

URSZULA KRASUSKA, AGNIESZKA GNIAZDOWSKA, RENATA BOGATEK

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego
Wydział Rolnictwa i Biologii
Katedra Fizjologii Roślin
Nowoursynowska 159, 02-776 Warszawa
E-mail: u.krasuska@gmail.com
agnieszka_gniazdowska@sggw.pl

ROLA ROS W FIZJOLOGII NASION

WSTĘP

Wytwarzanie nasion stanowi jedną z wielu adaptacji roślin sprzyjających przetrwaniu i ekspansji gatunku w środowisku naturalnym. Stan spoczynku (głębokiego) to czasowa, przejściowa blokada dalszego rozwoju organizmu, umożliwiająca unikanie niekorzystnych czynników otoczenia. Czas trwania spoczynku nasion zależy od gatunku rośliny. Zastosowanie radioaktywnego węgla przy datowaniu pozwoliło ustalić wiek nasion daktylowca właściwego (*Phoenix dactylifera*) na około 2000 lat (SALLON i współaut. 2000). Kiełkowanie nasion, będące zespołem procesów fizjologiczno-biochemicznych, jest możliwe po usunięciu wszystkich blokad związanych z utrzymaniem spoczynku. Proces kiełkowania *sensu stricto* rozpoczyna się pobieraniem wody przez suche nasiono, a kończy aktywacją metaboliczną zarodka, wiodącą do przebicia okryw nasiennych przez korzeń zarodkowy (CÔME i CORBINEAU 1989, KUCERA i współaut. 2005). Reaktywne formy tlenu (ang. reactive oxygen species, ROS) biorą udział w regulacji metabolizmu nasion na różnych etapach rozwoju (BAILLY i współaut. 2008). Niekompletna redukcja cząsteczki tlenu (O_2) prowadzi do powstania ROS, takich jak anionorodnik ponadtlenkowy ($O_2^{\cdot-}$) czy nadtlenek wodoru (H_2O_2), które bardzo szybko wchodzą w reakcje z podstawowymi składnikami komórek, zatem produkowane w nadmiarze mogą powodować

uszkodzenia prowadzące nawet do śmierci (BARTOSZ 2004). Z drugiej strony, związki te są niezbędne do prawidłowego funkcjonowania organizmów jako przekaźniki informacji drugiego rzędu. W związku z tym, zaproponowano nowe określenie działania ROS na komórki – sygnał oksydacyjny, które mogłoby zastąpić powszechnie stosowany termin – stres oksydacyjny (FOYER i NOCTOR 2005). W biologii nasion ROS, w zależności od stężenia, pełnią różne funkcje. Nadmiar ROS w tkankach powoduje przyspieszanie procesów związanych ze starzeniem, jednak ich obecność jest konieczna zarówno podczas dojrzewania, przełamывania spoczynku, jak i kiełkowania nasion (BAILLY i współaut. 2008). Produkcja ROS w czasie kiełkowania nasion rzodkwi (*Raphanus sativus*) jest niezbędna do późniejszego prawidłowego wzrostu i rozwoju siewek (SCHOPFER i współaut. 2001). Wykazano, że związki te uczestniczą w procesach wzrostowych komórek osi zarodkowych, jak ma to miejsce w przypadku nasion soi (*Glycine max*) (PUNTARULO i współaut. 1988). ROS stanowią także istotny czynnik różnicowania się komórek w czasie morfogenezy korzeni, włośników korzeniowych i liści u rzodkiewnika (*Arabidopsis thaliana*) (CAROL i DOLAN 2006). Badania na poziomie proteomicznym dowiodły udziału ROS w po-translacyjnej modyfikacji białek (utlenianiu białek), które uczestniczą w podstawowych

szlakach metabolicznych zachodzących na różnych etapach w fizjologii nasion (JOB i współaut. 2005).

Z uwagi na dwojaki charakter natury ROS, pozwalający na określanie ich działania wyrażeniem „związki tworzące sygnał oksydacyjny”, autorzy niniejszej pracy starali się odpowiedzieć na pytanie jaką rolę odgrywają te cząsteczki w regulacji rozwoju, kiełkowania i starzenia nasion. Podstawowe informacje dotyczące tego zagadnienia znajdzie zainteresowany czytelnik w pracy przeglądowej

opublikowanej kilka lat temu w 33 tomie *Postępów Biologii Komórki* (WOJTYLA i współaut. 2006). Jednocześnie należy podkreślić, że w przypadku rozważania funkcji ROS w procesach rozwojowych korzystne byłoby zastąpienie terminu „system antyoksydacyjny” terminem „system modulowania ROS”, oznaczającym system regulujący stężenie ROS w komórkach. Zagadnienie to zostało szczegółowo opisane poniżej.

POWSTAWIANIE ROS W NASIONACH

Jednoelektronowa redukcja O_2 prowadzi do powstania anionorodnika ponadtlenkowego ($O_2^{\cdot-}$), którego czas połowicznego rozpadu wynosi od około 0,2 ms do 20 ms (zazwyczaj mniej niż 1 ms). W procesie zwanym dysmutacją (proces dysproporcjonowania) następuje spontaniczne samoprzekształcanie $O_2^{\cdot-}$ do nadttlenku wodoru (H_2O_2) i O_2 (BARTOSZ 2004, FOYER i NOCTOR 2005). Proces ten ulega znacznemu przyspieszeniu w obecności dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) (BOWLER i współaut. 1994). Bardziej stabilną formą ROS jest H_2O_2 , który posiada zdolność do swobodnego przemieszczania się przez błony biologiczne kanałami wodnymi, akwaporynami, lub specyficznymi kanałami zwanymi peroksykanałami (NEILL i współaut. 2002, BIENERT i współaut. 2007). Może zatem oddziaływać z różnymi składnikami komórki, np. modyfikować strukturę białek (reagowanie z grupami sulfhydrylowymi -SH reszt aminokwasów) poza miejscem, w którym powstaje (SCANDALIOS i współaut. 1997). Ze względu na łatwość przemieszczania się, H_2O_2 pełni bardzo ważną funkcję przekaźnika drugiego rzędu w przenoszeniu sygnału w komórkach roślinnych (FOYER i NOCTOR 2005). Wytwarzanie H_2O_2 zachodzi nie tylko w wyniku samorzutnego dysproporcjonowania $O_2^{\cdot-}$, ale też na drodze redukcji $O_2^{\cdot-}$, przy udziale takich reduktantów komórkowych jak askorbinian (AsA), glutation (GSH) oraz inne związki zawierające grupy -SH (ASADA 1999). Najbardziej „agresywną” formą ROS, zwłaszcza w stosunku do komórkowego DNA, jest rodnik hydroksylowy (OH), który nie tylko może niszczyć strukturę deoksyrybozy, ale również zasad purynowych, jak i pirymidynowych. Nagromadzenie 8-hydroksyguanydiny jest najczęściej obserwowaną modyfikacją wynikającą z działania tlenu single-

towego (1O_2), zaliczanego do ROS (BARTOSZ 2004, MØLLER i współaut. 2007). Ponadto OH natychmiast wchodzi w reakcję ze wszystkimi składnikami komórki, które znajdują się w jego pobliżu, reaguje z wolnymi cukrami i poliolami, a głównym produktem tej reakcji jest szkodliwy kwas mrówkowy (MØLLER i współaut. 2007, MØLLER i SWEETLOVE 2010). Stężenie ROS w komórce dodatkowo wzrasta w wyniku reakcji Fentona, w której, przy udziale H_2O_2 i $O_2^{\cdot-}$ w obecności takich katalizatorów jak jony żelaza (Fe^{2+}) czy miedzi (Cu^+), dochodzi do zwiększonej produkcji OH (CHEN i SCHOPFER 1999, BARTOSZ 2004).

Czynnikami środowiskowymi (biotycznymi i abiotycznymi) stymulującymi wzrost wytwarzania ROS w nasionach na różnych etapach ich rozwoju są m.in.: promieniowanie jonizujące, promieniowanie nadfioletowe, nadmierna energia świetlna, ozon, utlenianie zredukowanych form niskocząsteczkowych składników komórek, reakcje enzymatyczne oraz metale ciężkie (RUCIŃSKA i współaut. 1999, BARTOSZ 2004, BAILLY i współaut. 2008), atak patogenów oraz działanie ekstremalnych temperatur (WOJTASZEK 1997, BOLWELL i współaut. 2002, BLOKHINA i współaut. 2003). Ponadto, wzrost stężenia ROS w komórkach nasion powodowany jest również modyfikacją metabolizmu. Enzymami zaangażowanymi w wytwarzanie ROS są przede wszystkim oksydazy: oksydaza NADPH, oksydaza glikolanowa, oksydaza glukozowa, oksydaza poliaminowa, oksydaza ksantyny, aminooksydaza apoplastowa (ASADA 1992, WOJTASZEK 1997), a także lipooksygenaza oraz pH-zależne peroksydazy związane ze ścianą komórkową (BOLWELL i współaut. 2002, NEILL i współaut. 2002). Oksydaza NADPH związana z plazmolemą katalizuje produkcję $O_2^{\cdot-}$ z O_2 , wykorzystując NADPH jako do-

nor elektronów (FOREMAN i współaut. 2003, MØLLER i współaut. 2007). Innymi źródłami ROS są również: oksydoreduktaza ksantyny i cytochrom P450 oraz reduktaza cytochromu P450 (BARTOSZ 2004, MØLLER i współaut. 2007, BAILLY i współaut. 2008).

Organella komórkowe nasion, w których produkowane są ROS, to przede wszystkim peroksosomy i mitochondria (BAILLY i współaut. 2008). Peroksosomy roślinne odpowiedzialne są za wewnątrzkomórkową produkcję głównie H_2O_2 , ponadto jak wykazano w ostatnich latach, biorą również udział w syntezie zarówno O_2^- jak i tlenków azotu (NO_x) (CORPAS i współaut. 2001, DEL RÍO i współaut. 2002). Znaczne ilości ROS są wytwarzane w kiełkujących nasionach lipidowych, takich roślin jak słonecznik (*Helianthus annuus*) i jabłoni (*Malus domestica*) w specyficznych peroksosomach (glioksosomach), gdzie zachodzi proces β -oksydacji kwasów tłuszczowych (BOGATEK i współaut. 2003, BAILLY i współaut. 2008). Ponadto ROS powstają w wyniku enzymatycznej reakcji z udziałem oksydaz flawinowych (DEL RÍO i współaut. 2002, FOYER i NOCTOR 2003). Wzrost stężenia ROS w matriks peroksosomów związany jest także z utlenianiem ksantyny do kwasu uronowego, w reakcji katalizowanej przez oksydazę ksantyny (CORPAS i współaut. 2001). We wczesnych etapach dojrzewania nasion pewnych gatunków roślin, takich jak pomidor (*Lycopersicon esculentum*), marchew zwyczajna (*Daucus carota*), kapusta (*Brassica oleracea*) czy łubin (*Lupinus luteus*), dodatkowe źródło ROS stanowi fotosyntetyczny transport elektronów w chloroplastach (JALINK i współaut. 1999, GARNCZARSKA i współaut. 2009).

W procesie oddychania mitochondrialnego, w warunkach fizjologicznych, obserwowane jest zjawisko tzw. przecieku mitochondrialnego. Polega ono na niepełnej redukcji tlenu (około 1–2%) zużywanego przez rośliny. Prowadzi to do wytwarzania głównie O_2^- , który z kolei ulega dysmutacji do H_2O_2 . Podstawowym miejscem powstawania ROS w łańcuchu transportu elektronów w mito-

chondriach są kompleks I (oksydoreduktaza: NADH-ubichinon) i kompleks III (oksydoreduktaza: ubichinol – cytochrom c) (MØLLER i współaut. 2007). Zatem można przyjąć, że wzrost produkcji ROS w mitochondriach jest związany ze zmianą intensywności oddychania. Dodatkowo ROS (głównie H_2O_2) mogą powstawać również podczas glukoneogenezy (GRAHAM 2008).

Kiełkowanie, to proces rozpoczynający się gwałtownym pobieraniem wody (imbibicja) przez nasiona. W tym czasie obserwowany jest wzrost stężenia ROS. Uwodnienie komórek umożliwia metaboliczną aktywację zarodka, związaną z mobilizacją substancji zapasowych i indukcją oddychania mitochondrialnego, które stanowią podstawowe źródło ROS (BAILLY i współaut. 2008). Wzrost wewnątrzkomórkowego stężenia ROS może być uważany za jedną z charakterystycznych cech kiełkowania *sensu stricto* (BAILLY i współaut. 2008, GNIAZDOWSKA i współaut. 2010a). Wczesne etapy kiełkowania związane są ze zmianą objętości przez pęczniejące komórki. W regulacji wydłużania komórek uczestniczą m.in. auksyny, które dodatkowo przyczyniają się do apoplastycznej produkcji ROS (CAROL i DOLAN 2006). Wykazano, że hamowanie wzrostu wydłużeniowego komórek, indukowanego auksyną, następuje w obecności związków stosowanych jako zmiatacze ROS (głównie OH) (SCHOPFER 2001). W procesach rozluźniania struktury ścian komórkowych uczestniczą również peroksydazy apoplastowe stymulujące wytwarzanie OH. W ten sposób ROS przyspieszają rozluźnianie struktury ścian komórkowych, umożliwiając szybszy wzrost wydłużeniowy komórek i ułatwiając przebicie korzenia zarodkowego przez okrywy nasienne (SCHOPFER i współaut. 2002, MÜLLER i współaut. 2009). ROS mogą też oddziaływać na kiełkowanie nasion poprzez utlenianie związków fenolowych, obecnych np. w perykarpie, a uważanych za inhibitory kiełkowania, jak ma to miejsce w przypadku nasion cynii wytwornej (*Zinnia elegant*) (BAILLY i współaut. 2008).

AKTYWNOŚĆ BIOLOGICZNA ROS

Toksyczne działanie ROS polega na ich ogromnej reaktywności z różnymi składnikami żywej komórki takimi jak: lipidy, białka (w tym enzymy), kwasy nukleinowe i cukry. Prowadzi to do wielu modyfikacji struktury i funkcji tych cząsteczek (oksy-

dacja lipidów, inaktywacja enzymów, białek transportujących, receptorów i kanałów jonowych, uszkodzenie struktury kwasów nukleinowych, depolimeryzacja polisacharydów) (BARTOSZ 2004, MØLLER i współaut. 2007, BAILLY i współaut. 2008). Działanie

to może być zarówno pośrednie (utlenianie określonych związków, które poprzez taką modyfikację stają się przekaźnikami informacji), jak i bezpośrednie, m.in. poprzez modyfikację czynników transkrypcyjnych i w konsekwencji zmianę ekspresji genów (FOYER i NOCTOR 2005, MØLLER i SWEETLOVE 2010). Wzrost stężenia ROS (głównie H_2O_2) w danym organellum komórkowym, które reaguje na czynnik stresowy (np. mitochondrium lub chloroplast), nie stanowi specyficznego sygnału przekazywanego dalej do jądra komórkowego. W zależności od rodzaju bodźca stresowego i jego lokalizacji potrzebne są odpowiednie produkty transkrypcji, które po dotarciu do miejsca docelowego umożliwiłyby reakcję na ten stres. Zaproponowano, że takim specyficznym sygnałem oksydacyjnym, stymulującym transkrypcję określonych białek, mogą być wtórne przekaźniki informacji powstające lub modyfikowane lokalnie (w konkretnym organellum) w wyniku działania ROS, np. odpowiednie kinazy białkowe czy peptydy utlenione (MØLLER i SWEETLOVE 2010).

Wykazano, że podwyższone stężenie H_2O_2 w kulturze zawiesinowej komórek rzodkiewnika wywołuje zmianę ekspresji ponad 100 genów kodujących m.in. enzymy należące do systemu zmniejszającego stężenie ROS: S-transferazę glutationową, amoniakoliazę L-fenylalaniny, katalazę. ROS zwiększają ponad 2-krotnie ekspresję genów kodujących wymienione białka oraz kodujących białka związane ze starzeniem i naprawą uszkodzonego DNA (DESIKAN i współaut. 2001, HANCOCK i współaut. 2001). ROS kontrolują również aktywację białek kinazowych aktywowanych mitogenami (MAP) (BAILLY i współaut. 2008). Specyficzną kinazą, która ulega regulacji za pośrednictwem ROS u rzodkiewnika jest OXI1 (ang. oxidative signal-inducible 1), która uczestniczy w sygnale kinaz białkowych MAP (AtMPK3 i AtMPK6) (RENTEL i współaut. 2004). Z drugiej strony, ROS hamują aktywność fosfataz typu 2C (PP2C), ABI1 i ABI2, będących elementami szlaku transdukcji sygnału indukowanego przez kwas abscysynowy (ABA), fitohormon utrzymujący spoczynek nasion (BAILLY i współaut. 2008). ROS modyfikują stężenie jonów wapnia (Ca^{2+}) w komórkach. U rzodkiewnika wykazano zwiększony napływ jonów Ca^{2+} do komórek pod wpływem działania ROS, które aktywowały kanały wapniowe (MORI i SCHROEDER 2004). Proponuje się, że kanałami podlegającymi aktywacji przez ROS są anek-

syny (LAOHAVISIT i współaut. 2010). Sugerowana jest także regulacja stężenia ROS na zasadzie sprzężenia zwrotnego. Pod wpływem zmian zawartości Ca^{2+} w komórkach następują zmiany ilości ROS (CAROL i DOLAN 2006). Ponadto w ścieżkach sygnałowych indukowanych przez H_2O_2 uczestniczą Ca^{2+} i kalmodulina (DESIKAN i współaut. 2001).

ROS modyfikują potencjał redoks w komórce m.in. w wyniku oddziaływania na zmianę wartości stosunku glutationu w formie zredukowanej do formy utlenionej (GSH/GSSG) (BAILLY i współaut. 2008). Wykazano, że aktywność niektórych białek zaangażowanych w regulację procesów związanych z produkcją energii podlega modyfikacjom przez H_2O_2 . Takim białkiem jest np. dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego (GAPDH) występująca u rzodkiewnika w dwu izoformach: cytozolowej i zlokalizowanej w ścianie komórkowej (HANCOCK i współaut. 2005). Aktywność GAPDH wyizolowanej z zawiesiny komórkowej rzodkiewnika ulega odwracalnemu hamowaniu pod wpływem ROS, a ponadto reakcja ta jest zależna od stężenia H_2O_2 (HANCOCK i współaut. 2005). Aktywność GAPDH podlega również inaktywacji przez NO, a efekt ten jest odwracalny w obecności reduktantów np. ditiotreitolu (DTT) (LINDERMAYR i współaut. 2005). H_2O_2 może współdziałać z NO w modyfikacji innych białek, działając na grupy sulfhydrylowe (-SH) i umożliwiając ich nitrozyzację. Innymi białkami podlegającymi modyfikacjom przez ROS są: dehydrogenaza alkoholowa, syntaza glutaminowa i transferaza S-adenozylometioniny (jeden z komponentów szlaku biosyntezy etylenu i poliamin). W przypadku tego ostatniego enzymu, odwracalnemu utlenieniu przez ROS ulega reszta cysteiny (Cys), która również podlega modyfikacjom przez NO (HANCOCK i współaut. 2005). ROS (głównie H_2O_2) wspólnie z NO, stymulują oddychanie drogą niewrażliwą na cyjanki (CN^-) i azydki, poprzez aktywację genów kodujących alternatywną oksydazę (AOX), np. *AOX1a* w liściach tytoniu (EDERLI i współaut. 2009). Wzrost ekspresji *AOX1a* pod wpływem działania H_2O_2 wykazano również dla siewek kukurydzy (*Zea mays*) (POLIDOROS i współaut. 2005). AOX może zapobiegać nadmiernej produkcji ROS w mitochondriach podczas zaburzenia transportu elektronów, spowodowanego różnymi czynnikami stresowymi (JUSZCZUK i RYCHTER 2003).

W wyniku oddziaływania ROS, w białkach utlenianiu ulegają określone reszty aminokwasowe m.in. Cys i metionina (Met). ROS

powodują utlenianie grupy $-SH$ w Cys do mostków disiarczkowych. Cys może też być przekształcana do kwasu sulfinowego cysteiny ($R-SO_2H$) z wytworzeniem metabolitu pośredniego, kwasu sulfenowego cysteiny ($R-SO_3H$). Reszta Met ulega odwracalnemu pojedynczemu lub podwójnemu utlenianiu do sulfotlenku i sulfonu metioniny (MØLLER i współaut. 2007, REINDERS i SICKMANN 2007). Nieodwracalną modyfikacją białek przez ROS jest utlenianie reszt tryptofanowych (Trp) do N-formylokynureniny (NFK) (MØLLER i współaut. 2007). Analiza białek wyizolowanych z mitochondriów ziemniaka (*Solanum tuberosum*) i ryżu (*Oryza sativa*), przeprowadzona metodą spektrometrii masowej, pozwoliła na zidentyfikowanie szeregu enzymów podlegających takim modyfikacjom. Obecnie uważa się, że utlenianie reszt aminokwasów w białkach przez ROS nie jest szkodliwe, ale raczej stanowi potranslacyjną zmianę ich aktywności (MØLLER i współaut. 2007). Jedną z takich najważniejszych modyfikacji jest utlenianie białek, będące najprawdopodobniej procesem nieodwracalnym. Utlenianie w białkach reszt aminokwasowych: argininy (Arg), histydy (His), lizyny (Lys), prolina (Pro), treoniny (Thr) i tryptofanu (Trp) powoduje powstawanie wolnych grup karbonylowych ($C=O$). Białka wiążące jony metali przejściowych są zdecydowanie bardziej narażone na karbonylację, gdyż rodniki OH (powstałe w wyniku redukcji H_2O_2) reagują z aminokwasami znajdującymi się w ich najbliższym sąsiedztwie (MØLLER i współaut. 2007). Analiza poziomu utleniania białek występujących w peroksysomach obielma kiełkujących nasion rącznika pospolitego (*Ricinus communis*) wykazała występowanie grup karbonylowych w stężeniu około 4 nmol w mg białka całkowitego (NGUYEN i DONALDSON 2005). Ponadto obserwowano ponad 8-krotny wzrost ilości grup utlenionych po dwu godzinnej inkubacji tych białek w obecności askorbinianu i jonów miedzi. Warunki sprzyjające utlenianiu aminokwasów umożliwiły identyfikację białek najbardziej podatnych na omawiane działanie ROS. Zaobserwowano zatem około 80% hamowanie aktywności CAT oraz 50–100% hamowanie aktywności syntazy jabłczanowej, liazy izocytrynianowej i dehydrogenazy jabłczanowej (NGUYEN i DONALDSON 2005). Nowsze badania wykazały, że cząsteczki CAT i syntazy jabłczanowej podlegają utlenianiu w kilku różnych miejscach (ANAND i współaut. 2009). Powstawanie grup karbonylowych w białkach pod wpływem działania ROS stano-

wi obecnie powszechnie stosowany znacznik w badaniach nad utlenianiem białek (JOB i współaut. 2005). Metodą pozwalającą na oznaczanie grup karbonylowych jest ich kowalencyjne wiązanie z 2,4-dinitrofenylohydrazyną (DNPH). Powstaje wówczas stabilny produkt 2,4-dinitrofenylohydrazon, który można oznaczać spektrofotometrycznie lub znakować za pomocą przeciwciał. Jednakże ostatnie doniesienia wskazują na mniejszą niż początkowo sądzono specyficzność tej metody. Okazuje się, że DNPH reaguje również ze zmodyfikowanymi resztami Cys, tworząc pochodne hydrazonowe (DALLE-DONNE i współaut. 2009).

Badania związane z karbonylacją białek w nasionach prowadzone są przez grupę badawczą pod kierunkiem Dominique i Claudette Job (Laboratoire mixte CNRS / Bayer Crop Science, Lyon). Wykazano, że w czasie dojrzewania nasion rzodkiewnika następuje gromadzenie białek zapasowych, strukturalnych, enzymatycznych i transkryptów białkowych. Proces desykcji nasion powoduje wzrost stężenia ROS w komórkach i jednocześnie stopniowe obniżanie aktywności enzymów regulujących zawartość tych reaktywnych związków. Takie warunki fizjologiczne sprzyjają intensywnemu procesowi utleniania białek. Ilość białek karbonylowanych dodatkowo może ulec zwiększaniu w trakcie imbibicji (pierwszej fazy kiełkowania nasion). Analizy proteomiczne udowodniły nie tylko selektywność procesu karbonylacji, ale i konieczność jego występowania na różnych etapach rozwoju nasion. Badania te pozwoliły na uzyskanie obrazu zmian ilościowych i jakościowych białek utlenionych, podczas dojrzewania i kiełkowania nasion. W trakcie dojrzewania nasion utlenianiu ulegały głównie białka zapasowe zaliczane do β 11–12S globulin, u rzodkiewnika zwane krucyferynami. Grupy karbonylowe wykryto w obu podjednostkach krucyferyny, chociaż stopień karbonylacji dla poszczególnych podjednostek był różny. Najprawdopodobniej modyfikacja ta ma związek z późniejszym, szybszym wykorzystaniem tych białek jako źródła azotu do syntezy innych związków (JOB i współaut. 2005). Poza białkami zapasowymi, utlenianiu w czasie dojrzewania nasion ulegają także białka szoku cieplnego (ang. heat shock proteins, HSP) białka późnej embriogenezy (ang. late-embryogenesis-abundant, LEA), enolaza i białko podlegające indukcji kwasem jasmonowym (JA) (JOB i współaut. 2005). Interesujące jest, że w czasie kiełkowania nasion

rzodkiewnika wykazano wzrost karbonylacji większej podjednostki karboksylazy/oksygenazy rybulozo-1,5-bisfosforanu (RuBisCO), białek HSP, białek chaperonowych, białek należących do rodziny 1 hydrolaz glikozydowych, cytozolowej GAPDH, aminopeptydaz, podjednostki β F_0F_1 -ATPazy i wielu czynników transkrypcyjnych (JOB i współaut. 2005). Karbonylacja białek podczas kiełkowania nasion została wykazana również w zarodkach słonecznika (ORACZ i współaut. 2007), w których nieodwracalnemu utlenianiu przez ROS ulegały dehydrogenaza alkoholowa, enolaza, hydrolaza epoksydowa oraz czynnik wzrostu 2. Jednocześnie karbonylacja tych białek związana była z ustąpieniem spoczynku zarodków słonecznika.

ROS mogą brać udział również w powstawaniu reaktywnych form elektrofilowych oksylipin (ang. reactive electrophilic oxylipins, RES). Związki te jak wykazano dla rzodkiewnika powstają nie tylko w wyniku utleniania wielonienasyconych kwasów tłuszczowych (ang. polyunsaturated fatty acid, PUFA) błon komórkowych, ale również utleniania wolnych kwasów tłuszczowych. RES reagują z białkami oraz kwasami nukleinowymi, zatem w wyższych stężeniach są toksyczne (MUELLER i BERGER 2009). Z drugiej strony, stwierdza się stałe, niewielkie stężenie RES nawet w tkankach i komórkach nie poddanych działaniu czynników stresowych. RES zmieniają metabolizm m.in. na drodze indukcji ekspresji genów, w tym również tych, które uczestniczą w detoksykacji ROS, jak np. transferaza S-glutationowa. Poza tym RES modyfikują aktywność białek bogatych w grupy tiolowe (MUELLER i BERGER 2009).

W czasie dojrzewania nasion niewrażliwych na desykację (nasiona ortodoksyjne) dochodzi do zmiany aktywności enzymów zaangażowanych w usuwanie ROS. Następuje spadek aktywności SOD i wzrasta akumulacja ROS w tkankach zarodka (BAILLY i współaut. 2008). Jednocześnie, wzrost aktywności CAT zabezpiecza przed zbyt wysokim stężeniem ROS. Długotrwałe przechowywanie nasion lub/i niewłaściwe warunki (temperatura, wilgotność powietrza) prowadzą do obniżenia zdolności do kiełkowania. Jest to związane m.in. ze zmianą aktywności biologicznej, a w konsekwencji również nagromadzeniem ROS w nasionach. Pomimo silnego odwodnienia, nawet niewielka ilość wody znajdująca się w suchych nasionach może sprzyjać powstawaniu ROS, głównie na drodze nieenzymatycznego samoutleniania niektórych związków

organicznych, w tym lipidów (BAILLY i współaut. 2008). Mimo niskiej aktywności metabolicznej w suchych nasionach może dochodzić do degradacji białek i DNA w wyniku nagromadzenia się ROS. Wzrost stężenia ROS związany jest z serią reakcji chemicznych, tzw. reakcji Amadori-Maillard zainicjowanych obecnością cukrów redukujących i reszt aminokwasów o charakterze zasadowym. W wieloetapowym łańcuchu reakcji Amadori-Maillard następuje uszkodzenie struktury białek, hydroliza cukrów oraz uszkodzenie błon komórkowych, co sprzyja procesom starzenia nasion (BAILLY i współaut. 2008).

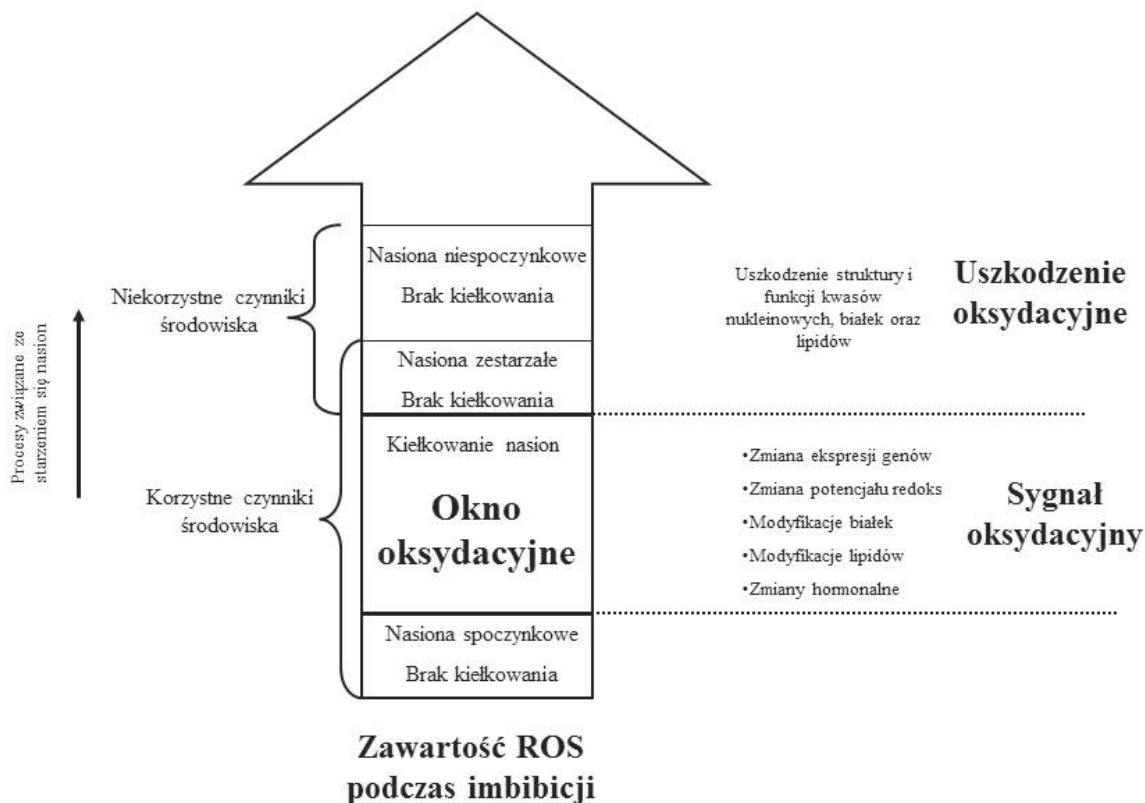
Oprócz toksycznej roli ROS należy szczególnie podkreślić pozytywne znaczenie tych związków w fizjologii nasion. Kiełkowanie nasion wielu gatunków roślin jest stymulowane przez H_2O_2 . Regulacji takiej podlegają m.in. spoczynkowe nasiona jęczmienia (*Avena sativa*) (BAILLY i współaut. 2008), ryżu (NAREDO i współaut. 1998) i zarodki jabłoni (BOGATEK i współaut. 2003). W pracach prowadzonych na kiełkujących nasionach soi zaobserwowano wzrost stężenia ROS, zarówno w osi zarodkowej jak i w okrywie nasiennej. Wzmożoną syntezę H_2O_2 w osiach zarodkowych i okrywach nasiennych wykazano również w przypadku kiełkujących nasion rzodkwi (SCHOPFER i współaut. 2001), osiach zarodkowych słonecznika (ORACZ i współaut. 2009) oraz w osiach zarodkowych jabłoni (GNIAZDOWSKA i współaut. 2010a). Wzrost stężenia ROS zaobserwowano również w osiach zarodkowych łubinu tuż po przebicciu okrywy nasiennej (GARNCZARSKA i współaut. 2009). Utlenianie specyficznych polisacharydów ściany komórkowej nasion pieprzycy siewnej (*Lepidium sativum*) przez OH stymulowało ich kiełkowanie (MÜLLER i współaut. 2009), podobnie jak wzrost elongacyjny koleoptyli siewek kukurydzy. Ponadto działanie ROS na rozluźnianie struktury ścian komórkowych było tkankowo-specyficzne i podlegało hormonalnej regulacji przez gibereliny (GA) i ABA (MÜLLER i współaut. 2009). Wzrost stężenia ROS podczas kiełkowania zarodków słonecznika nie przyczyniał się do nagromadzenia malonyldialdehydu (MDA) – wskaźnika peroksydacji lipidów (ORACZ i współaut. 2009), stąd autorzy sugerują, że główna rola ROS w tym przypadku związana jest z funkcją informacyjną. Zmianę zawartości ROS stwierdzono nie tylko *in situ*, ale również w podłożu bezpośrednio otaczającym kiełkujące nasiona soi (FRAHRY i SCHOPFER 1998). Także podczas prowadzenia kultu-

ry zarodków jabłoni zaobserwowano wzrost stężenia ROS (H_2O_2) w podłożu (Gniazdowska i współaut. 2010a). Proces ten może być zatem wskaźnikiem ustępowania spoczynku. Niewątpliwie, wydzielanie ROS do środowiska zewnętrznego przez kiełkujące nasiona i rozwijające się siewki wzmagają się podczas ataku patogenów, co jest związane z antyseptycznym działaniem tych reaktywnych związków (Frahry i Schopfer 1998, Schopfer i współaut. 2002). Jednakże wykazano, że korzenie wydzielają do podłoża H_2O_2 , nawet mimo braku patogenów, czy innych elicytorów (Frahry i Schopfer 1998).

Warunki hipoksji występujące w nasionach podczas pierwszych etapów kiełkowania przyczyniają się do nagromadzenia ROS. Ograniczony dostęp tlenu do zarodka, spowodowany obecnością okryw nasiennych, powoduje zmniejszenie aktywności enzymów uczestniczących w detoksykacji ROS (Bogatek i współaut. 2003). Po przebicciu ł-

piny nasiennej obserwuje się wzrost zawartości ROS, związany ze stymulacją aktywności mitochondrialnej, co w skrajnych przypadkach może prowadzić nawet do obumarcia kiełkujących nasion (Garnczarska i współaut. 2009).

Istnieje wiele hipotez wyjaśniających udział ROS w usuwaniu spoczynku i stymulacji kiełkowania nasion. Bailly i współaut. (2008) zaproponowali model tzw. „okna oksydacyjnego”, opisujący krytyczne wartości ROS determinujące dalszy los nasion. Zbyt wysokie stężenie ROS (powyżej wartości określonej jako okno oksydacyjne) powoduje uszkodzenie komórek, spadek wigoru nasion tj. kiełkowanie ulega zahamowaniu lub/i wykształcają się nieprawidłowe siewki (Ryc. 1). Stopniowo nasiona ulegają starzeniu lub nawet dochodzi do śmierci w wyniku licznych uszkodzeń składników komórkowych. Z drugiej strony nasiona są zdolne do kiełkowania dopiero gdy stężenie ROS w ich komórkach



Ryc. 1. Model okna oksydacyjnego opisujący podwójną funkcję ROS w fizjologii nasion.

Wzrost zawartości ROS w nasionach podczas imbibicji przedstawia strzałka podzielona na fragmenty reprezentujące konkretne stężenie tych reaktywnych związków. Okno oksydacyjne odpowiada takiemu stężeniu ROS, które musi zostać osiągnięte aby nasiona mogły rozpocząć proces kiełkowania. Poniżej tego stężenia ROS, nasiona pozostają w stanie spoczynku. Zbyt wysokie stężenie ROS (powyżej okna oksydacyjnego) powstałe na skutek procesów starzenia bądź niekorzystnych warunków środowiskowych uniemożliwia kiełkowanie nasion. Wg. (Bailly i współaut. 2008) zmodyfikowany.

osiągnię progową wartość. Poniżej tego krytycznego stężenia ROS nasiona nie kiełkują i pozostają w stanie spoczynku. Jak wykazano dla nasion kasztana jadalnego (*Castanea sativa*), należących do nasion wrażliwych na odwodnienie (ang. recalcitrant), zewnątrzkomórkowa produkcja ROS zwiększa tolerancję na niewielką desykację (ROACH i współaut. 2010). Żywotność odwodnionych w niewielkim stopniu (do 38% zawartości wody) całych nasion oraz izolowanych z nich osi zarodkowych wzrastała po podaniu H_2O_2 (ROACH i współaut. 2010).

Wielokrotnie wykazano, że obniżone kiełkowanie nasion w warunkach odbiegających od optymalnych jest związane z dodatkową produkcją i akumulacją ROS w komórkach. Nagromadzanie ROS może powodować hamowanie kiełkowania w niesprzyjających warunkach środowiskowych. Wrażliwe na chłód nasiona soi, poddane imbibicji w 5°C, wykazywały intensywną peroksydację lipidów. Hamowanie kiełkowania związane z nadmiernym utlenianiem tłuszczu przez nagromadzanie ROS było wynikiem działania niskiej temperatury jako czynnika stresowego (POSMYK i współaut. 2001). Imbibicja nasion słonecznika w zbyt wysokiej temperaturze (powyżej 40°C) również prowadziła do wzrostu zawartości ROS oraz obniżenia kiełkowania (CORBINEAU i współaut. 2002). Obecność w środowisku specyficznych związków chemicznych, allelozwiązków, może także ograniczać kiełkowanie nasion różnych gatunków roślin w wyniku nadmiernej produkcji i akumulacji ROS w ich tkankach. Kiełkowanie nasion gorczycy białej (*Sinapis alba*) było hamowane allelozwiązkami pochodzącymi z liści słonecznika. Efekt ten był wynikiem zwiększonej akumulacji ROS, zwiększonej przepuszczalności błon komórkowych i peroksydacji lipidów (BAILLY i współaut. 2008).

Prowadzono również badania nad interakcją pomiędzy ROS i ABA w regulacji spoczynku nasion; pod wpływem działania H_2O_2 zahamowaniu ulega nie tylko droga sygnału wywołanego ABA. Traktowanie spoczynkowych nasion jęczmienia (*Hordeum vulgare*) donorami ROS prowadziło także do spadku stężenia ABA w tkankach (WANG i współaut. 1998). BOGATEK

i współaut. (2003) wykazali, że poddanie zarodków jabłoni działaniu czynników zwiększających stężenie ROS w komórkach powoduje spadek zawartości ABA. Traktowanie spoczynkowych nasion rzodkiewnika H_2O_2 powodowało stymulację ekspresji genów *CYP707A* związanych z katabolizmem ABA (LIU i współaut. 2010). Z drugiej strony podanie ABA znosiło stymulujący efekt działania H_2O_2 w przypadku kiełkujących nasion grochu (*Pisum sativum*) (BARBA-ESPIN i współaut. 2010). ROS poza oddziaływaniem z ABA, mogą współdziałać z innymi fitohormonami uczestniczącymi w regulacji procesu kiełkowania nasion, takimi jak GA, etylen czy brasinosteroidy (BARBA-ESPIN i współaut. 2010). Wykazano, że poza przyspieszaniem degradacji ABA, H_2O_2 stymuluje biosyntezę GA (wzrost ekspresji genów *GA3ox* i *GAu20ox*) podczas kiełkowania nasion rzodkiewnika (LIU i współaut. 2010). ROS stymulują wydzielanie etylenu działając na jego bezpośredni prekursor – ACC (kwas 1-aminocyklopropanokarboksylowy). W czasie pierwszych faz kiełkowania zarodków jabłoni obserwuje się jednoczesny wzrost stężenia ROS i spadek stężenia ACC przy niskiej aktywności oksydazy ACC (ACO) (GNIAZDOWSKA i współaut. 2010b). Przekształcanie ACC do etylenu pod wpływem działania ROS może stanowić kolejny mechanizm regulacji usuwania głębokiego spoczynku nasion. Udział ROS w etylenowym szlaku transdukcji sygnału został potwierdzony przez wyniki badań ORACZ i współaut. (2009). Autorzy wykazali wzrost ekspresji genów *ETR2* i *ERF1* w kiełkujących zarodkach słonecznika pod wpływem działania ROS. Zwiększona transkrypcja ERF1, czynnika odpowiedzi na etylen, w zarodkach słonecznika była również obserwowana pod wpływem działania HCN i samego etylenu. Wyniki te wskazują na powiązanie ROS, HCN i etylenu w ustępowaniu spoczynku nasion (ORACZ i współaut. 2009).

Rozwój nowych metod badawczych pozwala na identyfikację w komórkach coraz większej liczby związków, które podlegają pośrednim bądź bezpośrednim modyfikacjom przez ROS. Prowadzi to do lepszego poznania mechanizmów związanych z powstawaniem, usuwaniem spoczynku i regulacją kiełkowania nasion.

REGULACJA STĘŻENIA ROS

Równolegle z produkcją ROS, aktywacji ulega system modulujący ich stężenie w komórkach roślinnych. System ten można po-

dzielić na: enzymatyczny i nieenzymatyczny. Do pierwszego z nich zalicza się: dysmutazę ponadtlenkową (SOD, EC 1.15.1.1), katalazę

(CAT, EC 1.11.1.6), enzymy zaangażowane w cykl glutationowo-askorbinianowy (zwany też cyklem Halliwell-Asada): peroksydazę askorbinianową (APX, EC 1.11.1.11), reduktazę monodehydroaskorbinianową (MDHAR, EC 1.6.5.4), reduktazę dehydroaskorbinianu (DHAR, EC 1.8.5.1) oraz reduktazę glutationową (GR, EC 1.6.4.2) (BARTOSZ 2004, BAILLY i współaut. 2008). Ponadto enzymami zaangażowanym w metabolizm ROS są peroksydazy (POx, EC 1.11.1.7) w tym głównie peroksydaza glutationowa (GPX, EC 1.11.1.9) (CHANG i współaut. 2009). W przypadku mitochondrium, enzymem regulującym stężenie ROS jest alternatywna oksydaza (AOX), która katalizuje redukcję O_2 z pominięciem kompleksu III i IV szlaku cytochromowego (JUSZCZUK i RYCHTER 2003). Reduktaza benzochinonu (BR; EC 1.6.5.7) stanowi kolejny enzym regulujący stężenie ROS w komórkach roślin. Zaliczany jest on do rodziny oksydoreduktaz, bierze udział w przenoszeniu dwóch elektronów z NAD(P)H na flawiny z pominięciem wytworzenia wolnych rodników. Jak wykazano dla siewek grochu traktowanie ich H_2O_2 powodowało wzrost aktywności tego enzymu (BARBA-ESPIN i współaut. 2010).

Do nieenzymatycznego systemu modulującego stężenie ROS zalicza się głównie drobnocząsteczkowe zmiatacze ROS, rozpuszczalne w wodzie: askorbinian i glutation oraz rozpuszczalne w tłuszczach, głównie tokoferole i karotenoidy (BARTOSZ 2004). Antyoksydacyjne działanie tokoferoli związane jest przede wszystkim z usuwaniem wtórnych rodników organicznych i przerywaniem łańcuchowych reakcji wolnorodnikowych lipidów (BLOKHINA i współaut. 2003). Innymi cząsteczkowymi składnikami systemu detoksykacji ROS są: polifenole, flawonoidy, antocyjany i peroksyredoksyny (PER), homologi tioredoksyn (AALEN 1999). PER redukują $\cdot OH$ i H_2O_2 oraz redukują mostki disiarczkowe w białkach ochraniając je przed utlenieniem. Związki te, gromadzone są w nasionach w czasie dehydratacji m.in. w celu ochrony materiału genetycznego. PER biorą także udział w regulacji stężenia ROS podczas wczesnych faz kiełkowania nasion (imbibicja) (AALEN 1999). W usuwaniu ROS uczestniczą również dehidryny, białka należące do grupy białek LEA, które biorą udział w reakcjach tolerancji na odwodnienie w czasie dojrzewania nasion różnych gatunków roślin, m.in. buku zwyczajnego (*Fagus sylvatica*). Podobną rolę ochronną pełnią białka HSP (KALEMBA i PUKACKA 2008). Innymi białkami biorącymi

udział w metabolizmie ROS są białka zdolne do redukcji dehydroaskorbinianu (DHA). Aktywność tych białek zanotowano zarówno w zarodkach, jak i endospermie nasion sosny pinii (*Pinus pinea*) oraz w zarodkach pszenicy (*Triticum durum*) i bobu (*Vicia faba*) (TOMMASI i współaut. 2002). Białka redukujące DHA występują tylko we wczesnych etapach kiełkowania, zwłaszcza nasion niewrażliwych na desykację, co koreluje z początkowym brakiem aktywności APX. Białka redukujące DHA powodują wzrost stężenia AsA (gromadzonego głównie jako DHA), który stanowi niezbędny substrat do dalszych procesów fizjologicznych zachodzących podczas kiełkowania nasion (TOMMASI i współaut. 2002). Głównym, cząsteczkowym antyutleniaczem nasion typu ortodoksyjnego jest glutation, w przeciwieństwie do nasion wrażliwych na odwodnienie (typu *recalcitrant*) (TOMMASI i współaut. 2002). Najnowsze badania sugerują, że melatonina, hormon syntetyzowany w szyszynce, regulujący rytmy okołodobowe u ssaków, pełni funkcję modulującą stężenie ROS również w komórkach roślinnych, także w kiełkujących nasionach (JANAS i współaut. 2005). Ponadto, główne źródło fosforu w nasionach, kwas fitynowy (sześćfosforan inozytolu), ma zdolność do chelatowania Fe^{3+} , zatem ogranicza produkcję ROS. Ostatnio wykazano, że u mutantów (*lpa1-241*) kukurydzy o obniżonej zawartości kwasu fitynowego w nasionach obserwowano niższą zdolność kiełkowania m.in. w wyniku nagromadzenia się ROS (DORIA i współaut. 2009).

CZĄSTECZKOWY SYSTEM REGULACJI ROS W NASIONACH

Askorbinian (witamina C) występuje w komórkach w dwóch podstawowych formach: zredukowanej, jako kwas L-askorbinowy (AsA), oraz utlenionej, jako rodnik monodehydroaskorbinianu i monodehydroaskorbinian (DHA) (SMIRNOFF 2000). W nasionach typu *recalcitrant*, jak i typu przejściowego główną formą askorbinianu jest AsA. Ponadto, jak wykazano dla nasion buku zwyczajnego, głównym miejscem akumulacji AsA jest oś zarodkowa (PUKACKA i RATAJCZAK 2005). W czasie dojrzewania nasion typu ortodoksyjnego początkowa wysoka zawartość AsA spada, a wzrasta stężenie DHA, co ma najprawdopodobniej związek z utrzymywaniem ich metabolizmu na minimalnym poziomie (TOMMASI i współaut. 2002, GARNCZARSKA i współaut. 2009). Askorbinian (głównie AsA) przede wszystkim pełni funkcję

antyoksydacyjną (bezpośrednio i pośrednio), ale jest również kofaktorem wielu enzymów, zwłaszcza tych, które zawierają jony metali przejściowych (CONKLIN i współaut. 2006). Stanowi donor elektronów w reakcjach katalizowanych przez APX i stymuluje ekspresję genów kodujących APX (ASADA 1999), uczestniczy w reakcjach regeneracji α -tokoforoli i β -karotenu z ich postaci rodnikowych (SHARMA i BUETTNER 1993, AZZI i STOCKER 2000), reguluje potencjał redoks oraz wraz z glutationem podziały komórkowe (POTTERS i współaut. 2002). Askorbinian stymuluje również syntezę nukleotydów purynowych i pirydynowych (STASOLLA 2010). U mutantów (*vtc*) rzodkiewnika o obniżonej zdolności do syntezy askorbinianu obserwowano wzrost wrażliwości na ROS, związany z działaniem czynników stresowych (SMIRNOFF 2000, CONKLIN i współaut. 2006). Poza tym, askorbinian uczestniczy w regulacji wzrostu i różnicowania się komórek oraz w procesach związanych z rozwojem ściany komórkowej, wakuolizacją i wytwarzaniem korzeni (SMIRNOFF 2000, TOMMASI i współaut. 2002). Zatem synteza askorbinianu w zarodkach nasion zarówno typu ortodoksyjnego jak i wrażliwych na desykację jest konieczna do prawidłowego przebiegu procesów związanych z kiełkowaniem oraz wzrostem i rozwojem siewek (TOMMASI i współaut. 2002). Inkubacja nasion w roztworze askorbinianu stymuluje kiełkowanie halofitów, niwelując szkodliwe działanie nadmiaru soli w podłożu (KHAN i współaut. 2006). W nasionach, AsA stymuluje aktywność enzymów uczestniczących w syntezie niektórych fitohormonów między innymi takich jak: ACO (powodując wzrost syntezy etylenu), hydroksylazy GA i dioksygenazy 9-*cis*-epoksykarotenoidowej (związanej z metabolizmem ABA) (DE TULLIO i ARRIGONI 2003). Nie zawsze jednak AsA zmniejsza stężenie ROS. Przy obniżonej zawartości wody w tkankach AsA reagując z Fe^{3+} powoduje wzrost stężenia OH (DE TULLIO i ARRIGONI 2003).

Glutation (γ -Glu-Cys-Gly), to ważny magazyn reszt tiolowych w komórkach roślinnych. Występuje w dwóch postaciach: zredukowanej (GSH) i utlenionej (GSSG). W standardowych warunkach kiełkowania nasion dominującą formą glutationu jest forma zredukowana i stanowi ona ponad 90% ogólnej jego zawartości. Wykazano, że w suchych nasionach sosny pinii, należącej do nasion typu ortodoksyjnego, stężenie GSSG stanowi około 50% całkowitej zawartości glutationu i spada do około 4% podczas imbibicji (TOMMASI i współaut. 2002). Podobnie, w przypadku

nasion buku i łubinu w czasie dojrzewania wzrasta zawartość GSSG, przewyższając stężenie GSH (PUKACKA i RATAJCZAK 2005, GARNCZARSKA i współaut. 2009). Stwierdzono, że akumulacja GSSG w suchych nasionach może sprzyjać utrzymaniu głębokiego spoczynku, prawdopodobnie na skutek obniżania aktywności metabolicznej, w tym hamowania biosyntezy białek (TOMMASI i współaut. 2002). Począwszy od pierwszej fazy kiełkowania nasion typu ortodoksyjnego następuje gwałtowny wzrost stężenia GSH (TOMMASI i współaut. 2002). W nasionach GSH pełni funkcję ochronną w stosunku do białek narażonych na działanie stresu oksydacyjnego stabilizując grupy tiolowe aminokwasów. Stanowi on ponadto prekursor fitochelatyn (NOCTOR i współaut. 2002). GSH, poza regulacją stężenia ROS, umożliwia tolerowanie procesów związanych z desykacją w czasie dojrzewania nasion różnych gatunków roślin. GSH jest niezbędnym magazynem reszt Cys wykorzystywanych do biosyntezy białek podczas dojrzewania nasion rzodkiewnika (CAIRNS i współaut. 2006). Utrzymanie odpowiedniego stosunku GSH/GSSG podczas kiełkowania odpowiada za komórkową homeostazę potencjału redoks i uczestniczy w aktywacji ekspresji niektórych genów (NOCTOR i współaut. 2002). Istnieją również przesłanki świadczące o tym, że glutation reguluje aktywność mitotyczną komórek. Od jego stężenia zależy dalszy los komórki tj. wejście w fazę S (faza poprzedzająca mitozę), bądź w fazę G1 (MAY i współaut. 1998, POTTERS i współaut. 2002). GSH stanowi bezpośredni donor elektronów w reakcjach katalizowanych przez GPX. Uczestniczy on w reakcjach odtwarzania AsA z MDA, stymulując aktywność reduktazy dehydroaskorbinianowej (STASOLLA 2010).

Tokoferole (witamina E), to rozpuszczalne w lipidach cząsteczkowe antyoksydanty, posiadające amfipatyczny charakter, obecne we wszystkich roślinach oraz niektórych algach i cyjanobakteriach. Można wyróżnić cztery podstawowe typy tokoferoli: α , β , γ i δ , które różnią się między sobą ilością i miejscem podstawienia grup metylowych w pierścieniach chromanolu (SATTLER i współaut. 2004). Najwyższe stężenie tokoferoli obserwuje się w nasionach takich gatunków roślin jak pszenica, słonecznik i soja (AZZI i STOCKER 2000). Tokoferole, poza bezpośrednim reagowaniem z ROS, mogą neutralizować nadtlutki lipidów, a powstały w tej reakcji rodnik tokoferylowy przekształcany jest do formy wyjściowej przy udziale m.in. askorbi-

nianu (AZZI i STOCKER 2000, SATTLER i współaut. 2004). Zatem główną funkcją tokoferoli w nasionach jest ich ochronne działanie w stosunku do wielonienasyconych kwasów tłuszczowych przed szkodliwym działaniem ROS, poza tym regulują potencjał redoks w komórkach. Tokoferole przeciwdziałają procesom starzenia nasion co wykazano dla rzodkiewnika (SATTLER i współaut. 2004).

ENZYMATYCZNY SYSTEM REGULACJI ROS W NASIONACH

Dysmutazy (SOD) zalicza się do głównych enzymów uczestniczących w pierwszej kolejności w modulacji stężenia ROS (BARTOSZ 2004). Różne izoformy SOD mogą występować w różnych częściach komórki: w matriks mitochondrium, peroksosomach i glioksysomach – MnSOD (tetramer, zawierający mangan w centrum aktywnym, złożony z czterech podjednostek o masie cząsteczkowej około 20 kDa), w stromie chloroplastów – Cu,ZnSOD (homodimer zawierający miedź i cynk w centrum aktywnym, złożony z dwóch podjednostek o masie cząsteczkowej około 16 kDa), oraz izoforma zawierająca żelazo – FeSOD, a w cytozolu – Cu,ZnSOD (LEE i współaut. 2010). Wszystkie z wymienionych izoform SOD charakteryzuje różna wrażliwość na H_2O_2 i HCN. Izozym Cu,ZnSOD jest wrażliwa zarówno na H_2O_2 , jak i HCN, FeSOD jest wrażliwa tylko na H_2O_2 , a MnSOD jest odporna na oba inhibitory (BOWLER i współaut. 1994, BARTOSZ 2004, MØLLER i współaut. 2007). Nie wszystkie izoformy SOD wykazują taką samą aktywność katalityczną. Najbardziej aktywną jest izoforma Cu,ZnSOD. Aktywność SOD zależy od wieku i stadium fizjologicznego tkanek. W przypadku MnSOD najwyższą aktywność odnotowano w zarodkach rzodkiewnika i łubinu we wczesnych etapach ich rozwoju (GARNCZARSKA i współaut. 2009). Do konstytutywnych enzymów zalicza się Cu,ZnSOD obecną w cytozolu, a aktywność MnSOD podlega regulacji za pośrednictwem takich czynników jak tlen czy obecność innych silnych utleniaczy i jest związana z reakcją na stresy środowiskowe (BLOKHINA i współaut. 2003, BARTOSZ 2004). Przyspieszone starzenie nasion i hamowanie kiełkowania są konsekwencją ich przedłużonego przechowywania oraz niekorzystnych czynników środowiska. Nasiona transgenicznego tytoniu z nadekspresją genów kodujących Cu,ZnSOD i APX (w plastydach) charakteryzuje prawidłowy rozwój, lepsza żywotność podczas ich przedłużonego przechowywania i wyższa zdolność do kiełko-

wania w różnych warunkach środowiska (LEE i współaut. 2010).

Katalazy (CAT) są enzymami zaangażowanymi w metabolizm ROS. To tetrametry, które katalizują dwuetapową reakcję dysmutacji H_2O_2 do H_2O i O_2 (BARTOSZ 2004, MØLLER i współaut. 2007). Aktywność CAT nie wymaga obecności siły redukcyjnej, ale enzym ten ma niższe powinowactwo do substratu niż POx (FOYER i NOCTOR 2003). CAT należą do metalo-enzymów, w centrum aktywnym zawierają jony żelaza (Fe). Istnieją CAT, które, zamiast Fe, posiadają w centrum aktywnym mangan (Mn). Te CAT, zwane też pseudokatalazami, charakteryzuje niewrażliwość na HCN i azydki (YASUKISA i FRIDOVICH 1983). W nasionach rzodkiewnika CAT (zawierające Fe) są kodowane przez rodzinę genów (CAT-CAT8) (BAILLY i współaut. 2008). Główne miejsce występowania CAT to peroksosomy, w kiełkujących nasionach glioksysomy, ale w przypadku kukurydzy, izoformę CAT 3 wykryto w mitochondriach (SCANDALIOS i współaut. 1997). Ponadto w czasie dojrzewania nasion kukurydzy wykazano czasowo-przestrzennie zróżnicowaną ekspresję różnych izoform CAT (SCANDALIOS i współaut. 1997). W czasie dojrzewania nasion wyższa aktywność CAT zabezpiecza przed nadmiarem ROS powstających podczas dehydratacji. Sugeruje się, że CAT chronią nasiona przed procesem starzenia. Podczas kiełkowania obserwowany jest wzrost aktywności CAT. W tym przypadku enzym zabezpiecza nasiona przed nadmiernym wzrostem stężenia ROS związanym z rehydratacją tkanek i aktywacją metabolizmu. W kiełkujących nasionach słonecznika zaobserwowano wzrost aktywności GR i CAT tuż przed przebicciem okrywy nasiennych przez korzenie zarodkowe. Aktywność tych enzymów była związana z usuwaniem nadmiaru ROS i hamowaniem procesu peroksydacji lipidów (BAILLY i współaut. 2008). Podobny wzrost aktywności CAT w czasie kiełkowania zaobserwowano w przypadku nasion kukurydzy (SCANDALIOS i współaut. 1997), soi (PUNTARULO i współaut. 1988), rzodkiewnika (GALLARDO i współaut. 2001) i sosny zwyczajnej (*Pinus sylvestris*) (TOMMASI i współaut. 2002). Wysokie stężenie $O_2^{\cdot-}$ w komórkach nasion może hamować aktywność FeCAT. Zjawisko to jest związane ze specyficzną budową centrum aktywnego CAT, która warunkuje wysokie powinowactwo substratowe enzymu do małych cząsteczek, w tym również $O_2^{\cdot-}$. Nie jest wykluczone, że w takiej sytuacji główną izoformą CAT może być MnCAT niewrażliwa na azydki i HCN. Enzym ten wyizolowano z *Lactobacillus plantarum* i wykazano jego zde-

cydowanie wyższą stabilność w stosunku do izoformy, która zawiera Fe w centrum aktywnym (YASUKISA i FRIDOVICH 1983).

Reduktaza glutationowa (GR), to heterotetramer, składający się z podjednostek o masie cząsteczkowej około 60 kDa i 32 kDa (KALT-TORRES i współaut. 1984). GR katalizuje reakcję redukcji GSSG do GSH w obecności NADPH, który równocześnie ulega utlenieniu do NADP⁺. Wzrost aktywności GR jest zintegrowany ze zwiększoną produkcją NADPH (donor elektronów dla GR) w szlaku pentozofosforanowym (PPP), który również ulega aktywacji w czasie kiełkowania nasion (BOGATEK i współaut. 2003, BARBA-ESPIN i współaut. 2010). Aktywność GR w nasionach jest wysoka, stymulowana dodatkowo działaniem ROS. Wzrost aktywności GR obserwowano m.in. w czasie dojrzewania nasion różnych gatunków roślin, zwłaszcza typu ortodoksyjnego oraz podczas procesu kiełkowania (BOGATEK i współaut. 2003, BAILLY i współaut. 2008, GARNCZARSKA i współaut. 2009). Aktywność tego enzymu zlokalizowano głównie w osi zarodkowej, jak obserwowano w przypadku nasion buku (PUKACKA i RATAJCZAK 2005).

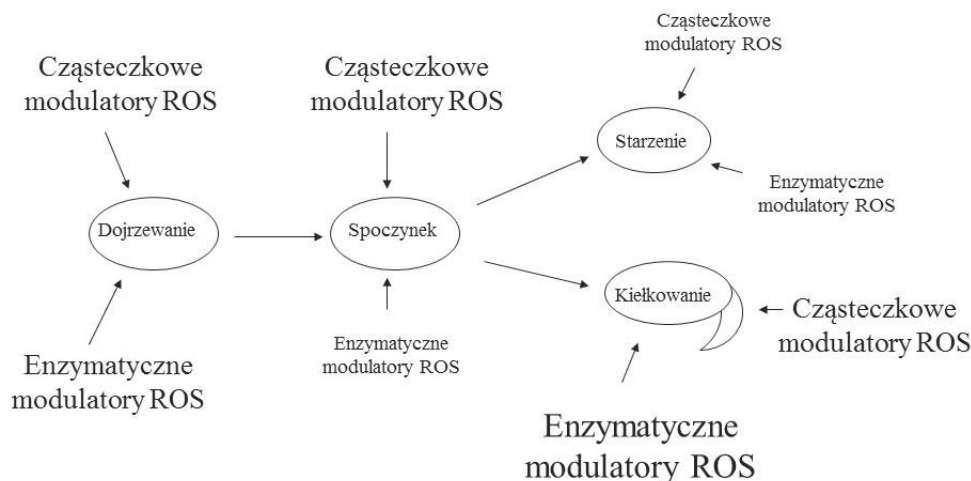
Peroksydazy (POx, EC1.11.1.7, obecnie nazywane Prxs), to grupa enzymów korzystających z różnych donorów elektronów, w zależności od katalizowanej reakcji. POx należące do klasy III peroksydaz występują głównie w wakuoli i ścianie komórkowej, biorą udział m.in. w reakcjach roślin na czynniki stresowe, rozluźnianiu struktur polisacharydów, biosyntezie lignin, degradacji IAA oraz w biosyntezie etylenu (ALMAGRO i współaut. 2009). Ich działanie związane jest nie tyle z usuwaniem nadmiaru ROS, ale raczej z produkcją tych związków. W centrum aktywnym POx będących glikoproteinami, znajdują się jony Fe. Osobną grupę POx (nie należących do glikoprotein), typowych zmiataczy ROS, stanowią: APX (wykorzystująca AsA jako donor elektronów), występująca głównie u roślin i GPX (wykorzystująca GSH jako donor elektronów), charakterystyczna dla ssaków (ASADA 1992).

Peroksydazy glutationowe (GPX EC1.11.1.9) rodzina enzymów katalizująca redukcję H₂O₂, organicznych nadtlenowodorów i lipidowych nadtlenowodorów, z udziałem GSH jako donora elektronów. GPX należą do tetramerów o masie cząsteczkowej około 80 kDa. Brak jonów żelaza w centrum aktywnym cząsteczki GPX odróżnia ją od innych POx (FOYER i NOCTOR 2003). Do niedawna uważano, że GPX występują głównie w organizmach zwierzęcych, dopiero pod koniec XX w. oznaczo-

no ich aktywność w tkankach roślinnych. Obecność GPX wykazano w cytozolu, chloroplastach, mitochondriach i retikulum endoplazmatycznym (CHANG i współaut. 2009). GPX nie jest enzymem konstytutywnym, stąd wynikają trudności w jego identyfikacji. Poza tym nie wyizolowano jeszcze roślinnej GPX, która posiadałaby w centrum aktywnym selenocysteinę, jak ma to miejsce u ssaków (FOYER i NOCTOR 2003). Z kiełkujących ziarniaków jęczmienia wyizolowano białko, które wykazywało typową, zależną od selenu aktywność GPX (HUANG i współaut. 1994). Indukcja syntezy GPX zachodzi w odpowiedzi na czynnik stresowy, w tym stres oksydacyjny. W przypadku zarodków jabłoni, czynnikiem stymulującym aktywność GPX-podobną było krótkotrwałe działanie związków stymulujących wytwarzanie ROS: HCN lub NO (KRASUSKA 2009). Biorąc pod uwagę wysokie stężenia H₂O₂ występujące w komórkach roślinnych, można stwierdzić, że aktywność GPX jest niższa w stosunku do całkowitej aktywności POx, a także niższa niż aktywność ssaczych GPX (FOYER i NOCTOR 2003). Uważa się, że GPX uczestniczą głównie w usuwaniu nadtlenu lipiidów i nadtlenków alkilowych, aczkolwiek mają również wysokie powinowactwo do H₂O₂ (CHANG i współaut. 2009).

Peroksydazy askorbinianowe (APX) katalizują reakcję redukcji H₂O₂ do H₂O, przy współudziale AsA jako donora elektronów (ASADA 1999). Enzymy te różnią się strukturalnie od POx, mimo iż zawierają protoporfirynę IX jako grupę prostetyczną (KARYOTOU i DONALDSON 2005). Poza występowaniem w chloroplastach i cytozolu, izoformę APX zlokalizowano w gliksysomach kiełkujących nasion takich gatunków roślin jak rącznik pospolity, dynia (*Cucurbita pepo*), bawełna (*Gossypium hirsutum*) czy szpinak (*Spinacia oleracea*) (KARYOTOU i DONALDSON 2005). APX chloroplastowe są zdecydowanie bardziej wrażliwe na brak askorbinianu niż izoformy cytozolowe tego enzymu (YOSHIMURA i współaut. 2000). Najwyższą aktywność APX obserwowano w przypadku zarodków miłorzębu (*Ginkgo biloba*) i buku, ponieważ właśnie w nich zawartość AsA jest największa (PUKACKA i RATAJCZAK 2005, TOMMASI i współaut. 2006).

Z jednej strony ROS w niższych stężeniach regulują procesy fizjologiczne nasion, z drugiej, wysoka zawartość tych związków może prowadzić nawet do śmierci organizmu. Nasiona wykształciły zatem dobrze funkcjonujący system modulujący ilość ROS w komórkach. Autorzy niniejszej pracy sugerują nie tyle działanie an-



Ryc. 2. Regulacja zawartości ROS w nasionach.

Zmiany zawartości metabolitów i aktywności enzymów systemu modulującego ROS w komórkach przedstawiono różnicując wielkość czcionki.

tyksoydacyjne związków wyżej omawianych, co głównie działanie regulujące aktualną zawartość ROS w nasionach. Odpowiednie stę-

żenie ROS umożliwia nasionom dojrzewanie, zapadanie w stan spoczynku bądź rozpoczęcie procesu kiełkowania (Ryc. 2).

PODSUMOWANIE

Zmiany stężenia ROS stanowią ważny element kaskady sygnałów determinujących przełamanie spoczynku, kiełkowanie lub starzenie nasion. Zastosowanie proteomiki i metabolomiki umożliwia poznanie mechanizmów działania ROS w nasionach. Coraz częściej podkreśla się pozytywną funkcję tych cząsteczek. Białka i/lub lipidy utlenione

powstające przy udziale ROS mogą być stosowane jako znaczniki jakości nasion, podobnie jak zmiana składu i zawartości związków regulujących stężenie ROS. Otwiera się dzięki temu możliwość poszukiwania specyficznych regulatorów ekspresji genów aktywowanych przez ROS powstające w określonych przedziałach komórkowych.

ROLA ROS W FIZJOLOGII NASION

Streszczenie

Reaktywne formy tlenu (ROS) pełnią w nasionach podwójną funkcję, są zarówno cząsteczkami sygnałowymi determinującymi kolejne etapy fizjologii nasion, jak też związkami toksycznymi, wywołującymi nieodwracalne zmiany strukturalne prowadzące do starzenia nasion. Zmiany stężenia ROS, szczególnie w osi zarodkowej, decydują o tym czy nasiona pozostaną w stanie spoczynku, czy też rozpocznie się proces kiełkowania, a następnie wzrost siewki. Zależność pomiędzy stężeniem ROS w nasionach, a realizacją kolejnych faz fizjologicznych opisuje model tzw. „okna oksydacyjnego”. Zbyt niskie stężenie ROS w osi zarodkowej sprawia, że nasiona pozostają w stanie spoczynku, nie kiełkują, z kolei nadmiernie wysokie stężenie ROS – toksyczne dla komórek prowadzi do nieodwracalnych zmian, których wynikiem jest starzenie nasion. Rozpoczęcie kiełkowania nasion jest możliwe gdy stężenie ROS osiąga wartość

optymalną dla tego procesu. Regulacyjna rola ROS związana jest z ich bezpośrednim i pośrednim działaniem na elementy strukturalne komórki. Ponadto modyfikacja metabolizmu nasion przez ROS zachodzi poprzez zmianę potencjału redoks i współdziałanie z reaktywnymi formami azotu (RNS), a także tworzenie innych cząsteczek sygnałowych np. reaktywnych elektrofiliowych oksylipin. Istotną funkcją ROS jest modyfikacja białek np. przez tworzenie grup karbonylowych w konkretnych resztach aminokwasowych. Tak zmodyfikowane białka, tzw. białka utlenione, wytworzone w określonym organelum komórkowym biorą udział w kaskadzie specyficznego sygnału wywołanego przez ROS. Zmiany stężenia ROS podlegają precyzyjnej kontroli za pośrednictwem systemu odpowiednich enzymów oraz cząsteczkowych antyoksydantów komórkowych. Z uwagi na jego funkcję regulującą stężenie ROS w komórkach sugeruje się,

aby dotychczasową nazwę „system antyoksydacyjny” zastąpić wyrażeniem „system modulujący stężenie ROS”, jako lepiej obrazującym jego prawdziwą rolę.

Niniejsza praca przedstawia najnowsze poglądy na temat roli ROS w regulacji rozwoju, kiełkowania i starzenia nasion.

ROLE OF ROS IN SEED PHYSIOLOGY

Summary

Reactive oxygen species (ROS) are involved in various aspects of seed physiology. They are generated during seed development, germination and ageing. Despite acting as toxic molecules ROS participate also in signal transduction pathways during different phases of seed development leading to modification in gene expression. In the present paper we explain the model of “oxidative window” describing dual role of ROS in seed physiology. ROS regulate seed metabolism *via* cellular redox status, interaction with reactive nitrogen species (RNS) and

initiation of generation of reactive electrophilic oxilipine species (RES). One of the key functions of ROS is oxidation of proteins. Oxyproteins generated in distinct compartment may act as ROS-mediated specific signal molecules. ROS content is precisely regulated by detoxifying enzymes and cellular antioxidant compounds responsible for ROS scavenging. Taking into account an informational function of ROS, it is suggested that expression “oxidative stress” should be replaced by the phrase “oxidative signal”.

LITERATURA

- AALLEN R. B., 1999. *Peroxioredoxin antioxidants in seed physiology*. Seed Sci. Res. 9, 285–295.
- ALMAGRO L., GÓMEZ ROS L.V., BELCHI-NAVARRO S., BRU R., BARCELÓ A. R., PEDRENÑO M. A., 2009. *Class III peroxidases in plant defence reactions*. J. Exp. Bot. 60, 377–390.
- ANAND P., KWAK Y., SIMHA R., DONALDSON R. P., 2009. *Hydrogen peroxide induced oxidation of peroxisomal malate synthase and catalase*. Arch. Biochem. Biophys. 491, 25–31.
- ASADA K., 1992. *Ascorbate peroxidase – a hydrogen peroxidase – scavenging enzyme in plants*. Physiol. Plant. 85, 235–241.
- ASADA K., 1999. *The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons*. Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 50, 601–639.
- AZZI A., STOCKER A., 2000. *Vitamin E: non-antioxidant roles*. Prog. Lipid Res. 39, 231–255.
- BAILLY C., EL-MAAROUF-BOUTEAU H., CORBINEAU F., 2008. *From intracellular signaling networks to cell death: the dual role of reactive oxygen species in seed physiology*. C. R. Biol. 331, 806–814.
- BARBA-ESPIN G., DIAZ-VIVANCOS P., CLEMENTE-MORENO M. J., ALBACETE A., FAIZE L., FAIZE M., PÉREZ-ALFONSO F., HERNÁNDEZ J. A., 2010. *Interaction between peroxide and plant hormones during germination and the early growth of pea seedlings*. Plant Cell Environ. 33, 981–994.
- BARTOSZ G., 2004. *Druga twarz tlenu. Wolne rodniki w przyrodzie*. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa.
- BIENERT G. P., MÖLLER A. L. B., KRISTIANSEN K. A., SCHULZ A., MÖLLER I. M., SCHJOERRING J. K., JAHN T. P., 2007. *Specific aquaporins facilitate the diffusion of hydrogen peroxide across membranes*. J. Biol. Chem. 282, 1183–1192.
- BLOKHINA O., VIROLAINEN E., FAGERSTEDT K. V., 2003. *Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review*. Ann. Bot. 91, 179–194.
- BOGATEK R., GAWROŃSKA H., ORACZ K., 2003. *Involvement of oxidative stress and ABA in CN-mediated elimination of embryonic dormancy in apple* [W:] *The Biology of Seeds: Recent Research Advances*. NICOLAS G., BRADFORD K. J., CÔME D., PRITCHARD H. W. (red.). CABI Publishing, 211–216.
- BOLWELL G. P., BINDSCHEDLER L. V., BLEE K. A., BUTT V. S., DAVIES D. R., GARDEM S. L., GERRISH C., MINIBAYEVA F., 2002. *The apoplastic oxidative burst in response to biotic stress in plants: a three-component system*. J. Exp. Bot. 53, 1367–1376.
- BOWLER C., VAV CAMP W., VAN MONTAGU M., INZÈ D., 1994. *Superoxide dismutase in plants*. Crit. Rev. Plant Sci. 13, 199–218.
- CAIRNS N. G., PASTERNAK M., WACHTER A., COBBETT C. S., MEYER A. J., 2006. *Maturation of Arabidopsis seeds is dependent on glutathione biosynthesis within the embryo*. Plant Physiol. 141, 446–455.
- CAROL R. J., DOLAN L., 2006. *The role of reactive oxygen species in cell growth: lessons from root hairs*. J. Exp. Bot. 57, 1829–1834.
- CHANG C. C. C., ŚLEZAK I., JORDA L., SOTNIKOV A., MELZER M., MISZALSKI Z., MULLINEAUX P. M., PARKER J. E., KARPINSKA B., KARPINSKI S., 2009. *Arabidopsis chloroplastic glutathione peroxidases play a role in cross talk between photooxidative stress and immune responses*. Plant Physiol. 150, 670–683.
- CHEN S.-X., SCHOPFER P., 1999. *Hydroxyl-radical production in physiological reactions: a novel function of peroxidase*. Eur. J. Biochem. 260, 726–735.
- CÔME D., CORBINEAU F., 1989. *Some aspects of metabolic regulation of seed germination and dormancy*. [W:] *Recent advances in the development and germination of seeds*. TAYLORSON R. B. (red.). New York, Plenum Press, 165–179.
- CONKLIN P. L., GATZEK S., WHEELER G. L., DOWDLE J., RAYMOND M. J., ROLINSKI S., ISUPOV M., LITTECHILD J. A., SMIRNOFF N., 2006. *Arabidopsis thaliana VTC4 encodes L-galactose-1-P phosphatase, a plant ascorbic acid biosynthetic enzyme*. J. Biol. Chem. 281, 15662–15670.
- CORBINEAU F., GAY-MATHIEU C., VINEL D., CÔME D., 2002. *Decrease in sunflower (Helianthus annuus L.) seed viability caused by high temperature as related to energy metabolism, membrane damage and lipid composition*. Physiol. Plant. 116, 489–496.
- CORPAS F. J., BARROSO J. B., DEL RÍO L. A., 2001. *Peroxisomes as a source of reactive oxygen species and nitric oxide signal molecules in plant cells*. Trends Plant Sci. 6, 145–150.
- DALLE-DONNE I., CARINI M., ORIOLE M., VISTOLI G., REGAZZONI L., COLOMBO G., ROSSI R., MILZANI A.,

- ALDINI G., 2009. *Protein carbonylation: 2,4-dinitrophenylhydrazine reacts with both aldehydes/ketones and sulfenic acids*. Free Rad. Biol. Med. 46, 1411–1419.
- DEL RÍO L. A., CORPAS F. J., SANDALIO L. M., PALMA J. M., GÓMEZ M., BARROSO J. B., 2002. *Reactive oxygen species, antioxidant systems and nitric oxide in peroxisomes*. J. Exp. Bot. 53, 1255–1272.
- DESIKAN R., MACKERNES S. A. H., HANCOCK J. T., NEILL S. J., 2001. *Regulation of the Arabidopsis transcriptome by oxidative stress*. Plant Physiol. 127, 159–172.
- DE TULLIO M. C., ARRIGONI O., 2003. *The ascorbic acid system in seeds: To protect and to serve*. Seed Sci. Res. 13, 249–260.
- DORIA E., GALLESCHI L., CALUCCI L., PINZINO C., PILU R., CASSANI E., NIELSEN E., 2009. *Phytic acid prevents oxidative stress in seeds: evidence from a maize (Zea mays L.) low phytic acid mutant*. J. Exp. Bot. 60, 967–978.
- EDERLI L., REALE L., MADEO L., FERRANTI F., GEHRING C., FORNACIARI M., ROMANO B., PASQUALINI S., 2009. *NO release by nitric oxide donors in vitro and in planta*. Plant Physiol. Biochem. 47, 42–48.
- FOREMAN J., DEMIDCHIK V., BOTHWELL J. H., MYLONA P., MIEDEMA H., TORRES M. A., LINSTAD P., COSTA S., BROWNLEER C., JONES J. D. G., DAVIES J. M., DOLAN L., 2003. *Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth*. Nature 422, 442–446.
- FOYER C. H., NOCTOR G., 2003. *Redox sensing and signaling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria*. Physiol. Plant. 119, 355–364.
- FOYER C. H., NOCTOR G., 2005. *Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological responses*. Plant Cell 17, 1866–1875.
- FRAHRY G., SCHOPFER P., 1998. *Hydrogen peroxide production by roots and its stimulation by exogenous NADH*. Physiol. Plant. 103, 395–404.
- GALLARDO K., JOB C., GROOT S. P. C., PUYE M., DEMOL H., VANDEKERCKHOVE J., JOB D., 2001. *Proteomic analysis of Arabidopsis seed germination and priming*. Plant Physiol. 126, 835–848.
- GARNCZARSKA M., BEDNARSKI W., JANCELEWICZ M., 2009. *Ability of lupine seeds to germinate and to tolerate desiccation as related to changes in free radical level and antioxidants in freshly harvested seeds*. Plant Physiol. Biochem. 47, 56–62.
- GNIAZDOWSKA A., KRASUSKA U., CZAJKOWSKA K., BOGATEK R., 2010a. *Nitric oxide, hydrogen cyanide and ethylene are required in the control of germination and undisturbed development of young apple seedlings*. Plant Growth Regul. 61, 75–84.
- GNIAZDOWSKA A., KRASUSKA U., BOGATEK R., 2010b. *Dormancy removal in apple embryos by nitric oxide or cyanide involves modifications in ethylene biosynthetic pathway*. Planta 232, 1397–1407.
- GRAHAM I. A., 2008. *Seed storage oil mobilization*. Annu. Rev. Plant Biol. 59, 115–142.
- HANCOCK J. T., DESIKAN R., NEILL S. J., 2001. *Role of reactive oxygen species in cell signalling pathways*. Biochem. Soc. Trans. 29, 345–350.
- HANCOCK J. T., HENSON D., NYIRENDA M., DESIKAN R., HARRISON J., LEWIS L., HUGHES J., NEILL S. J., 2005. *Proteomic identification of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase as an inhibitory target of hydrogen peroxide in Arabidopsis*. Plant Physiol. Biochem. 43, 828–835.
- HUANG K., LAURIDSEN E., CLAUSEN J., 1994. *Selenium-containing peroxidases of germinating barley*. Biol. Trace. Elem. Res. 46, 173–182.
- JALINK H., VAN DER SCHOOR R., FRANDAS A., VAN PIJLEN J. G., BINO R. J., 1999. *Seed chlorophyll content as an indicator for seed maturity and seed quality*. Acta Hort. 504, 219–227.
- JANAS K. M., SZAFRAŃSKA K., POSMYK M., 2005. *Melatonina w roślinach*. Kosmos 54, 251–258.
- JOB C., RAJJOU L., LOVIGNY Y., BELGHAZI M., JOB D., 2005. *Patterns of protein oxidation in Arabidopsis seeds and during germination*. Plant Physiol. 138, 790–802.
- JUSZCZUK I. M., RYCHTER A. M., 2003. *Alternative oxidase in higher plants*. Acta Bioch. Pol. 50, 1257–1271.
- KALEMBA E. M., PUKACKA S., 2008. *Changes in late embryogenesis abundant proteins and small heat shock protein during storage of beech (Fagus sylvatica L.) seeds*. Environ. Exp. Bot. 63, 274–280.
- KALT-TORRES W., BURKE J. J., ANDERSON J. M., 1984. *Chloroplast glutathione reductase: Purification and properties*. Physiol. Plant. 61, 271–278.
- KARYOTOU K., DONALDSON R. P., 2005. *Ascorbate peroxidase, a scavenger of hydrogen peroxide in glyoxysomal membranes*. Arch. Biochem. Biophys. 434, 248–257.
- KHAN M. A., AHMED M. Z., HAMEED A., 2006. *Effect of sea salt and L-ascorbic acid on the seed germination of halophytes*. J. Arid Environ. 67, 535–540.
- KRASUSKA U., 2009. *Współdziałanie cyjanowodoru i tlenu azotu w przetwarzaniu głębokiego spoczynku nasion jabłoni (Malus domestica Borkh.)*. Rozprawa doktorska SGGW w Warszawie.
- KUCERA B., COHN M. A., LEUBNER-METZGER G., 2005. *Plant hormone interactions during seed dormancy release and germination*. Seed Sci. Res. 15, 281–307.
- LAOHAVISIT A., BROWN A. T., CICUTA P., DAVIES J. M., 2010. *Annexins: components of the calcium and reactive oxygen signaling network*. Plant Physiol. 152, 1824–1829.
- LEE Y. P., BAEK K.-H., LEE H.-S., KWAK S.-S., BANG J.-W., KWON S.-Y., 2010. *Tobacco seeds simultaneously over-expressing Cu/Zn superoxide dismutase and ascorbate peroxidase display enhanced seed longevity and germination rates under stress conditions*. J. Exp. Bot. 61, 2499–2506.
- LINDERMAYR C., SAALBACH G., DURNER J., 2005. *Proteomic identification of S-nitrosylated proteins in Arabidopsis*. Plant Physiol. 137, 921–930.
- LIU Y., YE N., LIU R., CHEN M., ZHANG J., 2010. *H₂O₂ mediates the regulation of ABA catabolism and GA biosynthesis in Arabidopsis seed dormancy and germination*. J. Exp. Bot. 61, 2979–2990.
- MAY M. J., VERNOUX T., LEAVER C., VAN MONTAGU M., INZÈ D., 1998. *Glutathione homeostasis in plants: implications for environmental sensing and plant development*. J. Exp. Bot. 49, 649–667.
- MORI I. C., SCHROEDER J. I., 2004. *Reactive Oxygen Species activation of plant Ca²⁺ channels. A signaling mechanism in polar growth, hormone transduction, stress signaling, and hypothetically mechanotransduction*. Plant Physiol. 135, 702–708.
- MØLLER I. M., JENSEN P. E., HANSSON A., 2007. *Oxidative modifications to cellular components in plants*. Annu. Rev. Plant Biol. 58, 459–481.
- MØLLER I. M., SWEETLOVE L. J., 2010. *ROS signaling – specificity is required*. Trends Plant Sci. 15, 370–374.
- MUELLER M. J., BERGER S., 2009. *Reactive electrophilic oxylipins: Pattern recognition and signalling*. Phytochemistry 70, 1511–1521.

- MÜLLER K., LINKIES A., VREEBURG R. A. M., FRY S. C., KRIEGER-LISZKAY A., LEUBNER-METZGER G., 2009. *In vivo* cell wall loosening by hydroxyl radicals during cress seed germination and elongation growth. *Plant Physiol.* 150, 1855–1865.
- NAREDO M. E. B., JULIANO A. B., LU B. R., DE GUZMAN F., JACKSON M. T., 1998. *Responses to seed dormancy-breaking treatments in rice species (Oryza L.)*. *Seed Sci. Tech.* 26, 675–689.
- NEILL S. J., DESIKAN R., HANCOCK J. T., 2002. *Hydrogen peroxide signalling*. *Curr. Opin. Plant Biol.* 5, 388–395.
- NGUYEN A. T., DONALDSON R. P., 2005. *Metal-catalysed oxidation induces carbonylation of peroxisomal proteins and loss of enzymatic activities*. *Arch. Biochem. Biophys.* 439, 25–31.
- NOCTOR G., GOMEZ L., VANACKER H., FOYER C., 2002. *Interactions between biosynthesis, compartmentation and transport in the control of glutathione homeostasis and signaling*. *J. Exp. Bot.* 53, 1283–1304.
- ORACZ K., EL-MAAROUF-BOUTEAU H., FARRANT J. M., COOPER K., BELGHAZI M., JOB C., CORBINEAU F., BAILLY C., 2007. *ROS production and protein oxidation as a novel mechanism for seed dormancy alleviation*. *Plant J.* 50, 452–465.
- ORACZ K., EL-MAAROUF-BOUTEAU H., KRANNER I., BOGATEK R., CORBINEAU F., BAILLY C., 2009. *The mechanisms involved in seed dormancy alleviation by hydrogen cyanide unravel the role of reactive oxygen species as key factors of cellular signaling during germination*. *Plant Physiol.* 150, 494–505.
- POLIDOROS A., MYLONA P., PASENTSIS K., SCANDALIOS J., TSAFTARIS A., 2005. *The maize alternative oxidase 1a (AOX1a) gene is regulated by signals related to oxidative stress*. *Redox Rep.* 10, 71–78.
- POSMYK M. M., CORBINEAU F., VINEL D., BAILLY C., CÔME D., 2001. *Osmoconditioning reduces physiological and biochemical damage and lipid composition*. *Physiol. Plant.* 111, 473–482.
- POTTERS G., DE GARA L., ASARD H., HOREMANS N., 2002. *Ascorbate and glutathione: guardians of the cell cycle, partners in crime?* *Plant Physiol. Biochem.* 40, 537–548.
- PUKACKA S., RATAJCZAK E., 2005. *Production and scavenging of reactive oxygen species in Fagus sylvatica seeds during storage at varied temperature and humidity*. *J. Plant Physiol.* 162, 873–885.
- PUNTARULO S., SANCHEZ R., BOVERIS A., 1988. *Hydrogen peroxide metabolism in soybean axes at the onset of germination*. *Plant Physiol.* 86, 626–630.
- REINDERS J., SICKMANN A., 2007. *Modificomics: Post-translational modifications beyond protein phosphorylation and glycosylation*. *Biomol. Eng.* 24, 169–177.
- RENTEL M. C., LECOURIEUX D., QUAKED F., USHER S. L., PETERSEN L., OKAMOTO H., KNIGHT H., PECK S. C., GRIERSON C. S., HIRT H., KNIGHT M. R., 2004. *OX11 kinase is necessary for oxidative burst-mediated signaling in Arabidopsis*. *Nature* 427, 858–861.
- ROACH T., BECKETT R. P., MINIBAYEVA F. V., COLVILLE L., WHITAKER C., CHEN H., BAILLY C., KRANNER I., 2010. *Extracellular superoxide production, viability and redox poise in response to desiccation in recalcitrant Castanea sativa seeds*. *Plant Cell Environ.* 33, 59–75.
- RUCIŃSKA R., WAPLAK S., GWOŹDŹ E. A., 1999. *Free radical formation and activity of antioxidant enzymes in lupine roots exposed to lead*. *Plant Physiol. Biochem.* 37, 187–194.
- SALLON S., SOLOWEY E., COHEN Y., KORCHINSKY R., EGLI M., WOODHATCH I., SIMCHONI O., KISLEV M., 2000. *Germination, genetics, and growth of an ancient date seed*. *Science* 320, 1464.
- SATTLER S. E., GILLILAND L. U., MAGALLANES-LUNDBACK M., POLLARD M., DELLAPENNA D., 2004. *Vitamin E is essential for seed longevity and for preventing lipid peroxidation during germination*. *Plant Cell* 16, 1419–1432.
- SCANDALIOS J. G., GUAN L., POLIDOROS A. N., 1997. *Catalase in plants: gene structure, properties, regulation, and expression*. [W:] *Oxidative Stress and the Molecular Biology of Antioxidant Defenses*. SCANDALIOS J. G. (red.) Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 353–406.
- SCHOPFER P., 2001. *Hydroxyl radical-induced cell-wall loosening in vitro and in vivo: implications for the control of elongation growth*. *Plant J.* 28, 679–688.
- SCHOPFER P., PLACHY C., FRAHRY G., 2001. *Release of reactive oxygen intermediates (superoxide radicals, hydrogen peroxide, and hydroxyl radicals) and peroxidase in germinating radish seeds controlled by light, gibberellin, and abscisic acid*. *Plant Physiol.* 125, 1591–1602.
- SCHOPFER P., LISZKAY A., BECHTOLD M., FRAHRY G., WAGNER A., 2002. *Evidence that hydroxyl radicals mediate auxin-induced extension growth*. *Planta* 214, 821–828.
- SHARMA M. K., BUETTNER G. R., 1993. *Interaction of vitamin C and vitamin E during free radical stress in plasma: an ESR study*. *Free Rad. Biol. Med.* 14, 649–653.
- SMIRNOFF N., 2000. *Ascorbic acid: metabolism and functions of a multi-faceted molecule*. *Curr. Opin. Plant Biol.* 3, 229–235.
- STASOLLA C., 2010. *Glutathione redox regulation of in vitro embryogenesis*. *Plant Physiol. Biochem.* 48, 319–327.
- TOMMASI F., PACIOLLA C., DE PINTO M. C., DE GARA L., 2002. *A comparative study of glutathione and ascorbate metabolism during germination of Pinus pinea L. seeds*. *J. Exp. Bot.* 52, 1647–1654.
- TOMMASI F., PACIOLLA C., DE PINTO M. C., DE GARA L., 2006. *Effects of storage temperature on viability, germination and antioxidant metabolism in Ginkgo biloba L. seeds*. *Plant Physiol. Biochem.* 44, 359–368.
- WANG M., VAN DER MEULEN R. M., VISSER K., VAN SCHAIK H. P., VAN DUIN B., DE BOER A. H., 1998. *Effects of dormancy-breaking chemicals on ABA levels in barley grain embryos*. *Seed Sci. Res.* 8, 129–137.
- WOJTASZEK P., 1997. *Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection*. *Biochem J.* 322, 681–692.
- WOJTYŁA Ł., GARNCZARSKA M., RATAJCZAK L., 2006. *Rola reaktywnych form tlenu w procesie rozwoju i kiełkowania nasion*. *Post. Biol. Kom.* 33, 543–553.
- YASUKISA K., FRIDOVICH I., 1983. *Inhibition and reactivation of Mn-catalase*. *J. Biol. Chem.* 258, 13646–13648.
- YOSHIMURA K., YABUTA Y., ISHIKAWA T., SHIGEOKA S., 2000. *Expression of spinach ascorbate peroxidase isoenzymes in response to oxidative stress*. *Plant Physiol.* 123, 223–233.