

JAK POWSTAJĄ BARWY I ZAPACHY KWIATÓW

Teresa Orlikowska

Instytut Sadownictwa i Kwiaciarstwa w Skierniewicach

Wstęp

Barwa i zapach są najważniejszymi cechami opisującymi rośliny użytkowane dla dekoracyjności kwiatów i kwiatostanów. Kolor jest ważnym wyróżnikiem dla nabywcy i wpływa na jego preferencje, które wyrażają się w dwóch planach – dalszym, gdy ważna jest intensywność i atrakcyjność koloru podstawowego i bliższym, gdzie liczą się niuans kolorystyczne – odcienie i rozmieszczenie pigmentów na płatkach lub liściach przykwiatowych. Hodowla uczyniła tu nadzwyczajny postęp – w wielu przypadkach otrzymano odmianowe „serie kolorystyczne”, które charakteryzują się fenotypami o podobnym pokroju roślin i kształcie kwiatów, a różniącymi się jedynie ich barwą.

Odmienne przedstawia się sytuacja w odniesieniu do zapachu kwiatów. Jest to cecha ważna w naturze, ponieważ może przywabić owady zapylające z dużych odległości, a więc decyduje o potencjale reprodukcyjnym roślin. Często jest ona niedoceniana lub wręcz eliminowana w trakcie hodowli dla silnej, choć niecałkowicie wyjaśnionej zależności między intensywnością zapachu a trwałością kwiatów [VAINSTEIN i in. 2001]. Innym powodem ignorowania tej cechy przez hodowców jest brak prostego i obiektywnego sposobu oceny jakości i intensywności zapachu.

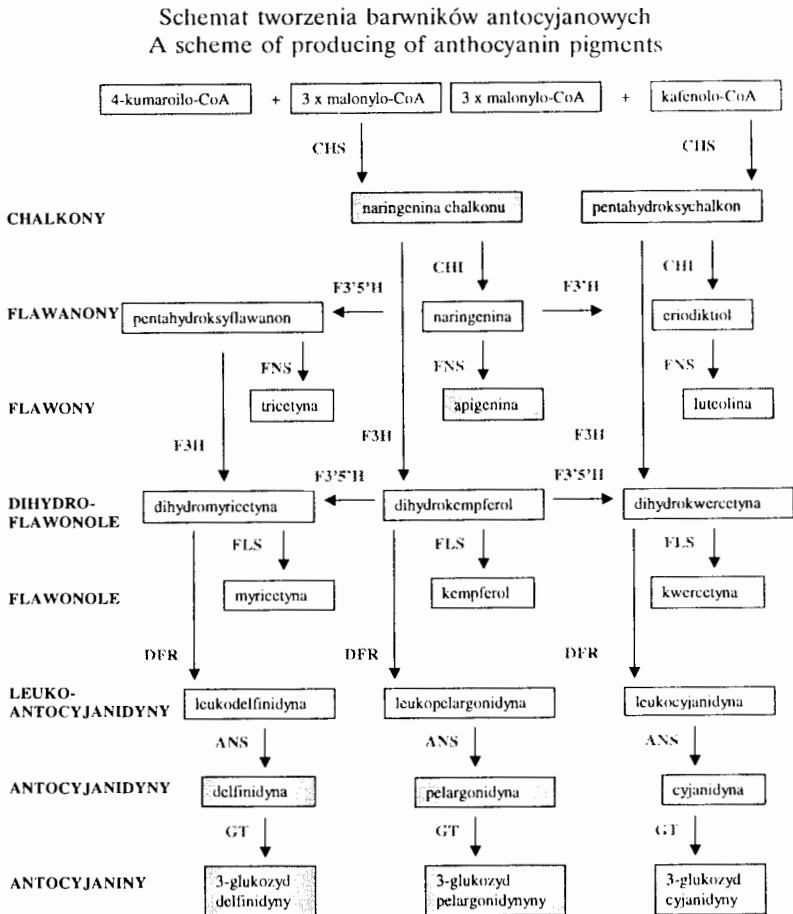
Każda cecha, którą wyróżniają nasze zmysły, jest rezultatem szeregu przemian biochemicznych, realizowanych w komórkach sekwencyjnie przy udziale enzymów, kodowanych przez wiele genów. Postęp w technikach badawczych umożliwił szczegółowe poznanie wielu procesów i budowy wielu genów, co znacznie zwiększa możliwości kierowania hodowlą oraz podpowiada nowe jej sposoby, oparte na inżynierii genetycznej. Celem tej pracy jest zwięzłe przedstawienie podstawowych przemian metabolicznych, prowadzących do wytwarzania pigmentów i substancji lotnych, nadających kwiatom barwę i zapach.

Tworzenie barwników

Barwne kwiaty pełnią rolę wizualnego atraktanta dla przywabiania zapylaczy. Barwniki roślinne należą do jednej z trzech grup związków chemicznych – antocyjanin, karotenoidów i betalain [DAVIES, SCHWINN 1997]. Najbardziej rozpowszechnione i najliczniejsze są antocyjaniny, których opisano ponad 3 tysiące, a ka-

rotenoidów około 600. Najmniejsze znaczenie mają betalainy, ponieważ występują tylko w dwóch rodzinach, których przedstawiciele mają zastosowanie w kwaciarstwie – *Portulacaceae* i *Cactaceae*. Barwniki te mogą koegzystować w tej samej roślinie; wyjątkiem jest wykluczanie się betalain i antocyjanin. Enzymy uczestniczące w biosyntezie antocyjanin są kodowane przez geny jądrowe, co stanowi, że są przekazywane do zarodka zarówno przez formę mateczną (komórka jajowa), jak i ojcowską (plemnik). Geny odpowiedzialne za biosyntezę karotenoidów są zlokalizowane w chromoplastach, więc przekazywane są przede wszystkim przez komórki jajowe.

Schemat 1; Scheme 1

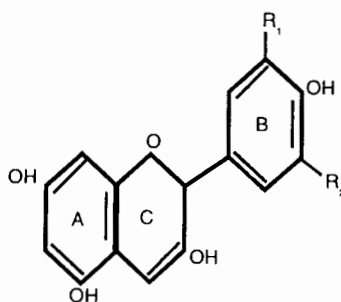


Skrótami oznaczono enzymy: CHS – syntaza chalkonu, CHI – izomeraza chalkonu, F3'H – 3'-hydroksylaza flawanonu, FNS – syntaza flawonu, F3'5'H – hydroksylaza 3'5' flawonoidu, FLS – syntaza flawonolu, DFR – 4-reduktaza dihydroflawonolu, ANS – syntaza antocyjanu, GT – transferaza glukozylowa. Pola zacienione wskazują związki barwne. Wg BEN-MEIR i in. [2002]

Abbreviations represent enzymes: CHS – chalcone synthase, CHI – chalcone isomerase, F3'H – flavanone 3'-hydroxylase, FNS – flavone synthase, F3'5'H – flavonoid 3'5'-hydroxylase, FLS – flavonol synthase, DFR – dihydroflavonol 4-reductase, ANS – anthocyanin synthase, GT – glucosyltransferase. Shaded cells represent colour compounds. After BEN-MEIR et al. [2002]

Produkcja barwników jest procesem wielostopniowym, w którego końcowych etapach bierze udział kilka enzymów (schemat 1). Antocyjaniny należą do flawonoidów, a ich wytwarzanie odbywa się w ramach szlaku metabolicznego fenylpropanoidów. Pierwszym etapem jest kondensacja jednej jednostki estru hydroksycynamonowego-CoA (najczęściej p-kumaroilo-CoA) z trzema jednostkami malonylo-CoA, który katalizuje enzym syntaza chalkonu (CHS). Wytworzona 15-węglowa struktura – żółty chalkon, składa się z dwóch pierścieni 6-węglowych. Chalkony mogą przekształcać się w ciemnożółte aurony. Najczęściej chalkony są przekształcane we flawanony (naringenina, eriodyktiol) w procesie izomeryzacji, katalizowanym przez izomerazę chalkonu (CHI). Flawanony mogą metabolizować w kierunku flawonów (apigenina, luteolina) za pośrednictwem syntazy flawonowej (FNS) lub w kierunku dihydroflawonoli (dihydrokempferol, dihydrokwercytyna) za pośrednictwem 3-hydroksylazy flawononu i do flawonoli (kempferol, kwercytyna) za pośrednictwem syntazy flawonoli (FLS). Redukcja dihydroflawonoli za pośrednictwem 4-reduktazy dihydroflawonoli (DFR) prowadzi do wytworzenia bezpośrednich bezbarwnych prekursorów antocyjanidyn – leukoantocyjanidyn. Przy udziale innej hydroksylazy – syntazy antocyjanidyny (ANS) następuje wytwarzanie niestabilnych barwnych cząsteczek antocyjanidyn (delfinidyna, pelargonidyna, cyjanidyna). Ich stabilizacja następuje po przyłączeniu reszt cukrowych przy udziale transferazy 3-O-glikozylowej antocyjanidyn (GT), co prowadzi do wytworzenia rozpuszczalnych w wodzie antocyjanin, gromadzonych w wodniczkach. Podstawowa struktura antocyjanin może być modyfikowana przez przyłączanie do pierścienia B reszt metylowych i hydroksylowych, z konsekwencjami zmiany barwy (schemat 2). Antocyjaniny występują w kompleksach z flawonolami i flawonami, które modyfikują kolor podstawowy.

Schemat 2; Scheme 2

Budowa cząsteczek antocyjanidyn
Structure of anthocyanidin molecules

Pelargonidyna – $R_1 = R_2 = H$ (pomarańczowoczerwona; orange red)
 Cyjanidyna – $R_1 = OH, R_2 = H$ (karmazynowa; crimson)
 Peonidyna – $R_1 = OCH_3, R_2 = H$ (różowoczerwona; pink-red)
 Delfinidyna – $R_1 = R_2 = OH$ (niebieskofioletowa; blue-violet)
 Petunidyna – $R_1 = OCH_3, R_2 = OH$ (purpurowa; purple)
 Malwidyna – $R_1 = R_2 = OCH_3$ (bladofioletowa; light violet)

A i B – pierścienie 6-węglowe, C – mostek trójwęglowy. Grupa hydroksylowa – OH, grupa metylowa – OCH_3 . Wg STRZALKA [1998]

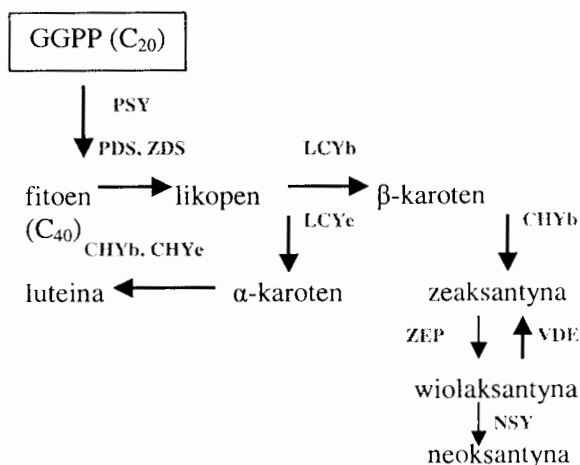
A and B – 6-carbon rings, C – tri-carbon bridge. OH – hydroxyl group, OCH_3 – methyl group. After STRZALKA [1998]

Prawie wszystkie geny kodujące enzymy katalizujące przemiany w kierunku antocyjanin zostały poznane i sklonowane z kilkunastu najważniejszych gatunków roślin ozdobnych, a wiele z nich było zastosowanych do transformowania, z zadaniem kontrolowanej zmiany zabarwienia kwiatów [BEN-MEIR i in. 2002].

Karotenoidy są barwnikami rozpuszczalnymi w lipidach, których struktura jest oparta na 40-węglowym łańcuchu, powstającym w szlaku izoprenoidowym [CUNNINGHAM, GANTT 2002]. Są one wytwarzane i gromadzone w chromoplastach. Podstawowym związkiem wyjściowym jest pirofosforan geranylogeranylowy (GGPP), (schemat 3). Pierwszym etapem szlaku karotenoidowego jest wytworzenie fitoenu z dwóch cząsteczek GGPP, katalizowane przez enzym syntazę fitoenu (PSY). Fitoen jest przekształcany w związki barwne w wyniku udziału kilku enzymów, m.in. desaturazy fitoenu (PDS) i desaturazy karotenu (ZDS), co prowadzi do wytworzenia barwnego różowoczerwonego związku – likopenu. Następne etapy, których wynikiem jest zamykanie łańcucha pierścieniami węglowymi są zależne od enzymów cyklazy likopenu, katalizujących tworzenie żółtopomarańczowego β -karotenu i żółtego ζ -karotenu. Kolejne modyfikacje - hydroksylacje i oksydacje powodują powstawanie ksantofili, np. wiolaksantyny, neoksantyny, luteiny. Wyizolowano ponad 20 genów kodujących enzymy związane z wytwarzaniem karotenoidów u roślin [CUNNINGHAM, GANTT 2002].

Schemat 3; Scheme 3

Schemat tworzenia karotenoidów
A scheme of producing of carotenoids



Skróty oznaczają enzymy: PSY – syntaza fitoenu, PDS – desaturaza fitoenu, ZDS – desaturaza ζ karotenu, LCYb – cyklaza likopenu β , LCYc – cyklaza likopenu ϵ , CHYb – hydroksylaza pierścienia β , CHYc – hydroksylaza pierścienia ϵ , ZEP – epoksydaza zeaksantyny, VDE – de-epoksydaza wiolaksantyny, NSY – syntaza neoksantyny. Wszystkie związki, z wyjątkiem fitoenu, są barwne. GGPP – pirofosforan geranylogeranylu. Wg CUNNINGHAM, GANTT [2002]

Abbreviations represent enzymes: PSY – phytoene synthase, PDS – phytoene desaturase, ZDS – ζ -carotene desaturase, LCYb – lycopene β -cyclase, LCYc – lycopene ϵ -cyclase, CHYb – β -ring hydroxylase, CHYc – ϵ -ring hydroxylase, ZEP – zeaxanthin epoxidase, VDE – violaxanthin de-epoxidase, NSY – neoxanthin synthase. All the compounds, with the exception of phytoene are coloured. GGPP – geranylgeranyl pyrophosphate. After CUNNINGHAM, GANTT [2002]

Na ogół barwa kwiatów postrzegana przez nasze oko jest wynikiem równoczesnej obecności w komórkach kilku barwników, w różnych proporcjach [DAVIES, SCHWINN 1997]. Ostateczny efekt barwny zależy także od rozmieszczenia barwników w płatkach kwiatowych. Obserwujemy często niejednorodne zabarwienie – silniejsze w pobliżu wiązek przewodzących (nerwów), bardziej intensywne lub przeciwnie, mniej intensywne przy nasadach płatków. Wytworzono odmiany o płatkach cieniowanych tęczowo lub o różnej kombinacji barw wewnątrz i na zewnątrz płatków. Rozmieszczenie barwników jest najczęściej efektem ekspresji genów sterowanej przez promotory reagujące na intensywność światła lub jakość promieniowania [HOLTON, CORNISH 1995]. Także intensywność barwy zależy od rodzaju promotorów lub trwałości mRNA. Nagromadzenie antocyjanin w bardzo dużej ilości powoduje u tulipana i bratka zabarwienie zbliżone do czarnego [Harborne 1976, cyt. DAVIES, SCHWINN 1997]. Czynnikiem wpływającym na postrzeganie kolorów jest kształtowanie powierzchni płatków – obecność i grubość wosków, gruczołów i innych szczegółów struktury, które modyfikują przechodzenie i odbijanie promieni świetlnych [MUDALIGE i in. 2003]. Na barwę mają także wpływ geny regulujące kwasowość treści wodniczki – im jest wyższa, tym kolor bardziej zbliżony do niebieskiego. Zmiana wartości pH wodniczki od 6,5 do 7,5 w czasie rozwoju kwiatów powoduje, że w stadium pąka płatki wilca trójbarwnego są różowawe, a w pełnym rozwoju jasnoniebieskie [Asen i in. 1977, cyt. DAVIES, SCHWINN 1997]. Kolor modyfikuje także obecność niektórych metali, szczególnie magnezu, żelaza lub glinu w wodniczkach, gdzie antocyjany są magazynowane. Zarówno liczba barwników możliwych do wytworzenia, jak i wieloetapowość przekształceń, które można zahamować całkowicie lub częściowo na każdym etapie, dają ogromne możliwości hodowli, ale odzwierciedlają także stopień trudności w osiągnięciu pożądanego fenotypu.

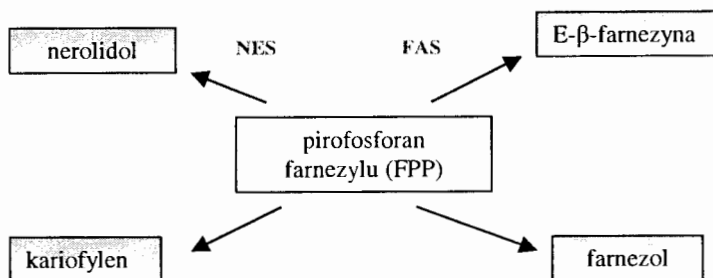
Tworzenie związków zapachowych

Podobnie jak barwniki, substancje lotne należą do metabolitów wtórnych, przede wszystkim z grupy terpenoidów (mono- i seskwiterpenów), fenylopropanoidów i benzoidów oraz pochodnych kwasów tłuszczowych, a poznano ich setki [PICHERSKY i in. 1999; VAINSTEIN i in. 2001]. Najczęściej stwierdza się w roślinach monoterpeny – linalol, limonen, myrcen i seskwiterpeny – farnesynę, nerolidol i kariofyllen. Prekursorem wszystkich monoterpenów jest pirofosforan geranylu (GPP). Przy udziale syntaz przekształca się on w związki lotne – linalol, pinen, limonen, myrcen i inne (schemat 4). Biosynteza odbywa się w plastydach. Prekursorem seskwiterpenów jest pirofosforan farnesylu (FPP), który przy udziale syntaz jest przekształcany w związki lotne – nerolidol, kariofyllen, farnesol i inne (schemat 5).

Związkiem wyjściowym dla fenylopropanoidów jest kwas cynamonowy, który może zostać przekształcony w lotny cinamonian metylu lub w kwas kumarynowy, a ten w inne lotne związki – pochodne eugenolu, głównie za pośrednictwem metylotransferaz (IEMT), (schemat 6). Wytworzenie kwasu benzooesowego z kwasu cynamonowego prowadzi do jego przekształceń w lotne formy alkoholowe, octanowe i aldehydowe. Przedstawione na schematach enzymy zostały zidentyfikowane, określono sekwencje ich aminokwasów oraz sekwencje nukleotydów kodujących DNA. To otwiera drogę do badania ekspresji tych genów w tkankach roślinnych, a także do tworzenia serii zapachowych odmian, gdzie goździk nie musi koniecznie pachnieć goździkiem, a róża różą.

Schemat 4; Scheme 4

Schemat tworzenia lotnych seskwiterpenów (zaciemnione pola)
A scheme of producing volatile sesquiterpenes (shadowed cells)

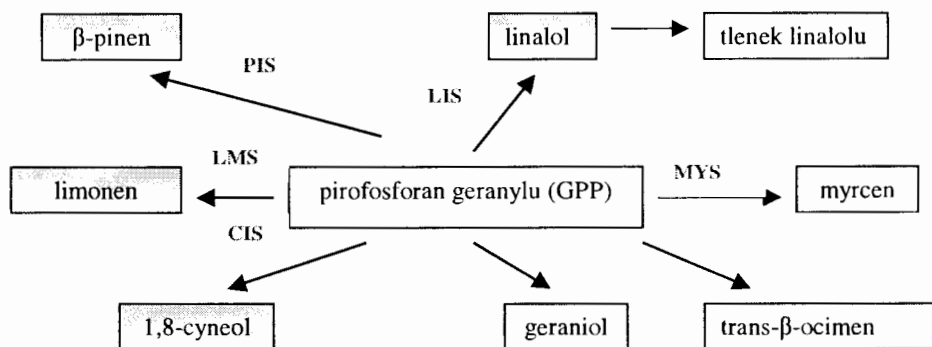


Skróty oznaczają enzymy: NES – syntaza nerolidolu, FAS – syntaza β-farnezylny. Wg DUDAREVA [2002]

Abbreviations represent enzymes: NES – nerolidol synthase, FAS – β-farnesene synthase. After DUDAREVA [2002]

Schemat 5; Scheme 5

Schemat tworzenia monoterpenów lotnych (zaciemnione pola)
A scheme of producing volatile monoterpenes (shadowed cells)



Skróty oznaczają enzymy: PIS – syntaza β pinenu, LIS – syntaza linalolu, MYS – syntaza myrcenu, CIS – syntaza 1,8-cineolu, LMS – syntaza limonenu. Wg DUDAREVA [2002]

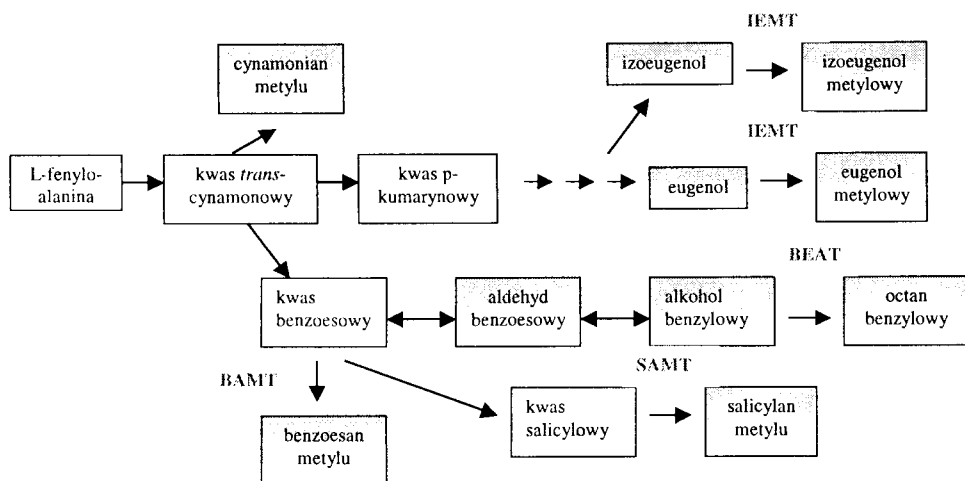
Abbreviations represent enzymes: PIS – (β-pinene synthase), LIS – linalol synthase, MYS – myrcene synthase, CIS – 1,8-cineole synthase, LMS – limonene synthase. After DUDAREVA [2002]

Woń kwiatów jest najczęściej mieszanką różnych niskocząsteczkowych substancji lotnych (100–200 Da) [DUDAREVA 2002]. Skład mieszanki z powodu przystosowania dla konkretnych zapyłaczy jest specyficzny dla poszczególnych genotypów roślin. Blisko spokrewnione gatunki mogą emitować zapachy lub nie, a mieszanki zapachowe nie muszą być podobne [DUDAREVA, PICHERSKY 2000]. Dla przykładu, skład chemiczny substancji lotnych wyizolowanych z płatków *Cyclamen persicum* był zdominowany przez węglowodany seskwiterpenów (określony jako zapach

drzew i pudru), a wśród substancji wyizolowanych z *C. purpurascens* największy udział miały alkohole, aldehydy i estry monoterpenów (zapach określano jako różany lub hiacyntowy) [ISHIZAKA i in. 2002]. Tradycyjne różce ogrodowe, należące do gatunków *Rosa damascena*, *R. gallica*, *R. alba*, *R. eglanteria* emitują typowe zapachy różane. Główny składnik zapachu róż – monoterpen geraniolu jest także tworzony w dużych ilościach w kwiatach jaśminowca, którego mieszanina zapachowa jest jednak zdecydowanie inna [Croteau, Karp 1991; cyt. VAINSTEIN i in. 2001]. W mieszaninie zapachów starych odmian goździka dominuje eugenol; odmiany nowe także go produkują, ale w ilościach niewyczuwalnych przez nasze zmysły [Clery i in. 1999, cyt. VAINSTEIN i in. 2001].

Schemat 6; Scheme 6

Schemat tworzenia lotnych fenylopropanoidów (zacięzione pola)
A scheme of producing volatile phenylpropanoids (shadowed cells)



Skroty oznaczają enzymy: IEMT – metylotransferaza izo-eugenolu, BEAT – transferaza acetylowa benzylu, SAMT – metylotransferaza salicylanu, BAMT – metylotransferaza kwasu benzoesowego. Wg DUDAREVA [2002]

Abbreviations represent enzymes: IEMT – (iso)eugenol *O*-methyltransferase, BEAT – benzylalcohol acetyltransferase, SAMT – salicylic acid carboxyl methyltransferase, BAMT – benzoic acid carboxyl methyltransferase. After DUDAREVA [2002]

Głównym producentem substancji lotnych jest epiderma płatków [DUDAREVA, PICHERSKY 2002; GUTERMAN i in. 2002]. Zapach jest cechą bardzo trudną do badania, ponieważ bezpośrednio po wytworzeniu, związki lotne są uwalniane do atmosfery. Intensywność wytwarzania jest uzależniona od pory aktywności zapylaczy, dlatego część roślin produkuje ich więcej w nocy, a większość w dzień. Związki lotne, wyłapane na siatkach polimerowych są analizowane technikami chromatografii gazowej i spektrofotometrii masowej.

Poznanie metabolizmu tworzenia związków lotnych było punktem wyjścia dla klonowania genów kodujących enzymy sterujące procesem i badanie ich ekspresji w różnych tkankach i różnych gospodarzach [DUDAREVA i in. 2000; CHANNELLIÈRE i in. 2002; GUTERMAN i in. 2002; SHALIT i in. 2003; VAINSTEIN i in. 2003].

Literatura

- BEN-MEIR H., ZUKER A., WEISS D., VAINSTEIN A. 2002.** *Molecular control of floral pigmentation: anthocyanins*, w: *Breeding for ornamental: classical and molecular approaches*. A. Vainstein (red.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht: 273–293.
- CHANNELIÈRE S., RIVIERE S., SCALLIET G., SZECZI J., JULLIEN F., DOLLE C., VERGNE P., DUMAS C., BENDAHMANE M., HUGUENEY P., COCK J.M. 2002.** *Analysis of gene expression in rose petals using expressed sequence tags*. FEBS Letters 515: 35–38.
- CUNNINGHAM F.X., GANTT E. 2002.** *Molecular control of floral pigmentation: carotenoids*, w: *Breeding for ornamental: classical and molecular approaches*. A. Vainstein (red.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht: 253–272.
- DAVIES K.M., SCHWINN K.E. 1997.** *Flower colour*, w: *Biotechnology of ornamental plants*. Geneve R.L., Preece J.E., Merkle S.A. CAB International, Wallingford: 259–294.
- DUDAREVA N. 2002.** *Molecular control of floral fragrance*, w: *Breeding for ornamental: classical and molecular approaches*. A. Vainstein (red.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht: 295–309.
- DUDAREVA N., MURFITT L.M., MANN C.J., GORENSTEIN N., KOLOSOVA N., KISH C.M., BONHAM C., WOOD K. 2000.** *Developmental regulation of methyl benzoate biosynthesis and emission in snapdragon flowers*. The Plant Cell 12: 949–961.
- DUDAREVA N., PICHERSKY E. 2000.** *Biochemistry and molecular genetic aspects of floral scents*. Plant Physiol. 122: 627–633.
- GUTERMAN I., SHALIT M., MENDA N., PIESTUN D., DAFNY-YELIN M., SHALEV G., BAR E., DAVYDOV O., OVADIS M., EMANUEL M., WANG J., ADAM Z., PICHERSKY E., LEWINSOHN E., ZAMIR D., VAINSTEIN A., WEISS D. 2002.** *Rose scent: genomics approach to discovering novel floral fragrance-related genes*. The Plant Cell 14: 2325–2338.
- HOLTON T.A., CORNISH E.C. 1995.** *Genetics and biochemistry of anthocyanin biosynthesis*. The Plant Cell 7: 1071–1083.
- ISHIZAKA H., YAMADA H., SASAKI K. 2002.** *Volatile compounds in the flowers of Cyclamen persicum, C. purpurascens and their hybrids*. Scientia Hort. 94: 125–135.
- MUDALIGE R.G., KUEHNLE A.R., AMORE T.D. 2003.** *Pigment distribution and epidermal cell shape in Dendrobium species and hybrids*. HortScience 38: 573–577.
- PICHERSKY E., DUDAREVA N., WANG J., CSEKE L., LEWINSOHN E. 1999.** *Biosynthesis of scent and flavor compounds*, w: *Plant biotechnology and in vitro biology in the 21st century*. Altman A. et al. (red.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht: 601–604.
- SHALIT M., GUTERMAN I., VOLPIN H., BAR E., TAMARI T., MENDA N., ADAM Z., ZAMIR D., VAINSTEIN A., WEISS D., PICHERSKY E., LEWINSOHN E. 2003.** *Volatile ester formation in roses. Identification of an acetyl-coenzyme A. geraniol/citronellol acetyltransferase in developing rose petals*. Plant Physiol. 131: 1868–1876.
- STRZAŁKA K. 1998.** *Procesy anaboliczne*, w: *Podstawy fizjologii roślin*. Kopcewicz J., Lewak S. (red.), Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa: 315–332.
- VAINSTEIN A., LEWINSOHN E., ADAM Z., PICHERSKY E., ZAMIR D., WEISS D. 2003.** *Rose fragrance: genomic approaches and metabolic engineering*. Acta Horticulturae 612: 105–111.

VAINSTEIN A., LEWINSOHN E., PICHERSKY E., WEISS D. 2001. *Floral fragrance. New inroads into an old commodity*. Plant Physiol. 127: 1383–1389.

Słowa kluczowe: antocyjaniny, karoteny, metabolizm, terpenoidy, fenylopropanoidy, inżynieria genetyczna, hodowla roślin

Streszczenie

W pracy przeglądowej naszkicowano sposób powstawania barwników z grupy antocyjanin i karotenoidów oraz substancji lotnych z grupy terpenoidów i fenylopropanoidów. Podano także stan wiedzy dotyczący możliwości kierowania metabolizmem związanym z powstawaniem pigmentów i substancji lotnych dla celów hodowli odmian o nowych cechach.

HOW FLOWER PIGMENTS AND FRAGRANCES ARE PRODUCED

Teresa Orlikowska

Research Institute of Pomology and Floriculture, Skierniewice

Key words: anthocyanins, carotenoids, metabolism, terpenoids, phenylpropanoids, genetic engineering, plant breeding

Summary

A basic metabolism leading to production of pigments – anthocyanins and carotenoids which paint flowers, as well as volatile compounds – terpenoids and phenylpropanoids which fragrance flowers are presented in this paper.

Prof. dr hab. **Teresa Orlikowska**
Instytut Sadownictwa i Kwiaciarnictwa
ul. Pomologiczna 18
96-100 SKIERNIEWICE
e-mail: torlikow@insad.pl