

Joanna Troczyńska

Akademia Techniczno-Rolnicza w Bydgoszczy, Wydział Rolniczy, Katedra Fizjologii Roślin

System mirozynaza – glukozynolany — charakterystyka i funkcje w roślinie

System myrosinase – glucosinolates — its character and functions in plant

Słowa kluczowe: mirozynaza, glukozynolany, *Brassicaceae*, system obronny

Glukozynolany są metabolitami wtórnymi występującymi powszechnie u *Brassicaceae* (Fahey i in. 2001). Łącznie z rozkładającym je enzymem mirozynazą (β -tioglukozydaza EC 3.2.3.1) stanowią dwuskładnikowy system obronny roślin przeciwko patogenom i roślinożercom (Rask i in. 2000). Glukozynolany mogą być także dla rośliny źródłem C, N i S oraz prekursorem hormonu roślinnego kwasu indolilo-3-octowego (Clossais-Besnard i Larher 1991, Normanly i Bartel 1999, Rask i in. 2000). Niniejsza praca opisuje obecny stan wiedzy dotyczący biosyntezy i rozkładu glukozynolanów uwzględniając geny zaangażowane w te procesy i ich regulację, fizjologiczne funkcje systemu mirozynaza-glukozynolany oraz kompartmentację składników układu w roślinie.

Key words: myrosinase, glucosinolates, *Brassicaceae*, defensive system

Glucosinolates, secondary metabolites commonly occurring in plants of *Brassicaceae*, together with the enzyme myrosinase, constitute a two-component defensive system against pathogens and pests (Krzymański 1995, Rask et al. 2000, Fahey et al. 2001). In intact plant, the enzyme is stored separately from glucosinolates. Upon tissue disruption, for example by pests, glucosinolates are degraded and toxic compounds such as thiocyanates, isothiocyanates, nitriles, epithionitriles are released. A large number of glucosinolates occurring in plant and multiple isoforms of myrosinase indicate that these compounds are necessary for plant development (Thangstad et al. 1993, Rask et al. 2000). Glucosinolates may be a source of C, N and S and serve as precursors for plant hormone indole-3-acetic acid (Clossais-Besnard and Larher 1991, Normanly and Bartel 1999, Rask et al. 2000). Glucosinolate degradation products have antinutritional as well as protective (cancer-preventing) effects in higher animals and human. This paper describes current knowledge on biosynthesis and degradation of glucosinolates considering genes involved in these processes and their regulation, physiological functions of myrosinase – glucosinolates system and the compartmentation of these components in plant.

Glukozynolany są metabolitami wtórnymi występującymi powszechnie u *Brassicaceae* oraz w rodzinach pokrewnych (Fahey i in. 2001). Łącznie z rozkładającym je enzymem mirozynazą stanowią dwuskładnikowy system obronny roślin przeciwko patogenom i szkodnikom (Rask i in. 2000). Ponadto produkty hydrolizy glukozynolanów pełnią szereg ważnych funkcji fizjologicznych.

Biosynteza glukozynolanów

Glukozynolany w roślinie syntetyzowane są z aminokwasów: metioniny, alaniny, waliny, leucyny, izoleucyny (alifatyczne), tyrozyny i fenyloalaniny (aromatyczne), tryptofanu (indolowe).

Proponowana droga biosyntezy glukozynolanów obejmuje oksydacyjną dekarboksylację aminokwasu do odpowiedniego aldoksydu, konwersję oksydu do struktury glukozynolanu oraz wtórne modyfikacje powstałej cząsteczki glukozynolanu (Wittstock i Halkier 2002). Na szlaku tych przemian zidentyfikowano następujące związki pośrednie: N-hydroksyaminokwas, aldoksyd, kwas tiohydroksymowy i desulfoglukozynolan.

Biosyntezę niektórych glukozynolanów poprzedza cykl reakcji prowadzących do przedłużenia łańcucha bocznego aminokwasów (Wittstock i Halkier 2002). Zapoczątkowuje je deaminacja aminokwasu do odpowiedniego ketokwasu, po czym następuje przyłączenie acylu z acetylo-CoA. Następnie w wyniku izomeryzacji i oksydacyjnej dekarboksylacji powstaje ketokwas o łańcuchu dłuższym o jeden atom węgla. Ten ostatni związek może ulec transaminacji bądź przejść kolejne cykle wydłużania.

Pierwszy etap biosyntezy glukozynolanów, konwersja aminokwasów oraz ich homologów do aldoksydu, katalizowana jest przez monooksygenazy cytochromu P450. W genomie rzodkiewnika (*Arabidopsis thaliana* L.) wykryto siedem funkcjonalnych genów kodujących białka enzymatyczne P450 oznaczone CYP79 (CYP79A2, CYP79B2, CYP79B3, CYP79C1, CYP79C2, CYP79F1, CYP79F2), z których pięć zostało scharakteryzowanych. CYP79A2 katalizuje konwersję fenyloalaniny (Wittstock i Halkier 2000). CYP79B2 i CYP79B3 przekształcają tryptofan do indolilo-3-acetaldoxymu (IAOX), związku uczestniczącego także w biosyntezie kwasu indolilo-3-octowego (Mikkelsen i in. 2000, Hull i in. 2000). Analogiczną reakcję u gorczycy kontroluje gen CYP79B1 (Naur i in. 2003). CYP79F1 i CYP79F2 metabolizują pochodne metioniny, przy czym CYP79F1 przekształca homologi metioniny mające zarówno krótki jak i długi łańcuch węglowy, aktywność drugiego ograniczona jest do pentahomo- i heksahomometioniny (Hansen i in. 2001, Reintanz i in. 2001).

U *A. thaliana* zidentyfikowano również dwa białka należące do innej rodziny cytochromów P450 (CYP83A1, CYP83B1), które katalizują kolejną reakcję na szlaku syntezy glukozynolanów — oksydację aldoksydu do związku acinitrowego (Bak i Feyereisen 2001). Związek ten po przyłączeniu grupy tiolowej pochodzącej z cysteiny lub metioniny przekształcony zostaje w S-alkilowany kwas tiohydroksymowy, który prawdopodobnie dalej rozkładany jest przez C-S wiąże do kwasu tiohydroksymowego (Wittstock i Halkier 2002, Mikkelsen i in. 2002). W wyniku końcowych reakcji przeniesienia glukozy i reszty kwasu siarkowego, katalizowanych odpowiednio przez S-glukozylotransferazę i sulfotransferazę, powstaje cząsteczka glukozynolanu.

U linii rzepaku (*Brassica napus*) syntetycznego (powstałego w wyniku krzyżowania oddalonego) i rzodkiewnika zidentyfikowano *loci* alleli kontrolujących elongację łańcucha węglowego metioniny podczas biosyntezy glukozynolanów alifatycznych (Magrath i in. 1994, Mithen i Campos 1996, Wittstock i Halkier 2002). Wśród nich allele znajdujące się w *locus* *GSL-PRO* warunkują zawartość glukozynolanów propylowych rzepaku, natomiast za biosyntezę glukozynolanów butylowych i pentylowych odpowiedzialne są allele w dwóch innych *loci* (*GSL-ELONG-C* i *GSL-ELONG-A*). U rzodkiewnika w *locus* *GSL-ELONG* zlokalizowano allele dwóch genów kodujących białka podobne do rodziny syntaz izopropylgłabczanowych odpowiedzialnych za wydłużenie łańcuchów węglowych.

W ostatnim etapie biosyntezy, cząsteczki glukozynolanów mogą ulegać modyfikacjom, takim jak: oksydacja grupy tiolowej, hydroksylacja, metoksylacja, tworzenie wiązań podwójnych, glikozylacja, estryfikacja. Przemiany te decydują o właściwościach fizykochemicznych tych związków i aktywności biologicznej produktów ich rozkładu (Wittstock i Halkier 2002). W oparciu o wyniki badań genetycznych zaproponowano model modyfikacji łańcucha węglowego glukozynolanów alifatycznych, według którego allele *locus* *GSL-OXID* odpowiedzialne są za oksydację glukozynolanów metylo- do metylosulfinylalkanowych, allele *locus* *GSL-ALK* kontrolują usunięcie reszty metylosulfinylowej i powstanie glukozynolanów alkenowych oraz allele *locus* *GSL-OH* determinują hydroksylację glukozynolanu butenylowego (Giamoustaris i Mithen 1996). Dodatkowo u rzodkiewnika zidentyfikowano *locus* *GSL-OHP*, którego allele regulują tworzenie glukozynolanu hydroksypropylowego z metylosulfinylpropylowego (Mithen i Campos 1996). U *Arabidopsis* w regionie, gdzie znajdują się *loci* *GSL-OHP* i *GSL-ALK* zlokalizowano rodzinę genów kodujących dioksygenazy zależne od 2-oksoglutaranu (*AOP1*, *AOP2*, *AOP3*) (Kliebenstein i in. 2001). Heterologiczna ekspresja tych genów u *E. coli* wykazała, że enzymy *AOP2* i *AOP3* katalizują odpowiednio, powstanie glukozynolanów alkenowych lub hydroksyalkanowych, funkcja katalityczna genu *AOP1* nie została wyjaśniona.

Występowanie oraz skład jakościowy i ilościowy glukozynolanów

Liczba zidentyfikowanych glukozynolanów wynosi około 120 (Fahey i in. 2001). Dużą różnorodnością pod względem tej cechy charakteryzują się rośliny należące do kapustnych. Przykładem może być rzodkiewnik, u którego wykryto ponad 30 różnych glukozynolanów, jak też gatunki należące do rodzaju *Brassica* (Sorensen 1988, Kliebeinstein i in. 2001, Brown i in. 2003).

Skład jakościowy i ilościowy glukozynolanów zależy od gatunku rośliny, organu i fazy rozwojowej. Najwyższą zawartość stwierdza się w nasionach i młodych siewkach niższą zaś w kwiatostanach, łuszczykach oraz korzeniach i liściach (Drozdowska i Rogozińska 1982, Petersen i in. 2002, Brown i in. 2003). W fazie kwitnienia w organach wegetatywnych obserwuje się spadek zawartości gluko-

zynolanów, przy czym w miarę starzenia ich dominującą formą są glukozynolany indolowe (Clossais-Besnard i Larher 1991, Porter i in. 1991, Brown i in. 2003). Mechanizm regulacji profilu i zawartości glukozynolanów podczas ontogenezy jest nieznan. Przypuszcza się, że decydującą rolę odgrywa aktywność enzymów odpowiedzialnych za biosyntezę glukozynolanów oraz aktywność mirozynyzy (Chen i Andreasson 2001). Dodatkowo, glukozynolany mogą być aktywnie transportowane w roślinie poprzez floem z tkanek donorowych (liście, łuszczyzny) do tkanek akceptorowych (nasiona), a część z nich syntetyzowana jest *in situ* (Chen i Andreasson 2001).

Zawartość glukozynolanów mogą także modyfikować czynniki środowiska oraz cząsteczki sygnałowe związane z reakcjami rośliny na stres biotyczny i abiotyczny (Koritsas i in. 1991, Blake-Kalff i in. 1998, Hosegawa i in. 2000). Zaobserwowano, że kwas jasmonowy, związek towarzyszący zranieniom i infekcjom roślin, powoduje w tkankach rzepaku podwyższenie poziomu glukozynolanów indolowych (Doughty i in. 1995). W związku z tym wysunięto przypuszczenie, że glukozynolany indolowe uczestniczą w reakcjach roślin na uszkodzenie. Wykazano również, że kwas salicylowy, który naturalnie jest syntetyzowany w roślinie w czasie infekcji, może powodować w tkankach rzepaku wzrost poziomu glukonasturtiny, glukozynolanu powstającego z fenyloalaniny (Kiddle i in. 1994).

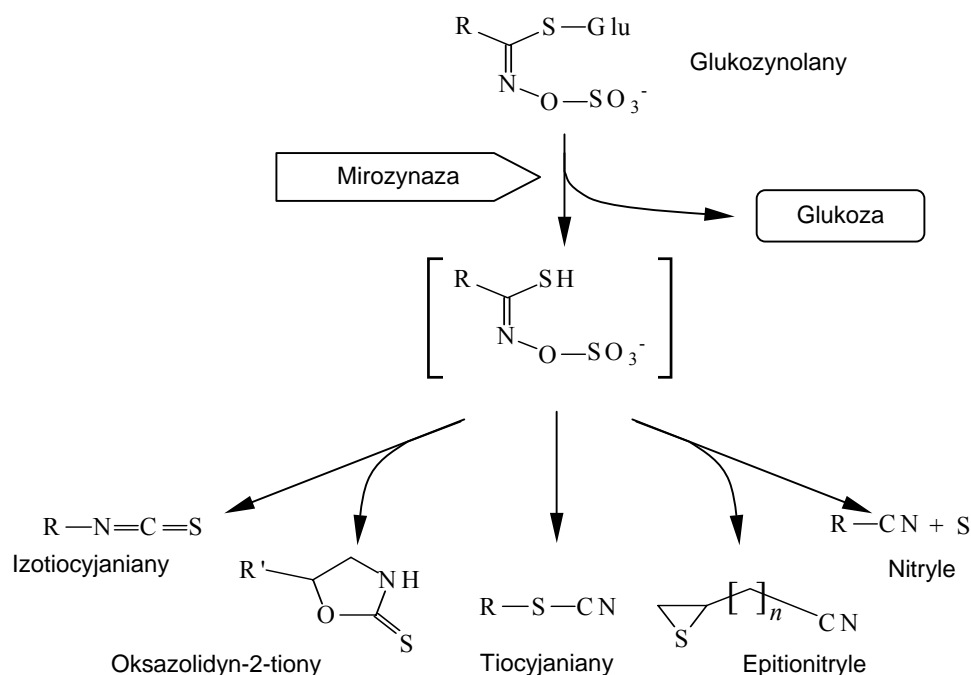
Rozkład glukozynolanów

Mirozynaaza (β -tioglukozydaza EC 3.2.3.1) jest enzymem rozkładającym glukozynolany. W momencie uszkodzenia komórek następuje hydroliza wiązania S-glikozydowego glukozynolanu i uwalnia się D-glukoza, siarczan i aglikon podlegający dalszym nieenzymatycznym przekształceniom. W zależności od rodzaju glukozynolanu i warunków reakcji (pH, obecność białka epitospecyficznego i jonów Fe^{+2}) mogą powstawać różne produkty rozkładu, wśród których wyróżnia się: tiocyjaniany, izotiocyjaniany, nityle, epitionityle (rys. 1).

Obecność mirozynyzy stwierdzono u wszystkich roślin zawierających glukozynolany z wyjątkiem rośliny *Koeberlinia spinosa*, która ma enzym, natomiast nie posiada substratu (Ettlinger i Kjaer 1968). Aktywność mirozynyzy wykazano również u niektórych grzybów, bakterii i owadów (Oginsky i in. 1965, Tani i in. 1974, Pontoppidan i in. 2001, Jones i in. 2001).

Mirozynaaza występuje w tkankach roślin w postaci homodimeru. Burmeister i in. (1997) wyznaczyli przestrzenną strukturę podjednostki mirozynyzy wyizolowanej z nasion gorzycy. Według autorów cząsteczka ma kształt cylindra z licznymi grupami węglowodanowymi na powierzchni, składającego się z ośmiu α helis oraz ośmiu nici β (6,5 kDa/podjednostkę). Dimer stabilizowany jest jonem Zn^{2+} . W obszarze odpowiedzialnym za katalityczne właściwości stwierdzono obecność kieszeni hydrofobowej, prawdopodobnie wiążącej część aglikonową glukozynolanów, reszty argininy mogące oddziaływać z grupą siarczanową substratu oraz glutaminian, który przez wiązanie α -glikozydowe może łączyć się z glukozą.

Reakcja hydrolizy glukozynolanów prawdopodobnie jest dwuetapowa. W pierwszej fazie (glikozylacja), mirozynaza wiąże się kowalencyjnie z resztą glukozy glukozynolanu z jednoczesnym uwolnieniem aglikonu, natomiast w drugim etapie (deglikozylacja), przy udziale cząsteczki wody zachodzi uwolnienie glukozy oraz regeneracja enzymu (Burmeister i in. 1997).



Rys. 1. Rozkład glukozynolanów katalizowany przez mirozynazę i produkty hydrolizy; rodnik (R) (Wittstock i Halkier 2002) — *Degradation of glucosinolates catalyzed by myrosinase and products of hydrolysis; variable side chain (R)* (Wittstock i Halkier 2002)

Podczas izolacji enzymu z tkanek otrzymuje się mieszaninę izoenzymów mirozynazy o masach od 62 do 75 kDa różniących się właściwościami fizykochemicznymi i kinetycznymi (Bones i Rossiter 1996). Optimum ich działania waha się między pH 4 a 7. Oczyszczone izoenzymy z roślin różnią się stopniem glikozylacji, reakcją na wysokie i niskie stężenie kwasu askorbinowego, a także szybkością hydrolizy poszczególnych glukozynolanów (James i Rossiter 1991, Shikita i in. 1999).

Najlepiej poznane izoenzymy mirozynazy zidentyfikowane w nasionach rzepaku, składają się z podjednostek o masie 75, 70 i 65 kDa (Lenman i in. 1993b). Podjednostki o masie 75 kDa tworzą homodimer (140 kDa). Dwa pozostałe izoenzymy (65 i 70 kDa) tworzą heterokompleksy o masie 250–800 kDa z białkami

wiązującymi mirozynazę (Myrosinase Binding Proteins, MBP) i białkiem towarzyszącym mirozynazie (Myrosinase Associated Protein, MyAP) (Lenman i in. 1990, Rask i in. 2000). Przypuszcza się, że białka łącznie z mirozynazą stanowią część systemu obronnego roślin skierowanego przeciwko patogenom.

Mirozynaza u *Brassicaceae* kodowana jest przez rodzinę genów dzielącą się na przynajmniej 3 podrodziny: MA (lub Myr1), MB (lub Myr2) i MC. W genomie rzepaku liczba genów wchodzących w skład podrodzin wynosi około 25 (Falk i in. 1992, 1995; Xue i in. 1992; Lenman i in. 1993b; Thangstad i in. 1993). U gorczycy zidentyfikowano tylko transkrypty należące do podrodziny MA i MB (Xue i in. 1992, Eriksson i in. 2001). Natomiast sekwencji kodujących mirozynazę u rzodkiewnika nie można zaliczyć do żadnej z wymienionych podrodzin (Xue i in. 1995). Do tej pory dokładnie scharakteryzowano sześć genów kodujących mirozynazy przez wyznaczenie ich sekwencji nukleotydowych, dwa funkcjonalne geny — *Myr1* (MA), *Myr2* (MB) i jeden pseudogen (MA) u rzepaku, dwa u rzodkiewnika — *TGG1* i *TGG2* i jeden u rzepiku — *TGG1* (MB) (Lenman i in. 1993a, Thangstad i in. 1993, Xue i in. 1995). Ich organizacja jest konserwatywna z 12 eksonami i 11 intronami (Lenman i in. 1993a, Thangstad i in. 1993, Xue i in. 1995). Dzięki porównaniu sekwencji aminokwasowych i nukleotydowych ustalono, iż u rzepaku mirozynazy o masie 75 kDa kodowane są przez geny należące do podrodziny MA, mirozynazy o masie 70 kDa przez geny podrodziny MC, a o masie 65 kDa przez geny podrodziny MB (Lenman i in. 1993b, Falk i in. 1995).

Analiza ekspresji genów mirozynazy wykazała, że u rzepaku, gorczycy i rzodkiewnika ulegają one tkankowo i organowo specyficznej ekspresji pokrywającej się częściowo z miejscami występowania białka (James i Rossiter 1991, Falk i in. 1992, Lenman i in. 1993b, Falk i in. 1995, Xue i in. 1993, 1995). U rzepaku stwierdzono, iż aktywacja genów MA i MC zachodzi tylko w komórkach nasion, podczas gdy geny MB są aktywne przez całą ontogenezę rośliny (Lenman i in. 1993a, b; Falk i in. 1995). Transkrypty MC lokalizowano w całym zarodku, przy czym MA w części osiowej, zaś MB głównie w liścieniach (Falk i in. 1995). Obecność mRNA należących do rodziny MB w dojrzałych roślinach rzepaku wykazano w tkankach liści, łodyg, szypulek kwiatowych, płatków korony, łuszczyn, natomiast brak ich było w korzeniach (Falk i in. 1992, Lenman i in. 1993b). Transkrypty genów *TGG1* i *TGG2* kodujących mirozynazy rzodkiewnika wykryto w komórkach szparkowych, w pojedynczych komórkach mezofilu liści i w elementach kwiatu z wyjątkiem ziaren pyłku i pręcików (Xue i in. 1995). W rozwijających się nasionach oraz łuszczynach obecne były nieliczne komórki z transkryptami genu *TGG1*. Nie stwierdzono natomiast produktów tego genu w komórkach korzeni.

W czasie ontogenezy aktywność mirozynazy zmienia się (Bones 1990). Spośród organów dojrzałych roślin rzepaku najwyższą aktywność enzymu stwierdzono w korzeniach, zwłaszcza w ich górnej części (bliżej szyjki korzeniowej), niższą w liściach, natomiast najniższą w łodydze i kwiatostanach. Wysoką aktyw-

nością mirozyny charakteryzowały się organy siewek rzepaku, spośród których najwyższą odnotowano w hypokotylach. Wysoką aktywność mirozyny stwierdzono również w nasionach gorczycy i rzepaku, zaś niską w nasionach rzodkiewnika (Pihakaski i Pihakaski 1978, Bones 1990, Drozdowska i in. 1992, Andreasson i in. 2001, Petersen i in. 2002).

Wykazano, że na ekspresję genów i aktywność mirozyny mogą wpływać takie czynniki jak: brak niektórych składników pokarmowych w podłożu, światło niebieskie, kwas salicylowy i abscysynowy, a także jasmonian metylu (Taipalensuu i in. 1997, Visvalingam i in. 1998, Blake-Kalff i in. 1998, Hosegawa i in. 2000).

System mirozyna – glukozynolany

Mirozyna występuje głównie w komórkach zwanych komórkami mirozynowymi. Zawierają one specyficzne ciała białkowe zwane ziarnami mirozynowymi o wymiarach od 2,5 do 10 μm , rozmieszczone pomiędzy oleosomami (Bones i Iversen 1985). Podczas różnicowania komórek mirozynowych ziarna prawdopodobnie łączą się ze sobą (Rask i in. 2000). Badania immunofluorescencyjne wykazały, że ziarna mirozynowe w komórkach mirozynowych liścieni zarodka rzepaku tworzą ciągły siateczkowaty system (Andreasson i in. 2001).

W roślinach należących do rodzaju *Brassica* obecność komórek mirozynowych stwierdzono w organach generatywnych i wegetatywnych (Höglund i in. 1991, Drozdowska i in. 1992, Andreasson i in. 2001). U rzepaku komórki zawierające mirozynę pojawiają się około 20 dni po zapyleniu, a ich liczba zwiększa się podczas formowania nasion, osiągając 2–5% wszystkich komórek dojrzałego zarodka (Höglund i in. 1991, Thangstad i in. 2004). Większość z nich zlokalizowana jest w warstwie subepidermalnej liścieni i hypokotyła. W pozostałych organach rzepaku wykryto mirozynę w komórkach szparkowych, w komórkach parenchymy floemu, w ksylemie i w komórkach warstwy korowej korzeni (Höglund i in. 1991, Andreasson i in. 2001). Badania porównujące lokalizację komórek mirozynowych w różnych tkankach rzepaku i rzodkiewnika wykazały, że u tego ostatniego gatunku występują one tylko w parenchymie floemu (Andreasson i in. 2001). W dalszych pracach stwierdzono aktywność promotora genu *TGG1*, również poza komórkami floemu, natomiast był on nieaktywny w korzeniach (Husebye i in. 2002, Thangstad i in. 2004)

Do tej pory dokładnie nie wiadomo, jaka jest w komórce lokalizacja glukozynolanów i mirozyny. Przypuszcza się, że glukozynolany gromadzone są w wakuolach razem z kwasem askorbinowym, który może wpływać na aktywność znajdującej się w cytoplazmie mirozyny (Lüthy i Matile 1984). Nie wyklucza się również, iż składniki systemu znajdują się w różnych komórkach (Rask i in. 2000). Jedynym glukozynolanem, którego lokalizację poznano *in planta* jest sinigrina (glukozynolan alilowy) (Kelly i in. 1998). Obecność mirozyny i substratu stwierdzono w komórkach podobnych do komórek aleuronowych. W komórkach

mirozynazowych wykryto tylko enzym. Badania, wykorzystujące radioaktywnie znakowany prekursor jednego z glukozynolanów, wykazały, że desulfoglukozynolan występuje w komórkach mirozynazowych (Thangstand i in. 2001). Jest to jedna z możliwości bezpiecznej kolokalizacji składników systemu, ponieważ desulfoglukozynolany prawdopodobnie nie są rozkładane przez mirozynazę

Nie wiadomo, w jaki sposób dochodzi do kontaktu między składnikami systemu w nieuszkodzonych tkankach (Chew 1988). U rzodkiewnika wykryto między endodermą a floemem sąsiadujące z komórkami mirozynazowymi grupy komórek zawierających glukozynolany (Karoleva i in. 2000). Przypuszcza się, że glukozynolany mogą być transportowane przez plazmodesmy do komórek mirozynazowych (Andreasson i in. 2001).

Różnice w poziomie ekspresji genów mirozynazy i zróżnicowana zawartość glukozynolanów w organach roślinnych związane są prawdopodobnie z rolą tego układu w procesach różnicowania i dojrzewania tkanek (Lenman i in. 1993b). Sądzi się, iż glukozynolany mogą być dla rośliny źródłem C, N i S (Clossais-Besnard i Larher 1991, Rask i in. 2000). Wskazuje na to gwałtowny spadek zawartości glukozynolanów skorelowany z wysoką aktywnością mirozynazy, np. podczas kiełkowania czy w okresie juwenilnym (Rask i in. 2000). Przypuszczalnie transport floemowy umożliwia szybkie uruchomienie źródła tych substancji odżywczych (Chen i Andreasson 2001). Obecność w wiązkach przewodzących komórek zawierających glukozynolany w sąsiedztwie komórek mirozynazowych może potwierdzać tę hipotezę (Karoleva i in. 2000, Andreasson i in. 2001). Taka lokalizacja elementów systemu może chronić przed patogenami żywiącymi się sokiem floemowym oraz stwarza możliwość koordynowania syntezy związków obronnych w całej roślinie (Chen i Andreasson 2001).

Glukozynolany indolowe u roślin z rodziny *Brassicaceae* prawdopodobnie mogą być także prekursorem fitohormonów (auksyn) (Normanly i Bartel 1999). Podczas ich rozkładu katalizowanego przez mirozynazę powstaje nitryl indolilo-3-octowy, który następnie może być hydrolizowany przez nitrylazę do kwasu indolilo-3-octowego (IAA). Wykazano również, że biosynteza glukozynolanów indolowych i IAA są ze sobą powiązane poprzez udział białek CYP79B2 i CYP79B3 (Mikkelsen i in. 2000, Hull i Celenza 2000). Przypuszcza się, że w warunkach stresowych nasila się synteza glukozynolanów kosztem IAA (Chen i Andreasson 2001).

Stwierdzono również udział systemu w reakcji fototropijnej u rzodkiewki. W części poddanej działaniu światła odnotowano wzrost aktywności mirozynazy i indukcję kodujących ją genów (Yamada i in. 2002). W wyniku hydrolizy glukozynolanu 4-metylotiobutenylowego (glukoerucina) powstaje rafanusanina (Hosegawa i in. 2000). Stwierdzono, że związek ten gromadząc się po stronie oświetlonej hamuje wzrost komórek i indukuje reakcję wygięciową. Aktywność biologiczną glukozynolanów potwierdza również ich hamujący wpływ na kiełkowanie nasion niektórych gatunków roślin (Waligóra i Krzymańska 1993).

Produktom hydrolizy glukozynolanów przypisuje się biologiczną rolę w interakcji między roślinami z innymi organizmami, przy czym efekty wzajemnych oddziaływań są bardzo zróżnicowane. Zazwyczaj gatunki roślin wykazujące wysoką zawartość glukozynolanów nie są atakowane przez szkodniki (Giamoustaris i Mithen 1995, Kliebenstein i in. 2002). Przypuszcza się, że odpowiadają za to powstające podczas hydrolizy izotiocyaniany. Wykazano, że ekotypy *A. thaliana*, u których podczas rozkładu tworzą się nityle i epitionityle są częściej i chętniej atakowane przez polifaga *Trichoplusia ni* (Lambrix i in. 2001). Za ten polimorfizm odpowiada gen kodujący białko epitiospecyficzne u rzodkiewnika, spotykane również u innych roślin krzyżowych (Lambrix i in. 2001). Hydroliza glukozynolanów alkenowych w jego obecności prowadzi do powstania epitionityli, a nie izotiocyanianów. Przypuszcza się, że białko epitiospecyficzne współdziała z mirozynazą w systemie obronnym roślin (Lambrix i in. 2001).

Część szkodników przystosowała się do żerowania na roślinach zawierających glukozynolany (Giamoustaris i Mithen 1995). Adaptacja niekiedy jest tak daleko posunięta, że glukozynolany lub produkty ich rozkładu mogą decydować o wyborze rośliny żywicielskiej i owipozycji (Chew 1988). Dla wielu owadów czynnikiem przywabiającym jest izotiocyanian allilu pochodzący z rozkładu sinigriny (Rask i in. 2000). Wykazano także, że pewna ilość glukozynolanów w diecie warunkuje prawidłowy rozwój szkodników typowych dla roślin kapustnych (Waligóra i in. 1991).

W toku ewolucji fitofagi *Brassicaceae* wykształciły zdolność do zmniejszenia, unieszkodliwiania lub nawet wykorzystania efektów działania systemu mirozynaza – glukozynolany. Jedną z takich cech może być posiadanie własnej mirozynazy konkurującej o substraty z roślinnym enzymem. U mszycy kapuścianej prawdopodobnie katalizuje ona reakcję powstawania mniej szkodliwych produktów rozkładu glukozynolanów, które mogą także pełnić funkcję feromonów alarmowych (Pontoppidan i in. 2001). Z kolei u fitofaga *Plutella xylostella* wykryto obecność sulfatazy biorącej udział w powstaniu desulfoglukozynolanów, niedostępnych dla mirozynazy (Ratzka i in. 2002).

Produkty degradacji glukozynolanów wpływają również negatywnie na bakterie i grzyby atakujące rośliny kapustne (Rask i in. 2000). Niektóre patogeny próbują przezwyciężyć system obronny roślin poprzez detoksykację produktów rozpadu glukozynolanów. Np. u grzyba *Leptosphaeria maculans* stwierdzono aktywność enzymu hydratazy cyjankowej rozkładającej nityle do mniej toksycznego formamidu (Sexton i Howlett 2000).

Pod wpływem patogenów metabolizm glukozynolanów w roślinach może być modyfikowany. Wykazano, iż zakażenie kiłą kapuścianą (*Plasmodiophora brassicae*) powoduje hipertrofię korzeni, której towarzyszy wzrost poziomu auksyn i glukozynolanów indolowych (Ludwig-Möller i in. 1999). Zaobserwowano także,

że wystąpieniu objawów choroby towarzyszy zwiększone stężenie kwasu jasmonowego oraz podwyższona aktywność nitylazy i mirozynazy (Grsic i in. 1999).

Funkcja systemu mirozynaza – glukozynolany w roślinie jak i w ekosystemie jest nie do końca jasna. Dzięki nowoczesnym metodom badawczym poszerzono wiedzę dotyczącą biosyntezy glukozynolanów i rozkładu tych związków. W przyszłości może to zaowocować otrzymaniem roślin o sprofilowanym poziomie glukozynolanów, warunkującym np. wyższą odporność na patogeny. W ostatnich latach wzrosło także zainteresowanie tą grupą związków ze względu na potencjalną możliwość użycia ich w walce z rakiem. Wykazano, iż niektóre produkty hydrolizy glukozynolanów indukują syntezę i zwiększają aktywność zwierzęcych enzymów biorących udział w komórkowych procesach detoksykacji (Talalay i Fahey 2001).

Literatura

- Andreasson E., Jorgensen L.B., Hoeglund A.S., Rask L., Meijer J. 2001. Different myrosinase and idioblast distribution in *Arabidopsis* and *Brassica napus*. *Plant Physiol.*, 127: 1750-1763.
- Bak S., Feyereisen R. 2001. The involvement of two P450 enzymes, CYP83B1 and CYP83A1, in auxin homeostasis and glucosinolate biosynthesis. *Plant Physiol.* 127: 108-118.
- Blake-Kalff M.M., Harrison K.R., Hawkesford M.J., Zhao F.J., McGrath S.P. 1998. Distribution of sulfur within oilseed rape leaves in response of sulfur deficiency during vegetative growth. *Plant Physiol.*, 97: 1337-1344.
- Bones A., Iversen T.H. 1985. Myrosin cells and myrosinase. *Isr. J. Bot.*, 34: 351-375.
- Bones A., Rossiter J. 1996. The myrosinase-glucosinolate system, its organisation and biochemistry. *Physiol. Plantarum*, 97: 194-208.
- Bones A.M. 1990. Distribution of β -thoglucosidase activity in intact plants, cell and tissue cultures and regenerated plants of *Brassica napus* L. *J. Exp. Bot.*, 41:737-744.
- Brown P.D., Tokuhsa J.G., Reichelt M., Gershenzon J. 2003. Variation of glucosinolate accumulation among different organs and developmental stages of *Arabidopsis thaliana*. *Phytochem.*, 62: 471-481.
- Burmeister W.P., Cottaz S., Driguez H., Iori R., Palmieri S., Henrissat B. 1997. The crystal structures of *Sinapis alba* myrosinase and a covalent glycosyl-enzyme intermediate provide insights into the substrate recognition and active-site machinery of an S-glycosidase. *Structure*, 5: 663-675.
- Chen S., Andreasson E. 2001. Update on glucosinolate metabolism and transport. *Plant Physiol. Bioch.*, 39: 743-758.
- Chew F.S. 1988. Biological effects of glucosinolates. *Biologically Active Natural Products ACS*, Washington DC, 155-181.
- Clossais-Besnard N., Larher F. 1991. Physiological role of glucosinolates in *Brassica napus*. Concentration and distribution pattern of glucosinolates among plant organs during complete life cycle. *J. Sci. Food Agric.*, 56: 25-38.
- Doughty K.J., Kiddle G.A., Morton A.M., Pye B.J., Wallsgrove R.M., Pickett J.A. 1995. Selective induction of glucosinolates in oilseed rape leaves by methyl jasmonate. *Phytochem.*, 38: 347-350.
- Drozdowska L., Rogozińska J. 1982. The occurrence of glucosinolates during the flowering and maturation of oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Acta Agrobot.*, 35: 25-29.

- Drozdowska L., Thangstad O.P., Beisvaag T., Evje K., Bones A.M., Iversen T.H. 1992. Myrosinase and myrosin cell development during embryogenesis and seed maturation. *Isr. J. Bot.*, 41: 213-223.
- Eriksson S., Ekbom B., Xue J., Rask L., Meijer J. 2001. Identification and characterization of soluble and insoluble myrosinases in different organs of *Sinapis alba*. *Physiol. Plant.*, 111: 353-364.
- Ettlinger M.G., Kjaer A. 1968. Sulfur compounds in plants. *Rec. Adv. Phytochem.*, 1: 59-144.
- Fahey J.W., Zalcman, A.T., Talalay P. 2001. The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants. *Phytochem.*, 56: 5-51.
- Falk A., Ek B., Rask L. 1995. Characterization of a new myrosinase in *Brassica napus*. *Plant Mol. Biol.*, 27: 863-874.
- Falk A., Xue J., Lenman M., Rask L. 1992. Sequence of a cDNA clone encoding the enzyme myrosinase and expression of myrosinase in different tissue of *Brassica napus*. *Plant. Sci.*, 83: 181-186.
- Giamoustaris A., Mithen R. 1995. The effect of modifying the glucosinolate content of leaves on oilseed rape (*Brassica napus* ssp. *oleifera*) on its interaction with specialist and generalist pests. *Ann. Appl. Biol.*, 126: 347-363.
- Giamoustaris A., Mithen R. 1996. Genetics of aliphatic glucosinolates. IV. Side-chain modification in *Brassica oleracea*. *Theor. Appl. Genet.*, 93: 1006-1010.
- Grsic S., Kirchheim B., Pieper K., Fritsch M., Hilgenberg W., Ludwig-Müller J. 1999. Induction of auxin biosynthetic enzymes by jasmonic acid and in clubroot diseased Chinese cabbage plants. *Physiol. Plant.*, 105: 521-531.
- Hansen C.H., Wittstock U., Olsen C.K., Hick A.J., Pickett J.A., Halkier B.A. 2001. Cytochrome P450 CYP79F1 from *Arabidopsis* catalyzes the conversion of dihomomethionine and trihomomethionine to the corresponding aldoximes in the biosynthesis of alifatic glucosinolates. *J. Biol. Chem.*, 276: 11078-11085.
- Höglund A.S., Lenman M., Rask L., Rask A. 1991. Distribution of myrosinase in rapeseed tissues. *Plant Physiol.*, 95: 213-221.
- Hosegawa T., Yamada K., Kosemura S., Yamamura S., Hasegawa K. 2000. Phototropic stimulation induces the conversion of glucosinolate to phototropism-regulating substances of radish hypocotyls. *Phytochem.*, 54: 275-279.
- Hull A.K., Vij R., Celenza J.L. 2000. *Arabidopsis* cytochrome P450s that catalyze the first step of tryptophan-dependent indole-3-acetic acid biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 97: 2379-2384.
- Husebye H., Chadchawan S., Winge P., Thanstad O.P., Bones A.M. 2002. Guard cell and phloem idioblast-specific expression of thioglucoside glucohydrolase I (Myrosinase) in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.*, 128: 1180-1188.
- James D., Rossiter J.T. 1991. Development and characteristic of myrosinase in *Brassica napus* during early seedling growth. *Physiol. Plant.*, 82: 163-170.
- Jones A.M.E., Bridges M., Bones A.M., Cole R., Rossiter J.T. 2001. Purification and characterisation of a non-plant myrosinase from the cabbage aphid *Brevicoryne brassicae* (L.). *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 31: 1-5.
- Karoleva O.A., Davies A., Deeken R., Thorpe M.R., Tomos D., Hedrich R. 2000. Identification of a new glucosinolate-rich cell type in *Arabidopsis* flower stalk. *Plant Physiol.*, 124: 599-608.
- Kelly P.J., Bones A., Rossister J.T. 1998. Sub-cellular immunolocalization of the glucosinolate sinigrin in seedlings of *Brassica juncea*. *Planta*, 206: 370-377.
- Kiddle G.A., Doughty K.J., Wallsgrave R.M. 1994. Salicylic acid-induced accumulation of glucosinolates in oilseed rape leaves. *J. Exp. Biol.*, 45: 1343-1346.

- Kliebeinstein D.J., Kroymann J., Brown P., Figuth A., Pedersen D., Gershenzon J., Mitchell-Olds T. 2001. Genetic control of natural variation in *Arabidopsis* glucosinolate accumulation. *Plant Physiol.*, 126: 811-825.
- Koritsas V.M., Lewis J.A., Fenwick G.R. 1991. Glucosinolate response of oilseed rape, mustard and kale to mechanical wounding and infestation by cabbage stem flea beetle (*Psylliodes chrysocephala*). *Ann. Appl. Biol.*, 118: 209-221.
- Krzymański J. 1995. Biosynteza i fizjologiczne funkcje glukozyzolanów w roślinie. *Rośliny Oleiste – Oilseed Crops*, XVI (1): 113-126.
- Lambrix V., Reichelt M., Mitchell-Olds T., Klebeinstein D.J., Gershenzon J. 2001. The *Arabidopsis* epithiospecifier proein promotes the hydrolysis of glucosinolates to nitriles and influences *Trichoplusia ni* herbivory. *Plant Cell*, 13: 2793-2807.
- Lenman M., Falk A., Rask L. 1993a. Characterization of *Brassica napus* pseudogene: myrosinases are members of the BGA family of β -glycosidases. *Plant Mol. Biol.*, 21: 463-474.
- Lenman M., Falk A., Roedin J., Höglund A.S., Ekbohm B., Rask L. 1993b. Differential expression of myrosinase gene families. *Plant Physiol.*, 103: 703-711.
- Lenman M., Roedin J., Josefsson L.G., Rask L. 1990. Immunological characterization of rapeseed myrosinase. *Eur. J. Biochem.*, 194: 747-753.
- Ludwig-Müller J., Pieper K., Ruppel M., Cohen J.D., Epstein E. 1999. Indole glucosinolate and auxin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. glucosinolate mutants and the development of clubroot disease. *Planta*, 208, 3: 409-419.
- Lüthy B., Matile P. 1984. The mustard oil bomb: Rectified analysis of the subcellular organisation of the myrosinase system. *Biochem. Physiol. Pflanz.*, 179: 5-12.
- MacLeod A.J., Rossiter J.T. 1985. The occurrence and activity of epithiospecifier protein in some *Cruciferae* seeds. *Phytochem.*, 24: 1895-1898.
- Magrath R., Mithen R.F. 1993. Maternal effects on the expression of individual aliphatic glucosinolates in seeds and seedlings *Brassica napus*. *Plant Breeding*, 111: 249-252.
- Mikkelsen M.D., Hansen C.H., Wittstock U., Halkier B.A. 2000. Cytochrom P450 CYP79B2 from *Arabidopsis* catalyzes the conversion of tryptophan to indole-3-acetaldoxime, a precursor of indoleglucosinolates and indole-3-acetic acid. *J. Biol. Chem.*, 275: 33712-33717.
- Mikkelsen M.D., Petersen B.L., Olsen C.E., Halkier B.A. 2002. Biosynthesis and metabolic engineering of glucosinolates. *Amino Acids*, 22: 279-295.
- Mithen R.F., Campos H. 1996. Genetic variation of aliphatic glucosinolates in *Arabidopsis thaliana* and prospects for map-based cloning. *Entomol. Exp. Appl.*, 80: 202-205.
- Naur P., Hansen C.H., Bak S.H., Bjarne G., Jensen N.B. 2003. CYP79B1 from *Sinapis alba* converts tryptophan to indole-3-acetaldoxime. *Arch. Biochem. Biophys.*, 409: 235-241.
- Normanly J., Bartel B. 1999. Redundancy as a way of life—IAA metabolism. *Current Opinion in Plant Biol.*, 2: 207-213.
- Oginsky E.L., Stein A.E., Greer M.A. 1965. Myrosinase activity in bacteria as demonstrated by conversion of progroitrin to goitrin. *Soc. Exp. Biol. Med. Proc.*, 119: 360-364.
- Petersen B., Chen S., Hansen C., Olsen C., Halkier B. 2002. Composition and content of glucosinolates in developing *Arabidopsis thaliana*. *Planta*, 214: 562-571.
- Pihakaski K., Pihakaski S. 1978. Myrosinase in *Brassicaceae* (*Cruciferae*) II. Myrosinase activity in different organs of *Sinapsis alba* L. *J. Exp. Bot.*, 29 (109): 335-345.
- Pontoppidan B., Ekbohm B., Eriksson S., Meijer J. 2001. Purification and characterization of myrosinase from cabbage aphid (*Brevicoryne brassicae*), a *brassica* herbivore. *Eur. J. Biochem.*, 268: 1041-1048.

- Porter A.J.R., Morton A.M., Kiddle G., Doughty K.J., Wallsgrove R.M. 1991. Variation in the glucosinolate content of oilseed rape (*Brassica napus* L.), I. Effects of leaf age and position. *Ann. Appl. Biol.*, 118: 461-467.
- Rask L., Andreasson E., Ekblom B., Eriksson S., Pontoppidan B., Meijer J. 2000. Myrosinase: gene family evolution and herbivore defense in *Brassicaceae*. *Plant Mol. Biol.*, 42: 93-114.
- Ratzka A., Vogel H., Kliebenstein D.J., Mitchel-Olds T., Kroymann J. 2002. Disarming the mustard oil bomb. *Ecology*, 99: 11223-11228.
- Reintanz B., Lehnen M.M., Reichelt M., Gershenzon J., Kowalczyk M., Sandberg G., Godde M., Uhl R., Palme K. 2001. *bus*, a bushy *Arabidopsis* CYP79F1 knockout mutant with abolished synthesis of short-chain aliphatic glucosinolates. *Plant Cell*, 13: 351-367.
- Sexton A.C., Howlett B.J. 2000. Characterisation of a cyanide hydratase gene in the phytopathogenic fungus *Leptosphaeria maculans*. *Molecular and General Genetics – MGG*, 263 (3): 463-470.
- Shikita M., Fahey J.W., Golden T.R., Holtzclaw W.D., Talalay P. 1999. An unusual case of 'uncompetitive activation' by ascorbic acid: purification and kinetic properties of a myrosinase from *Raphanus sativus* seedlings. *Bioch. J.*, 341: 725-732.
- Sorensen H. 1988. Glucosinolates: Structure-properties-function. *Rapeseed/Canola: Production, Chemistry, Nutrition and Processing Technology*, 9: 149-172.
- Taipalensuu J., Eriksson S., Rask L. 1997. The myrosinase-binding proteins from *Brassica napus* seeds possess lectin activity and has a highly similar vegetatively expressed wound-inducible counterpart. *Eur. J. Biochem.*, 250: 680-688.
- Talalay P., Fahey J. 2001. Phytochemicals from *Cruciferous* plants protect against cancer by modulating carcinogen metabolism. American Institute for Cancer Research 11th Annual Research Conference on Diet, Nutrition and Cancer, 3027S-3033S.
- Tani N., Ohtsuru M., Hata T. 1974 Purification and general characteristics of bacterial myrosinase produced by *Enterobacter cloacae*. *Agr. Biol. Chem.*, 38: 1623-1630.
- Thangstad O.P., Bones A.M., Holtan S., Moen L., Rossiter J.T. 2001. Microautoradiographic localisation of a glucosinolate precursor to specific cells in *Brassica napus* L. embryos indicates a separate transport pathway into myrosin cells. *Planta*, 213: 207-213.
- Thangstad O.P., Gilde B., Chadchawan S., Seem M., Husebye H., Bradley D., Bones A.M. 2004. Cell specific, cross-species expression of myrosinases in *Brassica napus*, *Arabidopsis thaliana* and *Nicotiana tabacum*. *Plant Mol. Biol.*, 54: 597-611.
- Thangstad O.P., Winge P., Husbye H., Bones A. 1993. The myrosinase (thioglucoside glucosylhydrolase) gene family in *Brassicaceae*. *Plant. Mol. Biol.*, 23: 511-524.
- Visvalingam S., Hrnsi T.G., Bones A.M. 1998. Sulphate and micronutrients can modulate the expression levels of myrosinase in *Sinapis alba* plants. *Physiol. Plant.*, 104: 30-37.
- Waligóra D., Krzymańska J. 1993. Aktywność biologiczna glukozynolanów wyizolowanych z liści rzepaku. *Postępy Nauk Rolniczych*, 5: 151-156.
- Waligóra D., Krzymańska J., Lisiecka E. 1991. Zawartość glukozynolanów w liściach rzepaku a rozwój mszycy kapuścianej *Brevicoryna brassicae* L. *Materiały z XXXI Sesji Naukowej IOR*: 228-232.
- Wittstock U., Halkier B.A. 2000. Cytochrom P450 CYP79A2 from *Arabidopsis thaliana* L. catalyzes the conversion of L-phenylalanine to phenylacetaldoxime in the biosynthesis of benzylglucosinolate. *J. Biol. Chem.*, 275: 14659-14666.
- Wittstock U., Halkier B.A. 2002. Glucosinolate research in the *Arabidopsis* era. *Trends in Plant Science*, 7: 263-270.

- Xue J., Joergensen M., Pihlgren U., Rask L. 1995. The myrosinase gene family in *Arabidopsis thaliana*: gene organisation, expression and evolution. *Plant Mol. Biol.*, 27: 911-922.
- Xue J., Lenman M., Falk A., Rask L. 1992. The glucosinolate-degrading enzyme myrosinase *Brassicaceae* is encoded by gene family. *Plant Mol. Biol.*, 18: 387-398.
- Xue J., Pihlgren U., Rask L. 1993. Temporal, cell-specific, and tissue-preferential expression of myrosinase genes during embryo and seedling development in *Sinapsis alba*. *Planta*, 191: 95-101.
- Yamada K., Hasegawa T., Minami E., Shibuya N., Kosemura S., Yamamura S., Hasegawa K. 2002. Induction of myrosinase gene expression and myrosinase activity in radish hypocotyls by phototropic stimulation. *J. Plant Physiol.*, 43: 1-5.