

## MANIPULACJE GENOWE WZMACNIAJĄCE STRES OKSYDACYJNY I ODPOWIEDŹ ANTYOKSYDACYJNĄ ROŚLIN W RÓŻNYCH WARUNKACH ŚRODOWISKA

*Renata Bączek-Kwinta*

Katedra Fizjologii Roślin, Akademii Rolniczej im. H. Kołłątaja w Krakowie

### Wstęp

Wprowadzenie do upraw roślin modyfikowanych genetycznie (GM) przynosi coraz więcej korzyści, niezależnie od kontrowersji dotyczących potencjalnie szkodliwego wpływu transformantów na stan ekosystemów i zdrowie konsumentów. Nowe rośliny GM często charakteryzują się zwiększoną możliwością obrony przed czynnikami środowiskowymi. Genetyczne podłoże odporności na stres abiotyczny (chłód, mróz, suszę, zanieczyszczenia atmosferyczne, glebowe i inne czynniki) może wiązać się ze zmianami obejmującymi elementy enzymatyczne i nieenzymatyczne systemu przeciwutleniaczy, jako że nadprodukcja (re)aktywnych form tlenu (RFT) takich jak  $^1O_2$ ,  $O_2^{\cdot-}$ ,  $H_2O_2$ ,  $^{\cdot}OH$  i rodników lipidowych jest wspólnym zjawiskiem podczas reakcji roślin na te czynniki [FOYER i in. 1997]. Natomiast w celu zintensyfikowania reakcji obronnej roślin przeciwko patogenom, metodami inżynierii genetycznej wzmacnia się procesy oksydacyjne komórek określane jako wybuch oksydacyjny.

### Nadekspresja genów SOD

Większość doniesień dotyczących roślin transgenicznych odpornych na stres tlenowy dotyczy nadekspresji genów kodujących enzym SOD (dysmutazę ponadtlenkową), co zapewne uzasadnione jest faktem, iż białko to funkcjonuje na „pierwszej linii obrony” przed nadmiarem wolnych rodników. Unieszkodliwia bowiem anionorodnik ponadtlenkowy  $O_2^{\cdot-}$  powstający jako pierwsza (często też wtórna) reaktywna forma tlenu tworząca się bezpośrednio z  $O_2$ . SOD występuje w postaci trzech rodzin we wszystkich organellach komórkowych, wykryto ją także w przestrzeni intercelularnej, można więc przypuszczać, że wprowadzenie nowego genu wzmocni antyoksydacyjną odpowiedź komórki, a to zaowocuje pożądanym rezultatem w postaci minimalizacji skutków stresu oksydacyjnego. W wielu przypadkach uzyskano obiecujące wyniki. Jednym z pierwszych doniesień o

udanym eksperymencie przeprowadzonym *in planta* była praca SEN GUPTY i in. [1993], dotycząca wpływu nadekspresji cDNA kodującego Cu/ZnSOD na zmniejszenie uszkodzeń fotoinhibicyjnych tytoniu wywołanych współdziałaniem chłodu i intensywnego oświetlenia. Skrzyżowanie transformantów Cu/ZnSOD z również transgeniczną linią o podwyższonej aktywności reduktazy glutationowej zwiększyło tolerancję badanych okazów na herbicyd fotodynamiczny – parakwat [AONO i in. 1995]. Wprowadzenie manganowej izoformy SOD do tkanek lucerny zadziałało ochronnie na rośliny poddane suszy glebowej [MCKERSIE i in. 1996]. Podobny efekt wywołała nadekspresja genu kodującego rzadką u roślin izoformę należącą do rodziny Fe-SOD w chloroplastach tego gatunku [VAN CAMP i in. 1996], a w przypadku kukurydzy GM zanotowano wzrost odporności na stres oksydacyjny wywołany przez wiologen metylu (MV) [VAN BREUSEGEM i in. 1999a]. Uzyskano też (w 2–3-letnich doświadczeniach polowych) zwiększoną zimotrwałość lucerny i podwyższony plon zielonki roślin z wbudowaną kopią genu Mn- i Fe-SOD [MCKERSIE i in. 1999, 2000], chociaż nastąpiło to przy braku bezpośredniego wpływu nowego białka na poziom wytwarzanych podczas mrozu anionorodników ponadtlenkowych i stan uszkodzeń wywołanych ujemną temperaturą. Mechanizm wpływu „dodatkowej” SOD na reakcję systemu antyutleniaczy wyjaśnili jednak VAN CAMP i in. [1996], którzy wykazali, że badana izoforma rodziny żelazowej SOD ze względu na chloroplastowe pochodzenie charakteryzuje się większą zdolnością do elektrostatycznego przyłączania do błon chloroplastów niż mitochondrialna dysmutaza manganowa. Wywołuje to różne właściwości nowych enzymów – FeSOD, umiejscowiona w pobliżu źródła anionorodnika ponadtlenkowego jakim są fotosystemy, chroni zarówno membrany komórkowe, jak i strömę przed tymi rodnikami, podczas gdy MnSOD posiada jedynie zdolność do zapobiegania ich rozprzestrzenianiu, przeciwdziałając uszkodzeniom błon i wpływowi jonów z komórek. Wydaje się jednak, iż odporność krzyżowa roślin poprzez nadprodukcję białek FeSOD jest trudna do uzyskania, gdyż izoforma ta chroni rośliny kukurydzy przed działaniem metylwiologenu, lecz nie polepsza ich odporności na chłód, podobnie transgeniczny tytoń niewrażliwy na MV jest nieodporny na zasolenie podłoża [VAN CAMP i in. 1996].

Zwiększenie chłodoodporności kukurydzy poprzez nadekspresję cDNA dysmutaz i reduktazy glutationowej nie zostało dotychczas uzyskane. System antyoksydacyjny liści tej rośliny jest rozdzielony pomiędzy mezofil i pochwę wokółwiązkową. Paradoksalnie, pomimo obecności tlenu w mezofilu SOD tam nie występuje, niezależnie od temperatury wegetacji roślin. Natomiast aktywność reduktazy glutationowej wykryto prawie wyłącznie w mezofilu [DOULIS i in. 1997]. Geny kodujące SOD i reduktazę glutationową (GR) – zarówno natywne jak i wprowadzane – podlegają ekspresji pod wpływem sygnałów metabolicznych specyficznych dla rodzaju tkanek fotosyntetycznych [KINGSTON-SMITH, FOYER 2000]. W miększu zieleniowym sygnałem takim jest NADPH wytwarzany przez fotosystem II (PS II), którego pozbawiona jest pochwa okołowiązkowa. Przewaga formy NADPH nad NADP<sup>+</sup> umożliwia translację transkryptów GR [PASTORI i in. 2000]. Nie udało się dotychczas wyjaśnić przyczyn braku natywnej SOD w mezofilu, natomiast niestabilność jej transkryptu i inhibicja promotora CaMV35S są, według VAN BREUSEGEMA i in. [1998] przyczyną niemożności wprowadzenia enzymu do tej tkanki. Nie można też wykluczyć zahamowania etapu translacji SOD, czyli mechanizmu podobnego do regulacji ekspresji GR w komórkach pochwy okołowiązkowej.

## Problemy ze stechiometrią

W badaniach nad poprawą odporności na stesy poprzez nadprodukcję enzymów katalizujących rozkład produktu dysmutaz ponadtlenkowych uzyskiwano pozytywne wyniki, jak np. w pracy MIYAGAWY i in. [2000], którzy wprowadzili gen kodujący bakteryjną katalazę do genomu chloroplastowego tytoniu, co wpłynęło ochronnie na aparat fotosyntetyczny badanych okazów podczas stresu fotooksydacyjnego. Podobny zabieg (wprowadzenie dodatkowej peroksydazy askorbinianowej do plastydów) nie zwiększył jednak odporności tych roślin na podwyższone stężenie ozonu [TORSETHAUGEN i in. 1997], gdyż okazało się, iż to nie aktywność zmiataczy  $H_2O_2$ , lecz dysmutaz była zbyt mała w stosunku do powstającego  $O_2^{\cdot -}$ . Zakłócenie równowagi pomiędzy produktami utleniania, tworzonymi na kolejnych etapach reakcji systemu antyoksydacyjnego, a możliwością ich rozkładu lub regeneracji, stanowi kolejny problem podczas konstruowania transformantów. Ilustrują to także eksperymenty polegające na podwyższaniu poziomu glutationu (GSH). Ten tripeptyd, wydajnie chroniący grupy sulfhydrylowe (tiolowe) białek przed oksydacją sam podlega utlenieniu, tworząc disulfid glutationowy (GSSG). Reakcja  $2GSH \rightarrow GSSG$  przebiega w różnych przedziałach komórkowych i często jest katalizowana przez peroksydazę glutationową. Regeneracja glutationu z disulfidu następuje przy udziale reduktazy glutationowej (GR). Równowaga dynamiczna pomiędzy utlenioną a zredukowaną formą GSH jest niezwykle istotna, indukując wiele genów związanych z odpornością [WINGATE i in. 1988], a niedobór tego peptydu zwiększa podatność komórek na uszkodzenia oksydacyjne [MAY, LEAVER 1993]. Przewaga formy GSH nad GSSG uzależniona jest natomiast od przewagi stężenia NADPH nad zawartością  $NADP^+$  [PASTORI i in. 2000]. Wprowadzenie do genomu roślinnego DNA kodującego  $\gamma$ -ECS – syntetazę gamma-glutamylcysteiny (prekursora glutationu) dało zadowalający rezultat w postaci ochrony doświadczalnych roślin topoli przed stresem oksydacyjnym [NOCTOR i in. 1996]. Jednak podobny zabieg nie zwiększył odporności siewek tych drzew na podwyższone stężenie kadmu w glebie – zarówno kontrola jak i GM wykazywały zahamowanie wzrostu. Nastąpiła natomiast intensyfikacja akumulacji Cd w roślinach [ARISI i in. 2000], co być może znajdzie zastosowanie praktyczne w fitoremediacji. Z kolei wprowadzenie kopii bakteryjnego genu syntetazy samego glutationu do komórek gorczycy (*Brassica juncea* (L.) CZERN.) podwyższyło odporność roślin na kadm, zwiększając nie tylko zawartość GSH, ale i innych tioli, a także fitochelatyn i wapnia [ZHU i in. 1999]. Ponieważ, jak już wspomniano, w przypadku glutationu istotna jest nie tylko jego zawartość, ale i możliwość regeneracji z GSSG, czyniono próby poprawiania odporności na niekorzystne warunki poprzez zwiększanie poziomu reduktazy glutationowej. AONO i in. [1995] uzyskali pozytywne wyniki u tytoniu z nadekspresją GR (lecz również SOD), natomiast podobny zabieg (nadekspresja GR i syntetazy glutationowej) podjęty w celu ochrony topoli przed toksycznym wpływem ozonu okazał się nieskuteczny [STROHM i in. 1999], a dodatkowa kopia genu kodującego GR w chloroplastach pomidora nie zwiększyła chłodoodporności badanych roślin [BRÜGGEMANN i in. 1999], gdyż w tym ostatnim przypadku podczas oddziaływania niskiej temperatury i słabego oświetlenia prawdopodobnie bardziej istotne dla komórek jest zapobieganie tworzeniu reaktywnych form tlenu niż ich zmiatanie. Obraz zależności pomiędzy wpływem proporcji GSH/GSSG a reakcją na stres zakłócają wyniki badań [ROXAS i in. 2000]. Autorzy ci wprowadzili do genomu tytoniu gen (również

z *Nicotiana tabacum* L.) kodujący S-transferazę glutationową o aktywności peroksydazy glutationowej (GST/GPX), uzyskując poprawę odporności roślin na niską (10°C) i wysoką temperaturę (30°C) oraz NaCl, zastosowane w fazie pęcznienia nasion. Korzystne oddziaływanie nadekspresji genu kodującego GST/GPX związane było ze wzrostem zawartości glutationu (GSH – formy zredukowanej!) i askorbinianu oraz indukcją aktywności peroksydazy askorbinianowej i reduktazy monodehydroaskorbinianowej. Zatem nowy enzym uaktywnił większość elementów cyklu askorbinianowo-glutationowego. Ponieważ jednak szkodliwe czynniki zastosowano w fazie pęcznienia, a reakcję antyoksydantów badano u 7-dniowych siewek, przypadek ten zdaje się wskazywać na możliwość wystąpienia odmiennej reakcji na stres w zależności od fazy rozwojowej (nasion, siewek lub dorosłych okazów), w której się on pojawił. Nie można także wykluczyć uwarunkowań gatunkowych i zależności od rodzaju stresora, który wywołuje zróżnicowanie reakcji obronnych komórek roślinnych. Dodatkową trudność stanowi występowanie enzymatycznych antyoksydantów w różnych postaciach – w przypadku SOD są to 4 rodziny tworzące łącznie 9 izoform, CAT tworzy 3, a APX 4 izoformy [PRASAD i in. 1994; TORSETHAUGEN i in. 1997; VAN BREUSEGEM i in. 1999b], jest zatem prawdopodobne, że wzrost lub spadek aktywności którejs z nich będzie kompensowany spadkiem lub podwyższeniem pozostałych.

### Nowe możliwości

Niezależnie od mnożących się pytań o warunki, jakie należy spełnić, aby uzyskać pożądaną transgeniczną roślinę odporną na stres tlenowy, trwają prace nad nadekspresją także przeciwutleniaczy niskocząsteczkowych, na przykład mannitolu. Ten sześciowęglowy alkohol znany jako osmoprotektant, wykazuje również właściwości antyoksydacyjne wydajnie zmiatając agresywny rodnik hydroksylowy  $\cdot\text{OH}$ . SHEN i in. [1997] dokonali udanej próby utworzenia roślin transgenicznych o jego podwyższonej zawartości w celu zapobieżenia stresowi oksydacyjnemu w chloroplastach. Istotne również wydaje się zbadanie mechanizmu ekspresji genu alternatywnej oksydazy – AOX [VANLEBERGHE, MCINTOSH 1997; POTTER i in. 2001]. Białko to zapewnia przekazywanie elektronów podczas oddychania mitochondrialnego w warunkach blokujących drogę cytochromową – jest to tzw. oddychanie niewrażliwe na cyjanek. Ekspresja genu *aox-1* i aktywowanie alternatywnego szlaku respiracyjnego związane są z wytwarzaniem dodatkowej ilości ciepła, a przy tym zmniejszają pulę anionorodnika ponadtlenkowego syntetyzowanego podczas przejścia elektronów z ubichinonu na cytochrom *b*. Z tej przyczyny intensyfikacja aktywności AOX mogłaby pomóc w tworzeniu odpornych na niską temperaturę odmian roślin chłodowrażliwych.

### Zapobieganie powstawaniu RFT

Antyoksydanty to nie tylko zmiatacze reaktywnego tlenu, lecz i substancje przeciwdziałające jego nadprodukcji. Funkcję taką pełni na przykład ferrytyna, białko występujące w plastydach [MATAMOROS i in. 1999]. Wykazując się zdolnością do wiązania żelaza (do 4500 atomów Fe na cząsteczkę), zapobiega powstawaniu  $\cdot\text{OH}$ . I chociaż dotychczas opublikowane prace nad GM koncentrowały się na

wpływie ferrytyny na wysokość i jakość plonu [GOTO i in. 2000], to jednak HORVÁTH i in. [1999] oraz KIRÁLY [2000] uwzględniali także antyoksydacyjny aspekt nadekspresji tej proteiny. Natomiast próby wiązania nadmiaru tlenu w chloroplastach poprzez wprowadzenie genu kodującego leghemoglobinę okazały się nieudane [BARATA i in. 2000].

### Wzmocnienie stresu oksydacyjnego

Generowanie aktywnych form tlenu, czyli „wybuch oksydacyjny”, jako jeden z mechanizmów unieszkodliwiania czynników infekcyjnych przez roślinę również znajduje zastosowanie w inżynierii genetycznej. W badaniach tego typu dążono do obniżenia aktywności enzymów rozkładających nadtlenuk wodoru lub wprowadzano nowe białka syntetyzujące RFT, wyzwalające reakcje jego syntezy lub wykorzystujące  $H_2O_2$  do procesów dalszego utleniania. Tak więc zwiększona produkcja  $H_2O_2$  w tkankach: transgenicznego tytoniu o obniżonej aktywności katalazy [CHAMNONGPOL i in. 1998], tytoniu z nadekspresją zmutowanej kalmoduliny [OH i in. 1999] czy ziemniaka z dodatkową kopią genu kodującego oksydazę glukozową [WU i in. 1997] wzmogła zarówno bezpośrednią reakcję zaatakowanych komórek na czynnik infekcyjny, jak i aktywowała geny związane z odpornością systemiczną, co prowadziło między innymi do syntezy białek PR, wzmocnienia ścian komórkowych rośliny gospodarza i rozluźnienia ścian komórkowych grzybów chorobotwórczych. Natomiast bardzo silny bezpośredni toksyczny wpływ na patogen stwierdzono podczas ekspresji genów kodujących chloroperoksydazę niehemową (CPO-P). Enzym ten katalizuje między innymi utlenianie jonów chlorkowych (przy udziale  $H_2O_2$ ) do podchlorynu HOCl, związku o bardzo silnej aktywności antymikrobiologicznej. Komórki roślin naczyniowych są pozbawione CPO-P, czego konsekwencją jest osłabienie ochrony przed bakteriami i grzybami, zaś wprowadzenie bakteryjnego DNA chloroperoksydazy do tkanek tytoniu hamuje wzrost grzybni *Aspergillus flavus in vitro* [JACKS i in. 2000] oraz zmniejsza stopień porażenia roślin GM przez antraknozę (*Colletotrichum destructivum*) [RAJASEKARAN i in. 2000].

W podsumowaniu można zatem stwierdzić, iż dalsze poznanie i wykorzystanie mechanizmów ekspresji genów związanych z łagodzeniem lub wzmocnieniem stresu oksydacyjnego stało się narzędziem w walce z negatywnym wpływem różnych szkodliwych warunków środowiskowych na rośliny. Ponieważ jednak używana w ten sposób intensyfikacja odporności obejmuje często tylko jeden rodzaj stresu, należy wyrazić nadzieję, że kolejne prace doprowadzą do wytworzenia odporności krzyżowej i znajdą wiele zastosowań praktycznych.

### Indeks skrótów

AOX – alternatywna oksydaza, APX – peroksydaza askorbinianowa, białka PR – białka związane z patogenezą, CAT – katalaza, CPO-P – chloroperoksydaza, GM – rośliny modyfikowane genetycznie, GR – reduktaza glutationowa, GSH – forma zredukowana glutationu, GSSG – disulfid glutationowy, PS II – fotosystem II, RTF – reaktywne formy tlenu, SOD – dysmutaza ponadtlenukowa: Cu/ZnSOD – cynkowo-miedziowa, MnSOD – manganowa, FeSOD – żelazowa.

## Literatura

- AONO M., SAJI H., SAKAMOTO A., TANAKA K., KONDO N., TANAKA K. 1995. *Paraquat tolerance of transgenic Nicotiana tabacum with enhanced activities of glutathione reductase and superoxide dismutase*. Plant Cell Physiol. 36: 1687–1691.
- ARISI A.-C.M., MOCQUOT B., LAGRIFFOUL A., MENCH M., FOYER C.H., JOUANIN L. 2000. *Responses to cadmium in leaves of transformed poplars overexpressing gamma-glutamylcysteine synthetase*. Physiol. Plant. 109: 143–149.
- BARATA R.M., CHAPARRO A., CHABREGAS S.M., GONZALEZ R., LABATE C.A., AZEVEDO R.A., SARATH G., LEA P.J., SILVA-FILHO M.C. 2000. *Targeting of the soybean leghemoglobin to tobacco chloroplasts: effect on aerobic mechanism in transgenic plants*. Plant Science 155: 193–202.
- BRÜGGEMANN W., BEYEL V., BRODKA M., POTH H., WEIL M., STOCKHAUS J. 1999. *Antioxidants and antioxidative enzymes in wild-type and transgenic Lycopersicon genotypes of different chilling tolerance*. Plant Science 140: 145–154.
- CHAMNONGPOL S., WILLEKENS H., MOEDER W., LANGEBAEELS C., SANDERMANN H., VAN MONTAGU M., INZE D., VAN CAMP W. 1998. *Defense activation and enhanced pathogen tolerance induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in transgenic tobacco*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 5818–5823.
- DOULIS A.G., DEBIAN N., KINGSTON-SMITH A.H., FOYER C.H. 1997. *Differential localization of antioxidants in maize leaves*. Plant Physiol. 114: 1031–1037.
- FOYER C.H., LOPEZ-DELGADO H., DAT J.F., SCOTT I.M. 1997. *Hydrogen peroxide and glutathione-associated mechanisms of acclimatory stress tolerance and signalling*. Physiol. Plant. 100: 241–254.
- GOTO F., YOSHIHARA T., SAIKI H. 2000. *Iron accumulation and enhanced growth in transgenic lettuce plants expressing the iron-binding protein ferritin*. Theoret. and Applied Genetics 100: 658–664.
- HORVÁTH G.V., OBERSCHALL A., DEAK M., SASS I., VASS I., BARNA B., KIRALY Z., HIDEG E., FEHER A., DUDITS D. 1999. *Transgenic strategy to improve stress resistance of crop plants*. J. Plant Biotechnol. 1: 61–68.
- JACKS T.J., DE LUCCA A.J., RAJASEKARAN K., STROMBERG K.D., VAN PEÉ K.-H. 2000. *Antifungal and peroxidative activities of nonheme chloroperoxidase in relation to transgenic plant protection*. J. Agric. Food Chem. 48: 4561–4564.
- KINGSTON-SMITH J.H., FOYER C.H. 2000. *Overexpression of Mn-superoxide dismutase in maize leaves leads to increased monodehydroascorbate reductase, dehydroascorbate reductase and glutathione reductase activities*. J. Exp. Bot. 51: 167–187.
- KIRÁLY Z. 2000. *New aspects of breeding crops for disease resistance: the role of antioxidants, w: Use of agriculturally important genes in biotechnology*. G. Hrazdina (red.). IOS Press. Ohmsa, Amsterdam-Berlin-Oxford-Tokyo-Washington, DC (NATO Science Series).
- MATAMOROS M.A., BAIRD L.M., ESCUREDO P.R., DALTON D.A., MINCHIN F.R., ITURBE-ORMATEXE I., RUBIO M.C., MORAN J.F., GORDON A.J., BECANA M. 1999. *Stress-induced legume root nodule senescence. Physiological, biochemical and structural alterations*. Plant Physiol. 121: 97–111.
- MAY M.J., LEAVER C.J. 1993. *Oxidative stimulation of glutathione synthesis in Arabidopsis thaliana suspension cultures*. Plant Physiol. 103: 621–627.

- MCKERSIE B.D., BOWLEY S.R., HARJANTO E., LEPRINCE O. 1996. *Water-deficit tolerance and field performance of transgenic alfalfa overexpressing superoxide dismutase*. Plant Physiol. 111: 1177–1181.
- MCKERSIE B.D., BOWLEY S.R., JONES K.S. 1999. *Winter survival of transgenic alfalfa overexpressing superoxide dismutase*. Plant Physiol. 119: 839–847.
- MCKERSIE B.D., MURNGHAN J., JONES K.S., BOWLEY S.R. 2000. *Iron-superoxide dismutase expression in transgenic alfalfa increases winter survival without a detectable increase in photosynthetic oxidative stress tolerance*. Plant Physiol. 122: 1427–1437.
- MIYAGAWA Y., TAMOI M., SHIGEOKA S. 2000. *Evaluation of the defense system in chloroplasts to photooxidative stress caused by paraquat using transgenic tobacco plants expressing catalase from Escherichia coli*. Plant Cell Physiol. 41: 311–320.
- NOCTOR G., STROHM M., JOUANIN L., KUNERT K.-J., FOYER CH., RENNENBERG H. 1996. *Synthesis of glutathione in leaves of transgenic poplar overexpression  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase*. Plant Physiol. 112: 1071–1078.
- OH S.K., PARK Y.S., YANG M.S. 1999. *Transgenic tobacco plants expressing a mutant VU-4 calmodulin have altered nicotinamide co-enzyme levels and hydrogen peroxide levels*. J. Biochem. Molec. Biol. 32: 1–5.
- PASTORI G., MULLINEAUX P., FOYER CH. 2000. *Post-transcriptional regulation prevents accumulation of glutathione reductase protein and activity in the bundle sheath cells of maize*. Plant Physiol. 122: 667–675.
- POTTER F.J., WISKICH J.T., DRY I.B. 2001. *The production of an inducible antisense alternative oxidase (Aox1a) plant*. Planta 212: 215–221.
- PRASAD T.K., ANDERSON M.B., MARTIN B.A., STEWART C.R. 1994. *Evidence for chilling-induced oxidative stress in maize and a regulatory role for hydrogen peroxide*. The Plant Cell 6: 65–74.
- RAJASEKARAN K., CRY J.W., JACKS T.J., STROMBERG K.D., CLEVELAND T.E. 2000. *Inhibition of fungal growth in planta and in vitro by transgenic tobacco expressing a bacterial nonheme chloroperoxidase gene*. Plant Cell Reports 19: 333–338.
- ROXAS V.P., LODHI S.A., GARRETT D.K., MAHAN J.R., ALLEN R.D. 2000. *Stress tolerance in transgenic tobacco seedlings that overexpress glutathione-S-transferase/glutathione peroxidase*. Plant Cell Physiol. 41: 1229–1234.
- SEN GUPTA A., HEINEN J.L., HOLADAY A.S., BURKE J.J., ALLEN R.D. 1993. *Increased resistance to oxidative stress in transgenic plants that overexpress chloroplastic Cu/Zn superoxide dismutase*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 1629–1633.
- SHEN B., JANSEN R.G., BOHNERT H.J. 1997. *Increased resistance to oxidative stress in transgenic plants by targeting mannitol biosynthesis to chloroplasts*. Plant Physiol. 113: 1177–1183.
- STROHM M., EIBLMEIER M., LANGEBARTELS CH., JOUANIN L., POLLE A., SANDERMANN H., RENNENBERG H. 1999. *Responses of transgenic poplar (Populus tremula x P. alba) overexpressing glutathione synthetase or glutathione reductase to acute ozone stress visible injury and leaf gas exchange*. J. Exp. Bot. 332: 365–374.
- TORSETHAUGEN G., PITCHER L.H., ZILINSKAS B.A., PELL E.J. 1997. *Overproduction of ascorbate peroxidase in the tobacco chloroplast does not provide protection against ozone*. Plant Physiol. 114: 529–537.
- VAN BREUSEGEM F., VAN MONTAGU M., INZE D. 1998. *Engineering stress tolerance in*

maize. *Outlook Agric.* 27: 115–124.

VAN BREUSEGEM F., SLOOTEN L., STASSART J.-M., MOENS T., BOTTERMAN J., VAN MONTAGU M., INZE D. 1999a. *Overproduction of Arabidopsis thaliana FeSOD confers oxidative stress tolerance to transgenic maize.* *Plant Cell Physiol.* 40: 515–523.

VAN BREUSEGEM F., SLOOTEN L., STASSART J.-M., MOENS T., BOTTERMAN J., MOENS T., VAN MONTAGU M., INZE D. 1999b. *Effects of overproduction of tobacco MnSOD in maize chloroplasts on foliar tolerance to cold and oxidative stress.* *J. Exp. Bot.* 50: 71–78.

VAN CAMP W., CAPIAU K., VAN MONTAGU M., INZE D., SLOOTEN L. 1996. *Enhancement of oxidative stress tolerance in transgenic tobacco plants overproducing Fe-superoxide dismutase in chloroplasts.* *Plant Physiol.* 112: 1703–1714.

VANLEBERGHE G.C., MCINTOSH L. 1997. *Alternative oxidase: from gene to function.* *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48: 703–734.

WINGATE V.P.M., LAWTON M.A., LAMB C.J. 1988. *Glutathione causes a massive and selective induction of plant defense genes.* *Plant Physiol.* 31: 205–211.

WU G., SHORTT B.J., LAWRENCE E.B., LEON J., FITZSIMMONS K.C., LEVINE E. B., RASKIN L., SHAH D.M. 1997. *Activation of host defense mechanisms by elevated production of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in transgenic plants.* *Plant Physiol.* 115: 427–435.

ZHU Y.L., PILON-SMITH E.A.H., JOUANIN L., TERRY N. 1999. *Overexpression of glutathione synthetase in indian mustard enhances cadmium accumulation and tolerance.* *Plant Physiol.* 119: 73–79.

**Słowa kluczowe:** rośliny transgeniczne, antyoksydanty, odporność na stres, stres oksydacyjny, wybuch oksydacyjny

### Streszczenie

Niniejsza praca stanowi przegląd dotychczasowych badań nad poprawą odporności na stesy środowiskowe drogą manipulacji genowych obejmujących enzymatyczne i niskcząsteczkowe elementy systemu antyoksydacyjnego. Intensyfikacja aktywności przeciwutleniaczy znajduje zastosowanie w ochronie roślin przed skutkami stresów abiotycznych – chłodu, mrozu, suszy, herbicydów fotodynamicznych i innych. Natomiast w celu wzmocnienia nadwrażliwości na patogen i wywołania odporności systemicznej (SAR) tworzone są transformanty o wzmożonej zdolności do tzw. wybuchu oddechowego, czyli do nadprodukcji tlenu singletowego, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> i rodników tlenowych. Konstruowanie roślin modyfikowanych genetycznie (GM) drogami powyżej opisanymi napotyka jednak liczne problemy, przede wszystkim są to nieoczekiwane i niepożądane reakcje systemu antyoksydantów wywołane zmianami w stechiometrii sygnałów metabolicznych. W wielu przypadkach trudna do uzyskania jest też odporność krzyżowa transformantów.



GENETIC MANIPULATIONS ENHANCING OXIDATIVE STRESS  
AND PLANTS' ANTIOXIDATIVE RESPONSE IN VARIOUS  
ENVIRONMENTAL CONDITIONS

*Renata Bączek-Kwinta*  
Department of Plant Physiology,  
Agricultural University, Kraków

Key words: transgenic plants, antioxidants, stress resistance, oxidative stress, oxidative burst

Summary

This article will give the overview of so far performed studies of the enhancement of plants' resistance to environmental stresses via genetic manipulations of both enzymatic and low-molecular weight antioxidants. The improvement of antioxidative activity has been applied to protect plants from abiotic stresses such as chill, frost, drought, photodynamic herbicides etc. On the other hand, in order to enhance the hypersensitivity to pathogen and to release the systemic acquired resistance, transformants with elevated ability to continuously overproduce singlet oxygen,  $H_2O_2$  and oxygen radicals have been constructed. Manipulations described above have many difficulties, however. The main problems are the changes in the stoichiometry of metabolic signals leading to unpredictable and undesirable responses of antioxidant system. The cross-resistance of transgenes also needs to be conferred.

Mgr inż. Renata **Bączek-Kwinta**  
Katedra Fizjologii Roślin  
Akademia Rolnicza im. H. Kołłątaja  
ul. Podłużna 3  
330-239 KRAKÓW  
e-mail: rrbaczek@cyf-kr.cdu.pl