

AGNIESZKA OLKO, MONIKA KUJAWSKA

*Zakład Fizjologii Roślin
Instytut Biologii
Wydział Biologii i Nauk o Ziemi
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej
Akademicka 19, 20-033 Lublin
E-mail: agnieszkaolko@poczta.umcs.lublin.pl*

PODWÓJNA ROLA H_2O_2 W ODPOWIEDZI ROŚLIN NA DZIAŁANIE WARUNKÓW STRESOWYCH

WSTĘP

Zmienność warunków środowiskowych oraz brak możliwości aktywnego poruszania się większości roślin powodują, że są one organizmami szczególnie narażonymi na działanie czynników stresowych. Biorąc pod uwagę charakter czynnika stresowego, stresy na jakie mogą być narażone organizmy roślinne w swoim środowisku wzrostu dzieli się na stresy abiotyczne, wywołane działaniem czynników fizycznych i chemicznych (np. promieniowaniem UV, intensywnym oświetleniem, brakiem wody, zasoleniem podłoża, niską lub wysoką temperaturą, obecnością

metali ciężkich) oraz biotyczne, wywołane działaniem czynników biologicznych żywionych (np. obecnością innych roślin, atakiem patogenów, aktywnością zwierząt i ludzi). Badania odpowiedzi roślin na działanie różnych stresów abiotycznych i biotycznych jednoznacznie wskazują, że w każdym przypadku są to procesy związane ze zjawiskiem niekontrolowanego wzrostu poziomu aktywnych form tlenu (ang. reactive oxygen species, ROS), w tym H_2O_2 , w ich komórkach, czyli z tzw. stresem oksydacyjnym (JASPERS i KANGASJÄRVI 2010).

KUMULACJA H_2O_2 W WARUNKACH DZIAŁANIA STRESÓW ABIOTYCZNYCH I BIOTYCZNYCH

Intensywne oświetlenie jest jednym z głównych źródeł stresu oksydacyjnego u roślin, szczególnie w warunkach działania dodatkowych czynników ograniczających asymilację CO_2 . W warunkach intensywnego oświetlenia, wolne tempo przebiegu enzymatycznych reakcji asymilacji CO_2 w stosunku do intensywnego tempa produkcji $NADPH_2$ i ATP w fazie jasnej fotosyntezy, prowadzi w końcu do niedoboru końcowego akceptora elektronów $NADP^+$. W efekcie prowadzi to kolejno do: zmniejszenia puli plastochinolu i/lub inhibicji kompleksu fotolizy wody, inaktywacji fotosystemu PSII (tzw. fotoinhibicja), wzrostu poziomu redukcji O_2 i w końcu

do kumulacji ROS. Wykazano to w badaniach z udziałem takich gatunków jak *Vinca major*, *Schefflera arboricola*, *Mahonia regens* (GRACE i LOGAN 1996), *Arabidopsis thaliana* (KARPIŃSKI i współaut. 1997), a także mutantów tytoniu niewykazujących aktywności katalazy, u których w warunkach silnego oświetlenia dochodziło do silnej kumulacji H_2O_2 (WILLEKENS i współaut. 1997). Pośrednim dowodem na kumulację H_2O_2 i innych ROS w warunkach stresu intensywnego oświetlenia są również badania wykazujące wzrost aktywności większości enzymów antyoksydacyjnych u roślin grochu wystawionych na działanie intensywnego światła (MISHRA i współ-

aut. 1995) oraz degradacja białek: syntetazy glutaminianowej, fosfatazy fosfoglikolanowej, dużej podjednostki karboksylazy/oksygenazy rybulozo-1,5-bisfosforanowej, i ogólnie zwiększona zawartość grup karbonylowych w białkach stromy u tych roślin, w tych warunkach (STIEGER i FELLER 1997).

Podobnie jest w przypadku stresu niedoboru wody. W tych warunkach rośliny dążą do ograniczenia jej utraty poprzez zamykanie aparatów szparkowych w celu ograniczenia transpiracji. Zamknięcie aparatów szparkowych powoduje jednak jednocześnie zahamowanie asymilacji CO_2 i dlatego, analogicznie jak w przypadku intensywnego oświetlenia, stres niedoboru wody powoduje wzrost produkcji ROS, w tym H_2O_2 w komórkach roślinnych. Potwierdzają to wyniki badań przeprowadzonych na roślinach słonecznika (SGHERRI i współaut. 1993) i żyta (BIEHLER i FOCK 1996). Przejawem kumulacji ROS w komórkach roślinnych, w warunkach deficytu wody, jest ponadto obserwowany wówczas wzrost poziomu antyoksydantów oraz wzrost poziomu peroksydacji lipidów, który jest powszechnie uznawanym wyznacznikiem stresu oksydacyjnego (AZIZ i LARHER 1998).

Deficyt wody w komórkach roślinnych może wynikać nie tylko z niedoboru wody w podłożu, ale również z jego zasolenia. U roślin rosnących na glebach słonych, podobnie jak u roślin rosnących w warunkach niedoboru wody, dochodzi do stresu oksydacyjnego na skutek zamykania aparatów szparkowych i zaburzenia przebiegu procesu fotosyntezy. Kumulacja H_2O_2 u roślin w warunkach stresu osmotycznego została wykazana: bezpośrednio między innymi u roślin ryżu i tytoniu, a pośrednio, poprzez wzrost aktywności enzymów antyoksydacyjnych, u roślin grochu, bawełny (GOSSETT i współaut. 1996), cytrusów (PIQUERAS i współaut. 1999) i tytoniu (SAVOURE i współaut. 1999).

Powszechnie przyjmuje się, że ekspozycja roślin na działanie niskich temperatur wywołuje u nich stres oksydacyjny głównie na skutek zwolnienia tempa enzymatycznych reakcji asymilacji CO_2 . Istnieją jednak wyniki badań wykazujące, że głównym źródłem produkcji ROS w tych warunkach u roślin są mitochondria. Niemniej jednak, występowanie stresu oksydacyjnego w komórkach roślinnych pod wpływem działania niskich temperatur jest faktem, który został potwierdzony doświadczalnie w badaniach przeprowadzonych między innymi na roślinach zbóż ozi-

mych, ogórka, *A. thaliana*, ryżu i kukurydzy (DAT i współaut. 2000).

Mechanizmy powstawania stresu oksydacyjnego w warunkach działania wysokich temperatur są różnorodne, ale najczęściej wynikają z kumulacji ROS w chloroplastach na skutek zaburzenia asymilacji CO_2 . Alternatywnie, wzrost produkcji ROS w warunkach stresu wysokich temperatur może być spowodowany aktywacją oksydazy NADPH właśnie przez wysokie temperatury. Wzrost poziomu H_2O_2 w tych warunkach obserwowano u pomidora, tytoniu i *Brassica juncea*. Podobnie jak w przypadku innych stresów abiotycznych, wzrost poziomu ROS u roślin w warunkach działania wysokich temperatur przejawia się również wzrostem aktywności enzymów antyoksydacyjnych: dysmutazy ponadtlenkowej, peroksydazy askorbinianowej, reduktazy glutationowej oraz katalazy (DAT i współaut. 2000).

Pod wpływem działania metali ciężkich należących do grupy metali przejściowych (np. Cu, Fe, Pb), w obecności H_2O_2 dochodzi do intensywnej produkcji ROS w wyniku reakcji Fentona i Habera-Weissa. Natomiast metale ciężkie niewykazujące aktywności w komórkowych procesach redoks (np. Cd, Zn), mogą powodować wzrost poziomu ROS poprzez aktywację oksydazy NADPH (BOLWELL i WOJTASZEK 1997, CAKMACK 2000). Wzrost poziomu ROS w komórkach roślinnych traktowanych metalami ciężkimi, wiąże się ponadto z aktywacją zlokalizowanych w przestrzeni apoplastycznej oksydaz: amin, diamin, poliamin (ALLAN i FLUHR 1997) oraz aktywnością zlokalizowanej w ścianie komórkowej peroksydazy (BOLWELL i WOJTASZEK 1997). Kumulację H_2O_2 u roślin pod wpływem metali ciężkich wykazano u roślin *Phaseolus vulgaris* traktowanych cynkiem, natomiast wzrost różnych ROS obserwowano u roślin traktowanych jonami miedzi, aluminium i żelaza (DAT i współaut. 2000). Co ciekawe, jak wykazują badania, niedobór niektórych metali ciężkich (np. Zn) również może być przyczyną stresu oksydacyjnego u roślin (CAKMACK i MARSCHNER 1993).

Stres oksydacyjny wywołany działaniem promieniowania UV wynika przede wszystkim z aktywacji procesów fotoutleniania. Dochodzi wówczas do intensywnej akumulacji anionorodnika nadttlenkowego (O_2^-), który, z udziałem dysmutazy ponadtlenkowej (ang. superoxide dismutase, SOD), jest następnie przekształcany w H_2O_2 . Potwierdzają to badania na kulturach komórek *Rosa damascena*,

które wykazały kumulację H_2O_2 po 60–90 minutach ekspozycji na promieniowanie UV-C. Natomiast u *Nicotiana plumbaginifolia*, indukcję stresu oksydacyjnego pod wpływem działania promieniowania UV-B wykazano obserwując wzrost aktywności enzymów antyoksydacyjnych: katalazy, peroksydazy glutationowej u tej rośliny, w warunkach działania promieniowania UV-B (DAT i współaut. 2000).

Mechanizm generacji stresu oksydacyjnego u roślin w warunkach obecności ozonu polega na jego reakcji z komponentami ścian komórkowych i błon plazmatycznych, co prowadzi do kumulacji różnych ROS. Dodatkowo, produkcja ROS u roślin pod wpływem ozonu może wynikać również z aktywacji oksydazy NADPH pod jego wpływem. Akumulację H_2O_2 pod wpływem ozonu potwierdzono doświadczalnie między innymi u *Arabidopsis* (RAO i DAVIS 1999), zaś wzrost aktywności enzymów antyoksydacyjnych pod wpływem ozonu, jako pośredni dowód występowania stresu oksydacyjnego, wykryto u roślin *Arabidopsis*, tytoniu i fasoli (DAT i współaut. 2000).

Przyczyną stresu oksydacyjnego u roślin mogą być również mechaniczne uszkodzenia tkanek. Źródłem ROS w takich warunkach jest aktywacja oksydazy NADPH, co w efekcie prowadzi do kumulacji kolejno $^{\bullet}O_2^-$, a następnie H_2O_2 , w wyniku aktywności dysmutazy ponadtlencowej. Wykazano to u pomidorów, u których w efekcie zranienia obserwowano kumulację H_2O_2 w liściach (DAT i współaut. 2000).

Stres oksydacyjny u roślin może być również wywołany atakiem patogenu na tkanki

roślinne. W tych warunkach do kumulacji ROS dochodzi w dwóch odrębnych fazach. Faza pierwsza, niespecyficzna, rozwija się w ciągu kilku minut po infekcji patogenem, zaś faza druga, zależna od rozpoznania niekompatybilnego patogenu przez organizm gospodarza, rozwija się w ciągu 1–3 godzin po początkowym „wybuchu” ROS. Uważa się, że w fazie pierwszej dochodzi do kumulacji ROS głównie w wyniku aktywacji NADPH-zależnej oksydazy. Powstały w wyniku aktywności NADPH-zależnej oksydazy $^{\bullet}O_2^-$ jest następnie dysmutowany z udziałem dysmutazy ponadtlencowej do H_2O_2 , który z kolei aktywuje hydrolazę kwasu benzoowego, co w efekcie prowadzi do kumulacji kwasu salicylowego (ang. salicylic acid, SA). Kumulacja SA i H_2O_2 ma zaś kluczowe znaczenie dla silnej aktywacji genów obronnych i programowanej śmierci komórki (ang. programmed cell death, PCD). „Wybuch” ROS w drugiej fazie jest zależny od NAD(P)H i prowadzi do indukcji ekspresji genów białek PR (ang. pathogenesis related), fitoaleksyn, wzmacniania ścian komórkowych poprzez tworzenie poprzecznych wiązań między resztami prolin bogatych w ten aminokwas glikoproteidów, kumulacji SA i kwasu benzoowego. Dokładne, fizjologiczne znaczenie tych dwóch, następujących po sobie wybuchów ROS, nie jest do końca poznane. Uważa się jednak, że zmienna kinetyka kumulacji H_2O_2 warunkuje aktywację bardzo różnych mechanizmów obronnych roślin, które ogólnie związane są z tzw. silnym efektem kwasu salicylowego, aktywacją genów obronnych, aktywacją mechanizmów PCD (DAT i współaut. 2000).

ROLA H_2O_2 W ODPOWIEDZI ROŚLIN NA DZIAŁANIE STRESÓW ABIOTYCZNYCH I BIOTYCZNYCH

Nagromadzony w komórkach roślinnych, pod wpływem działania stresów abiotycznych i biotycznych, H_2O_2 może łatwo wchodzić w reakcje redoks z różnymi biomolekułami roślinnymi. Część z tych reakcji ma charakter nieodwracalny i prowadzi do kumulacji chemicznie zmienionych, a tym samym biologicznie nieaktywnych, biomolekuł. Takie biomolekuły są w dalszym ciągu przez komórkę eliminowane lub akumulowane w formie agregatów (np. uszkodzone białka). Efektem zachodzenia tego typu procesów w komórkach roślinnych jest dysfunkcja ich organelli, a w skrajnych przypadkach nekro-

za, czyli gwałtowna śmierć całych komórek, przebiegająca z przerwaniem ciągłości plazmalemmy i wypływem cytoplazmy do otoczenia. Nieodwracalne uszkodzenia biomolekuł roślinnych z udziałem H_2O_2 mogą zachodzić wskutek trzech, wymienionych poniżej procesów.

1. Nieenzymatyczna peroksydacja lipidów. Jest to proces utleniania lipidów, a w szczególności nienasyconych reszt kwasów tłuszczowych, wchodzących w skład wielu lipidów roślinnych, z udziałem H_2O_2 i innych ROS. Efektem tego procesu jest destabilizacja i rozpad lipidów z wytworzeniem aldehydów

i alkoholi, co w komórkach przejawia się głównie uszkodzeniami błon plazmatycznych (błon komórkowych, błon chloroplastowych i mitochondrialnych).

2. Utlenianie białek. H_2O_2 może inaktywować białka poprzez: reakcje utleniania metali w ich centrach aktywnych (np. Cu, Zn lub Fe w dysmutazie ponadtlenkowej), reakcje nieodwracalnego utleniania grup tiolowych (-SH) w łańcuchach bocznych aminokwasów (cysteina) do kwasów sulfinowego i cysteinowego, reakcje utleniania grup hydroksylowych (-OH) w łańcuchach bocznych aminokwasów (histydyna, arginina, lizyna) do grup ketonowych lub aldehydowych, reakcje utleniania aminokwasów w rdzeniu łańcucha polipeptydowego białka, co prowadzi do powstawania fragmentów łańcucha polipeptydowego z N-terminalnymi grupami ketonowymi lub aldehydowymi. Dodatkowo, białka mogą być również utleniane w reakcjach z produktami peroksydacji lipidów jak 4-hydroksy-2-nonenal oraz w wyniku koniugacji z cukrami o właściwościach redukujących lub ich utlenionymi produktami.

3. Zaburzenia w obrębie kwasów nukleinowych. Proces ten jest związany z atakiem cząsteczki H_2O_2 na komponenty kwasów nukleinowych: nukleozydy (zmiany w resztach purynowych i pirymidynowych) i reszty cukrowe, co w efekcie prowadzi to do powstawania mutacji (FOYER i NOCTOR 2000, VRANOVA i współaut. 2002, GHEZZI i BONETTO 2003, WOŹNY i PRZYBYŁ 2004, PASTERNAK i współaut. 2005).

Obok reakcji nieodwracalnych, kumulujący się w komórkach roślinnych, w warunkach działania czynników stresowych, H_2O_2 może również inicjować odwracalne przemiany redoks biomolekuł roślinnych. Przemiany te mają za zadanie bądź to ochronę strategicznych dla zachowania funkcji biologicznych biomolekuł grup funkcyjnych, bądź modulację ich aktywności biologicznych. Tak zwana koncepcja „regulacji redoks” wynika z faktu, iż w określonych warunkach środowiskowych, w każdej komórce roślinnej ustala się określony potencjał równowagi redoks, czyli stan równowagi między zredukowanymi i utlenionymi formami wszystkich biomolekuł chemicznie zdolnych tworzyć obie takie formy. Dla ustalenia się równowagi potencjału redoks w komórkach roślinnych kluczowe znaczenie ma przebieg fazy jasnej fotosyntezy. W warunkach optymalnych dla wzrostu i rozwoju rośliny, w toku przemian fazy jasnej fotosyntezy dochodzi do wytworzenia ATP,

NADPH₂ oraz redukcji tioredoksyn (FOYER i NOCTOR 2000). W ten sposób, w warunkach optymalnych komórka roślinna utrzymuje równowagę potencjału redoks na poziomie dominacji form zredukowanych nad formami utlenionymi. Aktywnym uczestnikiem reakcji redoks w komórkach roślinnych jest także H_2O_2 . W stosunku do biomolekuł roślinnych wykazuje on silne właściwości utleniające, dlatego jego akumulacja może zakłócać aktualny stan równowagi potencjału redoks. Niskocząsteczkowe elementy systemu antyoksydacyjnego (askorbinian, tokoferol, glutation), dzięki właściwościom detoksyfikującym ROS, mogą w pewnym zakresie buforować zaburzenia stanu równowagi potencjału redoks w komórkach roślinnych, wynikające z przejściowego wzrostu poziomu produkcji ROS. Jednakże w warunkach działania stresów abiotycznych i biotycznych, intensywność przebiegu procesów prowadzących do kumulacji H_2O_2 przekracza zdolności buforujące niskocząsteczkowych antyoksydantów, wskutek czego dochodzi do stresu oksydacyjnego i ustalenia się nowego poziomu równowagi potencjału redoks (FOYER i NOCTOR 2005). Według koncepcji „regulacji redoks” zmiana poziomu równowagi potencjału redoks w komórkach roślinnych, wywołana kumulacją H_2O_2 w warunkach działania stresów abiotycznych i biotycznych, wydaje się mieć strategiczne znaczenie dla uruchamiania procesów aklimatyzacyjnych u roślin, polegających na przestawianiu metabolizmu z trybu właściwego dla warunków optymalnych, na tryb odpowiedni dla określonych warunków ekstremalnych. Pod względem chemicznym, odwracalna modyfikacja białek na drodze reakcji redoks, może zachodzić na drodze odwracalnego utleniania grup tiolowych do kwasu sulfinowego, rodników tiolowych lub grup disulfidowych oraz odwracalnej redukcji grup disulfidowych do grup tiolowych. Pośrednio, do procesów odwracalnej modyfikacji białek indukowanych zmianą równowagi potencjału redoks w komórkach roślinnych, należy również glutationylacja i cysteinylacja białek. Procesy te polegają na wymianie podstawników przy grupach disulfidowych białek z udziałem odpowiednio glutationu (GSH) lub cysteiny. Najczęściej spotykanym u roślin modelem aktywacji redoks jest redukcja mostków siarkowych (grupy bisulfidowe) do wolnych grup sulfhydrylowych. W ten sposób aktywowane są kluczowe enzymy takich szlaków biochemicznych jak: synteza ATP, cykl Calvina-Bensona, biosynte-

za *de novo* kwasów tłuszczowych, biosynteza skrobi w liściach, transport $NADPH_2$ poza chloroplast, asymilacyjna redukcja azotanów oraz hamowane są kluczowe enzymy szlaku biodegradacji skrobi w liściach. Regulacja aktywności białek roślinnych na drodze glutationylacji jest słabo zbadana, choć została potwierdzona doświadczalnie w badaniach *in vivo* (GEIGENBERGER i współaut. 2005, FOYER i NOCTOR 2009).

Hipoteza „regulacji redoks”, u roślin poza regulacją aktywności występujących w komórkach białek, obejmuje również wpływ H_2O_2 na zmianę profilu ekspresji genów. Uważa się obecnie, że H_2O_2 wraz z pozostałymi ROS, pełnią kluczową rolę w regulacji aktywności kaskad MAPK (ang. mitogen activated protein kinases) u roślin. Wyróżnia się trzy podstawowe mechanizmy regulacji aktywności kaskad MAPK za pośrednictwem H_2O_2 w komórkach roślinnych:

- uruchamianie szlaków transdukcji sygnałów poprzez interakcję H_2O_2 z sensorami szlaków transdukcji sygnałów;
- modyfikację aktywności szlaków transdukcji sygnałów poprzez interakcję H_2O_2 z dalszymi komponentami szlaków transdukcji sygnałów;
- aktywację ekspresji czynników transkrypcyjnych dla ekspresji białek generujących reakcje obronne/aklimatyzacyjne lub modyfikacja aktywności istniejących już w komórce czynników transkrypcyjnych poprzez ich bezpośrednią interakcję z H_2O_2 .

Przypuszcza się, że funkcję sensora ROS w szlakach transdukcji sygnałów u roślin mogą pełnić pewne błonowe kinazy histydynowe. Uważa się, że w warunkach obecności lub braku ROS (w tym H_2O_2), enzymy te mogą katalizować autofosforylację swoich reszt histydynowych i uzyskiwać w ten sposób aktywność biologiczną. Przykładem modyfikacji aktywności kaskad MAPK na skutek interakcji ich dalszych komponentów z H_2O_2 może być oddziaływanie H_2O_2 z białkową fosfatazą tyrozynową 1 (ang. protein tyrosine phosphatase 1, PTP1). Enzym ten posiada zdolność modyfikacji aktywności różnych szlaków transdukcji, związanych z kaskadami MAPK poprzez inaktywację 6 kinazy białkowej aktywowanej mitogenem (MPK6). W wyniku interakcji z H_2O_2 PTP1 odwracalnie traci swoją aktywność biologiczną i regulacyjny wpływ na przebieg szlaków transdukcji sygnałów, których elementem jest MPK6. W kwestii zmiany poziomu ekspresji genów w komórkach roślinnych pod wpływem bez-

pośredniego oddziaływania H_2O_2 z obecnymi w komórkach czynnikami transkrypcyjnym, kontrolującymi regulon genów będących pod kontrolą kaskad MAPK wiadomo, że wiąże się to ze zmianą ich lokalizacji, aktywności, bądź czasu połowicznego półtrwania, co wpływa na ich oddziaływanie ze specjalnymi cis-elementami składającymi się na promotory owych genów (DESIKAN i współaut. 2000). Jak dotąd jednak w królestwie roślin nie wykryto obecność czynników transkrypcyjnych aktywowanych w bezpośredniej interakcji z H_2O_2 , podobnych do tego typu czynników transkrypcyjnych występujących u *Escherlichia coli* (OxyR) czy drożdży (Yap1) (APEL i HIRT 2004, MILLER i współaut. 2008). Pod wpływem H_2O_2 może dochodzić również do aktywacji procesów biosyntezy czynników transkrypcyjnych składających się na regulon genów będących pod kontrolą kaskad MAPK. Na podstawie dotychczas przeprowadzonych badań przypuszcza się, że do grupy tzw. H_2O_2 -zależnych czynników transkrypcyjnych u roślin mogą należeć białka: Hsfs (ang. heat shock transcription factors), Zat (ang. Cys2/His2-type plant-specific zinc finger proteins), czynniki transkrypcyjne WRKY oraz transkrypcyjny koaktywator MBF1c (ang. multi-protein bridging factor 1c).

Białka Hsfs, to modularne czynniki transkrypcyjne, kodowane u *Arabidopsis* przez co najmniej 21 genów, a u roślin ryżu i soi nawet przez większą ich liczbę. Funkcja biologiczna tych białek jest związana z udziałem w ekspresji wielu genów, których produkty biorą udział w generacji odpowiedzi roślin na działanie stresów abiotycznych i biotycznych. Badania pokazują, że w konkretnych warunkach stresowych aktywowana jest biosynteza ściśle określonych czynników transkrypcyjnych z tej rodziny. Uważa się również, że czynniki transkrypcyjne Hsfs mogą funkcjonować również jako bezpośrednie sensory poziomu H_2O_2 w komórkach roślinnych.

Białka Zat, to grupa ponad 20 czynników transkrypcyjnych zawierających typowe dla roślin domeny palców cynkowych typu Cys2/His2 oraz domenę EAR (ang. ERF-associated amphiphilic repression), dzięki której mogą pełnić funkcje białek represorowych. Badania nad udziałem czynników transkrypcyjnych Zat w powstawaniu odpowiedzi roślin na warunki stresowe wykazały aktywność trzech członków ich rodziny (białka: Zat12, Zat10 i Zat7) w modulacji odpowiedzi roślin na stresy abiotyczne. Sugeruje się, że białko

Zat12 kontroluje regulon 42 różnych genów związanych z odpowiedzią roślin na stres osmotyczny i intensywnego oświetlenia, aktywność białka Zat10 jest związana z odpowiedzią roślin na stres osmotyczny, niedoboru wody, zasolenia, wysokich temperatur, a aktywność białka Zat7 jest bardziej specyficzna i związana głównie z odpowiedzią roślin na stres osmotyczny i wysokich temperatur. Ogólnie przyjmuje się, że odpowiedź białek Zat na działanie stresów abiotycznych cechuje wysoki stopień złożenia i hierarchiczności, a w całej sieci skomplikowanych zdarzeń mających miejsce pomiędzy odebraniem bodźca a wystąpieniem odpowiedzi, mogą one pełnić funkcję czynników integrujących sygnał ROS z powstawaniem odpowiedzi na różne stresy abiotyczne.

Czynniki transkrypcyjne WRKY, to jedna z najliczniejszych rodzin roślinnych czynników transkrypcyjnych, licząca 74 członków u *Arabidopsis* i ponad 90 - u ryżu. Są to konserwatywne białka zawierające stałą sekwencję aminokwasową WRKY o dużym powinowactwie do elementów cis-W-box. W obrębie tych białek wyróżnia się trzy podgrupy ze względu na ilość domen WRKY i palca cynkowego. Badania mające określić funkcję czynników transkrypcyjnych WKRY u *Arabidopsis* wykazały, że niemal wszyscy członkowie podgrupy III biorą udział w odpowiedzi na różne stresy biotyczne, a 49 z 74 genów wykazuje aktywność w odpowiedzi na infekcje bakteryjne lub SA. Ostatnie doniesienia potwierdzają również aktywność tych białek w odpowiedzi roślin na stresy abiotyczne.

Koaktywator transkrypcyjny MBF1c, to konserwatywne białko, którego poziom ekspresji u roślin wzrasta w odpowiedzi na działanie patogenów, wysokiej temperatury, kwasu abscysynowego (ABA), SA, H_2O_2 oraz stresu suszy i zasolenia. Transgeniczne rośliny *Arabidopsis* z nadekspresją MBF1c wykazują wzrost poziomu kumulacji trehalozy i SA oraz wyższą tolerancję na infekcje bakteryjne, stres osmotyczny oraz stres wysokiej temperatury. Odwrotnie zaś, mutanty *Arabidopsis* z blokiem syntezy MBF1c są niezdolne do kumulacji trehalozy i SA oraz wykazują większą wrażliwość na stres wysokiej temperatury oraz obniżoną podstawową termowrażliwość. Uważa się, że białko MBF1c w odpowiedzi roślin na działanie stresów abiotycznych zajmuje pozycję powyżej trehalozy, SA i etylenu, a poniżej H_2O_2 . W związku z tym sugeruje się, że w komórkach roślinnych może ono pełnić funkcję ogniwa łączą-

cego sygnał ROS z tymi elementami szlaków transdukcji sygnałów, które bezpośrednio odpowiadają za generację poszczególnych odpowiedzi roślin na działanie stresów abiotycznych i biotycznych (MILLER i współaut. 2008). Pomimo tego, iż w ciągu ostatnich lat wiedza na temat zagadnienia kaskad MAPK u roślin została znacząco pogłębiona, jednoznacznie poznano budowę zaledwie kilku z nich. Przykładem może być aktywowana stresem chłodu i zasolenia kaskada transdukcji sygnału MEKK1-MKK1/2-MPK4/6. W tym szlaku H_2O_2 funkcjonuje jako aktywator i stabilizator zarówno MEKK1, jaki i komponentów MAPK: MAK4 i MAK6. W kwestii budowy pozostałych kaskad MAPK przypuszcza się jedynie, że MAPKKK mogą być specyficznie aktywowane przez określone bodźce, podczas szlaki różnych kaskad MAPK mogą się zbiegać w MAPKK, które prawdopodobnie mogą aktywować jednocześnie kilka różnych MAPK. Spośród 20 wykrytych u *Arabidopsis* MAPK scharakteryzowano tylko trzy: MPK4, MPK3 i MPK6. Wszystkie one mogą być aktywowane przez ROS, stresy abiotyczne i biotyczne, choć za pośrednictwem różnych MAPKK. Podczas stresu zasolenia i zimna, na przykład MAPK6 i MAPK 4 są aktywowane przez MAPKK2, choć MAPK6 może być również aktywowana przez MAPKK3, co nie jest już jednak związane z aktywacją odpowiedzi na stres zasolenia. Co więcej, nadekspresja MAPKK9, innej MAPKK fosforylującej MAPK6, u roślin transgenicznych prowadzi do ich dużej wrażliwości na stres zasolenia. Dodatkowo, wzrost aktywności MAPK1 i 2 zaobserwowano zarówno w odpowiedzi na zranienie, działanie jasmonianu (JA), H_2O_2 oraz ABA, a MAPK7 jest aktywowana w równym stopniu przez MAPKK3, w odpowiedzi na JA i działanie patogenu, co w odpowiedzi na działanie H_2O_2 . W końcu wydaje się, że H_2O_2 może mieć ogólnie stabilizujący wpływ na aktywność MAPKK u roślin (JASPERS i KANGÄSJARVI 2010).

Skomplikowany charakter interakcji H_2O_2 z kaskadami MAPK wykazuje, że na regulację ekspresji genów w systemie redoks u roślin dodatkowo wpływają jeszcze interakcje istniejące pomiędzy szlakami sygnalingu redoks a pozostałymi, istniejącymi u roślin szlakami transdukcji sygnałów, związanymi z aktywnością fitohormonów, metabolizmem cukrów oraz fotoperiódem. Do fitohormonów intensywnie oddziałujących z sygnalingiem redoks zalicza się: auksyny, etylen, wspomniany już ABA, SA, JA i tlenek azotu (NO). Wyniki ba-

dań pokazują na przykład, że SA może powielać sygnał ROS na zasadzie sprzężenia zwrotnego, a blokada aktywności katalazy, przy jednoczesnym obniżeniu poziomu syntezy SA u transgeniczných roślin tytoniu, uniemożliwia u nich aktywację ekspresji genów PR. Ponadto potwierdzono doświadczalnie, że H_2O_2 i SA współdziałają również w przebiegu szlaków transdukcji sygnałów związanych z sygnałami fotoperiodu (FOYER i NOCTOR 2009). W przypadku ABA wiadomo natomiast, że zależny od ABA wybuch H_2O_2 reguluje zamykanie aparatów szparkowych. Aplikacja egzogennej ABA daje również efekt akumulacji ROS w szlaku transdukcji sygnału związanym z aktywacją systemu jony wapnia/kalmodulina powyżej i poniżej aktywności H_2O_2 . Kumulacja H_2O_2 może prowadzić do syntezy fosfolipazy D i jej lipidowego produktu, kwasu fosfatydylowego, i tym samym prowadzić do aktywacji szlaków transdukcji sygnałów związanych z: sygnałem ABA, modyfikacją wzrostu włókników i generacją całej gamy innych odpowiedzi roślin na działanie czynników stresowych. Przeprowadzone badania potwierdzają również współdziałanie H_2O_2 z NO, co udowodniono wykazując kumulację NO w aparatach szparkowych i liściach, w odpowiedzi na ABA-zależną kumulację H_2O_2 . Ostatnie badania sugerują również, że ABA jest integralnym elementem niektórych długodystansowych szlaków transdukcji sygnalingu H_2O_2 . Dowodem na istnienie korelacji między sygnałem redoks a sygnałem cukrów jest z kolei mechanizm regulacji aktywności pyrofosforylasy ADP-glukozy, enzymu nadzorującego przebieg szlaku biosyntezy skrobi. Ostatnie badania dowodzą, że pełna aktywacja tego enzymu wymaga jednoczesnej aktywacji szlaków transdukcji sygnałów związanych z aktywnościami kinazy typu SNF1 (ang. sucrose non-fermenting 1) i heksokinazy, z zaistnieniem odpowiedniego potencjału redoks oraz obecnością trehalozo-6-fosforanu. Cukier ten jest pośrednim metabolitem w szlaku biosyntezy trehalozy i uważany jest za podstawowy regulator procesów utylizacji cukrów u roślin (FOYER i NOCTOR 2009).

Efektem istnienia opisanej, bardzo skomplikowanej sieci różnych, powiązanych ze sobą mechanizmów regulacyjnych wspólnie nadzorujących proces generacji odpowiedzi roślin na działanie stresów abiotycznych i biotycznych, jest generacja tych odpowiedzi w formie pakietów zmian metabolicznych. Do pakietu takich zmian zalicza się:

aktywację wspomnianych już białek PR, aktywację enzymów systemu antyoksydacyjnego oraz syntezę metabolitów wtórnych. Białka PR, to duża grupa białek licząca obecnie 17 rodzin, wydzielonych ze względu na masę molekularną, punkt izoelektryczny, lokalizację w komórce oraz aktywność biologiczną. Zalicza się do nich białka o aktywnościach β -1,3-gukanaz (PR2), chitynaz (PR 3,4,8,11), białka przypominające taumatynę syntetyzowaną przez *Thaumatococcus daniellii*, osmotyny i permatyny (PR5), inhibitory proteaz (PR6), białka o funkcjach podobnych do rybonukleaz (PR10), tioniny (PR13), S-transferazy glutationowe katalizujące reakcję detoksyfikacji różnych substancji o właściwościach hydrofilowych i elektrofilowych oraz transportery lipidów. Na temat biologicznych funkcji białek PR u roślin wiadomo stosunkowo niewiele. Potwierdzono, że ich aktywność ma charakter obronny, jest indukowana działaniem stresów abiotycznych i biotycznych oraz że znajduje się pod kontrolą cząsteczek sygnałowych takich jak: JA, SA, ABA, etylen, H_2O_2 , cytokininy, potencjalne inhibitory fosfataz białkowych, kantarydyna, kwas okadainowy (JWA i współaut. 2006). Ze względu na wysoką toksyczność H_2O_2 względem biomolekuł roślinnych, do pakietu zmian metabolicznych indukowanych stresami abiotycznymi i biotycznymi należy również aktywacja wysokocząsteczkowych elementów systemu antyoksydacyjnego. Zalicza się do nich: dysmutazy ponadtlenkowe, katalizujące konwersję anionorodnika ponadtlenkowego (O_2^-) do H_2O_2 i tlenu, katalazy (ang. catalase, CAT) i peroksydazy askorbinianowe (ang. ascorbate peroxidases, APX), katalizujące konwersję H_2O_2 do wody i tlenu, peroksydazy (ang. peroxidases, POX), zewnątrzkomórkowe enzymy katalizujące reakcje redoks pomiędzy H_2O_2 a kilkoma innymi reduktantami oraz peroksydazy glutationowe (ang. glutathione peroxidase, GPX), które stanowią główną linię obrony membran przed uszkodzeniami oksydacyjnymi. Ponadto, u roślin wykryto również obecność tzw. genu antyoksydacyjnego, którego aktywność jest związana z transportem miedzi i odpowiedzią na stres oksydacyjny. Wyniki badań nad profilem aktywności wszystkich tych białek jednoznacznie potwierdzają wyraźny wzrost poziomu ich aktywności w odpowiedzi na działanie różnych stresów abiotycznych i biotycznych oraz udział globalnych cząsteczek sygnałowych w mechanizmach

kontrolujących aktywację ich ekspresji (JWA i współaut. 2006). Metabolity wtórne z kolei, to grupa różnorodnych, niskocząsteczkowych związków, będących pochodnymi terpenoidów, fenylopropanoidów, alkaloidów oraz ubocznych produktów szlaków biosyntezy kwasów tłuszczowych i poliketydów. Obecność metabolitów wtórnych w organizmach roślinnych nie jest konieczna dla prawidłowego przebiegu podstawowych procesów metabolicznych; zaobserwowano natomiast, że są one akumulowane w odpowiedzi na działanie różnych warunków stresowych. Szczególnie istotna, z punktu widzenia biosyntezy metabolitów wtórnych, jest aktywność dwóch enzymów: amoniakolizazy fenyloalaninowej, katalizującej reakcję deaminacji L-fenyloalaniny do kwasu trans-cynamonowego, w wyniku czego powstają metabolity wtórne o budowie opartej na szkielecie fenylopropanowym (monomery ligniny, pewne fitoaleksyny), oraz syntazy chalkonowej katalizującej pierwszy etap biosyntezy flawonoidów i związanej również z biosyntezą antocyjanów. Badania nad mechanizmami regulacji aktywności genów kodujących te enzymy wykazały, że wzrost poziomu ich ekspresji może inicjować: atak grzyba, patogenu, promieniowanie UV, kantarydyna, zranienie. W przypadku syntazy chalkonowej wykazano ponadto, że aktywacja ekspresji jej genów jest związana z aktywnością SA (ZHU i współaut. 1995, JWA i współaut. 2006).

Wymienione pakiety zmian metabolicznych składają się na wyżej zorganizowane formy odpowiedzi roślin na działanie czynników stresowych, mające na celu ograniczenie wnikania tych czynników w głąb tkanek roślinnych (np. metali ciężkich, patogenów), oraz łagodzenie zmian wewnątrzkomórkowych, wynikających z ich oddziaływania na przebieg procesów metabolicznych. Należą do nich: wytwarzanie brodawek zawierających substancje ograniczające wnikanie patogenu w głąb tkanek roślinnych (kalozę, białka, fenole), lignifikacja czy też powstawanie wiązań poprzecznych pomiędzy bogatymi w prolinę/hydroksyprolinę białkami i innymi polimerami obecnymi w ścianach komórkowych roślin (KUŹNIAK i URBANEK 2000), produkcja wspomnianych już fitoaleksyn-hydrofobowych, niskocząsteczkowych substancji o właściwościach antybakteryjnych (APOSTOL i współaut. 1989), odpowiedź lokalna HR (ang. hypersensitive response), odpowiedź

systemiczna SAR (ang. systemic acquired resistance) czy w końcu PCD. Odpowiedź lokalna HR polega na lokalnym, gwałtownym uruchamianiu procesu PCD w komórkach otaczających miejsca infekcji, w celu ograniczenia rozprzestrzeniania się patogenu na pozostałe części rośliny. Odpowiedź lokalną HR mogą generować jedynie rośliny zdolne rozpoznać atakujący patogen, na skutek interakcji produktu ich genu odporności z produktem genu awirulencji patogenu. Jest ona związana z kumulacją ROS (LOW i MERIDA 1996), a kumulacja H_2O_2 ma znaczenie kluczowe dla przebiegu tego procesu (TENHAKEN i współaut. 1995). Odpowiedź systemiczna SAR jest związana z aktywacją wspomnianych już genów PR i prowadzi do uzyskania przez roślinę długotrwałej odporności na szerokie spektrum patogenów. Przebieg odpowiedzi systemicznej SAR jest związany z kumulacją SA w infekowanej roślinie i kumulowaniem H_2O_2 w pojedynczych komórkach przylegających do wiązek przewodzących, w miejscach oddległych od miejsca ataku patogenu. Kumulacja H_2O_2 w tych komórkach jest związana z uruchamianiem w nich PCD. Odpowiedź systemiczną SAR rośliny mogą generować w odpowiedzi na atak różnych patogenów, w szczególności tych, które wywołują nekrozę tkanek atakowanej rośliny. Badania nad mechanizmami odpowiedzi obronnych roślin typu HR i SAR wykazały, że są one związane ze zmianami poziomu ekspresji genów katalazy, transferazy glutationowej, peroksydazy glutationowej oraz, w przypadku odpowiedzi SAR, dodatkowo jeszcze genów białek PR pod wpływem kumulacji H_2O_2 (KUŹNIAK i URBANEK 2000). Ostatnie wyniki badań wykazują, że PCD może być wywołana kumulacją H_2O_2 spowodowaną nie tylko działaniem stresów biotycznych, ale również stresów abiotycznych, np. działaniem ozonu (WOHLGEMUTH H. i współaut. 2002). Wyżej zorganizowaną formą odpowiedzi roślin na działanie warunków stresowych może być również zamykanie aparatów szparkowych, który to proces jest odpowiedzią roślin na stres suszy i wiele innych stresów będących konsekwencją stresu suszy. Proces zamykania aparatów szparkowych przebiega według skomplikowanego mechanizmu związanego z fosforylacją pewnych białek, kumulacją ABA, która prowadzi do kumulacji H_2O_2 i aktywacji kanałów wapniowych w błonach komórek szparkowych (LALOI i współaut. 2004).

PODSUMOWANIE

W warunkach działania stresów abiotycznych i biotycznych na organizmy roślinne dochodzi w nich do zwiększonej kumulacji H_2O_2 i innych ROS, czyli do stresu oksydacyjnego. Gromadzący się w organizmach roślinnych H_2O_2 generuje w nich dwie jakościowo różne odpowiedzi na działanie tych stresów. Z jednej strony, toksyczność H_2O_2 względem biomolekuł prowadzi do gromadzenia się w komórkach uszkodzeń, a z drugiej, wysoka aktywność H_2O_2 w reakcjach redoks, które mają kluczowe znaczenie dla regulacji procesów metabolicznych u roślin, pozwala H_2O_2 zmieniać przebieg tych procesów. Regulacyjna funkcja H_2O_2 względem przebiegu procesów metabolicznych u roślin, wynika przede

wszystkim z regulacji aktywności funkcjonujących w komórce biomolekuł, głównie białek, oraz z regulacji profilu ekspresji genów. Obecnie uważa się, że zmiany przebiegu procesów metabolicznych u roślin w tzw. systemie redoks stanowią podstawę mechanizmów aklimatyzacyjnych roślin do warunków stresowych. Tak więc, kumulacja H_2O_2 u roślin w warunkach stresowych prowadzi nie tylko do powstawania uszkodzeń struktur komórkowych, ale również do szeroko pojętych zmiany aklimatyzacyjnych, dostosowujących przebieg procesów metabolicznych w komórkach roślinnych do aktualnie występujących warunków środowiskowych.

PODWÓJNA ROLA H_2O_2 W ODPOWIEDZI ROŚLIN NA DZIAŁANIE WARUNKÓW STRESOWYCH

Streszczenie

W warunkach działania stresów abiotycznych i biotycznych, u roślin dochodzi do wzrostu poziomu syntezy ROS. Ten przejściowy stan kumulacji ROS w komórkach roślinnych, wywołany działaniem czynników stresowych, nazywany jest wtórnym stresem oksydacyjnym. W efekcie wystąpienia wtórnego stresu oksydacyjnego, na skutek wysokiej reaktywności H_2O_2 , w komórkach roślinnych powstają dwa rodzaje odpowiedzi na działanie czynników stresowych. Pierwsza, polega na kumulacji chemicznie zmienionych i tym samym biologicznie nieaktywnych biomolekuł, co powoduje zaburzenia przebiegu procesów metabolicznych i może prowadzić do nekrozy. Druga, związana jest ze zmianami wewnątrzkomórkowego potencjału redoks i polega na zmianie aktywności występujących w komórce białek oraz profilu ekspresji genów, co prowadzi do aktywacji procesów aklimatyzacyjnych i obronnych. Do zmian profilu ekspresji genów wywołanych wy-

soką reaktywnością H_2O_2 /zmianą wewnątrzkomórkowego potencjału redoks może dochodzić na wskutek: aktywacji lub modyfikacji przebiegu szlaków transdukcji sygnałów, aktywacji ekspresji czynników transkrypcyjnych biorących udział w procesach ekspresji białek aktywnych w procesach aklimatyzacyjnych/obronnych, bezpośredniej aktywacji obecnych w komórkach, nieaktywnych form czynników transkrypcyjnych białek aktywnych w procesach aklimatyzacyjnych/obronnych jak również poprzez tzw. cross-talk pomiędzy różnymi szlakami transdukcji sygnałów. Tym samym, kumulacja H_2O_2 w komórkach roślinnych, w warunkach działania czynników stresowych, z jednej strony powoduje niekorzystne zaburzenia przebiegu procesów metabolicznych, a z drugiej strony korzystne zmiany metaboliczne pozwalające roślinie dostosować przebieg metabolizmu do aktualnie panujących warunków środowiskowych.

DOUBLE FUNCTION OF H_2O_2 IN PLANT RESPONSE TO STRESS CONDITIONS

Summary

The accumulation of high quantities of H_2O_2 and other ROS in cells is a common plant response toward abiotic and biotic stresses. This transient state of the increased level of the ROS production in cells is described as so-called oxidative stress. As a result of its high reactivity H_2O_2 provokes two kinds of responses in plant cells. The first, is related to the biochemical injury of the plant metabolism and may result with necrosis. The second, is more complicated and is associated with the change of the so-called cellular redox potential. According to the current knowledge the cellular redox potential seems to be a crucial player in plant stress acclima-

tion/defence processes as it can regulate the activity of presented in plant cells proteins as well as it can impose on the profile of the gene expression. The change of the gene expression profile induced by the H_2O_2 activity/change of the cellular redox potential can occurs by: induction of signal transduction pathways, modification of the course of the signal transduction pathways, induction of the expression of transcription factors involved in the expression of proteins generating the acclimation/defence processes or direct activation of presented in cells, inactive forms of these transcription factors, as well as by cross talk between redox signaling pathways and

other signaling pathways existing in plant systems. Therefore, H_2O_2 accumulation in plants, in response to stress conditions, provokes the biochemical injury

of the plant metabolism as well as induces some of the metabolic changes allowing life support in stressing conditions.

LITERATURA

- ALLAN A. C., FLUHR R., 1997. *Two distinct sources of elicited reactive oxygen species in tobacco epidermal cells*. Plant Cell 9, 1559–1572.
- APEL K., HIRT H., 2004. *Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress, and signal transduction*. Annu. Rev. Plant Biol. 55, 373–399.
- APOSTOL I., HEINSTEIN P. F., LOW P. S., 1989. *Rapid stimulation of an oxidative burst during elicitation of culture plant cells*. Plant Physiol. 90, 109–116.
- AZIZ A., LARHER F., 1998. *Osmotic stress induced changes in lipid composition and peroxidation in leaf discs of Brassica napus L.* J. Plant Physiol. 153, 754–762.
- BIEHLER K., FOCK H., 1996. *Evidence of the contribution of the Mehler-peroxidase reaction in dissipating excess electrons in drought-stressed wheat*. Plant Physiol. 112, 265–272.
- BOLWELL G. P., WOJTASZEK P., 1997. *Mechanisms for the generation of reactive oxygen species in plant defence – a broad perspective*. Physiol. Mol. Plant P 4, 347–366.
- CAKMACK I., 2000. *Tansley review No. 111 – Possible roles of zinc in protecting plant cells from damage by reactive oxygen species*. New Phytol. 146, 185–205.
- CAKMACK I., MARSCHNER H., 1993. *Effect of zinc nutritional status on activities of superoxide radical and hydrogen peroxide scavenging enzymes in bean leaves*. Plant Soil 155/156, 127–130.
- DAT J., VANDENABEELE S., VRANOVA E., VAN MONTAGU M., INZE D., VAN BREUSEGEM F., 2000. *Dual action of the active oxygen species during plant stress responses*. Cell. Mol. Life Sci. 57, 779–795.
- DESIKAN R., NEILL S. J., HANCOCK J. T., 2000. *Hydrogen peroxide-induced gene expression in Arabidopsis thaliana*. Free Radical Bio. Med. 28, 773–778.
- FOYER C. H., NOCTOR G., 2000. *Oxygen processing in photosynthesis: regulation and signalling*. New Phytol. 146, 359–388.
- FOYER C. H., NOCTOR G., 2005. *Oxidant and antioxidant signalling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context*. Plant Cell Environ. 28, 1056–1071.
- FOYER C. H., NOCTOR G., 2009. *Redox Regulation in Photosynthetic Organisms: Signaling, Acclimation, and Practical Implications*. Antioxid. Redox Sign. 11, 861–905.
- GEIGENBERGER P., KOLBE A., TIESSEN A., 2005. *Redox regulation of carbon storage and partitioning in response to light and sugars*. J. Exp. Bot. 56, 1469–1479.
- GRACE S. C., LOGAN B. A., 1996. *Acclimation of foliar antioxidant system to growth irradiance in three broad-leaved evergreen species*. Plant Physiol. 112, 1631–1640.
- GHEZZI P., BONETTO V., 2003. *Redox proteomics: Identification of oxidatively modified proteins*. Proteomics 3, 1145–1153.
- GOSSETT D. R., BANKS S. W., MILLOHOLLON E. P., LUCAS M. C., 1996. *Antioxidant response to NaCl stress in a control and an NaCl-tolerant cotton cell line grown in the presence of paraquat, buthionine sulfoximine, and endogenous glutathione*. Plant Physiol. 112, 803–809.
- JASPERS P., KANGASJÄRVI J., 2010. *Reactive oxygen species in abiotic stress signaling*. Physiol. Plant 138, 405–413.
- JWA N. S., AGRAWAL G. K., TAMOGAMI S., YONEKURA M., HAN O., IWAHASHI H., RAKWAL R., 2006. *Role of defense/stress-related marker genes, proteins and secondary metabolites in defining rice self-defense mechanisms*. Plant Physiol. Bioch. 44, 261–273.
- KARPIŃSKI S., ESCOBAR C., KARPIŃSKA B., CRWISSEN G., MULLINEAUX P. M., 1997. *Photosynthetic electron transport regulates the expression of cytosolic ascorbate peroxidase genes in Arabidopsis during excess light stress*. Plant Cell 9, 627–640.
- KUŹNIAK E., URBANEK H., 2000. *The involvement of hydrogen peroxide in plant responses to stresses*. Acta Physiol. Plant. 22, 195–203.
- LALOI C., APEL K., DANON A., 2004. *Reactive oxygen signaling: the latest news*. Curr. Opin. Plant Biol. 7, 323–328.
- LOW P. S., MERIDA J. R., 1996. *The oxidative burst in plant defense: function and signal transduction*. Physiol. Plant 96, 553–542.
- MILLER G., SHULAEV V., MITTLER R., 2008. *Reactive oxygen signaling and abiotic stress*. Physiol. Plant 133, 481–489.
- MISHRA N. P., FATMA T., SINGHAL G. S., 1995. *Development of antioxidative defense system of wheat seedlings in response to high light*. Physiol. Plant 95, 77–82.
- PASTERNAK T., POTTERS G., CAUBERGS R., JANSEN M. A. K., 2005. *Complementary interactions between oxidative stress and auxins control plant growth responses at plant, organ, and cellular level*. J. Exp. Bot. 56, 1991–2001.
- PIQUERAS A., HERNANDEZ J. A., OLMOS E., HELLIN E., SEVILLA F., 1999. *NaCl and CuSO₄ treatments trigger distinct oxidative defence mechanism in Nicotiana plumbaginifolia L.* Plant Cell Environ. 22, 387–396.
- RAO M. V., DAVIS K. R., 1999. *Ozone-induced cell death occurs via two distinct mechanisms in Arabidopsis: the role of salicylic acid*. Plant J. 17, 603–614.
- SAVOURE A., THORIN D., DAVEY M., HUA X. J., MAURO S., VAN MONTAGU M., INZE D., VERBURUGEN N., 1999. *NaCl and CuSO₄ treatments trigger distinct oxidative defence mechanisms in Nicotiana plumbaginifolia L.* Plant Cell Environ. 22, 387–396.
- SGHERRI C. L. M., PINZINO C., NAVARI-IZZO F., 1993. *Chemical changes and O₂⁻ production in thylakoid membranes under water stress*. Physiol. Plant 87, 211–216.
- STIEGER P. A., FELLER U., 1997. *Degradation of stromal proteins in pea (Pisum sativum L.) chloroplasts under oxidising conditions*. J. Plant Physiol. 151, 214–219.
- TENHAKEN R., LEVINE A., BRISSON L. F., DIXON R. A., LAMB C., 1995. *Function of the oxidative burst in hypersensitive disease resistance*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92, 4158–4163.
- WILLEKENS H., CHAMNONGPOL S., DAVEY M., SCHRAUDNER M., LANGEBAEELS C., VAN MONTAGU M., 1997. *Catalase is a sink for H₂O₂ and is indispensable for stress defence C3 plants*. EMBO J. 16, 4806–4816.

- WOHLGEMUTH H., MITTELSTRASS K., KSCHIESCHAN S., BENDER J., WEIGEL H. J., OVERMYER K., KANGÄSJARVI J., SANDERMANN H., LANGEBARTELS C., 2002. *Activation of an oxidative burst is a general feature of sensitive plants exposed to the air pollutant ozone*. Plant Cell Environ. 25, 717–726.
- WOŻNY A., PRZYBYŁ K., 2004. *Komórki roślinne w warunkach stresu. Tom I. Komórki in vivo*. Część 2. Wydawnictwo Naukowe UAM, Poznań.
- VRANOVA E., INZ D., VAN BREUSEGEM F., 2002. *Signal transduction during oxidative stress*. J Exp Bot 53, 1227–1236.
- ZHU Q., DABI T., BEECHE A., YAMAMOTO R., LAWTON M. A., LAMB C., 1995. *Cloning and properties of a rice gene encoding phenylalanine ammonia-lyase*. Plant Mol. Biol. 29, 535–550.