

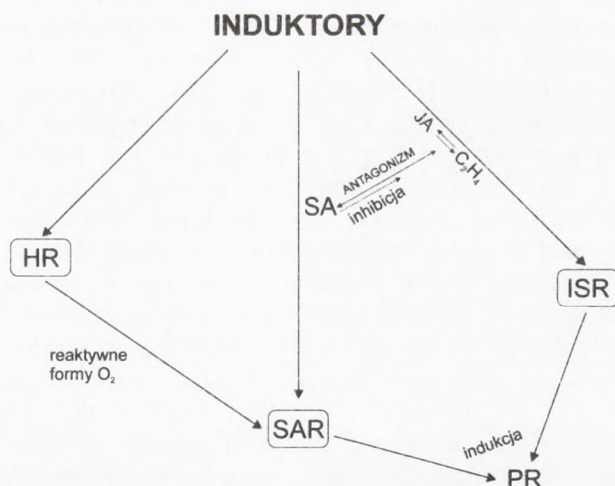
Etylen a reakcje obronne roślin

Luiza Handschuh
Instytut Chemii Bioorganicznej
Polska Akademia Nauk
Poznań

Termin „układ immunologiczny” w literaturze biologicznej czy medycznej, jak się wydaje, jest zarezerwowany jedynie dla najwyżej uplasowanych w hierarchii świata zwierzęcego strunowców. Trudno byłoby go tym bardziej zastosować w odniesieniu do roślin, chociaż nikt nie neguje istnienia pojęcia „choroby roślin”. Nie ma najmniejszej wątpliwości, że rośliny, choć pozbawione możliwości przemieszczania się, posiadają zdolność obrony nie tylko przed niesprzyjającymi warunkami klimatycznymi, ale i przed inwazją licznych patogenów.

Do dwóch podstawowych typów reakcji obronnych roślin należą znane powszechnie reakcja nadwrażliwości (HR — *hypersensitive response*) i tzw. nabyta odporność systemiczna (SAR — *systemic acquired resistance*) (1-5). Pierwsza z nich to szybka, niespecyficzna odpowiedź o niewielkim zasięgu, mająca na celu ograniczenie strefy inwazji patogena i zapobieganie jego rozprzestrzenianiu się w roślinie. Typowymi jej objawami są miejscowe nekrozy komórek (2). Wystąpienie HR jest możliwe dzięki natychmiastowemu rozpoznaniu patogena przez roślinę, na ogół poprzez bezpośrednią „reakcję genu na gen” (ang. *gene-for-gene resistance*) (1,3). SAR obejmuje natomiast bardziej złożone mechanizmy, wolniejsze, ale i długofalowe, zapewniające roślinie protekcję przed szerokim spektrum patogennych mikroorganizmów (4). Proces ten odbywa się dzięki wieloetapowej aktywacji szeregu różnych białek, określanym wspólnym mianem białek PR (*pathogenesis-related proteins*) (1,2,6). Częsteczką pełniącą podstawową rolę w indukcji SAR jest kwas salicylowy (SA — *salicylic acid*) (7). SAR wykazuje pewne podobieństwa (zarówno strukturalne jak i funkcjonalne) do elementów odpowiedzi immunologicznej owadów i strunowców (2).

W ciągu kilku ostatnich lat zgromadzono dostatecznie dużo dowodów na to, że SAR nie jest jedynym procesem wywołującym odporność roślin na patogeny. Główną rolę w alternatywnej wobec SAR reakcji odpornościowej, nazwanej dla odróżnienia indukowaną odpornością systemiczną (ISR — *induced systemic resistance*), przypisuje się dwóm niezależnym cząsteczkom sygnałowym. Są to kwas jasmonowy (JA — *jasmonic acid*) i etylen. Produkcja etylenu jest jednym z pierwszych elementów odpowiedzi rośliny na atak



Rys.1. Typy reakcji obronnych roślin (indukowanych przez szeroki zakres czynników stresowych) oraz zależności pomiędzy nimi. Powstające w ramach HR reaktywne formy tlenu pośrednio prowadzą do uruchomienia mechanizmów SAR. Ostatecznym efektem SAR oraz ISR jest aktywacja ekspresji szeregu białek związanych z patogenezą (PR).

patogena (8). ISR pojawia się np. na skutek inwazji bakterii kolonizujących korzenie roślin (1).

Zależności pomiędzy trzema wymienionymi typami reakcji obronnych roślin przedstawiono na rysunku 1. Prawdopodobnie są one asymetryczne (1); salicylan jest inhibitorem nie tylko syntezy jasmonianu i etylenu, ale i szlaków przekaźników indukowanych przez te związki (z wyjątkiem ryżu, w którym analog SA powoduje nawet wzrost poziomu ekspresji genów indukowanych przez JA (7)), natomiast, jak pokazano na przykładzie niewrażliwych na etylen mutantów *Arabidopsis thaliana*, etylen nie wpływa na przebieg SAR czy reakcję typu „gen na gen” (8). Etylen i jasmonian indukują się wzajemnie na poziomie biosyntezy (1) i współdziałają ze sobą w tworzeniu odpowiedzi obronnej. Pokazano to m.in. na przykładzie jednoczesnej aktywacji genu defensyny PDF1.2 w *Arabidopsis* w wyniku ataku patogena. W aktywacji PDF1.2 biorą udział elementy sygnałowe indukowane zarówno przez etylen (EIN2), jak i jasmonian (CO11) (9).

Niektórzy autorzy wprowadzają rozróżnienie białek PR na kwaśne, podlegające indukcji przez salicylan czy reaktywne formy tlenu, oraz białka zasadowe indukowane przez etylen i jasmonian (zwłaszcza jego formę metylowaną) (6). Takie rozgraniczenie, jak się wydaje, jest jednak nie w pełni uprawnionym uproszczeniem, zważywszy, że ciągle odkrywane są kolejne białka związane z patogenezą, o różnych właściwościach chemicznych, a ich funkcje oraz zależności od konkretnych cząstek regulatorowych, nadal czekają na wyjaśnienie.

Pierwsze doniesienia o wzmożonej ekspresji etylenu w tkankach rośliny po infekcji wirusowej pochodzą już z przełomu lat sześćdziesiątych i siedem-

dziesiątych. Prawdziwy jednak rozkwit badań związku tej niewielkiej molekuly z mechanizmami obronnymi roślin zaczął się kilka lat temu i nadal w literaturze pojawia się wiele nowych pozycji na ten temat.

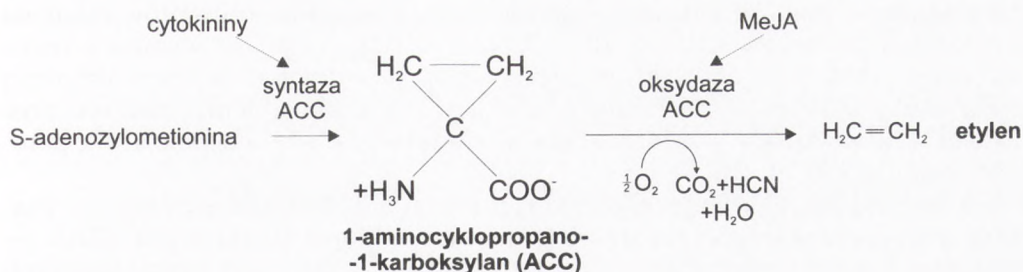
Etylen jest niezwykle wszechstronnym sygnałem; pełni regulatorową rolę w wielu fundamentalnych procesach zachodzących w roślinie w trakcie jej rozwoju, takich jak kiełkowanie nasion, wydłużanie komórek, determinacja płci, dojrzewanie owoców, starzenie czy opadanie liści i wreszcie indukcja odpowiedzi na biotyczne i abiotyczne czynniki stresowe (10-12). Najpowszechniej przytaczanym w literaturze zespołem symptomów wywoływanych przez etylen jest syndrom tzw. potrójnej odpowiedzi (*triple response*), obserwowany w etiolowanych siewkach wielu roślin, np. *Arabidopsis thaliana*. Jego bardzo charakterystycznymi objawami są drastyczne zahamowanie wzrostu, okrągłe wybrzuszenie w obrębie hipokotyłu oraz przesadne skrócenie wierzchołka pędu (10,11,13). Procesy rozwojowe rośliny i reakcje obronne na ogół regulowane są przez etylen niezależnie, ale bywa i tak, że są ze sobą pośrednio powiązane. Banalnym przykładem jest tu fakt, że etylen powoduje wzrost poziomu enzymów biorących udział w lignifikacji ścian komórkowych (peroksydazy, liazy), a grubsze i twardsze ściany stanowią pewniejszą barierę chroniącą środowisko wewnątrzkomórkowe od zewnętrznego, obfitującego w patogeny i wiele innych czynników stresowych (14).

Ten najprostszy z hormonów roślinnych jest indukowany przez zranienie, zalanie, stres anaerobowy, obecność w środowisku jonów metali ciężkich, patogenów, procesy rozwojowe rośliny, a także obecność egzogennych auksyn i egzogenego etylenu (indukcja zgodna z zasadą pozytywnego sprzężenia zwrotnego) (2,13). Znanym inhibitorem etylenu są natomiast jony srebra (13). Regulatorowa rola etylenu jest niepodważalna, nie jest on jednak, mimo tak licznych funkcji, niezbędny roślinie do życia.

Etylen indukuje syntezę wielu enzymów (w tym wielu klas białek PR), takich jak białka przeciwgrzybowe (PR-1), β -1,3-glukanazy (PR-2), chitynazy (PR-3), osmotyny (PR-5), liazy, celulazy, peroksydazy (PR-9), syntazy chalkonowe, glikoproteiny, a także enzymy własnej biosyntezy oraz geny białek związanych z dojrzewaniem (8,11,12).

Prawidłowy przebieg wielu, często niezależnych od siebie, procesów indukowanych przez etylen zapewniają mechanizmy precyzyjnej regulacji zarówno syntezy, jak i percepcji tego hormonu.

Ścisłej kontroli poddany jest szlak biosyntezy etylenu, a zwłaszcza jego dwa główne enzymy; syntaza i oksydaza kwasu 1-aminocyklopropano-1-karboxylogowego (ang. *1-aminocyclopropane-1-carboxylate*, w skrócie ACC) (2,13,15). Na rysunku 2 widać, że prekursorem etylenu jest S-adenozylometionina, która jest przekształcana przez syntazę ACC w kwas aminocyklopropanokarboxylogowy (ACC). Etylen powstaje bezpośrednio z ACC, przy udziale oksydazy ACC (15). Produkcja syntazy ACC (w skrócie ACS), stanowiącej pierwszy limitujący czynnik na drodze biosyntezy etylenu, jest w różnych organizmach indukowana przez auksyny (IAA), niski poziom cytokinin, czynniki stresowe, takie jak zranienie, zalanie, temperaturę, ozon, jony miedzi, patogeny, a także, choć nie zawsze, przez sam etylen (13,14,16). Przykładowo, w kiełkach



Rys. 2. Biosynteza etylenu. Strzałkami ukośnymi zaznaczono działanie inhibitorów enzymów (dla syntazy ACC są nimi cytokininy, a dla oksydazy ACC metylowana forma kwasu jasmonowego).

grochu *Pisum sativum* wykryto hamujący efekt etylenu na biosyntezę ACS (negatywne sprzężenie zwrotne) (16). Oksydaza ACC (w skrócie ACO) jest regulowana również przez etylen, zranienie, suszę, jony NaCl, jony miedzi i żelaza, światło, a także procesy rozwojowe roślin i mikroorganizmy patogeniczne (13,17). Stwierdzono stymulację produkcji etylenu poprzez indukcję syntezy enzymów ACS i ACO w wyniku systemicznej infekcji tytoniu *Nicotiana tabacum* wirusem mozaiki ogórka CMV-Y, najwyższą w zielonych częściach objętych chlorozą liści (18). Rytmiczną produkcję etylenu skorelowaną z rytmicznym zwiększeniem poziomu transkryptów mRNA ACC zaobserwowano w *Sorghum bicolor* podczas wzrostu w podczerwieni lub w warunkach symulowanego zacielenia (17). Inhibitorem ACO jest metylowany kwas jasmonowy (13).

Drugim poziomem regulacji etylenu jest szlak jego transdukcji, od receptorów błonowych do aktywacji odpowiednich genów. Zdecydowana większość spośród składników tego nie do końca jeszcze poznanego szlaku jest indukowana przez etylen (13).

Pierwszy element szlaku, jak pokazano na rysunku 3, stanowi grupa receptorów etylenu, do których należą białka ETR, ERS i EIN4, o funkcji kinaz histydynowych (10,11,13,19). Receptory te wykazują bardzo wysokie powinowactwo do etylenu, czego dowodem jest efektywne działanie tego hormonu nawet w nanomolarnych stężeniach. Wykazano, że czynnikiem podwyższającym to powinowactwo jest obecność jonu miedzi Cu (II) zasocjowanego z domeną receptora wiążącą etylen (20,21). Co ciekawsze w podobną interakcję z receptorami wchodzi także jony srebra Ag (I), znane z inhibicji odpowiedzi na etylen. Być może jon srebra wiąże się z receptorem w taki sposób, że ułatwia jego interakcję z etylenem, ale jednocześnie uniemożliwia pewne zmiany konformacyjne tego receptora, a w konsekwencji przekaz sygnału (13,20).

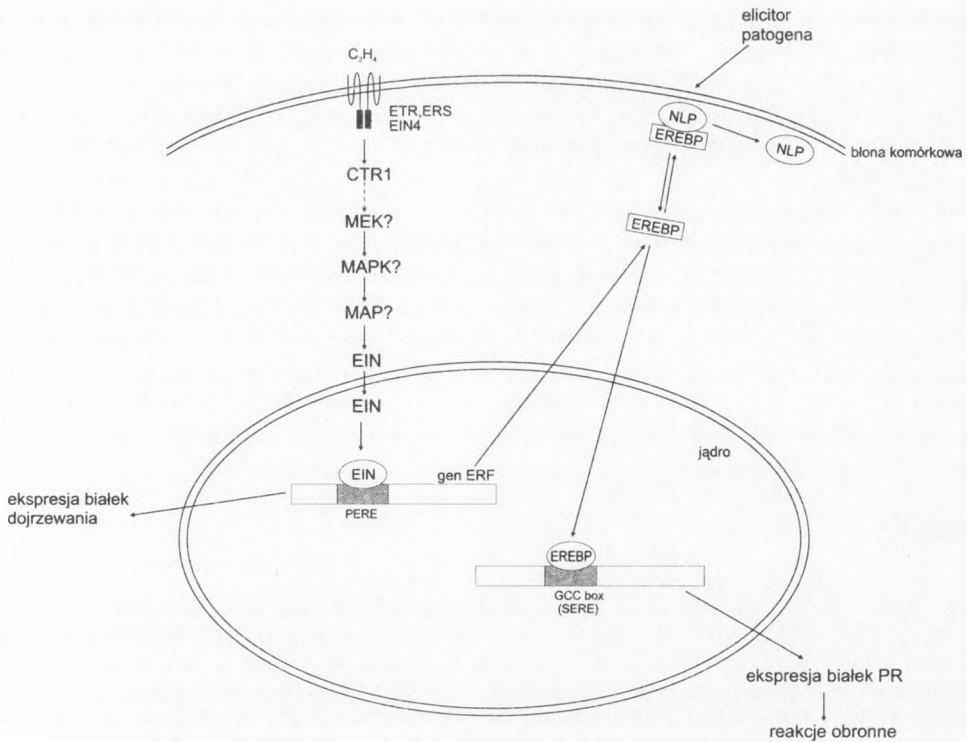
Kolejnym ogniwem łańcucha jest białko CTR1 (nazwa od mutantów wykazujących konstytutywnie objawy potrójnej odpowiedzi; ang. *constitutive triple response*), również będące kinazą białkową, która przypuszczalnie poprzez kaskadę fosforylacji kinaz podobnych do MEK i MAP, przekazuje zwię-

lokrotniony sygnał na jądrowe białka EIN (nazwanych od mutantów *ethylene insensitive*) zwane też białkami EIL (*EIN-like*). CTR1, reagujące również z regulatorową cząsteczką ARR (*Arabidopsis response regulator*), w swej aktywnej formie inhibuje dalszą część szlaku. Dopiero związanie etylenu przez receptor i idące za tym zmiany konformacyjne dezaktywują CTR1, co umożliwia przekaz sygnału (10,11,13).

W nukleoplazmie rolę przekaźników przejmują czynniki transkrypcyjne, wiążące się już dalej bezpośrednio z elementami odpowiedzi na etylen (ERE — *ethylene response elements*), obecnymi głównie w rejonach promotorowych genów indukowanych przez etylen. Przekażniki te zawdzięczają swej funkcji nazwę EREBPs (*ethylene response element binding proteins*) (10-13,19,22). Ekspresja niektórych z nich jest pobudzana przez etylen, egzogeny czynnik uwalniający etylen (13), a także przez sam etylen, natomiast hamowana przez kwas abscyzynowy (12). Przestrzenne rozmieszczenie tych białek odbywa się jednak prawdopodobnie w sposób niezależny od etylenu (12).

W obrębie promotorów wielu genów indukowanych przez etylen, np. promotora osmotyny (22) znajdują się zgodne sekwencje o długości 7-11 par zasad; (TAAG)AGCCGCC, zwane *GCC box*. Za pomocą analiz mutantów wykazano, że obecność regionu *GCC box* jest wymagana do aktywacji wielu, głównie zasadowych, białek PR w odpowiedzi na etylen (13,22). EREBPs wiążą się specyficznie z rejonami *GCC box* poprzez konserwatywną, 59-aminokwasową domenę o charakterze zasadowym (4,13,22). Przykładami białek posiadających podobną domenę wiążącą się z DNA są Pti4/5/6 z pomidora oraz AtEBP, TINY, AP2, ANT i CBF1 z *Arabidopsis* (22). AtEBP jest białkiem asocjującym z *GCC box* promotora genu kodującego białko PR-1b. W genie osmotyny (należącej do klasy PR-5) znaleziono dwie sekwencje *GCC box*, których obecność jest wymagana do reakcji indukowanych przez etylen. Wiążą się z nimi EREBP2 i EREBP3, które wchodzi też w interakcję z białkiem NLP (*nitrilase-like protein*), podobnym do nitylazy — enzymu biorącego udział w biosyntezie auksyn. Ponieważ NLP jest luźno związane z plazmalemą, prawdopodobnie przekaz sygnału odbywa się poprzez dysocjację kompleksu NLP-EREBPs, co w konsekwencji umożliwia translokację EREBPs do jądra komórkowego i tam wiązanie się ich z DNA (22). W niektórych pracach (19) podkreśla się istnienie dwustopniowego etapu transdukcji sygnału w obrębie jądra komórkowego. Zgodnie z tymi doniesieniami białka EIN wiążą się bezpośrednio z tzw. PERE (*primary ethylene response element*) na promotorze ERF1 (*ethylene response factor*), jednego z EREBPs. Pobudzona dzięki temu ekspresja ERF jest bezpośrednim sygnałem do ekspresji białek przyspieszających dojrzewanie, natomiast do wywołania reakcji obronnej (czyli ekspresji białek typu PR) konieczna jest interakcja ERF z rejonem *GCC DNA*, nazwanym w tym przypadku SERE (*secondary ethylene response element*) (19). Złożona hierarchia czynników pośredniczących w transdukcji powoduje zwielokrotnienie przekazywanego sygnału.

Proces transdukcji etylenu wymaga jeszcze wielu wyjaśnień. Badania roli tego związku nie należą do łatwych, przede wszystkim ze względu na jego szeroki zakres działania. Najpowszechniejszą metodą badań w tej dziedzinie



Rys. 3. Hipotetyczny model transdukcji sygnału wywołanego przez etylen. Pomiedzy białkiem CTR1 a kolejnymi przekaźnikami jest strzałka przerywana, co podkreśla negatywną kontrolę CTR1 nad dalszymi etapami transdukcji. Szczegółowy opis w tekście (na podstawie 10,11,13,19 i 22).

jest analiza właściwie wyselekcjonowanych mutantów, defektywnych tylko w jednym genie (8,9).

Największy problem tkwi w tym, że wśród badaczy brak jest jednomyślności co do ostatecznej funkcji etylenu w mechanizmach obronnych; wątpliwość czy zwiększa on odporność roślin na choroby czy też wzmacnia ich wrażliwość wciąż nie jest rozwiązana (13). Obserwowany efekt zależy bowiem w dużej mierze od wybranej rośliny modelowej oraz od konkretnego patogena. Nawet ta sama roślina może wykazywać odmienne reakcje w odpowiedzi na różne patogeny. Mutanty soi o minimalnej wrażliwości na etylen charakteryzują się łagodniejszymi symptomami chorobowymi wywołanymi przez *Pseudomonas syringae* czy *Phytophthora sojae*, natomiast *Septoria glycines* i *Rhizoctonia solani* powodują u nich znacznie ostrzejszy przebieg choroby niż w szczepie dzikim (8). Z kolei niedojrzewające mutanty pomidora (*Never ripe*) wykazują wyższą tolerancję wobec *Xanthomonas campestris* i *Fusarium oxysporum*, natomiast w niewrażliwej na etylen odmianie tytoniu objawy chorobotwórcze wywołuje *Pythium sylvaticum*, grzyb niepatogeniczny dla odmian niezmutowanych (8). Jednym z najbardziej interesujących doniesień w tej

kwestii jest to, że niektóre mikroorganizmy wchodzące w interakcje z roślinami same produkują etylen (np. *Pseudomonas syringae*) lub analogi bądź etylenu, bądź też innych cząsteczek sygnałowych, np. koronatyne — analog jasmonianu (7). Ponieważ mało prawdopodobne jest, aby patogen „samobójczo” wspomagał mechanizmy obronne roślin, wydaje się, że wykorzystuje on raczej możliwości zwiększenia podatności swego gospodarza na infekcję.

Przeprowadzając eksperymenty *in vivo* narażamy się często na obserwowanie efektów plejotropowych, współistnienia wielu pojedynczych procesów regulowanych przez ten sam czynnik i powiązanych ze sobą subtelnymi zależnościami. Szczególnie łatwo o to w przypadku etylenu uwikłanego w tak wiele procesów, od regulacji rozwoju rośliny poprzez wpływ na formowanie brodawek korzeniowych (np. determinacja typu brodawki (23)) w ramach interakcji z bakteriami symbiotycznymi, aż do szeroko pojętych reakcji obronnych indukowanych przez biotyczne i abiotyczne czynniki stresowe.

Literatura

1. Dong X., (1998), *Curr. Opin. Plant Biol.*, 1, 316-323.
2. Molina A., Hunt M. D., Ryals J. A., (1998), *The Plant Cell*, 10, 1903-1914.
3. Tang X., Xie M., Kim Y. J., Zhou J., Klessig D., Martin G. B., (1999), *The Plant Cell*, 11, 15-29.
4. Shah J., Kachroo P., Klessig D., (1999), *The Plant Cell*, 11, 191-206.
5. Keller H., Pamboukdjian N., Ponchet M., Poupet A., Delon R., Verrier J., Roby D., Ricci P., (1999), *The Plant Cell*, 11, 223-235.
6. Kitajima S., Sato F., (1999), *J. Biochem.*, 125, 1-8.
7. Reymond P., Farmer E. E., (1998), *Curr. Opin. Plant Biol.*, 1, 404-411.
8. Hoffman T., Schmidt J. S., Zheng X., Bent A. F., (1999), *Plant Physiol.*, 119, 935-949.
9. Penninckx I., Thomma B., Buchala A., Metraux J., Broekaert W., (1998), *The Plant Cell*, 10, 2103-2113.
10. Solano R., Ecker J. (1998), *Curr. Opin. Plant Biol.*, 1, 393-398.
11. Kieber J. J., (1997), *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 48, 277-296.
12. Leubner-Metzger G., Petruzzelli L., Waldvogel R., Vogeli-Lange R., Meins F. Jr, (1998), *Plant Mol. Biol.*, 38, 785-795.
13. Johnson P. R., Ecker J. R., (1998), *Annu. Rev. Genet.*, 32, 227-254.
14. Sitbon F., Hennion S., Little A., Sundberg B., (1999), *Plant Science*, 141, 165-173.
15. Mita S., Kawamura S., Yawamaki K., Nakamura K., Hyodo H., (1998), *Plant Cell Physiol.*, 39 (11), 1209-1217.
16. Peck S. C., Kende H., (1998), *Plant Mol. Biol.*, 38, 977-982.
17. Finlayson S. A., Lee I., Mullet J. E., Morgan P. W., (1999), *Plant Physiol.*, 119, 1083-1089.
18. Chaundry Z., Yoshioka T., Satoh S., Hase S., Ehara Y., (1998), *Plant Science*, 131, 123-130.
19. Solano R., Stepanova A., Chao Q., Ecker J. R., (1998), *Gen. & Dev.*, 12, 3703-3714.
20. Rodriguez F., Esch J., Hall A., Binder B., Schaller G., Bleecker A., (1999), *Science*, 283, 996-997.
21. Yun H., Yi S., Yu S., Choi D., (1999), *J. Plant Physiol.*, 154, 327-333.
22. Xu P., Narasimhan L., Samson T., Coca M., Huh G., Zhou J., Martin G., Hasegawa P., Bressan R., (1998), *Plant Physiol.*, 118, 867-874.
23. Fernandez-Lopez M., Goormachtig S., Gao M., Haeze W., van Montez M., Holsters M., (1998), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 12724-12728.

Ethylene and Plant Defense Response

Summary

The simplest plant growth and development hormone, ethylene, belongs (together with SA and JA) to key molecules governing the plant defense response. Production of ethylene is stimulated by wounding, flooding, metal ions, senescence and abscission processes, pathogene attack and ethylene itself. High level of ethylene induces the expression of many classes of pathogenesis-related proteins (PR). In order to properly function, ethylene must be precisely regulated, especially at the biosynthesis and signalling pathways. Two main enzymes involved in ethylene biosynthesis are ACC synthase and ACC oxidase. The ethylene signal transduction pathway is very complicated and needs to be further investigated. Ethylene binds to its receptors ETRs, then the signal is transduced to CTR1 and through phosphorylating kinases cascades to EINs and EREBPs, directly binding to DNA GCC boxes. As a consequence, many PR proteins are activated.

Key words:

SAR, ISR, ethylene, SA, JA, pathogenesis, PR-proteins, signal transduction.

Adres do korespondencji:

Luiza Handschuh, Instytut Chemii Bioorganicznej PAN, ul. Noskowskiego 12/14, 71-704 Poznań, e-mail: luizahan@rose.man.poznan.pl