



Indukcja biosyntezy glukotropaeoliny i aktywności myrozynazy w korzeniach włosnikowatych nasturcji

Marzena Wielanek, Henryk Urbanek

Katedra Fizjologii i Biochemii Roślin, Uniwersytet Łódzki, Łódź

Induction of glucotropaeolin biosynthesis and myrosinase activity in hairy roots of nasturtium

Summary

Kinetin, BAP and NAA increased glucotropaeolin content in dry weight of nasturtium hairy roots but they inhibited biomass growth. Salicylates most strongly (by about 100-200% above control) and DL- β -aminobutyric acid and methyl jasmonate to a lesser degree increased glucotropaeolin yield. They also slightly increased myrosinase activity. *Trans*-cinnamic acid was a much stronger inducer of myrosinase activity than glucotropaeolin biosynthesis; it strongly inhibited biomass growth. L-1-amino-2-phenylethylphosphonic acid, inhibitor of L-phenylalanine ammonia-lyase (PAL), induced glucotropaeolin production and enhanced the effect of salicylates and jasmonate on glucotropaeolin yield but it did not affect myrosinase activity.

Key words:

glucotropaeolin, myrosinase, hairy roots, growth regulators, salicylates, elicitors, methyl jasmonate, PAL-inhibitor.

Adres do korespondencji

Henryk Urbanek,
Katedra Fizjologii
i Biochemii Roślin,
Uniwersytet Łódzki,
ul. Banacha 12/16,
90-237 Łódź.

1. Wstęp

Glukotropaeolina jest pochodzącym od fenyloalaniny glukozynolanem nasturcji (*Tropaeolum majus* L.), rozkładanym przez myrozynazę do aktywnego, działającego przeciw patogenom i antyrakowo benzyloizotiocyanianu. Duże nadzieje wiąże się z produkcją metabolitów wtórnych przez korzenie włosnikowate. Ich wzrost jest niezależny od egzogennych fitohormonów, jednak

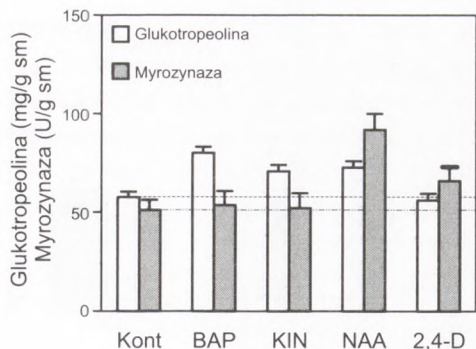
nie jest wyjaśnione, czy nie stymulują one korzeni do produkcji metabolitów. Ponadto interesujące jest określenie możliwości indukcji produkcji metabolitów w korzeniach włośnikowatych w wyniku elicytacji lub przez blokowanie konkurencyjnych szlaków metabolicznych. Celem pracy było zbadanie wpływu auksyn, cytokinin, salicylanów, elicytorów, jasmonianu metylu, kwasu *trans*-cynamonowego i inhibitora amoniakolizy L-fenylalaniny (PAL) na wytwarzanie glukotropeoliny i aktywność myrozynazy w korzeniach włośnikowatych nasturcji.

2. Materiał i metody

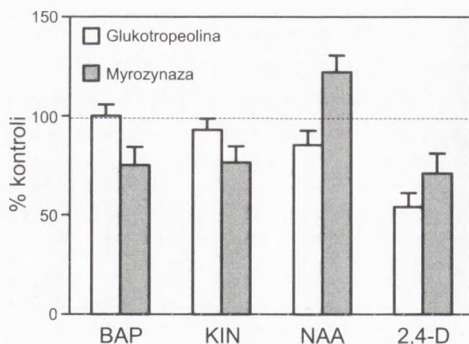
Korzenie włośnikowate nasturcji uzyskano zakażając sterylne rośliny *Agrobacterium rhizogenes* LBA 9402 (PR₁ 1855). Korzenie hodowano w 300 ml kolbach Erlenmeyera zawierających 100 ml płynnej pożywki B5 (1) z dodatkiem 3% sacharozy (pH 5,8), na wytrząsarce rotacyjnej, w ciemności, w temperaturze 22°C. Wpływ aktywności PAL na zawartość glukotropeoliny i aktywność myrozynazy badano hodując korzenie z dodatkiem 0,5 mM kwasu *trans*-cynamonowego (CA) i kwasu L-1-amino-2-fenyletylofosfonowego (I). W badaniach wpływu 50 µM regulatorów wzrostu: BAP, KIN, NAA i 2,4-D; 0,5 mM: salicylanu sodu (NaSA), kwasu acetylosalicylowego (AcSA), hydrazidu kwasu salicylowego (HySA), benzotiadiazolu (BTH), kwasu DL-β-aminomasłowego (BABA) oraz 0,05 mM jasmonianu metylu (MeJA) 9-dniowe korzenie przez 24 godziny traktowano wymienionymi związkami, następnie odsączano i przenoszono na świeżą pożywkę. Takie same stężenia oraz sposób hodowli zastosowano badając ich współdziałanie z I (0,5 mM). We wszystkich eksperymentach materiał do analiz zbierano co 3 dni. Na wykresach przedstawiono wartości z szóstego dnia po potraktowaniu badanymi związkami. Zawartość glukotropeoliny i aktywność myrozynazy badano według wcześniej opisanych metod (2). Jednostkę aktywności myrozynazy zdefiniowano jako ilość enzymu hydrolizującą 1 µmol glukotropeoliny w ciągu 1 min. Zawartość glukotropeoliny i aktywność myrozynazy podano w przeliczeniu na gram suchej masy (g sm), wydajność w przeliczeniu na 100 ml hodowli.

3. Wyniki i dyskusja

Badane cytokiny podwyższyły zawartość glukotropeoliny o ok. 20-30% nie wpływając istotnie na aktywność myrozynazy. NAA w podobnym stopniu zwiększała zawartość glukotropeoliny wyraźnie jednak podwyższała aktywność myrozynazy (rys. 1). Dodanie do podłoża hodowlanego regulatorów wzrostu hamowało przyrost biomasy, w efekcie wydajność glukotropeoliny nie zmieniała się lub była niższa niż w kontroli, wydajność myrozynazy była obniżona (rys. 2). Egzogenne fitohormony mogą zatem stymulować syntezę metabolitów wtórnych niezależnie od negatywne-



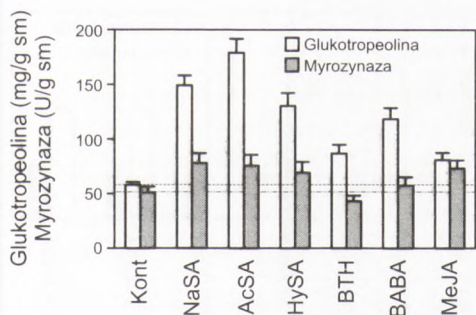
Rys. 1. Zawartość glukotropeoliny i aktywność myrozynazy w hodowlach korzeni włośnikowatych traktowanych regulatorami wzrostu.



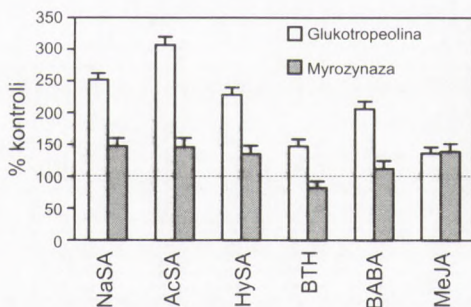
Rys. 2. Wydajność glukotropeoliny i myrozynazy w hodowlach korzeni włośnikowatych traktowanych regulatorami wzrostu.

go wpływu na biomasę. Zwiększenie produkcji hioscyjminy i skopolaminy stwierdzono w traktowanych auksynami korzeniach włośnikowatych *Hyoscyamus muticus* (3).

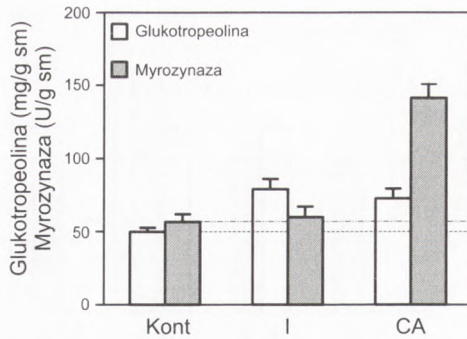
Zastosowane salicylany, elicytory (BTH, BABA) i MeJA wyraźnie zwiększały zawartość jak i wydajność glukotropeoliny. W kulturach traktowanych NaSA, AcSA, HySA i MeJA o kilkadziesiąt procent podwyższona była też aktywność myrozynazy (rys. 3 i 4). Według danych literaturowych elicytory i uczestniczące w procesie elicytacji kwas salicylowy i jasmonowy indukują produkcję metabolitów wtórnych uczestniczących w odpowiedzi roślin na stres (4). Produkcję glukotropeoliny najsilniej stymulowały salicylany, najwyższą wydajność, ok. 300% kontroli, stwierdzono w hodowlach traktowanych AcSA. Podobnie stwierdzono selektywny wzrost zawartości aromatycznych glukozynolanów w rzepaku traktowanym SA (5).



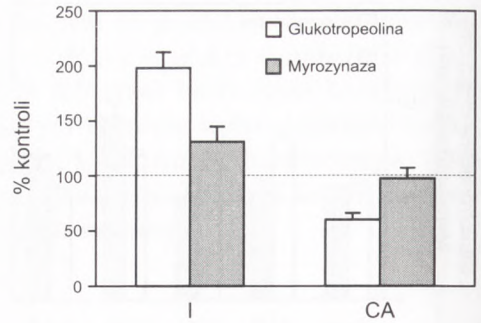
Rys. 3. Zawartość glukotropeoliny i aktywność myrozynazy w hodowlach korzeni włośnikowatych traktowanych salicylanami, elicytorami i jasnioniem.



Rys. 4. Wydajność glukotropeoliny i myrozynazy w hodowlach korzeni włośnikowatych traktowanych salicylanami, elicytorami i jasnioniem.

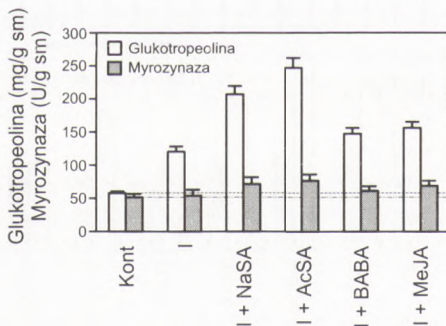


Rys. 5. Zawartość glukocholeoliny i aktywność myrozynazy w korzeniach włosnikowatych hodowanych z dodatkiem I oraz CA.

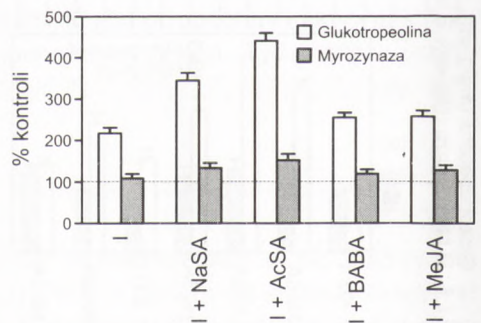


Rys. 6. Wydajność glukocholeoliny i myrozynazy w korzeniach włosnikowatych hodowanych z dodatkiem I oraz CA.

Przekształcenie L-fenylalaniny (Phe) do benzyloaldoksymu prowadzi do syntezy glukocholeoliny, podczas gdy PAL przekształca Phe do CA, prekursora fenylpropenoidów. CA oraz I zwiększały zawartość glukocholeoliny, aktywność myrozynazy była silnie podwyższona tylko przez CA (rys. 5). Traktowanie CA obniżało wydajność w związku z silnym hamowaniem biomasy (rys. 6), któremu towarzyszyło brązowienie hodowli. Stymulacja produkcji glukocholeoliny mogła być zatem efektem hamowania przez produkt reakcji Phe→CA jak i stresowego działania fenolowych pochodnych CA. W zawiesinach komórkowych lucerny traktowanych inhibitorem PAL stwierdzono obniżenie zawartości kwasów fenolowych i stymulację podziałów komórkowych (6). W hodowlach traktowanych I podwyższona produkcja glukocholeoliny połączona ze zwiększonym przyrostem biomasy mogła być zatem efektem in-



Rys. 7. Zawartość glukocholeoliny i aktywność myrozynazy w hodowlach korzeni włosnikowatych traktowanych równocześnie I oraz salicylanami, elicytorami i jasionianem.



Rys. 8. Wydajność glukocholeoliny i myrozynazy w hodowlach korzeni włosnikowatych traktowanych równocześnie I oraz salicylanami, elicytorami i jasionianem.

aktywacji PAL (rys. 5 i 6). Równoczesne potraktowanie korzeni włośnikowatych I oraz salicylanami, BABA i MeJA potęgowało efekt elicytacji. Traktowanie I wraz z AcSA ok. 4,5-krotnie podwyższało zawartość i wydajność glukotropeoliny (rys. 7 i 8). Spostrzeżenie przez I efektu elicytacji wskazuje, że zaindukowana synteza metabolitów wtórnych z Phe została poprzez spadek aktywności PAL skierowana na szlak syntezy glukotropeoliny.

Na podstawie uzyskanych wyników sugeruje się, że poprzez inhibicję PAL i elicytację można zwiększyć produkcję glukotropeoliny i myrozynazy w kulturach korzeni włośnikowatych nasturcji.

Literatura

1. Gamborg O. L., Miller R. A., Ojima K., (1968), *Exp. Cell Res.*, 50, 151-158.
2. Wielanek M., Urbanek H., (1999), *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.*, 57, 39-45.
3. Vanhala L., Eeva M., Lapinjoki S., Hiltunen R., Oksman-Caldentey K-M., (1998), *J. Plant Physiol.*, 153, 475-481.
4. Kessmann H., Staub T., Hofmann C., Maetzke T., Herzog J., (1994), *Annu. Rev. Phytopathol.*, 32, 347-350.
5. Kiddle G. A., Doughty K. J., Wallsgrove R. M., (1994), *J. Exp. Bot.*, 45, 1343-1346.
6. Cvikrová M., Binarová P., Eder J., Vágner M., Hrubcová M., Zoň J., Macháčková I., (1999), *Physiol. Plant.*, 107, 329-337.