

REAKTYWNE FORMY TLENU W ODPOWIEDZI OBRONNEJ ROŚLIN NA GRZYBY NEKROTROFICZNE*

REACTIVE OXYGEN SPECIES IN PLANT DEFENCE RESPONSE TO NECROTROPHIC FUNGI

Szymon DĄBROWSKI, Sylwester GŁOWACKI, Violetta K. MACIOSZEK,
Andrzej K. KONONOWICZ

Katedra Genetyki Ogólnej, Biologii Molekularnej i Biotechnologii Roślin,
Uniwersytet Łódzki, Łódź

Streszczenie: Częsteczka tlenu w stanie podstawowym jest stosunkowo mało reaktywna. Jednak może być źródłem reaktywnych pochodnych nazywanych reaktywnymi formami tlenu (RFT), produkowanych zarówno w wyniku aktywności metabolicznej komórki, jak i po ekspozycji roślin na różne czynniki stresowe. W stopniowej, jednoelektronowej redukcji tlenu dochodzi do wytworzenia częściowo zredukowanych produktów pośrednich, którymi są w kolejności: anionorodnik ponadtlenkowy (O_2^-), nadttlenek wodoru (H_2O_2) oraz rodnik hydroksylowy (OH). Wzbudzenie cząsteczki tlenu, występującej w stanie trypletowym, prowadzi do powstania tlenu singletowego (1O_2), który może wchodzić w reakcje z alkanami, sulfidami i fenolami. Wolne rodniki – anionorodnik ponadtlenkowy i rodnik hydroksylowy, biorą udział w wielu reakcjach – mogą tworzyć wiązania kowalencyjne w reakcji z innymi wolnymi rodnikami lub zapoczątkować łańcuchową reakcję wolnorodnikową z cząsteczkami nierodnikowymi. W konsekwencji może dojść do poważnych uszkodzeń związków wielkocząsteczkowych komórki – białek, lipidów oraz kwasów nukleinowych. Najczęściej badaną reaktywną formą tlenu podczas infekcji roślin przez patogeny jest nadttlenek wodoru, który jest bardziej stabilny niż inne RFT. Produkcja reaktywnych form tlenu w komórce gospodarza, która zachodzi podczas infekcji grzybami nekrotroficznymi, jest w znacznej mierze wynikiem modyfikacji i/lub zaburzenia mechanizmów utrzymujących homeostazę w warunkach fizjologicznych. Do tych mechanizmów zalicza się różnorodne systemy produkcji RFT w ścianie komórkowej, błonie cytoplazmatycznej oraz w poszczególnych organellach, a także systemy antyoksydacyjne usuwające nadmiar RFT powstających w warunkach fizjologicznych lub jako produkty uboczne innych procesów, np. produkty uboczne metabolizmu mitochondriów, chloroplastów i peroksysomów. RFT mogą modulować procesy odpornościowe w odpowiedzi na infekcję grzybami nekrotroficznymi, mogą wpływać na indukcję śmierci komórki, zmiany profilu ekspresji genów, indukcję biosyntezy fitoaleksyn i rearanżację struktury ściany komórkowej. W artykule przedstawiono mechanizmy powstawania reaktywnych form tlenu oraz regulacji ich aktywności, a także szlaki sygnałowe, w których uczestniczą podczas oddziaływań roślin z grzybami nekrotroficznymi.

*Praca finansowana z grantów MNiSzW nr N N302 3188 33 oraz UŁ nr 505/0397 i 506/0996. Udział SD i SG w przygotowaniu niniejszej pracy był jednakowy.

Słowa kluczowe: grzyby nekrotroficzne, reakcja obronna roślin, reaktywne formy tlenu, wybuch tlenowy.

Summary: An oxygen molecule in its basic form is relatively nonreactive. However, it can be a source of reactive derivatives generally called reactive oxygen species (ROS) which are produced both because of physiological metabolic activity of the cell and after exposing a plant to various stress factors. In a gradual, single-electron reduction of oxygen, partly reduced indirect products are generated. They comprise superoxide anion radical (O_2^-), hydrogen peroxide (H_2O_2) and hydroxyl radical (OH). An induced oxygen molecule that occurs in triplet state results in the production of singlet oxygen (1O_2) which can react with alkanes, sulphides and phenols. Free radicals – superoxide anion radical and hydroxyl radical – participate in a range of reactions: they can create covalence bonds in reactions with another free radical, or start a free radical chain reaction with nonradical molecules. Consequently, a serious impairment of macromolecular compounds of cells such as proteins, lipids and nucleic acids can occur. One of the very often investigated ROS is hydrogen peroxide, mainly because it is more stable than other ROS. The process of generating reactive oxygen forms in the host cell, which occurs during the infection of plant with necrotrophic fungi, is basically the result of the modification and/or disorders of the mechanisms sustaining homeostasis in the physiological conditions. These mechanisms include various ROS generation systems in the cell wall, plasmalemma and particularly in organelles, as well as the antioxidative systems removing ROS surplus generated in the physiological conditions or as the side products of other processes, e.g. side products of the metabolism of mitochondria, chloroplasts and peroxisomes. RFT can modulate plant defence response during infection with necrotrophic fungi, the induction of changes in gene expression profile, triggering of phytoalexins synthesis or rearrangement of cell wall structure. The present article contains a review of problems connected with the origin of reactive oxygen species, especially the mechanisms of regulation of their activity and signalling pathways they participate during interactions of plants with necrotrophic fungi.

Key words: necrotrophic fungi, oxidative burst, plant defense response, reactive oxygen species.

WSTĘP

W odpowiedzi roślin na atak grzybów nekrotroficznych, podobnie jak na czynniki stresu abiotycznego, istotną rolę odgrywają reaktywne formy tlenu – RFT (ang. *Reactive Oxygen Species*), takie jak: nadtlenek wodoru, anionorodnik ponadtlenkowy lub tlen singletowy. Procesy, które zachodzą podczas interakcji gospodarz-nekrotrof, obejmują m.in. produkcję RFT zarówno w tkankach gospodarza, jak i w komórkach grzyba. Za odporność roślin na atak patogenów biotroficznych w znacznej mierze odpowiadają mechanizmy opisywane w modelu gen-na-gen (ang. *gene-for-gene*), który zakłada, że rozpoznanie czynników awirulencji patogena zachodzi poprzez specyficzne dla niego białka R gospodarza. Dotychczas nie wykryto takich mechanizmów w oddziaływaniach roślin z patogenami nekrotroficznymi [27, 32]. Obecnie proponuje się modele mechanizmu odporności roślin na nekrotrofy w interakcjach typu *non-host* (roślina nie jest gospodarzem w stosunku do patogena), które ze względu na odpowiedź gospodarza można podzielić na dwa typy: typ I – bez widocznych objawów makroskopowych oraz typ II, w którym występują ograniczone nekrozy, przypominające odpowiedź nadwrażliwości – HR (ang. *Hypersensitive Response*) w odporności typu gen-na-gen [38].

W badaniach nad infekcją roślin przez patogeny największe zainteresowanie wśród reaktywnych form tlenu budzi nadtlenek wodoru. Jest on bardziej stabilny niż inne RFT, łatwo dyfunduje przez błony komórkowe, a ponadto wykazano, że przenika przez akwaporyny błony komórkowej [17]. Nadtlenek wodoru może być

wykorzystywany przez peroksydazy, jako utleniacz różnych substratów, w tym związków fenolowych, prekursorów ligniny, auksyn i metabolitów wtórnych [40].

REAKTYWNE FORMY TLENU W KOMÓRKACH GOSPODARZA

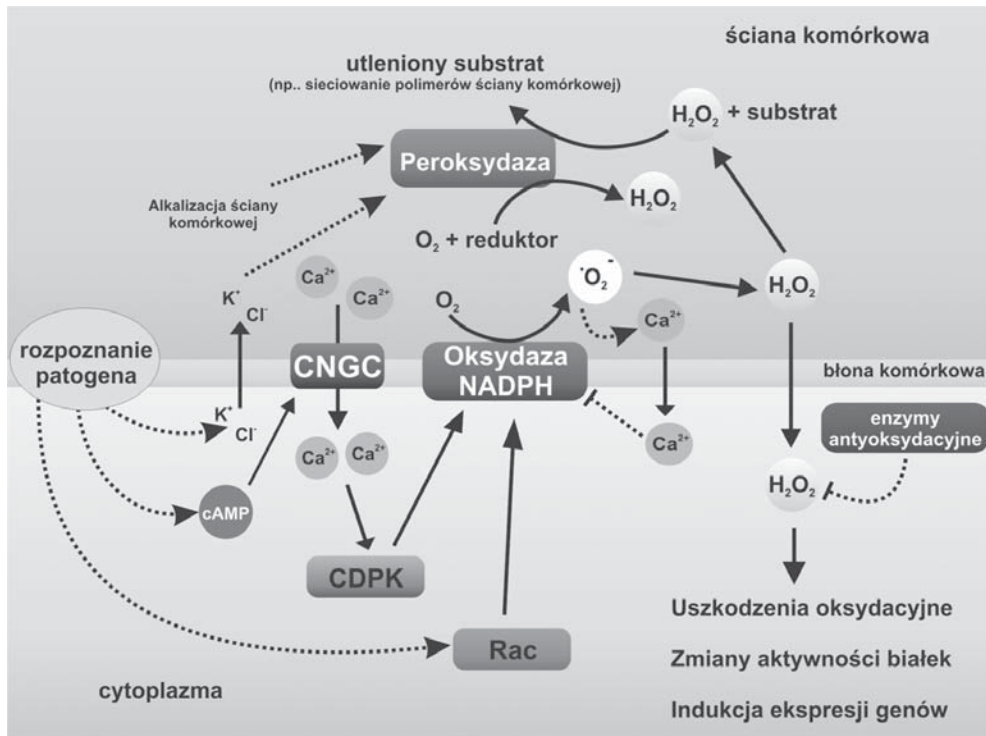
Podczas infekcji roślin przez grzyby nekrotroficzne powstawanie reaktywnych form tlenu jest indukowane zarówno bezpośrednio przez dostarczane do komórki gospodarza toksyny patogena, jak i pośrednio – w wyniku aktywacji specyficznych szlaków sygnałowych gospodarza, obejmujących między innymi napływ jonów wapnia oraz aktywację białek G i Rac. Pozostaje nierozstrzygnięte, czy w indukcji odpowiedzi na atak nekrotrofów biorą udział receptory – wskazuje się m.in. na możliwość zaangażowania w tym procesie białek zawierających domenę TIR (ang. *Toll/IL-1R domain*) [56]. Zidentyfikowano liczne, niespecyficzne toksyny produkowane przez grzyby, które wykazują aktywność fotouczulaczy indukujących produkcję reaktywnych form tlenu w wyniku wzbudzenia światłem. Należą one do grupy perylenochinonów rozpuszczalnych w tłuszczach, np. cercosporyna, elzynochrom czy alterotoksyna I [14, 31]. Związki te podczas wzbudzenia przez światło ulegają przekształceniu we wzbudzoną formę singletową, przechodzącą następnie w bardziej stabilną formę trypletową. Forma trypletowa może ulegać jednej z dwóch typów reakcji: w reakcji typu I forma trypletowa zostaje zredukowana do rodnika przez dodatkowy reduktor, a powstający rodnik redukuje tlen, dając anionorodnik ponadtlenny, zaś w reakcji typu II forma trypletowa przekazuje energię wzbudzenia bezpośrednio na tlen, dając tlen singletowy. Utworzone RFT dokonują peroksydacji lipidów błony komórkowej, prowadząc do jej uszkodzenia i w konsekwencji do śmierci komórki. Są one także głównymi czynnikami odpowiedzialnymi za toksyczność perylenochinonów [13].

Oprócz indukcji reaktywnych form tlenu przez toksyny grzybowe, w wielu przypadkach obserwowano gwałtowny wzrost ich stężenia w ścianie komórkowej, mitochondriach i/lub plastydach komórek gospodarza zwany wybuchem tlenowym (ang. *Oxidative Burst*). Obserwowano zarówno wybuch jednofazowy, jak i dwufazowy, np. u fasoli podczas infekcji przez *Botrytis cinerea* [61]. W niektórych przypadkach wybuch tlenowy zdaje się wpływać negatywnie na rozwój grzybów patogennych, np. *Sclerotinia sclerotiorum* może produkować kwas szczawiowy, który funkcjonuje jako supresor reaktywnych form tlenu [64]. Wybuch tlenowy jest przeważnie elementem procesów prowadzących do śmierci komórek gospodarza i sprzyja wzrostowi patogena, ale należy zaznaczyć, że istnieją również dowody wskazujące na brak znaczenia wybuchu tlenowego dla podatności roślin na infekcję przez patogeny nekrotroficzne [20, 23].

Enzymy zaangażowane w generowanie wybuchu tlenowego to przede wszystkim oksydazy NADPH [59, 60], które są zlokalizowane transbłonowo w plazmolemie i katalizują reakcję redukcji tlenu cząsteczkowego z wykorzystaniem NADPH jako

źródła elektronów. Stanowią one zróżnicowaną grupę białek, których homologi odkryto u roślin, zwierząt i grzybów, a także u niektórych *Protista* [6]. Wszystkie oksydazy NADPH wykazują podobieństwo strukturalne – mają zwykle sześć domen transbłonowych (w zwierzęcych oksydazach typu DUOX występuje dodatkowa domena transbłonowa) z dwoma miejscami wiążącymi hem oraz cytoplazmatyczne miejsce wiążące NADPH [6, 28, 52, 57]. Roślinne oksydazy NADPH zawierają motyw dłoni EF – domenę o strukturze *helisa-pętla-helisa*, która powoduje zmiany konformacyjne białek pod wpływem jonów Ca^{2+} i umożliwia regulację aktywności enzymu poprzez zmiany stężenia jonów wapnia. Oksydazy NADPH pełnią zróżnicowane funkcje nie tylko w odpowiedzi roślin na infekcję, ale także w regulacji różnicowania ksylemu lub aktywności aparatów szparkowych [4, 30, 49]. Wybuch tlenowy jest zwykle poprzedzony napływem do komórki jonów wapnia, które są jednym z głównych przekazników sygnału w różnych procesach zachodzących w komórkach (ryc. 1). W warunkach *in vitro* wykazano, że aktywność oksydaz NADPH może być bezpośrednio stymulowana przez stosunkowo duże stężenie jonów Ca^{2+} , w zakresie $50\ \mu\text{M}$ – $10\ \text{mM}$ [51], co wyklucza możliwość udziału tego mechanizmu *in vivo*. Jednak, wykazano, że zwiększenie poziomu jonów Ca^{2+} w cytozolu jest rzeczywiście wymagane do produkcji RFT przez rośliny [9]. Ponadto wykazano, że indukcja aktywności enzymatycznej oksydaz NADPH u *Arabidopsis thaliana* jest wynikiem fosforylacji dwóch reszt serynowych na ich N-końcach [29, 39] w wyniku działania kinazy białkowej zależnej od wapnia – CDPK (ang. *Calcium-Dependent Protein Kinase*) [29]. Fosforylacja powoduje zmiany konformacyjne w domenie N-końcowej, co umożliwia wiązanie GTPazy Rac i indukcję aktywności enzymatycznej. Produkowany w wyniku aktywności oksydazy nadtlenek wodoru powoduje dodatkowy napływ jonów Ca^{2+} , które pełnią funkcję inhibitora wiązania GTPazy z białkiem Rac [65]. Natomiast w przypadku produkcji reaktywnych form tlenu w wyniku aktywności peroksydaz ściany komórkowej stwierdzono, że oprócz napływu jonów wapnia do wnętrza komórki, istotne znaczenie ma wypływ jonów K^+ do apoplastu [15]. Napływ jonów wapnia z apoplastu do cytozolu jest zależny od aktywności transbłonowych kanałów bramkowanych cyklicznymi nukleotydami – CNGCs (ang. *Cyclic Nucleotide Gated Channels*), które mają domenę wiążącą kalmodulinę. Zaproponowano model produkcji RFT, w którym percepcja elicytora patogena powoduje otworenie kanałów wapniowych zbudowanych z CNGC2, wywołując napływ jonów Ca^{2+} do komórki. To z kolei wywołuje aktywację kalmoduliny lub białka podobnego do kalmoduliny i w tym samym czasie zamykanie kanałów. Jednocześnie, kalmodulina aktywuje syntazę tlenku azotu, powodując produkcję tlenku azotu, co prowadzi do odpowiedzi nadwrażliwości zależnej od tlenku azotu oraz nadtlenku wodoru [1]. Model ten został potwierdzony u mutantu *A. thaliana cpr22*, charakteryzującego się ekspresją chimerowego białka AtCNGC11/12, u którego wykazano konstytutywną aktywację programowanej śmierci komórki w sposób zależny od stężenia jonów Ca^{2+} [62].

Innym źródłem RFT w wybuchu tlenowym podczas odpowiedzi *A. thaliana* na elicytor *Fusarium oxysporum* mogą być enzymy ściany komórkowej: peroksydazy, oksydazy szczawianowe i oksydazy aminowe [8]. Nadtlenek wodoru produkowany przez te enzymy bierze udział zarówno we wzmacnianiu ściany komórkowej i tworzeniu papilli, jak również funkcjonuje jako cząsteczka sygnałowa. Oksydazy szczawianowe są



RYCINA 1. Indukcja wybuchu tlenowego w ścianie komórkowej gospodarza. W wyniku rozpoznania patogena w komórce roślinnej dochodzi m.in. do produkcji cAMP, aktywacji białek Rac i przepływu jonów przez błonę komórkową. Napływ jonów wapnia z apoplastu do cytoplazmy jest zależny przede wszystkim od aktywności transbłonowych kanałów bramkowanych cyklicznymi nukleotydami (CNGC). Ponadto, obserwuje się wypływ jonów potasu i chloru, co powoduje podwyższenie pH ściany komórkowej. Peroksydazy ściany komórkowej są odpowiedzialne za utlenianie szeregu substratów z wykorzystaniem nadtlenku wodoru jako utleniacza. Jednak w obecności odpowiednich reduktorów peroksydazy mogą produkować nadtlenek wodoru. Proces ten jest zależny od napływu jonów potasu i/lub alkalinizacji apoplastu. Aktywacja oksydaz NADPH zależy od jonów wapnia, CDPKs i białek Rac również prowadzi do powstania reaktywnych form tlenu. Reaktywne formy tlenu wpływają na stan fizjologiczny komórki, aktywność białek oraz ekspresję genów poprzez wywołanie uszkodzeń oksydacyjnych wielkocząsteczkowych składników komórki. Skróty: cAMP – cykliczny adenosinomonofosforan; CNGC – kanał jonowy bramkowany cyklicznymi nukleotydami; CDPK – kinaza białkowa zależna od wapnia; Rac – białko z rodziny GTPaz

FIGURE 1. Induction of oxidative burst in the host cell wall: In plant cell production of cAMP, Rac protein activation and ion fluxes through the plasma membrane occur as the consequence of pathogen recognition. Calcium influx from the apoplast to the cytosol is in the great measure dependent on activity of transmembrane cyclic nucleotide-gated channels (CNGCs). Moreover, there can be observed potassium and chlorine ions influx, which triggers alkalization of the cell wall. Peroxidases of the cell wall are responsible for the oxidation of a large number of substrates using hydrogen peroxide as an oxidant. However, in the presence of appropriate reductors, peroxidases can produce hydrogen peroxide, which depends on potassium influx and/or alkalization of the apoplast. Activation of NADPH oxidases depends on calcium ions, CDPKs and Rac proteins. Reactive oxygen species affect the physiological state of the cell, proteins and gene expression through the oxidative damage of high molecular weight compounds of the cell. Abbreviations: cAMP – cyclic adenosine monophosphate; CNGC – cyclic nucleotide-gated channels; CDPK – calcium-dependent protein kinase; Rac – protein of GTPases family

glikoproteinami, które tworzą złożone, wielopodjednostkowe kompleksy, katalizujące utlenianie szczawianów do dwutlenku węgla, z jednoczesnym wytworzeniem nadtlenu wodoru. Aktywność tych enzymów stwierdzono u wielu roślin, w tym u jęczmienia, buraka cukrowego, sorgo, kukurydzy, owsa, żyta i ryżu [58]. Miedziowe oksydazy aminowe katalizują utlenianie amin do aldehydów z wydzielaniem amoniaku i nadtlenu wodoru. Oksydazy te zlokalizowane są w dużych ilościach w ścianach komórkowych roślin dwuliściennych, przede wszystkim u *Leguminosae*, lecz ich obecność stwierdzono m.in. także u *A. thaliana*. Natomiast u roślin jednoliściennych powszechne są oksydazy poliaminowe [12]. Peroksydazy hemowe klasy III zlokalizowane są w macierzy ściany komórkowej, a także wakuolach. Enzymy te występują powszechnie u roślin w wielu izoformach i w cyklu peroksydacji katalizują utlenianie dużej liczby substratów, m.in. związków fenolowych, prekursorów ligniny, auksyn i metabolitów wtórnych z wykorzystaniem nadtlenu wodoru, jak również mogą produkować RFT w alternatywnym cyklu, w którym pośredniczą także dodatkowe związki w postaci odrębnych reduktorów, np. związków tiolowych R-SH i ich rodników [2]. Funkcja fizjologiczna peroksydaz hemowych jest związana przede wszystkim z sieciowaniem i rearanżacją struktury polimerów ściany komórkowej, w tym ligniny i suberyny, co jest istotne we wzroście wydłużeniowym korzeni, kiełkowaniu nasion, a także w tworzeniu papilli [7, 48]. Z kolei na przykładzie peroksydazy klasy III wyizolowanej z tataraku, wykazano, że enzymy te mogą ograniczać wzrost i powodować poważne zaburzenia w morfologii strzępek patogennych grzybów *Macrophomina phaseolina*, *Trichosporium vesiculosum* i *Fusarium moniliforme* [22].

PERCEPCJA REAKTYWNYCH FORM TLENU

Mechanizm działania reaktywnych form tlenu jako cząsteczek sygnałowych w szlakach przekazywania sygnałów związanych z interakcjami roślin z grzybami nekrotroficznymi jest w znacznej mierze niewyjaśniony. Podstawą przekazywania sygnału może być zmiana aktywności białek docelowych poprzez utlenienie reszt tiolowych cysteiny lub utlenianie reszt innych aminokwasów – tyrozyny, tryptofanu lub histydyny [18]. Jeśli w reakcji biorą udział dwie reszty cysteiny proces ten może prowadzić do utworzenia mostka dwusiarczkowego albo do utlenienia grupy tiolowej do -SOH, -SO₂H lub -SO₃H – zależnie od wartości równowagowego potencjału redoks i dostępności oksydanta. Ponieważ reszty tiolowe poszczególnych białek różnią się równowagowymi potencjałami redoks, istnieje możliwość precyzyjnej regulacji ich aktywności w zależności od wewnątrzkomórkowego stanu redoks [24]. Mostki dwusiarczkowe mogą zostać ponownie zredukowane przez tioredoksyny lub glutaredoksyny, a reszty -SOH przez sulfiredoksyny – zapewnia to mechanizm odwracalnej modyfikacji białek poprzez ich utlenienie. Mechanizm ten wydaje się być wydajnym sposobem regulacji ich aktywności, pozwalającym na wykorzystanie tego procesu w kaskadach sygnałowych [50].

Z przekazywaniem sygnału związanego z działaniem RFT jest związana aktywacja kaskady MAP kinaz – MAPKs (ang. *Mitogen-Activated Protein Kinases*), które podczas odpowiedzi obronnej fosforylują czynniki transkrypcyjne, wywołując zmianę profilu ekspresji genów [35]. U *Arabidopsis thaliana* zrekonstruowano kaskady ANP1-AtMEK4-AtMPK3 oraz ANP1-AtMEK5-AtMPK6, w których ANP1 może być bezpośrednio aktywowana przez nadtlenek wodoru [43]. Aktywność AtMPK3 oraz AtMPK6 wykazano m.in. podczas infekcji *B. cinerea*, gdzie indukują ekspresję genów kodujących enzymy szlaku syntezy kamaleksyny. Dodatkowo, o zaangażowaniu tych kinaz w reakcję obronną przeciw *B. cinerea* świadczy obniżenie odporności mutantów *mpk3* i *mpk6* [44]. Wykazano również, że nadtlenek wodoru aktywuje kinazy OXI1 (ang. *Oxidative Signal-Inducible1*) oraz AtNDPK2 (ang. *Arabidopsis thaliana Nucleoside Diphosphate Kinase 2*) potrzebne do efektywnej indukcji kaskad AtMPK3 i AtMPK6 (ang. *Arabidopsis thaliana Mitogen-activated Protein Kinase*) [45].

Reaktywne formy tlenu mogą również wpływać na aktywację czynników transkrypcyjnych patogenów, co wykazano na przykładzie YAP1 (ang. *Yeast-Associated Protein 1*) występującego u drożdży oraz u biotroficznego patogena kukurydzy *Ustilago maydis*. Pod wpływem nadtlenu wodoru YAP1 jest utleniane przez białko Gpx3 podobne do peroksydazy glutationu i powoduje utworzenie wewnątrzcząsteczkowych mostków dwusiarczkowych, które zmieniają konformację czynnika transkrypcyjnego YAP1 i umożliwiają jego transport do jądra [36]. U roślin natomiast wykazano indukcję czynnika transkrypcyjnego TGA1 przez białko NPR1 (ang. *Nonexpresser of PR Genes 1*) wywołaną przez zmianę komórkowego stanu redoks. W postaci nieaktywnej NPR1 występuje w formie polimeru, którego podjednostki są połączone międzycząsteczkowymi mostkami dwusiarczkowymi. Redukcja mostków dwusiarczkowych powoduje uwolnienie monomerów NPR1, które po translokacji do jądra aktywują TGA1 i indukują ekspresję genów PR [37]. Wskazuje się także na możliwość aktywacji czynników transkrypcyjnych szoku cieplnego – HSTFs (ang. *Heat Shock Transcription Factors*) poprzez tworzenie międzycząsteczkowych mostków dwusiarczkowych i formowanie dimerów aktywnych kompleksów. Większość dostępnych danych pochodzi z badań nad HSTFs ssaków, *Drosophila melanogaster* oraz drożdży, lecz istnieją przykłady silnej ekspresji genów kodujących te czynniki u roślin pod wpływem nadtlenu wodoru [34]. Ponadto stwierdzono wpływ RFT na ekspresję innych genów w badaniach nad zmianami profili ekspresji genów pod wpływem wybuchu tlenowego, m.in. u *A. thaliana* obserwowano pięciokrotny wzrost ekspresji 3 925 genów [19].

ROLA RFT W ODDZIAŁYWANIACH ROŚLIN Z PATOGENAMI NEKROTROFICZNYMI

Jednym z najczęściej badanych grzybów nekrotroficznych jest *B. cinerea*, który wywołuje chorobę zwaną szarą zgnilizną u ponad 200 różnych gatunków roślin.

Dysponuje on bogatym zestawem enzymów pomagających skolonizować tkankę roślinną (wśród nich kutynazami, lipazami i pektynazami), a także toksynami specyficznymi względem gospodarza (ang. *host specific toxins*), z których najlepiej poznana jest botrydial [63]. Ponadto, istnieją przesłanki wskazujące, że podczas infekcji patogen ten aktywuje u roślin wybuch tlenowy, inicjujący programowaną śmierć komórek. Wykazano, że komórki *A. thaliana* akumulują nadtlenek wodoru i anionorodnik ponadtlenkowy 6 godzin po inokulacji sporami lub elicytorem *B. cinerea*, a następnie widoczne stają się objawy charakterystyczne dla odpowiedzi nadwrażliwości. Zarówno dodanie katalazy, jak i DPI (inhibitor oksydaz NADPH) hamuje tworzenie nekroz na liściach, co sugeruje, że RFT są odpowiedzialne za indukcję programowanej śmierci komórki. Natomiast u mutantu *A. thaliana dnd1*, który nie wykazuje HR, nekrozy nie powstają, a wzrost patogena zostaje zahamowany [23]. Chociaż *B. cinerea* wywołuje u *A. thaliana* wybuch tlenowy powiązany z inicjacją HR, wykorzystując to zjawisko do skutecznej kolonizacji gospodarza, istnieją przesłanki, że RFT mogą być również zaangażowane w reakcję obronną roślin przeciw temu grzybowi. Transformowane rośliny *A. thaliana* z genem peroksydazy FBP1 w orientacji antysensowej, wykazują obniżoną ekspresję peroksydaz zaangażowanych w wybuch tlenowy, a w konsekwencji, mniejszą akumulację nadtlenku wodoru. Rośliny te okazują się znacznie bardziej podatne na infekcję *B. cinerea* niż rośliny typu dzikiego [8]. Również badania nad pomidorem wskazują na udział RFT w obronie przed tym patogenem. Okazuje się, że podczas infekcji przez *B. cinerea*, akumulacja H_2O_2 w roślinach pomidora mniej podatnych następuje wcześniej niż u kultywaru bardziej podatnego. Co więcej, u roślin mniej podatnych w apoplacie dochodzi do szybkiego wzrostu aktywności peroksydaz względem substratów charakterystycznych dla izoenzymów odpowiedzialnych za lignifikację, a tym samym za wzmacnianie ściany komórkowej [41]. Ponadto u pomidora inokulowanego sporami *B. cinerea* traktowanego *o*-hydroksyrutyną, u którego dochodzi do zwiększonej produkcji RFT, nekrozy wywoływane przez grzyb obejmują mniejszy obszar liścia w porównaniu z kontrolą. W dodatku obserwuje się obniżoną efektywność kiełkowania spor patogena, co najprawdopodobniej pozwala roślinie na mobilizację odpowiedzi obronnej. Przemawia za tym istotne zwiększenie aktywności peroksydaz, sugerując możliwość ich udziału we wzmacnianiu ściany komórkowej [33]. Wykazano, że mutanty *B. cinerea* z delecją genu miedziowo-cynkowej dysmutazy ponadtlenkowej BCSOD1 (ang. *Botrytis cinerea Superoxide Dismutase 1*) charakteryzują się istotnie zmniejszoną wirulencją w stosunku do *Phaseolus vulgaris*. Z jednej strony można to tłumaczyć zwiększoną akumulacją anionorodnika ponadtlenkowego w komórkach patogena prowadzącą do stresu oksydacyjnego lub brakiem ochrony przed wysokim stężeniem anionorodnika ponadtlenkowego wytwarzanym przez roślinę. Z drugiej strony, zakładając, że produkcja H_2O_2 przez BCSOD1 ma związek z indukcją HR u roślin, mutant *Δbcsod1* może być pozbawiony istotnego czynnika wirulencji [47].

S. sclerotiorum, nekrotroficzny patogen ponad 300 gatunków roślin, który jest spokrewniony z *B. cinerea*, wydziela podczas infekcji niespecyficzną względem

gospodarza toksynę – kwas szczawiowy, który w niewyjaśniony dotychczas sposób hamuje wybuch tlenowy w roślinie. Kwas szczawiowy ponadto obniża pH ściany komórkowej rośliny oraz chelatuje kationy wapnia występujące w kompleksie z pektynami, stwarzając tym samym odpowiednie warunki dla aktywności enzymów pektynolitycznych wydzielanych przez grzyba. Wykazano, że kwas szczawiowy jest niezbędny dla wirulencji tego grzyba [25]. Rośliny tytoniu typu dzikiego wykazują dużą aktywność katalazy i akumulują umiarkowane ilości RFT jedynie w trakcie pierwszych 24 godzin po inokulacji *S. sclerotiorum*. Natomiast tytoń transgeniczny, z ekspresją genu dekarboksylazy szczawianu z *Trametes versicolor*, 24 godziny po inokulacji wykazuje bardzo niską aktywność katalazy i wytwarza duże ilości nadtlenu wodoru. Na tych roślinach wzrost grzyba *S. sclerotiorum* jest wolniejszy niż na roślinach dzikich. Nie można jednak tego zjawiska przypisać bezpośrednio toksycznemu działaniu nadtlenu wodoru, ponieważ *S. sclerotiorum* w warunkach *in vitro* toleruje nawet znaczne stężenia RFT. Interesujące, że transgeniczny tytoń CAT1AS z obniżoną aktywnością katalazy, chociaż produkuje znaczne ilości H_2O_2 , nie wykazuje zwiększonej odporności na infekcję tym patogenem [64]. Transgeniczne rośliny słonecznika z ekspresją genu oksydazy szczawianu pszenicy, która utlenia kwas szczawiowy do nadtlenu wodoru i CO_2 , również wykazują zwiększoną odporność na infekcję *S. sclerotiorum*. Stwierdzono u nich zwiększony poziom akumulacji nadtlenu wodoru i kwasu salicylowego, a także zwiększoną ekspresję m.in. genów PR-5 i defensyny bez inokulacji patogenem. Ponadto rośliny wykazują fenotyp typu „*lesion mimic*” ze śmiercią komórek podobną do HR. Jednak za ten fenotyp niekoniecznie jest odpowiedzialny zwiększony poziom nadtlenu wodoru, ponieważ jego egzogenne podanie nie wywołuje śmierci komórek, lecz indukuje ekspresję genów obrony [26].

Wydaje się, że nekrotroficzny grzyb *Alternaria alternata* również może wykorzystywać produkcję RFT do skutecznej kolonizacji komórek gospodarza. Wykazano indukcję ultrastrukturalnych zmian w błonie komórkowej komórek gruszy przez specyficzną toksynę AK-I z *A. alternata*. W miejscach, w których błona komórkowa była najbardziej uszkodzona, stwierdzono akumulację nadtlenu wodoru. Zmiany były najbardziej widoczne w komórkach roślin kultywaru wrażliwego [55]. Wykazano również akumulację RFT w sporach, strzępkach rostkowych, przycistkach (*appressorium*) *A. alternata* a także w ścianach komórkowych i błonach komórkowych w podatnych liściach roślin gruszy, lecz nie podczas infekcji liści roślin odpornych [54].

U częściowo odpornych roślin rzepaku inokulowanych zarodnikami *Alternaria brassicae* 48 godzin po inokulacji wykazano wzrost zawartości kilku białek detoksyfikujących RFT, tj. peroksyredoksyne, peroksydazę glutationu, reduktazę dehydroaskorbinianu oraz białek GLP (ang. *Germin-Like Protein*). Prawdopodobnie GLPs pełnią rolę zewnątrzkomórkowych SOD. Innym białkiem, którego wzmożoną ekspresję stwierdzono w linii rzepaku tolerancyjnej na *A. brassicae*, jest kinaza NDPK zaangażowana w przekazywanie sygnału w warunkach stresu abiotycznego; u *A. thaliana* stwierdzono, że nadekspresja AtNDPK2 daje odporność na różne czynniki stresowe i obniżoną akumulację RFT [53].

Reaktywne formy tlenu mogą wpływać na indukcję śmierci komórki, zmiany profilu ekspresji genów, indukcję biosyntezy fitoaleksyn lub rearanżację struktury ściany komórkowej. Często podczas reakcji obronnej rośliny dochodzi do aktywacji szlaku syntezy związków fenylopropanowych, które są prekursorami ligniny i suberyny oraz fitoaleksyn – niskocząsteczkowych związków, które wywierają toksyczny efekt na patogeny [67]. Istnieją dowody wskazujące na zaangażowanie RFT w indukcję tych reakcji. Wytwarzanie anionorodnika ponadtlenkowego jest niezbędne do akumulacji fitoaleksyn podczas odpowiedzi odpornościowej komórek tytoniu [42]. Podczas infekcji *A. thaliana* przez *F. oxysporum* stwierdzono korelację pomiędzy wytwarzaniem RFT i syntezą kamaleksyny pod wpływem toksyny tego grzyba – kwasu fuzarynowego [11]. Wykazano również, że mutant *A. thaliana* *esal* (ang. *Enhanced Susceptibility to Alternaria*) wykazuje znacznie obniżony poziom biosyntezy kamaleksyny oraz defensyny PDF1.2 w odpowiedzi na związki indukujące tworzenie RFT. Ponadto stwierdzono, że mutanty *esal* wykazują obniżoną odporność na grzyby nekrotroficzne, tj. *Alternaria brassicicola*, *B. cinerea* i *Plectosphaerella cucumerina* oraz nie są zdolne do syntezy kamaleksyny również w odpowiedzi na *Leptosphaeria maculans* [10]. Inny mutant *A. thaliana*, *ups1*, podczas infekcji *B. cinerea* wykazywał obniżoną ekspresję genów indukowanych przez RFT i obniżoną akumulację kamaleksyny [16]. Badania prowadzone na roślinach pomidora odpornych i podatnych na atak *B. cinerea* (w tym mutancie pomidora o obniżonej zdolności do akumulacji kwasu abscysynowego i zwiększonej odporności na infekcję przez *B. cinerea*) wykazały, że wybuch tlenowy u tych pierwszych zachodzi wcześniej, a ponadto dochodzi u nich także do silniejszej aktywacji peroksydaz w apoplazmie zaangażowanych w przebudowę ściany komórkowej [5]. Podobnych wyników dostarczyły badania nad odpowiedzią obronną odpornych odmian słonecznika na atak *Alternaria helianthi*, rośliny podatne również wykazywały wcześniejszą aktywację ekspresji różnych izoform peroksydaz ściany komórkowej [3]. Z drugiej strony, badania nad oddziaływaniem *A. thaliana* i *B. cinerea* mogą sugerować, że w wielu przypadkach wybuch tlenowy i modyfikacje ściany komórkowej nie wpływają na poziom odporności roślin na grzyby nekrotroficzne. Wykazano, że oligogalakuronidy uwalniane z degradowanej w trakcie ataku nekrotrofów ściany komórkowej gospodarza wywołują silny wybuch tlenowy i skorelowaną z nim akumulację kalozy. Jednak, mutant *atrbohD* z niefunkcjonalną oksydazą NADPH nie wykazywał obniżonej odporności na *B. cinerea* w porównaniu z roślinami typu dzikiego, pomimo braku wybuchu tlenowego i akumulacji kalozy [20].

Jak dotąd zgromadzono wiele dowodów wskazujących na istotną rolę RFT w indukowaniu śmierci komórki [21]. Jednym z czynników modulujących aktywację śmierci komórki są RFT produkowane w mitochondriach. W prawidłowo funkcjonującym łańcuchu oddechowym mitochondriów cząsteczka tlenu ulega czteroelektrowej redukcji przez oksydazę cytochromu c. Ze względu na silne powinowactwo cytochromu c do tlenu, aktywność tego enzymu nie powoduje tworzenia zredukowanych form tlenu. Jednak na wcześniejszych etapach łańcucha oddechowego, może dojść do ich produkcji przez dehydrogenazę NADH (kompleks I), a także przez semiubichinonową formę koenzymu Q (kompleks III). Nawet w warunkach

fizjologicznych, niemal 2% tlenu zużywanego przez mitochondria zostaje wykorzystane do produkcji anionorodnika ponadtlenkowego, a następnie nadtlenu wodoru przez dysmutazy ponadtlenkowe [46]. W badaniach interakcji pomiędzy owsem a grzybem *Cochliobolus victoriae* stwierdzono m.in., że jego toksyna wiktoryna indukuje produkcję RFT w mitochondriach, a zastosowanie „zmiataczy” reaktywnych form tlenu powoduje supresję mitochondrialnego wybuchu tlenowego oraz prowadzi do opóźnienia objawów śmierci komórki, takich jak degradacja DNA i kondensacja chromatyny [66].

LITERATURA

- [1] ALI R, MA W, LEMTIRI-CHLIEH F, TSALTAS D, LENG Q, VON BODMAN S, BERKOWITZ GA. Death don't have no mercy and neither does calcium: *Arabidopsis* CYCLIC NUCLEOTIDE GATED CHANNEL2 and innate immunity. *Plant Cell* 2007; **19**: 1081–1095.
- [2] ALMAGRO L, GÓMEZ ROS LV, BELCHI-NAVARRO S, BRU R, ROS-BARCELÓ A, PEDREÑO MA. Class III peroxidases in plant defence reactions. *J Exp Bot* 2009; **60**: 377–390.
- [3] ANJANA G, KINI K, SHETTY H, PRAKASH H. Differential expression of sunflower peroxidase isoforms and transcripts during necrotrophic interaction with *Alternaria helianthi*. *Russ J Plant Physiol* 2007; **54**: 513–517.
- [4] ASAI S, OHTA K, YOSHIOKA H. MAPK signaling regulates nitric oxide and NADPH oxidase-dependent oxidative bursts in *Nicotiana bentamiana*. *Plant Cell* 2008; **20**: 1390–1406.
- [5] ASSELBERGH B, CURVERS K, FRANCA SC, AUDENAERT K, VUYLSTEKE M, VAN BREUSEGEM F, HÖFTE M. Resistance to *Botrytis cinerea* in *sitiens*, an abscisic acid-deficient tomato mutant, involves timely production of hydrogen peroxide and cell wall modifications in the epidermis. *Plant Physiol* 2007; **144**: 1863–1877.
- [6] BEDARD K, LARDY B, KRAUSE K-H. NOX family NADPH oxidases: Not just in mammals. *Biochimie* 2007; **89**: 1107–1112.
- [7] BERNARDS MA, SUMMERHURST DK, RAZEM FA. Oxidases, peroxidases and hydrogen peroxide: The suberin connection. *Phytochem Rev* 2004; **3**: 113–126.
- [8] BINDSCHEDLER LV, DEWDNEY J, BLEE KA, STONE JM, ASAI T, PLOTNIKOV J, DENOUE C, HAYES T, GERRISH C, DAVIES DR, AUSUBEL FM, BOLWELL GP. Peroxidase-dependent apoplastic oxidative burst in *Arabidopsis* required for pathogen resistance. *Plant J* 2006; **47**: 851–863.
- [9] BLUME B, NÜRNBERGER T, NASS N, SCHEEL D. Receptor-mediated increase in cytoplasmic free calcium required for activation of pathogen defense in parsley. *Plant Cell* 2000; **12**: 1425–1440.
- [10] BOHMAN S, STAAL J, THOMMA BP, WANG M, DIXELIUS C. Characterisation of an *Arabidopsis*-*Leptosphaeria maculans* pathosystem: resistance partially requires camalexin biosynthesis and is independent of salicylic acid, ethylene and jasmonic acid signalling. *Plant J* 2004; **37**: 9–20.
- [11] BOUIZGARNE B, EL-MAAROUF-BOUTEAU H, FRANKART C, REBOUTIER D, MADIONA K, PENNARUN AM, MONESTIEZ M, TROUVERIE J, AMIAR Z, BRIAND J, BRAULT M, RONA JP, OUHDOUCH Y, EL HADRAMI I, BOUTEAU F. Early physiological responses of *Arabidopsis thaliana* cells to fusaric acid: toxic and signalling effects. *New Phytol* 2006; **169**: 209–218.
- [12] CONAA, REA G, ANGELINI R, FEDERICO R, TAVLADORAKI P. Functions of amine oxidases in plant development and defence. *Trends Plant Sci* 2006; **11**: 80–88.
- [13] DAUB M, EHRENSHAFT M. The photoactivated *Cercospora* toxin cercosporin: Contributions to plant disease and fundamental biology. *Annu Rev Phytopathol* 2000; **38**: 461–490.
- [14] DAUB ME, HERRERO S, CHUNG KR. Photoactivated perylenequinone toxins in fungal pathogenesis of plants. *FEMS Microbiol Lett* 2005; **252**: 197–206.
- [15] DAVIES DR, BINDSCHEDLER LV, STRICKLAND TS, BOLWELL GP. Production of reactive oxygen species in *Arabidopsis thaliana* cell suspension cultures in response to an elicitor from *Fusarium oxysporum*: implications for basal resistance. *J Exp Bot* 2006; **57**: 1817–1827.

- [16] DENBY KJ, JASON LJ, MURRAY SL, LAST RL. *ups1*, an *Arabidopsis thaliana* camalexin accumulation mutant defective in multiple defence signalling pathways. *Plant J* 2005; **41**: 673–684.
- [17] DYNOWSKI M, SCHAAF G, LOQUE D, MORAN O, LUDEWIG U. Plant plasma membrane water channels conduct the signalling molecule H_2O_2 . *Biochem J* 2008; **414**: 53–61.
- [18] FOYER CH, NOCTOR G. Oxidant and antioxidant signalling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. *Plant Cell Environ* 2005; **28**: 1056–1071.
- [19] GADJEV I, VANDERAUWERA S, GECHETS, LALOIC, MINKOVIN, SHULAEV V, APEL K, INZÉ D, MITTLER R, VAN BREUSEGEM F. Transcriptomic footprints disclose specificity of reactive oxygen species signaling in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 2006; **141**: 436–445.
- [20] GALLETTI R, DENOUX C, GAMBETTA S, DEWDNEY J, AUSUBEL FM, DE LORENZO G, FERRARI S. The AtrbohD-mediated oxidative burst elicited by oligogalacturonides in *Arabidopsis* is dispensable for the activation of defense responses effective against *Botrytis cinerea*. *Plant Physiol* 2008; **148**: 1695–1706.
- [21] GECHETS, HILLE J. Hydrogen peroxide as a signal controlling plant programmed cell death. *J Cell Biol* 2005; **168**: 17–20.
- [22] GHOSH M. Antifungal properties of haem peroxidase from *Acorus calamus*. *Ann Bot* 2006; **98**: 1145–1153.
- [23] GOVRIN EM, RACHMILEVITCH S, TIWARI BS, SOLOMON M. An elicitor from *Botrytis cinerea* induces the hypersensitive response in *Arabidopsis thaliana* and other plants and promotes the gray mold disease. *Phytopathology* 2006; **96**: 299–307.
- [24] HANCOCK J, DESIKAN R, HARRISON J, BRIGHT J, HOOLEY R, NEILL S. Doing the unexpected: proteins involved in hydrogen peroxide perception. *J Exp Bot* 2006; **57**: 1711–1718.
- [25] HEGEDUS DD, RIMMER SR. *Sclerotinia sclerotiorum*: when „to be or not to be” a pathogen? *FEMS Microbiol Lett* 2005; **251**: 177–184.
- [26] HU X, BIDNEY DL, YALPANI N, DUVICK JP, CRASTA O, FOLKERTS O, LUL G. Overexpression of a gene encoding hydrogen peroxide-generating oxalate oxidase evokes defense responses in sunflower. *Plant Physiol* 2003; **133**: 170–181.
- [27] JONES JDG, DANGL J. The plant immune system. *Nature* 2006; **444**: 323–329.
- [28] KAWAHARA T, QUINN MT, LAMBETH JD. Molecular evolution of the reactive oxygen-generating NADPH oxidase (Nox/Duox) family of enzymes. *BMC Evol Biol* 2007; **7**: e109.
- [29] 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.
- [30] KOLLA VA, VAVASSEUR A, RAGHAVENDRA AS. Hydrogen peroxide production is an early event during bicarbonate induced stomatal closure in abaxial epidermis of *Arabidopsis*. *Planta* 2007; **225**: 1421–1429.
- [31] LIAO H, CHUNG K. Cellular toxicity of elsinochrome phytotoxins produced by the pathogenic fungus, *Elsinoë fawcettii* causing citrus scab. *New Phytol* 2008; **177**: 239–250.
- [32] ŁAŻNIEWSKA J, MACIOSZEK VK, LAWRENCE CB, KONONOWICZ AK. Fight to the death: *Arabidopsis thaliana* defense response to fungal necrotrophic pathogens. *Acta Physiol Plant* 2009; doi 10.1007/s11738-009-0372-6.
- [33] MAŁOLEPSZA U. Spatial and temporal variation of reactive oxygen species and antioxidant enzymes in *o*-hydroxyethylrutin-treated tomato leaves inoculated with *Botrytis cinerea*. *Plant Pathol* 2005; **54**: 317–324.
- [34] MILLER G, MITTLER R. Could heat shock transcription factors function as hydrogen peroxide sensors in plants? *Ann Bot* 2006; **98**: 279–288.
- [35] MISHRA NS, TUTEJA R, TUTEJA N. Signaling through MAP kinase networks in plants. *Arch Biochem Biophys* 2006; **452**: 55–68.
- [36] MOLINA L, KAHMANN R. An *Ustilago maydis* gene involved in H_2O_2 detoxification is required for virulence. *Plant Cell* 2007; **19**: 2293–2309.
- [37] MOU Z, FAN W, DONG X. Inducers of plant systemic acquired resistance regulate NPR1 function through redox changes. *Cell* 2003; **113**: 935–944.
- [38] MYSORE KS, RYU CM. Nonhost resistance: How much do we know? *Trends Plant Sci* 2004; **9**: 97–104.
- [39] NÜHSE TS, BOTTRILL AR, JONES AM, PECK SC. Quantitative phosphoproteomic analysis of plasma membrane proteins reveals regulatory mechanisms of plant innate immune responses. *Plant J* 2007; **51**: 931–940.

- [40] PASSARDI F, PENEL C, DUNAND C. Performing the paradoxical: how plant peroxidases modify the cell wall. *Trends Plant Sci* 2004; **9**: 534–540.
- [41] PATYKOWSKI J, URBANEK H. The activity of antioxidative enzymes, contents of H_2O_2 and of ascorbate in tomato leaves of cultivars more or less sensitive to infection with *Botrytis cinerea*. *Acta Physiol Plant* 2005; **27**: 193–203.
- [42] PERRONE ST, MCDONALD KL, SUTHERLAND MW, GUEST DI. Superoxide release is necessary for phytoalexin accumulation in *Nicotiana tabacum* cells during the expression of cultivar-race and non-host resistance towards *Phytophthora* spp. *Physiol Mol Plant Pathol* 2003; **62**: 127–135.
- [43] REN D, YANG H, ZHANG S. Cell death mediated by MAPK is associated with hydrogen peroxide production in *Arabidopsis*. *J Biol Chem* 2002; **277**: 559–565.
- [44] REN D, LIU Y, YANG KY, HAN L, MAO G, GLAZEBROOK J, ZHANG S. A fungal-responsive MAPK cascade regulates phytoalexin biosynthesis in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; **105**: 5638–5643.
- [45] RENTEL MC, LECOURIEUX D, OUAKED F, USHER SL, PETERSEN L, OKAMOTO H, KNIGHT H, PECK SC, GRIERSON CS, HIRT H, KNIGHT MR. OXII kinase is necessary for oxidative burst-mediated signalling in *Arabidopsis*. *Nature* 2004; **427**: 858–861.
- [46] RHOADS DM, UMBACH AL, SUBBAIACH CC, SIEDOW JN. Mitochondrial reactive oxygen species. Contribution to oxidative stress and interorganellar signaling. *Plant Physiol* 2006; **141**: 357–366.
- [47] ROLKE Y, LIU S, QUIDDE T, WILLIAMSON B, SCHOUTEN A, WELTRING K-M, SIEWERS V, TENBERGE K.B, TUDZYNSKI B, TUDZYNSKI P. Functional analysis of H_2O_2 -generating systems in *Botrytis cinerea*: the major Cu-Zn-superoxide dismutase (BCSOD1) contributes to virulence on French bean, whereas a glucose oxidase (BGOD1) is dispensable. *Mol Plant Pathol* 2004; **5**: 17–27.
- [48] ROS BARCELÓ A, GÓMEZ ROS LV, GABALDÓN C, LÓPEZ-SERRANO M, POMAR F, CARRIÓN J, PEDREÑO MA. Basic peroxidases: The gateway for lignin evolution? *Phytochem Rev* 2004; **3**: 61–78.
- [49] ROS BARCELÓ A. Xylem parenchyma cells deliver the H_2O_2 necessary for lignification in differentiating xylem vessels. *Planta* 2005; **220**: 747–756.
- [50] ROUHIER N, GELHAYE E, JACQUOT JP. Plant glutaredoxins: still mysterious reducing systems. *Cell Mol Life Sci* 2004; **61**: 1266–1277.
- [51] 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.
- [52] SAGI M, FLUHR R. Production of reactive oxygen species by plant NADPH oxidases. *Plant Physiol* 2006; **141**: 336–340.
- [53] SHARMA N, RAHMAN M, STRELKOV S, THIAGARAJAH M, BANSAL VK, KAV NNV. Proteome-level changes in two *Brassica napus* lines exhibiting differential responses to the fungal pathogen *Alternaria brassicae*. *Plant Sci* 2007; **172**: 95–110.
- [54] SHINOBI T, SUZUKI T, KURIHARA T, NARUSAKA Y. Microscopic detection of reactive oxygen species generation in the compatible and incompatible interactions of *Alternaria alternata* Japanese pear pathotype and host plants. *J Gen Plant Pathol* 2003; **69**: 7–16.
- [55] SHINOBI T, SUZUKI T, NARUSAKA Y, PARK P. Ultrastructural localization of hydrogen peroxide in host leaves treated with AK-toxin I produced by *Alternaria alternata* Japanese pear pathotype. *J Gen Plant Pathol* 2002; **68**: 38–45.
- [56] STAAL J, KALIFF M, DEWAELE E, PERSSON M, DIXELIUS C. RLM3, a TIR domain encoding gene involved in broad-range immunity of *Arabidopsis* to necrotrophic fungal pathogens. *Plant J* 2008; **55**: 188–200.
- [57] SUMIMOTO H. Structure, regulation and evolution of Nox-family NADPH oxidases that produce reactive oxygen species. *FEBS J* 2008; **275**: 3249–3277.
- [58] SVEDRUŽIĆ D, JÓNSSON S, TOYOTA CG, REINHARDT LA, RICAGNO S, LINDQVIST Y, RICHARDS NG. The enzymes of oxalate metabolism: unexpected structures and mechanisms. *Arch Biochem Biophys* 2005; **433**: 176–192.
- [59] TORRES MA, DANGL JL. Functions of the respiratory burst oxidase in biotic interactions, abiotic stress and development. *Curr Opin Plant Biol* 2005; **8**: 397–403.
- [60] TORRES MA, JONES JD, DANGL JL. Reactive oxygen species signaling in response to pathogens. *Plant Physiol* 2006; **141**: 373–378.
- [61] UNGER C, KLETA S, JANDL G, TIEDEMANN A. Suppression of the defence-related oxidative burst in bean leaf tissue and bean suspension cells by the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea*. *J Phytopathol* 2005; **153**: 15–26.

- [62] URQUHART W, GUNAWARDENA AH, MOEDER W, ALI R, BERKOWITZ GA, YOSHIOKA K. The chimeric cyclic nucleotide-gated ion channel ATCNGC11/12 constitutively induces programmed cell death in a Ca^{2+} dependent manner. *Plant Mol Biol* 2007; **65**: 747–761.
- [63] VAN KAN JAL. Licensed to kill: the lifestyle of a necrotrophic plant pathogen. *Trends Plant Sci* 2006; **11**: 247–253.
- [64] WALZ A, ZINGEN-SELL I, THEISEN S, KORTEKAMP A. Reactive oxygen intermediates and oxalic acid in the pathogenesis of the necrotrophic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. *Eur J Plant Pathol* 2008; **120**: 317–330.
- [65] 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.
- [66] YAO N, TADA Y, SAKAMOTO M, NAKAYASHIKI H, PARK P, TOSA Y, MAYAMA S. Mitochondrial oxidative burst involved in apoptotic response in oats. *Plant J* 2002; **30**: 567–579.
- [67] ZHAO J, DAVIS L, VERPOORTE R. Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnol Adv* 2005; **23**: 283–333.

*Prof. dr hab. Andrzej K. Kononowicz,
Katedra Genetyki Ogólnej, Biologii Molekularnej
i Biotechnologii Roślin, Uniwersytet Łódzki,
ul. S. Banacha 12/16, 90-237 Łódź
E-mail: akononow@biol.uni.lodz.pl*