

## **ROLA REAKTYWNYCH FORM TLENU W PROCESIE ROZWOJU I KIEŁKOWANIA NASION\***

### **FUNCTION OF REACTIVE OXYGEN SPECIES IN SEED DEVELOPMENT AND GERMINATION**

Łukasz WOJTYLA, Małgorzata GARNCZARSKA, Lech RATAJCZAK

Zakład Fizjologii Roślin, Uniwersytet im. A. Mickiewicza, Poznań

*Streszczenie:* Reaktywne formy tlenu (RFT) powstają w nasionach nie tylko w wyniku działania czynników stresowych, lecz również w procesach zachodzących w warunkach fizjologicznych. Stwierdzono, że RFT powstają w nasionach na każdym etapie ich rozwoju i kiełkowania, tj. podczas rozwoju zarodka, desykcji nasion, starzenia, pęcznienia, mobilizacji substancji zapasowych, jak również w momencie przebiccia łupiny nasiennej przez oś zarodkową. RFT mogą powodować poważne uszkodzenia komórek zarodka podczas wczesnej embriogenezy oraz desykcji, uniemożliwiając wykształcenie prawidłowych nasion. W trakcie długotrwałego przechowywania nasion RFT mogą przyspieszać utratę zdolności kiełkowania. RFT mogą także chronić nasiona, a szczególnie kiełkujący zarodek, przed atakiem patogenów poprzez tzw. wybuch tlenowy, jaki obserwuje się w momencie przebiccia łupiny nasiennej przez oś zarodkową. W biologii nasion szczególnie istotną funkcję pełnią systemy antyoksydacyjne odpowiedzialne za regulację poziomu RFT i ich usuwanie.

*Słowa kluczowe:* antyoksydanty, enzymy antyoksydacyjne, reaktywne formy tlenu, rozwój i kiełkowanie nasion.

*Summary:* Generation of reactive oxygen species (ROS) occurs in seed not only during stress conditions, but also as a result of physiological processes. ROS are produced in seed in all developmental and germination phases like embryogenesis, including desiccation, seed ageing, imbibition, mobilization of storage reserves and germination manifested in radicle protrusion. Increase in ROS level during early embryogenesis and desiccation may lead to serious damage of embryo's cells and disturb developmental processes. ROS generated during prolonged storage may promote the inability of seed to germinate. Reactive oxygen species may also protect seed and particularly the emerging seedling against attack by pathogens by oxidative burst which occurs when the expanding embryo ruptures the seed coat. In seed biology systems responsible for regulation of ROS production and scavenging play a key role.

*Keywords:* antioxidants, antioxidative enzymes, reactive oxygen species, seed development and germination.

\*Praca finansowana w ramach grantu KBN nr 2 PO6R 085 26.

*Skróty:* AOX – oksydaza alternatywna, APX – peroksydaza askorbinianowa, AsA – zredukowany askorbinian, DHA – dehydroaskorbinian, CAT – katalaza, GSSG (*glutathione disulfid*) – dwusiarczek glutationu, GSH – glutation, HSP (*Heat Shock Proteins*) – białka szoku cieplnego, LEA (*Late-Embryogenesis-Abundant*) – białka gromadzące się w czasie późnej embriogenezy, PUMP (*Plant Uncoupling Mitochondrial Protein*) – białko rozprzegające, RFT (*reactive oxygen species – ROS*) – reaktywne formy tlenu, SOD – dysmutaza ponadtlenkowa

## 1. WSTĘP

W cyklu życiowym roślin ważną rolę odgrywa nasienie. Jak definiuje Jankun w Encyklopedii Biologicznej, nasienie to twór charakterystyczny dla roślin nasiennych (*Spermatophyta*), forma przetrwalnikowa, służąca jednocześnie do rozsiewania i rozprzestrzeniania gatunku [23]. Zarówno budowa, jak i skład nasion wykazują istotne różnice w zależności od gatunku. Większość nasion w stanie dojrzałym zawiera bardzo małe ilości wody, często poniżej 10%, jedynie część gatunków (w tym wiele roślin tropikalnych, drzew i roślin wodnych) wykształca nasiona, które zamierają, gdy zawartość wody spadnie w nich poniżej 20% [3, 29, 50]. Ze względu na zawartość wody w dojrzałych nasionach wyróżnia się dwie kategorie nasion. Do tzw. nasion typu „*orthodox*” zalicza się nasiona, które w trakcie rozwoju ulegają silnemu odwodnieniu i zachowują w tym stanie zdolność do kiełkowania nawet przez wiele lat. Typ „*recalcitrant*” obejmuje nasiona, które osiągają dojrzałość w stanie uwodnionym i tracą zdolność do kiełkowania podczas podsuszania nawet do stosunkowo wysokiego poziomu wody (20–30%) [43]. Reaktywne formy tlenu (RFT) powstają w nasionach na każdym etapie ich rozwoju i kiełkowania, tj. podczas rozwoju zarodka, w tym jego odwadniania, podczas starzenia nasion, w wyniku pęcznienia, mobilizacji substancji zapasowych, jak również w momencie przebiccia przez oś zarodkową łupiny nasiennej [3, 17, 26, 40, 45, 47]. Istotny wpływ na żywotność nasion mają zdolności antyoksydacyjne zapobiegające gromadzeniu się reaktywnych form tlenu. Nadmiar RFT prowadzi do stresu oksydacyjnego, uszkodzeń komórek i w konsekwencji do zaburzeń procesu kiełkowania, a nawet śmierci zarodka [3, 40, 47, 52]. RFT powodują uszkodzenia struktur wewnętrznych, degradację błon komórkowych, upośledzenie funkcji białek i enzymów, uszkodzenia kwasów nukleinowych oraz działają mutagennie [3, 26, 31]. Prawidłowe działanie systemów antyoksydacyjnych w nasionach jest zatem konieczne do właściwego przebiegu procesu kiełkowania. Proces kiełkowania jest ważnym etapem w życiu rośliny, decydującym o kondycji młodej siewki i wpływającym na dalsze etapy wzrostu i rozwoju. W tym czasie zachodzą istotne zmiany w metabolizmie nasion; z początkowo powolnego, uśpionego stanu anabiozy komórki przechodzą do bardzo intensywnego metabolizmu [3].

Ostatnio coraz częściej dyskutowana jest pozytywna rola reaktywnych form tlenu w komórkach roślinnych. Postuluje się ich udział w procesach rozwojowych, w systemach transdukcji sygnału, w ochronie komórek przed atakiem patogenów, modyfikacji ścian komórkowych oraz w rozluźnianiu ich struktury, co ułatwia wzrost komórkom [3, 33, 45]. Rola jaką RFT pełnią w komórkach zależy w dużym stopniu od ich stężenia, dlatego istotny wpływ na prawidłowy przebieg procesów rozwoju i

kiełkowania nasion, a także na zachowanie zdolności do kiełkowania w trakcie przechowywania nasion mają systemy regulujące poziom RFT. Systemy antyoksydacyjne dzielimy na enzymatyczne i nieenzymatyczne. Te pierwsze wykorzystują aktywność takich enzymów, jak: dysmutaza nadadtlenkowa (SOD EC 1.15.1.1), katalaza (CAT EC 1.11.1.6), a także enzymów zaangażowanych w cykl askorbinianowo-glutationowy: peroksydaza askorbinianowa (APX EC 1.11.1.11), reduktaza monodehydroaskorbinianu (MDHAR EC 1.6.5.4), reduktaza dehydroaskorbinianu (DHAR EC 1.8.5.1) oraz reduktaza glutationu (GR EC 1.6.4.2) [35]. Systemy nieenzymatycznej obrony komórek przed działaniem RFT obejmują głównie niskocząsteczkowe związki antyoksydacyjne rozpuszczalne w wodzie, takie jak: askorbinian i glutation oraz rozpuszczalny w tłuszczach  $\alpha$ -tokoferol [47].

## 2. REAKTYWNE FORMY TLENU W ROZWOJU NASION

### 2.1. Wczesna embriogeneza

W zarodkach niektórych nasion na wczesnych etapach rozwoju zachodzi proces fotosyntezy, będący jednym z głównych źródeł reaktywnych form tlenu w zielonych tkankach roślin. Proces ten jest uznawany za główne źródło tlenu singletowego oraz anionorodnika nadadtlenkowego. Również mitochondrialny łańcuch transportu elektronów jest ważnym źródłem RFT podczas rozwoju nasion, kiedy procesy oddechowe zachodzą z dużą intensywnością [3]. W normalnych warunkach w wyniku tzw. przecieku mitochondrialnego około 1% tlenu zużywanego przez rośliny w procesie oddychania mitochondrialnego ulega niepełnej redukcji stając się źródłem reaktywnych form tlenu, głównie anionorodnika nadadtlenkowego, który w wyniku dysmutacji przekształcany jest do nadadtlenku wodoru [34]. Ważnym miejscem powstawania RFT są także peroksydomy. W organellach tych wytwarzany jest w procesie fotooddychania nadtlenek wodoru oraz anionorodnik nadadtlenkowy w peroksydomowym łańcuchu przenośników elektronów. Peroksydomy mają także udział w procesie usuwania RFT. Organelle te zaangażowane są bowiem w cykl askorbinianowo-glutationowy, są także miejscem występowania dysmutazy nadadtlenkowej oraz katalazy uczestniczącej w rozkładzie  $H_2O_2$ . Peroksydomy są również źródłem tlenu azotu, cząsteczki sygnałnej, która uczestniczy między innymi w procesach obrony komórki przed działaniem czynników stresowych, a ponadto moduluje odpowiedź komórkowego systemu antyoksydacyjnego [8, 18, 24]. W komórkach roślinnych źródłem reaktywnych form tlenu są także oksydazy NADPH, pH-zależne peroksydazy ściany komórkowej oraz aminooksydazy apoplastowe [1, 3, 7, 30, 32]. Ich znaczenie w biologii nasion nie zostało jeszcze w pełni poznane i wymaga dalszych badań w celu scharakteryzowania ich roli w trakcie procesu rozwoju i kiełkowania nasion.

Powstające podczas embriogenezy reaktywne formy tlenu, w tym także  $H_2O_2$ , mogą pełnić istotną rolę w prawidłowym rozwoju nasienia. Zmiany stężenia  $H_2O_2$  wpływają na poziom ekspresji niektórych genów. Stwierdzono że, w komórkach rzodkiewnika pospolitego (*Arabidopsis thaliana*) wystawionych na działanie podwyższonego stężenia  $H_2O_2$  zmianie uległ poziom ekspresji 175 genów, z których część stanowiły geny kodujące enzymy uczestniczące w procesach obrony komórek przed RFT [10]. Istotną rolę w procesie embriogenezy pełni askorbinian (AsA). W początkowych etapach rozwoju zarodka, kiedy brak mu zdolności do samodzielnej syntezy, askorbinian jest w całości dostarczany przez roślinę mateczną [2]. AsA pełni ważną rolę w cyklu komórkowym poprzez pobudzanie i kontrolę podziałów komórek merystematycznych [9, 38]. W trakcie rozwoju nasion typu „*orthodox*” zawartość askorbinianu stopniowo spada, wzrasta natomiast stężenie dehydroaskorbinianu (DHA). Równocześnie spada także aktywność peroksydazy askorbinianowej [51].

## 2.2. Desykcja

Szkodliwe działanie reaktywnych form tlenu na nasiona ma miejsce w trakcie ich desykcji i przechodzenia w stan anabiozy. Nasiona, które osiągnęły dojrzałość, nie prowadzą fotosyntezy, są w stanie silnego odwodnienia i ich metabolizm jest znacznie spowolniony. Proces desykcji jest naturalnym etapem rozwoju nasion typu „*orthodox*”, w wyniku którego mogą one poprzez ograniczenie metabolizmu przetrwać długi okres w niekorzystnych warunkach, zachowując zdolność do kiełkowania. Najważniejszym źródłem RFT w dojrzałych nasionach jest mitochondrialny łańcuch transportu elektronów [3]. Spadek zawartości wody poniżej 0,25 g na gram suchej masy nasion ogranicza do minimum proces oddychania mitochondrialnego. Prawdopodobnie jest to także skuteczny sposób zmniejszenia produkcji RFT przez mitochondria [3, 4]. Nasiona typu „*orthodox*” charakteryzują się wysoką odpornością na odwodnienie poprzez unikanie negatywnych skutków działania RFT. Nasiona wrażliwe na wysuszenie („*recalcitrant*”) wraz z utratą wody tracą swoją żywotność. Dodatkowo obserwuje się w nich szereg objawów stresu oksydacyjnego, takie jak: zwiększenie stężenia tiobarbituranów, uwalnianie etanu i akumulację stabilnych form rodników organicznych [12, 21]. Uszkodzenia spowodowane deficytem wody w komórkach nasion typu „*recalcitrant*” przypisuje się zwiększonej produkcji RFT w połączeniu z obniżeniem zdolności antyoksydacyjnej systemów ochronnych [28].

Nasiona wykształciły mechanizmy obrony antyoksydacyjnej na stres oksydacyjny spowodowany deficytem wody polegające na regulacji aktywności enzymów odpowiedzialnych za usuwanie RFT, jak również na zmianach stężenia cząsteczek o właściwościach przeciwutleniających [5, 28]. Suche nasiona typu „*orthodox*”, w odróżnieniu od nasion typu „*recalcitrant*” charakteryzują się niską zawartością lub brakiem askorbinianu (AsA). Stwierdzono w nich również brak aktywności APX [51]. Istnieje również grupa nasion, które pomimo silnego odwodnienia nie są w pełni pozbawione AsA i aktywności peroksydazy askorbinianowej. Ilustrują to wyniki uzyskane w przypadku nasion buka zwyczajnego (*Fagus sylvatica*), co sugeruje pośredni charakter tych nasion [40]. Głównym związkami o charakterze antyoksydacyjnym w suchych nasionach jest glutation [9, 26]. W suchych nasionach grochu (*Pisum sativum*) obserwuje się szczególnie

wysoki poziom glutationu i to zarówno jego formy zredukowanej GSH, jak i utlenionej GSSG, jednak w porównaniu ze świeżymi tkankami forma disulfidowa stanowi większy procent całkowitego glutationu [27, 52, 55]. Oprócz funkcji antyoksydacyjnej, glutation, a dokładniej stosunek GSH/GSSG, reguluje syntezę białek i wpływa na aktywność enzymów poprzez reakcje z grupami cysteinowymi białek [52]. Glutation uczestniczy także w regulacji cyklu komórkowego [38]. W suchych, dojrzałych nasionach typu „*orthodox*” obserwuje się również wysoką aktywność reduktazy glutationowej [4, 27]. Innym ważnym elementem przystosowującym nasiona do stanu silnego odwodnienia jest wzrost stężenia rozpuszczalnych cukrów w tkankach [4, 19, 39, 41]. Podobny mechanizm zaobserwowano także u roślin rezurekcyjnych („zmartwychwstających”) i porostów [22, 26]. Proces odwodnienia nasion jest związany z powstawaniem wolnych rodników i reaktywnych form tlenu. Mechanizm ich powstawania oraz aktywacji systemu antyoksydacyjnego został dokładnie opisany dla nasion typu „*recalcitrant*” poddanych odwodnieniu w warunkach laboratoryjnych [28]. Niewiele prac poświęcono roli systemu antyoksydacyjnego w nabywaniu tolerancji na desykcję podczas rozwoju nasion *in planta*. Zmiana aktywności enzymów antyoksydacyjnych zachodząca podczas dojrzewania nasion i stopniowej utraty wody wydaje się być sposobem ich przystosowania do obrony przed RFT w warunkach silnego odwodnienia. Stwierdzono, że w trakcie dojrzewania nasion niewrażliwych na desykcję spada aktywność dysmutazy ponadtlenkowej, co może prowadzić do akumulacji anionorodnika ponadtlenkowego oraz wzrasta stężenie  $H_2O_2$  w tkankach zarodka [4]. Równocześnie wzrasta aktywność katalazy i spada aktywność peroksydazy askorbinianowej. W trakcie desykcji następuje stopniowe obniżenie zawartości  $H_2O_2$ , co sugeruje rolę CAT w usuwaniu nadtlenu wodoru [5]. Regulacja ekspresji form izoenzymatycznych CAT badana była w trakcie rozwoju ziaren kukurydzy. W badaniach tych wykazano czasowo i przestrzennie zróżnicowaną ekspresję różnych form katalaz [44].

Silnemu odwodnieniu nasion towarzyszy wiele komórkowych i biochemicznych przemian. Zalicza się do nich modyfikacje ultrastruktury komórkowej, takie jak waskularyzacja oraz syntezę białek LEA (*Late-Embryogenesis-Abundant*), białek szoku cieplnego (HSP – *Heat Shock Proteins*), aktywację systemów antyoksydacyjnych oraz akumulację oligosacharydów [4]. Synteza białek zaliczanych do grupy LEA (należą do nich również dehidryny) rozpoczyna się wraz z początkiem procesu desykcji. Dominującymi cząsteczkami mRNA występującymi w nasionach w stanie odwodnionym są mRNA kodujące białka LEA. Ich synteza spada stopniowo już po kilku godzinach od momentu, kiedy suche nasiona zaczynają pobierać wodę w procesie pęcznienia [22, 50]. Dehidryny, białka zaliczane do klasy 2 białek LEA, mogą być zaangażowane w proces usuwania RFT [3]. Ze względu na silnie hydrofilowy charakter białek LEA postuluje się ich udział w wiązaniu wody, co zapewnia minimalną jej ilość, niezbędną do przeżycia [22]. Odwodnienie nasion prowadzi do ograniczenia metabolizmu i zmniejszenia zużycia tlenu, nie powoduje to jednak całkowitego zatrzymania procesów metabolicznych. W celu podtrzymania metabolizmu i produkcji ATP nasiona stopniowo przechodzą na szlak oddychania beztlenowego. Aktywację torów fermentacyjnych obserwowano przy spadku zawartości wody poniżej 0,6 g na gram świeżej masy tkanki

[28], jednak aktywność dehydrogenazy alkoholowej ujawniała się już na wczesnych etapach rozwoju zarodka [15, 20].

### 2.3. Starzenie się nasion

Reaktywne formy tlenu mogą spowodować utratę przez nasiona zdolności do kiełkowania w trakcie ich długotrwałego przechowywania. Akumulacja RFT w trakcie spoczynku nasion uznawana jest za jedną z głównych przyczyn ich starzenia. RFT mogą albo reagować bezpośrednio ze składnikami komórek, powodując ich uszkodzenia, albo zostać związane w strukturach wewnątrzkomórkowych [3].

Jak już wspomniano powyżej, dojrzałe nasiona typu „*orthodox*” zawierają bardzo małe ilości wody, ale nawet bardzo niskie stężenia wody mogą podtrzymywać przebieg nieenzymatycznych procesów samoutleniania się niektórych związków, głównie lipidowych, prowadzących do powstawania wolnych rodników [53]. Powstające w tych procesach wolne rodniki mogą kumulować się w tkankach powodując ich uszkodzenia i obniżając żywotność nasion, głównie w wyniku peroksydacji lipidów. Prowadzi to do zmian w strukturze wielonienasyconych kwasów tłuszczowych obecnych w błonach komórkowych oraz w ciałach tłuszczowych nasion oleistych. Reakcje tego typu są prawdopodobnie głównym źródłem RFT w dojrzałych, suchych nasionach [3, 26]. W komórkach w stanie silnie odwodnionym aktywność enzymatyczna jest bardzo ograniczona. Również enzymy antyoksydacyjne nie są w stanie w pełni uczestniczyć w procesach obrony komórek przed działaniem RFT, dlatego funkcje ochronne pełnią wówczas niskocząsteczkowe antyoksydanty. Również warunki przechowywania nasion, takie jak: temperatura i wilgotność powietrza, mają wpływ na powstawanie RFT i aktywność enzymów antyoksydacyjnych [3, 40].

## 3. ROLA REAKTYWNYCH FORM TLENU PODCZAS KIEŁKOWANIA NASION

### 3.1. Pęcznienie

Proces pęcznienia jest pierwszym etapem kiełkowania nasion. Kiełkowanie można podzielić na trzy główne fazy. Początkowa faza charakteryzuje się gwałtownym pobieraniem wody przez nasiona, w wyniku czego szybko wzrasta masa nasion oraz zużycie tlenu przez nasiona. Faza druga określana jest jako metaboliczne plateau, jednak w tym okresie rozpoczyna się synteza kwasów nukleinowych i białek, przygotowując oś zarodkową do wzrostu. Ostatnia trzecia faza kiełkowania jest etapem charakteryzującym się ponownym wzmożonym poborem wody i tlenu przez nasiona i związana jest z wydostaniem się osi zarodkowej na zewnątrz okrywy nasiennej. Moment ten powszechnie uważa się za zakończenie procesu kiełkowania [3, 6, 17, 48]. W niektórych przypadkach, zwłaszcza w rolnictwie, za zakończenie kiełkowania uznaje się ukazanie się liścieni lub pierwszego liścia, a czasem uzyskanie przez siewkę autotrofii [29].

Intensywne pobieranie wody podczas pęcznienia suchych nasion może powodować uszkodzenia związane z gwałtownym wzrostem stężenia wody, wpływające na obniżenie efektywności kiełkowania, a nawet prowadzące do utraty tej zdolności przez część nasion. Na negatywne skutki pęcznienia narażone są głównie nasiona przechowywane przez długi czas w stanie silnie odwodnionym [48]. Podczas procesu pęcznienia następuje powrót do intensywnego metabolizmu. Również ponowne wejście na tor fosforylacji oksydacyjnej jest źródłem RFT. Istotnym źródłem RFT w pęczniejących i kiełkujących nasionach mogą być uwalniane w wyniku pęcznienia i mobilizacji substancji zapasowych rodniki związane przez gromadzone w trakcie dojrzewania nasion związki [3].

### 3.2. Przebicie okrywy nasiennej

Moment przebicia okrywy nasiennej przez oś zarodkową jest najbardziej widocznym symptomem kiełkowania i rozpoczęcia wzrostu. Proces przebicia okrywy nasiennej tłumaczą trzy różne koncepcje. Pierwsza z możliwości zakłada, że początkowe etapy wzrostu osi zarodkowej są wynikiem wzrostu turgoru komórek. Pod koniec kiełkowania potencjał osmotyczny w komórkach osi zarodkowej staje się bardziej ujemny na skutek wzrostu stężenia substancji osmotycznie czynnych pochodzących z hydrolizy materiałów zapasowych zgromadzonych w komórkach osi zarodka. Prowadzi to do zwiększonego pobierania wody przez komórki i wzrostu ich objętości [6]. Według drugiej koncepcji wzrost elongacyjny komórek osi zarodkowej jest możliwy dzięki rozluźnieniu struktury ścian komórkowych i zwiększeniu ich rozciągliwości. Trzecia możliwość zakłada rozluźnienie struktur okrywy nasiennej ułatwiające przebicie osi zarodkowej na zewnątrz. Wzrost osi zachodzi przez wydłużanie się komórek spowodowane działaniem potencjału ciśnienia, który w sytuacji, kiedy wzrost komórek nie jest ograniczony poprzez otaczające struktury, jest wystarczająco wysoki [6].

Przebicie okrywy nasiennej zmienia w sposób istotny warunki, w jakich rozwija się kiełkujące nasienie. W początkowych etapach kiełkowania nasiona narażone są na stan przejściowej anaerobiozy będący wynikiem słabej przepuszczalności okrywy nasiennej dla gazów, następuje wówczas aktywacja torów fermentacyjnych [15]. Warunki te charakterystyczne są dla stanu hipoksji. Podczas hipoksji zmniejsza się wydajność mechanizmów antyoksydacyjnych [7]. Pęknięcie okrywy nasiennej i wydostanie się osi zarodkowej na zewnątrz zwiększa dopływ tlenu do komórek. Towarzyszy temu intensywny wzrost stężenia RFT określanego jako tzw. wybuch tlenowy. Obecnie postuluje się, że RFT mogą być główną przyczyną zamierania skiełkowanych nasion, które po okresie hipoksji eksponowane są na warunki tlenowe [13, 14]. RFT powstają w tym okresie głównie w mitochondriach, co jest wynikiem wzmożonej aktywności oddechowej tkanek spowodowanej zwiększoną dostępnością tlenu. Wykazano, że w nasionach grochu i łubinu wzrasta poziom wolnych rodników pochodzenia semichinonowego w momencie przebicia okrywy nasiennej przez oś zarodkową [16, 55]. Wzrost stężenia  $H_2O_2$  zaobserwowano między innymi podczas kiełkowania nasion łubinu [16], soi [17] i rzodkiewki [45]. Procesowi kiełkowania towarzyszył także wzrost poziomu rodnika hydroksylowego i anionorodnika ponadtlenkowego [17, 45]. Sugeruje się, że głównym miejscem wytwarzania RFT w trakcie kiełkowania są: oś zarodkowa, okrywa

nasienna i warstwa aleuronowa [3, 17]. Zjawisko zwiększonej produkcji RFT zaobserwowano u roślin również w sytuacji kontaktu komórek z patogenem lub cząsteczką elisytora [54]. Schopfer i wsp. [45] wykazali gwałtowny wzrost stężenia RFT w kiełkujących nasionach rzodkiewki (*Raphanus sativus*) na krótko przed przebicciem przez oś zarodkową okrywy nasiennej i to nie tylko w tkankach, ale również w środowisku otaczającym kiełkujące nasienie. Autorzy ci postulują udział RFT w procesach obronnych przed atakiem patogenów w trakcie kiełkowania nasion. RFT uczestniczą również w procesie depozycji lignin i rozluźnieniu struktury ściany komórkowej, co ułatwia wzrost elongacyjny komórkom osi zarodkowej [3]. Stwierdzono także udział RFT w programowanej śmierci komórek warstwy aleuronowej w ziarniakach jęczmienia (*Hordeum vulgare*) w trakcie ich kiełkowania [11].

Doniesienia literaturowe z ostatnich lat wskazują na udział oksydazy alternatywnej (AOX) i białka rozprzegającego PUMP (*Plant Uncoupling Mitochondrial Protein*) w obronie komórek roślinnych przed RFT, ale dotychczas brak danych potwierdzających ich rolę w obronie przed RFT wytwarzanymi w procesach rozwoju i kiełkowania nasion [25, 49]. Większość badań poświęconych mechanizmom obrony antyoksydacyjnej uruchamianym podczas kiełkowania nasion dotyczy roli enzymów i metabolitów cyklu askorbinianowo-glutationowego. W trakcie kiełkowania obserwuje się wzrost zawartości askorbinianu. W początkowym okresie pęcznienia tłumaczy się to wzrostem aktywności reduktazy dehydroaskorbinianu, która uczestniczy w przekształcaniu DHA do askorbinianu. Gwałtowny wzrost stężenia askorbinianu w kiełkującym zarodku następuje dopiero po aktywacji szlaków biosyntezy AsA, zwłaszcza w momencie przebiccia przez oś zarodkową łupiny nasiennej [16, 36, 37, 55]. Zmianie ulega również stężenie innych substancji niskocząsteczkowych mających zdolności antyoksydacyjne między innymi  $\alpha$ -tokoferolu i  $\gamma$ -tokoferolu [46, 47]. Innym miejscem powstawania RFT są glioksysomy, będące funkcjonalną klasą peroksysomów, których główną funkcją jest katabolizm kwasów tłuszczowych. Uczestniczą one w produkcji RFT w procesie  $\beta$ -oksydacji lipidów katalizowanym przez oksydazę acylo-CoA, jak również w cyklu glioksalowym [42]. Procesy te są znaczącym źródłem RFT szczególnie w nasionach oleistych.

## PODSUMOWANIE

Nie ulega wątpliwości, że reaktywne formy tlenu pełnią istotną funkcję w biologii nasion. Pojawiają się we wszystkich stadiach życia nasion począwszy od rozwoju aż po kiełkowanie. Wytwarzanie RFT towarzyszy dramatycznym zmianom uwodnienia i aktywności metabolicznej nasion. Ostatnie lata przyniosły znaczący postęp w badaniach zarówno nad rolą RFT w fizjologii nasion, jak i systemami antyoksydacyjnymi aktywowanymi na poszczególnych etapach życia nasion. Pomimo nasilenia tych badań wiele kwestii pozostaje niewyjaśnionych. Zbyt mało jeszcze wiadomo na temat roli RFT w procesie kiełkowania. Nie mniej jednak wydaje się już niemal pewne, że wzmożonej produkcji reaktywnych form tlenu nie należy rozpatrywać wyłącznie w



kategoriach stresu oksydacyjnego, lecz jako przejaw aktywności biologicznej nasion znajdującej się pod kontrolą rozwojową. Poznanie mechanizmów leżących u podstaw oddziaływania reaktywnych form tlenu z hormonami dostarczy nowych danych na temat nabywania tolerancji na desykcję oraz przełamania spoczynku nasion.

## LITERATURA

- [1] APEL K, HIRT H. Reactive oxygen species: metabolism. Oxidative stress, and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol* 2004; **55**: 373–399.
- [2] ARRIGONI O, DE GARA L, TOMMASI F, LISOR R. Changes in the ascorbate system during seed development of *Vicia faba* L. *Plant Physiol* 1992; **99**: 235–238.
- [3] BAILLY C. Active oxygen species and antioxidants in seed biology. *Seed Sci Res* 2004; **14**: 93–107.
- [4] BAILLY C, AUDIGIER C, LADONNE F, WAGNER MH, COSTE F, CORBINEAU F, CÔME D. Changes in oligosaccharide content and antioxidant enzyme activities in developing bean seeds as related to acquisition of drying tolerance and seed quality. *J Exp Bot* 2001; **52**: 701–708.
- [5] BAILLY C, LEYMARIE J, LEHNER A, ROUSSEAU S, CÔME D, CORBINEAU F. Catalase activity and expression in developing sunflower seeds as related to drying. *J Exp Bot* 2004; **55**: 475–483.
- [6] BEWLEY JD. Seed germination and dormancy. *Plant Cell* 1997; **9**: 1055–1066.
- [7] BLOKHINA O, VIROLAINEN E, FAGERSTEDT KV. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Ann Bot* 2003; **91**: 179–194.
- [8] CORPAS FJ, BARROSO JB, DEL RIO LA. Peroxisomes as a source of reactive oxygen species and nitric oxide signal molecules in plant cells. *Trend Plant Sci* 2001; **6**: 145–150.
- [9] DE TULLIO MC, ARRIGONI O. The ascorbic acid system in seeds: to protect and to serve. *Seed Sci Res* 2003; **13**: 249–260.
- [10] DESIKAN R, A-H MACKERNESS S, HANCOCK JT, NEILL SJ. Regulation of the *Arabidopsis* transcriptome by oxidative stress. *Plant Physiol* 2001; **127**: 159–172.
- [11] FATH A, BETHKE P, BELIGNI V, JONES R. Active oxygen and cell death in cereal aleurone cells. *J Exp Bot* 2002; **53**: 1273–1282.
- [12] FINCH-SAVAGE WE, BLAKE PS, CLAY HA. Desiccation stress in recalcitrant *Quercus robur* L. seeds results in lipid peroxidation and increased synthesis of jasmonates and abscisic acid. *J Exp Bot* 1996; **47**: 661–667.
- [13] GARNCZARSKA M, BEDNARSKI W. Effect of a short-term hypoxic treatment followed by re-aeration on free radicals level and antioxidative enzymes in lupine roots. *Plant Physiol Biochem* 2004; **42**: 233–240.
- [14] GARNCZARSKA M, BEDNARSKI W, MORKUNAS I. Re-aeration – induced oxidative stress and antioxidative defenses in hypoxically pretreated lupine roots. *J Plant Sci* 2004; **161**: 415–422.
- [15] GARNCZARSKA M, RATAJCZAK L. Changes in the activity and isozyme patterns of alcohol dehydrogenase in developing and germinating seeds of yellow lupine. *Acta Physiol Plant* 1993; **15**: 257–261.
- [16] GARNCZARSKA M, WOJTYLA Ł, BEDNARSKI W, ZALEWSKI T, JURGA S. Characterization of germinating lupine seeds by NMR imaging and EPR spectroscopy. *Biol Lett* 2005; **42**: 157.
- [17] GIDROL X, LIN WS, DÉGOUSÉE N, YIP SF, KUSH A. Accumulation of reactive oxygen species and oxidation of cytokinin in germinating soybean seeds. *Eur J Biochem* 1994; **224**: 21–28.
- [18] GNIAZDOWSKA A. Rola tlenu azotu w metabolizmie komórki roślinnej. *Kosmos* 2004; **53**: 343–353.
- [19] GÓRECKI RJ, LAHUTA JB, HENDLY CL, JONES AD. Soluble sugars in maturing pea seeds of different isolines in relation to desiccation tolerance. W: BLACK M, BRADFORD KJ, VASQUEZ-RAMOS J [red.] Seed Biology: Advances and Applications. *CAB International* 2000: 67–74.
- [20] GÓRECKI RJ, PIOTROWICZ-CIEŚLAK A. Anaerobic respiration during yellow lupine seeds maturation. W: COME D, CORBINEAU F [red.] Proceedings of the Fourth International Workshop on seeds. Basic and Applied Aspects of seed Biology. ASFIS, Paris 1993: 73–79.
- [21] HENDRY GAF, FINCH-SAVAGE WE, THORPE PC, ATHERTON NM, BUCKLAND SM, NILSSON KA, SEEL WE. Free radical processes and loss of seed viability during desiccation in the recalcitrant species *Quercus robur* L. *New Phytol* 1992; **122**: 273–279.

- [22] INGRAM J, BARTELS D. The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 1996; **47**: 377–403.
- [23] JANKUN A. Nasienie. W: Encyklopedia Biologiczna. Agencja Publicystyczno-Wydawnicza Opres Kraków 1998; VII: 146.
- [24] JIMÉNEZ A, HERNÁNDEZ JA, DEL RIO LA, SEVILLA F. Evidence for the presence of the ascorbate-glutathione cycle in mitochondria and peroxisomes of pea leaves. *Plant Physiol* 1997; **114**: 275–284.
- [25] JUSZCZUK IM, RYCHTER AM. Alternative oxidase in higher plants. *Acta Biochim Pol* 2003; **50**: 1257–1271.
- [26] KRANNER I, BIRTIĆ S. A modulating role for antioxidants in desiccation tolerance. *Integr Comp Biol* 2005; **45**: 734–740.
- [27] KRANNER I, GRILL D. Content of low-molecular-weight thiols during the imbibition of pea seeds. *Physiol Plant* 1993; **88**: 557–562.
- [28] LEPRINCE O, BUITINK J, HOEKSTRA FA. Axes and cotyledons of recalcitrant seeds of *Castanea sativa* Mill. exhibit contrasting responses of respiration to drying in relation to desiccation sensitivity. *J Exp Bot* 1999; **50**: 1515–1524.
- [29] LEWAK S. Kiełkowanie nasion. W: KOPCEWICZ J, LEWAK S [red.] Fizjologia roślin. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2002: 485–497.
- [30] MAŁECKA A, TOMASZEWSKA B. Reaktywne formy tlenu w komórkach roślinnych i enzymatyczne systemy obronne. *Post Biol Kom* 2005; **32**: 311–325.
- [31] MANCINI A, BUSCHINI A, RESTIVO FM, ROSSI C, POLI P. Oxidative stress as DNA damage in different transgenic tobacco plants. *Plant Sci* 2006; **170**: 845–852.
- [32] MITTLER R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci* 2002; **7**: 405–410.
- [33] MITTLER R, VANDERAUWERA S, GOLLERY M, VAN BREUSEGEM F. Reactive oxygen gene network of plants. *Trends Plant Sci* 2004; **9**: 490–498.
- [34] MØLLER IM. Plant mitochondria and oxidative stress: electron transport, NADPH turnover, and metabolism of reactive oxygen species. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 2001; **52**: 561–591.
- [35] NOCTOR G, FOYER CH. Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 1998; **49**: 249–279.
- [36] PALLANCA JE, SMIRNOFF N. Ascorbic acid metabolism in pea seedlings. A comparison of D-glucosone, L-sorbosone, and L-galactono-1,4-lactone as ascorbate precursors. *Plant Physiol* 1999; **120**: 453–461.
- [37] PALLANCA JE, SMIRNOFF N. The control of ascorbic acid synthesis and turnover in pea seedlings. *J Exp Bot* 2000; **51**: 669–674.
- [38] POTTERS G, DE GARA L, ASARD H, HOREMANS N. Ascorbate and glutathione: guardians of the cell cycle, partners in crime? *Plant Physiol Biochem* 2002; **40**: 537–548.
- [39] PUKACKA S, PUKACKI PM. Changes in soluble sugars in relation to desiccation tolerance and effect of dehydration on freezing characteristics of *Acer platanoides* and *Acer pseudoplatanus* seeds. *Acta Physiol Plant* 1997; **19**: 147–154.
- [40] PUKACKA S, RATAJCZAK E. Production and scavenging of reactive oxygen species in *Fagus sylvatica* seeds during storage at varied temperature and humidity. *J Plant Physiol* 2005; **162**: 873–885.
- [41] PUKACKA S, WÓJKIEWICZ E. Carbohydrate metabolism in Norway maple and sycamore seeds in relation to desiccation tolerance. *J Plant Physiol* 2002; **159**: 273–279.
- [42] RATAJCZAK L. Peroksysony. W: WOŹNY A, MICHEJDA J, RATAJCZAK L [red.] Podstawy biologii komórki roślinnej. Wydawnictwo Naukowe UAM, Poznań 2001: 411–430.
- [43] ROBERTS EH. Predicting the storage life of seeds. *Seed Sci Technol* 1973; **1**: 163–169.
- [44] SCANDALIOS JG, GUAN L, POLIDOROS AN. Catalases in plants: gene structure, properties, regulation and expression. W: SCANDALIOS JG [red.] Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defenses. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York 1997: 343–406.
- [45] SCHOPFER P, PLACHY C, FRAHRY G. 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* 2001; **125**: 1591–1602.
- [46] SIMONTACCHI M, CARO A, FRAGA CG, PUNTARULO S. Oxidative stress affects  $\alpha$ -tocopherol content in soybean embryonic axes upon imbibition and following germination. *Plant Physiol* 1993; **103**: 949–953.
- [47] SIMONTACCHI M, SADOVSKY L, PUNTARULO S. Profile of antioxidant content upon developing of *Sorghum bicolor* seeds. *Plant Sci* 2003; **164**: 709–715.
- [48] SIVRITEPE HO, DOURADO AM. The effect of seed moisture content and viability on the susceptibility of pea seeds to soaking injury. *Scientia Horticulturae* 1995; **61**: 185–191.

- [49] SLUSE FE, ALMEIDA AM, JARMUSZKIEWICZ W, VERCESI AE. Free fatty acids regulate the uncoupling protein and alternative oxidase activities in plant mitochondria. *FEBS Lett* 1998; **433**: 237–240.
- [50] SOEDA Y, KONINGS MCJM, VORST O, VAN HOUWELINGEN AMML, STOOPEN GM, MALIEPARD CA, KODDE J, BINO RJ, GROOT SPC, VAN DER GEEST AHM. Gene expression programs during *Brassica oleracea* seed maturation, osmopriming, and germination are indicators of progression of the germination process and the stress tolerance level. *Plant Physiol* 2005; **137**: 354–368.
- [51] TOMMASI F, PACIOLLA C, ARRIGONI O. The ascorbate system in recalcitrant and orthodox seeds. *Physiol Plant* 1999; **105**: 193–198.
- [52] TOMMASI F, PACIOLLA C, DE PINTO MC, DE GARA L. A comparative study of glutathione and ascorbate metabolism during germination of *Pinus pinea* L. seeds. *J Exp Bot* 2001; **52**: 1647–1654.
- [53] WALTERS C. Understanding the mechanisms and kinetics of seed aging. *Seed Sci Res* 1998; **8**: 223–244.
- [54] WOJTASZEK P. Oxidative burst: an early plant response to pathogen infection. *Biochem J* 1997; **322**: 681–692.
- [55] WOJTYŁA Ł, BEDNARSKI W, GARNCZARSKA M. Free radicals level and profile of antioxidants in germinating pea seeds. *Biol Lett* 2005; **42**: 129–130.

*Redaktor prowadzący – Maria Olszewska*

*Otrzymano: 31.05. 2006 r.*

*Przyjęto: 10.07. 2006 r.*

*Al. Niepodległości 14, 61-713 Poznań*

*e-mail: garnczar@amu.edu.pl*