

## REGULACYJNA ROLA TLENKU AZOTU W KIEŁKOWANIU NASION\*

### REGULATORY ROLE OF NITRIC OXIDE DURING SEED GERMINATION

Agnieszka GNIAZDOWSKA, Renata BOGATEK

Katedra Fizjologii Roślin, Wydział Rolnictwa i Biologii, SGGW, Warszawa

*Streszczenie:* Tlenek azotu (NO) jest wolnym rodnikiem, co warunkuje jego wysoką reaktywność w układach biologicznych. Jest obecny w środowisku glebowym jako produkt reakcji nitryfikacji i denitryfikacji, w komórkach roślinnych może być syntetyzowany w wyniku reakcji enzymatycznych (katalizowanych przez roślinną syntazę tlenku azotu i/lub reduktazę azotanową) lub powstawać spontanicznie w wyniku reakcji nieenzymatycznych. Podobnie jak w organizmach zwierzęcych pełni rolę cząsteczki sygnałowej. Donory NO (nitroprusydek sodu, S-nitrozo-N-acetyloapenicyloamina czy nitrozoglutation) stymulują kiełkowanie nasion wielu gatunków roślin. Produkcję endogennego NO wykazano we wczesnych etapach kiełkowania nasion, co wskazuje, że NO może być endogennym regulatorem tego procesu. Jednakże mechanizm jego działania w regulacji kiełkowania nasion nie jest w pełni poznany. Prawdopodobnie, NO uruchamia „fitochromowy” szlak transdukcji sygnału prowadzący do przerwania spoczynku i rozpoczęcia kiełkowania w przypadku nasion fotoblastycznych. Ponadto, funkcja NO jako czynnika stymulującego kiełkowanie może dotyczyć współdziałania NO z hormonami roślinnymi uczestniczącymi w indukcji procesu kiełkowania nasion.

*Słowa kluczowe:* fitochrom, hormony roślinne, kiełkowanie nasion, tlenek azotu, spoczynek nasion.

*Summary:* Nitric oxide (NO) is an inorganic free radical, that plays an important role in regulation of variety processes in living organisms. Soils are an important source of NO, produced during denitrification, nitrification and reduction of  $\text{NO}_3^-$  to  $\text{NH}_4^+$ . In plants NO production depends on the activity of nitric oxide synthase and/or nitrate reductase as well as non enzymatic generation of NO can be detected. Similarly as in animals, in plant cells NO is widely regarded as a signaling molecule. There are a number of data proving that different NO donors (sodium nitroprusside, S-nitrosoglutathione, S-nitroso-N-acetyl-D-penicillamine) stimulate seed germination of many plants. Moreover endogenous synthesis of NO during seed germination was reported, indicating its role as a link to activation of embryonic axes. Although it is not questionable that NO acts as mediator of seed germination its mode of action in this process is still known only fragmentary. NO stimulates germination of photoblastic seeds, by activation of phytochrome signal transduction pathway. On the other hand NO interact with classical phytohormones (ethylene, abscisic acid, gibberellins) involved in regulation of seed germination.

\*Praca powstała w trakcie realizacji grantu JMRektora SGGW nr 504-01020017.

**Keywords:** germination, nitric oxide, phytochrome, plant hormones, seed dormancy.

**Skróty:** **ABA** – kwas abscysynowy, **ACC** – kwas 1-aminocyklopropano-1-karboksylowy, **ACO** – oksydaza ACC, **ACS** – syntaza ACC, **cADPR** – cykliczna ADP-ryboza, **cGMP** – cykliczny guanozynomonofosforan, **cPTIO** (2-[4-carboxyphenyl]-4,4,5,5-teramethylimidazoline-1-oxyl 3-oxide) – 3-N-tlenek 2-[4-karboksyfenylo]-4,4,5,5-terametylo-1-oksyimidazolu, **DAF-FM DA** – dwuocian 3-amino-4-(N-metyloamino)-2'7'-dwufluorofluoresceina, **GA<sub>3</sub>** – giberelina, **GSNO** – S-nitrozoglutation, **nGA<sub>3</sub>** – azotyn kwasu giberelinowego, **NOS** – syntaza tlenu azotu, **NR** – reduktaza azotanowa, **RFT** (*reactive oxygen species*-ROS) – reaktywne formy tlenu, **SNAP** – S-nitrozo-N-acetyloopenicyloamina, **SNP** – nitroprusydek sodu.

## 1. WIELOKIERUNKOWE DZIAŁANIE TLENU AZOTU

Przyznanie w 1998 roku Nagrody Nobla z dziedziny medycyny i fizjologii za opisanie roli tlenu azotu (NO) w regulacji układu naczyniowo-sercowego człowieka zapoczątkowało wybuch zainteresowania funkcją NO w organizmach roślinnych. Pierwsze doniesienia dotyczyły NO jako cząsteczki sygnałowej w odpowiedzi rośliny na atak patogenu [19,21]. W ciągu kolejnych lat ukazało się szereg prac o udziale NO w regulacji podstawowych procesów fizjologicznych roślin, takich jak: oddychanie [37], fotosynteza [71], kiełkowanie [11], kwitnienie [33], starzenie, dojrzewanie owoców [48] czy odpowiedź roślin na warunki stresowe [34, 39, 44, 66, 70]. Stwierdzono również współdziałanie NO z niektórymi hormonami roślinnymi. W ostatnich latach ukazały się prace dotyczące zależności pomiędzy NO i auksyną w indukcji tworzenia korzeni [53, 58], stymulacji wygięcia grawitropicznego korzeni [35], interakcji pomiędzy NO i ABA w regulacji ruchów aparatów szparkowych [55], współdziałania NO z etylenem w procesie dojrzewania owoców [48], a także kwasem jasmonowym w reakcji na zranienie [36]. Chociaż proponowana przez Beligni i Lamattina [7] koncepcja uznania NO za nowy hormon roślinny nie spotkała się z pozytywną reakcją fizjologów roślin, nie ulega wątpliwości, że NO pełni niezwykle istotną funkcję w regulacji wzrostu i rozwoju organizmów roślinnych.

Tlenek azotu jest wolnym rodnikiem. Łatwo reaguje z tlenem tworząc dwutlenek azotu, który z kolei reaguje z organicznymi związkami nienasyconymi tworząc wolne rodniki, z niesparowanym elektronem na atomie węgla. Dalsze reakcje, w których uczestniczą rodniki, prowadzą do powstawania rodników nadadtlenkowych ROO<sup>•</sup>, alkoksylowych RO<sup>•</sup> i kolejnych cząsteczek dwutlenku azotu. NO reaguje też z anionorodnikiem nadadtlenkowym O<sub>2</sub><sup>-•</sup>, w wyniku czego powstaje nadtlenoazotyn ONOO<sup>-</sup>, ten zaś wywołuje uszkodzenia komórek reagując z grupami tiolowymi białek i wielonienasyconymi resztami kwasów tłuszczowych w lipidach [67]. Ponadto NO reaguje łatwo z jonami metali przejściowych, takimi jak: Fe, Cu, Zn. Tak duża reaktywność sprawia, że NO uczestniczy w regulacji aktywności wielu enzymów i aktywacji czynników transkrypcyjnych [47]. Grun i wsp. [31] w pracy przeglądowej podają nawet listę genów, których transkrypcja w warunkach stresowych (głównie zranienia i ataku patogenu) jest regulowana przez NO.

Transdukcja sygnału NO w komórkach roślinnych odbywa się, podobnie jak w komórkach zwierzęcych, przez aktywację cykazy guanylanowej i wzrost stężenia

cyklicznego guanozynomonofosforanu (cGMP) [21]. Opis wielokierunkowego działania NO z uwzględnieniem roli sygnałowej tej cząsteczki znajdzie zainteresowany Czytelnik w pracach przeglądowych w języku polskim, które ukazały się w Postęпах Biologii Komórki [54], w Kosmosie [27] oraz XII tomie Na Pograniczu Chemii i Biologii [45].

Niniejsza praca stanowi próbę kompleksowego opisu udziału NO w regulacji procesu kiełkowania nasion z uwzględnieniem mechanizmów działania tej cząsteczki w usuwaniu spoczynku umożliwiającym kiełkowanie nasion.

## 2. ŹRÓDŁA TLENKU AZOTU

Tlenki azotu  $\text{NO}_x$  (np.  $\text{NO}_2$ , NO) emitowane do atmosfery są w większości wynikiem procesów biologicznych zachodzących w glebie lub produktami reakcji spalania biomasy roślinnej [23]. Część (20%) NO obecnego w atmosferze pochodzi z gleby. Zarówno  $\text{N}_2\text{O}$ , jak i NO są produktami reakcji denitryfikacji, nitryfikacji i redukcji azotanów do jonów amonowych [17]. Okazuje się, że wzrost nawożenia azotowego przyczynia się do zwiększonej emisji NO i  $\text{N}_2\text{O}$ , przy czym natężenie emisji NO zależy od rodzaju uprawy, temperatury gleby i dostępności wody [47]. Emisja tlenków azotu w procesach spalania materii organicznej dotyczy w szczególności obszarów klimatu gorącego i związana jest z występowaniem pożarów lasów, sawanny lub też spalania pozostałości roślin uprawnych [2,42]. Kolejne istotne źródło NO stanowią gazy spalinowe [63].

Natomiast w praktyce laboratoryjnej najczęściej stosowanymi donorami tlenku azotu są: nitroprusydek sodu (SNP), S-nitrozoglutation (GSNO) oraz S-nitrozoacetylo-penicylamina (SNAP). Różnią się one zarówno ilością emitowanego NO, jak też kinetyką tego procesu. Porównanie emisji NO z różnych donorów wykazało, że największe ilości tego gazu powstają przy zastosowaniu roztworu SNAP (30  $\mu\text{M}$ ), następnie GSNO (12  $\mu\text{M}$ ) i SNP (6  $\mu\text{M}$ ), przy czym maksymalna emisja NO z 0,5 mM roztworów poszczególnych donorów przypada na pierwszą godzinę po oświetleniu w przypadku SNAP, piątą godzinę dla GSNO i drugą godzinę dla SNP [22]. Z kolei czas półtrwania stosowanych donorów określono na około 12 godzin dla SNP, 3 godziny dla SNAP i 7 godzin dla GSNO [22]. Jako zmiatacze NO stosowane są dwa związki: PTIO (3-N-tlenek 2-fenilo-4,4,5,5-terametylo-1-oksyimidazolu) oraz jego pochodna c-PTIO (3-N-tlenek 2-[4-karboksyfenilo]-4,4,5,5-terametylo-1-oksyimidazolu), które reagują z NO, tworząc azotyny [29].

## 3. EGZOGENNY TLENEK AZOTU STYMULUJE KIEŁKOWANIE NASION

Kiełkowanie nasion obejmuje przemiany poprzedzające wzrost, podziały komórek i ich różnicowanie, począwszy od pęcznienia (imbibicji) nasion, kończąc na indukcji wzrostu elongacyjnego osi zarodkowej [13]. Początek wzrostu, objawiający się przebi-

TABELA 1. Przykłady roślin, u których wykazano stymulację kiełkowania nasion przez NO

Roślina (nazwa polska i łacińska)	Związek chemiczny będący donorem NO	Literatura
Proso różgowe ( <i>Panicum virgatum</i> ), Palczatka gerarda ( <i>Andropogon gerardii</i> ) <i>Sorghastrum nutans</i>	SNP, NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> w kwaśnym pH	[61]
Sałata ( <i>Lactuca sativa</i> )	SNP, SNAP	[6]
Paulownia cesarska ( <i>Paulownia tomentosa</i> )	SNP, SNAP, (SIN-1), NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> w kwaśnym pH	[26, 30]
Rzodkiewnik ( <i>Arabidopsis thaliana</i> )	SNP, nitrogliceryna SNP, SNAP, gazowy NO	[4] [10,12] [52]
Paulownia cesarska ( <i>Paulownia tomentosa</i> ), Gwiazdnica pospolita ( <i>Stellaria media</i> )	nGA <sub>3</sub> SNP	[41] [24]
Pszenica ( <i>Triticum aestivum</i> )	SNP	[69]
<i>Suaeda salsa</i>	SNP	[51]
Stulicha psia ( <i>Descurainia Sophia</i> )	SNP	[50]
Łubin żółty ( <i>Lupinus luteus</i> )	SNP	[44]
Jabłoń ( <i>Malus domestica</i> )	SNP, SNAP	[16, 28]

ciem okrywy nasiennej przez korzeń zarodkowy, oznacza zakończenie kiełkowania i rozpoczęcie fazy wzrostu zarodka. Definicja ta odpowiada powszechnie przyjętemu określeniu „wczesne kiełkowanie” (*early germination*) [13] lub „kiełkowanie *sensu stricto*” [49].

Wykazano, że donory tlenu azotu stymulują kiełkowanie nasion wielu gatunków roślin (tab. 1). Kiełkowanie w ciemności nasion sałaty odmiany Grand Rapids było stymulowane przez SNP lub SNAP, a efekt ten był odwracany przez cPTIO [6]. Podobny efekt obserwowano dla nasion paulownii cesarskiej (*Paulownia tomentosa*) [26] i gwiazdnicy pospolitej (*Stellaria media*) [24]. SNP przerywał spoczynek i stymulował kiełkowanie również nasion innego chwastu – stulichy psiej (*Descurainia sophia*) [50]. Kiełkowanie nasion stulichy, podobnie jak nasion sałaty i paulownii, jest stymulowane przez światło czerwone (R) i hamowane przez daleką czerwień (FR), a ponadto pozostaje pod kontrolą giberelin. Wykazano, że podanie unikonazolu (inhibitora syntezy giberelin) ograniczało stymulujący wpływ NO na kiełkowanie stulichy [50], co może sugerować współdziałanie GA i NO w regulacji kiełkowania nasion.

SNP wykazywał też wyraźny stymulujący efekt na kiełkowanie nasion łubinu żółtego (*Lupinus luteus*) [44]. Kiełkowanie nasion łubinu nie podlega regulacji przez światło, u nasion tych nie obserwuje się też spoczynku, a zatem mechanizm działania NO w tym przypadku jest prawdopodobnie inny. Jednocześnie obserwowano spadek wrażliwości nasion łubinu traktowanych NO na niekorzystne warunki środowiskowe, tj. obecność

metali ciężkich (ołowiu lub kadmu) i zasolenie. Podobnie, SNP stymulował kiełkowanie nasion *Suaeda salsa*, jednego z halofitów występujących w Chinach, w warunkach zasolenia (800 lub 400 mM NaCl) [51]. Analogicznie, kiełkowanie nasion traw, takich jak: proso (*Panicum virgatum*), palczatka (*Andropogon gerardii*) i *Sorghastrum nutans*, było stymulowane przez roztwór SNP [61]. Dodatkowo zaobserwowano, że NO uwolniony z azotynów w kwaśnym pH wywiera dużo lepszy aniżeli SNP wpływ na kiełkowanie nasion prosa. Bethke i wsp. [9,10,12] zastosowali interesujący model eksperymentalny, w którym nasiona rzodkiewnika (*Arabidopsis thaliana*) kiełkowały w obecności par wydzielających się z wodnego roztworu SNP. Zaobserwowali oni ponad 80% kiełkowanie spoczynkowych nasion *Arabidopsis*, natomiast 50 lub 100  $\mu$ M roztwór cPTIO redukowało kiełkowanie badanych nasion do 13 i 4% [9]. Podobnie, potraktowanie spoczynkowych nasion jęczmienia (*Hordeum vulgare*) wodnym roztworem SNP powodowało zwiększenie ich kiełkowania [9]. Ponadto, podanie cPTIO nie wpływało na kiełkowanie nasion niespoczynkowych, co sugeruje, że zmiatacz NO nie hamuje kiełkowania (nasion niespoczynkowych) w warunkach, gdy spoczynek nasion jest usuwany przez czynniki środowiskowe, takie jak np. niska temperatura [9]. Zatem działanie NO mogłoby polegać na regulacji usuwania spoczynku nasion.

Nasiona jabłoni charakteryzują się głębokim spoczynkiem zarodkowym, który może być usunięty pod wpływem kilkunastotygodniowej chłodnej (5°C) stratyfikacji. Zarodki izolowane ze spoczynkowych nasion jabłoni kiełkują bardzo słabo (w około 10%), a wyrastające z nich siewki wykazują liczne anomalie rozwojowe, polegające między innymi na skróceniu hypokotyli i nierównomiernym wzroście i zielenieniu obu liścieni [14]. Przełamanie spoczynku i stymulacja kiełkowania izolowanych zarodków jabłoni następuje w wyniku krótkotrwałego traktowania ich cyjanowodorem (1 mM, 6 godz.), a ponadto następuje wówczas zniwelowanie wyżej opisanych anomalii rozwojowych siewek [14]. Zastosowanie donorów NO (SNP i SNAP) wywołuje efekt podobny jak użycie cyjanowodoru [16,28]. Krótkotrwałe (3 godz.) podanie SNP (5 mM) powoduje znaczną stymulację kiełkowania spoczynkowych zarodków, a wyrastające z nich siewki nie wykazują anomalii typowych dla siewek wyrastających ze spoczynkowych nasion. Także zastosowanie azotynu w kwaśnym pH jako źródła NO powoduje usunięcie spoczynku i prowadzi do kiełkowania prawie w 60% zarodków, których liścienie równomiernie się rozwijają i zazieleniają (dane własne niepublikowane). Równocześnie, podanie cPTIO we wszystkich przypadkach niweluje stymulujący efekt NO [28]. Prezentowane powyżej dane dowodzą uczestnictwa egzogenego NO w regulacji kiełkowania nasion różnych roślin.

#### 4. TLENEK AZOTU JEST SYNTETYZOWANY W NASIONACH W CZASIE KIEŁKOWANIA

Rośliny nie tylko reagują na NO obecny w środowisku, ale także zdolne są do jego syntezy. Biosynteza tego gazu w tkankach roślinnych może zachodzić w różnych strukturach komórkowych [3, 8, 32, 60, 64]. Przypuszczalnie, większość NO w

komórkach roślin powstaje w wyniku reakcji katalizowanej przez zależną od NAD(P)H reduktazę azotanową (NR), chociaż nie można pominąć udziału w tym procesie również syntazy tlenku azotu (NOS) [18].

Istnieje szereg dowodów wskazujących na wzrost biosyntezy NO w nasionach podczas przerywania spoczynku i kiełkowania. Produkcja NO w osi zarodkowej kiełkujących nasion sorgo została stwierdzona przy użyciu metody elektronowego rezonansu paramagnetycznego (EPR) [62]. Autorzy tej pracy określili ponadto drogi syntezy NO w osiach zarodkowych sorgo. Zaobserwowali oni, że wzrost emisji NO był skorelowany ze wzrostem aktywności NR pomiędzy 24 a 30 godziną imbibicji nasion w obecności  $\text{NO}_3^-$ . W tym samym czasie występowało też maksimum aktywności NADPH-diaforazy wrażliwej na L-NAME (inhibitor NOS). Wyniki te sugerują istotną rolę obu enzymów (NR i NOS) w produkcji NO we wczesnych etapach kiełkowania nasion sorgo. Kilka lat wcześniej pierwszej próby wykrycia NO przy zastosowaniu tej samej metody dokonali Giba i wsp. [26], wykazując nieznaczną produkcję NO po 3 godzinnej inkubacji napęczniałych nasion paulownii cesarskiej w 1 mM roztworze nitrogliceryny.

Produkcję endogennego NO w czasie kiełkowania nasiona prosa stwierdzono również oznaczając emisję NO metodą fluorescencyjną [61]. Fluorescencja ze znacznikiem fluorescencyjnym dla NO (DAF-FM DA) była obserwowana zarówno dla nasion kiełkujących w wodzie, jak też dla nasion poddanych działaniu SNP lub katechiny z azotanami (źródło NO). Najwyższą fluorescencję obserwowano w końcowej fazie kiełkowania i zaraz po przebicciu okrywy nasiennej przez korzeń zarodkowy [61]. Obecność zmiatacza NO – PTIO powodowała zanik sygnału fluorescencyjnego w wszystkich badanych nasionach. Podobnie, zwiększoną emisję NO (zmierzoną metodą fluorescencyjną) po 30 godzinach imbibicji nasion jęczmienia (*Hordeum vulgare*) obserwowali Desel i Krupińska [20]. Jednocześnie wykazali oni korelację pomiędzy emisją NO i zawartością  $\gamma$ -tokoferolu w nasionach. Zaobserwowali, że ilość emitowanego NO jest odwrotnie proporcjonalna do zawartości  $\gamma$ -tokoferolu w tkance. Sugeruje to, że  $\gamma$ -tokoferol w nasionach może pełnić funkcję zmiatacza NO, a obecność tokoferoli może modulować znaczenie NO jako czynnika regulacyjnego w procesie kiełkowania nasion.

Przedstawione dane dostarczają argumentów przemawiających na korzyść poglądu, w myśl którego tlenek azotu może być uważany za endogenną cząsteczkę o charakterze sygnałowym uczestniczącą w regulacji kiełkowania nasion. Nie można ponadto wykluczyć, że podobną rolę może pełnić jon peroksynitrylowy (nadtlenoazotyn –  $\text{ONOO}^-$ ) powstający w reakcji NO z anionorodnikiem ponadtlenkowym, tym bardziej że wzrostowi aktywności oddechowej we wczesnych etapach kiełkowania towarzyszy wyrzut reaktywnych form tlenu (RFT) [1]. Obszerną pracę przeglądową w języku polskim na temat roli RFT w procesie kiełkowania nasion znajdzie zainteresowany Czytelnik w Postęпах Biologii Komórki [68]. Zatem, NO może współuczestniczyć z RFT w regulacji kiełkowania, a notowany brak emisji NO tuż przed pojawieniem się korzenia zarodkowego u nasion niektórych gatunków roślin może być wynikiem tworzenia nadtlenoazotynów.

## 5. MECHANIZM DZIAŁANIA TLENKU AZOTU W REGULACJI KIEŁKOWANIA NASION

Znanych jest szereg czynników egzogennych (światło, temperatura, wilgotność) i endogennych (fitohormony), biorących udział w regulacji ustępowania spoczynku i kiełkowania nasion. Podczas ustępowania spoczynku maleje stężenie ABA, a zwiększa się zawartość giberelin i cytokinin w wielu nasionach [46]. Ważnym hormonem uczestniczącym w regulacji kiełkowania nasion jest również etylen [43]. Przy czym, obserwuje się ścisłą zależność pomiędzy wzrostem biosyntezy etylenu i spadkiem wrażliwości na endogenne ABA w kiełkujących nasionach [46]. Wzrost wydzielania etylenu następuje najczęściej w ostatniej fazie kiełkowania nasion wielu gatunków roślin [46]. Sugeruje się udział tego hormonu w regulacji procesów istotnych dla kiełkowania (*germination „sensu stricto”*), jak również procesu wzrostu (*post-germination*) młodej rozwijającej się siewki.

Stymulacja kiełkowania nasion przez NO została wykazana dla nasion wrażliwych na światło, takich jak: sałata czy paulownia (rozdział 3). Stymulacja kiełkowania tych nasion zachodzi pod wpływem światła czerwonego (R, o długości fali 660 nm), efekt ten ulega odwróceniu po naświetlaniu światłem dalekiej czerwieni (FR, o długości fali 730 nm). Giba i wsp. [25] sugerują wpływ NO na kiełkowanie nasion fotoblastycznych za pośrednictwem fitochromu – receptora światła R i FR, występującego w pięciu różnych typach, oznaczonych literami A, B, C, D i E [65]. Wrażliwość nasion na światło może być regulowana przez dwa mechanizmy:

(i) światło stymuluje biosyntezę giberelin lub zwiększa wrażliwość nasion na gibereliny za pośrednictwem fitochromów albo

(ii) światło (przez układ fitochromów) lub giberelina wpływa na zawartość ABA w nasionach (przez regulację biosyntezy lub katabolizmu ABA).

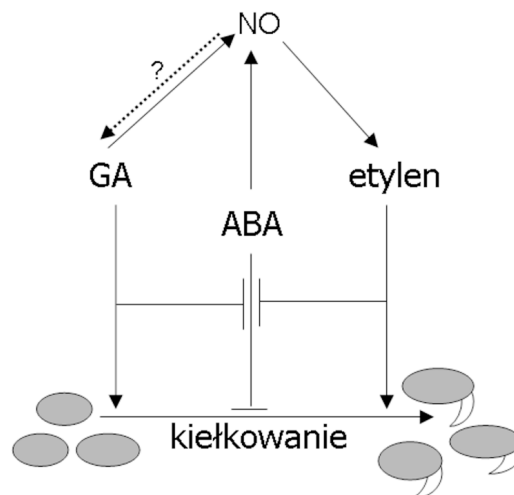
Badania z zastosowaniem mutantów *Arabidopsis* niezdolnych do syntezy fitochromu A lub fitochromu B, albo też podwójnych mutantów wykazały, że regulacja kiełkowania przez NO może odbywać się za pośrednictwem fitochromu A [4]. Batak i wsp. [4] postulują, że mechanizm działania NO w tym przypadku może polegać na indukcji S-nitrozylacji apoproteiny fitochromu A lub też, że takiej modyfikacji ulegają inne białka zaangażowane w fitochromowy szlak transdukcji sygnału. Ponadto, mechanizm działania NO w tym przypadku może być związany ze stymulacją syntezy cyklicznego guanyzynomonofosforanu (cGMP), którego biosynteza jest regulowana przez NO w reakcji roślin na patogeny [21]. Jednocześnie wiadomo, że cząsteczka ta występuje w szlaku transdukcji sygnału uruchamianym przez fitochrom A [25]. Interesującą próbę określenia współdziałania NO i gibereliny w procesie kiełkowania nasion *Paulownia tomentosa* i *Stellaria media* podjęli Jovanovic i wsp. [41], stosując azotyn kwasu giberelinowego ( $nGA_3$ ), mający dwie grupy -O-NO w miejscu grup hydroksylowych. Nasiona paulownii do indukcji kiełkowania bezwzględnie wymagają oświetlenia światłem czerwonym, podczas gdy nasiona *S. media* kiełkują również w ciemności.  $GA_3$  może zastąpić działanie światła w przypadku nasion paulownii, umożliwiając ich kiełkowanie w

ciemności, natomiast  $GA_3$  jest nieefektywna w przypadku kiełkowania nasion *S. media*.  $nGA_3$  stymulował kiełkowanie nasion paulownii, tylko po oświetleniu światłem czerwonym (puls 10 min.), co sugeruje aktywność tej substancji jako donora NO; podobną indukcję kiełkowania obserwowano w obecności SNP lub nitrogliceryny. Dodatkowo,  $nGA_3$  stymulował kiełkowanie nasion *S. media* w ciemności, mimo że nasiona te są niewrażliwe na gibereliny. Działanie  $nGA_3$  w tym przypadku, jak sugerują autorzy, wynikało z aktywności  $nGA_3$  jako donora NO i współdziałania NO z aktywną formą fitochromu obecną w nasionach [41].

Powiązanie pomiędzy  $GA_3$  a NO były rozpatrywane również w kiełkujących ziarniakach zbóż [69]. Gibereliny stymulują syntezę *de novo*  $\alpha$ -amylazy w warstwie aleuronowej ziarniaków podczas kiełkowania [65]. Wzrost aktywności  $\alpha$ -amylazy w kiełkujących ziarniakach poprzedza wzrost aktywności  $\beta$ -amylazy, która w przeciwieństwie do  $\alpha$ -amylazy jest obecna w dojrzałym nasieniu w formie związanej (nieaktywnej). Zhang i wsp. [69] wykazali, że stymulujący efekt NO na kiełkowanie pszenicy (*Triticum aestivum*) jest związany z indukcją  $\beta$ -amylazy podczas pierwszych 12 godzin kiełkowania. SNP powodował wzrost aktywności tylko  $\beta$ -amylazy, nie wpływając na aktywność  $\alpha$ -amylazy, równocześnie nie obserwowano wzrostu aktywności  $\beta$ -amylazy w odpowiedzi na  $GA_3$ . Autorzy uważają, że działanie NO w tym przypadku może polegać na stymulacji uwalniania aktywnego enzymu z form związanych [69]. Na podstawie prezentowanych wyników badań można przypuszczać, że NO może działać jako stymulator aktywności  $\beta$ -amylazy we wczesnej (inicjalnej) fazie kiełkowania ziarniaków, podczas gdy gibereliny regulują procesy zachodzące w późniejszych fazach kiełkowania. Jednocześnie badania Bethke i wsp. [8] wykazały syntezę NO drogą nieenzymatyczną w warstwie aleuronowej ziarniaków jęczmienia (*Hordeum vulgare*) traktowanych gibereliną oraz zaobserwowano wzrost aktywności  $\alpha$ -amylazy w warstwie aleuronowej ziarniaków [5]. Wydaje się więc, że NO może działać jako czynnik koordynujący w czasie metaboliczną aktywację osi zarodkowej, tarczki i warstwy aleuronowej. NO z uwagi na stosunkowo krótki czas trwania może pełnić funkcję sygnału krótkoterminowego, podczas gdy hormony roślinne, np. giberelina lub ABA, mogłyby działać jako czynniki długoterminowe [8].

Obserwuje się wyraźne podobieństwo działania NO i cyjanowodoru (HCN) w regulacji przerywania spoczynku i kiełkowania nasion różnych gatunków roślin [10, 12, 16]. Wyniki badań przeprowadzonych dotychczas w naszym laboratorium wykazały, że HCN stymuluje kiełkowanie spoczynkowych zarodków jabłoni poprzez zwiększenie emisji etylenu, czemu towarzyszy wzrost transkrypcji genów kodujących dwa kluczowe enzymy szlaku biosyntezy etylenu (syntazę ACC i oksydazę ACC) (dane własne niepublikowane). Ponadto, krótkotrwale traktowanie zarodków jabłoni HCN stymuluje produkcję wolnych rodników tlenowych [15]. Przejściowy wzrost stężenia RFT jest warunkiem koniecznym dla prawidłowego przebiegu procesu kiełkowania [1] i odpowiada za wzrost stężenia białek utlenionych w kiełkujących nasionach, co z kolei może być niezbędne do rozpoczęcia wzrostu siewki [40]. Wyniki badań prowadzonych w naszym laboratorium wskazują, że rola NO w regulacji przerywania głębokiego spoczynku zarodków jabłoni może być, podobnie jak w przypadku działania HCN, związana

ze zmianami w zawartości fitohormonów w tkance. Krótkotrwałe działanie donorem NO powoduje stymulację kiełkowania zarodków jabłoni, której towarzyszy wzmożona emisja etylenu [28]. Jednocześnie obniża się wrażliwość tych zarodków na egzogeny ABA [28]. Ponadto obserwuje się zwiększoną zawartość  $H_2O_2$  w zarodkach traktowanych NO po pierwszych 24 godzinach kiełkowania, co może sugerować współdziałanie NO i  $H_2O_2$  w przełamaniu spoczynku badanych nasion (dane własne niepublikowane). Dochodzi też do wzrostu zawartości transkryptów genów kodujących ACS i ACO w zarodkach jabłoni po 2 dniach od traktowania SNAP lub SNP (dane własne, niepublikowane). Podobny wzrost transkrypcji genów kodujących białka ACS i ACO w odpowiedzi na SNP zaobserwowano w siewkach *A. thaliana* [57]. Sugierowane powiązanie pomiędzy NO i hormonami roślinnymi w regulacji kiełkowania nasion przedstawiono na rycinie 1.



RYCINA 1. Regulacja przełamania spoczynku i kiełkowania nasion przez NO i hormony roślinne (gibereliny, ABA, etylen). Giberelina i ABA stymulują syntezę NO drogą nieenzymatyczną w kwaśnym pH i obecności jonów  $NO_2^-$ . NO stymuluje biosyntezę etylenu. Etylen obniża wrażliwość nasion na ABA

## PODSUMOWANIE I PERSPEKTYWY

Ostatnie lata przyniosły wiele doniesień na temat udziału NO w regulacji procesu kiełkowania nasion. We wczesnych etapach kiełkowania obserwuje się wzrost produkcji NO w nasionach. Stwierdzono również, że egzogeny NO przerywa spoczynek i umożliwia kiełkowanie nasion wielu gatunków roślin. Istnieją też przesłanki wskazujące na synergistyczne działanie NO i światła w regulacji kiełkowania nasion fotoblastycznych. Stwierdzono także ścisłe współdziałanie NO z hormonami roślinnymi (ABA, etylen i gibereliny) uczestniczącymi w regulacji kiełkowania. Nadal jednak mechanizm działania NO w regulacji przełamania spoczynku i kiełkowania nie jest w pełni poznany. Prawdopodobnie zastosowanie szeregu mutantów niewrażliwych na fitohormony lub niezdolnych do ich syntezy pozwoli w przyszłości na poznanie dróg współdziałania i wzajemnych zależności pomiędzy NO a hormonami roślinnymi w regulacji procesu kiełkowania nasion.

Wydaje się jednak, że kluczem do odpowiedzi na pytanie dotyczące mechanizmu działania NO w regulacji procesów fizjologicznych w organizmach roślinnych byłyby

identyfikacja docelowego miejsca działania tej cząsteczki. Najczęściej typowanymi białkami mogącymi pełnić tę funkcję są: katalaza, hemoglobina, oksydaza cytochromu c, cyklaza guanylanowa, a także peroksydazy i dysmutazy ponadtlenkowe [11]. Hemoglobina jest niezwykle interesująca ze względu na zdolność wiązania NO [39, 59], tym bardziej że obecność tzw. niesymbiotycznych hemoglobin wykazano w nasionach [38]. Szlak transdukcji sygnału uruchamianego przez NO został poznany w przypadku odpowiedzi roślin na atak patogenu. Uwzględnia on współdziałanie NO z wtórnymi przekaźnikami sygnałowymi, takimi jak: cGMP i cADPR (cADP-ryboza) oraz jony  $\text{Ca}^{2+}$  [21]. Podobnie, Giba i wsp. [26] sugerują, że współdziałanie NO i fitochromu w regulacji kiełkowania nasion wymaga aktywacji cyklazy guanylanowej przez NO, chociaż brak jak na razie danych jednoznacznie potwierdzających tę hipotezę. Nie do końca poznane jest również współdziałanie NO i RFT w regulacji procesu kiełkowania. Można przypuszczać, że modyfikacja aktywności białek przez NO może zachodzić bezpośrednio przez S-nitrozylację lub nitrację, albo też wyrzut ROS w odpowiedzi na NO może prowadzić do utleniania niektórych białek, istotnych dla procesu kiełkowania. Wskazują na to zmiany profilu białek utlenionych w nasionach słonecznika kiełkujących po krótkotrwałym traktowaniu ich HCN i RFT [56]. Stąd też, niezwykle interesujące byłoby zbadanie profilu białek utlenionych w nasionach, których kiełkowanie jest stymulowane w obecności donorów NO.

## LITERATURA

- [1] BAILLY C. Active oxygen species and antioxidants in seed biology. *Seed Sci Res* 2004; **14**: 93–107.
- [2] BALDWIN IT, PRESTON CA, KROCK B. Smoke and mirrors: reply to Fotheringham and Keeley. *Seed Sci Res* 2005; **15**: 373–375.
- [3] BARROSO JB, CORPAS FJ, CARRERAS A, SANDALIO LM, VALDERRAMA R, PALMA JM, LUPIA-NEZ JA, del RIO LA. Localization of nitric oxide synthase in plant peroxisomes. *J Biol Chem* 1999; **274**: 36729–36733.
- [4] BATAK I, DEVIC M, GIBA Z, GRUBISIC D, POFF KL, KONJEVIC R. The effect of potassium nitrate and NO-donors on phytochrome A- and phytochrome B-specific induced germination of *Arabidopsis thaliana* seeds. *Seed Sci Res* 2002; **12**: 253–259.
- [5] BELIGNI MV, FATH A, BETHKE PC, LAMATTINA L, JONES RL. Nitric oxide acts as an antioxidant and delays programmed cell death in barley aleurone layers. *Plant Physiol* 2002; **129**: 1642–1650.
- [6] BELIGNI MV, LAMATTINA L. Nitric oxide stimulates seed germination and de-etiolation, and inhibits hypocotyls elongation, three light-inducible responses in plants. *Planta* 2000; **210**: 215–221.
- [7] BELIGNI MV, LAMATTINA L. Nitric oxide: a non traditional regulator of plant growth. *Trends Plant Sci* 2001; **6**: 508–509.
- [8] BETHKE PC, BADGER MR, JONES R. Apoplastic synthesis of nitric oxide by plant tissues. *Plant Cell* 2004; **16**: 332–341.
- [9] BETHKE PC, GUBLER F, JACOBSEN JV, JONES RL. Dormancy of *Arabidopsis* seeds and barley grains can be broken by nitric oxide. *Planta* 2004; **219**: 847–855.
- [10] BETHKE PC, LIBOUREL IGL, JONES RL. Nitric oxide reduces seed dormancy in *Arabidopsis*. *J Exp Bot* 2006; **57**: 517–526.
- [11] BETHKE PC, LIBOUREL IGL, JONES RL. Nitric oxide in seed dormancy and germination. W: Bradford K, Nonogaki H [red.] *Seed Development, Dormancy and Germination. Blackwell Publishing* 2007: 153–175.

- [12] BETHKE PC, LIBOUREL IGL, REINOHL V, JONES RL. Sodium nitroprusside, cyanide, nitrite and nitrate break *Arabidopsis* seed dormancy in a nitric oxide-dependent manner. *Planta* 2006; **223**: 805–812.
- [13] BEWLEY JD. Seed germination and dormancy. *Plant Cell* 1997; **9**: 1055–1066.
- [14] BOGATEK R, DZIEWANOWSKA K, LEWAK St. Hydrogen cyanide and embryonal dormancy in apple seeds. *Physiol Plant* 1991; **83**: 417–421.
- [15] BOGATEK R, GAWROŃSKA H, ORACZ K. Involvement of oxidative stress and ABA in CN-mediated elimination of embryonic dormancy in apple. W: Nicolas G, Bradford KJ, Come D, Pritchard HW [red.] *The Biology of Seeds: Recent Research Advances*, CABI Publishing 2003: 211–216.
- [16] BOGATEK R, GNIAZDOWSKA A. Nitric oxide and HCN reduce deep dormancy of apple seeds. *Acta Physiol Plant* 2006; **28**: 281–287.
- [17] COLLIVIER BB, STEPHENSON T. Production of nitrogen oxide and dinitrogen oxide by autotrophic nitrifiers. *Biotechnol Adv* 2000; **18**: 219–232.
- [18] CRAWFORD NM. Mechanisms for nitric oxide synthesis in plants. *J Exp Bot* 2006; **57**: 471–478.
- [19] DELLEDONNE M, XIA Y, DIXON RA, LAMB C. Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature* 1998; **394**: 585–588.
- [20] DESEL C, KRUPINSKA K. The impact of tocopherols on early seedling development and NO release. *J Plant Physiol* 2005; **162**: 771–776.
- [21] DURNER J, WENDEHENNE D, KLESSIG DF. Defense gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP and cyclic ADP-ribose. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**: 10328–10333.
- [22] FLORYSZAK-WIECZOREK J, MILCZAREK G, ARASIMOWICZ M, CISZEWSKI A. Do nitric oxide donors mimic endogenous NO-related response in plants? *Planta* 2006; **224**: 1363–1372.
- [23] FRENEY JR. Emission of nitrous oxide from soils used for agriculture. *Nutr Cycling Agroecosys* 1997; **49**: 1–6.
- [24] GIBA Z, GRUBISIC D, KONJEVIC R. Sodium nitroprusside-stimulated germination of common chick weed (*Stellaria media* L.) seeds. *Arch Biol Sci* 1992; **44**: 17P–18P.
- [25] GIBA Z, GRUBISIC D, KONJEVIC R. Nitrogen oxides as environmental sensors for seeds. *Seed Sci Res* 2003; **13**: 187–196.
- [26] GIBA Z, GRUBISIC D, TEODOROVIC S, SAJC L, STOJAKOVIC D, KONJEVIC R. Effect of nitric oxide-releasing compounds on phytochrome-controlled germination of Empress tree seeds. *Plant Growth Regul* 1998; **26**: 175–181.
- [27] GNIAZDOWSKA A. Rola tlenku azotu w metabolizmie komórki roślinnej. *Kosmos* 2004; **53**: 343–353.
- [28] GNIAZDOWSKA A, DOBRZYŃSKA U, BABĄŃCZYK T, BOGATEK R. Breaking of apple embryo dormancy by nitric oxide involves stimulation of ethylene production. *Planta* 2007; **225**: 1051–1057.
- [29] GOLDSTEIN S, RUSSO A, SAMUNI A. Reactions of PTIO and carboxy-PTIO with NO, NO<sub>2</sub> and O<sub>2</sub>. *J Biol Chem* 2003; **278**: 50949–50955.
- [30] GRUBISIC D, KONJEVIC R. Light and nitrate interaction in phytochrome-controlled germination of *Paulownia tomentosa* seeds. *Planta* 1990; **181**: 239–243.
- [31] GRUN S, LINDERMAYR C, SELL S, DURNER J. Nitric oxide and gene regulation in plants. *J Exp Bot* 2006; **57**: 507–516.
- [32] GUPTA KJ, STOIMENOVA M, KAISER WM. In higher plants, only root mitochondria, but not leaf mitochondria reduce nitrite to NO, *in vitro* and *in situ*. *J Exp Bot* 2005; **56**: 2601–2609.
- [33] HE Y, TANG RH, HAO Y, STEVENS RD, COOK CW, AHN SM, JING L, YANG Z, CHEN L, GUO F, FIORANI F, JACKSON RB, CRAWFORD NM, PEI Z-M. Nitric oxide represses the *Arabidopsis* floral transition. *Science* 2004; **305**: 1968–1971.
- [34] HSU YT, KAO CH. Cadmium toxicity is reduced by nitric oxide in rice leaves. *Plant Growth Regul* 2004; **42**: 227–238.
- [35] HU X, NEILL SJ, TANG Z, CAI W. Nitric oxide mediates gravitropic bending in soybean roots. *Plant Physiol* 2005; **137**: 663–670.
- [36] HUANG X, STETTMAIER K, MICHEL C, HUTZLER P, MUELLER MJ, DURNER J. Nitric oxide is induced by wounding and influences jasmonic acid signaling in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 2004; **215**: 914–923.
- [37] HUANG X, von RAD U, DURNER J. Nitric oxide induces transcriptional activation of the nitric oxide-tolerant alternative oxidase in *Arabidopsis* suspension cells. *Planta* 2002; **215**: 914–923.
- [38] HUNT PW, WATTS RA, TREVASKIS B, LIEWELYN DJ, BURNELL J, DENNIS ES, PEACOCK WJ. Expression and evolution of functionally distinct haemoglobin genes in plants. *Plant Mol Biol* 2001; **47**: 677–692.

- [39] IGAMBERDIEV AU, BARON K, MANAC'H-LITTLE N, STOIMENOVA M, HILL RD. The haemoglobin/nitric oxide cycle: Involvement in flooding stress and effects on hormone signaling. *Ann Bot* 2005; **96**: 557–564.
- [40] JOB C, RAJJOU L, LOVIGNY Y, BELGHAZI M, JOB D. Patterns of protein oxidation in *Arabidopsis* seeds and during germination. *Plant Physiol* 2005; **138**: 790–802.
- [41] JOVANOVIĆ V, GIBA Z, DJOKOVIĆ D, MILOSAVLEVIĆ S, GRUBISIC D, KONJEVIĆ R. Gibberellic acid nitrite stimulates germination of two species of light-requiring seeds via the nitric oxide pathway. *Ann NY Acad Sci* 2005; **1048**: 476–481.
- [42] KEELEY JE, FOTHERINGHAM CJ. Trace gas emissions and smoke-induced seed germination. *Science* 1997; **276**: 1248–1250.
- [43] KĘPCZYŃSKI J, KĘPCZYŃSKA E. Znaczenie etylenu w ustępowaniu spoczynku i kiełkowaniu nasion. *Kosmos* 2000; **49**: 246–247.
- [44] KOPYRA M, GWÓŹDŹ EA. Nitric oxide stimulates seed germination and counteracts the inhibitory effect of heavy metals and salinity on root growth of *Lupinus luteus*. *Plant Physiol Biochem* 2003; **41**: 1011–1017.
- [45] KOPYRA M, GWÓŹDŹ EA. Rola tlenu azotu w odpowiedzi roślin na stresy środowiskowe. W: Na Pograniczu Chemii i Biologii, Tom XII, Korniak H, Barciszewski J (red.) Wydawnictwo Naukowe UAM 2005: 355–367.
- [46] KUCERA B, COHN MA, LEUBNER-METZGER G. Plant hormone interactions during seed dormancy release and germination. *Seed Sci Res* 2005; **15**: 281–307.
- [47] LAMATTINA L, GARCIA-MATA C, GRAZIANO M, PAGNUSSAT G. Nitric oxide: The versatility of an extensive signal molecule. *Annu Rev Plant Biol* 2003; **54**: 109–136.
- [48] LESHEM YY, WILLS RBH, KU VVV. Evidence for the function of the free radical gas – nitric oxide (NO) – as an endogenous maturation and senescence regulating factor in higher plants. *Plant Physiol Biochem* 1998; **36**: 825–833.
- [49] LEWAK St. Regulatory pathways in removal of apple seed dormancy. *Acta Horticulturae* 1981; **120**: 149–159.
- [50] LI W, LIU X, KHAN MA, KAMIYA Y, YAMAGUCHI S. Hormonal and environmental regulation of seed germination in flaxweed (*Descurainia sophia*). *Plant Growth Regul* 2005; **45**: 199–207.
- [51] LI W, LIU X, KHAN MA, KAMIYA Y, YAMAGUCHI S. The effect of plant growth regulators, nitric oxide, nitrate, nitrite and light on the germination of dimorphic seeds of *Suaeda salsa* under saline conditions. *J Plant Res* 2005; **118**: 207–214.
- [52] LIBOUREL IGL, BETHKE PC, DE MICHELE R, JONES RL. Nitric oxide gas stimulates germination of dormant *Arabidopsis* seeds: use of flow-through apparatus for delivery of nitric oxide. *Planta* 2006; **223**: 813–820.
- [53] LOMBARDO MC, GRAZIANO M, POLACCO JC, LAMATTINA L. Nitric oxide functions as positive regulator of root hair development. *Plant Signal Behav* 2006; **1**: 18–33.
- [54] MATKOWSKI A. Tlenek azotu u roślin. *Post Biol Kom* 2002; **29**: 613–626.
- [55] NEILL SJ, DESICAN R, CLARKE A, HANCOCK JT. Nitric oxide is a novel component of abscisic acid signaling in stomatal guard cells. *Plant Physiol* 2002; **128**: 13–16.
- [56] 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 of seed dormancy alleviation. *Plant J* 2007; **50**: 452–465.
- [57] PARANI M, RUDRABHATLA S, MYERS R, WEIRICH H, SMITH B, LEAMAN DW, GOLDMAN SL. Microarray analysis of nitric oxide responsive transcripts in *Arabidopsis*. *Plant Biotech J* 2004; **2**: 359–366.
- [58] PAGNUSSAT GC, LANTERI ML, LAMATTINA L. Nitric oxide and cyclic GMP are messengers in the indole acetic acid-induced adventitious rooting process. *Plant Physiol* 2003; **32**: 1241–1248.
- [59] PERAZZOLLI M, ROMERO-PUERTAS MC, DELLEDONNE M. Modulation of nitric oxide bioactivity by plant haemoglobins. *J Exp Bot* 2006; **57**: 479–488.
- [60] RIBEIRO JR EA, CUNHA FQ, TAMASHIRO WM, MARTINS IS. Growth phase-dependent subcellular localization of nitric oxide synthase in maize cells. *FEBS Letters* 1999; **445**: 283–286.
- [61] SARATH G, BETHKE PC, JONES R, BAIRD LM, HOU G, MITCHELL RB. Nitric oxide accelerates seed germination in warm-season grasses. *Planta* 2006; **223**: 1154–1164.
- [62] SIMONTACCHI M, JASID S, PUNTARULO S. Nitric oxide generation during early germination of sorghum seeds. *Plant Sci* 2004; **167**: 839–847.

- [63] STAŃCZYK K. Powstawanie i emisja tlenku azotu w procesie spalania węgla i karbonizatów. Wydawnictwo Naukowe GIG 2002.
- [64] STOHR C, STUBE F, MARX G, ULLRICH WR, ROCKEL P. A plasma membrane-bound enzyme of tobacco roots catalyses the formation of nitric oxide from nitrite. *Planta* 2001; **212**: 835–841.
- [65] TAIZ L, ZEIGER E. 2005. Plant Physiology. Third Edition. Sinauer Associates, Inc., Publishers Sunderland, Massachusetts 2002: 375–402.
- [66] UCHIDA A, JAGENDORF AT, HIBINO T, TAKABE T, TAKABE T. Effects of hydrogen peroxide and nitric oxide on both salt and heat stress tolerance in rice. *Plant Sci* 2002; **163**: 515–523.
- [67] WENDEHENNE D, PUGIN A, KLESSIG DF, DURNER J. Nitric oxide: comparative synthesis and signaling in animal and plant cells. *Trends Plant Sci* 2001; **6**: 177–183.
- [68] WOJTYŁA Ł, GARNCZARSKA M, RATAJCZAK L. Rola reaktywnych form tlenu w procesie rozwoju i kiełkowania nasion. *Post Biol Kom* 2006; **33**: 543–553.
- [69] ZHANG H, SHEN W-B, ZHANG W, XU L-L. A rapid response of  $\alpha$ -amylase to nitric oxide but not gibberelin in wheat seeds during the early stage of germination. *Planta* 2005; **220**: 708–716.
- [70] ZHANG Y, WANG L, LIU Y, ZHANG Q, WEI Q, ZHANG W. Nitric oxide enhances salt tolerance in maize seedlings through increasing activities of proton-pump and  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiport in the tonoplast. *Planta* 2006; **224**: 545–555.
- [71] ZHANG L, WANG Y, ZHAO L, SHI S, ZHANG L. Involvement of nitric oxide in light-mediated greening of barley seedlings. *J Plant Phys* 2006; **163**: 818–826.

*Redaktor prowadzący – Maria Olszewska*

*Otrzymano: 18.04. 2007 r.*

*Przyjęto: 11.06. 2007 r.*

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

*e-mail: agnieszka\_gniazdowska@sggw.pl.*