

Uloga glukozinolata u obrani biljaka od nametnika

Sažetak

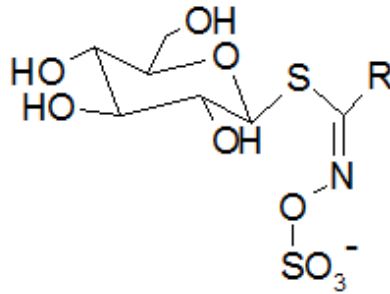
Glukozinolati su složena klasa spojeva tioglukozidne strukture svojstvena biljkama porodice *Cruciferae*, u koju ubrajamo značajne kulture kao što su uljana repica, kupus, cvjetača, brokula, koraba, kelj, hren, gorušica. Sve biljke koje sadrže glukozinolate sadrže i endogeni enzim hidrolize - mirozinazu (β -tioglukozid-glukohidrolaza, EC 3.2.1.1) u odijeljenim dijelovima biljke. Oštećenjem tkiva oni dolaze u kontakt s enzimom mirozinazom te ovisno o strukturi glukozinolata nastaju različiti biološki aktivni produkti razgradnje, koji imaju čitav niz bioloških svojstava, od toksičnih do antikarcinogenih. Udio i sastav glukozinolata razlikuje se između biljnih vrsta te između sorata istih vrsta te se mogu razlikovati unutar biljne jedinice ovisno o stupnju razvoja i vrsti organa. Različiti uvjeti okoliša u kojima se biljka nalazi, kao što su svjetlo, nutritivni status biljke, mehaničko oštećenje, infekcija fitopatogenima i oštećenja uzrokovana napadom insekata, mogu uzrokovati značajne promjene u sastavu i udjelu glukozinolata. Stoga postoji niz teorija o potencijalnoj ulozi glukozinolata u biljci, iako se njihova uloga u obrani biljke od insekata i fitopatogena smatra primarnom.

Ključne riječi: glukozinolati, fitopatogeni, mirozinaza, nametnici, obrana biljaka

Struktura i svojstva glukozinolata

Glukozinolati su složena skupina spojeva tioglukozidne strukture svojstvena biljkama porodice *Cruciferae*, u koju ubrajamo značajne kulture kao što su uljana repica, kupus, cvjetača, brokula, koraba, kelj, hren i gorušica. Glukozinolati imaju istu osnovnu strukturu: β -tioglukozidi u kojima je glikonski dio najčešće glukoza, a aglikonski dio tj. bočni lanac potječe od aminokiseline, prekursora u njihovoj biosintezi (slika 1). Prema strukturi aminokiseline glukozinolati se dijele na: alifatske (nastali iz metionina, izoleucina, leucina i valina), indolne (nastali iz triptofana) i aromatske (nastali iz fenilalanina i tirozina). Biosinteza glukozinolata može se podijeliti u tri stupnja: produženje lanca aminokiselina uvođenjem metilne skupine, pretvorba aminokiseline u osnovnu strukturu glukozinolata te oksidativne modifikacije osnovne strukture. Prvi stupanj se odnosi samo na glukozinolati koji nastaju iz derivata metionina, a druga dva stupnja zajednička su za biosintezu svih glukozinolata (Radojčić Redovniković i sur, 2008). Kao i kod drugih sekundarnih metabolita njihov udio i sastav ovisi o stupnju razvoja i okolišu u kojem se biljka nalazi. Do danas je poznato više od stotinu različitih glukozinolata, ali samo se neki od njih nalaze u većim udjelima u pojedinim biljnim vrstama (Avato i Argentieri, 2015). Najveći udjeli glukozinolata nađeni su u sjemenu biljaka, a potom u drugim biljnim organima u aktivnim stupnjevima rasta. Sastav glukozinolata i njihov međusobni odnos različit je u varijetetima iste vrste, pojedinim dijelovima iste biljke kao i u pojedinim stupnjevima razvoja biljke. Iako su geni biosintetskog puta skoro u cijelosti identificirani, regulacija biosinteze s ciljem manipulacije sastavom i udjelom glukozinolata u biljci nije dovoljno istražena (Halkier i Gershenzon, 2006).

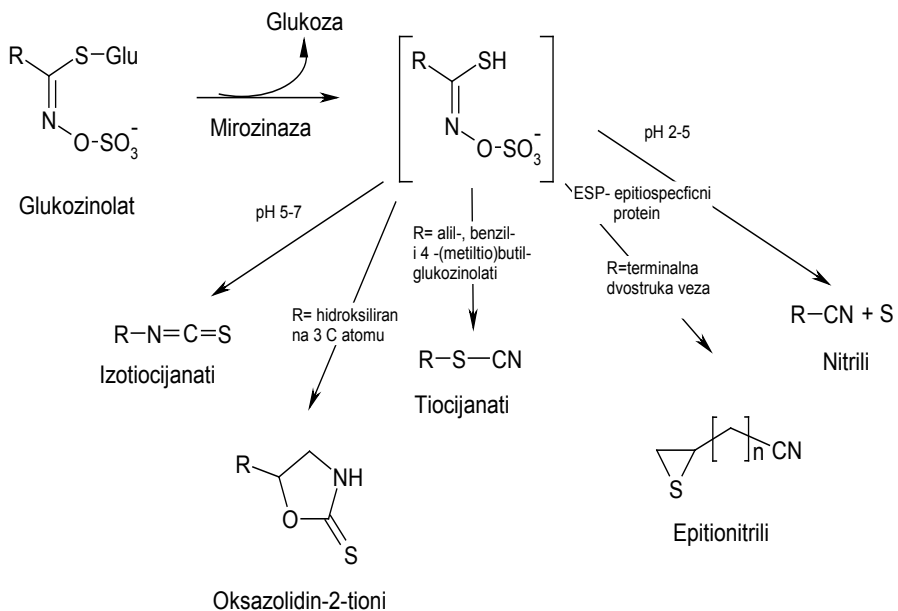
¹ Prehrambeno – biotehnološki fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Pierottijeva 6, 10000 Zagreb, Hrvatska



Slika 1. Opća struktura glukozinolata (*R* oznaka za bočni lanac)

Organizacija sustava glukozinolati/mirozinaza u biljci

Sve biljke koje sadrže glukozinolate sadrže i endogeni enzim hidrolize - mirozinazu (-tioglukozid-glukohidrolaza, EC 3.2.1.1) u odijeljenim dijelovima biljke. Oštećenjem tkiva oni dolaze u kontakt s enzimom mirozinazom te ovisno o strukturi glukozinolata nastaju različiti biološki aktivni produkti razgradnje, koji imaju čitav niz bioloških svojstava, od toksičnih do antikarcinogenih. Hidrolizom glukozinolata nastaje glukoza i nestabilni produkt koji podliježe spontanjoj Lossenovoj pregradnji i pritom, ovisno o strukturi bočnog lanca glukozinolata, uvjetima hidrolize te prisustvu kofaktora mogu nastati izotiocijanati, oksazolidin-2-tioni, nitrili, epitionitrili i tiocijanati (slika 2) (Rask i sur., 2000; Bones i Rossiter, 2006). Enzim mirozinazne aktivnosti utvrđen je i u plijesnima (*Aspergillus sydowi* i *Aspergillus niger*), bakterijama intestinalne mikroflore (*Enterobacter cloacae* i *Paracolobactrum aerogenoides*), sisavcima te lisnim ušima kupusnjača (Kazana i sur., 2007; Radojčić Redovniković i sur., 2008).



Slika 2. Opća shema enzimske hidrolize glukozinolata

Pri neutralnim uvjetima hidrolize najčešće nastaju izotiocijanati, a ako je na 2-C-atomu prisutna hidroksilna skupina u bočnom lancu nastali izotiocijanati su nestabilni i cikliziraju se u okazolidin-2-tione. U kiselim uvjetima uz prisustvo Fe^{2+} -iona *in vitro* nastaju nitrili dok je *in vivo* za nastajanje nitrila potreban proteinski faktor kao što je epitiospecifični protein (ESP). Glukozinolati s terminalnom dvostrukom vezom u bočnom lancu u prisustvu ESP hidrolizom daju epitionitrile, dok tiocijanati nastaju hidrolizom benzil-, alil- i 4-metilsulfinilbutil-glukozinolata. Razgradni produkti indolnih glukozinolata razlikuju se od gore navedenih budući da su nastali izotiocijanati pri neutralnim i slabo kiselim uvjetima nestabilni i stvaraju metanol-indole, konjugate s askorbinskom kiselinom te smjese oligomera (Lambrix i sur., 2001; Bernardi i sur., 2003). Zbog velikog niza bioloških svojstava istraživanja glukozinolata usmjerena su na različita područja kao što su agronomija, entimologija, ekologija, kemija, nutricionizam i medicina. Veliko zanimanje za kontrolu sastava i količine pojedinih glukozinolata u biljci potaklo je istraživanja njihove biosinteze, a većina istraživanja provedena su na modelnoj biljci *Arabidopsis thaliana*. Poznavanje biosinteze i njene regulacije omogućilo bi manipulaciju sastava glukozinolata i njihovih produkata hidrolize te dobivanje ratarskih kultura s poboljšanim svojstvima koji uključuju bolju otpornost prema nametnicima te poboljšana nutritivna svojstva, kao što su bolji okus i veći udio antikarcinogenih supstancija (Sønderby i sur., 2010).

Uloga sustava glukozinolati/mirozinaza u biljci

Udio i sastav glukozinolata razlikuje se između biljnih vrsta te između sorta istih vrsta te se mogu razlikovati unutar biljne jedinice ovisno o stupnju razvoja i vrsti organa. Različiti uvjeti okoliša u kojima se biljka nalazi, kao što su svjetlo, nutritivni status biljke, mehaničko oštećenje, infekcija fitopatogenima i oštećenja uzrokovana napadom insekata, mogu uzrokovati značajne promjene u sastavu i udjelu glukozinolata. Stoga postoji niz teorija o potencijalnoj ulozi glukozinolata u biljci, iako se njihova uloga u obrani biljke od insekata i fitopatogena smatra primarnom (Rask i sur., 2000; Wittstock i sur., 2004; Halkier i Gershenzon, 2006; Radojčić Redovniković i sur., 2008).

Uloga sustava glukozinolati/mirozinaza u interakcijama između biljke i kukca

U obrani od insekata glukozinolati i njihovi produkti hidrolize pokazuju toksičnost prema velikom broju nametnika koji se ubrajaju u opće štetnike, dok za nametnike koji su se specijalizirali za rast na biljkama koji sadrže glukozinolate mogu služiti kao signal koji ih privlači stimulirajući njihovo hranjenje ili nošenje jaja. U nekoliko istraživanja utvrđeno je da glukozinolati inhibitorno djeluju na veliki broj nespecijaliziranih nametnika uzrokujući najčešće nakupljanje glukozinolata i tako poboljšavajući sposobnost preživljavanja biljke (Radojčić Redovniković i sur., 2008). Praćenjem sastava i udjela glukozinolata u *A. thaliana* nakon napada dviju vrsta lisnih ušiju (specijalizirane i nespecijalizirane) te gusjenica neprilagođenih kukaca, uvrđena je indukcija kratkolančanih alifatskih glukozinolata za sve tri interakcije, dok je za gusjenice neprilagođenih kukaca utvrđena i indukcija dugolančanih alifatskih glukozinolata. U ovim pokusima nije uvrđena indukcija indolnih glukozinolata što nije bio slučaj u prijašnjim istraživanjima (Mewis i sur., 2005). Eksperimenti provedeni u polju s više sorti *Brassica napus*, koje se razlikuju po udjelu i sastavu glukozinolata, pokazali su da kod sorata s povećanim udjelom glukozinolata nastaju manja oštećenja kad su kukci nespecijalizirani, a suprotno tomu oštećenje biljake je bilo znatno veće nakon napada sa specijaliziranim kukcima. Također je utvrđeno da povećanje stupnja produžetka lanca i hidroksilacija bočnog lanca alifatskih glukozinolata pospješuje hranjenje specijaliziranog kukca *Psylliodes chrysocephala*. Praćenje ponašanja kukaca i elektrofiziološki eksperimenti potvrdili su da specijalizirani kukci neposredno reagiraju na glukozinolate i produkte njihove hidrolize, posebice hlapljive produkte koji također mogu privući i prirodne

neprijatelje kukaca kao što su paraziti koji sudjeluju u indirektnoj obrani biljke (Miles i sur. 2005; Ratzka i sur., 2002).

Kukci, koji su specijalizirani za rast na biljkama, moraju imati neki mehanizam zaštite od glukozinolata. Jedan od mehanizama uočen je u *Plutella xylostella* koja ima enzim sulfatazu koja katalizira odcjepljivanje sulfatne skupine u glukozinolatima te nastali desulfoglukozinolati ne mogu biti hidrolizirani mirozinazom. Kod *Pieris rape* utvrđeno je postojanje nitril-specifičnih proteina koji tijekom hidrolize umjesto izotiocijanata daju nitrile koji su manje toksični. Također je utvrđeno skladištenje glukozinolata unutar organizama kukaca i njihovo iskorištavanje za obranu uključujući mirozinazu koja može biti prirodno prisutna u kukcima ili njihovim neprijateljima. Tako na primjer lisna uš *Brevicoryne brassicae* ima prirodno mirozinazu koja nakupljene glukozinolate hidrolizira u izotiocijanate, koji služe kao alarm drugim lisnim ušima kolonije ukoliko je došlo do oštećenja (referenca).

Uloga sustava glukozinolati/mirozinaza u interakcijama između biljke i fitopatogena

Uloga sustava glukozinolati/mirozinaza u obrani od fitopatogena manje je istražena iako mnogobrojne studije ukazuju na toksičnost razgradnih produkata hidrolize prema fitopatogenim *in vitro*, a manji je broj studija koje su pokazale korelaciju između udjela glukozinolata i smanjenja osjetljivosti biljke na razvoj bolesti nakon napada fitopatogena. Kulture roda *Brassica* nazivaju se "prijelazne kulture" budući da glukozinolati i njihovi produkti hidrolize, otpušteni u zemlju, imaju inhibični učinak na patogene prirodno prisutne u zemlji. Eksperimenti provedeni u poljima pokazali su da pšenica ima bolji prinos nakon uzgoja indijske gorušice i uljane repice nego nakon pšenice. Prirodno prisutni mikroorganizmi u zemlji, gdje se uzgajaju biljke koje sadrže glukozinolate, razlikuju se od drugih s povećanom tolerancijom na izotiocijanate (Dufour i sur., 2015). Također je utvrđeno da određeni sojevi mikorize pokazuju bolji rast uz prisutnost razgradnih produkata indolnih glukozinolata. Toksičnost nekoliko produkata razgradnje glukozinolata istražena je u uvjetima *in vitro* i uvrđeno je da razgradni produkti, ovisno o njihovoj strukturi, pokazuju različito fungitoksično djelovanje. Produkti razgradnje aromatskih glukozinolata pokazuju izraženije fungitoksične učinke nego alifatski glukozinolati, čija toksičnost raste s porastom duljine bočnog lanca. Testirane su neke transformirane *Arabidopsis* biljke koje imaju promjenjen sastav glukozinolata. Tako je za mutante, koji imaju manji udio 4-metilulfinilbutil-izotiocijanata, dokazano da su osjetljiviji na napad *Fusarium oxysporum*, dok za nekoliko drugih plijesni to nije utvrđeno što ukazuje da pojedini razgradni produkti glukozinolata mogu služiti u obrani samo od određenih plijesni (Tierens i sur., 2001).

Važnost indolnih glukozinolata povezana je s pojavom bolesti korijena kod *Brassicaceae* kultura koju uzrokuje *Plasmodiphora brassicae*. Pojava ove bolesti praćena je povećanom koncentracijom auksina i citokina što dovodi do ubrzane diobe i produžetka stanica. Nastanak indol-3-octene kiseline (IAA) povezan je konverzijom indolnih glukozinolata u indol-3-acetonitril te daljnjom konverzijom nitrilazom u IAA. Istraživanje *Arabidopsis* mutanata s promjenjenom koncentracijom glukozinolata nije dovelo do jednoznačnog zaključka o njihovoj ulozi, ali je u gotovo svim mutantima kao i u divljoj sorti Columbia uočena povećana koncentracija indol-3-metil-glukozinolata te je u nekim mutantima uočena manja osjetljivost na razvoj bolesti. Kod nekih mutanata i sorte Columbia također je uočena povećana koncentracija nekih alifatskih glukozinolata (Radojčić Redovniković i sur., 2008; Halkier i Gershenzon, 2006).

Poput kukaca, neke plijesni imaju mehanizam kojim prevladavaju obrambeni sustav glukozinolati/mirozinaza u biljci pa je moguće da razgrađuju glukozinolate u netoksične ili manje toksične produkte prije razgradnje mirozinazom, razvijaju mehanizam detoksifikacije produkata nastalih razgradnjom mirozinazom te tijekom patogeneze daju produkte koji inhibiraju hidrolizu glukozinolata. Put razgradnje glukozinolata u netoksične ili manje toksične spojeve

bio bi najprihvatljiviji radi toga što patogeni organizmi preživljavaju obranu sustava glukozinolati/mirozinaza, a iz glukozinolata oslobođenu glukozu koriste kao hranjivi supstrat (Sexton i Howlett, 2000).

Zaključak

Iz cjelokupno dostupne literature o glukozinolatima može se zaključiti da glukozinolati sudjeluju u obrani biljke, ali njihovi mehanizmi djelovanja još uvijek nisu u potpunosti istraženi. Također se mora uzeti u obzir da su obrambeni mehanizmi biljke složeni procesi, koji ovise o uvjetima okoline i vrstama koje su uključene. Interakcija između okoline i pojedinih biljnih vrsta čini jedinstveni sustav koji na različite biotičke i abiotičke uvjete reagira pojedinačno, a odgovor mora biti precizno reguliran kako bi biljka pronašla najbolje rješenje za svoj opstanak i reprodukciju.

Literatura

- Avato, P., Argentieri, M. P. (2015) Brassicaceae: a rich source of health improving phytochemicals. *Phytochemistry Rev.* 14, 1019-1033.
- Bernardi, R., Finiguerra, M. G., Rossi, A. A., Palmieri, S. (2003) Isolation and biochemical characterization of a basic myrosinase from ripe *Crambe abyssinica* seeds, highly specific for epi-progoitrin. *J. Agric. Food Chem.* 51, 2737-2744.
- Bones, A. M., Rossiter, J. T. (2006) The enzymatic and chemically induced decomposition of glucosinolate. *Phytochemistry* 67, 1053-1067.
- Dufour, V., Stahl, M., Baysse, C. (2015) The antibacterial properties of isothiocyanates. *Microbiology* 161, 229-243.
- Halkier, B. A., Gershenzon, J. (2006) Biology and biochemistry of glucosinolates. *Annu. Rev. Plant Biol.* 57, 303-333.
- Kazana, E., Pope, T. W., Tibbles, L., Bridges, M., Pickett, J. A., Bones, A. M., Powell, G., Rossiter, J. T. (2007) The cabbage aphid: a walking mustard oil bomb. *Proc. Biol. Sc.* 274, 2271-2277.
- Lambrix, V., Reichelt, M., Mitchell-Olds, T., Kliebenstein, D. J., Gershenzon, J. (2001) The Arabidopsis epithiospecifier protein promotes the hydrolysis of glucosinolates to nitriles and influences *Trichoplusia* ni herbivory. *Plant Cell* 13, 2793-2807.
- Mewis, I., Appel, H. M., Hom, A., Raina, R., Schultz, J. C. (2005) Major signaling pathways modulate Arabidopsis glucosinolate accumulation and response to both phloem-feeding and chewing insects. *Plant Physiol.* 138, 1149-1162.
- Miles, C. I., del Campo M. L., Renwick, J. A. (2005) Behavioral and chemosensory responses to a host recognition cue by larvae of *Pieris rapae*. *J. Comp. Physiol. A.* 191, 147-155.
- Radojčić Redovniković, I., Glivetić, T., Delonga, K., Vorkapić-Furač, J. (2008) Glucosinolates and their potential role in plant. *Period. Biol.* 110, 297-309.
- Rask, L., Andreasson, E., Ekblom, B., Eriksson, S., Pontoppidan, B., Meijer, J. (2000) Myrosinase: gene family evolution and herbivore defence in Brassicaceae. *Plant Mol. Biol.* 42, 93-113.
- Ratzka, A., Vogel, H., Kliebenstein, D. J., Mitchell-Olds, T., Kroymann, J. (2002) Disarming the mustard oil bomb. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 11223-11228.
- Sexton, A. C., Howlett, B. J. (2000) Characterisation of a cyanide hydratase gene in the phytopathogenic fungus *Leptosphaeria maculans*. *Mol. Gen. Genet.* 263, 463-470.
- Sønderby, I. E., Geu-Flores, F., Halkier, B. A. (2010) Biosynthesis of glucosinolates - gene discovery and beyond. *Trends Plant Sci.* 15, 283-290.
- Tierens, K. F., Thomma, B. P., Brouwer, M., Schmidt, J., Kistner, K., Porzel, A., Mauch-Mani, B., Cammue, B. P., Broekaert, W. F. (2001) Study of the role of antimicrobial glucosinolate-derived isothiocyanates in resistance of Arabidopsis to microbial pathogens. *Plant Physiol.* 125, 1688-1699.
- Wittstock, U., Agerbirk, N., Stauber, E. J., Olsen, C. E., Hippler, M., Mitchell-Olds, T., Gershenzon, J., Vogel, H. (2004) Successful herbivore ontack due to metabolic diversion of a plant chemical defense. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 4859-4864.

Professional paper

Glucosinolates potential role in plant defence

Summary

Glucosinolates are sulfur- and nitrogen-containing plant secondary metabolites common in the Brassicaceae and related plant families. In the plant, they coexist with an endogenous β -thioglucosidase (EC 3.2.3.1) called myrosinase and upon plant tissue disruption, glucosinolates are released at the damage site and become hydrolyzed by myrosinase. The chemical nature of the hydrolysis products depends on the structure of the glucosinolate side chain, plant species and reaction conditions. Glucosinolate pattern differs between species and ecotype as well as between and even within individual plants, depending on developmental stage, tissue and photoperiod. A number of environmental conditions such as light plant, nutritional status, fungal infection, wounding and insect damage can alter the glucosinolate pattern significantly. The change of the glucosinolate profile by several environmental factors has brought forward different theories regarding their potential roles in the plant. However, the most accepted theory is that the glucosinolate-myrosinase system is involved in defense against herbivores and pathogens.

Key words: glucosinolates, insect/herbivore, myrosinase, phytopathogen, plant defence