

Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu
Wydział Nauk Biologicznych i Weterynaryjnych
Katedra Biochemii



Patrycja Wojtaczka

Rozprawa doktorska

**Wpływ indolilo-3-acetylo-asparaginianu na odpowiedź
siewek grochu (*Pisum sativum* L.) na szok osmotyczny**

Promotor
dr hab. Maciej Ostrowski, prof. UMK

Toruń, 2023

Serdecznie dziękuję
Panu dr hab. Maciejowi Ostrowskiemu, prof. UMK
za opiekę naukową podczas realizacji pracy badawczej
oraz za poświęcony czas i pomoc przy pisaniu niniejszej pracy.

*Serdecznie dziękuję
dr Annie Ciarkowskiej
za wsparcie podczas realizacji pracy badawczej
oraz za nieocenioną pomoc przy przygotowywaniu niniejszej pracy.*

*Dziękuję pracownikom Katedry Biochemii
za miłą atmosferę, życzliwość i wsparcie
podczas realizacji pracy badawczej.*

Spis treści

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW	7
STRESZCZENIE	9
ABSTRACT	11
WSTĘP	13
1. Auksyny	13
2. Biosynteza auksyn.....	15
3. Koniugaty auksyn.....	15
3.1. Koniugaty estrowe	16
3.2. Koniugaty amidowe	17
3.2.1. Charakterystyka koniugatów amidowych	17
3.2.2. Rola koniugatów auksyn	19
3.2.3. Rola IAA-Asp	19
3.2.4. GH3 – enzymy katalizujące biosyntezę koniugatów amidowych IAA.....	20
3.2.5. Mechanizm syntezy koniugatów amidowych IAA	22
3.2.6. Rola GH3 w odpowiedzi na stres abiotyczny oraz biotyczny	25
4. Stres oksydacyjny.....	27
4.1. Karbonylacja białek	30
4.2. S-nitrozylacja białek	30
4.3. S-glutationylacja białek	33
4.4. Mechanizmy obronne roślin przed stresem oksydacyjnym	34
CEL PRACY	36
MATERIAŁY I METODY	38
1. Materiały	38
1.1. Materiał roślinny i warunki wzrostu	38
1.2. Odczynniki	38
2. Metody	39
2.1. Badanie hydrolizy IAA-Asp w siewkach grochu	39
2.2. Oznaczanie zawartości proliny oraz askorbinianu.....	40
2.3. Badanie peroksydacji lipidów oraz zawartości metyloglioksalu	41
2.4. Badanie stosunku GSH/GSSG oraz stosunku białkowych grup -SH do całkowitej zawartości grup -SH.....	42
2.5. Oznaczanie aktywności enzymów regulujących poziom glutationu	43
2.6. Badanie S-glutationylacji białek grochu	46
2.7. Badanie karbonylacji białek grochu	48
2.8. Oznaczanie poziomu IAA-Asp oraz fitohormonów	50
2.9. Badanie ekspresji oraz aktywności amidosyntetazy IAA-Asp	51
2.10. Oznaczanie aktywności syntazy IAGlc	54
2.11. Inne metody analityczne	54
WYNIKI.....	55
1. Analiza hydrolizy IAA-Asp do IAA w siewkach <i>P. sativum</i>	55
2. Poziom proliny oraz askorbinianu w siewkach grochu traktowanych IAA-Asp oraz czynnikami powodującymi szok osmotyczny	57
3. Wpływ IAA-Asp oraz szoku osmotycznego na peroksydację lipidów oraz zawartość metyloglioksalu	58

4. Stosunek GSH/GSSG oraz stosunek białkowych grup -SH do całkowitej zawartości grup -SH w siewkach grochu traktowanych IAA-Asp oraz czynnikami wywołującymi szok osmotyczny	59
5. Zmiana aktywności enzymów regulujących poziom glutationu pod wpływem działania IAA-Asp oraz czynników powodujących szok osmotyczny	61
6. Wpływ IAA-Asp oraz szoku osmotycznego na S-glutationylację białek grochu.....	67
7. Karbonylacja białek w siewkach grochu traktowanych IAA-Asp oraz czynnikami wywołującymi szok osmotyczny	69
8. Poziom fitohormonów w siewkach grochu traktowanych IAA-Asp oraz czynnikami wywołującymi szok osmotyczny	73
9. Wpływ IAA-Asp i szoku osmotycznego na poziom badanego koniugatu i IAA oraz na ekspresję i aktywność amidosyntetazy IAA-Asp.....	75
10. Aktywność syntazy IAGlc w siewkach grochu traktowanych IAA-Asp oraz czynnikami wywołującymi szok osmotyczny	79
DYSKUSJA.....	80
1. IAA-Asp nie jest źródłem wolnego IAA w siewkach <i>P. sativum</i>	80
2. IAA-Asp moduluje odpowiedź grochu na szok osmotyczny.....	82
2.1. Wpływ IAA-Asp na poziom przeciwutleniaczy oraz peroksydację lipidów w siewkach grochu	82
2.2. IAA-Asp moduluje status tiolowy w siewkach grochu	83
2.3. Wpływ IAA-Asp na karbonylację białek w siewkach grochu.....	87
3. IAA-Asp moduluje poziom fitohormonów w siewkach grochu	89
4. Wpływ IAA-Asp na homeostazę auksynową w siewkach grochu.....	90
PODSUMOWANIE	95
LITERATURA.....	96

WYKAZ STOSOWANYCH SKRÓTÓW

1-*O*-IA-glukoza - 1-*O*-indolilo-3-acetylo- β -D-glukoza
2,4-D – kwas 2,4-dichlorofenoksyoctowy
2-DE – elektroforeza dwukierunkowa
ABA – kwas abscysynowy
ACN – acetonitryl
CAPS - 3-[(3-cholamidopropyl)dimetyloamonio]-1-propanosulfonian
CDNB - 1-chloro-2,4-dinitrobenzen
CHAPS - (3-[(3-cholamidopropyl)-dimetyloamonio]-propano- sulfonian)
DCIP – 2,6-dichloroindofenol
DNPH - 2,4-dinitrofenylohydrazyna
DTNB - kwas 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoesowy)
DTT - ditiotreitol
EDTA - kwas etylenodinitrylotetraoctowy
EF1 α - czynnik elongacyjny 1-alfa
GA – gibereliny
GH3 – Gretchen Hagen 3
GPX – peroksydaza glutationowa
GR – reduktaza glutationowa
GRX - glutaredoksyna
GSH – glutation zredukowany
GSNO - nitrozoglutation
GSSG – glutation utleniony
GST – S-transferaza glutationowa
HCCA - kwas α -cyjano-4-hydroksy-cynamonowy
HEPES - kwas 2-[4-(2-hydroksyetylo)piperazyno-1-ilo]etanosulfonowy
HSP70 – białko szoku cieplnego o masie 70 kDa
IAA – kwas indolilo-3-octowy
IAA-Asp – indolilo-3-acetylo-asparaginian
IAA-Glu - indolilo-3-acetylo-glutaminian
IBA – kwas indolilo-3-masłowy
IEF – ogniskowanie izoelektryczne
IPyA – indolilo-3-pirogronian

JA – kwas jasmonowy
JA-Ile - jasmonylo-izoleucyna
LC-MS/MS – chromatografia cieczowa z tandemową spektrometrią mas
LOX - lipooksygenaza
MDA – dialdehyd malonowy
MTT - bromek 3-(4,5-dimetylotiazol-2-ylo)-2,5-difenylotetrazoliowy
NAA - kwas naftylo-1-octowy
NBT – błękit nitrotetrazoliowy
NEM - *N*-etylomaleimid
oxIAA - kwas 2-oksyindolilo-3-octowy
oxIAA-Asp - 2-oksyindolilo-3-acetylo-asparaginian
PAA - kwas 2-fenylooctowy
PEG – glikol polietylenowy
PMS - metosiarczan fenazyny
PTM – potranslacyjne modyfikacje białek
RFT – reaktywne formy tlenu
SA – kwas salicylowy
SDS - dodecylosiarczan sodu
SDS-PAGE - elektroforeza denaturująca białek w żelu poliakrylamidowym w SDS
TBA - kwasu tiobarbiturowy
TCA – kwas trójchlorooctowy
TLC – chromatografia cienkowarstwowa
Tris – tri(hydroksymetylo)aminometan
TRX - tioredoksyna
UDPG – urydynodifosfoglukoza

STRESZCZENIE

Należący do auksyn kwas indolilo-3-octowy (IAA) występuje w roślinie w większości pod postacią koniugatów, które stanowią formę związaną tego fitohormonu. Wyróżnia się koniugaty estrowe IAA, które posiadają przyłączoną do fitohormonu cząsteczkę cukru, alkoholu *myo*-inozytolu lub glikoproteiny oraz koniugaty amidowe IAA z dołączoną do auksyny cząsteczką aminokwasu, peptydu lub białka. W tkankach grochu (*Pisum sativum* L.) dominującym koniugatem amidowym jest indolilo-3-acetylo-asparaginian (IAA-Asp), który powstaje w zależnej od ATP reakcji katalizowanej przez amidosyntetazy z rodziny Gretchen Hagen 3 (GH3). W przeciwieństwie do większości koniugatów amidowych IAA, które służą jako źródło wolnej auksyny, IAA-Asp uczestniczy przede wszystkim w oksydacyjnej degradacji tego fitohormonu. Z drugiej strony koniugat ten wykazuje również swoiste, niezależne od IAA działanie w odpowiedzi roślin na stres abiotyczny, między innymi na stres termiczny, solny oraz metali ciężkich, i biotyczny wywołany przez patogeny grzybowe i bakteryjne. Należy jednak zaznaczyć, że wiedza na temat działania IAA-Asp jako cząsteczki aktywnej biologicznie jest wciąż mała. W ramach niniejszej pracy badano wpływ egzogenego IAA-Asp na odpowiedź siewek grochu (*Pisum sativum* L.) na szok osmotyczny wywołany 3-godziną inkubacją roślin z NaCl lub 48-godziną inkubacją z glikolem polietylenowym (PEG). W pierwszym etapie badań zaobserwowano, że IAA-Asp nie podlega hydrolizie do IAA, co oznacza, że zmiany zachodzące w siewkach po podaniu IAA-Asp są efektem działania koniugatu, nie zaś wzrostu stężenia auksyny. Następnie wykazano, że IAA-Asp nie wywołuje zmian w poziomie antyoksydantów, proliny i askorbinianu, peroksydacji lipidów oraz zawartości metyloglioksalu w siewkach grochu narażonych na szok osmotyczny. Egzogeny IAA-Asp w warunkach szoku osmotycznego wywołanego działaniem PEG wpływa jednak na aktywność enzymów regulujących zawartość glutationu (reduktazy glutationowej (GR) oraz S-transferazy glutationowej (GST)) oraz na S-glutationylację białek, w konsekwencji modulując status tiolowy w siewkach grochu. Natomiast u roślin traktowanych NaCl koniugat wywiera efekt na status grup tiolowych poprzez zmianę aktywności GR oraz indukuje karbonylację białek. IAA-Asp reguluje także poziom fitohormonów (kwasu jasmonowego (JA), kwasu abscysynowego (ABA) oraz kwasu salicylowego (SA)) w siewkach grochu. Wpływa on na zawartość ABA i SA w optymalnych warunkach wzrostu, a także JA u roślin inkubowanych z chlorkiem sodu oraz nienarażonych na działanie szoku osmotycznego. Badany koniugat nie moduluje natomiast poziomu IAA, pomimo wpływu na ekspresję i aktywność amidosyntetazy

IAA-Asp w siewkach grochu traktowanych NaCl oraz na aktywność amidosyntetazy IAA-Asp i syntazy IAGlc, enzymu katalizującego pierwszy etap tworzenia koniugatów estrowych, u roślin inkubowanych w roztworze PEG. Przedstawione badania poszerzają dotychczasową wiedzę na temat biologicznego działania IAA-Asp.

ABSTRACT

Indole-3-acetic acid (IAA), a member of auxins, mostly occurs in plants as conjugates which are the bound form of this phytohormone. We can distinguish IAA ester conjugates with a sugar, *myo*-inositol, alcohol or glycoprotein molecule attached to the phytohormone, and IAA amide conjugates with an amino acid, peptide or protein molecule linked to auxin. The main amide conjugate in pea (*Pisum sativum* L.) tissues is indole-3-acetyl-aspartate (IAA-Asp) which is formed in an ATP-dependent reaction catalyzed by amidosynthetases from the Gretchen Hagen 3 (GH3) family. IAA-Asp, unlike most amide conjugates serving as a source of free auxin, mainly participates in the oxidative degradation of this phytohormone. On the other hand, this conjugate also has a specific, IAA-independent effect on plant response to abiotic stress, including thermal, salt and heavy metal stress, and biotic stress caused by fungal and bacterial pathogens. However, it should be noted that knowledge about the effect of IAA-Asp as a biologically active molecule is still limited. This study investigated the effect of exogenous IAA-Asp on the response of pea (*Pisum sativum* L.) seedlings to osmotic shock caused by a three-hour incubation of plants with NaCl or a 48-hour incubation with polyethylene glycol (PEG). In the first stage of the study, the lack of IAA-Asp hydrolysis to IAA was observed which proves that the changes occurring in seedlings after IAA-Asp administration are the effect of the conjugate and not the increase in auxin concentration. Next, it was demonstrated that IAA-Asp does not affect the level of antioxidants, proline and ascorbate, lipid peroxidation and methylglyoxal content in pea seedlings exposed to osmotic shock. However, exogenous IAA-Asp, under osmotic shock conditions caused by PEG, changes the activity of enzymes regulating glutathione content (glutathione reductase (GR) and glutathione S-transferase (GST) and S-glutathionylation of proteins and as a consequence modulates the thiol status in pea seedlings. Moreover, in plants treated with NaCl, the conjugate has an effect on the thiol group status by changing GR activity and induces protein carbonylation. IAA-Asp also regulates the level of phytohormones (jasmonic acid (JA), abscisic acid (ABA) and salicylic acid (SA)) in pea seedlings. It affects ABA and SA content under optimal growth conditions, as well as JA in plants incubated with sodium chloride and not exposed to osmotic shock. However, the tested conjugate does not modulate the IAA level, despite its effect on the expression and activity of IAA-Asp amidosynthetase in NaCl-treated pea seedlings and the activity of the IAA-Asp amidosynthetase and IAGlc synthase, the enzyme catalyzing the first step in the formation of ester conjugates, in plants incubated in PEG

solution. The presented research broadens the current knowledge about the biological effects of IAA-Asp.

WSTĘP

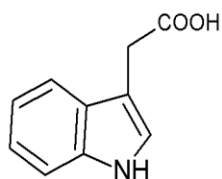
1. Auksyny

Hormony roślinne jako strukturalnie zróżnicowane cząsteczki o niewielkiej masie cząsteczkowej są kluczowe dla wzrostu oraz rozwoju roślin (Santner i Estelle 2009). Do grupy tej zaliczane są auksyny, pierwsze odkryte fitohormony, które kontrolują szereg procesów, takich jak elongacja i różnicowanie komórek, tworzenie organów, odpowiedź rośliny na biotyczne i abiotyczne czynniki stresowe, regulacja procesu starzenia się rośliny oraz inne (Sauer i wsp. 2013). Auksyny pod względem chemicznym należą do organicznych kwasów zawierających pierścień indolowy (kwas indolilo-3-octowy (IAA) oraz kwas indolilo-3-masłowy (IBA)) lub pierścień fenolowy (kwas 2-fenylooctowy (PAA)) (Ryc. 1). Oprócz naturalnych auksyn wyróżnia się również auksyny syntetyczne, np. kwas naftylo-1-octowy (NAA) czy też należący do herbicydów kwas 2,4-dichlorofenoksyoctowy (2,4-D), kwas 4-(2,4-dichlorofenoksy)masłowy (2,4-DB) oraz dikamba. Wśród auksyn najlepiej poznaną, powszechnie występującą w roślinach cząsteczką jest IAA.

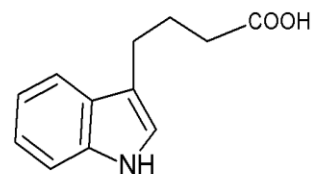
Molekularny mechanizm działania auksyny opiera się na szybkiej regulacji ekspresji genów zależnej od poziomu hormonu w komórce (Lavy i Estelle 2016). W procesie tym głównie uczestniczą działające na terenie jądra komórkowego trzy rodziny białek: receptory auksyny TIR1/AFB (ang. *F-box Transport Inhibitor Response 1/Auxin signaling F-Box protein*) wchodzące w skład kompleksu ligazy ubikwitynowej SCF (ang. *Skp1-Cullin-F-box protein*) typu E3, czynniki transkrypcyjne ARF (ang. *Auxin Response Factor*) oraz represory transkrypcji Aux/IAA (ang. *Auxin/Indole-3-Acetic Acid*). Przy niskim poziomie auksyny Aux/IAA oddziałują poprzez C-końcową domenę PB1 (ang. *I/II Phox and Bem1*) z białkami ARF. Aux/IAA łącząc się z ARF, prowadzą do hamowania ich aktywności, a w konsekwencji do represji transkrypcji genów (Lavy i Estelle 2016; Leyser 2018). Aux/IAA oddziałują również z korepresorami transkrypcji TPL (ang. *Topless*) oraz TPR (ang. *TPL-Related*), co skutkuje kondensacją DNA wpływającą na zahamowanie transkrypcji. Zwiększenie poziomu auksyny w komórce powoduje, że hormon ten działa jak „molekularny klej” łącząc ze sobą TIR1/AFB oraz Aux/IAA. Następnie dochodzi do poliubikwitynacji Aux/IAA przez kompleks ligazy ubikwitynowej E3 SCF i do degradacji represora na drodze proteasomalnej. W tych warunkach wolne białka ARF wiążą się do elementów odpowiedzi auksynowej AuxRE (ang. *Auxin Response Elements*) promotorów genów regulowanych przez auksynę i modulują transkrypcję. W skład kompleksu ligazy ubikwitynowej E3 SCF oprócz podjednostki

TIR1/AFB wchodzi również: białko rusztowania CUL1 (ang. *Cullin 1*), białko RBX1 (ang. *Ring-Box protein 1*) umożliwiające transfer ubikwityny na cząsteczkę substratu oraz białko ASK1 (ang. *Arabidopsis SKP1 homolog 1*) (Lavy i Estelle 2016).

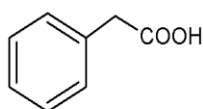
Auksyny naturalne



kwas indolilo-3-octowy (IAA)

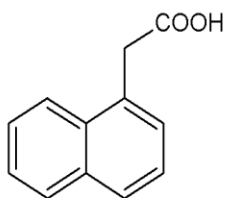


kwas indolilo-3-masłowy (IBA)

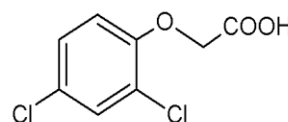


kwas 2-fenyloctowy (PAA)

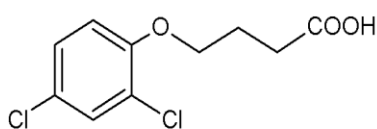
Auksyny syntetyczne



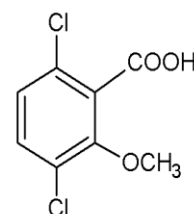
kwas naftylo-1-octowy (NAA)



kwas 2,4-dichlorofenoksyoctowy (2,4-D)



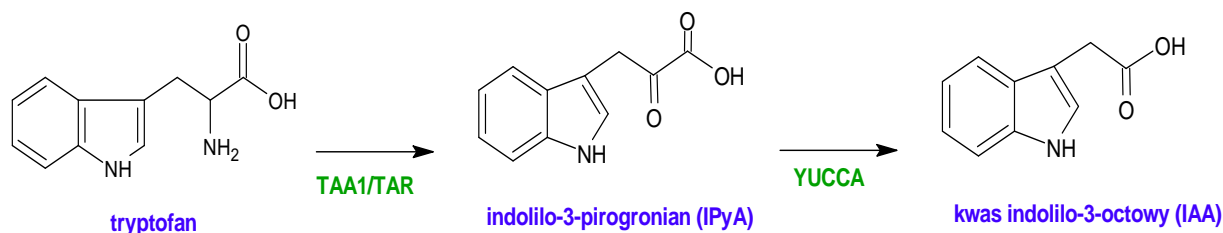
kwas 4-(2,4-dichlorofenoksy)masłowy (2,4-DB)



dikamba

Ryc. 1. Budowa auksyn naturalnych oraz syntetycznych.

2. Biosynteza auksyn



Ryc. 2. Szlak IPyA jako główny szlak biosyntezy auksyn.

Utrzymywanie odpowiedniego poziomu IAA wewnątrz komórek roślinnych jest kluczowe dla regulacji wzrostu i rozwoju rośliny. Wśród procesów niezbędnych dla zachowania homeostazy auksynowej wymienia się: biosyntezę oraz degradację IAA, jego ukierunkowany transport oraz tworzenie koniugatów (Casanova-Sáez i wsp. 2021). Biosynteza IAA może zachodzić na drodze zależnej od tryptofanu lub też niezależnej od tego aminokwasu aromatycznego (Korasick i wsp. 2013; Sauer i wsp. 2013). Obecnie zdecydowanie lepiej poznana jest droga tworzenia IAA zależna od Trp, gdzie wyróżnia się cztery podstawowe szlaki, których nazwy pochodzą od głównych związków pośrednich tworzących się w tych szlakach: IPyA (indolilo-3-pirogronian), IAOx (indolilo-3-acetaldotsym), TAM (tryptamina) oraz IAM (indolilo-3-acetamid). Najlepiej poznany szlak IPyA, będący głównym źródłem wolnego IAA, jest dwuetapową przemianą, gdzie w pierwszym etapie dochodzi do przekształcenia Trp do indolilo-3-pirogronianu dzięki aktywności aminotransferazy tryptofanu 1 pochodzącej z *Arabidopsis* (TAA1) lub białek spokrewnionych z TAA1, tzw. TAR (ang. *TAA1-Related proteins*) (Ryc. 2) (Korasick i wsp. 2013; Casanova-Sáez i wsp. 2021). Następnie IPyA ulega dekarboksylacji do IAA w reakcji katalizowanej przez monooksygenazę flawinową z rodziny YUCCA (YUC).

3. Koniugaty auksyn

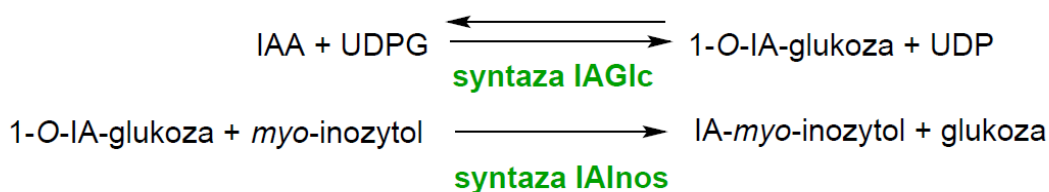
Tworzenie koniugatów, czyli przyłączenie za pomocą wiązania kowalencyjnego związków nisko- oraz wysokocząsteczkowych do fitohormonów, jest procesem powszechnie występującym u roślin (Sembdner i wsp. 1994). Wśród auksyn wyróżnia się między innymi koniugaty IAA, które występują w ilości przekraczającej pulę wolnego IAA obecnego w roślinach (Bajguz i Piotrowska 2009). Do grupy karboksylowej IAA mogą przyłączać się za pomocą wiązań estrowych cukry (zarówno monosacharydy, jak i polisacharydy), alkohole

(głównie *myo*-inozytol) lub glikoproteiny, tworząc koniugaty estrowe. Druga grupa koniugatów IAA to koniugaty amidowe, gdzie poprzez utworzenie wiązania amidowego katalizowanego przez amidosyntetazy Gretchen Hagen 3 (GH3) następuje przyłączenie aminokwasów, peptydów lub białek do auksyny. W wyniku powstawania koniugatów IAA dochodzi do utraty aktywności auksynowej tego fitohormonu. Należy podkreślić, że zarówno ilość, jak i rodzaj koniugatów IAA są odmienne u różnych gatunków roślin, w różnym stadium ich rozwoju, czy też w zależności od rodzaju badanej tkanki (Ludwig-Müller 2011; Korasick i wsp. 2013). Jednakże z przeprowadzonych badań wynika, że rośliny jednoliścienne charakteryzują się większą pulą koniugatów estrowych, natomiast u roślin dwuliściennych dominującą formą są koniugaty amidowe (Korasick i wsp. 2013).

3.1. Koniugaty estrowe

Koniugaty estrowe IAA obecne u roślin naczyniowych oraz mchów pełnią głównie funkcję magazynu tego fitohormonu uwalnianego podczas hydrolizy koniugatów oraz uczestniczą w jego odwracalnej inaktywacji (Ludwig-Müller i wsp. 2009; Korasick i wsp. 2013). Szczególnie wysoka ilość koniugatów estrowych występuje między innymi u nasion kukurydzy (*Zea mays*) oraz ryżu (*Oryza sativa*) (Hall 1980; Cohen i Bandurski 1982). Przeciwnie, u należącej do roślin dwuliściennych *Arabidopsis thaliana* tylko 10% IAA występuje w postaci koniugatów estrowych (Woodward i Bartel 2005). Tworzenie wiązań estrowych pomiędzy cukrowcami lub *myo*-inozytolem a cząsteczką IAA wymaga w pierwszej kolejności aktywacji fitohormonu (Ryc. 3) (Michalczyk i Bandurski 1982; Leźnicki i Bandurski 1988a). Proces ten katalizowany jest przez glikozylotransferazę IAA (syntazę IAGlc) zależną od urydynodifosfoglukozu (UDPG) i prowadzi do utworzenia 1-*O*-indolilo-3-acetylo- β -D-glukozy (1-*O*-IA-glukozy). Do tej pory udało się oczyścić syntazę IAGlc między innymi z kukurydzy i grochu (*Pisum sativum* L.) (Leźnicki i Bandurski 1988a; Jakubowska i Kowalczyk 2004), a białko rekombinowane tego enzymu uzyskano z rzodkiewnika, ryżu oraz kukurydzy (Jin i wsp. 2013; Liu i wsp. 2019; Ciarkowska i wsp. 2021). W drugim etapie reakcja katalizowana jest przez specyficzne acylotransferazy indolowe należące do rodziny acylotransferaz podobnych do karboksypeptydaz serynowych (SCPL) (Kowalczyk i wsp. 2003). U kukurydzy acylotransferaza 1-*O*-indolilo-3-acetylo- β -D-glukoza : *myo*-inozytol (syntaza IAInos) katalizuje przyłączenie reszty IAA z 1-*O*-IA-glukozy do cząsteczki *myo*-inozytolu (Michalczyk i Bandurski 1982). Energia potrzebna do tej reakcji jest uwalniana z nietrwałego połączenia 1-*O*-IA-glukozy. Kowalczyk i wsp. (2003) zaobserwowali również, że syntaza IAInos może

przenosić resztę IAA z IA-*myo*-inozytolu na cząsteczki monosacharydów, takie jak glukoza, galaktoza, mannoza czy arabinoza. Ponadto enzym ten oprócz aktywności acylotransferazowej uczestniczy także w hydrolizie wytworzonego przez siebie produktu, prowadząc do zwiększenia ilości wolnego IAA. Została również odkryta u kukurydzy acylotransferaza cukrowca, która katalizuje przyłączanie grupy indoliloacetylowej z 1-*O*-IA-glukozy do monosacharydów (glukozy, galaktozy, mannozy), disacharydów (melibiozy, gentobiozy) lub trisacharydów (rafinozy) (Starzyńska i Kowalczyk 2012).



Ryc. 3. Reakcje prowadzące do utworzenia koniugatów estrowych na przykładzie syntezy IA-*myo*-inozytolu u kukurydzy.

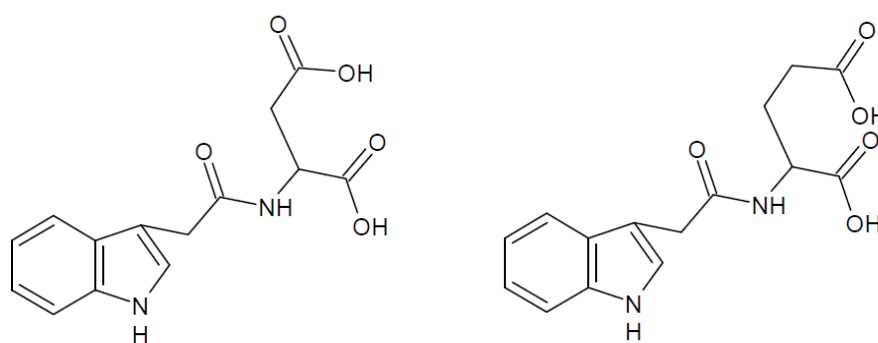
3.2. Koniugaty amidowe

3.2.1. Charakterystyka koniugatów amidowych

Wśród koniugatów amidowych IAA licznie występujących, jak wspomniano wcześniej, u roślin dwuliściennych wyróżnia się przede wszystkim połączenia z aminokwasami, między innymi Leu, Gly, Val, Ala (Bajguz i Piotrowska 2009). Jednakże szczególnie wysoką zawartość u roślin dwuliściennych stanowią indolilo-3-acetylo-asparaginian (IAA-Asp) oraz indolilo-3-acetylo-glutaminian (IAA-Glu) (Ryc. 4) (Casanova-Sáez i wsp. 2021). Przykładem mogą być rośliny strączkowe a wśród nich soja, u której w nasionach dominują te dwa rodzaje koniugatów IAA (Cohen 1982; Epstein i wsp. 1986). Natomiast w tkankach grochu odkryto w przeważającej ilości IAA-Asp (Andrea i Good 1955; Südi 1964). Bandurski i Schulze (1977) wykazali, że w nasionach grochu koniugaty amidowe, w tym przede wszystkim IAA-Asp, dominują ponad 2-krotnie pod względem ilości w porównaniu do wolnego IAA.

Koniugaty amidowe IAA mogą służyć jako źródło wolnego IAA powstającego w wyniku hydrolizy tych związków (Ludwig-Müller 2011). Dotyczy to między innymi IAA-Ala, IAA-Phe, IAA-Leu, IAA-Gly oraz IAA-Ile (Bajguz i Piotrowska 2009; Ludwig-Müller 2011). Z drugiej strony IAA-Asp oraz IAA-Glu uczestniczą w oksydacyjnej degradacji IAA katalizowanej w pierwszym etapie przez dioksygenazę DAO (ang. *Dioxygenase for*

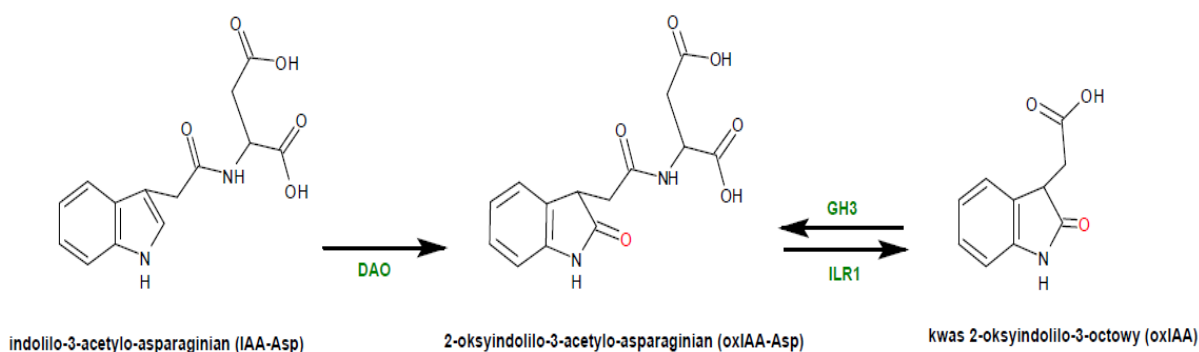
Auxin Oxidation) (Ryc. 5) (Hayashi i wsp. 2021; Müller i wsp. 2021). W przypadku IAA-Asp enzym ten katalizuje jego utlenianie do 2-oksyindolilo-3-acetylo-asparaginianu (oxIAA-Asp) u *A. thaliana*. Następnie oxIAA-Asp ulega hydrolizie do kwasu 2-oksyindolilo-3-octowego (oxIAA) dzięki aktywności amidohydrolazy ILR1 (ang. *IAA-Leu-Resistant1*) (Hayashi i wsp. 2021). Proces ten może być odwracalny w wyniku działania GH3, enzymu który zmniejsza poziom oxIAA poprzez jego koniugację z aminokwasami (Brunoni i wsp. 2023). Przez długi okres uważano, że IAA-Asp oraz IAA-Glu, w przeciwieństwie do innych koniugatów amidowych, nie podlegają hydrolizie do IAA. Z czasem jednak zaczęły pojawiać się doniesienia o występowaniu tego procesu u kapusty chińskiej (*Brassica rapa*), lucerny (*Medicago truncatula*) oraz poziomki (*Fragaria vesca*) (Ludwig-Müller i wsp. 1996; Campanella i wsp. 2008; Tang i wsp. 2019). Natomiast w 2021 roku Hayashi i wsp. opisali hydrolizę IAA-Asp i IAA-Glu u *A. thaliana* katalizowaną przez amidohydrolazy ILR1/ILL (ang. *IAA-Leu-Resistant1/Arabidopsis ILR1-Like*).



indolilo-3-acetylo-asparaginian (IAA-Asp)

indolilo-3-acetylo-glutaminian (IAA-Glu)

Ryc. 4. Struktura IAA-Asp oraz IAA-Glu należących do koniugatów amidowych.



Ryc. 5. Szlak oksydacyjnej degradacji IAA z udziałem IAA-Asp.

3.2.2. Rola koniugatów auksyn

W poprzednich podrozdziałach opisano rolę koniugatów auksyn jako związków odpowiedzialnych za utrzymanie homeostazy IAA (Ludwig-Müller 2011). Jednakże istnieją również doniesienia o roli tych koniugatów w procesach fizjologicznych roślin, jak i w ich odpowiedzi na stres abiotyczny lub biotyczny (González-Lamothe i wsp. 2012; Böttcher i wsp. 2013). W 2009 roku Staswick opublikował badania, które wskazują na udział indolilo-3-acetylo-tryptofanu (IAA-Trp) w hamowaniu odpowiedzi grawitropicznej oraz w hamowaniu rozwoju korzeni bocznych u *A. thaliana*. Natomiast badania Pavlović i wsp. (2018) przeprowadzone na siewkach *B. rapa* przedstawiają zmniejszony poziom koniugatu 1-*O*-IA-glukozy w warunkach stresu solnego w porównaniu do kontroli. W ostatnim czasie został także sprawdzony wpływ IA-*myo*-inozytolu na markery stresu oksydacyjnego, takie jak peroksydacja lipidów, karbonylacja białek czy poziom askorbinianu w siewkach *Z. mays* (Ciarkowska i wsp. 2022). W zależności od tego, czy badany był koleoptyl, czy korzenie siewek, podawany do roślin koniugat nie powodował zmian w wymienionych markerach lub też wywoływał porównywalny efekt jak aplikowany IAA czy *myo*-inozytol, co mogło wynikać z jego hydrolyzy. Uzyskane wyniki świadczą o braku niezależnej od IAA roli IA-*myo*-inozytolu w odpowiedzi kukurydzy na stres. Należy podkreślić, że najczęściej do tej pory badań powstało na temat roli IAA-Asp w rozwoju i odpowiedzi roślin na stres (Böttcher i wsp. 2013; Ostrowski i wsp. 2016a).

3.2.3. Rola IAA-Asp

Pierwsze informacje o niezależnej od IAA roli IAA-Asp opublikowali Oetiker i Aeschbacher w 1997 roku, gdzie badano wpływ wysokiej temperatury na hodowlę komórek lulka (*Hyoscyamus muticus* L.). Potraktowanie komórek wrażliwych na temperaturę IAA-Asp

powodowało pojawienie się u nich tolerancji na stres termiczny. Wpływ IAA-Asp na odpowiedź rośliny na stres abiotyczny, a dokładniej na stres solny i stres metali ciężkich, został również przedstawiony w pracy opublikowanej przez Ostrowskiego i wsp. (2016a). W tym celu zbadano efekt, jaki wywierał IAA-Asp na aktywność enzymów uczestniczących w stresie oksydacyjnym (peroksydazy gwajakolowej, peroksydazy askorbinianowej oraz katalazy), poziom nadtlenu wodoru oraz karbonylację białek. IAA-Asp powodował między innymi zwiększenie poziomu karbonylowanych białek, zwiększenie aktywności katalazy oraz obniżenie aktywności peroksydazy askorbinianowej w siewkach grochu traktowanych chlorkiem kadmu. W przypadku stresu solnego IAA-Asp wpływał na obniżenie poziomu nadtlenu wodoru, zmniejszenie aktywności katalazy oraz peroksydazy gwajakolowej czy podwyższenie aktywności peroksydazy askorbinianowej w siewkach grochu. W badaniach tych sprawdzono również efekt IAA-Asp na parametry morfologiczne rośliny. Podawany koniugat powodował między innymi wzrost korzenia, ale zahamowanie wzrostu pędu, co może świadczyć o jego roli w regulacji wzrostu rośliny. Natomiast Böttcher i wsp. (2013) zasugerowali na podstawie wykonanych badań wpływ IAA-Asp na proces dojrzewania owoców winorośli. Istnieją również doniesienia opisujące negatywny efekt, jaki może wywierać IAA-Asp na odpowiedź *A. thaliana* związaną z pojawieniem się patogenów grzybowych oraz bakteryjnych (González-Lamothe i wsp. 2012). IAA-Asp promuje rozwój choroby wywołanej przez *Botrytis cinerea* oraz *Pseudomonas syringae* poprzez indukcję transkrypcji ich genów wirulencji. Jednym z elementów regulujących ten proces u rzodkiewnika jest czynnik transkrypcyjny RPL (ang. *Replumless*), zwiększający oporność rośliny na atak patogenów (Xu i wsp. 2022). Czynnik ten może wiązać się bezpośrednio do promotorów genów *GH3* i wpływać negatywnie na ich ekspresję, w konsekwencji prowadząc do powstawania zmniejszonej ilości IAA-Asp w reakcji katalizowanej przez amidosyntetazę *GH3*.

3.2.4. GH3 – enzymy katalizujące biosyntezę koniugatów amidowych IAA

Gen *GH3* po raz pierwszy odkryto w siewkach soi (*Glycine max*), co zapoczątkowało serię badań nad tą rodziną genów (Hagen i wsp. 1984; Wojtaczka i wsp. 2022). Po podaniu kwasu 2,4-D, który należy do auksyn syntetycznych, w ciągu 5 minut zaobserwowano występowanie w roślinie transkryptów *GH3*, pomimo jednoczesnego działania cykloheksymidu (inhibitora syntezy białek) (Hagen i wsp. 1984; Hagen i Guilfoyle 1985). Na podstawie tych obserwacji większość genów *GH3*, podobnie jak *Aux/IAA* oraz *SAUR*, została sklasyfikowana do rodziny genów wczesnej/pierwotnej odpowiedzi na auksynę (Hagen i Guilfoyle 2002). Członkowie tej rodziny ulegają ekspresji natychmiast po potraktowaniu rośliny auksyną, po-

przez aktywację już obecnych w komórce elementów systemu transkrypcyjnego. Transkrypcja genów *GH3* jest tkankowo specyficzna i może być indukowana zarówno poprzez naturalne, jak i syntetyczne auksyny (Roux i Perrot-Rechenmann 1997; Staswick i wsp. 2005). Ekspresja tych genów jest również regulowana przez inne oprócz auksyn fitohormony oraz różnorodne czynniki biotyczne czy abiotyczne, takie jak susza, zimno, światło, metale ciężkie i inne (Takase i wsp. 2003; Zhang i wsp. 2007; Zhang i wsp. 2009; Wang i wsp. 2010). Przykładowo transkrypcja genu *GH3* z grochu jest indukowana przez fitohormony (IAA, kwas jasmonowy (JA), kwas absycynowy (ABA), kinetyny oraz gibereliny (GA)), światło (czerwone, białe, niebieskie), oraz herbicydy (2,4-D, dikamba oraz pikloram) (Ostrowski i Jakubowska 2013). U wielu gatunków roślin jednoliściennych oraz dwuliściennych odkryto do chwili obecnej liczne geny *GH3* (Hagen i Guilfoyle 2002; Terol i wsp. 2006; Jain i Khurana 2009; Feng i wsp. 2015). Co więcej, występują one również u roślin nienaczyniowych, między innymi u mchu *Physcomitrella patens* (Ludwig-Müller i wsp. 2009).

Badania nad amidosyntetazami GH3 rozpoczęły się w 2002 roku od odkrycia roli *GH3.11*, jednego z genów *GH3* u *A. thaliana*, który koduje enzym strukturalnie podobny do lucyferazy świetlika (Staswick i wsp. 2002). W tym samym roku została również zaproponowana klasyfikacja białek GH3 na trzy grupy w oparciu o ich specyficzność substratową oraz homologię sekwencji. W grupie pierwszej znajduje się między innymi AtGH3.11 katalizujący syntezę jasmonylo-izoleucyny (JA-Ile), aktywnej formy hormonu z grupy jasmonianów (Staswick i wsp. 2002; Thines i wsp. 2007). W grupie drugiej najliczniej występują białka odpowiedzialne za tworzenie koniugatów pomiędzy IAA a aminokwasami, takimi jak: Glu, Ala, Asp, Gly, Val, Leu oraz inne (Staswick i wsp. 2002). Wyjątek stanowi AtGH3.5, który akceptuje jako substrat nie tylko auksyny, ale również benzoesany (Staswick i wsp. 2005; Westfall i wsp. 2016). Grupa trzecia zawiera AtGH3.12 modulujący stężenie kwasu salicylowego (SA) poprzez koniugację prekursora tego związku, izochoryzmianu (Staswick i wsp. 2002; Rekhter i wsp. 2019). Oprócz wspomnianej powyżej klasyfikacji istnieje również klasyfikacja genów i białek GH3 oparta na analizie podobieństwa genomów, powiązań filogenetycznych, ekspresji genów oraz funkcji białek (Okrent i Wildermuth 2011), czy też klasyfikacja stworzona na podstawie różnic sekwencji w miejscach wiązania donora grupy acylowej przez GH3 (Westfall i wsp. 2012). Najnowsze badania nad rodziną białek GH3 z roślin drzewiastych odkryły ich nową, czwartą podrodzinę o nieznanych jeszcze preferencjach substratowych (Vielba 2019). Analiza filogenetyczna wykazała, że członkowie tej grupy posiadają specyficzne sekwencje i są nie tylko obecni u gatunków drzewiastych, ale również u różnych roślin jednoli-

ściennych, jak i dwuliściennych. Jednakże nowoodkryta podrodzina nie występuje u organizmów modelowych: rzodkiewnika pospolitego, kukurydzy, ziemniaka i tytoniu.

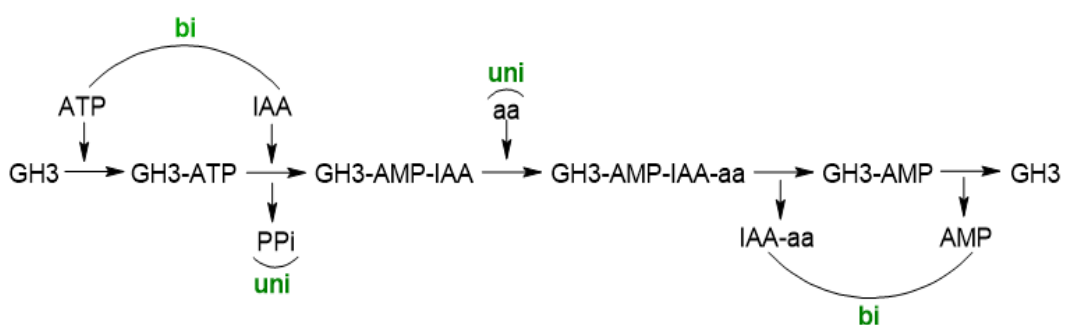
Przeprowadzone do tej pory badania wskazują jednoznacznie na lokalizację białka GH3 w cytoplazmie komórki roślinnej. W 1987 roku Wright i wsp. zaobserwowali w wyniku przeprowadzonych analiz immunochemicznych obecność prążka odpowiadającego białku GH3 we frakcji zawierającej rozpuszczalne białka cytozolowe soi. Dzięki obserwacjom mikroskopowym lokalizację cytoplazmatyczną potwierdzono u PpGH3.1 z *P. patens* oraz GUS-GH3.11 (Hsieh i wsp. 2000; Ludwig-Müller i wsp. 2009). Również w części cytoplazmatycznej komórek pędu grochu wykryto sygnał immunofluorescencyjny dla GH3 oraz aktywność enzymatyczną prowadzącą do syntezy IAA-Asp (Ostrowski i wsp. 2014).

Badania nad oczyszczoną z nasion grochu amidosyntetazą GH3 dotyczące specyficzności substratowej tego enzymu wykazały jego wyraźne preferencje wobec IAA jako donora reszty acylowej (Ostrowski i Jakubowska 2011). Ujawnił on również stosunkowo silne powinowactwo wobec NAA należącego do auksyn syntetycznych. Natomiast pozostałe badane auksyny (PAA, IBA, 2,4-D) były słabymi akceptorami reszty aminoacylowej. W przypadku aminokwasów amidosyntetaza GH3 silnie preferowała jako substrat asparaginian. Aktywność enzymu była bardzo niska przy pozostałych 13 badanych aminokwasach. Odmiennie przedstawiają się wyniki dotyczące specyficzności substratowej u rekombinowanego enzymu PsGH3 (Ostrowski i wsp. 2016b). Wykazywał on, podobnie jak natywna syntetaza IAA-Asp, najwyższą aktywność wobec IAA oraz Asp. Natomiast w przeciwieństwie do natywnego enzymu, PsGH3 akceptował również jako substraty aminokwasy Met, Trp, Phe oraz Tyr. Wyniki te, jak również niewielkie różnice w sekwencji aminokwasowej obu enzymów, wskazują, że rekombinowany PsGH3 nie jest tym samym białkiem co natywna syntetaza IAA-Asp, co wskazuje na występowanie przynajmniej dwóch enzymów z rodziny GH3 w grochu.

3.2.5. Mechanizm syntezy koniugatów amidowych IAA

Nadrodzina enzymów ANL, do której zaliczamy amidosyntetazy GH3, charakteryzuje się dwuetapowym, tzw. Bi Uni Uni Bi Ping Pong, mechanizmem reakcji (Ryc. 6) (Gulick 2009; Chen i wsp. 2010; Wojtaczka i wsp. 2022). W pierwszym etapie dochodzi do tworzenia acylo-AMP w wyniku reakcji ATP z grupą karboksylową substratu acylowego. Następnie energia produktu pośredniego jest wykorzystywana do utworzenia tioestru, między innymi w przypadku syntetaz acylo-CoA, lub do uwolnienia fotonu światła po dekarboksylacji oksydacyjnej katalizowanej przez lucyferazę świetlika.

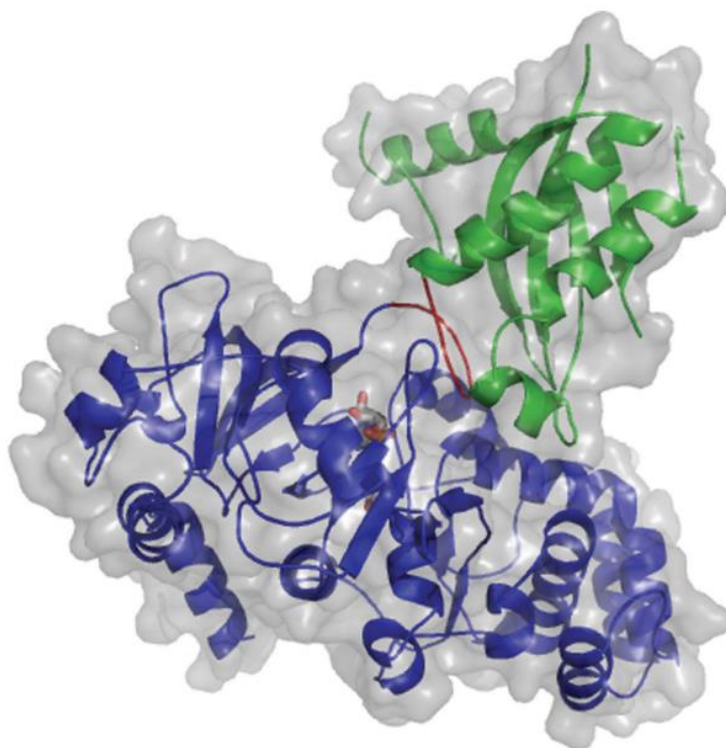
Jak przedstawiono na Ryc. 6, reakcja syntezy koniugatów amidowych IAA przez GH3 rozpoczyna się od przyłączenia ATP, a następnie IAA do enzymu (Chen i wsp. 2010). Prowadzi to do powstania przejściowego trójskładnikowego kompleksu, który jest w dalszej kolejności modyfikowany przez hydrolizę ATP prowadzącą do uwolnienia nieorganicznego difosforanu (PPi) i utworzenia związku pośredniego GH3-AMP-IAA. Następnie z enzymem wiąże się kolejny substrat, aminokwas, i powstaje wiązanie amidowe pomiędzy nim a IAA. W ostatnim etapie reakcji AMP oraz koniugat amidowy odłączają się od miejsc wiążących w amidosyntetazie GH3.



Ryc. 6. Mechanizm reakcji GH3 na przykładzie syntezy koniugatów amidowych IAA.

W 2012 roku Westfall i wsp. po raz pierwszy opisali trójwymiarową strukturę GH3 wyjaśniającą jego mechanizm reakcji na przykładzie AtGH3.11 katalizującego połączenie JA z Ile oraz AtGH3.12 preferującego jako substrat pochodne benzoesu. Białka te posiadają dwie domeny: większą domenę na N-końcu zbudowaną z β -baryłki oraz podwójnej β -kartki otoczonej przez α -helisy, oraz mniejszą domenę na C-końcu z czteroniciową β -kartką oflanowaną przez dwie α -helisy (Ryc. 7). Obie domeny połączone są elastyczną pętlą zawiasową (od $\beta 15$ do $\alpha 15$), która odpowiedzialna jest za obracanie C-końcowej domeny (Westfall i wsp. 2012; Round i wsp. 2013). Podobną strukturę wykazuje VvGH3.1 z *Vitis vinifera* katalizujący reakcję tworzenia koniugatów amidowych IAA (Peat i wsp. 2012). Ze względu na obecność miejsca aktywnego wiążącego substraty pomiędzy dwiema domenami białka, zmiany konformacyjne wywołane przez pętlę zawiasową są kluczowe dla aktywności enzymu i umożliwiają mu przejście ze stanu otwartego do zamkniętego (Round i wsp. 2013). Otwarta konformacja GH3 powoduje inicjację reakcji poprzez wiązanie niezbędnych dla etapu adenylacji ATP oraz jonów Mg^{2+} do trzech konserwatywnych miejsc wiązania ATP/AMP. Pierwszy motyw odpowiedzialny za wiązanie grupy fosforanowej to pętla z resztami Ser 95 oraz Ser 96. Drugi motyw wiązania ATP/AMP zawiera strukturę β -zwrot- β z dwiema kluczowymi resztami: Ser 328 wiążącą α -fosforan oraz Tyr 325, której pierścień aromatyczny oddziałuje z

pierścieniem aromatycznym adeniny poprzez interakcje hydrofobowe (Westfall i wsp. 2012; Round i wsp. 2013). Istotną funkcję pełni również reszta Glu 329, zapewniając odpowiednie ułożenie ATP podczas reakcji oraz umożliwiając przyłączenie jonów magnezu (Westfall i wsp. 2012). Ostatni, trzeci motyw zawiera konserwatywną resztę Asp 398 odpowiedzialną za wiązanie cukru rybozy w cząsteczce ATP. W kolejnym etapie reakcji następuje wiązanie IAA lub innego donora reszty acylowej poprzez kieszeń obecną w domenie, położoną blisko drugiego motywu wiązania ATP/AMP. Specyficzność substratowa GH3 określona jest przez różne reszty aminokwasowe zlokalizowane w pozycjach $\alpha 5$, $\alpha 6$, $\beta 8$ oraz $\beta 9$, które tworzą miejsce wiązania kwasu będącego donorem reszty acylowej. Na przykład IAA wiąże się z miejscem aktywnym białka VvGH3.1 zawierającym między innymi reszty Val 172, Leu 173, Ala 337 i Tyr 342, podczas gdy JA, substrat specyficzny dla AtGH3.11/JAR1, oddziałuje z resztami takimi jak Leu 117, Thr 121, Phe 125, Thr 166, Val 169 i inne (Peat i wsp. 2012; Westfall i wsp. 2012).



Ryc. 7. Struktura AtGH3.12 (konformacja zamknięta w miejscu aktywnym) z dołączonym salicylanem i AMPCPP (nieulegającym hydrolizie analogiem ATP). To monomeryczne białko składa się z większej domeny N-końcowej (kolor niebieski) i mniejszej domeny C-końcowej (kolor zielony), które są połączone elastyczną pętlą zawiasową (kolor czerwony) (na podstawie Round i wsp. 2013, zmieniono).

W wyniku hydrolizy ATP zachodzącej po pierwszym etapie reakcji powstaje nieorganiczny pirofosforan, który może zostać uwolniony przez otwarty kanał, co w konsekwencji prowadzi do rotacji C-końcowej domeny (Westfall i wsp. 2012). Jednakże późniejsze badania wykazały, że zamknięta konformacja miejsca aktywnego AtGH3.12 pojawia się przed, a nie po etapie adenylacji reakcji, w wyniku umiejscowienia ogona fosforanowego ATP w innym miejscu (Round i wsp. 2013). Hydroliza uwolnionego pirofosforanu napędza tworzenie wiązania amidowego między donorem reszty acylowej a aminokwasem i czyni ten etap nieodwracalnym.

Jak przedstawiono na Ryc. 6, podczas drugiej połowy reakcji aminokwas wiąże się z kompleksem GH3-AMP-donor reszty acylowej. Podobnie jak miejsce wiązania kwasu będącego donorem reszty acylowej, motyw wiążący aminokwas charakteryzuje się zróżnicowaniem reszt aminokwasowych odpowiedzialnych za specyficzność substratową. W przypadku AtGH3.12 reszta Lys 146 umożliwia przyłączenie kwasowego L-glutaminianu (Westfall i wsp. 2012). Przeciwnie, u AtGH3.11 zamiast reszty lizyny obecna jest Ser 151, powodując zmianę w preferowanym substracie na aminokwas L-izoleucynę. Wykazano, że AtGH3.11 wiąże również inne aminokwasy hydrofobowe w miejscu aktywnym. Zależność preferencji substratu aminokwasowego od sekwencji białka jest również widoczna w przypadku innych amidosyntetaz GH3. U *V. vinifera* cztery enzymy GH3 (VvGH3.1, VvGH3.2, VvGH3.3, VvGH3.5) posiadają w motywie wiążącym aminokwas zasadową resztę Arg 115 umożliwiającą przyłączanie kwasu asparaginowego (Peat i wsp. 2012). Natomiast dwa kolejne GH3 (VvGH3.4, VvGH3.6) preferują inny aminokwas również o kwasowym charakterze – kwas glutaminowy, co uwarunkowane jest obecnością niepolarną proliny zamiast Arg 115.

3.2.6. Rola GH3 w odpowiedzi na stres abiotyczny oraz biotyczny

Białka GH3, jako regulatory poziomu fitohormonów, mają kluczowe znaczenie dla prawidłowego rozwoju roślin, a także dla ich odpowiedzi obronnej na różne abiotyczne oraz biotyczne czynniki stresowe (Wojtaczka i wsp. 2022). Jest to między innymi widoczne w przypadku reakcji *O. sativa* na stres suszy, w której udział bierze *OsGH3.13/TLD1* (Zhang i wsp. 2009). Zwiększona ekspresja tego genu, kodującego syntetazę IAA-Asp, wzmacnia tolerancję ryżu na podany stres, powodując zmniejszoną utratę wody oraz poprawę przeżywalności rośliny. Może to wynikać z pozytywnego wpływu nadekspresji *OsGH3.13/TLD1* na transkrypcję genów *LEA* kodujących białka chroniące przed suszą. Z kolei nadekspresja *OsGH3.2* ma negatywny wpływ na odpowiedź obronną ryżu na stres suszy, ale zwiększa jego tolerancję

na stres zimna (Du i wsp. 2012). Pomimo tego ekspresja *OsGH3.2* jest aktywowana nie tylko w wyniku pojawienia się stresu zimna, ale również po wystąpieniu stresu suszy. Zaobserwowano także u ryżu zwiększoną ekspresję genów *OsGH3.1* oraz *OsGH3.8*, ale zmniejszoną genu *OsGH3.5* po potraktowaniu rośliny stresem solnym (Jain i Khurana 2009). Udział GH3 w odpowiedzi na stres abiotyczny jest również widoczny u *A. thaliana*, u którego nadekspresja *AtGH3.5/GH3a/WES1* występująca u mutantu *wes1-D* ma pozytywny wpływ na obronę rośliny przed stresem solnym, suszy oraz termicznym (Park i wsp. 2007). Ponadto zaobserwowano także u *wes1-D* zwiększoną ilość transkryptów genów powiązanych ze stresem, takich jak *CBF* (ang. *C-repeat/dehydration-responsive element-Binding Factor*) oraz *RD* (ang. *Response to Dehydration*), które należą do szlaku odpowiedzi na stres, w którym istotną rolę odgrywa ABA. Odkryto również, że ABA, SA oraz różne abiotyczne warunki stresowe wpływają na zwiększenie ekspresji genu *AtGH3.5*. Zmiany w ekspresji genów *GH3* po potraktowaniu różnymi stresami abiotycznymi występują również u kukurydzy (*Z. mays*), jabłka (*Malus sieversii*), ciecierzycy (*Cicer arietinum*) czy pszenicy (*Triticum aestivum*) (Yuan i wsp. 2013; Feng i wsp. 2015; Singh i wsp. 2015; Jiang i wsp. 2020).

Istnieją również liczne doniesienia dotyczące roli GH3 w reakcji obronnej roślin na stres biotyczny. Przykładem może być tu *AtGH3.5*, który nie tylko jest zaangażowany w odpowiedź rzodkiewnika na stres abiotyczny, ale prawdopodobnie reguluje także obronę rośliny przed patogenami (Westfall 2016). Park i wsp. (2007) podczas badań nad mutantem *wes1-D* odkryli, że nadekspresja *AtGH3.5* pozytywnie wpływa na reakcję rośliny na zakażenie *Pseudomonas syringae*. Po ataku bakteryjnym *wes1-D* wykazywał dłużej trwającą nadekspresję genu *PR-1* (ang. *Pathogenesis Related-1*), który uczestniczy w nabytej odporności systemicznej SAR (ang. *Systemic Acquired Resistance*), w porównaniu do roślin typu dzikiego. Zwiększona ekspresja *GH3.5* występuje także u innego mutantu rzodkiewnika, *gh3.5-1D* (Zhang i wsp. 2007). Roślina ta, podobnie jak *wes1-D*, posiada podwyższony poziom SA podczas infekcji wywołanej przez *P. syringae*. Ponadto *gh3.5-1D* w odpowiedzi na patogeny wykazuje nadekspresję genów odpowiedzialnych za obronę przed stresem. Odkryto również, że rośliny z mutacją skutkującą utratą funkcji *GH3.5* (*gh3.5-1* oraz *gh3.5-2*), w przeciwieństwie do *gh3.5-1D*, mają częściowo zaburzoną obronę systemiczną. Oprócz wywoływania pozytywnych zmian w sygnalizacji SA podczas interakcji patogen-roślina, *GH3.5* bierze także udział w szlaku auksyny promującym podatność rośliny na infekcję. Rośliny *gh3.5-1D* zakażone *P. syringae* wykazują zarówno podwyższony poziom IAA, jak również nadekspresję genów odpowiedzialnych za ten stan. Prawdopodobnie prowadzi to do upośledzonej lokalnej odporności uwarunkowanej obecnością czynników R oraz nie dochodzi do zwiększenia odporności

typu SAR w porównaniu do roślin typu dzikiego. Dalsze badania nad rolą *GH3.5* w sygnalizacji SA potwierdziły, że gen ten reguluje odpowiedź obronną roślin na atak bakterii poprzez szlak zależny od SA (Zhang i wsp. 2008). Co więcej, szlak ten występuje u mutantu *gh3.5-ID* zarówno w sposób zależny, jak i niezależny od genów *NPRI* (ang. *Nonexpressor of Pathogenesis-Related genes 1*), które są ważne do aktywowania odporności typu SAR. Należy również wspomnieć, że u *gh3.5-ID* po infekcji *P. syringae* zaobserwowano podwyższony poziom kamaleksyny, która uczestniczy w skutecznej odpowiedzi roślin na patogeny (Wang i wsp. 2012). Zwiększona ilość tej fitoaleksyny prawdopodobnie jest konsekwencją jej biosyntezy odbywającej się za pośrednictwem *GH3.5*.

Na obronę roślin przed stresem biotycznym ma również wpływ gen *AtPBS3/GH3.12/GDGI*, który jest kolejnym regulatorem stężenia SA (Nobuta i wsp. 2007). Białko kodowane przez ten gen katalizuje tworzenie wiązania amidowego pomiędzy izochoryzmianem a kwasem glutaminowym (Rekhter i wsp. 2019). Utworzony koniugat stanowi następnie prekursor kwasu salicylowego. Badanie mutantu *pbs3* (ang. *avrPphB Susceptible 3*), charakteryzującego się nokautem genu *GH3.12*, wykazało obniżony poziom SA-glukozydów oraz transkryptu *PR-1* po zakażeniu *P. syringae* w porównaniu do roślin typu dzikiego (Nobuta i wsp. 2007). Podobne negatywne zmiany po ataku bakteryjnym wystąpiły u mutantu *gdgl* (ang. *GH3-like Defense Gene 1*) posiadającego *GH3.12* z mutacją utraty funkcji (Jagadeeswaran i wsp. 2007). Wpływ genów *GH3* na obronę przed stresem biotycznym obserwuje się również między innymi u ryżu (*O. sativa*), tytoniu (*Nicotiana attenuata*) czy lucerny (*M. truncatula*) (Wang i wsp. 2007; Yang i wsp. 2015b; Hui i wsp. 2019).

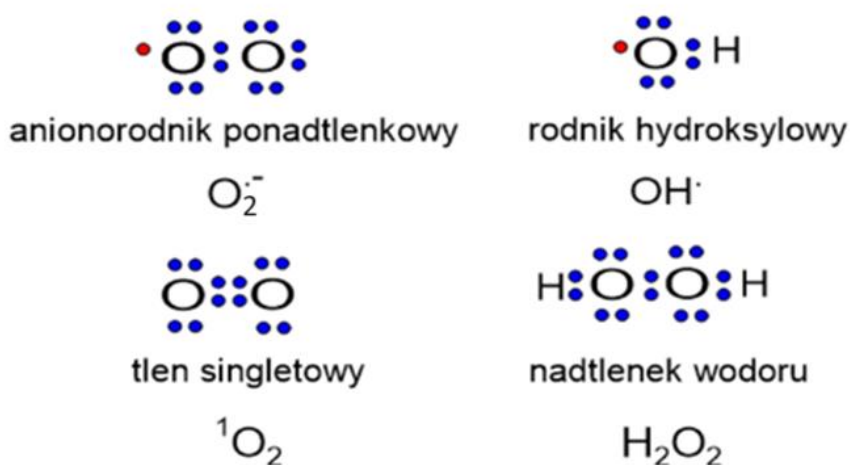
4. Stres oksydacyjny

Rośliny żyjąc w swoim naturalnym środowisku mogą być nieustannie narażone na abiotyczne oraz biotyczne czynniki stresowe, które powodują generowanie stresu oksydacyjnego prowadzącego do silnych zaburzeń w ich funkcjonowaniu (Demidchik 2015). Wśród abiotycznych czynników wywołujących stres oksydacyjny wyróżnia się między innymi metale ciężkie, herbicydy, zasolenie czy suszę. Dwa ostatnie z nich mogą powodować w początkowym okresie ich działania na rośliny stres osmotyczny lub też szok osmotyczny (Shavrukov 2013). Stres osmotyczny wywoływany jest przez stopniową ekspozycję roślin na rosnący poziom czynnika abiotycznego, przez ekspozycję roślin na niski poziom czynnika abiotycznego lub też w wyniku połączenia obu tych elementów. Natomiast szok osmotyczny powstaje w wyniku nagłego działania na rośliny wysokiego stężenia czynnika abiotycznego. W porów-

naniu do zjawiska stresu osmotycznego szok osmotyczny rzadziej zachodzi w naturalnym środowisku. Zarówno stres, jak i szok osmotyczny charakteryzują się wzrostem komórkowego stężenia osmolitów, ale w drugim przypadku ten wzrost jest zdecydowanie bardziej gwałtowny. Do chwili obecnej w wielu artykułach definicje stresu oraz szoku osmotycznego stosowane są zamiennie (Chen i Fluhr 2018; Merlaen i wsp. 2019).

W czasie stresu oksydacyjnego dochodzi do nadmiernego kumulowania się reaktywnych form tlenu (RFT), jako konsekwencji zaburzonej równowagi pomiędzy generowaniem a usuwaniem z komórek RFT wynikającej z nieprawidłowego funkcjonowania komórkowych procesów fizjologicznych. Jednocześnie, tworzące się *de novo* RFT, jako cząsteczki sygnalizacyjne, uczestniczą w odpowiedzi obronnej roślin na negatywne czynniki środowiskowe (Considine i wsp. 2015; Demidchik 2015). Należy podkreślić, że RFT regulują również procesy odpowiedzialne za wzrost oraz rozwój rośliny (Das i Roychoudhury 2014).

Do reaktywnych form tlenu zalicza się między innymi anionorodnik ponadtlenkowy ($O_2^{\cdot-}$), rodnik hydroksylowy (OH^{\cdot}), tlen singletowy (1O_2) czy nadtlenek wodoru (H_2O_2), które przede wszystkim powstają w chloroplastach, mitochondriach oraz peroksosomach (Ryc. 8) (Das i Roychoudhury 2014; Demidchik 2015). Konsekwencją wywoływanego przez nie stresu oksydacyjnego są poważne uszkodzenia wewnątrz komórek roślinnych obejmujące degradację lipidów, DNA, białek czy węglowodanów, co może prowadzić w ostateczności do śmierci komórek.



Ryc. 8. Struktury elektronowe reaktywnych form tlenu. Na czerwono zaznaczono niesparowane elektrony.

Powszechnym, bardzo negatywnym procesem zachodzącym podczas stresu oksydacyjnego jest peroksydacja lipidów, która obejmuje trzy kolejne etapy: inicjację, propagację oraz terminację. Etap inicjacji rozpoczyna się od oderwania atomów wodoru z wielonienasy-

conych reszt kwasów tłuszczowych budujących lipidy w wyniku aktywności rodników hydroksylowych, nadtlenkowych lub alkoksylowych. Prowadzi to do powstania rodników lipidowych L^{\bullet} , które podczas etapu propagacji reagują z cząsteczką tlenu formując rodniki nadtlenkowe LOO^{\bullet} . Następnie atakują one sąsiednie cząsteczki kwasów tłuszczowych tworząc wodoronadtlenki lipidowe (LOOH) oraz kolejne rodniki lipidowe (L^{\bullet}). Końcowymi produktami peroksydacji lipidów tworzącymi się z rozpadu kwasów tłuszczowych są aldehydy oraz hydroksyaldehydy, między innymi dialdehyd malonowy (MDA), akroleina czy 4-hydroksy-2-hekzenal (Demidchik 2015). Efektem peroksydacji lipidów jest również powstawanie reaktywnych związków dikarbonylowych, takich jak metyloglioksal, glioksal czy 3-deoksyglukozon (Shumilina i wsp. 2019). Uszkodzenia lipidów zachodzące w wyniku ich peroksydacji prowadzą w konsekwencji do uszkodzenia błon komórkowych, które przestają pełnić funkcję barierową. Następnie dochodzi do rozpadu organelli oraz dysfunkcji białek, DNA oraz RNA (Demidchik 2015).

W czasie stresu oksydacyjnego mogą pojawiać się również uszkodzenia roślinnego materiału genetycznego, które dotyczą przede wszystkim chloroplastowego i mitochondrialnego DNA (Das i Roychoudhury 2014). Wynika to z braku obecności otaczających DNA histonów oraz z bliskiego położenia enzymów produkujących RFT. Działanie RFT, a szczególnie rodników hydroksylowych, powoduje między innymi modyfikację zasad azotowych nukleotydów, utlenianie cukru deoksyrybozy, niedopasowanie nukleotydów, pękanie nici czy sieciowanie DNA i białka (Sharma i wsp. 2012; Das i Roychoudhury 2014; Demidchik 2015). Rodniki hydroksylowe atakują wszystkie zasady purynowe i pirymidynowe najczęściej poprzez przyłączenie OH^{\bullet} do wiązań podwójnych zasad. Natomiast wywoływane przez OH^{\bullet} utlenianie deoksyrybozy zachodzi w wyniku odrywania z tej cząsteczki wodoru. Oprócz działania rodników hydroksylowych obserwuje się również wpływ tlenu singletowego na modyfikację guaniny (Sharma i wsp. 2012). Nadmierne zmiany w strukturze DNA spowodowane przez RFT nie mogą być naprawione przez przeznaczone do tego systemy naprawy DNA, co skutkuje jego trwałym uszkodzeniem.

Kolejnymi makrocząsteczkami modyfikowanymi w wyniku działania stresu oksydacyjnego są białka. Wyróżnia się modyfikacje bezpośrednie białek obejmujące procesy takie jak karbonylacja, S-nitrozylacja czy S-glutationylacja oraz modyfikacje pośrednie białek wywołane choćby przez końcowe produkty peroksydacji lipidów (Sharma i wsp. 2012; Das i Roychoudhury 2014).

4.1. Karbonylacja białek

Karbonylacja białek, należąca do nieodwracalnych modyfikacji potranslacyjnych (PTM), prowadzi do utworzenia aldehydowej lub ketonowej grupy karbonylowej w bocznym łańcuchu aminokwasu (Lounifi i wsp. 2013; Tola i wsp. 2021). Ze względu na sposób, w jaki dochodzi do tej modyfikacji wyróżnia się dwa podstawowe rodzaje karbonylacji białek (Tola i wsp. 2021). Pierwszy z nich, nazywany pierwotną karbonylacją białek, powstaje jako konsekwencja procesu utleniania katalizowanego metalami (ang. *Metal-Catalyzed Oxidation*) (Møller i wsp. 2017; Tola i wsp. 2021). W wyniku reakcji Fentona, w której zredukowane jony metali, np. Cu^+ lub Fe^{2+} , reagują z nadtlenkiem wodoru, dochodzi do powstania rodników hydroksylowych. Następnie nowo powstałe reaktywne formy tlenu powodują tworzenie grup karbonylowych poprzez utlenianie łańcuchów bocznych aminokwasów proliny, treoniny czy lizyny lub też fragmentację łańcucha białkowego. Drugi rodzaj karbonylacji białek, określany jako wtórna karbonylacja, zachodzi zdecydowanie rzadziej (Tola i wsp. 2021). Konsekwencją peroksydacji lipidów jest powstawanie reaktywnych form karbonylowych, tzw. RCS (ang. *Reactive Carbonyl Species*), które jako związki elektrofilowe przyłączane są do łańcucha bocznego histydyny, cysteiny czy lizyny. Wśród końcowych produktów peroksydacji lipidów zaangażowanych w formowanie grup karbonylowych w cząsteczkach białek wymienia się MDA, akroleinę oraz 4-hydroksynonenal.

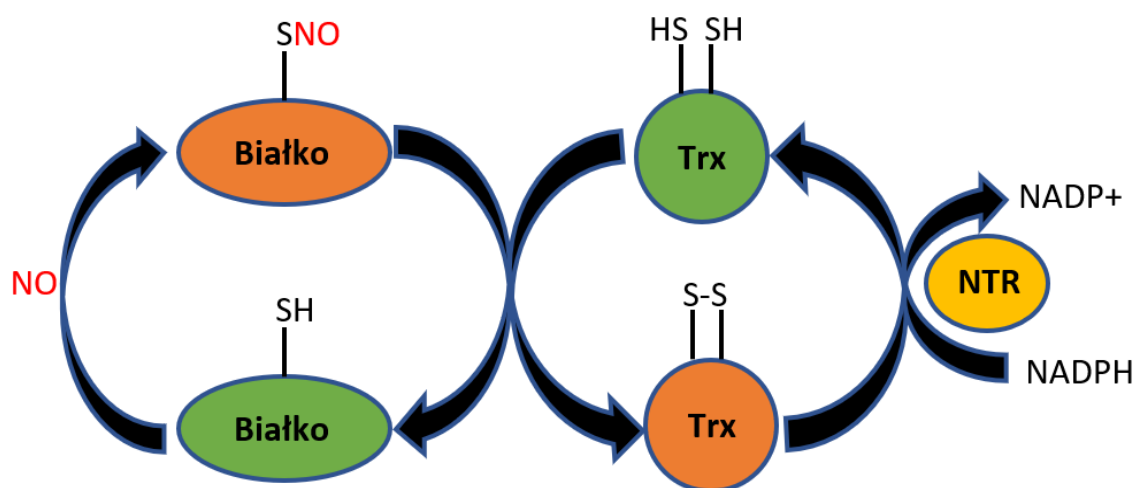
Białka, które uległy karbonylacji zazwyczaj tracą swoją funkcję i są kierowane na drogę degradacji w proteasomach 20S (Tola i wsp. 2021). Zaburzony proces usuwania tych białek może prowadzić do tworzenia agregatów, które są toksyczne dla komórki. Ze względu na ściśle powiązany z nadmierną kumulacją RFT wzrost karbonylacji białek w warunkach stresowych, proces ten uznaje się za wskaźnik stresu oksydacyjnego w organizmie roślinnym. Podwyższony poziom karbonylowanych białek jest charakterystyczny zarówno dla różnych stresów abiotycznych, jak i biotycznych. Jednakże należy podkreślić, że karbonylowane białka są również obecne u roślin niepoddanych stresowi, co wskazuje na rolę tej modyfikacji potranslacyjnej w prawidłowym wzroście i rozwoju rośliny. Odkryto między innymi wpływ karbonylowanych białek na przemiany fizjologiczne nasion, takie jak ich spoczynek, kiełkowanie czy starzenie (Lounifi i wsp. 2013).

4.2. S-nitrozylacja białek

S-nitrozylacja jest kolejną modyfikacją potranslacyjną białek charakterystyczną dla stresu oksydacyjnego (Romero-Puertas i wsp. 2013). Polega ona na kowalencyjnym wiązaniu

ugrupowania nitrozowego (-NO) do grupy tiolowej (-SH) cysteiny prowadząc do utworzenia S-nitrozotiolu (-SNO) (Ryc. 9). Tlenek azotu (NO) należący do reaktywnych form azotu (RFA) to związek odpowiedzialny za S-nitrozylację białek, który występuje powszechnie w komórkach roślinnych funkcjonując jako cząsteczka sygnalizacyjna (Romero-Puertas i wsp. 2013; Saddhe i wsp. 2019). Oprócz wpływania na aktywność białek w wyniku ich S-nitrozylacji, tlenek azotu powoduje również inne modyfikacje, obejmujące nitrowanie reszt tyrozyny poprzez dołączenie grupy nitrowej nadtlenoazotynu (-ONOO⁻) do pierścienia aromatycznego i powstanie 3-nitrotyrozyny (Feng i wsp. 2019). W tworzeniu S-nitrozotiołu podczas S-nitrozylacji białek uczestniczą: bezpośrednio - tlenek azotu pod postacią jonu nitrozonowego NO⁺ lub rodnika NO[•], oraz pośrednio - tlenki azotu na wyższych stopniach utlenienia (między innymi N₂O₃), kompleksy metal-NO utworzone w wyniku reakcji tlenku azotu z przejściowymi metalami, czy też nadtlenoazotyn (Lindermayr i Durner 2009; Feng i wsp. 2019). Może również zachodzić proces transnitrozylacji polegający na przeniesieniu ugrupowania nitrozowego z białka, które uległo wcześniej S-nitrozylacji, na kolejną cząsteczkę białka (Feng i wsp. 2019). Białka z grupą -SNO nitrozylujące sąsiednie cząsteczki białek nazywane są transnitrozylazami. Odkryto ich obecność między innymi w komórkach zwierzęcych oraz bakteryjnych. Jednakże w komórkach roślinnych są one wciąż poszukiwane.

W porównaniu do karbonylacji białek, proces S-nitrozylacji jest odwracalny. Katalizowane przez tioredoksyny (TRX) odłączanie grup nitrozowych z białek nazywane jest denitrozylacją (Ryc. 9). Tioredoksyna denitrozyluje ugrupowania -SNO obecne w białkach dzięki obecności własnej grupy ditiolowej, która utlenia się poprzez przyjęcie grupy nitrozowej. Następnie utleniona TRX jest redukowana w wyniku aktywności reduktazy tioredoksyny zależnej od NADPH (NTR).



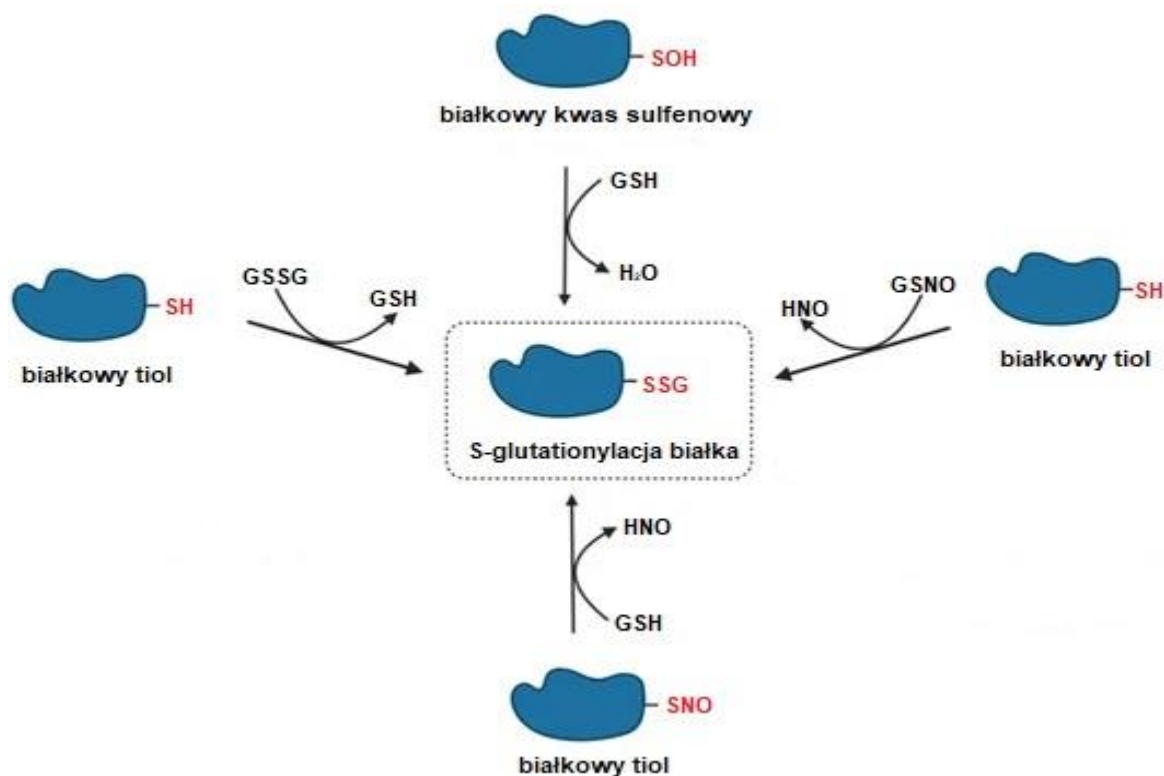
Ryc. 9. S-nitrozylacja oraz denitrozylacja białka. W procesie S-nitrozylacji ugrupowanie nitrozowe (-NO) przyłącza się do grupy tiolowej (-SH) cysteiny prowadząc do utworzenia S-nitrozotiolu (-SNO). W procesie denitrozylacji tioredoksyna przenosi grupę -NO z białka na swoją grupę ditiolową (-SH SH-), co prowadzi do jej utlenienia (-S-S-). Następnie utleniona TRX jest redukowana w wyniku aktywności reduktazy tioredoksyny zależnej od NADPH (NTR) (na podstawie Feng i wsp. 2019, zmieniono).

Do chwili obecnej opisano zachodzenie procesu S-nitrozylacji u wielu białek roślinnych. Odkryto między innymi tworzenie się S-nitrozotiolu w receptorze auksyny TIR1 w pozycji Cys 140 oraz w pozycjach Cys 37 oraz Cys 118 u białka ASK1, które tak jak TIR1 wchodzi w skład kompleksu ligazy ubikwitynowej E3 SCF (Iglesias i wsp. 2018). S-nitrozylacja tych białek nasila tworzenie kompleksu pomiędzy TIR1/AFB oraz represorem Aux/IAA ułatwiając degradację represora na drodze proteasomalnej, a w konsekwencji pozytywnie regulując sygnalizację auksyny. Przeciwnie, S-nitrozylacja cysteiny 115 w białku AHP1, należącym do szlaku sygnalizacji cytokinin, hamuje przenoszenie przez to białko grupy fosforanowej prowadząc do zablokowania przekazywanego sygnału (Feng i wsp. 2013). Proces S-nitrozylacji odgrywa również istotną rolę w modulowaniu odpowiedzi rośliny na zarówno stres abiotyczny, jak i biotyczny (Romero-Puertas i wsp. 2007; Feng i wsp. 2019). Modyfikacja ta pojawia się u białek zaangażowanych w przemiany RFT, między innymi u peroksyredoksyny II E, peroksydazy askorbinianowej 1 czy RbohD (ang. *Respiratory burst oxidase homolog D*) należącej do oksydaz NADPH, wpływając na homeostazę RFT (Romero-Puertas i wsp. 2007; Yun i wsp. 2011; Yang i wsp. 2015a). Również poziom NO ulegający znacznym zmianom w komórkach roślinnych w warunkach stresowych jest regulowany poprzez proces S-nitrozylacji reduktazy nitrozoglutationowej (GSNOR) powodujący zmianę jej aktywności (Guerra i wsp. 2016). Enzym ten katalizuje redukcję nitrozoglutationu (GSNO), który stanowi główny magazyn NO, do glutationu utlenionego (GSSG) oraz amoniaku.

S-nitrozyłacja pojawia się również u białek zaangażowanych w proces fotosyntezy, metabolizm chlorofilu czy różnicowanie komórek ksylemu (Feng i wsp. 2019).

4.3. S-glutationylacja białek

S-glutationylacja białek, podobnie jak S-nitrozyłacja, jest odwracalną modyfikacją posttranslacyjną grup tiolowych cysteiny (Zaffagnini i wsp. 2012). Polega ona na przyłączeniu cząsteczki glutationu do reaktywnej cysteiny poprzez wiązanie disiarczkowe (Bergara-Morales i wsp. 2016). Glutation jest powszechnie występującym w komórce roślinnej tripeptydem tiolowym (γ -glutamylcysteinylglicyną) o małej masie cząsteczkowej (Zaffagnini i wsp. 2012). Cząsteczka ta, występująca w dwóch formach – zredukowanej (GSH) lub utlenionej, pełni wiele funkcji w komórce, między innymi utrzymuje środowisko wewnątrzkomórkowe w stanie zredukowanym, uczestniczy w degradacji RFT, bierze udział w syntezie fitochelatyn, czy reguluje wzrost i rozwój roślin (Zaffagnini i wsp. 2012; Noctor i wsp. 2012). Proces S-glutationylacji białek może być katalizowany przez enzymy lub też zachodzić spontanicznie (Zaffagnini i wsp. 2012). Pierwszy mechanizm jest słabo poznany u roślin, bez scharakteryzowanych enzymów w nim uczestniczących, w porównaniu do lepiej poznanej spontanicznej S-glutationylacji, w której bierze udział GSSG ulegający redukcji do GSH w wyniku tworzenia mieszanego disiarczku pomiędzy białkiem a glutationem (Ryc. 10). Proces S-glutationylacji może być poprzedzony utlenieniem przez RFT grupy tiolowej białka do kwasu sulfenowego (-SOH), a następnie przyłączeniem GSH. Może również dochodzić do reakcji pomiędzy utworzonym w procesie S-nitrozyłacji nitrozotiolem białkowym a glutationem zredukowanym lub też pomiędzy GSNO a grupą tiolową białka. Natomiast w wyniku deglutationylacji katalizowanej przez glutaredoksyny (GRX) dochodzi do odłączenia cząsteczki glutationu od reszty cysteinowej białka. GRX mogą działać poprzez mechanizm monotiolowy, gdzie odłączony od białka glutation utlenia grupę tiolową enzymu. Następnie kolejna cząsteczka GSH redukuje nowo powstały związek pośredni GRX-SSG prowadząc do utworzenia GSSG i zredukowanej GRX. W mechanizmie ditiolowym, który również wykorzystują glutaredoksyny, nietrwałe połączenie enzymu z glutationem jest atakowane przez sąsiednią cysteinę białka powodując powstanie utlenionej GRX oraz cząsteczki GSH.



Ryc. 10. Mechanizmy spontanicznej S-glutationylacji białka. W proces S-glutationylacji może być zaangażowany GSSG, GSH lub też GSNO (na podstawie Musaogullari i Chai 2020, zmieniono).

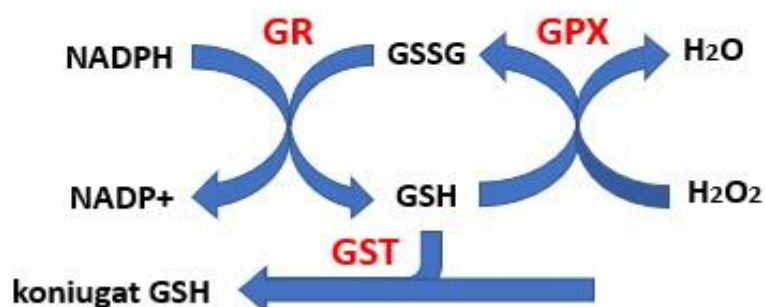
Wiele doniesień wskazuje na ochronną rolę S-glutationylacji białek przed stresem oksydacyjnym (Bergara-Morales i wsp. 2016). Jednakże modyfikacja ta jest również zaangażowana w mechanizmy sygnalizacyjne mające na celu zmianę funkcji ich białek docelowych, szczególnie w warunkach stresowych. Odnosi się to między innymi do chloroplastowej dehydrogenazy aldehydu 3-fosfoglicerynowego (GAPDH) z *A. thaliana* uczestniczącej w cyklu Calvina. S-glutationylacja Cys 149 powoduje zahamowanie aktywności tego enzymu, dzięki czemu nie jest on narażony na negatywne, utleniające działanie nadtlenu wodoru. Wśród białek, które ulegają S-glutationylacji wymienia się również S-transferazę glutationową (GST), peroksyredoksyny, białka szoku cieplnego oraz inne białka, głównie związane ze stresem oksydacyjnym, ale również uczestniczące w fotosyntezie, biosyntezie aminokwasów czy metabolizmie lipidów (Zaffagnini i wsp. 2012; Bergara-Morales i wsp. 2016).

4.4. Mechanizmy obronne roślin przed stresem oksydacyjnym

Bardzo istotne w przypadku stresu oksydacyjnego są mechanizmy antyoksydacyjne rośliny chroniące ją przed poważnymi uszkodzeniami wywołanymi przez pojawienie się nadmiernej ilości RFT (Das i Roychoudhury 2014). W obronie antyoksydacyjnej uczestniczą

zarówno różnorodne enzymy, jak i nieenzymatyczne przeciwutleniacze. Wśród enzymów zaangażowanych w mechanizmy antyoksydacyjne wyróżnia się między innymi reduktazę glutationową (GR), peroksydazę glutationową (GPX), S-transferazę glutationową oraz wiele innych. GR, należąca do oksydoreduktaz, redukuje GSSG do GSH wykorzystując w reakcji NADPH, który jednocześnie ulega utlenieniu do NADP^+ (Ryc. 11). Enzym ten, podobnie jak peroksydaza askorbinianowa, reduktaza dehydroaskorbinianowa oraz reduktaza monodehydroaskorbinianowa, należy do cyklu askorbinian-GSH (Hasanuzzaman i wsp. 2019). W związku z tym, powstały w reakcji katalizowanej przez reduktazę glutationową GSH służy do regeneracji askorbinianu z dehydroaskorbinianu (Hasanuzzaman i wsp. 2019; Das i Roychoudhury 2014). Zredukowany glutation może być również bezpośrednio zaangażowany w reakcje detoksykacji RFT lub ksenobiotyków dzięki aktywności enzymatycznej GPX czy GST (Ryc. 11) (Hasanuzzaman i wsp. 2017). GPX redukuje szkodliwy H_2O_2 z jednoczesnym utlenieniem GSH do GSSG. Natomiast GST unieszkodliwia w komórkach roślinnych ksenobiotyki, między innymi pestycydy czy herbicydy, poprzez katalizowanie wiązania się GSH z tymi związkami. Jednakże podobnie jak GPX może również brać udział w detoksykacji RFT.

Do nieenzymatycznych przeciwutleniaczy można zaliczyć, np. glutation, askorbinian, aminokwas prolinę, flawonoidy, karotenoidy, fenole czy α - tokoferol (Das i Roychoudhury 2014). Wśród związków uczestniczących w obronie przed stresem oksydacyjnym wymienia się także białka metalotioneiny, oligomery glutationu (tzw. fitochelatyny), białka strukturalne oraz polisacharydy ściany komórkowej (Demidchik 2015). Wpływają one na zmniejszanie aktywności katalitycznej metali przejściowych.



Ryc. 11. Enzymy zaangażowane w metabolizm glutationu pełniące funkcję przeciwutleniacza. GPX – peroksydaza glutationowa, GR – reduktaza glutationowa, GST – S-transferaza glutationowa

CEL PRACY

IAA-Asp jest głównym koniugatem amidowym auksyny obecnym w tkankach grochu (*P. sativum* L.) (Bandurski i Schulze 1977). Powstaje on, podobnie jak pozostałe koniugaty amidowe, w zależnej od ATP, dwuetapowej reakcji katalizowanej przez amidosyntetazy z rodziny GH3 (Staswick i wsp. 2005). W przeciwieństwie do IAA-Ala, IAA-Leu czy IAA-Gly, które służą jako źródło wolnego IAA, IAA-Asp oraz IAA-Glu uczestniczą przede wszystkim w oksydacyjnej degradacji auksyny (Ludwig-Müller 2011). Z drugiej strony pojawiające się doniesienia o hydrolizie IAA-Asp oraz IAA-Glu mogą wskazywać również na ich rolę jako magazynów IAA (Ludwig-Müller i wsp. 1996; Tang i wsp. 2019; Hayashi i wsp. 2021). Należy jednak podkreślić, że proces hydrolizy tych koniugatów został do chwili obecnej opisany tylko u kilku gatunków roślin, do których nie zalicza się groch.

IAA-Asp, oprócz utrzymywania homeostazy IAA, wykazuje również swoiste działanie, niezależne od tego fitohormonu. Koniugat ten wpływa między innymi na proces dojrzewania owoców winorośli (Böttcher i wsp. 2013). IAA-Asp jest także zaangażowany w odpowiedź *A. thaliana* na stres biotyczny wywołany przez patogeny grzybowe oraz bakteryjne (González-Lamothe i wsp. 2012). Ponadto opisywany związek wywiera efekt na rośliny poddane działaniu stresu abiotycznego: termicznego (Oetiker i Aeschbacher 1997) oraz solnego i metali ciężkich (Ostrowski i wsp. 2016a).

Należy podkreślić, że wiedza na temat działania IAA-Asp jako cząsteczki aktywnej biologicznie jest wciąż mała. Szczególnie interesującym wydaje się zagadnienie wpływu koniugatu na odpowiedź roślin na stresy abiotyczne oraz biotyczne. Ostrowski i wsp. (2016a) po raz pierwszy wskazali na udział IAA-Asp w odpowiedzi grochu na niekorzystne czynniki środowiskowe. Przedstawione przez autorów badania były jednak wstępne i wymagały dalszej kontynuacji. W związku z powyższym, celem prowadzonych w ramach niniejszej pracy badań było szczegółowe poznanie wpływu IAA-Asp na między innymi poziom przeciwutleniaczy, aktywność enzymów antyoksydacyjnych oraz na modyfikacje potranslacyjne białek w siewkach grochu traktowanych NaCl lub glikolem polietylenowym (PEG). Sprawdzano również, w jaki sposób koniugat może wywoływać zmiany w wymienionych czynnikach. W związku z tym zbadano, czy podawany IAA-Asp moduluje poziom fitohormonów w siewkach grochu. Analizowano także, jak koniugat wpływa na aktywność enzymów odpowiedzialnych za koniugację IAA. Należy dodać, że w niniejszej pracy po raz pierwszy poddano weryfikacji tezę o biologicznej, niezależnej od wolnej auksyny, roli IAA-asparagianu.

Do realizacji zamierzonego celu wyznaczono następujące zadania:

1. Analiza hydrolizy IAA-Asp do IAA w siewkach grochu.
2. Badanie wpływu IAA-Asp na poziom przeciwutleniaczy, peroksydację lipidów oraz aktywność enzymów regulujących poziom glutationu u siewek grochu poddanych działaniu szoku osmotycznego.
3. Badanie wpływu IAA-Asp na S-glutationylację oraz karbonylację białek grochu narażonego na działanie szoku osmotycznego.
4. Oznaczanie poziomu fitohormonów w siewkach grochu potraktowanych koniugatem oraz NaCl lub PEG.
5. Analiza ekspresji i aktywności amidosyntetazy IAA-Asp oraz aktywności syntazy IAGlc w siewkach grochu poddanych działaniu IAA-Asp oraz szoku osmotycznego.

MATERIAŁY I METODY

1. Materiały

1.1. Materiał roślinny i warunki wzrostu

W badaniach wykorzystano 7-dniowe lub 9-dniowe siewki grochu. Nasiona grochu siewnego cukrowego (*P. sativum* L.) odmiany Iłowiecki (W. Legutko) inkubowano w wodzie destylowanej przez 4 h w temperaturze pokojowej. Po tym czasie nasiona umieszczano w plastikowych pojemnikach wypełnionych wysterylizowanymi trocinami i hodowano w ciemności w temperaturze 23-25°C przez 7 dni. Dla sprawdzenia wpływu szoku osmotycznego wywołanego działaniem NaCl, etiolowane siewki grochu przenoszono na szalki Petriego wyłożone bibułą filtracyjną i inkubowano przez 3 godziny w ciemności w wodzie destylowanej (kontrola), 200 μM IAA-Asp, 150 mM NaCl lub 200 μM IAA-Asp w połączeniu z 150 mM NaCl. Dla zbadania wpływu szoku osmotycznego wywołanego działaniem PEG, etiolowane siewki grochu przenoszono do szklanych zlewek wyłożonych na dnie bibułą filtracyjną i inkubowano przez 48 godzin w ciemności w wodzie destylowanej (kontrola), 200 μM IAA-Asp, 20% (w/v) PEG 6000 lub 200 μM IAA-Asp w połączeniu z 20% (w/v) PEG 6000. W celu sprawdzenia, czy występuje hydroliza IAA-Asp etiolowane siewki grochu przenoszono na szalki Petriego wyłożone bibułą filtracyjną i inkubowano przez 3, 16, 24 oraz 48 godzin w ciemności w mieszaninie zawierającej 1 μM IAA-[²H₅, ¹⁵N]Asp oraz 199 μM IAA-Asp.

1.2. Odczynniki

W badaniach stosowano odczynniki o stopniu czystości cz. d. a. oraz przeznaczone do HPLC lub analiz LC-MS z następujących firm:

Bio-Rad - ReadyPrep™ 2-D Starter Kit, ReadyStrip IPG Strips, pH 3-10, 7 cm

EURx – GeneMATRIX Universal RNA/miRNA Purification Kit, RNA Extracol

Hartmann Analytic GmbH - [¹⁴C]IAA (50 mCi mmol⁻¹)

ICN – płyn scyntylacyjny EcoLite (+)

Macherey-Nagel - kolumnienki ekstrakcyjne Chromabond SPE

OiChemIm – [²H₆]ABA, [¹³C₆]IAA, [²H₅]IAA, IAA-Asp, IAA-[²H₅, ¹⁵N]Asp, [²H₄]SA

Roche - tabletki NBT/BCIP, zestaw LightCycler 480 SYBR Green Master I

Serva - membrana nitrocelulozowa NC 2

Sigma-Aldrich – antykozie przeciwciała królicze skoniugowane z alkaliczną fosfatazą, antymysie przeciwciała kozie skoniugowane z alkaliczną fosfatazą, Immobilon Signal Enhancer, [²H₅]JA, kozie przeciwciała poliklonalne skierowane przeciwko dinitrofenolowi, mysie przeciwciała pierwotne skierowane przeciwko glutationowi, rekombinowana reduktaza glutationowa z drożdży *S. cerevisiae*, trypsyna,

Merck - płytki TLC Silica Gel F₂₆₀

Thermo Scientific – DNaza I, marker mas cząsteczkowych Spectra™ multicolor broad range protein ladder (10-260 kDa), zestaw RevertAid First Strand Synthesis Kit

2. Metody

2.1. Badanie hydrolizy IAA-Asp w siewkach grochu

Poziom [²H₅]IAA, jako produktu ewentualnej hydrolizy IAA-[²H₅, ¹⁵N]Asp pobranego podczas inkubacji siewek grochu w mieszaninie zawierającej 1 μM IAA-[²H₅, ¹⁵N]Asp oraz 199 μM IAA-Asp, wyznaczano według zmodyfikowanej metody QuEChERS (ang. *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*) (Perestrelo i wsp. 2019) stosując do oznaczeń chromatografię cieczą z tandemową spektrometrią mas, tzw. LC-MS/MS (ang. *Liquid Chromatography tandem Mass Spectrometry*). Około 100 mg zamrożonych w -80°C pędów siewek grochu homogenizowano w moździerzu w ciekłym azocie. Następnie do utartych prób dodawano 1,7 ml 80% (v/v) acetonitrylu (ACN) zawierającego 1 mM 2,6-di-tert-butylo-4-metylofenol (BHT) oraz 5% (v/v) kwas mrówkowy. Po dodaniu do homogenatów 4 ng [¹³C₆]IAA prowadzono całonocne wytrząsanie prób (170 rpm) w temperaturze 4°C. W kolejnym etapie dodawano do prób 60 mg MgSO₄ i 20 mg NaCl, a następnie ponownie je wytrząsano (170 rpm) przez 30 min w temperaturze pokojowej. Po tym czasie homogenaty wirowano przez 10 min przy 20 000 x g w temperaturze 4°C w celu rozdzielenia fazy wodnej i acetonitrylowej. Górną fazę acetonitrylową przenoszono do nowych probówek, a następnie dodawano do nich 80 mg Na₂SO₄, aby usunąć pozostałą w fazie acetonitrylowej wodę. Homogenaty ponownie wytrząsano oraz wirowano jak opisano powyżej, po czym cały supernatant przenoszono do nowych probówek. Po tym etapie fazę acetonitrylową odparowywano do sucha w strumieniu azotu w temperaturze 45°C, a powstały osad zawieszano w 1 ml 1 M kwasu mrówkowego i nanoszono na wcześniej zrównoważoną (1 ml 100% metanolu i 2 ml 1 M kwasu mrówkowego) kolumnkę ekstrakcyjną Chromabond SPE. Po nałożeniu

prób, kolumnienki przemywano 2 ml 1 M kwasu mrówkowego, a następnie prowadzono elucję związków ze złożem związków stosując 0,5 ml 80% (v/v) metanolu. Otrzymane eluaty liofilizowano przy użyciu koncentratora próżniowego typu SpeedVac i zawieszano w 100 µl 35% (v/v) metanolu zawierającego 0,1% (v/v) kwas mrówkowy. Następnie próby analizowano metodą LC-MS/MS.

Analizy przeprowadzono w aparacie Nexera X2 UHPC sprzężonym z LCMS-8045 (Shimadzu), który wyposażony jest w potrójny kwadrupol z jonizacją przez elektrorozpylanie. Rozdział chromatograficzny prowadzono na kolumnie Ascentis Express C-18 (2,7 µm, 100 x 2,1 mm, Supelco) utrzymywanej w temperaturze 35°C. Faza ruchoma składała się z (solwentu A) 0,1% (v/v) kwasu mrówkowego i (solwentu B) 100% metanolu z 0,1% (v/v) kwasem mrówkowym przepływających z szybkością 0,35 ml min⁻¹ w gradiencie binarnym. Gradient zaczynał się od 35% solwentu B, po czym wzrastał liniowo do 90% solwentu B w ciągu 4 minut. Następnie w ciągu kolejnych 2 minut osiągał 100% solwentu B. Identyfikację związków prowadzono poprzez monitorowanie reakcji rozpadu jonów, tzw. MRM (ang. *Multiple Reaction Monitoring*), w jonizacji dodatniej dla IAA-[²H₅, ¹⁵N]Asp (*m/z* 296,15>133,15), [²H₅]IAA (*m/z* 178,20>132,30) oraz [¹³C₆]IAA (*m/z* 182,20>136,15). Powierzchnię pików badanych jonów potomnych i jonów macierzystych wykorzystywano do oznaczeń ilościowych stosując do odczytu danych oprogramowanie LabSolutions 5.8 (Shimadzu).

2.2. Oznaczanie zawartości proliny oraz askorbinianu

Badanie poziomu proliny

Poziom proliny wyznaczano spektrofotometrycznie według zmodyfikowanej metody, którą opisali Bates i wsp. (1973). 500 mg pędów siewek grochu homogenizowano w moździerzu w ciekłym azocie, a następnie dodawano do moździerza 2,5 ml 3% (w/v) kwasu sulfosalicylowego. Homogenaty wirowano przez 10 minut przy 10 000 x g w temperaturze pokojowej, a otrzymane supernatanty wykorzystywano do badania. Do oznaczenia poziomu proliny przygotowywano mieszaninę reakcyjną zawierającą 100 µl supernatantu, 100 µl 3% (w/v) kwasu sulfosalicylowego, 200 µl 99% kwasu octowego oraz 200 µl kwaśnego roztworu ninhydryny (140 mM ninhydryna w 60% (v/v) kwasie octowym oraz 2,4 M kwasie ortofosforowym). Próby po wymieszaniu inkubowano przez 30 minut w 95°C, a następnie przez 3 minuty w lodzie. W kolejnym etapie prowadzono ekstrakcję toluenem. Do prób dodawano po 1 ml toluenu, wytrząsano je przez 20 sekund, po czym inkubo-

wano próby przez 5 minut w temperaturze pokojowej. Po rozdziale mieszaniny na dwie fazy przenoszono fazę wodną do nowych probówek, a następnie mierzono ich absorbancję przy $\lambda = 520$ nm na spektrofotometrze Vis SP-830Plus (Metertech). Próba kontrolna zawierała sam toluen. Stężenie proliny obliczano na podstawie współczynnika kalibracji. Do wyznaczenia krzywej kalibracyjnej mieszanina reakcyjna zamiast homogenatu zawierała 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350 $\mu\text{g ml}^{-1}$ proliny. Zawartość proliny wyrażano w miligramach na gram świeżej masy (mg g^{-1} świeżej masy).

Badanie poziomu askorbinianu

Pędy siewek grochu homogenizowano w zimnym moździerzu w 5% (w/v) kwasie trójchlorooctowym (TCA), w stosunku 1 g tkanki : 1 ml TCA. Homogenaty wirowano przez 20 minut przy 14 000 x g w temperaturze 4°C, a otrzymane supernatanty rozcieńczano 10-krotnie 5% (w/v) TCA. Do oznaczenia poziomu askorbinianu przygotowywano mieszaninę reakcyjną zawierającą 0,135 ml supernatantu, 0,685 ml roztworu fenantroliny (0,075% (w/v) fenantrolina rozpuszczona w 4,8% (w/v) octanie sodu oraz 0,85% (v/v) kwasie octowym) oraz 0,140 ml świeżo przygotowanego 1% (w/v) FeCl_3 . Próba kontrolna zawierała 5% (w/v) TCA zamiast homogenatu. Przygotowane próby wytrząsano, a następnie inkubowano przez godzinę w temperaturze pokojowej. Absorbancję mierzono przy $\lambda = 512$ nm na spektrofotometrze Vis SP-830Plus (Metertech). Stężenie askorbinianu obliczano na podstawie współczynnika kalibracji. Do wyznaczenia krzywej kalibracyjnej mieszanina reakcyjna zamiast homogenatu zawierała 30, 50, 60, 70, 80, 90 lub 100 μM askorbinian. Poziom askorbinianu wyrażano w mikromolach na gram świeżej masy ($\mu\text{mole g}^{-1}$ świeżej masy).

2.3. Badanie peroksydacji lipidów oraz zawartości metyloglioksalu

Oznaczanie peroksydacji lipidów

W celu oznaczenia peroksydacji lipidów mierzono zawartość dialdehydu malonowego (MDA) powstającego jako produkt peroksydacji występujących w błonach komórkowych kwasów tłuszczowych (Demidchik 2015). Poziom MDA wyznaczano spektrofotometrycznie według zmodyfikowanej metody, którą opisali Heath i Packer (1968). Pędy siewek grochu homogenizowano w moździerzu w 5% (w/v) TCA, w stosunku 1 g tkanki : 2 ml TCA. Homogenaty wirowano przez 15 minut przy 18 000 x g w 4°C, a otrzymane supernatanty wykorzystywano do badania. Do oznaczenia poziomu MDA przygotowywano mieszaninę reakcyjną zawierającą 0,25 ml supernatantu, 0,25 ml 15% (w/v) TCA w 0,25 M HCl oraz

0,25 ml 0,37% (w/v) kwasu tiobarbiturowego (TBA) w 0,25 M HCl. Próba kontrolna zamiast TBA zawierała wodę destylowaną. Próby po wymieszaniu inkubowano przez 10 minut w 95°C, a następnie wstawiono je do lodu na kilka minut w celu ich ochłodzenia. Próby ponownie wirowano przez 3 minuty przy 5 000 x g w temperaturze pokojowej, po czym mierzono ich absorbancję przy $\lambda = 535$ nm na spektrofotometrze Vis SP-830Plus (Metertech). Poziom MDA obliczano stosując współczynnik absorpcji $\varepsilon = 156 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ i wyrażano w nanomolach na gram świeżej masy (nmole g^{-1} świeżej masy).

Oznaczanie zawartości metylogliksalu

Poziom metylogliksalu wyznaczano spektrofotometrycznie według zmodyfikowanej metody, którą opisali Gilbert i Brandt (1975). Pędy siewek grochu homogenizowano w mózdzierzu w 10% (w/v) TCA, w stosunku 0,5 g tkanki : 1 ml TCA. Homogenaty wirowano przez 10 minut przy 10 000 x g w 4°C, a otrzymane supernatanty wykorzystywano do badania. Do oznaczenia poziomu metylogliksalu przygotowywano mieszaninę reakcyjną zawierającą 20 μl supernatantu oraz 180 μl 0,2 mM 2,4-dinitrofenylohydrazyny (DNPH) w 2 mM HCl. Do próby kontrolnej zamiast supernatantu dodawano 10% (w/v) TCA. Próby inkubowano przez 45 minut w temperaturze 37°C, a następnie mierzono ich absorbancję na płytkach 96-dołkowych przy $\lambda = 432$ nm (mikropłytkowy spektrofotometr Epoch™, BioTek). Zawartość metylogliksalu obliczano stosując współczynnik absorpcji $\varepsilon = 14\,189 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ i wyrażano w nanomolach na gram świeżej masy (nmole g^{-1} świeżej masy).

2.4. Badanie stosunku GSH/GSSG oraz stosunku białkowych grup -SH do całkowitej zawartości grup -SH

Wyznaczanie stosunku GSH/GSSG

Stosunek GSH/GSSG wyznaczano według zmodyfikowanej metody opisanej przez Gietler i wsp. (2016). Pędy siewek grochu homogenizowano w mózdzierzu w 3% (w/v) zimnym TCA, w stosunku 0,3 g tkanki : 1 ml TCA. Homogenaty trzymano przez 30 minut w temperaturze 4°C, a następnie wirowano przez 15 minut przy 18 000 x g w 4°C. Do oznaczenia GSSG 0,2 ml supernatantu dodawano do 0,2 ml 10 mM *N*-etylomaleimidu (NEM) rozpuszczonego w 125 mM buforze fosforanowym pH 7,5 zawierającym 5 mM EDTA. Po 70-minutowej inkubacji w temperaturze pokojowej, z prób usuwano NEM przez pięciokrotną ekstrakcję eterem dietylowym. W celu oznaczenia całkowitej puli glutationu (GSH oraz GSSG) do supernatantu nie dodawano NEM. Mieszanina reakcyjna o całkowitej objętości

200 μ l zawierała 100 mM bufor fosforanowy pH 7,5, 0,5 mM NADPH, 0,02 U reduktazy glutationowej, 0,6 mM kwas 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoesowy) (DTNB) oraz 10 μ l supernatantu. Absorbancję mierzono na płytkach 96-dołkowych przy $\lambda = 412$ nm (mikroplótkowy spektrofotometr Epoch™, BioTek). Zawartość GSH obliczano poprzez odjęcie od całkowitej puli glutationu zawartości GSSG.

Wyznaczanie stosunku białkowych grup -SH do całkowitej zawartości grup -SH

Stosunek białkowych grup -SH do całkowitej zawartości grup -SH wyznaczano spektrofotometrycznie według zmodyfikowanej metody, którą opisali De Kok i Kuiper (1986). Pędy siewek grochu homogenizowano w zimnym mózdzierzu w 0,15% (w/v) askorbinianie sodu, w stosunku 0,2 g tkanki : 3,3 ml askorbinianu sodu. Następnie otrzymane homogenaty wirowano przez 15 minut przy 18 000 x g w 4°C. W celu wyznaczenia całkowitej zawartości grup tiolowych 0,5 ml supernatantu dodawano do mieszaniny zawierającej 0,5 ml 8% (w/v) SDS, 1 ml 0,2 M Tris-HCl pH 8,0 oraz 0,1 ml świeżo przygotowanego 10 mM DTNB, po czym całość inkubowano przez 15 minut w temperaturze 30°C. Próba kontrolna zamiast supernatantu zawierała 0,15% (w/v) askorbinian sodu. Absorbancję mierzono przy $\lambda = 415$ nm na spektrofotometrze UVmini-1240 UV-vis (Shimadzu). W celu wyznaczenia zawartości niebiałkowych grup tiolowych 0,5 ml supernatantu odbiałczano poprzez ogrzewanie w temperaturze 100°C przez 5 minut. Następnie 0,5 ml potraktowanego wysoką temperaturą homogenatu inkubowano w mieszaninie opisanej powyżej. Ilość tiolowych grup białkowych obliczano poprzez odjęcie niebiałkowej ilości grup tiolowych od całkowitej ilości grup tiolowych.

2.5. Oznaczanie aktywności enzymów regulujących poziom glutationu

Badanie aktywności reduktazy glutationowej (GR, EC 1.6.4.2)

Aktywność reduktazy glutationowej wyznaczano według zmodyfikowanej metody, którą opisali Schaedle i Bassham (1977). Pędy siewek grochu homogenizowano w zimnym mózdzierzu w 50 mM buforze fosforanowym pH 7,5 zawierającym 1 mM EDTA, w stosunku 0,5 g tkanki : 1 ml buforu. Homogenaty wirowano przez 15 minut przy 18 000 x g w 4°C, a otrzymane supernatanty wykorzystywano do badania. Aktywność reduktazy glutationowej oznaczano w całkowitej objętości 220 μ l zawierającej 34 mM bufor fosforanowy pH 7,5, 3,41 mM MgCl₂, 0,29 mM NADPH oraz 15 μ l supernatantu. Reakcję rozpoczynano dodając 80 μ l 10 mM GSSG. Absorbancję mierzono na płytkach 96-dołkowych przy $\lambda = 340$ nm przez 5 minut w temperaturze pokojowej (mikroplótkowy spektrofotometr Epoch™, BioTek).

Szybkość reakcji enzymatycznej obliczano stosując współczynnik absorpcji $\varepsilon = 3,73 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ i wyrażano jako liczbę nmoli GSSG zredukowanych w ciągu 1 minuty na 1 mg całkowitego białka.

Wykrywanie aktywności izoform reduktazy glutationowej (GR, EC 1.6.4.2)

W celu oznaczenia aktywności izoform reduktazy glutationowej pędy siewek grochu homogenizowano w zimnym mózdzierzu w 50 mM buforze fosforanowym pH 7,5 zawierającym 2 mM EDTA, w stosunku 1 g tkanki : 1 ml buforu. Następnie homogenaty wirowano przez 15 minut przy 18 000 x g w temperaturze 4°C. Określoną objętość homogenatu zawierającą 30 μg białka наносono na żel (10% (w/v) żel rozdzielający i 4% (w/v) żel zagęszczający). Po elektroforezie w warunkach natywnych (Ogita i Markert 1979) aktywność izoform GR analizowano w żelu według metody opisanej przez Ye i wsp. (1997) i zmodyfikowanej przez Romero-Puertas i wsp. (2006). Żel przemywano wodą destylowaną, a następnie inkubowano przez 15 minut w ciemności w roztworze zawierającym 0,6 mM DTNB w 50 mM buforze fosforanowym pH 8,0. Po tym czasie żel przenoszono na 30 minut do mieszaniny zawierającej 1,2 mM GSSG i 0,35 mM NADPH w 50 mM buforze fosforanowym pH 8,0. W ostatnim etapie żel inkubowano 4 godziny w ciemności w mieszaninie 1 mM błękitu nitrotetrazoliowego (NBT) oraz 0,04 mM 2,6-dichloroindofenolu (DCIP) w 50 mM buforze fosforanowym pH 8,0. W celu uwidocznienia wszystkich białek żel po elektroforezie w warunkach natywnych krótko barwiono w mieszaninie zawierającej 0,4% (w/v) błękit brylantowy Coomassie G-250, 4,5% (v/v) kwas nadchlorowy oraz 20% (v/v) etanol (Blakesley i Boezi 1977).

Badanie aktywności peroksydazy glutationowej (GPX, EC 1.11.1.9)

Aktywność peroksydazy glutationowej wyznaczano według zmodyfikowanej metody, którą opisali Gaber i wsp. (2012). Pędy siewek grochu homogenizowano w zimnym mózdzierzu w 125 mM buforze fosforanowym pH 8,2, w stosunku 0,1 g tkanki : 1 ml buforu. Homogenaty wirowano przez 15 minut przy 18 000 x g w 4°C, a otrzymane supernatanty wykorzystywano do badania. Aktywność peroksydazy glutationowej oznaczano w całkowitej objętości 1 ml zawierającej 50 mM bufor fosforanowy pH 8,2, 1 mM EDTA, 1 mM GSH, 0,25 mM NADPH, 0,25 mM H_2O_2 oraz 50 μl supernatantu. Reakcję rozpoczynano dodając 350 μl 2 U/ml reduktazy glutationowej w 50 mM buforze fosforanowym pH 8,2. Absorbancję mierzono przy $\lambda = 340 \text{ nm}$ przez 5 minut w temperaturze pokojowej (spektrofotometr UVmini-1240 UV-Vis, Shimadzu). Szybkość reakcji enzymatycznej obliczano stosując współczyn-

nik absorpcji $\epsilon = 6,62 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ i wyrażano jako liczbę nmoli NADPH utlenionych w ciągu 1 minuty na 1 mg całkowitego białka.

Wykrywanie aktywności izoform peroksydazy glutationowej (GPX, EC 1.11.1.9)

W celu oznaczenia aktywności izoform peroksydazy glutationowej pędy siewek grochu homogenizowano w zimnym mózdzierzu w 50 mM buforze fosforanowym pH 7,5, w stosunku 1 g tkanki : 1 ml buforu. Po elektroforezie w warunkach natywnych wykonanej według procedury stosowanej do oznaczenia izoform reduktazy glutationowej (Ogita i Markert 1979), żel przemywano wodą destylowaną, a następnie inkubowano 15 minut w mieszaninie zawierającej 13 mM GSH i 0,004% (v/v) H_2O_2 w 50 mM buforze fosforanowym pH 8,2 (Lin i wsp. 2002). Po tym czasie żel przenoszono na 10 minut do mieszaniny zawierającej 1,2 mM bromek 3-(4,5-dimetylotiazol-2-ylo)-2,5-difenylotetrazoliowy (MTT) oraz 1,6 mM metosiarczan fenazyny (PMS).

Badanie aktywności S-transferazy glutationowej (GST, EC 2.5.1.18)

Aktywność S-transferazy glutationowej wyznaczano według zmodyfikowanej metody, którą opisali Rice-Evans i wsp. (1991). Pędy siewek grochu homogenizowano w zimnym mózdzierzu w 50 mM buforze fosforanowym pH 7,0, w stosunku 0,5 g tkanki : 1 ml buforu. Homogenaty wirowano przez 15 minut przy $18\,000 \times g$ w 4°C , a otrzymane supernatanty wykorzystywano do badania. Aktywność S-transferazy glutationowej oznaczano w mieszaninie o objętości 200 μl zawierającej 85 mM bufor fosforanowy pH 7,0, 1 mM GSH oraz 1 mM 1-chloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB). Reakcję rozpoczynano od dodania 10 μl supernatantu zawierającego S-transferazę glutationową. Absorbancję mierzono na płytkach 96-dółkowych przy $\lambda = 340 \text{ nm}$ przez 5 minut w temperaturze pokojowej (mikropłytkowy spektrofotometr EpochTM, BioTek). Szybkość reakcji enzymatycznej obliczano stosując współczynnik absorpcji $\epsilon = 5,76 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ i wyrażano jako liczbę nmoli GSH przyłączonych do CDNB w ciągu 1 minuty na 1 mg całkowitego białka.

Wykrywanie aktywności izoform S-transferazy glutationowej (GST, EC 2.5.1.18)

W celu oznaczenia aktywności izoform S-transferazy glutationowej pędy siewek grochu homogenizowano w zimnym mózdzierzu w 50 mM buforze fosforanowym pH 7,5, w stosunku 1 g tkanki : 1 ml buforu. Po elektroforezie w warunkach natywnych wykonanej według procedury stosowanej do oznaczenia izoform reduktazy glutationowej (Ogita i Markert 1979), żel przemywano wodą destylowaną, a następnie inkubowano przez 10 minut z wytrząsaniem w mieszaninie zawierającej 4,5 mM GSH, 1 mM CDNB oraz 1 mM NBT w

0,1 M buforze fosforanowym pH 7,0 (Contreras-Vergara i wsp. 2007). Po tym czasie ponownie przemyty wodą destylowaną żel przenoszono do roztworu 3 mM PMS w 0,1 M buforze fosforanowym pH 7,0.

2.6. Badanie S-glutationylacji białek grochu

Elektroforeza denaturująca białek w żelu poliakrylamidowym SDS-PAGE

Pędy siewek grochu homogenizowano w zimnym moździerzu w 50 mM buforze fosforanowym pH 7,5, w stosunku 1 g tkanki : 1 ml buforu. Homogenaty wirowano przez 15 minut przy 18 000 x g w 4°C, a otrzymane supernatanty nanoszono na dwa żele (30 µg białka na ścieżkę) przeznaczone do elektroforezy SDS-PAGE w warunkach nieredukujących (10% (w/v) żel rozdzielający i 4% (w/v) żel zagęszczający) (Ogita i Markert 1979). Po rozdziale elektroforetycznym jeden z żeli barwiono w mieszaninie zawierającej 0,1% (w/v) błękit brylantowy Coomassie R-250, 10% (v/v) kwas octowy oraz 40% (v/v) metanol, aby zobrazować prążki z białkami. Drugi żel natomiast przeznaczono do wykonania procedury Western blot w celu detekcji białek glutationylowanych. Jako markera mas cząsteczkowych używano Spectra™ multicolor broad range protein ladder (10-260 kDa).

Western blot

Białka z żelu przenoszono na membranę nitrocelulozową NC 2 podczas mokrego elektrotransferu prowadzonego przez godzinę w temperaturze 4°C pod napięciem 90 V w 10 mM buforze CAPS/NaOH pH 11,0 zawierającym 10% (v/v) etanol. Następnie przez noc blokowano wolne miejsca na membranie używając odczynnika Immobilon Signal Enhancer. W kolejnym etapie membranę inkubowano przez godzinę w roztworze przeciwciał pierwotnych (mysie przeciwciała monoklonalne skierowane przeciwko glutationowi) rozcieńczonych w stosunku 1 : 1000 odczynnikiem Immobilon Signal Enhancer. Membranę, po trzykrotnym płukaniu przez 5 minut buforem TBS (137 mM NaCl oraz 2,7 mM KCl w 25 mM Tris-HCl pH 8,0), inkubowano przez godzinę w roztworze przeciwciał wtórnych (antymysie przeciwciała kozie skoniugowane z alkaliczną fosfatazą) rozcieńczonych w stosunku 1 : 10 000 odczynnikiem Immobilon Signal Enhancer. W ostatnim etapie użyto tabletek NBT/BCIP do zlokalizowania kompleksów antygen-przeciwciała. Prążki białek odpowiadające S-glutationylowanym białkom wykrytym poprzez wykonanie Western blot wycinano z żelu po elektroforezie SDS-PAGE, a następnie zidentyfikowano metodą spektrometrii mas.

Identyfikacja białek metodą spektrometrii mas (we współpracy z grupą badawczą pod kierunkiem prof. Joerga Fettke z Instytutu Biochemii i Biologii Uniwersytetu w Poczdamie, w Niemczech)

Prążki białek wycięte z żelu odbarwiano poprzez ich inkubację przez 15 minut w mieszaninie o objętości 100 μ l zawierającej 50% (v/v) ACN oraz 50 mM wodorowęglan amonu. Następnie do fragmentów żelu dodawano 50 μ l 100% ACN w celu ich dehydratacji. Po 5-minutowej inkubacji usuwano ACN i suszono wycięte kawałki żelu w koncentratorze próżniowym typu SpeedVac przez 15 minut w temperaturze 37°C. W kolejnym etapie dodawano 15 μ l roztworu trypsyny (3 μ g trypsyny rozpuszczano w 100 μ l schłodzonego 50 mM wodorowęglanu amonu) i prowadzono przez 15 minut rehydratację fragmentów żelu na lodzie. Po dodaniu 10 μ l 50 mM wodorowęglanu amonu próby inkubowano przez całą noc w temperaturze 37°C. Po procesie trawienia białek przez trypsynę do prób dodawano 20 μ l wody destylowanej i inkubowano je przez 15 minut w temperaturze pokojowej. Po tym czasie prowadzono ekstrakcję peptydów z fragmentów żelu poprzez 5-minutową inkubację prób w 20 μ l ACN. W kolejnym etapie dodawano 20 μ l 5% (v/v) kwasu mrówkowego i próby inkubowano przez 15 minut. Następnie wykonywano ponownie ekstrakcję peptydów używając ACN jak opisano powyżej. Próby z dwóch ekstrakcji łączono ze sobą i odparowywano do sucha w koncentratorze próżniowym typu SpeedVac. W ostatnim etapie osady zawierające peptydy zawieszano w od 5 do 10 μ l 0,1% (v/v) kwasu trifluorooctowego (TFA).

Peptydy analizowano metodą spektrometrii mas typu MALDI-TOF (ang. *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight*) (Microflex II, Bruker) oraz MS/MS MALDI-LTQ XL (Thermo Scientific). Nakładano 0,35 μ l próby z peptydami na metalową płytkę, a następnie na próby nanoszono taką samą objętość służącego jako matryca roztworu kwasu α -cyjano-4-hydroksy-cynamonowego (HCCA) przygotowanego poprzez rozpuszczenie 3,5 mg HCCA w 84% (v/v) ACN, 13% (v/v) etanolu oraz w wodzie. Widma masowe peptydów (m/z 500 - 3500 Da) rejestrowano w trybie jonów dodatnich. Białka identyfikowano porównując uzyskane wartości do bazy danych SwissProt przy użyciu oprogramowania Mascot (<http://matrixscience.com>). Jako enzym trawiący wybrano trypsynę, a tolerancję dla peptydu ustawiono na 0,6 Da.

2.7. Badanie karbonylacji białek grochu

Przygotowanie prób do elektroforezy dwukierunkowej, tzw. 2-DE (ang. *Two-Dimensional gel Electrophoresis*)

Oznaczanie karbonylowanych białek wykonano według zmodyfikowanej metody opisananej przez Colombo i wsp. (2016). Pędy siewek grochu homogenizowano w zimnym mrożdzierzu w 50 mM buforze Tris-HCl pH 7,5 zawierającym 2 mM EDTA, w stosunku 1 g tkanki : 1 ml buforu. Homogenaty wirowano przez 15 minut przy 20 000 x g w 4°C, a otrzymane supernatanty wykorzystywano do badania. Do prób zawierających 1 ml supernatantu dodawano 0,2 ml 10 mM DNPH w 2 M HCl, a następnie próby wytrząsano przez godzinę w ciemności w temperaturze pokojowej. W kolejnym etapie dodawano do prób 1,2 ml schłodzonego 20% (w/v) TCA. Po wymieszaniu próby wstawiano na 15 minut do lodówki, po czym wirowano je przez 5 minut przy 10 000 x g w 4°C. Następnie odrzucano supernatanty i powtarzano procedurę z TCA. W kolejnym etapie otrzymane osady przemywano 1 ml mieszaniny zawierającej 50% (v/v) etanol oraz 50% (v/v) octan etylu, po czym wirowano próby przez minutę przy 5 000 x g w 4°C. Po odrzuceniu supernatantów powtarzano 4-krotnie procedurę z octanem etylu. W końcowym etapie osady rozpuszczano w 1 ml mieszaniny zawierającej 7 M mocznik, 2 M tiomocznik oraz 4% (w/v) CHAPS, a następnie oznaczano w próbach stężenie białka.

Elektroforeza dwukierunkowa

W kolejnym etapie wyekstrahowane białka rozdzielano metodą dwukierunkowej elektroforezy korzystając z zestawu ReadyPrep™ 2-D Starter Kit. Próby przeznaczone do dwukierunkowej elektroforezy połączonej z Western blot zawierały 20 µg białka. Natomiast próby poddawane dwukierunkowej elektroforezie połączonej z wycinaniem z żeli białek do identyfikacji zawierały 100 µg białka. Przygotowane próby białek dopełniano do objętości 125 µl mieszaniną zawierającą 8 M mocznik, 2% (w/v) CHAPS, 50 mM ditiotretitol (DTT), 0,2% (w/v) mieszaninę amfolitów o pH w zakresie 3-10 oraz 0,001% (w/v) błękit bromofenolowy. Następnie wymieszane próby nakładano na plastikową tackę z rynienkami, po czym na każdą próbę rozprowadzoną po całej długości rynienki kładziony był pasek żelowy ReadyStrip IPG Strips, pH 3-10 o długości 7 cm. Po 20 minutach od położenia pasków ich powierzchnię pokrywano olejem mineralnym. W kolejnym etapie prowadzono całonocną inkubację pasków w temperaturze pokojowej w celu ich rehydratacji oraz absorpcji prób. Ogniskowanie izoelektryczne białek, tzw. IEF (ang. *Isoelectric Focusing*), odbywało się w 20°C w aparacie Protean i12™ IEF System (Bio-Rad) zgodnie z parametrami opisanymi w Tabeli 1.

Po zakończonym ogniskowaniu zabezpieczone paski wkładano na całą noc do -80°C , a następnego dnia wykonywano elektroforezę SDS-PAGE oraz Western blot.

Tabela 1. Parametry ogniskowania izoelektrycznego dla białek z pędów siewek grochu.

Rodzaj napięcia	Maksymalna wartość napięcia (V)	Maksymalna wartość natężenia (μA)	Czas trwania (h)	Vh
Gradientowy (wzrost liniowy)	250	50	0:20	-
Gradientowy (wzrost liniowy)	4000	50	2:00	-
Stały	4000	50	-	10 000

Przed wykonaniem elektroforezy SDS-PAGE paski były inkubowane przez 10 minut w mieszaninie zawierającej 6 M mocznik, 2% (w/v) SDS, 0,375 M Tris-HCl pH 8,8, 20% (v/v) glicerol oraz 2% (w/v) DTT. Następnie prowadzona była 10-minutowa inkubacja pasków w mieszaninie składającej się z 6 M mocznika, 2% (w/v) SDS, 0,375 M Tris-HCl pH 8,8, 20% (v/v) glicerolu oraz 1,5% (w/v) jodoacetamidu. Przemywanie pasków w opisanych roztworach miało na celu zredukowanie powstałych po ogniskowaniu izoelektrycznym wiązań disiarczkowych, alkilację wolnych grup $-\text{SH}$ oraz utworzenie kompleksów pomiędzy białkami a SDS. W kolejnym etapie paski zanurzano na kilka sekund w buforze do elektroforezy SDS-PAGE, po czym kładziono je na wcześniej spolimeryzowane żele do elektroforezy (10% (w/v) żele rozdzielające). Na powierzchnię pasków wlewano 0,5% (w/v) agarozę rozpuszczoną w roztworze o składzie: 25 mM Tris, 192 mM glicyna, 0,1% (w/v) SDS oraz 0,001% (w/v) błękit bromofenolowy, która po spolimeryzowaniu umożliwiała przyleganie pasków do powierzchni żelu rozdzielającego. Elektroforeza prowadzona była do momentu, aż czoło niebieskiego barwnika pojawiło się na wysokości 1 cm do końca żelu. Dla każdego powtórzenia biologicznego jeden z żeli po zakończeniu elektroforezy barwiono w mieszaninie zawierającej 0,1% (w/v) błękit brylantowy Coomassie R-250, 10% (v/v) kwas octowy oraz 40% (v/v) metanol, aby zobrazować plamki z białkami. Drugi żel natomiast przeznaczano do

wykonania procedury Western blot. Jako markera mas cząsteczkowych używano Spectra™ multicolor broad range protein ladder (10-260 kDa).

Western blot oraz identyfikacja białek metodą spektrometrii mas (we współpracy z grupą badawczą pod kierunkiem prof. Joerga Fettke z Instytutu Biochemii i Biologii Uniwersytetu w Poczdamie, w Niemczech)

W celu wykrycia karbonylowanych białek znakowanych DNPH, po elektroforezie SDS-PAGE wykonywano analizę Western blot według procedury opisanej w podrozdziale 2.6. Przez noc blokowano wolne miejsca na membranach używając odczynnika Immobilon Signal Enhancer. W kolejnym etapie membrany inkubowano przez godzinę w roztworze przeciwciał pierwotnych (kozie przeciwciała poliklonalne skierowane przeciwko dinitrofenolowi (DNP)) rozcieńczonych w stosunku 1 : 5 000 odczynnikiem Immobilon Signal Enhancer. Membrany, po trzykrotnym płukaniu przez 5 minut buforem TBS, inkubowano przez godzinę w roztworze przeciwciał wtórnych (antykozie przeciwciała królicze skoniugowane z alkaliczną fosfatazą) rozcieńczonych w stosunku 1 : 20 000 odczynnikiem Immobilon Signal Enhancer. W ostatnim etapie użyto tabletek NBT/BCIP do zlokalizowania kompleksów antygen-przeciwciało. Następnie membrany z wykrytymi karbonylowanymi białkami zeskanowano, po czym analizowano w programie SameSpots (TotalLab) przeznaczonym do analizy żeli 2-DE. Na podstawie wykonanej analizy karbonylowane białka wykazujące różnice pomiędzy wariantami wycinano z żeli po elektroforezie dwukierunkowej, a następnie identyfikowano metodą spektrometrii mas zgodnie z procedurą opisaną w podrozdziale 2.6.

2.8. Oznaczanie poziomu IAA-Asp oraz fitohormonów

Oznaczanie poziomu IAA-Asp oraz fitohormonów metodą LC-MS/MS

Przygotowanie prób oraz ich analiza metodą LC-MS/MS była wykonywana jak opisano w podrozdziale 2.1 Metod. Do homogenatów dodawano mieszaninę standardów wewnętrznych zawierającą: 4 ng [²H₆]ABA, 4 ng [²H₅]IAA, 4 ng IAA-[²H₅, ¹⁵N]Asp, 10 ng [²H₅]JA oraz 10 ng [²H₄]SA. Identyfikację związków prowadzono poprzez monitorowanie ich MRM (Tabela 2).

Tabela 2. Wartości MRM oraz rodzaj jonizacji dla badanych fitohormonów w pędach siewek grochu.

Hormon	Typ jonizacji	Wartości MRM
[² H ₆]ABA	(-)	269,20>159,05
ABA	(-)	263,0>153,0
[² H ₅]IAA	(+)	178,20>132,30
IAA	(+)	176,20>130,30
IAA-[² H ₅ , ¹⁵ N]Asp	(+)	296,15>133,15
IAA-Asp	(+)	291,10>130,20
[² H ₅]JA	(+)	214,10>134,30
JA	(+)	211,10>133,30
[² H ₄]SA	(-)	141,40>97,10
SA	(-)	137,30>93,0

2.9. Badanie ekspresji oraz aktywności amidosyntetazy IAA-Asp

Oznaczanie ekspresji genu amidosyntetazy IAA-Asp z siewek grochu

W celu zbadania ekspresji genu amidosyntetazy IAA-Asp (*PsGH3*) wykonano reakcję PCR w czasie rzeczywistym opartą na odwrotnej transkrypcji, tzw. RT-qPCR (ang. *Reverse Transcription quantitative Polymerase Chain Reaction*). W pierwszym etapie izolowano całkowity RNA ze 100 mg pędów siewek grochu, które homogenizowano w moździerzu w 1 ml roztworu RNA Extracol. Następnie próby wirowano przez 10 minut przy 12 000 x g w temperaturze 4°C, a uzyskany supernatant pobierano do nowych probówek. Po 5-minutowej inkubacji prób w temperaturze pokojowej dodawano do nich 100 µl 99% 1-bromo-3-chloropropanu, po czym próby mieszano i ponownie inkubowano jak podano powyżej. W kolejnym etapie próby wirowano przez 15 minut przy 12 000 x g w temperaturze 4°C w celu rozdzielenia faz. Następnie ostrożnie pobierano górną fazę do nowych probówek. Do prób pochodzących od siewek traktowanych przez 3 godziny wodą, 200 µM IAA-Asp, 150 mM NaCl

lub 200 μM IAA-Asp w połączeniu z 150 mM NaCl dodawano 0,5 ml 100% izopropanolu. W kolejnym etapie prowadzono 10-minutową inkubację prób w temperaturze pokojowej oraz ich wirowanie przez 10 minut przy 12 000 x g w temperaturze 4°C. Uzyskane osady przemywano 1 ml 75% (v/v) etanolu, a następnie próby ponownie wirowano przez 5 minut przy 10 000 x g w temperaturze 4°C. W ostatnim etapie osad po zwirowaniu zawieszano w 50 μl wody wolnej od RNaz. W przypadku prób pochodzących od siewek traktowanych przez 48 godzin wodą, 200 μM IAA-Asp, 20% (w/v) PEG 6000 lub 200 μM IAA-Asp w połączeniu z 20% (w/v) PEG 6000 do pobranej górnej fazy dodawano 300 μl 100% etanolu. Następnie korzystano z zestawu GeneMATRIX Universal RNA/miRNA Purification Kit postępując zgodnie z instrukcją od producenta.

W celu usunięcia pozostałości genomowego DNA z wyizolowanego z siewek grochu RNA przeprowadzono reakcję trawienia prób z wykorzystaniem wolnej do RNaz DNazy I. Następnie wykonywano reakcję odwrotnej transkrypcji z użyciem zestawu RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit. Mieszanina reakcyjna, oprócz odczynników z kitu, zawierała również 1 μg RNA. Reakcję przeprowadzano zgodnie z instrukcją załączoną przez producenta. Mieszanina reakcyjna do qPCR o objętości 20 μl składała się ze składników zestawu LightCycler 480 SYBR Green Master I oraz z 50 ng cDNA. Sekwencje starterów stosowanych do analizy ekspresji genu *PsGH3* oraz genu referencyjnego *Ps18S rRNA* przedstawiono w Tabeli 3. Reakcję wykonywano w termocyklerze LightCycler 480 (Roche) według warunków podanych w Tabeli 4. Specyficzność każdej reakcji potwierdzano na podstawie krzywej topnienia. Względną ekspresję analizowanego genu obliczano za pomocą oprogramowania LightCycler 480 SW 1.5.1 (Roche) wobec *Ps18S rRNA* jako genu referencyjnego (Saha i Vandemark 2012).

Tabela 3. Sekwencje zaprojektowanych starterów używanych w reakcji qPCR.

Badany gen	Numer dostępu	Sekwencja startera	Długość produktu (nt)
<i>PsGH3</i>	>KU310549.1	L: 5'- AGCCCAAACGAAGCCATCTT-3' P: 5'- CATGATGAGCCCACAGAGCA-3'	75
<i>Ps18S rRNA</i>	>AH001723.2	L: 5'- CGGGTGACGGAGAATTAGGG-3' P: 5'- CTGCCTTCCTTGGATGTGGT-3'	73

Tabela 4. Warunki reakcji qPCR stosowane do badania ekspresji genu amidosyntetazy IAA-Asp z grochu.

Etap	Czas	Temperatura	Ilość cykli
Denaturacja wstępna matrycy	5 min	95°C	1
Denaturacja matrycy	10 s	95°C	45
Przyłączanie starterów	20 s	57°C	
Elongacja	15 s	72°C	

Oznaczanie aktywności enzymatycznej amidosyntetazy IAA-Asp z siewek grochu

Pędy siewek grochu homogenizowano w zimnym moździerzu w 50 mM buforze Tris-HCl pH 7,6 zawierającym 2 mM EDTA oraz 5 mM β -merkaptoetanol, w stosunku 1 g tkanki : 1 ml buforu. Homogenaty wirowano przez 15 minut przy 18 000 x g w 4°C, a otrzymane supernatanty stosowano do reakcji. Aktywność enzymatyczną amidosyntetazy IAA-Asp oznaczano metodą izotopową z wykorzystaniem rozdziału substratów i produktów reakcji metodą chromatografii cienkowarstwowej (TLC) (Ostrowski i Jakubowska 2011). Mieszanina reakcyjna o objętości 8 μ l zawierała 2 mM IAA, 5 mM ATP, 50 mM Tris-HCl pH 8,5, 10 mM L-Asp, 5 mM MgCl₂, 2 mM DTT, 0,05 μ Ci [¹⁴C]IAA oraz 3 μ l homogenatu. Mieszaninę inkubowano przez 2 h w temperaturze 30°C, a następnie reakcję zahamowywano poprzez naniesienie 4 μ l mieszaniny na płytkę TLC Silica Gel F₂₆₀. Miejsca naniesienia próby suszono w strumieniu gorącego powietrza. Chromatografię cienkowarstwową prowadzono w układzie rozwijającym o składzie chloroform : octan etylu : kwas mrówkowy zmieszanych w stosunku objętościowym 35 : 55 : 10 (Staswick i wsp. 2005). Następnie płytkę suszono i zanurzano w odczynniku Van Urk-Salkowskiego (Ehmann 1977), w celu wizualizacji składników zawierających pierścień indolowy (IAA, IAA-Asp). Do naczynka scyntylicyjnego wkładano wycięty obszar płytki odpowiadający IAA-Asp, po czym dodawano po 2 ml płynu scyntylicyjnego EcoLite (+). Radioaktywność prób zmierzono w liczniku scyntylicyjnym Wallac 1409. Radioaktywność całkowitą oznaczono nanosząc 4 μ l mieszaniny reakcyjnej na fragment płytki bez przeprowadzania chromatografii.

2.10. Oznaczanie aktywności syntazy IAGlc

Pędy siewek grochu homogenizowano w zimnym mrożdzierzu w 50 mM buforze Tris-HCl pH 7,5 zawierającym 2 mM EDTA, w stosunku 1 g tkanki : 1 ml buforu. Homogenaty wirowano przez 15 minut przy 10 000 x g w 4°C, a otrzymane supernatanty stosowano do reakcji. Aktywność enzymatyczną syntazy IAGlc oznaczano metodą izotopową z wykorzystaniem rozdziału substratów i produktów reakcji metodą TLC jak opisano w podrozdziale 2.9. Mieszanina reakcyjna o objętości 24 µl (15 µl środowiska reakcji oraz 9 µl homogenatu) zawierała 4 mM IAA, 0,05 µCi [¹⁴C]IAA, 50 mM HEPES-NaOH pH 7,6, 7,5 mM UDPG, 2,5 mM MgCl₂ oraz 5 mM laktone kwasu D-glukonowego (Ostrowski i wsp. 2015). Chromatografię cienkowarstwową prowadzono w układzie rozwijającym złożonym z octanu etylu : 2-butanonu : etanolu : wody zmieszanych w stosunku objętościowym 5 : 3 : 1 : 1. Płytki TLC barwiono jak opisano wyżej. Fragment płytki zawierający produkt reakcji odpowiadający retencji 1-O-IA-glukozy wycinano i umieszczano w naczynku scyntylacyjnym. Radioaktywność zmierzono jak opisano wyżej.

2.11. Inne metody analityczne

Oznaczanie stężenia białka

Stężenie białka oznaczano spektrofotometrycznie metodą Bradforda (1976) używając albuminy surowicy wołowej jako standardu.

Analizy statystyczne

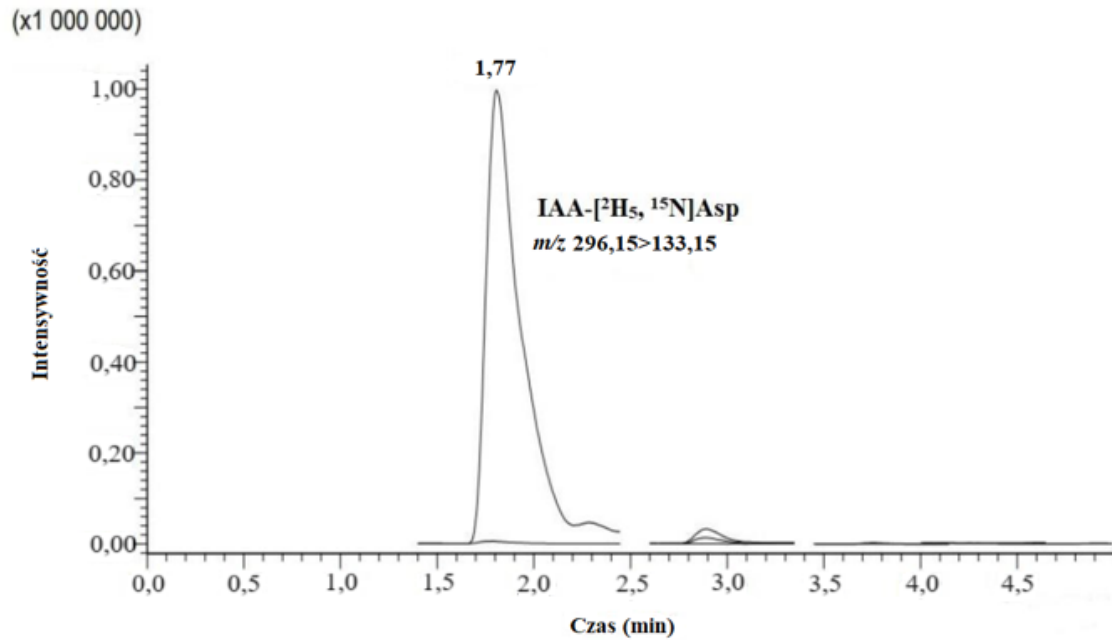
Wszystkie dane przedstawione są jako średnia ± odchylenie standardowe (SD). Dane zostały poddane analizie statystycznej ANOVA wraz z testem *post-hoc* Tukeya.

WYNIKI

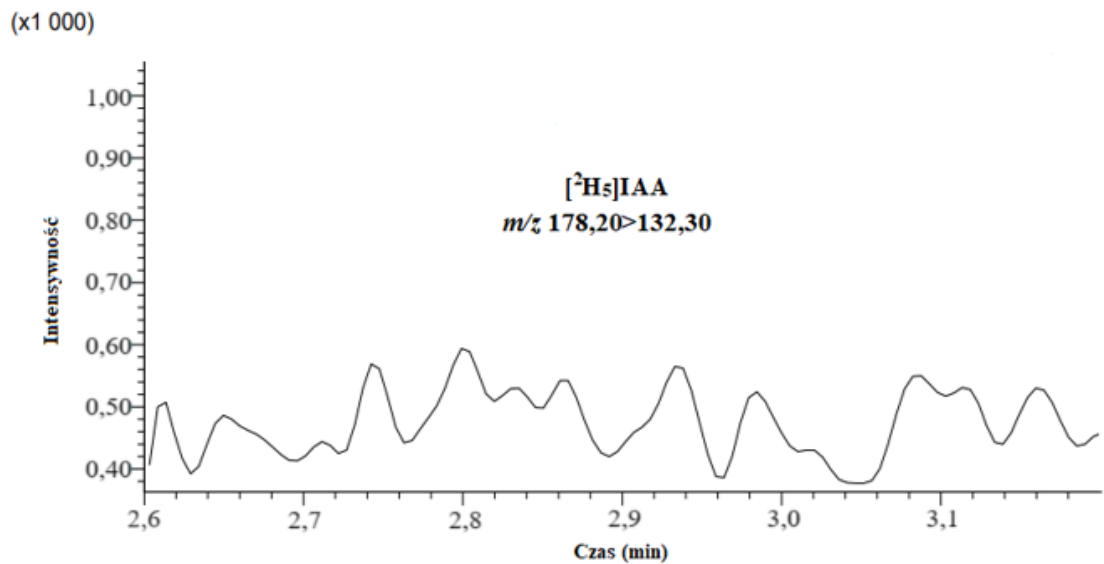
1. Analiza hydrolizy IAA-Asp do IAA w siewkach *P. sativum*

Biorąc pod uwagę doniesienia o hydrolizie IAA-Asp u *B. rapa*, *F. vesca* czy *A. thaliana* (Ludwig-Müller i wsp. 1996; Tang i wsp. 2019; Hayashi i wsp. 2021), w pierwszym etapie badań sprawdziliśmy, czy proces ten zachodzi również w siewkach *P. sativum*. W tym celu inkubowano siewki w obecności radioaktywnie znakowanego koniugatu IAA-[²H₅, ¹⁵N]Asp przez 3, 16, 24 i 48 godzin. Pobieranie znakowanego koniugatu przez rośliny zostało zaobserwowane w przypadku każdego z analizowanych czasów inkubacji siewek z mieszaniną zawierającą IAA-[²H₅, ¹⁵N]Asp (Ryc. 12a). Jednakże nie wykryto [²H₅]IAA w siewkach *P. sativum*, co świadczy o braku u tych roślin hydrolizy IAA-Asp we wszystkich badanych warunkach (Ryc. 12b).

(a)



(b)



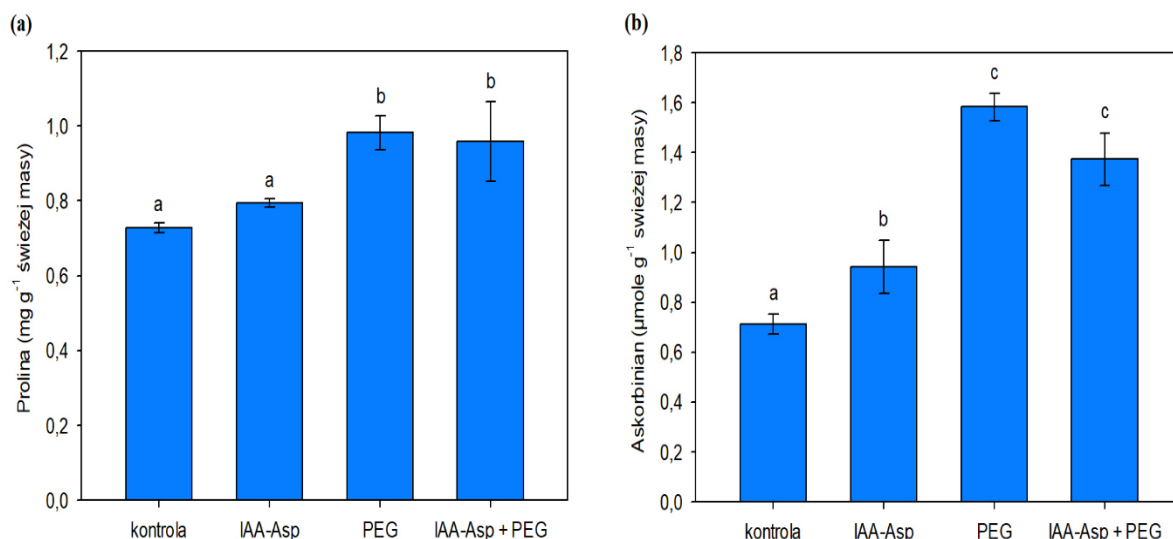
Ryc. 12. Analiza hydrolizy IAA-Asp w pędach siewek grochu. (a) Chromatogram LC-MS/MS przedstawiający MRM dla IAA-[²H₅, ¹⁵N]Asp ekstrahowanego z homogenatu, potwierdzający pobieranie znakowanego IAA-Asp przez siewki grochu inkubowane przez 3 godziny. (b) Chromatogram przedstawiający brak pików dla [²H₅]IAA w siewkach grochu traktowanych IAA-[²H₅, ¹⁵N]Asp, co potwierdza brak hydrolizy IAA-Asp do IAA u tych roślin.

2. Poziom proliny oraz askorbinianu w siewkach grochu traktowanych IAA-Asp oraz czynnikami powodującymi szok osmotyczny

Ze względu na wcześniejsze doniesienia dotyczące efektu, jaki wywiera IAA-Asp na aktywność enzymów antyoksydacyjnych, jak i na poziom nadtlenu wodoru w siewkach grochu w warunkach stresu abiotycznego, zbadano wpływ samego koniugatu oraz w połączeniu z NaCl lub PEG na poziom przeciwutleniaczy, proliny oraz askorbinianu (Ostrowski i wsp. 2016a). Po 3-godzinnej inkubacji siewek z wodą, IAA-Asp, NaCl lub IAA-Asp razem z NaCl nie zaobserwowano żadnych zmian w zawartości badanych przeciwutleniaczy (nie pokazano).

Jak przedstawiono na Ryc. 13a, poziom proliny wzrósł po potraktowaniu rośliny PEG ($0,98 \text{ mg g}^{-1}$ świeżej masy) w porównaniu do kontroli ($0,73 \text{ mg g}^{-1}$ świeżej masy). Nie zaobserwowano natomiast różnic w poziomie proliny pomiędzy siewkami inkubowanymi w roztworze IAA-Asp a kontrolą. Podobnie rośliny traktowane PEG oraz IAA-Asp w połączeniu z PEG nie wykazywały między sobą zmian w zawartości proliny.

Poziom askorbinianu był około 1,2-krotnie podwyższony po inkubacji siewek z IAA-Asp w porównaniu do kontroli (Ryc. 13b). Również rośliny potraktowane PEG wykazywały zwiększoną zawartość askorbinianu ($1,58 \text{ } \mu\text{moli g}^{-1}$ świeżej masy) w stosunku do kontroli ($0,71 \text{ } \mu\text{moli g}^{-1}$ świeżej masy). Nie zaobserwowano natomiast różnic w poziomie askorbinianu pomiędzy siewkami grochu traktowanymi samym PEG a inkubowanymi w roztworze IAA-Asp oraz PEG.



Ryc. 13. Wpływ IAA-Asp oraz szoku osmotycznego na poziom proliny (a) oraz askorbinianu (b) w pędach siewek grochu. Rośliny były inkubowane w 200 μM IAA-Asp, 20% (w/v) PEG lub 200 μM IAA-Asp w połączeniu z 20% (w/v) PEG przez 48 godzin. Wyniki przedstawiono w postaci średniej ± odchylenie standardowe dla 3 powtórzeń biologicznych każdego wariantu. Różnice istotne statystycznie ($p < 0,05$; test Tukeya) występują pomiędzy wynikami oznaczonymi różnymi literami.

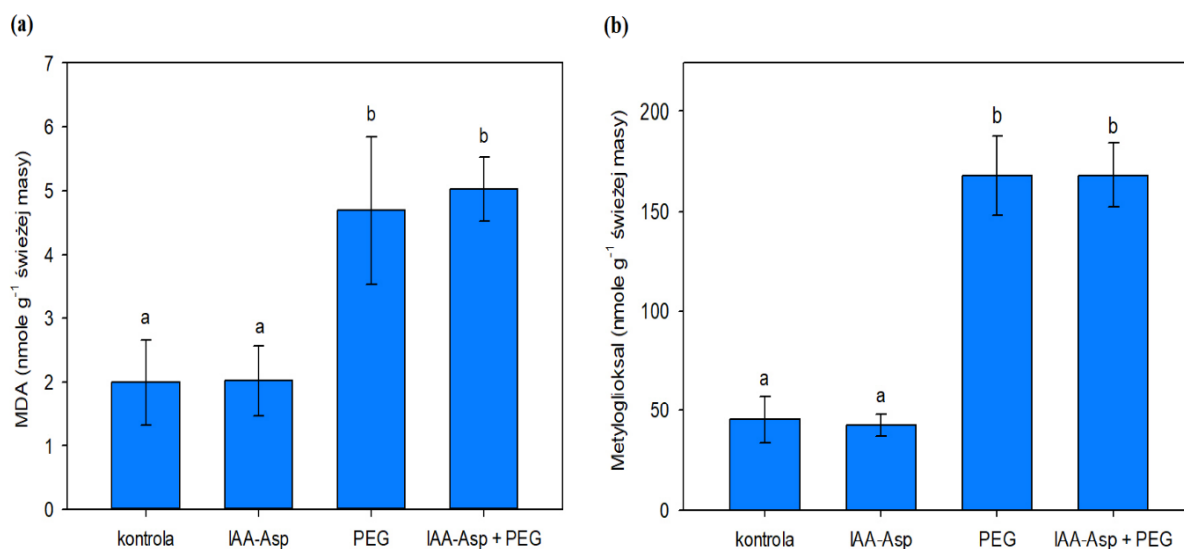
3. Wpływ IAA-Asp oraz szoku osmotycznego na peroksydację lipidów oraz zawartość metylogliksalu

W kolejnym etapie badań sprawdzono, czy w warunkach szoku osmotycznego IAA-Asp wpływa na peroksydację lipidów poprzez zmierzenie zawartości MDA powstającego jako produkt peroksydacji kwasów tłuszczowych, występujących w błonach komórkowych (Demidchik 2015; Shumilina i wsp. 2019). Badano również poziom metylogliksalu, należącego, podobnie jak MDA, do związków dikarbonylowych, który również może być wytwarzany na drodze peroksydacji lipidów (Shumilina i wsp. 2019). Po 3-godzinnej inkubacji siewek z wodą, IAA-Asp, NaCl lub IAA-Asp razem z NaCl nie zaobserwowano żadnych zmian w poziomie MDA i metylogliksalu (nie pokazano).

Jak przedstawiono na Ryc. 14a, poziom MDA zwiększył się około 2,4-krotnie po inkubacji siewek grochu w roztworze PEG w stosunku do kontroli. Nie wykryto natomiast różnic w zawartości MDA pomiędzy roślinami traktowanymi PEG a inkubowanymi w roztworze IAA-Asp w połączeniu z PEG. Podobnie podawany koniugat nie wpłynął na zmianę w poziomie MDA w porównaniu do roślin kontrolnych.

W przypadku zawartości metylogliksalu nie zaobserwowano zmian w jego poziomie pomiędzy wariantem kontrolnym a siewkami traktowanymi IAA-Asp (Ryc. 14b). Natomiast

siewki poddane działaniu PEG miały zwiększony poziom metylogliksalu (168,26 nmoli g⁻¹ świeżej masy) w stosunku do kontroli (45,49 nmoli g⁻¹ świeżej masy). Nie wykryto jednakże różnic pomiędzy roślinami traktowanymi PEG a inkubowanymi w roztworze IAA-Asp oraz PEG.



Ryc. 14. Wpływ IAA-Asp oraz szoku osmotycznego na poziom MDA (a) oraz metylogliksalu (b) w pędach siewek grochu. Rośliny były inkubowane w 200 μM IAA-Asp, 20% (w/v) PEG lub 200 μM IAA-Asp w połączeniu z 20% (w/v) PEG przez 48 godzin. Wyniki przedstawiono w postaci średniej ± odchylenie standardowe dla 3 powtórzeń biologicznych każdego wariantu. Różnice istotne statystycznie ($p < 0,05$; test Tukeya) występują pomiędzy wynikami oznaczonymi różnymi literami.

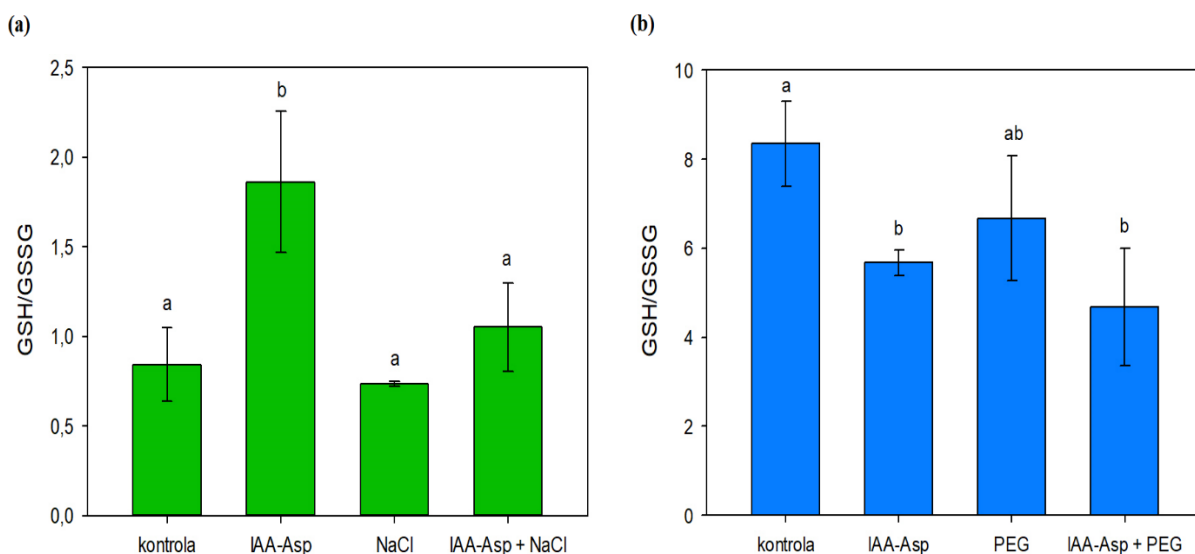
4. Stosunek GSH/GSSG oraz stosunek białkowych grup -SH do całkowitej zawartości grup -SH w siewkach grochu traktowanych IAA-Asp oraz czynnikami wywołującymi szok osmotyczny

Glutation, należący do grupy antyoksydantów, odgrywa ważną rolę w obronie komórek roślinnych przed stresem oksydacyjnym (Hasanuzzaman i wsp. 2019). Jedną z jego funkcji jest utrzymywanie środowiska wewnątrzkomórkowego w stanie zredukowanym. Równowaga stanu redoks jest kontrolowana przez stosunek GSH do GSSG. W związku z tym zbadano w siewkach grochu, czy IAA-Asp może modulować ten stosunek. Sprawdzone również, czy IAA-Asp wpływa na stosunek białkowych grup -SH do całkowitej zawartości grup -SH, który jest ściśle zależny od występującego w komórkach stanu redoks.

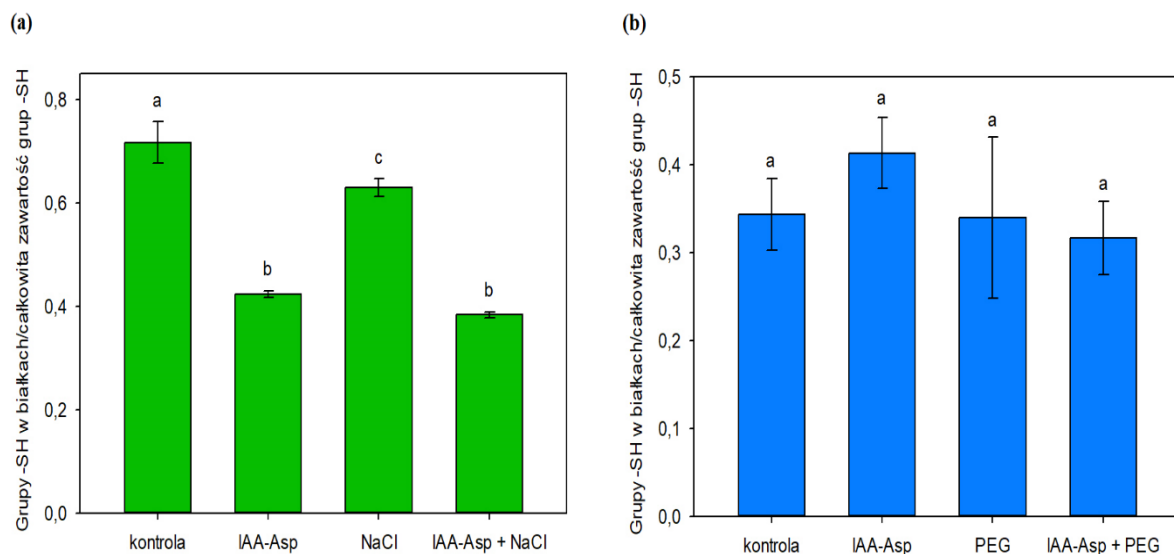
Jak pokazano na Ryc. 15a, stosunek GSH/GSSG wzrósł około 2,2-krotnie u siewek grochu poddanych działaniu IAA-Asp przez 3 godziny w stosunku do kontroli. Odmienne

wyniki występują u roślin traktowanych samym NaCl lub też w połączeniu z IAA-Asp. Opisywane warianty nie wykazywały różnic w stosunku GSH/GSSG w porównaniu do kontroli. Badany stosunek nie uległ również zmianie u roślin inkubowanych w roztworze PEG, natomiast zmniejszył się około 1,5-krotnie u siewek traktowanych IAA-Asp przez 48 godzin porównując wyniki z kontrolą (Ryc. 15b). Brak jest także różnic w stosunku GSH/GSSG pomiędzy siewkami poddanymi działaniu PEG a inkubowanymi w roztworze IAA-Asp oraz PEG.

Na Ryc. 16 widoczne są wykresy przedstawiające stosunek grup -SH w białkach do całkowitej zawartości grup -SH w siewkach grochu. W wyniku traktowania roślin solą badany stosunek uległ zmniejszeniu (0,63) w porównaniu do kontroli (0,72) (Ryc. 16a). Jeszcze większy spadek stosunku grup -SH w białkach do całkowitej zawartości grup -SH zaobserwowano u siewek poddanych działaniu IAA-Asp (spadek 1,7-krotny) lub IAA-Asp w połączeniu z NaCl (spadek 1,9-krotny). Natomiast nie ma różnic w stosunku grup tiolowych pomiędzy czterema wariantami inkubowanymi przez 48 godzin (Ryc. 16b).



Ryc. 15. Wpływ IAA-Asp oraz szoku osmotycznego na stosunek GSH/GSSG w pędach siewek grochu. (a) Rośliny były inkubowane w 200 μ M IAA-Asp, 150 mM NaCl lub 200 μ M IAA-Asp w połączeniu z 150 mM NaCl przez 3 godziny. (b) Rośliny były inkubowane w 200 μ M IAA-Asp, 20% (w/v) PEG lub 200 μ M IAA-Asp w połączeniu z 20% (w/v) PEG przez 48 godzin. Wyniki przedstawiono w postaci średniej \pm odchylenie standardowe dla 3 powtórzeń biologicznych każdego wariantu. Różnice istotne statystycznie ($p < 0,05$; test Tukeya) występują pomiędzy wynikami oznaczonymi różnymi literami.



Ryc. 16. Wpływ IAA-Asp oraz szoku osmotycznego na stosunek grup -SH w białkach do całkowitej zawartości grup -SH w pędach siewek grochu. (a) Rośliny były inkubowane w 200 μ M IAA-Asp, 150 mM NaCl lub 200 μ M IAA-Asp w połączeniu z 150 mM NaCl przez 3 godziny. **(b)** Rośliny były inkubowane w 200 μ M IAA-Asp, 20% (w/v) PEG lub 200 μ M IAA-Asp w połączeniu z 20% (w/v) PEG przez 48 godzin. Wyniki przedstawiono w postaci średniej \pm odchylenie standardowe dla 3 powtórzeń biologicznych każdego wariantu. Różnice istotne statystycznie ($p < 0,05$; test Tukeya) występują pomiędzy wynikami oznaczonymi różnymi literami.

5. Zmiana aktywności enzymów regulujących poziom glutationu pod wpływem działania IAA-Asp oraz czynników powodujących szok osmotyczny

Enzymy takie jak reduktaza glutationowa, peroksydaza glutationowa czy S-transferaza glutationowa regulując poziom glutationu, w konsekwencji wpływają na stosunek GSH/GSSG (Hasanuzzaman i wsp. 2019). W związku z opisanymi w rozdziale 4 Wyników zmianami w stosunku GSH/GSSG pod wpływem działania IAA-Asp oraz szoku osmotycznego, przeanalizowano również wpływ tych czynników na aktywność enzymów modułujących poziom glutationu. Aktywność GR, GPX oraz GST analizowano spektrofotometrycznie w sposób ilościowy, a także wykonano elektroforezę w warunkach natywnych w celu wizualizacji izoform tych enzymów.

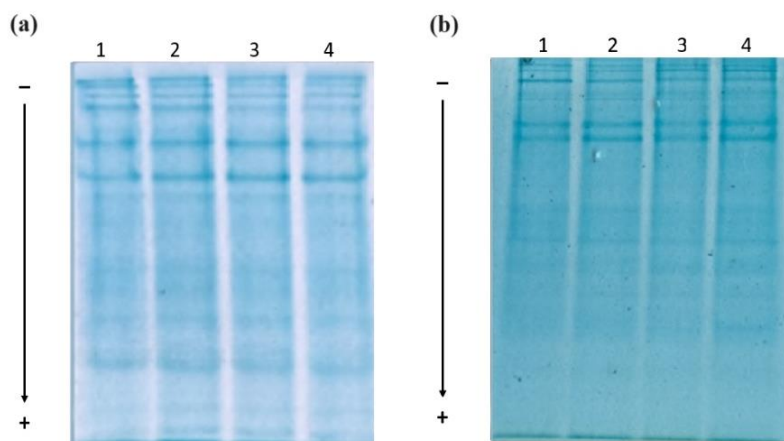
Jak przedstawiono na Ryc. 18a, siewki grochu traktowane przez 3 godziny IAA-Asp, jak również samym NaCl, miały podwyższoną aktywność reduktazy glutationowej w porównaniu z kontrolą. Nie zaobserwowano natomiast różnic w aktywności GR pomiędzy roślinami poddanymi działaniu IAA-Asp a inkubowanymi w roztworze chlorku sodu. Z drugiej strony siewki traktowane IAA-Asp w połączeniu z NaCl miały zmniejszoną aktywność reduktazy

glutationowej ($70,4 \text{ nmoli min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ białka) w porównaniu do roślin eksponowanych na działanie samej soli ($90,7 \text{ nmoli min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ białka). W przypadku 48-godzinnej inkubacji, tylko u siewek traktowanych PEG zaobserwowano zmianę aktywności GR (wzrost około 1,4-krotny) w stosunku do kontroli (Ryc. 18c). Pozostałe dwa warianty miały wartości porównywalne do wariantu kontrolnego. Na Ryc. 17a i 17b widoczne są żele po barwieniu błękitem Coomassie G-250, wykonanym w celu przedstawienia całkowitej ilości białka użytego do analiz izoform enzymów. Natomiast na Ryc. 18b i 18d pokazano żele z izoformami GR po 3 lub 48 godzinach inkubacji siewek grochu. Pojedynczy prążek reduktazy glutationowej zaobserwowano w kontroli, jak również w wariantach z siewkami traktowanymi przez 3 godziny IAA-Asp, NaCl lub IAA-Asp w połączeniu z NaCl (Ryc. 18b). Natomiast homogenaty z roślin inkubowanych przez 48 godzin w roztworze samego IAA-Asp, PEG lub IAA-Asp razem z PEG ujawniły drugi, dodatkowy prążek wykazujący aktywność GR (Ryc. 18d). Połączenie IAA-Asp z PEG zmieniło intensywność prążków reduktazy glutationowej (wzrost intensywności dla prążka 2 i zmniejszenie intensywności dla prążka 1) w porównaniu z innymi testowanymi wariantami.

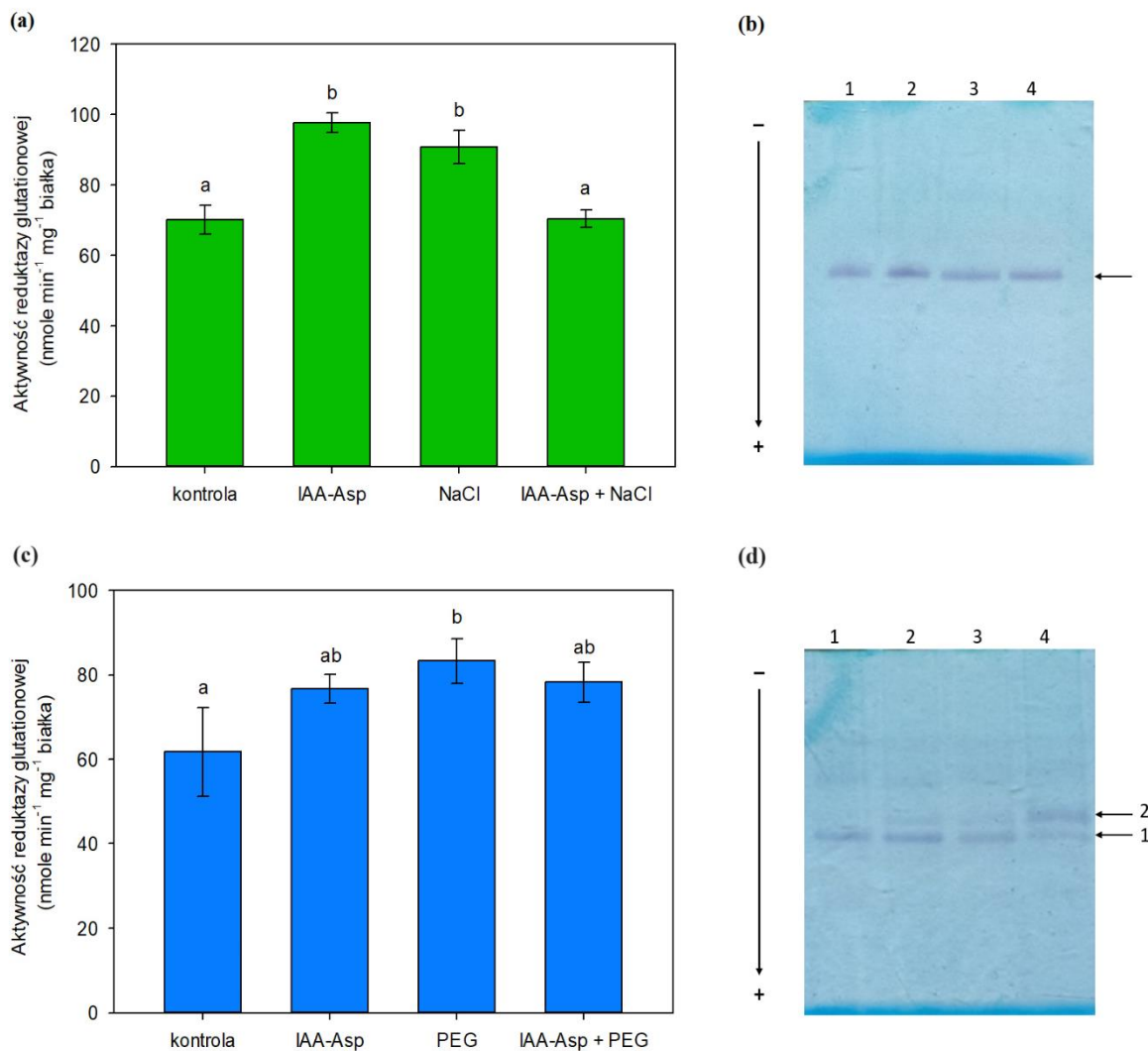
Aktywność peroksydazy glutationowej była zmniejszona około 1,4-krotnie w siewkach grochu poddanych działaniu soli w porównaniu do kontroli (Ryc. 19a). Podobny spadek aktywności zaobserwowano u roślin traktowanych IAA-Asp w połączeniu z NaCl. Nie wykazano natomiast różnic pomiędzy wariantem z IAA-Asp a wariantem kontrolnym. Odmienne wyniki uzyskano po 48-godzinnej inkubacji siewek, gdzie aktywność GPX wzrosła po traktowaniu roślin IAA-Asp ($111,42 \text{ nmoli min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ białka) w stosunku do kontroli ($58,63 \text{ nmoli min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ białka) (Ryc. 19c). Nie zaobserwowano jednakże zmian w aktywności peroksydazy glutationowej pomiędzy roślinami inkubowanymi z wodą a poddanymi działaniu PEG lub IAA-Asp razem z PEG. Na Ryc. 19 widoczne są również izoformy GPX wykryte po inkubacji żeli z substratami GSH oraz H_2O_2 . Dwa prążki o aktywności peroksydazy glutationowej zaobserwowano w przypadku wszystkich czterech wariantów siewek inkubowanych przez 3 godziny (Ryc. 19b). Natomiast dodatkowa izoforma enzymu pojawiła się po dłuższym, 48-godzinnym traktowaniu siewek IAA-Asp, PEG oraz IAA-Asp w połączeniu z PEG (Ryc. 19d).

W przypadku S-transferazy glutationowej nie wykryto różnic w aktywności tego enzymu pomiędzy roślinami inkubowanymi z wodą a poddanymi 3-godzinnemu działaniu IAA-Asp, NaCl lub IAA-Asp razem z NaCl (Ryc. 20a). Jednak po 48-godzinnej inkubacji, siewki grochu traktowane IAA-Asp w połączeniu z PEG wykazywały zwiększoną aktywność GST w porównaniu do pozostałych wariantów (Ryc. 20c). Liczba izoform S-transferazy glu-

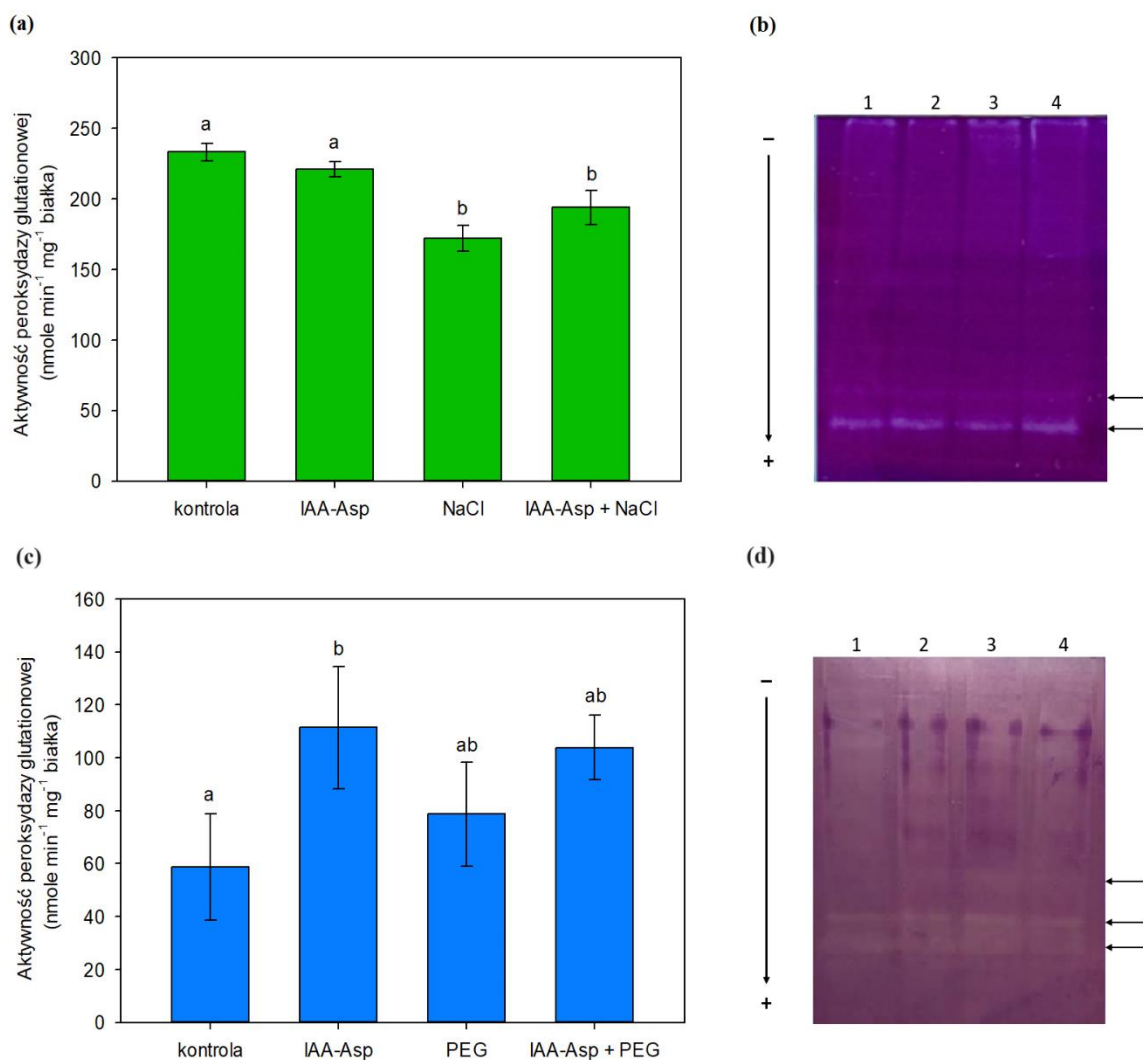
tationowej była taka sama (dwie) dla wszystkich czterech wariantów siewek inkubowanych przez 3 godziny (Ryc. 20b), natomiast po 48 godzinach inkubacji pojawiła się dodatkowa izoforma enzymu we wszystkich wariantach badawczych (Ryc. 20d).



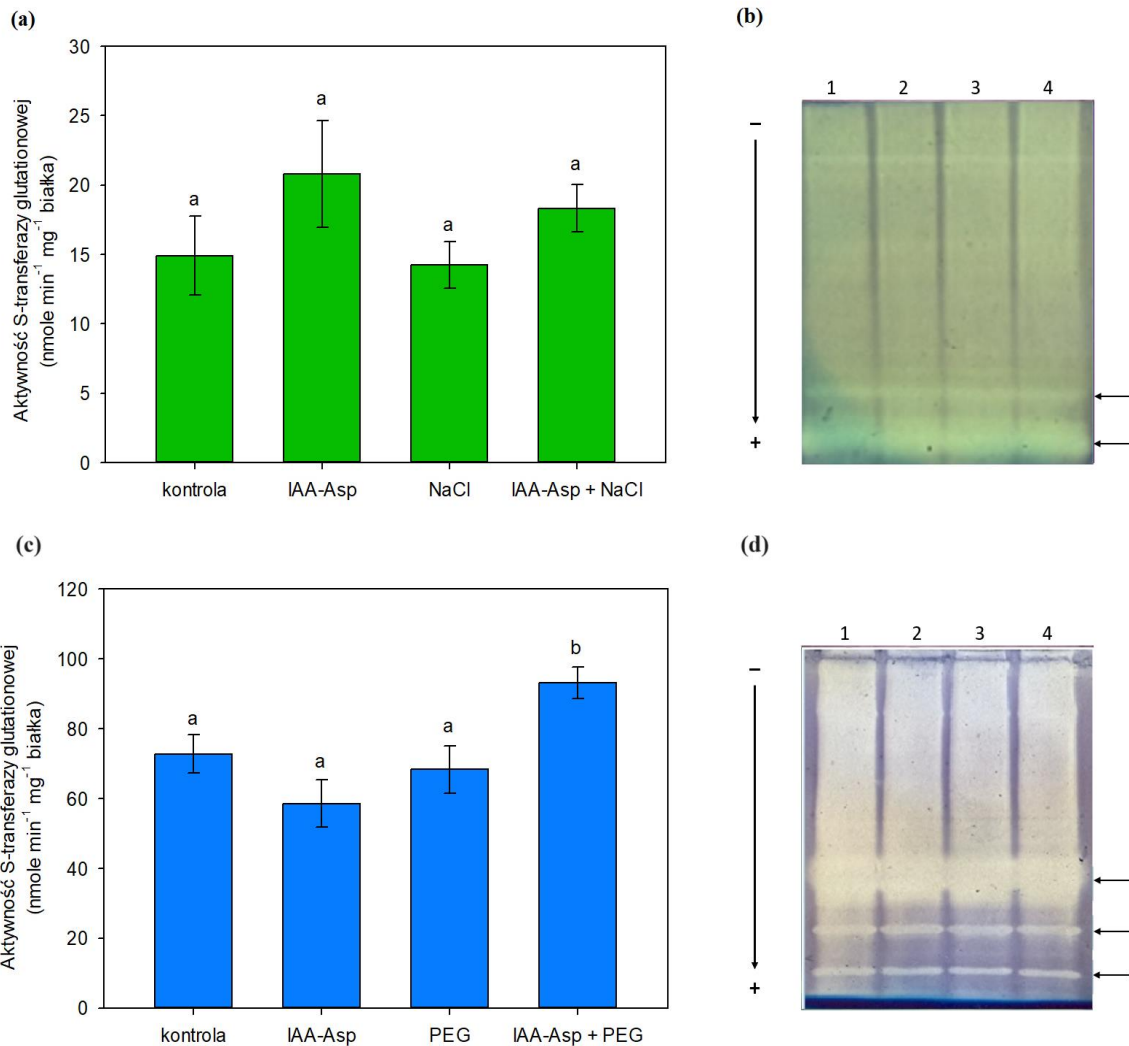
Ryc. 17. Proteinogramy przedstawiające całkowitą ilość białka użytą do analiz izoform enzymów.
(a) 1 – kontrola, 2 – 200 μM IAA-Asp, 3 – 150 mM NaCl, 4 – 200 μM IAA-Asp oraz 150 mM NaCl.
(b) 1 – kontrola, 2 – 200 μM IAA-Asp, 3 – 20% (w/v) PEG, 4 – 200 μM IAA-Asp oraz 20% (w/v) PEG.



Ryc. 18. Wpływ IAA-Asp oraz szoku osmotycznego na aktywność reduktazy glutationowej w pędach sievek grochu. Analizy spektrofotometryczne (a, c) oraz zymogramy z izoformami enzymu (b, d). (a, b) Rośliny były inkubowane w wodzie (1), 200 μ M IAA-Asp (2), 150 mM NaCl (3) lub 200 μ M IAA-Asp w połączeniu z 150 mM NaCl (4) przez 3 godziny. (c, d) Rośliny były inkubowane w wodzie (1), 200 μ M IAA-Asp (2), 20% (w/v) PEG (3) lub 200 μ M IAA-Asp w połączeniu z 20% (w/v) PEG (4) przez 48 godzin. (a, c) Wyniki przedstawiono w postaci średniej \pm odchylenie standardowe dla 3 powtórzeń biologicznych każdego wariantu. Różnice istotne statystycznie ($p < 0,05$; test Tukeya) występują pomiędzy wynikami oznaczonymi różnymi literami. (b, d) Strzałki wskazują izoformy enzymu.



Ryc. 19. Wpływ IAA-Asp oraz szoku osmotycznego na aktywność peroksydazy glutationowej w pędach siewek grochu. Analizy spektrofotometryczne (a, c) oraz zymogramy z izoformami enzymu (b, d). (a, b) Rośliny były inkubowane w wodzie (1), 200 μ M IAA-Asp (2), 150 mM NaCl (3) lub 200 μ M IAA-Asp w połączeniu z 150 mM NaCl (4) przez 3 godziny. **(c, d)** Rośliny były inkubowane w wodzie (1), 200 μ M IAA-Asp (2), 20% (w/v) PEG (3) lub 200 μ M IAA-Asp w połączeniu z 20% (w/v) PEG (4) przez 48 godzin. **(a, c)** Wyniki przedstawiono w postaci średniej \pm odchylenie standardowe dla 3 powtórzeń biologicznych każdego wariantu. Różnice istotne statystycznie ($p < 0,05$; test Tukeya) występują pomiędzy wynikami oznaczonymi różnymi literami. **(b, d)** Strzałki wskazują izoformy enzymu.

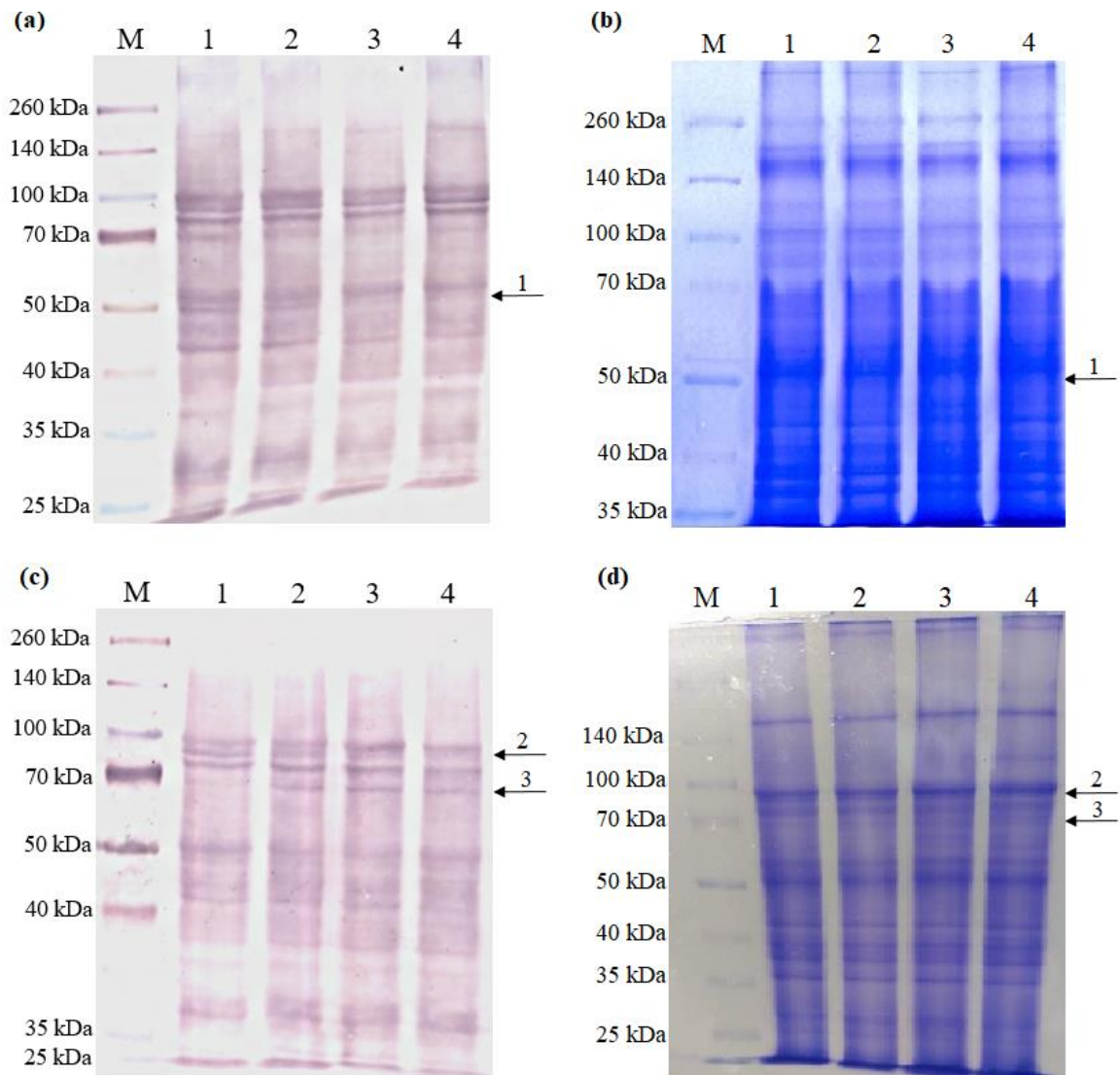


Ryc. 20. Wpływ IAA-Asp oraz szoku osmotycznego na aktywność S-transferazy glutationowej w pędach siewek grochu. Analizy spektrofotometryczne (a, c) oraz zymogramy z izoformami enzymu (b, d). (a, b) Rośliny były inkubowane w wodzie (1), 200 μM IAA-Asp (2), 150 mM NaCl (3) lub 200 μM IAA-Asp w połączeniu z 150 mM NaCl (4) przez 3 godziny. (c, d) Rośliny były inkubowane w wodzie (1), 200 μM IAA-Asp (2), 20% (w/v) PEG (3) lub 200 μM IAA-Asp w połączeniu z 20% (w/v) PEG (4) przez 48 godzin. (a, c) Wyniki przedstawiono w postaci średniej ± odchylenie standardowe dla 3 powtórzeń biologicznych każdego wariantu. Różnice istotne statystycznie ($p < 0,05$; test Tukeya) występują pomiędzy wynikami oznaczonymi różnymi literami. (b, d) Strzałki wskazują izoformy enzymu.

6. Wpływ IAA-Asp oraz szoku osmotycznego na S-glutationylację białek grochu

Wyniki badań nad stosunkiem grup tiolowych oraz stosunkiem GSH/GSSG pozwoliły na sformułowanie przypuszczenia, że IAA-Asp może być zaangażowany w modulację S-glutationylacji białek grochu. W związku z tym przeprowadzono analizy Western blot, aby sprawdzić, czy IAA-Asp wpływa na S-glutationylację białek w siewkach grochu poddanych działaniu NaCl lub PEG. Następnie S-glutationylowane białka wykazujące różnice pomiędzy wariantami identyfikowano metodą spektrometrii mas.

Na Ryc. 21a i c widoczne są membrany po analizie Western blot z użyciem przeciwciał wykrywających S-glutationylację białek. Na membranie zaobserwowano zmniejszoną intensywność prążka odpowiadającego białkom o masie około 50 kDa dla siewek traktowanych samym NaCl oraz IAA-Asp w połączeniu z NaCl w porównaniu do kontroli i roślin poddanych działaniu koniugatu (Ryc. 21a). Prążek na wysokości około 50 kDa został zidentyfikowany jako przypuszczalny czynnik elongacyjny 1-alfa, tzw. EF1 α (ang. *Elongation Factor 1-alpha*), który uczestniczy w procesie translacji białka (Tabela 5) (Jakobsson i wsp. 2018). Podobnie prążek o masie około 97 kDa (Ryc. 21c), zidentyfikowany z dużym prawdopodobieństwem jako lipooksygenaza (LOX) (Tabela 5), jest wyraźnie widoczny w kontroli i w wariacie z siewkami inkubowanymi w roztworze IAA-Asp, w przeciwieństwie do roślin traktowanych samym PEG. Najślabszy sygnał dla tego białka występuje u roślin poddanych działaniu IAA-Asp w połączeniu z PEG. Różnice widoczne są również dla prążka zidentyfikowanego jako przypuszczalne białko szoku cieplnego o masie 70 kDa (ang. *Heat Shock Protein 70*, HSP70). Intensywny sygnał S-glutationylacji tego białka zaobserwowano u siewek grochu traktowanych IAA-Asp, PEG lub IAA-Asp w połączeniu z PEG.



Ryc. 21. Analiza S-glutationylacji białek. Analiza Western blot (a, c) oraz rozdziel SDS-PAGE (b, d) S-glutationylowanych białek z pędów siewek grochu traktowanych NaCl (a, b) lub PEG (c, d). Strzałki wskazują prążki białek w żelu, które odpowiadają S-glutationylowanym białkom na membranie. Numeracja nad strzałką odpowiada danym z Tabeli 5. Wskazane białka zidentyfikowano za pomocą spektrometrii mas. Dla **a, b: M – marker, 1 – kontrola, 2 – 200 μM IAA-Asp, 3 – 150 mM NaCl, 4 – 200 μM IAA-Asp oraz 150 mM NaCl. Dla **c, d**: M – marker, 1 – kontrola, 2 – 200 μM IAA-Asp, 3 – 20% (w/v) PEG, 4 – 200 μM IAA-Asp oraz 20% (w/v) PEG.**

Tabela 5. S-glutationylowane białka z pędów siewek grochu zidentyfikowane metodą spektrometrii mas.

Numer białka (na podstawie Ryc. 21) ^a	Nazwa białka	Numer identyfikacyjny	Masa cząsteczkowa (kDa)	Liczba zidentyfikowanych peptydów	Pokrycie sekwencji (%)
1	czynnik elongacyjny 1-alfa (<i>Daucus carota</i>)	EF1A1_DAUCA	49,27	9	20
2	lipooksygenaza (<i>Pisum sativum</i>)	B7Z177_PEA	96,77	19	27
3	70 kDa białko szoku cieplnego (<i>Pisum sativum</i>)	Q40980_PEA	71,17	10	21

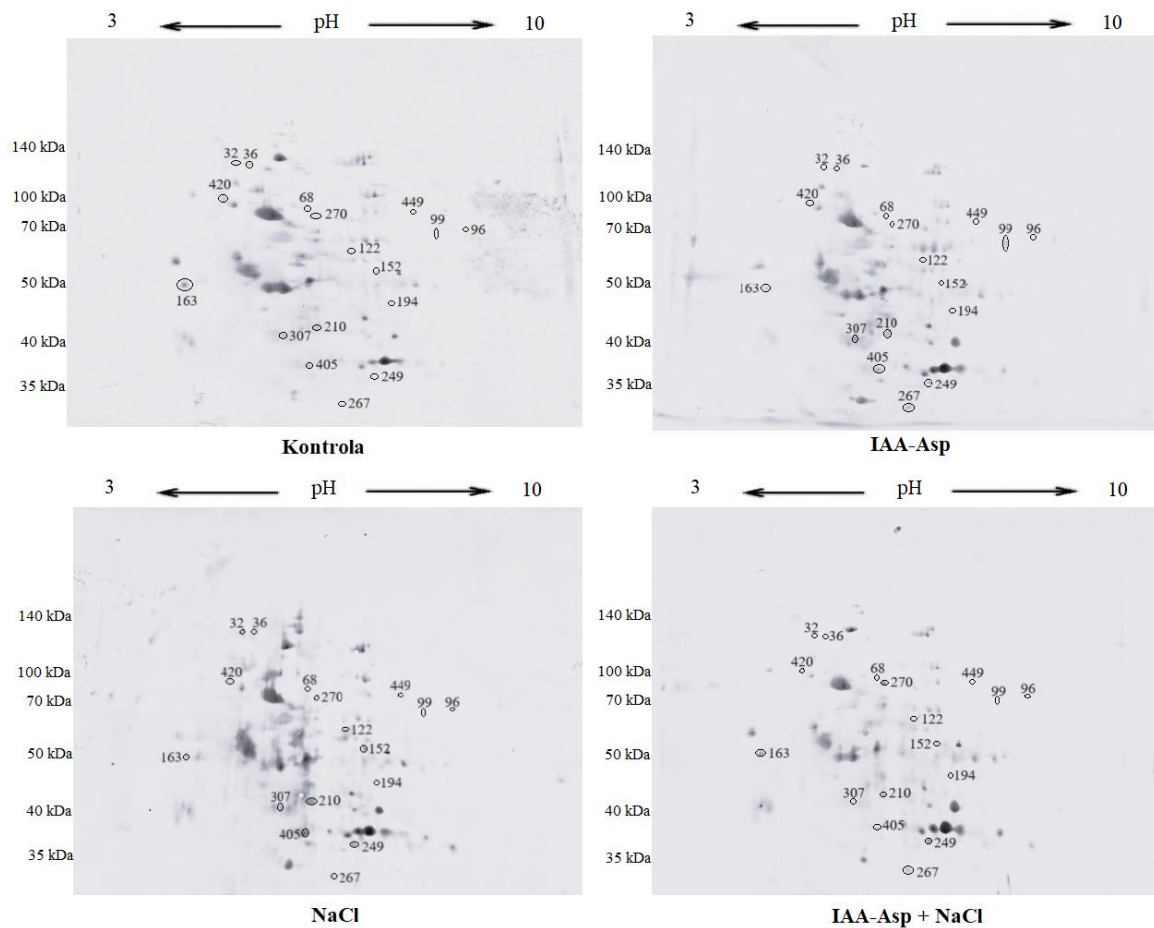
^a Numer białka odpowiada numerowi nad strzałką wskazującą prążek białka na membranie po analizie Western blot i na żelu po elektroforezie SDS-PAGE (Ryc. 21).

7. Karbonylacja białek w siewkach grochu traktowanych IAA-Asp oraz czynnikami wywołującymi szok osmotyczny

Karbonylacja białek jest kolejną, po S-glutationylacji, modyfikacją potranslacyjną białek charakterystyczną dla stresu oksydacyjnego (Tola i wsp. 2021). Ze względu na wcześniejsze doniesienia dotyczące wpływu IAA-Asp oraz stresu abiotycznego na poziom karbonylowanych białek (Ostrowski i wsp. 2016a) sprawdzono jak zmienia się profil karbonylowanych białek w siewkach grochu inkubowanych przez 3 godziny w wodzie, IAA-Asp, NaCl lub IAA-Asp w połączeniu z NaCl. W tym celu wykonano dwukierunkowy rozdział elektroforetyczny (IEF/SDS-PAGE) połączony z detekcją karbonylowanych białek metodą Western blot oraz ich identyfikacją metodą spektrometrii mas.

Na Ryc. 22 przedstawione są reprezentatywne membrany po analizie Western blot z zaznaczonymi 17 karbonylowanymi białkami, które wykazywały różnice w intensywności sygnału pomiędzy badanymi wariantami. Z siedemnastu karbonylowanych białek udało się zidentyfikować tylko pięć (Tabela 6). W wyniku analiz statystycznych porównujących białka wariantu kontrolnego z wariantem, gdzie siewki traktowane były przez 3 godziny IAA-Asp, dwa białka o numerach 194 (zwiększona intensywność plamki dla kontroli) i 99 (zwiększona intensywność plamki dla wariantu z IAA-Asp) wykazywały różnice w karbonylacji (Ryc. 22). Z kolei porównując działanie NaCl w stosunku do kontroli, zaobserwowano cztery białka (32,

36, 163, 420), które charakteryzowały się zwiększoną karbonylacją w wariancie kontrolnym, natomiast trzy polipeptydy (122, 210, 267) prezentowały silniejszą intensywność sygnału w próbach traktowanych NaCl, niż w kontroli. Białko o numerze 267 zostało zidentyfikowane jako potencjalny homolog reduktazy izoflawonowej (Tabela 6). W przypadku grochu inkubowanego w roztworze IAA-Asp w połączeniu z NaCl, trzy karbonylowane białka (267, 270, 307) charakteryzowały się zwiększoną intensywnością sygnału, a dwa, zmniejszoną (96, 449) w stosunku do kontroli (Ryc. 22). Białko o numerze 96 zostało zidentyfikowane przypuszczalnie jako białko 1 pokrewne z białkiem retinoblastomą (RB), a białko o numerze 307 jako aktyna 1 (Tabela 6). Wariant z siewkami traktowanymi IAA-Asp razem z NaCl wykazywał również zwiększoną karbonylację trzech białek (68, 152, 194), a zmniejszoną jednego białka (99) w porównaniu z siewkami poddanymi działaniu samego koniugatu (Ryc. 22). Natomiast groch inkubowany w roztworze NaCl miał trzy karbonylowane białka (152, 249, 405) o zwiększonym sygnale oraz inne trzy (32, 36, 99) o zmniejszonym sygnale w stosunku do wariantu z IAA-Asp. Numer 249 został zidentyfikowany jako izoforma cytoplazmatyczna dehydrogenazy jabłczanowej, a numer 405 prawdopodobnie jako syntetaza glutaminy (Tabela 6). Zestawiając ze sobą siewki traktowane NaCl i poddane działaniu IAA-Asp razem z NaCl, tylko jedno białko (270) wykazywało różnice w karbonylacji (zwiększona intensywność plamki dla wariantu z IAA-Asp i NaCl) (Ryc. 22).



Ryc. 22. Elektroforeza dwukierunkowa 2-DE (IEF/SDS-PAGE) oraz analiza Western blot karbonylowanych białek. Ekstrakty białkowe pochodziły z pędów siewek grochu traktowanych przez 3 godziny wodą (kontrola), 200 μ M IAA-Asp, 150 mM NaCl lub 200 μ M IAA-Asp w połączeniu z 150 mM NaCl. Plamki z przypisaną numeracją wskazują karbonylowane białka, które różniły się intensywnością sygnału pomiędzy badanymi wariantami. Dla każdego wariantu wykonano 3 powtórzenia biologiczne.

Tabela 6. Karbonylowane białka z pędów siewek grochu zidentyfikowane metodą spektrometrii mas.

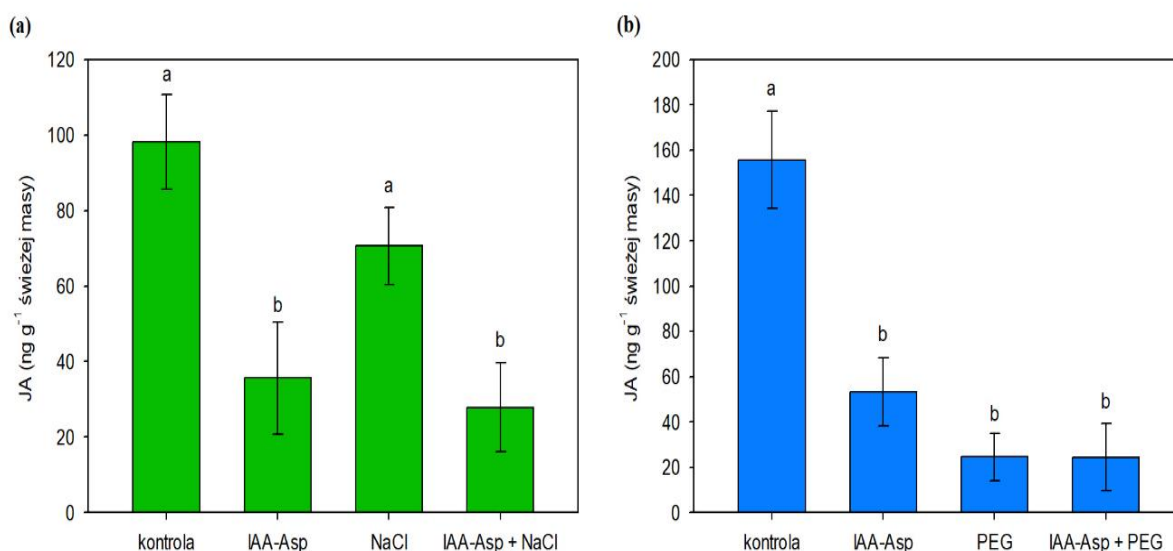
Numer białka ^a	Nazwa białka	Różnice pomiędzy wariantami ^b	Numer identyfikacyjny	Masa cząsteczkowa (kDa)	Liczba zidentyfikowanych peptydów	Pokrycie sekwencji (%)
96	białko 1 pokrewne z białkiem RB (<i>Pisum sativum</i>)	H ₂ O : IAA-Asp + NaCl ↓	RBR1_PEA	114,48	1	2
249	cytoplazmatyczna dehydrogenaza jabłczanowa (<i>Medicago sativa</i>)	IAA-Asp : NaCl ↑	MDHC_MEDSA	35,52	1	3
267	homolog reduktazy izoflawonowej (<i>Solanum tuberosum</i>)	H ₂ O : NaCl ↑ H ₂ O : IAA-Asp + NaCl ↑	IFRH_SOLTU	33,85	1	4
307	aktyna 1 (<i>Pisum sativum</i>)	H ₂ O : IAA-Asp + NaCl ↑	ACT1_PEA	41,70	5	22
405	syntetaza glutaminy, izoenzym obecny w brodawkach korzeniowych (<i>Pisum sativum</i>)	IAA-Asp : NaCl ↑	GLNA1_PEA	38,93	2	9

^a Numer białka odpowiada numerowi plamki zaznaczonej na membranie po analizie Western blot połączonej z dwukierunkową elektroforezą (Ryc. 22).

^b Cztery warianty analizowano między sobą pod względem różnic w karbonylacji białek. ↑ - wzrost karbonylacji białka, ↓ - spadek karbonylacji białka, strzałka położona jest przy wariantcie, w którym występuje wzrost lub spadek karbonylacji białka w porównaniu do wariantu po lewej stronie.

8. Poziom fitohormonów w siewkach grochu traktowanych IAA-Asp oraz czynnikami wywołującymi szok osmotyczny

W następnym etapie badań sprawdzono, czy IAA-Asp wpływa na zawartość fitohormonów JA, SA oraz ABA. Poziom JA zmniejszył się około 2,8-krotnie u siewek poddanych 3-godzinnemu działaniu IAA-Asp w porównaniu do kontroli (Ryc. 23a). Podobny spadek zaobserwowano u roślin traktowanych koniugatem w połączeniu z NaCl (27,79 ng g⁻¹ świeżej masy) w stosunku do wariantu z samym NaCl (70,6 ng g⁻¹ świeżej masy). W przypadku dwudniowej inkubacji grochu najwyższy poziom JA występował w kontroli (155,64 ng g⁻¹ świeżej masy) (Ryc. 23b). U pozostałych trzech wariantów zawartość JA była zdecydowanie niższa w porównaniu do siewek traktowanych wodą. Brak było też różnic pomiędzy siewkami traktowanymi IAA-Asp, PEG lub IAA-Asp w połączeniu z PEG.

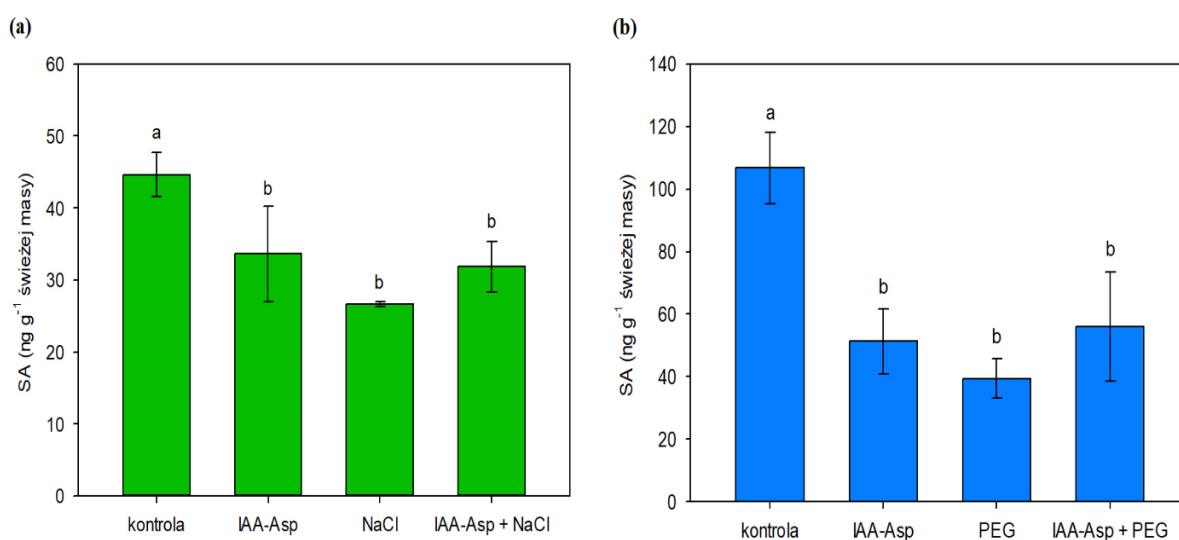


Ryc. 23. Poziom JA w pędach siewek grochu oznaczony metodą LC-MS/MS. (a) Rośliny były inkubowane w 200 μM IAA-Asp, 150 mM NaCl lub 200 μM IAA-Asp w połączeniu z 150 mM NaCl przez 3 godziny. **(b)** Rośliny były inkubowane w 200 μM IAA-Asp, 20% (w/v) PEG lub 200 μM IAA-Asp w połączeniu z 20% (w/v) PEG przez 48 godzin. Wyniki przedstawiono w postaci średniej ± odchylenie standardowe dla 3 powtórzeń biologicznych każdego wariantu. Różnice istotne statystycznie ($p < 0,05$; test Tukeya) występują pomiędzy wynikami oznaczonymi różnymi literami.

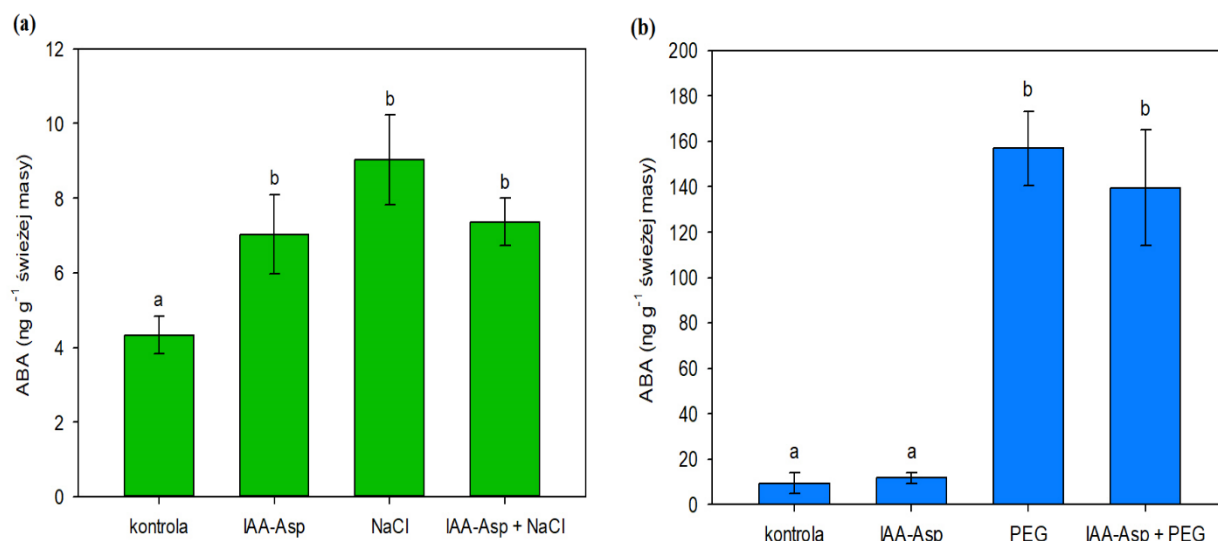
Siewki grochu inkubowane przez 3 godziny w roztworze IAA-Asp wykazywały obniżony około 1,3-krotnie poziom SA w stosunku do kontroli (Ryc. 24a). Natomiast zawartość SA była porównywalna u roślin poddanych działaniu NaCl oraz u grochu traktowanego IAA-Asp w połączeniu z NaCl, które to warianty również posiadały zmniejszony poziom SA w porównaniu do kontroli. Podobnie przedstawiają się wyniki dla czterech wariantów siewek

inkubowanych przez 48 godzin (Ryc. 24b). Poziom SA był najwyższy u roślin traktowanych wodą (106,82 ng g⁻¹ świeżej masy). Natomiast siewki poddane działaniu IAA-Asp, PEG lub IAA-Asp w połączeniu z PEG nie różniły się między sobą zawartością SA, ale wykazywały obniżony poziom tego fitohormonu w stosunku do kontroli.

Na Ryc. 25 przedstawiono wykresy z poziomem ABA w siewkach grochu traktowanych samym IAA-Asp oraz w połączeniu z NaCl lub PEG. Najwyższą zawartość ABA zaobserwowano u roślin poddanych 3-godzinnemu działaniu soli (wzrost około 2,2-krotny w porównaniu do kontroli) (Ryc. 25a). Zwiększony poziom ABA w stosunku do wariantu kontrolnego wystąpił również u siewek inkubowanych w roztworze IAA-Asp, jak również poddanych działaniu IAA-Asp razem z NaCl. Natomiast brak było różnic w poziomie tego fitohormonu u roślin traktowanych samym IAA-Asp, NaCl lub IAA-Asp w połączeniu z NaCl. Siewki grochu inkubowane w roztworze PEG posiadały około 16,8-krotnie zwiększoną zawartość ABA porównując wyniki do kontroli (Ryc. 25b). Nie wystąpiły jednak różnice pomiędzy wariantem z samym PEG a wariantem z IAA-Asp i PEG. Podobnie nie zaobserwowano zmian w poziomie ABA u grochu traktowanego samym IAA-Asp w stosunku do kontroli.



Ryc. 24. Poziom SA w pędach siewek grochu oznaczony metodą LC-MS/MS. (a) Rośliny były inkubowane w 200 μM IAA-Asp, 150 mM NaCl lub 200 μM IAA-Asp w połączeniu z 150 mM NaCl przez 3 godziny. **(b)** Rośliny były inkubowane w 200 μM IAA-Asp, 20% (w/v) PEG lub 200 μM IAA-Asp w połączeniu z 20% (w/v) PEG przez 48 godzin. Wyniki przedstawiono w postaci średniej ± odchylenie standardowe dla 3 powtórzeń biologicznych każdego wariantu. Różnice istotne statystycznie ($p < 0,05$; test Tukeya) występują pomiędzy wynikami oznaczonymi różnymi literami.



Ryc. 25. Poziom ABA w pędach siewek grochu oznaczony metodą LC-MS/MS. (a) Rośliny były inkubowane w 200 μ M IAA-Asp, 150 mM NaCl lub 200 μ M IAA-Asp w połączeniu z 150 mM NaCl przez 3 godziny. **(b)** Rośliny były inkubowane w 200 μ M IAA-Asp, 20% (w/v) PEG lub 200 μ M IAA-Asp w połączeniu z 20% (w/v) PEG przez 48 godzin. Wyniki przedstawiono w postaci średniej \pm odchylenie standardowe dla 3 powtórzeń biologicznych każdego wariantu. Różnice istotne statystycznie ($p < 0,05$; test Tukeya) występują pomiędzy wynikami oznaczonymi różnymi literami.

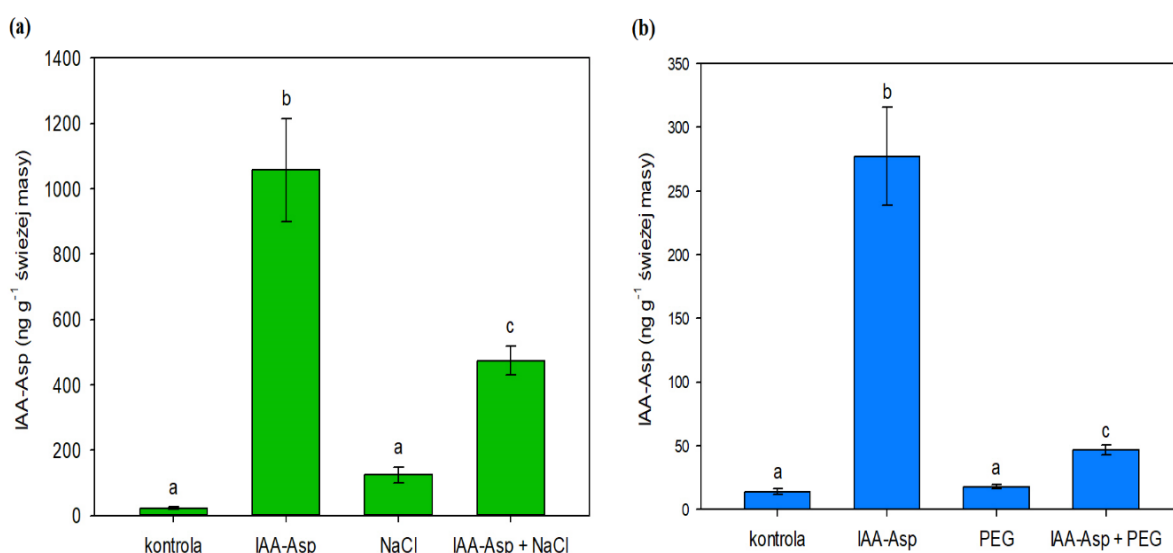
9. Wpływ IAA-Asp i szoku osmotycznego na poziom badanego koniugatu i IAA oraz na ekspresję i aktywność amidosyntetazy IAA-Asp

W kolejnym etapie badań sprawdzono, jak zmienia się poziom IAA-Asp u siewek traktowanych tym koniugatem, a także spróbowano odpowiedzieć na pytanie, czy jego zawartość jest modulowana w wyniku działania NaCl lub PEG. Zbadano także, czy IAA-Asp, pomimo braku jego hydrolizy w siewkach grochu, może wpływać u tych roślin na poziom IAA. Sprawdzono również, czy poziom IAA lub IAA-Asp koreluje z aktywnością amidosyntetazy IAA-Asp odpowiedzialnej za tworzenie wspomnianego koniugatu.

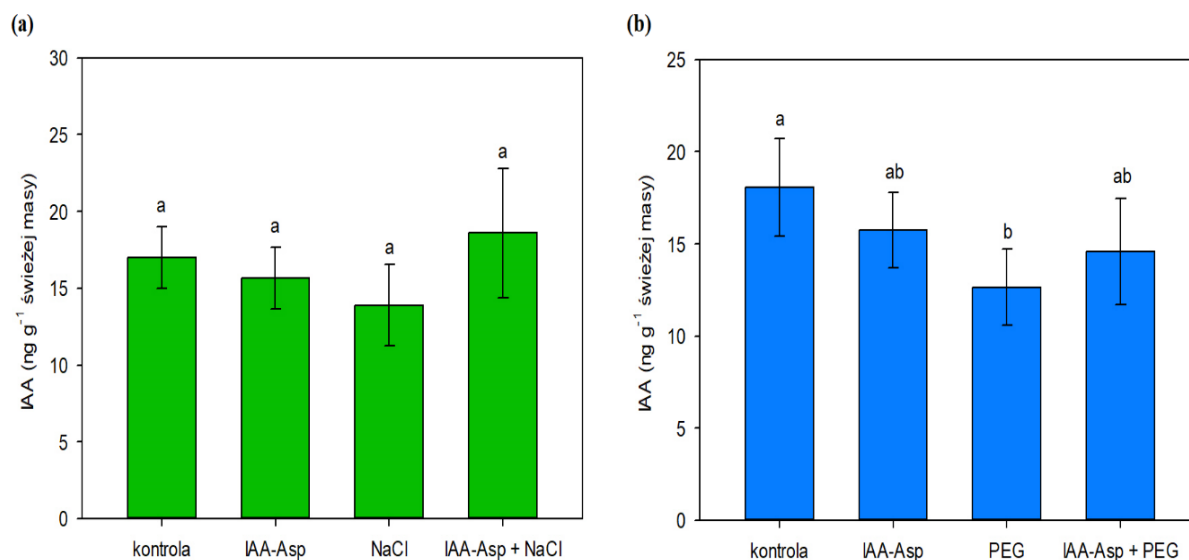
Poziom IAA-Asp był najwyższy u siewek inkubowanych przez 3 godziny w roztworze IAA-Asp (1 056,62 ng g⁻¹ świeżej masy) (Ryc. 26a). Zawartość IAA-Asp była wyższa u tego wariantu około 46,6-krotnie w porównaniu do kontroli. Natomiast rośliny poddane działaniu koniugatu w połączeniu z NaCl wykazywały zmniejszony około 2,2-krotnie poziom IAA-Asp w porównaniu do siewek traktowanych samym IAA-Asp oraz zwiększony około 3,8-krotnie w stosunku do grochu inkubowanego w roztworze samego NaCl. Również w przypadku 48-godzinnej inkubacji siewek, zawartość IAA-Asp była najwyższa dla wariantu poddanego działaniu koniugatu (277,14 ng g⁻¹ świeżej masy) (Ryc. 26b). Poziom IAA-Asp był około

20-krotnie wyższy u tego wariantu w porównaniu do kontroli. Natomiast rośliny poddane działaniu koniugatu w połączeniu z PEG wykazywały zmniejszony około 6-krotnie poziom IAA-Asp w porównaniu do wariantu z samym IAA-Asp oraz zwiększony około 2,6-krotnie w stosunku do grochu inkubowanego w roztworze samego PEG.

Na Ryc. 27 przedstawiono wykresy z poziomem IAA w siewkach grochu traktowanych samym IAA-Asp oraz w połączeniu z NaCl lub PEG. Nie zaobserwowano różnic w zawartości IAA pomiędzy wszystkimi czterema wariantami siewek inkubowanymi przez 3 godziny (Ryc. 27a). W przypadku inkubacji trwającej 48 godzin, tylko rośliny poddane działaniu PEG miały około 1,6-krotnie obniżony poziom IAA w porównaniu do kontroli (Ryc. 27b). Zarówno siewki traktowane samym koniugatem, jak i koniugatem w połączeniu z PEG nie wykazywały różnic między sobą ani w stosunku do kontroli i wariantu z PEG.



Ryc. 26. Poziom IAA-Asp w pędach siewek grochu oznaczony metodą LC-MS/MS. (a) Rośliny były inkubowane w 200 μM IAA-Asp, 150 mM NaCl lub 200 μM IAA-Asp w połączeniu z 150 mM NaCl przez 3 godziny. **(b)** Rośliny były inkubowane w 200 μM IAA-Asp, 20% (w/v) PEG lub 200 μM IAA-Asp w połączeniu z 20% (w/v) PEG przez 48 godzin. Wyniki przedstawiono w postaci średniej ± odchylenie standardowe dla 3 powtórzeń biologicznych każdego wariantu. Różnice istotne statystycznie ($p < 0,05$; test Tukeya) występują pomiędzy wynikami oznaczonymi różnymi literami.

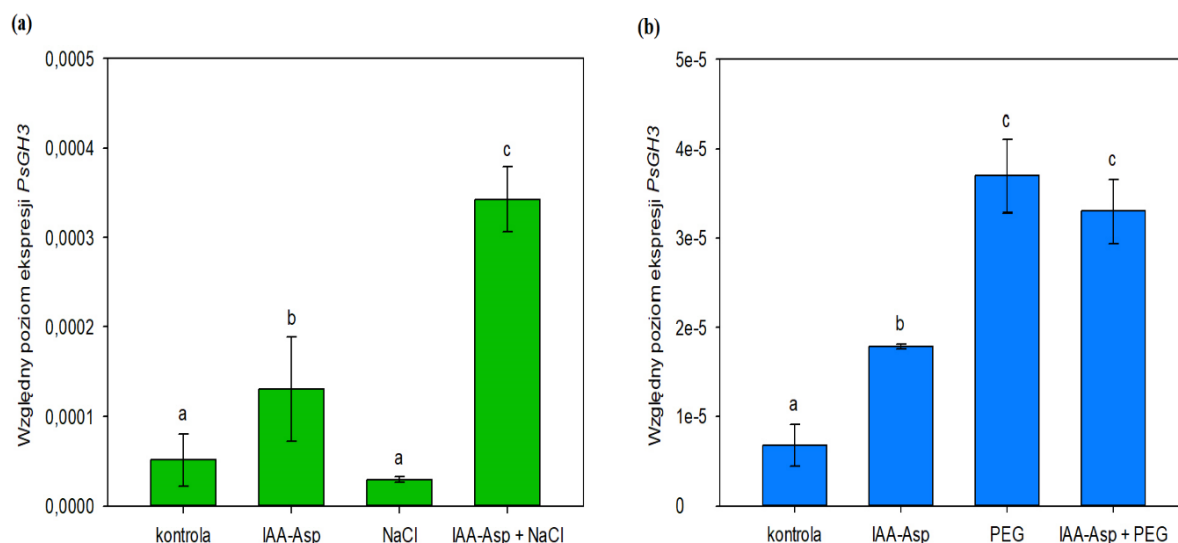


Ryc. 27. Poziom IAA w pędach siewek grochu oznaczony metodą LC-MS/MS. (a) Rośliny były inkubowane w 200 μM IAA-Asp, 150 mM NaCl lub 200 μM IAA-Asp w połączeniu z 150 mM NaCl przez 3 godziny. **(b)** Rośliny były inkubowane w 200 μM IAA-Asp, 20% (w/v) PEG lub 200 μM IAA-Asp w połączeniu z 20% (w/v) PEG przez 48 godzin. Wyniki przedstawiono w postaci średniej \pm odchylenie standardowe dla 3 powtórzeń biologicznych każdego wariantu. Różnice istotne statystycznie ($p < 0,05$; test Tukeya) występują pomiędzy wynikami oznaczonymi różnymi literami.

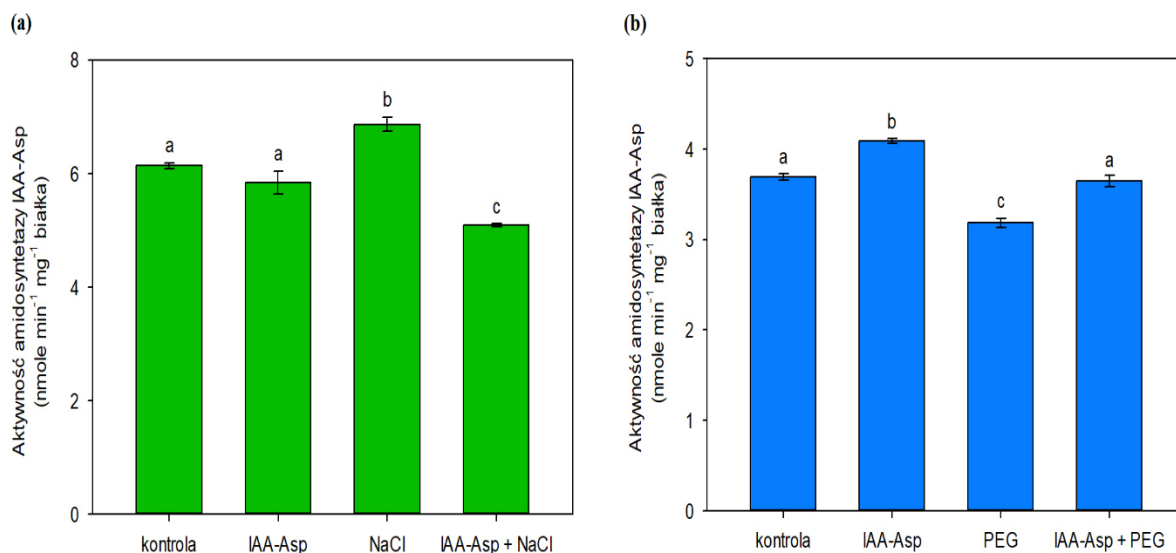
Na Ryc. 28 widoczne są wykresy przedstawiające względny poziom ekspresji genu *PsGH3* kodującego amidosyntetazę IAA-Asp. Ilość transkryptów *PsGH3* zwiększyła się około 2,5-krotnie u siewek traktowanych przez 3 godziny IAA-Asp w porównaniu do kontroli (Ryc. 28a). Jeszcze większy wzrost zaobserwowano u roślin poddanych działaniu IAA-Asp w połączeniu z NaCl w stosunku do samego NaCl (około 11,6-krotny), do IAA-Asp (około 2,6-krotny) lub do kontroli (około 6,6-krotny). Podobnie w przypadku siewek grochu inkubowanych przez 48 godzin w roztworze IAA-Asp wystąpił wzrost około 2,7-krotny względnego poziomu ekspresji *PsGH3* w porównaniu do kontroli (Ryc. 28b). Zwiększoną ekspresję tego genu zaobserwowano również u wariantu z grochem poddanym działaniu PEG w stosunku do kontroli oraz samego IAA-Asp. Brak jest natomiast różnic pomiędzy wariantem z samym PEG a wariantem z IAA-Asp w połączeniu z PEG.

W przypadku amidosyntetazy IAA-Asp najwyższa aktywność tego enzymu wystąpiła u siewek grochu traktowanych NaCl (6,86 nmoli min⁻¹ mg⁻¹ białka) (Ryc. 29a). Natomiast dodanie IAA-Asp do wariantu z siewkami inkubowanymi z NaCl spowodowało obniżenie aktywności amidosyntetazy około 1,3-krotnie. Nie ma natomiast różnic pomiędzy kontrolą a wariantem z IAA-Asp. Odmiennie przedstawiają się wyniki dla siewek traktowanych przez 48 godzin koniugatem, gdzie zaobserwowano nieznaczny wzrost aktywności amidosyntetazy IAA-Asp w porównaniu z kontrolą (Ryc. 29b). Przeciwnie, spadek aktywności enzymu wy-

stał u grochu inkubowanego w roztworze PEG w stosunku do pozostałych wariantów, w tym do roślin poddanych działaniu IAA-Asp w połączeniu z PEG.



Ryc. 28. Wpływ IAA-Asp oraz szoku osmotycznego na ekspresję *PsGH3* w pędach siewek grochu. (a) Rośliny były inkubowane w 200 μ M IAA-Asp, 150 mM NaCl lub 200 μ M IAA-Asp w połączeniu z 150 mM NaCl przez 3 godziny. (b) Rośliny były inkubowane w 200 μ M IAA-Asp, 20% (w/v) PEG lub 200 μ M IAA-Asp w połączeniu z 20% (w/v) PEG przez 48 godzin. Wyniki przedstawiono w postaci średniej \pm odchylenie standardowe dla 3 powtórzeń biologicznych każdego wariantu. Różnice istotne statystycznie ($p < 0,05$; test Tukeya) występują pomiędzy wynikami oznaczonymi różnymi literami.

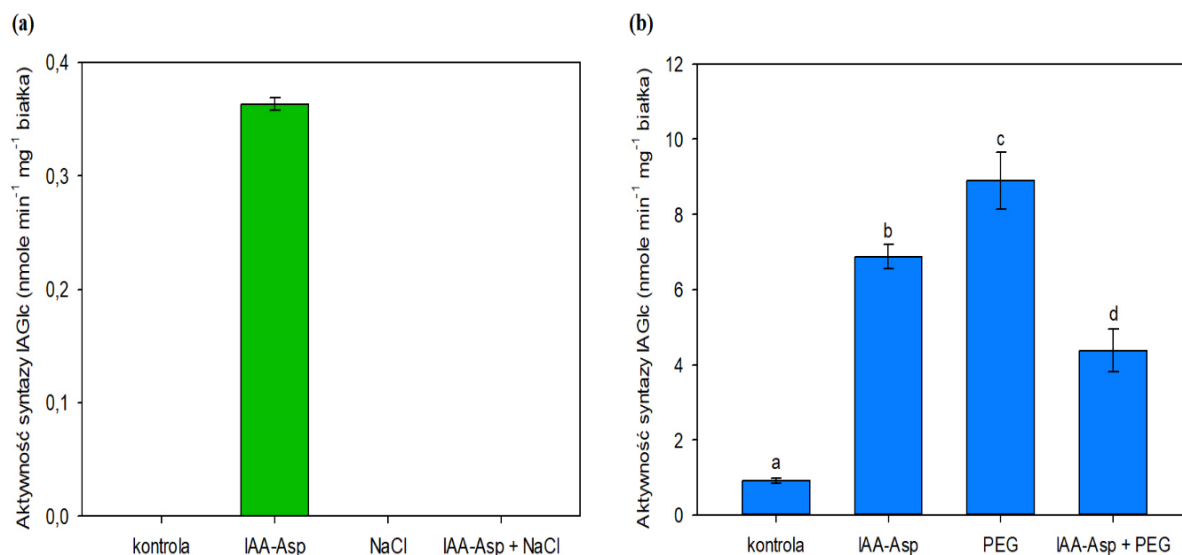


Ryc. 29. Wpływ IAA-Asp oraz szoku osmotycznego na aktywność amidosyntetazy IAA-Asp w pędach siewek grochu. (a) Rośliny były inkubowane w 200 μ M IAA-Asp, 150 mM NaCl lub 200 μ M IAA-Asp w połączeniu z 150 mM NaCl przez 3 godziny. (b) Rośliny były inkubowane w 200 μ M IAA-Asp, 20% (w/v) PEG lub 200 μ M IAA-Asp w połączeniu z 20% (w/v) PEG przez 48 godzin. Wyniki przedstawiono w postaci średniej \pm odchylenie standardowe dla 3 powtórzeń biologicznych każdego wariantu. Różnice istotne statystycznie ($p < 0,05$; test Tukeya) występują pomiędzy wynikami oznaczonymi różnymi literami.

10. Aktywność syntazy IAGlc w siewkach grochu traktowanych IAA-Asp oraz czynnikami wywołującymi szok osmotyczny

Syntaza IAGlc jest jednym z enzymów zaangażowanym w tworzenie koniugatów estrowych IAA (Michalczuk i Bandurski 1982; Leźnicki i Bandurski 1988). Mając to na uwadze, sprawdzono, czy IAA-Asp jako koniugat amidowy może modulować aktywność syntazy IAGlc, a w konsekwencji wpływać na powstawanie koniugatów estrowych IAA.

U siewek grochu traktowanych przez 3 godziny tylko rośliny poddane działaniu IAA-Asp wykazywały aktywność syntazy IAGlc ($0,36 \text{ nmoli min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ białka) (Ryc. 30a). U pozostałych wariantów nie zaobserwowano aktywności tego enzymu. W przypadku 48-godzinnej inkubacji najwyższą aktywnością syntazy IAGlc charakteryzowały się siewki poddane działaniu PEG ($8,9 \text{ nmoli min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ białka) (Ryc. 30b). Wariant ten wykazywał zwiększoną około 9,8-krotnie aktywność enzymu względem kontroli. Duży spadek aktywności syntazy IAGlc widoczny był u siewek traktowanych IAA-Asp w połączeniu z PEG w porównaniu do wariantu z samym IAA-Asp lub z samym PEG. Najniższą aktywność syntazy IAGlc zaobserwowano natomiast u wariantu kontrolnego ($0,91 \text{ nmoli min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ białka).



Ryc. 30. Wpływ IAA-Asp oraz szoku osmotycznego na aktywność syntazy IAGlc w pędach siewek grochu. (a) Rośliny były inkubowane w $200 \mu\text{M}$ IAA-Asp, 150 mM NaCl lub $200 \mu\text{M}$ IAA-Asp w połączeniu z 150 mM NaCl przez 3 godziny. (b) Rośliny były inkubowane w $200 \mu\text{M}$ IAA-Asp, 20% (w/v) PEG lub $200 \mu\text{M}$ IAA-Asp w połączeniu z 20% (w/v) PEG przez 48 godzin. Wyniki przedstawiono w postaci średniej \pm odchylenie standardowe dla 3 powtórzeń biologicznych każdego wariantu. Różnice istotne statystycznie ($p < 0,05$; test Tukeya) występują pomiędzy wynikami oznaczonymi różnymi literami. Brak słupka na wykresie oznacza brak aktywności syntazy IAGlc u badanego wariantu.

DYSKUSJA

Groch (*P. sativum*), należący do roślin strączkowych, jest bogatym źródłem białka roślinnego stanowiącego od 20 do 30% zawartości w roślinie (Ceyhan i Avcı 2015; Powers i Thavarajah 2019). Roślina ta zawiera również węglowodany, dużą ilość fosforu, żelaza i cynku oraz witaminy. Wysoki poziom związków odżywczych, a przede wszystkim białka, w grochu klasyfikuje go jako roślinę użytkową cenną pod względem gospodarczym. Ze względu na postępującą zmianę klimatu rośliny uprawne, w tym groch, narażone są coraz częściej na negatywny wpływ różnych stresów abiotycznych i biotycznych, prowadzący do zmniejszenia się ich plonów. W związku z tym badania dotyczące działania czynników środowiskowych na różne aspekty wzrostu i rozwoju roślin oraz poszukiwania związków, które mogą wywierać pozytywny wpływ na odpowiedź rośliny podczas działania stresu, są niezmiernie ważne.

Homeostaza hormonalna jest kluczowa dla prawidłowego wzrostu oraz rozwoju rośliny (Bajguz i Piotrowska 2009). Jednym z procesów zaangażowanych w utrzymanie odpowiedniego poziomu auksyny jest tworzenie koniugatów IAA. Należy podkreślić, że w tkankach grochu IAA-Asp jest dominującą formą koniugatów amidowych (Andrea i Good 1955; Südi 1964; Bandurski i Schulze 1977). Wskazuje to na ważną rolę, jaką proces jego syntezy pełni u tej rośliny. Nie ulega wątpliwości, że tworzenie IAA-Asp jest istotne ze względu na regulację poziomu IAA u grochu. Z drugiej strony, może być również ważne ze względu na działanie samego koniugatu jako cząsteczki aktywnej biologicznie (Oetiker i Aeschbacher 1997; González-Lamothe i wsp. 2012; Ostrowski i wsp. 2016a).

1. IAA-Asp nie jest źródłem wolnego IAA w siewkach *P. sativum*

Koniugaty amidowe auksyn mogą służyć jako źródło aktywnego biologicznie fitohormonu w wyniku ich hydrolizy enzymatycznej. W przeciwieństwie do koniugatów takich jak IAA-Ala, IAA-Leu, IAA-Phe, IAA-Tyr, IAA-Ser IAA-Met oraz IAA-Gly dla których zidentyfikowano amidohydrolazy, kwestia uwalniania IAA z IAA-Asp była przez długi czas otwarta (LeClere i wsp. 2002; Campanella i wsp 2003). Pierwsze doniesienia o hydrolizie IAA-Asp do IAA zostały opisane w 1996 roku przez Ludwig-Müller i wsp., którzy zaobserwowali ten proces u kapusty chińskiej. Hydroliza koniugatu zachodziła w korzeniach rośliny zaatakowanej przez *Plasmodiophora brassicae*, powodując znaczne zwiększenie się puli wolnego IAA. Natomiast wyizolowana z bakterii *Enterobacter agglomerans* amidohydrolaza

IAA-Asp (IAASPH) wpływała hamująco na kiełkowanie nasion fasoli złotej (*Vigna radiata*) (Liu i wsp. 2007). Ten negatywny efekt, po wprowadzeniu białka do nasion, mógł wynikać z obserwowanego w efekcie hydrolizy IAA-Asp wzrostu poziomu IAA prowadzącego do zaburzonej homeostazy auksyny. Badania nad hydrolazami koniugatów amidowych IAA z lucerny (*M. truncatula*), należącej podobnie jak groch do rodziny bobowatych, pozwoliły wykryć 4 białka, MtIAR-31, 32, 33 oraz 34 (ang. *IAA-Ala Resistance*), wykazujące aktywność wobec IAA-Asp (Campanella i wsp. 2008). Odkryto również, że ekspresja genu kodującego MtIAR-33, białko o najwyższej aktywności hydrolitycznej wobec IAA-Asp, wzrastała w korzeniach lucerny zainfekowanych przez bakterie symbiotyczne *Sinorhizobium meliloti* oraz *Glomus intraradices*. Natomiast u pomidora (*Solanum lycopersicum*) żadna z siedmiu zidentyfikowanych amidohydrolaz IAA-aminokwasów nie wykazywała specyficzności substratowej wobec IAA-Asp (Fu i wsp. 2019). Ponadto wspomniany koniugat miał niewielki efekt na odcinanie szypułek kwiatu pomidora w porównaniu do ulegającego hydrolizie IAA-Ile, który powodował zahamowanie tego procesu. Z kolei badania Tang i wsp. (2019) wskazały na zachodzenie hydrolizy IAA-Asp w rozwijających się siewkach poziomki. Powstała w tym procesie auksyna regulowała następnie wzrost rośliny. Również u rzodkiewnika pospolitego zaobserwowano katalizowaną przez amidohydrolazę ILR1/ILL hydrolizę IAA-Asp podawanego do rośliny w postaci niepolarnego estru dimetylowego (IAA-Asp-DM), który łatwo dyfunduje przez błonę komórkową (Hayashi i wsp. 2021). Uwolniony w konsekwencji IAA wywoływał u rośliny charakterystyczne dla nadmiaru auksyny efekty, takie jak hamowanie wzrostu wydłużeniowego korzeni oraz promowanie tworzenia się korzeni bocznych. Zahamowany wzrost korzeni widoczny był również u ryżu oraz kłosownicy dwukłoskowej (*Brachypodium distachyon*) traktowanych IAA-Asp-DM.

Przedstawione w rozprawie wyniki badań wskazują na brak hydrolizy IAA-Asp w młodych siewkach grochu. Już po 3 godzinach traktowania roślin egzogennym IAA-[²H₅, ¹⁵N]Asp zaobserwowano obecność tego izotopu w tkankach grochu. Nie wykryto natomiast [²H₅]IAA, produktu hydrolizy IAA-[²H₅, ¹⁵N]Asp, nie tylko po 3 godzinach, ale również po dłuższej (16, 24 i 48 godzin) inkubacji ze znakowanym koniugatem. Sprawdzono również poziom IAA w siewkach grochu traktowanych przez 3 lub 48 godzin samym koniugatem jak i koniugatem w połączeniu z NaCl lub PEG. Poziom auksyny u tych wariantów nie różnił się od kontroli, co potwierdza brak hydrolizy IAA-Asp w młodych siewkach grochu. Uzyskane wyniki wskazują również, że IAA-Asp nie jest źródłem IAA w siewkach grochu poddanych działaniu czynników wywołujących szok osmotyczny. Przeprowadzone badania

sugerują, że hydroliza IAA-Asp występuje tylko u określonych gatunków roślin i być może w określonych organach lub stadium rozwojowym.

2. IAA-Asp moduluje odpowiedź grochu na szok osmotyczny

Stres oksydacyjny, będący następstwem działania na rośliny abiotycznych oraz biotycznych czynników stresowych, charakteryzuje się generowaniem nadmiernej ilości reaktywnych form tlenu, które mogą powodować poważne uszkodzenia wewnątrz komórek roślinnych (Demidchik 2015). Rośliny broniąc się przed negatywnym wpływem RFT uruchamiają mechanizmy antyoksydacyjne, w tym działanie różnorodnych enzymów, między innymi GR, GPX, GST, oraz nieenzymatycznych przeciwutleniaczy, takich jak prolina, askorbinian, glutation oraz innych (Das i Roychoudhury 2014). Bardzo ważną rolę w przypadku wystąpienia stresu oksydacyjnego odgrywają również hormony roślinne, które wpływają na szlaki sygnalizacyjne zależne od RFT (Souza i wsp. 2017).

Istnieją doniesienia wskazujące na rolę IAA-Asp jako cząsteczki aktywnej biologicznie, wykazującej działanie niezależne od IAA. IAA-asparaginian jest zaangażowany w odpowiedź *H. muticus* na stres termiczny (Oetiker i Aeschbacher 1997) oraz *A. thaliana* na stres biotyczny (González-Lamothe i wsp. 2012). Uczestniczy także w procesie dojrzewania owoców winorośli (Böttcher i wsp. 2013). Należy podkreślić, że w tkankach grochu występuje wysoki poziom IAA-Asp, który nie ulega hydrolizie do IAA, co może sugerować rolę IAA-Asp jako modulatora procesów wzrostu i rozwoju lub odpowiedzi roślin na stres. Ostrowski i wsp. (2016a) przedstawili wstępne badania dotyczące wpływu wspomnianego koniugatu na odpowiedź grochu na stres oksydacyjny wywołany działaniem abiotycznych czynników stresowych. Wyniki przedstawione w rozprawie pogłębiają ten temat.

2.1. Wpływ IAA-Asp na poziom przeciwutleniaczy oraz peroksydację lipidów w siewkach grochu

Prolina, jako wielofunkcyjny aminokwas, w warunkach stresu oksydacyjnego oprócz wychwytywania RFT odpowiada również za regulację ciśnienia osmotycznego (Kaur i Asthir 2015). Bierze także udział w aktywacji białek chroniących przed stresem, czy moduluje funkcje mitochondriów, co przyczynia się do uzyskania przez roślinę tolerancji na stres. Podobnie askorbinian wykazuje wielorakie działanie w odpowiedzi na stres. Oprócz działania antyoksydacyjnego, uczestniczy także w utrzymywaniu homeostazy redoks, moduluje syntezę i me-

tabolizm fitohormonów (etylenu, ABA i GA) oraz reguluje funkcjonowanie szlaków sygnałowych RFT (Xiao i wsp. 2021). Zarówno prolina jak i askorbinian wpływają również na prawidłowy wzrost i rozwój roślin (Mattioli i wsp. 2009; Ortiz-Espín i wsp. 2017). Na podstawie wyników przedstawionych w pracy można zauważyć, że w siewkach grochu poddanych działaniu szoku osmotycznego IAA-Asp nie wpływał na zawartość proliny ani askorbinianu. Jednakże sam IAA-Asp, bez połączenia z czynnikiem wywołującym szok osmotyczny, powodował u roślin inkubowanych przez 48 godzin wzrost stężenia askorbinianu w porównaniu do kontroli. Koreluje to z wynikami przedstawionymi w pracy Ostrowskiego i wsp. (2016a), gdzie zaobserwowano w analogicznych warunkach spadek aktywności peroksydazy askorbinianowej, enzymu katalizującego utlenianie askorbinianu do dehydroaskorbinianu z jednoczesną redukcją H_2O_2 do wody. W tym samym artykule opisano również pozytywny wpływ IAA-Asp na wzrost korzeni siewek grochu. Należy podkreślić, że istnieją doniesienia na temat promowania wzrostu korzeni roślin przez askorbinian (Kka i wsp. 2018). W związku z tym można przypuszczać, że IAA-Asp, działając pośrednio poprzez zwiększenie poziomu askorbinianu, może w konsekwencji indukować wzrost wydłużeniowy korzeni siewek grochu.

W wyniku stresu oksydacyjnego w komórkach roślinnych, oprócz uszkodzeń białek, DNA czy węglowodanów, dochodzi również do degradacji lipidów na skutek ich peroksydacji wywołanej przez RFT (Demidchik 2015). Jednym z efektów peroksydacji lipidów jest powstawanie MDA czy metyloglioksalu (Demidchik 2015; Shumilina i wsp. 2019), przy czym drugi z tych związków może być również produktem wywołanych stresem przemian węglowodanów oraz białek (Hoque i wsp. 2016). Wyniki przedstawione w niniejszej pracy wskazują na brak wpływu IAA-Asp na poziom MDA oraz metyloglioksalu zarówno w siewkach grochu poddanych działaniu PEG, jak i nietraktowanych tym związkiem. Sugeruje to, że potencjalna rola IAA-Asp w odpowiedzi na szok osmotyczny nie jest bezpośrednio związana z peroksydacją lipidów.

2.2. IAA-Asp moduluje status tiolowy w siewkach grochu

Jak już wcześniej wspomniano enzymy GR, GPX oraz GST uczestniczą w obronie antyoksydacyjnej roślin oraz regulują stosunek GSH/GSSG (Das i Roychoudhury 2014). Ich aktywność zmienia się również w czasie wzrostu i rozwoju roślin (Bela i wsp. 2015; Estévez i wsp. 2020; Madhu i wsp. 2022). Badania przedstawione w pracy wskazują na wpływ podawanego IAA-Asp na aktywność GR w siewkach grochu. Rośliny traktowane koniugatem przez 3 godziny wykazywały podwyższoną aktywność tego enzymu, co korelowało z wyso-

kim stosunkiem GSH do GSSG. Być może rolą IAA-Asp jest przygotowanie rośliny na niekorzystne warunki środowiskowe (np. szok, stres), dlatego nagły wzrost stężenia koniugatu podnosi poziom zredukowanego glutationu, będącego czynnikiem antyoksydacyjnym. Należy również podkreślić, że aktywność enzymów antyoksydacyjnych może być modulowana przez fitohormony (Szalai i wsp. 2009). Przykładem mogą być badania przeprowadzone przez Kellós i wsp. 2008, gdzie po podaniu ABA oraz SA obserwowany był wzrost aktywności GR u kukurydzy. Ponadto zwiększeniu uległ stosunek GSH/GSSG, co może sugerować, że fitohormony w sposób pośredni, poprzez wpływ na aktywność enzymów regulujących poziom glutationu, modułują stosunek GSH do GSSG. Nawiązując do opisanych badań, przedstawiony w rozprawie wzrost aktywności reduktazy glutationowej po trzygodzinnym traktowaniu siewek IAA-Asp, a co za tym idzie zwiększony stosunek GSH/GSSG, może być powiązany z podwyższonym poziomem kwasu absycynowego. Z drugiej strony obniżony poziom SA nie koreluje ze zwiększoną aktywnością GR w badanych warunkach. Z kolei dłuższa inkubacja grochu z koniugatem nie spowodowała zmian w aktywności reduktazy glutationowej, ale zwiększyła aktywność GPX prawdopodobnie przyczyniając się do niższego stosunku GSH/GSSG w porównaniu z kontrolą. Porównywalna do kontroli aktywność GR u siewek traktowanych koniugatem przez 48 godzin może być powiązana z brakiem u tych roślin zmian w poziomie ABA. Badania Ostrowskiego i wsp. (2016a) wykazały, że inkubacja przez dwie doby siewek grochu z IAA-Asp obniża poziom H_2O_2 , ale nie zwiększa aktywności katalazy, peroksydazy askorbinianowej oraz peroksydazy gwajakolowej, enzymów biorących udział w degradacji H_2O_2 . W związku z tym podwyższona aktywność GPX wywołana traktowaniem rośliny wspomnianym koniugatem, może sugerować istotny udział tego enzymu w detoksykacji H_2O_2 .

IAA-Asp powodował obniżenie aktywności reduktazy glutationowej, ale nie wywierał efektu na aktywność peroksydazy glutationowej u siewek grochu inkubowanych w roztworze NaCl. Natomiast zawartość SA oraz ABA u tych roślin była na podobnym poziomie, co u siewek traktowanych samym chlorkiem sodu. Pod wpływem koniugatu zmniejszyła się jednak zawartość JA, o którym wiadomo, że pozytywnie wpływa na odpowiedź roślin, między innymi pszenicy oraz jęczmienia, na stres solny (Qiu i wsp. 2014; Pakar i wsp. 2016). Być może aktywność GR jest regulowana w odpowiedzi na JA i obniżony poziom tego fitohormonu obserwowany w warunkach inkubacji siewek grochu z IAA-Asp w połączeniu z NaCl, jest dla rośliny sygnałem do zmniejszenia aktywności wspomnianego enzymu. Pomimo spadku aktywności reduktazy glutationowej, stosunek GSH/GSSG nie uległ zmianie, co może oznaczać, że inne enzymy, takie jak antyoksydacyjne, czy uczestniczące w biosyntezie lub

degradacji glutationu, kompensują obniżoną aktywność GR poprzez zwiększenie poziomu GSH lub spadek zawartości GSSG. W przypadku szoku osmotycznego wywołanego u siewek grochu działaniem PEG, IAA-Asp nie wpływał na aktywność GR ani GPX, co koreluje z brakiem zmian w stosunku GSH/GSSG. Również zawartość JA, ABA oraz SA była na podobnym poziomie, jak u siewek traktowanych samym PEG.

Zymogram wykonany dla GR wskazuje, że u grochu poddanego działaniu PEG IAA-Asp wpływa na zróżnicowanie aktywności izoform tego enzymu. Przeciwny efekt koniugatu na aktywność dwóch izoform reduktazy glutationowej może prowadzić w konsekwencji do tego, że aktywność całkowitej puli enzymu utrzymuje się na stałym poziomie. Jest to zgodne z opisanymi powyżej badaniami ilościowymi. Co więcej, 48-godzinna inkubacja siewek z koniugatem aktywuje dodatkowe izoformy GR i GPX, których brak w kontroli. Jednakże koreluje to z wynikami uzyskanymi w badaniach spektrofotometrycznych jedynie dla peroksydazy glutationowej. Należy zaznaczyć, że te dwie wykorzystane metody (ilościowe badania spektrofotometryczne oraz jakościowe analizy zymogramów) mogą się różnić czułością, co może wpływać na rozbieżności w uzyskanych wynikach.

Utrzymywanie odpowiedniego stosunku GSH/GSSG w komórkach ma istotny wpływ na odpowiedź rośliny na stres oksydacyjny (Szalai i wsp. 2009). W wyniku działania niekorzystnych czynników środowiskowych odmiany roślin tolerancyjne na stres wykazują wyższy stosunek glutationu zredukowanego do utlenionego w porównaniu do odmian wrażliwych na działanie stresu. Wskazuje to, że wysoka wartość tego parametru ma pozytywny efekt na obronę roślin przed stresem. Zmiany w stosunku GSH/GSSG obserwuje się nie tylko w warunkach stresu, ale również w czasie wzrostu i rozwoju rośliny. Zarówno glutation zredukowany, jak i utleniony mogą modyfikować aktywność enzymów oraz białek regulatorowych poprzez odpowiednio redukcję wiązań disiarczkowych albo utlenianie grup tiolowych.

Wyniki przedstawione w pracy sugerują, że IAA-Asp może modulować stosunek GSH/GSSG u siewek grochu na wczesnym etapie ich rozwoju. Rośliny wykazywały podwyższony stosunek glutationu zredukowanego do utlenionego po krótszej (3-godzinnej) inkubacji z koniugatem. Z kolei dłuższa (48-godzinna) inkubacja siewek grochu z IAA-Asp powodowała zmniejszenie stosunku GSH do GSSG. Różnice we wspomnianym stosunku pomiędzy 3 a 48-godzinnym traktowaniem roślin IAA-Asp mogą sugerować, że koniugat ten uczestniczy w zależnych od czasu odrębnych procesach na poziomie molekularnym. IAA-Asp nie wywoływał natomiast zmian w stosunku GSH/GSSG u roślin, które były poddane jednoczesnemu działaniu NaCl lub PEG. Bashandy i wsp. (2010) wykazali, że glutation jest istotny dla regulacji transportu oraz metabolizmu auksyny. Niski poziom auksyny zaobserwowano w mutan-

cie *A. thaliana ntra ntrb cad2*, który charakteryzował się zaburzoną biosyntezą glutationu. Ponadto Pasternak i wsp. (2020) podali, że rzodkiewnik traktowany IAA oraz sulfoksyiminą butioniny (BSO), która służy jako inhibitor biosyntezy GSH, posiadał wyższy poziom glutationu zredukowanego w porównaniu z roślinami traktowanymi samym BSO. W związku z tym być może IAA-Asp poprzez regulację poziomu glutationu wpływa na homeostazę auksynny. Glutation w postaci zredukowanej, jako główny przedstawiciel niskocząsteczkowych tioli, ma duży wpływ na całkowitą zawartość grup -SH u roślin (Zaffagnini i wsp. 2012). Stosunek grup tiolowych w białkach do całkowitej zawartości grup -SH był zmniejszony w porównaniu do kontroli u grochu inkubowanego przez 3 godziny z IAA-Asp, co koreluje ze zwiększonym stosunkiem GSH/GSSG u tych siewek.

Spadek stosunku GSH/GSSG występujący podczas stresu oksydacyjnego może promować S-glutationylację białek (Dalle-Donne i wsp. 2007). S-glutationylacja białek, należąca do odwracalnych modyfikacji potranslacyjnych, polega na przyłączaniu cząsteczki glutationu poprzez wiązanie disiarczkowe do reaktywnej cysteiny (Bergara-Morales i wsp. 2016). W procesie tym zdecydowanie częściej uczestniczy glutation w postaci zredukowanej w porównaniu do glutationu utlenionego.

Wyniki przedstawione w rozprawie wykazały u siewek grochu obniżoną pod wpływem działania NaCl S-glutationylację czynnika elongacyjnego 1-alfa, białka uczestniczącego w procesie translacji (Jakobsson i wsp. 2018). Być może wynika to z procesu deglutationylacji dotyczącego jednej lub wielu grup tiolowych EF1 α . Shin i wsp. (2009) zaobserwowali w swoich badaniach pozytywny wpływ tego czynnika elongacyjnego na odpowiedź *A. thaliana* na stres solny. Biorąc pod uwagę, że EF1 α jest potencjalnym białkiem opiekuńczym, proces jego S-glutationylacji/deglutationylacji może odgrywać ważną rolę w odpowiedzi rośliny na zasolenie.

Z kolei w siewkach grochu traktowanych PEG zaobserwowano obniżoną S-glutationylację lipooksygenazy, enzymu, który uczestniczy w szlaku biosyntezy oksylipin, między innymi kwasu jasmonowego (Singh i wsp. 2022). Ponadto obecność IAA-Asp spowodowała jeszcze większe obniżenie poziomu S-glutationylacji tego białka w badanych warunkach. Należy wspomnieć, że aktywność LOX zmienia się u roślin w warunkach stresu suszy (Sofa i wsp. 2004; Rezayian i wsp. 2018). Nie można w związku z tym wykluczyć, że S-glutationylacja lipooksygenazy wpływa na aktywność tego enzymu, a w konsekwencji na poziom JA, zwłaszcza że siewki grochu traktowane PEG lub IAA-Asp w połączeniu z PEG charakteryzowały się zmniejszoną zawartością kwasu jasmonowego w porównaniu do kontroli. Być może aktywność lipooksygenazy jest hamowana przez obniżenie poziomu jej

S-glutationylacji, co przyczynia się do zmniejszonej zawartości JA. Z drugiej strony nie zaobserwowano różnic w poziomie kwasu jasmonowego u roślin poddanych działaniu IAA-Asp i PEG w porównaniu do siewek inkubowanych w roztworze samego PEG. Ponadto zawartość JA, pomimo braku zmian w S-glutationylacji LOX, zmniejszyła się u grochu traktowanego samym koniugatem przez 3 lub 48 godzin oraz w połączeniu z NaCl w porównaniu do kontroli. Wyniki te sugerują wpływ również innych szlaków metabolicznych na poziom JA w podanych warunkach.

Zaobserwowano również zwiększoną S-glutationylację białka szoku cieplnego o masie 70 kDa u roślin poddanych 48-godzinnemu działaniu samego IAA-Asp, PEG oraz IAA-Asp w połączeniu z PEG. Wcześniejsze badania Gietler i wsp. (2016) pokazały, że u siewek pszenicy narażonych na stres suszy także wystąpiła podwyższona S-glutationylacja obecnego w błonie chloroplastów białka pokrewnego z HSP70. Klasa białek szoku cieplnego o masie 70 kDa odgrywa ważną rolę w tolerancji roślin na stres suszy (Aghaie and Tafreshi 2020). Zwiększona S-glutationylacja członka tej klasy białek wywołana przez działanie IAA-Asp może sugerować, że dłuższa ekspozycja na koniugat wywiera zmiany w aktywności białek szoku cieplnego.

2.3. Wpływ IAA-Asp na karbonylację białek w siewkach grochu

Karbonylacja białek, w przeciwieństwie do S-glutationylacji, jest nieodwracalną modyfikacją potranslacyjną prowadzącą do utworzenia grupy karbonylowej w łańcuchu bocznym niektórych aminokwasów, między innymi lizyny, proliny, treoniny, histydyny, czy też cysteiny (Møller i wsp. 2017; Tola i wsp. 2021). Proces ten zachodzi przede wszystkim w warunkach stresu oksydacyjnego i wywiera negatywny efekt na funkcje białek (Tola i wsp. 2021). Z drugiej strony karbonylowane białka obecne są również u roślin nienarażonych na stres, co może wskazywać na wpływ tej modyfikacji na procesy fizjologiczne, którym podlegają rośliny.

Wyniki analizy Western blot białek poprzedzone rozdzielaniem polipeptydów metodą elektroforezy dwukierunkowej wskazują 17 karbonylowanych białek, które wykazywały różnice w intensywności sygnału pomiędzy kontrolą, siewkami traktowanymi przez 3 godziny IAA-Asp, NaCl lub IAA-Asp w połączeniu z NaCl. Niestety ze względu na niską wydajność ekstrakcji białek z żelu spowodowaną trudnościami w wycinaniu fragmentów żeli zawierających określone białka, udało się zidentyfikować tylko 5 z nich. Siewki grochu inkubowane w roztworze IAA-Asp wykazywały różnice w karbonylacji dwóch białek (jedno o zwiększonym

sygnale, a drugie o zmniejszonym) w porównaniu do kontroli. Natomiast rośliny traktowane koniugatem wraz z NaCl posiadały jedno białko o zwiększonej karbonylacji, porównując z grochem poddanym działaniu samej soli. Wyniki te mogą wskazywać, że IAA-Asp po 3-godzinnej inkubacji nieznacznie indukuje karbonylację białek grochu w warunkach fizjologicznych oraz w warunkach szoku osmotycznego. Wpływ koniugatu na poziom karbonylowanych białek został również zaobserwowany w badaniach Ostrowskiego i wsp. (2016a). IAA-Asp zwiększał zawartość karbonylowanych białek u siewek grochu traktowanych tylko tym związkiem lub też poddanych jednoczesnemu działaniu IAA-Asp z CdCl₂. U roślin inkubowanych w roztworze koniugatu z chlorkiem sodu zidentyfikowano 3 karbonylowane białka różniące się intensywnością sygnału w porównaniu do wariantu kontrolnego. Zwiększoną karbonylację zaobserwowano między innymi u homologa reduktazy izoflawonowej, która zaangażowana jest w metabolizm wtórny roślin (Wang i wsp. 2006). Badania innych autorów wykazały, że nadekspresja genów kodujących te białka wpływa pozytywnie na odpowiedź roślin na stres abiotyczny lub biotyczny (Kim i wsp. 2010; Cheng i wsp. 2015; Shokat i wsp. 2021). Zwiększona karbonylacja wystąpiła również u aktyny 1, białka cytoszkieletu niezbędnego dla prawidłowego wzrostu i rozwoju rośliny (McCurdy i wsp. 2001). Karbonylacja aktyny została także wykryta u *A. thaliana* po podaniu 2,4-D i prowadziła do degradacji filamentów aktynowych budujących cytoszkielet komórki (Rodríguez-Serrano i wsp. 2014). Natomiast wśród białek ze zmniejszoną karbonylacją zostało zidentyfikowane białko 1 pokrewne z białkiem retinoblastomą, które uczestniczy w regulacji cyklu komórkowego (Gutzat i wsp. 2012). Podwyższona karbonylacja homologa reduktazy izoflawonowej była również widoczna u siewek traktowanych samym NaCl w porównaniu do kontroli. Wariant z solą, porównując z grochem inkubowanym w roztworze IAA-Asp, charakteryzował się natomiast zwiększoną karbonylacją cytoplazmatycznej dehydrogenazy jabłczanowej katalizującej jedną z reakcji cyklu Krebsa (Musrati i wsp. 1998) oraz syntetazy glutaminy uczestniczącej w metabolizmie aminokwasów (Valderrama-Martín i wsp. 2022). Podwyższona karbonylacja syntetazy glutaminy występowała również u pomarańczy gorzkiej (*Citrus aurantium* L.) narażonej na stres solny (Tanou i wsp. 2012). Zidentyfikowane w niniejszej pracy białka wzbogacają dotychczasową wiedzę na temat warunkowanej działaniem chlorku sodu karbonylacji białek grochu.

3. IAA-Asp moduluje poziom fitohormonów w siewkach grochu

Fitohormony, jako cząsteczki regulatorowe, dzięki pełnej współpracy między sobą regulują prawidłowy wzrost i rozwój roślin oraz modułują ich odpowiedź na pojawiające się warunki stresowe (Santner i Estelle 2009). Należy podkreślić, że ścisła regulacja poziomu tych związków jest konieczna do pełnienia przez nie kluczowych dla roślin funkcji. W związku z tym sprawdzono, czy egzogeny IAA-Asp, będący produktem koniugacji IAA, może modulować poziom fitohormonów: JA, ABA oraz SA u siewek grochu.

IAA-Asp wpływał negatywnie na zawartość JA u siewek grochu inkubowanych w roztworze koniugatu. Rośliny traktowane IAA-Asp przez 3 lub 48 godzin wykazywały, porównując z kontrolą, zmniejszony poziom badanego fitohormonu. Należy wspomnieć, że istnieją doniesienia o negatywnym wpływie kwasu jasmonowego na wzrost korzeni roślin (Corti Monzón i wsp. 2012; Ghorbel i wsp. 2021). Natomiast Ostrowski i wsp. (2016a) zaobserwowali, że siewki grochu traktowane IAA-Asp przez 48 godzin charakteryzowały się dłuższymi korzeniami niż rośliny kontrolne. Być może obniżony poziom JA wywołany podaniem IAA-Asp jest powiązany z indukcją wzrostu korzeni grochu. Badany koniugat powodował obniżenie zawartości kwasu jasmonowego również u siewek inkubowanych w roztworze NaCl. Należy podkreślić, że kwas jasmonowy jest prohormonem, który ulega przemianie do aktywnego hormonu JA-Ile podczas reakcji enzymatycznej katalizowanej przez AtGH3.11/JAR1 (Staswick i wsp. 2005; Thines i wsp. 2007). Nie można zatem wykluczyć, że IAA-Asp, jako produkt podobnej reakcji zależnej od GH3, jest w stanie modulować stężenie JA poprzez regulację tworzenia JA-Ile.

Fitohormony ABA oraz SA odgrywają istotną rolę w odpowiedzi roślin na stres abiotyczny (Verma i wsp. 2016). Siewki grochu traktowane IAA-Asp przez 3 oraz 48 godzin wykazywały obniżony poziom kwasu salicylowego w porównaniu do kontroli. Jednakże w przypadku kwasu absycynowego koniugat, w warunkach krótszej inkubacji, powodował wzrost zawartości tego hormonu. Należy zauważyć, że zmiany w poziomach ABA i SA wywołane podaniem IAA-Asp były podobne do tych występujących u roślin w warunkach szoku osmotycznego. Może to świadczyć o negatywnym wpływie koniugatu na siewki grochu. Mimo, że zarówno stosowanie warunków szoku osmotycznego, jak i IAA-Asp skutkowało zwiększeniem stężenia ABA oraz zmniejszeniem stężenia SA w siewkach grochu, połączenie obu czynników nie pogłębiało tego efektu. Zapewne rośliny uruchomiły dodatkowe mechanizmy wpływające na zawartość obu fitohormonów, aby zapobiec nadmiernemu wzrostowi/obniżeniu ich poziomu.

4. Wpływ IAA-Asp na homeostazę auksynową w siewkach grochu

Auksyny, w tym IAA, kontrolują liczne procesy u roślin, począwszy od elongacji i różnicowania komórek do rozwoju organów, a kończąc na regulacji procesu starzenia się (Sauer i wsp. 2013). Jednym z procesów warunkujących utrzymanie IAA na odpowiednim poziomie, co jest kluczowe dla pełnienia przez ten fitohormon wspomnianych funkcji, jest tworzenie koniugatów IAA. Badania nad ekspresją genów *GH3* wykazały wpływ wielu czynników, takich jak fitohormony, herbicydy oraz stresy abiotyczne i biotyczne, na proces ich transkrypcji, (Takase i wsp. 2003; Zhang i wsp. 2007; Zhang i wsp. 2009; Wang i wsp. 2010). Wymienione elementy mogą również modulować aktywność amidosyntetaz *GH3* odpowiedzialnych za tworzenie koniugatów amidowych (Elobeid i wsp. 2012; Ostrowski i Jakubowska 2013). Podobnie jest w przypadku syntezy koniugatów estrowych, gdzie aktywność enzymów katalizujących ten proces może być regulowana przez wiele czynników. Jako przykład można podać syntazę *IAInos* z ryżu, której aktywność zmienia się pod wpływem działania IAA, ABA, SA, 2,4-D oraz stresu suszy i solnego (Ciarkowska i wsp. 2016). Fitohormony mogą również modulować aktywność syntazy *IAGlc* z kukurydzy (Leżnicki i Bandurski 1988b; Kowalczyk i wsp. 2002). W kolejnym etapie badań wykonywanych w ramach doktoratu sprawdzono, czy IAA-Asp wpływa na homeostazę auksynową w siewkach grochu. W związku z tym zbadano u tych roślin poziom IAA po podaniu IAA-Asp. Analizowano również, jak w siewkach grochu traktowanych IAA-Asp zmienia się zawartość wspomnianego koniugatu. Sprawdzono także, czy IAA-Asp, podobnie jak wymienione wyżej czynniki, reguluje ekspresję oraz aktywność syntetazy IAA-Asp oraz aktywność syntazy *IAGlc*, dwóch enzymów modulujących poziom auksyny.

W siewkach grochu inkubowanych z IAA-Asp przez 3 godziny zaobserwowano najwyższą zawartość IAA-Asp wynikającą prawdopodobnie z akumulacji koniugatu pobranego z roztworu. Natomiast znaczny spadek poziomu IAA-Asp w porównaniu do opisanego wariantu wystąpił po 48-godzinnym traktowaniu roślin koniugatem. Obniżona zawartość koniugatu w badanych warunkach przypuszczalnie jest konsekwencją oksydacyjnej degradacji, której podlega ten związek, jak wcześniej bowiem wspomniano, nie zaobserwowano w siewkach grochu hydrolizy IAA-Asp (Hayashi i wsp. 2021; Müller i wsp. 2021). Roślina, chcąc sobie poradzić z nagłym napływem dużej ilości IAA-Asp, prawdopodobnie uruchamia proces jego degradacji, czego końcowym efektem jest powstanie *oxIAA*. Poziom IAA-Asp jest również zmniejszony w siewkach traktowanych koniugatem w połączeniu z chlorkiem sodu w porównaniu do grochu poddanego działaniu samego koniugatu. Podobnie jest w przypadku dłuższej

inkubacji roślin, gdzie PEG spowodował spadek poziomu IAA-Asp u roślin traktowanych jednocześnie koniugatem oraz glikolem polietylenowym. Być może wynika to z negatywnego wpływu zarówno soli, jak i PEG na pobieranie koniugatu.

Egzogenny IAA-Asp nie wpłynął na zmianę poziomu IAA u siewek grochu, co może wskazywać, że badany koniugat nie zaburza homeostazy auksynowej u tych roślin. Brak zmian w zawartości IAA u siewek traktowanych IAA-Asp przez 3 godziny koreluje z porównywalną do kontroli aktywnością syntetazy IAA-Asp. Z drugiej strony w badanych warunkach nastąpił wzrost aktywności syntazy IAGlc. Należy jednak zauważyć, że aktywność tego enzymu nadal była bardzo niska, co może przekładać się na brak zauważalnych zmian w poziomie IAA. Również u grochu traktowanego jednocześnie IAA-Asp oraz NaCl nie zaobserwowano różnic w zawartości IAA, pomimo obniżonej aktywności syntetazy IAA-Asp. Także i w tym przypadku brak zmian w poziomie badanej auksyny może wynikać z nieznacznego spadku aktywności opisywanego enzymu. Tylko rośliny poddane działaniu PEG wykazywały zmniejszony poziom IAA w porównaniu do kontroli, co koreluje z wysokim wzrostem aktywności syntazy IAGlc w badanych warunkach. Niższy wzrost aktywności wspomnianego enzymu u siewek traktowanych przez 48 godzin samym IAA-Asp lub też w połączeniu z PEG nie wywołał już zmian w zawartości IAA. Niezmieniony poziom IAA u grochu inkubowanego w roztworze IAA-Asp, pomimo występujących zmian w aktywności syntetazy IAA-Asp czy też syntazy IAGlc, może wskazywać na jednoczesne działanie innych enzymów regulujących zawartość tej auksyny.

Wyniki przedstawione w niniejszej rozprawie wskazują na pozytywny wpływ IAA-Asp na ekspresję kodującej syntetazę IAA-Asp genu *PsGH3* w siewkach grochu traktowanych koniugatem przez 3 lub 48 godzin. Badania Ostrowskiego i Jakubowskiej (2013) wskazują, że ekspresja *PsGH3.5*, kolejnego genu należącego do rodziny *GH3* grochu, jest regulowana przez działanie fitohormonów, herbicydów auksynowych oraz światła. Najwyższą zawartość transkryptów tego genu zaobserwowano po traktowaniu grochu IAA lub GA₃. Natomiast mniejszy wzrost ekspresji *PsGH3.5* wystąpił u siewek inkubowanych w roztworze ABA, kinetyny lub JA. Z badanych fitohormonów tylko SA nie aktywował ekspresji *PsGH3.5*. Należy zauważyć, że siewki grochu traktowane IAA-Asp przez 3 godziny wykazywały podwyższoną zawartość ABA. Być może, tak jak w przypadku *PsGH3.5*, zwiększony poziom tego fitohormonu wpływa pozytywnie na ekspresję *PsGH3*. Z drugiej strony siewki grochu poddane 48-godzinemu działaniu IAA-Asp pomimo wzrostu ekspresji *PsGH3* nie miały podwyższonego poziomu ABA w porównaniu do kontroli. Należy podkreślić, że *PsGH3.5* i *PsGH3*, chociaż oba kodują białka GH3, są dwoma różnymi genami, więc fito-

hormony aktywujące transkrypcję *PsGH3.5* mogą wywoływać inny efekt na ekspresję *PsGH3*. Jako przykład można tutaj podać odmienny wpływ fitohormonów na transkrypcję różnych genów *GH3* z kukurydzy (*Z. mays*) (Feng i wsp. 2015). W pędach badanej rośliny *ZmGH3-1* wykazywał nadekspresję w wyniku działania ABA oraz JA, podczas gdy *ZmGH3-2* charakteryzował się zmniejszoną ekspresją po podaniu kwasu abscysynowego lub brakiem jej zmian pod wpływem kwasu jasmonowego. Pomimo podwyższonego poziomu transkryptów *PsGH3*, aktywność syntetazy IAA-Asp nie uległa zmianie u siewek grochu traktowanych IAA-Asp przez 3 godziny w porównaniu do kontroli. Jednakże okres trzech godzin jest zbyt krótki, aby oprócz procesu transkrypcji mogła również zajść translacja syntetazy IAA-Asp prowadząca do wzrostu poziomu tego białka, co może tłumaczyć brak zmian aktywności enzymatycznej. Ponadto u siewek inkubowanych przez krótszy czas w roztworze IAA-Asp występuje bardzo wysoki poziom wspomnianego koniugatu, który jako produkt reakcji katalizowanej przez syntetazę IAA-Asp może wpływać hamująco na aktywność tego enzymu. Warto również zaznaczyć, że podobnie jak w przypadku ekspresji *PsGH3.5*, również aktywność syntetazy IAA-Asp z grochu jest regulowana przez fitohormony, herbicydy auksynowe oraz światło (Ostrowski i Jakubowska 2013). Najwyższy wzrost aktywności enzymu pojawił się po podaniu IAA oraz SA. Natomiast słabsze działanie indukujące wykazywały ABA, GA₃, kinetyna lub JA. Wyniki te mogą sugerować, że wywołane przez IAA-Asp zmiany w poziomie fitohormonów mogą w konsekwencji wpływać nie tylko na ekspresję *PsGH3*, ale również na aktywność syntetazy IAA-Asp. Siewki grochu traktowane koniugatem przez 48 godzin charakteryzowały się nieznacznie podwyższoną aktywnością tego enzymu. Może być to powiązane z jednoczesnym wzrostem ilości transkryptów *PsGH3*, które mogą następnie podlegać translacji. Z drugiej strony omawiane rośliny miały niższy poziom IAA-Asp w porównaniu do grochu inkubowanego przez 3 godziny w roztworze koniugatu. Jego niższa zawartość mogła przyczynić się do zmniejszonego hamowania aktywności syntetazy IAA-Asp.

W przypadku siewek grochu traktowanych NaCl podawany koniugat powodował wzrost ekspresji *PsGH3*, ale spadek aktywności syntetazy IAA-Asp. Być może zwiększona w tych warunkach transkrypcja *PsGH3* jest odpowiedzią na obniżoną aktywność syntetazy IAA-Asp. Należy zauważyć, że poziom IAA-Asp w siewkach inkubowanych w roztworze NaCl w połączeniu z koniugatem był wyższy w porównaniu do wariantu z samym NaCl. Możliwe, że podwyższona zawartość IAA-Asp mogła spowodować spadek aktywności syntetazy IAA-Asp u tych roślin. Z kolei badany koniugat nie wpływał na ekspresję *PsGH3* u grochu poddanego działaniu PEG. Jednak w tych warunkach obserwowany był niewielki wzrost

aktywności syntetazy IAA-Asp. Uzyskane wyniki świadczą o odmiennym działaniu koniugatu na ekspresję oraz aktywność syntetazy IAA-Asp w warunkach szoku osmotycznego w porównaniu do warunków fizjologicznych rośliny.

W ramach niniejszej pracy doktorskiej badano również wpływ IAA-Asp na aktywność syntazy IAGlc, która katalizuje pierwszy etap tworzenia koniugatów estrowych. IAA-Asp po 3 lub 48-godzinnej inkubacji powodował wzrost aktywności tego enzymu u siewek grochu. Zaobserwowano także pozytywne działanie badanego koniugatu na aktywność rekombinowanej syntazy IAGlc z kukurydzy (Ciarkowska i wsp. 2021). Na podstawie wykonanej analizy kinetycznej enzymu autorzy artykułu zasugerowali, że IAA-Asp może konkurować z IAA o jego miejsce aktywne i zmniejszać powinowactwo enzymu do IAA. Natomiast w pracy Yin i wsp. (2021) została zidentyfikowana *N*-glukozylotransferaza z miłorzębu (*Ginkgo biloba*), która katalizuje tworzenie glukozydów IAA-Asp. Nawiązując do opisanych badań, IAA-Asp może być substratem syntazy IAGlc, co tłumaczyłoby zwiększoną aktywność tego enzymu po podaniu koniugatu przy jednoczesnym braku zmian w poziomie IAA. Z drugiej strony IAA-Asp powodował obniżenie aktywności wspomnianej glukozylotransferazy u siewek traktowanych PEG. Przedstawione wyniki wskazują, że IAA-Asp reguluje aktywność syntazy IAGlc obecnej w grochu. Wpływ tego związku, podobnie jak w przypadku syntetazy IAA-Asp, zależy od jednoczesnego działania na roślinę czynnika stresowego lub też jego braku.

Koniugaty fitohormonów uczestniczą w metabolizmie tych związków oraz stanowią ich magazyn (Bajguz i Piotrowska 2009). Mogą również wykazywać aktywność biologiczną istotną dla wzrostu i rozwoju roślin lub ich funkcjonowania w warunkach stresowych (González-Lamothe i wsp. 2012; Böttcher i wsp. 2013). Koniugat amidowy JA-Ile jest aktywnym hormonem, który jako cząsteczka sygnałowa oddziałuje z kompleksem receptorowym SCF^{COI1}-JAZ (Thines i wsp. 2007). Odkryto także, że jasmonylo-walina (JA-Val) oraz jasmonylo-leucyna (JA-Leu) również promują interakcję pomiędzy białkiem COI1 a represorem transkrypcji JAZ w ryżu, a w konsekwencji wpływają pozytywnie na odpowiedź rośliny na atak szkodników (Fu i wsp. 2022). Badania przedstawione w rozprawie potwierdzają, że podobnie jak wspomniane koniugaty kwasu jasmonowego, również IAA-Asp może wykazywać aktywność biologiczną, niezależną od IAA. Ponadto uzyskane wyniki poszerzają dotychczasową wiedzę dotyczącą wpływu IAA-Asp na mechanizmy antyoksydacyjne u roślin narażonych na działanie czynników abiotycznych. W celu przybliżenia się do odpowiedzi, w jaki sposób może działać wspomniany koniugat, po raz pierwszy sprawdzono jego wpływ na poziom IAA oraz innych fitohormonów oraz na ekspresję i/lub aktywność enzymów zaangażo-

wanych w tworzenie koniugatów auksyny. Badania te stanowią jednak początek do poznania mechanizmu działania IAA-Asp, nad którym należałoby się pochylić w przyszłości.

PODSUMOWANIE

1. IAA-Asp nie stanowi źródła wolnego IAA w siewkach grochu nienarażonych na działanie warunków stresowych, jak i poddanych działaniu szoku osmotycznego. W związku z tym obserwowane wyniki są efektem działania samego IAA-Asp, nie zaś wzrostu stężenia IAA spowodowanego hydrolizą koniugatu.
2. IAA-Asp nie wpływa na poziom antyoksydantów, proliny i askorbinianu, peroksydację lipidów oraz zawartość metyloglioksalu u siewek narażonych na szok osmotyczny.
3. W warunkach szoku osmotycznego egzogeny IAA-Asp wpływa na aktywność enzymów regulujących zawartość glutationu (GR oraz GST) oraz na S-glutationylację białek, dzięki czemu moduluje status tiolowy w siewkach grochu.
4. IAA-Asp nieznacznie indukuje karbonylację białek w siewkach grochu poddanych działaniu szoku osmotycznego.
5. Badany koniugat reguluje zawartość fitohormonów ABA i SA w optymalnych warunkach wzrostu, a także JA w siewkach grochu nienarażonych na działanie warunków stresowych, jak i poddanych działaniu szoku osmotycznego.
6. IAA-Asp nie wywołuje zmian w poziomie IAA, pomimo wpływu na ekspresję i aktywność amidosyntetazy IAA-Asp oraz aktywność syntazy IAGlc w siewkach grochu nienarażonych na działanie warunków stresowych, jak i poddanych działaniu szoku osmotycznego.

LITERATURA

1. Aghaie P, Tafreshi SAH (2020) Central role of 70-kDa heat shock protein in adaptation of plants to drought stress. *Cell Stress Chaperon* **25**: 1071-1081
2. Andrea WA, Good NE (1955) The formation of indoleacetylaspartic acid in pea seedlings. *Plant Physiol* **30**: 380-382
3. Bajguz A, Piotrowska A (2009) Conjugates of auxin and cytokinin. *Phytochemistry* **70**: 957-969
4. Bandurski RS, Schulze A (1977) Concentration of indole-3-acetic acid and its derivatives in plants. *Plant Physiol* **60**: 211-213
5. Bates LS, Waldren RP, Teare ID (1973) Rapid determination of free proline for water-stress studies. *Plant Soil* **39**: 205-207
6. Bashandy T, Guilleminot J, Vernoux T, Caparros-Ruiz D, Ljung K, Meyer Y, Reichheld JP (2010) Interplay between the NADP-linked thioredoxin and glutathione systems in Arabidopsis auxin signaling. *Plant Cell* **22**: 376-391
7. Bela K, Horváth E, Gallé Á, Szabados L, Tari I, Csiszár J (2015) Plant glutathione peroxidases: emerging role of the antioxidant enzymes in plant development and stress responses. *J Plant Physiol* **176**: 192-201
8. Bergara-Morales JC, Sánchez-Calvo B, Chaki M, Valderrama R, Mata-Pérez C, Corpas FJ, Barroso JB (2016) Protein S-nitrosylation and S-glutathionylation as regulators of redox homeostasis during abiotic stress response. W: Gupta D, Palma J, Corpas F (red.) Redox state as a central regulator of plant-cell stress responses **17**. Springer, Cham, str. 365-386
9. Blakesley RW, Boezi JA (1977) A new staining technique for proteins in polyacrylamide gels using Coomassie Brilliant Blue G250. *Anal Biochem* **82**: 580-582
10. Böttcher C, Burbidge CA, Boss PK, Davies C (2013) Interactions between ethylene and auxin are crucial to the control of grape (*Vitis vinifera* L.) berry ripening. *BMC Plant Biol* **13**: 222
11. Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254

12. Brunoni F, Pěňčík A, Žukauskaitė A, Ament A, Kopečná M, Collani S, Kopečný D, Novák O (2023) Amino acid conjugation of oxIAA is a secondary metabolic regulation involved in auxin homeostasis. *New Phytol* **238**: 2264-2270
13. Campanella JJ, Ludwig-Müller J, Bakllamaja V, Sharma V, Cartier A (2003) ILR1 and sILR1 IAA amidohydrolase homologs differ in expression pattern and substrate specificity. *Plant Growth Regul* **41**: 215–223
14. Campanella JJ, Smith SM, Leib D, Wexler R, Ludwig-Müller J (2008) The auxin conjugate hydrolase family of *Medicago truncatula* and their expression during the interaction with two symbionts. *J Plant Growth Regul* **27**: 26–38
15. Casanova-Sáez R, Mateo-Bonmatí E, Ljung K (2021) Auxin metabolism in plants. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **13**: a039867
16. Ceyhan E, Avci MA (2015) Determination of some agricultural characters of developed pea (*Pisum sativum* L.) lines. *Int J Biol Biomol Agric Food Biotechnol Eng* **9**: 12
17. Cheng Q, Li N, Dong L, Zhang D, Fan S, Jiang L, Wang X, Xu P, Zhang S (2015) Overexpression of soybean isoflavone reductase (*GmIFR*) enhances resistance to *Phytophthora sojae* in soybean. *Front Plant Sci* **6**: 1024
18. Chen Q, Westfall CS, Hicks LM, Wang S, Jez JM (2010) Kinetic basis for the conjugation of auxin by a GH3 family indole-acetic acid-amido synthetase. *J Biol Chem* **285**: 29780-29786
19. Chen T, Fluhr R (2018) Singlet oxygen plays an essential role in the root's response to osmotic stress. *Plant Physiol* **177**: 1717-1727
20. Ciarkowska A, Ostrowski M, Jakubowska A (2016) Abiotic stress and phytohormones affect enzymic activity of 1-O-(indole-3-acetyl)- β -D-glucose: myo-inositol indoleacetyl transferase from rice (*Oryza sativa*). *J Plant Physiol* **205**: 93-96
21. Ciarkowska A, Ostrowski M, Kozakiewicz A (2021) Biochemical characterization of recombinant UDPG-dependent IAA glucosyltransferase from maize (*Zea mays*). *Int J Mol Sci* **22**: 3355
22. Ciarkowska A, Wojtaczka P, Kęsy J, Ostrowski M (2022) Auxin homeostasis in maize (*Zea mays*) is regulated via 1-O-indole-3-acetyl-myoinositol synthesis at early stages of seedling development and under abiotic stress. *Planta* **257**: 23
23. Cohen JD (1982) Identification and quantitative analysis of indole-3-acetyl-L-aspartate from seeds of *Glycine max* L. *Plant Physiol* **70**: 749-753
24. Cohen JD, Bandurski RS (1982) Chemistry and physiology of the bound auxins. *Annu Rev Plant Physiol* **33**: 403-430

25. Colombo G, Clerici M, Garavaglia ME, Giustarini D, Rossi R, Milzani A, Dalle-Donne I (2016) A step-by-step protocol for assaying protein carbonylation in biological samples. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **1019**: 178-190
26. Considine MJ, Sandalio LM, Foyer CH (2015) Unravelling how plants benefit from ROS and NO reactions, while resisting oxidative stress. *Ann Bot* **116**: 469-473
27. Contreras-Vergara CA, Valenzuela-Soto E, García-Orozco KD, Sotelo-Mundro RR, Yepiz-Plascencia G (2007) A Mu-class glutathione S-transferase from gills of the marine shrimp *Litopenaeus vannamei*: purification and characterization. *J Biochem Mol Toxicol* **21**: 62-67
28. Corti Monzón G, Pinedo M, Lamattina L, de la Canal L (2012) Sunflower root growth regulation: the role of jasmonic acid and its relation with auxins. *Plant Growth Regul* **66**: 129-136
29. Dalle-Donne I, Rossi R, Giustarini D, Colombo R, Milzani A (2007) S-glutathionylation in protein redox regulation. *Free Radic Biol Med* **43**: 883-898
30. Das K, Roychoudhury A (2014) Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. *Front Environ Sci* **2**: 53
31. De Kok LJ, Kuiper PJC (1986) Effect of short-term dark incubation with sulfate, chloride and selenate on the glutathione content of spinach leaf discs. *Physiol Plant* **68**: 477-482
32. Demidchik V (2015) Mechanisms of oxidative stress in plants: from classical chemistry to cell biology. *Environ Exp Bot* **109**: 212-228
33. Du H, Wu N, Fu J, Wang S, Li X, Xiao J, Xiong L (2012) A GH3 family member, OsGH3-2, modulates auxin and abscisic acid levels and differentially affects drought and cold tolerance in rice. *J Exp Bot* **63**: 6467-6480
34. Ehmann A (1977) The Van Urk-Salkowski reagent – a sensitive and specific chromogenic reagent for silica gel thin-layer chromatographic detection and identification of indole derivatives. *J Chromatogr* **132**: 267-276
35. Elobeid M, Göbel C, Feussner I, Polle A (2012) Cadmium interferes with auxin physiology and lignification in poplar. *J Exp Bot* **63**: 1413-1421
36. Epstein E, Baldi BG, Cohen JD (1986) Identification of indole-3-acetylglutamate from seeds of *Glycine max*. *Plant Physiol* **80**: 256-258
37. Estévez IH, Hernández MR (2020) Plant glutathione S-transferases: an overview. *Plant Gene* **23**: 100233

38. Feng J, Chen L, Zuo J (2019) Protein S-nitrosylation in plants: current progresses and challenges. *J Integr Plant Biol* **61**: 1206-1223
39. Feng J, Wang C, Chen Q, Chen H, Ren B, Li X, Zuo J (2013) S-nitrosylation of phosphotransfer proteins represses cytokinin signaling. *Nat Commun* **4**: 1529
40. Feng S, Yue R, Tao S, Yang Y, Zhang L, Xu M, Wang H, Shen C (2015) Genome-wide identification, expression analysis of auxin responsive *GH3* family genes in maize (*Zea mays* L.) under abiotic stresses. *J Integr Plant Biol* **57**: 783-795
41. Fu W, Jin G, Jiménez-Alemán GH, Wang X, Song J, Li S, Lou Y, Li R (2022) The jasmonic acid-amino acid conjugates JA-Val and JA-Leu are involved in rice resistance to herbivores. *Plant Cell Environ* **45**: 262-272
42. Fu X, Shi Z, Jiang Y, Jiang L, Qi M, Xu T, Li T (2019) A family of auxin conjugate hydrolases from *Solanum lycopersicum* and analysis of their roles in flower pedicel abscission. *BMC Plant Biol* **19**: 233
43. Gaber A, Ogata T, Maruta T, Yoshimura K, Tamoi M, Shigeoka S (2012) The involvement of *Arabidopsis* glutathione peroxidase 8 in the suppression of oxidative damage in the nucleus and cytosol. *Plant Cell Physiol* **53**: 1596-1606
44. Ghorbel M, Brini F, Sharma A, Landi M (2021) Role of jasmonic acid in plants: the molecular point of view. *Plant Cell Rep* **40**: 1471-1494
45. Gietler M, Nykiel M, Orzechowski S, Fettke J, Zagdańska B (2016) Proteomic analysis of S-nitrosylated and S-glutathionylated proteins in wheat seedlings with different dehydration tolerances. *Plant Physiol Biochem* **108**: 507-518
46. Gilbert RP, Brandt RB (1975) Spectrophotometric determination of methyl glyoxal with 2,4-dinitrophenylhydrazine. *Anal Chem* **47**: 2418-2422
47. González-Lamothe R, Oirdi ME, Brisson N, Bouarab K (2012) The conjugated auxin indole-3-acetic acid-aspartic acid promotes plant disease development. *Plant Cell* **24**: 762-777
48. Guerra D, Ballard K, Truebridge I, Vierling E (2016) S-nitrosation of conserved cysteines modulates activity and stability of S-nitrosogluthathione reductase (GSNOR). *Biochemistry* **55**: 2452-2464
49. Gulick AM (2009) Conformational dynamics in the acyl-CoA synthetases, adenylation domains of non-ribosomal peptide synthetases, and firefly luciferase. *ACS Chem Biol* **4**: 811-827
50. Gutzat R, Borghi L, Gruissem W (2012) Emerging roles of RETINOBLASTOMA-RELATED proteins in evolution and plant development. *Trends Plant Sci* **17**: 139-148

51. Hagen G, Guilfoyle T (2002) Auxin-responsive gene expression: genes, promoters and regulatory factors. *Plant Mol Biol* **49**: 373-385
52. Hagen G, Guilfoyle TJ (1985) Rapid induction of selective transcription by auxins. *Mol Cell Biol* **5**: 1197-1203
53. Hagen G, Kleinschmidt A, Guilfoyle T (1984) Auxin-regulated gene expression in intact soybean hypocotyl and excised hypocotyl sections. *Planta* **162**: 147-153
54. Hall PJ (1980) Indole-3-acetyl-*myo*-inositol in kernels of *Oryza sativa*. *Phytochemistry* **19**: 2121-2123
55. Hasanuzzaman M, Bhuyan MHMB, Anee TI, Parvin K, Nahar K, Mahmud JA, Fujita M (2019) Regulation of ascorbate-glutathione pathway in mitigating oxidative damage in plants under abiotic stress. *Antioxidants* **8**: 384
56. Hasanuzzaman M, Nahar K, Anee TI, Fujita M (2017) Glutathione in plants: biosynthesis and physiological role in environmental stress tolerance. *Physiol Mol Biol Plants* **23**: 249-268
57. Hayashi KI, Arai K, Aoi Y, Tanaka Y, Hira H, Guo R, Hu Y, Ge C, Zhao Y, Kasahara H, Fukui K (2021) The main oxidative inactivation pathway of the plant hormone auxin. *Nat Commun* **12**: 6752
58. Heath RL, Packer L (1968) Photoperoxidation in isolated chloroplasts. I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Arch Biochem Biophys* **125**: 189-198
59. Hoque TS, Hossain MA, Mostofa MG, Burritt DJ, Fujita M, Tran LS (2016) Methylglyoxal: an emerging signaling molecule in plant abiotic stress responses and tolerance. *Front Plant Sci* **7**: 1341
60. Hsieh HL, Okamoto H, Wang M, Ang LH, Matsui M, Goodman H, Deng XW (2000) *FIN219*, an auxin-regulated gene, defines a link between phytochrome A and the downstream regulator COP1 in light control of Arabidopsis development. *Genes Dev* **14**: 1958-1970
61. Hui S, Hao M, Liu H, Xiao J, Li X, Yuan M, Wang S (2019) The group I GH3 family genes encoding Ja-Ile synthetase act as positive regulator in the resistance of rice to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Biochem Biophys Res Commun* **508**: 1062-1066
62. Iglesias MJ, Terrile MC, Correa-Aragunde N, Colman SL, Izquierdo-Alvarez A, Fiol DF, Paris R, Sanchez-Lopez N, Marina A, Calderon Villalobos LIA, Estelle M, Lamattina L, Martinez-Ruiz A, Casalongue CA (2018) Regulation of SCF^(TIR1/AFBs) E3 ligase assembly by S-nitrosylation of *Arabidopsis* SKP1-like1 impacts on auxin signaling. *Redox Biol* **18**: 200-210

63. Jagadeeswaran G, Raina S, Acharya BR, Maqbool SB, Mosher SL, Appel HM, Schultz JC, Klessig DF, Raina R (2007) *Arabidopsis GH3-like defense gene 1* is required for accumulation of salicylic acid, activation of defense responses and resistance to *Pseudomonas syringae*. *Plant J* **51**: 234-236
64. Jain M, Khurana JP (2009) Transcript profiling reveals diverse roles of auxin-responsive genes during reproductive development and abiotic stress in rice. *FEBS J* **276**: 3148-3162
65. Jakobsson ME, Małeckki J, Falnes PØ (2018) Regulation of eukaryotic elongation factor 1 alpha (eEF1A) by dynamic lysine methylation. *RNA Biol* **15**: 314-319
66. Jakubowska A, Kowalczyk S (2004) The auxin conjugate 1-O-indole-3-acetyl-beta-D-glucose is synthesized in immature legume seeds by IAGlc synthase and may be used for modification of some high molecular weight compounds. *J Exp Bot* **55**: 791-801
67. Jiang W, Yin J, Zhang H, He Y, Shuai S, Chen S, Cao S, Li W, Ma D, Chen H (2020) Genome-wide identification, characterization analysis and expression profiling of auxin-responsive GH3 family genes in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Mol Biol Rep* **47**: 3885-3907
68. Jin SH, Ma XM, Han P, Wang B, Sun YG, Zhang GZ, Li YJ, Hou BK (2013) UGT74D1 is a novel auxin glycosyltransferase from *Arabidopsis thaliana*. *PLoS ONE* **8**: e61705
69. Kaur G, Asthir B (2015) Proline: a key player in plant abiotic stress tolerance. *Biol Plant* **59**: 609-619
70. Kellös T, Tímár I, Szilágyi V, Szalai G, Galiba G, Kocsy G (2008) Stress hormones and abiotic stresses have different effects on antioxidants in maize lines with different sensitivity. *Plant Biol (Stuttg)* **10**: 563-572
71. Kim SG, Kim ST, Wang Y, Kim SK, Lee CH, Kim KK, Kim JK, Lee SY, Kang KY (2010) Overexpression of *rice isoflavone reductase-like* gene (*OsIRL*) confers tolerance to reactive oxygen species. *Physiol Plant* **138**: 1-9
72. Kka N, Rookes J, Cahill D (2018) The influence of ascorbic acid on root growth and the root apical meristem in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol Biochem* **129**: 323-330
73. Korasick DA, Enders TA, Strader LC (2013) Auxin biosynthesis and storage forms. *J Exp Bot* **64**: 2541-2555
74. Kowalczyk S, Jakubowska A, Bandurski RS (2002) 1-Naphtalene acetic acid induces indole-3-ylacetylglucose synthase in *Zea mays* seedling tissue. *Plant Growth Regul* **38**: 127-134

75. Kowalczyk S, Jakubowska A, Zielińska E, Bandurski RS (2003) Bifunctional indole-3-acetyl transferase catalyses synthesis and hydrolysis of indole-3-acetyl-*myo*-inositol in immature endosperm of *Zea mays*. *Physiol Plant* **119**: 165-174
76. Lavy M, Estelle M (2016) Mechanisms of auxin signaling. *Development* **143**: 3226-3229
77. LeClere S, Tellez R, Rampey RA, Matsuda SP, Bartel B (2002) Characterization of a family of IAA-amino acid conjugate hydrolases from Arabidopsis. *J Biol Chem* **277**: 20446-20452
78. Leyser O (2018) Auxin signaling. *Plant Physiol* **176**: 465-479
79. Leźnicki AJ, Bandurski RS (1988a) Enzymic synthesis of indole-3-acetyl-1-O- β -D-glucose. I. Partial purification and characterization of the enzyme from *Zea mays*. *Plant Physiol* **88**: 1474-1480
80. Leźnicki AJ, Bandurski RS (1988b) Enzymic synthesis of indole-3-acetyl-1-O- β -D-glucose. II. Metabolic characteristics of the enzyme. *Plant Physiol* **88**: 1481-1485
81. Lin CL, Chen HJ, Hou WC (2002) Activity staining of glutathione peroxidase after electrophoresis on native and sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gels. *Electrophoresis* **23**: 513-516
82. Lindermayr C, Durner J (2009) S-nitrosylation in plants: pattern and function. *J Proteomics* **73**: 1-9
83. Liu K, Lee HJ, Leong SS, Liu CL, Chou JC (2007) A bacterial indole-3-acetyl-L-aspartic acid hydrolase inhibits mung bean (*Vigna radiata* L.) seed germination through arginine-rich intracellular delivery. *J Plant Growth Regul* **26**: 278-284
84. Liu Q, Chen TT, Xiao DW, Zhao SM, Lin JS, Wang T, Li YJ, Hou BK (2019) OsI-AGT1 is a glucosyltransferase gene involved in the glucose conjugation of auxins in rice. *Rice* **12**: 92
85. Lounifi I, Arc E, Molassiotis A, Job D, Rajjou L, Tanou G (2013) Interplay between protein carbonylation and nitrosylation in plants. *Proteomics* **13**: 568-578
86. Ludwig-Müller J (2011) Auxin conjugates: their role for plant development and in the evolution of land plants. *J Exp Bot* **62**: 1757-1773
87. Ludwig-Müller J, Epstein E, Hilgenberg W (1996) Auxin-conjugate hydrolysis in Chinese cabbage: characterization of an amidohydrolase and its role during infection with clubroot disease. *Physiol Plant* **97**: 627-634

88. Ludwig-Müller J, Jülke S, Bierfreund NM, Decker EL, Reski R (2009) Moss (*Physcomitrella patens*) GH3 proteins act in auxin homeostasis. *New Phytol* **181**: 323-338
89. Madhu, Kaur A, Tyagi S, Shumayla, Singh K, Upadhyay SK (2022) Exploration of glutathione reductase for abiotic stress response in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Cell Rep* **41**: 639-654
90. Mattioli R, Costantino P, Trovato M (2009) Proline accumulation in plants: not only stress. *Plant Signal Behav* **4**: 1016-1018
91. McCurdy DW, Kovar DR, Staiger CJ (2001) Actin and actin-binding proteins in higher plants. *Protoplasma* **215**: 89-104
92. Merlaen B, De Keyser E, Ding L, Leroux O, Chaumont F, Van Labeke MC (2019) Physiological responses and aquaporin expression upon drought and osmotic stress in a conservative vs prodigal *Fragaria x ananassa* cultivar. *Plant Physiol Biochem* **145**: 95-106
93. Michalczyk L, Bandurski RS (1982) Enzymic synthesis of 1-*O*-indol-3-ylacetyl- β -glucose and 1-*O*-indol-3-ylacetyl-*myo*-inositol. *Biochem J* **207**: 273-281
94. Møller IM, Havelund JF, Rogowska-Wrzesinska A (2017) Protein carbonylation in plants. W: Ros J (red.) Protein carbonylation: principles, analysis, and biological implications. Wiley, Hoboken, str. 321-339
95. Müller K, Dobrev PI, Pěňčík A, Hošek P, Vondráková Z, Filepová R, Malínská K, Brunoni F, Helusová L, Moravec T, Retzer K, Harant K, Novák O, Hoyerová K, Petrášek J (2021) DIOXYGENASE FOR AUXIN OXIDATION 1 catalyzes the oxidation of IAA amino acid conjugates. *Plant Physiol* **187**: 103-115
96. Musaogullari A, Chai YC (2020) Redox regulation by protein S-glutathionylation: from molecular mechanisms to implications in health and disease. *Int J Mol Sci* **21**: 8113
97. Musrati RA, Kollárová M, Mernik N, Mikulášová D (1998) Malate dehydrogenase: distribution, function and properties. *Gen Physiol Biophys* **17**: 193-210
98. Nobuta K, Okrent RA, Stoutemyer M, Rodibaugh N, Kempema L, Wildermuth MC, Innes RW (2007) The GH3 acyl adenylase family member PBS3 regulates salicylic acid-dependent defense responses in Arabidopsis. *Plant Physiol* **144**: 1144-1156
99. Noctor G, Mhamdi A, Chaouch S, Han Y, Neukermans J, Marquez-Garcia B, Queval G, Foyer CH (2012) Glutathione in plants: an integrated overview. *Plant Cell Environ* **35**: 454-484

100. Oetiker JH, Aeschbacher G (1997) Temperature-sensitive plant cells with shunted indole-3-acetic acid conjugation. *Plant Physiol* **114**: 1385-1395
101. Ogita ZI, Markert CL (1979) A miniaturized system for electrophoresis on polyacrylamide gels. *Anal Biochem* **99**: 233-241
102. Okrent RA, Wildermuth MC (2011) Evolutionary history of the GH3 family of acyl adenylases in rosids. *Plant Mol Biol* **76**: 489-505
103. Ortiz-Espín A, Sánchez-Guerrero A, Sevilla F, Jiménez A (2017) The role of ascorbate in plant growth and development. W: Hossain M, Munné-Bosch S, Burritt D, Diaz-Vivancos P, Fujita M, Lorence A (red.) *Ascorbic acid in plant growth, development and stress tolerance*. Springer, Cham, str. 25-45
104. Ostrowski M, Ciarkowska A, Jakubowska A (2016a) The auxin conjugate indole-3-acetyl-aspartate affects responses to cadmium and salt stress in *Pisum sativum* L. *J Plant Physiol* **191**: 63-72
105. Ostrowski M, Hetmann A, Jakubowska A (2015) Indole-3-acetic acid UDP-glucosyltransferase from immature seeds of pea is involved in modification of glycoproteins. *Phytochemistry* **117**: 25-33
106. Ostrowski M, Jakubowska A (2011) Purification and biochemical characterization of indole-3-acetyl-aspartic acid synthetase from immature seeds of pea (*Pisum sativum*). *J Plant Growth Regul* **30**: 30-40
107. Ostrowski M, Jakubowska A (2013) GH3 expression and IAA-amide synthetase activity in pea (*Pisum sativum* L.) seedlings are regulated by light, plant hormones and auxinic herbicides. *J Plant Physiol* **170**: 361-368
108. Ostrowski M, Mierek-Adamska A, Porowińska D, Goc A, Jakubowska A (2016b) Cloning and biochemical characterization of indole-3-acetic acid-amino acid synthetase PsGH3 from pea. *Plant Physiol Biochem* **107**: 9-20
109. Ostrowski M, Świdziński M, Ciarkowska A, Jakubowska A (2014) IAA-amidosynthetase activity and *GH3* expression during development of pea seedlings. *Acta Physiol Plant* **36**: 3029-3037
110. Pakar N, Pirasteh-Anosheh H, Emam Y, Pessarakli M (2016) Barley growth, yield, antioxidant enzymes and ion accumulation affected by PGRs under salinity stress conditions. *J Plant Nutr* **39**: 1372-1379
111. Park JE, Park JY, Kim YS, Staswick PE, Jeon J, Yun J, Kim SY, Kim J, Lee YH, Park CM (2007) GH3-mediated auxin homeostasis links growth regulation with stress adaptation response in *Arabidopsis*. *J Biol Chem* **282**: 10036-10046

112. Pasternak T, Palme K, Paponov IA (2020) Glutathione enhances auxin sensitivity in *Arabidopsis* roots. *Biomolecules* **10**: 1550
113. Pavlović I, Pěnčík A, Novák O, Vujčić V, Radić Brkanac S, Lepeduš H, Strnad M, Salopek-Sondi B (2018) Short-term salt stress in *Brassica rapa* seedlings causes alterations in auxin metabolism. *Plant Physiol Biochem* **125**: 74-84
114. Peat TS, Böttcher C, Newman J, Lucent D, Cowieson N, Davies C (2012) Crystal structure of an indole-3-acetic acid amido synthetase from grapevine involved in auxin homeostasis. *Plant Cell* **24**: 4525-4538
115. Perestrelo R, Silva P, Porto-Figueira P, Pereira JAM, Silva C, Medina S, Câmara JS (2019) QuEChERS - Fundamentals, relevant improvements, applications and future trends. *Anal Chim Acta* **1070**: 1-28
116. Powers SE, Thavarajah D (2019) Checking agriculture's pulse: field pea (*Pisum sativum* L.), sustainability, and phosphorus use efficiency. *Front Plant Sci* **10**: 1489
117. Qiu Z, Guo J, Zhu A, Zhang L, Zhang M (2014) Exogenous jasmonic acid can enhance tolerance of wheat seedlings to salt stress. *Ecotoxicol Environ Saf* **104**: 202-208
118. Rekhter D, Lüdke D, Ding Y, Feussner K, Zienkiewicz K, Lipta V, Wiermer M, Zhang Y, Feussner I (2019) Isochorismate-derived biosynthesis of the plant stress hormone salicylic acid. *Science* **365**: 498-502
119. Rezayian M, Niknam V, Ebrahimzadeh H (2018) Effects of drought stress on the seedling growth, development, and metabolic activity in different cultivars of canola. *Soil Sci Plant Nutr* **64**: 360-369
120. Rice-Evans CA, Diplock AT, Symons MCR (1991) Techniques in free radical research. W: Burdon RH, van Knippenberg PH (red.) **22**. Elsevier, Amsterdam, str. 196-199
121. Rodríguez-Serrano M, Pazmiño DM, Sparkes I, Rochetti A, Hawes C, Romero-Puertas MC, Sandalio LM (2014) 2,4-dichlorophenoxyacetic acid promotes S-nitrosylation and oxidation of actin affecting cytoskeleton and peroxisomal dynamics. *J Exp Bot* **65**: 4783-4793
122. Romero-Puertas MC, Corpas FJ, Sandalio LM, Leterrier M, Rodríguez-Serrano M, Del Río LA, Palma JM (2006) Glutathione reductase from pea leaves: response to abiotic stress and characterization of the peroxisomal isozyme. *New Phytol* **170**: 43-52
123. Romero-Puertas MC, Laxa M, Matte A, Zaninotto F, Finke-Meier I, Jones AM, Perazzoli M, Vandelle E, Dietz KJ, Delledonne M (2007) S-nitrosylation of peroxiredoxin II E promotes peroxynitrite-mediated tyrosine nitration. *Plant Cell* **19**: 4120-4130

124. Romero-Puertas MC, Rodríguez-Serrano M, Sandalio LM (2013) Protein S-nitrosylation in plants under abiotic stress: an overview. *Front Plant Sci* **4**: 373
125. Round A, Brown E, Marcellin R, Kapp U, Westfall CS, Jez JM, Zubieta C (2013) Determination of the GH3.12 protein conformation through HPLC-integrated SAXS measurements combined with X-ray crystallography. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* **69**: 2072-2080
126. Roux C, Perrot-Rechenmann C (1997) Isolation by differential display and characterization of a tobacco auxin-responsive cDNA *Nt-gh3*, related to *GH3*. *FEBS Lett* **419**: 131-136
127. Saddhe AA, Malvankar MR, Karle SB, Kumar K (2019) Reactive nitrogen species: paradigms of cellular signaling and regulation of salt stress in plants. *Environ Exp Bot* **161**: 86-97
128. Saha GC, Vandemark GJ (2012) Evaluation of expression stability of candidate references genes among green and yellow pea cultivars (*Pisum sativum* L.) subjected to abiotic and biotic stress. *Am J Plant Sci* **3**: 235-242
129. Sanchez Carranza A, Singh A, Steinberger K, Panigrahi K, Palme K, Dovzhenko A, Dal Bosco C (2016) Hydrolases of the ILR1-like family of *Arabidopsis thaliana* modulate auxin response by regulating auxin homeostasis in the endoplasmic reticulum. *Sci Rep* **6**: 24212
130. Santner A, Estelle M (2009) Recent advances and emerging trends in plant hormone signalling. *Nature* **459**: 1071–1078
131. Sauer M, Robert S, Kleine-Vehn J (2013) Auxin: simply complicated. *J Exp Bot* **64**: 2565–2577
132. Schaedle M, Bassham JA (1977) Chloroplast glutathione reductase. *Plant Physiol* **59**: 1011-1012
133. Sembdner G, Atzorn R, Schneider G (1994) Plant hormone conjugation. *Plant Mol Biol* **26**: 1459-1481
134. Sharma P, Jha AB, Dubey RS, Pessarakli M (2012) Reactive oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *J Bot*
135. Shavrukov Y (2013) Salt stress or salt shock: which genes are we studying? *J Exp Bot* **64**: 119-127

136. Shin D, Moon SJ, Park SR, Kim BG, Byun MO (2009) Elongation factor 1 α from *A. thaliana* functions as molecular chaperone and confers resistance to salt stress in yeast and plants. *Plant Sci* **177**: 156-160
137. Shokat S, Novák O, Šíroková J, Singh S, Gill KS, Roitsch T, Großkinsky DK, Liu F (2021) Elevated CO₂ modulates the effect of heat stress responses in *Triticum aestivum* by differential expression of an *isoflavone reductase like (IRL)* gene. *J Exp Bot* **72**: 7594-7609
138. Shumilina J, Kusnetsova A, Tsarev A, Janse van Rensburg HC, Medvedev S, Demidchik V, Van den Ende W, Frolov A (2019) Glycation of plant proteins: regulatory roles and interplay with sugar signalling? *Int J Mol Sci* **20**: 2366
139. Singh P, Arif Y, Miszczuk E, Bajguz A, Hayat S (2022) Specific roles of lipoxygenases in development and responses to stress in plants. *Plants* **11**: 979
140. Singh VK, Jain M, Garg R (2015) Genome-wide analysis and expression profiling suggest diverse roles of *GH3* genes during development and abiotic stress responses in legumes. *Front Plant Sci* **5**: 789
141. Sofo A, Dichio B, Xiloyannis C, Masia A (2004) Lipoxygenase activity and proline accumulation in leaves and roots of olive trees in response to drought stress. *Physiol Plant* **121**: 58-65
142. Souza LA, Monteiro CC, Carvalho RF, Gratão PL, Azevedo RA (2017) Dealing with abiotic stresses: an integrative view of how phytohormones control abiotic stress-induced oxidative stress. *Theor Exp Plant Physiol* **29**: 109–127
143. Starzyńska E, Kowalczyk S (2012) Novel 1-O-indole-3-acetyl- β -D-glucose-dependent acyltransferase transferring indoleacetyl moiety to some mono- di- and oligosaccharides. *Acta Physiol Plant* **34**: 53-63
144. Staswick PE (2009) The tryptophan conjugates of jasmonic acid and indole-3-acetic acids are endogenous auxin inhibitors. *Plant Physiol* **150**: 1310-1321
145. Staswick PE, Serban B, Rowe M, Tiryaki I, Maldonado MT, Maldonado MC, Suza W (2005) Characterization of an Arabidopsis enzyme family that conjugates amino acids to indole-3-acetic acid. *Plant Cell* **17**: 616-627
146. Staswick PE, Tiryaki I, Rowe ML (2002) Jasmonate response locus *JAR1* and several related Arabidopsis genes encode enzymes of the firefly luciferase superfamily that show activity on jasmonic, salicylic and indole-3-acetic acids in an assay for adenylation. *Plant Cell* **14**: 1405-1415

147. Südi J (1964) Induction of the formation of complexes between aspartic acid and indolyl-3-acetic acid or 1-naphthalene acetic acid by other carboxylic compounds. *Nature* **201**: 1009-1010
148. Szalai G, Kellös T, Galiba G, Kocsy G (2009) Glutathione as an antioxidant and regulatory molecule in plants under abiotic stress conditions. *J Plant Growth Regul* **28**: 66-80
149. Takase T, Nakazawa M, Ishikawa A, Manabe K, Matsui M (2003) *DFL2*, a new member of the *Arabidopsis* *GH3* gene family, is involved in red light-specific hypocotyl elongation. *Plant Cell Physiol* **44**: 1071-1080
150. Tang Q, Yu P, Tillmann M, Cohen JD, Slovin JP (2019) Indole-3-acetylaspartate and indole-3-acetylglutamate, the IAA-amide conjugates in the diploid strawberry achene, are hydrolyzed in growing seedlings. *Planta* **249**: 1073-1085
151. Tanou G, Filippou P, Belghazi M, Job D, Diamantidis G, Fotopoulos V, Molassiotis A (2012) Oxidative and nitrosative-based signaling and associated post-translational modifications orchestrate the acclimation of citrus plants to salinity stress. *Plant J* **72**: 585-599
152. Terol J, Domingo C, Talón M (2006) The GH3 family in plants: genome wide analysis in plants and evolutionary history based on EST analysis. *Gene* **371**: 279-290
153. Thines B, Katsir L, Melotto M, Niu Y, Mandaokar A, Liu G, Nomura K, He SY, Howe GA, Browse J (2007) JAZ repressor proteins are targets of the SCF(COI1) complex during jasmonate signalling. *Nature* **448**: 661-665
154. Tola AJ, Jaballi A, Missihoun TD (2021) Protein carbonylation: emerging roles in plant redox biology and future prospects. *Plants (Basel)* **10**: 1451
155. Valderrama-Martín JM, Ortigosa F, Ávila C, Cánovas FM, Hirel B, Cantón FR, Cañas RA (2022) A revised view on the evolution of glutamine synthetase isoenzymes in plants. *Plant J* **110**: 946-960
156. Verma V, Ravindran P, Kumar PP (2016) Plant hormone-mediated regulation of stress responses. *BMC Plant Biol* **16**: 86
157. Vielba JM (2019) Identification and initial characterization of a new subgroup in the GH3 gene family in woody plants. *J Plant Biochem Biotechnol* **28**: 280-290
158. Wang L, Halitschke R, Kang JH, Berg A, Harnisch F, Baldwin IT (2007) Independently silencing two JAR family members impairs levels of trypsin proteinase inhibitors but not nicotine. *Planta* **226**: 159-167

159. Wang MY, Liu XT, Chen Y, Xu XJ, Yu B, Zhang SQ, Li Q, He ZH (2012) *Arabidopsis* acetyl-amido synthetase GH3.5 involvement in camalexin biosynthesis through conjugation of indole-3-carboxylic acid and cysteine and upregulation of camalexin biosynthesis genes. *J Integr Plant Biol* **54**: 471-485
160. Wang S, Bai Y, Shen C, Wu Y, Zhang S, Jiang D, Guilfoyle TJ, Chen M, Qi Y (2010) Auxin-related gene families in abiotic stress response in *Sorghum bicolor*. *Funct Integr Genom* **10**: 533-546
161. Wang X, He X, Lin J, Shao H, Chang Z, Dixon RA (2006) Crystal structure of isoflavone reductase from alfalfa (*Medicago sativa* L.). *J Mol Biol* **358**: 1341-1352
162. Westfall CS, Sherp AM, Zubieta C, Alvarez S, Schraft E, Marcellin R, Ramirez L, Jez JM (2016) *Arabidopsis thaliana* GH3.5 acyl acid amido synthetase mediates metabolic crosstalk in auxin and salicylic acid homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **113**: 13917-13922
163. Westfall CS, Zubieta C, Herrmann J, Kapp U, Nanao MH, Jez JM (2012) Structural basis for prereceptor modulation of plant hormones by GH3 proteins. *Science* **336**: 1708-1711
164. Wojtaczka P, Ciarkowska A, Starzyńska E, Ostrowski M (2022) The GH3 amidosynthetases family and their role in metabolic crosstalk modulation of plant signaling compounds. *Phytochemistry* **194**: 113039
165. Woodward AW, Bartel B (2005) Auxin: Regulation, action, and interaction. *Ann Bot* **95**: 707-735
166. Wright RM, Hagen G, Guilfoyle T (1987) An auxin-induced polypeptide in dicotyledonous plants. *Plant Mol Biol* **9**: 625-634
167. Xiao M, Li Z, Zhu L, Wang J, Zhang B, Zheng F, Zhao B, Zhang H, Wang Y, Zhang Z (2021) The multiple roles of ascorbate in the abiotic stress response of plants: antioxidant, cofactor and regulator. *Front Plant Sci* **12**: 598173
168. Xu M, Wang X, Liu J, Jia A, Xu C, Deng XW, He G (2022) Natural variation in the transcription factor REPLUMLESS contributes to both disease resistance and plant growth in *Arabidopsis*. *Plant Commun* **3**: 100351
169. Yang H, Mu J, Chen L, Feng J, Hu J, Li L, Zhou JM, Zuo J (2015a) S-nitrosylation positively regulates ascorbate peroxidase activity during plant stress responses. *Plant Physiol* **167**: 1604-1615
170. Yang Y, Yue R, Sun T, Zhang L, Chen W, Zeng H, Wang H, Shen C (2015b) Genome-wide identification, expression analysis of *GH3* family genes in *Medicago truncatula*

- catula* under-stress related hormones and *Sinorhizobium meliloti* infection. *Appl Microbiol Biotechnol* **99**: 841-854
171. Ye B, Gitler C, Gressel J (1997) A high-sensitivity, single-gel, polyacrylamide gel electrophoresis method for the quantitative determination of glutathione reductases. *Anal Biochem* **246**: 159-165
 172. Yin Q, Zhang J, Wang S, Cheng J, Gao H, Guo C, Ma L, Sun L, Han X, Chen S, Liu A (2021) *N*-glucosyltransferase GbNGT1 from ginkgo complements the auxin metabolic pathway. *Hortic Res* **8**: 229
 173. Yuan H, Zhao K, Lei H, Shen X, Liu Y, Liao X, Li T (2013) Genome-wide analysis of the GH3 family in apple (*Malus x domestica*). *BMC Genom* **14**: 297
 174. Yun BW, Feechan A, Yin M, Saidi NB, Le Bihan T, Yu M, Moore JW, Kang JG, Kwon E, Spoel SH, Pallas JA, Loake G (2011) S-nitrosylation of NADPH oxidase regulates cell death in plant immunity. *Nature* **478**: 264-268
 175. Zaffagnini M, Bedhomme M, Marchand CH, Morisse S, Trost P, Lemaire SD (2012) Redox regulation in photosynthetic organisms: focus on glutathionylation. *Antioxid Redox Signal* **16**: 567-586
 176. Zhang SW, Li CH, Cao J, Zhang YC, Zhang SQ, Xia YF, Sun DY, Sun Y (2009) Altered architecture and enhanced drought tolerance in rice via the down-regulation of indole-3-acetic acid by *TLD1/OsGH3.13* activation. *Plant Physiol* **151**: 1889-1901
 177. Zhang Z, Li Q, Li Z, Staswick PE, Wang M, Zhu Y, He Z (2007) Dual regulation role of *GH3.5* in salicylic acid and auxin signaling during *Arabidopsis-Pseudomonas syringae* interaction. *Plant Physiol* **145**: 450-464
 178. Zhang Z, Wang M, Li Z, Li Q, He Z (2008) *Arabidopsis* GH3.5 regulates salicylic acid-dependent and both NPR1-dependent and independent defense responses. *Plant Signal Behav* **3**: 537-542