

ROMUALD CZERPAK, ANDRZEJ BAJGUZ

Zakład Biochemii, Instytut Biologii, Uniwersytet w Białymstoku

Świerkowa 20 B, 15-950 Białystok

E-mail: abajguz@noc.uwb.edu.pl

AKTYWNOŚĆ FIZJOLOGICZNA I METABOLICZNA KWASU SALICYLOWEGO U ROŚLIN

WSTĘP

Kwas salicylowy (*o*-hydroksybenzoesowy), w języku angielskim salicylic acid (SA), należy do fenolokwasów pospolicie występujących u roślin naczyniowych. Fenolokwasy jako uniwersalne składniki organiczne roślin występują głównie jako hydroksylowe pochodne aromatycznych kwasów: benzoesowego, fenylooctowego i fenylopropenowego. Najczęściej spotykane u roślin są kwasy: *p*-hydroksybenzoesowy, salicylowy, protokatecholowy, gentyzynowy, chinowy, galusowy, orselinowy, szikimowy, wanilinowy, syringowy, *o*- i *p*-hydroksyfenylooctowy, *o*- i *p*-kumarowy, ferulowy, synapinowy, kawowy, preferowy, choryzmowy, chlorogenowy, elagowy i diferulowy (CZERPAK 1993, MACHEI X 1996).

Fenolokwasy (kwasy fenolowe) posiadają charakterystyczne właściwości fizykochemiczne, które umożliwiają im tworzenie wiązań wodorowych między cząsteczkami, a niektóre z nich zwłaszcza *o*-hydroksykwasy łatwo chelatują jony dwuwartościowych metali. Część spośród fenolokwasów, na przykład galusowy i elagowy łatwo wchodzi ze sobą w reakcje kondensacji tworząc oligo- i polimeryczne połączenia o specyficznych właściwościach chemicznych. Powstałe w ten sposób związki należą do grupy hydrolizujących garbników. Właściwości te de-

cydują o aktywności fizjologiczno-metabolicznej fenolokwasów. Fenolokwasy, o charakterze przeważnie inhibicyjnym, rzadziej stymulującym, obok typowych fitohormonów są zaliczane do jednej z głównych grup endogennych regulatorów wzrostu i metabolizmu roślin (ABERG 1981, CZERPAK 1993, PIERPOINT 1994).

Poza oddziaływaniem na szereg procesów fizjologicznych i metabolicznych roślin niektóre z fenolokwasów należą do fitoaleksyn o niespecyficznych właściwościach, które u wielu gatunków roślin służą do obrony przed patogenami wirusowymi, bakteryjnymi i grzybowymi. Część fenolokwasów, zwłaszcza tworzących związki garbnikowe, poprzez łatwe łączenie się z białkami enzymatycznymi działają bakteriostatycznie na wzrost licznych patogenów. Sporo fenolokwasów odgrywa ważną rolę w allelopatii, czyli we wzajemnym chemicznym oddziaływaniu między niektórymi gatunkami roślin naczyniowych. Znaczne ilości kwasów fenolowych w wyniku sekrecji lub z obumarłych roślin dostają się do zewnętrznego środowiska i wywierają istotny wpływ na kształtowanie stosunków ekologicznych i fitosocjologicznych, szczególnie w lądowych biocenozach (ZABŻA 1989, RASKIN 1992a, b, HARBORNE 1997).

WYSTĘPOWANIE KWASU SALICYLOWEGO U ROŚLIN

Kwas salicylowy (SA) jako normalny składnik chemiczny, najczęściej związany estrowo lub glikozydowo, występuje u wielu gatunków roślin należących głównie do rodzin: wierzbowatych (Salicaceae), brzoźowatych (Betulaceae), wrzosowatych (Ericaceae), złożonych (Com-

positae), wargowych (Labiatae), różowatych (Rosaceae), fiołkowatych (Violaceae), oliwkowatych (Oleaceae), kokornakowatych (Aristolochiaceae), storczykowatych (Orchidaceae), baldaszkowatych (Umbelliferae), palm (Palmae) i paprotkowatych (Polypodiaceae). Po raz pier-

wszy SA został wyizolowany w 1828 roku z kory wierzby (*Salix* sp.) przez Johana Büchnera (RASKIN 1992a, b, KOHLMÜNZER 1993).

Niewielkimi ilościami SA w postaci wolnej charakteryzują się rośliny należące do rodzin: wierzbowatych, wrzosowatych i różowatych. Najczęściej SA znajduje się w formie estru metylowego jako składnik chemiczny olejków eterycznych i balsamów, zwłaszcza w roślinach baldaszkowatych, fiołkowatych, różowatych, krzyżownicowatych (*Polygalaceae*), brzoźowatych i wrzosowatych (PIERPOINT 1994).

Rozpowszechnione są także połączenia glikozydowe SA, najczęściej z glukozą. Rzadziej są spotykane glikozydy zawierające część aglikonową w formie aldehydu bądź alkoholu salicylowego lub glikozydy salicylanu metylu z disacharydami: primwerozą i wicjanozą. Tego rodzaju glikozydy, na przykład monotropitozyd, prymwerozyd i wiolutozyd występują w korzeniach brzoź (*Betula* sp.), pierwiosnkach (*Primu-*

la sp.) i fiołkach (*Viola* sp.). Połączenie glikozydowe SA, zwane salicyną, początkowo wyodrębniono z kory wierzb: *Salix alba*, *S. fragilis* i *S. purpurea*. Salicylowe glikozydy powszechnie występują u roślin kwiatowych, zwłaszcza z rodzin: wierzbowatych, wrzosowatych, wargowatych, złożonych (*Compositae*), różowatych, storczykowatych, fiołkowatych i paprotnikowatych (KLAMBT 1962, KOHLMÜNZER 1993, PIERPOINT 1994, RASKIN 1995).

Również w korze niektórych gatunków wierzb, topoli (*Populus* sp.) i brzoź oraz palm, zwłaszcza daktylowych, stwierdzono obecność niewielkich ilości kwasu acetylosalicylowego, który jest estrowym połączeniem SA z kwasem octowym. Kwas ten zwany potocznie w nazewnictwie farmaceutycznym aspiryną lub polopiryną jest stosowany powszechnie we wszystkich krajach od stu lat jako cenny lek (KOHLMÜNZER 1993, PIERPOINT 1994).

BIOSYNTeza I PRZEMIANY KWASU SALICYLOWEGO

Głównym prekursorem w biosyntezie SA u roślin jest aromatyczny aminokwas fenyloalanina (kwas 2-amino-3-fenylpropionowy). Najprawdopodobniej istnieją dwa alternatywne szlaki biosyntezy SA ze wspólnego substratu wyjściowego, jakim jest fenyloalanina (ryc. 1). W pierwszym etapie aminokwas ten w procesie nieoksydacyjnej deaminacji za pomocą enzymu PAL (amoniako-liazy L-fenyloalaniny) zostaje przekształcony w kwas *trans*-cynamonowy o antyauksynowych właściwościach. Kwas ten w zależności od taksonomii i fazy rozwojowej rośliny oraz warunków środowiska pod wpływem specyficznej izomerazy może ulec przestrzennej transformacji do kwasu *cis*-cynamonowego o auksynopodobnej aktywności biologicznej (RASKIN 1995, JAKUBOWSKA i współaut. 1996).

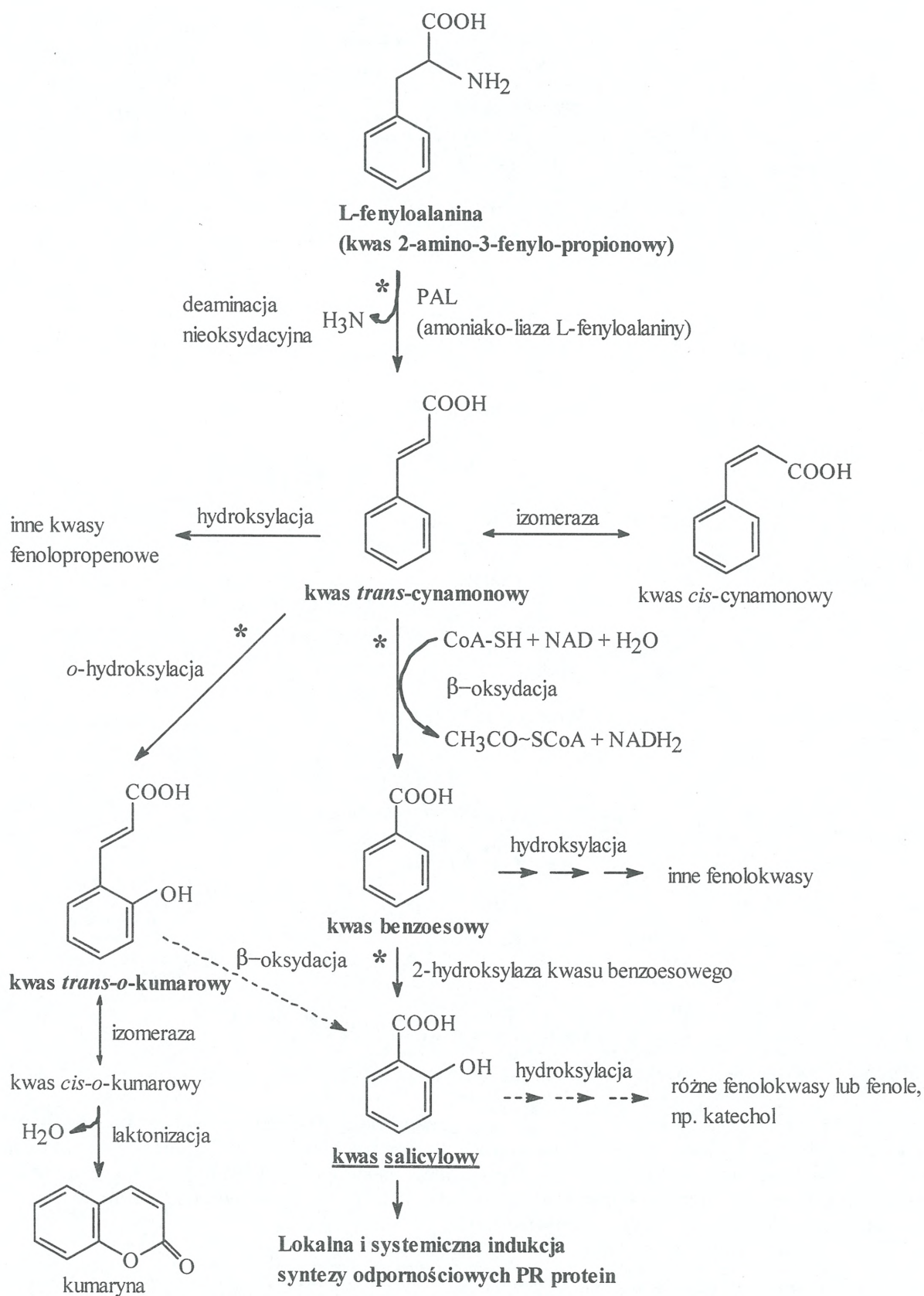
PAL jest kluczowym enzymem, który zapoczątkowuje oksydacyjne przemiany układu fenylopropanowego fenyloalaniny prowadzące do kilku szlaków, między innymi syntezy kwasów: cynamonowego, benzoesowego i różnych fenolokwasów, wśród których znajdują się także związki o właściwościach fitoaleksyn. Niektóre kwasy fenolopropenowe ulegają redukcji do fenoloalkoholi, na przykład koniferylowego, kumarylowego i synapilowego, które mogą dalej ulegać polimeryzacji do ligniny (KLAMBT 1962, RASKIN 1995, MAUCH-MANI i SLUSARENKO 1996).

Jeden ze szlaków biosyntezy SA, potwierdzony empirycznie, polega na przemianie typu β -oksydacji kwasu *trans*-cynamonowego w kwas benzoesowy, który następnie ulega hydro-

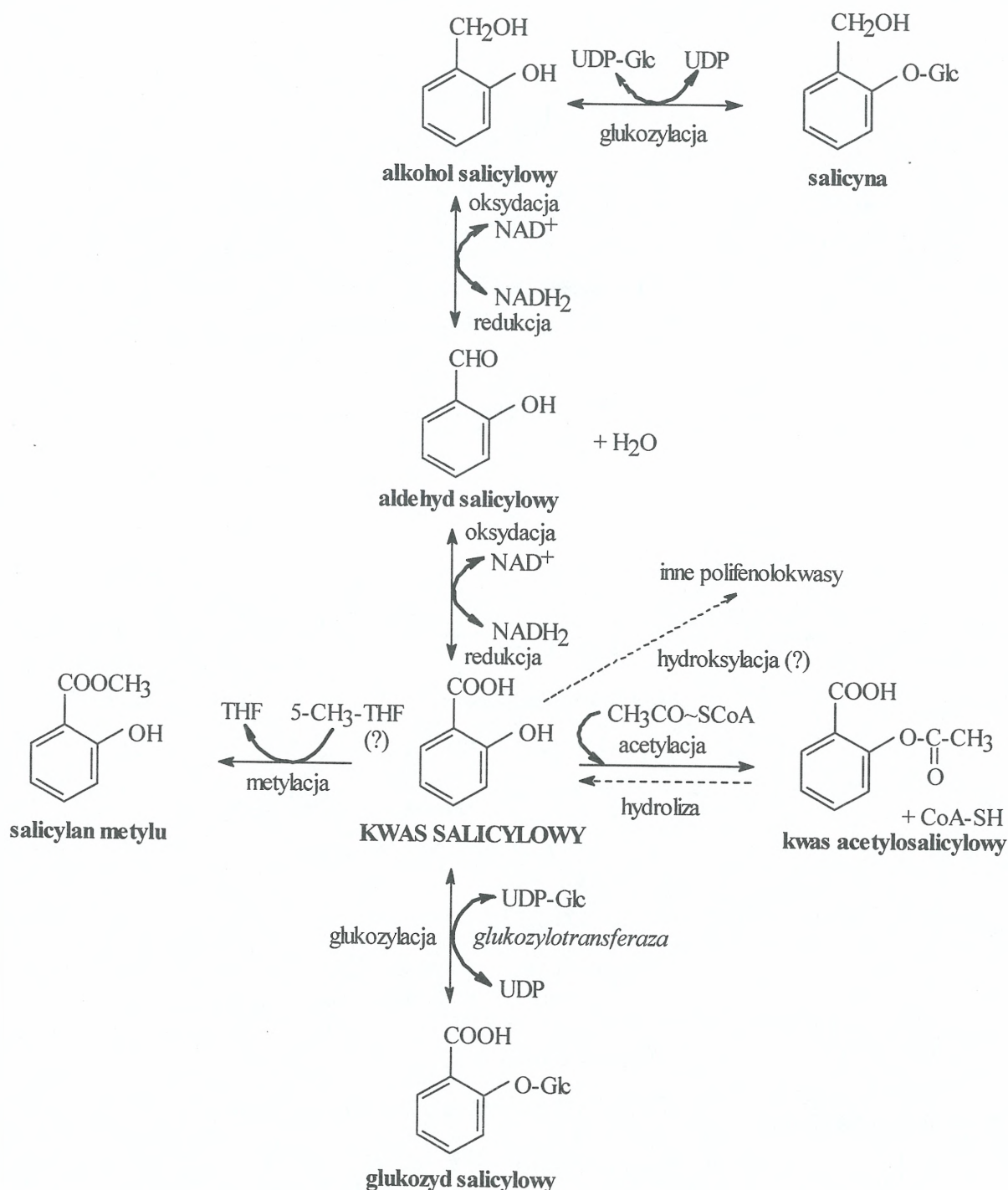
ksylacji w położeniu *orto* za pomocą 2-hydroksylazy do kwasu salicylowego. Natomiast w drugim hipotetycznym szlaku kwas *trans*-cynamonowy najpierw ulega *orto*-hydroksylacji do kwasu *trans*-*o*-kumarowego, a ten prawdopodobnie w procesie β -oksydacji może przekształcić się w SA (LEON i współaut. 1993, 1995a, b). Prócz tego u niektórych roślin forma *trans* kwasu *o*-kumarowego przechodzi w *cis*, a ta z kolei ulegając laktonizacji wytwarza podstawowy szkielet kumarynowy (PIERPOINT 1994, RASKIN 1995).

W roślinach kwas salicylowy ulega wielokierunkowym przemianom biochemicznym (ryc. 2), których sporo nie jest w szczegółach wyjaśnione. Najczęściej SA przy udziale UDP-Glc tworzy połączenia glikozydowe z glukozą, albo ulega metylacji typu estrowego do salicylanu metylu prawdopodobnie za pomocą 5-metylotetrahydrofolianu (5-CH₃-THF). W niektórych roślinach stwierdzono niewielkie ilości kwasu acetylosalicylowego, który powstaje w wyniku acetylacji SA najprawdopodobniej przy udziale acetylokoenzymu A (PIERPOINT 1994, SILVERMAN i współaut. 1995).

Również część roślin obok wolnego SA i jego formy glikozydowej zawiera niewielkie bądź znikome ilości aldehydu lub alkoholu salicylowego. Świadczy to o istnieniu przemian redukcyjnych SA o charakterze odwracalnym, prowadzących poprzez formę aldehydową do alkoholu salicylowego. Przypuszcza się, że formy: alkoholowa, acetylowa i glikozydowa SA stanowią



Ryc. 1. Szlaki biosyntezy kwasu salicylowego u roślin (*działanie patogenów).



Ryc. 2. Wielokierunkowość przemian biochemicznych kwasu salicylowego u roślin.

jego rezerwę w roślinach i być może pełnia jakieś specyficzne funkcje fizjologiczne bądź metaboliczne. Poza tym istnieje duże prawdopodobieństwo, że nie tylko kwas benzoesowy jest głównym substratem wyjściowym w biosyntezie

różnorodnych fenolokwasów, ale również SA być może ulega dalszej hydroksylacji do bardziej złożonych polifenolokwasów (ENYEDI i RASKIN 1993, LEON i współaut. 1993).

WPLYW SA NA PROCESY FIZJOLOGICZNE I METABOLICZNE ROŚLIN

Kwas salicylowy, którego zawartość w różnych gatunkach roślin może wahać się od set-

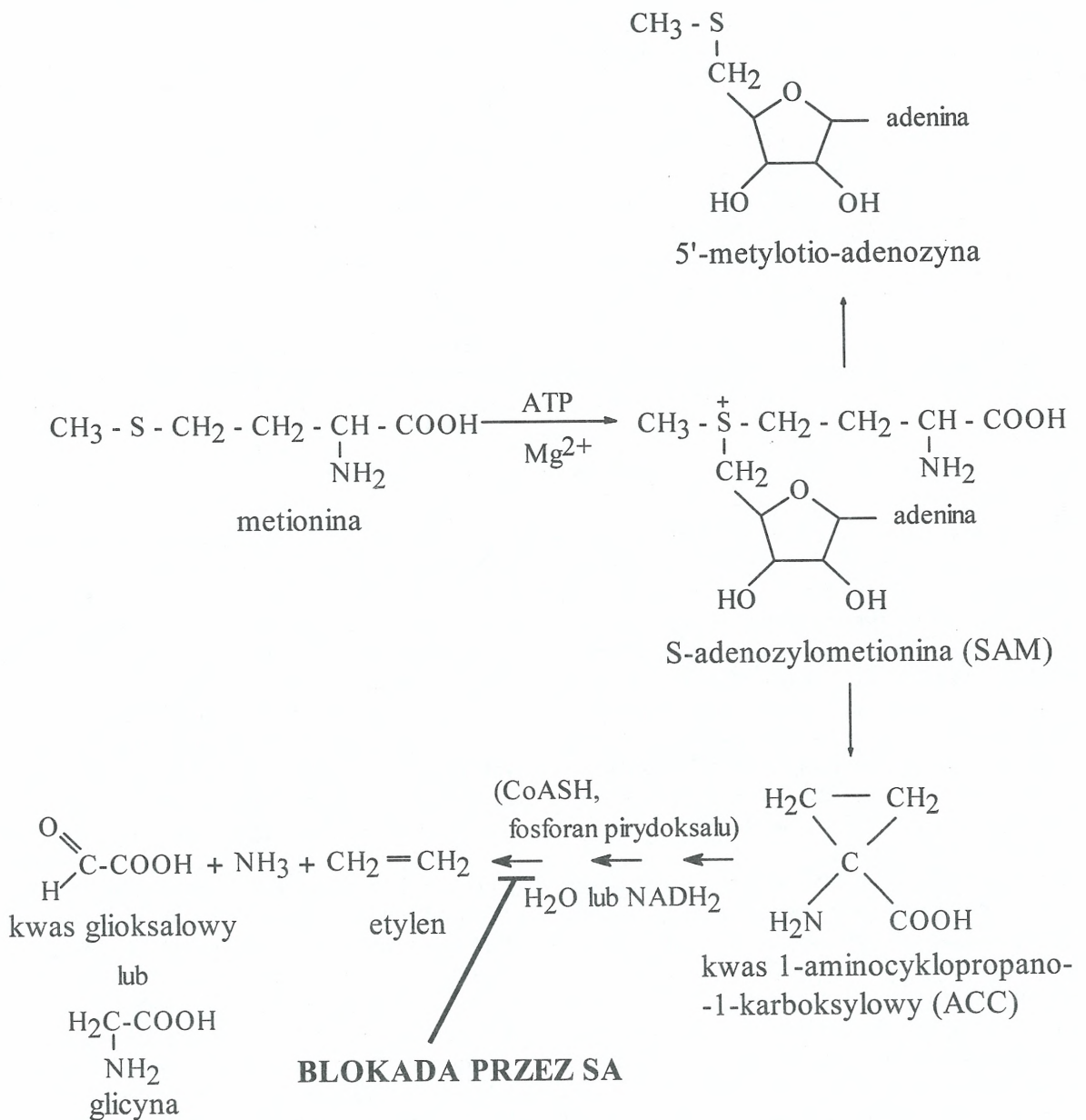
nych części do około $40 \mu\text{g/g}$ świeżej masy, występuje najczęściej w postaci wolnej lub po-

łączeń estrowych i glikozydowych. Największe ilości SA stwierdzono u roślin wierzbowatych, topolach, liściach ryżu siewnego (*Oryza sativa*), kwiatostanach roślin termogenicznych oraz u roślin zaatakowanych przez patogeny (MEUWLY i współaut. 1994, RASKIN 1995).

Z dotychczasowych badań wiadomo, że SA oddziałuje najczęściej w sposób specyficzny na wiele różnorodnych procesów fizjologicznych i metabolicznych zachodzących w roślinach. Związek ten ma wpływ regulacyjny na takie procesy jak: kiełkowanie nasion, wzrost systemu korzeniowego i liści, biosynteza chlorofili i białek, kwitnienie roślin, termogeneza, odporność na patogeny, oksydacyjny stres i inne

szkodliwe czynniki, transport metabolitów, szczególnie dwuwartościowych kationów metali przez błony cytoplazmatyczne oraz ich absorpcję z gleby do korzeni i kumulację w komórkach (RASKIN 1992a, b, GROSS i PARTHIER 1994, PANCHEVA i współaut. 1996).

Do niedawna uważano SA za jeden ze specyficznych czynników indukujących kwitnienie na podstawie doświadczeń z rzęsą wodną (*Lemna gibba*). Jednak badania ostatnich lat nie potwierdzają w pełni tego, ponieważ poziom endogennego SA nie różni się w kwitnących i nie kwitnących roślinach. Najprawdopodobniej stymulacja kwitnienia oraz jego czasowe wydłużenie przez SA wiąże się z jego właściwościami



Ryc. 3. Uproszczony szlak biosyntezy etylenu i jego blokada przez kwas salicylowy.

chelatującymi lub tworzącymi kowalencyjne wiązania z wieloma makro- i mikroelementami niezbędnymi do intensywnego przebiegu procesów fizjologicznych i metabolicznych (KHURANA i MAHESHWARI 1980, RASKIN 1995).

Kwas salicylowy nie tylko przedłuża proces kwitnienia, ale także opóźnia starzenie się korzeni, głównie poprzez blokadę syntezy etylenu (ryc. 3), który razem z kwasem abscysynowym (ABA) należy do głównych fitohormonów aktywujących katabolizm, a wraz z nim starzenie się roślin i dojrzewanie owoców i nasion. Mechanizm inhibicji biosyntezy etylenu przez SA polega na blokadzie przez niego przemiany bezpośredniego prekursora, czyli kwasu 1-amino-cyklopropano-1-karboksylowego (ACC) w etylen (LESLIE i ROMANI 1988, ROMANI i współaut. 1989, LI i współaut. 1992). W doświadczeniach przeprowadzonych na brzoskwini (*Prunus persica*) i papryce rocznej (*Capsicum annuum*) stwierdzono, że opóźnianie opadania liści przez SA jest związane z hamowaniem przez niego syntezy etylenu i enzymu celulazy (ROUSTAN i współaut. 1990, RASKIN 1992a, SILVERMAN i współaut. 1993, FERRARESE i współaut. 1996).

Badania wykonane na jęczmieniu zwyczajnym (*Hordeum vulgare*) wykazały, że SA działa hamująco na wzrost liści i korzeni oraz zawartość chlorofili i białek. Okazało się też, że w liściach pomidora (*Lycopersicon esculentum*) SA działając inhibicyjnie na zawartość inhibitorów

proteinaż, hamuje szlak biosyntezy kwasu jasmonowego i systemin (BOWLES 1990, KLESSIG i MALAMY 1994, DOARES i współaut. 1995).

Pod wpływem optymalnych stężeń SA w granicach 10^{-6} – 10^{-4} M stwierdzono indukujące działanie w tworzeniu się bulw ziemniaka jadalnego (*Solanum tuberosum*), a także wzrost ilości i wydajności strączków fasoli zwykłej (*Phaseolus vulgaris*) oraz ziaren prosa zwyczajnego (*Panicum miliaceum*). W kiełkujących ziarnach kukurydzy (*Zea mays*) SA indukuje syntezę antocyjanin oraz wzrost aktywności reduktazy azotanowej. Również SA stosowany wspólnie z kwasem 3-indoliloctowym (IAA) wzmacnia stymulację tworzenia się systemu korzeniowego fasoli przez auksyny (RASKIN 1992b, 1995, GROSS i PARTHIER 1994).

Kwas salicylowy oddziałuje także na zawartość i dynamikę zmian podstawowych składników mineralnych, takich jak: fosforany i azotany, kationy: amonowy, wapnia, magnezu i prawdopodobnie inne, które są niezbędne do prawidłowego przebiegu oraz intensyfikacji przemian związanych z oddychaniem komórkowym, to jest glikolizy, cyklu Krebsa i łańcucha oddechowego. Ponadto SA aktywuje szlak alternatywnego oddychania niewrażliwego na cyjaniki u roślin termo- i nietermogenicznych (RASKIN i współaut. 1990, KAPULNIK i współaut. 1992, RHOADS i MCINTOSH 1992, CHEN i współaut. 1993, PIERPOINT 1994, RASKIN 1995).

ZNACZENIE SA W TERMOGENEZIE

Proces wytwarzania ciepła w roślinach zwany termogenezą został po raz pierwszy opisany na przykładzie rodzaju *Arum* przez Lamarcka w 1778 roku. Zjawisko termogenezy dotyczy kwiatów bądź całych kwiatostanów niektórych gatunków roślin okrytozalążkowych (*Angiospermae*), a przede wszystkim przedstawicieli rodzin: flaszowcowate (*Annonaceae*), obrazkowate (*Araceae*), kokornakowate, *Cyclanthaceae*, grzybieniolowate (*Nymphaeaceae*) i palm (RASKIN i współaut. 1987, RASKIN 1995, JAKUBOWSKA i współaut. 1996).

RASKIN (1992a, 1995) w doświadczeniach przeprowadzonych na męskich kwiatach *Saurum guttatum* wykazał, że SA jest naturalnym induktorem i regulatorem wytwarzania ciepła w kwiatach podczas kwitnienia u roślin termogenicznych. Wraz ze wzrostem temperatury kwiatów SA przyczynia się pośrednio do uwalniania lotnych związków o właściwościach przywabiających owady zapylające tak zwanych atraktantów lub o nieprzyjemnym zapachu odstraszających szkodniki, to jest repelentów.

Podwyższenie temperatury kwiatów podczas kwitnienia poza ich kolorem i zapachem jest dla niektórych owadów zapylających dodatkowym, a może głównym sygnałem termicznym przyciągającym je do roślin (RASKIN i współaut. 1989, RASKIN 1992a).

Wzrost temperatury podczas kwitnienia roślin jest poprzedzony wielokrotnym wzrostem zawartości w nich SA, który działa indukcyjnie na ekspresję genu alternatywnej oksydazy. Podczas termogenezy znaczna część elektronów przepływających w grzebieniach mitochondrialnych jest przekazywana z normalnej drogi cytochromowego łańcucha oddechowego na szlak alternatywnego oddychania, w którym końcowym akceptorem elektronów jest właśnie alternatywna oksydaza. Energia elektronów przemieszczających się przez szlak alternatywnego oddychania w porównaniu z normalnym łańcuchem oddechowym nie jest przetwarzana na chemiczną kumulowaną w ATP, lecz prawie w całości jest uwalniana w postaci ciepła (RASKIN i współaut. 1987, 1989).

W doświadczeniach wykonanych na nie-termogenicznym tytoniu (*Nicotiana tabacum*) potraktowanym egzogennym SA wykazano również znaczny wzrost zawartości alternatywnej oksydazy oraz stymulację szlaku alternatywnego oddychania. Egzogenne zastosowanie SA w stężeniu rzędu 0,13 µg/g biomasy kwiatów *Sauromatum guttatum* spowodowało wzrost temperatury kwiatostanu od 10°C do 14°C w odniesieniu do kontrolnych roślin. Wszystko wskazuje na to, że SA indukuje nie tylko eks-

presję genu kodującego syntezę alternatywnej oksydazy, ale także enzymów katalizujących przemianę glikolityczną i cykl Krebsa, które dostarczają protonów i elektronów do alternatywnego oddychania komórkowego. Spośród przebadanych 33 związków pokrewnych i analogów chemicznych SA, tylko kwas acetylosalicylowy i 2,6-dihydroksybenzoesowy powodowały indukcję ciepła w kwiatach (RASKIN i współaut. 1989, RASKIN 1992 a, 1995).

ROLA SA W PROCESACH ODPORNOŚCIOWYCH

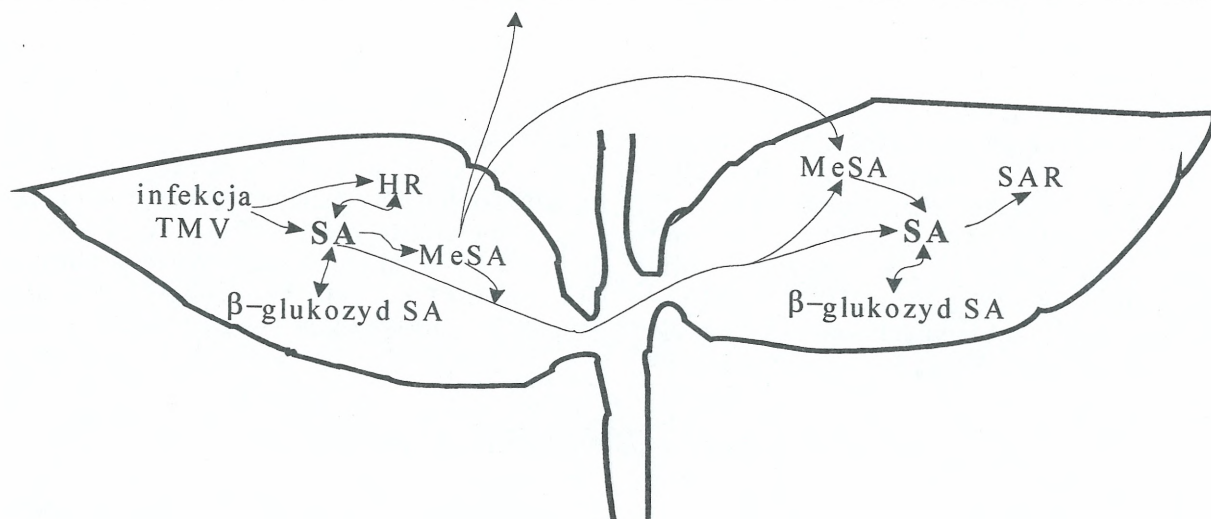
W ostatnich latach jest coraz więcej informacji naukowych odnośnie udziału SA jako molekularnego przekaznika w procesach odpornościowych roślin na choroby szczególnie wywołane przez patogeny wirusowe, bakteryjne i grzybowe o właściwościach nekrotyzujących. W liściach tytoniu i ogórka (*Cucumis sativus*) zainfekowanych wirusem mozaiki tytoniowej (TMV) lub patogennym grzybem *Colletotrichum lagenarium* wzrasta zawartość SA 10 do 50-krotnie w porównaniu do zdrowych roślin. Również u innych roślin należących do pospolitych warzyw, zbóż i drzew, na przykład topoli zarażonych patogenami jak: *Agrobacterium tumefaciens*, *Pseudomonas syringe*, *Colletotrichum falcatum*, *Fusarium oxysporum*, *Dothiciza populae*, *Phytophthora* sp. i wielu innymi, w okresie między 1 a 6 dniem po infekcji stwierdzono od 10 do 100-krotny wzrost zawartości SA w liściach i ekstraktach z tkanki sitowej lub łykowej (MALAMY i współaut. 1990, MALAMY i KLESSIG 1992, DELANEY i współaut. 1994, PALVA i współaut. 1994, MEUWLY i współaut. 1995, RASKIN 1995, DURNER i współaut. 1997).

W mechanizmach odpornościowych roślin na choroby spowodowane patogenami SA spełnia rolę czynnika indukującego syntezę i akumulację białek PR (pathogenesis related) związanych z przebiegiem patogenez. Intensywną biosyntezę białek PR stwierdzono u takich roślin zainfekowanych patogenami, jak: tytoń, pomidor, ziemniak, groch zwyczajny (*Pisum sativum*), fasola zwykła, ryż siewny, soja owłosiona (*Glycine max*), ogórek, burak cukrowy (*Beta vulgaris* var. *altissima*), czosnek pospolity (*Allium sativum* var. *sativum*) i rzodkiewnik pospolity (*Arabidopsis thaliana*) (RASKIN 1992a, KLESSIG i MALAMY 1994).

Badając genetyczną odporność tytoniu na różne patogeny potwierdzono, że SA indukuje ekspresję co najmniej kilkunastu genów kodujących syntezę peroksydazy oraz grupę kwasowych i zasadowych białek od PR-1 do PR-5 i dro-

bnocząsteczkowych protein o funkcji jeszcze nie poznanej, odpornych na działanie proteaz. Spośród białek PR zidentyfikowano dwa enzymy: β-1,3-glukanazę (PR-2) i chitynazę (PR-3). Okazało się, że SA aktywuje geny hamujące szlak biosyntezy jasmonianu oraz nie indukuje genów inhibitorów proteinaz oraz syntezy etylenu (MALAMY i współaut. 1990, 1992, DELANEY i współaut. 1994, Palva i współaut. 1994, Wobbe i KLESSIG 1996, DURNER i współaut. 1997).

Ostatnie badania dostarczają coraz więcej dowodów na to, że u roślin SA jest związkiem sygnałowym w systemicznej odporności nabytej (SAR, ang. systemic acquired resistance) i lokalnej, mimo że molekularny mechanizm przekazywania sygnału do odpowiednich genów nie jest w pełni poznany. Odporność systemiczna roślin ujawnia się po pewnym czasie od momentu pierwotnego zainfekowania, na przykład po kilku godzinach lub dniach. Jest ona skierowana nie tylko przeciwko patogenowi wywołującemu infekcję, ale również przeciwko innym patogenom. Odporność systemiczna obejmuje również pozostałe niezainfekowane części rośliny. Z kolei nabyta odporność lokalna polega na nabywaniu przez tkanki roślinne odporności w miejscu ich zainfekowania (ROGGERO i PENNAZIO 1988, RASMUNSEN i współaut. 1991, CHEN i współaut. 1995, RASKIN 1995, DURNER i współaut. 1997). Obecnie wiadomo, że obok SA również salicylan metylu (MeSA) może pełnić funkcję mobilnego i lotnego sygnalizatora, który aktywuje odporność na choroby poprzez ekspresję odpowiednich genów odpornościowych w zdrowych tkankach roślinnych tytoniu, a zarazem sąsiadujących z zainfekowanymi wirusem mozaiki tytoniowej (TMV) (ryc. 4). MeSA jest lotnym związkiem produkowanym przez komórki tytoniu zainfekowane TMV. Gazowy MeSA poprzez ruchy powietrza przedostaje się na zdrowe jeszcze części rośliny, skąd stosunkowo łatwo wnika do komórek, gdzie przekształca się w wolny SA. Jednocześnie wzrost poziomu SA i



Ryc. 4. Rola kwasu salicylowego i salicylanu metylu jako sygnalizatorów aktywujących odporność tytoniu na infekcje wirusem TMV (wg DURNERA i współaut. 1997).

jego rozchodzenie się po zdrowych częściach rośliny wiąże się z wytwarzaniem białek PR oraz nabywaniem odporności SAR przez zdrową, jak i zainfekowaną roślinę (SHULAEV i współaut. 1997).

W badaniach przeprowadzonych na tytoniu zainfekowanym wirusami TMV stwierdzono, że w temperaturze otoczenia powyżej 28°C w roślinach nie dochodzi do indukcji syntezy białek PR, a także następuje wzmożenie infekcji patogenem. Dotychczas w tych warunkach temperaturowych nie stwierdzono spadku zawartości SA. Doświadczenia wykonane na transgenicznym tytoniu zainfekowanym TMV wykazały, że gen *nahG* koduje enzym hydroksylazę salicylową powodującą przekształcenie SA w katechol, który jest niezdolny do indukcji systemów odporności SAR i SIS (MALAMY i współaut. 1992). Dopiero badania GAFFNEYA i współpracowników (1993) wykazały, że akumulacja SA jest niezbędna dla indukcji procesu SAR.

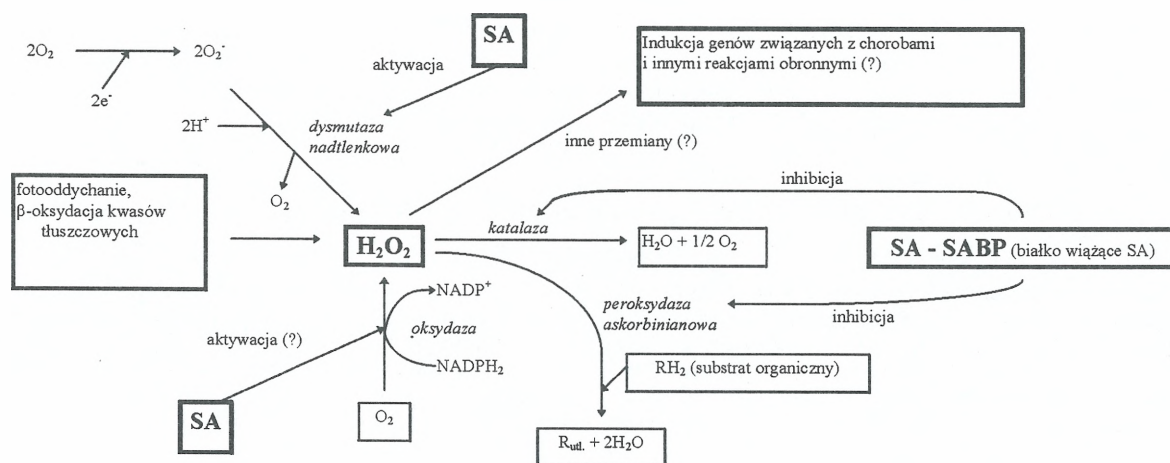
Kwas salicylowy podobnie jak większość roślinnych fenolokwasów pod wpływem specyficznej glikozylotransferazy ulega glikozylacji do β-glukozydu SA (SAG), którego zawartość wzrasta kilkakrotnie w liściach tytoniu między 2 a 3 dniem po infekcji TMV, przy jednoczesnym wzroście formy wolnej SA. W ten sposób zainfekowane rośliny gromadzą zapasy SA w formie glikozydowej jako SAG, który przy wzmożonej infekcji patogenami łatwo ulega hydrolizie z powrotem do SA, aby aktywnie kontynuować indukcję mechanizmów obronnych i odpornościowych (ENYEDI i RASKIN 1993, HENNIG i współaut. 1993).

Przy silnej infekcji w celach obronnych przed patogenami SA może być wydzielany pozakomórkowo do otoczenia. Z dotychczasowego przeglądu literatury wynika, że istnieje

ściśła korelacja między zawartością endogennego SA w zainfekowanych roślinach, a ekspresją genów związanych z regulacją systemów odporności nabytej i systemicznej oraz syntezą białek PR i peroksydazy (YALPANI i współaut. 1993a, b).

Rola SA w mechanizmach indukcji genów i transdukcji sygnałów związanych z odpornością nabytą i systemiczną oraz syntezą białek PR jako odpowiedzi obronnej na choroby wywołane patogenami bądź niektórymi stresowymi czynnikami natury fizykochemicznej lub metabolicznej poznano dokładniej po zidentyfikowaniu i biochemicznym scharakteryzowaniu białka receptorowego wiążącego kwas salicylowy (SABP). Receptor ten jest kompleksem białkowym zbudowanym z czterech podjednostek o masie cząsteczkowej analogicznej do katalazy oraz posiadającej zdolność do rozkładu H_2O_2 na H_2O i O_2 . SABP jest białkiem homologicznym do katalazy, odbierającym sygnał od SA i przekazującym dalej do genów związanych z odpornością roślin zainfekowanych bądź zestresowanych. Doświadczalnie wykazano, że w zainfekowanej roślinie SABP może tworzyć aktywne biologicznie odwracalne połączenia z kwasami: acetylosalicylowym i 2,6-dihydroksybenzoesowym. Przypuszcza się, że istnieją związki pośredniczące w indukcji genów przy udziale SA, odpowiedzialnych za syntezę białek PR oraz MAP-kinazy związanych z patogenezą i odpornością chorobową typu SAR i SIS (MÉTRAUX i współaut. 1990, GAFFNEY i współaut. 1993, VERNON i współaut. 1994, CHEN i współaut. 1995, RÜFFER i współaut. 1995, MUR i współaut. 1996, DU i KLESSIG 1997, ZHANG i KLESSIG 1997).

Znaczenie SA w regulacji metabolizmu H_2O_2 u roślin na przykładzie tytoniu zainfekowanego wirusem TMV przedstawia schemat na rycinie 5 (SÁNCHEZ-CASAS i KLESSIG 1994, RASKIN 1995,



Ryc. 5. Znaczenie kwasu salicylowego (SA) w metabolizmie H_2O_2 u roślin (wg KLESSIGA i MALAMY 1994, zmodyf.).

RÜFFER i współaut. 1995, DURNER i KLESSIG 1996). Dotychczasowe badania jednoznacznie wskazują, że H_2O_2 indukuje ekspresję genu kodującego syntezę białka PR-1 związanego z systemem odporności nabytej i systemicznej roślin (KLESSIG i MALAMY 1994, BI i współaut. 1995, LEON i współaut. 1995a, b, RAO i współaut. 1997).

W badaniach przeprowadzonych na soi owłosionej zainfekowanej bakteriami *Pseudomonas syringae* (TENHAKEN i RÜBEL 1997), a także na rzodkiewniku pospolitym znajdującym się w oksydacyjnym stresie (RAO i współaut. 1997) stwierdzono w komórkach roślinnych zależność między zawartością H_2O_2 a SA i jego wpływem na metabolizm nadtlenu wodoru. Kwas salicylowy, zwłaszcza w początkowej fazie działania wzmacnia aktywność miedziowo-cynkowej dysmutazy nadtlenkowej, a inaktywuje katalazę i peroksydazę askorbinianową. W ten sposób SA pośredniczy w niekorzystnym dla roślin oksydacyjnym utlenianiu za pomocą H_2O_2 lipidów, zwłaszcza nienasyconych kwasów tłuszczowych, części białek, chlorofilu i karotenów, co ujemnie wpływa na niektóre procesy biochemiczne, między innymi na fotosyntezę.

Prawdopodobnie SA jest niezbędny przy zaprogramowanej śmierci komórek roślinnych silnie zainfekowanych, bądź bardzo uszkodzonych czynnikami fizycznymi, względnie chemi-

cznymi. W tym przypadku SA działa jako inhibitor katalazy i peroksydazy askorbinianowej (MURPHY i współaut. 1993, MÖLDERS i współaut. 1996). W zainfekowanych komórkach roślinnych wytworzenie się stanu reakcji nadwrażliwości (HR, hypersensitive reaction) zależy od odpowiedniego awirulentnego genu (*avr*) i niskiego stężenia SA (ENYEDI i współaut. 1992, TENHAKEN i RÜBEL 1997).

W podsumowaniu należy podkreślić, że kwas salicylowy dość powszechnie występujący u roślin, a zwłaszcza jego intensywny wzrost zawartości w stanach chorobowych i niektórych stresowych wywiera istotny wpływ na liczne procesy metaboliczne i fizjologiczne, głównie dotyczące kwasów nukleinowych, białek, lipidów, węglowodanów, H_2O_2 i barwników fotosyntezujących oraz oddychania, termogenezy i fotosyntezy (RASKIN 1995). Poprzez bezpośrednie i pośrednie oddziaływania SA na te procesy, wywiera on istotny wpływ na kształtowanie interakcji biochemicznych w stanach adaptacyjnych, chorobowych i obronnych roślin, co ma podstawowe znaczenie ekologiczne i fitosocjologiczne. Dlatego też w niedalekiej przyszłości istnieje realna możliwość otrzymania roślin transgenicznych metodami inżynierii genetycznej o podwyższonej zawartości SA bądź jego analogów, zwiększających odporność roślin na patogeny i inne stresy (PIERPOINT 1994).

PODSUMOWANIE

Dotychczasowe badania wykonane na roślinach termo- i nietermogenicznych, zdrowych i zainfekowanych lub zestresowanych wskazują na to, że kwas salicylowy (SA) jest endogennym przekaźnikiem chemicznym indukującym al-

ternatywną oksydazę. SA stymuluje także oddychanie komórkowe na poziomie glikolizy i przemian cyklu kwasów trikarboksylowych. SA indukuje także wzrost temperatury podczas kwitnienia u roślin termogenicznych. Również

SA indukuje geny odpowiedzialne za mechanizmy odpornościowe roślin typu nabytego (SAR) na inwazję patogenów i niektórych czynników stresujących oraz indukuje syntezę białek PR

związanych bezpośrednio z patogenezą. Ponadto SA ma wpływ regulacyjny na przemiany metaboliczne H_2O_2 u roślin, zwłaszcza w stanach patologicznych i stresowych.

PHYSIOLOGICAL AND METABOLIC ACTIVITY OF SALICYLIC ACID IN PLANTS

Summary

Recent studies performed on thermogenic and non-thermogenic, healthy and infected plants indicated that salicylic acid (SA) as an endogenous regulator induces alternative oxidase, stimulates cell respiration at the level of glycolysis and tricarboxylate cycle, and also induces a temperature increase during flowering in thermogenic

plants. SA has been shown to induce the expression of defence-related genes, in response to pathogen infection, stress factors and induce a pathogenesis-related (PR) protein. SA has also a regulatory effect on metabolic reaction of H_2O_2 in plants, especially in pathological and stress interactions.

LITERATURA

- ABERG B., 1981. *Plant growth regulators. XII. Monosubstituted benzoic acids*. Swed. J. Agr. Res. 11, 913–1105.
- BI Y. M., KENTON P., MUR L., DARBY R., DRAPER J., 1995. *Hydrogen peroxide does not function downstream of salicylic acid in the induction of PR protein expression*. Plant J. 8, 235–245.
- BOWLES D., 1990. *Defense-related proteins in higher plants*. Ann. Rev. Biochem. 59, 873–907.
- CHEN Z., MALAMY J., HENNIG J., CONRATH U., SÁNCHEZ-CASAS P., SILVA H., RICIGLIANO J., KLESSIG D. F., 1995. *Induction, modification and transduction of the salicylic acid signal in plant defense responses*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92, 4134–4137.
- CHEN Z., SIVA H., KLESSIG D. F., 1993. *Active oxygen species in the induction of plant systemic acquired resistance by salicylic acid*. Science 262, 1883–1886.
- CZERPAK R., 1993. *Biochemia ogólna. Cz. I. Biochemia strukturalna*. Wyd. Uniwersytetu Warszawskiego, Filia w Białymstoku.
- DELANEY T. P., UKNES S., VERNOOIJ B., FRIEDRICH J., WEYMANN K., NEGRETTO D., GAFFNEY T., GUT-RELLA M., KESSMANN H., WARD E., RYALS J., 1994. *A central role of salicylic acid in plant disease resistance*. Science 266, 1247–1250.
- DOARES S. H., NARVAEZ-VASQUEZ J., CONCONI A., RYAN C. A., 1995. *Salicylic acid inhibits synthesis of proteinase inhibitors in tomato leaves by systemin and jasmonic acid*. Plant Physiol. 108, 1741–1746.
- DU H., KLESSIG D. F., 1997. *Identification of a soluble, high affinity salicylic acid – binding protein in tobacco*. Plant Physiol. 113, 1319–1327.
- DURNER J., KLESSIG D. F., 1996. *Salicylic acid is a modulator of tobacco and mammalian catalases*. J. Biol. Chem. 271, 28492–28501.
- DURNER J., SHAH J., KLESSIG D. F., 1997. *Salicylic acid and disease resistance in plants*. Trends Plant Sci. 2, 266–274.
- ENYEDI A. J., RASKIN I., 1993. *Induction of UDP-glucose: salicylic acid glucosyltransferase activity in tobacco mosaic virus – inoculated tobacco (Nicotiana tabacum) leaves*. Plant Physiol. 101, 1375–1380.
- ENYEDI A. J., YALPANI N., SILVERMAN P., RASKIN I., 1992. *Localization, conjugation and function of salicylic acid in tobacco during hypersensitive reaction to tobacco mosaic virus*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 2480–2484.
- FERRARESE L., MORETTO P., TRAINOTTI L., RASCIO N., CASADORO G., 1996. *Cellulase involvement in the abscission of peach and pepper leaves is affected by salicylic acid*. J. Exp. Bot. 47, 251–257.
- GAFFNÉY T., FRIEDRICH L., VERNOOIJ B., NEGRETTO D., NYE G., UKNES S., WARD E., KESSMANN H., RYALS J., 1993. *Requirement of salicylic acid for the induction of systemic acquired resistance*. Science 261, 754–756.
- GROSS D., PARTHIER B., 1994. *Novel natural substances acting in plant growth regulation*. J. Plant Growth Regul. 13, 93–114.
- HARBORNE J. B., 1997. *Ekologia biochemiczna* (tłum. z ang.). PWN, Warszawa.
- HENNIG J., MALAMY J., GRYNKIEWICZ G., INDULSKI J., KLESSIG D. F., 1993. *Interconversion of the salicylic acid and its glucoside in tobacco*. Plant J. 4, 593–600.
- JAKUBOWSKA A., MURACH A. P., KOWALCZYK S., 1996. *Nowe cząsteczki sygnałowe i związki regulujące wzrost i rozwój roślin*. Post. Biol. Kom. 23, 657–682.
- KAPULNIK Y., YALPANI N., RASKIN I., 1992. *Salicylic acid induces cyanide-resistant respiration in tobacco cell-suspension cultures*. Plant Physiol. 100, 1921–1926.
- KHURANA J. P., MAHESHWARI S. C., 1980. *Some effect of salicylic acid on growth and flowering to Spirodella polyrrhiza SP20*. Plant Cell Physiol. 21, 923–927.
- KLAMBT H. D., 1962. *Conversion in plants of benzoic acid to salicylic acid and its b-D-glucoside*. Nature 196, 491–492.
- KLESSIG D. F., MALAMY J., 1994. *The salicylic acid signal in plants*. Plant Mol. Biol. 26, 1439–1458.
- KOHLMÜNZER S., 1993. *Farmakognozja*. PZWŁ, Warszawa.
- LEON J., LAWTON M. A., RASKIN I., 1995a. *Hydrogen peroxide stimulates salicylic acid biosynthesis in tobacco*. Plant Physiol. 108, 1673–1678.
- LEON J., SHULAEV V., YALPANI N., LAWTON M. A., RASKIN I., 1995b. *Benzoic acid 2-hydroxylase a soluble oxygenase from tobacco catalyzes salicylic acid biosynthesis*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92, 1348–1356.
- LEON J., YALPANI N., RASKIN I., LAWTON M. A., 1993. *Induction of benzoic acid 2-hydroxylase in virus – inoculated tobacco*. Plant Physiol. 103, 323–328.
- LESLIE C. A., ROMANI R. J., 1988. *Inhibition of ethylene biosynthesis by salicylic acid*. Plant Physiol. 88, 833–837.
- LI N., PARSONS B. L., LIU D., MATTOO A. K., 1992. *Accumulation of wound – inducible ACC synthase transcript in tomato fruit is inhibited by salicylic acid and polyamines*. Plant Mol. Biol. 18, 477–487.
- MACHEIX J. J., 1996. *Les composés phénoliques des végétaux*. Acta Bot. Gal. 143, 473–479.
- MALAMY J., CARR J. P., KLESSIG D. F., RASKIN I., 1990. *Salicylic acid: a likely endogenous signal in the resistance response of tobacco to viral infection*. Science 250, 1002–1004.
- MALAMY J., HENNIG J., KLESSIG D. F., 1992. *Temperature – dependent induction of salicylic acid conjugates during*

- the resistance response to tobacco mosaic virus infection. *Plant Cell* 4, 359–366.
- MALAMY J., KLESSIG D. F., 1992. Salicylic acid and plant disease resistance. *Plant J.* 2, 643–654.
- MAUCH-MANI B., SLUSARENKO A. J., 1996. Production of salicylic acid precursors is a major function of phenylalanine ammonia-lyase in the resistance of *Arabidopsis* to *Peronospora parasitica*. *Plant Cell* 8, 203–212.
- MÉTRAUX J. P., SIGNER H., RYALS J., WARD E., WYSS-BENZ M., GANDIN J., RASH-DORF K., SCHMID E., BLUM M., INVERARDI B., 1990. Increase in salicylic acid at the onset of systemic acquired resistance in cucumber. *Science* 250, 1004–1006.
- MEUWLY P., MÖLDERS W., BUCHALA A., MÉTRAUX J. P., 1995. Local and systemic biosynthesis of salicylic acid in infected cucumber plants. *Plant Physiol.* 109, 1107–1114.
- MEUWLY P., MÖLDERS W., SUMMERMATTER K., STICHER L., MÉTRAUX J. P., 1994. Salicylic acid and chitinase in infected cucumber plants. *Acta Hort.* 1, 371–374.
- MÖLDERS W., BUCHALA A., MÉTRAUX J. P., 1996. Transport of salicylic acid in tobacco necrosis virus – infected cucumber plants. *Plant Physiol.* 112, 787–792.
- MURL A. J., NAYLOR G., WARNER S. A. J., SUGARS J. M., WHITE R. F., DRAPER J., 1996. Salicylic acid potentiates defense gene expression in tissue exhibiting acquired resistance to pathogen attack. *Plant J.* 9, 559–571.
- MURPHY T. M., RASKIN I., ENYEDI A. J., 1993. Plasma membrane effects of salicylic acid treatment on cultured rose cells. *Environ. Exp. Bot.* 33, 267–272.
- PALVA T. K., HURTING M., SAINDRENAN P., PALVA E. T., 1994. Salicylic acid induced resistance to *Erwinia carotovora* in tobacco. *Mol. Plant Microbe Interact.* 7, 356–363.
- PANCHEVA T. V., POPOVA L. P., UZUNOVA A. N., 1996. Effects of salicylic acid in growth and photosynthesis in barley plants. *J. Plant Physiol.* 149, 57–63.
- PIERPOINT W. S., 1994. Salicylic acid and its derivatives in plants: medicines, metabolites and messenger molecules. *Adv. Bot. Res.* 20, 163–233.
- RAO M. V., PALIYATH C., ORMROD D. P., MURR D. P., WATKINS C. B., 1997. Influence of salicylic acid on H_2O_2 production, oxidative stress and H_2O_2 metabolizing enzymes. *Plant Physiol.* 115, 137–149.
- RASKIN I., 1992a. Role of salicylic acid in plants. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 43, 439–463.
- RASKIN I., 1992b. Salicylate, a new plant hormone. *Plant Physiol.* 90, 799–803.
- RASKIN I., 1995. Salicylic acid. [W:] DAVIES P. J., (red.). *Plant Hormones. Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*. Kluwer Acad. Publ., Dordrecht – Boston – London, 188–205.
- RASKIN I., EHMANNA., MELANDER W. R., MEEUSE B. J. D., 1987. Salicylic acid – a natural inducer of heat production in *Arum lilies*. *Science* 237, 1545–1556.
- RASKIN I., SKUBATZ H., TANG W., MEEUSE B. J. D., 1990. Salicylic acid levels in thermogenic and non-thermogenic plants. *Ann. Bot.* 66, 376–383.
- RASKIN I., TURNER I. M., MELANDER W. R., 1989. Regulation of heat production in the inflorescences of an *Arum* lily by endogenous salicylic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86, 2214–2218.
- RASMUNSEN J. B., HAMMERSCHMIDT R., ZOOK M. N., 1991. Systemic induction of salicylic acid accumulation in cucumber after inoculation with *Pseudomonas syringae*. *Plant Physiol.* 97, 1342–1347.
- RHOADS D. M., MCINTOSH L., 1992. Salicylic acid regulation of respiration in higher plants: alternative oxidase expression. *Plant Cell* 4, 1131–1139.
- ROGGERO P., PENNAZIO S., 1988. Effects of salicylate on systemic invasion of tobacco plants by various viruses. *J. Phytopathol.* 123, 207–216.
- ROMANI R. J., HESS B. M., LESLIE C. A., 1989. Salicylic acid inhibition of ethylene production by apple discs and other plant tissue. *J. Plant Growth Regul.* 8, 63–70.
- ROUSTAN J. P., LATCHE A., FALLOT J., 1990. Inhibition of ethylene production and stimulation of carrot somatic embryogenesis by salicylic acid. *Biol. Plant.* 32, 273–276.
- RÜFFER M., STEIPE B., ZENK M. H., 1995. Evidence against specific binding of salicylic acid to plant catalase. *FEBS Lett.* 377, 175–180.
- SÁNCHEZ-CASAS P., KLESSIG D. F., 1994. Salicylic acid binding activity correlates with inhibition by salicylic acid of catalase activity in various plants. *Plant Physiol.* 106, 1675–1679.
- SILVERMAN P., NUCKLES E., YE X. S., KUC J., RASKIN I., 1993. Salicylic acid, ethylene, and pathogen resistance in tobacco. *Mol. Plant Microbe Interact.* 6, 775–781.
- SILVERMAN P., SESKAR M., KANTER D., SCHWEIZER P., MÉTRAN J. P., RASKIN I., 1995. Salicylic acid in rice. Biosynthesis, conjugation and possible role. *Plant Physiol.* 108, 633–639.
- SHULAEV V., SILVERMAN P., RASKIN I., 1997. Airborne signalling by methyl salicylate in plant pathogen resistance. *Nature* 385, 718–721.
- TENHAKEN R., RÜBEL C., 1997. Salicylic acid is needed in hypersensitive cell death in soybean but does not act as a catalase inhibitor. *Plant Physiol.* 115, 291–298.
- VERNOOLJ B., FRIEDRICH I., MORSE A., REIST R., KOLDITZ-JAWHAR R., WARD E., EKES S., KESSMANN H., RYALS J., 1994. Salicylic acid is not the translocated signal responsible for inducing systemic acquired resistance but is required in signal transduction. *Plant Cell* 6, 959–965.
- WOBBE K. K., KLESSIG D. F., 1996. Salicylic acid – an important signal in plants. [W:] DENNIS E. S. (red.). *Plant Gene Research*. Springer – Verlag, Berlin, 167–196.
- YALPANI N., LEON J., LAWTON M. A., RASKIN I., 1993a. Pathway of salicylic acid biosynthesis in healthy and virus – inoculated tobacco. *Plant Physiol.* 103, 315–321.
- YALPANI N., SHULAEV V., RASKIN I., 1993b. Endogenous salicylic acid levels correlate with accumulation of pathogenesis related proteins and virus resistance in tobacco. *Phytopathology* 83, 702–708.
- ZABZA A., 1989. Chemiczne podstawy oddziaływania roślinina – owad. *Kosmos* 38, 155–177.
- ZHANG S., KLESSIG D. F., 1997. Salicylic acid activates a 48 kDa MAP kinase in tobacco. *Plant Cell* 9, 809–824.