germination involves seed compartment-specific expression and activity of pectin methylesterases. *Plant Physiol* 2015; **167**: 200-215.
- [57] SHIN L-J, LO J-C, YEN K-C. Copper chaperone antioxidant protein1 is essential for copper homeostasis. *Plant Physiol* 2012; **159**: 1099-110.
- [58] SINCLAIR AM, TROBACHER CP, MATHUR N, GREENWOOD JS, MATHUR J. Peroxule extension over ER-defined paths constitutes a rapid subcellular response to hydroxyl stress. *Plant J* 2009; **59**: 231-242.
- [59] SINGH BN, SINGH A, SINGH SP, SINGH HB. *Trichoderma harzianum* – mediated reprogramming of oxidative stress response in root apoplast of sunflower enhances defence against *Rhizoctonia solani*. *Eur J Plant Pathol* 2011; **131**: 121-134.
- [60] SMIRNOVA AV, MATVEYEVA NP, YERMAKOV IP. Reactive oxygen species are involved in regulation of pollen wall cytomechanics. *Plant Biol* 2013; **16**: 252-257.
- [61] STOPARIĆ G, MAKSIMOVIĆ I. The effect of cytokinins on the concentration of hydroxyl radicals and the intensity of lipid peroxidation in nitrogen deficient wheat. *Cereal Res Commun* 2008; **36**: 601-609.
- [62] STRADOMSKA TJ. Peroksysony – funkcje i zaburzenia metaboliczne. *Postępy Bioch* 2011; **57**: 183-190.
- [63] SZABADOS L, SAVOURÉ A. Proline: a multifunctional amino acid. *Trends Plant Sci* 2010; **15**: 89-97.
- [64] TAMÁS L, VALENTOVICOVÁ K, HALUSKOVÁ L, HUTTOVÁ J, MISTRIK I. Effect of cadmium on the distribution of hydroxyl radical, superoxide and hydrogen peroxide in barley root tip. *Protoplasma* 2009; **236**: 67-72.
- [65] TONÓN C, TERRILE MC, IGLESIAS MJ, LAMATTINA L, CASALONGUÉ C. Extracellular ATP, nitric oxide and superoxide act coordinately to regulate hypocotyl growth in etiolated *Arabidopsis* seedlings. 2010. *J Plant Physiol* 2010; **167**: 540-546.
- [66] TORRES MA, MORALES J, SÁNCHEZ-RODRIGUEZ C, MOLINA A, DANGL JL. Functional interplay between *Arabidopsis* NADPH oxidases and heterotrimeric G protein. *Mol Plant Microbe Interact* 2013; **26**: 686-694.
- [67] VAHISALU T, PUZÓRJOVA I, BROSCHE M, VALK E, LEPIKU M, MOLDAU H, PECHTER P, WANG YS, LINDREN O, SALOJÄRVI J, LOOG M, KANGASJÄRVI J, KOLLIST H. Ozone-triggered rapid stomatal response involves the production of reactive oxygen species, and is controlled by SLAC1 and OST1. *Plant J* 2010; **62**: 442-453.
- [68] VALLURU R, VAN DEN ENDE W. Myo-inositol and beyond – emerging networks under stress. *Plant Sci* 2011; **181**: 387-400.
- [69] VELARDE-BUENDIA AM, SHABALA S, CVIKROVA M, DOBROVINSKAYA O, POTTOSIN I. Salt-sensitive and salt-tolerant barley varieties differ in the extent of potentiation of the ROS-induced K⁺ efflux by polyamines. *Plant Physiol Biochem* 2012; **61**: 18-23.
- [70] VELJOVIĆ-JOVANOVIĆ S, KUKAVICA B, CVETIĆ T, MOJOVIĆ M, VUCINIĆ Z. Ascorbic acid and the oxidative processes in pea root cell wall isolates: characterization by fluorescence and EPR spectroscopy. *Ann N Y Acad Sci* 2005; **1048**: 500-504.
- [71] VOEGELE A, GRAEBER K, ORACZ K, TARKOWSKA 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; **14**: 5337-5350.

- [72] WRZACZEK M, BROSCHE M, KANGASJÄRVI J. ROS signaling loops – production, perception, regulation. *Curr Opin Plant Biol* 2013; **16**: 575-582.
- [73] WU J, SHANG Z, WU J, JIANG X, MOSCHOU PN, SUN W, ROUBELAKIS-ANGELAKIS KA, ZHANG S. Spermidine oxidase-derived H₂O₂ regulates pollen plasma membrane hyperpolarization-activated Ca²⁺-permeable channels and pollen tube growth. *Plant J* 2010; **63**: 1042-1053.
- [74] ZEPEDA-JAZO I, VELARDE-BUENDÍA AM, ENRÍQUEZ-FIGUEROA R, BOSE J, SHABALA S, MUÑOZ-MURGUÍA, POTTOSIN II. Polyamines interact with hydroxyl radicals in activating Ca²⁺ and K⁺ transport across the root epidermal plasma membranes. *Plant Physiol* 2011; **157**: 2167-2180.
- [75] ZHANG Y, CHEN B, XU Z, SHI Z, CHEN S, HUANG X, CHEN J, WANG X. Involvement of reactive oxygen species in endosperm cap weakening and embryo elongation growth during lettuce seed germination. *J Exp Bot* 2014; **65**: 3189-3200.
- [76] ZHANG Y-K, ZHU D-F, ZHANG Y-P, CHEN H-Z, XIANG J, LIN X-Q. Low pH-induced changes of antioxidant enzyme and ATPase activities in the roots of rice (*Oryza sativa* L.) seedlings. *PLoS One* 2015; DOI: 10.1371/journal.pone.0116971.

Redaktor prowadzący – Janusz Maszewski

Otrzymano: 03.03.2015

Przyjęto: 08.07.2015

Krzyszyna Oracz

Katedra Fizjologii Roślin

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

ul. Nowoursynowska 159, 02-776 Warszawa

tel.: +48 22 593 25 33

fax: +48 22 593 25 21

email: krzyszyna_oracz@sggw.pl