

BIOLOGICZNE FUNKCJE OKSYDAZ NADPH W KOMÓRCZE ROŚLINNEJ

BIOLOGICAL FUNCTIONS OF NADPH OXIDASES IN PLANT CELL

Marlena STAWSKA, Julia ZDZIESZYŃSKA,
Ewa WALCZUK, Krystyna ORACZ

Katedra Fizjologii Roślin, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Streszczenie: Roślinne oksydazy NADPH kodowane są przez geny *RBOH* (ang. *Respiratory Burst Oxidase Homolog*). Enzymy te katalizują wytwarzanie anionorodnika ponadtlenkowego ($O_2^{\cdot-}$), jednego z przedstawicieli reaktywnych form tlenu (ang. Reactive Oxygen Species, ROS). W komórce $O_2^{\cdot-}$ jest szybko dysmutowany do nadtlenu wodoru (H_2O_2), innego typu ROS. Produkty aktywności oksydaz NADPH są ważnymi cząsteczkami sygnałowymi w komórkach roślinnych, jak również mogą oddziaływać bezpośrednio ze składnikami komórki (np. białkami, polisacharydami) modyfikując ich właściwości i funkcje. Wiadomo, że biorą one udział w regulacji wielu procesów fizjologicznych, w tym m.in.: wzrostu elongacyjnego komórek, ustępowania spoczynku i kiełkowania nasion, itp. Potwierdzono też, że oksydazy NADPH i geny kodujące te białka pełnią istotną funkcję podczas tzw. wybuchu tlenowego mającego miejsce w trakcie odpowiedzi komórek roślinnych na atak patogena (stres biotyczny). Nasza wiedza na temat roli oksydaz NADPH w odpowiedzi na stresy abiotyczne również wzrosła w ostatnich latach. Zwiększająca się liczba przykładów funkcji pełnionych przez oksydazy NADPH w organizmach roślinnych sugeruje, że mogą one służyć, jako istotne centra molekularne uczestniczące w generowaniu i przekazywaniu sygnałów komórkowych za pośrednictwem ROS. Niniejszy artykuł przeglądowy koncentruje się na omówieniu najnowszych naukowych odkryć pozwalających na lepsze zrozumienie mechanizmów działania oraz biologicznych funkcji oksydaz NADPH oraz genów kodujących te enzymy, w różnych procesach zachodzących w roślinach.

Słowa kluczowe: kiełkowanie, oksydazy NADPH, reaktywne formy tlenu, spoczynek nasion, stres abiotyczny i biotyczny, wzrost elongacyjny

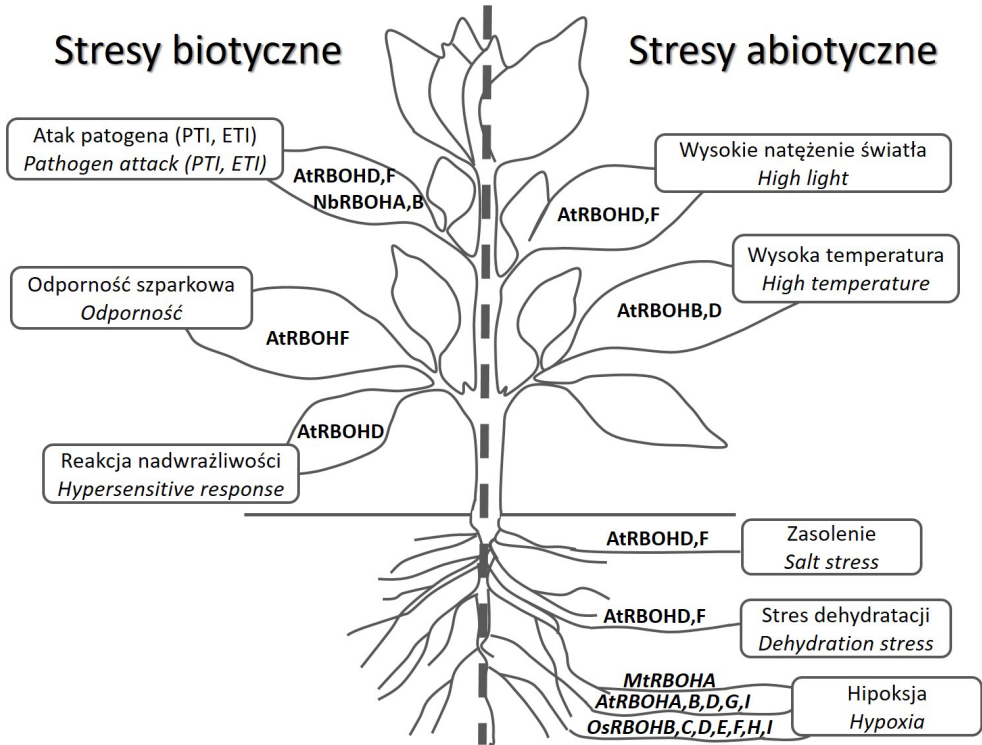
Summary: Plants NADPH oxidases are coded by homologs of *RBOH* genes (*Respiratory Burst Oxidase Homolog*). These enzymes catalyse the production of superoxide radical ($O_2^{\cdot-}$), one of the representatives of reactive oxygen species (ROS). In the cell $O_2^{\cdot-}$ is dismutated into H_2O_2 , another type of ROS. The products of the activity of NADPH oxidases are important signalling molecules in plant cells, as well as they can directly interact with components of the cell (i.e. proteins, polysaccharides)

leading to modifications of their properties and functions. It is known that they participate in regulation of many physiological processes including: cell elongation growth, dormancy alleviation and germination of seeds, etc. It was proven, that plant NADPH oxidases and genes coding these proteins are also key players for pathogen-responsive oxidative burst (biotic stress). Our knowledge about the role of NADPH oxidases in response to abiotic stresses has also increased in recent years. This broad range of examples of functions suggests that NADPH oxidases may serve as important molecular 'hubs' during ROS-mediated signalling in plants. This particular review focus on recent advances in our understanding of biological functions of NADPH oxidases and genes coding these enzymes in various processes occurring in plants.

Keywords: abiotic and biotic stress, elongation growth, germination, NADPH oxidases, plant hormones, reactive oxygen species, seed dormancy

WSTĘP

Reaktywne formy tlenu (ang. *Reactive Oxygen Species*, ROS) pełnią istotną rolę w życiu roślin. Charakteryzują się one bardzo krótkim okresem półtrwania, dlatego też poznanie mechanizmów ich wytwarzania wydaje się być kluczowe dla zrozumienia sposobów, w jaki funkcjonują. Cząsteczki te powstają w wyniku kolejnych etapów jedno-, dwu- lub trójelektronowej redukcji cząsteczki tlenu. Wśród ROS wyróżniamy: 1) wolne rodniki – atomy lub cząsteczki mające jeden lub więcej niesparowanych elektronów (np.: anionorodnik ponadtlenkowy, $O_2^{\cdot-}$; rodnik hydroksylowy, OH^{\cdot}), a także 2) atomy lub cząsteczki niebędące wolnymi rodnikami (np.: tlen singletowy, 1O_2 ; nadtlenuk wodoru, H_2O_2 oraz kwas podchloryny $HOCl$). Wiadomym jest, że ROS generowane są w różnych kompartmentach komórkowych m.in.: w błonie komórkowej, peroksyosomach, ścianie komórkowej, chloroplastach i mitochondriach [50]. Jednym ze źródeł $O_2^{\cdot-}$ w komórce roślinnej są zlokalizowane w błonie komórkowej oksydazy NADPH (ang. *Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Oxidase*) [27, 50]. Coraz liczniejsze wyniki badań potwierdzają, że ROS wytwarzane przez te oksydazy pełnią rolę molekuł sygnałowych regulujących liczne procesy życiowe zachodzące w organizmach roślinnych, takie jak: wzrost wydłużeniowy komórek, regulacja kiełkowania nasion, indukowanie reakcji odporności, czy też aklimatyzacji do warunków stresowych [28, 50, 53, 54] (ryc. 1). Co więcej, te niezwykle reaktywne cząsteczki mogą też oddziaływać bezpośrednio ze składnikami komórki (np. białkami, polisacharydami) modyfikując ich właściwości i funkcje [50]. Aby produkty działania oksydaz NADPH mogły pełnić pozytywną, regulatorową rolę w w/w procesach, ich poziom musi być stale kontrolowany przez system antyoksydacyjny (enzymy antyoksydacyjne, takie jak np.: katalaza, dysmutaza ponadtlenkowa, reduktaza glutationowa oraz nieenzymatyczne antyoksydanty, jak np.: glutation, witaminy A, C i E, itp.) [50]. Coraz częściej sugeruje się także, że oksydazy NADPH i produkty ich aktywności odgrywają rolę centralnego węzła komórkowej sieci



RYCINA 1. Przykłady stresów biotycznych i abiotycznych, które oddziałując na organizmy roślinne indukują reakcje odporności i/lub aklimatyzacji do warunków stresowych, wymagające zaangażowania oksydaz NADPH (RBOH). W ramkach wyszczególniono rodzaj stresu oraz wskazano specyficzne oksydazy NADPH i/lub geny *RBOH* kodujące te białka, uczestniczące w generowaniu odpowiedzi na wskazany czynnik stresowy. Badania naukowe potwierdziły, że w przypadku stresów biotycznych w regulację PTI i ETI a także w odporność szparkową i HR zaangażowane są enzymy, takie jak np.: *AtRBOHD*, *AtRBOHF* a także *NbRBOHA* i *NbRBOHB*. Natomiast, w generowaniu odpowiedzi na stresy abiotyczne uczestniczą białka np.: *AtRBOHD* i *F* – na skutek oddziaływania wysokiego natężenia światła, zasolenia oraz suszy fizjologicznej, *AtRBOHB* oraz *AtRBOHD* – w wyniku działania wysokiej temperatury. Ponadto udowodniono, że w odpowiedzi na stres hipoksji uczestniczą białka *AtRBOHA*, *B*, *D*, *G* i *I* oraz geny, takie jak: *MtRBOHA*, *AtRBOHA*, *G*, *I*, *OsRBOHC*, *E*, *H*, *I*

FIGURE 1. The examples of biotic and abiotic stresses, which affect plant organisms, inducing reactions of resistance and/or acclimatization to stress conditions, requiring the involvement of NADPH oxidases (RBOH). In the frames are indicated the type of stresses and specific NADPH oxidases and/or *RBOH* genes encoding these proteins, which are involved in generation of the response to the designated stress factor. The research studies has confirmed that in the case of biotic stresses, in the regulation of PTI and ETI as well as in stomatal resistance and HR are involved enzymes, such as for example: *AtRBOHD*, *AtRBOHF* as well as *NbRBOHA* and *NbRBOHB*. However, in the generation of response to abiotic stresses participate proteins i.e.: *AtRBOHD* and *F* – due to the effects of high intensity of light, salinity and physiological drought, *AtRBOHB* and *AtRBOHD* – as a result of the influence of high temperature. In addition, it was demonstrated that in the response to hypoxia stress, the *AtRBOHA*, *B*, *D*, *G* i *I* proteins and genes, such as: *MtRBOHA*, *AtRBOHA*, *G*, *I*, *OsRBOHC*, *E*, *H*, *I*, are involved

transdukcji sygnału [6, 70]. Charakterystyka budowy i mechanizmu działania, jak również przykłady biologicznych funkcji pełnionych w komórce roślinnej przez te enzymy i ROS wytwarzane z ich udziałem omówione są w kolejnych podrozdziałach niniejszego artykułu.

BUDOWA I MECHANIZM DZIAŁANIA OKSYDAZ NADPH W KOMÓRCE ROŚLINNEJ

Pierwszym, roślinnym białkiem o potwierdzonej funkcji oksydazy NADPH było OsRBOHA zidentyfikowane u ryżu siewnego (*Oryza sativa*) [20]. W niedługim czasie, kolejne badania ujawniły obecność tego rodzaju białek również u innych gatunków, np.: pomidora zwyczajnego (*Lycopersicon esculentum*), tytoniu szlachetnego (*Nicotiana tabacum*), rzodkiewnika pospolitego (*Arabidopsis thaliana*), lucerny ściętolistkowej (*Medicago truncatula*), fasoli zwyczajnej (*Phaseolus vulgaris*), kukurydzy zwyczajnej (*Zea mays*), itd. [2, 3, 39, 48, 60]. Oksydazy NADPH występujące w komórkach roślinnych charakteryzują się podobną budową, jednakże poszczególne gatunki roślin mogą różnić się ilością izoform tych enzymów. U *A. thaliana* zidentyfikowano 10 białek oksydaz NADPH kodowanych przez rodzinę genów *RBOH* (ang. *Respiratory Burst Oxidase Homolog*), od *AtRBOHA* do *AtRBOHJ*.

Oksydazy NADPH występujące u roślin zbudowane są z 6-ciu transmembranowych helis, charakteryzujących się obecnością dwóch grup hemowych. Zarówno C-terminalny jak i N-terminalny koniec cząsteczki tych białek skierowany jest do wnętrza komórki. Na C-terminalnym końcu zlokalizowane są dwie hydrofilowe domeny zaangażowane w przyłączanie organicznych związków chemicznych: FAD (dinukleotyd flawinoadeninowy) oraz NADPH (dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy). Z kolei na N-terminalnym końcu cząsteczki tego enzymu występują najczęściej dwa (lub więcej) motywy dłoni EF zawierające ligand umożliwiający wiązanie jonów wapnia Ca^{2+} [27, 36]. Enzymy należące do tego typu oksydaz przeprowadzają reakcję utlenienia cząsteczki NADPH przy jednoczesnym przeniesieniu elektronów na tlen. W wyniku tej reakcji w przestrzeni apoplastu dochodzi do powstania $O_2^{\cdot-}$, który następnie może być transportowany do cytozolu i poprzez reakcję dysmutacji przekształcony w H_2O_2 . Regulacja aktywności oksydaz NADPH wymaga zaangażowania różnych komponentów, takich jak np.: 1) jony Ca^{2+} , 2) kinazy białkowe np.: CDPK (ang. *Calcium Dependent Protein Kinase*), MAPK (ang. *Mitogen Activated Protein Kinase*), OST1 (ang. *Open Stomata 1*) oraz 3) białko Rop (ang. *Rho-like protein*) [5, 31, 49, 71]. W oparciu o liczne wyniki badań ścieżki aktywacji oksydaz NADPH podzielono na: fosforylacyjnie zależną oraz fosforylacyjnie niezależną. Pierwszy rodzaj regulacji aktywności

oksydaz NADPH zachodzi z udziałem kinaz, takich jak np. CDPK i OST1 oraz jonów Ca^{2+} . Obie w/w kinazy przeprowadzają proces bezpośredniej fosforylacji specyficznych białek oksydaz NADPH. Mechanizm działania i funkcje kinaz StCDPK4 i StCDPK5 scharakteryzowano w badaniach z wykorzystaniem roślin ziemniaka (*Solanum tuberosum*). Wykazano, że kinazy te są aktywne w obecności jonów Ca^{2+} i przeprowadzają fosforylację białka StRBOHB [31]. Z kolei kinaza OST1 uczestniczy w zależnym od ABA i ROS zamykaniu aparatów szparkowych. Udowodniono, że OST1 przeprowadza bezpośrednią fosforylację AtRBOHF stymulując wytwarzanie ROS przez tę oksydazę [62]. Natomiast, fosforylacyjnie niezależna regulacja aktywności oksydaz NADPH zachodzi np. przy udziale rodziny białek Ras tzw. małych GTPaz [16]. U roślin obecna jest jedna nadrodzina GTPaz Ras zwana Rac/Rop. Badania wykazały, iż aktywność Rac/Rop jest pozytywnie skorelowana z katalizowaną przez oksydazy NADPH akumulacją ROS u *A. thaliana* [16]. Wykazano również, że poziom ekspresji genów kodujących białka oksydaz NADPH u *A. thaliana* jest regulowany przez hormony roślinne, takie jak: auksyny (IAA), gibereliny (GA), kwas abscysynowy (ABA), etylen (ET) oraz ester metylowy kwasu jasmonowego (MeJA) [41, 42, 44, 62].

REGULACJA WZROSTU ELONGACYJNEGO Z UDZIAŁEM OKSYDAZ NADPH

Kształt i rozmiar organów, a nawet całych organizmów roślinnych jest determinowany przez wzrost prowadzący nie tylko do zwielokrotnienia liczby komórek (w wyniku podziałów komórkowych), ale także zwiększenia ich wielkości (wzrost elongacyjny). Wzrost elongacyjny komórek odgrywa ważną rolę podczas cyklu życiowego rośliny. Wydłużanie włośników, wzrost łagiewki pyłkowej, czy też kiełkowanie to tylko niektóre przykłady procesów, w trakcie których ma miejsce intensywny wzrost wydłużeniowy. Istotną rolę w regulacji wzrostu tego rodzaju odgrywają modyfikacje ściany komórkowej: 1) z udziałem ekspansyn i białek enzymatycznych (np. celulaz, liaz pektynianowych, metyloesteraz pektynianowych, itp.), jak również 2) w wyniku bezpośrednich oddziaływań ROS ze składnikami budulcowymi tej struktury [50, 76]. Rozluźnianie struktury ściany komórkowej podczas w/w procesów modulowane jest m.in. poprzez zmiany pH oraz stężenia jonów Ca^{2+} w apoplastacie. Wykazano, że w warunkach pH apoplastowego równego około 4.5 ma miejsce aktywacja kanałów wapniowych umożliwiających transport Ca^{2+} do apoplastu, co prowadzi do aktywacji oksydaz NADPH i wzrostu poziomu apoplastowych ROS generowanych przez te enzymy [53, 65, 69]. W wyniku bezpośredniego oddziaływania ROS z polisacharydami budującymi ścianę komórkową dochodzi do modyfikacji jej struktury [22, 50, 55]. Zaobserwowano,

że podczas wzrostu włosników oraz łagiewki pyłkowej u *A. thaliana*, do utrzymania niezbędnego gradientu Ca^{2+} pomiędzy apoplastem a wnętrzem komórki wymagana jest akumulacja H_2O_2 powstałego w wyniku dysmutacji $\text{O}_2^{\cdot -}$ produkowanego przez 3 oksydazy NADPH, takie jak: RBOHC, RBOHH oraz RBOHJ [12, 40, 45, 57]. Skoordynowane działanie opisanych tu czynników jest również odpowiedzialne za utrzymanie polaryzacji komórek podczas morfogenezy. Wykazano bowiem, że podczas polarnego rozszerzania się komórek w trakcie wykształcania włosników oraz łagiewki pyłkowej, w apikalnej strefie wydłużającej się komórki dochodzi do wzrostu stężenia jonów Ca^{2+} oraz do oddziaływania apoplastycznych ROS ze składnikami ściany komórkowej [65]. Fakt, iż ROS wytwarzane przez oksydazy NADPH są istotne dla przebiegu wzrostu polarnego potwierdzają badania z udziałem mutantu *A. thaliana rbohC*. Zaobserwowano, iż u tych mutantów pomimo zainicjowania rozwoju włosników i pojawienia się wybrzuszeń trichoblastów (komórki skórki wytwarzające włosniki), to z powodu zahamowanego wzrostu elongacyjnego w większości przypadków nie dochodziło do ich całkowitego wykształcenia [6, 30]. Wykazano również, że ROS produkowane przez RBOHC podczas wzrostu włosników oddziałują na kinazę OXI1 (ang. *Oxidative signal-inducible 1*), która następnie aktywuje kaskadę kinaz MAPK. Sekwencja tych zdarzeń w rezultacie prowadzi do stymulacji wzrostu elongacyjnego [59].

Wzrastająca liczba dowodów naukowych potwierdza też istotną rolę oksydaz NADPH i wytwarzanych przez nie ROS w regulacji wzrostu łagiewki pyłkowej u *A. thaliana*. Wykazano, że podczas tego procesu istotną rolę pełnią dwie oksydazy NADPH, takie jak: RBOHH i RBOHJ [45]. Obrazowanie ROS *in vivo* wykazało, iż podwójne mutanty *rbohH/rbohJ* tego gatunku, w których na skutek punktowej mutacji w motywach EF zablokowano zdolność wiązania Ca^{2+} , charakteryzowały się obniżonym poziomem ROS w wierzchołkowej strefie łagiewki [29]. Co więcej udowodniono, że gwałtowny wzrost produkcji ROS przez oksydazy NADPH jest istotny dla pęknięcia ściany komórkowej łagiewki pyłkowej w celu uwolnienia komórki plemnikowej. Związane jest to ze zmianami pH wywołanymi przez napływ jonów H^+ poprzez ATPazę oraz na drodze wymiany $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ [19]. Wiadomym jest, że w komórkach *A. thaliana* występują dwie formy międzybłonowej ATPazy, kodowane odpowiednio przez geny *AHA1* i *AHA2* (ang. *Autoinhibited H⁺-ATPase isoform 1 i 2*) [7]. Białko AHA1 jest odpowiedzialne za transport H^+ w łagiewce pyłkowej, zaś AHA2 pełni swoją funkcję we włosnikach korzeniowych.

ROLA OKSYDAZ NADPH W BIOLOGII NASION

Wytwarzanie ROS przez oksydazy NADPH towarzyszy wielu procesom zachodzącym w nasionach np. podczas ustępowania spoczynku i kiełkowania [50, 52].

Kiełkowanie jest zespołem procesów, prowadzących do aktywacji metabolicznej zarodka i rozpoczęcia jego wzrostu elongacyjnego. Za koniec procesu kiełkowania nasion większości gatunków roślin dwuliściennych uznaje się moment przebiccia warstw okrywających (np.: bielma i okrywy nasiennej u *A. thaliana*) przez wydłużający się elongacyjnie korzeń zarodkowy. Natomiast spoczynek nasion jest stanem czasowej niezdolności do kiełkowania, nawet w optymalnych warunkach środowiska. Wykazano, że podczas dojrzewania posprzętnego (przechowywanie nasion w suchych warunkach) i stymulacji kiełkowania przez światło dochodzi do zmniejszenia wrażliwości komórek nasion na hormonalne inhibitory np. ABA, natomiast zwiększa się rola molekuł o stymulującym działaniu, takich jak: GA, ET oraz ROS [53, 54, 63]. Coraz większa liczba wyników badań podkreśla także znaczenie interakcji szlaków sygnałowych indukowanych przez w/w czynniki endogenne oraz czynniki egzogenne (np. światło, temperatura) w procesach zachodzących w nasionach [53, 63]. Zarówno w suchych nasionach dojrzewających posprzętnie, jaki i w spęczniałych, kiełkujących nasionach, ROS generowane przez oksydazy NADPH modulują procesy w nich zachodzące. Może się to odbywać poprzez dwa rodzaje oddziaływań ROS, tj.: 1) bezpośrednie – ze składnikami komórkowymi (np. poprzez utlenianie mRNA, białek i polisacharydów) i/lub 2) pośrednie – działając jako cząsteczka sygnałowa [50, 54, 55]. W wyniku tych przemian dochodzi do ustąpienia spoczynku a nasiona stają się zdolne do kiełkowania w szerokim spektrum warunków środowiskowych.

Obecnie wiadomo, że podczas posprzętnego dojrzewania, w suchych nasionach na drodze nieenzymatycznej generowane są ROS, które mogą utleniać specyficzne cząsteczki kwasów nukleinowych i białek, przyczyniając się do ustąpienia spoczynku [8, 51, 54]. Niektórzy naukowcy postulują, że w regulację ustępowania spoczynku zaangażowany jest gen *AtRBOHB* kodujący oksydazę NADPH [47]. Wykazano, że transkrypty genu *AtRBOHB* ulegały alternatywnemu splicingowi, a ilość poszczególnych form genu różniła się w zależności od głębokości spoczynku, jakim obarczone były zarówno suche jak i pęczniejące przez 24 godziny, na świetle nasiona. Co więcej, niespoczynkowe nasiona mutantów *A. thaliana rbohB* podczas imbibicji charakteryzowały się większą wrażliwością na ABA [47]. W innych badaniach, również przeprowadzonych na nasionach *A. thaliana* potwierdzono rolę oksydazy NADPH kodowanej przez gen *AtRBOHD* w indukcji spoczynku na etapie embriogenezy [34]. Zaobserwowano, że świeżo zebrane nasiona mutantu *A. thaliana rbohD* charakteryzowały się znacznie silniejszym spoczynkiem w porównaniu do nasion typu dzikiego. Ponadto, wymagały one znacznie dłuższego okresu dojrzewania posprzętnego, aby osiągnąć zdolność kiełkowania na poziomie obserwowanym w przypadku nasion niespoczynkowych typu dzikiego [34].

Wiadomym jest, że jednym ze źródeł ROS w pęczniejących nasionach *L. sativum*, *A. thaliana* i *H. annuus* są błonowe oksydazy NADPH [50, 52, 55]. Wykazano, że

potraktowanie nasion *H. annuus* i prosa różgowatego (*Panicum virgatum*) roztworem DPI (ang. *Diphenylene Iodonium*), który jest inhibitorem tego rodzaju enzymów, skutkowało spowolnieniem ich kiełkowania [52, 61]. W innych badaniach zaobserwowano, że zahamowanie aktywności oksydaz NADPH przez DPI skorelowane było ze znacznym zmniejszeniem aktywności α -amylazy w warstwie aleuronowej kiełkujących ziarniaków jęczmienia zwyczajnego (*Hordeum vulgare*) [22]. Prowadziło to w konsekwencji do uniemożliwienia wykorzystania skrobi w celu pozyskania energii niezbędnej kiełkującemu zarodkowi do zakończenia tego procesu [22]. Udowodniono również, że w pęczniejących ziarniakach *H. vulgare* dochodziło do wzrostu ekspresji genów kodujących oksydazy NADPH, takich jak: *HvRbohB1*, *HvRbohE*, *HvRbohF1* i *HvRbohF2* w zarodku i warstwie aleuronowej [22]. Wiadomym jest także, że ROS produkowane przez te enzymy uczestniczą w zależnej od GA i ABA regulacji kiełkowania ziarniaków *H. vulgare*. Wykazano, że aktywność oksydaz NADPH jest stymulowana przez GA, podczas gdy ABA hamuje ten proces. Co więcej, ROS produkowane przez oksydazy NADPH promują biosyntezę GA oraz katabolizm ABA w kiełkującym zarodku nasion tego gatunku [22].

ZNACZENIE OKSYDAZ NADPH W ODPOWIEDZI KOMÓRKI ROŚLINNEJ NA STRESY BIOTYCZNE I ABIOTYCZNE

Rośliny, jako organizmy osiadłe nie mają możliwości zmiany środowiska życia, dlatego też stosunkowo bardziej niż zwierzęta są narażone na szkodliwy wpływ czynników zewnętrznych. Wśród niekorzystnych warunków egzogennych oddziałujących na rośliny wyróżnia się: 1) stresy biotyczne np. atak patogenów oraz żerowanie szkodników roślin, 2) stresy abiotyczne np.: suboptymalna temperatura, susza, zasolenie gleby oraz wysokie natężenie światła (ryc. 1). W toku ewolucji organizmy roślinne wykształciły różne mechanizmy odpowiedzialne za: 1) odbiór docierających do nich bodźców, 2) indukcję i transdukcję specyficznych sygnałów oraz 3) wygenerowanie reakcji komórkowych umożliwiających adaptację do zmieniających się warunków środowiska i/lub mechanizmów odpornościowych. Wykazano, iż w roślinnych tkankach atakowanych przez abiotyczny stresor generowany jest sygnał, który następnie przesłany do pozostałych, nienarażonych bezpośrednio części rośliny umożliwia im aklimatyzację do warunków stresowych. Jest to tzw. systemowa nabyta aklimatyzacja (ang. *Systemic Acquired Acclimation*, SAA) [43]. Odpowiednikiem SAA dla stresów biotycznych jest systemowa nabyta odporność (ang. *Systemic Acquired Resistance*, SAR), w wyniku której analogicznie części roślin nienarażone na bezpośredni kontakt z czynnikiem stresogennym zyskują na niego odporność. Liczne badania naukowe potwierdziły, iż ROS wytwarzane przez oksydazy NADPH, są cząsteczkami sygnałowymi pełniącymi ważną funkcję w re-

gulacji odpowiedzi roślin na czynniki stresowe. W związku z tym w dalszej części tego artykułu omówione są przykłady oksydaz NADPH kodowanych przez specyficzne geny *RBOH*, w przypadku których eksperymentalnie potwierdzono ich zaangażowanie w modulowanie odpowiedzi roślin na wskazane stropy (ryc. 1).

STRATEGIE ODPOWIEDZI ROŚLIN NA STRESY BIOTYCZNE Z UDZIAŁEM OKSYDAZ NADPH

Reakcje odpornościowe nabywane przez rośliny podczas odpowiedzi immunologicznej można podzielić na: 1) PTI (ang. *PAMP Triggered Immunity, Pathogen-Associated Molecular Pattern Triggered Immunity*) – odporność niespecyficzną, tzw. podstawową, bazową oraz 2) ETI (ang. *Effector Triggered Immunity*) – specyficzną odporność indukowaną przez tzw. efekторы, czynniki awirulencji patogena (*avr*) swoiste w swoim działaniu względem danego gospodarza [24, 36]. Podczas indukcji reakcji odporności rośliny wyróżnia się 4 fazy, takie jak: 1) pierwsza, podczas której molekularny wzór towarzyszący patogenowi PAMP lub MAMP (ang. *Pathogen- lub Microbe-Associated Molecular Pattern*) jest rozpoznawany przez roślinne, wysoce swoiste receptory PRR (ang. *Pattern Recognition Receptors*), co skutkuje wykształceniem się podstawowej odporności PTI, 2) druga faza, w której ma miejsce wytworzenie efektorów przez patogena i przełamanie PTI, 3) trzecia faza, gdy następuje nabycie przez roślinę specyficznej odporności ETI wzmacnianej dodatkowo przez PTI, co często prowadzi do tzw. reakcji nadwrażliwości HR (ang. *Hypersensitive Response*) oraz 4) czwarta faza, w trakcie której patogen nabywa zdolność wytworzenia nowych efektorów przełamujących odporność specyficzną rośliny [24]. Liczne wyniki badań wykazały, iż ważną rolę podczas HR pełnią apoplastowe ROS wytwarzane przez oksydazy NADPH [13, 40]. Na skutek ataku patogena w komórkach roślinnych dochodzi do wzrostu poziomu ROS, które są istotne między innymi do zaindukowania programowanej śmierci komórki (ang. *Programmed Cell Death, PCD*) [75]. W trakcie HR dochodzi do szybkiego obumierania komórek zainfekowanych oraz sąsiadujących z nimi [15]. Molekularne podłoże tego procesu nie jest jeszcze dobrze poznane.

U roślin wyróżnia się również tzw. odporność szparkową (ang. *stomatal immunity*). Polega ona na indukcji zamykania się aparatów szparkowych, mającej na celu uniemożliwienie wniknięcia patogenowi do wnętrza rośliny. Stanowi to jeden z przykładów odpowiedzi PTI organizmu roślinnego. U *A. thaliana* wykazano, że w regulację tego rodzaju obrony rośliny przed infekcją zaangażowane są białka AtRBOHD oraz AtRBOHF [36, 37, 42].

Przykładem bakteryjnego PAMP, które aktywuje mechanizmy obronne roślin jest bakteryjne białko flagelina. Na konserwatywnym N-końcu tego białka znajduje się 22 aminokwasów, które stanowią aktywny epitop flg22, czyli fragment łączący się bezpośrednio z roślinnym receptorem PRR zwanym FLS2 (ang. *Fla-*

gellin Sensitive 2) [64]. Udowodniono, że fosforylacja RBOHD poprzez BIK1 (ang. *Botrytis-Induced Kinase 1*) jest konieczna do prawidłowego uruchomienia odpowiedzi PTI rośliny podczas ataku patogena wytwarzającego flagelinę [26]. Ostatecznie dzięki aktywacji kompleksu tych białek może dochodzić do odpowiedzi roślin na stres objawiających się m.in.: zamknięciem aparatów szparkowych, usztywnieniem ściany komórkowej i wzrostem produkcji ROS [25, 26, 67].

Białka RBOH pełnią także istotne funkcje w czasie odpowiedzi roślin na atak patogenów grzybowych. W próbach wyizolowanych z liści *N. benthamiana* porażonych przez chorobotwórczy grzyb z gatunku *Phytophthora infestans* wykazano, że poziom ekspresji genów *NbRBOHB* oraz *NbRBOHA* był wyższy w porównaniu do tego zaobserwowanego u roślin zdrowych [74]. Ponadto, na roślinach *N. benthamiana* charakteryzujących się wyciszeniem powyższych genów zauważono, że skala porażenia liści przez *P. infestans* była zdecydowanie większa niż u roślin typu dzikiego. Kolejne analizy transkryptomocne wykonane na próbach uzyskanych z zainfekowanych przez *P. infestans* liści *N. benthamiana* ujawniły, że *NbRBOHA* wykazywał wzrost poziomu transkryptów już we wczesnej fazie infekcji i charakteryzował się konstytutywną ekspresją w następnych fazach. Natomiast ekspresję genu *NbRBOHB* obserwowano wyłącznie po traktowaniu specyficznym elicytorem PAMP wytwarzanym przez *P. infestans*, takim jak INF1 (ang. *Infestans 1*). Wynik ten potwierdził, że udział *NbRBOHB* w odpowiedzi PTI jest specyficzny i zależy od INF1 [74]. Mutanty *N. benthamiana* z wyciszonym genem *NbRBOHB* cechowała wysoka podatność na patogena *P. infestans*, ale co ciekawe nie charakteryzowały się zwiększoną wrażliwością na patogena *Colletotrichum orbiculare* [4].

Badania innych badaczy pozwoliły na scharakteryzowanie roli oksydazy NADPH kodowanej przez *RBOHD* w regulacji mechanizmów obronnych PTI. Wykazano, że mutanty *rbohD A. thaliana* charakteryzowały się większą wrażliwością na zakażenie nekrofitycznym grzybem *Alternaria brassicicola* [56]. W przypadku roślin kontrolnych zainfekowanych *A. brassicicola*, PCD obserwowana była w komórkach bezpośredniego kontaktu z patogenem, jednak proces ten nie obejmował sąsiednich komórek. Natomiast w mutantach *rbohD A. thaliana* obserwowano rozległą PCD zajmującą duże powierzchnie liści co sugerowało, że mutant ten jest mniej odporny na atak patogena niż typ dziki. Na tej podstawie wysunięto wniosek, że *RBOHD* pełni pozytywną rolę w regulacji odporności roślin [56]. Większą wrażliwość mutantów *rbohD A. thaliana* obserwowano także w przypadku infekcji grzybem *Golovinomyces cichoracearum* [11] oraz bakterią *Erwinia chrysanthemi* [18]. Z kolei charakterystyka mutantów *A. thaliana* z indukowanymi promotorami genów *AtRbohD* i *AtRbohF* wykazała różne wzorce ich ekspresji podczas odpowiedzi na stres biotyczny wywołany przez bakterię *P. syringae* pv. tomatu DC3000 oraz nekrofitycznego grzyba *Plectosphaerella cucumerina* [46]. Jednoczesne traktowanie szczepem *Pto* DC3000 i zawiesiną spor grzyba *P. cucumerina* aktywowało promotory obydwu analizowanych genów *RBOH*, jednak wzrost ekspresji

AtRBOHD zlokalizowany był głównie w obszarach liści, które charakteryzowały się rozległą nekrozą oraz podwyższonym poziomem ROS. Z kolei wzrost ekspresji *AtRBOHF* obserwowano w tkankach przewodzących. Przeprowadzone badania sugerują, iż z uwagi na czasowo-przestrzenne różnice w ekspresji genów *AtRBOHD* i *AtRBOHF* ich funkcje w regulacji ścieżek sygnałowych odpowiedzi immunologicznej zależnej od ROS u *A. thaliana* mogą być inne [46]. Również inne oksydazy NADPH wydają się pełnić istotną rolę podczas odpowiedzi roślin na atak patogenów. Wykazano, że mutanty *rbohC* *A. thaliana* charakteryzowały się większą podatnością na mączniaka prawdziwego *G. cichoracearum*. W roślinach *A. thaliana* pod wpływem aplikacji chityny pochodzącej ze ścian komórek grzybów dochodziło do stymulacji ekspresji genu *ATL9* (ang. *Arabidopsis Toxicos en Levadura 9*). Wiadomym jest również, że ekspresja tego genu regulowana jest także przez oksydazy NADPH [11]. Analiza transkryptomyczna w próbach wyizolowanych z roślin typu dzikiego oraz mutantów *rbohD*, *rbohF*, *rbohD/F* *A. thaliana* potraktowanych chityną ujawniła spadek ekspresji *ATL9* u wszystkich mutantów w porównaniu do typu dzikiego. Wynik ten potwierdził, że zmiany poziomu transkryptów tego genu w wyniku oddziaływania chityny są skorelowane z aktywnością oksydaz NADPH [11].

Liczne badania naukowe sugerują, że w obu typach odporności PTI i ETI ważną rolę pełnią jony Ca^{2+} , kinazy CDPK i MAPK oraz ROS wytwarzane przez oksydazy NADPH. Współdziałanie w/w czynników jest istotne dla indukcji transkrypcji specyficznych genów, takich jak: *PR1 – PR5* (ang. *Pathogen Related genes*); *WRKY*, kodujących czynniki transkrypcyjne; *HSP* (ang. *Heat Shock Protein genes*), kodujących białka szoku cieplnego oraz genów *R*, kodujących receptory rozpoznające czynniki avr patogena podczas odpowiedzi ETI [1, 10, 68]. Rozpoznanie patogena przez komórki roślinne przyczynia się do wzrostu stężenia Ca^{2+} w cytoplazmie, skutkującym między innymi aktywacją kinaz CDPK. Wykazano, iż białka kodowane przez geny *RBOH* (głównie *RBOHD*) są fosforylowane przez zależne od Ca^{2+} kinazy CDPK, co ostatecznie prowadzi do wybuchu tlenowego oraz jest kluczowe dla prawidłowego zajścia odpowiedzi PTI [17, 31]. Natomiast w roślinach *N. benthamiana* wykazano, że MAPK mogą aktywować ekspresję *RBOHB* po podaniu INF1, co prowadzi do wybuchu tlenowego podczas odpowiedzi PTI lub ETI [1]. W badaniach wykorzystano liście *N. benthamiana* z przejściowo wyciszonymi dwoma genami kodującymi kinazy MAPK – *NtSIPK* (ang. *Salicylic acid-Induced Protein Kinase*) i *NtNTF6* (ang. *Mitogen activated protein kinase homolog NTF 6*). W celu wywołania odpowiedzi PTI liście transformantów *N. benthamiana* z wyciszonymi genami *SIPK/NTF6* oraz kontrolne traktowano peptydem flg22 lub białkiem INF1. Natomiast odpowiedź ETI wywołano za pomocą białka R3a i AVR3a. W przypadku traktowania białkami INF1, R3a i AVR3a zaobserwowano znaczny wzrost poziomu transkryptu *RBOHB* oraz znacznie wyższy poziom ROS w liściach roślin kontrolnych niż tych z unieczynnionymi genami MAPK. Uzyskany wynik sugeruje pozytywną regulację *RBOHB* przez w/w kinazy MAPK [1].

OKSYDAZY NADPH W ODPOWIEDZI NA STRESY ABIOTYCZNE

Stres temperaturowy oraz wysokiego natężenia światła

W toku ewolucji rośliny wypracowały mechanizmy umożliwiające odbieranie szerokiego spektrum środowiskowych bodźców generowanych przez czynniki biotyczne i abiotyczne oraz pozwalające im na adaptację i przetrwanie nawet podczas oddziaływania niekorzystnych warunków. Spośród głównych czynników abiotycznych wywołujących reakcję stresową roślin, w które zaangażowane są oksydazy NADPH możemy wyróżnić m.in. suboptymalną temperaturę, suszę, jak również wysokie natężenie światła (ryc. 1). W zależności od cech gatunkowych rośliny, zbyt niska lub zbyt wysoka temperatura może wywierać niekorzystny wpływ na jej organizm, prowadząc do uszkodzenia struktury błon komórkowych, integralności komórek, zahamowania podstawowych procesów życiowych, a w skrajnych przypadkach nawet do śmierci całej rośliny. Istnieją dowody, że w regulację odpowiedzi rośliny na niekorzystne czynniki środowiskowe są zaangażowane ROS generowane przez oksydazy NADPH. Jak wykazały ostatnie badania przeprowadzone na *A. thaliana* to głównie białka kodowane przez *AtRBOHD* i *AtRBOHF* biorą udział w regulacji odpowiedzi roślin na różnego rodzaju stresy abiotyczne [6]. W przypadku oddziaływania wysokiej temperatury wykazano, że mutanty *A. thaliana* z nieaktywnymi genami *AtRBOHB* oraz *AtRBOHD* charakteryzowały się zwiększoną wrażliwością na ten stres. Objawiała się ona zmniejszoną przeżywalnością siewek mutantów *rbohB* i *rbohD* *A. thaliana* inkubowanych okresowo w temperaturze 45 °C, w porównaniu do roślin typu dzikiego [33]. Inne badania przeprowadzone na roślinach ogórka (*Cucumis sativus*) wykazały, że pod wpływem oddziaływania podwyższonej temperatury w roślinach *C. sativus* przeszczepionych na podkładkę korzeniową pochodzącą z truckwy (*Luffa cylindrica*) następowała indukcja ekspresji genu *CsRBOH* oraz *CsHSP70* (ang. *Heat Shock Protein 70*), akumulacja H_2O_2 i ABA w porównaniu do roślin nieprzeszczepionych [35]. Było to skorelowane z wyższą odpornością roślin *C. sativus* na podkładce z *L. cylindrica* na stres wysokiej temperatury. Wykazano jednocześnie, że potraktowanie liści ogórka roztworem DPI hamowało zarówno wzrost ekspresji *CsHSP70*, jak i obniżało ogólną tolerancję roślin na stres wysokiej temperatury. Na tej podstawie można wnioskować, że ROS produkowane przez oksydazy NADPH oddziałują ze szlakiem sygnałowym ABA a pośrednio modulując poziom transkryptów *CsHSP70* pełnią pozytywną rolę podczas reakcji odpowiedzi roślin na stres wysokiej temperatury.

W środowisku naturalnym rośliny często są narażone na oddziaływanie więcej niż jednego czynnika stresogennego w tym samym czasie np.: stres wysokiej temperatury oraz wysokiego natężenia światła. Oddziaływanie tego drugiego czynnika przyczynia się do generowania dużych ilości ROS między innymi przez błonowe białka kodowane przez *RBOH*, analogicznie jak ma to miejsce podczas

stresu temperaturowego [77]. Wyniki innych autorów wskazują, iż RBOH występujące u *A. thaliana* są niezbędne do prawidłowej transdukcji sygnału ROS pomiędzy sąsiednimi komórkami oraz tkankami położonymi w większej odległości od lokalizacji oddziaływania stresu wysokiego natężenia światła, regulując w ten sposób reakcję SAA na ten czynnik [14]. Dowodzą tego wyniki uzyskane na podwójnych mutantach *rbohD/rbohF* *A. thaliana*, które charakteryzowały się zahamowaniem odpowiedzi SAA w tkankach oddalonych od miejsca ekspozycji rośliny na bodziec wysokiego natężenia światła, co objawiało się większą wrażliwością tych tkanek na działanie bodźca stresogennego [14]. W oparciu o uzyskane wyniki badań zaproponowano, że ROS pełnią funkcję cząsteczek sygnałowych informujących tkanki nienarażone bezpośrednio na działanie stresu abiotycznego o występowaniu niekorzystnych warunków. Wywołują tym samym aklimatyzację organów oddalonych od miejsca działania stresu przejawiającą się między innymi, oprócz wzrostu poziomu ROS produkowanych przez oksydazy NADPH, także aktywacją systemu antyoksydacyjnego oraz wzrostem stężenia ABA, dzięki czemu dalej położone organy są lepiej przygotowane na potencjalne oddziaływanie stresu [43].

Stres hipoksji

Globalne zmiany klimatyczne w zależności od szerokości geograficznej mogą objawiać się dużymi wahaniami temperatur, ale także obfitymi, często gwałtownymi opadami lub długimi okresami suszy w poszczególnych regionach świata. W przypadku podtopienia lub zalania terenu utrudniona jest wymiana gazowa pomiędzy organami roślin a atmosferą. Niższe stężenie tlenu powoduje ograniczenie oddychania komórkowego i fotosyntezy prowadząc do deficytu energetycznego oraz gromadzenia toksycznych związków (np. produktów reakcji beztlenowych), a także wzrostu poziomu ROS [58, 73]. Jednym z istotniejszych negatywnych skutków zalania jest ograniczenie dostępności tlenu prowadzące do stresu hipoksji. Wykazano, iż podczas hipoksji w roślinach *A. thaliana* dochodzi do wzrostu ekspresji genów *AtRBOHA*, *B*, *D*, *G* i *I* [73]. Zaobserwowano również, że mutanty *rbohD* *A. thaliana* charakteryzowały się niższym poziomem H_2O_2 , mniejszą ilością transkryptów genów *AtACS7* i *AtACS8* (ang. *1-Amino-Cyclopropane-1-Carboxylate Synthase 7* i *8*) zaangażowanych w syntezę hormonu ET, a także genów indukowanych przez stres hipoksji, takich jak: *AtERF73/AtHRE1* (ang. *Ethylene Response Factor73/Hypoxia Responsive ERF*) i *AtADH1* (ang. *Alcohol Dehydrogenase 1*) [73]. Może to sugerować, iż *AtRBOHD* pełni pozytywną rolę w regulacji odpowiedzi roślin na stres hipoksji. Natomiast w innej pracy wykazano, że pod wpływem częściowego zalania, w roślinach *O. sativa* dochodziło do stymulacji ekspresji genów *OsRBOHB*, *C*, *D*, *E*, *F*, podczas gdy całkowite zalanie powodowało wzrost transkryptów *OsRBOHH* oraz *I* [70]. Zmiany profilu ekspresji poszczególnych genów *OsRBOH* umożliwiały roślinom przetrwanie

stresu hipoksji [73]. Z kolei badania przeprowadzone na *M. truncatula* wykazały, że w korzeniach tych roślin w warunkach stresu hipoksji dochodziło do stymulacji ekspresji genu *MtRBOHA* [39]. Uzyskany wynik potwierdził rolę enzymu kodowanego przez ten gen w regulacji odpowiedzi roślin *M. truncatula* na niedobór tlenu w tkankach [39].

Stres zasolenia oraz dehydratacji z przyczyn fizjologicznych

Innym rodzajem stresu, na jaki często narażone są rośliny jest stres spowodowany zasoleniem gleby. Jony Na^+ w wysokich stężeniach wykazują działanie toksyczne powodując zahamowanie fotosyntezy i wzrostu roślin. Nadmierne stężenie soli prowadzi także do zaburzenia gospodarki jonowej K^+ i Ca^{2+} , co negatywnie wpływa na zdolność pobierania składników pokarmowych z gleby oraz zaburza regulację otwierania aparatów szparkowych [66]. Jony Na^+ pobierane są z gleby oraz transportowane elementami ksylemu do części nadziemnych roślin, gdzie gromadzone w wysokich stężeniach wykazują działanie toksyczne. Efektami działania stresu solnego są utrata turgoru, nadprodukcja ROS oraz wzmożona fotorespiracja występująca wspólnie z ograniczoną fotosyntezą [32]. Rośliny bardzo szybko reagują na wysokie stężenie NaCl w podłożu, niemalże natychmiast wykazując nagły wzrost stężenia Ca^{2+} w cytozolu komórek korzeni, który rozprzestrzenia się następnie systemicznie w innych tkankach. Wykazano, iż u *A. thaliana* ekspresja *AtRBOHD* oraz *AtRBOHF* jest stymulowana przez stres solny, co sugeruje ich istotną rolę w odpowiedzi roślin na ten czynnik stresogenny [38]. Wyniki dotychczasowych badań sugerują, że oksydaza NADPH kodowana przez *RBOHF* wywołując wspomnianą już „falę ROS” w warunkach stresu solnego odgrywa negatywną rolę w załadunku jonów Na^+ do ksylemu i w ten sposób chroni pędy przed negatywnymi skutkami tego typu stresu [23]. U dorosłych roślin mutantów *rbohF* *A. thaliana* nie zaobserwowano bowiem wzrostu poziomu ROS w tkankach przewodzących podczas stresu solnego, co prowadziło do zwiększonej akumulacji Na^+ w tkankach przewodzących korzeni i pędów. Mutanty te charakteryzowały się także nadwrażliwością pędów na Na^+ transportowanego w zwiększonych ilościach z gleby, co objawiało się rozległymi chlorozami a nawet nekrozami powstającymi w wyniku PCD [23]. Z kolei badania przeprowadzone na podwójnych mutantach *rbohD/rbohF* *A. thaliana* wykazały, że są one bardziej wrażliwe na działanie stresu solnego niż typ dziki, a także pojedyncze mutanty *rbohD* i *rbohF*. Co więcej, trzytygodniowe rośliny mutantu *rbohD/rbohF* w warunkach stresu solnego miały także podwyższoną zawartość jonów Na^+ oraz obniżoną zawartość K^+ co sugeruje, że ROS produkowane w warunkach stresu solnego przez *AtRBOHD* oraz *AtRBOHF* pełnią funkcję cząsteczek sygnałowych zapewniających utrzymanie równowagi pomiędzy Na^+ i K^+ , zwiększając tym samym tolerancję *A. thaliana* na ten rodzaj stresu [38]. Dalsze badania ujawniły, że podczas krótkotrwałego stresu solnego w siewkach tych mutantów nie dochodziło do

powstania wybuchu oksydacyjnego, nie obserwowano wzrostu poziomu H_2O_2 ani wzrostu aktywności enzymów systemu antyoksydacyjnego [9]. Dorosłe rośliny *A. thaliana* typu dzikiego były bardziej tolerancyjne także na długotrwałe działanie zasolenia podłoża niż mutanty *rbohD/rbohF* tego gatunku. Może to sugerować, że zależny od AtRBOHD/F wzrost poziomu H_2O_2 w początkowych fazach działania stresu zwiększa tolerancję roślin na wydłużający się okres oddziaływania omawianego tu czynnika stresogennego [9].

Wysokie stężenie soli w podłożu przyczynia się do obniżenia potencjału wody w glebie i ograniczenia jej pobierania przez korzenie roślin, prowadząc do powstania tzw. stresu dehydratacji z przyczyn fizjologicznych. Wykazano, iż w warunkach stresu dehydratacji wywołanego wysokim stężeniem NaCl w podłożu, w roślinach *A. thaliana* dochodziło między innymi do czasowego wzrostu poziomu H_2O_2 skorelowanego z akumulacją proliny będącej α -aminokwasem uczestniczącym np. w utrzymaniu prawidłowego turgoru komórek, równowagi osmotycznej oraz stabilizacji membran komórkowych [21]. Zaobserwowano również, iż ograniczenie akumulacji ROS zarówno poprzez aplikację DPI jak i podanie DMTU (dimetylotiomocznik, posiada właściwości antyoksydacyjne) istotnie ograniczyło akumulację proliny w komórkach *A. thaliana* roślin poddanych stresowi suszy fizjologicznej [10]. Podobny spadek poziomu proliny zaobserwowano w mutantach *A. thaliana* z unieczynnionymi genami *AtRBOHF* i *AtRBOHD* po narażeniu ich na działanie stresu dehydratacji z przyczyn fizjologicznych [10]. Oznacza to, że w warunkach stresu dehydratacji ROS produkowane przez AtRBOH są istotnymi czynnikami regulującymi akumulację proliny w komórkach *A. thaliana*, a tym samym przynajmniej częściowo odpowiadają za modulowanie reakcji odpornościowych roślin na ten rodzaj stresu.

PODSUMOWANIE I PRZYSZŁE PERSPEKTYWY

Wygląd i rozmiar roślin, a także wiele procesów zachodzących w cyklu życiowym tych organizmów (np.: ustępowanie spoczynku, wzrost włośników korzeniowych, wzrost łagiewki pyłkowej, itp.) jest modulowanych przez mechanizmy, w które zaangażowane są różne białka enzymatyczne, np. oksydazy NADPH. Co ciekawe, przytoczona tu grupa oksydaz wykorzystywana jest przez rośliny także do wygenerowania odpowiedzi i aklimatyzacji do zmiennych, często niesprzyjających warunków środowiska. Liczne doniesienia dowodzą, że ROS wytwarzane przez oksydazy NADPH pełnią pozytywną rolę sygnałową w roślinach narażonych na oddziaływanie stresów abiotycznych i biotycznych (ryc. 1). Cząsteczki sygnałowe wygenerowane z udziałem tych enzymów umożliwiają indukcję a następnie transdukcję sygnału do bardziej oddalonych organów. Pozwalają w ten sposób na zaaklimatyzowanie się roślin i zwiększenie tym samym ich szans na przetrwanie

niekorzystnych warunków. Poznanie nowych mechanizmów odpornościowych, jak i tych regulujących wzrost organów roślinnych angażujących oksydazy NADPH jest niezwykle intrygujące. W przyszłych badaniach warto zwrócić uwagę na możliwe interakcje szlaku sygnałowego ROS produkowanych przez NADPH oksydazy, ze ścieżkami sygnałowymi hormonów (np. ABA, SA, JA i ET) i/lub innych regulatorów wzrostu i rozwoju rośliny w modulowaniu w/w procesów.

PODZIĘKOWANIA

Wyrazy wdzięczności dla grantu *PRELUDIUM12 Narodowego Centrum Nauki* (nr 2016/23/N/NZ3/02239) (M. Stawska) oraz grantu *OPUS12 Narodowego Centrum Nauki* (nr 2016/23/B/NZ3/03147) (K. Oracz) za finansowanie prac naukowych realizowanych w ramach w/w projektów

LITERATURA

- [1] ADACHI H, NAKANO T, MIYAGAWA N, ISHIHAMA N, YOSHIOKA M, KATOU Y, YAENO T, SHIRASU K, YOSHIOKA H. WRKY Transcription Factors Phosphorylated by MAPK Regulate a Plant Immune NADPH Oxidase in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Cell* 2015; **27**: 2645-2663.
- [2] AMICUCCI E, GASCHLER K, WARD JM. NADPH Oxidase Genes from Tomato (*Lycopersicon esculentum*) and Curly Leaf Pondweed (*Potamogeton crispus*). *Plant Biol* 1999; **1**: 524-528.
- [3] ARTHIKALA MK, SÁNCHEZ LÓPEZ R, NAVA N, SANTANA O, CÁRDENAS L, QUINTO C. RbohB, a *Phaseolus vulgaris* NADPH oxidase gene, enhances symbiosome number, bacteroid size, and nitrogen fixation in nodules and impairs mycorrhizal colonization. *New Phytol* 2014; **202**: 886-900.
- [4] ASAI S, OHTA K, YOSHIOKA H. MAPK signaling regulates nitric oxide and NADPH oxidase-dependent oxidative bursts in *Nicotiana benthamiana*. *Plant Cell* 2008; **20**: 1390-1406.
- [5] ASAI S, YOSHIOKA H. The role of radical burst via MAPK signaling in plant immunity. *Plant Signal Behav* 2008; **3**: 920-922.
- [6] BAXTER A, MITTLER R, SUZUKI N. ROS as key players in plant stress signalling. *J Exp Bot* 2014; **65**: 1229-1240.
- [7] BAXTER I, TCHIEU J, SUSSMAN MR, BOUTRY M, PALMGREN MG, GRIBSKOV M, HARPER JF, AXELSEN KB. Genomic Comparison of P-Type ATPase Ion Pumps in *Arabidopsis* and Rice. *Plant Physiol* 2003; **132**: 618-628.
- [8] BAZIN J, LANGLADE N, VINCOURT P, ARRIBAT S, BALZERGUE S, EL-MAAROUF-BOUTEAU H, BAILLY C. Targeted mRNA Oxidation Regulates Sunflower Seed Dormancy Alleviation during Dry After-Ripening. *Plant Cell* 2011; **23**: 2196-2208.
- [9] BEN REJEB K, BENZARTI M, DEBEZ A, BAILLY C, SAVOURÉ A, ABDELLY C. NADPH oxidase-dependent H₂O₂ production is required for salt-induced antioxidant defense in *Arabidopsis thaliana*. *J Plant Physiol* 2015; **174**: 5-15.
- [10] BEN REJEB K, LEFEBVRE-DE VOS D, LE DISQUET I, LEPRINCE A-S, BORDENAVE M, MALDINEY R, JDEY A, ABDELLY C, SAVOURÉ A. Hydrogen peroxide produced by NADPH oxidases increases proline accumulation during salt or mannitol stress in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytol* 2015; **208**: 1138-1148.
- [11] BERROCAL-LOBO M, STONE S, YANG X, ANTICO J, CALLIS J, RAMONELL KM, SOMERVILLE S. ATL9, a RING zinc finger protein with E3 ubiquitin ligase activity implicated in chitin- and NADPH oxidase-mediated defense responses. *PLoS One* 2010; **5**: e14426.

- [12] BOISSON-DERNIER A, LITUIEV DS, NESTOROVA A, FRANCK CM, THIRUGNANARAJAH S, GROSSNIKLAUS U. ANXUR Receptor-Like Kinases Coordinate Cell Wall Integrity with Growth at the Pollen Tube Tip Via NADPH Oxidases. *PLoS Biol* 2013; **11**: e1001719.
- [13] BOSE J, RODRIGO-MORENO A, SHABALA S. ROS homeostasis in halophytes in the context of salinity stress tolerance. *J Exp Bot* 2014; **65**: 1241-1257.
- [14] CARMODY M, CRISP PA, D'ALESSANDRO S, GANGULY D, GORDON M, HAVAUX M, ALBRECHT-BORTH V, POGSON BJ. Uncoupling High Light Responses from Singlet Oxygen Retrograde Signaling and Spatial-Temporal Systemic Acquired Acclimation. *Plant Physiol* 2016; **171**: 1734-1749.
- [15] COLL NS, EPPLE P, DANGL JL. Programmed cell death in the plant immune system. *Cell Death Differ* 2011; **18**: 1247-1256.
- [16] DUAN Q, KITA D, LI C, CHEUNG AY, WU H-M. FERONIA receptor-like kinase regulates RHO GTPase signaling of root hair development. *Proc Natl Acad Sci* 2010; **107**: 17821-17826.
- [17] DUBIELLA U, SEYBOLD H, DURIAN G, KOMANDER E, LASSIG R, WITTE C-P, SCHULZE WX, ROMEIS T. Calcium-dependent protein kinase/NADPH oxidase activation circuit is required for rapid defense signal propagation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013; **110**: 8744-8749.
- [18] FAGARD M, DELLAGI A, ROUX C, PÉRINO C, RIGAUT M, BOUCHER V, SHEVCHIK VE, EXPERT D. *Arabidopsis thaliana* expresses multiple lines of defense to counterattack *Erwinia chrysanthemi*. *Mol Plant-Microbe Interact* 2007; **20**: 794-805.
- [19] FALHOF J, PEDERSEN JT, FUGLSANG AT, PALMGREN M. Plasma Membrane H⁺-ATPase Regulation in the Center of Plant Physiology. *Mol Plant* 2016; **9**: 323-337.
- [20] GROOM L. A., SNEDDON A. A., ALESSI D. R., DOWD S., KEYSE S. M. Differential regulation of the MAP, SAP and RK/p38 kinases by Pyst1, a novel cytosolic dual-specificity phosphatase. *EMBO J* 1996; **15**: 3621-3632.
- [21] HAYAT S, HAYAT Q, ALYEMENI MN, WANI AS, PICHTEL J, AHMAD A. Role of proline under changing environments. *Plant Signal Behav* 2012; **7**: 1456-1466.
- [22] ISHIBASHI Y, KASA S, SAKAMOTO M, AOKI N, KAI K, YUASA T, HANADA A, YAMAGUCHI S, IWAYA-INOUE M. A Role for Reactive Oxygen Species Produced by NADPH Oxidases in the Embryo and Aleurone Cells in Barley Seed Germination. *PLoS One* 2015; **10**: e0143173.
- [23] JIANG C, BELFIELD EJ, MITHANI A, VISSCHER A, RAGOUSSIS J, MOTT R, SMITH JAC, HARBERD NP. ROS-mediated vascular homeostatic control of root-to-shoot soil Na delivery in *Arabidopsis*. *EMBO J* 2012; **31**: 4359-4370.
- [24] JONES JDG, DANGL JL. The plant immune system. *Nature* 2006; **444**: 323-329.
- [25] KADOTA Y, SHIRASU K, ZIFFEL C. Regulation of the NADPH Oxidase RBOHD During Plant Immunity. *Plant Cell Physiol* 2015; **56**: 1472-1480.
- [26] KADOTA Y, SKLENAR J, DERBYSHIRE P, STRANSFELD L, ASAI S, NTOUKAKIS V, JONES JDG, SHIRASU K, MENKE F, JONES A, ZIFFEL C. Direct regulation of the NADPH oxidase RBOHD by the PRR-associated kinase BIK1 during plant immunity. *Mol Cell* 2014; **54**: 43-55.
- [27] KAUR G, PATI PK. Analysis of cis-acting regulatory elements of Respiratory burst oxidase homolog (Rboh) gene families in *Arabidopsis* and rice provides clues for their diverse functions. *Comput Biol Chem* 2016; **62**: 104-118.
- [28] KAWARAZAKI T, KIMURA S, IZUKA A, HANAMATA S, NIBORI H, MICHIKAWA M, IMAI A, ABE M, KAYA H, KUCHITSU K. A low temperature-inducible protein AtSRC2 enhances the ROS-producing activity of NADPH oxidase AtRbohF. *Biochim Biophys Acta* 2013; **1833**: 2775-2780.
- [29] KAYA H, NAKAJIMA R, IWANO M, KANAOKA MM, KIMURA S, TAKEDA S, KAWARAZAKI T, SENZAKI E, HAMAMURA Y, HIGASHIYAMA T, TAKAYAMA S, ABE M, KUCHITSU K. Ca²⁺-Activated Reactive Oxygen Species Production by *Arabidopsis* RbohH and RbohJ Is Essential for Proper Pollen Tube Tip Growth. *Plant Cell* 2014; **26**: 1069-1080.
- [30] KNIGHT MR. New ideas on root hair growth appear from the flanks. *Proc Natl Acad Sci* 2007; **104**: 20649-20650.
- [31] KOBAYASHI M, OHURA I, KAWAKITA K, YOKOTA N, FUJIWARA M, SHIMAMOTO K, DOKE N, YOSHIOKA H. Calcium-dependent protein kinases regulate the production of reactive oxygen species by potato NADPH oxidase. *Plant Cell* 2007; **19**: 1065-1080.

- [32] KURUSU T, KUCHITSU K, TADA Y. Plant signaling networks involving Ca²⁺ and Rboh/Nox-mediated ROS production under salinity stress. *Front Plant Sci* 2015; **6**: 427.
- [33] LARKINDALE J, HALL JD, KNIGHT MR, VIERLING E. Heat stress phenotypes of *Arabidopsis* mutants implicate multiple signaling pathways in the acquisition of thermotolerance. *Plant Physiol* 2005; **138**: 882-897.
- [34] LEYMARIE J, VITKAUSKAITĖ G, HOANG HH, GENDREAU E, CHAZOULE V, MEIMOUN P, CORBINEAU F, EL-MAAROUF-BOUATEAU H, BAILLY C. Role of Reactive Oxygen Species in the Regulation of *Arabidopsis* Seed Dormancy. *Plant Cell Physiol* 2012; **53**: 96-106.
- [35] LI H, LIU S-S, YI C-Y, WANG F, ZHOU J, XIA X-J, SHI K, ZHOU Y-H, YU J-Q. Hydrogen peroxide mediates abscisic acid-induced HSP70 accumulation and heat tolerance in grafted cucumber plants. *Plant Cell Environ* 2014; **37**: 2768-2780.
- [36] LIU Y, HE C. Regulation of plant reactive oxygen species (ROS) in stress responses: learning from AtRBOHD. *Plant Cell Rep* 2016; **35**: 995-1007.
- [37] MACHO AP, BOUTROT F, RATHJEN JP, ZIPFEL C. Aspartate oxidase plays an important role in Arabidopsis stomatal immunity. *Plant Physiol* 2012; **159**: 1845-1856.
- [38] MA L, ZHANG H, SUN L, JIAO Y, ZHANG G, MIAO C, HAO F. NADPH oxidase AtrbohD and AtrbohF function in ROS-dependent regulation of Na⁺/K⁺ homeostasis in *Arabidopsis* under salt stress. *J Exp Bot* 2012; **63**: 305-317.
- [39] MARINO D, ANDRIO E, DANCHIN EGJ, OGER E, GUCCIARDO S, LAMBERT A, PUPPO A, PAULY N. A *Medicago truncatula* NADPH oxidase is involved in symbiotic nodule functioning. *New Phytol* 2010; **189**: 580-592.
- [40] MARINO D, DUNAND C, PUPPO A, PAULY N. A burst of plant NADPH oxidases. *Trends Plant Sci* 2012; **17**: 9-15.
- [41] MARUTA T, INOUE T, TAMOI M, YABUTA Y, YOSHIMURA K, ISHIKAWA T, SHIGEOKA S. *Arabidopsis* NADPH oxidases, AtrbohD and AtrbohF, are essential for jasmonic acid-induced expression of genes regulated by MYC2 transcription factor. *Plant Sci* 2011; **180**: 655-660.
- [42] MERSMANN S, BOURDAIS G, RIETZ S, ROBATZEK S. Ethylene signaling regulates accumulation of the FLS2 receptor and is required for the oxidative burst contributing to plant immunity. *Plant Physiol* 2010; **154**: 391-400.
- [43] MITTLER R, BLUMWALD E. The roles of ROS and ABA in systemic acquired acclimation. *Plant Cell* 2015; **27**: 64-70.
- [44] MITTLER R, VANDERAUWERA S, SUZUKI N, MILLER G, TOGNETTI VB, VANDEPOELE K, GOLLERY M, SHULAEV V, BREUSEGEM FV. ROS signaling: the new wave? *Trends Plant Sci* 2011; **16**: 300-309.
- [45] MONSHAUSEN GB, BIBIKOVA TN, MESSERLI MA, SHI C, GILROY S. Oscillations in extracellular pH and reactive oxygen species modulate tip growth of *Arabidopsis* root hairs. *Proc Natl Acad Sci* 2007; **104**: 20996-21001.
- [46] MORALES J, KADOTA Y, ZIPFEL C, MOLINA A, TORRES M-A. The *Arabidopsis* NADPH oxidases RbohD and RbohF display differential expression patterns and contributions during plant immunity. *J Exp Bot* 2016; **67**: 1663-1676.
- [47] MÜLLER K, CARSTENS AC, LINKIES A, TORRES MA, LEUBNER-METZGER G. The NADPH-oxidase AtrbohB plays a role in *Arabidopsis* seed after-ripening. *New Phytol* 2009; **184**: 885-897.
- [48] NESTLER J, LIU S, WEN T-J, PASCHOLD A, MARCON C, TANG HM, LI D, LI L, MEELEY RB, SAKAI H, BRUCE W, SCHNABLE PS, HOCHHOLDINGER F. Roothairless5, which functions in maize (*Zea mays* L.) root hair initiation and elongation encodes a monocot-specific NADPH oxidase. *Plant J* 2014; **79**: 729-740.
- [49] OGASAWARA Y, KAYA H, HIRAOKA G, YUMOTO F, KIMURA S, KADOTA Y, HISHINUMA H, SENZAKI E, YAMAGOE S, NAGATA K, NARA M, SUZUKI K, TANOKURA M, KUCHITSU K. Synergistic Activation of the *Arabidopsis* NADPH Oxidase AtrbohD by Ca²⁺ and Phosphorylation. *J Biol Chem* 2008; **283**: 8885-8892.
- [50] ORACZ K. Rodnik hydroksylowy – mała cząsteczka o dużym znaczeniu w biologii komórki roślinnej. *Postepy Biol Komorki* 2015; **42**: 707-726.

- [51] ORACZ K, EL-MAAROUF BOUTEAU H, FARRANT JM, COOPER K, BELGHAZI M, JOB C, JOB D, CORBINEAU F, BAILLY C. ROS production and protein oxidation as a novel mechanism for seed dormancy alleviation. *Plant J Cell Mol Biol* 2007; **50**: 452-465.
- [52] ORACZ K, EL-MAAROUF-BOUTEAU H, KRANNER I, BOGATEK R, CORBINEAU F, BAILLY C. The Mechanisms Involved in Seed Dormancy Alleviation by Hydrogen Cyanide Unravel the Role of Reactive Oxygen Species as Key Factors of Cellular Signaling during Germination. *Plant Physiol* 2009; **150**: 494-505.
- [53] ORACZ K, KARPIŃSKI S. Phytohormones Signaling Pathways and ROS Involvement in Seed Germination. *Front Plant Sci* 2016; **7**: 864.
- [54] ORACZ K, STAWSKA M. Cellular Recycling of Proteins in Seed Dormancy Alleviation and Germination. *Front Plant Sci* 2016; **7**: 1128.
- [55] Oracz K, Voegelé A, Tarkowská D, Jacquemoud D, Turečková V, Urbanová T, Strnad M, Śliwinska E, Leubner-Metzger G. Myrigalone A inhibits *Lepidium sativum* seed germination by interference with gibberellin metabolism and apoplastic superoxide production required for embryo extension growth and endosperm rupture. *Plant Cell Physiol* 2012; **53**: 81-95.
- [56] POGÁNY M, VON RAD U, GRÜN S, DONGO A, PINTYE A, SIMONEAU P, BAHNWEIG G, KISS L, BARNA B, DURNER J. Dual roles of reactive oxygen species and NADPH oxidase RBOHD in an Arabidopsis-Alternaria pathosystem. *Plant Physiol* 2009; **151**: 1459-1475.
- [57] POTOCKÝ M, JONES MA, BEZVODA R, SMIRNOFF N, ŽÁRSKÝ V. Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase are involved in pollen tube growth. *New Phytol* 2007; **174**: 742-751.
- [58] PUCCIARIELLO C, BANTI V, PERATA P. ROS signaling as common element in low oxygen and heat stresses. *Plant Physiol Biochem PPB* 2012; **59**: 3-10.
- [59] RENTEL MC, LECOURIEUX D, OUAKEF F, USHER SL, PETERSEN L, OKAMOTO H, KNIGHT H, PECK SC, GRIERSON CS, HIRT H, KNIGHT MR. OXI1 kinase is necessary for oxidative burst-mediated signalling in *Arabidopsis*. *Nature* 2004; **427**: 858-861.
- [60] SAGI M, FLUHR R. Superoxide production by plant homologues of the gp91(phox) NADPH oxidase. Modulation of activity by calcium and by tobacco mosaic virus infection. *Plant Physiol* 2001; **126**: 1281-1290.
- [61] SARATH G, HOU G, BAIRD LM, MITCHELL RB. Reactive oxygen species, ABA and nitric oxide interactions on the germination of warm-season C₄-grasses. *Planta* 2007; **226**: 697-708.
- [62] SIRICHANDRA C, GU D, HU H-C, DAVANTURE M, LEE S, DJAOUI M, VALOT B, ZIVY M, LEUNG J, MERLOT S, KWAK JM. Phosphorylation of the *Arabidopsis* AtrbohF NADPH oxidase by OST1 protein kinase. *FEBS Lett* 2009; **583**: 2982-2986.
- [63] STAWSKA M, ORACZ K. Sieć powiązań szlaków fitochromowych, kryptochromowych oraz indukowanych przez regulatory wzrostu i rozwoju w biologii nasion. *Postepy Biol Komorki* 2015; **42**: 687-706.
- [64] SUN Y, LI L, MACHO AP, HAN Z, HU Z, ZIPFEL C, ZHOU J-M, CHAI J. Structural basis for flg22-induced activation of the Arabidopsis FLS2-BAK1 immune complex. *Science* 2013; **342**: 624-628.
- [65] SWANSON S, GILROY S. ROS in plant development. *Physiol Plant* 2010; **138**: 384-392.
- [66] TAVAKKOLI E, RENGASAMY P, MCDONALD GK. The response of barley to salinity stress differs between hydroponic and soil systems. *Funct Plant Biol* 2010; **37**: 621-633.
- [67] TENA G, BOUDSOCQ M, SHEEN J. Protein kinase signaling networks in plant innate immunity. *Curr Opin Plant Biol* 2011; **14**: 519-529.
- [68] TSUDA K, KATAGIRI F. Comparing signaling mechanisms engaged in pattern-triggered and effector-triggered immunity. *Curr Opin Plant Biol* 2010; **13**: 459-465.
- [69] VOEGELE A, GRAEBER K, ORACZ K, TARKOWSKÁ D, JACQUEMOUD D, TUREČKOVÁ V, URBANOVÁ T, STRNAD M, ŚLIWINSKA E, LEUBNER-METZGER G. Embryo growth, testa permeability, and endosperm weakening are major targets for the environmentally regulated inhibition of *Lepidium sativum* seed germination by myrigalone A. *J Exp Bot* 2012; **63**: 5337-5350.
- [70] WILLEMS P, MHAMDI A, STAEL S, STORME V, KERCHEV P, NOCTOR G, GEVAERT K, BREUSEGEM FV. The ROS Wheel: refining ROS transcriptional footprints in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* January 2016; **171**: 1720-1733.

- [71] WONG HL, PINONTOAN R, HAYASHI K, TABATA R, YAENO T, HASEGAWA K, KOJIMA C, YOSHIOKA H, IBA K, KAWASAKI T, SHIMAMOTO K. Regulation of Rice NADPH Oxidase by Binding of Rac GTPase to Its N-Terminal Extension. *Plant Cell* 2007; **19**: 4022-4034.
- [72] WU Y-S, YANG C-Y. Physiological Responses and Expression Profile of NADPH Oxidase in Rice (*Oryza Sativa*) Seedlings under Different Levels of Submergence. *Rice N Y N* 2016; **9**: 2.
- [73] YANG C-Y, HONG C-P. The NADPH oxidase Rboh D is involved in primary hypoxia signalling and modulates expression of hypoxia-inducible genes under hypoxic stress. *Environ Exp Bot* 2015; **115**: 63-72.
- [74] YOSHIOKA H, NUMATA N, NAKAJIMA K, KATOU S, KAWAKITA K, ROWLAND O, JONES JDG, DOKE N. *Nicotiana benthamiana* gp91phox Homologs NbrbohA and NbrbohB Participate in H₂O₂ Accumulation and Resistance to *Phytophthora infestans*. *Plant Cell* 2003; **15**: 706-718.
- [75] YUN B-W, FEECHAN A, YIN M, SAIDI NBB, LE BIHAN T, MANDA Y, MOORE JW, KANG J-G, KWON E, SPOEL SH, PALLAS JA, LOAKE GJ. S-nitrosylation of NADPH oxidase regulates cell death in plant immunity. *Nature* 2011; **478**: 264-268.
- [76] ZDZIESZYŃSKA J, STAWSKA M, ORACZ K. Rola białek modyfikujących strukturę ściany komórkowej w regulacji kiełkowania nasion. *Postepy Biol Komorki* 2016; **43**: 503-524.
- [77] ZHANG S, APEL K, KIM C. Singlet oxygen-mediated and EXECUTER-dependent signalling and acclimation of *Arabidopsis thaliana* exposed to light stress. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2014; **369**: 20130227.

Redaktor prowadzący – Maciej Zabel

Otrzymano: 28.03.2018

Przyjęto: 05.04.2018

Dr Krystyna Oracz

Katedra Fizjologii Roślin

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

ul. Nowoursynowska 159, 02-776, Warszawa, Polska

email: krystyna_oracz@sggw.pl

tel.: +48 22 593 25 35

fax: +48 22 593 25 21