

POLIAMINY W REGULACJI SPOCZYNKU I KIEŁKOWANIA NASION

POLYAMINES IN REGULATION OF SEED DORMANCY AND GERMINATION

Urszula KRASUSKA, Katarzyna BUDNICKA, Renata BOGATEK,
Agnieszka GNIAZDOWSKA

Katedra Fizjologii Roślin, Wydział Rolnictwa i Biologii, Szkoła Główna
Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Streszczenie: Poliaminy (putrescyna, spermina, spermidyna) są głównie znane z ochronnej roli jaką pełnią w organizmach roślinnych narażonych na działanie różnych stresów biotycznych i abiotycznych. Należą do grupy regulatorów wzrostu i rozwoju. Wraz z klasycznymi fitohormonami oraz cząsteczkami sygnałowymi, takimi jak reaktywne formy tlenu (ROS) i tlenek azotu (NO), uczestniczą w regulacji embriogenezy, a także spoczynku, kiełkowania i starzenia nasion. Poliaminy występują w dojrzałych nasionach wszystkich zbadanych dotąd roślin, chociaż udział poszczególnych poliamin w ogólnej puli tych związków wykazuje znaczne wahania gatunkowe, a nawet odmianowe. Podczas ustępowania spoczynku i kiełkowania nasion obserwowane są charakterystyczne dla tych procesów zmiany stężenia poliamin, mimo że rola poszczególnych poliamin (putrescyny, sperminy i spermidyny) jest różnorodna. U większości nasion spermina uznawana jest raczej za inhibitor kiełkowania i związek warunkujący utrzymywanie spoczynku, podobnie jak kwas abscysynowy (ABA), podczas gdy putrescyna i spermidyna zapewniają prawidłowy przebieg katabolicznej i anabolicznej fazy kiełkowania. Zakłócenie biosyntezy lub katabolizmu poliamin powoduje zaburzenia formowania nasion, często prowadzące do ich aborcji lub wykształcenia nasion niezdolnych do kiełkowania. Mutacje genów kodujących kluczowe enzymy biosyntezy poliamin, a także zmiany aktywności oksydaz poliaminowych opóźniają, a nawet uniemożliwiają kiełkowanie nasion i prawidłowy rozwój siewek. W niniejszej pracy przedstawiono przegląd wyników najnowszych badań dotyczących funkcji poliamin w biologii nasion.

Słowa kluczowe: kiełkowanie, nasiona, poliaminy, spoczynek, stratyfikacja

Summary: Polyamines, mainly putrescine, spermine and spermidine play essential role in various physiological processes and in reaction to biotic and abiotic stresses, indicating their importance for plant survival. This review focus on polyamines action in seeds. In cooperation with classical phytohormones (abscisic acid, gibberellins, ethylene) and small signaling molecules, such as reactive oxygen species (ROS) or nitric oxide (NO), polyamines take part in regulation of embryogenesis,

ageing, dormancy removal and germination of seeds. Polyamines are abundant in mature seeds, although the contribution of particular polyamines differ even among the same species. The effect of spermine in seed physiology, in general, contrast with other polyamines: putrescine and spermidine emphasizing that individual polyamines have defined action in plants and that they differentially affect seed dormancy and germination. Manipulation of polyamine biosynthesis and/or catabolism leads to alteration in seedling development due to modification in seed embryogenesis resulting in seed abortion or restriction of germination.

Key words: dormancy, germination, polyamines, seeds, stratification

CHARAKTERYSTYKA POLIAMIN (PA)

Związki określane jako poliaminy (PA) występują zarówno w komórkach roślinnych, jak i zwierzęcych, a także u mikroorganizmów [39, 64, 68]. Do podstawowych PA obecnych w komórkach roślinnych zalicza się: diaminę – putrescynę (Put) - 1,4-diaminobutan, triaminę – spermidynę (Spd) - N-(3-aminopropyl)-1,4-diaminobutan, tetraaminę – sperminę (Spm) - NN'-bis-(3-aminopropyl)-1,4-diaminobutan, agmatynę - 1-amino-4-guanidynobutan. Kadaweryna (Cad) - 1,5-diaminopentan spotykana jest tylko u niektórych gatunków roślin, m.in. w soi (*Glycine max* (L.) Merrill). PA uznawane są za regulatory wzrostu i rozwoju roślin, gdyż ich stężenie w komórkach waha się od mikro- do milimolarnego [64]. Lokalizacja komórkowa PA obejmuje cytoplazmę, ścianę komórkową, wakuole, mitochondria, chloroplasty oraz jądro komórkowe [42].

PA to substancje alifatyczne, posiadające dwie lub więcej grup aminowych (-NH₂), co decyduje o ich zdolności wiązania się z innymi związkami [68]. W komórkach roślinnych PA występują w trzech formach: wolnej (zaledwie 7 – 10 %), związanej (kiedy tworzą połączenia z makrocząsteczkami np. białkami) lub w postaci koniugatów z małymi cząsteczkami, np. kwasami fenolowymi [60, 64].

BIOSYNTeza I KATABOLIZM PA W KOMÓRKACH ROŚLINNYCH

Biosynteza PA rozpoczyna się od reakcji prowadzących do powstawania Put (ryc. 1). Pierwszą z nich jest wytworzenie L-ornityny, następujące po odłączeniu mocznika od cząsteczki argininy (Arg), w reakcji katalizowanej przez arginazę (EC 3.5.3.1). L-ornityna stanowi substrat do bezpośredniej syntezy Put z udziałem dekarboksylazy ornityny (ODC; EC 4.1.1.17). Put może być też syntetyzowana z Arg w szlaku, którego produktami pośrednimi są agmatyna i N-karbamoiloputrescyna. Reakcje te są katalizowane przez: dekarboksylazę argininy (ADC; EC 4.1.1.19), iminohydrolazę agmatyny (AIH, EC 3.5.3.12) i aminohydrolazę N-karbamoiloputrescyny (CPA, EC 3.5.1.53) (ryc.1) [43].

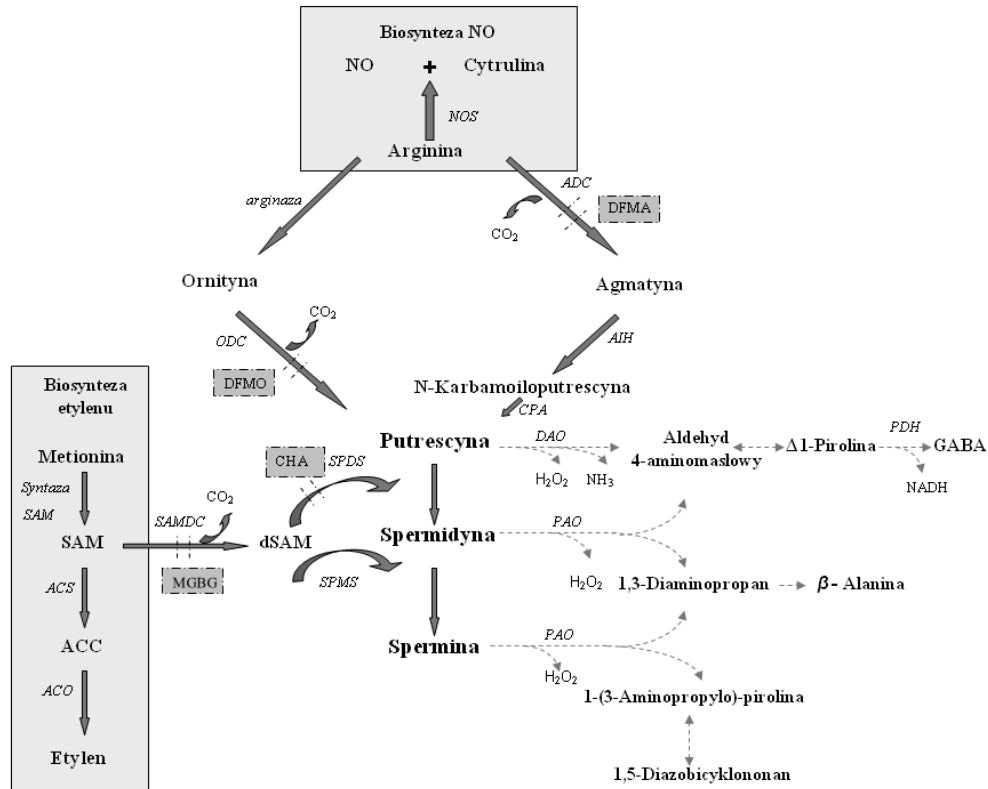
Synteza Spd i Spm wiąże się z obecnością Put, a także ze szlakiem biosyntezy etylenu [14] (ryc. 1). Pierwotnym substratem szlaku biosyntezy etylenu jest L-metionina (Met), która ulega przekształceniu do S-adenozylometioniny (SAM) i następnie dekarboksylowanej S-adenozylometioniny (dSAM). Związki te powstają w reakcjach katalizowanych kolejno przez: syntazę SAM (EC 2.5.1.6) i dekarboksylazę SAM (SAMDC, EC 4.1.1.50). Dekarboksylowana SAM stanowi donor grup aminopropylowych. Przenoszenie tych grup na inne związki zachodzi w obecności dwóch enzymów: syntazy Spd (SPDS, EC 2.5.1.16) i syntazy Spm (SPMS; EC 2.5.1.22), które katalizują kolejno następujące reakcje: syntezę Spd z Put i przekształcenie Spd do Spm.

Niektóre reakcje, prowadzące pośrednio lub bezpośrednio do syntezy PA, mogą być hamowane przez zastosowanie odpowiednich inhibitorów. α -Difluorometyloarginina (DFMA) i α -difluorometyloornityna (DFMO) to inhibitory hamujące odpowiednio aktywność ADC i ODC. Metyloglioksalo-*bis*-guanylohydrazon (MGBG) stanowi inhibitor SAMDC, natomiast cykloheksyloamina (CHA) hamuje aktywność SPDS [39, 64].

Na szczególną uwagę zasługuje powiązanie szlaku biosyntezy PA ze szlakami biosyntezy fitohormonu - etylenu oraz cząsteczek sygnałowych np. tlenku azotu (NO) (ryc. 1). Jak wcześniej wspomniano, PA powstają m.in. z dSAM lub z Arg. SAM jest również prekursorem kwasu 1-amino-cyklopropano-1-karboksylowego (ACC), który powstaje w reakcji katalizowanej przez syntazę ACC (ACS, EC 4.4.1.14). ACC jest utleniany do etylenu w reakcji zależnej od oksydazy ACC (ACO EC 1.14.17.4) (ryc. 1) lub w reakcjach nieenzymatycznych w obecności ROS [31].

U roślin poznano kilka szlaków katabolizmu PA (ryc. 1). Powszechnie wyróżnia się dwie klasy oksydaz aminowych (AO), katalizujących deaminację PA. Do pierwszej z nich zalicza się oksydazy diaminowe zawierające miedź (DAO, CuAOs EC 1.4.3.6). Druga klasa obejmuje oksydazy poliaminowe (PAO EC 1.5.3.11) z grupą prostetyczną flawinową (FAD) związaną niekowalencyjnie [2]. CuAOs utleniają pierwszorzędowe grupy aminowe w cząsteczkach Put i Cad do odpowiednich aminoaldehydów i amoniaku. DAO w obecności O₂ przekształca Put do aldehydu 4-aminomasłowego, który w wyniku spontanicznej cyklizacji daje pirolinę. W reakcji katalizowanej przez ten enzym powstaje dodatkowo nadtlenek wodoru (H₂O₂). Pirolina może ulegać dalszemu przekształceniu do kwasu γ -aminomasłowego (GABA) [19,48].

Spd i Spm są utleniane przez PAO (ryc. 1). Spd jest przekształcana do 1,3-diaminopropanu i aldehydu 4-aminomasłowego, a następnie piroliny. Spm ulega degradacji do 1,3-diaminopropanu i 1-(3-aminopropilo)-piroliny. W reakcji oksydacyjnej deaminacji z 1,3-diaminopropanu powstaje β -alanina, a 1-(3-aminopropilo)-pirolina może podlegać dalszej przemianie do 1,5-diazobicyklononanu [19].



RYCINA 1. Biosynteza (grube linie ciągłe) i katabolizm (cienkie linie przerywane) podstawowych PA w komórkach roślinnych, w powiązaniu ze szlakiem biosyntezy etylenu i szlakiem biosyntezy NO zależnym od argininy. Zmodyfikowane; wg [7, 19]. Oznaczenia metabolitów: ACC – kwas 1-aminocyklopropano-1-karboksylowy, dSAM – dekarboksylowana SAM, GABA – kwas γ -aminomasłowy, SAM – S-adenozylometionina. Oznaczenia enzymów: ACO – oksydaza ACC, ACS – syntaza ACC, ADC – dekarboksylaza argininy, AIH – iminohydrolaza agmatyny, CPA – aminohydrolaza N-karbamoiloputrescyny, DAO – oksydaza diaminowa, NOS – syntaza NO, ODC – dekarboksylaza ornityny, PAO – oksydaza poliaminowa, PDH – dehydrogenaza piroliny, SAMDC – dekarboksylaza S-adenozylometioniny, SPDS – syntaza Spd, SPMS – syntaza Spm. Oznaczenia inhibitorów: CHA – cykloheksylamina, DFMA – α -difluorometylargina, DFMO – α -difluorometylornityna, MGBG – metyloglioksalo-*bis*-guanylohydrazon

FIGURE 1. Biosynthesis (wide lines) and catabolism (light dashed lines) of PAs in plant cells, linked to ethylene biosynthetic pathway and arginine dependent NO biosynthesis. According to [7, 19]; modified. Abbreviation of metabolites: ACC – 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid, dSAM – decarboxylated SAM, GABA – γ -aminobutyric acid, SAM – S-adenozylomethionine. Abbreviation of enzymes: ACO – ACC oxidase, ACS – ACC synthase, ADC – arginine decarboxylase, AIH – agmatine iminohydrolase, CPA – aminohydrolase N-carbamoylputrescine, DAO – diamine oxidase, NOS – NO synthase, ODC – ornithine decarboxylase, PAO – polyamine oxidase, PDH – pyrroline dehydrogenase, SAMDC – S-adenozylomethionine decarboxylase, SPDS – Spd synthase, SPMS – Spm synthase. Abbreviation of inhibitors: CHA – cyclohexylamine, DFMA – difluoromethylarginine, DFMO – difluoromethylornithine, MGBG – methylglyoxal-*bis*-guanylylhydrazone

AKTYWNOŚĆ BIOLOGICZNA PA W KOMÓRKACH ROŚLINNYCH

PA występują powszechnie w komórkach roślinnych w stosunkowo niskich stężeniach (w zakresie około 5-500 $\mu\text{g g}^{-1}$ świeżej masy tkanki). Jednak, wzrost syntezy PA obserwowany jest szczególnie podczas działania biotycznych oraz abiotycznych czynników stresowych [1, 43]. Obszerne omówienie roli PA w odpowiedzi roślin na działanie stresów znajdzie czytelnik w pracach przeglądowych w języku polskim [20, 39, 40, 60]. Ponadto, PA biorą udział w regulacji szeregu procesów rozwojowych, takich jak: podziały komórkowe, somatyczna embriogeneza, różnicowanie komórek, rozwój kwiatów i owoców, dojrzewanie owoców oraz starzenie [68]. Interesujący przegląd literatury na temat funkcji PA w programowanej śmierci komórki został przedstawiony w opracowaniu Chojnackiej i Sobieszczuk-Nowickiej [18]. W niniejszej pracy omówiono natomiast funkcję PA w fizjologii nasion obejmującej kiełkowanie, starzenie i ustępowanie spoczynku.

PA W REGULACJI KIEŁKOWANIA NASION

Obecność PA w dojrzałych nasionach licznych gatunków roślin została potwierdzona przez wielu autorów, chociaż stężenie poszczególnych PA było zróżnicowane [49]. Angosto i Matilla [3] oznaczając zawartość PA w nasionach trzech gatunków endemicznych roślin strączkowych *Adenocarpus decorticans* Boiss., *Astragalus granatensis* Lam. i *Cytisus reverchonii* Degen & Hervier występujących w Kordylierach wykazali 10-krotną, a nawet ponad 100-krotną różnicę w zawartości analizowanych PA. Jednocześnie, we wszystkich badanych nasionach ilościowo przeważała Spd, oprócz której obserwowano także Spm, Put i Cad. W dojrzałych ziarniakach kukurydzy (*Zea mays* L.) stwierdzono obecność Spm, Spd, Put i Cad, przy czym udział Spd i Put był największy, gdyż stanowiły one ponad 67 % zidentyfikowanych PA [6].

Według Huang i Villanueva [32] w nasionach świerku pospolitego (*Picea abies* (L.) H. Karst) najliczniej występowała Spd i Spm, podczas gdy Put tylko w niewielkich ilościach. Nieco odmienne wyniki otrzymali Santanen i Simola [59], którzy analizowali zawartość PA w zarodkach i pierwotnym endospermie nasion świerku. Według nich w dojrzałych zarodkach świerku najliczniej występującą PA była Put, natomiast stężenie Spd i Spm było odpowiednio 4- i 8-krotnie niższe, podczas gdy w endospermie przeważała Spd. Wysoką zawartością Spd charakteryzowały się też dojrzałe ziarniaki pszenicy twardej (*Triticum durum* L.) [4], trzech różnych odmian jęczmienia (*Hordeum vulgare* L.) [55] i nasiona ciecierzycy pospolitej (*Cicer arietinum* L.) [25].

Generalnie, w suchych dojrzałych nasionach stężenie PA jest stosunkowo wysokie i może stanowić typową odpowiedź tkanki na stres niedoboru wody [12]. Ponadto wykazano, że podczas embriogenezy (np. ziarniaków kukurydzy) PA zapobiegają aborcji zarodków [16, 45, 78].

Proces tzw. kiełkowania „*sensu stricto*” nasion obejmuje trzy etapy: imbibicję, fazę kataboliczną i fazę anaboliczną, w której następuje inicjacja procesów wzrostowych osi zarodkowej [44]. Podczas kiełkowania, w nasionach dochodzi do zmian zawartości fitohormonów (giberelin - GA, kwasu abscysynowego - ABA, etylenu) [41], cząsteczek sygnałowych takich jak: reaktywne formy tlenu (ROS) [5] lub reaktywne formy azotu (RNS) [63] oraz innych regulatorów wzrostu, w tym PA [49]. Istotne zmiany zawartości poszczególnych PA zaobserwowano podczas kiełkowania ziarniaków kukurydzy [6]. Po 5 dniach kiełkowania następował 3-krotny wzrost zawartości Spd, 6-krotny wzrost zawartości Spm i ponad 50-krotny wzrost zawartości Put. Podobne zmiany zawartości PA wykazano również podczas 2 dni kiełkowania nasion soi [29]. Dodatkowo w kiełkujących nasionach soi zaobserwowano znaczny wzrost stężenia agmatyny i Cad. Autorzy łączyli notowane zmiany stężenia PA z okresem wzmożonej aktywności mitotycznej oraz intensywnym wzrostem elongacyjnym, gdyż następowały one w momencie wydłużania korzenia zarodkowego. Zaskakujące jest to, że zwiększenie zawartości całkowitych PA dotyczyło przede wszystkim liścieni, a nie osi zarodkowej. Wyniki te zupełnie nie zgadzają się z wcześniejszymi obserwacjami [46], w których wykazano, że w kiełkujących nasionach soi odmiany Williams, biosynteza PA (głównie Cad i Put) zachodzi w korzeniach zarodkowych, a nie w liścieniach, oraz jest wysoka podczas wzrostu młodych siewek. Felix i Harr [22] zbadali zmiany zawartości PA w kiełkujących nasionach 30 różnych gatunków roślin i zaobserwowali wzrost zawartości PA w czasie kiełkowania, szczególnie w liścieniach i endospermie, podczas gdy w zasadzie nie obserwowano takich wahań stężenia PA w osi zarodkowej, hipokotylu lub koleoptylu, a więc w organach intensywnie rosnących.

W zarodkach mandarynki (*Citrus reticulata* Blanco) gwałtowny wzrost stężenia PA następował do około 24 godziny imbibicji, a stopniowe obniżenie notowano do momentu zakończenia kiełkowania „*sensu stricto*”, kiedy wyraźnie wydłużały się osie zarodkowe [56]. Jednocześnie obserwowano najwyższe stężenie Put, natomiast Spm i Spd występowały w ilościach około 2-krotnie niższych niż wspomniana wcześniej PA. Przebieg zmian stężenia wszystkich trzech analizowanych PA w czasie kiełkowania zarodków był podobny. W kolejnych dniach kultury, podczas wzrostu młodych siewek mandarynki następował ponowny wzrost, a następnie obniżenie stężenia PA [56]. Gwałtowny wzrost stężenia PA był charakterystyczny także dla kiełkujących nasion oraz rosnących siewek lnu (*Linum usitatissimum* L.) [72]. W czasie kiełkowania „*sensu stricto*”, mającego miejsce podczas dwóch pierwszych dni kultury, stężenie PA rosło 5-krotnie. Największy (15-krotny) wzrost zawartości dotyczył agmatyny i Spd (10-krotny), natomiast stężenie Put obniżało się ponad 2-krotnie i utrzymywało na tym poziomie podczas

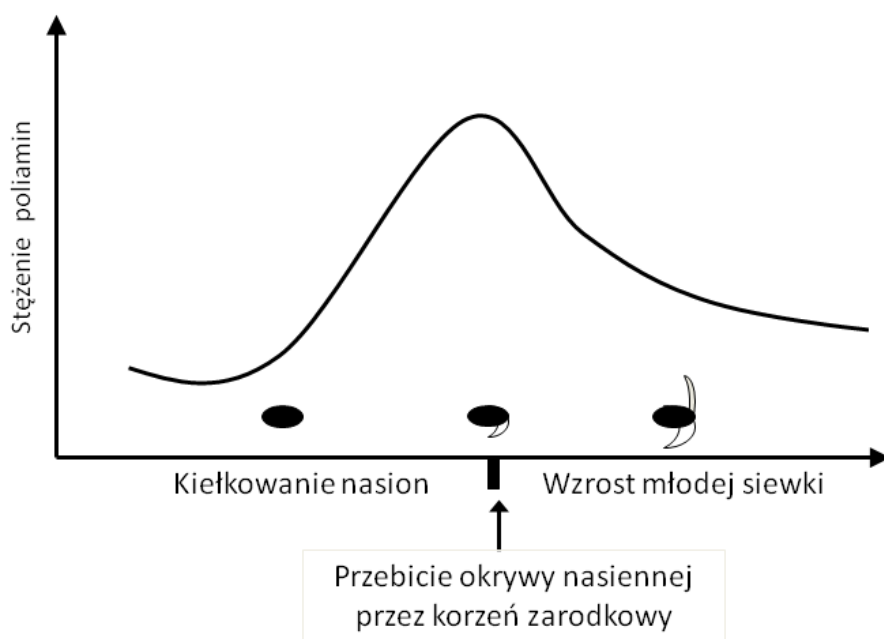
dalszego wzrostu i rozwoju siewek [72]. Analogiczne zmiany stężenia PA w czasie kiełkowania nasion występowały także np. u rzepaku (*Brassica napus* L.) [58]. Wzrost zawartości PA (wolnych i skoniugowanych) obserwowano do 36 godziny imbibicji, czyli podczas kiełkowania „*sensu stricto*”. Wyraźny spadek zawartości PA notowano w momencie przebiccia okrywy nasiennej przez korzeń zarodkowy, zatem gdy rozpoczynał się wzrost siewki [58]. Dodatkowo w czasie kiełkowania najliczniej występującą PA była Spd, natomiast w siewkach największy udział miała Put. Obserwacje te potwierdzają dane uzyskane wcześniej na kiełkujących nasionach ciecierzycy pospolitej [25]. Warto jednocześnie zwrócić uwagę na zależność pomiędzy zawartością Put i Spd (stosunek Put/Spd), a aktywnością mitotyczną komórek. Niska wartość stosunku Put/Spd (poniżej 1) jest typowa dla tkanek merystematycznych, charakteryzujących się licznymi podziałami, podczas gdy wartość stosunku Put/Spd powyżej 1 wskazuje raczej na intensywny wzrost wydłużeniowy komórek [58]. Wysokie stężenie Spm i Spd obserwuje się w czasie wzmożonej syntezy RNA, natomiast akumulacja Put i Spd jest charakterystyczna dla okresu intensywnej syntezy DNA [49].

Podobne zmiany zawartości PA następowały podczas kiełkowania nasion typu *recalcitrant* (wrażliwych na dehydratację) dwóch różnych gatunków roślin *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze oraz *Ocotea odorifera* (Vell.) Rohwer [57]. Jednocześnie, bardzo niskie stężenie skoniugowanych form Spd i Spm oraz wyraźne wahania stężenia wolnych Spd i Spm w zarodkach podczas kiełkowania nasion obu gatunków roślin wskazują na szczególną rolę obu PA w regulacji tego procesu. Biorąc jednak pod uwagę bardzo różnorodny przebieg zmian stężenia poszczególnych PA podczas kiełkowania nasion wielu roślin, trudno jest jednoznacznie typować konkretną PA jako biomarker procesu kiełkowania. Pomimo nie zawsze powtarzalnych fluktuacji zawartości wybranych PA w nasionach różnych roślin wydaje się, że można jednak nakreślić pewien ogólny profil zmian stężenia PA w czasie kiełkowania nasion, który schematycznie przedstawiono na ryc. 2.

Generalnie, funkcja PA wiąże się z aktywnymi metabolicznie tkankami i w wielu przypadkach niskie stężenie PA w nasionach koreluje z ich słabą zdolnością kiełkowania, jednak zależność ta nie jest jednoznaczna. Przykładem może być ryż (*Oryza sativa* L.), u którego wyższe stężenie PA obserwowano w nasionach o niskim wigorze w porównaniu do tych o wyższym potencjale kiełkowania [53].

Mechanizm działania PA podczas kiełkowania nasion nie jest dokładnie poznany. Wydaje się, że spadek stężenia PA w czasie katabolicznej fazy kiełkowania nasion fasoli mung (*Vigna radiata* L.) może być związany np. z regulacją aktywności α -amylazy, ponieważ podanie PA hamowało syntezę tego enzymu [35]. Z kolei w liścieniach kiełkującej fasoli mung egzogenne Put (10-25 mM) i Spd (5-10 mM) powodowały spadek aktywności endopeptydaz, jednak w tym przypadku nie dochodziło do obniżenia zawartości białka enzymatycznego [47]. Aktywność enzymów szlaku biosyntezy PA, jak również zawartość PA

ulegają modyfikacjom w nasionach podczas kiełkowania [51]. Aktywność arginazy wzrastała w czasie kiełkowania nasion sosny taeda (*Pinus taeda* L.) [69]. Z kolei Gallardo i wsp. [26] obserwowali, że zahamowanie syntezy PA (po zastosowaniu inhibitorów) stymulowało kiełkowanie nasion ciecierzycy pospolitej, prawdopodobnie przez zwiększenie stężenia ACC i tym samym wzrost emisji etylenu. W obecności egzogennych PA (np. Put) zahamowanie biosyntezy PA było związane ze zmianą aktywności SAMDC [28]. Z kolei niezakłócone kiełkowanie nasion ciecierzycy było uwarunkowane wysoką aktywnością DAO, sukcesywnie wzrastającą podczas pierwszych 3 dni kultury [50]. Natomiast kiełkowanie zarodków trzmieliny pospolitej (*Euronymus europeus* L.) korelowało z oscylacyjnymi zmianami aktywności PAO i DAO, których maksimum przypadało na moment przebiccia okrywy nasiennych przez korzenie zarodkowe [10]. W kiełkujących nasionach soi wzrost stężenia PA wiązano z aktywnością ADC i ODC [46].



RYCINA 2. Zmiany stężenia PA podczas kiełkowania nasion i wzrostu siewek, schemat na podstawie danych z prac [9, 29, 56, 57, 72]

FIGURE 2. Fluctuation of PA concentration during seeds germination and seedling growth. Scheme based on data from [9, 29, 56, 57, 72]

ZNACZENIE PA PODCZAS STARZENIA NASION I KIELKOWANIA W NIEKORZYSTNYCH WARUNKACH ŚRODOWISKOWYCH

Starzenie nasion definiuje się jako spadek żywotności i wigoru oraz utratę zdolności do kiełkowania. Indukcja procesu starzenia podczas przechowywania nasion związana jest z nagromadzeniem uszkodzeń, w tym także uszkodzeń oksydacyjnych [21], których ilość podlega regulacji przez szereg czynników związanych z budową i właściwościami nasion. Anguillesi i wsp. [4] analizowali zmiany zawartości PA podczas naturalnego starzenia ziarniaków pszenicy twardej. W suchych ziarniakach stężenie PA, szczególnie Spd, wzrastało do szóstego roku ich przechowywania, po czym spadało gwałtownie wraz z utratą ich żywotności. Jednocześnie, w czasie imbibicji charakterystyczny szybki wzrost stężenia PA obserwowano tylko w świeżych ziarniakach, podczas gdy w starzejących następowało raczej obniżenie stężenia PA. Aktywność ODC i ADC wzrastała podczas imbibicji tylko w świeżych, niestarzejących się ziarniakach [4]. Inaczej kształtowały się zmiany zawartości PA podczas starzenia nasion cebuli (*Allium cepa* L.) [8], w których po roku przechowywania spadała zawartość Put, Spd i Spm, przy czym zmiana ta była największa dla Spd. Zastosowanie metody polepszania jakości nasion poprzez kondycjonowanie (ang. *priming*) w 25% glikolu polietylenowym (PEG) spowodowało znaczący wzrost zawartości PA (szczególnie Put i Spd) w nasionach. Zdecydowanie lepsze kiełkowanie nasion cebuli obserwowano jednak w wyniku kondycjonowania w 25% PEG z dodatkiem PA, przy czym najskuteczniejsza okazała się 0,1 mM Spd [8]. Natomiast dla sałaty (*Lactuca sativa* L.) aplikacja Put podczas kondycjonowania wywoływała korzystny efekt na jakość nasion i ich kiełkowanie (szczególnie w wyższych temperaturach) [36]. Podczas starzenia nasion dębu czerwonego i szypułkowego (*Quercus borealis* L. i *Quercus robur* L.) obserwowano wyraźne zmniejszenie stężenia PA postępujące wraz ze spadkiem zdolności kiełkowania [65]. Zmiany te dotyczyły przede wszystkim Spm i Spd w osiach zarodkowych, nie obserwowano ich natomiast w liścieniach. Nie zanotowano także obniżenia stężenia Put ani w osiach ani w liścieniach.

Kultura nasion lub izolowanych zarodków oraz ich fragmentów (liścieni, osi zarodkowych) w medium wzbogaconym o PA lub inhibitory biosyntezy PA jest stosunkowo wygodnym modelem do badania roli, jaką pełnią te związki podczas kiełkowania nasion i wzrostu siewek. Umieszczenie starych nasion cebuli w roztworach Spd, Spm lub Put o stężeniu 0,1 mM zdecydowanie skracało czas kiełkowania oraz korzystnie wpływało na wzrost siewek. Prawdopodobnie wiąże się to z ochronną i antyoksydacyjną rolą PA, szczególnie w stosunku do błon komórkowych. Korzystny efekt PA na kiełkowanie ziarniaków jęczmienia uzyskano w stresie zasolenia w obecności 0,3 M NaCl, który hamował kiełkowanie ziarniaków w 80% [17]. W tych warunkach Put, Spd, Spm, a także Cad działały

stymulująco prowadząc do 50-80% kiełkowania. W przypadku stresu solnego korzystny wpływ PA dotyczył raczej samego procesu kiełkowania ziarniaków, a nie wzrostu siewek. Ponadto, nie zaobserwowano stymulacji kiełkowania ziarniaków jęczmienia przez PA w warunkach kontrolnych, gdy imbibicję prowadzono w wodzie, chociaż zanotowano stymulację wzrostu wydłużeniowego koleoptyli młodych siewek [17]. W kiełkujących niełupkach słonecznika, w ciągu pierwszych 72 godzin zaobserwowano gwałtowny wzrost zawartości Put, Spm i Spd, przy czym stężenie Put i Spd wzrosło prawie 4-krotnie [9]. W kolejnych dniach kultury, aż do 5-tego dnia, stężenie badanych PA utrzymywało się na stałym, wysokim poziomie. Natomiast podanie NaCl w stężeniu 150 mM, które znacznie opóźniło kiełkowanie i całkowicie hamowało wykształcanie prawidłowo rozwiniętych siewek, prowadziło do drastycznego obniżenia zawartości Put oraz Spd, co wiązało się jednocześnie z obniżeniem aktywności ADC [9]. Obniżenie stężenia Put i jednoczesny wzrost stężenia Spm zaobserwowano również w nasionach sałaty, melona (*Cucumis melo* L.), pieprzu (*Capsicum annum* L.), brokułów (*Brassica oleraceae* L.) i pomidora (*Lycopersicon esculentum* Mill.) kiełkujących w obecności 100-150 mM NaCl [75], co potwierdza ochronną rolę Spm w stosunku do błon komórkowych w warunkach stresu osmotycznego.

PA W REGULACJI SPOCZYNKU NASION

Spoczynek jest to stan charakteryzujący się przejściowym zahamowaniem wzrostu i spowolnieniem aktywności metabolicznej zarodków, w którym pomimo zapewnienia korzystnych warunków nasiona nie kiełkują. Spoczynek pozostaje pod kontrolą zarówno czynników środowiskowych (światło, temperatura i wilgotność), jak i czynników wewnętrznych (regulatorów wzrostu i rozwoju) [23,37]. U wielu gatunków roślin, spoczynek nasion ustępuje podczas chłodnej stratyfikacji polegającej na długotrwałym przechowywaniu nasion w wilgotnym piasku lub torfie w temperaturze około 5°C (chłód). Podczas tego zabiegu dochodzi do zmian zawartości hormonów (głównie GA i ABA, a także etylenu), ale obserwuje się także modyfikacje obecności i stężenia PA.

W nasionach klonu zwyczajnego (*Acer platanoides* L.) stężenie PA podczas chłodnej stratyfikacji wykazywało zmiany pulsacyjne [66], przy czym oscylacje stężenia PA dotyczyły zarówno osi zarodkowych, jak i liścieni. Stężenie PA gwałtownie spadało do 2 tygodnia stratyfikacji, następnie rosło by ponownie osiągnąć minimum około 8 tygodnia trwania zabiegu, co zbiegało się z ustępowaniem spoczynku nasion. Po 8 tygodniu stratyfikacji odnotowano kolejne maksimum stężenia PA; był to jednocześnie okres, po którym całkowicie ustępował spoczynek badanych nasion. Zmiany zawartości poszczególnych PA były widoczne w osiach zarodkowych i liścieniach, a dotyczyły przede wszystkim Spd i Spm. Dodatkowo, podanie Spm podczas stratyfikacji przyspieszało ustępowanie spoczynku nasion i stymulowało ich kiełkowanie [66]. Ilość wolnej

Put, Spd i Spm utrzymywała się na niskim poziomie w osiach w trakcie chłodnej stratyfikacji w nasionach klonu srebrzystego (*Acer saccharum* Marschall), ale wzrastała w trakcie kiełkowania tych nasion [70, 71]. Chłodna stratyfikacja nasion ciecierzycy pospolitej, prowadziła do obniżenia ilości wolnych oraz związanych PA w liścieniach i w korzeniach zarodkowych [54]. Podczas chłodnej stratyfikacji nasion świerku, także obserwowano obniżenie stężenia PA, zarówno w zarodkach jak i endospermie, przy czym w zarodkach najistotniejsza zmiana dotyczyła Spd i Spm [59]. W nasionach buku zwyczajnego (*Fagus sylvatica* L.) poddanych chłodnej stratyfikacji w temperaturze 3°C, indukującej kiełkowanie, wzrost zawartości PA podczas imbibicji obserwowano wcześniej niż w niekiełkujących nasionach, stratyfikowanych w cieple (15°C) [67]. W niskiej temperaturze od piątego tygodnia stratyfikacji obserwowano gwałtowny spadek zawartości Put, Spm i Spd w osiach i liścieniach zarodków *F. sylvatica*. Jednocześnie podanie kanawaniny (antagonisty argininy - inhibitora biosyntezy PA i zwierzęcej NOS) lub DFMO hamowało ustępowanie spoczynku i obniżało ilość kiełkujących nasion [67]. Analogicznie jak w nasionach *F. sylvatica* również w zarodkach izolowanych ze spoczynkowych nasion jabłoni (*Malus domestica* Borkh.) stężenie Put, Spd i Spm było wyższe niż w zarodkach z nasion stratyfikowanych w chłodzie [62]. Niezależnie od stanu zarodków (spoczynkowe lub stratyfikowane – niespoczynkowe) najwyższe stężenie stwierdzono dla Put, Spd, a najniższe dla Spm. W czasie stratyfikacji obserwowano obniżenie stężenia wszystkich trzech PA, przy czym dla Spm było ono największe. Ponadto Put i Spd w stężeniach 0,1 mM i 1 mM stymulowały kiełkowanie, natomiast w stężeniu 5 mM działały jak inhibitory kiełkowania. Korzystne działanie Put i Spd na kiełkowanie zarodków było nieznacznie wyższe dla zarodków izolowanych ze stratyfikowanych nasion. Spm hamowała kiełkowanie, szczególnie gdy była podana w stężeniu 5 mM, przy czym wyraźniejszy efekt hamowania kiełkowania obserwowano dla zarodków spoczynkowych. Obecność Put i Spd w medium w czasie stratyfikacji nasion wpływała stymulująco na kiełkowanie zarodków wyizolowanych z tych nasion, podczas gdy Spm podana podczas stratyfikacji hamowała kiełkowanie [62]. Dodatkowo prekursorzy PA: Arg, Met i ornityna stymulowały kiełkowanie zarodków w podobny sposób jak Put i Spd, a kanawanina znosiła ten efekt. Z uwagi na to, że Spm hamowała kiełkowanie zarodków, a jej zawartość była w nasionach spoczynkowych prawie dwa razy większa w stosunku do zawartości Put i Spd można sądzić, że Spm odgrywa rolę w podtrzymywaniu spoczynku, równoległe z innymi związkami endogennymi, np. ABA. Natomiast ze względu na korzystne działanie Put i Spd, można je zaliczyć do czynników pełniących korzystną rolę w usuwaniu spoczynku nasion.

Podobne wyniki otrzymano podczas analizy zmian zawartości PA w czasie 60-dniowej chłodnej (5°C) stratyfikacji nasion orzecha włoskiego (*Juglans regia* L.), prowadzącej do całkowitego ustąpienia spoczynku i podczas 20-dniowej cieplej stratyfikacji w 27°C, która nie tylko nie stymulowała kiełkowania, ale

nawet prowadziła do starzenia nasion [76]. W przypadku stratyfikacji ciepłej w osiach zarodkowych w ciągu 20 dni nie zmieniała się zawartość Spd, nieznacznie spadała zawartość Put, natomiast dla Spm obserwowano początkowo spadek, a następnie wzrost jej zawartości. W tym samym czasie podczas stratyfikacji chłodnej drastycznie obniżała się zawartość wszystkich trzech PA, by ponownie wzrosnąć około 40 dnia, stanowiącego okres stratyfikacji wystarczający dla ustąpienia spoczynku nasion [76]. Na uwagę zasługuje fakt, że obniżenie zdolności kiełkowania nasion orzecha w warunkach ciepłej stratyfikacji korelowało z drastycznym spadkiem aktywności arginazy obserwowanym około 20 dnia trwania zabiegu, co autorzy wiążą z uszkodzeniami oksydacyjnymi. Znaczenie aktywności tego enzymu podczas kiełkowania, podkreśla też wzrost ekspresji genu *ARS20* kodującego arginazę, obserwowany w stratyfikowanych nasionach sosny taeda [69].

Podsumowując dane dotyczące zmian stężenia PA następujących podczas ustępowania spoczynku w czasie stratyfikacji nasion różnych roślin wydaje się, że powszechnym zjawiskiem jest obniżenie stężenia PA, które można wiązać z równoczesnym wzrostem emisji etylenu (jak ma to miejsce w przypadku nasion jabłoni) [44].

WSPÓLDZIAŁANIE PA Z HORMONAMI ROŚLINNYMI I NO PODCZAS KIEŁKOWANIA NASION

Ustępowanie spoczynku i kiełkowanie nasion pozostaje pod kontrolą fitohormonalną. GA oraz etylen zaliczane są do stymulatorów kiełkowania, natomiast ABA odpowiada za utrzymanie spoczynku nasion [13,34,41]. Ścisła współzależność pomiędzy metabolizmem etylenu i PA wynika ze wspólnej ścieżki biosyntezy obu związków [51] (ryc. 1). Jak wspomniano wcześniej, prekursorem etylenu i PA (głównie Spd) jest SAM, powstająca w wyniku reakcji przekształcania Met przez syntazę SAM. Wykazano, że Met stymuluje kiełkowanie nasion rzodkiewnika (*Arabidopsis thaliana* L.), podczas gdy podanie inhibitora biosyntezy Met hamuje ten proces [27]. PA powstają też na szlaku zależnym od Arg [43,48], a pierwszym enzymem tej drogi biosyntezy PA jest arginaza przekształcająca L-Arg w L-ornitynę. Prowadzone w ostatnich latach intensywne badania dotyczące syntezy NO w komórkach roślinnych wykazały, że Arg jest także substratem dla enzymów wykazujących aktywność podobną do syntazy NO (*NOS-like*), przekształcających L-argininę do L-cytruliny i NO [74] (ryc.1). Białko o takiej aktywności zostało ostatnio zidentyfikowane i wyizolowane w komórkach zielenicy (*Ostreococcus tauri*) [24]. Ponadto, w warunkach anoksji wykazano, że NO może bezpośrednio reagować z PA, tworząc połączenia poliamina-NONO, np. Spm-NONO. Związki takie mogłyby być źródłem lub magazynem NO [40]. Zakładając, że Spm odpowiada za utrzymanie spoczynku, a NO stymuluje kiełkowanie, wiązanie NO z tą PA mogłoby ograniczać jego korzystny wpływ na

kielkowanie. Jednocześnie, podczas ustępowania spoczynku nasion mogłoby dochodzić do uwolnienia NO związanego ze Spm, co z jednej strony prowadziłoby do wzmożonej emisji NO, a z drugiej umożliwiało wzrost aktywności PAO i w rezultacie prowadziło do obniżenia stężenia Spm. Niewątpliwie, powiązanie ww. szlaków metabolicznych może świadczyć o współdziałaniu NO, etylenu i PA w regulacji różnych procesów fizjologicznych w komórkach roślinnych. Sińska i Lewandowska [62] sugerują, że ze względu na spadek zawartości endogennych PA w trakcie stratyfikacji nasion i stopniowe zwiększanie się ilości etylenu w tym samym czasie, procesy biosyntezy PA i etylenu w trakcie stratyfikacji odbywają się niezależnie od siebie. Gdyby SAM był obiektem konkurencji w trakcie syntezy PA i etylenu – podanie inhibitorów biosyntezy etylenu (kwasu aminooksyoctowego - AOA i 2-aminoetoksywinyloglicyny AVG) w trakcie stratyfikacji nasion, prowadzące do zwiększenia stężenia SAM, powinno skutkować zwiększeniem stężenia PA. Jednak, pomimo wysokiego stężenia SAM nie obserwowano wzrostu zawartości Spm w zarodkach. Także donor etylenu (etefon, etrel), użyty w medium w trakcie stratyfikacji nasion jabłoni, nie wpływał znacząco na zmianę zawartości endogennych PA. Traktowanie spoczynkowych zarodków jabłoni Put lub Spd nie miało wpływu na ilość wydzielanego etylenu. Podobne wyniki uzyskano w przypadku nasion stratyfikowanych w obecności Put lub Spd. Natomiast podanie Spm znacząco obniżało emisję etylenu zarówno w zarodkach spoczynkowych, jak i stratyfikowanych, jednak hamujące działanie Spm malało wraz z wydłużaniem okresu stratyfikacji [62]. Brak stymulacji biosyntezy PA przez etefon obserwowano także podczas imbibicji nasion rzepaku [58]. Wyklucza to raczej bezpośredni hamujący efekt tego fitohormonu na syntezę PA. Wydaje się, że Spm przyczynia się do podtrzymywania spoczynku nasion poprzez hamowanie syntezy etylenu, a spadek ilości tej PA podczas stratyfikacji nasion jabłoni w niskiej temperaturze może z kolei prowadzić do wzmożonej syntezy etylenu. Natomiast Put i Spd biorą udział w przełamywaniu spoczynku niezależnie od etylenu [62]. Potwierdzeniem takiej tezy wydaje się być zestawienie wyników obrazujących obniżenie stężenia PA podczas kielkowania „*sensu stricto*” nasion rzepaku i towarzyszący mu wzrost ekspresji *ACO2*, kodującego oksydazę ACC katalizującą ostatni etap biosyntezy etylenu [58].

Béranger-Novat i wsp. [10] zaobserwowali wyraźną zależność pomiędzy stymulacją kielkowania nasion trzmieliny pospolitej przez GA a zawartością PA w zarodkach. Podanie GA powodowało gwałtowne zwiększenie, a następnie spadek stężenia Put, następujące przed widocznym wydłużaniem korzenia zarodkowego. Zmiany stężenia Spd wywołane przez GA były podobne, jednak przesunięte w czasie o około 2-3 dni. W przypadku obu PA ich maksymalna zawartość w zarodkach traktowanych GA była 2-3 krotnie wyższa niż w zarodkach nietraktowanych. Wskazano jednocześnie na wzrost aktywności ADC [11] oraz PAO podczas usuwania spoczynku nasion trzmieliny w obecności GA. Na tle tych wyników możliwe jest, że spoczynek badanych nasion wynika z zaburzenia syntezy PA i katabolizmu Spd *via* PAO podczas wczesnych faz kielkowania.

ABA produkowany podczas embriogenezy odpowiada za indukcję i utrzymanie spoczynku oraz opóźnia kiełkowanie nasion. Obniżenie stężenia ABA w nasionach następuje w wyniku ustępowania spoczynku i na początku kiełkowania [33]. Nasiona mutantów rzodkiewnika *spr2* (odpornych na Spm) charakteryzowały się zredukowanym spoczynkiem i wykazywały tendencję do porastania (wiwiparii), jednak pomimo tego miały nie zmienioną wrażliwość na inne PA (Put i Spd) oraz ABA, co wskazuje na Spm jako jeden z regulatorów wzrostu odpowiadających za spoczynek nasion [52]. Wykazano jednoznacznie współzależność pomiędzy stężeniem PA w zarodkach ciecierzycy a hamowaniem kiełkowania w obecności ABA [15]. ABA (w stężeniu 5 i 25 μM) hamował obniżenie zawartości Spm, Spd i Put charakterystyczne dla niezakłóconego kiełkowania zarodków ciecierzycy, przy czym zależność pomiędzy ABA i Spm była najwyraźniejsza. Jednocześnie podanie PA nie było do końca skuteczne w odwracaniu negatywnego efektu ABA na aktywność mitotyczną i biosyntezę DNA w osiach zarodkowych ciecierzycy, co wskazuje na istnienie innej niż *via* PA drogi ograniczania kiełkowania nasion w obecności ABA.

Oprócz fitohormonów i NO także ROS biorą udział w regulacji ustępowania spoczynku oraz kiełkowania nasion wielu gatunków roślin [13, 30, 38, 51, 73]. Powszechnie przyjmuje się, że podstawowym enzymem odpowiadającym za generowanie ROS podczas kiełkowania nasion jest błonowa oksydaza NADPH [5], jednak innymi enzymatycznymi źródłami odpowiadającymi za biosyntezę ROS na terenie ściany komórkowej mogą być także DAO i PAO (ryc. 1); degradacja Put, Spd lub Spm prowadzi zatem do powstawania H_2O_2 [19]. Wyraźna korelacja zmian stężenia PA i aktywności PAO obserwowana podczas kiełkowania „*sensu stricto*” nasion różnych gatunków roślin sugeruje, że udział PA w regulacji procesu kiełkowania może odbywać się także poprzez ROS.

Oddziaływanie PA podczas kiełkowania nasion może być też związane z NO. Taką sugestię potwierdzają doświadczenia wykonane na nasionach komonicy (*Lotus japonicus* L.), których kiełkowanie hamowano przez podanie 2,5 % glukozy [77]. Spm (0,2 mM), a także donory NO (nitroprusydek sodu - SNP) odwracały hamujący efekt glukozy na kiełkowanie badanych nasion. Jednocześnie korzystny efekt SNP i Spm na kiełkowanie usuwany był po podaniu zmiatacza NO - tlenu 2-[4-karboksyfenilo]-4,4,5,5-terametylo-1-oksymidazolu (cPTIO), co może wskazywać na wspólne działanie obu związków. Podobne wyniki uzyskano w testach kiełkowania spoczynkowych zarodków jabłoni w obecności PA, Arg i Met, przy jednoczesnym podaniu cPTIO oraz spoczynkowych zarodków krótkotrwale traktowanych donorami NO w obecności inhibitorów biosyntezy PA (DFMO i kanawaniny). Ponadto, zaobserwowano wzrost emisji NO z osi zarodków jabłoni, których spoczynek ustępował pod wpływem Put i Spd (Krasuska i Budnicka dane niepublikowane). Współzależność pomiędzy PA i NO obserwowano także podczas embriogenezy somatycznej w kulturze zawieszinowej araukarii brazylijskiej (*Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze.) [61]. W komórkach embriogenicznych obserwowano emisję NO, która ulegała nasileniu w obecności 1

mM Put. Podanie Spm lub Spd hamowało biosyntezę NO i jednocześnie prowadziło do formowania dużych agregatów komórkowych o zaburzonej polarności. Autorzy sugerują, że zastosowanie donorów NO w pożywce może mieć pozytywny wpływ na wydajność tworzenia zarodków somatycznych u gatunków o niskiej kompetencji do embriogenezy tego typu [61].

PODSUMOWANIE

Biorąc pod uwagę zaprezentowane w pracy dane nie ulega wątpliwości, że PA pełnią ważne funkcje podczas embriogenezy, a także w regulacji spoczynku i kiełkowania nasion. Zmiany stężenia PA w tkankach, na równi z wahaniami stężenia klasycznych fitohormonów, wydają się być kluczowe dla prawidłowego przebiegu kolejnych faz ontogenezy roślin, chociaż dokładny mechanizm działania poszczególnych PA nadal nie jest wyjaśniony. Większość doniesień na temat zmian zawartości PA w tkankach nasion znajdujących się na różnych etapach rozwoju ontogenetycznego pochodzi z lat 90-tych XX wieku i związana jest z rozwojem technik analitycznych, głównie HPLC, umożliwiających kompleksowe oznaczanie tych związków. W ostatnim okresie odnotowuje się jednak wzrost zainteresowania badaniami prowadzonymi na mutantach lub roślinach transgenicznych, zwłaszcza rzodkiewnika, u których modyfikowane są szlaki biosyntezy lub katabolizmu PA. Rośliny takie stają się wygodnym modelem, którego zastosowanie może przybliżyć jednoznaczne określenie funkcji jaką pełnią PA w czasie rozwoju i kiełkowania nasion. Jednocześnie znajomość znaczenia oraz mechanizmu działania PA podczas ustępowania spoczynku i kiełkowania może przyczynić się do opracowania metod służących polepszeniu jakości nasion poprzez zastosowanie tych związków np. podczas prekondukcjonowania nasion lub oprysków roślin w czasie zawiązywania nasion. To z kolei, może mieć kluczowe znaczenie dla uzyskania większych plonów, co byłoby istotne w przypadku roślin uprawnych (np. kukurydzy). Natomiast z poznawczego punktu widzenia najciekawsze wydaje się powiązanie biosyntezy i oddziaływania PA z drogami biosyntezy i działania NO.

PODZIĘKOWANIA

Praca powstała podczas realizacji grantu NCN NN 303821840 dotyczącego współdziałania PA i NO w regulacji ustępowania spoczynku i kiełkowania zarodków jabłoni. Autorzy składają podziękowania dr Anicie Wiśniewskiej za konstruktywną dyskusję i cenne uwagi udzielone podczas przygotowywania manuskryptu.

LITERATURA

- [1] ALCÁZAR R, ALTABELLA T, MARCO F, BORTOLOTTI C, REYMOND M, KONCZ C, CARRASCO P, TIBURCIO AF. Polyamines: molecules with regulatory functions in plant abiotic stress tolerance. *Planta* 2010; **231**: 1237-1249.
- [2] ANGELINI R, CONA A, FEDERICO R, FINCATO P, TAVLSDORAKI P, TISI A. Plant amine oxidases “on the move”: An update. *Plant Physiol Biochem* 2010; **48**: 560 – 564.
- [3] ANGOSTO T, MATILLA AJ. Variation in seeds of three endemic leguminous species at different altitudes. *Physiol Plant* 1993; **87**: 329-334.
- [4] ANGUILLES MC, GRILLI I, TAZZIOLO R, FLORIS C. Polyamine accumulation in aged wheat seeds. *Biol Plant* 1990; **32**: 189-197.
- [5] BAILLY C, EL-MAAROUF-BOUTEAU H, CORBINEAU F. From intracellular signaling networks to cell death: the dual role of reactive oxygen species in seed physiology. *C R Bio* 2008; **331**: 806-814.
- [6] BANDEIRA CM, EVANGELISTA WP, GLORIA MBA. Bioactive amines in fresh, canned and dried sweet corn, embryo and endosperm and germinated corn. *Food Chem* 2012; **131**: 1355-1359.
- [7] BARON K, STASOLLA C. The role of polyamines during *in vivo* and *in vitro* development. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 2008; **44**: 384-395.
- [8] BASRA AS, SINGH B, MALIK CP. Priming-induced changes in polyamine levels in relation to vigor of aged onion seeds. *Bot Bull Acad Sin* 1994; **34**: 19-23.
- [9] BENAVIDES MP, AIZENCANG G, TOMARO ML. Polyamines in *Helianthus annuus* L. during germination under salt stress. *J Plant Growth Regul* 1997; **16**: 205-211.
- [10] BÉRANGER-NOVAT N, MONIN J, JASSEY J, MARTIN-TONGUY J. Polyamine catabolism in dormant embryos of spindle tree (*Euonymus europaeus* L.) and dormancy break obtained after treatment with gibberelic acid. *Plant Growth Regul* 1997; **21**: 65-70.
- [11] BÉRANGER-NOVAT N, MONIN J, MARTIN-TONGUY J. Polyamines and their biosynthetic enzymes in dormant embryos of the spindle tree (*Euonymus europaeus* L.) and dormancy break obtained after treatment with gibberelic acid. *Plant Sci* 1994; **102**: 139-145.
- [12] BEZOLD TN, LOY JB, MINOCHA SC. Changes in the cellular content of polyamines in different tissues of seed and fruit of a normal and a hull-less seed variety of pumpkin during development. *Plant Sci* 2003; **164**: 743-752.
- [13] BOGATEK R, GNIAZDOWSKA A. Ethylene in seed development, dormancy and germination. *Ann Plant Rev* 2012; **44**: 189-218.
- [14] BOUCHEREAU A, AZIS A, LARHER F, MARTIN-TANGUY J. Polyamines and environmental challenges: recent development. *Plant Sci* 1999; **140**: 103-125.
- [15] BUENO M, MATILLA AJ. Abscisic acid increases the content of free polyamines and delays mitotic activity induced by spermine in isolated embryonic axes of chick-pea seeds. *Physiol Plant* 1992; **85**: 531-536.
- [16] CAO DD, HU J, ZHU SJ, HU WM, KNAPP A. Relationship between changes in endogenous polyamines and seed quality during development of *sh₂* sweet corn (*Zea mays* L.) seed. *Sci Hort* 2010; **123**: 301-307.
- [17] ÇAVUŞOĞLU K, KILIÇ S, KABAR K. Some morphological and anatomical observations during alleviation of salinity (NaCl) stress on seed germination and seedling growth of barley polyamines. *Acta Physiol Plant* 2007; **29**: 551-557.
- [18] CHOJNACKA A, SOBIESZCZUK-NOWICKA E. Poliaminy w programowanej śmierci komórki. *Post Biol Kom* 2009; **36**: 161-169.
- [19] CONA A, REA G, ANGELINI R, FEDERICO R, TAVLADORAKI P. Functions of amine oxidases in plant development and defense. *Trends Plant Sci* 2006; **11**: 80-88.
- [20] CZERPAK R, BAJGUZ A. Aktywność fizjologiczno-biochemiczna poliamin w adaptacji roślin do stresów. *Post Biol Kom* 1999; **26**: 523-538.
- [21] EL-MAAROUF-BOUTEAU H, MAZUY C, CORBINEAU F, BAILLY C. DNA alteration and programmed cell death during ageing of sunflower seed. *J Exp Bot* 2011; **62**: 5003-5011.
- [22] FELIX H, HARR J. Association of polyamines to different parts of various plant species. *Physiol Plant* 1987; **71**: 245-250.

- [23] FINCH-SAVAGE WE, LEUBNER-METZGER G. Seed dormancy and the control of germination. *New Phytol* 2006; **171**: 501-523.
- [24] FORESI N, CORREA-ARAGUNDE N, PARISI G, CALÓ G, SALERNO G, LAMATTINA L. Characterization of a nitric oxide synthase from the plant kingdom: NO generation from the green alga *Ostreococcus tauri* is light irradiance and growth phase dependent. *Plant Cell* 2010; **22**: 3816-3830.
- [25] GALLARDO M, BUENO M, ANGOSTO T, GALLARDO ME, MATILLA AJ. 1992. Free polyamines in *Cicer arietinum* seeds during the onset of germination. *Phytochemistry* 1992; **31**: 2283-2287.
- [26] GALLARDO M, GALLARDO ME, MATILLA AJ, MUNOZ DE RUEDA P, SANCHEZ-CALLE IM. Inhibition of polyamine synthesis by cyclohexylamine stimulates the ethylene pathway and accelerates the germination of *Cicer arietinum* seeds. *Physiol Plant* 1994; **91**: 9-16.
- [27] GALLARDO K, JOB C, GROOT SPC, PUYPE M, DEMOL H, VANDEKERCKHOVE J, JOB D. Importance of methionine biosynthesis for *Arabidopsis* seed germination and seedling growth. *Physiol Plant* 2002; **116**: 238-247.
- [28] GALLARDO M, SANCHEZ-CALLE IM, MUNOZ DE RUADA P, MATILLA AJ. The alteration of termoinhibition in chick-pea seeds by putrescine involves ethylene pathway. *Aust J Plant Physiol* 1996; **23**: 479-487.
- [29] GLÓRIA MBA, TAVARES-NETO J, LABANCA RA, CARVALHO MS. Influence of cultivars and germination on bioactive amines in soybeans (*Glycine max* L. Merrill). *J Agricult Food Chem* 2005; **53**: 7480-7485.
- [30] GNIAZDOWSKA A, BOGATEK R. Regulacyjna rola tlenu azotu w kielkowaniu nasion. *Post Biol Kom* 2007; **34**: 431-443.
- [31] GNIAZDOWSKA A, KRASUSKA U, BOGATEK R. Dormancy removal in apple embryos by nitric oxide or cyanide involves modifications in ethylene biosynthetic pathway. *Planta* 2010; **232**: 1397-1407.
- [32] HUANG HT, VILLANUEVA VR. Inhibition of polyamine biosynthesis and seed germination in *Picea abies*. *Phytochemistry* 1992; **31**: 3353-3356.
- [33] KERMODE AR. Role of abscisic acid in seed dormancy. *J Plant Growth Reg* 2005; **24**: 319-344.
- [34] KĘPCZYŃSKI J, KĘPCZYŃSKA E. Znaczenie etylenu w ustępowaniu spoczynku i kielkowaniu nasion. *Kosmos* 2000; **49**: 161-168.
- [35] KOIZUKA N, TANAKA Y, MOROHASHI Y. Effects of spermidine on the synthesis of α -amylase in cotyledons of mung bean seedlings. *Physiol Plant* 1991; **81**: 211-214.
- [36] KORKMAZ A. Ameliorative effects of ethylene precursor and polyamines on the high temperature inhibition of seed germination in lettuce (*Lactuca sativa* L.) before and after seed storage. *Seed Sci Tech* 2006; **34**: 465-474.
- [37] KRANNER I, MINIBAYEVA FV, BECKETT RP, SEAL CE. What is stress? Concepts, definitions and applications in seed science. *New Phytol* 2010; **188**: 655-673.
- [38] KRASUSKA U, GNIAZDOWSKA A, BOGATEK R. Rola ROS w fizjologii nasion. *Kosmos* 2011; **60**: 113-128.
- [39] KUBIŚ J. Poliaminy i ich udział w reakcji roślin na warunki stresowe środowiska. *Kosmos* 2006; **55**: 209-215.
- [40] KUBIŚ J. Spotkanie na szlakach sygnałowych – czy poliaminy indukują syntezę tlenu azotu i modyfikują poziom nadtlenu wodoru u roślin. *Wiad Bot* 2008; **52**: 55-62.
- [41] KUCERA B, COHN MA, LEUBNER-MATZGER G. Plant hormone interactions during seed dormancy release and germination. *Seed Sci Res* 2005; **15**: 281-307.
- [42] KUMAR A, ALTABELLA T, TAYLOR M, TIBURCIO AF. Recent advances in polyamine research. *Trends Plant Sci* 1997; **2**: 124-130.
- [43] KUSANO T, BERBERICH T, TATEDA C, TAKAHASHI Y. Polyamines: essential factors for growth and survival. *Planta* 2008; **228**: 367-381.
- [44] LEWAK S, BOGATEK R, GNIAZDOWSKA A. Hormonalne i metaboliczne uwarunkowania spoczynku i kielkowania nasion. [w] Jankiewicz LS, Filek M, Lech W [red] Fizjologia roślin sadowniczych strefy umiarkowanej. Tom II. Plonowanie i udział różnych czynników w tym procesie. PWN, Warszawa: 2011: 319-341.
- [45] LIANG Y-L, LUR H-S. Conjugated and free polyamines levels in normal and aborting maize kernels. *Crop Sci* 2002; **42**: 1217-1224.

- [46] LIN PPC. Polyamine anabolism in germinating *Glycine max* (L.) seeds. *Plant Physiol* 1984; **76**: 372-380.
- [47] MAKI H, MOROHASHI Y. Inhibitory effect of polyamines on activity of endopeptidase in mung bean cotyledons. *J Plant Physiol* 2000; **159**: 1341-1347.
- [48] MARTIN-TONGUY J. Metabolism and function of polyamines in plants: recent development (new approaches). *Plant Growth Regul* 2001; **34**: 135-148.
- [49] MATILLA AJ. Polyamines and seed germination. *Seed Sci Res* 1996; **6**: 81-93.
- [50] MATILLA AJ, GARCIA S, BUENO M. Diamine oxidase activity during the germinative and post-germinative growth of the embryonic axis in chickpea seeds. *Biol Plant* 2002; **45**: 551-556.
- [51] MATILLA AJ, MATILLA-VAZQUEZ MA. Involvement of ethylene in seed physiology. *Plant Sci* 2008; **175**: 87-99.
- [52] MIRZA JI, REHMAN A. A spermine-resistant mutant of *Arabidopsis thaliana* displays precocious germination. *Acta Physiol Plant* 1998; **20**: 235-240.
- [53] MUKHOPADHYAY A, CHOUDHURI MM, SEN K, GHOSH B. Changes in polyamines and related enzymes with loss of viability in rice seeds. *Phytochemistry* 1983; **22**: 1547-1551.
- [54] MUÑOZ DE RUEDA P, MATILLA AJ, SANCHEZ-CALLE IM, BUENO M, GALLARDO M. Thermoinhibition alters the polyamine levels in cotyledons and embryonic axes during germination of stratified chick-pea seeds. *Plant Sci* 1994; **101**: 143-150.
- [55] NIELSEN K. Polyamine content in relation to embryo growth and dedifferentiation in barley (*Hordeum vulgare* L.). *J Exp Bot* 1990; **41**: 849-854.
- [56] NIEVES N, MARTINEZ ME, BLANCO MA, GONZALEZ JL, BORROTO E, LORENZO JC, PORTILLA Y. Changes in soluble proteins and polyamines during citrus seed germination. *Fruits* 1998; **53**: 27-33.
- [57] PIERUZZI FP, DIAS LLC, BALBUENA TS, SANTA-CATARINA C, DOS SANTOS ALW, FLOH EIS. Polyamines, IAA and ABA during germination in two recalcitrant seeds: *Araucaria angustifolia* (Gymnosperm) and *Ocotea odorifera* (Angiosperm). *Ann Bot* 2011; **108**: 337-345.
- [58] PUGA-HERMIDA MI, GALLARDO M, RODRIGEZ-GACIO MC, MATILLA AJ. Polyamine contents, ethylene synthesis, and BraACO2 expression during turnip germination. *Biol Plant* 2006; **50**: 574-580.
- [59] SANTANEN A, SIMOLA LK. Metabolism of L[U-14C]-arginine and L[U-14C]-ornithine in maturing and vernalised embryos and megagametophytes in *Picea abies*. *Physiol Plant* 1999; **107**: 433-440.
- [60] SEMPRUCH C. Znaczenia amin alifatycznych i aromatycznych w reakcjach obronnych roślin przeciwko patogenom. *Post Nauk Rol* 2008; **3**: 17-33.
- [61] SILVEIRA V, SANTA-CATARINA C, TUN NN, SCHRER GFE, HANDRO W, GUERRA MP, FLOH EIS. Polyamines effects on the endogenous polyamine contents, nitric oxide release, growth and differentiation of embryonic suspension cultures of *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. *Plant Sci* 2006; **171**: 91-98.
- [62] SIŃSKA I, LEWANDOWSKA U. Polyamines and ethylene in the removal of embryonal dormancy in apple seeds. *Physiol Plant* 1991; **81**: 59-64.
- [63] ŠIROVÁ J., SEDLÁŘOVÁ M., PITERKOVÁ J., LUHOVÁ L., PETŘIVALSKÝ M. 2011. The role of nitric oxide in germination of plant seeds and pollen. *Plant Sci* 2011; **181**: 560-572.
- [64] SOBIESZCZUK-NOWICKA E, LEGOCKA J. Nowe podejścia w badaniach nad rolą poliamin w komórce roślinnej. *Post Biol Kom* 2007; **34**: 527-540.
- [65] SZCZOTKA Z. Polyamines changes in (*Quercus borealis* Michx.) and (*Quercus robur* L.) seeds during ageing in controlled conditions. *Acta Physiol Plant* 1984a; **6**: 127-135.
- [66] SZCZOTKA Z. Differences in concentration of polyamines during the process of after ripening seeds of *Acer platanoides* L. *Acta Physiol Plant* 1984b; **6**: 137-144
- [67] SZCZOTKA Z, PAWŁOWSKI T, KRAWIARZ K. Proteins and polyamines relation during dormancy breaking of European beech (*Fagus sylvatica* L.) seeds. *Acta Physiol Plant* 2003; **25**: 423-435.
- [68] TAKAHASHI T, KAKEHI J-I. Polyamines: ubiquitous polycations with unique roles in growth and stress responses. *Ann Bot* 2010; **105**: 1-6.
- [69] TODD CD, COOKE JEK, MULLEN RT, GIFFORD DJ. Regulation of loblolly pine (*Pinus taeda* L.) arginase in developing seedling tissue during germination and post germinative growth. *Plant Mol Biol* 2001; **45**: 555-565.

- [70] WALKER MA, ROBERTS DR, SHIH C, DUMBROFF EB. A requirement for polyamines during the cell division phase of radical emergence in seeds of *Acer saccharum*. *Plant Cell Physiol* 1985; **26**: 967-97.
- [71] WALKER MA, ROBERTS DR, WAITE JL., DUMBROFF EB. Relationships among cytokinins, ethylene and polyamines during the stratification-germination process in seeds of *Acer saccharum*. *Physiol Plant* 1989; **76**: 326-332
- [72] WANASUNDARA PKJPD, SHAHIDI F, BROSNAN ME. Changes in flax (*Linum usitatissimum*) seed nitrogenous compounds during germination. *Food Chem* 1999; **65**: 289-295.
- [73] WOJTYLA Ł, GARNCZARSKA M, RATAJCZAK L. Rola reaktywnych form tlenu w procesie rozwoju i kiełkowania nasion. *Post Biol Kom* 2006; **33**: 543-553.
- [74] YAMASAKI H, COHEN MF. NO signal at the crossroads: polyamine-induced nitric oxide synthesis in plants? *Trends Plant Sci* 2006; **11**: 522-524.
- [75] ZAPATA PJ, SERRANO M, PRETEL MT, AMORÓS A, BOTELLA A. Polyamines and ethylene changes during germination of different plant species under salinity. *Plant Sci* 2004; **167**: 781-788.
- [76] ZAREI-GHADIKOLAEI M, ABDOLZADEH A, SEDEGHIPOUR HR. Arginase, glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase activities in moist chilled and warm-incubated walnut kernels. *Trees* 2010; **24**: 425-433.
- [77] ZHAO M-G, LIU R-J, CHEN L, TIAN Q-Y, ZHANG W-H. Glucose-induced inhibition of seed germination in *Lotus japonicus* is alleviated by nitric oxide and spermine. *J Plant Physiol* 2009; **166**: 213-218.
- [78] ZHAO JH, QIU RX. Affected on ethylene and polyamines during the early period of maize kernel development. *J Maize Sci* 2003; **S1**:58-59.

Redaktor prowadzący – J. Maszewski

Otrzymano: 07.03.2012

Przyjęto: 23.04.2012

Agnieszka Gniazdowska

Katedra Fizjologii Roślin, Wydział Rolnictwa i Biologii

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

ul. Nowoursynowska 159, 02-776 Warszawa

tel.: 022-593-25-30

e.mail: agnieszka_gniazdowska@sggw.pl, gniazdowska@gmail.com

