

IRENA SIEGIEŃ

*Zakład Fizjologii Roślin  
Instytut Biologii  
Uniwersytet w Białymstoku  
Świerkowa 20B, 15-950 Białystok  
e-mail: siegien@uwb.edu.pl*

## CYJANOGENEZA U ROŚLIN I JEJ EFEKTYWNOŚĆ W OCHRONIE ROŚLIN PRZED ATAKIEM ROŚLINOŻERCÓW I PATOGENÓW

### WSTĘP

Cyjanogeneza, czyli zdolność uwalniania cyjanowodoru (HCN) z tkanek roślin została stwierdzona dotychczas u ponad 2650 gatunków roślin wyższych należących do paprotników, roślin nagonasiennych i okrytonasiennych (jednoliściennych i dwuliściennych). Głównym źródłem HCN w roślinach są cyjanogenne glikozydy, a w przypadku nasion niektórych roślin należących do Sapindaceae i Hippocastanaceae – cyjanogenne lipidy (SEIGLER 1998). Niewielkie ilości cyjanowodoru mogą powstawać w roślinach podczas syntezy etylenu z kwasu 1-amino-cyklopropano-1-karboksyłowego (ACC) (YIP i YANG, 1988). Ponadto związek ten może być wytwarzany w tkankach roślin z glioksalanu i hydroksylaminy, produktów pośrednich odpowiednio fotooddychania i szlaku redukcji azotanów (HUCKLESBY i współaut. 1982). Cyjanowodór jest związkiem toksycznym dla organizmów zwierzęcych głównie z powodu hamowania aktywności oksydazy cytochromowej w mitochondrialnym łańcuchu oddechowym, jest też skutecznym inhibitorem innych enzymów zawierających metale. Z tego też względu związkom cyjanogennym (głównie cyjanoglikozydom) występującym w tkankach roślin, przypisuje się rolę ochronną przed roślinożercami (szczególnie owadami) i atakiem patogenów (NAHRSTEDT 1985).

Wyniki niektórych badań, opracowane przy użyciu metod statystycznych wskazują, że występowanie cyjanogenów warunkuje pewną specyficzność pokarmową roślinożerców (unikanie roślin cyjanogennych) (HRUSKA 1988, FENGRUI 1998). Pewne dane jednakże wskazują, że HCN może szkodzić również roślinom cyjanogennym, osłabiając działanie innych mechanizmów obronnych (LIEBEREI i współaut. 1989).

Wydaje się, że efektywność cyjanogenezy w „odstraszeniu” roślinożerców nie zależy tylko od obecności lub braku związków cyjanogennych w tkankach roślin. Wrażliwość różnych gatunków zwierząt na HCN i rośliny cyjanogenne, ilość zjedzonego pokarmu, jak też szybkość uwalniania cyjanowodoru z cyjanoglikozydów może mieć nie mniej ważne znaczenie. W artykule tym autorka pragnie przedyskutować powyższe zagadnienia w oparciu o nowe dane literaturowe, uwzględniając również sposób życia i pewne nawyki żywieniowe roślinożerców, jak też aktualne stężenia cyjanogenów w roślinach. Wyniki badań ostatnich lat, otrzymane przy użyciu metod inżynierii genetycznej, rzucające nowe światło na relacje roślina cyjanogenna – roślinożerca, będą również przedmiotem rozważań niniejszej pracy.

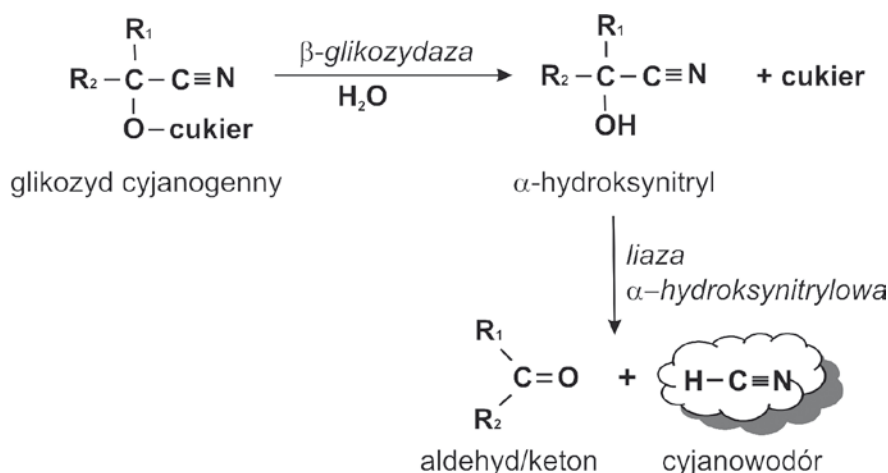
## GLIKOZYDY CYJANOGENNE – GŁÓWNE ŹRÓDŁO HCN W TKANKACH ROŚLIN

Wszystkie spośród wykrytych dotąd 75 glikozydów cyjanogennych są O-β-glikozydami α-hydroksynitryli, pochodzących od L-aminokwasów (walina, izoleucyna, leucyna, fenylalanina i tyrozyna), jak też aminokwasu niebiałkowego – cyklopentenyloglicyny. Zasadnicze różnice w budowie poszczególnych cyjanoglikozydów dotyczą budowy rodników R<sub>1</sub> i R<sub>2</sub>, a także reszty cukrowej związanej z grupą α-hydroksylową (SIEGIEŃ 1998, ZAGROBELNY i współaut. 2004) (Ryc. 1). Rośliny syntetyzujące cyjanogenne glikozydy, zwykle zawierają β-glikozydazy – enzymy hydrolizujące te związki do α-hydroksynitryli – cyjanohydrin (aglikonów) i cukru. W następnym etapie liazy hydroksynitrylowe katalizują dysocjację cyjanohydrin do związków karbonylowych i HCN (Ryc. 1). Cyjanohydriny są związkami niestabilnymi i mogą być degradowane, zależnie od pH (szybciej w środowisku alkalicznym) do związków karbonylowych i cyjanowodoru (HCN). W tkankach roślinnych jednakże, o lekko kwaśnym pH, liazy hydroksynitrylowe przyspieszają tę reakcję około 20-krotnie (NAHRSTEDT 1993).

Pomimo że enzymy (β-glikozydazy i liazy hydroksynitrylowe) i substraty (glikozydy cyjanogenne) często występują razem w tej samej roślinie, czy jej organie, są one jednak przestrzennie rozdzielone. Cyjanoglikozydy gromadzone są w centralnej wakuoli komórek roślin cyjanogennych, zaś enzymy hydrolytyczne mogą występować w cytoplazmie lub w przestrzeni apoplastycznej (VETTER 2000). Ponadto, jak wykazano dla sorgo (*Sorghum bicolor*), rośliny w której badano jednocześnie lokalizację enzymów hydrolytycznych i ich substratów, cyjanoglikozyd diury-

na występuje w wakuolach tkanki epidermalnej, natomiast diurynaza zlokalizowana jest w plastydach i cytozolu komórek mezofilu (KOJIMA i współaut. 1979). Uwalnianie HCN możliwe jest wówczas, gdy tkanki rośliny cyjanogennej zostają zmacerowane, np. podczas zjadania przez roślinożerców, w wyniku czego dochodzi do kontaktu cyjanoglikozydów i hydrolizujących je enzymów. W przypadku roślin zawierających glikozydy cyjanogenne a nie zawierających enzymu, hydroliza cyjanoglikozydów może zachodzić w przewodzie pokarmowym zwierzęcia, pod warunkiem że zwierzę lub jego endosymbionty wytwarzają β-glikozydazę (NAHRSTEDT 1993).

Organizmy żywe mają zdolność przekształcania HCN do mniej toksycznych związków. Jednym z najważniejszych procesów detoksykacji HCN w roślinach i u owadów jest przeniesienie CN<sup>-</sup> do cysteiny i wytworzenie β-cyanoalaniny (LECHTENBERG i NAHRSTEDT 1999; Ryc. 2, szlak 4). Katalizująca ten proces syntaza β-cyanoalaniny (β-CAS) zlokalizowana jest w mitochondriach, organellach, które są najbardziej podatne (narażone) na działanie toksycznego cyjanowodoru. Enzym ten występuje również u szeregu roślin nie akumulujących związków cyjanogennych i jego funkcją jest katalizowanie wiązania HCN powstającego jako ko-produkt w biosyntezie etylenu (YIP i YANG 1988). Innym enzymem jest rodanaza, katalizująca reakcję przekształcania cyjanowodoru i tiosiarczanu do tiocyjanianu i tiosiarczynu (Ryc. 2, szlak 1). Jest to główna droga detoksykacji HCN u zwierząt wyższych i człowieka, ale jej obecność stwierdza się także u roślin, owadów i mikroorganizmów (BEESLEY i współaut. 1985,



Ryc. 1. Powstawanie cyjanowodoru (HCN) w wyniku hydrolizy glikozydów cyjanogennych (wg ZAGROBELNEGO i współaut. 2004, zmieniona).

HATZFELD i SAITO 2000). Wydajność tego szlaku zależy od dostępności aminokwasów zawierających siarkę -metioniny i cysteiny, (JONES 1998). Kolejną drogą detoksykacji HCN u zwierząt wyższych i człowieka jest jego reakcja z hydroksykobalaminą z wytworzeniem cyjanokobalaminy (LECHTENBERG i NAHRSTEDT 1999) (Ryc. 2, szlak 2). Bezpośrednia reakcja

cyjanku z cysteiną prowadzi do powstania kwasu 2-imino-4-tiazolidyno-karboksylowego, produktu wydzielanego do moczu (LECHTENBERG i NAHRSTEDT 1999) (Ryc. 2, szlak 3). Inną drogą detoksykacji wykrytą u grzybów, jest uwodnienie HCN do formamidu przy udziale hydroliazy formamidu (WANG i współaut. 1999) (Ryc. 2, szlak 5).

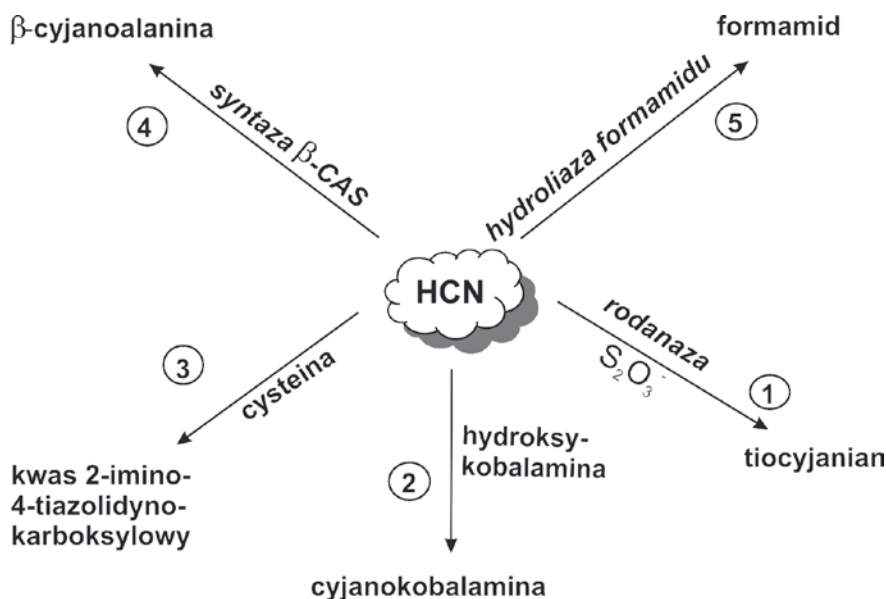
## STĘŻENIE ZWIĄZKÓW CYJANOGENNYCH W ROŚLINACH A ICH TOKSYCZNOŚĆ

W badaniach nad efektywnością glikozydów cyjanogennych w obronie przed roślinożercami, w wielu przypadkach bierze się pod uwagę jedynie obecność lub brak tych związków w tkankach roślin. Tymczasem ich stężenie w roślinach cyjanogennych, czy też potencjał cyjanogeny (potencjalna możliwość uwalniania cyjanowodoru – HCN-p, ang. cyanogenic potential) zmienia się znacznie w trakcie sezonu wegetacyjnego (STOCHMAL i OLESZEK 1997, STOCHMAL 2001). Zawartość cyjanoglikozydów zależy również od żywienia mineralnego (BUSK i MOLLER 2002), jak też od wielu czynników środowiskowych (VETTER 2000, NIEDŹWIEDŹ-SIEGIEŃ i GIERASIMUK 2001).

Wykazano, że podczas kiełkowania nasion fasoli Limańskiej (*Phaseolus lunatus*), HCN-p pozostaje na stałym poziomie (CLEGG i współaut. 1979). Natomiast nasiona sorgo nie zawierające cyjanoglikozydów, czy nasiona komonicy zwyczajnej (*Lotus corniculatus*), zawierające niewielkie ilości tych związków, syntetyzują je w szybkim tempie podczas kiełkowania (VETTER 2000, BUSK i

MOLLER 2002). Komonica, jak też inne rośliny paszowe, najwyższy HCN-p osiągają w fazie intensywnego wzrostu, szczególnie w czasie drugiego wzrostu po wykoszeniu (VETTER 2000). Rośliny lnu (*Linum usitatissimum*) natomiast charakteryzują się wysokim HCN-p na etapie wzrostu siewek, jak również w fazie generatywnej (NIEDŹWIEDŹ-SIEGIEŃ 1998).

Spośród wielu gatunków roślin cyjanogennych wyróżnić można kilka, które są polimorficzne pod tym względem, tzn. charakteryzujące się występowaniem osobników cyjanogennych i acyjanogennych: koniczyna biała (*Trifolium repens*), komonica zwyczajna, komonica wąskolistna (*Lotus tenuis*) i fasola limeńska (HUGHES 1991). U najlepiej poznanej koniczyny białej polimorfizm cyjanogeny kontrolują allele dwóch niezależnie segregujących się loci: *Ac/ac* odpowiedzialnych za syntezę linamariny i lotaustraliny i *Li/li* kontrolujących syntezę linamarazy – enzymu hydrolizującego te glukozydy. Fenotyp cyjanogeny wymaga obecności funkcjonalnych alleli obu loci. Naturalne populacje koniczyny mogą zatem zawierać cztery geno-



Ryc. 2. Główne drogi detoksykacji cyjanowodoru (HCN) w organizmach żywych (wg NAHRSTEDTA 1993, LECHTENBERGA i NAHRSTEDTA 1999, zmieniona).

(1), (4) – rośliny wyższe;  
(1), (2), (3) – zwierzęta; (5) – grzyby

typy: *AcLi*, *Acli*, *acLi* i *acli* (HUGHES 1991). Polimorfizm cyjanogeny obserwowany jest również w przypadku jadalnych roślin cyjanogennych, takich jak *Sorghum* spp., *Prunus* spp. (śliwy) czy też *Manihot* (maniok, kasawa) (NAHRSTEDT 1993).

Wyniki przedstawione w Tabeli 1 wskazują, że potencjalne stężenie HCN w różnych częściach danej rośliny cyjanogennej może znacznie się różnić. Duże ilości cyjanoglikozydów gromadzą nasiona niektórych gatunków roślin np. *Linum* spp., *Phaseolus* spp. czy *Prunus* spp. Szczególnie wysokim HCN-p charakteryzują się młode siewki, rosnące pędy i liście, np. *Linum* spp., *Phase-*

*olus* spp., *Prunus* spp., *Sorghum* spp., jak również kwiaty np. *Prunus* spp., *Linum* spp. (FREHNER i współaut. 1990, NIEDŹWIEDŹ-SIEGIEŃ 1998). Wysokie stężenie cyjanogenów znajduje się także w zewnętrznych częściach jadalnych bulw kasawy (CARDOSO i współaut. 2005). Reasumując, wysokie stężenia enzymatycznie uwalnianego HCN są zgromadzone w organach reprodukcyjnych, takich jak nasiona, owoce, kwiaty, ale również w młodych liściach i siewkach, tzn. w takich tkankach które ze względu na funkcję, lub etap rozwoju, wymagają szczególnej ochrony (BRUNT i współaut. 2006). Lokalizacja taka może być jednym z przystosowań

Tabela1. Stężenie enzymatycznie uwalnianego HCN z glikozydów cyjanogennych (HCN-p) różnych organów roślin (wg NAHRSTEDTA 1993, LECHTENBERGA i NAHRSTEDT 1999, zmodyfikowana).

Roślina	Organ	Potencjał cyjanogeny (mg HCN/ 100g św. m.)	Źródło HCN
Bambus ( <i>Bambusa vulgaris</i> )	Niedojrzałe pędy	300	Taksyfilina
	Wierzchołki siewek	800	
Brzoskwinia ( <i>Prunus persica</i> )	Nasiona	160	Amygdalina
	Liście	125	Prunazyna
Kasawa ( <i>Manihot esculenta</i> )	Liście	104	Linamaryna
	Kora bulw	84	Lotaustralina
	Wewn. części bulw	33	
Koniczyna biała ( <i>Trifolium repens</i> )	Młode liście	max. 350	Linamaryna Lotaustralina
Len ( <i>Linum usitatissimum</i> )	Wierzchołki siewek	910	Linamaryna
	Nasiona	21-54	Lotaustralina
Migdałowiec ( <i>Prunus amygdalus</i> )	Gorzkie nasiona	290	Amygdalina
	Młode liście	20	Prunazyna
Morela ( <i>Prunus armeniaca</i> )	Nasiona	40-400	Amygdalina Prunazyna
Sorgo ( <i>Sorghum bicolor</i> )	Wierz. pędów (etiol.)	240	Diuryna
	Młode zielone liście	60	
	Dojrzałe nasiona	max. 0.6	
Czereśnia ( <i>Prunus avium</i> )	Nasiona	ok. 100	Amygdalina Prunazyna
Laurowiśnia ( <i>Prunus laurocerasus</i> )	Liście	150	Prunazyna

rośliny do przetrwania i zakończenia całego cyklu rozwojowego.

Rośliny tropikalne, w odróżnieniu od rosnących w klimacie umiarkowanym, są bardziej narażone na atak roślinożerców, w szczególności owadów, ze względu na ich większą różnorodność gatunkową i całoroczną obecność. Odzwierciedleniem tego jest niewątpliwie częstotliwość cyanogenezy. Tak więc spośród roślin drzewiastych, zasiedlających regiony tropikalne 4% stanowią gatunki cyanogenne, charakteryzujące się szczególnie wysokim HCN-p w organach reprodukcyjnych. Natomiast w górzystych rejonach neotropików, obfitujących w paprocie, dominujący gatunek stanowi orlica *Pteridium arachnoideum*, składający się w 99% z form cyanogennych (ALONSO-AMELOT i OLIVEROS-BASTIDAS 2005).

Generalnie uważa się, że tkanki rośliny zawierające więcej niż 20 mg potencjalnego HCN w 100 g świeżej masy są toksyczne (NAHRSTEDT 1993). Stopień toksyczności zależy w dużej mierze od wrażliwości danego gatunku na HCN, przejawem której są różne dawki letalne, wynoszące odpowiednio (w mg/kg masy ciała) dla: owcy – 2,4, bydła – 2,0, myszy – 3,7, kota – 2,0, szczura – 0,5–10,0 i psa 1,5 (JONES 1998). Oszacowanie to zakła-

da, że cały HCN spożyty jest jednocześnie lub w bardzo krótkim czasie. Gdy pokarm cyanogeny jest zjadany powoli lub w niewielkich porcjach rozłożonych w czasie, dawka letalna może być 10–20 krotnie wyższa. Tak np. owca może zjeść z pokarmem 15–20 mg HCN/kg masy ciała/dzień w małych porcjach w ciągu całego dnia, nie przejawiając oznak zatrucia (JONES 1998). Dzieje się tak, ponieważ ssaki mają możliwość detoksykacji niewielkich dawek cyjanku, głównie na drodze enzymatycznej przy użyciu rodanazy (Ryc. 2, szlak 1). Należy jednak podkreślić, że oprócz ostrych zatruc, mogą wystąpić u zwierząt objawy zatruc chronicznych powodowanych produktami hydrolizy glikozydów cyanogennych (aldehydy, ketony), a także metabolitami detoksykacji HCN, głównie rodankami,  $\beta$ -cyjanoalaniną (NAHRSTEDT 1993).

Letalne dawki HCN dla człowieka, w przypadku spożycia doustnego, wahają się w granicach 0,5–3,5 mg/kg masy ciała (ok. 5  $\mu$ g/ml krwi). Stopień toksyczności zależy głównie od wieku – dzieci są bardziej podatne niż dorośli. Natomiast wśród dorosłych bardziej wrażliwe są osoby, których dieta uboga jest w białka, jak również palacze wykazujący niedobór witaminy B<sub>12</sub> (NAHRSTEDT 1993).

#### OD CZEGO ZALEŻY SKUTECZNOŚĆ CYANOGENEZY W OCHRONIE ROŚLIN PRZED ROŚLINOŻERCAMI ?

Roślinożercy w różny sposób reagują na obecność glikozydów cyanogennych w ich diecie. Różnice w efektywności tych związków w obronie przed roślinożercami mogą zależeć od kilku, czasami wzajemnie powiązanych czynników (GLEADOW i WOODROW 2002): (i) stężenie cyanoglikozydów w tkankach zjadanych roślin może nie przekraczać poziomu toksyczności; (ii) roślinożercy mogą należeć do tzw. grupy specjalistów, które mają wewnętrzne mechanizmy przeciwdziałające nadmiernemu nagromadzeniu się HCN; (iii) roślina cyanogenna stanowi jedynie pewną część diety roślinożercy, nie osiągając poziomu toksycznego; (iv) sposób pobierania pokarmu cyanogennego prowadzi do minimalnego uszkodzenia tkanki roślinnej, co ogranicza kontakt cyanoglikozydów i hydrolizujących je enzymów.

Biorąc pod uwagę rozważania przedstawione w poprzednim rozdziale można stwierdzić, że w zależności od warunków wzrostu

i etapu rozwoju, ta sama roślina cyanogenna może być mniej lub bardziej toksyczna dla roślinożerców. Zatem skuteczność cyanogenezy w obronie przed roślinożercami powinna być korelowana z aktualnym HCN-p tkanki roślinnej, a nie tylko faktem samej obecności cyanogenów w roślinie. Zaobserwowano na przykład, że stopień uszkodzenia liści drzewa eukaliptusowego (*Eucalyptus cladocalyx*) przez roślinożerców był odwrotnie proporcjonalny do stężenia glikozydów cyanogennych w tych organach (WOODROW i współaut. 2002). Podobnie, toksyczne dla pasących się zwierząt okazały się młode rośliny sorgo, o dużej zawartości cyanogenów, natomiast dojrzałe o niskim HCN-p, nie stanowiły dla nich żadnego zagrożenia (HASKINS i współaut. 1987).

Według BALLHORNA i współaut. (2005, 2006) odstraszaający efekt cyanogenezy zależy nie tylko od potencjału cyanogennej tkanki (HCN-p), lecz także (lub przede wszyst-

kim) od ilości toksycznego cyjanku, który może być uwolniony w jednostce czasu (ang. cyanogenic capacity, HCN-c). Autorzy ci wykazali, że liście *Phaseolus lunatus*, charakteryzujące się wysokim HCN-p (15  $\mu\text{mol}$  cyjanku/g św. m. liścia) i wysokim HCN-c (1  $\mu\text{mol}$  HCN/10 min.) nie były zjadane lub były zjadane w niewielkim stopniu przez niespecjalistę *Schistocera gregaria* (gatunek szarańczy afrykańskiej). Natomiast mniej cyjanogenne liście tej rośliny były konsumowane w dużej ilości, co w konsekwencji prowadziło do silnych zatruc. Na tej podstawie autorzy sugerują, że cyjanogeneza u *Phaseolus lunatus* pełni funkcję ochronną w dwojaki sposób:

wysoki HCN-p i HCN-c liści działa odstrasza- jąco na roślinożerców, zaś konsumpcja liści o niskim HCN-p i HCN-c wykazuje efekt toksyczny (BALLHORN i współaut. 2005). Chociaż sugestie te oparte są jedynie na analizach ilościowych dotyczących interakcji *Phaseolus lunatus-Schistocera gregaria*, nie można wykluczyć, że są one słuszne również w przypadku innych roślin cyjanogennych i ich potencjalnych roślinożerców. Wydaje się, że podobne strategie obronne wykorzystywane są w polimorficznych populacjach tropikalnej paproci (*Pteridium arachnoideum*), charakteryzujących się różnym HCN-c i HCN-p (ALONSO-AMELOT i OLIVEROS-BASTIDAS 2005).

#### CYJANOGENEZA A ORGANIZMY PREFERUJĄCE ROŚLINY CYJANOGENNE

Cyjanogeneza nie spełnia funkcji odstraszających dla roślinożerców należących do tzw. grupy specjalistów, które wykształciły pewne mechanizmy tolerujące cyjanogenne glikozydy (PROVENZA i współaut. 1992). Niektóre organizmy, takie jak larwa motyla *Heliconius sara*, potrafią izolować we własnym organizmie glikozydy cyjanogenne, pochodzące od rośliny na której żerują – *Passiflora auriculata* (męczennica), nie dopuszczając w ten sposób do uwolnienia cyjanowodoru. Pobierając pokarm larwy te „odrywają” kawałki cyjanogennych liści, żują je szybko i połykają, nie dopuszczając do uwolnienia HCN w jamie gębowej. Dodatkowo,  $\beta$ -glikozydaza roślinna inaktywowana jest prawdopodobnie przez proteazy znajdujące się w aparacie gębowym i jelicie owada (ALONSO-AMELOT i współaut. 2006). Związki te metabolizowane są następnie w ciele owada, a azot wykorzystywany jest do syntezy własnych białek (ENGLER i współaut. 2000). Niektórzy roślinożercy preferujący rośliny cyjanogenne, poza asymilacją azotu, wykorzystują pozyskiwane z roślin cyjanoglikozydy do własnej obrony przeciw drapieżcom (SCHAPPERT i SHORE 1999, ENGLER i współaut. 2000). Bardziej skomplikowane zależności roślina cyjanogenna-roślinożerca obserwowano w przypadku larw należących do gatunków *Zygaena* (Zygaenidae – Kraśnikowate), które preferują rośliny cyjanogenne z rodziny *Fabaceae* (Bobowate) (np. *Lotus corniculatus*). Owady te nie tylko zjadają cyjanogenne rośliny, ale same też syntetyzują linamarynę i lotaustralinę – cyjanoglikozydy obecne w tkankach zjadanej rośliny. Ponadto w ciele larw *Zygaena*

stwierdzono aktywność  $\beta$ -glikozydazy, liazy  $\alpha$ -hydroksynitrylowej i syntazy  $\beta$ -cyjanoalaniny, jak też wykryto  $\beta$ -cyjanoalaninę – produkt detoksykacji HCN (ZAGROBELNY 2004). Interesującym jest też, że większość cyjanogenów zgromadzonych jest w hemolimfie i powłokach ciała larw *Zygaena*. Związki te, wraz z w/w enzymami w momencie podrażnienia owada wydzielane zostają w postaci specjalnego roztworu (fluidu), przez odpowiednie otwory rozmieszczone na grzbietowej stronie ciała, odstrasza- jąco w ten sposób mięsożernych kręgowców. Pomimo obecności  $\beta$ -glikozydazy w hemolimfie, z powodu nieodpowiedniego pH (6,2) enzym ten nie jest aktywny i nie dochodzi w tych warunkach do uwolnienia HCN.  $\beta$ -glikozydaza owada uaktywnia się dopiero w żołądku drapieżcy o niskim pH, doprowadzając do jego zatrucia. Cyjanoglikozydy spełniają na tyle ważną rolę w ciele owada, że są przekazywane wszystkim jego kolejnym stadiom rozwojowym: poczwarkom, formom dorosłym, a nawet składanym przez samice jajom (ZAGROBELNY 2004). Związki te jednakże nie odstrasza- ją pasożytujących na *Zygaena* larw innego owada – *Apanteles zygaenarum* (Ichneumonoidea – gąsieniczniki), które metabolizują HCN, prawdopodobnie przy użyciu rodanazy (NAHRSTEDT 1985). Warto podkreślić, że zdolność do syntezy glikozydów cyjanogennych nie ogranicza się jedynie do Zygaenoidea, lecz także innych Lepidoptera (Motyle) (SCHAPPERT i SHORE 1999). Wykazano ponadto, że zdolność do syntezy i hydrolizy cyjanoglikozydów, jak też detoksykacji HCN, pozwala niektórym owadom na zmianę preferencji pokarmowych w obrę-

bie polimorficznych pod względem cyjanogenezy roślin, należących do Passifloraceae (Męczennicowate) (ZAGROBELNY i współaut. 2004).

Lemur (*Haplemur aurens*), żyjący na Madagaskarze, żywi się młodymi pędami bambusa (*Cephalostachym* cv. *viguieri*), zawierającymi duże stężenie związków cyjanogennych (Tabela 1). Pomimo tego, że dzienna dawka dostarczanego z pokarmem potencjalnego HCN przewyższa 12-krotnie dawkę letalną, zwierzę to unika (z nieznanymi jak dotychczas powodów) zatrucia. Dzięki tego typu preferencjom pokarmowym *H. aurens* może zasiedlać wspólne tereny wraz z innymi gatunkami (*H. griseus* i *H. sium*), które żywią się niecyjanogennymi roślinami *C. perrieri* i niecyjanogennymi częściami *C. viguieri* (GLANDER i współaut. 1989).

Pewne dane wskazują, że cyjanogeneza może szkodzić roślinom cyjanogennym, zwiększając ich podatność na określony typ patogena. Znane są przykłady grzybów, pasożytujących na roślinach cyjanogennych, które wykorzystują cyjanoglikozydy jako źródło azotu, wiążąc uwalniany z nich HCN dzięki aktywności hydrolazy formamidu (CHT) (WANG i współaut. 1999). Zaobserwowano, że liście odmian drzewa kauczukowego (*Hevea brasiliensis*) o wysokiej zawartości glikozydów cyjanogennych były bardziej podatne na porażenie grzybem *Microcyclus ulei* niż odmian o niskiej zawartości tych związków (LIEBEREI i współaut. 1989). Okazało się, że uwalniany podczas ataku grzyba HCN hamuje syntezę fitoaleksyny – skopoletyny, wykazującej właściwości obronne (LIEBEREI i współaut. 1989, OSBOURN 1996). Podobnie, odwrotną zależność między zawartością cy-

janoglikozydu epiheterodendryny i odpornością na mączniaka prawdziwego (*Blumeria graminis* f. sp. *hordei*) zaobserwowano również w liściach jęczmienia (*Hordeum vulgare*) (NIELSEN i współaut. 2006). Ponieważ w liściach tych nie stwierdzono aktywności  $\beta$ -glukozydazy (NIELSEN i współaut. 2006), przypuszczano, że wrażliwość na mączniaka nie jest związana z produkcją HCN. W celu zrozumienia tego zjawiska skonstruowano transgeniczne rośliny jęczmienia, którym przywrócono cyjanogenezę przez włączenie genu kodującego  $\beta$ -glukozydazę (diurynazę-2) z sorgo. Okazało się, że transgeniczne rośliny cyjanogenne były bardziej odporne na atak mączniaka, niż rośliny typu dzikiego, nie produkujące HCN. W dalszych doświadczeniach wykazano jednak, że powodem obniżonej infekcji na patogena w roślinach transgenicznych nie był uwolniony cyjanowodor, lecz obniżona zawartość epiheterodendryny (w wyniku jej hydrolizy), będącej źródłem azotu dla kiełkujących konidiów mączniaka (NIELSEN i współaut. 2006). Można zatem oczekiwać, że kolejnym krokiem prowadzącym do poprawienia odporności jęczmienia na porażenie mączniakiem będzie uzyskanie roślin niezdolnych do syntezy epiheterodendryny.

Odmienne wyniki uzyskali z kolei PANDEY i współaut. (1981) którzy wykazali, że rośliny lnu o wysokiej zawartości glikozydów cyjanogennych (ok. 150  $\mu\text{g/g}$  św. m.) były bardziej odporne na atak grzyba-mączniaka (*Oidium lini*) niż rośliny niskocyjanogenne (ok. 20  $\mu\text{g/g}$  św. m.). Istnieją doniesienia wskazujące, że aglikony uwalniane w wyniku hydrolizy niektórych cyjanogenów mogą wchodzić w skład związków przeciwdziałających atakowi grzybów (SIEBERT i współaut. 1996).

#### CYJANOGENEZA A ORGANIZMY UNIKAJĄCE ROŚLIN CYJANOGENNYCH

Istnieje wiele gatunków zwierząt wrażliwych na cyjanek, dla których cyjanogeny pokarm roślinny staje się mniej lub bardziej toksyczny. Tak jest w przypadku wszystkożernych ssaków, które unikają roślin cyjanogennych, a przy braku innego pokarmu, ten cyjanogeny zjadają w minimalnych ilościach (GLEADOW i WOODROW 2002). Nornica *Arvicola terrestris* preferuje niecyjanogenne formy koniczyny białej, formy cyjanogenne zjada (w dużo mniejszych ilościach) jedynie wówczas, gdy nie ma wyboru (SAUCY i współaut. 1999). Podobne preferencje pokarmowe w stosunku do koniczyny obserwowano w wa-

runkach polowych w przypadku jeleni i królików (SAUCY i współaut. 1999). Unikanie roślin cyjanogennych jest charakterystyczną cechą także innych grup zwierząt. Tak np., młode (wrażliwe), jak i starsze (bardziej tolerujące cyjanek) osobniki *Zonocerus variegatus* (Orthoptera – Prostoskrzydłe) żywią się cyjanogennymi liśćmi kasawy, tylko wówczas gdy nie mają do wyboru pokarmu niecyjanogenne (NAHRSTEDT 1985). Zaobserwowano ponadto, że tempo wzrostu osobników starszych znacznie się obniża, gdy zmusza się je do zjadania tylko cyjanogennych liści tej rośliny. Podobnie, młode kurczaki karmione

paszą z korzeni kasawy o większej zawartości cyjanogenów (gorzej oczyszczoną) rosły wolniej niż zwierzęta, żywiące się podobną paszą z niewielką pozostałością tych związków. Natomiast dorosłe kury były bardziej tolerancyjne na obecność cyjanogennej paszy w ich diecie (PANIGRAKI i współaut. 1992).

Cyjanoglikozydy zawarte w zjadonym materiale roślinnym mają często gorzki smak, co działa odstrasżająco na wrażliwych roślinożerców. Jednakże głodne zwierzęta nie eliminują pokarmu cyjanogennego ze swojej diety, co objawia się silnymi zatruciami, a przy większych dawkach nawet ich śmiercią. Jednym z takich przypadków było silne zatrucie stada kóz w Australii cyjanogennymi liśćmi z powalonego drzewa *Eucalyptus cladocalyx*. Głodne zwierzęta z powodu braku pokarmu spowodowanego suszą, zjadały duże ilości cyjanogennych liści w krótkim czasie, co doprowadziło do śmierci ponad połowy stada (WEBBER i współaut. 1985).

Istnieją liczne dowody na to, że niezhydrolizowane glikozydy cyjanogenne są wydzielane z organizmu zwierzęcego i nie wykazują żadnej toksyczności. Ich toksyczność ujawnia się po hydrolizie w przewodzie pokarmowym zwierzęcia, dzięki aktywności  $\beta$ -glikozydazy obecnej w zjadonym roślinnym pokarmie cyjanogenym, lub wytworzonej przez zwierzę czy też mikroorganizmy zasiedlające jego przewód pokarmowy. W doświadczeniach nad szczurami wykazano, że kontrolne zwierzęta zjadające amygdalinę (600 mg/kg masy ciała) umierały w ciągu 3-5 godzin, zaś pozbawione mikroorganizmów z przewodu pokarmowego zjadały te same dawki cyjanoglikozydu, nie wykazując żadnych objawów toksyczności (JONES 1998). Toksyczność rośliny cyjanogennej w dużej mierze zależy od warunków panujących w żołądku zwierzęcia. Większość  $\beta$ -glikozydaz wykazuje optymalną aktywność w obojętnym pH, toteż u zwierząt o kwaśnym trawieniu (np. koni) enzymy te pozostają nieaktywne i nie następuje zatrucie. Natomiast podatne na zatrucia są przeżuwacze, mające w przewodzie pokarmowym odczyn obojętny, sprzyjający wysokiej aktywności  $\beta$ -glikozydaz (JONES 1998).

Toksyczność roślin cyjanogennych dla zwierząt zależy także od sposobu zjadania przez nich masy roślinnej. Ssaki zjadają (żują) całe liście, co powoduje, że do przewodu pokarmowego dostają się zarówno związki cyjanogenne, jak i hydrolizujące je enzymy (CORK 1996). Natomiast różne grupy owadów po-

siadają różnego typu aparaty gębowe, co warunkuje sposób spożywania pokarmu. Owady posiadające aparat ssący (np. Pluskwiaki – Hemiptera) uszkadzają cyjanogenną tkankę roślinną w niewielkim stopniu, unikając w ten sposób zatrucia. Nie jest więc zaskoczeniem, że transgeniczne rośliny winogrona (*Vitis vinifera*), zdolne do akumulacji w korzeniach diuryny i uwalniania HCN, są atakowane przez filoksera winiec (*Daktulosphaira vitifoliae*, Hemiptera), w podobnym stopniu jak niecyjanogenne korzenie tej rośliny (FRANKS i współaut. 2006). Spożywanie zaś cyjanogennych liści przez owady o gryzącym typie aparatu gębowego (np. Coleoptera – Chrząszcze, Hymenoptera – Błonkoskrzydłe, Orthoptera – Prostoskrzydłe), prowadzi do mieszania cyjanoglikozydów i degradujących je enzymów, co może być przyczyną zatrucia tych roślinożerców. Owady takie, w odróżnieniu od posiadających aparat ssący, wybierają spośród roślin polimorficznych formy niecyjanogenne (GLEADOW i WOODROW 2002). Ciekawy sposób konsumpcji obserwowano u ślimaków, które na początku jedynie „nadgryzają” liście lub pędy rośliny cyjanogennej i zostawiają je. Po pewnym czasie, gdy w uszkodzonych liściach w wyniku szoku osmotycznego cyjanogeneza jest zakończona, mięczaki te wracają i jedzą ponownie już mniej toksyczne, lub nietoksyczne rośliny (JONES 1998). Wykazano ostatnio, że uszkodzenie rośliny cyjanogennej przez owady jest impulsem do znacznego podwyższenia aktywności  $\beta$ -glikozydazy na obszarze naruszonej tkanki, efektem czego jest zwiększona emisja toksycznego dla roślinożercy HCN. Co ciekawe, aktywność tego enzymu zostaje podwyższona w minimalnym stopniu po mechanicznym uszkodzeniu tkanki rośliny cyjanogennej (BALLHORN i współaut. 2006).

Przekonywujących dowodów na korzyść „odstrasżającej” (ochronnej) roli glikozydów cyjanogennych dostarczyły obserwacje, dotyczące zmian preferencji pokarmowych pchełki smużkowanej (*Phyllotreta nemorum*, Coleoptera), w stosunku do transgenicznych roślin rzodkiewnika (*Arabidopsis thaliana*) zdolnych do syntezy diuryny, powstałych przez włączenie odpowiedzialnych za to genów z sorgo (TATTERSALL i współaut. 2001). Chrząszcze te, preferujące *Arabidopsis* i inne rośliny należące do Brassicacea (Kapustowate), zjadały o 80% mniej krążków liściowych o wysokim stężeniu diuryny, niż kontrolnych. Ponadto, obecność diuryny w liściach obniżała atrakcyjność *Arabidopsis* dla larw *Phyl-*



*lotreta nemorum* i powodowała podwyższenie śmiertelności wśród tych owadów, które

zjadały transgeniczne rośliny (TATTERSALL i współaut. 2001).

#### CYJANOGENEZA W ROŚLINACH JADALNYCH I JEJ WPŁYW NA ZDROWIE CZŁOWIEKA

Badania nad wpływem jadalnych roślin cyjanogennych na człowieka były i nadal są skoncentrowane na kilku gatunkach, takich jak kasawa, fasola limeńska i sorgo, które są bogatym źródłem skrobi i/lub białka w pewnych regionach świata. Inne używane są jako pewne przysmaki, leki ziołowe lub służą do produkcji dżemów, soków czy alkoholi (NAHRSTEDT 1993). W skład diety człowieka (przynajmniej w niektórych regionach świata), poza podstawowymi, wymienionymi powyżej gatunkami, wchodzi m. in. nasiona gorzkich migdałów (*Prunus amygdalus*), fasoli limeńskiej i lnu, pędy bambusa, owoce marakui (*Passiflora edulis*), kielki fasoli „mung bean” (*Phaseolus radiatus*), orzeszki macadamii (*Macadamia integrifolia*) czy też siewki pieprzu (*Lepidium latifolium*). Wszystkie one są cyjanogenne. Wiele innych roślin cyjanogennych nie stanowi dla człowieka potencjalnego zagrożenia, gdyż ich jadalne części zawierają niewiele cyjanogenów lub nie zawierają ich wcale (Tabela 1). Młode pędy i liście niektórych zbóż (np. jęczmień, sorgo) zawierają związki cyjanogenne, zaś ich nasiona – nie. Cyjanogenne są natomiast nasiona jabłek, w odróżnieniu od jadalnego miąższu (LECHTENBERG i NAHRSTEDT 1999).

W zasadzie większość związków cyjanogennych zostaje eliminowana w czasie przetwarzania żywności, zatem otrzymywane produkty nie powinny stanowić większego zagrożenia dla zdrowia i życia człowieka. Z drugiej strony, nawet jeśli żywność nie jest starannie oczyszczona, organizm ludzki ma zdolność detoksykacji cyjanowodoru (30–60 mg/godz., Ryc. 2) pod warunkiem, że cyjanogeny produkt spożywany jest w niewielkich dawkach rozłożonych w czasie (JONES 1998). Nie mniej jednak, spożywanie gorzkich migdałów czy nasion moreli może doprowadzić do ostrych zatruc, szczególnie u dzieci (LECHTENBERG i NAHRSTEDT 1999). Znane są przypadki szkodliwości napojów czy soków z jabłek, przygotowywanych z owoców wraz z nasionami, szczególnie dla osób dotkniętych niektórymi chorobami oczu (JONES 1998)

Jedną z najważniejszych cyjanogennych roślin jadalnych jest kasawa, której bulwiaste korzenie są bogate w skrobię. W Afryce i Ameryce Łacińskiej roślina ta jest ważnym

źródłem energii (podstawowym pożywieniem) dla ponad 500 milionów ludzi (CARDOSO i współaut. 2005). Potencjał cyjanogeny kasawy zależy od obecności cyjanoglikozydów (linamaryny i lotaustraliny), których stężenie jest wysokie w odmianach gorzkich, a niskie – w słodkich (LECHTENBERG i NAHRSTEDT 1999). Ze względu na wyższą tolerancję na stres, lepszą odporność na infekcje i roślinożerców, jak też wysoką wydajność, w uprawach preferowane są raczej odmiany wysokocyjanogenne (PUONTI-KAERLAS 1998). Ponieważ około 70% cyjanogenów zlokalizowanych jest w warstwie korowej (perydermie), bulwy korzeniowe są obierane (okorowane). Niestety, równocześnie z cyjanoglikozydami usuwana jest również większość białek, które ze względu na zawartość aminokwasów siarkowych (metionina, cysteina) mogłyby warunkować sprawniejszą detoksykację HCN w organizmie człowieka. Inne procedury, takie jak wyflukiwanie w wodzie, mielenie, a następnie długotrwałe suszenie, nie eliminują całkowicie cyjanogenów i HCN z przygotowanych produktów (NAHRSTEDT 1993, TUNCEL i współaut. 1995), co w przypadku długotrwałej konsumpcji prowadzi do zakłóceń w pracy mózgu (kretynizmu), czy też schorzeń układu nerwowego. W wielu krajach centralnej i zachodniej Afryki zmielone korzenie kasawy poddawane są procesom fermentacji, przy użyciu niektórych bakterii i grzybów, rozkładających cyjanoglikozydy i metabolizujących HCN. Otrzymywane w ten sposób produkty, choć w mniejszym lub większym stopniu pozbawione zostają cyjanogenów i gorzkiego smaku, zawierają szkodliwe produkty detoksykacji HCN. Są nimi, wspomina- ne wcześniej, goitrogenne rodanki (produkty aktywności rodanazy), jak też  $\beta$ -cyjanoalanina o właściwościach neurotoksycznych (LECHTENBERG i NAHRSTEDT 1999). Nie przywiązuje się też wystarczającej wagi do obecności toksyn, wydzielanych przez mikroorganizmy używane do fermentacji. Dotyczy to nie tylko produktów spożywczych otrzymywanych z korzeni kasawy, lecz także innych, uzyskiwanych np. z nasion moreli, które ze względu na dużą zawartość białka, stosowane są do produkcji dżemów i soków (TUNCEL i współaut. 1990).

Morele, wiśnie, śliwy i różne owoce roślin należących do Rosaceae (zawierające amygdalinę i prunazyne), używane są do produkcji różnego typu brandy. Whisky natomiast jest produkowana ze słodu jęczmienia zawierającego epiheterodendrynę. Cyjanoglikozydy zawarte w nasionach tych roślin uwalniają podczas fermentacji HCN, który w obecności etanolu tworzy karbaminian etylu, związek o właściwościach karcynogennych. Jednakże ze względu na jego bardzo niskie stężenie w produkowanych alkoholach nie stanowi zagrożenia dla dorosłych konsumentów. Warto również podkreślić, że w trakcie fermentacji z cyjanoglikozydów powstają nie tylko toksyczne, lecz także pożyteczne związki, nadające alkoholom aromat i lekko gorzki smak (NAHRSTEDT 1993).

Jak wynika z powyższych rozważań, wiele różnorodnych procesów wykorzystuje się do eliminacji HCN podczas produkcji żywności z cyjanogennych roślin. Jak dotychczas, żadna z tych procedur, jak też wszystkie łącznie, nie pozwoliły na uzyskanie całkowicie nietoksycznych produktów bezpiecznych dla zdrowia człowieka. W ostatnich latach uzyskano transgeniczne rośliny kasawy z obniżoną zawartością linamaryny w liściach

i korzeniach, odpowiednio o 94% i 99% w stosunku do form dzikich (SIRITUNGA i SAYRE 2004). Chociaż korzenie te stanowią źródło nietoksycznej żywności, brak cyjanogenów w roślinie może być przyczyną obniżenia ilości i jakości plonów, spowodowanych większym atakiem roślinożerców i patogenów. Okazało się ponadto, że transgeniczne rośliny kasawy ze zredukowaną ilością linamaryny w liściach i korzeniach nie były w stanie rosnąć przy braku zredukowanego azotu ( $\text{NH}_3$ ), co wskazuje na inną niż obronna rolę tego cyjanogenu w roślinach kasawy (SIRITUNGA i SAYRE 2004). Alternatywną strategią prowadzącą do obniżenia toksyczności produktów otrzymywanych z kasawy jest przyspieszenie cyjanogenezy i ulatniania HCN podczas przetwarzania żywności. W tym celu otrzymano rośliny transgeniczne z nadekspresją genu liazy hydroksynitrylowej (HNL) w korzeniach, co spowodowało ponad trzykrotne przyspieszenie uwalniania HCN z cyjanohydryny w procesie przetworczym, w stosunku do korzeni typu dzikiego (SIRITUNGA i współaut. 2004). Rośliny takie, w odróżnieniu od acyjanogennych, nie tracą funkcji obronnych i mogą stanowić źródło nietoksycznej żywności.

#### PODSUMOWANIE

Chociaż odstraszaający efekt cyjanogenezy nie odnosi się do wszystkich roślin cyjanogennych i wszystkich ich potencjalnych konsumentów, wiele przykładów opisanych w niniejszej pracy wskazuje, że nie jest to zjawisko marginalne w relacjach roślina-cyjanogenna – roślinożerca. Zależności tych nie należy rozpatrywać w oderwaniu od warunków panujących w środowisku, które w znaczący sposób wpływają na potencjał cyjanogeny i toksyczność zjadanych roślin, jak też aktywność roślinożerców. Ponadto, jak wskazują najnowsze doniesienia (BALLHORN i współaut. 2005, 2006), głównym parametrem określającym oporność rośliny na atak roślinożerców jest raczej jej zdolność do szybkiego uwalniania HCN z tkanek cyjanogennych (HCN-c), a nie tylko jej cyjanogeny potencjał (HCN-p). Odporność transgenicznych roślin *Arabidopsis*, zdolnych do syntezy cyjanoglikozydów (TATTERSAL i współaut. 2001), jak również zwiększona podatność roślin kasawy o zredukowanej zawartości tych związków, na zjedanie przez preferujących je roślinożerców (SIRITUNGA i SAYRE 2004), jest prze-

konywującym dowodem, przemawiającym za ochronną funkcją związków cyjanogennych w roślinach. Z drugiej strony, akumulacja cyjanogenów w roślinach jadalnych, lub ich częściach, sprawia że rośliny te są mniej lub bardziej toksyczne dla człowieka. Wydaje się, że kolejne badania w tym zakresie, z zastosowaniem nowych roślin genetycznie zmodyfikowanych, mogą doprowadzić do uzyskania rozwiązań, które będą korzystne zarówno z punktu widzenia rośliny cyjanogennej, jak i człowieka. Należałoby jednakże pamiętać, że związki cyjanogenne poza ochronną, mogą pełnić inne, równie ważne funkcje w roślinach. Wykorzystywane są one w metabolizmie pierwotnym, m. in. jako źródło azotu w syntezie aminokwasów i białek (SEIGLER 1998, SWAIN i POULTON 1994). Ponadto HCN uwalniany w wyniku hydrolizy cyjanogenów może pełnić regulacyjną (sygnalną) rolę w wielu procesach fizjologicznych (DZIEWANOWSKA i współaut. 1979, BOGATEK i współaut. 2003). Zagadnienia te były ostatnio przedmiotem rozważań, przedstawionych w pracy przeglądowej SIEGIEŃ i BOGATEK (2006).

## CYANOGENESIS IN PLANTS AND ITS ROLE IN HERBIVORE DEFENSE

## Summary

Cyanogenesis is the process by which hydrogen cyanide is released from endogenous cyanide containing compounds, mainly cyanogenic glycosides. Cyanogenic glycosides are phytoanticipins known to be present in more than 2600 species. They are considered to have an important role in plant defense against herbivores due to bitter taste and release of toxic hydrogen cyanide as the result of tissue disruption. However, some specialized herbivores, especially insects, preferentially feed on cyanogenic plants. Such herbivores have acquired the ability to metabolize cyanogenic glycosides or to sequester them for use against their own predator defense. Indeed, in some cases, the produced plant cyanide actually acts as a phagostimulant rather than an inhibitor. This has led to a certain degree of scepticism regarding the role of cyanogenic glycosides as defense compounds. In this review the author argues that the ef-

fectiveness of cyanogenesis in deterring herbivores depends not only on morphology, physiology, and behavior of the herbivores, but also on the concentration of cyanogenic glycosides in the host plant, and the amount of toxic hydrogen cyanide, which can be released per unit time.

Many plants used for human nutrition contain cyanogenic glycosides (e.g. cassava, sorghum, lima bean), so cyanide poisoning by such a food is an important problem, especially in some regions of the world. The last part of this review describes briefly the human ability to detoxify cyanide, and processing methods leading to remove cyanogens during food preparation. The consequences for human nutrition and for plant-herbivore interaction of established transgenic cyanogen-free plants or plants with induced accelerated cyanogenesis are also discussed.

## LITERATURA

- ALONSO-AMELOT M. E., OLIVEROS-BASTIDAS A., 2005. *Kinetics of the natural evolution of hydrogen cyanide in plants in neotropical Pteridium arachnoideum and its ecological significance*. J. Chem. Ecol. 31, 315–331.
- ALONSO-AMELOT M. E., NUNEZ J. L. A., DUARTE L., OLIVEROS-BASTIDAS A., 2006. *Hydrogen cyanide release during feeding of generalist and specialist lepidopteran larvae on a cyanogenic plant, Passiflora capsularis*. Physiol. Entomol. 31, 307–315.
- BALLHORN D. J., LIEBEREI R., GANZHORN J. U., 2005. *Plant cyanogenesis of Phaseolus lunatus and its relevance for herbivore-plant interaction: the importance of quantitative data*. J. Chem. Ecol. 31, 1445–1473.
- BALLHORN D. J., HEIL M., LIEBEREI R., 2006. *Phenotypic plasticity of cyanogenesis in lima bean Phaseolus lunatus – activity and activation of  $\beta$ -glucosidase*. J. Chem. Ecol. 32, 261–275.
- BEESLEY S. G., COMPTON S. G., JONES D. A., 1985. *Rhodanese in insects*. J. Chem. Ecol. 11, 45–50.
- BOGATEK R., GAWROŃSKA H., ORACZ K., 2003. *Involvement of oxidative stress and ABA in CN-mediated elimination of embryonic dormancy in apple*. [W:] *The Biology of Seeds*. NICOLAS G., BRADFORD K. J., COME D., PRITCHARD H. W. (red.). Recent Research Adv. 211–216.
- BRUNT C., READ J., SANSON G. D., 2006. *Changes in resource concentration and defence during leaf development in a tough-leaved (Nothofagus moorei) and soft-leaved (Toona ciliata) species*. Oecologia 148, 583–592.
- BUSK P. K., MOLLER B. L., 2002. *Dhurin synthesis in sorghum is regulated at the transcriptional level and induced by nitrogen fertilization in older plants*. Plant Physiol. 129, 1222–1231.
- CARDOSO A. P., MIRIONE E., ERNESTO M., MASSAZA F., CLIFF J., HAQUE M. R., BRADBURY J. H., 2005. *Processing of cassava roots to remove cyanogens*. J. Food Comp. Anal. 18, 451–460.
- CLEGG D. O., CONN E. E., JANZEN D. H., 1979. *Developmental fate of the cyanogenic glucoside linamarin in Costa Rica wild Lima bean seeds*. Nature 278, 343–344.
- CORK S. J., 1996. *Optimal digestive strategies for arboreal herbivorous mammals in contrasting forest types: Why Koalas and Colobines are different*. Aust. J. Ecol. 21, 10–20.
- DZIEWANOWSKA K., NIEDŹWIEDŹ I., CHODELSKA I., LEWAK S., 1979. *Hydrogen cyanide and cyanogenic compounds in seeds. I. Influence of hydrogen cyanide on germination of apple embryos*. Physiol. Veg. 17, 279–303.
- ENGLER H. S., SPENCER K. C., GILBERT L. E., 2000. *Insect metabolism: Preventing cyanide release from leaves*. Nature 406, 144–145.
- FENGRUI L., 1998. *Severity of damage to Trifolium repens leaves by certain invertebrate species in mixed perennial ryegrass/white clover swards: response to cultivar, cutting frequency and sward characteristics*. Grass and Forage Sci. 54, 137–143.
- FRANKS T. M., POWELL K. S., CHOIMES S., MARSCH E., IOCCO P., SINCLAIR C. M., VAN HEESWIJCK R., 2006. *Consequences of transferring three sorghum genes for secondary metabolite (cyanogenic glucoside) biosynthesis to grapevine hairy roots*. Transgenic Res. 15, 181–195.
- FREHNER M., SCALET M., CONN E. E., 1990. *Pattern of the cyanide-potential in developing fruits*. Plant Physiol. 94, 28–34.
- GLANDER K. E., WRIGHT P. C., SEIGLER D. S., RANDRIANASOL B., 1989. *Consumption of cyanogenic bamboo by a newly discovered species of bamboo lemur*. Am. J. Primatol. 19, 119–124.
- GLEADOW R. M., WOODROW I. A., 2002. *Constraints on effectiveness of cyanogenic glycosides in herbivore defense*. J. Chem. Ecol. 28, 1301–1313.
- HASKINS F. A., GORZ H. J., JOHNSON B. E., 1987. *Seasonal variation in leaf hydrocyanic acid potential of low- and high-dhurin sorghums*. Crop Sci. 27, 903–906.
- HATZFELD Y., SAITO K., 2000. *Evidence for existence of rhodanese (thiosulfate:cyanide sulfurtransferase) in plants: preliminary characterisation of two rhodanese cDNAs from Arabidopsis thaliana*. FEBS Lett. 470, 147–150.
- HRUSKA A. J., 1988. *Cyanogenic glucosides as defense compounds. A review for evidence*. J. Chem. Ecol. 14, 2213–2217.
- HUCKLESBY D. P., DOWLING M. J., HEWITT E. J., 1982. *Cyanide formation from glyoxylate and hydrox-*

- ylamine catalyzed by extracts of higher plant leaves. *Planta* 156, 487-491.
- HUGHES M. A., 1991. *The cyanogenic polymorphism in Trifolium repens L. (white clover)*. *Heredity* 66, 105-115.
- JONES, D. A. 1998. *Why are so many food plants cyanogenic?* *Phytochemistry* 47, 155-162.
- KOJIMA M., POULTON J. E., THAYER S. S., CONN E. E., 1979. *Tissue distribution of dhurrin and of enzymes involved in its metabolism in leaves of Sorghum bicolor*. *Plant Physiol.* 63, 1022-1028.
- LIEBERE R., BIEHL B., GIESEMANN A., JUNQUEIRA N. T. V., 1989. *Cyanogenesis inhibits active defense reactions in plants*. *Plant Physiol.* 90, 33-36.
- LECHTENBERG M., NAHRSTEDT A., 1999. *Cyanogenic glycosides*. [W:] *Naturally Occuring Glycosides*. IKAN R. (red.). Wiley & Sons J., Chichester, New York, Weinheim, Brisbane, Singapore, Toronto, 147-191.
- NAHRSTEDT A., 1985. *Cyanogenic compounds as protecting agents for organisms*. *Plant Syst. Evol.* 150, 35-47.
- NAHRSTEDT A., 1993. *Cyanogenesis and foodplants*. *Proc. Phytoch. Soc. Eur.* 34, 107-129.
- NIEDŹWIEDŹ-SIEGIEŃ I., 1998. *Cyanogenic glycosides in Linum usitatissimum*. *Phytochemistry* 49, 59-63.
- NIEDŹWIEDŹ-SIEGIEŃ I., GIERASIMIUK A., 2001. *Environmental factors affecting the cyanogenic potential of flax seedlings*. *Acta Physiol. Plant.* 23, 383-380.
- NIELSEN K. A., HRMOVA M., NIELSEN J. N., FORSLUND K., EBERT S., OLSEN C. E., FINCHER S., MOLLER B. L., 2006. *Reconstitution of cyanogenesis in barley (Hordeum vulgare L.) and its implications for resistance against the barley powdery mildew fungus*. *Planta* 223, 1010-1023.
- OSBOURN A. E., 1996. *Preformed antimicrobial compounds and plant defense against fungal attack*. *The Plant Cell* 8, 1821-1831.
- PANDEY R. M., KUSH A. K., MISRA D. P., 1981. *Hydrocyanic acid content, a biochemical marker for reactions to powdery mildew in linseed*. *Curr. Sci.* 50, 902-904.
- PANIGRAKI S., RICKARD J., O'BRIEN G. M., GAY G., 1992. *Effects of different rates of drying cassava root on its toxicity to broiler chicks*. *British Poll. Sci.* 33, 1025-1041.
- PROVENZA F. D., PEISTER J. A., CHENEY C. D., 1992. *Mechanisms of learning in diet selection with reference to phytotoxicosis in herbivores*. *J. Range Manag.* 45, 36-45.
- PUONTI-KAERLAS J., 1998. *Cassava biotechnology*. *Bio-technol. Genetic Enginner. Rev.* 15, 329-364.
- SAUCY F., STUDER J., AERNI V., SCHNEITER B., 1999. *Preference for acyanogenic white clover (Trifolium repens) in the vole Arvicola terrestris. I. Experiments with two varieties*. *J. Chem. Ecol.* 25, 1441-1454.
- SCHAPPERT P. J., SHORE J. S., 1999. *Effects of cyanogenesis polymorphism in Turnera ulmifolia on Euptoieta hegestia and potential Anolis predators*. *J. Chem. Ecol.* 25, 1455-1479.
- SEIGLER D. S., 1998. *Cyanogenic glycosides and cyanolipids*. [W:] *Plant Secondary Metabolism*. SEIGLER D. S. (red.). Kluwer Academic Press, Boston, 273-296.
- SIEBERT M., SOMMER S., LI S., WANG Z. SEVERIN K., HEIDE L., 1996. *Genetic engineering of plant secondary metabolism. Accumulation of 4-hydroxybenzoate glucosides as a result of the expression of the bacterial ubs gene in tobacco*. *Plant Physiol.* 112, 811-819.
- SIEGIEŃ I., 1998. *Cyanogeneza u roślin*. *Post. Biochem.* 44, 325-333.
- SIEGIEŃ I., BOGATEK R., 2006. *Cyanide action in plants – from toxic to regulatory*. *Acta Physiol. Plant.* 28, 483-497.
- SIRITUNGA D., SAYRE R., 2004. *Engineering cyanogen synthesis and turnover in cassava (Manihot esculenta)*. *Plant Mol. Biol.* 56, 661-669.
- SIRITUNGA D., ARIAS-GARZON D., WHITE W., SAYRE R. T., 2004. *Over-expression of hydroxynitrile lyase in transgenic cassava roots accelerates cyanogenesis and food detoxification*. *Plant Biotechnol. J.* 2, 37-43.
- STOCHMAL A., OLESZEK W., 1997. *Changes of cyanogenic glycosides in white clover (Trifolium repens L.) during the growing season*. *J. Agric. Food. Chem.* 45, 4333-4336.
- STOCHMAL A., 2001. *Ekologiczne znaczenie związków cyjanogennych*. [W:] *Biochemiczne oddziaływania środowiskowe*. OLESZEK W., GŁOWNIAK K., LESZCZYŃSKI B. (red.). Akademia Medyczna, Lublin, 151-167.
- SWAIN E., POULTON J. E., 1994. *Utilisation of amygdalin during seedling development of Prunus serotina*. *Plant Physiol.* 106, 437-445.
- TATTERSAL D. B., BAK S., JONES P. R., OLSEN C. E., NIELSEN J. K., HANSEN M. L., HOJ P. B., MOLLER B. L., 2001. *Resistance to an herbivore through engineered glucoside synthesis*. *Science* 293, 1826-1828.
- TUNCCEL G., NOUT M., J., R., BRIMER L., GOKTAN D., 1990. *Toxicological, nutritional and microbiological evaluation of tempe fermentation with Rhizopus oligosporus of bitter and sweet apricot seeds*. *Int. J. Food Microbiol.* 11, 337-344.
- TUNCCEL G., NOUT M., J., R., BRIMER L., 1995. *The effects of grinding, soaking and cooking on the degradation of amygdalin of bitter apricot seeds*. *Food Chem.* 53, 447-451.
- VETTER J., 2000. *Plant cyanogenic glycosides*. *Toxicol.* 38, 11-36.
- WANG P., SANDROCK R. W., VANETTEN H. D., 1999. *Disruption of the cyanide hydratase gene in Gloeocercospora sorghi increases its sensitivity to the phytoanticipin cyanide but does not affect its pathogenicity on the cyanogenic plant sorghum*. *Fung. Gen. Biol.* 28, 126-134.
- WEBBER J. J., ROYCROFT C. R., CALLINAN J. D., 1985. *Cyanide poisoning of goats from sugar gums (Eucalyptus cladocalyx)*. *Aust. Vet. J.* 62, 28.
- WOODROW I. E., SLOCUN D. J., GLEADOW R. M., 2002. *Influence of water stress on cyanogenic capacity in Eucalyptus cladocalyx*. *Funct. Plant Biol.* 29, 103-110.
- YIP W.-K., YANG S. F., 1988. *Cyanide metabolism in relation to ethylene production in plant tissues*. *Plant Physiol.* 88, 473-476.
- ZAGROBELNY M., BAK S., RASMUSSEN V., JORGENSEN B., NAUMANN C. M., 2004. *Cyanogenic glycosides and plant-insect interactions*. *Phytochemistry* 65, 293-306.