



INSTYTUT CHEMII BIOORGANICZNEJ PAN

PRACOWNIA FITOCHEMII

Mariola Piślewska

**Rola β -glukozydazy ze ścian komórkowych łubinu
białego (*Lupinus albus* L.) w przemianach fenolowych
metabolitów wtórnych**

POZNAŃ 1999

Praca finansowana przez KBN w ramach projektów badawczych 6 P04C 022 13 oraz 6 P04C 107 08

BIBLIOTEKA
INSTYTUTU CHEMII BIOORGANICZNEJ
POLSKIEJ AKADEMII NAUK
ul. Noskowskiego 12/14
61-704 POZNAŃ

D-36

*Panu Docentowi dr hab. Przemysławowi Wojtaszkowi
za wskazanie interesującego tematu badawczego,
wszechstronną pomoc w czasie realizacji pracy doktorskiej
oraz okazaną mi cierpliwość i wyrozumiałość*

Składam podziękowanie



Panu Profesorowi dr hab. Krzysztofowi Gulewiczowi

Koleżankom i Kolegom z Pracowni Fitochemii

*dziękuję za pomoc,
miłą atmosferę i życzliwość*

Prof. dr hab. Krzysztof Gulewicz

Katedra i Zakład Historii i Kultury

Wrocław

Instytut Historii i Kultury

*Pawłowi dziękuję za cierpliwość
i pomoc przy redagowaniu pracy*

Mamie, Tacie, Siostrze i Bratu

.....bardzo dziękuję

Pracownicy dziękują za cierpliwość
i pomoc przy redagowaniu pracy

...bardzo dziękuję
Mariane Tache, Siostrze i Brian...

SPIS TREŚCI

STOSOWANE SKRÓTY I OZNACZENIA.....	8
1. CEL PRACY	10
2. PRZEGLĄD LITERATURY	11
2.1. WPROWADZENIE	11
2.2. β -GLUKOZYDAZY I ICH SUBSTRATY	11
2.2.1. Glukozydy cytokinin	12
2.2.2. Glukozydy monolignoli	14
2.2.3. Glukozyd kwasu salicylowego	17
2.2.4. Glikozydy cyjanogenne	18
2.2.5. Saponiny	21
2.2.6. Glikozydy nasercowe.....	24
2.2.7. Polisacharydy i oligosacharydy	26
2.2.7.1. β -1,4-glukohydrolazy	27
2.2.7.2. β -1,3-glukohydrolazy	29
2.3. FLAWONOIDY	30
2.3.1. Biosynteza i metabolizm flawonoidów	30
2.3.2. Funkcje flawonoidów w roślinach.....	34
2.3.2.1. Flawonoidy w reakcjach obronnych roślin	35
2.3.2.2. Flawonoidy w oddziaływaniach symbiotycznych roślin motylkowatych.....	40
2.4. IZOFLAWONOIDY W ŁUBINIE BIAŁYM	43
2.4.1 Profil i metabolizm izoflawonoidów w roślinach i zawiesinach komórkowych łubinu białego	43
2.4.2. Izoflawonoidy w oddziaływaniach symbiotycznych łubinu białego	46
2.4.3. Izoflawonoidy w reakcjach obronnych łubinu białego	48
3. MATERIAŁY I METODY	50
3.1. MATERIAŁ ROŚLINNY.....	50
3.2. STOSOWANE ODCZYNNIKI.....	50
3.2.1. Odczynniki i rozpuszczalniki	50
3.2.2. Standardy i substraty do testów enzymatycznych.....	51
3.2.3. Nośniki chromatograficzne	51
3.3. PRZYGOTOWANIE MATERIAŁU BIOLOGICZNEGO	52
3.3.1. Uprawa roślin	52

8	STOSOWANE SKRÓTY I OZNACZENIA
10	1. CEL PRACY
11	2. PRZEGLĄD LITERATURY
11	2.1. WPROWADZENIE
11	2.2. β -GLUKOZYDAZY I ICH SUBSTRATY
12	2.2.1. Glukozydy cytolizyn
14	2.2.2. Glukozydy monoglin
17	2.2.3. Glukozyd kwasu salicylowego
18	2.2.4. Glukozydy cyjanogenne
21	2.2.5. Saponiny
24	2.2.6. Glukozydy nadtlenowe
26	2.2.7. Poliacetyly i oligoacetyly
27	2.2.7.1. β -1,4-glikozydazy
29	2.2.7.2. β -1,3-glikozydazy
30	2.3. FLAWONOIDY
30	2.3.1. Biosynteza i metabolizm flawonoidów
34	2.3.2. Funkcje flawonoidów w roślinach
34	2.3.2.1. Flawonoidy w reakcjach obronnych roślin
40	2.3.2.2. Flawonoidy w oddziaływaniach sygnalizacyjnych roślin masykujących
43	2.4. IZORAWONOIDY W LUBIE BIAŁYM
43	2.4.1. Profil i metabolizm izorawonoidów w roślinach i zawiesinach komórkowych
43	lubinu białego
46	2.4.2. Izorawonoidy w oddziaływaniach sygnalizacyjnych lubinu białego
48	2.4.3. Izorawonoidy w reakcjach obronnych lubinu białego
50	3. MATERIAŁY I METODY
50	3.1. MATERIAŁ ROŚLINNY
50	3.2. STOSOWANE ODCZYNNIKI
50	3.2.1. Odczynniki i ropuszczalniki
51	3.2.2. Standardy i substraty do testów enzymatycznych
51	3.2.3. Metody chromatograficzne
52	3.3. PRZYGOTOWANIE MATERIAŁU BIOLOGICZNEGO
52	3.3.1. Uprawa roślin

3.3.2. Otrzymanie i charakterystyka elysatora drożdżowego	52
3.3.3. Oznaczanie aktywności YE - testy liścieniowe	53
3.3.4. Zmienność IGG w reakcji na bodźce biotyczne i abiotyczne – testy na siewkach łubinu	53
3.4. EKSTRAKCJA BIAŁEK	54
3.4.1. Frakcjonowanie białek z tkanki roślinnej	54
3.4.2. Oczyszczanie IGG	54
3.4.3. Wydzielanie białek obecnych w przestworach międzykomórkowych	55
3.4.4. Markery cytoplazmatyczne	55
3.5. CHARAKTERYSTYKA ILOŚCIOWA I JAKOŚCIOWA BIAŁKA	56
3.5.1. Oznaczanie ilości białka	56
3.5.2. Elektroforeza w żelu poliakryloamidowym w warunkach denaturujących (SDS-PAGE)	56
3.5.3. Elektroforeza w żelu poliakryloamidowym w warunkach niedenaturujących	57
3.5.4. Ogniskowanie izoelektryczne (IEF)	57
3.5.5. Techniki barwienia żeli	58
3.5.5.1. Wybarwianie rozdzielonych elektroforetycznie białek	58
3.5.5.2. Barwienie aktywności enzymatycznej IGG	59
3.5.6. Oznaczanie masy cząsteczkowej natywnego enzymu - sączenie żelowe	59
3.6. OKREŚLENIE AKTYWNOŚCI ENZYMATYCZNEJ IGG	60
3.6.1. Pomiar ilości uwolnionego <i>p</i> -nitrofenolu	60
3.6.2. Pomiar ilości uwolnionej genisteiny	60
3.6.3. Pomiar ilości uwolnionego cukru	61
3.6.4. Oznaczanie specyficzności substratowej IGG	61
3.6.5. Oznaczenie aktywności hydrolitycznej IGG wobec polisacharydów ścian komórkowych	62
3.7. IZOLACJA I CHARAKTERYSTYKA ZWIĄZKÓW FENOLOWYCH	62
3.7.1. Ekstrakcja związków fenolowych z tkanek roślinnych	62
3.7.2. Izolacja związków fenolowych z przestworów międzykomórkowych	63
3.7.3. Analiza związków fenolowych metodą chromatografii cienkowarstwowej	63
3.7.4. Analiza związków fenolowych metodą wysokorozdzielczej chromatografii cieczowej	64
4. WYNIKI	65
4.1. ASPEKTY METODYCZNE	65
4.1.1. Optymalizacja preparatyki IWF	65

3.3.2. Oczyszczenie i charakterystyka elektrolizera drożdżowego	23
3.3.3. Oznaczanie aktywności YB - test ilościowy	23
3.3.4. Zmienne IG w reakcji na bodźce biologiczne i abiotyczne – testy na sewkaśn jodinu	23
3.4. EKSTRAKCA BIAŁEK	24
3.4.1. Frakcjonowanie białek z tkanki roślinnej	24
3.4.2. Oczyszczenie IG	24
3.4.3. Wydziałanie białek opornych w przetworach międzykomórkowych	25
3.4.4. Markery cytoplazmatyczne	25
3.5. CHARAKTERYSTYKA LIŚCOWA I JĄDROCIOWA BIAŁKA	26
3.5.1. Oznaczanie ilości białka	26
3.5.2. Elektrofoza w żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących (SDS-PAGE)	26
3.5.3. Elektrofoza w żelu poliakrylamidowym w warunkach niedenaturujących	27
3.5.4. Oznaczanie izoelektryczne (IEP)	27
3.5.5. Techniki barwienia żeli	28
3.5.5.1. Wybarwienie jodolodowy elektrolizy białek	28
3.5.5.2. Barwienie aktywności enzymatycznej IG	29
3.5.6. Oznaczanie masy cząsteczkowej nagłowego trypanu - sekanie żelowe	29
3.6. OKREŚLENIE AKTYWNOŚCI ENZYMATYCZNEJ IG	60
3.6.1. Pomiar ilości zwolnionego p-nitrofenolu	60
3.6.2. Pomiar ilości zwolnionej gliceriny	60
3.6.3. Pomiar ilości zwolnionego cukru	61
3.6.4. Oznaczanie specyficzności substratu IG	61
3.6.5. Oznaczanie aktywności hydrolizacji IG wobec polisacharydów skian komórkowych	62
3.7. IZOLACJA I CHARAKTERYSTYKA ZWIĄZKÓW FENOLOWYCH	62
3.7.1. Izolacja związków fenolowych z tkanki roślinnej	62
3.7.2. Izolacja związków fenolowych z przetworów międzykomórkowych	63
3.7.3. Analiza związków fenolowych metodą chromatografii cienkowarstwowej	63
3.7.4. Analiza związków fenolowych metodą wysokorozdzielczej chromatografii ciężkiej	64
4. WYBÓR	65
4.1. ASPEKTY METODYCZNE	65
4.1.1. Opтимalizacja preparacji IWT	65

4.1.2. Przygotowanie i określenie aktywności preparatów elisytora ze ścian komórkowych drożdży	68
4.2. AKTYWNOŚĆ IGG I PROFILE ZWIĄZKÓW FENOLOWYCH W TESTACH LIŚCIENIOWYCH.....	70
4.3. TKANKOWA I SUBKOMÓRKOWA LOKALIZACJA IGG.....	73
4.3.1. Aktywność IGG w populacjach białek cytoplazmatycznych i białek ścian komórkowych.....	73
4.3.2. Aktywność IGG w IWF	75
4.4. CHARAKTERYSTYKA AKTYWNOŚCI IGG	75
4.4.1. Oczyszczanie IGG	75
4.4.2. Parametry fizykochemiczne.....	80
4.4.2.1. Masa cząsteczkowa	80
4.4.2.2. Punkt izoelektryczny	82
4.4.2.3. Optimum pH.....	82
4.4.2.4. Specyficzność substratowa.....	83
4.4.3. Aktywność hydrolityczna IGG wobec polisacharydów ścian komórkowych	89
4.5. KORELACJA AKTYWNOŚCI IGG I PROFILI ZWIĄZKÓW FENOLOWYCH W ROŚLINACH ZDROWYCH LUB PODDANYCH DZIAŁANIU CZYNNIKÓW ŚRODOWISKOWYCH.....	90
4.5.1. Profil związków fenolowych w różnych częściach zdrowych roślin	90
4.5.2. Profil związków fenolowych w IWF	91
4.5.3. Zmiany aktywności IGG w poszczególnych częściach roślin wywołane działaniem elisytora drożdżowego	91
4.5.4. Wpływ preparatu YE oraz różnych form nawożenia azotowego na wydzielanie związków fenolowych oraz aktywność IGG w korzeniach łubinu białego	95
5. DYSKUSJA	100
5.1. AKTYWNOŚĆ PREPARATU YE.....	100
5.2. TKANKOWA I SUBKOMÓRKOWA LOKALIZACJA IGG I IZOFLAWONOIDÓW	102
5.3. WŁAŚCIWOŚCI FIZYKOCHEMICZNE IGG	105
5.4. ZMIANY AKTYWNOŚCI IGG W TESTACH BIOLOGICZNYCH	107
6. PODSUMOWANIE	111
7. LITERATURA	112

4.1.2. Przygotowanie i określenie aktywności preparatów elizyjna za pomocą	68
konduktometryczny	
4.2. AKTYWNOŚĆ IGG PRZECIŁE ZWIĄZKÓW FENOLOWYCH W TESTACH	70
IMUNOASYMPTOMATYCZNYCH	
4.3. TRĄPKOWA I SUBTRĄPKOWA LOKALIZACJA IGG	73
4.3.1. Aktywność IGG w populacjach kręków ektoparasytarycznych i dialekt	73
kręków konduktometryczny	
4.3.2. Aktywność IGG w IWF	75
4.4. CHARAKTERYSTYKA AKTYWNOŚCI IGG	75
4.4.1. Odczynienie IGG	75
4.4.2. Parametry fizykochemiczne	80
4.4.2.1. Masa cząsteczkowa	80
4.4.2.2. Punkt izoelektryczny	82
4.4.2.3. Optyczna gęstość	82
4.4.2.4. Specyficzność odzwierciedlenia	83
4.4.3. Aktywność hydrolizująca IGG wobec połączeń zainfekowanych	89
4.5. KORELACJA AKTYWNOŚCI IGG I PROFILI ZWIĄZKÓW FENOLOWYCH W	
ROZDRAŻNIENIACH ZDROWYCH LUB PODDANYCH DZIAŁANIU CZYNNIKÓW	
ŚRODOWISKOWYCH	90
4.5.1. Profil związków fenolowych w różnych częściach zdrowych roślin	90
4.5.2. Profil związków fenolowych w IWF	91
4.5.3. Zmiany aktywności IGG w poszczególnych częściach roślin wywołane	
działaniem elizyjna drożdżowego	91
4.5.4. Wpływ preparatu YE oraz różnych form nawożenia azotowego na wydzielanie	
związków fenolowych oraz aktywność IGG w korzeniach roślin dialekt	93
2. DYSKUSJA	100
2.1. AKTYWNOŚĆ PREPARATU YE	100
2.2. TRĄPKOWA I SUBTRĄPKOWA LOKALIZACJA IGG I IZOLACJA WOIWÓD	102
2.3. WŁAŚCIWOŚCI FIZYKOCHEMICZNE IGG	103
2.4. ZMIANY AKTYWNOŚCI IGG W TESTACH BIOLOGICZNYCH	107
6. PODSUMOWANIE	111
7. LITERATURA	112

STOSOWANE SKRÓTY I OZNACZENIA

BSA	albumina z surowicy bydłej
BPB	błękit bromofenolowy
CBB	Coomassie Brilliant Blue G-250
ConA	konkanawalina A
DMSO	dimetylosulfotlenek
EDTA	wersanian dwusodowy
EtOAc	octan etylu
EtOH	etanol
Fast Blue B	3,3'-dimetoksybenzydyna
Gly	glicyna
GT	glukozylotransferaza
HOAc	kwasy octowy
HPLC	wysokorozdzielcza chromatografia cieczowa
HR	reakcja nadwrażliwości
IGG	glukozydaza glukozydów izoflawonoidów (EC 3.2.1.21)
IWF	płyn z przestworów międzykomórkowych
MDH	dehydrogenaza jabłczanowa
MeOH	metanol
NADH	dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy, forma zredukowana
NADP ⁺	fosforan dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego, forma utleniona
NaOAc	octan sodu
MS	pożywka płynna wg Murashige i Skooga (1962)
MUG	β -D-glukopyranozyd 4-metyloumbelliferonu
PAGE	elektroforeza w żelu poliakryloamidowym
PAL	amoniakoliza fenyloalaniny (EC 4.3.1.5)
<i>p</i> NPG	β -D-glukozyd <i>p</i> -nitrofenolu
PR	białka klasy PR (obronne)

STOROWANE SŁOWY I OZNACZENIA

albumina z krowicy (głęboki)	BZA
białki brodawkowe	BPB
Coomassie Brilliant Blue G-250	CBB
konkawatina A	ConA
dimetylosulfan	DMSO
werszian dwusobowy	EDTA
octan cyjru	EtOAc
etanól	EtOH
3,3'-dimetyloindolizyna	Fast Blue B
glicyna	Gly
glikocyfostaza	GT
kwas octowy	HOAc
wykorzystanie chromatografia cieczowa	HPLC
reakcja nadwzrostowa	HR
glikozylacja glikogenu (lektynowa) (EC 3.2.1.21)	IGG
białko z przeszwołu mięsnych	IWP
dehydrogenaza jabłkowa	MDH
metanol	MeOH
dimktozyd nikotynomidobenzimidazolowy, forma zredukowana	NADH
fosforan dimktozdu nikotynomidobenzimidazolowego, forma utleniona	NADP
octan sodu	NaOAc
potywna białka wg Minamide i Skoog (1967)	MS
β-D-glukopiranozyd 4-metyloamidoazotanu	MUG
elektrofoza w żelu poliakrylamidowym	PAGE
amoniakalaza fosfotlenowa (EC 3.1.1.2)	PAL
β-D-glukozyl p-nitrofenol	WPG
białka klasy PR (ozonem)	PR

PVP	poliwinylopyrolidon
RP	odwrócona faza
SA	kwasy salicylowe
SAR	nabyta odporność systemiczna
SDS	dodecylosiarczan sodu
SCX	silny kationit
św.m.	świeża masa
TCA	kwasy trichlorooctowe
TEMED	N,N,N',N'-tetrametyloetylenodiamina
TLC	chromatografia cienkowarstwowa
Tris	tri-(hydroksymetyleno)-aminometan
YE	elisytor drożdżowy

PVP	poliwinylopyrrolidon
RP	odwrócona fazą
SA	kwas salicylowy
SAR	nabycie odporności systemicznej
SDS	dobocyanian sodu
SCX	silny kationit
Sw.m.	świeża maza
TCA	kwas trichlorooctowy
TEMED	N,N,N',N'-tetrametyloetylenodiamina
T.C.	chromatografia ciekłofazowa
Tra	tri-hydroksymetylo-aminometan
YE	elektor chodzący

1. CEL PRACY

Fenolowe metabolity wtórne odgrywają istotną rolę w życiu roślin, szczególnie w ich oddziaływaniach z otaczającym środowiskiem. Związki te mogą występować konstytutywnie w roślinie jako wolne aglikony lub też w postaci połączeń glikozydowych. Aktywność biologiczną w oddziaływaniu z otoczeniem wykazują jednak głównie aglikony. Nieaktywne glikozydy metabolitów fenolowych mogą pełnić funkcję formy zapasowej lub transportowej. Uwolnienie aglikonów z tych połączeń będzie więc zależne od występowania i aktywności odpowiedniego enzymu hydrolitycznego.

Jak dotąd stwierdzono występowanie w różnych gatunkach roślin enzymów hydrolizujących glikozydy kilku klas metabolitów, w tym również niektórych grup związków fenolowych: monolignoli, kwasu salicylowego oraz flawonoidów. Te ostatnie charakteryzują się różnorodną aktywnością biologiczną i są szeroko rozpowszechnione w królestwie roślin. U roślin motylkowatych flawonoidy pełnią dwie zasadnicze funkcje. Są elementem układu obronnego roślin w oddziaływaniach z mikroorganizmami patogennymi, a także chemicznymi sygnałami dla mikroorganizmów symbiotycznych. Wyniki niektórych badań sugerują, że w obu typach oddziaływań rośliny mogą korzystać z aglikonów flawonoidów uwolnionych w wyniku hydrolizy zmagazynowanych glukozydów. Jak dotąd jednak nie uzyskano jednoznacznych dowodów na istnienie takiego mechanizmu. Nie została również scharakteryzowana żadna z glukozydaz biorących udział w tym procesie.

Przedstawione powyżej fakty stały się podstawą badań, których wyniki prezentowane są w niniejszej pracy. Badania te prowadzono na roślinach łubinu białego (*Lupinus albus* L.), które charakteryzują się wysoką konstytutywną zawartością glikozydów izoflawonoidów. Wydają się więc one dobrym układem modelowym do badań nad metabolizmem glukozydów związków fenolowych oraz jego związkiem z oddziaływaniami roślin ze środowiskiem.

Celem pracy była próba odpowiedzi na pytanie, czy w roślinach łubinu białego istnieje aktywny układ glukozydaza – glukozydy izoflawonoidów? Cel ten starano się osiągnąć poprzez badania następujących zagadnień:

- Charakterystyka β -glukozydaz w łubinie białym
- Wzajemna lokalizacja enzymu i jego substratów na poziomie tkankowym i subkomórkowym
- Zmiany aktywności enzymu wywołane działaniem czynników środowiskowych

Fenolowe metabolity wrażliwe odgrywały istotną rolę w życiu roślin szczególnie w ich oddziaływaniach z otoczeniem środowiskiem. Związki te mogły występować konstytutywnie w roślinie jako wolne aglikony lub też w postaci połączeń glikozydowych. Aktywność biologiczną w oddziaływaniu z otoczeniem wykazywał jednak głównie aglikon. Niektóre glikozydy metabolitów fenolowych mogły pełnić funkcję formy zapasowej lub transportowej. Uwolnienie aglikonów z tych połączeń byłoby więc zależne od występowania i aktywności odpowiedniego enzymu hydrolytycznego.

Jak dotąd stwierdzono występowanie w różnych gatunkach roślin enzymów hydrolyzujących glikozydy kitnu i/oraz metabolitów, w tym również niektórych grup związków fenolowych: monoglikonów, kwasy salicylowego oraz flavonoidów. Te ostatnie charakteryzują się różnorodną aktywnością biologiczną i są szeroko rozpowszechnione w królestwie roślin. U roślin modyfikowany kwasowy pierścień może kaszubić funkcje. Ścieżką elementem układu obronnego roślin w oddziaływaniu z otoczeniem jest modyfikacja i także chemicznych związków dla mikroorganizmów symbiotycznych. Wyniki niektórych badań sugerują, że w celu tych oddziaływań rośliny mogą korzystać z aglikonów flavonoidów uwolnionych w wyniku hydrolyzy enzymatycznej glikozydów. Istotną rolę jednak nie wykazano jednoznacznych dowodów na istnienie takiego mechanizmu. Nie została również scharakteryzowana natura i glikozydów biologicznych udział w tym procesie.

Przedmiotem powyższej pracy były przede wszystkim badania dotyczące oddziaływań w niniejszej pracy. Badania te prowadzone na roślinach *Lupinus albus* L., które charakteryzują się wysoką koncentracją kwercetyny glikozydów izoflawonoidów. Wybrano więc one do badań w celu ustalenia mechanizmu oddziaływań glikozydów fenolowych oraz jego związku z oddziaływaniami roślin ze środowiskiem.

Celem pracy była przede wszystkim odpowiedź na pytanie, czy w roślinach *Lupinus albus* L. istnieje aktywny układ glikozydowy - glikozydy izoflawonoidów? Cel ten stawiano się osiągnąć poprzez badania następujących zagadnień:

- * Charakterystyka β -glikozydaz w *Lupinus albus* L.
- * Wzajemna katalizacja enzymu i jego substratów na poziomie tkankowym i subcelularnym
- * Zmiany aktywności enzymu wywołane działaniem czynników środowiskowych

2. PRZEGLĄD LITERATURY

2.1. WPROWADZENIE

Problematyka, której poświęcona jest niniejsza rozprawa, związana jest z dwoma odrębnymi zagadnieniami. Pierwsze z nich dotyczy β -glukozydaz i ich substratów, drugie - związków fenolowych, w szczególności flawonoidów. Każde z tych zagadnień jest szeroko opisywane w literaturze, dlatego też w prezentowanym tutaj przeglądzie ich zakres został ograniczony.

W części poświęconej β -glukozydazom omówiono jedynie enzymy hydrolizujące glikozydy metabolitów, które odgrywają lub mogą odgrywać istotną rolę w procesach życiowych roślin. Tak sformułowany zakres objął również glukohydrolazy oligo- i polisacharydów ścian komórkowych, ponieważ enzymy te spełniają ważną funkcję w procesach rozwojowych i reakcjach obronnych. Pominięto natomiast zagadnienia związane z glikozylacją i deglikozylacją białek. W każdym z opisanych przykładów starano się przedstawić funkcję metabolitu, rolę jaką odgrywa odpowiednia β -glukozydaza w jego przemianach oraz znaczenie tych procesów dla rośliny.

W przeglądzie literatury dotyczącym flawonoidów omówiono ich biogenezę, kładąc szczególny nacisk na reakcje tworzenia i hydrolizy połączeń glikozydowych tych metabolitów. Przedstawienie zagadnień związanych z aktywnością biologiczną flawonoidów ograniczono do dwóch problemów: roli tych związków w reakcjach obronnych oraz w oddziaływaniach symbiotycznych z bakteriami brodawkowymi. W obu przypadkach zwrócono uwagę na wyniki, które mogą wskazywać na wykorzystanie przez roślinę w tych oddziaływaniach glikozydów flawonoidów jako źródła aktywnych biologicznie aglikonów. Osobny rozdział poświęcono występowaniu i funkcji flawonoidów w łubinie białym.

2.2. β -GLUKOZYDAZY I ICH SUBSTRATY

Wiele różnych klas metabolitów roślinnych może występować w postaci połączeń z cukrami. Połączenia takie zwane są glikozydami. Ze względu na atom tworzący wiązanie z cząsteczką cukru dzielimy je na O-, N-, C- oraz S-glikozydy. Wiązanie O-glikozydowe jest wiązaniem kowalentnym utworzonym pomiędzy hemiacetalową grupą hydroksylową cukru, a grupą hydroksylową związku alkilowego lub aryłowego. Znaczenie i metabolizm tych związków są obiektem ciągłych badań, jednak dokładne funkcje glikozydów w roślinach nie

2. PRZEGLĄD LITERATURY

2.1. WPROWADZENIE

Problematyka której poświęcona jest niniejsza rozprawa, wygina jest z jednej strony odnośnymi zagadnieniami. Pierwszą z nich dotyczy β-glukozylacji i jej znaczenia w procesie powstawania związków fenolowych w szeregach fenolowych. Kwestia ta jest szczególnie istotna w opisywanych w literaturze danych, nie w praktyce, dlatego też w niniejszym opracowaniu ograniczono

W części poświęconej β-glukozylacji omówiono jedynie zasady syntezowania glikozyli metabolitów, które odgrywa rolę w procesie powstawania związków fenolowych w roślinach. Tak sformułowany zakres objął również glikozylację związków polisacharydów i innych związków, ponieważ istnieje wiele związków, które w procesach rozwojowych i reakcjach obronnych. Ponadto omówiono zagadnienia związane z glikozylacją i deglukozylacją białek. W każdym z opisanych przypadków omówiono przede wszystkim funkcję metabolitów, rolę jaką odgrywa związek β-glukozylacji w procesie powstawania związków fenolowych i ich znaczenie dla rośliny.

W przebiegu niniejszego opracowania omówiono zagadnienia związane z zagadnieniami, które w procesie powstawania i hydrolizy związków glikozylacji i ich znaczenia. Przedstawiono zagadnienia związane z syntezą związków fenolowych i ich znaczenia do dwóch problemów: roli tych związków w reakcjach obronnych i w oddziaływaniach symbiotycznych z bakteriami i grzybami. W obu przypadkach zwrócono uwagę na wyniki, które mogą wskazywać na związek ten jako związek oddziaływania glikozylacji fenolowych jako źródła energii biologicznej i jej roli w oddziaływaniach glikozylacji fenolowych i innych związków fenolowych. Odnosi tożsamość poświęconą występowaniu i funkcji fenolowych w formie białek.

2.2. β-GLUKOZYDAZY I ICH SUBSTRATY

Wiele różnych klas metabolitów roślinnych może występować w postaci białek i cukrów. Pojęciem takim zwane są glikozylanty. Za przykład może służyć związek w postaci glikozylacji cukru, który jest to O-, N-, C- oraz S-glikozylacja. Wzrost β-glukozylacji w procesie powstawania związków fenolowych jest szczególnie istotny, ponieważ jest to związek, który w procesie powstawania związków fenolowych jest szczególnie istotny. Wiele różnych klas metabolitów roślinnych może występować w postaci białek i cukrów. Pojęciem takim zwane są glikozylanty. Za przykład może służyć związek w postaci glikozylacji cukru, który jest to O-, N-, C- oraz S-glikozylacja. Wzrost β-glukozylacji w procesie powstawania związków fenolowych jest szczególnie istotny, ponieważ jest to związek, który w procesie powstawania związków fenolowych jest szczególnie istotny.

są jeszcze do końca poznane. Z chemicznego punktu widzenia glikozylowane metabolity wtórne różnią się od wolnych aglikonów dwoma głównymi właściwościami. Po pierwsze są zwykle lepiej rozpuszczalne w wodzie, a po drugie są mniej reaktywne. Dlatego też są one powszechnie uważane za nieaktywne formy zapasowe lub transportowe metabolitów wtórnych (Hösel 1981). Hydroliza wiązania glikozydowego przez enzymy zwane glikozydazami może prowadzić do uwolnienia biologicznie aktywnych aglikonów. Swoistość glikozydaz wyznaczana jest zwykle przez cukrową część substratu, dotyczy to zarówno konfiguracji wiązania glikozydowego, struktury pierścienia, jak i ułożenia grup hydroksylowych (Dey & del Campillo 1984). Ze względu na konfigurację hydrolizowanego wiązania enzymy te dzieli się na α - i β -glikozydazy. W tych dwóch grupach wyróżniane są enzymy swoiste dla glikozydów poszczególnych cukrów. W wypadku, gdy monosacharydem w glikozydzie jest cząsteczka glukozy, enzym hydrolizujący to połączenie nazywany jest glikozydazą.

Roślinne β -glikozydazy były jednymi z pierwszych opisanych enzymów. Przez pewien czas wśród badaczy przeważał pogląd o braku specyficzności tych enzymów w stosunku do aglikonowej części substratu. Jedną z przyczyn tego twierdzenia było powszechne stosowanie do testów aktywności syntetycznych, a nie naturalnych substratów. Drugą z przyczyn był fakt, że enzymy nie były całkowicie oczyszczone i dopiero wprowadzenie lepszych technik pozwoliło na ich wydzielenie w czystej postaci (Hösel 1981, Hösel & Conn 1982, Dey & del Campillo 1984, Conn 1993). Stąd nowsze badania wykazały, że większość roślinnych β -glikozydaz wykazuje wysoką specyficzność substratową, również w stosunku do części aglikonowej substratu. Sugeruje to, że enzymy te mogą odgrywać istotną rolę w procesach życiowych rośliny. Określenie roli β -glikozydazy wymaga jednak poznania funkcji, jaką w roślinie spełnia glikozyd będący jej substratem oraz wchodzący w jego skład aglikon, jak również określenia wzajemnej lokalizacji enzymu i jego substratu w komórce lub tkance roślinnej. Dla większości grup metabolitów, które mogą występować w postaci połączeń z glukozą, nie wszystkie te czynniki zostały dokładnie poznane, dlatego też rola wielu β -glikozydaz pozostaje nierozpoznana.

2.2.1. Glukozydy cytokinin

Cytokiny są hormonami roślinnymi uczestniczącymi w procesach regulacji podziałów komórkowych, różnicowania komórek, wzrostu, transportu asymilatów oraz starzenia. Większość związków o aktywności cytokinin to izopentenyłowe pochodne adeniny. Najpowszechniej występującą cytokininą jest zeatyna, czyli 6-(γ -hydroksymetylo, γ -

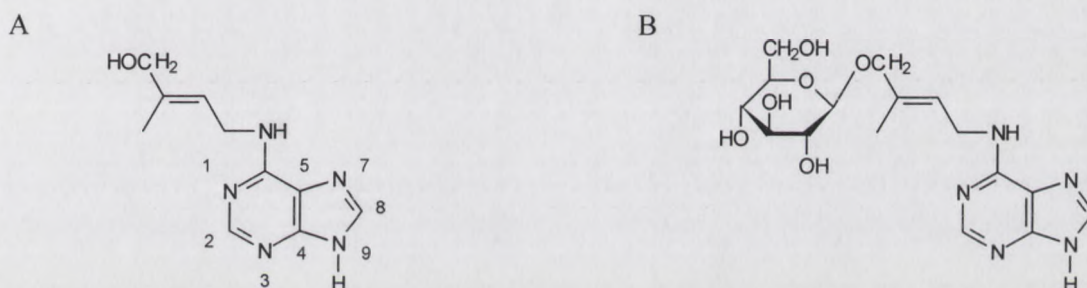
się jeszcze do końca poznane. Z chemicznego punktu widzenia glikozylowane metabolity wiotnie różnią się od wolnych aglikonów dwoma głównymi właściwościami. Po pierwsze są zwykle lepiej rozpuszczalne w wodzie, a po drugie są mniej reaktywne. Dlatego też są one powszechnie uważane za nieszkodliwe formy zapasowe lub transportowe metabolitów wrotych (Hösel 1981). Fizjologia wiązania glikozydowego przez enzymy kwasu glikoksydazami może prowadzić do uwzględnienia biologicznej aktywności aglikonów. Swoistość glikozylacji wyznaczona jest zwykle przez obecność cząstek substratu, dotyczy to zarówno konfiguracji wiązania glikozydowego, struktury pierścienia, jak i liczby grup hydroksylowych (Dey & del Campillo 1984). Na przykład na kodogenność biologiczną wiązania enzymy te dzielą się na α - i β -glikozylazy. W tych dwóch grupach wyróżniamy są enzymy swoiste dla glikozydów porządkowanych cukrów. W przypadku, gdy monosacharydem w glikozylacie jest cząsteczka glukozy, enzym hydrolyzujący to połączenie nazywany jest glikozylazą.

Roślinie β -glikozylazy były jedynymi z pierwszych opisanymi enzymom. Przez pewien czas wśród badaczy przeważał pogląd o braku specyficzności tych enzymów w stosunku do aglikonowej części substratu. Jedną z przyczyn tego twierdzenia było powszechne stosowanie do testów aktywności gniczywek, a nie naturalnych substratów. Drugą z przyczyn był fakt, że enzymy nie były dokładnie oczyszczone i dopiero wprowadzenie lepszych technik pozwoliło na ich wydzielenie w czystej postaci (Hösel 1981, Hösel & Conn 1982, Dey & del Campillo 1984, Conn 1993). Ślad nowego badania wykazywał, że większość roślinnych β -glikozylaz wykazuje wysokią specyficzność substratową, również w stosunku do części aglikonowej substratu. Sugeruje to, że enzymy te mogą odgrywać istotną rolę w procesach życiowych rośliny. Określenie roli β -glikozylazy wymaga jednak poznania funkcji, jaką w roślinie spełnia glikozylacja. Jej substratem oraz wchłapywaniem w jego skład aglikon, jak również określenie właściwości lokalnej transportu i jego substratu w komórce lub tkance roślinnej. Dla większości grup metabolitów, które mogą występować w postaci połączeń z glukozą, nie wszystkie te czynniki zostały dokładnie poznane. Dlatego też rola wielu β -glikozylaz pozostaje niejasna.

2.2.1. Glikozylacja cytolina

Cytoliny są hormonami roślinnymi uczestniczącymi w procesach regulacji podziałów komórkowych, różnicowania komórki, wzrostu, transportu asymilatów oraz naruszenia. Większość związków o aktywności cytolina to izopentenylowe pochodne adeniny. Najpowszechniej występującą cytolina jest xantyn, czyli 6-(β -hydroksy)uracil, 7-

metyloalliloamino)puryna (Rys. 2.1.). Cytokininy w roślinach mogą występować w postaci niezwiązanych cząsteczek oraz w połączeniach z innymi związkami, głównie z glukozą (Letham & Palni 1983, Brzobohatý i współpracownicy 1994, Sembdner i współpracownicy 1994). Cząsteczka glukozy może zostać przyłączona do jednego z atomów azotu pierścienia purynowego, powstają wówczas N-glukozydy cytokinin lub do atomu tlenu łańcucha izopentenylowego tworząc O-glukozyd (Rys. 2.1.). Wśród N-glukozydów w roślinach zidentyfikowano 3-, 7- i 9-N-glukozydy. Związki te nie wykazują aktywności biologicznej i charakteryzują się dużą stabilnością metaboliczną, dlatego przypuszcza się, że tworzenie tych połączeń prowadzi do nieodwracalnej inaktywacji cytokinin. W przeciwieństwie do N-glukozydów, O-glukozydy cytokinin są mniej stabilne i mogą ulegać hydrolizie, co sugeruje, że służą one jako forma transportowa lub zapasowa cytokinin.



Rys. 2.1. Struktura zeatyny (A) i β -O-glukozydu zeatyny (B).

U niektórych roślin stwierdzono, że zawartość O-glukozydów cytokinin spada gwałtownie w tych fazach rozwojowych, podczas których następuje intensyfikacja podziałów komórkowych. Spadek taki wykryto w kiełkujących siewkach kukurydzy (*Zea mays* L.), podczas rozwoju pąków bocznych siewek fasoli (*Phaseolus vulgaris* L.) oraz w rozwijających się pąkach apikalnych w bulwach ziemniaka (*Solanum tuberosum* L.) (Letham & Palni 1983, Brzobohatý i współpracownicy 1994). Przypuszcza się, że w procesach tych istotną rolę odgrywają cytokininy, które zostały uwolnione z połączeń O-glukozydowych. Kontrolowane uwalnianie wolnych cytokinin z ich glukozydów wymaga działania swoistej β -glukozydazy. Enzym, który mógłby uczestniczyć w tym procesie wyizolowano z koleoptyli siewek kukurydzy. Hydrolizował on O- i N-3-glukozydy cytokinin, wykazując słabą aktywność w stosunku do innych naturalnie występujących glukozydów, takich jak salicyna czy celobioza (Campos i współpracownicy 1992, Brzobohatý i współpracownicy 1993). Immunocytochemiczne analizy korzeni 3-dniowych siewek kukurydzy wykazały, że enzym ten występuje w strefach aktywnych podziałów komórkowych merystemu stożka wzrostu (Brzobohatý i współpracownicy 1993). Sugeruje

metylglikozaminopiryna (Rys. 2.1). Cyklobiny w roślinach mogą występować w postaci niezwiązanych cząsteczek oraz w połączeniach z innymi związkami, głównie z glukozą (Latham & Paine 1983, Brzobohatý i wspólnicy 1994, Sembdner i wspólnicy 1994). Cięższymi glukozy może zostać przyłączona do jednego z atomów azotu pierścienia pirynowego, powstaje wówczas N-glukozyd cytokinin lub do atomu tlenu łańcucha izopentenylowego tworząc O-glukozyd (Rys. 2.1). Wzrost N-glukozydów w roślinach zidentyfikowano 3-, 5- i 9-N-glukozyd. Związki te nie wykazują aktywności biologicznej i charakteryzują się dużą stabilnością metaboliczną, dlatego przypuszczano się, że tworzenie tych połączeń prowadzi do nieodwracalnej inaktywacji cytokinin. W przeciwieństwie do N-glukozydów, O-glukozyd cytokinin są mniej stabilne i mogą ulegać hydrolizie, co sugeruje, że stanowią one łatwą formę transportową lub zapasową cytokinin.



Rys. 2.1. Struktura cząstki (A) i O-glukozydu cząstki (B).

U niektórych roślin stwierdzano, że zawartość O-glukozydów cytokinin spada gwałtownie w tych fazach rozwojowych, podczas których następuje intensyfikacja podziałów komórkowych. Spadek taki występował w kiełkujących siewkach kukurydzy (Zhu waga i.), podczas rozwoju pędów bocznych siewek fasoli (Wentzler waga i.) oraz w rozwijających się pędach apikalnych w bulwach ziemniaka (Solomon i wspólnicy L.) (Latham & Paine 1983, Brzobohatý i wspólnicy 1994). Przypuszczano się, że w procesach tych istotną rolę odgrywa cytokinin, które zostało uwolnione z połączeń O-glukozydowych. Kontrolowane uwolnienie wolnych cytokinin z ich glukozydów wymaga działania swoistej β-glukozydazy, którą należy uszczelniać w tym procesie wyizolowano z kolonij siewek kukurydzy. Hydrolizował on O- i N-3-glukozyd, cytosolin, wykazując słaby aktywność w stosunku do innych naturalnie występujących glukozydów, takich jak salicyna czy celobioza (Campos i wspólnicy 1992, Brzobohatý i wspólnicy 1993). Immunocytochemiczne analizy korzeni 3-dniowych siewek kukurydzy wykazały, że cytokin ten występuje w sułach aktywnych podziałów komórkowych miejscem wzrostu (Brzobohatý i wspólnicy 1993). Sugeruje

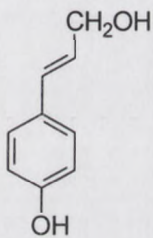
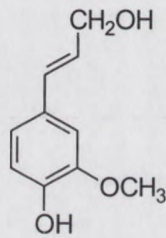
się więc, że O-glukozydy cytokinin mogą być transportowane z bielma do merystemu, gdzie następnie są hydrolizowane przez enzymy swoiście uwalniający aktywne cytokiny. Enzym hydrolizujący β -O-glukozyd zeatyny wyizolowano również z nasion rzepaku (*Brassica napus* L.). Hybrydyzacja *in situ* wykazała akumulację mRNA β -glukozydazy w młodych tkankach rzepaku, w których zachodzą intensywne podziały komórkowe: w pędowym stożku wzrostu, w dolnej części hypokotyla, w korzeniu oraz w dojrzewających nasionach (Falk & Rask 1995).

Istnieją przypuszczenia, że mechanizm regulacji aktywności cytokinin w roślinie poprzez tworzenie ich połączeń glukozydowych został wykorzystany przez niektóre bakterie patogenne. Wiadomo, że *Agrobacterium tumefaciens* i *A. rhizogenes* przekazują fragment T-DNA ze swojego plazmidu do genomu roślinnego (Chilton i wsp. 1982, Zambryski i wsp. 1989, Gaudin i wsp. 1994). W przypadku *A. tumefaciens* - bakterii wywołujących guzowatość szyjki korzeniowej, fragment T-DNA zawiera geny kodujące białka uczestniczące w biosyntezie związków o aktywności auksyn i cytokinin (Zambryski i wsp. 1989, Brzobohatý i wsp. 1994, Gaudin i wsp. 1994). Do tej pory nieznana pozostaje funkcja genów znajdujących się we fragmencie T-DNA wprowadzanym do genomu rośliny przez wywołujące włosowatość układu korzeniowego bakterie *A. rhizogenes*. Wiadomo, że ekspresja jednego z tych genów (*rolC*) w roślinach transgenicznych powoduje istotne zmiany fenotypowe (Faiss i wsp. 1996). Zmiany te obserwowano u roślin należących do różnych gatunków, co sugeruje, że produkt tego genu modyfikuje jakiś powszechnie występujący mechanizm regulacji wzrostu. Białko uzyskane w wyniku ekspresji genu *rolC* w *Escherichia coli* wykazywało właściwości β -glukozydazy, która może hydrolizować glukozydy cytokinin (Estruch i wsp. 1991). Uwalnianie cytokinin z ich nieaktywnych połączeń glukozydowych mogłoby w istotny sposób zakłócić rozwój rośliny. Badania nad transgenicznymi roślinami tytoniu, w których dokonano ekspresji genu *rolC* nie wykazały jednak wzrostu zawartości cytokinin i spadku poziomu ich glukozydów (Nilsson i wsp. 1993, Faiss i wsp. 1996). Nie można więc jednoznacznie stwierdzić, że gen *rolC* rzeczywiście koduje β -glukozydazę swoiście hydrolizującą glukozydy cytokinin.

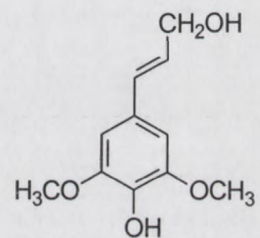
2.2.2. Glukozydy monolignoli

Ligniny są polimerami fenolowymi występującymi w niektórych ścianach komórkowych roślin. Elementami składowymi lignin są trzy podstawowe monomery, zwane monolignolami: alkohol *p*-kumarylowy, alkohol koniferylowy i alkohol synapinowy (Rys.

2.2.). Podczas biosyntezy lignin monolignole są przekształcane przy udziale oksydaz w rodniki, które następnie ulegają reakcji polimeryzacji. W większości roślin nagozalążkowych ligniny składają się głównie z monomerów alkoholu koniferylowego z niewielkim dodatkiem jednostek alkoholu *p*-kumarylowego, natomiast u roślin okrytozalążkowych w skład lignin wchodzi głównie jednostki pochodzące z alkoholu synapinowego oraz koniferylowego z niewielkim dodatkiem monomerów alkoholu *p*-kumarylowego. Względne proporcje monomerów lignin są różne dla poszczególnych gatunków roślin, rodzajów komórek, a nawet dla fragmentów ściany pojedynczej komórki. Skład lignin ulega również zmianom podczas ontogenezy, w kolejnych fazach rozwoju mogą być wprowadzane do polimeru różne monolignole (Whetten & Sederoff 1995, Boudet 1998, Whetten i wsp. 1998).

alkohol *p*-kumarylowy

alkohol koniferylowy



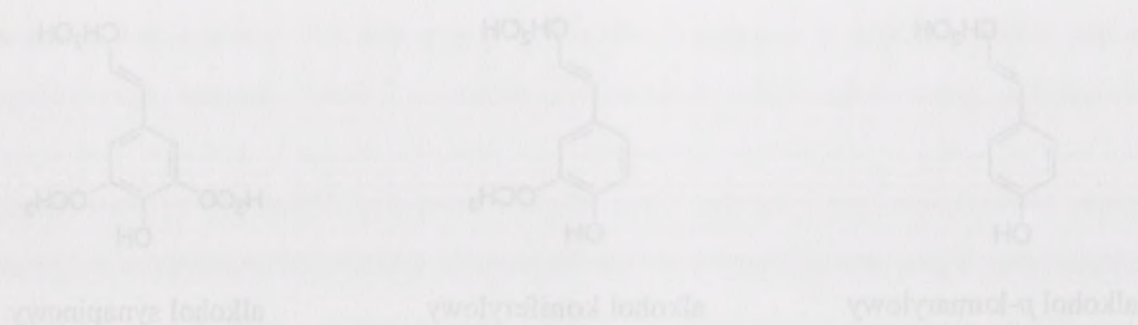
alkohol synapinowy

Rys. 2.2. Struktury podstawowych monomerów wchodzących w skład lignin.

Monolignole są stosunkowo reaktywne i w większych stężeniach mogą być toksyczne dla rośliny, dlatego też nie są akumulowane w komórkach. Glikozylacja grupy hydroksylowej pierścienia fenolowego zmniejsza reaktywność, a więc i toksyczność tych związków (Whetten & Sederoff 1995). W różnicującym się ksylemie drzew iglastych stwierdzono akumulację 4-O- β -D-glukozydów monolignoli. Zawartość koniferyny (4-O- β -D-glukozyd alkoholu koniferylowego) w tej tkance może dochodzić do kilku procent świeżej masy (Savidge 1989, Whetten & Sederoff 1995, Whetten i wsp. 1998). Glukozydy monolignoli wykryto również u niektórych roślinach okrytozalążkowych, jednak ich zawartość i profil akumulacji jest inny niż w roślinach nagozalążkowych. Występująca w lilaku pospolitym (*Syringa vulgaris* L.) syringina (β -glukozyd alkoholu synapinowego) akumulowana jest zarówno w ksylemie, jak i we floemie, a jej zawartość sięga jedynie 1% świeżej masy tkanki (Whetten & Sederoff 1995).

Glukozydy monolignoli jako związki mniej reaktywne od aglikonów nie są utleniane przez oksydazy biorące udział w biosyntezie lignin, uważa się je więc za formę transportową

2.2.) Podczas biosyntezy lignin monomeryole są przekształcane przy udziale oksydaz w katecholi, które następnie ulegają reakcji polimeryzacji. W zależności roślini nasyconych w ligninie składają się głównie z monomerów alkoholu katechylowego z niewielkim dodatkiem jednostek alkoholu β -kumarylowego, natomiast u roślini oksydacyjnych w skład lignin wchodzi głównie jednostki pochodzące z alkoholu sygninowego oraz katechylowego z niewielkim dodatkiem monomerów alkoholu β -kumarylowego. Względnie proporcje monomerów lignin są różne dla poszczególnych gatunków roślin, rodzajów katecholi, a nawet dla fragmentów tej samej pojedynczej komórki. Skład lignin ulega również zmianom podczas ontogenezy, w kolejnych fazach rozwoju mogą być wprowadzane do polimeru różne monomeryole (Whetten & Sederoff 1995, Bostel 1995, Whetten i wspólni 1998).



Rys. 2.2. Struktury podstawowych monomerów wchodzących w skład lignin.

Monomeryole są stosunkowo trwałe i w większych stężeniach mogą być toksyczne dla rośliny, dlatego też nie są skumulowane w komórkach. Glikozydacja grupy hydroksylowej pierścienia fenolowego zmniejsza reaktywność, a więc i toksyczność tych związków (Whetten & Sederoff 1995). W roślinie jest to kąpielnie drzew iglastych stwierdzono skumulację 4-O- β -D-glukozylów katechylu (4-O- β -D-glukozyl alkohol katechylowego) w tej ilości może dochodzić do kilku procent świeżej masy (Savidge 1989, Whetten & Sederoff 1995, Whetten i wspólni 1998). Glikozydy monomeryole występują również u niektórych roślinach oksydacyjnych, jednak ich zawartość i profil akumulacji jest inny niż w roślinach nasyconych. Występują w liściach porzeczki (Gwaryn i wspólni 1995), syringii (β -glukozyl alkoholu sygninowego) akumulowane jest zarówno w korze jak i we ściółce, a jej zawartość sięga jedynie 1% świeżej masy liści (Whetten & Sederoff 1995).

Glikozydy monomeryole jako związki mniej reaktywne od aglikonów nie są uwalniane przez oksydazy biogenne udział w biosyntezie lignin, uważa się je więc za formy transportowe

lub zapasową prekursorów lignin. Taką funkcję tych związków potwierdzają badania z radioaktywnie znakowanymi prekursorami: [U-¹⁴C]-L-Phe lub ¹⁴CO₂, wykazujące, że w siewkach świerku pospolitego (*Picea abies* L.) koniferyna ulega ciągłym przemianom metabolicznym (Marcinowski & Grisebach 1977). Przemiany te zachodzą jednak stosunkowo wolno, co sugeruje, że tylko część syntezy lignin przebiega szlakiem wykorzystującym koniferynę. Zawartość koniferyny w ksylemie drzew iglastych ulega również zmianom sezonowym, które związane są z fazami wzrostu. Najniższa zawartość tego związku obserwowana jest w okresie spoczynku. Wiosną, wraz ze wznowieniem podziałów komórkowych, ilość koniferyny zwiększa się, a wzrost ten obserwuje się bezpośrednio przed rozpoczęciem lignifikacji (Savidge 1988, 1989, Savidge & Förster 1998). Sezonowe zmiany zawartości koniferyny skorelowane są ze zmianami aktywności UDP-glukozylotransferazy alkoholu koniferylowego (Savidge & Förster 1998).

Wykorzystanie przez roślinę glukozydów monolignoli do syntezy lignin możliwe jest dzięki specyficznej β -glukozydazie uwalniającej aglikon. Enzym, który hydrolizuje koniferynę wyizolowano ze ścian komórkowych hypokotyli i korzeni siewek świerku pospolitego (Marcinowski & Grisebach 1978). β -glukozydazę o podobnej specyficzności substratowej wyizolowano również ze ścian komórek hodowli zawiesinowej ciecierzycy (*Cicer arietinum* L.) (Hösel i współpr. 1978). Stosując metodę lokalizacji immunohistochemicznej stwierdzono, że w siewkach tej rośliny enzym występuje w ścianach komórkowych epidermy, endodermy i egzodermy oraz ksylemu (Burmeister & Hösel 1981). Natomiast z hodowli zawiesinowej soi (*Glycine max* L.) wyizolowano β -glukozydazę, która swoiście hydrolizowała zarówno koniferynę, jak i syringinę (Hösel & Todenhausen 1980). W żadnym jednak przypadku nie wykazano bezpośredniego związku β -glukozydazy z biosyntezą lignin. Lepszego dowodu dostarczyła izolacja β -glukozydaz specyficznych dla koniferyny z rozwijającego się ksylemu sosny Banksa (*Pinus banksiana* Lamb.) (Leinhos i współpr. 1994) i sosny wydmowej (*Pinus contorta* L.) (Dharmawardhana i współpr. 1995). Metody stosowane podczas ekstrakcji tych enzymów z tkanki roślinnej wskazują, że w pierwszym przypadku mamy do czynienia z enzymem cytoplazmatycznym, a w drugim z enzymem związanym ze ścianami komórkowymi. Wyizolowana z sosny wydmowej β -glukozydaza hydrolizowała również syringinę. Lokalizacja *in situ* wykazała, że enzym ten występuje prawie wyłącznie w ulegających lignifikacji obszarach ksylemu wtórnego, a miejsca jego największej aktywności pokrywają się z miejscami aktywności peroksydazy, która przekształca monolignole do rodników fenoksylowych (Dharmawardhana i współpr. 1995).

lub zapasową przetrwaną lignin. Jaka funkcja jest w tym przypadku
radioaktywnie znaczącymi markernami: [^{14}C]-[2,6-dimetylo-4-
siatkach światła porostowego (Pawłowski i in.) kompozycji ligniny
markery (Mancowski & Grzech 1977) Prawdopodobnie
wolno, co sugeruje, że tylko część syntetyzowanej ligniny
kompozycji. Zawartość kompozycji w kształcie drzewa gęstości
rozmiarów, które związane są z ilością węgla. Ilość węgla
obserwowana jest w okresie spoczynku. Wzrost, który to
kompozycji, ilość kompozycji zwiększa się, a wzrost, ten okres
rozpościan lignifikacji (Zawadzki 1988, 1989; Zawadzki & Pająk 1987; Zawadzki
zawartości kompozycji składowane są ze zmianami węgla
alkohola kompozycji (Zawadzki & Pająk 1988).

Wykazano, że przez roślinę zbudowaną monoklonalnie, do której
dostał się specyficzny β -glukozylazie powstaje, a to
kompozycji wyizolowano ze składowanych kompozycji
porostowego (Mancowski & Grzech 1978) β -glukozylazie
substancji wyizolowano również ze składowanych kompozycji
(Czerwikowski i in.) (Hilbert i wsp. 1978) Prawdopodobnie
immunologicznej stwierdzono, że w siatkach, na których
kompozycji epidermy, celulozy i glikoprotein, a to
kationami x bodowii zawieszonych soli (Czerwikowski i in.)
związki hydrofilowe trudno kompozycji, jak i w innych
zadaniach jednak przepadła nie wykazano bezpośredniego związku
lignin. Ilość tego bodowii dostarczyla izolacja β -glukozylazie
rozwiązającego się kształtem sosny. Sosna (Pawłowski i in.)
sosny wydrowe) (Pawłowski i in.) (Dharmawardana i wsp. 1985)
podczas ekstrakcji tych ekstraktów z liści rośliny, w której
mamy do czynienia z enzymem cytoplazmatycznym, a w innych
stanami kompozycji. Wyizolowano z sosny wydrowe) β -glukozylazie
również ekstrakt. Lokalizacja in situ wykazała, że enzym
ulgięszych lignifikacji obszarach kształtem węgla, a to
pozwala się x miesiącami kształtem kształtem kształtem
roślinów fenolowych (Dharmawardana i wsp. 1985).

2.2.3. Glukozyd kwasu salicylowego

Kwas salicylowy (SA) jest związkiem fenolowym powszechnie uważanym za czynnik niezbędny dla indukcji białek PR (z ang. Pathogenesis-Related) oraz nabytej odporności systemicznej (SAR; z ang. Systemic Acquired Resistance). Stwierdzono, że w roślinach ogórka (*Cucumis sativus* L.), tytoniu (*Nicotiana tabacum* L.) i rzodkiewnika (*Arabidopsis thaliana* L.) poziom SA wzrasta do kilkuset razy po infekcji przez mikroorganizmy patogenne, a wzrost ten jest skorelowany z aktywacją SAR. Badania prowadzone na różnych roślinach, zarówno jedno-, jak i dwuliściennych wykazały, że również egzogenne wprowadzenie SA do tkanki roślinnej wywołuje natychmiastową indukcję SAR (Malamy & Klessig 1992, Klessig & Malamy 1994, Ryals i współpr. 1996, Durner i współpr. 1997, Klessig i współpr. 1998, Dempsey i współpr. 1999). Dodatkowych dowodów na rolę SA w indukcji mechanizmów obronnych dostarczyły doświadczenia z transgenicznymi roślinami tytoniu, w których dokonano ekspresji bakteryjnego genu hydroksylazy salicylanowej (*nahG*), która rozkłada SA. W roślinach tych po infekcji wirusem mozaiki tytoniowej (TMV) nie dochodziło do indukcji SAR, a plamy nekrotyczne powstające w miejscu infekcji były znacznie większe niż w roślinach kontrolnych (Gaffney i współpr. 1993). Rośliny tytoniu i rzodkiewnika z wprowadzonym genem *nahG* wykazały zwiększoną podatność na infekcję przez patogeny zarówno wirusowe, bakteryjne, jak i grzybowe (Delaney i współpr. 1994). Wyniki te wskazują, że akumulacja SA jest istotna nie tylko dla powstawania SAR, ale również dla indukcji innych mechanizmów obronnych. Badania prowadzone na zawiesinach komórkowych wykazały, że egzogenne wprowadzenie do zawiesiny fizjologicznych stężeń SA wzmacnia wywołaną infekcją przez wirulentne i awirulentne szczepy patogenów indukcję transkrypcji genów obronnych, akumulację H₂O₂ oraz reakcję nadwrażliwości (HR; z ang. Hypersensitive Response) (Draper 1997, Shirasu i współpr. 1997).

Chociaż związek SA z SAR oraz innymi reakcjami obronnymi został dość dobrze udowodniony, do tej pory nie wyjaśniono, jaką rolę odgrywa SA w indukcji mechanizmów obronnych. Nie wiadomo też, czy SA jest cząsteczką sygnałową, która może być transportowana w roślinie (Ryals i współpr. 1996, Durner i współpr. 1997, Klessig i współpr. 1998, Van Camp i współpr. 1998, Dempsey i współpr. 1999)? Wyniki prowadzonych badań wskazują na to, że w indukcji SAR i innych mechanizmów obronnych uczestniczą równocześnie z SA inne cząsteczki: H₂O₂ i NO[•] (Van Camp i współpr. 1998, Dempsey i współpr. 1999).

Inokulacja liści tytoniu wirusem TMV powoduje, oprócz wzrostu zawartości endogennego SA, również wzrost ilości glukozydu SA (Enyedi i współpr. 1992, Malamy i współpr. 1992). Podobnie infiltracja liści tytoniu SA prowadzi do wzrostu zawartości jego glukozydu. W obu przypadkach wzrost zawartości glukozydu skorelowany jest ze wzrostem aktywności specyficznej glukozylotransferazy (Enyedi & Raskin 1993, Lee & Raskin 1998). Również w owsie (*Avena sativa* L.) oraz w *Mallotus japonicus* wykazano indukcję aktywności takiego enzymu pod wpływem SA (Klessig & Malamy 1994). Przypuszcza się, że aktywacja glukozylotransferazy następuje w momencie przekroczenia pewnej granicznej zawartości SA w komórce (Enyedi i współpr. 1992). W ten sposób roślina może regulować transdukcję sygnału prowadzącego do odporności nabytej lub bronić się przed toksycznym stężeniem SA przekształcając go w odpowiedni glukozyd. Z drugiej strony wprowadzony egzogenicznie do przestworów międzykomórkowych liści tytoniu glukozyd ulega hydrolizie, a powstały SA wnika do komórek, gdzie indukuje białka PR i następnie ulega ponownej glukozytacji (Hennig i współpr. 1993). Testy enzymatyczne z użyciem preparatu białek ścian komórkowych tytoniu wykazały istnienie w przestworach międzykomórkowych aktywności β -glukozydazy hydrolizującej glukozyd SA (Chen i współpr. 1995, Seo i współpr. 1995). Egzogeniczne wprowadzenie SA do tkanki roślinnej powodowało wzrost aktywności β -glukozydazy (Seo i współpr. 1995). Stosowany w testach preparat białek hydrolizował również inne glukozydy, nie można więc jednoznacznie stwierdzić, że w przestworach międzykomórkowych tytoniu znajduje się enzym swoisty dla glukozydu SA (Chen i współpr. 1995). Jeśli β -glukozydaza hydrolizująca glukozyd SA zlokalizowana jest rzeczywiście w przestworach międzykomórkowych, to lokalizacja taka może mieć istotne znaczenie dla mechanizmów obronnych. W wyniku pierwszej infekcji w roślinie dochodzi do syntezy SA, który następnie zostaje zmagazynowany w komórkach w postaci glukozydu. Podczas infekcji wtórnej, na skutek uszkodzenia komórek rośliny przez patogena, glukozyd zostaje zhydrolizowany, a uwolnione gwałtownie duże ilości SA mogą wnikać do komórek sąsiadujących z miejscem infekcji i indukować w nich mechanizmy obronne o wiele szybciej i skuteczniej niż w przypadku infekcji pierwotnej (Klessig & Malamy 1994, Klessig i współpr. 1998).

2.2.4. Glikozydy cyjanogenne

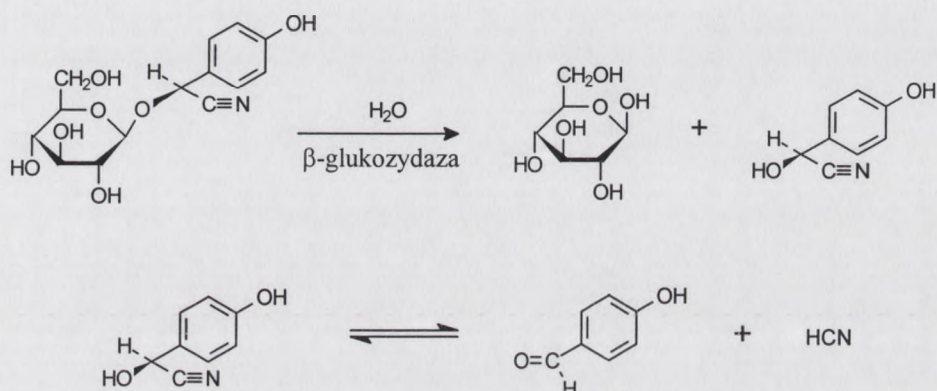
W roślinach zaliczanych do około 3000 gatunków stwierdzono występowanie zjawiska określonego mianem cyjanogenezy, czyli zdolności do wydzielania cyjanowodoru. W

Inhalacja liści traw w postaci TMTV powoduje, oprócz wzrostu zawartości chlorofilu, również wzrost ilości chlorofilu a (Frydli & wsp. 1992, Malamy & wsp. 1992). Podobnie inhalacja liści traw SA prowadzi do wzrostu zawartości jego chlorofilu. W obu przypadkach wzrost zawartości chlorofilu skorelowany jest ze wzrostem aktywności specyficznej glukozyloksydazy (Frydli & Raskin 1993, Lee & Raskin 1998). Również w owarze (*Phaseolus vulgaris* L.) oraz w *Mallotus japonicus* wykazano indukcyjną aktywność takiego enzymu pod wpływem SA (Klasek & Malamy 1994). Przeprowadzając badania wpływu glukozyloksydazy następuje w momencie przekroczenia pewnej granicznej zawartości SA w komórce (Frydli & wsp. 1992). W ten sposób roślina może regulować przekazywanie sygnału prowadzącego do aktywacji enzymu lub przeciwnie przez lokalizację SA przekazywać go w odpowiednim kierunku. Z drugiej strony wprowadzony enzym może do przetransportowania liści traw glukozyloksydazy ulega hydrolizie, a powstały SA wnika do komórki, gdzie indukując białka PR i następuje niegła ponowna aktywacja (Hwang & wsp. 1993). Testy wykazały, że ekstrakcja z ekstraktem białek z liści traw w postaci TMTV wykazywała indukcję białek PR i zwiększenie aktywności β-glukozyloksydazy hydrolizującej glukozyloksydazę SA (Chen & wsp. 1992, Seo & wsp. 1992). Eksperymentalne wprowadzanie SA do tkanki roślinnej powodowało wzrost aktywności β-glukozyloksydazy (Seo & wsp. 1992). Stwierdzono w testach preparatów hydrolizujących również inne glukozyloksydazy, nie można więc jednoznacznie stwierdzić, że w przetransportowaniu glukozyloksydazy traw nie ma znaczenia dla glukozyloksydazy SA (Chen & wsp. 1992). Jeśli β-glukozyloksydaza hydrolizująca glukozyloksydazę SA sializowana jest przez komórki przetransportowane, to lokalizacja taka może mieć istotne znaczenie dla mechanizmów obronnych. W wyniku pierwszej infekcji w roślinie dochodzi do syntazy SA, która następnie zostaje zmagazynowana w komórkach w postaci glukozyloksydazy. Podczas drugiej infekcji, na skutek uszkodzenia komórki rośliny przez patogena, glukozyloksydaza zostaje uwolniona, a uwolnione gwałtownie duże ilości SA mogą wnikać do komórki sąsiadującej z miejscem infekcji i indukować w niej mechanizmy obrony o wiele szybciej i skuteczniej niż w przypadku infekcji pierwotnej (Klasek & Malamy 1994, Klasek & wsp. 1998).

2.2.4. Glukozyloksydazy cyjanogenne

W roślinach zaliczanych do około 3000 gatunków stwierdzono występowanie związków cyjanogennych, czyli zdolności do wydzielenia cyjanowodoru. W

większości opisanych przypadków zjawisko to związane jest z grupą metabolitów nazywanych glikozydami cyjanogennymi (Poulton 1990). Związki te są β -O-glikozydami α -hydroksynitryli, w których, oprócz nielicznych przypadków di- lub triglikozydów, cząsteczką cukru jest D-glukoza połączona z aglikonem o charakterze alifatycznym, aromatycznym lub alicyklicznym (Conn 1981, Poulton 1990). Reakcja hydrolizy wiązania glikozydowego prowadzi do powstania α -hydroksynitrylu, który następnie może, samorzutnie lub przy udziale liazы hydroksynitrylowej, ulec rozpadowi z wydzieleniem cyjanowodoru (Rys. 2.3.).



Rys. 2.3. Katabolizm glikozydów cyjanogennych na przykładzie duryny.

W nieuszkodzonych tkankach roślinnych nie dochodzi do cyjanogenezy, ponieważ zapobiega temu kompartmentacja enzymu i jego substratu. W przypadku roślin sorga (*Sorghum bicolor* L.) oraz nasion śliwy domowej (*Prunus domestica* L.) i czeremchy późnej (*P. serotina* L.) rozdzielanie metabolitów i odpowiednich enzymów jest swoiste tkankowo (Poulton 1990, Poulton & Li 1994). W wielu innych roślinach stosując metody histologiczne, immunocytochemiczne oraz pozyskiwanie płynów apoplastycznych stwierdzono, że β -glukozydazy swoiste dla glikozydów cyjanogennych występują w przestworach międzykomórkowych (Kakes 1985, Poulton 1990, Selmar 1993). Biorąc pod uwagę fakt, że glikozydy cyjanogenne magazynowane są w wakuoli można stwierdzić, że izolacja tych związków od enzymów hydrolitycznych obserwowana jest na poziomie subkomórkowym. W momencie uszkodzenia tkanek roślinnych przez roślinożerców, glikozydy cyjanogenne mogą zostać zhydrolizowane przez glikozydazę, co w konsekwencji prowadzi do powstania cyjanowodoru (Conn 1981, Poulton 1990). Glikozydy cyjanogenne pełnią więc w roślinie funkcje obronne jako źródło toksycznego cyjanowodoru, a kluczowym enzymem biorącym udział w procesie jego powstawania jest glikozydaza.

Badania prowadzone nad β -glukozydazami biorącymi udział w cyjanogenezie w roślinach takich jak: czeremcha późna, sorgo, zakleśń olbrzymia (*Alocasia macrorrhiza* L.),

większości opisanych przypadków wystawia to zarzekać jest z grupą hydroksylową, w której znajduje się grupa hydroksylowa. Wzrost to są (D-)-glukozę (D-glucose), w której, oprócz niekiedy przysyconych 4- lub 6-tych grup hydroksylowych, znajduje się grupa hydroksylowa. Wzrost to są (D-)-glukozę (D-glucose), w której, oprócz niekiedy przysyconych 4- lub 6-tych grup hydroksylowych, znajduje się grupa hydroksylowa. Wzrost to są (D-)-glukozę (D-glucose), w której, oprócz niekiedy przysyconych 4- lub 6-tych grup hydroksylowych, znajduje się grupa hydroksylowa.

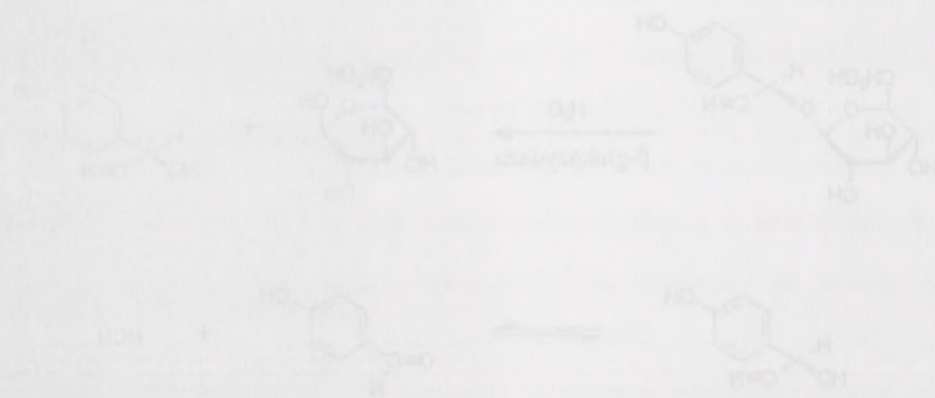
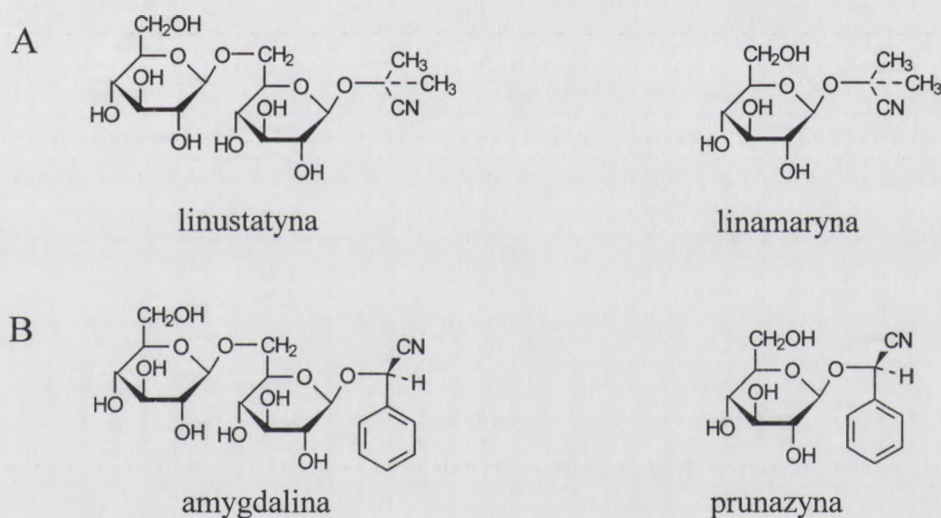


Fig. 2.3. Kataliza glikozydów cytanogennych na przykładzie cukru.

W nieustalonych warunkach roślinnych nie dochodzi do cytanogennych reakcji. Wzrost to są (D-)-glukozę (D-glucose), w której, oprócz niekiedy przysyconych 4- lub 6-tych grup hydroksylowych, znajduje się grupa hydroksylowa. Wzrost to są (D-)-glukozę (D-glucose), w której, oprócz niekiedy przysyconych 4- lub 6-tych grup hydroksylowych, znajduje się grupa hydroksylowa. Wzrost to są (D-)-glukozę (D-glucose), w której, oprócz niekiedy przysyconych 4- lub 6-tych grup hydroksylowych, znajduje się grupa hydroksylowa.

Badania prowadzone nad β-glikozydazami biorąmi udział w cytanogennych reakcjach roślinnych takich jak: czerwień białej, szarog, żółtej oliwkowej (diazotyzacja węgla).

koniczyna biała (*Trifolium repens* L.), *Davallia trichomanoides* i *Triglochin maritima* wykazały, że są to enzymy o wysokiej specyficzności substratowej w stosunku do glukozydu występującego w danej roślinie (Conn 1981, Hösel 1981, Poulton 1990). Z badanych dotąd enzymów jedynie glukozydazy hydrolizujące linamarynę (Rys. 2.4.), a występujące w roślinach lnu (*Linum usitatissimum* L.) oraz kaczukowca brazylijskiego (*Hevea brasiliensis* Mill.), nie wykazywały znaczącej specyficzności do części aglikonowej substratu (Poulton 1990, Selmar 1993). Enzymy te nie hydrolizują jednak występującej w tych roślinach linustatyny (Rys. 2.4.) - diglukozydu analogicznego do linamaryny. Linustatyna jest hydrolizowana jedynie przez swoistą diglukozydazę (Selmar i współpr. 1988, Selmar 1993). Podczas gdy występujące w obu roślinach enzymy hydrolizujące linamarynę obecne są w przestworach międzykomórkowych, diglukozydazy są enzymami cytoplazmatycznymi (Poulton 1990, Selmar 1993).



Rys. 2.4. Struktury wybranych glikozydów cyjanogennych występujących w roślinach lnu i kaczukowca brazylijskiego (A) oraz śliwy domowej (B).

Istnienie swoistej mono- i diglukozydazy oraz ich odmienna lokalizacja subkomórkowa związane są z transportem glikozydów cyjanogennych w roślinie. Linamaryna nie może być transportowana w roślinie, ponieważ podczas przejścia przez apoplast uległaby hydrolizie przez znajdującą się tam monoglukozydazę. Rzeczywiście, badania prowadzone na siewkach kaczukowca wykazały, że zmagazynowana w bielmie nasion linamaryna ulega przekształceniu w linustatynę, która jest transportowana do różnych części rozwijającej się siewki (Selmar i współpr. 1987, 1988, 1991). Diglukozyd ten może ulec hydrolizie z odtworzeniem linamaryny lub zostać wykorzystany przez roślinę jako źródło azotu, na co wskazuje wysoka aktywność syntazy β -cyjanoalaninowej oraz spadek całkowitej puli

glukozydów cyjanogennych podczas pierwszych dni rozwoju siewek kaczukowca brazylijskiego (Selmar i współpr. 1988, 1991). Istnienie takiego samego mechanizmu transportu z bielma do zarodka stwierdzono także w dojrzewających nasionach lnu i przypuszcza się, że może on występować również w innych roślinach zawierających linamarynę i linustatynę (Kurzahls i współpr. 1989, Selmar 1993). Badania nad dojrzewającymi nasionami śliwy domowej wykazały, że podobny układ może tworzyć inny glukozyd cyjanogeny – prunazyne i jej analogiczny diglukozyd amygdalina (Rys. 2.4.) (Selmar 1993).

2.2.5. Saponiny

Saponiny są glikozylowanymi metabolitami szeroko rozpowszechnionymi w królestwie roślin. Można je podzielić na trzy grupy w zależności od struktury aglikonu, którym może być triterpenoid, steroid lub glikoalkaloid steroidowy. We wszystkich saponinach w pozycji 3-aglikonu podstawiony jest łańcuch cukrowy (Osborn 1996).

Większość saponin wykazuje właściwości fungicydowe, a ponieważ związki te występują w zdrowych roślinach w stosunkowo wysokich stężeniach, uważa się, że są one odpowiedzialne za odporność roślin na niektóre grzyby patogenne. Właściwości fungicydowe saponin wynikają z ich zdolności do uszkodzania błon komórkowych. Badania przeprowadzone na glikoalkaloidach występujących w roślinach ziemniaka: α -solaniną i α -chakoniną oraz nad α -tomatyną z pomidorów (Rys. 2.5.) wykazały, że część aglikonowa tych związków w sposób nieodwracalny wiąże się ze sterolami błony komórkowej, natomiast wzajemne oddziaływania pomiędzy podstawionymi w pozycji 3- aglikonu resztami cukrowymi prowadzą do jej uszkodzenia (Keukens i współpr. 1992, 1995). Nie zostało do tej pory wyjaśnione, w jaki sposób rośliny bronią się przed uszkodzeniem własnych błon komórkowych przez saponiny. Mechanizm ten może się opierać na specyficznej subkomórkowej lokalizacji tych związków lub na odmiennym niż u grzybów składzie błon komórkowych (Osborn 1996).

W niektórych roślinach występują saponiny steroidowe podstawione dodatkową cząsteczką glukozy w pozycji 26- aglikonu (Mahato i współpr. 1982, Osborn 1996). Metabolity te nie wykazują aktywności biologicznej, prawdopodobnie dlatego, że cząsteczka glukozy umieszczona na drugim końcu części aglikonowej zwiększa jej polarność, co uniemożliwia tworzenie kompleksów ze sterolami błony komórkowej grzybów. Do tej grupy związków należą występujące w źdźbłach i liściach owsa saponiny - awenacozyny A i B

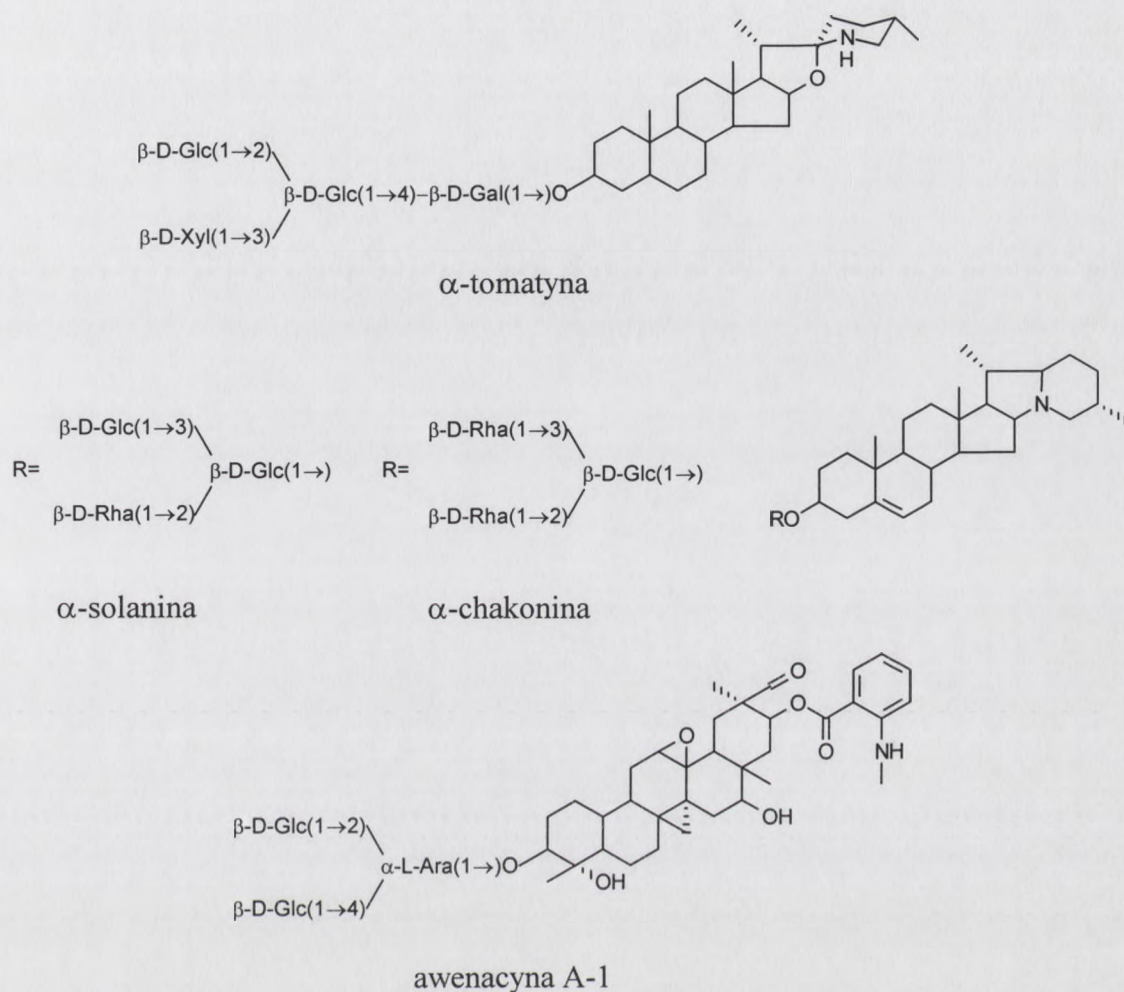
glukozydów cyjanogennych podczas przetwarzania, dla którego w 1952 roku
brakowało (Belman i wsp. 1952, 1953). Istotnie, istnieją także w drzewnie-
transportu z blizną do zarodka stwierdzono także w drzewnie-
przetwarzaniu się, że może on występować również w innych częściach
liścień i liścień (Korczak i wsp. 1953, Belman 1953).
dotychczasowymi nastawami filii domowej wykazały, że podobnie jak
glukozyd cyjanogenny - prunazy - i jej analogiczny (Belman i wsp. 1953)

1.2.2. Saponiny

Saponiny są glikozydowymi metabolitami roślin, które w postaci
roślin. Można je podzielić na trzy grupy w zależności od rodzaju szkieletu
triterpenoid, steroid lub glikokaloid steroidowy. W zależności od rodzaju
alkaloid podstawowy jest izochlorogen (Osborn 1953).

Wielkość saponin występuje w roślinach i zwierzętach, a ich
występowanie w zdrowych roślinach w stosunku do wyciągów z roślin
odpowiedzialne za odporność roślin na niektóre choroby. Wyciągi z
saponin wykazują z ich zdolności do wywołania reakcji alergicznych
przeobrażone na glikokaloidy występujących w roślinach, które w
chłoniący oraz nad n-transport z pomidorem (Fig. 2.2) wykazały, że
związków w sposób niedostateczny wiąże się ze składem saponin
wzajemnie oddziaływanie pomiędzy podstawowymi w postaci saponin
kulturami prowadzi do jej uszkodzenia (Korczak i wsp. 1953, 1954).
pauzy występują, w jaki sposób rośliny chronią się przed uszkodzeniem
komórkowych przez saponiny. Mechanizm ten może się wiązać z
subkomórkowej lokalizacji tych związków lub ich wnikaniem do komórek
komórkowych (Osborn 1956).

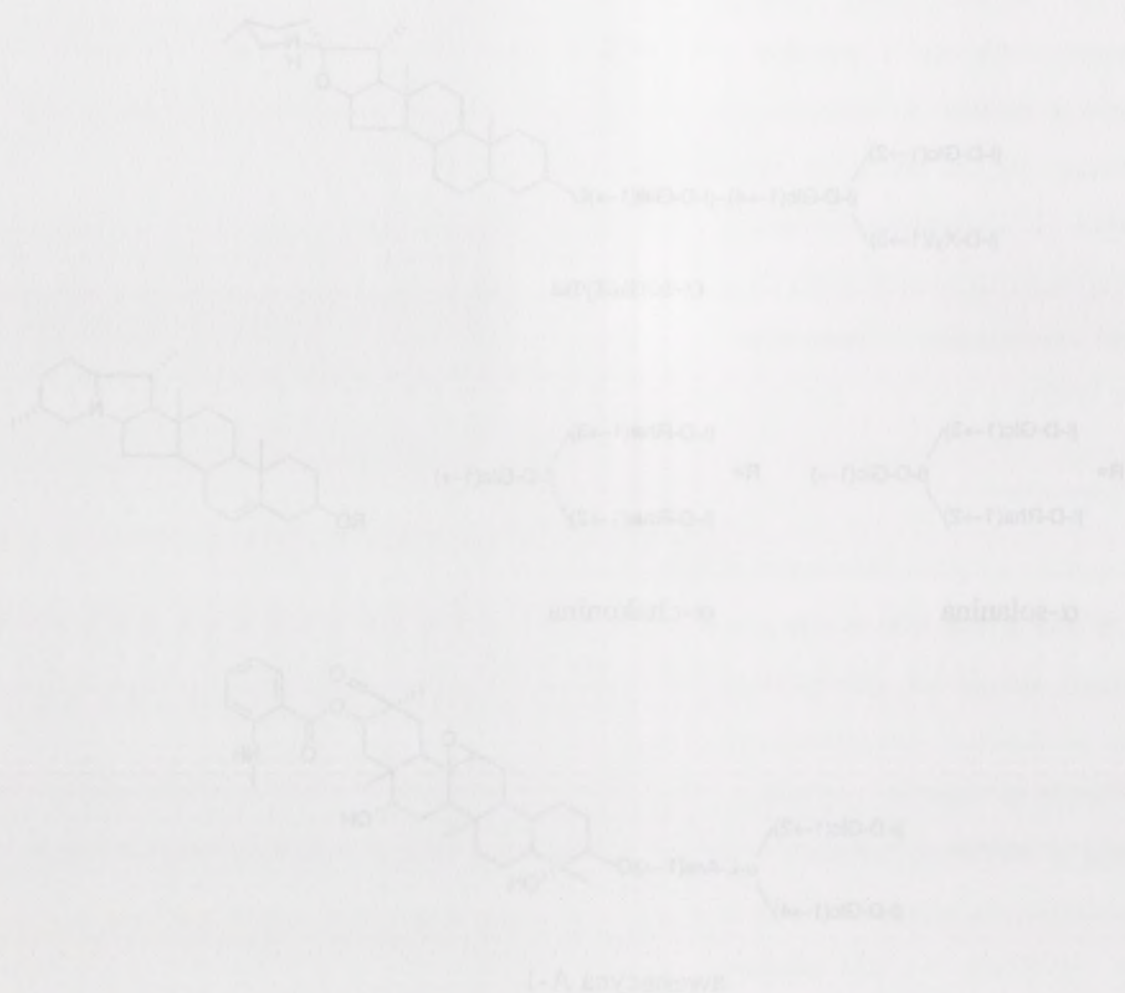
W niektórych roślinach występują saponiny, które w postaci
cząsteczki glukozy w postaci 26-alkaloid (Belman i wsp. 1953, 1954).
Metabolizacja nie wymaga aktywności biologicznej, prowadzącej do
glukozy umieszczonej na drugim końcu cząsteczki glukozy, która
nieumożliwia tworzenia kompleksów ze steroidami (Belman i wsp. 1953).
związków należy występujące w roślinach i zwierzętach - saponiny



Rys. 2.5. Struktury wybranych saponin.

(Osborn 1996). Hydroliza wiązania glikozydowego znajdującego się w pozycji 26-awenacozydów prowadzi do powstania związków o właściwościach fungicydowych, zwanych 26-deglukoawenacozydami (Rys. 2.6.).

Reakcja ta jest katalizowana przez specyficzną β -glukozydazę zlokalizowaną w stromie chloroplastów (Nisius 1988, Gus-Mayer i współpr. 1994). Ponieważ awenacozydy magazynowane są w wakuoli, w zdrowych tkankach nie dochodzi do hydrolizy. Może do niej dojść jedynie w wyniku zranienia spowodowanego mechanicznym uszkodzeniem lub infekcją (Osborn 1996). Cząsteczkę glukozy w pozycji 26- zawierają też występujące w kłączach *Costus speciosus* protogracylina i protodioscyina (Mahato i współpr. 1982, Inoue & Ebizuka 1996, Inoue i współpr. 1996). Z tej tkanki wyizolowano i oczyszczono swoistą dla tych dwóch związków 26-O- β -glukozydazę (Inoue & Ebizuka 1996, Inoue i współpr. 1996).



Rys. 2.2. Struktury wybranych ziół

(Osborn 1996). Chłonek chlorofyllowy, związek ten w postaci 20-aktylowanego chlorofyllu, prowadzi do powstania związków o właściwościach fungicydowych, zwanych 20-deaktylowanymi chlorofyllami (Rys. 2.6).

Kasza ta jest katalizowana przez apofityl i ma 2-glikozylowy charakter w stosunku do chlorofyllu (Nishiz 1988, Guzmán i wsp. 1994). Ponadto zawiera 20-deaktylowany chlorofyll, w warunkach naturalnych nie dochodzi do hydrolizy. Może do niej dojść jedynie w wyniku zmiany środowiska mechanicznego, mechanicznego lub infekcyjnego (Osborn 1996). Chłonek chlorofyllowy w postaci 20-aktylowanego chlorofyllu występuje w liściach. Chlorofyll jest katalizowany i protolizowany (Mata i wsp. 1982, Inoue & Ebata 1996, Inoue i wsp. 1996). Z tej strony wyizolowano i oczyszczono swoją formę dwóch związków 20-O-2-glikozylu (Inoue & Ebata 1996, Inoue i wsp. 1996).

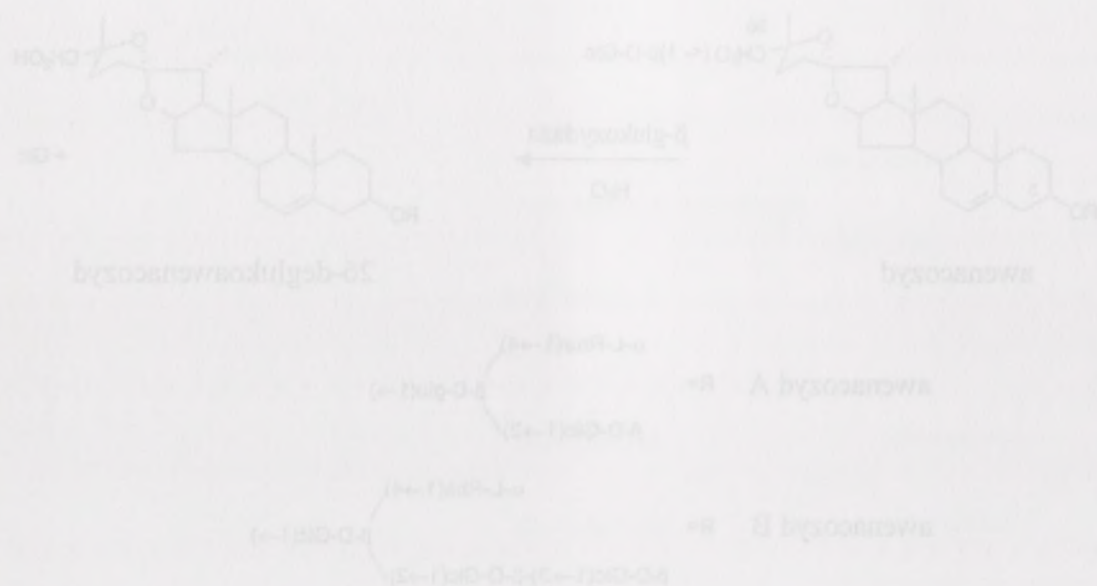


Fig. 2.6. Aktywna swerosydowa przez swoisty 3-O-β-D-glukozydazę.

W wyniku reakcji hydrolizy nieaktywne biologicznie protoswerosydy i protoswerosydy przekształcają się w posiadające właściwości farmakologiczne swerosydy i dioswerosydy. Reakcja ta nie zachodzi jednak w normalnych warunkach fizjologicznych. Świadczy to o tym, że enzym i jego substraty są rozłożone od siebie na poziomie tkankowym lub subkomórkowym.

W przeciwieństwie do glikozylacji w pozycji 3-O, która prowadzi do dezaktywacji) saponin, saponin saponinowy przetrzymuje w pozycji 3-O odgrywa istotną rolę w procesie uzależnienia błon komórkowych (Kucenas i współpr. 1992, 1993). Zdolność aktywności saponin od stopnia glikozylacji w pozycji 3-O zależy od stopnia podlegania do ich detoksyfikacji, jednakże z mechanizmami obrony żywych organizmów jest przekształcanie saponin w zwłoki o niższym stopniu glikozylacji. Istnieją charakterystyczne różnice w toksyczności (Crombie 1985). Patogen podobno 2-sporo gępczyci wytwarza β-glukozydazę zwana β-2-tomaryną, która zwłoki saponinowa podlega detoksyfikacji glikozylacji z tetrasacharydu przetrzymanego w pozycji 3-O-tomaryny (Guz 2.2) (Sandwick i współpr. 1990). Przekształcając w ten sposób α-tomarynę w mniej toksyczną β-tomarynę, 2-kolci u człowieka saponin 1. sp. gępczyci wyżyło i u człowieka, która w sposób specyficzny hydrolyzuje w α-tomarynę, wzmocnienie pomógł tetrasacharydem, a mniej toksycznym saponinem (Lairini i współpr. 1990). Patogen owca Gauru wytwarza gauru 2-tomarynę, która wytwarza β-glukozydazę, która detoksyfikuje występującą w korzeniach tej rośliny triterpenoidalną saponin - swerosydy A-1 (Roz 2.2) oddając dwie terminalne grupy z trisaccharidu przetrzymanego w pozycji 3-O swerosydy (Gibson i współpr. 1991). Inny z

patogenów owsa *Septoria avenae* f. sp. *avenae* wytwarza enzym zdolny do detoksyfikacji 26-deglukoawenacozydów. Enzym ten nazywany awenacozydazą, odcina kolejno cząsteczki L-ramnozy i D-glukozy z łańcucha cukrowego podstawionego w pozycji 3-26-deglukoawenacozydów i awenacozydów nie powodując w drugim przypadku hydrolizy wiązania glukozydowego w pozycji 26- (Wubben i współpr. 1996). U wywołującego na wielu roślinach objawy szarej pleśni grzybie *Botrytis cinerea* stwierdzono występowanie co najmniej trzech różnych swoistych glikozydaz: ksylozydazy detoksyfikującej α -tomatynę i digitoninę oraz dwóch glukozydaz hydrolizujących odpowiednio awenacyny i awenacozyd (Quidde i współpr. 1999).

2.2.6. Glikozydy nasercowe

U roślin z rodziny *Scrophulariaceae*, a przede wszystkim w roślinach różnych gatunków naparstnic (*Digitalis* sp.), występuje grupa metabolitów wtórnych określaną mianem glikozydów nasercowych. Związki te hamują działanie ATP-az sodowo-potasowych w mięśniu sercowym i dlatego powszechnie używane są jako lekarstwa spowalniające i wzmacniające pracę serca. Pod względem chemicznym są to połączenia steroidowej części aglikonowej (geniny) z różnymi cukrami, które przyłączone są w pozycji 3-aglikonu i tworzą nierozgałęziony łańcuch o długości do 5 jednostek cukrowych. W skład glikozydów nasercowych wchodzi rzadko występujące deoksycukry, takie jak D-digitoksoza, D-diginoza czy też D-cymaroz (Kohlmünzer 1985). Większość glikozydów nasercowych zawiera cząsteczkę glukozy na końcu łańcucha cukrowego. Związki o takiej budowie nazywane są glikozydami pierwotnymi, a połączenia nie zawierające terminalnej glukozy nazwano glikozydami wtórnymi (Rys. 2.7.). Podczas ekstrakcji glikozydów nasercowych z liści część glikozydów pierwotnych ulega przekształceniu w glikozydy wtórne, co może świadczyć o istnieniu w tkance roślinnej swoistej β -glukozydazy, która w normalnych warunkach fizjologicznych oddzielona jest od substratu.

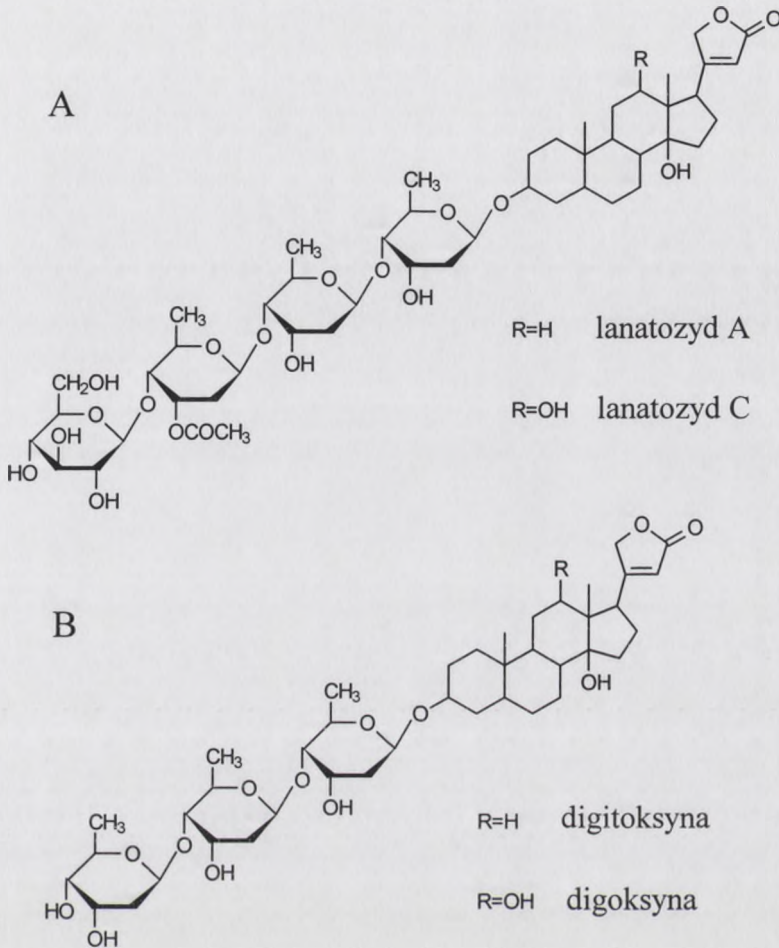
Ze względu na wykorzystanie glikozydów nasercowych w przemyśle farmaceutycznym prowadzono liczne badania nad ich metabolizmem, a obiektem badań były najczęściej zawiesiny komórkowe różnych gatunków naparstnicy. W zawiesinach komórkowych nie stwierdzono syntezy glikozydów *de novo*, wykazano jednak, że wprowadzone do pożywki glikozydy nasercowe ulegają różnym modyfikacjom, wśród których można wyróżnić stereospecyficzne hydroksylacje części aglikonowej oraz glukozylację i deglukozylację

patogenców owca zębionka wrona L. sp. z rodziny...
deglukosylowanocystyńców. Enzym ten nazywany...
tymozyny i D-glukozy z lektyną...
3,6-deglukosylowanocystyńców i zwanocystyńców...
wielozimna glukozyladowego w postaci 3,6- (W...
roślinach objawy szarej pleśni grzyba...
najmniej trzech różnych rodzajów glikozyl...
długonoc oraz dwóch glukozylaz hydroliz...
(Guida i wspólni 1999).

2.2.6. Glikozylizacja nasion

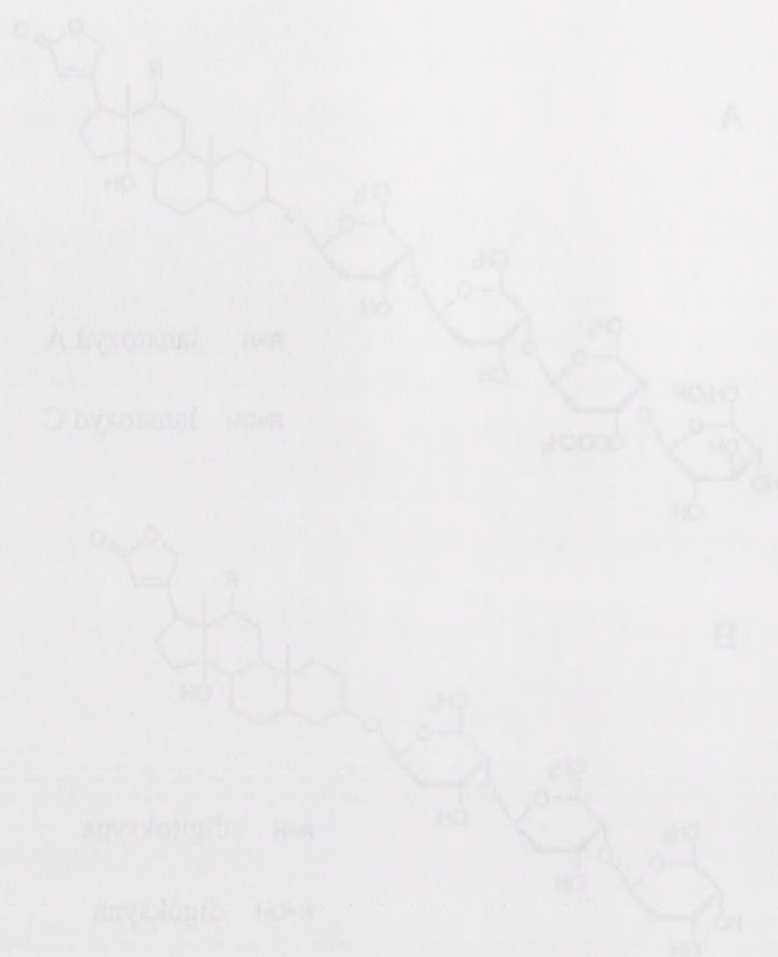
U roślin z rodziny Zygophyllaceae, a przede wszystkim...
naprzecinko (*Digitalis* sp.), występuje grupa...
glikozylizacji nasionowej. Związki te hamują...
miejscu nasionowym i dlatego powstają...
wzrostu nasion przez siew. Pod względem...
aglikonowej (geny) z różnymi cukrami, k...
niczozgarniętych lektyn o długości do 5...
nasionowych wiodła zostało wyszczególnione...
czy też D-amanoz (Kobayashi 1985). W...
cząsteczki glikozy na końcu łańcucha...
glikozylizacji przetrwały, a połączenie...
glikozylizacji wronami (Rys. 2.7). Podstaw...
glikozylizacji przetrwały ulega przekształcaniu...
istotnym w tkance roślinnej swojej. P...
fizjologicznych oddzielona jest od...
Za względu na wyjątkowość glikozylizacji...

proszono liczne badania nad ich...
zależności kombinacji różnych...
stwierdzono syntezę glikozylizacji...
glikozylizacji nasionowej...
stereospetyczne hydrolizacje...
glikozylizacji nasionowej...



Rys. 2.7. Struktury wybranych glikozydów nasercowych występujących w roślinach naporstnic: glikozydy pierwotne (A), glikozydy wtórne (B).

łańcucha cukrowego. W komórkach z hodowli zawieszinowej oraz w kalusach i liściach naporstnicy wełnistej (*D. lanata* Ehrh.), naporstnicy purpurowej (*D. purpurea* L.), *D. heywoodii* i naporstnicy zwyczajnej (*D. grandiflora* Mill.) wykryto aktywność 16'-O-glukozylotransferaz glikozydów nasercowych oraz aktywność swoistych glukozydaz hydrolizujących pierwotne glikozydy nasercowe (Kreis i współpracownicy 1986, Kreis & May 1990, Kreis i współpracownicy 1993). Testy enzymatyczne przeprowadzone na ekstraktach białkowych uzyskanych z liści wykazały, że β -glukozydazy z różnych gatunków naporstnic różnią się znacząco specyficznością substratową (Kreis & May 1990). Dalsze badania wykazały, że w komórkach naporstnicy wełnistej występują co najmniej trzy różne glukozylotransferazy oraz dwie różne glukozydazy biorące udział w metabolizmie glikozydów nasercowych (Theurer i współpracownicy 1994). Z liści tej rośliny wyizolowano i oczyszczono do stanu homogennego



Krys 2.7. Struktury związków glikozydów nasadowych występujących w roślinach naparstnic
 glikozyd pierwiastek (A) glikozyd pierwiastek (B)

liniucha celownika. W kładkach z hodowli zawierającej oraz w kładkach i liściach
 naparstnicy włośnicy (L. Anata Ehrh.) naparstnicy przysadowej (L. przysadowej L.) B
 kładkach i naparstnicy włośnicy (L. kładkach Mill.) wyizolowano 18-O-
 glikozylomastek glikozydów nasadowych oraz aktywność zwinnych glikozydów
 hydrokizujących pierwiastek glikozyd nasadowy (Kris & Mly 1990, Kris & Mly 1990
 Kris & Mly 1991). Też rozmyślnie przeprowadzone na kładkach białowoj
 kładkach z liści wykazały, że 6-glikozylomastek z różnych gatunków naparstnic różni się
 znacząco specyficznością substratów (Kris & Mly 1990). Działanie badania wykazały, że w
 kładkach naparstnicy włośnicy występuje co najmniej trzy różne katalizatory/nasadowe oraz
 dwa różne glikozylomastki białowoj w metabolizmie glikozydów nasadowych (Zhang &
 Mly 1994). Z liści tej rośliny wyizolowano i oczyszczono do stanu homogenego

β -glukozydazę, która w testach enzymatycznych wykazała wysoką swoistość dla glikozydów nasercowych (May & Kreis 1997).

Na podstawie zachowania podczas ekstrakcji stwierdzono, że glukozylotransferazy są enzymami cytoplazmatycznymi, a aktywność β -glukozydaz związana jest z błonami komórkowymi, ponieważ enzymy te wymywane są z materiału roślinnego tylko w buforach z dodatkiem detergentu (Kreis i współpr. 1986, Kreis & May 1990, May & Kreis 1997). Badania nad komórkową lokalizacją ich odpowiednich substratów wykazały, że pierwotne glikozydy nasercowe zlokalizowane są w wakuoli, w której nie wykrywa się aktywności glukozylotransferaz ani swoistych β -glukozydaz (Kreis i współpr. 1986, Kreis i współpr. 1993). Wykazano, że wprowadzone egzogennie do zawiesiny komórkowej naparstnicy zwyczajnej wtórne glikozydy nasercowe wnikają do komórek, gdzie ulegają modyfikacji do glikozydów pierwotnych, które następnie mogą być aktywnie transportowane przez tonoplast do wakuoli (Kreis i współpr. 1993). Uważa się więc, że glikozydy pierwotne są formą magazynową tej klasy metabolitów. Doświadczenia z glikozydem nasercowym znakowanym węglem ^{14}C wykazały, że glikozydy pierwotne są nie tylko magazynowane, lecz mogą ulegać ciągłym przemianom katalizowanym przez β -glukozydazę i glukozylotransferazę (Theurer i współpr. 1994). Wszystkie te dane wskazują na udział β -glukozydazy w metabolizmie i transporcie glikozydów nasercowych, jednak nie wiadomo, z jakimi procesami fizjologicznymi jest to związane oraz czy jest to jedyna funkcja tego enzymu? Fakt, że podczas izolacji związków nasercowych z liści naparstnicy dochodzi do hydrolizy glikozydów pierwotnych może sugerować, że podobny proces zachodzi podczas uszkodzenia tkanki roślinnej przez roślinożercę, a powstałe w wyniku działania β -glukozydazy glikozydy wtórne spełniają funkcje detergentne (May & Kreis 1997). Brak dokładnych danych na temat znaczenia glikozydów nasercowych w procesach życiowych rośliny uniemożliwia jednak dokładne określenie roli β -glukozydazy swoistej dla tych metabolitów.

2.2.7. Polisacharydy i oligosacharydy

Obecność kilku grup hydroksylowych w cząsteczkach monosacharydów umożliwia im tworzenie wiązań glikozydowych pomiędzy grupą hydroksylową przy anomerycznym atomie węgla jednej cząsteczki, a którąkolwiek z pozostałych grup hydroksylowych innej cząsteczki cukru. Struktura i właściwości chemiczne cukrów pozwalają więc na tworzenie tak polimerów liniowych, jak i rozgałęzionych. Enzymy, które hydrolizują wiązania β -O-glikozydowe w

polimerach glukozy nazywamy ogólnie β -O-glukohydrolazami lub β -O-glukanazami. Dzieli się je na dwie zasadnicze grupy: endoglukohydrolazy, które katalizują hydrolizę wewnętrznych wiązań glukozydowych w polisacharydach i oligosacharydach oraz egzoglukohydrolazy, które odłączają pojedyncze cząsteczki cukrów z nieredukującego końca łańcucha cukrowego. Prowadzone badania wykazują, że β -glukohydrolazy polisacharydów i oligosacharydów odgrywają istotną rolę w niektórych procesach rozwojowych roślin oraz w oddziaływaniach roślin z mikroorganizmami patogennymi.

2.2.7.1. β -1,4-glukohydrolazy

Wzrost i rozwój roślin wymagają modyfikacji struktury ścian komórkowych lub zmian ich właściwości fizycznych. Może się to odbywać poprzez wprowadzanie do ściany komórkowej nowych elementów lub przez modyfikację już istniejących polimerów, dzięki czemu możliwa jest zmiana kształtu lub rozmiarów komórki. U roślin dwuliściennych pierwotne ściany komórkowe zbudowane są z trzech klas polisacharydów: celulozy, hemiceluloz i pektyn (Carpita & Gibeaut 1993). Podstawowy szkielet ściany komórkowej stanowią włókna mikrofibril celulozowych, połączone między sobą łańcuchami ksyloglukanów - głównych hemiceluloz roślin dwuliściennych. Uważa się, że kluczową rolę w zmianie struktury ścian komórkowych odgrywa modyfikacja i hydroliza ksyloglukanów (Carpita & Gibeaut 1993, Cosgrove 1997, 1999). Przebudowa ich łańcuchów zachodzi podczas dojrzewania owoców, abscysji organów oraz w trakcie wzrostu komórek. Wyniki prowadzonych badań wskazują, że istotną rolę w tych procesach odgrywają β -1,4-glukanazy hydrolizujące wiązania $\beta(1\rightarrow4)$ w rdzeniu glukanowym ksyloglukanów. Stwierdzono, że niektóre geny kodujące β -1,4-glukanazy ulegają zwiększonej ekspresji w młodych szybko rosnących tkankach (Wu i wsp. 1996, Brummell i wsp. 1997a, Catala i wsp. 1997). Ekspresja innych genów kodujących β -1,4-glukanazy obserwowana jest w dojrzewających owocach (Lashbrook i wsp. 1994, Harpster i wsp. 1998, Llop-Tous i wsp. 1999) oraz podczas abscysji organów (del Campilo & Bennett 1996, Trainotti i wsp. 1998, Lashbrook i wsp. 1998). Na związek ekspresji wszystkich tych genów z procesami rozwojowymi wskazuje dodatkowo fakt, że zwiększa się ona pod wpływem auksyn lub etylenu.

Oprócz hydrolizy ksyloglukanów, β -1,4-glukanazy mogą spełniać również inne funkcje. W roślinach pomidora stwierdzono akumulację mRNA kodującego związaną z błoną komórkową β -1,4-glukanazę, która prawdopodobnie uczestniczy w procesie biosyntezy

polimerach zbudowanych z jednostek β -D-glukopiranozylowych lub β -D-glukanazami. Dzięki nim jest możliwe wytworzenie nowych, nietypowych polimerów, które będą miały właściwości podobne do naturalnych polisacharydów, ale z dodatkowymi funkcjami. W tym celu należy wykonać badania nad nowymi metodami syntezy i modyfikacji polisacharydów. W tym celu należy wykonać badania nad nowymi metodami syntezy i modyfikacji polisacharydów. W tym celu należy wykonać badania nad nowymi metodami syntezy i modyfikacji polisacharydów.

2.2.7.1. β -1,4-glikozydryazy

Wzrost i rozwój roślin wymaga modyfikacji struktury ścian komórkowych lub zmian ich właściwości fizycznych. Należy się to odbywać poprzez wprowadzanie do ściany komórkowej nowych elementów lub przez modyfikację już istniejących polimerów. Dzięki czemu możliwe jest zmiana kształtu lub rozmiarów komórki. U roślin dwuliściennej pierwotne ściany komórkowe zbudowane są z trzech klas polisacharydów: celulozy, hemicelulozy i pektynu (Carpita & Gibson 1993). Podstawowy składnik ściany komórkowej stanowi włókna mikrofibry celulozowe, połączone między sobą hemicelulozami i glikoproteinami. Głównymi hemicelulozami roślin dwuliściennej są: ksylglukanany, w tymczasie ściany ścian komórkowych roślin modyfikacja i hydroliza ksylglukanów (Carpita & Gibson 1993, Carpita 1997, Carpita 1997). Przesobowa ściana komórkowa składa się z polisacharydów owoców, składają się one z takich związków komórek. Wyniki prowadzonych badań wskazują, że istotną rolę w tych procesach odgrywa β -1,4-glikozydryazy, które w znacznym stopniu wpływają na modyfikację i hydrolizę ksylglukanów. Stwierdzono, że niektóre geny kodujące β -1,4-glikozydryazy znajdują się w młodych częściach roślinnych tkanek (Wu i wsp. 1995, Brumwell i wsp. 1997A, Catala i wsp. 1997). Ekspresja genów kodujących β -1,4-glikozydryazy obserwowana jest w dojrzewających owocach (Lashbrook i wsp. 1994, Hagera i wsp. 1998, Llop-Torres i wsp. 1999) oraz podczas abscyzji owoców (de Carvalho & Bennett 1996, Tamoni i wsp. 1998, Lashbrook i wsp. 1998). Jest to wskazuje na to, że zwiększa się ona pod wpływem sygnału hormonalnego związanego z dojrzewaniem i abscyzją. Istotnym faktem jest, że zwiększa się ona pod wpływem sygnału hormonalnego związanego z dojrzewaniem i abscyzją.

Opóźnienie hydrolizy ksylglukanów, β -1,4-glikozydryazy mogą również tworzyć inne typy. W roślinach powstają związki związki mRNA kodujące związki z hemicelulozami β -1,4-glikozydryazy, które powodują zmniejszenie w procesie biosyntezy

celulozy (Brummell i współpr. 1997b). Istnienie genu kodującego białko o podobnych właściwościach stwierdzono w roślinach rzodkiewnika i wykazano, że mutacja w tym genie powoduje istotne zmiany fenotypowe (Nicol & Höfte 1998, Nicol i współpr. 1998). Mutanty charakteryzowały się karłowatością oraz zmianami w strukturze pierwotnych ścian komórkowych.

Przypuszcza się, że β -1,4-glukanazy odgrywają istotną rolę w procesie uwalniania materiałów zapasowych w nasionach zbóż. Bielmo nasion zbóż jest tkanką zapasową, w której zgromadzone są skrobia i białka zapasowe stanowiące źródło energii i azotu podczas początkowych faz rozwoju siewki. Ściany komórkowe bielma stanowią fizyczną barierę pomiędzy materiałami zapasowymi, a hydrolizującymi je enzymami takimi jak α -amylazy i endopeptydazy, które podczas kiełkowania wydzielane są z otaczającej bielmo warstwy komórek aleuronowych. Wykorzystanie przez rozwijający się zarodek materiałów zapasowych wymaga więc degradacji ścian komórkowych bielma. Głównymi składnikami tych ścian są β -1,3-, β -1,4-glukany oraz arabinoksylany. W początkowych fazach kiełkowania ściany komórkowe bielma są częściowo degradowane przez odpowiednie hydrolazy. Enzymy, które mogą brać udział w tym procesie zostały dość dobrze poznane w kiełkujących nasionach jęczmienia (*Hordeum vulgare* L.). W jego siewkach wykryto dwa izoenzymy o aktywności endohydrolaz β -1,3-, β -1,4-glukanów. Gen pierwszego z nich ulega ekspresji w scutellum kiełkującego nasiona oraz w młodych liściach i korzeniach siewki, podczas gdy ekspresja genu drugiego izoenzymu ograniczona jest do warstwy komórek aleuronowych kiełkującego nasiona (Høj & Fincher 1995). Enzymy te hydrolizują wiązania $\beta(1\rightarrow4)$ w β -1,3-, β -1,4-glukanach tworząc mieszaninę oligosacharydów, wśród których większość stanowią 3-O- β -celobiozo-D-glukoza oraz 3-O- β -celotriozy-D-glukoza (Hrmova i współpr. 1997). Działanie β -glukoendohydrolaz niszczy ściany komórkowe bielma w stopniu umożliwiającym dostęp odpowiednich enzymów hydrolitycznych do zgromadzonych w bielmie materiałów zapasowych. Z kiełkujących nasion jęczmienia wyizolowano również dwa izoenzymy, o właściwościach β -glukoegzohydrolaz, hydrolizujące β -1,3-glukany oraz β -1,3-, β -1,4-glukany (Hrmova i współpr. 1996, Hrmova & Fincher 1998), a także dwa izoenzymy hydrolizujące wiązanie $\beta(1\rightarrow4)$ -glukozydowe (Hrmova i współpr. 1996, Leah i współpr. 1995). Enzymy te mogą hydrolizować powstałe w wyniku działania β -1,3-, β -1,4-glukoendohydrolaz oligosacharydy do monomerycznych cząsteczek glukozy.

2.2.7.2. β -1,3-glukohydrolazy

β -1,3-glukanazy są enzymami powszechnie występującymi w roślinach. Ich substratem są β -1,3-glukany obecne w ścianach komórkowych kilku rodzajów komórek roślinnych oraz β -1,3-,1,6-glukany, które są głównym składnikiem ścian komórkowych wielu grzybów. Stwierdzono, że infekcja przez mikroorganizmy patogenne lub zastosowanie elisyltorów biotycznych powoduje wzrost aktywności β -1,3-glukanaz i chitynaz, które hydrolizują chitynowy szkielet ścian komórkowych grzybów. Taki wzrost aktywności zaobserwowano u grochu (Mauch i współpr. 1984, 1988), kukurydzy (Cordero i współpr. 1994), tytoniu (Kauffmann i współpr. 1987), ciecierzycy (Vogelsang & Barz 1993), jęczmienia (Kaku i współpr. 1997) oraz pszenicy (Münch-Garthoff i współpr. 1997). Wyniki te są podstawą przypuszczeń, że β -1,3-glukanazy odgrywają bezpośrednią rolę w mechanizmach obronnych rośliny. Doświadczenia *in vitro* wykazały, że mieszanina β -1,3-glukanaz i chitynaz może inhibować wzrost grzybów powodując degradację ściany strzępki (Leah i współpr. 1991, van de Rhee i współpr. 1994). Do tej pory nie wykazano jednak, czy enzymy te hamują rozwój grzybów *in vivo*. Dodatkowo β -1,3-glukanazy mogą pośrednio wpływać na indukcję mechanizmów obronnych w roślinie. Uwolnione, podczas katalizowanej przez te enzymy hydrolizy ścian komórkowych grzybów, rozgałęzione lub podstawione β -1,3-, β -1,6-D-glukany są związkami o właściwościach elisyltorów, które mogą uruchamiać w roślinie dalsze reakcje obronne, takie jak synteza fitoaleksyn (Lamb i współpr. 1989, Ebel & Cosio 1994, Ham i współpr. 1995, Okinaka i współpr. 1995).

Chociaż wiele uwagi poświęcono roli β -1,3-glukanaz w mechanizmach obronnych, wydaje się, że mogą one również odgrywać rolę w normalnym rozwoju roślin. Świadczy o tym fakt, że enzymy te są tkankowo specyficzne, a ich aktywność oraz ekspresja kodujących je genów zależy od fazy rozwojowej (Mauch i współpr. 1988, Leah i współpr. 1991, Cordero i współpr. 1993, Hird i współpr. 1993, Bucciaglia & Smith 1994, Delp & Palva 1999). Aktywność ta może być również regulowana przez hormony roślinne (Mauch i współpr. 1984, Vogelsang & Barz 1993). Endogennym substratem dla β -1,3-glukanaz może być kaloza, jednak do tej pory nie wiadomo dokładnie, jaka może być rola tych enzymów w procesach rozwojowych. Wykazano jedynie, że w pylnikach rzepaku, rzodkiewnika i tytoniu następuje organowo specyficzna ekspresja genów kodujących β -1,3-glukanazy (Hird i współpr. 1993, Bucciaglia & Smith 1994). Enzymy te mogą hydrolizować utworzoną z kalozy ścianę,

β -1,3-glikanazy są enzymami powstającymi w roślinach, ich substratem są β -1,3-glikany obecne w ścianach komórkowych takich roślin jak komoski rośliny oraz β -1,3-1,6-glikany, które są głównymi składnikami ścian komórkowych wielu grzybów. Stwierdzono, że infekcja przez mikroorganizmy patogenne lub zastosowanie chemicznych powoduje wzrost aktywności β -1,3-glikanazy i chitynazy, które hydrolyzują chitynowy szkielet ścian komórkowych grzybów. Ta sama aktywność zachodziła u groniu (Maus i wsp. 1984, 1985, Kockubay (Cordero i wsp. 1994), Gronu (Kauffmann i wsp. 1987), ciociery (Vogelung & Bartz 1993), jęczmienia (Kaku i wsp. 1997) oraz pszenicy (Mitsch-Gambert i wsp. 1997). Wyniki te są podstawą przypuszczeń, że β -1,3-glikanazy odgrywają bezpośrednią rolę w mechanizmach obronnych roślin. Doświadczenia in vitro wykazały, że mieszanina β -1,3-glikanazy i chitynazy może inhibować wzrost grzybów powodując degradację ściany grzyba (Lash i wsp. 1991, van de Biele i wsp. 1991). Do tej pory nie wykazano jednak, czy enzymy te bierają udział w mechanizmach obronnych w roślinie. Uważano, podczas katabolizmu przez te enzymy hydrolyzują ścian komórkowych grzybów, rozkładając ją na podstawowe β -1,3- β -1,6-D-glikany są związkami o właściwościach chitynowych, które mogą urzekać w roślinie dalsze reakcje obronne, takie jak syntezę fibrolicyn (Lash i wsp. 1989, Edel & Cato 1994, Ham i wsp. 1992, Okinaka i wsp. 1992).

Choć wiele uwagi poświęcono roli β -1,3-glikanazy w mechanizmach obronnych, wydaje się, że mogą one również odgrywać rolę w normalnym rozwoju roślin. Świadczy o tym fakt, że enzymy te są łaskawo specyficzne, a ich aktywność oraz ekspresja kodujących je genów zależy od fazy rozwojowej (Maus i wsp. 1988, Lash i wsp. 1991, Cordero i wsp. 1993, Hird i wsp. 1993, Baccaglia & Smith 1994, Edel & Cato 1994). Aktywność ta może być również regulowana przez hormony roślinne (Maus i wsp. 1984, Vogelung & Bartz 1993). Endogenne substraty dla β -1,3-glikanazy może być kolosa, jednak do tej pory nie wiadomo dokładnie, jaka może być rola tych enzymów w procesach rozwojowych. Wykazano jedynie, że w przypadku trzaski, trzodkiewca i trzmi suszyci ogonowo specyficzna ekspresja genów kodujących β -1,3-glikanazy (Hird i wsp. 1993, Baccaglia & Smith 1994). Książki te mogą hydrolyzować utworzone z kolosy ściany

otaczającą powstałe w wyniku podziałów mejotycznych tetrazy, uwalniając w ten sposób mikrospory.

Enzymy o właściwościach β -1,3-D-glukoendohydrolaz izolowano również z kiełkujących nasion jęczmienia (Høj i współpr. 1998) oraz z okrywy nasiennej ryżu (*Oryza sativa* L.) (Akiyama i współpr. 1997). W nasionach jęczmienia zaobserwowano wzrost aktywności enzymu podczas kiełkowania i stwierdzono, że aktywność ta w kilkudniowych siewkach może być większa od aktywności enzymów hydrolizujących β -1,3-, β -1,4-glukany (Høj & Fincher 1995). Ponieważ w nasionach zbóż zawartość endogennych β -1,3-glukanów jest niewielka, przypuszcza się, że enzymy te mogą stanowić rodzaj zabezpieczenia przed infekcją przez mikroorganizmy patogenne, na które narażona jest rozwijająca się siewka.

2.3. FLAWONOIDY

Rośliny wytwarzają wiele różnych niskocząsteczkowych związków chemicznych. Większość z tych substancji została sklasyfikowana jako metabolity wtórne, ponieważ uważano, że nie odgrywają one żadnej istotnej roli w metabolizmie roślinnym. Jednak ludzie od dawna używali tych związków jako lekarstw, przypraw, substancji zapachowych, barwników oraz w różnych gałęziach przemysłu chemicznego. Jedną z intensywniej badanych grup roślinnych metabolitów wtórnych są flawonoidy. Do tej pory scharakteryzowano ponad 3 tys. różnych flawonoidów i cały czas pojawiają się doniesienia o nowych strukturach (Koes i współpr. 1994). Chociaż ich szerokie rozprzestrzenienie w królestwie roślin jest znane od wielu lat, początkowo uważano, że nie posiadają one dużego znaczenia biologicznego. Obecnie jednak wiadomo, że flawonoidy pełnią wiele ważnych funkcji w roślinach (Koes i współpr. 1994, Dixon & Paiva 1995, Shirley 1996, Berhow & Vaughn 1999).

2.3.1. Biosynteza i metabolizm flawonoidów

Flawonoidy są związkami fenolowymi, ich podstawowy szkielet C_{15} składa się z dwóch pierścieni fenolowych A i B połączonych łańcuchem trójwęglowym (Rys. 2.8.). W większości flawonoidów łańcuch ten jest zamknięty tworząc heterocykliczny pierścień C. W zależności od stopnia utlenienia pierścienia C flawonoidy dzieli się na sześć podklas: chalkony, flawanony, flawony, flawonole, antocyjanidyny i izoflawonoidy (Rys. 2.9.) (Hahlbrock 1981). Flawonoidy powstają w szlaku fenylopropanoidowym (Rys. 2.9.). Prawie wszystkie związki fenylopropanoidowe syntezowane są z kwasu cynamonowego, który powstaje z

dotyczy powstania w wyniku podziałów mejozycznych tetrad, uwzględniając w ten sposób mikrosporę.

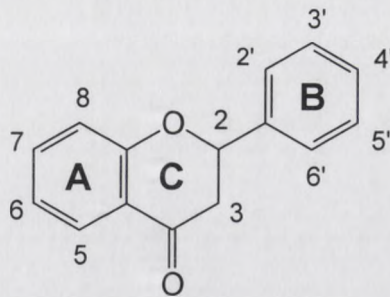
Enzymy o właściwościach β -1,3- β -glukanohydrolazy izolowano również z histyngowych nasion jęczmienia (Haj i wsp. 1988) oraz z otrawy nasiennej ryżu (Owari i Ino 1987). W nasionach jęczmienia zachorowano w czasie aktywności enzymu podczas kiełkowania i zwiędnięcia, ze aktywność ta w kiełkujących ziarnach może być większa od aktywności enzymu hydrolyzującego β -1,3- β -1,4-glukany (Haj & Fischer 1987). Powstanie w nasionach ziół zawartość endogennych β -1,3-glukanów jest niewielka, przyczyną jest to, że enzymy te mogą stanowić rodzaj zabezpieczenia przed infekcją przez mikroorganizmy patogenne, na które nasiona jest rozwijające się rośliny.

2.1. FIAWONIDY

Rośliny wytwarzają wiele różnych niekoenzymatycznych związków chemicznych. Większość z tych substancji została sklasyfikowana jako metabolity wtórne, ponieważ uważano, że nie odgrywały one żadnej roli w metabolizmie roślinnym. Jednak badanie od czasu odkrycia tych związków jako lektyn, przyswajaczy, substancji zapachowych, barwników oraz w różnych gałęziach przemysłu chemicznego. Jedną z intensywniej badanych grup roślinnych metabolitów wtórnych są fiawonoidy. Do tej pory scharakteryzowano ponad 3 tys. różnych fiawonoidów i cały czas pojawiają się doniesienia o nowych strukturach (Koca i wsp. 1994). Chociaż ich znaczenie toksykologiczne w królestwie roślin jest mniejsze od wielu innych, początkowo uważano, że nie posiadają one dużego znaczenia biologicznego. Obecnie jednak wiadomo, że fiawonoidy pełnią wiele ważnych funkcji w roślinach (Koca i wsp. 1994, Dixon & Paiva 1995, Shihai 1996, Barthol & Vaughn 1999).

2.1.1. Biosynteza i metabolizm fiawonoidów

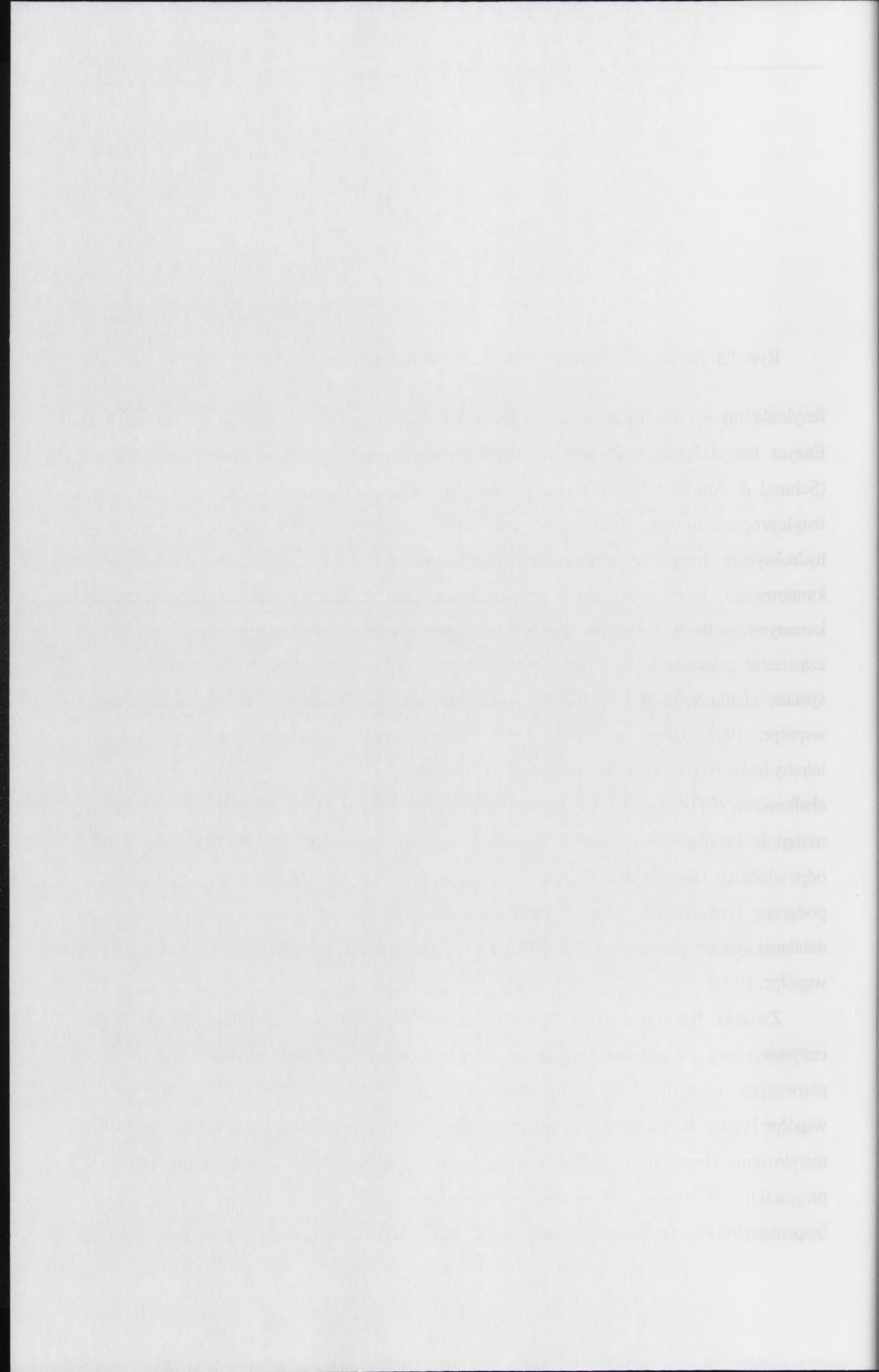
Fiawonoidy są związkami fenolowymi, ich podstawowy szkielet C_{15} składa się z dwóch pierścieni fenolowych A i B połączonej łańcuchem węglowym (Rys. 2.8.). W węzłach fiawonoidów łańcuch ten jest zamknięty tworząc heterocykliczny pierścień C. W zależności od stopnia utlenienia pierścienia C fiawonoidy dzielą się na sześć podklas: chalcony, flavanony, flavony, flavonole, antyflawonoidy i izoflawnonoidy (Rys. 2.9.) (Hahlbeck 1981). Fiawonoidy powstają w szkieletu fenylpropanoidowym (Rys. 2.9.). Pierwsze wszystkie związki fenylpropanoidowe syntezowane są z kwasu cynamonowego, który powstaje z

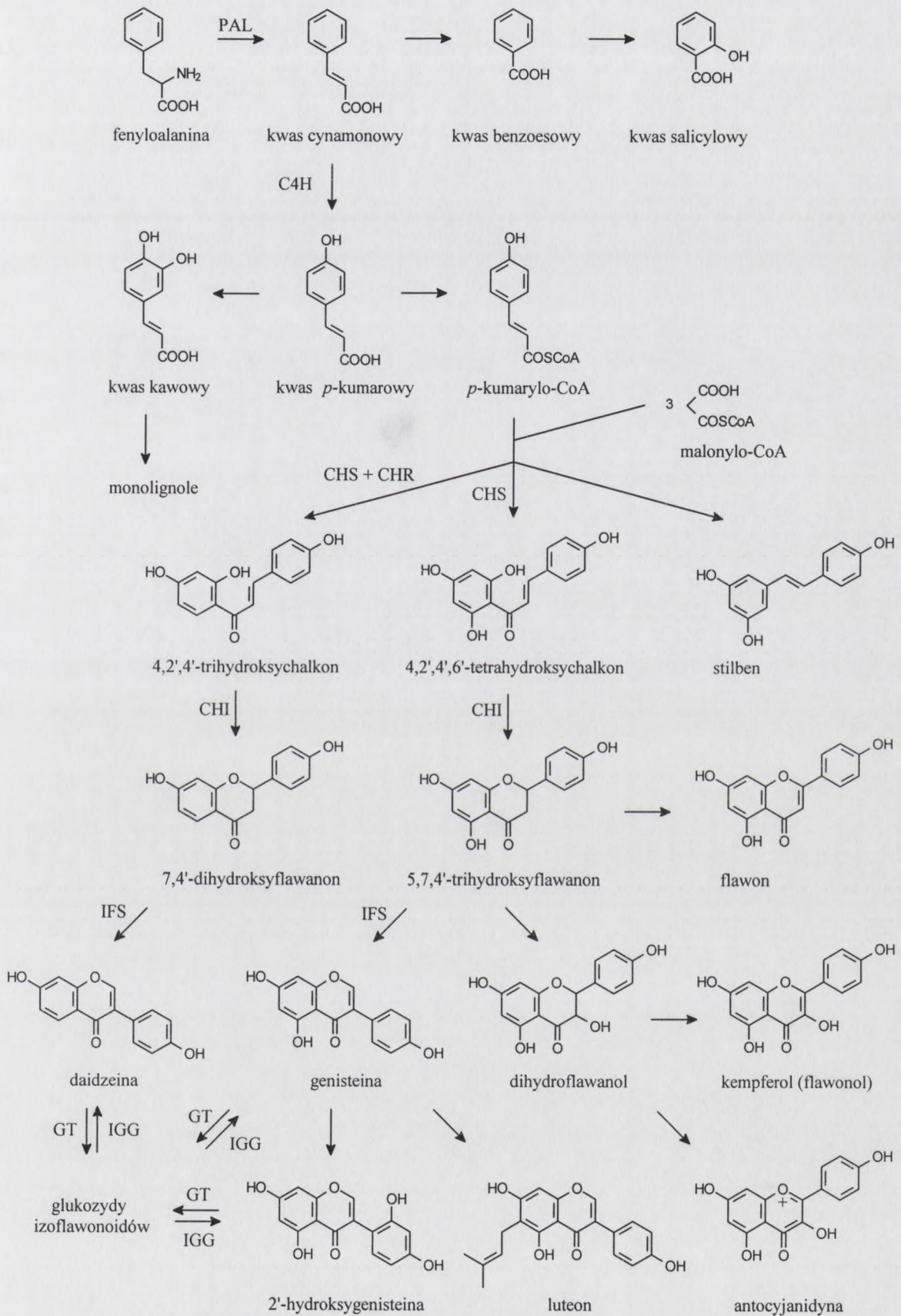


Rys. 2.8. Struktura podstawowego szkieletu flawonoidów.

fenyloalaniny w reakcji katalizowanej przez amoniakoliazę fenyloalaniny (PAL; EC 4.3.1.5). Enzym ten oddziela zaliczany do metabolizmu pierwotnego szlak kwasu szikimowego (Schmid & Amrhein 1995), w którym powstają trzy aminokwasy aromatyczne, od szlaku fenylopropanoidowego. Hydroksylowanie kwasu cynamonowego katalizowane przez 4-hydroksylazę kwasu cynamonowego (C4H; EC 1.14.13.11), prowadzi do kwasu *p*-kumarowego, który dalej może być przekształcany w związki takie, jak: flawonoidy, kumaryny, stilbeny i ligniny. Flawonoidy syntezowane są w reakcji kondensacji jednej cząsteczki *p*-kumarylo-CoA oraz trzech cząsteczek malonylo-CoA, katalizowanej przez syntazę chalkonową (CHS; EC 2.3.1.74) (Schröder & Schröder 1990, Rommeswinkel i wspóln. 1992, Dixon & Steele 1999). W większości roślin w reakcji tej powstaje tetrahydroksychalkon, a w roślinach, które obok CHS posiadają również reduktazę chalkonową (CHR; EC 1.1.1.-) może być tworzony trihydroksychalkon. Związki te ulegają następnie katalizowanej przez izomerazę flawanonu (CHI; EC 5.5.1.64) izomeryzacji do odpowiednich flawanonów. W tym miejscu szlak biosyntezy ulega rozgałęzieniu na różne podgrupy flawonoidów. Jedną z nich stanowią izoflawonoidy, które powstają w wyniku działania syntazy izoflawonu (IFS; EC 5.4.99.-) (Hagmann & Grisebach 1984, Hakamatsuka i wspóln. 1990).

Związki fenolowe mogą ulegać dalszym modyfikacjom chemicznym na drodze enzymatycznej, co prowadzi do dużej różnorodności strukturalnej flawonoidów. Jedną z pierwszych modyfikacji jest hydroksylowanie (Gunia i wspóln. 1991, Schopfer i wspóln. 1998); w późniejszych etapach biosyntezy grupy hydroksylowe mogą ulegać metylowaniu (Ibrahim i wspóln. 1987, Khouri i wspóln. 1988, He & Dixon 1996). W przypadku niektórych flawonoidów obserwuje się również podstawienie grupy izopentenylowej. Ta ostatnia modyfikacja występuje szczególnie często w przypadku





Rys. 2.9. Biosynteza izoflawonoidów (opis w tekście).

izoflawonoidów, a podstawnik prenylowy przyłączony jest zwykle w pozycji 6-, 8- lub 3'- (Biggs i współpr. 1990, Welle & Grisebach 1991, Laflamme i współpr. 1993, Tahara & Ibrahim 1995). Pochodne izopentenylowe ulegają często dalszym modyfikacjom prowadzącym do powstania dodatkowego pierścienia w cząsteczce (Tanaka i współpr. 1996).

Jedną z końcowych modyfikacji, której mogą ulegać związki fenolowe jest glikozylacja. Przyłączenie reszt cukrowych zwiększa ich rozpuszczalność, co umożliwia magazynowanie glikozylowanych metabolitów w wakuolach (Hösel 1981, Stafford 1990). W przypadku związków fenolowych obserwuje się dwa rodzaje połączeń z cząsteczką cukru poprzez wiązania O- lub C-glikozydowe. Flawonoidy mogą tworzyć wiązania O-glikozydowe w pozycjach 3-, 5-, 7-, 3'- i 4'-, wiązania C-glikozydowe tworzone są zwykle w pozycji 6- i 8- (Hösel 1981, Stafford 1990). W przypadku izoflawonoidów niemożliwe jest utworzenie 3-O-glikozydów i nie stwierdzono też występowania 2-O-glikozydów. Reakcje glikozylacji są katalizowane przez odpowiednie glikozylotransferazy (GT), które jako substrat wykorzystują połączenia nukleotydowo-cukrowe, w przypadku glukozylotransferaz zwykle UDP-glukozę (Ibrahim i współpr. 1987, Ishikura & Yamamoto 1990, McIntosh i współpr. 1990). Glikozylotransferazy flawonoidowe wykazują dużą specyficzność w stosunku do określonej podgrupy flawonoidów oraz określonego wzoru podstawienia cząsteczki, jak i pozycji, w której zachodzi glikozylacja (Hösel 1981).

Wchodzące w skład glikozydów podjednostki cukrowe mogą ulegać acylowaniu, zarówno kwasami alifatycznymi, na przykład malonowym, jak i aromatycznymi, na przykład kwasem hydroksycynamonowym (Stafford 1990). Reakcja ta jest katalizowana przez odpowiednie O-acylotransferazy. W roślinach motylkowatych glukozydy izoflawonoidów występują często jako 6''-O-malonylowane pochodne. W ciecierzycy, w różnych gatunkach koniczyny, a także w *Baptisia australis* L. i *Ononis spinosa* L. stwierdzono występowanie 7-O-(6''-O-malonylo)glukozydów formononetyny oraz biochaniny A (Köster i współpr. 1983). W hodowli zawiesinowej ciecierzycy wykryto 3-O-(6''-O-malonylo)glukozydy medikarpiny i mackiainy (Weidemann i współpr. 1991) i wykazano, że związki te występują w wakuoli (Mackenbrock i współpr. 1992). Głównymi metabolitami fenolowymi w hodowli zawiesinowej wyki (*Vicia sativa* L.) są 7-O-glukozyd aformozyny i jego pochodna 6''-O-malonylowa oraz 3-O-(6''-O-malonylo)glukozyd medikarpiny (Kessmann i współpr. 1990). W soi 7-O-glukozydy genisteiny, daidzeiny i glyciteiny występują głównie w postaci połączeń 6''-O-malonylowanych oraz w niewielkim stopniu jako 6''-O-acetylowane pochodne (Kudou i współpr. 1991a, 1991b, Graham 1991).

izoflawonoidów, a podawanie przeciwny przyspoko jest wykazane w pozycji 6-8- lub 3- (Higgs i wspólni 1995, Wells & Griesbach 1991, Latham i wspólni 1993, Tabata & Iwashita 1992). Podobnie izoflawonoidy mogą być także częścią diety modyfikującej prowadzącej do powstania dodatkowego fazy w ekspercie (Tanaka i wspólni 1990).

Jedną z końcowych możliwości, które mogą być osiągnięte w celu zwiększenia zawartości glikozydów, jest zwiększenie tężci cukrowych związków ich rozpuszczalność, co umożliwia magazynowanie glikozydowanych metabolitów w wakuolach (Häsel 1981, Stalford 1990). W przypadku zwiększenia zawartości glikozydów w wakuolach, należy pamiętać o tym, że glikozydowanie w wakuolach O- lub C-glikozydów. Izoflawonoidy mogą tworzyć wiązania O-glikozydowe w pozycjach 3-, 2-, 7-, 3'- i 4'-, wiązania C-glikozydowe tworzone są zwykle w pozycji 6- i 8- (Häsel 1981, Stalford 1990). W przypadku izoflawonoidów niemożliwe jest utworzenie 3-O-glikozydów i nie stwierdzono też występowania 5-O-glikozydów. Reakcje glikozylacji są katalizowane przez odpowiedni glikozylotransferaz (GT), które jako substrat wykorzystują połączenia nukleotydowo-cukrowe, w przypadku glikozylotransferazy zwiędła UDP-glukozę (Higgin i wspólni 1987, Iwashita & Yamamoto 1990, McInnes i wspólni 1990). Glikozylotransferazy flavonoidowe wykazują dużą specyficzność w stosunku do struktury podgrupy flavonoidów oraz określonego wzoru podstawienia cząsteczki, jak i pozycji, w której zachodzi glikozylacja (Häsel 1981).

Wchodząc w skład glikozydów podjednostki cukru mogą być także acetylowane, zarówno kwasami karboksylowymi, jak i amoniaczynami, na przykład malonowym, jak i izomercyzynami, na przykład kwasem hydroksycynamonowym (Stalford 1990). Reakcja ta jest katalizowana przez odpowiednią O-acetylotransferazę. W roślinach mączkowniczych glikozydy izoflawonoidów występują często jako 6"-O-malonylowane pochodne. W ciociarkach, w różnych gatunkach konicy, a także w kapturze ciociarki i G. officinalis L., stwierdzono występowanie 3-(6"-O-malonylo)glikozydów (formononety) oraz pochodną A (Koster i wspólni 1983). W bodwi zawierającej ciociarkę występuje 3-O-(6"-O-malonylo)glikozyd malonowy i malonowy oraz 3-O-(6"-O-malonylo)glikozyd malonowy (Kaseman i wspólni 1990). W zawieszonym wycie (L. sativa L.), są 7-O-glikozyd etononowy i jego pochodne 6"-O-malonylowane oraz 3-O-(6"-O-malonylo)glikozyd malonowy (Kaseman i wspólni 1990). W 3-O-glikozyd glicynowy, dajdżynowy i glicynowy występują głównie w postaci połączeń 6"-O-malonylowanych oraz w niewielkim stopniu jako 6"-O-acetylowane pochodne (Khalil i wspólni 1991a, 1991b, Gidam 1991).

Zmagazynowane przez roślinę glikozydy flawonoidów mogą ulegać hydrolizie katalizowanej przez odpowiednie glikozydazy. Do tej pory opisano jednak niewiele takich enzymów. Z liścieni, hypokotyli i korzeni ciecierzycy wyizolowano kilka izoform β -glukozydazy, specyficznej dla 7-O-glukozydów izoflawonoidów (Hösel & Barz 1975). Enzymy te nie hydrolizowały disacharydów oraz α -glukozydów, wykazując specyficzność w stosunku do glukozydów związków fenolowych, z wyraźną preferencją do 7-O- β -glukozydów formononetyny, biochaniny A oraz apigeniny. Stosując metodę lokalizacji immunohistochemicznej wykazano, że są to enzymy cytoplazmatyczne (Burmeister & Hösel 1981). Podobne izoformy glukozydaz izoflawonoidów wykryto w hodowlach zawieszinowych zainicjowanych z pędów i korzeni ciecierzycy, jednak wzajemne proporcje poszczególnych izoenzymów w zawieszinie były inne niż obserwowane w poszczególnych tkankach (Burmeister & Hösel 1980). Dodatkowo, w liściach ciecierzycy wykryto enzym hydrolizujący β -diglukozydy izoflawonoidów, którego nie obserwowano w pozostałych częściach rośliny (Hösel 1976).

Podczas analiz wydzielin z pęczniejących nasion soji wykryto w nich aktywność β -glukozydazy, która hydrolizowała glukozydy genisteiny i daidzeiny (Graham 1991). W liścieniach soji wykryto trzy izoformy enzymu o takiej aktywności, a jedna z nich została oczyszczona do stanu homogenego i scharakteryzowana (Matsuura i współpr. 1995). Nie wykazano jednak, że jest to β -glukozydaza swoista dla glukozydów izoflawonoidów, ponieważ enzym hydrolizował również z dużą wydajnością gentobiozę, eskulinę oraz amygdalinę.

β -glukozydazę swoistą dla glukozydów związków fenolowych wyizolowano z kwiatów jęczminkowych rumianku pospolitego (*Chamomilla recutita* L.) (Maier i współpr. 1991, 1993). Metodyka izolacji wskazuje na to, że jest to białko cytoplazmatyczne. Badania nad oczyszczonym enzymem wykazały, że nie hydrolizuje on α -glikozydów oraz disacharydów i jest specyficzny dla 7-O-glukozydów flawonoidów. Stwierdzono również, że wzrost aktywności β -glukozydazy podczas rozwoju kwiatów skorelowany jest ze wzrostem całkowitej zawartości flawonoidów w tej części rośliny (Maier i współpr. 1993).

2.3.2. Funkcje flawonoidów w roślinach

Flawonoidy pełnią wiele funkcji biologicznych w roślinach. W wielu przypadkach związki z tej grupy nadają zabarwienie płatkom kwiatów, odgrywając istotną rolę w procesie

rozmnażania jako atraktanty dla zapylających owadów (Koes i współpr. 1994, Dixon & Paiva 1995). Stwierdzono również, że flawonoidy są czynnikiem istotnym dla kiełkowania pyłku i wzrostu łagiewki pyłkowej (Ylstra i współpr. 1992). Dokładna ich rola w tym procesie nie jest znana, wyniki badań sugerują, że związki te mogą brać udział w tworzeniu ściany łagiewki pyłkowej (Derksen i współpr. 1999). Przypuszcza się również, że flawonoidy są istotne dla zachowania zdolności kiełkowania u przechowywanych nasion (Shirley 1998). Rośliny wykorzystują też fakt, że związki te absorbują promieniowanie z zakresu UV. Zmagazynowane w wakuolach komórek epidermy flawonoidy pochłaniają promieniowanie UV chroniąc komórki mezofilu przed jego szkodliwym działaniem (Stafford 1991, Koes i współpr. 1994, Dixon & Paiva 1995). Flawonoidy odgrywają też ważną rolę w oddziaływaniach roślin z mikroorganizmami patogennymi i symbiotycznymi (Stafford 1997).

2.3.2.1. Flawonoidy w reakcjach obronnych roślin

Odporność roślin na infekcję przez mikroorganizmy patogenne związana jest z szybkim i skoordynowanym uruchomieniem wielu mechanizmów obronnych. Elementami odpowiedzi obronnej są: reakcja nadwrażliwości, synteza białek strukturalnych ścian komórkowych oraz białek PR, a wśród nich enzymów hydrolitycznych: chitynaz i β -1,3-glukanaz oraz synteza i akumulacja fitoaleksyn. Fitoaleksyny są to niskocząsteczkowe związki o właściwościach przeciwgrzybowych i przeciwbakteryjnych, które są syntezowane przez roślinę *de novo* w wyniku infekcji przez mikroorganizmy patogenne (Müller & Börger 1940). Do tej pory zidentyfikowano ponad 350 fitoaleksyn u roślin należących do 30 różnych rodzin (Kuć 1995). Największą ilość tych związków, bo około 130, scharakteryzowano w rodzinie *Leguminosae*. W roślinach motylkowych powszechnie występują fitoaleksyny izoflawonoidowe (Smith & Banks 1986, Kuć 1995, Dakora & Phillips 1996) należące do różnych podklas strukturalnych takich jak: izoflawony, izoflawanony, pterokarpany (Rys. 2.10.), izoflawany i kumestany.

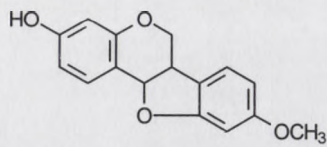
W roślinach mogą występować również metabolity o właściwościach fungicydowych i bakteriocydowych, które nie są syntezowane *de novo* w wyniku infekcji, lecz wytwarzane są konstytutywnie albo uwalniane są z istniejących połączeń. Ta grupa związków określona została mianem fitoantycypin (VanEtten i współpr. 1994). Należy zwrócić uwagę na fakt, że różnica pomiędzy fitoaleksyną a fitoantycypiną nie jest oparta na strukturze chemicznej, lecz na sposobie regulacji biosyntezy. Dlatego też ten sam metabolit może być zarówno fitoaleksyną, jak i fitoantycypiną, nawet w tej samej roślinie. Wydaje się, że taka sytuacja ma miejsce w przypadku roślin motylkowatych. W roślinach tej rodziny w wyniku infekcji

rozważania jako niezbędny dla zapobiegania owadów (Kozłowski & Pająk 1994, Dixon & Paine 1995). Stwierdzono również, że flawonoidy są odpowiedzialne za obronę roślin przed owadami (Kozłowski & Pająk 1994, Dixon & Paine 1995). Dotychczas ich rola w tym procesie nie jest znana, wyzwiłałaby jednak sugerować, że związki te mogły być udział w tworzeniu ściany komórkowej (Dixon & Paine 1995). Przypuszcza się również, że flawonoidy są istotne dla zachowania zdolności do fotosyntezy w warunkach stresu (Shibata 1998). Kolejny wykorzystany jest fakt, że związki te absorbują promieniowanie z zakresu UV. Zmagazynowane w warstwach komórek epidermy flawonoidy pochłaniają promieniowanie UV chroniąc komórki mesofila przed jego szkodliwym działaniem (Stallard 1991, Kozłowski & Pająk 1994, Dixon & Paine 1995). Flawonoidy odgrywają też ważną rolę w oddziaływaniach roślin z mikroorganizmami patogennymi i symbiotycznymi (Stallard 1997).

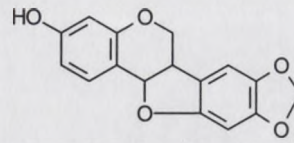
2.2.2.1. Flawonoidy w reakcjach obronnych roślin

Odporność roślin na infekcję przez mikroorganizmy patogenne zwiększa jest z wyjątkiem i skomplikowanym mechanizmem wielu mechanizmów obronnych. Kluczowym odpowiedem obronny jest reakcja nadwrażliwości, system białek strukturalnych oraz komponentów obrony. Białka PR z wśród nich enzymów hydrolitycznych: chitynaz i β -1,3-glukanaz oraz syntazy skopolony glukozyd. Flawonoidy są to niskocząsteczkowe związki o właściwościach przeciwdrobnoustrojowych i przeciwdrobnoustrojowych, które są syntezowane przez roślinę do czasu wystąpienia infekcji przez mikroorganizmy patogenne (Miller & Goyer 1990). Do tej grupy zaliczają się ponad 350 związków o rolniczo ważnych do 30 różnych rodzajów (Kozłowski 1995). Największą ilość tych związków, do około 13%, skumulowały w roślinie *Lycopersicon*. W roślinach motylkowych występuje glikozyd flawonoidowy kofeoinolozon (Smith & Banks 1990, Kozłowski & Paine 1995) zaliczający do grupy polifenolów strukturalnych takich jak: kofeoinolozon, kofeoinolozon (Ryż 1,10), indolizyny i kumestryny.

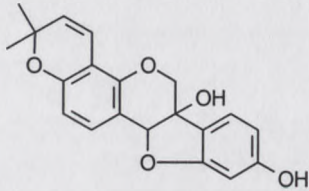
W roślinach mogą występować również metabolity o właściwościach przeciwdrobnoustrojowych. Istotne jest, że syntezowane do czasu wystąpienia infekcji, lecz wywołane są kofeoinolozonem lub innymi związkami. Te grupy związków określone zostały mianem fitoantycypin (Vandenberg & Paine 1994). Należy wiedzieć, że nie wszystkie różnice pomiędzy flawonoidami a fitoantycypinami nie jest oparta na strukturze chemicznej, lecz na sposobie regulacji biosyntezy. Dlatego też ten sam metabolit może być zarówno flawonoidem jak i fitoantycypiną nawet w tej samej roślinie. Wynika więc, że taka sytuacja ma miejsce w przypadku roślin motylkowych. W roślinach tej rodziny w wyjątkowo



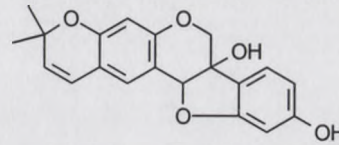
medikarpina



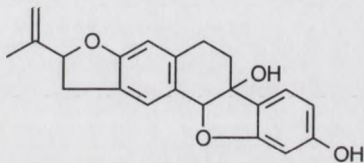
mackiaina



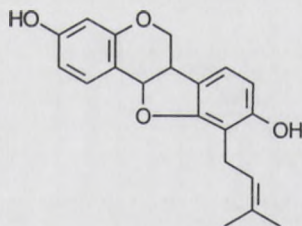
gliceolina I



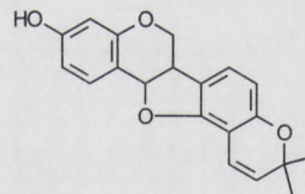
gliceolina II



gliceolina III



faseolidyna



faseolina

Rys. 2.10. Struktury wybranych fitoaleksyn pterokarpanowych występujących w roślinach motylkowatych.

dochodzi zazwyczaj do aktywacji enzymów szlaku fenylopropanoidowego i syntezy *de novo* fitoaleksyn izoflawonoidowych. Istnieją jednak wyniki wskazujące na to, że te same metabolity mogą być też uzyskiwane w wyniku hydrolizy zmagazynowanych w roślinie glikozydów. W takim przypadku związki te należy zaliczyć do fitoantycypin (VanEtten i współpr. 1994).

Mechanizmy biosyntezy i akumulacji fitoaleksyn pterokarpanowych zostały dość dobrze poznane w zawiesinowej hodowli komórek ciecierzycy (Barz & Mackenbrock 1994). Heterotroficzne hodowle komórkowe ciecierzycy syntezują głównie biochaninę A i



Fig. 1.10. Structure of 4-methylphenol.



Fig. 1.11. Structure of a steroid nucleus.

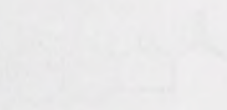


Fig. 1.12. Structure of a complex organic molecule.

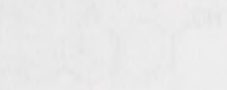


Fig. 1.13. Structure of 3-methylphenol.

Fig. 1.10. Structure of 4-methylphenol.

Fig. 1.11. Structure of a steroid nucleus.

Fig. 1.12. Structure of a complex organic molecule.

Fig. 1.13. Structure of 3-methylphenol.

formononetynę oraz w mniejszych ilościach homoferrerinę, cicerinę, medikarpinę i mackiainę. Związki te magazynowane są w wakuolach jako 3-O-(6''-O-malonylo)glukozydy (Weidemann i współpr. 1991, Mackenbrock i współpr. 1992). Zawiesiny komórkowe ciecierzycy traktowane elisytorem uzyskanym ze ścian komórkowych drożdży lub patogenicznego grzyba *Ascochyta rabiei* syntezują fitoaleksyny pterokarpanowe: medikarpinę i mackiainę, których część jest wydzielana przez komórki do medium (Kessmann i współpr. 1988, Gunia i współpr. 1991, Weidemann i współpr. 1991). Na to, że związki te syntezowane są *de novo* wskazuje, wywołana działaniem elisytorów, indukcja wszystkich enzymów biorących udział w biosyntezie fitoaleksyn, w tym zarówno enzymów zaliczanych do ogólnego metabolizmu fenylopropanoidowego, takich jak: PAL, CHS i IFS, jak i enzymów biosyntezy pterokarpanów (Daniel i współpr. 1988, 1990, Daniel & Barz 1990, Gunia i współpr. 1991). Akumulacja medikarpiny i mackiainy następuje pomiędzy 6 a 12 h po podaniu elisytora, a po 12 h w hodowli komórkowej gromadzą się 3-O-(6''-O-malonylo)glukozydy medikarpiny i mackiainy (Weidemann i współpr. 1991). Stosunek ilości powstałych glukozydów do aglikonów zależy od stężenia użytego elisytora, co można uznać za model stopnia nasilenia infekcji. Niskie stężenie elisytora aktywuje syntezę glikozydów medikarpiny i mackiainy, podczas gdy wyższe stężenia elisytora prowadzą do tworzenia wolnych aglikonów (Mackenbrock i współpr. 1993). Biosynteza aglikonów jest jednak ograniczona do krótkiego okresu czasu po elisytacji, po dłuższym czasie, nawet przy zastosowaniu dużych dawek elisytora, w komórkach dochodzi do akumulacji glikozydów.

Różnice wynikające z zastosowanego stężenia elisytora mogą być obserwowane również na poziomie enzymatycznym. Przy niższych stężeniach wzrasta aktywność glukozylotransferazy (GT) i malonylotransferazy (MT), podczas gdy zastosowanie wyższych stężeń elisytora prowadzi do wzrostu aktywności malonyloesterazy (EST) oraz glukozydazy (IGG) (Mackenbrock i współpr. 1993). Dane te wskazują, że źródłem wydzielanych do medium w hodowli zawiesinowej fitoaleksyn pterokarpanowych może być oprócz syntezy *de novo*, hydroliza zmagazynowanych w wakuolach malonylowanych glukozydów tych związków. Istnienie takiej alternatywnej drogi powstania medikarpiny i mackiainy z ich glikozydów potwierdzono w doświadczeniach z zastosowaniem inhibitora PAL (Mackenbrock i współpr. 1993). Doświadczenia takie wykazały również, że zablokowanie głównego szlaku fenylopropanoidowego prowadzi do hydrolizy, konstytutywnie występującego w komórkach ciecierzycy, 7-O-(6''-O-malonylo)glukozydu formononetyny, a powstały w wyniku tej reakcji aglikon jest wykorzystywany jako prekursor fitoaleksyn

pterokarpanowych (Mackenbrock & Barz 1991). Reakcja ta wydaje się być swoistą, ponieważ występujący również w komórkach 7-O-(6''-O-malonylo)glukozyd biochaniny A nie ulega hydrolizie. Podobny metabolizm glukozydu formononetyny obserwowano w korzeniach ciecierzycy (Jaques i współpr. 1985).

Doświadczenia prowadzone na hodowli zawiesinowej lucerny (*Medicago sativa* L.) wykazały, występowanie podobnego mechanizmu syntezy i akumulacji fitoaleksyn. Elisytacja hodowli komórkowej preparatem otrzymanym z *Colletotrichum lindemuthianum* prowadzi do aktywacji transkrypcji genów kodujących enzymy ogólnego metabolizmu fenylopropanoidowego, takie jak: PAL, CHS, CHR, CHI (Dalkin i współpr. 1990, Jorin & Dixon 1990, Ni i współpr. 1996), jak również genów kodujących enzymy biorące udział w syntezie fitoaleksyn pterokarpanowych (Paiva i współpr. 1991, He i współpr. 1998). Podobną aktywację wywołuje infekcja liści wyki patogennym grzybem *Phoma medicaginis* (Paiva i współpr. 1994). Aktywacja biosyntezy flawonoidów prowadzi do gwałtownej akumulacji medikarpiny, której stężenie osiąga maksimum po upływie około 14 h. Po tym czasie ilość medikarpiny maleje, wzrasta natomiast ilość jej 7-O-(6''-O-malonylo)glukozydu (Kessmann i współpr. 1990). Doświadczenia z zastosowaniem inhibitora PAL wykazały, że glukozyd ten może zostać wykorzystany jako alternatywne źródło medikarpiny. Równocześnie hydrolizie może ulegać 7-O-(6''-O-malonylo)glukozyd formononetyny, a powstały aglikon może być przekształcany do medikarpiny (Kessmann i współpr. 1990).

W soji większość całkowitej puli izoflawonoidów stanowią 7-O-(6''-O-malonylo)glukozydy genisteiny i daidzeiny (Kudou i współpr. 1991b). Funkcję fitoaleksyn w tej roślinie spełniają izomeryczne pterokarpany, określane mianem gliceolin, które są pochodnymi daidzeiny (Ingham i współpr. 1981). Chociaż podczas odpowiedzi obronnej soji aktywowane są geny kodujące enzymy szlaku fenylopropanoidowego (Habereeder i współpr. 1989) i syntezy pterokarpanów (Schopfer i współpr. 1998), możliwy jest również w syntezie gliceolin udział zmagazynowanych w roślinie glukozydów izoflawonoidów. Podczas infekcji liścieni soji grzybem *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea* dochodzi do gwałtownej hydrolizy 7-O-(6''-O-malonylo)glukozydów daidzeiny i genisteiny, a równolegle następuje akumulacja gliceolin (Graham i współpr. 1990). Inny obraz odpowiedzi obronnej uzyskano podczas inokulacji liści soji przez *P. megasperma*. W plamkach nekrotycznych stwierdzono wzrost ilości gliceolin, podczas gdy na obrzeżach plamek dodatkowo zaobserwowano znaczny wzrost zawartości glikozydów daidzeiny, genisteiny i glyciteiny (Morris i współpr. 1991). Podobny profil akumulacji izoflawonoidów zaobserwowano w testach liścieniowych z

użyciem elisytora z *P. megasperma*. W warstwach komórek znajdujących się w pobliżu miejsca podania elisytora dochodzi do akumulacji gliceolin, a w niższych warstwach komórek liścieni znacząco wzrasta ilość malonylowanych glukozydów genisteiny i daidzeiny (Graham & Graham 1991). Ta zróżnicowana odpowiedź w różnych warstwach komórek związana jest z działaniem kilku niezależnych czynników. Obecność samego elisytora wystarcza do aktywacji akumulacji glikozydu daidzeiny, gromadzenie glikozydu genisteiny wymaga światła, a synteza gliceolin zachodzi tylko wówczas, gdy elisytor наносzony jest na wcześniej zranioną tkankę (Graham & Graham 1994, Graham 1995, Graham & Graham 1996, 1999). Akumulacja gliceolin zmniejsza się po upływie 48 h, podczas gdy wzrost ilości glikozydów jest bardziej trwały, co sugeruje, że w wypadku dalej postępującej infekcji mogą one być hydrolizowane, a powstałe aglikony mogą być wykorzystane w reakcjach obronnych.

Daidzeina będąc prekursorem gliceolin może być wykorzystana przez roślinę do ich syntezy. W doświadczeniach, w których na plamki nekrotyczne hypokotyli наносono glukozyd daidzeiny, stwierdzono jednak jedynie wzrost ilości wolnej daidzeiny, a nie gliceolin (Morris i współpr. 1991). Wolna genisteina nie może być metabolizowana bezpośrednio do gliceolin, nie stwierdzono również by mogła być ona przekształcana w daidzeinę (Graham i współpr. 1990). Badania *in vitro* wykazały, że genisteina hamuje wzrost *Phytophthora sojae* (Rivera-Vargas i współpr. 1993), co sugeruje, że po uwolnieniu z glikozydów może ona dodatkowo wzmacniać fungicydowe działanie gliceolin. Wyniki najnowszych badań wskazują na to, że uwolniona z połączeń glikozydowych genisteina może regulować odkładanie polimerów fenolowych w ścianach komórkowych. Izoflawonoid ten wykazuje w testach *in vitro* zdolność aktywacji, związanej z błoną komórkową, oksydazy NADH (Nox II) (Graham i współpr. 1998, Graham & Graham 1999). Enzym ten wytwarza H₂O₂, konieczny do syntezy polimerów fenolowych. Na to, że genisteina rzeczywiście odgrywa rolę aktywatora Nox II wskazuje podobna dystrybucja tkankowa tego enzymu oraz swoistej glukozydazy, która może uwalniać genisteinę z jej połączeń glikozydowych. (Graham i współpr. 1998).

Podobnie jak w innych roślinach motylkowatych, również u fasoli w wyniku infekcji dochodzi do aktywacji genów kodujących enzymy głównego szlaku fenylopropanoidowego (Ryder i współpr. 1984, Edwards i współpr. 1985, Jakobek & Lindgren 1993). Jednocześnie wykazano udział zmagazynowanych w tkance tej rośliny glikozydów izoflawonoidów w syntezie fitoaleksyn. Na podstawie badań stwierdzono, że podczas infekcji hypokotyli fasoli

użył się elizytra z P. węgryczka. W warstwach komórek znajdujących się w pobliżu trójca podania elizytra dochodzi do akumulacji glicolitu, a w niższych warstwach komórek (Graham 1991). Ta różnicowana odpowiedź w różnych warstwach komórek związana jest z działaniem kilku niezależnych czynników. Obecność samego elizytra wywołuje aktywację akumulacji glicolitu do działania, promowanie glicolitu gęstości wywołuje światła, a synteza glicolitu zachodzi tylko wówczas, gdy elizytra nanoszony jest na wszelkiej stronie tkanki (Graham & Graham 1992, Graham 1994, Graham & Graham 1995, 1999). Akumulacja glicolitu zmniejsza się po upływie 48 h, podczas gdy wzrost ilości glicolitu jest bardziej trwały, co sugeruje, że w wypadku dalszej postępującej infekcji mogą one być hydrofobowe, a powstanie glicolitu mogłoby być wykorzystane w reakcjach obronnych.

Działanie będąc przetransmitowane glicolitu może być wykorzystane przez roślinę do ich syntezy. W doświadczalnych, w których na plonki nekrotyczne ryżokopii nanoszono glicolitu do działania, stwierdzono jednak jedynie wzrost ilości wolnej chlorenchimy, a nie glicolitu (Graham & Graham 1991). Wzrost glicolitu nie może być traktowany bezpośrednio do glicolitu, nie stwierdzono również, by mogła być ona przekształcona w do działania (Graham & Graham 1990). Badania in vitro wykazały, że glicolitu hamuje wzrost ryżokopii ryżu (Rivera-Vargas & wspólnicy 1993), co sugeruje, że po uwolnieniu z glicolitu może ona dodatkowo wzmocnić funkcje obronne glicolitu. Wyniki najnowszych badań wskazują na to, że uwolnienie z połączeń glicolitu glicolitu może regulować działanie polimerów fenolowych w komórce komórkowej. Izoflawnonoid ten występuje w postaci w postaci aktywności, związany z białą komórkową oksydazą NADH (Nox II) (Graham & Graham 1992, Graham & Graham 1999). Łącznie ten wytwórca H_2O_2 koniecznie do syntez polimerów fenolowych. Na to, że glicolitu trzymać się odbywa rolę aktywności Nox II, wskazuje podobna dysfunkcja tkankowa tego enzymu oraz swoiste glicolitu, które może uwolnić glicolitu z jej połączeń glicolitu (Graham & Graham 1992).

Podobnie jak w innych roślinach motylkowatych, również u fasoli w wyniku infekcji dochodzi do aktywacji genów kodujących syntezę glicolitu szlaku fenylpropanoidowego (Ryder & wspólnicy 1984, Edwards & wspólnicy 1985, Jakobs & Lindgren 1993). Jednocześnie wykazano udział manganowatych w tkance tej rośliny glicolitu iacetylaminowatych w syntezie glicolitu. Na podstawie badań stwierdzono, że podczas infekcji ryżokopii fasoli

grzybem *C. lindemuthianum* dochodzi do hydrolizy zmagazynowanego w wakuolach glukozydu faseolidyny i uwolnienia faseoliny (Soriano-Richards i wspópr. 1998).

2.3.2.2. Flawonoidy w oddziaływaniach symbiotycznych roślin motylkowatych

Rośliny motylkowe wchodzą w symbiozę z bakteriami *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Azorhizobium* i *Sinorhizobium*, określanymi wspólnym mianem rizobiów. Infekcja korzeni roślin motylkowatych przez rizobia jest procesem wieloetapowym. Bakterie reagują chemotaktycznie na związki obecne w wydzielinach korzeniowych roślin, przemieszczając się wzdłuż rosnącego gradientu stężenia tych związków w kierunku korzenia (Currier & Strobel 1976, Peters & Verma 1990, Barbour i wspópr. 1991). Następnie przyłączają się do powierzchni korzenia, a najczęstszym miejscem, w którym dochodzi do infekcji są młode rosnące włośniki. Pierwszym widocznym znakiem oddziaływań rizobium-roślina jest skręcanie się włośników korzeniowych i indukcja podziałów merystematycznych komórek kory korzenia. Bakterie infekują włośniki i migrują wewnątrz nici infekcyjnej do tworzącej się brodawki. Wnikające do komórek brodawki bakterie przekształcają się w bakteroidy, które zdolne są do redukcji azotu atmosferycznego. Wytworzony przez bakteroidy amoniak wykorzystywany jest przez rośliny jako źródło azotu (Brewin 1991, Mylona i wspópr. 1995, van Rhijn & Vanderleyden 1995, Howieson i wspópr. 1998, Schultze & Kondorosi 1998).

Wzajemne rozpoznanie rośliny i bakterii odbywa się poprzez wymianę sygnałów. Wydzielane przez korzenie roślin motylkowatych flawonoidy aktywują ekspresję bakteryjnych genów *nod* (Redmond i wspópr. 1986, Rolfe 1988), które odpowiedzialne są za syntezę czynników Nod. Czynniki Nod są modyfikowanymi oligomerami N-acetylo-D-glukozoaminy (Lerouge i wspópr. 1990, Spaink 1992, Howieson i wspópr. 1998) o właściwościach morfogenów indukujących skręcanie włośników korzeniowych i podziały komórkowe kory korzenia (Truchet i wspópr. 1991). Ekspresja genów *nod* bakterii wymaga obecności sygnału roślinnego oraz obecności regulatorowego białka NodD. Białko NodD wiąże się do konserwatywnej sekwencji DNA operonu *nod*. W obecności sygnału roślinnego NodD działa jako aktywator transkrypcji. Przypuszcza się, że flawonoidy wiążą się bezpośrednio z NodD powodując w nim zmiany konformacyjne (van Rhijn & Vanderleyden 1995). Białka NodD z różnych gatunków bakterii działają jako aktywatory transkrypcji tylko w obecności flawonoidów wydzielanych przez roślinę-gospodarza (Spaink i wspópr. 1987). Dlatego też profil związków fenolowych wydzielanych przez roślinę jest jednym z czynników

określających specyficzną oddziaływań symbiotycznych pomiędzy rizobiami, a roślinami motylkowatymi.

Każdy gatunek roślin motylkowatych wydziela charakterystyczne dla siebie flawonoidy. Rodzaj i ilość wydzielanych związków zależy też od fazy rozwojowej rośliny. U lucerny (Hartwig i wsp. 1989), soi (Graham 1991) i fasoli (Hungria i wsp. 1991a, Hungria i wsp. 1991b) profil flawonoidów wydzielanych przez nasiona jest inny niż profil w wydzielinach korzeniowych. Różnice te mogą wynikać z faktu, że w przypadku nasion wydzielane są flawonoidy zmagazynowane w okrywie nasiennej (Hartwig & Phillips 1991, Hungria & Phillips 1993), podczas gdy flawonoidy wydzielane przez korzenie syntezowane są *de novo* (Maxwell & Phillips 1990, Recourt i wsp. 1992a, Coronado i wsp. 1995). Wydzielanie związków fenolowych nie jest biernym wymyciem tych związków z epidermy, lecz odbywa się w sposób swoisty i selektywny, na co wskazują różnice profili flawonoidów w wydzielinach i w korzeniach (Maxwell & Phillips 1990, Recourt i wsp. 1992b, Zuanazzi i wsp. 1998). Intensywność wydzielania flawonoidów oraz ich akumulacja w korzeniach jest zależna od czynników glebowych, istotną rolę odgrywa forma i stężenie azotu w otoczeniu korzeni (Cho & Harper 1991a, 1991b, Wojtaszek i wsp. 1993, Coronado i wsp. 1995). Wydzielone przez daną roślinę motylkowatą flawonoidy stanowią mieszaninę silnych i słabych induktorów genów *nod*, jak również inhibitorów oraz związków nieaktywnych (Peters & Long 1988, Zuanazzi i wsp. 1998). Zdolność wydzielin korzeniowych do indukcji genów *nod* jest więc sumą oddziaływań poszczególnych związków wydzielanych przez roślinę (Hartwig i wsp. 1989). W niektórych przypadkach flawonoidy będące induktorami genów *nod* mogą równocześnie oddziaływać chemotaktycznie na symbionta (Dharmatilake & Bauer 1992).

Inokulacja roślin motylkowatych infekującymi je bakteriami prowadzi do zmian profilu lub ilości wydzielanych przez korzenie flawonoidów. U fasoli inokulowanej *R. leguminosarum* bv. *phaseoli*, *R. etli* lub *R. tropici* (Dakora i wsp. 1993b, Bolaños-Vásquez & Werner 1997) oraz soi inokulowanej *B. japonicum* (Schmidt i wsp. 1994) zaobserwowano znaczny wzrost ilości wydzielanych flawonoidów w porównaniu ze sterylnymi roślinami kontrolnymi. Badania prowadzone na soi dowiodły, że zwiększone wydzielanie flawonoidów indukowane jest przez bakteryjne czynniki Nod (Schmidt i wsp. 1994). Korzenie lucerny inokulowane *R. meliloti* (Dakora i wsp. 1993a) oraz korzenie wyki inokulowane *R. leguminosarum* bv. *viciae* (Recourt i wsp. 1991) wydzielają flawonoidy, których nie wykryto w wydzielinach ze sterylnych korzeni. Nie wiadomo jednak

określających specyficzność oddziaływań syntetycznych postaci trójczłonowej, a różnicami modelowymi.

Każdy gatunek roślin modelowych wymaga charakterystycznego dla siebie środowiska. Różni i ilość wydzielanych związków zależy też od trybu rozrodczej rośliny. U liści (Hartig i wsp. 1989, 1991; Gahan 1991) i liści (Hartig i wsp. 1991, Hartig i wsp. 1991b) profil flawonoidów wydzielanych przez rośliny jest inny niż profil w wydzielanach korzeniowych. Różnica ta może wynikać z faktu, że w przypadku nasion wydzielane są flawonoidy zmagazynowane w okresie nasienia (Hartig & Phillips 1991, Hartig & Phillips 1991). Podczas gdy flawonoidy wydzielane przez korzenie syntetyzowane są de novo (Mazurek & Phillips 1990, Bacon i wsp. 1991, Connors i wsp. 1992). Wydzielanie związków fenolowych nie jest pierwotnym wyznacznikiem tych związków z epitetem, lecz odbywa się w sposób wtórny i selektywny, na co wskazują różnice profili flawonoidów w wydzielanach i w korzeniach (Mazurek & Phillips 1990, Bacon i wsp. 1992). Zmiana i wpływ (1992) intensywności wydzielania flawonoidów oraz ich akumulacja w korzeniach jest zależna od czynników środowiska, istnieją różne odzwierciedlenia form i stężenia w stosunku do korzeni (Chen & Harper 1991, 1991b, Wojtaszek i wsp. 1992, Connors i wsp. 1992). Wydzielanie przez liście i korzenie flawonoidów stanowi istotną część i stężenie i stężenie induktorów genów w liściach i korzeniach. Zależność wydzielania korzeniowych od liści genów jest więc silnie oddziaływaniem powiązanych związków wydzielanych przez roślinę (Hartig i wsp. 1989). W niektórych przypadkach flawonoidy będące induktorem genów w liściach mogą występować w korzeniach, co może być symbolem (Damaschke & Bauer 1992).

Intensywność oddziaływań modelowych roślin zależy od różnic w profilu liści i liści wydzielanych przez korzenie flawonoidów. U liści i korzeni (Mazurek & Phillips 1990, 1991, 1991b, 1991c, 1991d, 1991e, 1991f, 1991g, 1991h, 1991i, 1991j, 1991k, 1991l, 1991m, 1991n, 1991o, 1991p, 1991q, 1991r, 1991s, 1991t, 1991u, 1991v, 1991w, 1991x, 1991y, 1991z, 1992a, 1992b, 1992c, 1992d, 1992e, 1992f, 1992g, 1992h, 1992i, 1992j, 1992k, 1992l, 1992m, 1992n, 1992o, 1992p, 1992q, 1992r, 1992s, 1992t, 1992u, 1992v, 1992w, 1992x, 1992y, 1992z, 1993a, 1993b, 1993c, 1993d, 1993e, 1993f, 1993g, 1993h, 1993i, 1993j, 1993k, 1993l, 1993m, 1993n, 1993o, 1993p, 1993q, 1993r, 1993s, 1993t, 1993u, 1993v, 1993w, 1993x, 1993y, 1993z, 1994a, 1994b, 1994c, 1994d, 1994e, 1994f, 1994g, 1994h, 1994i, 1994j, 1994k, 1994l, 1994m, 1994n, 1994o, 1994p, 1994q, 1994r, 1994s, 1994t, 1994u, 1994v, 1994w, 1994x, 1994y, 1994z, 1995a, 1995b, 1995c, 1995d, 1995e, 1995f, 1995g, 1995h, 1995i, 1995j, 1995k, 1995l, 1995m, 1995n, 1995o, 1995p, 1995q, 1995r, 1995s, 1995t, 1995u, 1995v, 1995w, 1995x, 1995y, 1995z, 1996a, 1996b, 1996c, 1996d, 1996e, 1996f, 1996g, 1996h, 1996i, 1996j, 1996k, 1996l, 1996m, 1996n, 1996o, 1996p, 1996q, 1996r, 1996s, 1996t, 1996u, 1996v, 1996w, 1996x, 1996y, 1996z, 1997a, 1997b, 1997c, 1997d, 1997e, 1997f, 1997g, 1997h, 1997i, 1997j, 1997k, 1997l, 1997m, 1997n, 1997o, 1997p, 1997q, 1997r, 1997s, 1997t, 1997u, 1997v, 1997w, 1997x, 1997y, 1997z, 1998a, 1998b, 1998c, 1998d, 1998e, 1998f, 1998g, 1998h, 1998i, 1998j, 1998k, 1998l, 1998m, 1998n, 1998o, 1998p, 1998q, 1998r, 1998s, 1998t, 1998u, 1998v, 1998w, 1998x, 1998y, 1998z, 1999a, 1999b, 1999c, 1999d, 1999e, 1999f, 1999g, 1999h, 1999i, 1999j, 1999k, 1999l, 1999m, 1999n, 1999o, 1999p, 1999q, 1999r, 1999s, 1999t, 1999u, 1999v, 1999w, 1999x, 1999y, 1999z, 2000a, 2000b, 2000c, 2000d, 2000e, 2000f, 2000g, 2000h, 2000i, 2000j, 2000k, 2000l, 2000m, 2000n, 2000o, 2000p, 2000q, 2000r, 2000s, 2000t, 2000u, 2000v, 2000w, 2000x, 2000y, 2000z, 2001a, 2001b, 2001c, 2001d, 2001e, 2001f, 2001g, 2001h, 2001i, 2001j, 2001k, 2001l, 2001m, 2001n, 2001o, 2001p, 2001q, 2001r, 2001s, 2001t, 2001u, 2001v, 2001w, 2001x, 2001y, 2001z, 2002a, 2002b, 2002c, 2002d, 2002e, 2002f, 2002g, 2002h, 2002i, 2002j, 2002k, 2002l, 2002m, 2002n, 2002o, 2002p, 2002q, 2002r, 2002s, 2002t, 2002u, 2002v, 2002w, 2002x, 2002y, 2002z, 2003a, 2003b, 2003c, 2003d, 2003e, 2003f, 2003g, 2003h, 2003i, 2003j, 2003k, 2003l, 2003m, 2003n, 2003o, 2003p, 2003q, 2003r, 2003s, 2003t, 2003u, 2003v, 2003w, 2003x, 2003y, 2003z, 2004a, 2004b, 2004c, 2004d, 2004e, 2004f, 2004g, 2004h, 2004i, 2004j, 2004k, 2004l, 2004m, 2004n, 2004o, 2004p, 2004q, 2004r, 2004s, 2004t, 2004u, 2004v, 2004w, 2004x, 2004y, 2004z, 2005a, 2005b, 2005c, 2005d, 2005e, 2005f, 2005g, 2005h, 2005i, 2005j, 2005k, 2005l, 2005m, 2005n, 2005o, 2005p, 2005q, 2005r, 2005s, 2005t, 2005u, 2005v, 2005w, 2005x, 2005y, 2005z, 2006a, 2006b, 2006c, 2006d, 2006e, 2006f, 2006g, 2006h, 2006i, 2006j, 2006k, 2006l, 2006m, 2006n, 2006o, 2006p, 2006q, 2006r, 2006s, 2006t, 2006u, 2006v, 2006w, 2006x, 2006y, 2006z, 2007a, 2007b, 2007c, 2007d, 2007e, 2007f, 2007g, 2007h, 2007i, 2007j, 2007k, 2007l, 2007m, 2007n, 2007o, 2007p, 2007q, 2007r, 2007s, 2007t, 2007u, 2007v, 2007w, 2007x, 2007y, 2007z, 2008a, 2008b, 2008c, 2008d, 2008e, 2008f, 2008g, 2008h, 2008i, 2008j, 2008k, 2008l, 2008m, 2008n, 2008o, 2008p, 2008q, 2008r, 2008s, 2008t, 2008u, 2008v, 2008w, 2008x, 2008y, 2008z, 2009a, 2009b, 2009c, 2009d, 2009e, 2009f, 2009g, 2009h, 2009i, 2009j, 2009k, 2009l, 2009m, 2009n, 2009o, 2009p, 2009q, 2009r, 2009s, 2009t, 2009u, 2009v, 2009w, 2009x, 2009y, 2009z, 2010a, 2010b, 2010c, 2010d, 2010e, 2010f, 2010g, 2010h, 2010i, 2010j, 2010k, 2010l, 2010m, 2010n, 2010o, 2010p, 2010q, 2010r, 2010s, 2010t, 2010u, 2010v, 2010w, 2010x, 2010y, 2010z, 2011a, 2011b, 2011c, 2011d, 2011e, 2011f, 2011g, 2011h, 2011i, 2011j, 2011k, 2011l, 2011m, 2011n, 2011o, 2011p, 2011q, 2011r, 2011s, 2011t, 2011u, 2011v, 2011w, 2011x, 2011y, 2011z, 2012a, 2012b, 2012c, 2012d, 2012e, 2012f, 2012g, 2012h, 2012i, 2012j, 2012k, 2012l, 2012m, 2012n, 2012o, 2012p, 2012q, 2012r, 2012s, 2012t, 2012u, 2012v, 2012w, 2012x, 2012y, 2012z, 2013a, 2013b, 2013c, 2013d, 2013e, 2013f, 2013g, 2013h, 2013i, 2013j, 2013k, 2013l, 2013m, 2013n, 2013o, 2013p, 2013q, 2013r, 2013s, 2013t, 2013u, 2013v, 2013w, 2013x, 2013y, 2013z, 2014a, 2014b, 2014c, 2014d, 2014e, 2014f, 2014g, 2014h, 2014i, 2014j, 2014k, 2014l, 2014m, 2014n, 2014o, 2014p, 2014q, 2014r, 2014s, 2014t, 2014u, 2014v, 2014w, 2014x, 2014y, 2014z, 2015a, 2015b, 2015c, 2015d, 2015e, 2015f, 2015g, 2015h, 2015i, 2015j, 2015k, 2015l, 2015m, 2015n, 2015o, 2015p, 2015q, 2015r, 2015s, 2015t, 2015u, 2015v, 2015w, 2015x, 2015y, 2015z, 2016a, 2016b, 2016c, 2016d, 2016e, 2016f, 2016g, 2016h, 2016i, 2016j, 2016k, 2016l, 2016m, 2016n, 2016o, 2016p, 2016q, 2016r, 2016s, 2016t, 2016u, 2016v, 2016w, 2016x, 2016y, 2016z, 2017a, 2017b, 2017c, 2017d, 2017e, 2017f, 2017g, 2017h, 2017i, 2017j, 2017k, 2017l, 2017m, 2017n, 2017o, 2017p, 2017q, 2017r, 2017s, 2017t, 2017u, 2017v, 2017w, 2017x, 2017y, 2017z, 2018a, 2018b, 2018c, 2018d, 2018e, 2018f, 2018g, 2018h, 2018i, 2018j, 2018k, 2018l, 2018m, 2018n, 2018o, 2018p, 2018q, 2018r, 2018s, 2018t, 2018u, 2018v, 2018w, 2018x, 2018y, 2018z, 2019a, 2019b, 2019c, 2019d, 2019e, 2019f, 2019g, 2019h, 2019i, 2019j, 2019k, 2019l, 2019m, 2019n, 2019o, 2019p, 2019q, 2019r, 2019s, 2019t, 2019u, 2019v, 2019w, 2019x, 2019y, 2019z, 2020a, 2020b, 2020c, 2020d, 2020e, 2020f, 2020g, 2020h, 2020i, 2020j, 2020k, 2020l, 2020m, 2020n, 2020o, 2020p, 2020q, 2020r, 2020s, 2020t, 2020u, 2020v, 2020w, 2020x, 2020y, 2020z, 2021a, 2021b, 2021c, 2021d, 2021e, 2021f, 2021g, 2021h, 2021i, 2021j, 2021k, 2021l, 2021m, 2021n, 2021o, 2021p, 2021q, 2021r, 2021s, 2021t, 2021u, 2021v, 2021w, 2021x, 2021y, 2021z, 2022a, 2022b, 2022c, 2022d, 2022e, 2022f, 2022g, 2022h, 2022i, 2022j, 2022k, 2022l, 2022m, 2022n, 2022o, 2022p, 2022q, 2022r, 2022s, 2022t, 2022u, 2022v, 2022w, 2022x, 2022y, 2022z, 2023a, 2023b, 2023c, 2023d, 2023e, 2023f, 2023g, 2023h, 2023i, 2023j, 2023k, 2023l, 2023m, 2023n, 2023o, 2023p, 2023q, 2023r, 2023s, 2023t, 2023u, 2023v, 2023w, 2023x, 2023y, 2023z, 2024a, 2024b, 2024c, 2024d, 2024e, 2024f, 2024g, 2024h, 2024i, 2024j, 2024k, 2024l, 2024m, 2024n, 2024o, 2024p, 2024q, 2024r, 2024s, 2024t, 2024u, 2024v, 2024w, 2024x, 2024y, 2024z, 2025a, 2025b, 2025c, 2025d, 2025e, 2025f, 2025g, 2025h, 2025i, 2025j, 2025k, 2025l, 2025m, 2025n, 2025o, 2025p, 2025q, 2025r, 2025s, 2025t, 2025u, 2025v, 2025w, 2025x, 2025y, 2025z, 2026a, 2026b, 2026c, 2026d, 2026e, 2026f, 2026g, 2026h, 2026i, 2026j, 2026k, 2026l, 2026m, 2026n, 2026o, 2026p, 2026q, 2026r, 2026s, 2026t, 2026u, 2026v, 2026w, 2026x, 2026y, 2026z, 2027a, 2027b, 2027c, 2027d, 2027e, 2027f, 2027g, 2027h, 2027i, 2027j, 2027k, 2027l, 2027m, 2027n, 2027o, 2027p, 2027q, 2027r, 2027s, 2027t, 2027u, 2027v, 2027w, 2027x, 2027y, 2027z, 2028a, 2028b, 2028c, 2028d, 2028e, 2028f, 2028g, 2028h, 2028i, 2028j, 2028k, 2028l, 2028m, 2028n, 2028o, 2028p, 2028q, 2028r, 2028s, 2028t, 2028u, 2028v, 2028w, 2028x, 2028y, 2028z, 2029a, 2029b, 2029c, 2029d, 2029e, 2029f, 2029g, 2029h, 2029i, 2029j, 2029k, 2029l, 2029m, 2029n, 2029o, 2029p, 2029q, 2029r, 2029s, 2029t, 2029u, 2029v, 2029w, 2029x, 2029y, 2029z, 2030a, 2030b, 2030c, 2030d, 2030e, 2030f, 2030g, 2030h, 2030i, 2030j, 2030k, 2030l, 2030m, 2030n, 2030o, 2030p, 2030q, 2030r, 2030s, 2030t, 2030u, 2030v, 2030w, 2030x, 2030y, 2030z, 2031a, 2031b, 2031c, 2031d, 2031e, 2031f, 2031g, 2031h, 2031i, 2031j, 2031k, 2031l, 2031m, 2031n, 2031o, 2031p, 2031q, 2031r, 2031s, 2031t, 2031u, 2031v, 2031w, 2031x, 2031y, 2031z, 2032a, 2032b, 2032c, 2032d, 2032e, 2032f, 2032g, 2032h, 2032i, 2032j, 2032k, 2032l, 2032m, 2032n, 2032o, 2032p, 2032q, 2032r, 2032s, 2032t, 2032u, 2032v, 2032w, 2032x, 2032y, 2032z, 2033a, 2033b, 2033c, 2033d, 2033e, 2033f, 2033g, 2033h, 2033i, 2033j, 2033k, 2033l, 2033m, 2033n, 2033o, 2033p, 2033q, 2033r, 2033s, 2033t, 2033u, 2033v, 2033w, 2033x, 2033y, 2033z, 2034a, 2034b, 2034c, 2034d, 2034e, 2034f, 2034g, 2034h, 2034i, 2034j, 2034k, 2034l, 2034m, 2034n, 2034o, 2034p, 2034q, 2034r, 2034s, 2034t, 2034u, 2034v, 2034w, 2034x, 2034y, 2034z, 2035a, 2035b, 2035c, 2035d, 2035e, 2035f, 2035g, 2035h, 2035i, 2035j, 2035k, 2035l, 2035m, 2035n, 2035o, 2035p, 2035q, 2035r, 2035s, 2035t, 2035u, 2035v, 2035w, 2035x, 2035y, 2035z, 2036a, 2036b, 2036c, 2036d, 2036e, 2036f, 2036g, 2036h, 2036i, 2036j, 2036k, 2036l, 2036m, 2036n, 2036o, 2036p, 2036q, 2036r, 2036s, 2036t, 2036u, 2036v, 2036w, 2036x, 2036y, 2036z, 2037a, 2037b, 2037c, 2037d, 2037e, 2037f, 2037g, 2037h, 2037i, 2037j, 2037k, 2037l, 2037m, 2037n, 2037o, 2037p, 2037q, 2037r, 2037s, 2037t, 2037u, 2037v, 2037w, 2037x, 2037y, 2037z, 2038a, 2038b, 2038c, 2038d, 2038e, 2038f, 2038g, 2038h, 2038i, 2038j, 2038k, 2038l, 2038m, 2038n, 2038o, 2038p, 2038q, 2038r, 2038s, 2038t, 2038u, 2038v, 2038w, 2038x, 2038y, 2038z, 2039a, 2039b, 2039c, 2039d, 2039e, 2039f, 2039g, 2039h, 2039i, 2039j, 2039k, 2039l, 2039m, 2039n, 2039o, 2039p, 2039q, 2039r, 2039s, 2039t, 2039u, 2039v, 2039w, 2039x, 2039y, 2039z, 2040a, 2040b, 2040c, 2040d, 2040e, 2040f, 2040g, 2040h, 2040i, 2040j, 2040k, 2040l, 2040m, 2040n, 2040o, 2040p, 2040q, 2040r, 2040s, 2040t, 2040u, 2040v, 2040w, 2040x, 2040y, 2040z, 2041a, 2041b, 2041c, 2041d, 2041e, 2041f, 2041g, 2041h, 2041i, 2041j, 2041k, 2041l, 2041m, 2041n, 2041o, 2041p, 2041q, 2041r, 2041s, 2041t, 2041u, 2041v, 2041w, 2041x, 2041y, 2041z, 2042a, 2042b, 2042c, 2042d, 2042e, 2042f, 2042g, 2042h, 2042i, 2042j, 2042k, 2042l, 2042m, 2042n, 2042o, 2042p, 2042q, 2042r, 2042s, 2042t, 2042u, 2042v, 2042w, 2042x, 2042y, 2042z, 2043a, 2043b, 2043c, 2043d, 2043e, 2043f, 2043g, 2043h, 2043i, 2043j, 2043k, 2043l, 2043m, 2043n, 2043o, 2043p, 2043q, 2043r, 2043s, 2043t, 2043u, 2043v, 2043w, 2043x, 2043y, 2043z, 2044a, 2044b, 2044c, 2044d, 2044e, 2044f, 2044g, 2044h, 2044i, 2044j, 2044k, 2044l, 2044m, 2044n, 2044o, 2044p, 2044q, 2044r, 2044s, 2044t, 2044u, 2044v, 2044w, 2044x, 2044y, 2044z, 2045a, 2045b, 2045c, 2045d, 2045e, 2045f, 2045g, 2045h, 2045i, 2045j, 2045k, 2045l, 2045m, 2045n, 2045o, 2045p, 2045q, 2045r, 2045s, 2045t, 2045u, 2045v, 2045w, 2045x, 2045y, 2045z, 2046a, 2046b, 2046c, 2046d, 2046e, 2046f, 2046g, 2046h, 2046i, 2046j, 2046k, 2046l, 2046m, 2046n, 2046o, 2046p, 2046q, 2046r, 2046s, 2046t, 2046u, 2046v, 2046w, 2046x, 2046y, 2046z, 2047a, 2047b, 2047c, 2047d, 2047e, 2047f, 2047g, 2047h, 2047i, 2047j, 2047k, 2047l, 2047m, 2047n, 2047o, 2047p, 2047q, 2047r, 2047s, 2047t, 2047u, 2047v, 2047w, 2047x, 2047y, 2047z, 2048a, 2048b, 2048c, 2048d, 2048e, 2048f, 2048g, 2048h, 2048i, 2048j, 2048k, 2048l, 2048m, 2048n, 2048o, 2048p, 2048q, 2048r, 2048s, 2048t, 2048u, 2048v, 2048w, 2048x, 2048y, 2048z, 2049a, 2049b, 2049c, 2049d, 2049e, 2049f, 2049g, 2049h, 2049i, 2049j, 2049k, 2049l, 2049m, 2049n, 2049o, 2049p, 2049q, 2049r, 2049s, 2049t, 2049u, 2049v, 2049w, 2049x, 2049y, 2049z, 2050a, 2050b, 2050c, 2050d, 2050e, 2050f, 2050g, 2050h, 2050i, 2050j, 2050k, 2050l, 2050m, 2050n, 2050o, 2050p, 2050q, 2050r, 2050s, 2050t, 2050u, 2050v, 2050w, 2050x, 2050y, 2050z, 2051a, 2051b, 2051c, 2051d, 2051e, 2051f, 2051g, 2051h, 2051i, 2051j, 2051k, 2051l, 2051m, 2051n, 2051o, 2051p, 2051q, 2051r, 2051s, 2051t, 2051u, 2051v, 2051w, 2051x, 2051y, 2051z, 2052a, 2052b, 2052c, 2052d, 2052e, 2052f, 2052g, 2052h, 2052i, 2052j, 2052k, 2052l, 2052m, 2052n, 2052o, 2052p, 2052q, 2052r, 2052s, 2052t, 2052u, 2052v, 2052w, 2052x, 2052y, 2052z, 2053a, 2053b, 2053c, 2053d, 2053e, 2053f, 2053g, 2053h, 2053i, 2053j, 2053k, 2053l, 2053m, 2053n, 2053o, 2053p, 2053q, 2053r, 2053s, 2053t, 2053u, 2053v, 2053w, 2053x, 2053y, 2053z, 2054a, 2054b, 2054c, 2054d, 2054e, 2054f, 2054g, 2054h, 2054i, 2054j, 2054k, 2054l, 2054m, 2054n, 2054o, 2054p, 2054q, 2054r, 2054s, 2054t, 205

czy obecność symbionta powoduje zmiany w roślinnym metabolizmie flawonoidów, czy też nowe związki powstają w wyniku biotransformacji normalnie wydzielanych flawonoidów przez bakterie. Zdolność modyfikacji genisteiny i daidzeiny wydzielanych przez korzenie soi wykazują bakterie *B. japonicum*, *R. fredii* oraz *Rhizobium* sp. NGR234 (Rao & Cooper 1995).

Wydzieliny z korzeni i nasion roślin motylkowatych mogą zawierać flawonoidy zarówno w postaci wolnych aglikonów, jak i ich połączeń glikozydowych. Glikozydy związków fenolowych jako substancje bardziej polarne są lepiej rozpuszczalne w wodzie, dzięki czemu mogą przemieszczać się w glebie na większe odległości niż aglikony i oddziaływać na bakterie znajdujące się wokół korzeni. Chociaż w niektórych przypadkach glikozydy wykazują aktywność w oddziaływaniach z bakteriami symbiotycznymi, ogólnie przyjmuje się jednak, że glikozydy flawonoidów są mniej aktywne niż aglikony.

W wydzielinach z nasion fasoli zidentyfikowano 10 różnych glikozydów antocyjanidyn i flawonoli, które indukują geny *nod* w *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* (Hungria i współpr. 1991a, Hungria & Phillips 1993). Badania nad aktywnością biologiczną aglikonów występujących w tych połączeniach glikozydowych wykazały, że aktywują one geny *nod* w nieco mniejszym stopniu niż odpowiednie glikozydy. Wśród związków wydzielanych przez korzenie fasoli najsilniejszymi induktorami genów *nod* są 7-O-glukozyd genisteiny oraz naryngenina i eriodiktiol, aktywność glukozydu jest nieznacznie większa od aktywności wolnej genisteiny (Hungria i współpr. 1991b). Zdolność do indukcji genów *nod* wykazano dla 7-O-(6''-O-malonylo)glukozydu formononetyny wydzielanego przez korzenie lucerny w obecności *R. meliloti*. Stwierdzono też, że hydroliza zarówno wiązania glikozydowego, jak i estrowego prowadzi do utraty aktywności biologicznej w oddziaływaniach symbiotycznych (Dakora i współpr. 1993a). Wydzielane przez nasiona i korzenie soi malonylowane i acetylowane glukozydy genisteiny, daidzeiny i glyciteiny są swoistymi induktorami genu *nodD₁* *B. japonicum* (Smit i współpr. 1992). Zwiększona ekspresja *nodD₁* prowadzi do wzrostu zawartości białka NodD₁ w komórce, co może przyczyniać się do zwiększenia ekspresji innych genów *nod*.

W niektórych przypadkach wydzielane do gleby glikozydy związków fenolowych nie aktywują ekspresji genów *nod* u odpowiednich szczepów bakterii. Przypuszcza się, że wydzielane glikozydy mogą być hydrolizowane do aktywnych aglikonów przez odpowiednie glikozydazy wydzielane przez roślinę lub przez mikroorganizmy. Kiełkujące nasiona lucerny wydzielają do otoczenia znaczne ilości 7-O-glukozydu luteoliny, który nie wykazuje aktywności w oddziaływaniach z symbiontem *R. meliloti* (Hartwig i współpr. 1990, Hartwig

oxy obecność zjawiska powoduje zmiany w rozkładzie metabolizmu flavonoidów, czy też nowe związki powstają w wyniku biotransformacji normalnie wydzielanych flavonoidów przez bakteria. Zdolność modyfikacji genetycznej i dalszej wydzielanych przez korzenie soi wykazują bakteria *B. japonicum*, *B. pasteurianum*, *B. thuringiensis* oraz *B. pumila* (Liao & Cooper 1992).

Wydzieliny z korzeni i szkielet roślin mączkowniczych mogą zawierać flavonoidy zarówno w postaci wolnych aglikonów, jak i ich połączeń glikozydowych. Glikozydy związki fenolowych jako substancje barwiącej polarna są lepiej rozpuszczalne w wodzie, dzięki czemu mogą przeniknąć się w glebie na większe odległości niż aglikony i oddziaływać na bakteria znajdujące się wokół korzeni. Cięższe w niektórych przypadkach glikozydy wykazują aktywność w oddziaływaniach z bakteriami gramopozytywnymi, ogólnie przynajmniej się jednak, że glikozydy flavonoidów są mniej aktywne niż aglikony.

W wydzielinach z korzeni roślin zidentyfikowano 10 różnych glikozydów amonijowych i flavonoid, które indukują geny nod w *B. japonicum* (Dr. J. H. Hwang i wsp. 1991a, Hwang & Phillips 1991). Badania nad aktywnością biologiczną aglikonów występujących w tych połączeniach glikozydowych wykazały, że aktywują one geny nod w nieco mniejszym stopniu niż odpowiednie glikozydy. Wśród związki fenolowych wydzielanych przez korzenie roślin najistotniejszą indukcją induktorem genów nod są 7-O-glukozydy genetyny oraz narygenina i etochilol, aktywność glikozydów jest nieznacznie większa od aktywności wolnej genetyny (Hwang i wsp. 1991b). Zdolność do indukcji genów nod wykazano dla 7-O-(6"-O-malonylo)glikozydu formononetyny wydzielanego przez korzenie lucerny w obecności *B. pasteurianum*. Stwierdzono też, że hydroksy związki glikozydowego, jak i ostrogo prowadzi do zmiany aktywności biologicznej w oddziaływaniach symbiotycznych (Dobson i wsp. 1991a). Wydzielanie przez nasiona i korzenie soi zaindukowane i oczyszczone glikozydy genetyny, daktyliny i glicetyny są związki indukcyjne genu nod. *B. japonicum* (Smit i wsp. 1992). Zwiększona ekspresja nodB, prowadzi do wzrostu zawartości białka NodD, w korzeniach, co może przekazywać się do zwiększenia ekspresji innych genów nod.

W niektórych przypadkach wydzielane do gleby glikozydy związki fenolowych nie aktywują ekspresji genów nod w odpowiednich szczepach bakterii. Przynajmniej się, że wydzielane glikozydy mogą być hydrolizowane do aktywnych aglikonów przez odpowiednie glikozydazy wydzielane przez rośliny lub przez mikroorganizmy. Kiełkujące nasiona lucerny wykazują do stoczenia znaczne ilości 7-O-glikozydu intecoliny, który nie wykazuje aktywności w oddziaływaniach z symbiontem *B. pasteurianum* (Hwang i wsp. 1990, Hwang

& Phillips 1991), podczas gdy wolna luteolina jest induktorem genów *nod*. Wprowadzany do medium zawierającego *R. meliloti* 7-O-glukozyd luteoliny ulegał częściowej hydrolizie do wolnej luteoliny, a we frakcji białek wydzielanych przez kiełkujące nasiona lucerny stwierdzono aktywność β -glukozydazy hydrolizującej ten związek (Hartwig & Phillips 1991). Badania nad wydzielinami z nasion i korzeni soi wykazały, że wydzielane 7-O-(6''-malonylo)glukozydy genisteiny i daidzeiny ulegają hydrolizie przez β -glukozydazę (Graham 1991). Stwierdzono też, że obecne w wydzielinach nasion i korzeni soi glukozydy genisteiny i daidzeiny mogą być hydrolizowane do wolnych aglikonów przez *B. japonicum*, *R. fredii* i *Rhizobium* sp. NGR234 (Rao & Cooper 1995) oraz przez *S. fredii* (Pueppke i wsp. 1998).

2.4. IZOFLAWONOIDY W ŁUBINIE BIAŁYM

2.4.1. Profil i metabolizm izoflawonoidów w roślinach i zawiesinach komórkowych łubinu białego

Rośliny z rodzaju *Lupinus* syntezują konstytutywnie flawonoidy zaliczane do grupy 5-hydroksyizoflawonów. W łubinie białym (*Lupinus albus* L.), zarówno w korzeniach, jak i w częściach zielonych występują głównie dwa proste izoflawony: genisteina i 2'-hydroksygenisteina oraz ich monoprenylowane pochodne: 6-izopentenylogenieina (wighteon) i 6-izopentenylo-2'-hydroksygenisteina (luteon) (Harborne i wsp. 1976, Ingham i wsp. 1983, Stobiecki & Wojtaszek 1990). W ekstraktach z liści wykryto jeszcze jeden prosty izoflawon 3'-O-metyloorobol oraz jego 6-izopentenyłową pochodną (lupizoflawon) (Tahara i wsp. 1984). Z korzeni łubinu białego wyizolowano również 3'-izopentenylo-2'-hydroksygenisteinę (likoizoflawon A), a także diprenyłową pochodną genisteiny: lupalbigeninę i dwie diprenylowane pochodne 2'-hydroksygenisteiny: 2'-hydroksylupalbigeninę i 2'-hydroksyizolupalbigeninę (Rys. 2.11.) (Ingham i wsp. 1983, Tahara i wsp. 1984, 1989). Obok wyżej wymienionych związków wyizolowano również wiele, występujących w śladowych ilościach, pochodnych izoflawonów, takich jak: dihydrofuranoizoflawony, pyranoizoflawony oraz dihydropyranoizoflawony (Ingham i wsp. 1983, Tahara i wsp. 1984, 1985, 1989, 1990, Stobiecki & Wojtaszek 1990). Związki tego typu mogą powstawać na skutek cyklizacji podstawnika prenylowego (Tanaka i wsp. 1996). Oprócz izoflawonów w korzeniach łubinu białego stwierdzono również występowanie kumaronochromonów oraz kumaronochromon-4-onów (Tahara i wsp. 1985, 1989, 1990, 1991). Łącznie w łubinie białym zidentyfikowano 50 różnych aglikonów izoflawonoidów. Niektóre spośród tych związków poddano testom *in vitro* na aktywność

W celu izolacji i wyodrębnienia

z wyizolowanych komórek

z wyizolowanych komórek

z wyizolowanych komórek

z wyizolowanych komórek

z wyizolowanych komórek

z wyizolowanych komórek

z wyizolowanych komórek

z wyizolowanych komórek

z wyizolowanych komórek

z wyizolowanych komórek

z wyizolowanych komórek

z wyizolowanych komórek

z wyizolowanych komórek

z wyizolowanych komórek

z wyizolowanych komórek

z wyizolowanych komórek

z wyizolowanych komórek

z wyizolowanych komórek

z wyizolowanych komórek

z wyizolowanych komórek

z wyizolowanych komórek

z wyizolowanych komórek

z wyizolowanych komórek

z wyizolowanych komórek

z wyizolowanych komórek

z wyizolowanych komórek

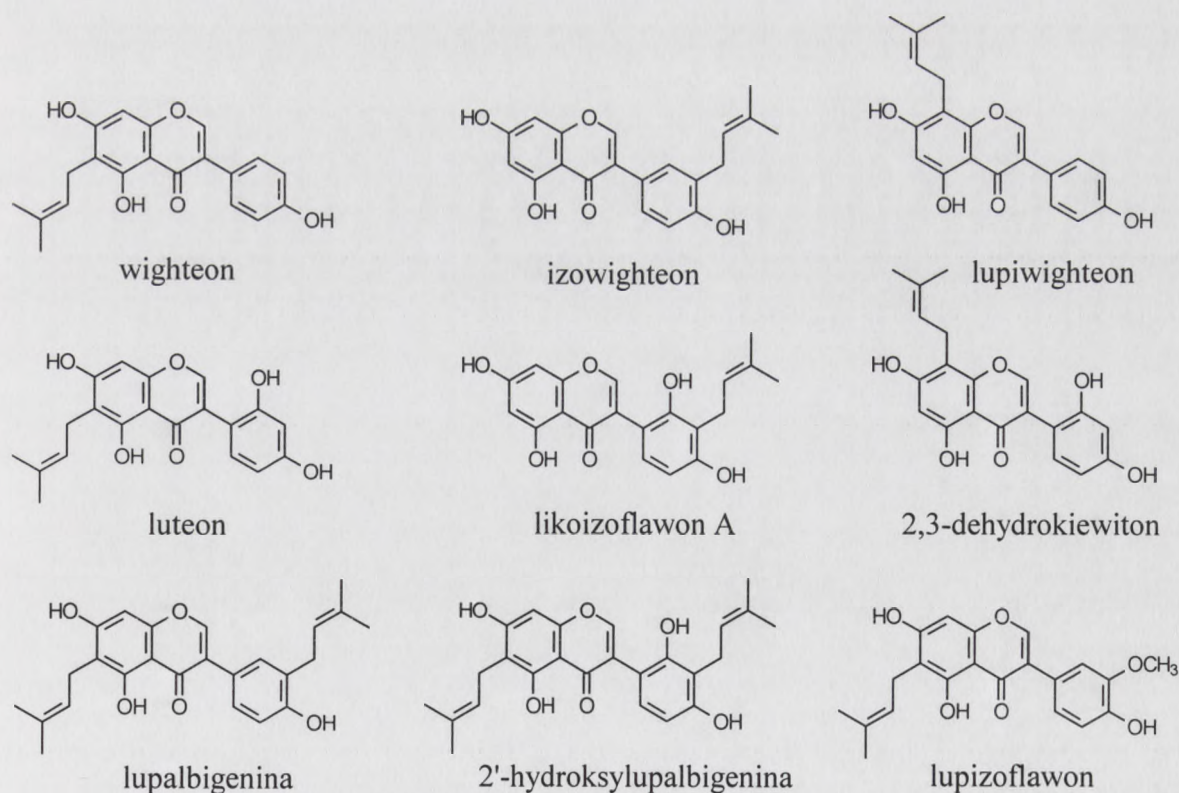
z wyizolowanych komórek

z wyizolowanych komórek

z wyizolowanych komórek

fungicydową, które wykazały, że taką aktywnością charakteryzują się prenylowane pochodne izoflawonoidów, a w szczególności pochodne 2'-hydroksygenisteiny: luteon i likoizoflawon A (Harborne i wspópr. 1976, Tahara i wspópr. 1984).

Wykazano również, że niektóre spośród wymienionych aglikonów mogą występować w połączeniach glikozydowych. Z korzeni łubinu białego wyizolowano: 7-O- β -glukozydy genisteiny, 2'-hydroksygenisteiny, luteonu i likoizoflawonu A, 4'-O- β -glukozydy genisteiny, 2'-hydroksygenisteiny i likoizoflawonu A oraz 7-O- β -(6''-malonylo)glukozydy genisteiny i 2'-hydroksygenisteiny (Shibuya i wspópr. 1991). Badania prowadzone na siewkach łubinu wykazały, że we wszystkich częściach rośliny w puli konstytutywnie wytwarzanych izoflawonoidów największy udział mają 7-O- β -glukozydy genisteiny i 2'-hydroksygenisteiny (Wojtaszek i wspópr. 1993, Gagnon i wspópr. 1995, Gagnon & Ibrahim 1997, Stobiecki i wspópr. 1997). Ponieważ podstawnik malonylowy jest labilny w roztworach wodnych i metanolowych trudno jest stwierdzić, czy zidentyfikowane glukozydy występują naturalnie w roślinie, czy też powstały wtórnie w wyniku degradacji malonylowanych glukozydów (Köster i wspópr. 1983, Shibuya i wspópr. 1991).



Rys. 2.11. Struktury prenylowanych pochodnych izoflawonoidów występujących w łubinie białym.

trójglukozyl, które wykazywają różny stopień charakterystyki się przegłównie pochodne trójglukozylu, a w szczególności pochodne 2'-hydroksygenisteiny, jak również i luteolinu (A) (Lubowicz i wsp. 1987, Taborski i wsp. 1984).

Wyznaczono również, że niektóre spośród wymienionych związków mogą występować w polimerach glikozydowych. Z katechiny lub katechin wyizolowano 7-O-β-D-glukozyl genisteiny, 7'-hydroksygenisteiny, luteolinu i luteolinu A, 4'-O-β-D-glukozyl genisteiny, 2'-hydroksygenisteiny i luteolinu A oraz 7-O-β-D-glukozyl genisteiny i 2'-hydroksygenisteiny (Shibus i wsp. 1991). Badania prowadzone na siwkach lubian wykazały, że we wszystkich częściach rośliny w pełni koncentrują się wyczerpanych trójglukozylu najwięcej, tj. 7-O-β-D-glukozyl genisteiny i 2'-hydroksygenisteiny (Wojcik i wsp. 1987, Gagnon i wsp. 1987, Gagnon & Ibrahim 1987, Stoliczka i wsp. 1987). Ponadto podawano, że wyczerpanie rośliny jest łatwiej w roztworach wodnych i metanowych niż w roztworach etanolowych, czy wyczerpanie glikozydów występuje naturalnie w roślinie, czy też powstaje w wyniku działania malonylowych glikozydów (Klein i wsp. 1983, Shibus i wsp. 1991).



Rys. 2.11. Struktury glikozydów pochodzących z trójglukozylu wyczerpanych w lubianu.

Część badań nad metabolizmem izoflawonoidów prowadzono wykorzystując zawiesinowe hodowle komórek łubinu białego. W zawiesinach zidentyfikowano genisteinę, 2'-hydroksygenisteinę, ich 7-O-glukozydy, oraz ich prenylowane pochodne: wighteon, luteon, likoizoflawon A, lupiwighteon, izowighteon, 2,3-dehydrokiewiton, lupalbigeninę, 2'-hydroksylupalbigeninę oraz pyranoizoflawony, a także kumaronochromon - lupinalbinę A. Wszystkie te związki występowały w komórkach oraz były wydzielane do medium hodowlanego (Gagnon i wspópr. 1992a, 1992b, Hallard i wspópr. 1992). Analizy wykazały, że profil izoflawonoidów izolowanych z komórek oraz z medium zależy od fazy wzrostu, jednak można stwierdzić, że w zawiesinie komórkowej w całkowitej puli izoflawonoidów dominują aglikony genisteiny i 2'-hydroksygenisteiny oraz ich prenylowane pochodne (Hallard i wspópr. 1992). Profil ten odbiega znacznie od profili izoflawonoidów w różnych częściach łubinu białego, gdzie dominują glukozydy genisteiny i 2'-hydroksygenisteiny (Gagnon i wspópr. 1995). Nieco odmienny zestaw związków fenolowych pojawia się w medium hodowlanym, zaobserwowano w nim większy udział prenylowanych pochodnych genisteiny i 2'-hydroksygenisteiny (Hallard i wspópr. 1992). Wprowadzenie do medium [U-¹⁴C]L-Phe wykazało, że wszystkie izoflawonoidy syntezowane są *de novo* i wydzielane do medium (Gagnon i wspópr. 1992a). Analiza rozkładu radioaktywności wykazała, że genisteina i 2'-hydroksygenisteina oraz ich 7-O-glukozydy, które stanowiły 85% puli izoflawonoidów zawierały 35% całkowitej radioaktywności, podczas gdy stanowiące 15% puli izoflawonoidów prenylowane pochodne zawierały 65% radioaktywności. Wyniki te wskazują na to, że zachodząca w hodowli biosynteza ukierunkowana jest głównie na prenylowane pochodne izoflawonoidów. Około 20% znakowanych radioaktywnie izoflawonoidów znajdowało się w medium, z czego 80% stanowiły prenylowane pochodne genisteiny i 2'-hydroksygenisteiny, co wyraźnie wskazuje na to, że związki te są wydzielane do medium w sposób selektywny (Gagnon i wspópr. 1992a).

Inne rośliny motylkowate oraz ich hodowle zawiesinowe nie wytwarzają w normalnych warunkach takich ilości prenylowanych izoflawonów lub prenylowanych pterokarpanów, dlatego też hodowle komórkowe i rośliny łubinu białego są dobrym układem modelowym do badań nad enzymami biorącymi udział w prenylacji izoflawonoidów. Zdolność do katalizowania reakcji prenylacji wykazywały mikrosomalne preparaty białkowe uzyskane z korzeni i z kultur komórkowych łubinu białego (Laflamme i wspópr. 1993). Preparaty enzymatyczne katalizowały prenylację genisteiny i 2'-hydroksygenisteiny w pozycjach 6-, 8- oraz 3'-, używając pirofosforanu izopentenyłu jako donora grupy prenylowej. Wyniki testów

enzymatycznych z różnymi substratami wykazały, że w łubinie istnieje kilka różnych prenylotransferaz tworzących kompleks multienzymatyczny, w którym prenylacja następuje w ściśle określonej sekwencji uwarunkowanej względami strukturalnymi.

Badania nad metabolizmem izoflawonoidów prowadzono również na siewkach łubinu białego. Opisano zmiany zawartości glukozydów, aglikonów oraz prenylowanych pochodnych izoflawonoidów w częściach roślin oraz w wydzielinach korzeniowych łubinu białego podczas pierwszych 13 dni rozwoju siewek (Wojtaszek i współpr. 1993, Gagnon i współpr. 1995b). Dojrzałe nasiona łubinu białego zawierają niewielkie ilości izoflawonoidów, głównie w postaci glukozydów oraz śladowe ilości prenylowanych pochodnych. Całkowita zawartość izoflawonoidów gwałtownie spada podczas pierwszych 24 h od momentu namoczenia nasion, a następnie zaczyna wzrastać. Maksymalne stężenie tych metabolitów w tkance rozwijającej się siewki zostaje osiągnięte 3 dnia wzrostu. W składzie jakościowym izoflawonoidów dominują glukozydy genisteiny i 2'-hydroksygenisteiny. Stosunek zawartości glukozydów do aglikonów jest różny w poszczególnych częściach roślin i zmienia się w trakcie rozwoju siewki, szczególnie wysoki jest po 5 dniu rozwoju. Zmiany w proporcji glukozydów do aglikonów sugerują, że w siewkach łubinu białego istnieje swoisty tkankowo i zmieniający się w trakcie ontogenezy mechanizm glukozyzacji i deglukozyzacji izoflawonoidów.

Doświadczenia z wykorzystaniem [2-¹⁴C] kwasu cynamonowego i [U-¹⁴C]L-Phe przeprowadzone na 2 dniowych siewkach wykazały, że zarówno całe siewki, jak i same korzenie oraz liścienie są w stanie syntezować ze znakowanych radioaktywnie prekursorów zarówno genisteinę i 2'-hydroksygenisteinę, jak i ich glukozydy i prenylowane pochodne (Gagnon i współpr. 1995b).

2.4.2. Izoflawonoidy w oddziaływaniach symbiotycznych łubinu białego

Wydzielanie izoflawonoidów do gleby odgrywa istotną rolę w oddziaływaniach symbiotycznych łubinu białego z rizobiami. Na podstawie analiz wydzielin korzeniowych łubinu białego stwierdzono, że profil izoflawonoidów w wydzielinach jest odmienny od profilu obserwowanego w korzeniach. W wydzielinach znacznie większy udział mają wolne aglikony genisteiny, 2'-hydroksygenisteiny oraz ich prenylowane pochodne, a zawartość glukozydów jest niewielka (Wojtaszek i współpr. 1993, Gagnon i współpr. 1995b). Do tej pory nie stwierdzono jednak, które ze związków wydzielanych przez korzenie łubinu mogą być induktorami genów *nod* symbionta. Wiadomo, że stężenie i forma azotu mają wpływ na profil izoflawonoidów w korzeniach, jak i w wydzielinach korzeniowych (Wojtaszek i

enzymy i witaminy, które są niezbędne do prawidłowego funkcjonowania organizmu. Wskazano również na rolę mikroorganizmów w procesie trawienia i wchłaniania składników odżywczych.

Wskazano również na rolę mikroorganizmów w procesie trawienia i wchłaniania składników odżywczych. Wskazano również na rolę mikroorganizmów w procesie trawienia i wchłaniania składników odżywczych.

Wskazano również na rolę mikroorganizmów w procesie trawienia i wchłaniania składników odżywczych. Wskazano również na rolę mikroorganizmów w procesie trawienia i wchłaniania składników odżywczych.

Wskazano również na rolę mikroorganizmów w procesie trawienia i wchłaniania składników odżywczych. Wskazano również na rolę mikroorganizmów w procesie trawienia i wchłaniania składników odżywczych.

Wskazano również na rolę mikroorganizmów w procesie trawienia i wchłaniania składników odżywczych. Wskazano również na rolę mikroorganizmów w procesie trawienia i wchłaniania składników odżywczych.

Wskazano również na rolę mikroorganizmów w procesie trawienia i wchłaniania składników odżywczych. Wskazano również na rolę mikroorganizmów w procesie trawienia i wchłaniania składników odżywczych.

Wskazano również na rolę mikroorganizmów w procesie trawienia i wchłaniania składników odżywczych. Wskazano również na rolę mikroorganizmów w procesie trawienia i wchłaniania składników odżywczych.

Wskazano również na rolę mikroorganizmów w procesie trawienia i wchłaniania składników odżywczych. Wskazano również na rolę mikroorganizmów w procesie trawienia i wchłaniania składników odżywczych.

Wskazano również na rolę mikroorganizmów w procesie trawienia i wchłaniania składników odżywczych. Wskazano również na rolę mikroorganizmów w procesie trawienia i wchłaniania składników odżywczych.

współpr. 1993). Wzrost stężenia jonów NO_3^- w medium, w którym umieszczone były korzenie siewek, powodował spadek ilości wydzielonych izoflawonoidów. Spadek ten może być interpretowany jako zmniejszenie wydzielania induktorów genów *nod* w sytuacjach, gdy ilość przyswajalnego azotu jest dla rośliny wystarczająca.

Wprowadzenie bakterii *R. loti* do medium, w którym inkubowano korzenie siewek łubinu białego powoduje zmiany zawartości izoflawonoidów zarówno w korzeniach, jak i w medium (Gagnon & Ibrahim 1997). W korzeniach następuje niewielki spadek ilości glukozydów oraz wzrost zawartości monoprenyloowanych pochodnych genisteiny. W medium zaobserwowano również spadek ilości glukozydów oraz znaczny wzrost ilości genisteiny i 2'-hydroksygenisteiny i jej prenyloowanych pochodnych. Rezultat ten jest zgodny z wynikami uzyskanymi dla innych roślin motylkowatych, gdzie inokulacja symbiontem również powodowała zwiększone wydzielanie induktorów genów *nod* (Recourt i współpr. 1991, Dakora i współpr. 1993a, 1993b, Schmidt i współpr. 1994, Bolaños-Vásquez 1997). Nie wiadomo jednak, czy wydzielany w największych ilościach przez korzenie łubinu wighteon jest induktorem genów *nod* *R. loti*, tym bardziej, iż w testach *in vitro* wykazano, że inhibuje on wzrost tej bakterii (Gagnon & Ibrahim 1997).

Na to, że izoflawonoidy znajdujące się w korzeniu odgrywają czynną rolę w oddziaływaniach z bakteriami symbiotycznymi wskazują analizy zawartości tych związków w brodawkach korzeniowych łubinu białego inokulowanego *B. lupini*. Profil izoflawonoidów wyizolowanych z brodawek znacznie odbiega od profilu tych związków w korzeniu i charakteryzuje się wysoką zawartością wolnych aglikonów, a zwłaszcza 2'-hydroksylupalbigeniny (Gagnon i współpr. 1995a). Ta diprenyloowana pochodna 2'-hydroksygenisteiny w zdrowych korzeniach występuje w śladowych ilościach, podczas gdy w brodawkach może stanowić do 30% całkowitej puli izoflawonoidów. Immunocyto lokalizacja 2'-hydroksylupalbigeniny z wykorzystaniem przeciwciał poliklonalnych wykazała, że w brodawkach związek ten występuje w korze wewnętrznej i jest związany z materiałem wypełniającym przestwory międzykomórkowe (Grandmaison & Ibrahim 1995, Gagnon i współpr. 1995a). Można przypuszczać, że 2'-hydroksylupalbigenina odgrywa ważną rolę we wczesnych etapach oddziaływań symbiotycznych, związaną, być może z tworzeniem się bariery tlenowej (Howieson i współpr. 1998).

2.4.3. Izoflawonoidy w reakcjach obronnych łubinu białego

Rośliny rodzaju *Lupinus* różnią się od innych roślin motylkowatych tym, że w normalnych warunkach syntezują i akumulują prenylowane pochodne izoflawonoidów wykazujące właściwości antygrzybowe (Harborne 1976, Hashidoko i wspópr. 1986, Lane & Newman 1987, Hallard i wspópr. 1992, Tahara & wspópr. 1994). W łubinie białym związki te akumulowane są głównie w korzeniach (Ingham i wspópr. 1983, Tahara i wspópr. 1984, Stobiecki & Wojtaszek 1990) oraz na powierzchni liści (Harborne i wspópr. 1976, Ingham i wspópr. 1983). Korzenie łubinu białego po obcięciu stożka wzrostu wydzielają znaczne ilości wighteonu i luteonu, co świadczy o dużej konstytutywnej zawartości tych metabolitów. Tak znacznego wydzielania flawonoidów nie stwierdzano u innych roślin motylkowatych. (Cosio i wspópr. 1996).

Biorąc pod uwagę fakt obecności prenylowanych izoflawonoidów w zdrowych roślinach łubinu białego, jak również dużą ilość izoflawonoidów zmagazynowanych w postaci glukozydów można przypuszczać, że w łubinie białym dominować mogą raczej konstytutywne, a nie indukowane mechanizmy obronne. Początkowo uważano nawet, że łubinowe izoflawonoidy o właściwościach fungicydowych stanowią wystarczającą barierę zabezpieczającą przed patogenami i w roślinie tej nie dochodzi w wyniku infekcji do ich dodatkowej syntezy (Harborne i wspópr. 1976). Późniejsze doświadczenia wykazały jednak, że stres biotyczny związany z infekcją, jak również czynniki abiotyczne mogą wpływać na metabolizm izoflawonoidów i ich profil w tkankach łubinu białego (Shibuya i wspópr. 1992, Gagnon & Ibrahim 1997, Stobiecki i wspópr. 1997, Wojtaszek & Stobiecki 1997).

W korzeniach siewek zanurzonych w roztworach elisytora drożdżowego lub chitozanu zaobserwowano wzrost całkowitej zawartości izoflawonoidów w porównaniu do siewek kontrolnych (Gagnon & Ibrahim 1997). W obu przypadkach największy względny wzrost dotyczył głównie monoprenylowanych pochodnych izoflawonoidów oraz genisteiny i 2'-hydroksygenisteiny, a chitozan spowodował dodatkowo wzrost ilości glukozydów tych związków. Analizy wydzielin korzeniowych wykazały, że obydwie elisytory powodują zwiększenie wydzielania wszystkich grup izoflawonoidów, a w szczególności monoprenylowanych pochodnych genisteiny i 2'-hydroksygenisteiny. Natomiast w doświadczeniach, w których korzenie siewek łubinu białego zanurzano w roztworze elisytora z *C. lindemuthianum* wykazano wzrost zawartości 2'-hydroksygenisteiny, wighteonu i luteonu w korzeniach siewek elisytowanych w porównaniu do roślin kontrolnych (Stobiecki i wspópr.

1.4.3. Koflawonoidy w reakcjach obronnych roślin białego

Kosiny rodzaju kaperon różnią się od innych roślin modelowych tym, że w normalnych warunkach syntetyzują i akumulują fenylpropanowe pochodne koflawonoidów wyzyskując właściwości antyoksydacyjne (Harborne 1976, Harborne i wsp. 1986, Lee & Newman 1987, Kalland i wsp. 1992, Tabata i wsp. 1994). W roślinie białym związek to akumulowane są głównie w korzeniach (Ingram i wsp. 1983, Tabata i wsp. 1984, Szobiel & Wojaszk 1990) oraz na powierzchni liści (Harborne i wsp. 1976, Ingram i wsp. 1983). Korzenie roślin białego po obciążeniu szkodliwym wykształcają znacznie ilości wightonu i luteonu co świadczy o dużej koncentracji zawartości tych metabolitów. Tak znacznego wykształcenia flavonoidów nie stwierdzano u innych roślin modelowych. (Cano i wsp. 1999)

Biorąc pod uwagę fakt obecności gromadzonego koflawonoidów w zdrowych roślinach roślin białego jak również dużą ilość koflawonoidów zaangażowanych w postaci glikozydów można przypuszczać, że w roślinie białym dominować mogą reakcje konstytutywne a nie indukowane mechanizmy obrony. Prawdopodobnie uważano nawet, że białe koflawonoidy a właściwie ich glikozydy stanowią wyszczepione bariery zapobiegające przed patogennymi i w roślinie tej nie dochodzi w wyniku infekcji do ich dodatkowej syntez (Harborne i wsp. 1976). Istotnym dowodem na to jest fakt, że przy biotycznym zawiązaniu z infekcją jak również czynnikami abiotycznymi mogą występować nieznaczne zmiany w ilościach koflawonoidów (Cano i wsp. 1992).

(Cano & Ibrahim 1997, Szobiel & Wojaszk 1997, Szobiel & Szobiel 1997)

W korzeniach siewek zanurzonych w roztworach chloroformu dietylowego lub chloroformu rozcieńczonego wodą (całkowicie) zawartość koflawonoidów w porównaniu do siewek kontrolnych (Cano & Ibrahim 1997). W obu przypadkach najwięcej wagi przytoczono do siewek dotyczących głównie monoprenylowanych pochodnych koflawonoidów oraz genisteiny i 2'-hydroksygenisteiny, a istotną rolę odegrał dodatkowy wzrost ilości glikozydów tych związków. Analizy wykształcenia koflawonoidów wykazały, że obydwa czynniki powodują zwiększenie wykształcenia wszystkich grup koflawonoidów, a w szczególności monoprenylowanych pochodnych genisteiny i 2'-hydroksygenisteiny. Istotnym dowodem na to jest fakt, że w korzeniach siewek białego zanurzonego w roztworze dietylowego i luteonu wykształcano w większym stopniu 2'-hydroksygenisteinę, wighton i luteon w korzeniach siewek chloroformu w porównaniu do roślin kontrolnych (Szobiel & Szobiel 1997).

1997). Zestawiając te wyniki ze zmianami w zawartości izoflawonoidów w korzeniach i wydzielinach korzeniowych spowodowanymi inkubacją z *R. loti* można zauważyć, że symbiont nie wywołuje aż tak znacznego wzrostu wydzielania prenylowanych pochodnych 2'-hydroksygenisteiny (Gagnon & Ibrahim 1997). Biorąc pod uwagę fakt, że związki te wykazują najsilniejsze właściwości antygrzybowe ze wszystkich izoflawonoidów wykrytych w łubinie białym (Tahara i współpr. 1984) można stwierdzić, że siewki swoiście reagują na pojawienie się mikroorganizmów patogennych lub symbiotycznych.

Zmiany w zawartości izoflawonoidów zaobserwowano również w testach z wykorzystaniem elisytora drożdżowego, przeprowadzonych na liścieniach łubinu białego (Wojtaszek & Stobiecki 1997). W tym przypadku analizowano zarówno zawartość izoflawonoidów w liścieniach, jak i ilość tych związków wydzielanych w miejscu zranienia, na które nanoszono roztwór elisytoru. W wydzielinach zaobserwowano wzrost ilości 2'-hydroksygenisteiny, lupinalbiny A oraz luteonu. Analizy zawartości izoflawonoidów w liścieniach wykazały wzrost całkowitej puli tych metabolitów w elisytowanych liścieniach, wzrost ten dotyczył głównie połączeń glikozydowych.

Wyniki powyższych testów biologicznych wskazują na zmiany w metabolizmie izoflawonoidów w łubinie wywołane infekcją przez mikroorganizmy patogenne. Nie wiadomo, jednak w jakim stopniu w wyniku infekcji zostaje uruchomiona synteza *de novo* prenylowanych pochodnych izoflawonoidów, a w jakim stopniu związki te mogą być uzyskiwane ze zmagazynowanych w roślinie glikozydów genisteiny i 2'-hydroksygenisteiny. Obecność takiego mechanizmu syntezy prenylowanych izoflawonoidów wymaga istnienia enzymu o aktywności β -glikozydazy w łubinie białym.

1987). Zestawienie te wyniki ze zmianami w zawartości izoflawonoidów w korzeniach i wyciekach korzeniowych spowodowały infekcją z *R. loti* można zauważyć, że symptom nie występuje aż tak znacząco w miejscu wyciekania przylgowanych pochodnych 3'-hydroksygenisteiny (Fujino & Iwabara 1997). Biorąc pod uwagę fakt że związki te wykazują najniższą właściwość antygenową ze wszystkich izoflawonoidów występujących w fabinie białym (Tobari i współpracownicy 1984) można stwierdzić, że niewielki ewolucyjny odpór na pojawienie się mikroorganizmów patogennych lub szkodliwych.

Zmiany w zawartości izoflawonoidów zapobiegają również w ten sposób wykorzystaniu systemu obronowego, przeprowadzonego na poziomie fabinu białego (Wojtaszek & Szobieski 1997). W tym przypadku analizowano zarówno zawartość izoflawonoidów w liściach, jak i liśćach wyciekających w miejscu zranienia, na które naniesiono ekstrakt olejowy. W wyciekach zapobiegano wzrost liści 3'-hydroksygenisteiny, genisteiny A oraz fasonu. Analizy zawartości izoflawonoidów w liściach wykazały wzrost całkowitej ilości tych związków w ekstrakcie liści, wzrost ten dotyczył głównie połączeń glikozydowych.

Wyniki powyższych badań biologicznych wskazują na zmiany w metabolizmie izoflawonoidów w fabinie wywołane infekcją przez mikroorganizmy patogenne. Nie wiadomo jednak w jakim stopniu w wyniku infekcji zostaje uruchomiona system obrony przylgowanych pochodnych izoflawonoidów a w jakim stopniu związki te mogą być wykorzystane do zmniejszających w roślinie glikozydów genisteiny i 3'-hydroksygenisteiny. Ubezpieczeństwo mechanizm obrony przylgowanych izoflawonoidów wymaga istnienia enzymów o aktywności β -glikozydaz w fabinie białym.

3. MATERIAŁY I METODY

3.1. MATERIAŁ ROŚLINNY

Do badań wykorzystywano siewki łubinu białego (*Lupinus albus* L.) odmiana Bac. Nasiona pochodziły z Zakładu Doświadczalnego Hodowli i Aklimatyzacji Roślin w Przebędowie.

3.2. STOSOWANE ODCZYNNIKI

3.2.1. Odczynniki i rozpuszczalniki

Podstawowe sole nieorganiczne oraz ninhydryna (cz.d.a.) pochodziły z POCh Gliwice, natomiast rozpuszczalniki organiczne z POCh Gliwice lub Chempur Piekary Śląskie. Wszystkie rozpuszczalniki przed użyciem destylowano.

Pozostałe odczynniki pochodziły z następujących źródeł:

- BDH (W. Brytania): Polyclar AT (PVP)
- BioRad (USA): $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$
- Chemapol Ltd. (W. Brytania): TCA
- International Enzymes Ltd (W. Brytania): SDS
- J. T. Baker (Holandia): acetonitryl o stopniu czystości HPLC Gradient Grade
- Merck (Niemcy): DMSO, 2,6-dichlorochinono-4-chloroimid, 2-merkaptioetanol
- National Diagnostics (USA): Protogel (akryloamid 30% (w/v), bisakryloamid 0.8% (w/v))
- Polfa Kraków (Polska): glukoza
- Polfa Tarchomin (Polska): karbenicylina
- Serva (Niemcy): TEMED, Tris
- Sigma-Aldrich (Polska): AgNO_3 , Ampholyte pH 3-10, EDTA, chlorowodorek neokupreiny, Fast Blue B, formaldehyd 37% (w/v), glicyna, glukozo-6-fosforan, kwas bursztynowy, kwas jabłkowy, kwas pirogronowy, kwas *p*-hydroksybenzoesowy, kwas 5-sulfosalicylowy, kwas szczawiooctowy, kwas szczawiowy, α -D-mannopyranozyd metylu, NADH, NADP^+ , naftorezorcyna

3. MATERIAŁY

3.1. MATERIAŁY

Do badań wykorzystano...

3.2. STOSOWANE ODCZYNNIKI

3.2.1. Odczynniki i reagenty

Podstawowe sole metali...
Wszystkie reagenty...
Podstawowe odczynniki...

- BDH (W. Brytania)
 - Biorad (USA) (MIL)
 - Cinnapol Ltd. (W. Brytania)
 - International Enzymes
 - I. T. Baker (Holandia)
 - Merck (Niemcy) (DMSO)
 - National Diagnostic (USA)
 - Polfa Kiszew (Polska)
 - Polfa Tachomin (Polska)
 - Serva (Niemcy) (TEMED)
 - Sigma-Aldrich (Polska)
- neopentyl, Fast Blue F, kwas jabłkowy, kwas karmazynowy, kwas salicylowy, kwas siarkowy, NADH, NADP, nifedypina

Odczynniki stosowane do elektroforez charakteryzowały się podwyższonym stopniem czystości („for electrophoresis”). Pozostałe odczynniki miały czystość analityczną („analytical grade”). Jeśli nie zostało to określone inaczej, to w doświadczeniach wykorzystywano wodę dejonizowaną w systemie Milli-Q Plus Millipore (USA).

3.2.2. Standardy i substraty do testów enzymatycznych

Stosowane standardy oraz substraty do testów enzymatycznych pochodziły z następujących źródeł:

- Nutritional Biochemical Corp. (USA): β -D-glukozyd alkoholu salicylowego (salicyna)
- Schuchardt (Niemcy): 7-O- β -(2''-O- α -ramnozylo)-glukozyd naryngeny (naryngina) i β -D-glukozyd hydrochinonu (arbutyna)
- Serva (Niemcy): cytochrom C, Protein Test Mixture 4 for SDS-PAGE, Protein Test Mixture for pI Determination pH 3-10
- Sigma-Aldrich (Polska): celobioza, gentobiza, rafinoza, sacharoza, stachioza, trehaloza, β -D-glukopyranozyd *p*-nitrofenolu (*p*NPG), β -D-glukopyranozyd 6-bromo-2-naftolu, β -D-glukopyranozyd 4-metyloumbelliferonu (MUG), Molecular Weight Markers for Non-Denaturing Electrophoresis

Glikozydy flawonoidów i izoflawonoidów: 4',7-O- β -D-diglukozyd genisteiny, 7-O- β -(2''-O- α -ramnozylo)-glukozyd apigeniny i 7-O- β -D-glukozyd genisteiny (genistyna), zostały wyizolowane, oczyszczone i zidentyfikowane w Pracowni Fitochemii IChB PAN wg procedury opisanej przez Frańskiego i współpr. (1999).

3.2.3. Nośniki chromatograficzne

Białka oczyszczano wykorzystując chromatografię jonowymienną na CM-celulozie (Serva), chromatografię powinowactwa na konkanawalinie A (Con A-Sepharose 4B; Sigma Aldrich) oraz sączenie żelowe na Sephacryl S-200 High Resolution i Sephacryl S-300 High Resolution (Pharmacia Biotech). Metabolity wtórne izolowano i oczyszczano na wymienniaczu jonowym SCX (Strong Cation Exchanger; Alltech) oraz w odwróconej fazie (RP-C18; Alltech). Związki fenolowe analizowano na płytkach z żelem krzemionkowym (0.25 mm, Silica gel 60 F₂₅₄; Merck).

3.3. PRZYGOTOWANIE MATERIAŁU BIOLOGICZNEGO

3.3.1. Uprawa roślin

Nasiona łubinu sterylizowano w 1.5% (v/v) KOCl przez 20 min, a następnie kilka razy przemywano sterylną wodą dejonizowaną. Nasiona były wysiewane do wysterylizowanego przez autoklawowanie perlitu. Kiełkowanie i rozwój roślin odbywały się w szklarni w warunkach kontrolowanych. Po upływie jednego tygodnia rośliny były podlewane 25% roztworem pożywki MS (Murashige & Skoog 1962). Po zakończeniu hodowli (zwykle po 14 dniach) rośliny dzielono na korzenie, hypokotyle, liścienie i pędy. Fragmenty roślin wykorzystywano bezpośrednio do izolacji białek lub związków fenolowych, albo zamrażano i przechowywano w -20°C .

3.3.2. Otrzymanie i charakterystyka elisytora drożdżowego

Preparat elisytora (YE) uzyskiwano z dostępnych handlowo drożdży piekarniczych (*Saccharomyces cerevisiae*). Oczyszczanie ścian komórkowych drożdży prowadzono wg zmodyfikowanej procedury opisanej przez Hahna i współprac. (1992). Czyste ściany komórkowe drożdży zawieszano w dejonizowanej wodzie (1:100, w/v) i autoklawowano 30 min w 121°C , a następnie zawiesinę sączo na sączku bibułowym. Przesącz zawierający fragmenty zhydrolizowanych ścian komórkowych zatężano na wyparce próżniowej lub stosując zestaw do ultrafiltracji z membraną o punkcie odcięcia 1 kDa firmy Amicon (USA). W zatężonym roztworze oznaczano całkowitą zawartość cukrów metodą kolorymetryczną wg opisu podanego przez Fry'a (1994). Stężenie cukrów oznaczano wobec krzywej wzorcowej przygotowanej dla glukozy w zakresie 2-15 μg . Do doświadczeń używano ilości YE określone w μg ekwiwalentów glukozy per ml. Roztwór elisytora przechowywano w -20°C .

Porównanie profili cukrów i aminokwasów w różnych preparatach YE prowadzono techniką TLC na płytkach pokrytych żelem krzemionkowym. Na płytkę nanoszono 10-50 μl roztworu elisytora. Badane próby rozwijano w fazie: izopropanol-EtOAc- H_2O (5:2:3, v/v/v). Po rozwinięciu i wysuszeniu płytki wybarwiano jednym z dwóch odczynników grupowych:

- 0.2% (w/v) roztwór naftorezorcyny w mieszaninie MeOH- H_2SO_4 (9:1, v/v) – cukry
- 0.2% (w/v) roztwór ninhydryny w EtOH – aminokwasy

3.3. PRZYGOTOWANIE MATERIAŁU BIOLOGICZNEGO

3.3.1. Uprawa roślin

Nasiona jęczmienia siewnego siewano w 1,5% KOCl przez 30 min, a następnie kilka razy przemywane sterylną wodą deionizowaną. Nasiona były wysiewane do wycieralnicowego przez autoklawowania perlitu. Kiełkowanie i rozwój roślin odbywały się w szklarni w warunkach kontrolowanych. Po upływie jednego tygodnia rośliny były podlewane 25% roztworem potasowej MS (Mannings & Steeg 1981). Po zakorzenieniu roślin (zwykle po 14 dniach) rośliny dzielono na korzenie, hipokotyle, liście i pędy. Fragmenty roślin wykorzystywane bezpośrednio do izolacji DNA lub zwiszków fenolowych, albo zamrażano i przechowywano w -20°C .

3.3.2. Oczyszczenie i charakterystyka elizjatu drożdżowego

Preparat elizjatu (YE) otrzymywano z dostępnych komercyjnie drożdży piaskarskich (Zachodniopomorski Zakład Mlecznictwa). Oczyszczenie ścian komórkowych drożdży prowadzono wg zmodyfikowanej procedury opisanej przez Hahn i wspólnicy (1993). Ciepłe seleny komórkowe drożdży zawieszano w deionizowanej wodzie (1:100, w/v) i nakładano 30 min w 121°C , a następnie zawiesinę ekspozycję na światło ultrafioletowe. Przeszły zawiesinę płynną zhydrolizowano ścian komórkowych za pomocą próżniowej lub stojąc zalew do ultradźwięków z zamianą o punkcie odjęcia i KDA firmy Amicon (USA). W zalegającym roztworze oczyszczano celowość zawiesinę metodą kolymetryczną wg opisu podanego przez Fryś (1994). Sztywne cukrowe oszacowano wobec fruktozy w warunkach przygotowanej dla glukozy w zakresie 2-12 µg. Do dowiedzenia używano listy YE otrzymanej w 1% ekstraktów glukozy per ml. Roztwór elizjatu przechowywano w -20°C .

Porównanie profili cukrów i aminokwasów w różnych preparatach YE prowadzono techniką HPLC na płytach polimerowych z kolumnami kationowymi. Na płytce naniesiono 10-20 µl roztworu elizjatu. Jakość próbki rozważano w fazie: propionu- $\text{EtOAc-H}_2\text{O}$ (2:2:2, w/v). Po rozwinieniu i wysuszeniu płytki wywołano jej obraz z dwóch obrazy w grupach:

- 0,2% (w/v) roztwór niflorazyny w mieszaninie $\text{MeOH-H}_2\text{SO}_4$ (9:1, w/v) - cefry
- 0,2% (w/v) roztwór ninhydriny w EtOH - aminokwasy

3.3.3. Oznaczanie aktywności YE - testy liścieniowe

Aktywność preparatu YE testowano na liścieniach 11-dniowych siewek łubinu białego wg procedury opisanej przez Hahna i współpr. (1992). Zdrowe i odpowiednio wywinięte liścienie ucinano przy nasadzie łodygi i ich powierzchnię przecierano 70% (v/v) EtOH. Następnie ścinano niewielką część tkanki i układano po 5-7 liścieni w sterylnych szalkach Petriego (Ø10 cm), na dwóch warstwach bibuły zwilżonych 7 ml sterylnej wody. Na ściętą powierzchnię nanoszono 90- μ l kroplę odpowiedniego roztworu. W testach stosowano sterylną wodę jako negatywną próbę kontrolną, 2 mM CuCl_2 jako pozytywną próbę kontrolną oraz roztwory YE w stężeniach 100-1000 $\mu\text{g/ml}$. Liścienie z naniesionymi roztworami inkubowano w ciemności w temperaturze pokojowej od 1 do 48 h. Po zakończeniu inkubacji każdy liścień zanurzano ściętą powierzchnią w wodzie (2 ml na liścień), zbierając w ten sposób dyfuzaty. Każdy wariant doświadczenia obejmował 2-3 szalki. Materiał roślinny zamrażano w -20°C , a dyfuzaty ekstrahowano 3 x 1 obj. EtOAc i po odparowaniu warstw organicznych oznaczano zawartość wydzielonych przez liścienie związków fenolowych (Wojtaszek & Stobiecki 1997).

3.3.4. Zmiany aktywności IGG w reakcji na bodźce biotyczne i abiotyczne – testy na siewkach łubinu

Siewki łubinu białego rosące po 5 sztuk w doniczkach z perlitem podlewano 50 ml 25% roztworu pożywki MS (Murashige i Skoog 1962) w 10 i 12 dniu wzrostu. W 14 dniu wzrostu rośliny podlewano roztworami różnych form azotu: 9 mM KNO_3 , 15 mM NH_4NO_3 , 5 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ lub roztworem YE o stężeniu 250 lub 500 $\mu\text{g/ml}$ używając 50 ml odpowiedniego roztworu na doniczkę. Każdy wariant obejmował 2 doniczki, a eksperyment wykonano dwukrotnie. W celu uniknięcia rozwoju mikroorganizmów, do przygotowanych roztworów dodawano karbenicylinę w ilości 0.5 mg/ml. Próbę kontrolną stanowiły rośliny podlewane wodnym roztworem karbenicyliny.

Równoległe, dla celów analizy wydzielanych związków fenolowych, część roślin umieszczano w kolbach stożkowych, w których znajdowało się po 200 ml wyżej wymienionych roztworów. W każdej kolbie umieszczono po 5 siewek łubinu, tak aby ich korzenie były zanurzone w roztworach. Ten wariant eksperymentu również wykonano dwukrotnie.

Po 24 lub 48 h rośliny dzielono na poszczególne części, w których oznaczano aktywność IGG. Roztwory, w których inkubowano rośliny ekstrahowano 2 x 1 obj. EtOAc i

3.3.3. Oznaczanie aktywności YE - testy błędnosławne

Aktywność preparatu YE testowano na błędnosławach 11-dniowych siewek jądrow białego węgla procedury opisaną przez Hahn i współprac. (1982). Siewki, 24howe i odpowiednio wywinięte błędnosławce ucinano przy nasadzie łodygi i ich powierzchnie przeciętano 70% (v/v) EtOH. Następnie ściłano niewielką część tkanki i układano po 2-7 błędnosławców w sterylnych szalkach Petriego (90 mm) na dwóch warstwach bibuły zwilżonych 7 ml sterylnej wody. Na ściłkę powierzchnię nanoszono 90- μ l kroplę odpowiedniego roztworu. W testach stosowano sterylną wodę jako negatywną próbę kontrolną. 2 mM CuCl₂ jako pozytywną próbę kontrolną oraz roztwory YE w stężeniach 100-1000 μ g/ml. L. dactylis z namieszczonej roztworami inkubowano w ciemności w temperaturze pokojowej od 1 do 48 h. Po zakończeniu inkubacji każdą błędnosławkę zamieszano ściłką powierzchnią w wodzie (2 ml na błędnosław), zbierając w ten sposób dyfuzat. Każdy warunek doświadczalny opisywano 2-3 razy. Materiał roślinny zamieszano w -50°C, a dyfuzaty ekstrahowano 3 x 1 obj. EtOAc i po odparowaniu warstw organicznych oszacowano zawartość wydzielonych przez błędnosławce związków fenolowych (Wojcicki & Stojczak 1997).

3.3.4. Zmiany aktywności IGG w reakcji na bodźce błędnosławne i splotyżne - testy na siewkach jądrow

Siewki jądrow białego rosnące po 2 tydzień w doniczkach z perlitem podlewano 50 ml 25% roztworu potasowej MS (Murashige i Skoog 1962) w 10 i 12 dniu wzrostu. W 14 dniu wzrostu rośliny podlewano roztworami różnej koncentracji: 9 mM KNO₃, 12 mM NH₄NO₃, 2 mM (NH₄)₂SO₄ lub roztworami YE o stężeniu 250 lub 500 μ g/ml uzyskując 50 ml odpowiedniego roztworu na doniczkę. Każdy warunek opisywano 2 doniczkami, a eksperyment wykonano dwukrotnie. W celu redukcji rozwoju mikroorganizmów, do przygotowanych roztworów dodawano karbendazym w ilości 0,2 mg/ml. Kroplę kontrolną stanowiły rośliny podlewane wodąnym roztworem karbendazymu.

Równoległe, dla celów analizy wydzielanych związków fenolowych, część roślin umieszczano w kolbach szklanych, w których znajdowało się po 200 ml wodyj wyzmięznych roztworów. W każdej kolbie umieszczano po 2 siewki jądrow, tak aby ich korzenie były zanurzone w roztworze. Ten warunek eksperymentalny również wykonano dwukrotnie.

Po 24 lub 48 h rośliny dzielono na poszczególne części, w których oszacowano aktywność IGG. Roztwory, w których inkubowano rośliny ekstrahowano 3 x 1 obj. EtOAc i

po odparowaniu warstw organicznych oznaczano zawartość wydzielonych przez korzenie związków fenolowych.

3.4. EKSTRAKCJA BIAŁEK

3.4.1. Frakcjonowanie białek z tkanki roślinnej

Izolację białek prowadzono w temp. 0°C. Materiał roślinny homogenizowano w móździerzu w 0.1 M buforze NaOAc, pH 5.0 (2 ml/g św.m.) w obecności PVP (0.2 g/3 g św.m.). Homogenat odwirowywano przy 20000 g przez 10 min. Wydzielony supernatant traktowano jako ekstrakt białek cytoplazmatycznych. Pozostały osad przemywano kilkakrotnie buforem ekstrakcyjnym na lejku Büchnera z sączkiem bibułowym, otrzymany przesącz dołączano do frakcji białek cytoplazmatycznych. Ekstrakcję białek jonowo związanych ze ścianami komórkowymi prowadzono inkubując otrzymany osad w 0.1 M buforze NaOAc pH 5.0 zawierającym 1 M NaCl przez 90 min przy ciągłym mieszaniu. Zawiesinę odwirowywano przy 20000 g przez 20 min. Osad ścian komórkowych ekstrahowano ponownie 1 M NaCl, a supernatanty z obu ekstrakcji łączono razem.

3.4.2. Oczyszczanie IGG

Procedurę oczyszczania IGG prowadzono w temp. 0°C. Ekstrakt białek ścian komórkowych wysalano $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ do 35% nasycenia roztworu przez 1 h przy ciągłym mieszaniu. Roztwór odwirowywano przy 20000 g przez 20 min. Wstępne doświadczenia wykazały, że w tych warunkach nie następuje wytrącenie IGG. Supernatant doprowadzano do 85% nasycenia $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ przy ciągłym mieszaniu przez 1 h, a następnie odwirowywano jak poprzednio. Osad rozpuszczano w 0.1 M buforze NaOAc, pH 5.0 i dializowano przez noc wobec tego samego buforu. Mieszaninę białek nanoszono na kolumnę z CM-celulozą (1.5 cm x 30 cm) zekwilibrowaną wcześniej 0.1 M buforem NaOAc, pH 5.0. Elucję prowadzono stosując gradient liniowy 0-0.5 M NaCl w tym samym buforze; zbierano frakcje o objętości 6 ml. We wszystkich frakcjach określano ilość białka (A_{280}) oraz aktywność IGG stosując test z pNPG (Rozdz. 3.6.1.). Frakcje wykazujące największą aktywność IGG łączono i wysalano $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ do 90% nasycenia, roztwór odwirowywano jak poprzednio. Osad białek rozpuszczano w 50 mM buforze NaOAc, pH 5.0 i dializowano przez noc wobec tego samego buforu. Białka nanoszono na kolumnę z ConA-Sepharose 4B (1.5 cm x 15 cm), zekwilibrowaną 50 mM buforem octanowym pH 5.0, zawierającym 25 mM NaCl i 0.2 M

α -D-mannopyranozyd metylu. Związane białka wmywano w skokowym gradiencie 25 mM, 0.5 M i 1 M NaCl w tym samym buforze w obecności 0.2 M α -D-mannopyranozydu metylu; zbierano frakcje o objętości 5 ml. Frakcje o największej aktywności IGG łączono i poddawano wysoleniu $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ do 90% nasycenia, po 1 h roztwór odwirowywano jak poprzednio. Otrzymany osad rozpuszczano w 0.1 M buforze NaOAc i białka poddawano sączeniu żelowemu na kolumnie wypełnionej Sephacryl S-300 HR (1.5 cm x 50 cm). Ekwilibrację kolumny, a następnie elucję białek prowadzono 0.1 M buforem NaOAc, pH 5.0; zbierano frakcje o objętości 2 ml. Frakcje o najwyższej aktywności IGG wykorzystywano do dalszych badań.

3.4.3. Wydzielanie białek obecnych w przestworach międzykomórkowych

Płyn z przestworów międzykomórkowych (IWF; z ang. Intercellular Washing Fluid) uzyskiwano z korzeni, hypokotyli, liścieni i liści roślin łubinu białego postępując zgodnie z opisem procedury podanym przez Hammond-Kosack (1992). Materiał roślinny poddawano infiltracji 0.1 M buforem NaOAc, pH 5.0, zawierającym 1 M NaCl. Infiltrację prowadzono podczas 5 cykli po 40 s obniżonego ciśnienia. Białka zawarte w IWF otrzymywano odwirowując materiał roślinny przy 230 g przez 10 min.

3.4.4. Markery cytoplazmatyczne

Stopień czystości IWF określano na drodze porównania aktywności enzymatycznej tzw. markerów cytoplazmatycznych w homogenatach roślinnych i w samych IWF. Jako enzymy markerowe wybrano: dehydrogenazę glukozo-6-fosforanową (A), dehydrogenazę jabłczanową (B), dehydrogenazę mleczanową (C) i fumarazę (D). Tkanki roślinne homogenizowano w móżdzierzu w 0.1 M buforze NaOAc pH 5.0/1 M NaCl (1 ml/g św.m.) w obecności PVP w temp. 0°C. Homogenaty odwirowywano 20 min przy 20000 g, a supernatanty używano do oznaczenia aktywności enzymatycznej. Mieszaniny testowe o objętości 1 ml zawierały odpowiednio (Bergmeyer 1974a, 1974b):

- A 0.1 M bufor Tris/ Cl^- pH 8.0, 1 mM glukozo-6-fosforan, pH 8.0, 1 mM MgCl_2 , 0.2 mM β -NADP⁺ oraz 50 μl IWF lub 10 μl homogenatu tkanek
- B 0.1 M bufor Tris/ Cl^- pH 7.5, 1 mM kwas szczawiooctowy, 0.2 mM β -NADH oraz 50 μl IWF lub 25 μl homogenatu tkanek

α-D-mannopiranozyd metodu Kwartana białka wyrażano w składowym składzie 25 mM 0.2 M i 1 M NaCl w tym samym buforze w objętości 0.5 M α-D-mannopiranozydu rozpuszczonego w 0.1 M NaCl. Białko o objętości 2 ml zostało odfiltrowane i poddawano wysołaniu (NH₄)₂SO₄ do 90% nasycenia, po 1 h rozwór odwirowano jak poprzednio. Oczyszczony osadek rozpuszczano w 0.1 M buforze NaOAc i białko poddawano poddaniu rozlowemu na kolumnie wysołanej Sephadryl 2-300 HR (1.2 cm x 30 cm). Efektwność kolony, a następnie klasę białka prowadzono 0.1 M buforem NaOAc, pH 5.0. Białko białko o objętości 2 ml zostało odfiltrowane i poddawano wysołaniu do dalszych badań.

3.4.3. Wydzielanie białek obcych w preparatach międzykolumnowych

Przy użyciu preparatów międzykolumnowych (IWC) z ang. interstitial Washing Field) uzyskano z kolumny wysołanej białko i białko w celu badania postępującego zjawiska opisanego poprzednio pod nazwą Haimon-Kozak (1972). Materiał kolony poddawano poddaniu rozlowemu 0.1 M buforem NaOAc, pH 5.0, zawierającym 1 M NaCl. Białko prowadzono poddaniem rozlowemu 0.1 M buforem NaOAc, pH 5.0, a następnie poddaniem rozlowemu 0.1 M buforem NaOAc, pH 5.0. Białko białko o objętości 2 ml zostało odfiltrowane i poddawano wysołaniu do dalszych badań.

3.4.4. Metody cytochemiczne

Stopień cytochemii (WC) określano na drodze porównania objętości cytochemii (WC) markerów cytochemicznych w homogenizatach roślinnych i w soku ch. IWC jako rozpuszczonego w buforze cytochemicznym (A), dehydrogenazę jaskrawą (B), dehydrogenazę niebieską (C) i fosfataz (D). Białki roślinne homogenizowano w 0.1 M buforze NaOAc, pH 5.0 i 0.1 M NaCl (1 ml/g świeżo) w objętości 10 ml w temp. 0°C. Homogenizaty odwirowano 30 min przy 20000 g, a supernatany przefiltrowano do objętości 1 ml. Białko białko o objętości 1 ml zostało odfiltrowane i poddawano wysołaniu (Bergmeyer 1974, 1976).

- A 0.1 M bufor TrisCl, pH 8.0, 1 mM-β-galacto-6-fosforan, pH 8.0, 1 mM MgCl₂, 0.2 mM β-NADP, oraz 50 μl IWC lub 10 μl homogenizatu roślin
- B 0.1 M bufor TrisCl, pH 7.5, 1 mM β-galacto-6-fosforan, 0.2 mM β-NADH oraz 50 μl IWC lub 25 μl homogenizatu roślin

- C 48 mM bufor fosforanowy pH 7.5, 0.63 mM kwas pirogronowy, 0.18 mM β -NADH oraz 25 μ l IWF lub 25 μ l homogenatu tkanek
- D 0.1 M bufor fosforanowy pH 7.4, 50 mM kwas jabłkowy oraz 10 μ l IWF lub 10 μ l homogenatu tkanek

Reakcje rozpoczynano poprzez dodanie odpowiedniego nukleotydu (A-C) lub kwasu jabłkowego (D). W testach wykorzystujących NADH (B-C) lub NADP^+ (A) miernikiem aktywności były zmiany absorbancji przy długości fali 340 nm. Aktywność fumarazy (D) wyznaczano ze zmian absorbancji przy długości fali 240 nm.

3.5. CHARAKTERYSTYKA ILOŚCIOWA I JAKOŚCIOWA BIAŁKA

3.5.1. Oznaczanie ilości białka

Ilość białka w próbkach oznaczano metodą Bradford (1974). Absorbancję próbek mierzono przy długości fali 595 nm. Ilość białka obliczano przez porównanie z krzywą wzorcową przygotowaną w zakresie 2.5-20 μ g BSA.

3.5.2. Elektroforeza w żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących (SDS-PAGE)

Elektroforezę prowadzono zgodnie z procedurą opisaną przez Laemmli'ego (1970) na żelach poliakrylamidowych typu „mini” w aparacie firmy Biometra (Niemcy). Próbki (3-20 μ g białka) zagęszczano przez wytrącenie 4 obj. zimnego acetonu w -20°C przez 20-40 min. Po odwirowaniu przy 10000 g przez 7 min, wytrącone białka przepłukiwano 2 x 400 μ l schłodzonego 80% (v/v) acetonu w -20°C przez 30 min, wirując 5 min przy 10000 g po każdym płukaniu. Próbki rozpuszczano w 10 μ l H_2O i 10 μ l buforu próbki o składzie: 20% (v/v) glicerol, 10% (v/v) β -merkaptioetanol, 4% (w/v) SDS oraz 0.0025% (w/v) BPB w 0.25 M Tris/ Cl^- pH 6.8. Przed nałożeniem na żel próbki gotowano 3 min i odwirowywano 2 min przy 10000 g. Jako markerów mas cząsteczkowych używano mieszaniny „Protein Test Mixture 4 for SDS-PAGE” (Serva), w skład której wchodziły następujące białka:

anhydraza węglanowa	29.0 kDa
albumina z jaja kurzego	45.0 kDa
albumina z surowicy wołowej	66.0 kDa
fosforylaza B	97.4 kDa

C 48 mM bufor fosforanowy pH 7.5, 0.02 mM kwas piroglutowy, 0.18 mM β-NADH oraz 25 μl IWP lub 25 μl homogenatu tkanki

D 0.1 M bufor fosforanowy pH 7.4, 50 mM kwas jabłkowy oraz 10 μl IWP lub 10 μl homogenatu tkanki

Reakcje rozoczyniano poprzez dodanie odpowiedniego nukleotynu (A-C) lub kwasu jabłkowego (D). W testach wykorzystujących NADH (B-C) lub NADP⁺ (A) mieszanik aktywności były zmiany absorbancji przy długości fali 340 nm. Aktywność fumarazy (D) wyznaczano ze zmian absorbancji przy długości fali 340 nm.

3.5. CHARAKTERYSTYKA ILOŚCIOWA I AKTYWNOŚĆ BIAŁKA

3.5.1. Określenie ilości białka

Ilość białka w próbcech oznaczono metodą Bradforda (1976). Absorbancję próbki zmierzono przy długości fali 595 nm. Ilość białka obliczano przez porównanie z krzywą wzorcową przygotowaną w zakresie 1.5-20 μg BSA.

3.5.2. Elektroforyza w żelu poliakrylamidowym w warunkach denaturujących (SDS-PAGE)

Elektroforyzę prowadzono zgodnie z procedurą opisaną przez Laemmli'ego (1970) na żelach poliakrylamidowych typu „mini” w aparacie firmy Biochem (Dziwny). Probki (3-20 μg białka) rozoczyniano przez wytopienie 4 obj. zimnego octanu w -20°C przez 20-40 min. Po odwiązaniu przy 10000 g przez 7 min, wytrzone białka precipitowano 2 x 400 μl schłodzonego 80% (v/v) octanu w -20°C przez 30 min, wirując 5 min przy 10000 g po każdym precipitacie. Probki rozpuszczono w 10 μl RPO 1 lub buforu probki o składzie: 20% (v/v) gliceroł, 10% (v/v) β-merkaptoetanol, 4% (w/v) SDS oraz 0.002% (w/v) BPS w 0.25 M TrisCl pH 6.8. Przed nakłaceniem na żel probki gotowano 3 min i odwiadowano 2 min przy 10000 g. Jako markerów mas cząsteczkowych używano mieszaniny „Protein Test Mixture 4 for SDS-PAGE” (Sigma), w skład której wchodziły następujące białka:

29.0 kDa	antymiotyna wąglowa
45.0 kDa	albumina z jaja kurczaka
66.0 kDa	albumina z serowicy wołowej
97.4 kDa	fosforylaza B

Przed nałożeniem prób, żele poddawano preelektroforezie przez 30' przy natężeniu prądu 6 mA/żel. Rozdział białek rozpoczynano przy 12 mA/żel, a po wejściu białek w żel rozdzielający podwyższano natężenie maksymalnie do 25 mA/żel. Rozdzielone białka wybarwiano CBB lub metodą srebrową.

3.5.3. Elektroforeza w żelu poliakryloamidowym w warunkach niedenaturujących

Elektroforezę w warunkach niedenaturujących prowadzono w warunkach identycznych jak opisane w rozdziale 3.5.2., z tym, że zarówno żele, jak i bufor elektrodowy pozbawione były SDS. Podobna była również procedura zagęszczania próbek białka, jednak wytrącenie w acetonie prowadzono tylko przez 20 min, a wytrącone białko przepłukiwano jedynie 1 x 400 µl 80% (v/v) acetonu przez 10-15 min. Próbki białek rozpuszczano następnie w 10 µl H₂O i 10 µl buforu próbki o składzie: 20% (v/v) glicerol oraz 0.0025% (w/v) BPB w 0.25 M Tris/Cl⁻ pH 6.8. Przed nałożeniem na żel próbek nie gotowano. Do elektroforezy niedenaturującej stosowano zestaw standardów „Molecular Weight Markers for Non-Denaturing Electrophoresis” (Sigma), w skład którego wchodziły następujące białka:

α-laktoalbumina		14.2 kDa
anhydraza węglanowa		29.0 kDa
albumina z jaja kurzego		45.0 kDa
albumina z surowicy wołowej	monomer	66.0 kDa
	dimer	132 kDa
ureaza	trimer	272 kDa
	heksamer	545 kDa

Masy cząsteczkowe standardów oraz badanych białek wyznaczano stosując procedurę opisaną przez producenta.

Po zakończeniu elektroforezy żele rozcinano na dwie części. Pierwszą zawierającą mieszaninę standardów barwiono CBB. Drugą część ze ścieżkami badanego białka poddawano wybarwianiu specyficznemu dla IGG.

3.5.4. Ogniskowanie izoelektryczne (IEF)

Ogniskowanie izoelektryczne białek prowadzono w 10% żelach poliakryloamidowych o następującym składzie: 9.5% (w/v) akryloamid, 0.5% (w/v) bisakryloamid, 10% (v/v) glicerol,

Przed nałożeniem próbek, zale podważano przedkolumnę przez 30' przy natężeniu prądu 0 mA/zet. Kolumnę białek rozpuszczono przy 12 mA/zet, a po wejściu białek w zol metodą podwyższonego natężenia maksymalnie do 25 mA/zet. Rozdzielono białka wydziwino CBB lub metodą zmienną.

3.2.3. Elektrofoza w zolu poliakrylamidowym w warunkach niedenaturujących

Białka w warunkach niedenaturujących prowadzone w warunkach identycznych jak opisano w rozdziale 3.2.2., z tym, że zmienną zale, jak i bufor elektrody prowadzone były SDS. Podobnie była również procedura zagęszczania próbek białek, jednak wytrącenie osadzie prowadzone było przez 30 min, a wytrącone białko przechowywano jedynie 1 x 400 ul 80% (v/v) acetonu przez 10-15 min. Półki białek rozpuszczano następnie w 10 ul H₂O i 10 ul buforu próbek o składzie: 20% (v/v) glicol i 0.0025% (w/v) BPH w 0.25 M TrisCl, pH 6.8. Przed nałożeniem na zol próbek nie gotowano. Do elektrofozy niedenaturującej stosowano zestaw standardów „Molecular Weight Marker for Non-Denaturing Electrophoresis” (Sigma), w skład którego wchodziły następujące białka:

14.5 kDa	α-laktalbumina
29.0 kDa	anhydrata węglinowa
45.0 kDa	albumina z jaja kurzego
66.0 kDa	albumina z serowicy wołowej
102 kDa	dimery
172 kDa	trimer
242 kDa	tetramer

Mamy częściowo standardów oraz badanych białek wyznaczano stosując procedury opisane przez producenta.

Po zakończeniu elektrofozy zale roztoczono w dwu części. Pierwszą zawieszając następnie standardów barwion CBB. Drugą część ze skłótkami badanego białka podważano wydziwino rozpuszczono do 100.

3.2.4. Oznaczenie izoelektryczne (IEF)

Oznaczenie izoelektryczne białek prowadzono w 10% zolu poliakrylamidowym o następującym składzie: 0.2% (w/v) akrylamid, 0.2% (w/v) bisakrylamid, 10% (v/v) glicol.

2% (v/v) Ampholyte, pH 3-10, 0.05% (w/v) $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ i 0.075% (v/v) TEMED. Elektroforezę wykonywano na żelach typu „mini” w aparacie do elektroforez horyzontalnych, skonstruowanym w IChB PAN. Próbki białek, przygotowywane jak w rozdziale 3.5.3., rozpuszczano w 15 μl 5 mM buforu NaOAc, pH 5.0. Jako markery pI wykorzystano mieszaninę białek „Protein Test Mixture for pI Determination, pH 3-10” (Serva), z której pobierano 10 μl i uzupełniano 5 μl 5 mM buforu NaOAc, pH 5.0. W skład mieszaniny standardów wchodziły następujące białka:

cytochrom C	pI 10.65
rybonukleaza A	pI 9.45
lektyna z soczewicy jadalnej	pI 7.75/8.00/8.30
mioglobina	pI 6.90/7.35
anhydraza węglanowa	pI 6.00
β -laktoglobulina	pI 5.15/5.30
inhibitor tripsyny z soi	pI 4.50
oksydaza glukozy	pI 4.20
amyloglukozydaza	pI 3.50

Próbki białek i standardy nakładano na kwadraciki bibuły (5 x 5 mm) Whatman 3MM umieszczone bezpośrednio na żelu. Jako bufor elektrodowy wykorzystywano 10 mM H_3PO_4 i 20 mM NaOH. Ogniskowanie prowadzono początkowo przy napięciu 100 V. Po 30 min zdejmowano bibułki i białka ogniskowano przez 3.5 h przy 150 V. Po zakończeniu elektroforezy, żełe dzielono na dwie części i wybarwiano tak, jak to opisano w rozdziale 3.5.3. Żele przeznaczone do barwienia CBB, inkubowano przez 30 min w mieszaninie 0.7 M TCA/0.13 M kwas sulfosalicylowy dla odmycia amfolin.

3.5.5. Techniki barwienia żeli

3.5.5.1. Wybarwianie rozdzielonych elektroforetycznie białek

Stosowano dwie metody barwienia:

- Barwienie mieszaniną CBB:

Żele inkubowano 45 min w mieszaninie zawierającej 0.1% (w/v) CBB w 10% (v/v) HOAc/20% (v/v) MeOH. Do odmycia niezwiązanego z białkiem CBB stosowano 10% (v/v) HOAc/20% (v/v) MeOH.

200 (w/v) Amalgam, pH 7-10, 0,05% (w/v) (NH₄)₂S₂O₈ i 0,05% (w/v) (NH₄)₂SO₄.
Kluczony wywołano na suchy preparat, który w sposób doświadczeniowy wywołano w
składowym w KCB PAM. Trójka kłosa przygotowywane jak w rozdziale 2.2.1.
rozpuszczono w 12 ml 2 mM buforu NaOAc, pH 5,0. Jako metody ni wywołania
niezależnie bufor „Protein Test Buffer” dla Determination, pH 7,0. Preparat z kłosa
podano 10 ml i uzupełniono 2 ml 2 mM buforu NaOAc, pH 5,0. W celu uzyskania
standardów urobiono następujące bufora:

cytolizyn C	ml 10,85
tybomaks A	ml 9,45
leżak z sekwencyjną	ml 7,75 & 0,008 30
minidol	ml 6,90 & 35
antyzak rybowy	ml 6,00
β-laktoglobulin	ml 5,15 & 30
inhibitor rybowy z witi	ml 4,50
olejowa guma	ml 4,20
antylizyn	ml 3,50

Probi i kłosa i wodoru azotan na kłosa i kłosa (2 x 2 mg) w 10 ml wody.
umieszczono w pojemniku na suchy jako buty i kłosa wywołano w 10 ml wody
i 20 ml NaOH. Oczyszczono preparatem oczyszczono przy pomocy 100 ml 0,1 M
roztworu probi i kłosa opiszono przez 3,5 h przy 100 °C. Po zakończeniu
kłosa, kłosa kłosa na dwie części i wywołano tak, jak to opisano w rozdziale
2.2.1. Zale powstano do badania CBB. Inokulowano przez 30 min w temperaturze 37 °C
TC-10 13 M kwas octowy dla otrzymania kłosa.

2.2.3. Technika badania kłosa

2.2.3.1. Wydzielanie rozkładających elektrolitów z kłosa

Stosowano dwie metody badania:

- Badanie mieszanki CBB.

Zale inokulowano 42 min w mieszaninie zawierającej 0,1% (w/v) CBB w 10% (w/v)
HOAc 20% (v/v) MeOH. Do omnia otrzymanego z kłosa CBB stosowano 10%
(w/v) HOAc 20% (v/v) MeOH.

- Barwienie srebrem:

Żele przemywano 3 x 30 min w 50% (v/v) MeOH. Następnie żele inkubowano w mieszaninie o składzie: 0.076% (w/v) NaOH, 0.35% (w/v) NH₃ oraz 0.4% (w/v) AgNO₃, przez 20 min. Po kilkukrotnym przepłukaniu wodą, żele umieszczano w roztworze wywołującym: 0.02% (w/v) formaldehyd i 0.005% (w/v) kwas cytrynowy. Wybarwienie zatrzymywano 50% (v/v) MeOH. Żele przechowywano w 20% (v/v) MeOH.

3.5.5.2. Barwienie aktywności enzymatycznej IGG

Stosowano dwie techniki barwienia aktywności enzymatycznej IGG, wykorzystujące dwa różne substraty:

- β -D-glukopyranozyd 6-bromo-2-naftolu

Barwienie wykonywano wg opisu podanego przez Lowenstein Spielman i Mowshowitz dla α -glukozydazy (1982). Żele płukano przez 5 min w 50 mM buforze NaOAc, pH 5.0, a następnie inkubowano przez 5 min w 1 mM EDTA w tym samym buforze. Przygotowywano 0.25 ml 1% (w/v) β -D-glukopyranozydu 6-bromo-2-naftolu w DMSO oraz 4.75 ml 50 mM buforze NaOAc pH 5.0 zawierającego 0.2% (w/v) Fast Blue B i 1 mM EDTA. Oba roztwory łączono, a powstałą mieszaniną spryskiwano żel i pozostawiano do wybarwienia.

- β -D-glukopyranozyd 4-metylumbelliferonu (MUG)

Barwienie wykonywano wg opisu podanego przez Hösel i Barza (1975). Żele płukano przez 5 min w 50 mM buforze NaOAc, pH 5.0, a następnie inkubowano przez 15 min w 0.02 mM MUG w tym samym buforze. Po zakończeniu inkubacji żele oglądano pod lampą UV przy długości fali 366 nm.

3.5.6. Oznaczanie masy cząsteczkowej natywnego enzymu – sączenie żelowe

Masę cząsteczkową białka oznaczano stosując sączenie żelowe na kolumnie z Sephacryl S-200 HR (1.5 cm x 25 cm). Martwą objętość kolumny określano stosując Dextran blue 2000. Kolumnę kalibrowano nanosząc na nią mieszaninę następujących białek: cytochrom C (12.3 kDa), anhydraza węglanowa (29 kDa), BSA (66 kDa) oraz katalaza (240 kDa). Elucję prowadzono 0.1 M buforem NaOAc pH 5.0, zbierano frakcje 0.5 ml i określano w nich ilość białka (A₂₈₀). Na wykalibrowaną kolumnę nanoszono 300 μ l preparatu IGG otrzymanego po częściowym oczyszczeniu na kolumnie z CM-celulozą lub płynu z przestworów

• **Badanie szkieletu**

Zaśnięto 3 x 30 min w 50% (w/v) MeOH. Następnie zaś inkubowano w mieszaninie o składzie: 0,5% (w/v) NaOH, 0,3% (w/v) NaCl oraz 0,4% (w/v) AgNO₃ przez 30 min. Po kilkunastu godzinach wodę zalewano w roztworze wywołującym 0,02% (w/v) formaldehyd i 0,02% (w/v) kwas octowy. Wybarwienie uzyskano 20% (w/v) MeOH. Zaśnięto w 30% (w/v) MeOH.

3.5.2. **Badanie siły wiązki enzymatycznej IGG**

Stosowano dwie techniki badania siły wiązki enzymatycznej IGG wykazujące

dwa różne substraty:

• **β-D-galaktosydoz 6-bromo-2-nafol**

Badanie wykonano wg opisu podanego przez Lowenthal [2] i Mieschowitz dla α-galaktazy (1987). Zaśnięto przez 3 min w 50 mM buforze NaOAc, pH 2,0, a następnie inkubowano przez 5 min w 1 mM EDTA w tym samym buforze. Przygotowano 0,25 ml 1% (w/v) β-D-galaktosydoz 6-bromo-2-nafolu w DMSO oraz 4,75 ml 50 mM bufora NaOAc, pH 2,0 zawierającego 0,2% (w/v) Fast Blue B i 1 mM EDTA. Oba roztwory łączono a powstała mieszanina ekspozycja została pozostawiona do wybarwienia.

• **β-D-galaktosydoz 4-metyloumbeliferon (MUB)**

Badanie wykonano wg opisu podanego przez Hórisz i Barcs (1972). Zaśnięto przez 5 min w 50 mM buforze NaOAc, pH 2,0, a następnie inkubowano przez 15 min w 0,02 mM MUB w tym samym buforze. Po zakończeniu inkubacji zaś oglądano pod lampą UV przy długości fali 366 nm.

3.5.6. **Oznaczanie masy cząsteczkowej najcięższego enzymu - szkieletu**

Masę cząsteczkową białka oznaczano metodą szkieletu na kolumnie z Sepharose 2-300 HR (1,2 cm x 25 cm). Metoda opierała się na rozdzielaniu roztworu białka (200 μl) kolumną kalibrowaną roztworami nie zawierającymi reagujących dialekt: glicerolem C (12,3 kDa), miedzią węgelną (29 kDa), BSA (66 kDa) oraz kazeiną (240 kDa). Elucja prowadzono 0,1 M buforem NaOAc, pH 2,0, z dodatkiem frakcji 0,5 M i odczynnika w nich ilość białka (A₂₈₀). Na wykalibrowanej kolumnie osadzono 300 μl roztworu IGG otrzymanego po częściowym oczyszczeniu na kolumnie z CM-cellulose lub płynu z przetworu

międzykomórkowych korzenia. Elucję prowadzono tak, jak dla mieszaniny standardów, w zebranych frakcjach oprócz ilości białka (A_{280}), określano też aktywność IGG w teście z *p*NPG (Rozdz. 3.6.1.).

3.6. OKREŚLANIE AKTYWNOŚCI ENZYMATYCZNEJ IGG

3.6.1. Pomiar ilości uwolnionego *p*-nitrofenolu

Do rutynowego oznaczania aktywności IGG stosowano test kolorymetryczny z użyciem β -D-glukozydu *p*-nitrofenolu jako substratu. Reakcje prowadzono przez 10 min w temp. 50°C w mieszaninie reakcyjnej (1 ml) zawierającej 0.1 M buforu NaOAc pH 5.0, 0.25 mM *p*NPG oraz określoną ilość białka (najczęściej 10 μ g). Reakcję zatrzymywano 1 ml 1 M Na_2CO_3 . Ilość uwolnionego *p*-nitrofenolu określano przez pomiar spektrofotometryczny przy długości fali 405 nm, odnosząc uzyskane wyniki do krzywej kalibracyjnej wykonanej dla roztworów *p*-nitrofenolu w zakresie 5-300 μ M. Na podstawie uzyskanych wyników obliczano aktywność enzymu. Jednostka aktywności β -glukozydazy została określona jako ilość enzymu katalizująca uwolnienie 1 μ mola *p*-nitrofenolu w ciągu 1 min w standardowych warunkach reakcji.

3.6.2. Pomiar ilości uwolnionej genisteiny

W niektórych przypadkach pomiaru aktywności IGG dokonywano wobec jej naturalnego substratu – genistyny (7-O- β -glukozydu genisteiny). Test prowadzono przez 1 h w temp. 50°C w mieszaninie reakcyjnej (1 ml) zawierającej 0.1 M bufor NaOAc pH 5.0, przy stężeniu genistyny 30 μ M oraz określoną ilość białka. Reakcję zatrzymywano przez dodanie 1.5 ml EtOAc i ekstrakcję związków fenolowych. Wytrząsanie z 1.5-ml porcją EtOAc powtarzano jeszcze raz. Połączone warstwy organiczne odparowywano do sucha w strumieniu N_2 , a następnie rozpuszczano w 0.5 ml MeOH i poddawano rozdzielności TLC na płytkach z żelem krzemionkowym, stosując jako fazę ruchomą mieszaninę CHCl_3 -MeOH- H_2O (40:10:1, v/v/v). Wykorzystując zjawisko wygaszania fluorescencji przez związki fenolowe wykonywano pomiary densytometryczne intensywności plamek flawonoidów przy użyciu systemu UVP 2000 Gel Analysis Software. Pomiary te umożliwiły analizę ilościową związków fenolowych w badanych próbkach poprzez odniesienie do krzywej wzorcowej wyznaczonej dla 0.1-10 nmoli genisteiny.

w niedokreślonych korzeni. Badanie przeprowadza się tak jak dla mieszaniny standardów w robionych ilościach odczynników (A₂₀), określano też aktywność IGG w cieczy z pNBG (Rozdz. 3.6.1.).

3.6. OKREŚLANIE AKTYWNOŚCI EKSTRAKCYJNEJ IGG

3.6.1. Pomiar ilości uwolnionego p-nitrofenolu

Do przygotowanego odczynnika aktywności IGG stosowano test kolorymetryczny z użyciem β-D-glukozylu p-nitrofenolu jako substratu. Reakcję prowadzono przez 10 min w temp. 30°C w mieszaninie reakcyjnej (1 ml) zawierającej 0.1 M bufor NaOAc pH 5.0, 0.25 mM pNBG oraz określony ilość białka (najczęściej 10 µg). Reakcję zatrzymywano 1 ml 1 M Na₂CO₃ ilość uwolnionego p-nitrofenolu określano przez pomiar spektrofotometryczny przy długości fali 405 nm, odczytanie uzyskane wznosi do krzywej kalibracyjnej wykonanej dla rozkładów p-nitrofenolu w zakresie 5-300 µM. Na podstawie uzyskanych wyników obliczono aktywność enzymu. Jednostka aktywności β-glukosylazę została określona jako ilość czynnika katalizującego uwolnienie 1 pmola p-nitrofenolu w ciągu 1 min w standardowych warunkach reakcji.

3.6.2. Pomiar ilości uwolnionej glicyny

W niektórych przypadkach pomiar aktywności IGG dokonywano wobec tej naturalnego substratu - glicyny (7-O-β-glukozylu glicyny). Test prowadzono przez 1 h w temp. 30°C w mieszaninie reakcyjnej (1 ml) zawierającej 0.1 M bufor NaOAc pH 5.0, przy stężeniu glicyny 30 µM oraz określony ilość białka. Reakcję zatrzymywano przez dodanie 1.2 ml EtOAc i ekstrahując związków fenolowych. Wyciąganie z 1.2-ml porcji EtOAc powtarzano jeszcze raz. Połączone warstwy organiczne odparowywano do sucha w strumieniu N₂ a następnie rozpuszczano w 0.2 ml MeOH i poddawano rozdzielowi TLC na płytce z żelazem krzemionkowym, stosując jako fazę ruchomą mieszaninę CHCl₃-MeOH-H₂O (40:10:1, v/v/v). Wykorzystując światło wyciążone fluorescencją przez zwizki fenolowe wykorzystywano pomiar densytometryczny intensywności plamek fenolonoidów przy użyciu systemu UVF 2000 Gel Analysis Software. Pomiaru ze umożliwily analizę ilościową związków fenolowych w badanych próbkach poprzez odniesienie do krzywej wzorcowej wykonanej dla 0.1-10 nmoli glicyny.

3.6.3 Pomiar ilości uwolnionego cukru

Dla niektórych substratów użytych do określenia specyficzności substratowej IGG, oznaczano ilość uwolnionej w wyniku hydrolizy glukozy, stosując test na cukry redukujące (Chaplin, 1986). Do 200 μ l próbki po teście enzymatycznym dodawano 400 μ l roztworu zawierającego 4% (w/v) Na_2CO_3 , 1.6% (w/v) glicyny i 0.045% (w/v) $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ oraz 400 μ l 0.15% (w/v) chlorowodoru neokupreiny. Mieszaninę wstawiano na 12 min do łaźni wodnej o temp. 100°C. Po wyjęciu z łaźni próbki schładzano, dodawano do każdej 1 ml wody i mierzono absorbancję przy długości fali 450 nm. Na podstawie otrzymanych wyników obliczano ilość cukru przez porównanie z krzywą wzorcową wykonaną dla 0.1-2 μ g glukozy.

3.6.4. Oznaczanie specyficzności substratowej IGG

Do badania specyficzności substratowej używano preparat IGG otrzymany po częściowym oczyszczeniu na kolumnie z CM-celulozą. Optimum pH aktywności IGG wyznaczano mierząc ilość uwolnionego *p*-nitrofenolu w mieszaninach reakcyjnych o różnym pH. Do testów użyto buforów: 0.1 M Gly/Cl⁻ w zakresie pH 2.5-3.5, 0.1 M kwas bursztynowy/NaOH pH 4.0, 0.1 M NaOAc w zakresie pH 4.5-5.5 i 0.1 M bufor Tris/Cl⁻ w zakresie pH 6.0-9.0.

Specyficzność substratową IGG określono analizując zdolność enzymu do hydrolizy następujących substratów: genistyny, ramnoglukozydu apigeniny, narynginy, arbutyny, salicyny, *p*NPG, gentobiozy, celobiozy, trehalozy, rafinozy i sacharozy. Reakcje hydrolizy, przy stałej ilości enzymu, prowadzono dla różnych stężeń substratów w zakresie 0.1-50 mM w mieszaninie reakcyjnej (1 ml) zawierającej także 0.1 M bufor NaOAc pH 5.0. Próbkę inkubowano 1 h w temp. 50°C. Dla 4',7-O- β -diglukozydu genisteiny (0.25 mM) analizowano również przebieg reakcji hydrolizy w czasie 10 – 120 min. Wszystkie analizy powtarzano co najmniej 2-krotnie.

Do określenia ilości uwolnionych produktów stosowano trzy różne metody:

- dla *p*NPG określano ilość uwolnionego *p*-nitrofenolu (Rozdz. 3.6.1.)
- dla genistyny, narynginy, ramnoglukozydu apigeniny i diglukozydu genisteiny określano ilość uwolnionego aglikonu (Rozdz. 3.6.2.)
- dla pozostałych substratów określano ilość uwolnionej w wyniku hydrolizy glukozy (Rozdz. 3.6.3.)

3.6.3 Pomiar ilości uwolnionej cukru

Dla niektórych substratów uzyskich do określenia specyficzności substratów IGG otrzymano ilość uwolnionej w wyniku hydrolizy glukozy, stosując test na cukry redukujące (Chaplin, 1986). Do 200 µl próbki po dokładnym zmieszaniu dodawano 400 µl roztworu zawierającego 4% (w/v) Na_2CO_3 , 1.5% (w/v) glukozy i 0.043M (w/v) $\text{CuSO}_4 \cdot x \text{H}_2\text{O}$ oraz 400 µl 0.125M (w/v) chlorowodoru nasycony. Mieszankę warowano na 15 min do całkowitego odwodnienia i koloru próbki schładzano, dodawano do każdej 1 ml wody o temp. 100°C. Po wystąpieniu koloru próbki schładzano, dodawano do każdej 1 ml wody i kolorowo absorbując przy długości fali 450 nm. Na podstawie otrzymanych wyników obliczano ilość cukru uwolnionego z każdej próbki w stosunku do ilości glukozy.

3.6.4 Określenie specyficzności substratów IGG

Do badania specyficzności substratów używane preparaty IGG otrzymane po oczyszczeniu oczyszczenia za pomocą z CM-cellulose , Optimum pH aktywności IGG wyznaczano metodą ilościową uwolnienia p-aminofenolu w mieszaninach reakcyjnych o różnym pH. Do tego celu budowano 0.1 M DTPCT w zakresie pH 5.2-5.5, 0.1 M kwas fosforowy NaOH pH 4.0, 0.1 M NaOAc w zakresie pH 4.2-5.2 i 0.1 M bufor TrisCl w zakresie pH 6.9-8.0.

Specyficzność substratów IGG określano analizując zdolność enzymu do hydrolizy następujących substratów: gemicyny, ramnoglukozylu epigeniny, narynginy, wchłapy, solifony, pNPG, gentiozyny, celobiozy, celulozy, rafinozy i sacharozy. Reakcje hydrolizy przy stałej ilości enzymu prowadzono dla różnych stężeń substratów w zakresie 0.1-50 mM w mieszaninie reakcyjnej (1 ml) zawierającej także 0.1 M bufor NaOAc pH 5.0. Probki inkubowano 1 h w temp. 30°C. Dla 4',7-O-β-digalaktosylu gentiozyny (0.25 mM) analizowano również przekrój reakcji hydrolizy w czasie 10 - 150 min. Wszystkie analizy powtarzano co najmniej 3-кратно.

Do określenia ilości uwolnionych produktów stosowano trzy różne metody:

- * dla pNPG określano ilość uwolnionego p-aminofenolu (Rozdz. 3.6.1.);
- * dla gemicyny, narynginy, ramnoglukozylu epigeniny i digalaktosylu gentiozyny określano ilość uwolnionego aldehydu (Rozdz. 3.6.2.);
- * dla pozostałych substratów określano ilość uwolnionej w wyniku hydrolizy glukozy (Rozdz. 3.6.3.).

Uzyskane wyniki ilościowe były wykorzystane do obliczenia K_M i V_{max} enzymu dla poszczególnych substratów. Obliczenia wykonano używając programu komputerowego EZ-FIT.

3.6.5. Oznaczenie aktywności hydrolitycznej IGG wobec polisacharydów ścian komórkowych

Preparat ścian komórkowych uzyskiwano z osadu pozostałego po ekstrakcji białek ścian komórkowych z korzeni łubinu białego. Osad umieszczano na sączku z bibuły na lejku Büchnera i przemywano (5 ml/1 g) dwukrotnie 80% (v/v) acetonem w wodzie, dwukrotnie mieszaniną $CHCl_3 - MeOH$ (1:1, v/v) i dwukrotnie acetonem. Po osuszeniu oczyszczone ściany komórkowe przechowywano w eksykatorze próżniowym nad P_2O_5 w temp. pokojowej.

Do testu enzymatycznego używano 12 mg ścian komórkowych. Zawieszono je w 1 ml wody na 15 min. Po odwirowaniu przy 3500 g przez 5 min, osad ponownie zawieszano w wodzie i odwirowano. Uwodnione ściany komórkowe zawieszano dwukrotnie w 50% (v/v) acetonie i wirowano tak jak poprzednio. Tak przygotowane ściany komórkowe zostały zawieszane w 4 ml 0.1 M buforu NaOAc, pH 5.0, do którego dodano białka ze ścian komórkowych korzeni (20 μ g) lub 200 μ l świeżo przygotowanego IWF z korzeni łubinu. Próba kontrolna nie zawierała preparatu białka. Każdy zestaw eksperymentalny przygotowywano w 2 powtórzeniach. Próby inkubowano w temp. 37°C przez 24 h. W określonych odstępach czasu pobierano próbki o objętości 200 μ l, które zamrażano. Po zakończeniu testu we wszystkich próbach oznaczono ilość uwolnionych reszt glukozy stosując test na cukry redukujące (Rozdz. 3.6.3.). Absorbancję próbek z preparatem białka mierzono w stosunku do odpowiednich próbek kontrolnych.

3.7. IZOLACJA I CHARAKTERYSTYKA ZWIĄZKÓW FENOLOWYCH

3.7.1. Ekstrakcja związków fenolowych z tkanek roślinnych

Materiał roślinny homogenizowano w móżdzierzu w 80% (v/v) MeOH (3 ml/g św. m.) Związki fenolowe ekstrahowano w łaźni ultradźwiękowej przez 30 min. Następnie mieszaninę sączono na sączku z bibuły na lejku ze spiekim. Osad przemywano dodatkowo 10 ml MeOH, przesącze łączono. Mieszaninę związków organicznych zagęszczano na wyparce próżniowej w temp. 40°C do pozostałości wodnej. Dalszą izolację związków fenolowych w zależności od potrzeb wykonywano przy użyciu jednej z dwóch metod.

Uśredniona wartość iloczynowa była wykorzystana do obliczenia K_{12} i V_{max} enzymu dla poszczególnych substratów. Obliczenia wykonano używając programu komputerowego EXFIT.

3.6.3. Oczyszczenie aktywności hydrolytycznej IGG wobec polisacharydów ścian komórkowych

Preparat ścian komórkowych uzyskano z osadu pozostałego po ekstrakcji dializ ścian komórkowych z korzeni jabłoni białej. Osad umieszczono na szkielet z fibryli na tleko Biotana i przemywano (2 ml) gę dwukrotnie 80% (v/v) acetatem w wodzie, dwukrotnie metanolem (CH₃OH) - MeOH (1:1, v/v) i dwukrotnie acetatem. Po osuszeniu oczyszczono ściany komórkowe przechowywano w czystym 0,1 M NaOH (1:1, v/v) w temp. pokojowej. Do testu enzymatycznego używano 12 mg ścian komórkowych. Zawieszono je w 1 ml wody na 12 min. Po odwirowaniu przy 3500 g przez 5 min, osad ponownie zawieszono w wodzie i odwirowano. Uwodniono ściany komórkowe zawieszono dwukrotnie w 80% (v/v) acetacie i ponownie tak jak poprzednio. Tak przygotowane ściany komórkowe zostały zawieszono w 4 ml 0,1 M buforu NaOAc, pH 5,0, do którego dodano białka ze ścian komórkowych korzeni (20 µg) lub 200 µl świeżo przygotowanego TWP z korzeni jabłoni. Próba kontrolna nie zawierała preparatu białka. Każdy zestaw eksperymentalny przygotowywano w 2 powtórzeniach. Próby inkubowano w temp. 37°C przez 24 h. W określonych odstępach czasu pobierano próbki o objętości 200 µl, które zamrazano. Po zakończeniu testu we wszystkich próbach oznaczano ilość uwolnionych resztek glukozy stosując test na czuły reduktujący (Bardal, 2003). Absorbancję próbek z preparatem białka mierzono w stosunku do odpowiednich próbek kontrolnych.

3.7. IZOLACJA I CHARAKTERYSTYKA ZWIĄZKÓW FENOLOWYCH

3.7.1. Ekstrakcja związków fenolowych z tkanek roślinnych

Materiał roślinny homogenizowano w moździerzu w 80% (v/v) MeOH (2 ml/g śwież. m.). Związki fenolowe ekstrahowano w letniej ultradźwiękowej przez 30 min. Następnie mieszaninę przefiltrowano na szkielet z fibryli na tleko Biotana. Osad przemywano dodatkowo 10 ml MeOH, przefiltrowano. Mieszaninę związków organicznych zagęszczono na wyciąg próżniowy w temp. 40°C do pozostałości wodnej. Dalej izolację związków fenolowych w zależności od potrzeb wykonywano przy użyciu jednej z dwóch metod.

W pierwszej z nich otrzymaną próbę ekstrahowano dwukrotnie EtOAc w proporcji 1:1 (v/v). Uzyskany ekstrakt związków organicznych odparowywano do sucha na wyparce próżniowej i przechowywano w -20°C do dalszych analiz.

Druga metoda oparta była o technikę ekstrakcji do fazy stałej. Próbkę wodną odpowiadającą 2 g św. m. tkanki przepuszczano przez układ dwóch kolumnienek, z których pierwsza zawierała 700 mg SCX, a druga 500 mg RP-C18. Obie kolumnienki wcześniej aktywowano, przemywając każdą z nich kolejno 5 ml MeOH i 5 ml H_2O . Do SCX wiązały się alkaloidy oraz w sposób niespecyficzny niewielka ilość związków fenolowych, do RP-C18 wiązały się pozostałe związki fenolowe. Po przepuszczeniu próby obie kolumnienki rozłączano, przemywano 5 ml H_2O , a następnie związki fenolowe wymywano z każdej z kolumnienek 5 ml MeOH. Frakcje metanolowe łączono i odparowywano do sucha na wyparce próżniowej, tak przygotowane próbki przechowywano w -20°C do dalszych analiz.

3.7.2. Izolacja związków fenolowych z przestworów międzykomórkowych

Izolację prowadzono metodą opisaną przez Hammond-Kosack (1992) dla uzyskania białek z przestworów międzykomórkowych. Rośliny infiltrowano 0.1 M buforem NaOAc pH 5.0 zawierającym 20% (v/v) EtOH. Uzyskane IWF ekstrahowano dwukrotnie EtOAc w proporcji 1:1 (v/v). Połączone warstwy organiczne odparowywano w strumieniu N_2 i przechowywano w -20°C do dalszych analiz.

3.7.3. Analiza związków fenolowych metodą chromatografii cienkowarstwowej

Związki fenolowe wyizolowane z różnych części roślin łubinu białego analizowano techniką TLC na płytkach pokrytych żelem krzemionkowym 60 F₂₅₄. Na płytkę наносzono 5-100 μl roztworu związków fenolowych. Mieszanki metabolitów wtórnych rozwijano w następujących fazach: $\text{CHCl}_3\text{-MeOH-H}_2\text{O}$ (40:10:1, v/v/v) lub $\text{CHCl}_3\text{-MeOH}$ (50:2, v/v). Po rozwinięciu i wysuszeniu płytki oglądano pod lampą UV przy długościach fali 254 i 366 nm. Dla potwierdzenia obecności związków fenolowych płytki wybarwiano odczynnikiem Gibbsa (0.2% (w/v) roztwór 2,6-dichlorochinono-4-chloroimidu w chloroformie) (Tahara 1984), który jest swoistym odczynnikiem grupowym dla tych metabolitów.

W pierwszej z nich otrzymuje się...
 (w/v) (15-główny składnik w...
 podziałowej i przestawiając...
 Druga metoda opiera się...
 odpowiadając 2 i 8w. m. (z...
 pierwsza zawiera 500 mg...
 aktywność przemyślan...
 alkaloidy oraz w sposób...
 wiązają się pozostałe...
 rozpuszczono, przefiltrowano 2...
 kolimację 2 ml MeOH. T...
 podziałowej, tak przygotowane...

3.7.2. Izolacja związków fenolowych...

Izolację prowadzono...
 plask z prędkością...
 pH 5.0 zawierającym 20%...
 proporcji 1:1 (w/v). Po...
 przechowywano w -20°C...

3.7.3. Analiza związków fenolowych...

Związki fenolowe...
 technika TLC na płytach...
 5-100 µl roztworu...
 nasyconych fazach...
 rozwinąć i wysuszyć...
 Dla potwierdzenia...
 (0,2%) roztwór 2,6-dibrom...
 który jest swoistym...

3.7.4. Analiza związków fenolowych metodą wysokorozdzielczej chromatografii ciekowej

Próbki ekstraktów związków fenolowych z wydzielin korzeniowych poddawano analizie jakościowej i ilościowej metodą wysokorozdzielczej chromatografii ciekowej (HPLC). Analizy prowadzono na zestawie firmy Merck-Hitachi (Niemcy-Japonia), w skład którego wchodziły: pompa L-7100 oraz detektor L-7450 rejestrujący widmo ciągłe w zakresie 210-400 nm. Rozdziały prowadzono na kolumnie Superspher 100 RP-18 (2 x 250 mm) firmy Merck (Niemcy), przy przepływie 0.2 ml/min. Jako fazy ruchome stosowano następujące dwie mieszaniny rozpuszczalników:

- A. acetonitryl - 95%, woda - 4.5%, HOAc - 0.5% (v/v/v)
- B. acetonitryl - 4.5%, woda - 95%, HOAc - 0.5% (v/v/v)

Analizy prowadzono w następującym gradiencie:

[min]	%A	%B
0	15	85
5	30	70
45	100	0
50	100	0
60	15	85

Eluowane z kolumny związki fenolowe identyfikowano przez porównanie czasów retencji i widm UV z analogicznymi danymi uzyskanymi dla substancji wzorcowych.

Integracji chromatogramów dokonywano przy długości fali 259 nm, stosując program D-7000 HSM firmy Merck-Hitachi (Niemcy-Japonia). Ilość poszczególnych związków fenolowych w próbkach określano jako stosunek powierzchni piku danego związku do powierzchni piku standardu wewnętrznego. Stosowanym standardem był kwas *p*-hydroksybenzoesowy w stężeniu 125 μ M.

3.7.4 Analiza związków fenolowych metodą wysokociśniskowej chromatografii cieczowej

Próby ekstraktów związków fenolowych z wydzielin korzeniowych poddawano analizie jądrowej i jądrowej metodą wysokociśniskowej chromatografii cieczowej (HPLC). Analizy prowadzono na rezewirze firmy Merck-Hitachi (Niemcy-Japonia) w skład którego wchodziły: pompa i -7100 oraz detektor UV-7420 (czujnikowy widmo ciągłe w zakresie 110-400 nm). Roztwórny prowadzono na kolumnie Superpore 100 RP-18 (2 x 250 mm) firmy Merck (Niemcy) przy przepływie 0,2 ml/min. Jako fazy ruchome stosowano następujące dawki mieszaniny rozpuszczalników:

- A. acetonitril - 92% woda - 4,2% HOAc - 0,2% (v/v/v)
- B. acetonitril - 4,2% woda - 92% HOAc - 0,2% (v/v/v)

Analizy prowadzono w temperaturze 30°C.

	FA	FB
0	10	85
5	30	70
10	100	0
20	100	0
80	10	85

Ekstrakty z kolumny zostały fenolowo utytlifikowane przez podważenie czasu retencji i widła UV z uwzględnieniem danych uzyskanych dla substancji wzorcowych.

Wyniki chromatogramów dokonywano przy długości fali 259 nm, stosując program D-7000 HSM firmy Merck-Hitachi (Niemcy-Japonia). Ilość porównawczych związków fenolowych w próbkach określano jako stosunek powierzchni piku danego związku do powierzchni piku standardu wzorcowego. Stosowanym standardem był kwas

2-hydroksybenzoesowy w stężeniu 12,5 µg/l.

4. WYNIKI

4.1. ASPEKTY METODYCZNE

4.1.1. Optymalizacja preparatyki IWF

Standardowo procedura wydzielania białek ścian komórkowych polega na ekstrakcji sekwencyjnej. Ze zhomogenizowanego materiału roślinnego najpierw izoluje się białka cytoplazmatyczne, a następnie z tej samej próbki ekstrahowane są białka związane oddziaływaniami jonowymi ze ścianami komórkowymi. Taka metodyka może jednak prowadzić do zanieczyszczenia frakcji białek ścian komórkowych białkami cytoplazmatycznymi. Dlatego też w celu jednoznacznego potwierdzenia lokalizacji białka w ścianach komórkowych do jego izolacji można wykorzystać metodę IWF.

Izolacja płynu międzykomórkowego jest alternatywnie stosowaną metodą otrzymywania białek ze ścian komórkowych. W jej wyniku otrzymuje się mniej białek niż podczas ekstrakcji, przy dobrze dobranych warunkach nie są one jednak zanieczyszczone białkami cytoplazmatycznymi. Zmieniając skład buforu używanego do infiltracji roślin można selektywnie ilościowo lub jakościowo wymywać białka w różny sposób oddziałujące ze ścianami komórkowymi.

Stopień czystości IWF ocenia się poprzez porównanie aktywności enzymatycznych markerów cytoplazmatycznych w IWF i w homogenatach tkanek. Do badań nad skutecznością metody IWF wybrano korzenie, ponieważ właśnie w nich, stosując ekstrakcję sekwencyjną (Rozdz. 4.3.1.), stwierdzono największą aktywność IGG związaną ze ścianami komórkowymi. Oznaczono aktywność następujących enzymów markerowych cytoplazmy: dehydrogenazy glukozy-6-fosforanowej, dehydrogenazy mleczanowej, fumarazy i dehydrogenazy jabłczanowej (MDH). Aktywność pierwszych trzech enzymów była znikoma w homogenatach korzeni, dlatego do określenia stopnia zanieczyszczenia IWF białkami pochodzenia cytoplazmatycznego wykorzystano jedynie MDH.

Kluczowym zagadnieniem niniejszej pracy jest kolokalizacja enzymu i jego substratów. Koniecznym było więc dobranie warunków otrzymywania IWF, które umożliwią izolację białek, a także wymycie związków fenolowych z apoplastu. Ponieważ przypuszczano, że badane białko związane jest jonowo ze ścianami komórkowymi, do jego izolacji wybrano 0.1 M NaOAc pH 5.0, zawierający 1 M NaCl. Bufor ten nie nadawał się jednak do izolacji izoflawonoidów, ponieważ związki te, a szczególnie ich wolne aglikony, słabo rozpuszczają

4.1. ASPEKTY METODYCZNE

4.1.1. Optymalizacja preparacji IWP

Standardowo procedura wydziałania białek ścian komórkowych polega na ekstrakcji sekwencyjnej. Na złożeniu zlokalizowanego materiału roślinnego najpierw izoluje się białka cytoplazmatyczne, a następnie z tej samej próbki ekstrakcyjne są białka związane oddziaływaniami jonowymi ze ścianami komórkowymi. Taka metoda może jednak prowadzić do zanieczyszczenia frakcji białek ścian komórkowych białkami cytoplazmatycznymi. Dlatego też w celu jednoczesnego powiększenia lokalizacji białka w ścianach komórkowych do jego izolacji można wykorzystać metodę IWP.

Isolacja białek mityochondriowych jest ułatwianiem stosując metodę otrzymania białek ze ścian komórkowych. W jej wyniku otrzymuje się mniej białek niż podczas ekstrakcji, gdyż dotyczy jedynie doświadczeń warunkach nie są one jednak zanieczyszczone białkami cytoplazmatycznymi. Zwiększenie siły buforu używanego do izolacji roślin można zwiększyć dodatkowo lub jakościowo wytworzyć białka w różny sposób oddziałujące ze ścianami komórkowymi.

Stopień czystości IWP ocenia się poprzez porównanie aktywności enzymatycznej markerów cytoplazmatycznych w IWP i w homogenizatach tkanek. Do badań nad skutecznością metody IWP wybrano białko, ponieważ właśnie w nich, stosując ekstrakcję sekwencyjną (Rozdz. 4.1.1), stwierdzono największą aktywność H₂O związaną ze ścianami komórkowymi. Oczekując aktywności markerów cytoplazmatycznych: dehydrogenazy glukozy-6-fosforanowej, dehydrogenazy mleczanowej, kinazy i dehydrogenazy jaskrawowej (MDH). Aktywność pierwszych trzech enzymów była znikoma w homogenizatach tkanek, dlatego do określenia stopnia zanieczyszczenia IWP białkami pochodzającymi cytoplazmatycznymi wykorzystano jedynie MDH.

Kluczowym zagadnieniem niniejszej pracy jest lokalizacja enzymu i jego substratów. Kluczowym jest więc dobrać odpowiednie warunki otrzymania IWP, które umożliwią izolację białek, a także wytworzyć związków fenolowych z epoksydów. Postawiamy przypuszczenie, że badane białko związane jest jonowo ze ścianami komórkowymi, do jego izolacji wybrano 0.1 M NaOAc pH 5.5, zawierający 1 M NaCl. Bufor ten nie nadawał się jednak do izolacji izolowanin, ponieważ związek ten, a szczególnie ich wolne aminy, słabo rozpuszczają

się w wodzie. Dlatego też badano zestaw buforów 0.1 M NaOAc zawierających 20, 30 lub 35% (v/v) EtOH, które, jako mniej polarne mogły być bardziej odpowiednie do wydzielania związków fenolowych. Pozostałe warunki otrzymywania IWF pozostawiono bez zmian.

Płyny międzykomórkowe uzyskiwano przy użyciu wybranych buforów, a homogenizację korzeni prowadzono w obecności buforu wcześniej użytego do infiltracji (Tab. 4.1). Aktywność MDH przeliczano bądź na μg białka, bądź na g świeżej masy korzeni. Ponieważ ilość wymytych białek zależy od składu buforu, słuszniejszym wydaje się przeliczanie aktywności enzymu na g św. m. gdyż można przyjąć, że średnio apoplast stanowi ten sam procent masy korzeni. Aktywność MDH w IWF stanowiła co najwyżej 0,3-1,5% całkowitej aktywności (Tab. 4.1.), co wydaje się być dobrym wskaźnikiem czystości IWF. Pamiętać również należy o tym, że aktywność MDH w płynach międzykomórkowych może wynikać nie tylko z zanieczyszczenia IWF białkami cytoplazmatycznymi, ale także z obecności MDH w ścianach komórkowych korzeni (Gross 1977). Potwierdza to eksperyment przeprowadzony w Pracowni Fitochemii, wykazujący, że egzogeny kwas jabłkowy stymuluje tworzenie H_2O_2 w 5-dniowych siewkach łubinu białego (Majewski 1999).

	Aktywność MDH [$\Delta A_{340}/\text{min}$]	
	na μg białka	na g świeżej masy korzenia
Homogenaty korzeni		
0.1 M NaOAc + 1M NaCl	0,090	49,1
0.1 M NaOAc + 20% EtOH	0,094	27,0
0.1 M NaOAc + 25% EtOH	0,060	20,3
0.1 M NaOAc + 30% EtOH	0,150	19,3
0.1 M NaOAc + 35% EtOH	0,044	11,0
IWF		
0.1 M NaOAc + 1 M NaCl	0,046	0,716
0.1 M NaOAc + 20% EtOH	0,004	0,068
0.1 M NaOAc + 25% EtOH	0	0
0.1 M NaOAc + 30% EtOH	0	0
0.1 M NaOAc + 35% EtOH	0	0

Tab. 4.1. Określenie stopnia czystości IWF. Aktywność dehydrogenazy jabłczanowej (MDH) w IWF i homogenatach korzeni otrzymanych przy użyciu różnych buforów infiltracyjnych.

Testy na aktywność MDH wykazały, że zastosowane bufory są odpowiednie do uzyskiwania czystych IWF. Należało jeszcze wykazać, że 0.1 M NaOAc z dodatkiem EtOH

się w wodzie. Dlatego też badano zestaw buforów 0,1 M NaOAc zawierających 10, 30 lub 50% (w/v) EtOH, które, jako małej pojemności, mogły być badane) odpowiednio do wydzielenia związków fenolowych. Poziostnie warunki otrzymania IWF pozostawiono bez zmian.

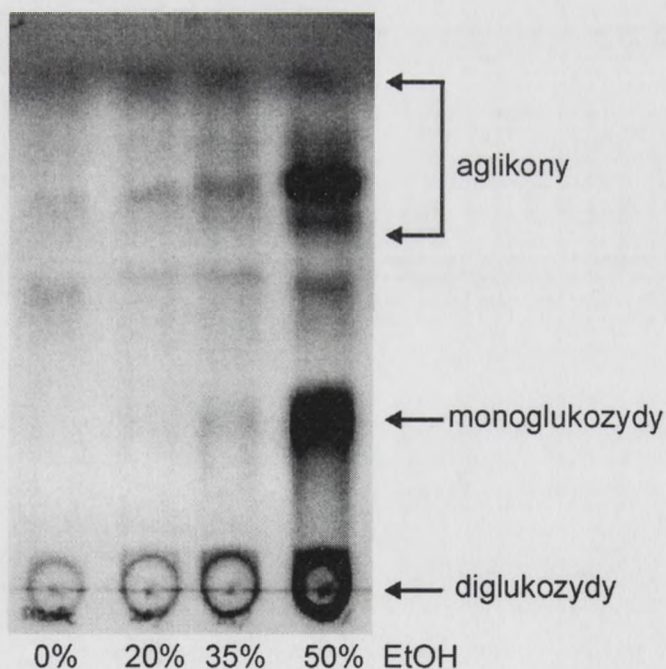
Przy metodach ekstrakcyjnych wykazano przy użyciu wyznaczonych buforów, a homogenizację komercyjną prowadzono w obecności buforu wcześniej ujętego do infuzji (Tab. 4.1). Aktywność MDH przeliczono jako μg białka, gdyż na g świeżej masy korzenia. Poziostnie ilość wyznaczonych buforów zależy od składu buforu, słuszejszym wydaje się przeliczenie aktywności enzymu na g su. m. gdyż można przeliczyć, że średnio spójność stanowi ten sam procent masy korzenia. Aktywność MDH w IWF stanowiła co najwyżej 0,3-1,2% całkowitej aktywności (Tab. 4.1), co wydaje się być dobrym wskaźnikiem czystości IWF. Ponadto również należy o tym, że aktywność MDH w płynach międzykomórkowych może wynikać nie tylko z zanieczyszczenia IWF białkami cytoplazmatycznymi, ale także z obecności MDH w tkankach komórkowych korzenia (Gross 1977). Poziostnie to ekspozycja przeprowadzona w Praceowni i Technice Wydziału, to oczyszczony kwas jabłkowy sprężony (tworzenie H_2O_2 w 3-dniowym zlewach indyko barwionym) (Migowski 1999).

Aktywność MDH [$\Delta\text{A}_{405}/\text{min}$]		Homogenizacja komercyjna
na g świeżej masy korzenia	na μg białka	
48,1	0,090	0,1 M NaOAc + 1M NaCl
27,0	0,004	0,1 M NaOAc + 20% EtOH
20,3	0,060	0,1 M NaOAc + 25% EtOH
19,3	0,130	0,1 M NaOAc + 30% EtOH
11,0	0,044	0,1 M NaOAc + 35% EtOH
IWF		
0,716	0,046	0,1 M NaOAc + 1 M NaCl
0,028	0,004	0,1 M NaOAc + 20% EtOH
0	0	0,1 M NaOAc + 25% EtOH
0	0	0,1 M NaOAc + 30% EtOH
0	0	0,1 M NaOAc + 35% EtOH

Tab. 4.1. Określenie stopnia czystości IWF. Aktywność dehydrogenazy jabłkowej (MDH) w IWF i homogenizacji komercyjnej otrzymanych przy użyciu różnych buforów w infuzji.

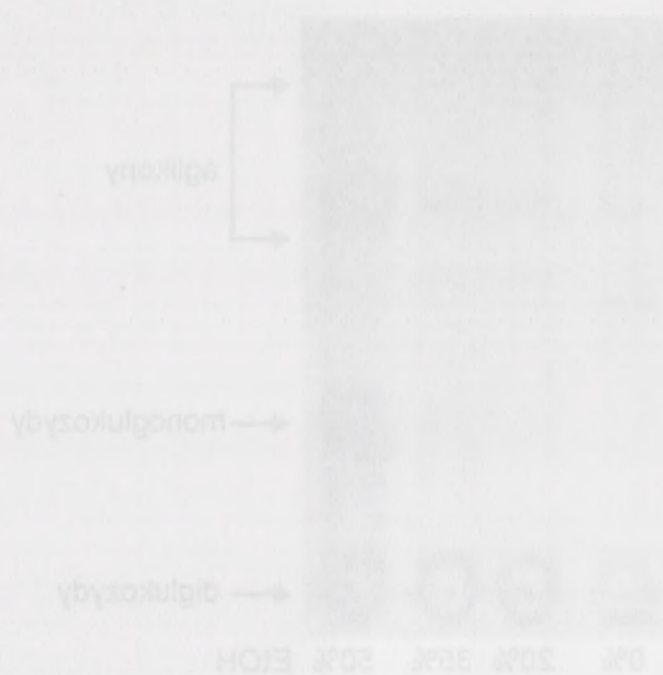
Testy na aktywność MDH wykazały, że zastosowane bufony są odpowiednie do oczyszczania czystości IWF. Najlepiej jeszcze wykazały, że 0,1 M NaOAc z dodatkiem EtOH

jest buforem odpowiednim do izolacji związków fenolowych z apoplastu. W tym celu przeprowadzono izolację IWF z korzeni stosując roztwory zawierające 0, 20, 35 lub 50% (v/v) EtOH. Z uzyskanych próbek wydzielono związki fenolowe, które poddano analizie metodą TLC (Rys. 4.1.). We wszystkich uzyskanych ekstraktach stwierdzono obecność izoflawonoidów. Wzrost stężenia EtOH w buforze użytym do infiltracji zwiększał stopień odzysku tych metabolitów. Gwałtowny wzrost zawartości izoflawonoidów w IWF uzyskanych po infiltracji 50% (v/v) EtOH jest prawdopodobnie efektem naruszenia integralności błon komórkowych i wydostania się związków fenolowych z wakuoli. Na podstawie tych wyników do dalszych doświadczeń wybrano 20% (v/v) EtOH. Dawał on zadawalający wynik ekstrakcji i jednocześnie nie wprowadzał ryzyka uszkodzenia ścian komórkowych rośliny, co wykazano w testach na aktywność MDH (Tab. 4.1.) i na co dodatkowo wskazują wyniki badań prowadzonych na fasoli przez Bolwella i współprac. (1998). Należy jednak pamiętać, że w takim roztworze lepiej rozpuszczają się glikozydy niż wolne aglikony, w wyniku czego, w ekstraktach można otrzymać nieco inny profil związków fenolowych niż występujący rzeczywiście w przestworach międzykomórkowych.



Rys. 4.1. Wpływ zawartości EtOH w buforze infiltracyjnym na izolację związków fenolowych z przestworów międzykomórkowych. Próbkę związków fenolowych uzyskanych metodą IWF z korzeni łubinu białego, przy zastosowaniu 0%, 20%, 35% lub 50% (v/v) EtOH w 0.1 M NaOAc pH 5.0, analizowano metodą TLC. Płytkę rozwijano w fazie $\text{CHCl}_3\text{-MeOH-H}_2\text{O}$ (40:10:1, v/v/v).

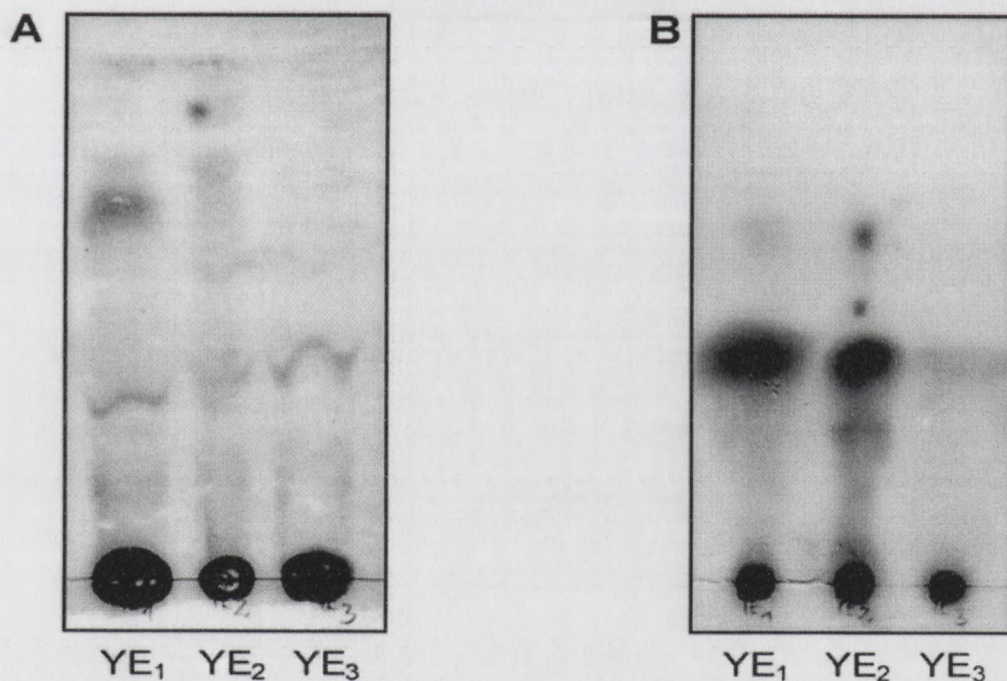
jest poziom odpowiedni do ilości związków fenolowych z epoksydów. W tym celu przeprowadzono reakcję EWT z kolumną osiową, rozpuszczając w niej 20% lub 50% (w/v) EtOH. Z uzyskanych próbek wyznaczono zawład fenolowe, które poddano analizie metodą T.L.C. (Rys. 4.1.). We wszystkich uzyskanych chromatogramach stwierdzono obecność izoflawnonoidów. Wartość rzędna EtOH w buforze użyty do infuzji zwiększa stopień objętości tych metabolitów. Oznacza to, że zawład izoflawnonoidów w EWT uzyskanych po infuzji 50% (v/v) EtOH jest prawdopodobnie większa niż zawład izoflawnonoidów w EWT uzyskanych po infuzji 20% (v/v) EtOH. Długość czasu infuzji nie ma wpływu na zawład izoflawnonoidów i wyznaczanie nie spowodowało większego wzrostu zawład izoflawnonoidów niż w przypadku infuzji 20% (v/v) EtOH. Długość czasu infuzji nie ma wpływu na zawład izoflawnonoidów i wyznaczanie nie spowodowało większego wzrostu zawład izoflawnonoidów niż w przypadku infuzji 20% (v/v) EtOH. Długość czasu infuzji nie ma wpływu na zawład izoflawnonoidów i wyznaczanie nie spowodowało większego wzrostu zawład izoflawnonoidów niż w przypadku infuzji 20% (v/v) EtOH. Długość czasu infuzji nie ma wpływu na zawład izoflawnonoidów i wyznaczanie nie spowodowało większego wzrostu zawład izoflawnonoidów niż w przypadku infuzji 20% (v/v) EtOH.



Rys. 4.1. Wpływ zawład EtOH w buforze infuzyjnym na izolację związków fenolowych z przetworów miodziożółtych. Próbkę związków fenolowych uzyskanych metodą EWT z kolumny osiowej, przy zawładaniu 0%, 20%, 30%, 50% (v/v) EtOH w 0.1 M NaOAc, poddano analizie metodą T.L.C. Próbkę rozważano w fazie EtOH-MeOH (40:10; v/v).

4.1.2. Przygotowanie i określenie aktywności preparatów elisytora ze ścian komórkowych drożdży

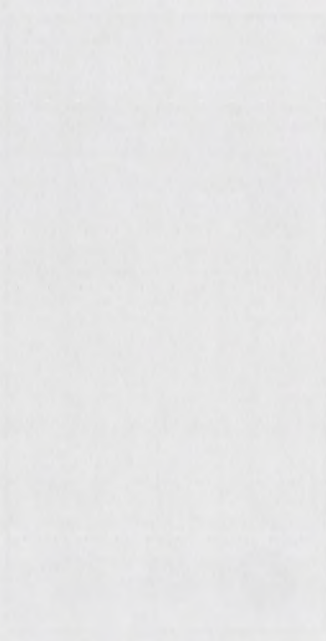
Reakcje obronne roślin można indukować wykorzystując krótkie fragmenty polimerów np. ścian komórkowych grzybów, zwane elisytorami. We wcześniejszych badaniach prowadzonych w Pracowni Fitochemii stosowano preparat elisytora z oczyszczonych ścian komórkowych drożdży (YE). Skład cukrowy i aminokwasowy tego preparatu (YE₁) został dość dobrze scharakteryzowany (Wojtaszek & Stobiecki 1997). Dla potrzeb niniejszej pracy przygotowano nowy preparat (YE₂), którego skład porównano z wcześniejszym preparatem przy pomocy techniki TLC (Rys. 4.2.). Dodatkowo analizie poddano preparat (YE₃), zagęszczany techniką ultrafiltracji, a nie na drodze zatężania pod obniżonym ciśnieniem, jak to miało miejsce w przypadku YE₁, YE₂.



Rys. 4.2. Porównanie profili cukrów i aminokwasów w trzech preparatach elisytora drożdżowego: YE₁ – scharakteryzowany przez Wojtaszka i Stobieckiego (1997), YE₂ – stosowany podczas doświadczeń opisanych w niniejszej pracy, YE₃ – uzyskany przy zastosowaniu zmodyfikowanej procedury. Próbkki YE analizowano metodą TLC. Płytki rozwijano w fazie izopropanol-EtOAc-H₂O (5:2:3, v/v/v) i wywoływano odczynnikami grupowymi: naftorezorcyną dla cukrów (A) lub ninhydriną dla aminokwasów (B).

Przeprowadzone analizy TLC (Rys. 4.2.) wykazały, że profil cukrów i aminokwasów w preparacie YE₂ podobny jest do składu preparatu określonego wcześniej przez Wojtaszka i Stobieckiego (1997). Można więc stwierdzić, że stosując tą samą metodykę, w kolejnych

The first objective of this study was to determine the prevalence of...
The second objective was to determine the prevalence of...
The third objective was to determine the prevalence of...
The fourth objective was to determine the prevalence of...
The fifth objective was to determine the prevalence of...



Results
Discussion
Conclusion

procedurach otrzymuje się elisytory o podobnym składzie aminokwasowym i cukrowym. Preparat YE₃ wykazywał nieco inny profil obu grup analizowanych związków. W roztworze tym praktycznie nie występowały niskocząsteczkowe oligosacharydy i wolne aminokwasy, których obecność stwierdzono w pozostałych dwóch preparatach. Różnicę tę można przypisać odmiennej technice zagęszczania YE.

Aktywność uzyskanego elisytora określano stosując testy liścieniowe (Hahn i współpr. 1992), podczas których na naciętą powierzchnię liścienia nanoszono roztwór elisytora. Po upływie określonego czasu liścienie przemywano wodą w celu zebrania związków fenolowych wydzielonych w miejscu zranienia. Pomiar absorbancji (A_{259}) uzyskanych w ten sposób dyfuzatów przyjęto za podstawę oceny aktywności preparatu YE. Długość fali $\lambda=259$ nm odpowiada maksimum absorpcji genisteiny i 2'-hydroksygenisteiny. Można przyjąć więc, że oznaczana wartość absorbancji była proporcjonalna do ilości izoflawonoidów w dyfuzatach.

Na podstawie testu przeprowadzonego dla różnych stężeń YE starano się określić optymalne stężenie preparatu do dalszych badań. Dla wszystkich zastosowanych stężeń YE zaobserwowano wzrost zawartości związków fenolowych w dyfuzatach w stosunku do kontroli negatywnej (H₂O) (Rys. 4.3.). Wzrost wydzielania związków fenolowych związany jest z uruchomieniem mechanizmów obronnych, dlatego też można stwierdzić, że otrzymany preparat YE wykazuje aktywność biologiczną. Zdecydowanie najsilniejszą odpowiedź uzyskano stosując roztwór elisytora w stężeniu 1000 $\mu\text{g/ml}$. W pozostałych przypadkach wydzielanie izoflawonoidów było wyraźnie mniejsze i zbliżone do wyniku uzyskanego dla 2 mM CuCl₂, który użyty był w doświadczeniu jako kontrola pozytywna (Wojtaszek & Stobiecki 1997).

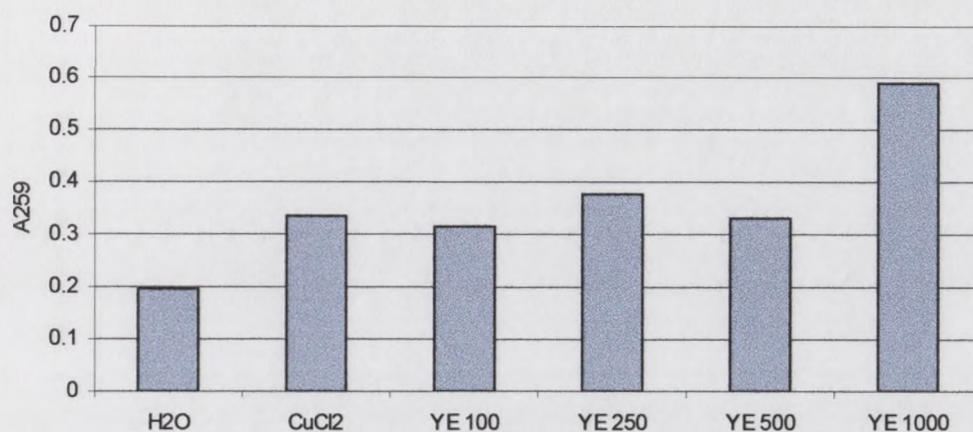
Na podstawie uzyskanych wyników do dalszych testów wybrano roztwory o stężeniach 250 oraz 1000 $\mu\text{g/ml}$. Zastosowanie pierwszego z nich wywołuje wyraźną reakcję obronną, która ulega wzmocnieniu w odpowiedzi na wyższe stężenie YE. Zachodzi jednak obawa, że tak wysokie stężenie elisytora może powodować dodatkowe efekty fizjologiczne (np. stres osmotyczny), które mogą zakłócić obserwowany obraz mechanizmów obronnych uruchomionych w roślinie.

procedurach otrzymuje się elizydat o podobnym składzie immunologicznym i cukrowym jak preparat YF. Wykazujemy nieco inny profil obu grup antybiotycznych związków. W tworzonej tym przypadku kła występuje subokapsułkowa oligosacharydy i wolne aminokwasy. Istotnych różnic stwierdzono w pozostałych dwóch preparatach. Różnice te można przypisać odmiennej technice zaprzęgnięcia YF.

Aby sprawdzić wytrzymałość elizydatu otrzymanego stosując te same ilości i warunki, w 1992 roku podjęto badania na zwierzętach doświadczalnych. Istotną różnicą między elizydatami otrzymanymi z różnych preparatów było przede wszystkim stężenie białka przemieszanego w celu zwiększenia trwałości wydziałek w miejscu zranienia. Porównano elizydaty (A₂₅) uzyskanych w ten sposób z elizydatem przygotowanym z podstawowej metody elizydaty preparatu YF. Długość fali λ=239 nm odpowiada maksimum absorpcji białka i 1% hydroksygeniny. Można przyjąć więc że otrzymane wartości elizydaty były proporcjonalne do ilości rozpuszczonych w elizydatach.

Do poznania stanu przetrwalności dla różnych elizydatów YF skusono się określić optymalne stężenie białka do dalszych badań. Dla wszystkich zastosowanych stężeń YF zapobiegano wzrostowi zawartości związków fenolowych w elizydatach w stosunku do kontroli przygotowanej (K₀) (Tabela 4.1.1). Wrost wydziałek fenolowych w elizydatach jest z mechanizmem mechanizmów obronnych, dlatego też można stwierdzić że otrzymane preparaty YF wykazują aktywność biologiczną. Zbadywanie najniższej odpowiedzi uzyskano stosując kontrolę elizydatu w stężeniu 1000 µg/ml. W pozostałych preparatach wydziałek rozpuszczalnych było wyższe niż w kontrolnej i zależne od wyników uzyskanego dla 2 ml (0,2%) roztworu który był w dotychczasowym jako kontrola przygotowana (Wojaszek & Szobieski 1997).

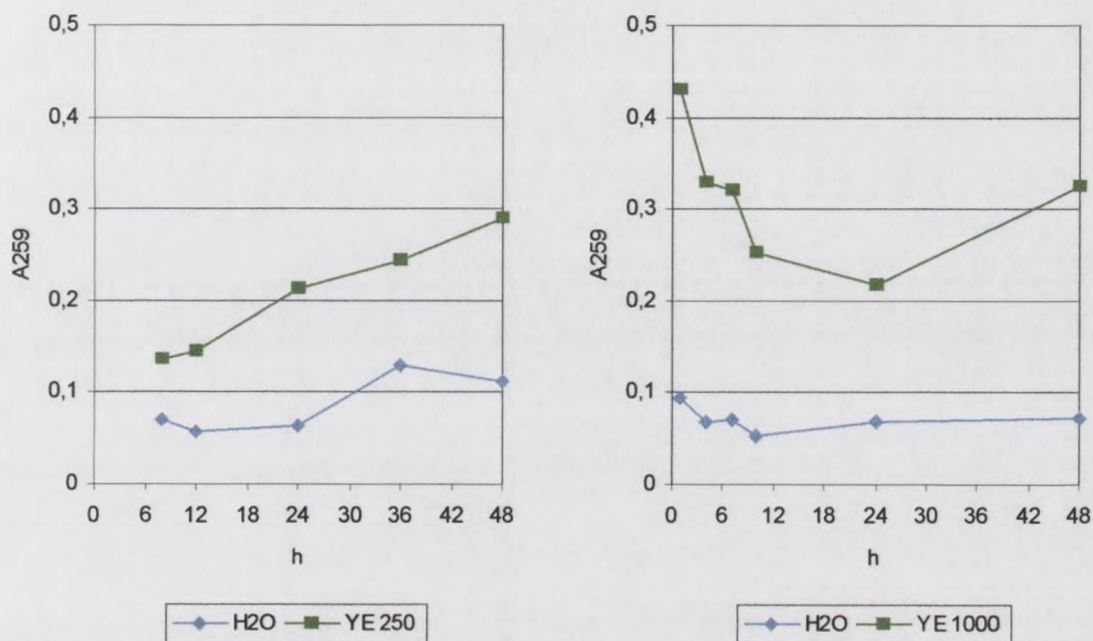
Do poznania wytrzymałości wydziałek do dalszych testów wybrano roztwory o stężeniach 250 oraz 1000 µg/ml. Zastosowanie przetrwałego z nich wywołuje wyjątkowo niskie stężenie białka w elizydatach w odpowiedzi na wysoki stężenie YF. Zależności jednak od czasu tak wyjątkowo niskie stężenie białka może powodować dodatni efekt fizjologiczny (np. stres immunologiczny). Istotną różnicą od obserwowanych obraz mechanizmów obronnych uruchomionych w roślinie.



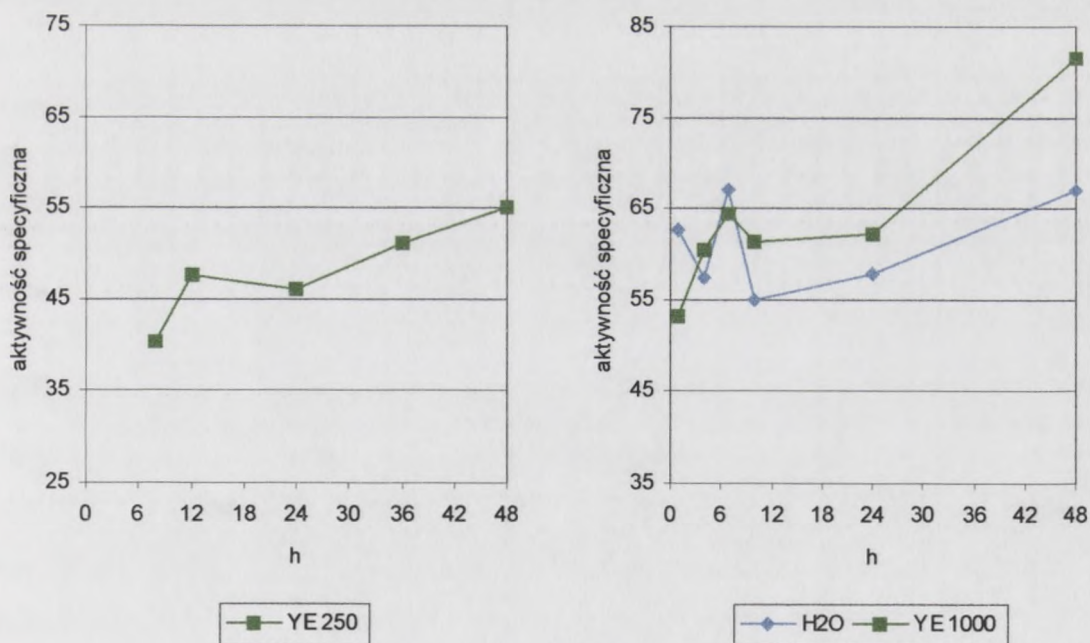
Rys. 4.3. Wydzielanie związków fenolowych indukowane działaniem YE, określone na podstawie pomiaru absorbancji (A_{259}) dyfuzatów uzyskanych w testach liścieniowych. Liścienie łubinu traktowano preparatem YE w stężeniach 100, 250, 500 i 1000 μg ekwiwalentów glukozy/ml. Sterylna woda (H_2O) stanowiła kontrolę negatywną, 2 mM CuCl_2 użyto jako kontrolę pozytywną. Prezentowane wyniki są średnią z dwóch niezależnych pomiarów.

4.2. AKTYWNOŚĆ IGG I PROFILE ZWIĄZKÓW FENOLOWYCH W TESTACH LIŚCIENIOWYCH

Dla obu wybranych stężeń elisytora przeprowadzono niezależne testy liścieniowe mające określić kinetykę procesu wydzielania związków fenolowych indukowanego przez YE. Absorbancję dyfuzatów mierzono w próbach pobranych w określonych punktach czasowych od momentu rozpoczęcia doświadczenia (Rys. 4.4.). Dla obu zastosowanych stężeń elisytora zawartość związków fenolowych w dyfuzatach z liścieni elisytowanych była znacząco większa, niż w dyfuzatach otrzymanych z liścieni kontrolnych. Absorbancja w próbach kontrolnych ulegała niewielkim zmianom w czasie. Ciągły wzrost A_{259} obserwowano w liścieniach traktowanych preparatem YE 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Inny obraz odpowiedzi uzyskano stosując YE w stężeniu 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$. W tym przypadku największą wartość A_{259} obserwowano po 1 h od momentu elisytacji. Po 12 h wartość A_{259} była o prawie 50% niższa i dalej obniżała się. Stopniowy wzrost absorbancji odnotowano w czasie 24 do 48 h po elisytacji. Zaobserwowane różnice mogą wynikać ze zróżnicowanego natężenia aktywowanych reakcji obronnych lub też z innych efektów fizjologicznych związanych np. z pojawieniem się dużych ilości cukrów.



Rys. 4.4. Wydzielanie związków fenolowych, indukowane działaniem YE, określone na podstawie pomiaru absorbancji (A_{259}) dyfuzatów uzyskanych podczas testów liściennych. W dwóch niezależnych doświadczeniach użyto roztwory YE o stężeniach 250 oraz 1000 $\mu\text{g/ml}$. Każdy z przedstawionych wyników jest średnią z dwóch niezależnych pomiarów. H₂O – kontrola.



Rys. 4.5. Zmiany aktywności specyficznej IGG [$\mu\text{mol pNPG}/(\text{min}\cdot\text{g białka})$], związanej ze ścianami komórkowymi liści, wywołane działaniem YE. W dwóch niezależnych testach liściennych użyto roztwory YE o stężeniach 250 oraz 1000 $\mu\text{g/ml}$. Każdy z przedstawionych wyników jest średnią z dwóch niezależnych oznaczeń. H₂O – kontrola.

Wcześniejsze badania prowadzone w Pracowni Fitochemii wykazały, że w otrzymywanych podczas testów liścieniowych dyfuzatach występują wolne aglikony związków fenolowych (Wojtaszek & Stobiecki 1997). Analiza profilu izoflawonoidów w zdrowych liścieniach wykazała natomiast, że w tej części rośliny obecne są głównie połączenia glikozydowe (Rys. 4.18.). Wydzielane aglikony muszą być więc albo syntezowane *de novo*, albo uwalniane z glikozydów. Pierwsza możliwość wydaje się mało prawdopodobna, ponieważ w testach liścieniowych nie zaobserwowano wzrostu aktywności PAL pod wpływem elisytacji (Piślewska & Wojtaszek dane niepublikowane). Aby sprawdzić drugą hipotezę, w liścieniach traktowanych elisytozem, oprócz stężenia wydzielanych izoflawonoidów, określono również aktywność IGG związanej ze ścianami komórkowymi.

W liścieniach traktowanych elisytozem w stężeniu 250 µg/ml, zaobserwowano stały wzrost aktywności IGG (Rys. 4.5.). Niestety, w doświadczeniu tym nie oznaczono aktywności IGG w liścieniach kontrolnych, co uniemożliwia jednoznaczne stwierdzenie, czy obserwowany wzrost jest rzeczywiście wywołany elisytacją. Takiego porównania aktywności IGG dokonano dla liścieni kontrolnych i liścieni poddanych działaniu YE w stężeniu 1000 µg/ml (Rys. 4.5.). W liścieniach elisytowanych stwierdzono wzrost aktywności IGG. Wzrost aktywności enzymu obserwowano również w próbach kontrolnych, w których jednak, poza punktem 7 h po elisytacji, była ona niższa niż w liścieniach traktowanych elisytozem. Zestawiając uzyskane wyniki można stwierdzić, że aktywność IGG wzrasta w odpowiedzi na pojawienie się elisytora. Pozwala to przypuszczać, że zwiększone wydzielanie aglikonów izoflawonoidów może przebiegać wg drugiego z proponowanych mechanizmów.

Z liścieni, które traktowano elisytozem w stężeniu 250 µg/ml wyizolowano również związki fenolowe. Uzyskane próbki analizowano stosując metodę TLC (Rys. 4.6.). Stwierdzono, że pod wpływem elisytacji w liścieniach zwiększa się zawartość wolnych aglikonów izoflawonoidów. Obserwuje się również, pomimo pewnych wahań, spadek zawartości monoglikozydów izoflawonoidów. Biorąc pod uwagę wszystkie pozostałe wyniki można stwierdzić, że w liścieniach traktowanych elisytozem najprawdopodobniej dochodzi do hydrolizy glikozydów izoflawonoidów, czego rezultatem jest wzrost stężenia wolnych aglikonów w tkance.

Zestawiając wyniki dotyczące aktywności IGG (Rys. 4.5.) oraz zmian zawartości związków fenolowych w liścieniach (Rys.4.6.) i dyfuzatach (Rys. 4.4.) można zauważyć, że w liścieniach poddanych działaniu YE 250 µg/ml istnieje korelacja pomiędzy aktywnością IGG,

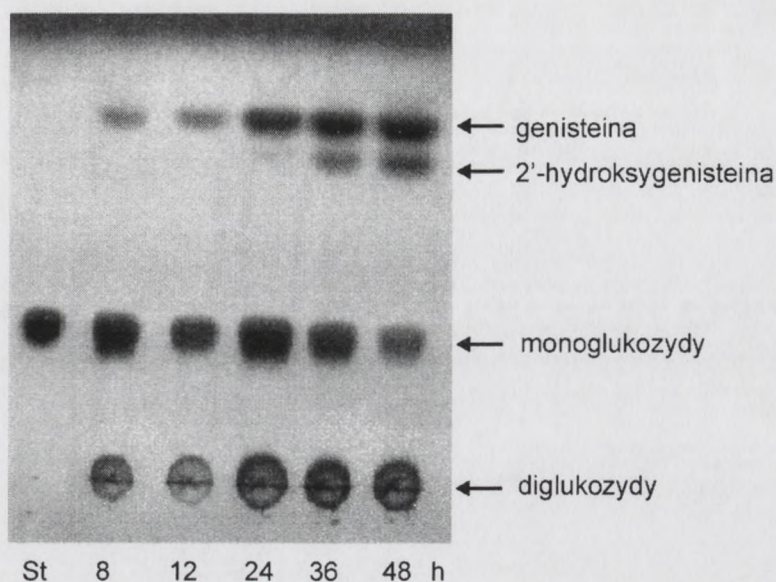
Wzrost i rozwój fizyczny dzieci w pierwszych latach życia charakteryzują się dynamicznymi zmianami. Wzrost liniowy jest najbardziej widocznym wskaźnikiem, który podlega znacznym wahaniom. Wzrost przyspiesza w pierwszych trzech miesiącach życia, a następnie następuje okres spowolnienia. Wzrost przyspiesza ponownie w okresie dojrzewania. Wzrost przyspiesza ponownie w okresie dojrzewania. Wzrost przyspiesza ponownie w okresie dojrzewania.

Wzrost i rozwój

Wzrost i rozwój fizyczny dzieci w pierwszych latach życia charakteryzują się dynamicznymi zmianami. Wzrost liniowy jest najbardziej widocznym wskaźnikiem, który podlega znacznym wahaniom. Wzrost przyspiesza w pierwszych trzech miesiącach życia, a następnie następuje okres spowolnienia. Wzrost przyspiesza ponownie w okresie dojrzewania. Wzrost przyspiesza ponownie w okresie dojrzewania. Wzrost przyspiesza ponownie w okresie dojrzewania.

Wzrost i rozwój

Wzrost i rozwój fizyczny dzieci w pierwszych latach życia charakteryzują się dynamicznymi zmianami. Wzrost liniowy jest najbardziej widocznym wskaźnikiem, który podlega znacznym wahaniom. Wzrost przyspiesza w pierwszych trzech miesiącach życia, a następnie następuje okres spowolnienia. Wzrost przyspiesza ponownie w okresie dojrzewania. Wzrost przyspiesza ponownie w okresie dojrzewania. Wzrost przyspiesza ponownie w okresie dojrzewania.



Rys. 4.6. Zmiany profili związków fenolowych w liściach wywołane działaniem preparatu YE o stężeniu 250 μg ekwiwalentów glukozy/ml. Próbkę związków fenolowych, izolowane z elisytowanych liści pobranych po 8, 12, 24, 36, i 48 h od elisytacji, analizowano metodą TLC. Płytkę rozwijało w fazie $\text{CHCl}_3\text{-MeOH-H}_2\text{O}$ (40:10:1, v/v/v). St – standard (7-O- β -glukozyd genisteiny).

a wzrostem zawartości wolnych aglikonów w tkance oraz ich wydzielaniem na zewnątrz. Wynik ten wyraźnie sugeruje udział IGG w reakcjach obronnych łubinu białego. Natomiast dla liści traktowanych elisytorem o stężeniu 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ nie można mówić o wyraźnej korelacji aktywności IGG i zawartości izoflawonoidów w dyfuzatach, bowiem obserwowane w pierwszych godzinach wysokie stężenie związków fenolowych w dyfuzatach nie jest związane z podwyższoną aktywnością IGG.

4.3. TKANKOWA I SUBKOMÓRKOWA LOKALIZACJA IGG

4.3.1. Aktywność IGG w populacjach białek cytoplazmatycznych i białek ścian komórkowych

Do określenia dystrybucji aktywności IGG w tkankach łubinu białego wykorzystano ekstrakcję sekwencyjną. Z korzeni, hypokotyli, liści i pędów izolowano frakcje białek cytoplazmatycznych i białek ścian komórkowych. W uzyskanych ekstraktach białek określano aktywność IGG na podstawie zdolności danej frakcji do uwalniania *p*-nitrofenolu z *p*NPG (Tab. 4.2.). Procedurę izolacji białek i oznaczania aktywności IGG powtórzono podczas pięciu niezależnych doświadczeń. We wszystkich doświadczeniach najwyższą aktywność IGG stwierdzano we frakcji białek ścian komórkowych korzenia. Aktywność ta była zwykle 10-15 razy większa od aktywności β -glukozydazy w populacji białek cytoplazmatycznych korzenia

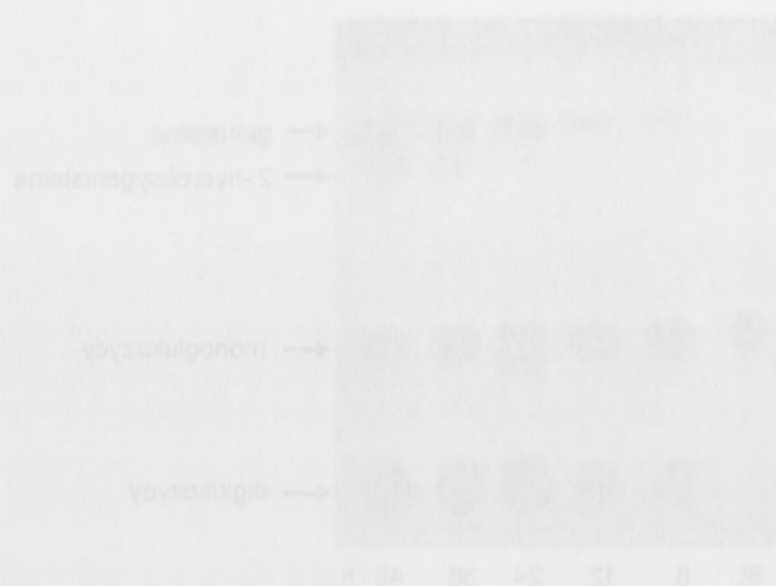


Fig. 4.5. Zmiany profilu związków fenolowych w liściach wyczołanych preparatów YF w czasie 250 µg aktywności ekwiwalentnej. Profil związków fenolowych izolowane z ekstraktami liści preparatów po 8, 12, 24, 36, 48 i 81 h od chwili analizowania metodą TJC. Punkt rozwoju w fazie CHCl₃-MeOH (40:60, v/v). R_F - standard (7-O-β-galaktosylgentiana).

z wzrostem zawartości wyczołanych ekstraktów w liściach wyczołanych preparatów. Wynik ten wskazuje na skuteczność izolacji związków fenolowych. Niezależnie od czasu ekstrakcji ekstrakt o aktywności 1000 µg/ml nie można mówić o wysokiej zawartości związków fenolowych w liściach wyczołanych preparatów. Wynik ten wskazuje na skuteczność izolacji związków fenolowych w liściach wyczołanych preparatów. Wynik ten wskazuje na skuteczność izolacji związków fenolowych w liściach wyczołanych preparatów.

4.3. TERMOGRAFICZNA IZOLACJA IZOLACJA IZOLACJA

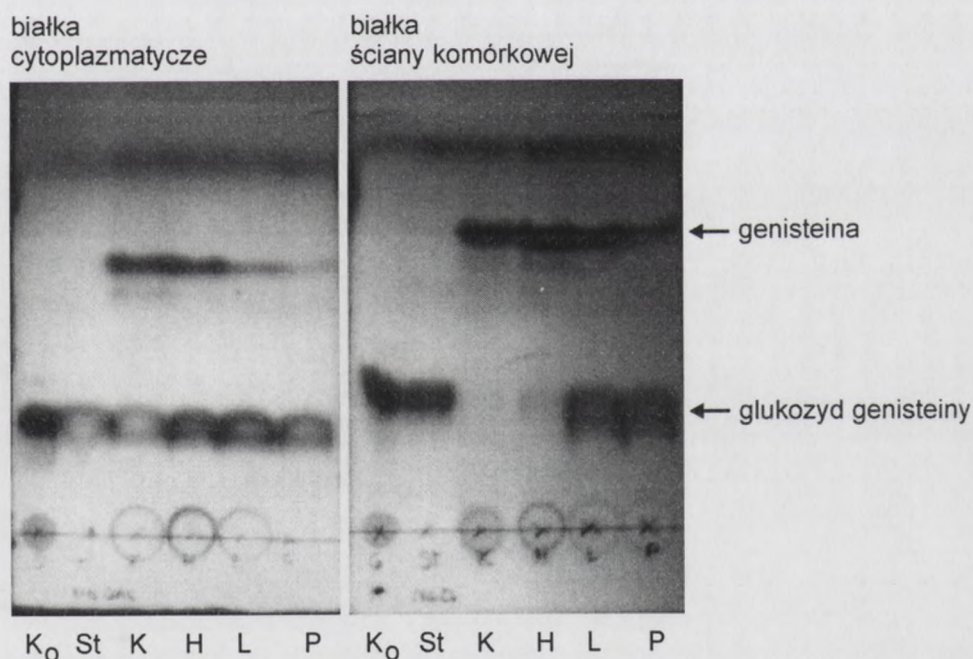
4.3.1. Aktywność IGG w populacjach liści cytoplazmatycznych i liści kłosa komórkowych

Do określenia aktywności IGG w liściach kłosa i liściach cytoplazmatycznych ekstrakt przygotowano z liści kłosa i liści cytoplazmatycznych. W uzyskanych ekstraktach liści określono aktywność IGG na podstawie zdolności dążyć liści do zwiększenia p-nitrofenolu x 2500 (Tab. 4.2). Wyniki analizy liści i owoców ekstraktów IGG powtórzone podczas pięciu niezależnych doświadczeń. We wszystkich doświadczeniach najwyższą aktywność IGG stwierdzono we frakcji liści kłosa komórkowych. Aktywność ta była zwykle 10-15 razy większa od aktywności liści cytoplazmatycznych. Wynik ten wskazuje na skuteczność izolacji związków fenolowych w liściach kłosa komórkowych.

oraz ponad 4-krotnie większa od aktywności IGG w którejkolwiek z pozostałych frakcji białek. Liścienie były jedyną częścią rośliny, w której aktywność IGG we frakcji białek cytoplazmatycznych była znacząco większa niż wśród białek ścian komórkowych.

Części roślin	Aktywność specyficzna [$\mu\text{mol } p\text{NPG}/(\text{min}\cdot\text{g białka})$]	
	Białka cytoplazmatyczne	Białka ścian komórkowych
Korzenie	34 ± 3	519 ± 50
Hypokotyle	35 ± 18	43 ± 5
Liścienie	146 ± 5	25 ± 3
Pędy	23 ± 1	18 ± 3

Tab. 4.2. Aktywność specyficzna IGG w różnych częściach łubinu białego oznaczona w teście z *p*NPG. Przedstawione dane są średnimi (\pm SD) z trzech niezależnych pomiarów wykonanych podczas jednego z pięciu przeprowadzonych doświadczeń.



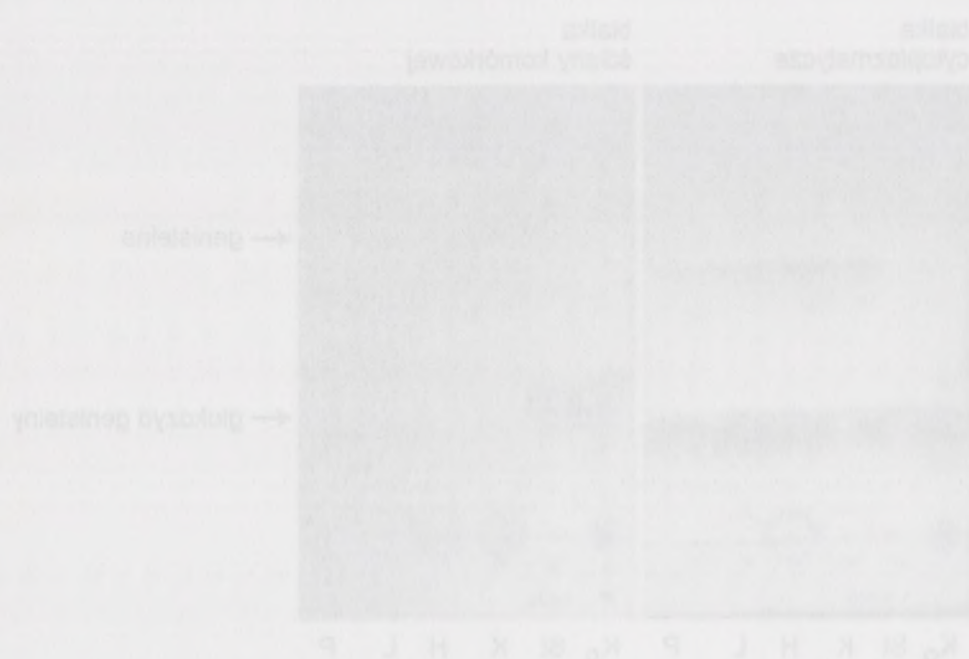
Rys. 4.7. Rozdział TLC próbek związków fenolowych po hydrolizie 7-O- β -glukozydu genisteiny przez preparaty białkowe wyizolowane z różnych części łubinu białego: korzeni (K), hypokotyli (H), liścieni (L) i pędów (P). K₀ – próba kontrolna (substrat inkubowany bez preparatu białkowego), St – standard (7-O- β -glukozyd genisteiny).

Aktywność IGG oznaczono również na drodze określenia zdolności frakcji białkowych do uwalniania aglikonu z 7-O- β -glukozydu genisteiny. Produkty reakcji i hydrolizy analizowano techniką TLC (Rys. 4.7.). Najwyższą aktywność, podobnie jak w teście z *p*NPG, wykryto we frakcji białek ścian komórkowych korzenia. W próbce, do której dodano tą

uczony ponad 4-krotnie większą od aktywności IGG w krążeniowiskach z pozostałych frakcji białek. Licznie były jednak czynniki neutralne, w której aktywność IGG we frakcji białek cytoplazmatycznych była znacząco większa niż wśród białek ściany komórkowej.

Część roślin	Aktywność specyficzna (μmol pNPG/min·g białek)	
	Białka ściany komórkowej	Białka cytoplazmatyczne
Karczocha	219 ± 20	34 ± 3
Hypochaeris	43 ± 2	32 ± 18
Liatris	22 ± 3	146 ± 2
Pędy	18 ± 3	23 ± 1

Tab. 4.3. Aktywność specyficzna IGG w różnych częściach roślin białego oszostka w teście z pNPG. Przedstawione dane są średnimi (± SD) z trzech niezależnych pomiarów wykonanych podczas jednego z pięciu powtarzalnych doświadczeń.



Rys. 4.3. Rozdzielanie TLC próbek zwitrzów (molekule) po hydrolizie 7-O-β-galaktosyl galaktozy przez czynniki białkowe wyizolowane z różnych części roślin białego oszostka (K) i hypochaeris (H), liatris (L) i pędów (P). K_c – próba kontrolna (substancje inaktywne porównawcze białkowe), B_c – standard (7-O-β-galaktosyl geniny).

Aktywność IGG oszacowano również na drodze określenia zdolności białkowych do uwolnienia aglikonu z 7-O-β-galaktosyl geniny. Produktu reakcji i hydrolizy analizowano techniką TLC (rys. 4.3). Najwyższe aktywności podobne jak w teście z pNPG wykazywały frakcje białek ściany komórkowej karczochu. W próbach, do których dodano 10

frakcję białek, zaobserwowano całkowitą hydrolizę substratu. Wysoką aktywność IGG wykazały też białka ścian komórkowych hypokotyli, czego nie zaobserwowano wcześniej w testach wykorzystujących *p*NPG jako substrat.

4.3.2. Aktywność IGG w IWF

Lokalizację IGG w ścianach komórkowych potwierdzono wykorzystując metodę izolacji płynów apoplastycznych (Rozdz. 4.1.1.). Aktywność IGG oznaczono w IWF otrzymanych z korzeni, hypokotyli, liścieni i pędów łubinu białego. Z tkanek pozostałych po wydzieleniu IWF, stosując ekstrakcję sekwencyjną, izolowano pozostałe białka związane jonowo ze ścianami komórkowymi. Dla celów porównawczych białka ścian komórkowych ekstrahowano również z materiału roślinnego, z którego nie wydzielano wcześniej IWF. Zastosowanie metody izolacji białek z przestworów międzykomórkowych potwierdziło lokalizację IGG w ścianach komórkowych (Tab. 4.3.). Najwyższą specyficzną aktywność IGG obserwowano w IWF z korzeni oraz z hypokotyli, co jest zgodne z wcześniejszymi wynikami uzyskanymi dla ekstraktów białek ścian komórkowych w testach z *p*NPG i genistyną (Tab. 4.2., Rys. 4.7.). Znaczna część aktywności została odzyskana dodatkowo podczas ekstrakcji białek ścian komórkowych z materiału pozostałego po otrzymywaniu IWF.

Części roślin	Aktywność specyficzna [$\mu\text{mol } p\text{NPG}/(\text{min} \cdot \text{g} \text{ białka})$]		
	IWF	Tkanki po wydzieleniu IWF	Świeże tkanki
Korzenie	304 \pm 14	218 \pm 17	552 \pm 44
Hypokotyle	259 \pm 11	113 \pm 3	110 \pm 9
Liścienie	115 \pm 15	87 \pm 3	68 \pm 2
Pędy	84 \pm 7	48 \pm 2	42 \pm 3

Tab. 4.3. Aktywność specyficzna IGG w tkankach i IWF wydzielonych z różnych części łubinu białego. Przedstawione dane są średnimi (\pm SD) z dwóch niezależnych pomiarów.

4.4. CHARAKTERYSTYKA AKTYWNOŚCI IGG

4.4.1. Oczyszczanie IGG

Na podstawie opisanych wcześniej wyników, do oczyszczania IGG wykorzystywano frakcję białek ścian komórkowych korzenia, wykazującą najwyższą aktywność specyficzną. Procedurę oczyszczania enzymu powtarzano podczas sześciu niezależnych doświadczeń.

Wskazano, że w badaniach nad wpływem IGG na reakcję białek, zapobiegano całkowitej hydrolizie substratu. Wyniki badań wykazały, że białka ścian komórkowych hydrolyzują, czego nie obserwujemy w testach wykorzystujących pNBG jako substrat.

4.2.3. Aktywność IGG w IWF

Localizację IGG w ścianach komórkowych potwierdzono wykorzystując metodę immunofluorescencyjną (Rozdz. 4.1.1). Aktywność IGG oznaczono w IWF ultracienkich korzeni hipokryty, liści i pędów lubnowałego X drzewka porzecznika po wydobyciu IWF, stosując skrajnie sekwencyjne, izolowano pozostałe białka zawierające jony Cu²⁺ i Zn²⁺ w postaci kompleksów. Dla celów porównawczych białka ścian komórek izolowano również z materiałów roślinnego, z którego nie wyizolowano IWF. Istotną metodą izolacji białek z frakcji IGG w preparatach immunofluorescencyjnych IGG w ścianach komórkowych (Tab. 4.2). Najwyższą specyficzną aktywność IGG obserwowano w IWF z korzeni oraz z hipokryty, co jest zgodne z wcześniejszymi wynikami (Rozdz. 4.1). W testach białek ścian komórkowych w testach z pNBG i gorszym (Tab. 4.2, Rozdz. 4.2). Wyniki te potwierdzają, że aktywność została odnotowana jedynie w białkach ścian komórkowych z materiałów pozostałego po oczyszczeniu IWF.

Część roślin	Aktywność specyficjna (μmol pNBG/min/g białek)	
	IWF	Trzeci po wyizolowaniu IWF
Korzenie	304 ± 14	218 ± 17
Hipokryty	229 ± 11	113 ± 3
Liście	112 ± 12	87 ± 1
Pędy	84 ± 7	48 ± 2

Tab. 4.2. Aktywność specyficjna IGG w frakcjach IWF wydobyciu z różnych części roślin. Wyniki przedstawiono jako średnią ± SD z dwóch niezależnych pomiarów.

4.4. CHARAKTERYSTYKA AKTYWNOŚCI IGG

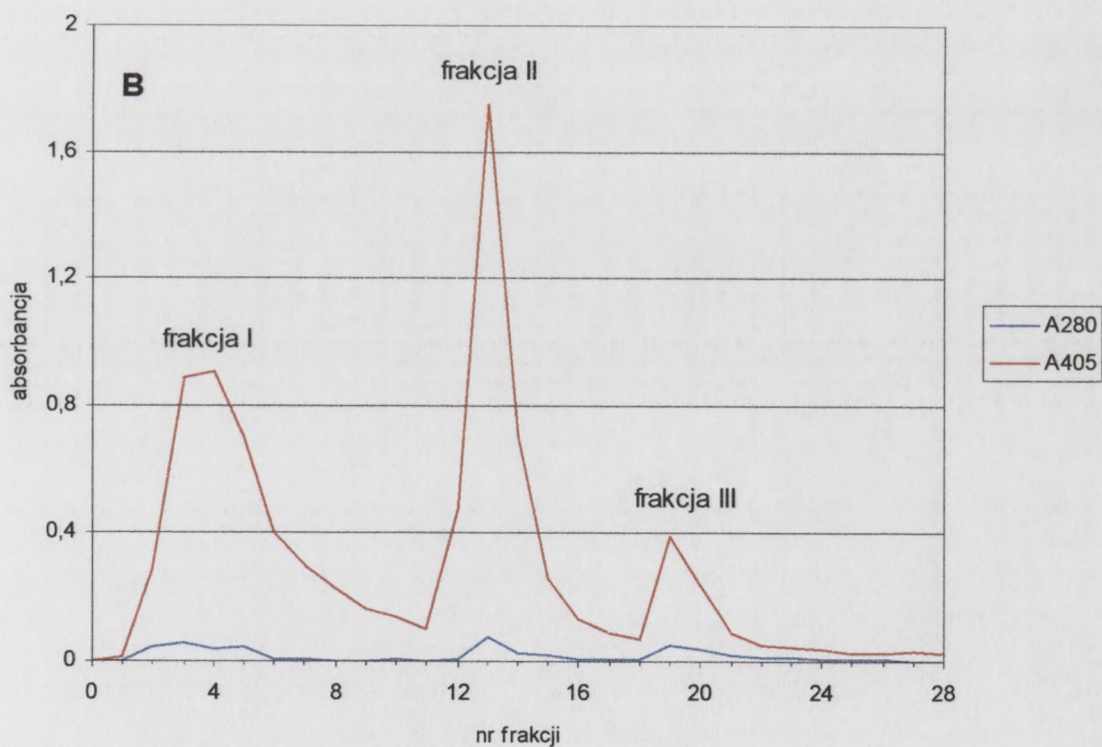
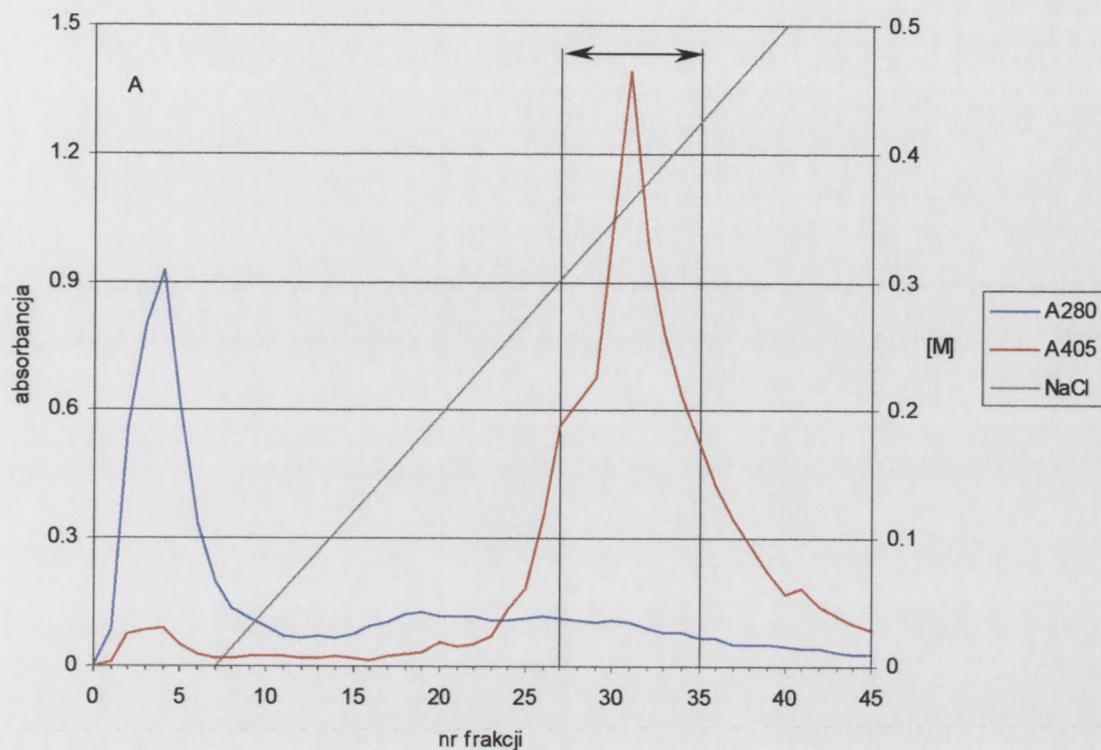
4.4.1. Oczyszczanie IGG

Na podstawie opisanych wcześniej wyników, do oczyszczenia IGG wykorzystano frakcje białek ścian komórkowych korzeni, wykazując najwyższą aktywność. Procedurę oczyszczania opierano głównie na podziale cząstek i białek.

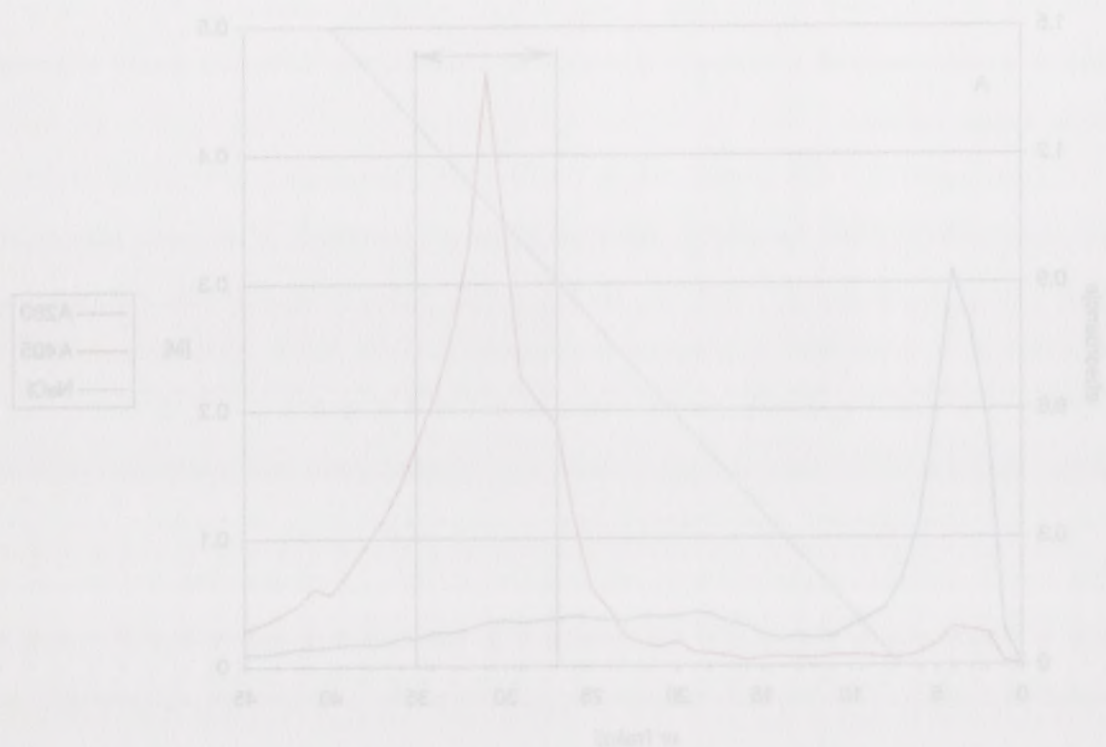
Stwierdzono, że populacja białek ścian komórkowych stanowi średnio około 8% całkowitej puli białek ekstrahowanych z korzeni i zawarte jest w niej około 35% całkowitej aktywności IGG w tej części rośliny.

Na rysunkach 4.8. i 4.9. przedstawiono profile elucji białek uzyskane podczas kolejnych etapów oczyszczania IGG metodami chromatografii kolumnowej. Większość nanoszonych białek nie wiązała się do CM-celulozy. Białka te nie wykazywały również aktywności β -glukozydazy. IGG wypływała z kolumny przy około 0.25 M NaCl. Wcześniejsze próby w gradiencie 0-1 M NaCl wykazały, że przy stężeniach NaCl powyżej 0.5 M nie wymywają się już żadne białka o aktywności β -glukozydazy. Po chromatografii powinowactwa na ConA-Sepharose 4B otrzymywano trzy frakcje białek o aktywności IGG. Pierwsza z nich (I) nie wiązała się do nośnika, druga (II) wymywała się w 0.2 M α -D-mannopyranozydzie metylu. Trzecią z otrzymanych frakcji (III) eluowano 0.2 M α -D-mannopyranozydzie metylu z dodatkiem 0.5 M NaCl. Charakteryzowała się ona wyraźnie najmniejszą aktywnością IGG. Testy enzymatyczne wykazały, że we wszystkich trzech frakcjach występują białka hydrolizujące 7-O- β -glukozyd genisteiny. Ponieważ chromatografia na ConA-Sepharose 4B różnicuje białka ze względu na powinowactwo ich bocznych łańcuchów oligosacharydowych do konkanawaliny A, możliwym jest, że we wszystkich frakcjach występuje ten sam enzym różniący się jedynie stopniem glikozylacji. Wskazują na to również wyniki sąceń żelowych frakcji I i II na Sephacryl S-300 HR. W obu przypadkach maksimum aktywności IGG uzyskano przy tej samej objętości elucji, co sugeruje, że w obu frakcjach znajdują się enzymy o takiej samej lub zbliżonej masie cząsteczkowej. Próby oczyszczania frakcji III na Sephacryl S-300 HR zakończyły się niepowodzeniem, gdyż ze względu na niewielką ilość białka (<10 μ g) nie było możliwym otrzymanie wiarygodnych wyników testu enzymatycznego z *p*NPG.

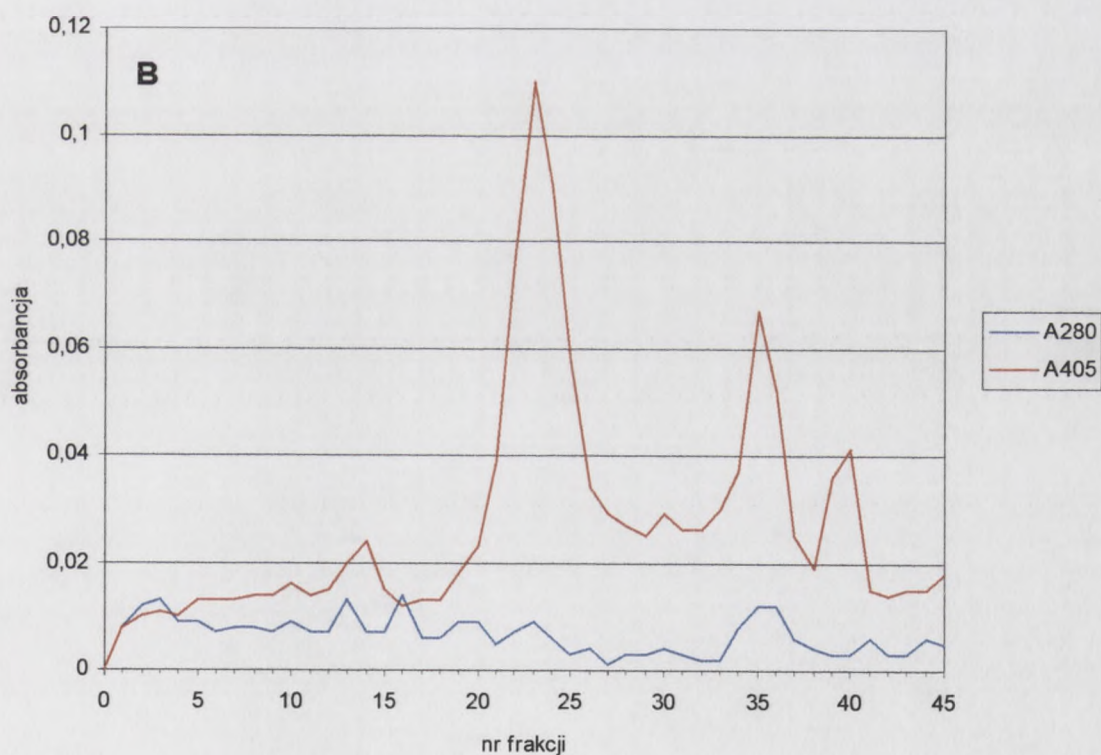
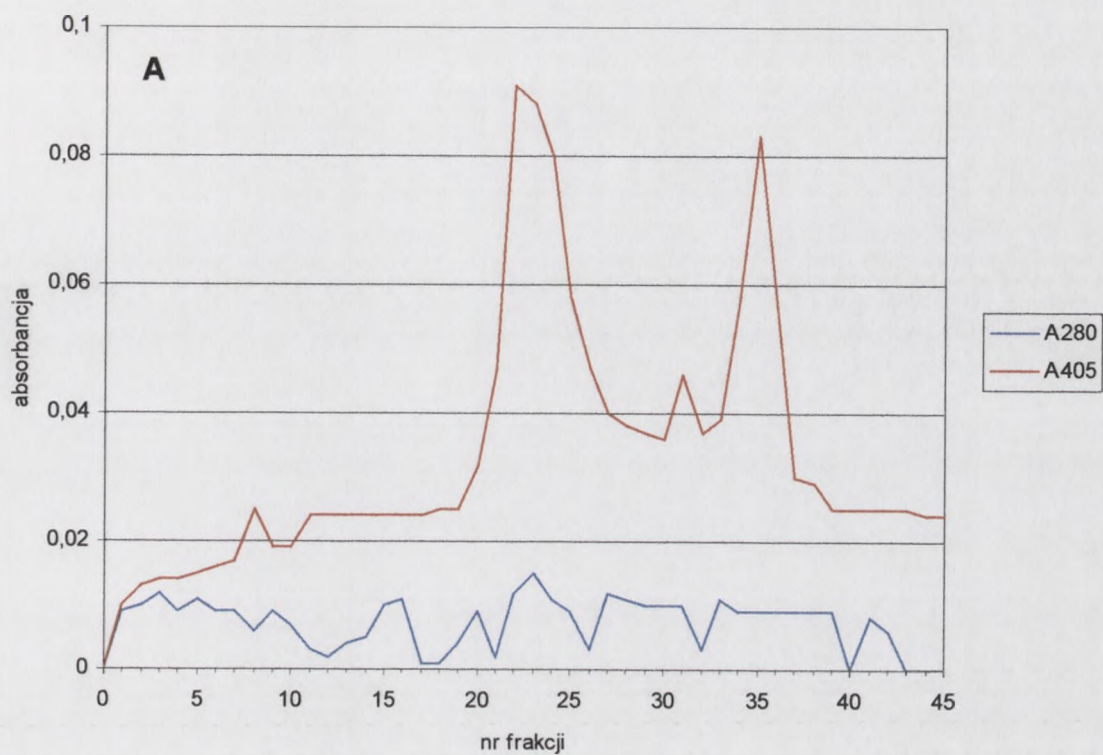
W tabeli 4.4. zestawiono wyniki otrzymane na poszczególnych etapach oczyszczania IGG podczas wybranych dwóch doświadczeń. Najwyższą specyficzną aktywność [7663 μ mol *p*NPG/(min·g białka)] uzyskano dla frakcji II po chromatografii powinowactwa na ConA-Sepharose 4B, co dało ponad 30-krotny współczynnik oczyszczenia. Po sąceniu żelowym ilość białka w wymywanych frakcjach otrzymanych na tym etapie była poniżej poziomu detekcji, co uniemożliwiło obliczenie aktywności specyficznej i współczynnika oczyszczenia. W tym przypadku oznaczono tylko aktywność całkowitą IGG.



Rys. 4.8. Profile elucji białek i aktywności IGG we frakcjach zebranych w trakcie chromatografii kolumnowej: A – frakcji białek ścian komórkowych korzeni na CM-celulozie, B – aktywnej frakcji IGG (\leftrightarrow) na ConA-Sepharose 4B. Aktywność określano w teście z *p*NPG (A_{405}), a zawartość białka wyznaczano na podstawie A_{280} .



Kryz 4.3. Profile elucji i absorpcyjności IIG w frakcjach zbranych w trakcie chromatografii kolumnowej. A – frakcja biała (niezależnie od czasu na CM-oligonu); B – frakcja biała (niezależnie od czasu na CM-oligonu). A230 – frakcja IIG (+) na CM-oligonu; A250 – frakcja IIG (+) na CM-oligonu; A270 – frakcja IIG (+) na CM-oligonu. Wyniki pomiarów przedstawiono w tabeli 4.3.1.



Rys. 4.9. Profile elucji białek i aktywności IGG we frakcjach zebranych w czasie sączenia żelowego na Sephacryl S-300 HR: A – frakcji I, B – frakcji II, uzyskanych po rozdziale na ConA-Sepharose 4B (Rys. 4.8.). Aktywność określano w teście z *p*NPG (A_{405}), a zawartość białka wyznaczano na podstawie A_{280} .

	Białko całkowite [mg]	Aktywność całkowita [$\mu\text{mol pNPG}/\text{min}$]	Aktywność specyficzna [$\mu\text{mol pNPG}/(\text{min}\cdot\text{g białka})$]	Współczynnik oczyszczenia	Stopień odzysku [%]
Ekstrakt ścian komórkowych	69.9	23.4	336	1	100
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	15.4	11.0	719	2.1	47
CM-celuloza	1.55	6.41	4126	12.3	27
ConA-Sepharose 4B					
fr I	0.021	0.11	5306	15.8	0.48
fr II	0.094	0.19	2045	6.1	0.83
fr III	0.006	0.03	4626	13.8	0.12
Sephacryl S-300 HR					
fr I		0.048			0.20
fr II		0.047			0.20
Ekstrakt ścian komórkowych	26.1	6.29	241	1	100
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	13.4	4.29	320	1.3	68
CM-celuloza	1.20	1.72	1431	5.9	27
ConA-Sepharose 4B					
fr I	0.048	0.59	1239	5.1	9.4
fr II	0.015	0.12	7663	31.7	1.9
Sephacryl S-300 HR					
fr I		0.104			1.6
fr II		0.044			0.7

Tab. 4.4. Zestawienie parametrów charakteryzujących oczyszczenie IGG na poszczególnych etapach procedury izolacji enzymu. W tabeli zestawiono wyniki uzyskane podczas dwóch wybranych doświadczeń.

Tab. 4.9. Wyniki pomiarów...
 Wyniki pomiarów...
 Wyniki pomiarów...

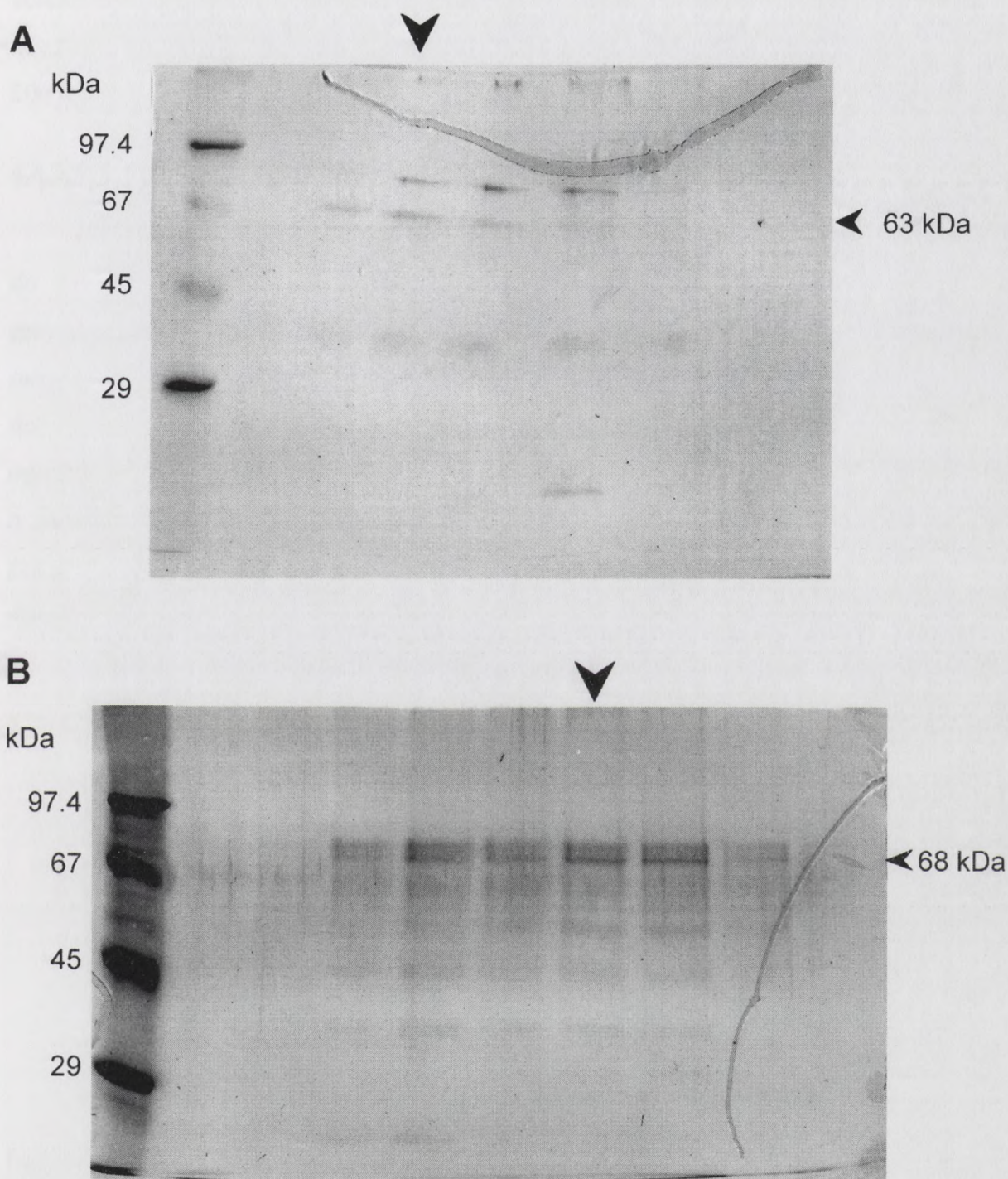
Zestawienie 1	Wzrost	170	175	180
	Ciężar ciała	65	70	75
Zestawienie 2	Wzrost	175	180	185
	Ciężar ciała	70	75	80
Zestawienie 3	Wzrost	180	185	190
	Ciężar ciała	75	80	85
Zestawienie 4	Wzrost	185	190	195
	Ciężar ciała	80	85	90
Zestawienie 5	Wzrost	190	195	200
	Ciężar ciała	85	90	95
Zestawienie 6	Wzrost	195	200	205
	Ciężar ciała	90	95	100
Zestawienie 7	Wzrost	200	205	210
	Ciężar ciała	95	100	105
Zestawienie 8	Wzrost	205	210	215
	Ciężar ciała	100	105	110
Zestawienie 9	Wzrost	210	215	220
	Ciężar ciała	105	110	115
Zestawienie 10	Wzrost	215	220	225
	Ciężar ciała	110	115	120
Zestawienie 11	Wzrost	220	225	230
	Ciężar ciała	115	120	125
Zestawienie 12	Wzrost	225	230	235
	Ciężar ciała	120	125	130
Zestawienie 13	Wzrost	230	235	240
	Ciężar ciała	125	130	135
Zestawienie 14	Wzrost	235	240	245
	Ciężar ciała	130	135	140
Zestawienie 15	Wzrost	240	245	250
	Ciężar ciała	135	140	145
Zestawienie 16	Wzrost	245	250	255
	Ciężar ciała	140	145	150
Zestawienie 17	Wzrost	250	255	260
	Ciężar ciała	145	150	155
Zestawienie 18	Wzrost	255	260	265
	Ciężar ciała	150	155	160
Zestawienie 19	Wzrost	260	265	270
	Ciężar ciała	155	160	165
Zestawienie 20	Wzrost	265	270	275
	Ciężar ciała	160	165	170
Zestawienie 21	Wzrost	270	275	280
	Ciężar ciała	165	170	175
Zestawienie 22	Wzrost	275	280	285
	Ciężar ciała	170	175	180
Zestawienie 23	Wzrost	280	285	290
	Ciężar ciała	175	180	185
Zestawienie 24	Wzrost	285	290	295
	Ciężar ciała	180	185	190
Zestawienie 25	Wzrost	290	295	300
	Ciężar ciała	185	190	195
Zestawienie 26	Wzrost	295	300	305
	Ciężar ciała	190	195	200
Zestawienie 27	Wzrost	300	305	310
	Ciężar ciała	195	200	205
Zestawienie 28	Wzrost	305	310	315
	Ciężar ciała	200	205	210
Zestawienie 29	Wzrost	310	315	320
	Ciężar ciała	205	210	215
Zestawienie 30	Wzrost	315	320	325
	Ciężar ciała	210	215	220
Zestawienie 31	Wzrost	320	325	330
	Ciężar ciała	215	220	225
Zestawienie 32	Wzrost	325	330	335
	Ciężar ciała	220	225	230
Zestawienie 33	Wzrost	330	335	340
	Ciężar ciała	225	230	235
Zestawienie 34	Wzrost	335	340	345
	Ciężar ciała	230	235	240
Zestawienie 35	Wzrost	340	345	350
	Ciężar ciała	235	240	245
Zestawienie 36	Wzrost	345	350	355
	Ciężar ciała	240	245	250
Zestawienie 37	Wzrost	350	355	360
	Ciężar ciała	245	250	255
Zestawienie 38	Wzrost	355	360	365
	Ciężar ciała	250	255	260
Zestawienie 39	Wzrost	360	365	370
	Ciężar ciała	255	260	265
Zestawienie 40	Wzrost	365	370	375
	Ciężar ciała	260	265	270
Zestawienie 41	Wzrost	370	375	380
	Ciężar ciała	265	270	275
Zestawienie 42	Wzrost	375	380	385
	Ciężar ciała	270	275	280
Zestawienie 43	Wzrost	380	385	390
	Ciężar ciała	275	280	285
Zestawienie 44	Wzrost	385	390	395
	Ciężar ciała	280	285	290
Zestawienie 45	Wzrost	390	395	400
	Ciężar ciała	285	290	295
Zestawienie 46	Wzrost	395	400	405
	Ciężar ciała	290	295	300
Zestawienie 47	Wzrost	400	405	410
	Ciężar ciała	295	300	305
Zestawienie 48	Wzrost	405	410	415
	Ciężar ciała	300	305	310
Zestawienie 49	Wzrost	410	415	420
	Ciężar ciała	305	310	315
Zestawienie 50	Wzrost	415	420	425
	Ciężar ciała	310	315	320
Zestawienie 51	Wzrost	420	425	430
	Ciężar ciała	315	320	325
Zestawienie 52	Wzrost	425	430	435
	Ciężar ciała	320	325	330
Zestawienie 53	Wzrost	430	435	440
	Ciężar ciała	325	330	335
Zestawienie 54	Wzrost	435	440	445
	Ciężar ciała	330	335	340
Zestawienie 55	Wzrost	440	445	450
	Ciężar ciała	335	340	345
Zestawienie 56	Wzrost	445	450	455
	Ciężar ciała	340	345	350
Zestawienie 57	Wzrost	450	455	460
	Ciężar ciała	345	350	355
Zestawienie 58	Wzrost	455	460	465
	Ciężar ciała	350	355	360
Zestawienie 59	Wzrost	460	465	470
	Ciężar ciała	355	360	365
Zestawienie 60	Wzrost	465	470	475
	Ciężar ciała	360	365	370
Zestawienie 61	Wzrost	470	475	480
	Ciężar ciała	365	370	375
Zestawienie 62	Wzrost	475	480	485
	Ciężar ciała	370	375	380
Zestawienie 63	Wzrost	480	485	490
	Ciężar ciała	375	380	385
Zestawienie 64	Wzrost	485	490	495
	Ciężar ciała	380	385	390
Zestawienie 65	Wzrost	490	495	500
	Ciężar ciała	385	390	395
Zestawienie 66	Wzrost	495	500	505
	Ciężar ciała	390	395	400
Zestawienie 67	Wzrost	500	505	510
	Ciężar ciała	395	400	405
Zestawienie 68	Wzrost	505	510	515
	Ciężar ciała	400	405	410
Zestawienie 69	Wzrost	510	515	520
	Ciężar ciała	405	410	415
Zestawienie 70	Wzrost	515	520	525
	Ciężar ciała	410	415	420
Zestawienie 71	Wzrost	520	525	530
	Ciężar ciała	415	420	425
Zestawienie 72	Wzrost	525	530	535
	Ciężar ciała	420	425	430
Zestawienie 73	Wzrost	530	535	540
	Ciężar ciała	425	430	435
Zestawienie 74	Wzrost	535	540	545
	Ciężar ciała	430	435	440
Zestawienie 75	Wzrost	540	545	550
	Ciężar ciała	435	440	445
Zestawienie 76	Wzrost	545	550	555
	Ciężar ciała	440	445	450
Zestawienie 77	Wzrost	550	555	560
	Ciężar ciała	445	450	455
Zestawienie 78	Wzrost	555	560	565
	Ciężar ciała	450	455	460
Zestawienie 79	Wzrost	560	565	570
	Ciężar ciała	455	460	465
Zestawienie 80	Wzrost	565	570	575
	Ciężar ciała	460	465	470
Zestawienie 81	Wzrost	570	575	580
	Ciężar ciała	465	470	475
Zestawienie 82	Wzrost	575	580	585
	Ciężar ciała	470	475	480
Zestawienie 83	Wzrost	580	585	590
	Ciężar ciała	475	480	485
Zestawienie 84	Wzrost	585	590	595
	Ciężar ciała	480	485	490
Zestawienie 85	Wzrost	590	595	600
	Ciężar ciała	485	490	495
Zestawienie 86	Wzrost	595	600	605
	Ciężar ciała	490	495	500
Zestawienie 87	Wzrost	600	605	610
	Ciężar ciała	495	500	505
Zestawienie 88	Wzrost	605	610	615
	Ciężar ciała	500	505	510
Zestawienie 89	Wzrost	610	615	620
	Ciężar ciała	505	510	515
Zestawienie 90	Wzrost	615	620	625
	Ciężar ciała	510	515	520
Zestawienie 91	Wzrost	620	625	630
	Ciężar ciała	515	520	525
Zestawienie 92	Wzrost	625	630	635
	Ciężar ciała	520	525	530
Zestawienie 93	Wzrost	630	635	640
	Ciężar ciała	525	530	535
Zestawienie 94	Wzrost	635	640	645
	Ciężar ciała	530	535	540
Zestawienie 95	Wzrost	640	645	650
	Ciężar ciała	535	540	545
Zestawienie 96	Wzrost	645	650	655
	Ciężar ciała	540	545	550
Zestawienie 97	Wzrost	650	655	660
	Ciężar ciała	545	550	555
Zestawienie 98	Wzrost	655	660	665
	Ciężar ciała	550	555	560
Zestawienie 99	Wzrost	660	665	670
	Ciężar ciała	555	560	565
Zestawienie 100	Wzrost	665	670	675
	Ciężar ciała	560	565	570

4.4.2. Parametry fizykochemiczne

4.4.2.1. Masa cząsteczkowa

Otrzymane podczas sączenia żelowego frakcje wykazujące aktywność w teście z *p*NPG poddawano elektroforezie SDS-PAGE. Ze względu na niewielką zawartość białka barwienie żeli mieszaniną CBB nie dawało pozytywnych rezultatów. Dopiero zastosowanie techniki barwienia żeli srebrem umożliwiło wizualizację białek po rozdzielach elektroforetycznych. Każdorazowo po wybarwianiu żeli na ścieżkach odpowiadającym poszczególnym frakcjom otrzymywano po kilka prążków białek. Ponieważ srebro, w przeciwieństwie do CBB, nie wiąże się z białkami ilościowo, na podstawie intensywności zabarwienia prążków nie można było stwierdzić, które białko dominuje w analizowanych frakcjach. Porównując żele otrzymane podczas kolejnych doświadczeń zauważono, że na wszystkich powtarza się intensywny prążek odpowiadający masie cząsteczkowej około 65 kDa (Rys. 4.10.). Ponieważ był to jedyny prążek powtarzający się podczas wszystkich doświadczeń przyjęto, że najprawdopodobniej odpowiada on badanemu enzymowi. Prążek ten obserwowano zarówno podczas elektroforezy białek pochodzących z frakcji I, jak i frakcji II, otrzymanych po chromatografii powinowactwa na ConA-Sepharose 4B. Wspiera to wcześniejsze przypuszczenia, że we frakcjach I i II występuje ten sam enzym różniący się stopniem glikozylacji.

Do elektroforez w warunkach niedenaturujących wykorzystywano preparaty białek ścian komórkowych korzeni wydzielonych metodą IWF. Pozycję prążka IGG określano na podstawie barwienia żeli na aktywność enzymatyczną z substratami, które po hydrolizie wypadały z roztworu w postaci barwnych (test z β -D-glukozydem 6-bromo-2-naftolu) lub fluoryzujących (test z MUG) produktów. Obie stosowane metody barwienia dały podobne wyniki. Na żelach obserwowano pojedynczy prążek aktywności IGG. Zabarcenie prążków w obu metodach było jednak krótkotrwałe i zbyt słabe, aby wykonać dokumentację żeli. Wobec tego wartość współczynnika R_f wyznaczano drogą pośrednią. Na podstawie wartości R_f prążków standardów oraz R_f prążków aktywności IGG, uzyskanych podczas rozdzielów na żelach 5%, 6% oraz 7%, wyznaczono masę cząsteczkową natywnego enzymu na około 180 kDa. Obliczenia wykonano według procedury dołączonej przez producenta zestawu białek standardowych. Porównując uzyskaną wartość z wynikiem otrzymanym podczas elektroforezy SDS-PAGE można stwierdzić, że badany enzym jest najprawdopodobniej trimerem.



Rys. 4.10. Analiza SDS-PAGE (żele 10%) frakcji białek wykazujących aktywność IGG uzyskanych po sączeniu żelowym na Sephacryl S-300 HR. Strzałkami oznaczono ścieżki, na które nałożono frakcje o najwyższej aktywności IGG. Sączeniu żelowemu poddano białka: frakcji I (A) oraz frakcji II (B) otrzymanych po chromatografii powinowactwa na ConA-Sepharose 4B. Oba żele wybarwiono srebrem.

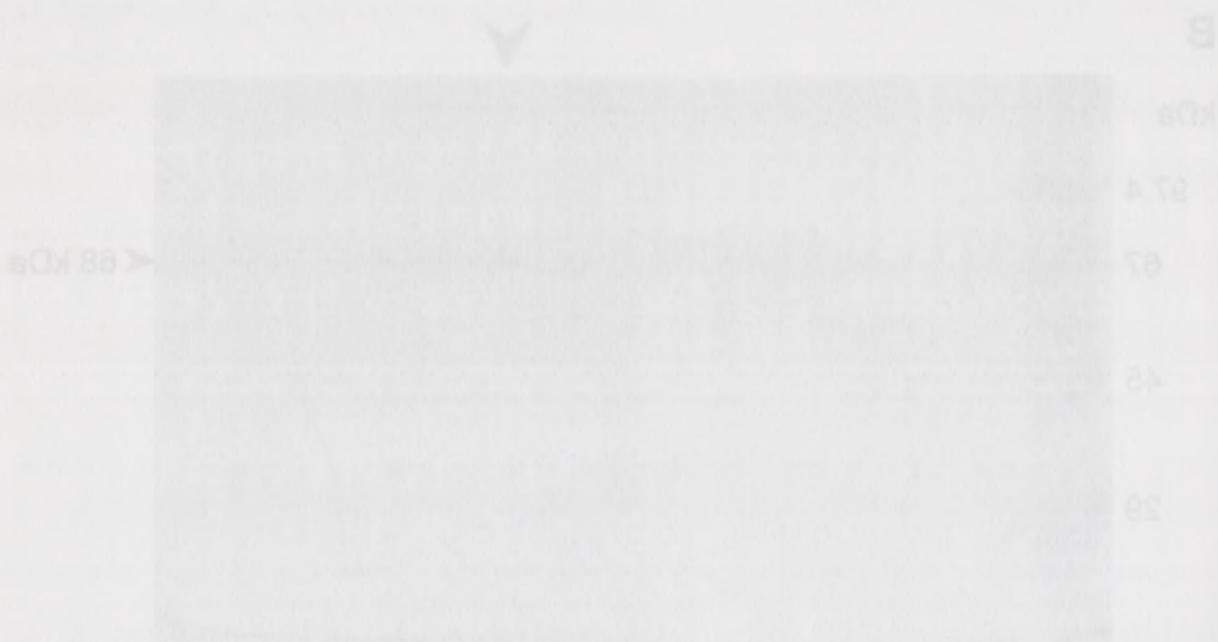
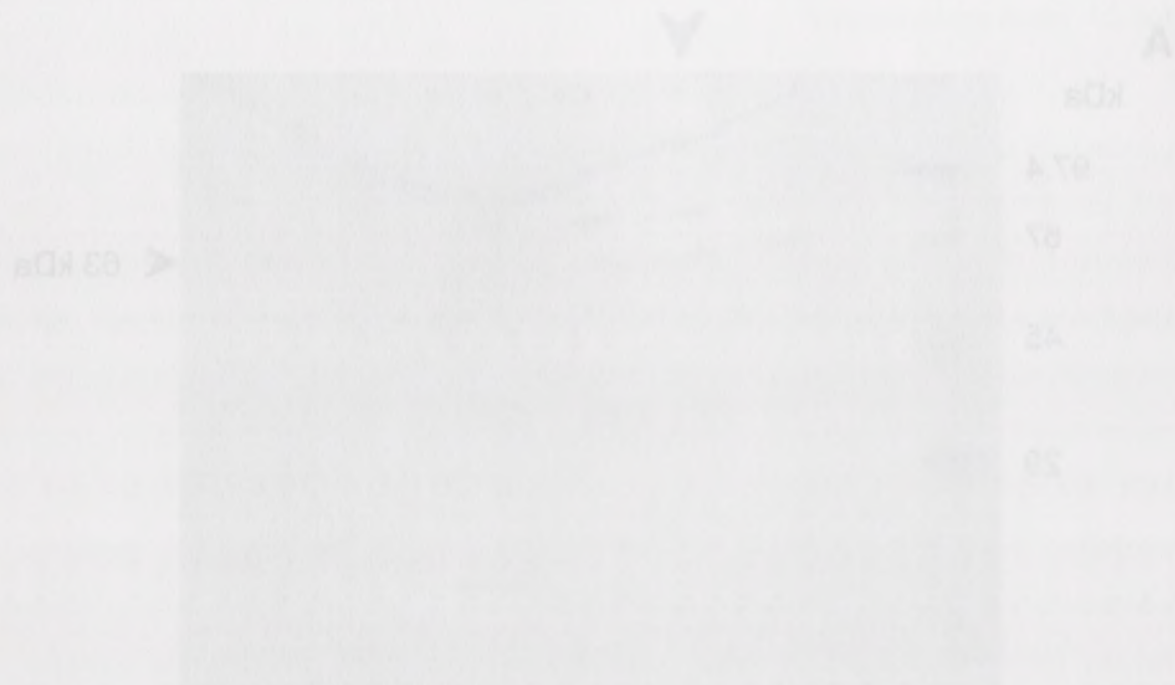
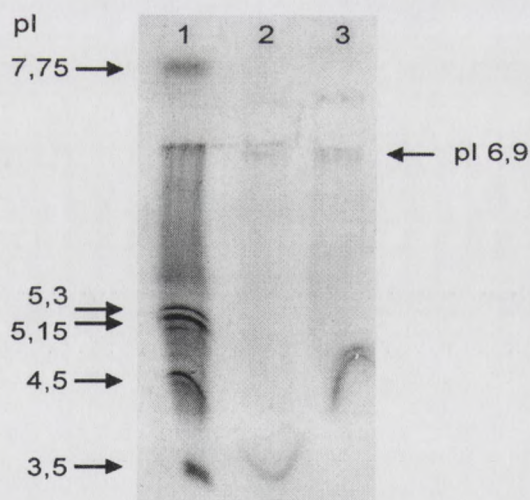


Fig. 4.10. Analiza SDS-PAGE (zrob. 10%) barzji bialek wyizolowanych z karmienia 100 uzskazany po sezonie zimowym na szelkach 2-300 HR. Strukturalni oznaczono detekcji, na karmie nalozono frakcje o roznych wagach 100. Sezonu zimowego podano bialek barzji I (A) oraz barzji II (B) otrzymanych po chowach na CorA-Sepetosa 48. Dla karmie wyizolowano bialek.

Wyniki otrzymane podczas elektroforezy w warunkach niedenaturujących potwierdzone zostały oznaczeniami wykonanymi techniką sączenia żelowego na Sephacryl S-200 HR. Według tej metody masa cząsteczkowa natywnego enzymu została oszacowana na około 200 kDa.

4.4.2.2. Punkt izoelektryczny

Punkt izoelektryczny IGG określono techniką ogniskowania izoelektrycznego, stosując do wybarwienia żeli metodę z β -D-glukozydem 6-bromo-2-naftolu lub MUG. W obu przypadkach otrzymywano pojedynczy prążek aktywności IGG zlokalizowany w tym samym miejscu. Podobnie jednak, jak w przypadku elektroforezy niedenaturującej, wykonanie dokumentacji żeli było bardzo trudne. Dlatego też podczas jednego z doświadczeń żel po ogniskowaniu izoelektrycznym poddano barwieniu na całkowitą pulę białek mieszaniną CBB, a następnie, przez porównanie z żelami barwionymi na aktywność IGG, zidentyfikowano prążek odpowiadający temu enzymowi (Rys. 4.11.). Na podstawie wartości R_f użytych standardów oraz R_f prążka aktywności IGG wartość pI wyznaczono na 6.9.



Rys. 4.11. Ogniskowanie izoelektryczne białek uzyskanych metodą IWF z korzeni łubinu białego. Na ścieżkę 1 naniesiono zestaw standardów, a na ścieżki 2 i 3 próbki białek odpowiadające objętościom 25 μ l lub 50 μ l IWF. Żel wybarwiono mieszaniną CBB. Pozycję prążka IGG określono przez porównanie z żelami barwionymi na aktywność z użyciem β -D-glukozydu 6-bromo-2-naftolu lub β -D-glukozydu 4-metyloumbelliferonu.

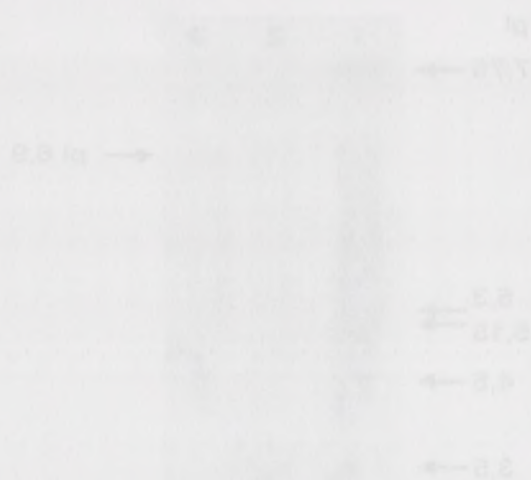
4.4.2.3. Optimum pH

Do oznaczania optimum pH stosowano preparat IGG otrzymany po częściowym oczyszczeniu na kolumnie z CM-celulozą. Test na optimum pH wykonano dwukrotnie w zakresach pH 2.5-9.0 oraz 2.5-6.0 (Rys. 4.12.). Badany preparat enzymatyczny wykazywał

Wyniki oznaczenia podane elektroforetycznie w warunkach niedemansujących potwierdzają
 zostały oznaczenia wykonanymi techniką spektroskopii masowej na 200-250 HR.
 Według tej metody masa cząsteczkowa natężonego roztworu została oszacowana na około
 200 kDa.

4.4.2.3. Punkt izoelektryczny

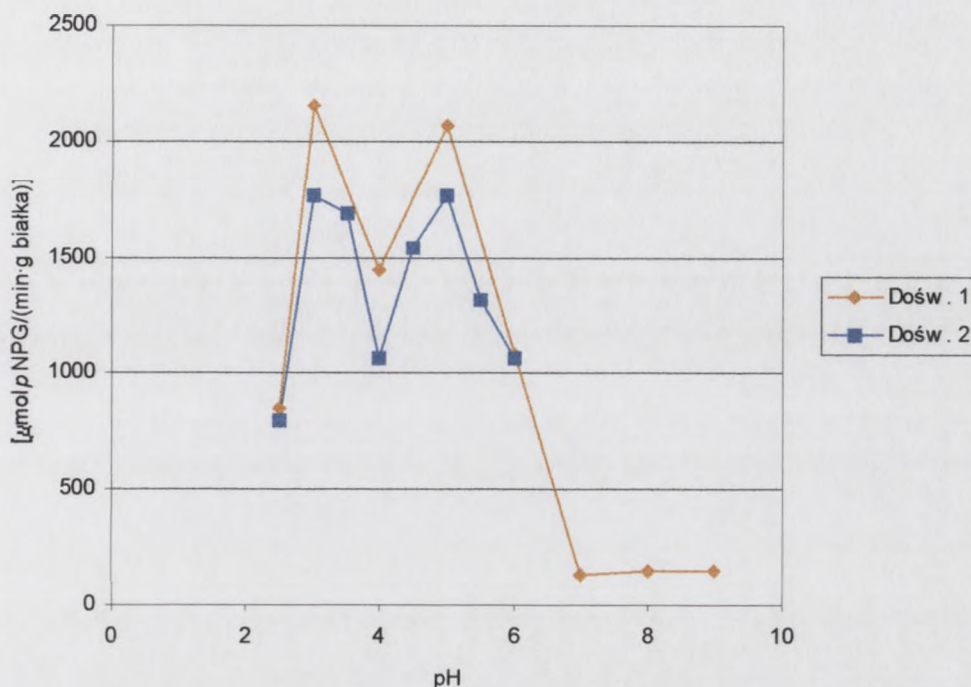
Punkt izoelektryczny IGG określono techniką opisywaną w rozdziale 4.4.2.2. W celu
 do wyznaczenia zmienną metodą z β -D-galaktozydą 6-bromo-2-naftolu lub MUG. W obu
 przypadkach otrzymywano pojedynczy paspek aktywności IGG zlokalizowany w tym samym
 miejscu. Podobnie jednak, jak w przypadku elektroforezy niedemansującej, wykonanie
 dokumentacji zmienną metodą z β -D-galaktozydą 6-bromo-2-naftolu i dowiedzieć się po
 oznaczeniu izoelektrycznym podano barwienie na czarny pół białek mieszaniny CBB,
 a następnie przez porównanie z tabelami barwienia na aktywność IGG, zidentyfikowano
 paspek odpowiadający temu samemu (Rys. 4.11). Na podstawie wartości R uzyskanych
 standardów oraz R-punkta aktywności IGG wartości pI wyznaczono na 6,9.



Rys. 4.11. Oznaczenie izoelektryczne białek uzyskanych metodą IWT z kolumny jodanu
 białego. Pół białek i natężono roztworu standardów z na lewicy 2.5 i 3.5 pI białek odpowiadające
 objętościom 25 i 50 pI IWT. Zmienną metodą mieszaniny CBB. Poziomo paspek IGG określono
 przez porównanie z tabelami barwienia na aktywność z natężeniem β -D-galaktozydu 6-bromo-2-naftolu
 lub β -D-galaktozydu 4-metyloumbutylozemu.

4.4.2.3. Optymum pI

Do oznaczenia optymum pI stosowano preparat IGG uzyskany po czyszczeniu
 odczyszczeniu na kolumnie z CM-cellulozą. Test na optymum pI wykonano dwukrotnie w
 zakresach pI 2.5-6.0 oraz 2.5-6.0 (Rys. 4.12). Badany preparat enzymatyczny wykazywał

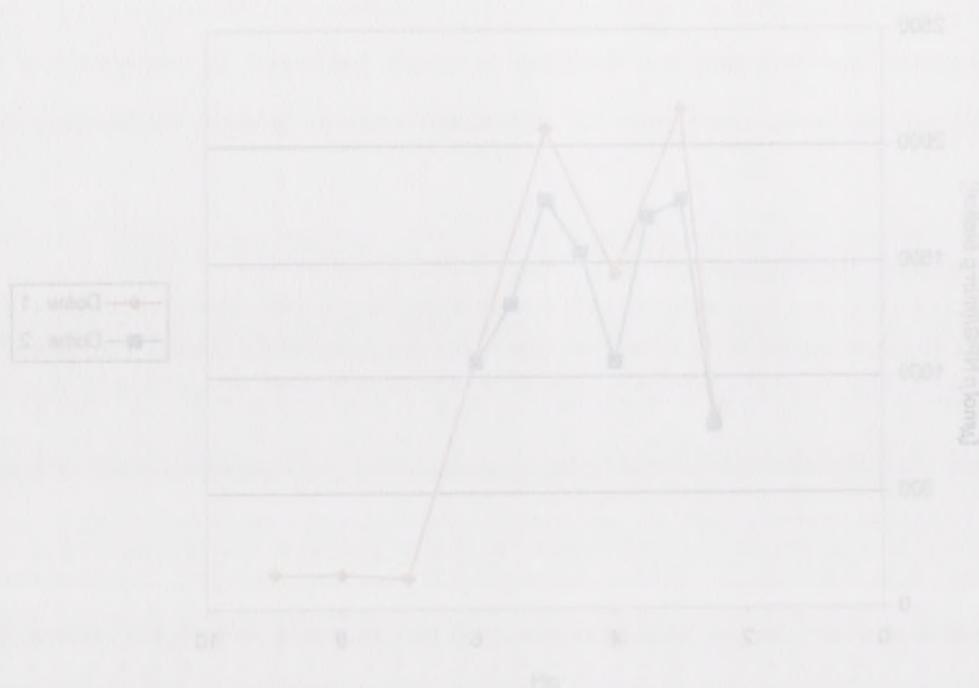


Rys. 4.12. Zmiany aktywności IGG zależne od pH mieszaniny reakcyjnej. Do analiz wykorzystywano preparat IGG uzyskany po chromatografii na kolumnie z CM-celulozą. Prezentowane wyniki są średnimi z dwóch niezależnych pomiarów.

dwa maksima aktywności przy pH 3.0 oraz pH 5.0. Może być to spowodowane występowaniem w preparacie dwóch różnych β -glukozydaz lub dwóch izoform enzymu o aktywności IGG.

4.4.2.4. Specyficzność substratowa

Specyficzność substratową IGG określano wobec szeregu substratów niosących wiązanie glikozydowe. Do analiz wykorzystano preparat IGG po wstępnym oczyszczeniu na kolumnie z CM-celulozą. Stwierdzono, że badany enzym nie hydrolizuje sacharozy, trehalozy oraz rafinozy, czyli tych związków, w których występuje α -anomer glukozy (Rys. 4.13.). Hydrolizie nie uległy również ramnoglukozydy apigeniny i naryngeniny, czyli diglikozydy flawonoidów, w których dostęp do cząsteczki glukozy zablokowany jest przez dodatkową cząsteczkę ramnozy przyłączoną wiązaniem $\alpha(1\rightarrow2)$ (Rys. 4.14.). Pozwala to stwierdzić, że enzym odłącza tylko pojedyncze cząsteczki β -anomerów glukozy z nieredukującego końca łańcucha cukrowego, czyli jest egzo- β -glukozydazą. Wykonany dwukrotnie test enzymatyczny z użyciem gentobiozy jako substratu nie wykazał jednoznacznie, czy enzym hydrolizuje ten związek. Wszystkie pozostałe substraty, w których występował β -anomer

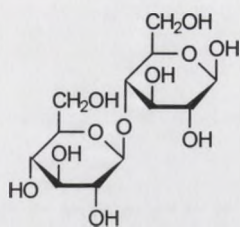


Rys. 4.12. Zmiany aktywności IGG zależnie od pH mieszaniny reakcyjnej. Do analiz wykorzystano preparat IGG otrzymany po chromatografii na kolumnie z CM-celulozą. Porównano wyniki w badaniach z dwoma niezależnymi pomiarami.

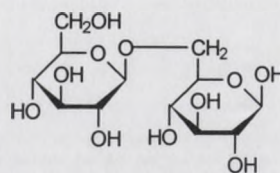
dwie reakcje aktywności przy pH 5,0 oraz pH 5,8. Można być to spowodowane występowaniem w preparacie dwóch różnych β -glukozydaz lub dwóch izoform enzymu o aktywności IGG.

4.4.3.4. Specyficzność substratowa

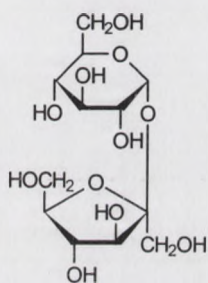
Specyficzność substratową IGG określono wobec szeregu substratów oligosacharydowych. Do analiz wykorzystano preparat IGG po wstępnej oczyszczaniu na kolumnie z CM-celulozą. Stwierdzono, że badany enzym nie hydrolyzuje sacharozy, celulozy oraz innych cząsteczek związków, w których występuje α -anomer glukozy (Rys. 4.13). Hydrolyznie nie ulega również kanonizującym oligosacharydom i nasyconym, cząsteczkom oligosacharydowym, w których dostęp do cząsteczki glukozy zapobiegany jest przez dodatkową cząsteczkę, tzn. niehydrolyzują one (1-2) (Rys. 4.14). Powstało stwierdzenie, że enzym odnosi tylko pojedyncze cząsteczki β -anomerów glukozy z niemożliwością końca łańcucha cukrowego, czyli jest *exo- β -glukozydazą*. Wykonany dwukrotnie test enzymatyczny z systemem gentiozylu jako substratu nie wykazał jednoznacznie, czy enzym hydrolyzuje ten związek. Wszystkie pozostałe substraty, w których występował β -anomer



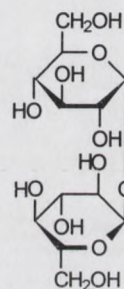
celobioza

4-O- β -D-glukopiranozylo-D-glukoza

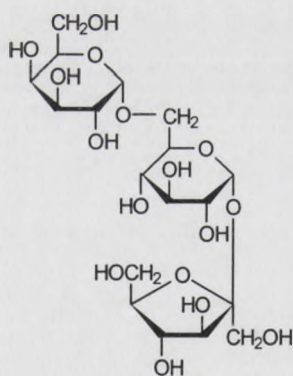
gentobioza

6-O- β -D-glukopiranozylo-D-glukoza

sacharoza

 α -D-glukopiranozylo- β -D-fruktofuranosyl

trehaloza

 α -D-glukopiranozylo- α -D-glukopiranozyd

rafinoza

6-O- α -D-galaktopiranozylo- α -D-glukopiranozylo- β -D-fruktofuranosyl

Rys. 4.13. Struktury oligosacharydów wykorzystywanych do określenia specyficzności substratowej IGG.



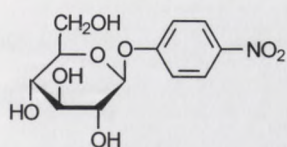
Fig. 1. 4-OH-D-glucose, 1,2:5,6-di-O-isopropylidene-4-OH-D-glucose.



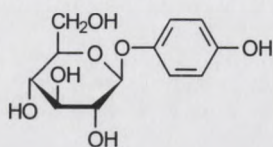
Fig. 2. 4-OH-D-glucose, 1,2:5,6-di-O-isopropylidene-4-OH-D-glucose.

4-OH-D-glucose

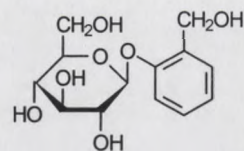
Fig. 1. 4-OH-D-glucose, 1,2:5,6-di-O-isopropylidene-4-OH-D-glucose.



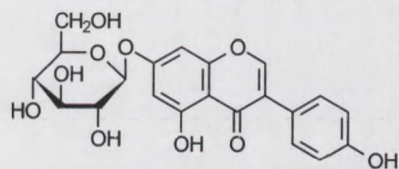
*p*NPG
β-glukozyd *p*-nitrofenolu



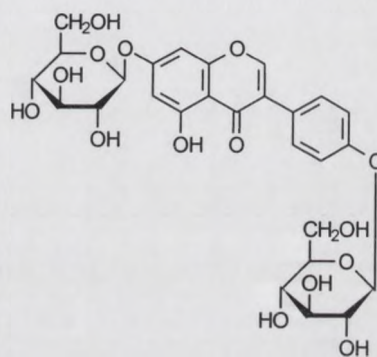
arbutyna
β-glukozyd hydrochinonu



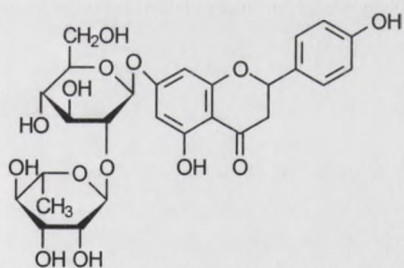
salicyna
β-glukozyd kwasu salicylowego



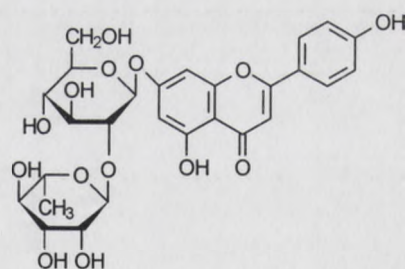
genistyna
7-O-β-glukozyd genisteiny



4',7-O-β-diglukozyd genisteiny

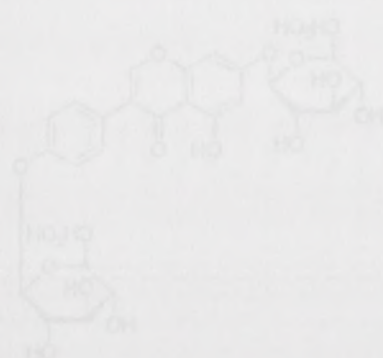
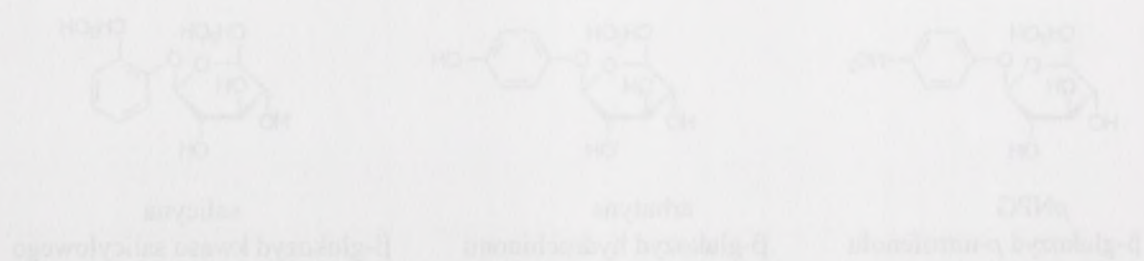


naryngina
7-O-(2''-O-α-ramnozylo)-β-glukozyd
naryngeniny



7-O-(2''-O-α-ramnozylo)-β-glukozyd
apigeniny

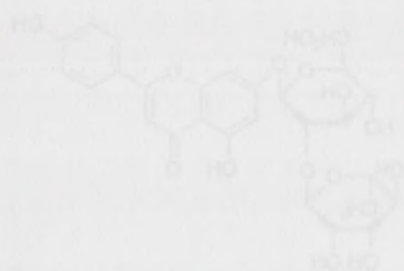
Rys. 4.14. Struktury glikozydów związków fenolowych wykorzystywanych do określenia specyficzności substratowej IGG.



4,7-O-(2-O-galloyl)-β-D-glucopyranoside



4,7-O-(2-O-galloyl)-β-D-glucopyranoside



1-O-(2-O-galloyl)-β-D-glucopyranoside



1-O-(2-O-galloyl)-β-D-glucopyranoside

Fig. 1.14. Struktury glikozydów zawierających resztki kwasu salicylowego do otrzymania pochodnych inhibitorów COX.

glukozy ulegały hydrolizie, a reakcje te wykazywały typową kinetykę Michaelisa-Menten (Rys. 4.15.). Na podstawie uzyskanych wyników obliczono współczynniki K_M oraz V_{max} dla poszczególnych substratów (Tab. 4.5.). Wartości stałych K_M wyznaczone dla *p*NPG, arbutyny, salicyny oraz genistyny są 1-2 rzędy wielkości mniejsze od wartości otrzymanej dla celobiozy, co świadczy o znacznej swoistości β -glukozydazy w stosunku do glukozydów związków fenolowych. Najmniejsze wartości K_M uzyskano dla *p*NPG i arbutyny, natomiast największą wartość K_M ze wszystkich stosowanych w testach glukozydów związków fenolowych stwierdzono dla salicyny. Porównując struktury substratów fenolowych (Rys. 4.14.) można zauważyć, że dwa pierwsze posiadają podstawnik przy pierścieniu fenolowym w pozycji para- w stosunku do wiązania glukozydowego, natomiast w salicynie podstawnik znajduje się w pozycji orto-. Można więc przypuszczać, że podstawnik w pozycji orto- stanowi zawadę przestrzenną, która w znacznym stopniu obniża powinowactwo enzymu do substratu. Genistyna, w której występują podstawniki w obu pozycjach meta- w stosunku do wiązania glukozydowego charakteryzuje się pośrednią wartością K_M .

	K_M [mM]	V_{max} [mmol/(h·mg)]
β -glukozyd <i>p</i> -nitrofenolu	0.14	0.06
β -glukozyd hydrochinonu	0.17	0.015
β -glukozyd alkoholu salicylowego	1.2	0.05
7-O- β -glukozyd genisteiny	0.44	0.05
celobioza	9.9	0.35

Tab. 4.5. Wartości stałej Michaelisa-Menten (K_M) i prędkości maksymalnej reakcji (V_{max}) dla substratów hydrolizowanych przez IGG. Do testów enzymatycznych zastosowano preparat białkowy po wstępnym oczyszczeniu na kolumnie z CM-celulozą.

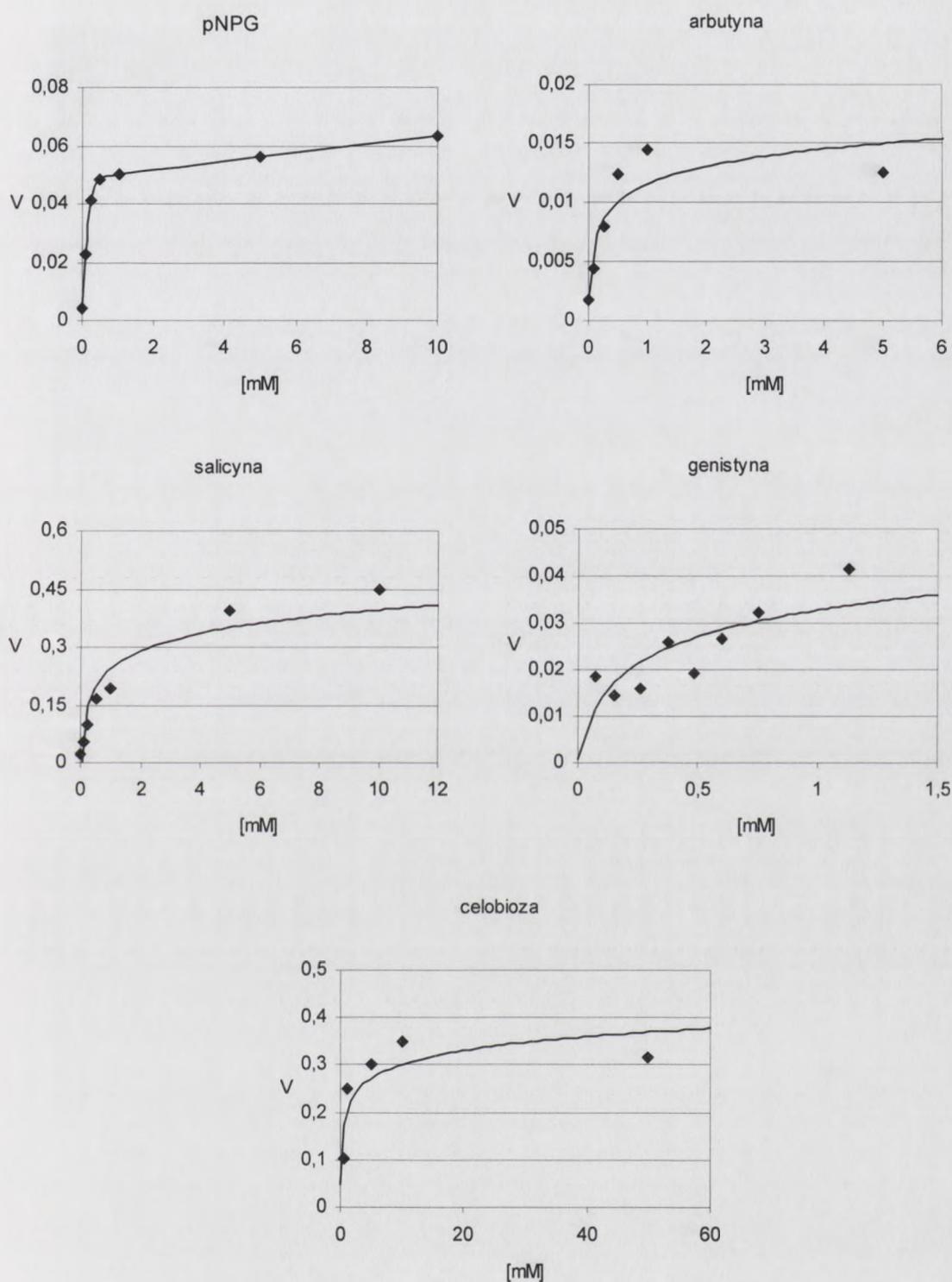
IGG hydrolizowała oba wiązania glukozydowe w 4',7-O- β -diglukozydzie genisteiny (Rys. 4.16.). Przeprowadzona analiza przebiegu czasowego tej reakcji umożliwiła wyciągnięcie kolejnych wniosków. Obserwując zmiany ilości substratu i produktów w czasie hydrolizy można zauważyć, że do około 45 min następuje stosunkowo szybki przyrost ilości monoglukozydu przy jednoczesnym minimalnym wzroście ilości wolnego aglikonu. Po 60 min prędkość przyrostu ilości monoglukozydu maleje, a aglikonu wzrasta. Taka kinetyka reakcji sugeruje, że IGG hydrolizuje preferencyjnie jedno z dwóch wiązań glukozydowych w 4',7-O- β -diglukozydzie genisteiny. Powstały w wyniku tej reakcji monoglukozyd jest hydrolizowany do wolnego aglikonu dopiero wtedy, gdy jego stężenie osiągnie pewną

glukozy, nietylko hydrolyzując, a także ze wykazywaną przez kinetykę Michaelis-Mentana (Rys. 4.12). Na podstawie uzyskanych wyników obliczono współczynniki K_M oraz V_{max} dla poszczególnych substratów (Tab. 4.2.). Wartości stałych K_M wyznaczono dla pNPG, arbutyny, salicylu oraz gemicyny ze 1-2 razy większą precyzją od wartości otrzymanych dla celulozy, co świadczy o znaczącej swoistości β -glukozydazy w stosunku do glukozydów związków fenolowych. Najmniejszą wartość K_M uzyskano dla pNPG i arbutyny, natomiast największą wartość K_M ze wszystkich stosowanych w testach glukozydów związków fenolowych stwierdzono dla salicylu. Porównując strukturę substratów fenolowych (Rys. 4.14) można zauważyć, że dwa pierwsze podstawniki były pięciocząnnymi fenolowymi w postaci par- i meta-izomerów. Można więc przypuszczać, że podstawnik w postaci orto-izomeru zawsze przesuwał kąt w znaczącym stopniu obniżając powinowactwo enzymu do substratu. Geometria, w której występuje podstawnik w obu pozycjach meta- w stosunku do wiązania glukozydowego charakteryzuje się podobną wartością K_M .

V_{max} (nmol(h·mg))	K_M (mM)	
0,06	0,14	β -glukozyd-p-nitrofenolu
0,015	0,17	β -glukozyd hydrochinonu
0,05	1,2	β -glukozyd alkoholu salicylowego
0,05	0,44	1-O- β -glukozyd gemicyny
0,35	9,9	celuloza

Tab. 4.2. Wartości stałej Michaelis-Mentana (K_M) i prędkości maksymalnej reakcji (V_{max}) dla substratów hydroksyfenolowych przez IGD. Do testów enzymatycznych zastosowano preparat bakteryjny po wstępnej oczyszczaniu osadzinami z CM-celulozą.

IGD hydrolyzowała oba wiązania glukozydowe w 4',7-O- β -diglukozydnie gemicynie (Rys. 4.15.). Przeprowadzona analiza przebiegu czasowego tej reakcji umożliwiła wyznaczenie kolejnych wniosków. Obserwując zmiany ilości substratu i produktów w czasie hydrolyzy można zauważyć, że do około 45 min następuje stosunkowo szybki wzrost ilości monoglukozydu przy jednoczesnym minimalnym wzroście ilości wolnego aglikonu. Po 60 min prędkość przyrostu ilości monoglukozydu maleje, a aglikonu wzrasta. Taką kinetykę reakcji sugeruje, że IGD hydrolyzuje preferencyjnie jedno z dwóch wiązań glukozydowych w 4',7-O- β -diglukozydnie gemicynie. Powstały w wyniku tej reakcji monoglukozyd jest hydrolyzowany do wolnego aglikonu dopiero wtedy, gdy jego stężenie osiągnie pewną

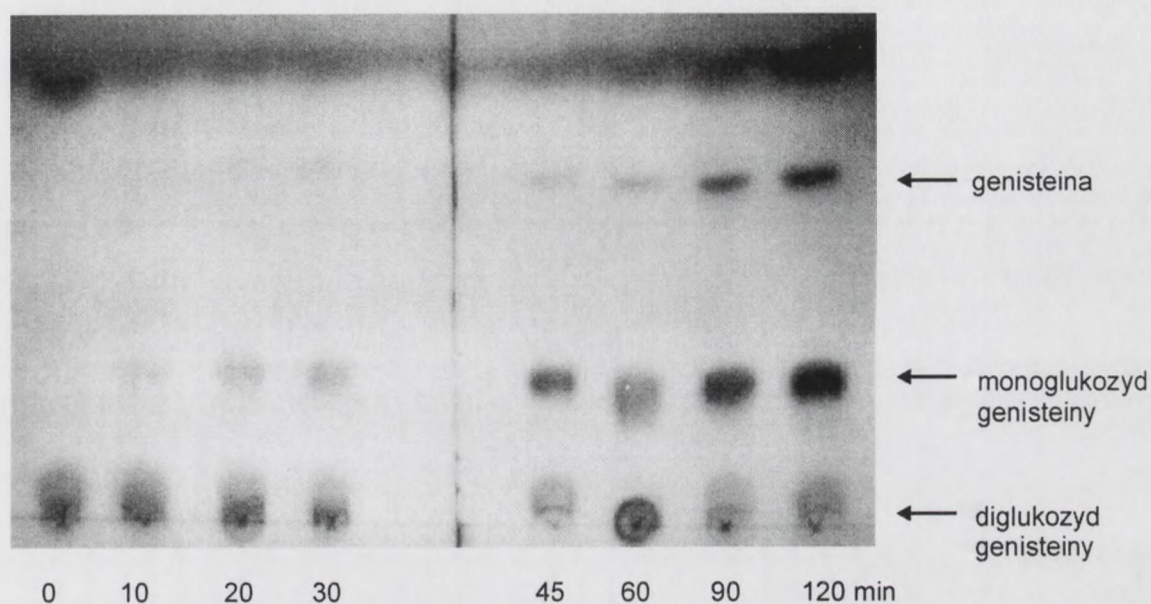


Rys. 4.15. Zależności prędkości reakcji $[\text{mmol}/(\text{h}\cdot\text{mg})]$ od stężeń substratów zastosowanych w testach na specyficzność substratową. Wartości prezentowane na wykresach są średnimi z dwóch niezależnych pomiarów.

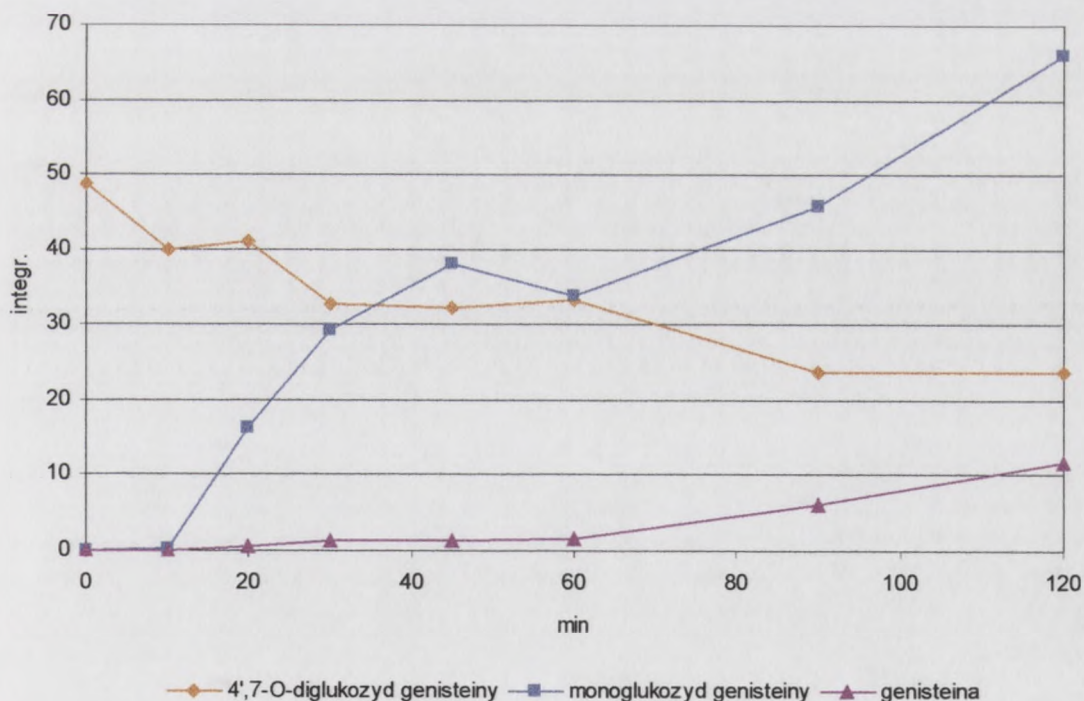


Rys. 4.1.2. Zależności potencjału (mV) od stężenia substancji rozpuszczonej w roztoku na elektrodach selektywnych. Wyniki pomiarów na roztworach o stężeniach od 0,1 do 1,0 mg/ml substancji rozpuszczonej.

A



B



Rys. 4.16. Przebieg czasowy reakcji hydrolizy 4',7-O- β -diglukozydu genisteiny przez preparat IGG uzyskany po chromatografii kolumnowej na CM-celulozie.

A. Rozdział TLC produktów i substratów reakcji wyizolowanych w różnych punktach czasowych.

B. Zmiany ilości di- i monoglukozydów oraz wolnej genisteiny w mieszaninie reakcyjnej określone drogą densytmetrycznej integracji intensywności plamek na płytce po rozdziale TLC.

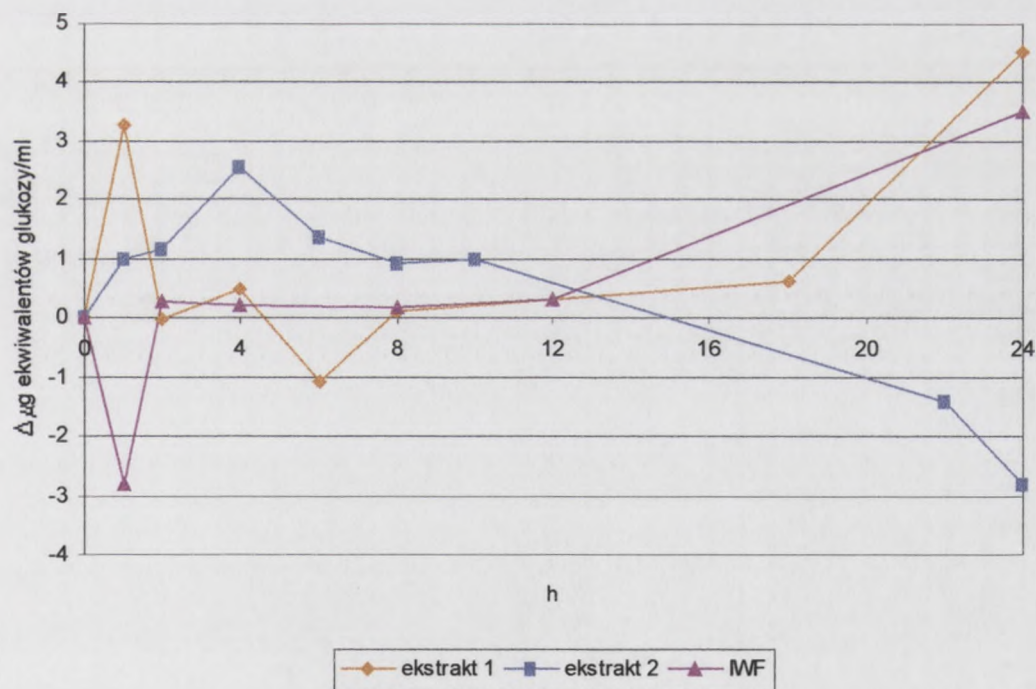


Fig. 1. Effect of pH on the stability of the drug solution. The drug solution was prepared in distilled water at pH 7.5. The pH was adjusted to the desired value by adding 0.1 M HCl or 0.1 M NaOH. The drug solution was stored at 25°C for 24 hours. The concentration of the drug solution was determined by UV spectrophotometry. The results are shown in Table I.

graniczną wartość. Na podstawie uzyskanych wyników nie można jednak stwierdzić, czy najpierw hydrolyzowane jest wiązanie w pozycji 4'-, czy też 7-. Wynika to z faktu, że zastosowane warunki rozdzielania TLC w analizie związków fenolowych w próbkach po teście enzymatycznym nie pozwalają na rozdzielenie 4'-O- β - i 7-O- β -glukozydów genisteiny. Biorąc pod uwagę wcześniejsze wnioski dotyczące wpływu pozycji podstawienia w pierścieniu fenolowym na powinowactwo enzymu do substratu można przypuszczać, że IGG z większą preferencją może hydrolyzować wiązanie w pozycji 4'-. Potwierdzenie tego wniosku wymaga oznaczenia stałej K_M dla 4'-O- β -glukozydu genisteiny, jednak związek ten w łubinie białym występuje w niewielkich ilościach, co znacznie utrudnia uzyskanie odpowiedniej ilości czystego substratu do testów enzymatycznych.

4.4.3. Aktywność hydrolityczna IGG wobec polisacharydów ścian komórkowych

Testy na specyficzność substratową wykazały, że IGG hydrolyzuje celobiozę. Fakt ten w połączeniu z lokalizacją IGG w ścianach komórkowych sugeruje, że enzym ten może



Rys. 4.17. Aktywność hydrolityczna IGG wobec polisacharydów ścian komórkowych określona na podstawie zmian stężeń cukrów redukujących. Oczyszczone ściany komórkowe korzeni inkubowano z płynami apoplastycznymi z korzeni (IWF) lub preparatami IGG ze ścian komórkowych korzeni uzyskanymi na drodze ekstrakcji sekwencyjnej i wstępnie oczyszczonymi podczas chromatografii na CM-celulozie (ekstrakt 1, ekstrakt 2). Każdy z prezentowanych wyników jest średnią dla dwóch niezależnych pomiarów.

Wykres ten przedstawia zmiany w zawartości glikozylacji w czasie. Wyniki te są zgodne z tym, że w czasie trwania badania obserwujemy wzrost w zawartości glikozylacji w czasie. Wyniki te są zgodne z tym, że w czasie trwania badania obserwujemy wzrost w zawartości glikozylacji w czasie. Wyniki te są zgodne z tym, że w czasie trwania badania obserwujemy wzrost w zawartości glikozylacji w czasie.

4.4.3. Aktywność hydrolityczna iG w obecności polimerów iG w celu badania stanu komórek

Testy na specyficzność zabarwienia wykazywały, że iG hydrolizuje celulozę. Fakt ten w połączeniu z lokalizacją iG w komórkach komórek sugeruje, że czynnik ten może

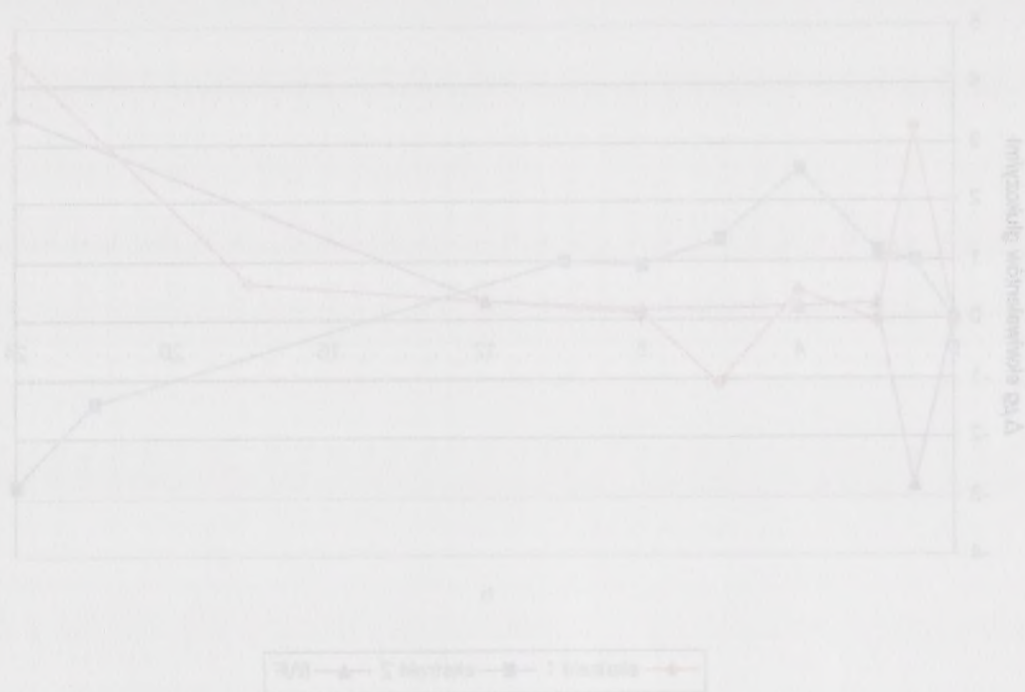


Fig. 4.17. Aktywność hydrolityczna iG w obecności polimerów iG w celu badania stanu komórek. Wykres ten przedstawia zmiany w zawartości glikozylacji w czasie. Wyniki te są zgodne z tym, że w czasie trwania badania obserwujemy wzrost w zawartości glikozylacji w czasie. Wyniki te są zgodne z tym, że w czasie trwania badania obserwujemy wzrost w zawartości glikozylacji w czasie.

w roślinie pełnić funkcje związane z rearanzacją struktury ścian komórkowych. Aby zweryfikować taką hipotezę przeprowadzono doświadczenia, w których określano aktywność hydrolityczną IGG wobec polisacharydów ścian komórkowych. Testy takie wykonano trzykrotnie. W dwóch przypadkach użyto preparatów białek ścian komórkowych korzenia, poddanych wstępnemu oczyszczeniu na kolumnie z CM-celulozą. W trzecim doświadczeniu wykorzystano białka wydzielone metodą IWF. Idea doświadczeń oparta była na założeniu, że hydroliza polisacharydów ścian komórkowych będzie prowadzić do zwiększenia ilości oligomerów cukrowych z wolnym końcem redukującym. Do oznaczania aktywności IGG wykorzystano więc test na cukry redukujące, a oznaczaną wielkością była zmiana ilości ekwiwalentów glukozy w próbce podczas trwania doświadczenia (Rys. 4.17.). Zastosowany test kolorymetryczny wykazał jedynie niewielkie i przypadkowo zmieniające się w czasie wahania stężeń cukrów redukujących w mieszaninach reakcyjnych. Brak znaczących zmian w ilości cukrów redukujących sugeruje, że badany enzym nie hydrolizuje polisacharydów ścian komórkowych. Obserwowane niewielkie wahania stężeń cukrów redukujących mogą być związane z występowaniem w stosowanych preparatach białkowych innych enzymów o aktywności glikohydrolaz.

4.5. KORELACJA AKTYWNOŚCI IGG I PROFILI ZWIĄZKÓW FENOLOWYCH W ROŚLINACH ZDROWYCH LUB PODDANYCH DZIAŁANIU CZYNNIKÓW ŚRODOWISKOWYCH

4.5.1. Profil związków fenolowych w różnych częściach zdrowych roślin

Doświadczenia omawiane w rozdziale 4.3. pokazały, że w łubinie białym aktywność IGG jest tkankowo specyficzna. Interesującym wydawało się pytanie, czy aktywność IGG ma wpływ na profil związków fenolowych w poszczególnych częściach rośliny? Aby to sprawdzić wykonano ekstrakcję związków fenolowych z korzeni, hypokotyli, liścieni i pędów. Uzyskane w ten sposób próbki analizowano stosując technikę TLC (Rys. 4.18.). Stwierdzono, że profil izoflawonoidów w korzeniach charakteryzuje się największą względną zawartością wolnych aglikonów. W liścieniach i pędach względna zawartość wolnych aglikonów jest niewielka, a dominują monoglukozydy izoflawonoidów. Hypokotyl charakteryzuje się najmniejszą całkowitą zawartością związków fenolowych. Zestawiając te wyniki z lokalizacją aktywności IGG w poszczególnych częściach rośliny (Tab. 4.2., Tab. 4.3., Rys. 4.7.) można zauważyć, że w korzeniach, w których stwierdzono najwyższą aktywność enzymu zaobserwowano również największą względną zawartość wolnych aglikonów. W pozostałych

w roślinie pełni funkcję zwrotnicę z transmiterem strasnym ścian komórkowych. Aby zwerzytkować taką hipotezę przeprowadzono doświadczenia w których określano aktywność hydrolyzacyjną IGG wobec polisacharydów ścian komórkowych. Testy takie wykonano tradycyjnie. W dwóch przypadkach użyto preparatów uzyskanych z komórek kandydów, w pozostałych natomiast wykorzystano ekstrakt z komórek z CM-celulozą. W trzech doświadczeniach wykorzystano bliżej wyżej wspomnianą metodę IWT. Idea doświadczeń opiera się na założeniu, że hydrolyza polisacharydów ścian komórkowych będzie prowadziła do zwiększenia ilości oligosacharydów cukrowych z wolnymi końcami redukującymi. Do oznaczenia stężenia IGG wykorzystano więc test na cząstki redukujące, a oznaczenie wielkości było zmianą ilości czwastek glukozy w procesie podzawianiu doświadczenia (rys. 4.17). Zastosowany test kolorymetryczny wykazał jedynie niewielkie i przypadkowe zmniejszenie się w czasie wahań stężenia cukrów redukujących w mieszaninach reakcyjnych. Brak znaczących zmian w ilości cukrów redukujących sugeruje, że badania cząstki nie hydrolyzują polisacharydów ścian komórkowych. Odstawiamy również wahań stężenia cukrów redukujących może być związane z występowaniem w stosowanych preparatach biologicznych innych enzymów o aktywności glicykolizacji.

4.2. KORELACJA AKTYWNOŚCI IGG I PROFILI ZWIĄZKÓW FENOLOWYCH W ROŚLINACH ZDROWYCH LUB PODDAJĄCYCH DZIAŁANIU CZYNNIKÓW ŚRODOWISKOWYCH

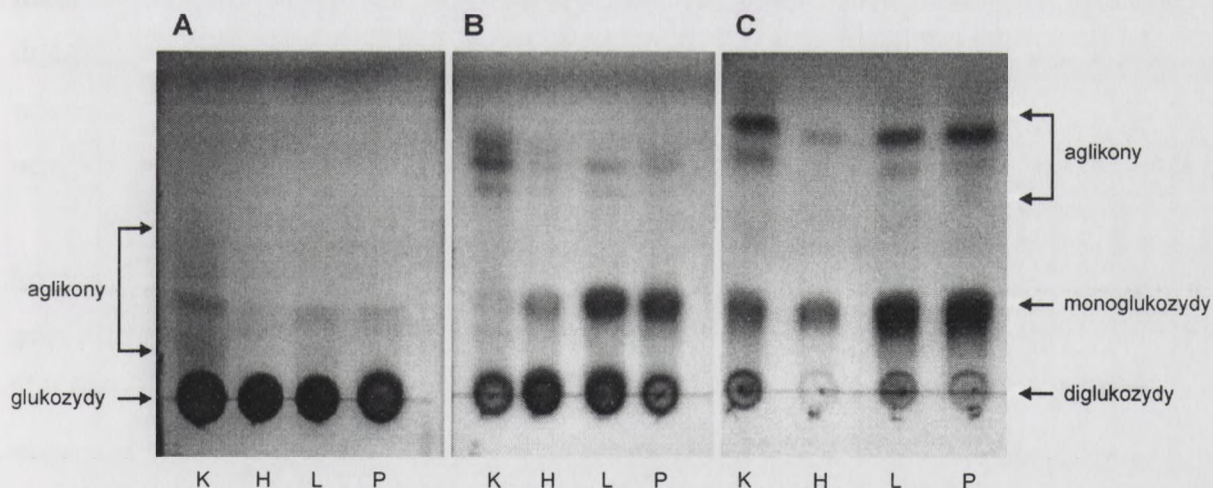
4.2.1. Profil związków fenolowych w różnych częściach zdrowych roślin

Doświadczenia omówione w rozdziale 4.3. pokazały, że w roślinie bliżej wspomnianej IGG jest tkankowo specyficzna. Interesującym wydawało się pytanie, czy aktywność IGG ma wpływ na profil związków fenolowych w poszczególnych częściach rośliny? Aby to sprawdzić wykonano ekstrakty związków fenolowych z korzeni, liści, pędów, liści i pędów. Użytkując w ten sposób metody analizowania standardu techniczne ITC (rys. 4.18). Świadczone, że profil izoflawnonoidów w korzeniach charakteryzuje się największą względnie zawartością woliowych aglikonów. W liściach i pędach względna zawartość woliowych aglikonów jest niewielka, a dominuje manganoliny i izoflawnonoidy. Charakterystyczne są natomiast całkowite zawartości związków fenolowych. Zauważając to wyniki z lokalizacji aktywności IGG w poszczególnych częściach rośliny (Tab. 4.2., Tab. 4.3., rys. 4.7.) można zauważyć, że w korzeniach, w których stwierdzono najwyższą aktywność enzymu zapobiegawaną również największą względnie zawartość woliowych aglikonów. W pozostałych

częściach rośliny, gdzie aktywność IGG jest mniejsza, większy udział w całkowitej puli izoflawonoidów mają glikozydy.

4.5.2. Profil związków fenolowych w IWF

Omówione wcześniej badania wykazały (Rozdz. 4.3.), że IGG jest enzymem zlokalizowanym w ścianach komórkowych łubinu białego. Aby jednak IGG mogła spełniać swoją funkcję, w tym samym przedziale komórki powinny znajdować się wolne związki fenolowe i ich glikozydy. Stosując odpowiednio zmodyfikowaną metodykę otrzymywania płynów apoplastycznych (Rozdz. 4.1.1.) wyizolowano związki fenolowe z przestworów międzykomórkowych korzeni, hypokotyli, liścieni oraz pędów łubinu białego. Na podstawie wykonanych analiz TLC (Rys. 4.18.) stwierdzono, że w przestworach międzykomórkowych wszystkich części roślin występują zarówno aglikony, jak i glikozydy izoflawonoidów. Profil związków fenolowych uzyskanych metodą IWF zbliżony jest do profilu w ekstraktach ze zhomogenizowanej tkanki. Największą względną zawartością aglikonów charakteryzuje się IWF otrzymany z korzeni.



Rys. 4. 18. Profil związków fenolowych w różnych częściach zdrowych roślin łubinu białego. Związki fenolowe izolowano z korzeni (K), hypokotyli (H), liścieni (L) i pędów (P) metodą ekstrakcji w 80% (v/v) MeOH (A i B) lub metodą IWF (C) stosując 20% (v/v) EtOH w 0.1 M NaOAc pH 5.0. Uzyskane w ten sposób próbki poddane były analizie TLC. Płytki rozwijano w fazie CHCl_3 -MeOH (50:2, v/v) (A) oraz CHCl_3 -MeOH- H_2O (40:10:1, v/v/v) (B i C).

4.5.3. Zmiany aktywności IGG w poszczególnych częściach roślin wywołane działaniem elisytora drożdżowego

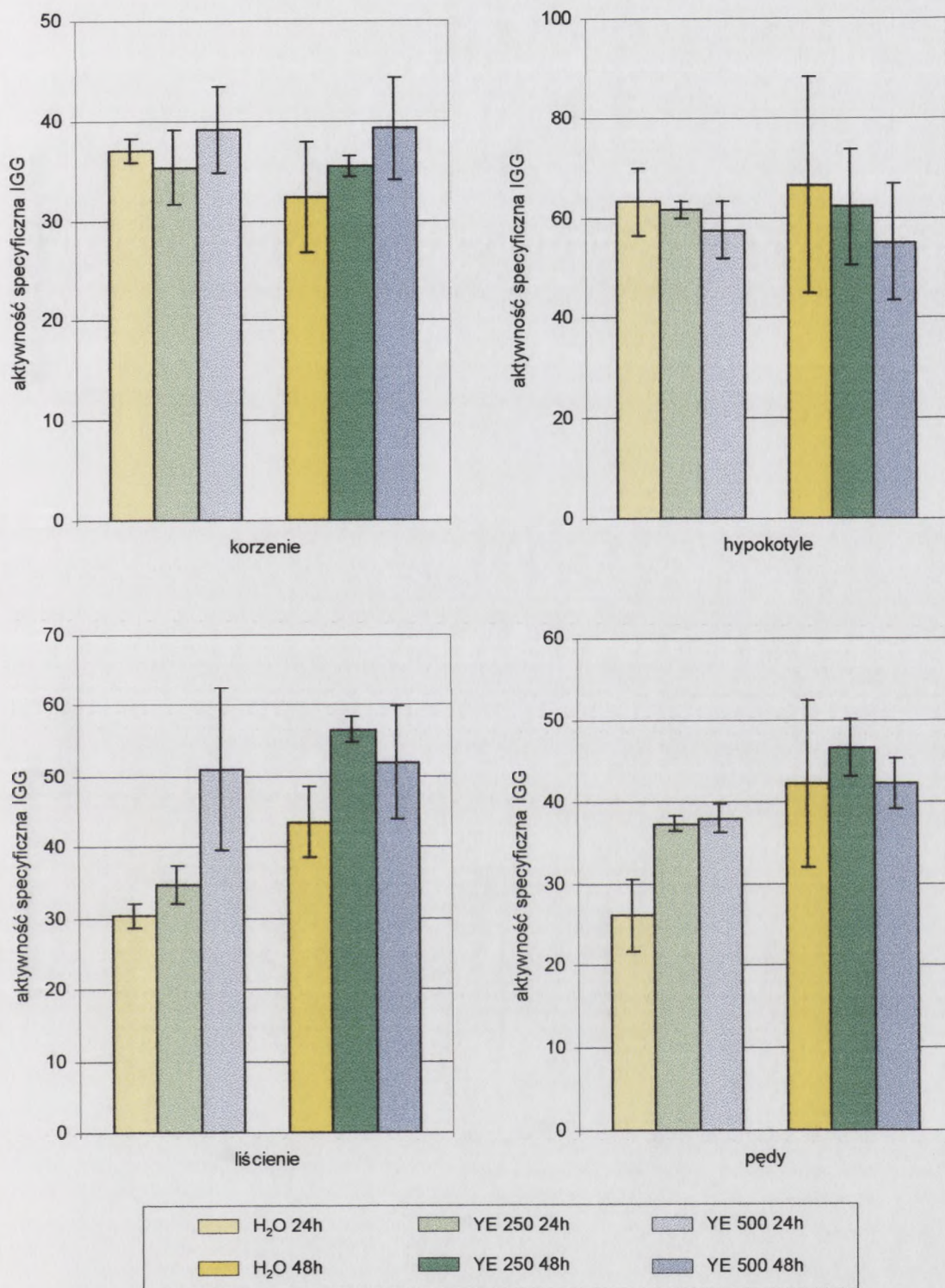
Wyniki przeprowadzonych testów liścieniowych (Rozdz. 4.2.) sugerowały, że IGG bierze udział w reakcjach obronnych aktywowanych przez preparat YE. Hipotezę tą

zweryfikowano w doświadczeniach na 14-dniowych roślinach łubinu białego. Rośliny podlewano roztworami YE o stężeniu 250 lub 500 $\mu\text{g/ml}$, zawierającymi 0.5 mg/ml karbenicyliny. Próbę kontrolną stanowiły rośliny podlewane wodnym roztworem karbenicyliny. Po upływie 24 i 48 h oznaczano aktywność IGG we frakcjach białek cytoplazmatycznych i białek ścian komórkowych, izolowanych z korzeni, hypokotyli, liścieni i pędów. Doświadczenie powtórzono 2-krotnie. Na rysunkach 4.19. i 4.20. przedstawiono średnie wartości aktywności specyficznych IGG, obliczone na podstawie wyników uzyskanych w obu doświadczeniach.

Analizując wyniki uzyskane dla frakcji białek cytoplazmatycznych (Rys. 4.19.) można zauważyć, że po 24 h nastąpił wzrost aktywności IGG w pędach oraz liścieniach roślin elisytowanych. Dla frakcji białek izolowanych z korzeni i hypokotyli po 24 h nie zaobserwowano żadnych istotnych zmian. W przypadku pędów obserwowano wyraźny wzrost przy obu stosowanych stężeniach elisytoru, w liścieniach większe zmiany w aktywności IGG wywołał roztwór YE 500 $\mu\text{g/ml}$. Po 48 h frakcje białek cytoplazmatycznych liścieni roślin elisytowanych nadal charakteryzowały się większą aktywnością specyficzną IGG niż białka izolowane z liścieni kontrolnych. W pędach natomiast nie zaobserwowano żadnych dodatkowych zmian wywołanych elisytacją. Niewielki wzrost aktywności IGG stwierdzono natomiast we frakcji białek cytoplazmatycznych korzeni, jednak z powodu dużych wartości odchyłeń standardowych wynik ten nie jest istotny statystycznie.

Inne zmiany obserwowano w puli białek ścian komórkowych (Rys. 4.20.). Po 24 h w korzeniach roślin elisytowanych zaobserwowano spadek aktywności specyficznej IGG. W pozostałych częściach roślin po upływie tego czasu nie zaobserwowano istotnych zmian. Natomiast po 48 h frakcje białek ścian komórkowych izolowane z korzeni i hypokotyli roślin elisytowanych charakteryzowały się wyższą aktywnością IGG niż odpowiednie frakcje białek z roślin kontrolnych. W liścieniach i pędach nie stwierdzono większych różnic aktywności IGG pomiędzy roślinami elisytowanymi a kontrolnymi.

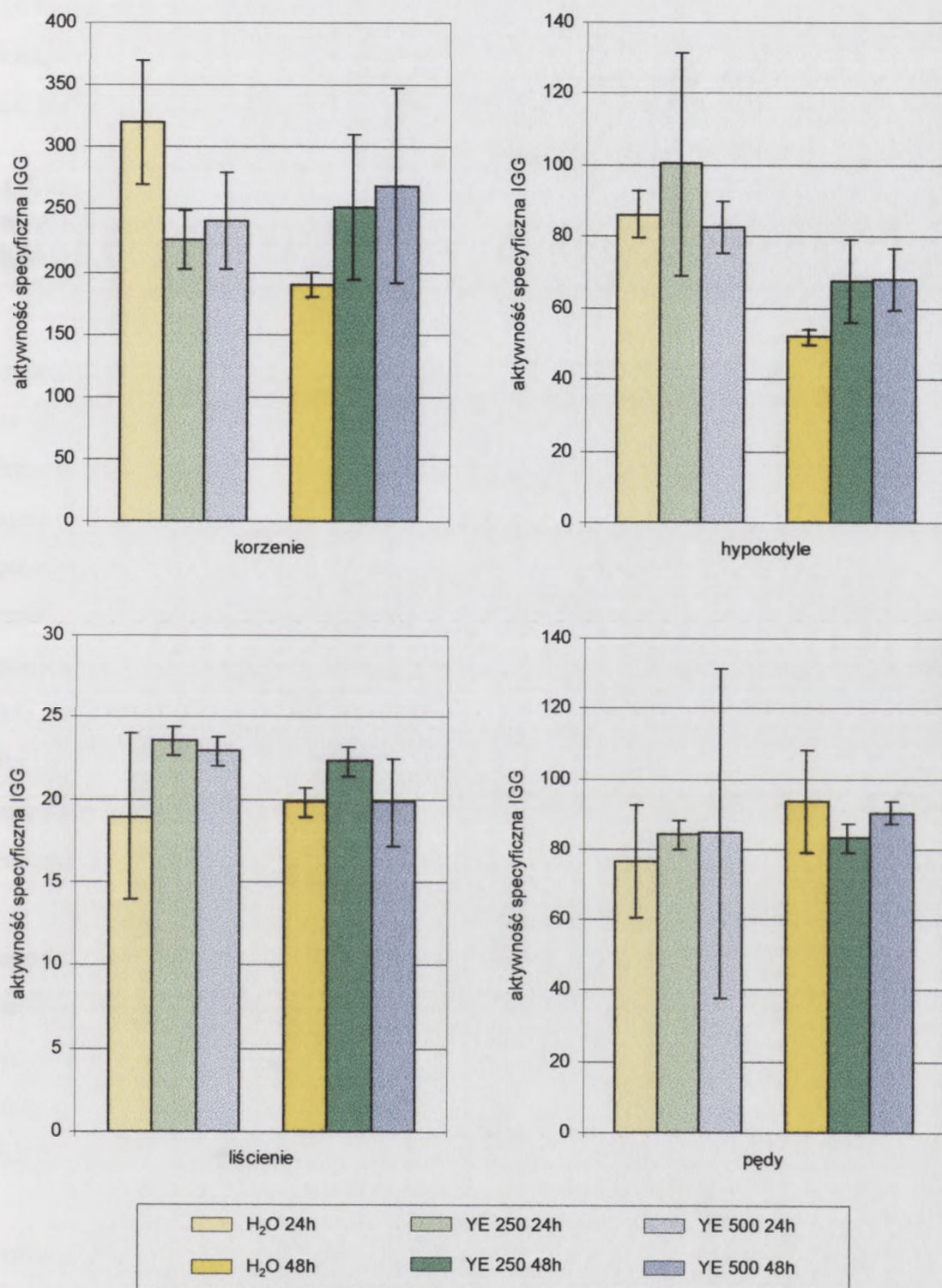
Przy porównaniu wyników uzyskanych po 24 i 48 h zastanawiające wydają się obserwowane zmiany aktywności IGG we frakcjach białek izolowanych z poszczególnych części roślin kontrolnych. W przypadku liścieni i pędów frakcje białek cytoplazmatycznych z roślin kontrolnych po 48 h charakteryzowały się większą aktywnością niż odpowiednie frakcje po 24 h. Natomiast frakcje białek ścian komórkowych izolowane z korzeni i hypokotyli roślin kontrolnych po 48 h posiadały wyraźnie niższą aktywność IGG niż te, które wyizolowano po



Rys 4.19. Zmiany aktywności specyficznej IGG [$\mu\text{mol } p\text{NPG}/(\text{min} \cdot \text{g} \text{ białka})$] wywołane działaniem YE we frakcjach białek cytoplazmatycznych ekstrahowanych z poszczególnych części łubinu białego. Rośliny podlewano roztworami YE o stężeniu 250 lub 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$, kontrolę (H₂O) stanowiły rośliny podlewane wodą. Materiał do izolacji białek pobierano po 24 i 48 h od elisytacji. Prezentowane dane są średnimi z wyników uzyskanych podczas dwóch niezależnych doświadczeń, w których przeprowadzono po dwa pomiary dla każdej próbki.



Fig. 4.19. Zmiany aktywności spektralnej OD1 (funkcja OD1) w czasie dojrzewania wódki i piwa w warunkach fermentacji w temperaturze 24°C i 48°C. Wyniki pomiarów aktywności spektralnej w wódce i piwie w czasie fermentacji w temperaturze 24°C i 48°C. Wyniki pomiarów aktywności spektralnej w wódce i piwie w czasie fermentacji w temperaturze 24°C i 48°C. Wyniki pomiarów aktywności spektralnej w wódce i piwie w czasie fermentacji w temperaturze 24°C i 48°C.



Rys 4.20. Zmiany aktywności specyficznej IGG [$\mu\text{mol pNPG}/(\text{min}\cdot\text{g białka})$] wywołane działaniem YE we frakcjach białek ścian komórkowych ekstrahowanych z poszczególnych części łubinu białego. Rośliny podlewano roztworami YE o stężeniu 250 lub 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$, kontrolę (H₂O) stanowiły rośliny podlewane wodą. Materiał do izolacji białek pobierano po 24 i 48 h od elisytacji. Prezentowane dane są średnimi z wyników uzyskanych podczas dwóch niezależnych doświadczeń, w których przeprowadzono po dwa pomiary dla każdej próbki.



Fig. 4.30. Zmiana aktywności optycznej OD₆₀₀ [międz. PMP(Young Diffus)] wywołana działaniem YE w różnych mediach oraz kombinacjach charakterystycznych z porządkowymi czynniki. Jedno badanie Kelling podważa twierdzenie YE o stężeniu 250 lub 500 µg/ml, kontrola (H₂O) stanowiła kontrolę podważa. Wyniki do testów podważa po 24 i 48 h od chwili. Przetworzone dane są zestawione w tabeli w tabeli podanej poniżej. Wyniki przedstawiono po dwa powtórzenia dla każdego podważa.

24 h. Zmiany te mogą być wywołane dodaną do stosowanych w doświadczeniach roztworów karbenicyliną, której stosunkowo wysokie stężenie (0.5 mg/ml) może być dla roślin czynnikiem stresowym.

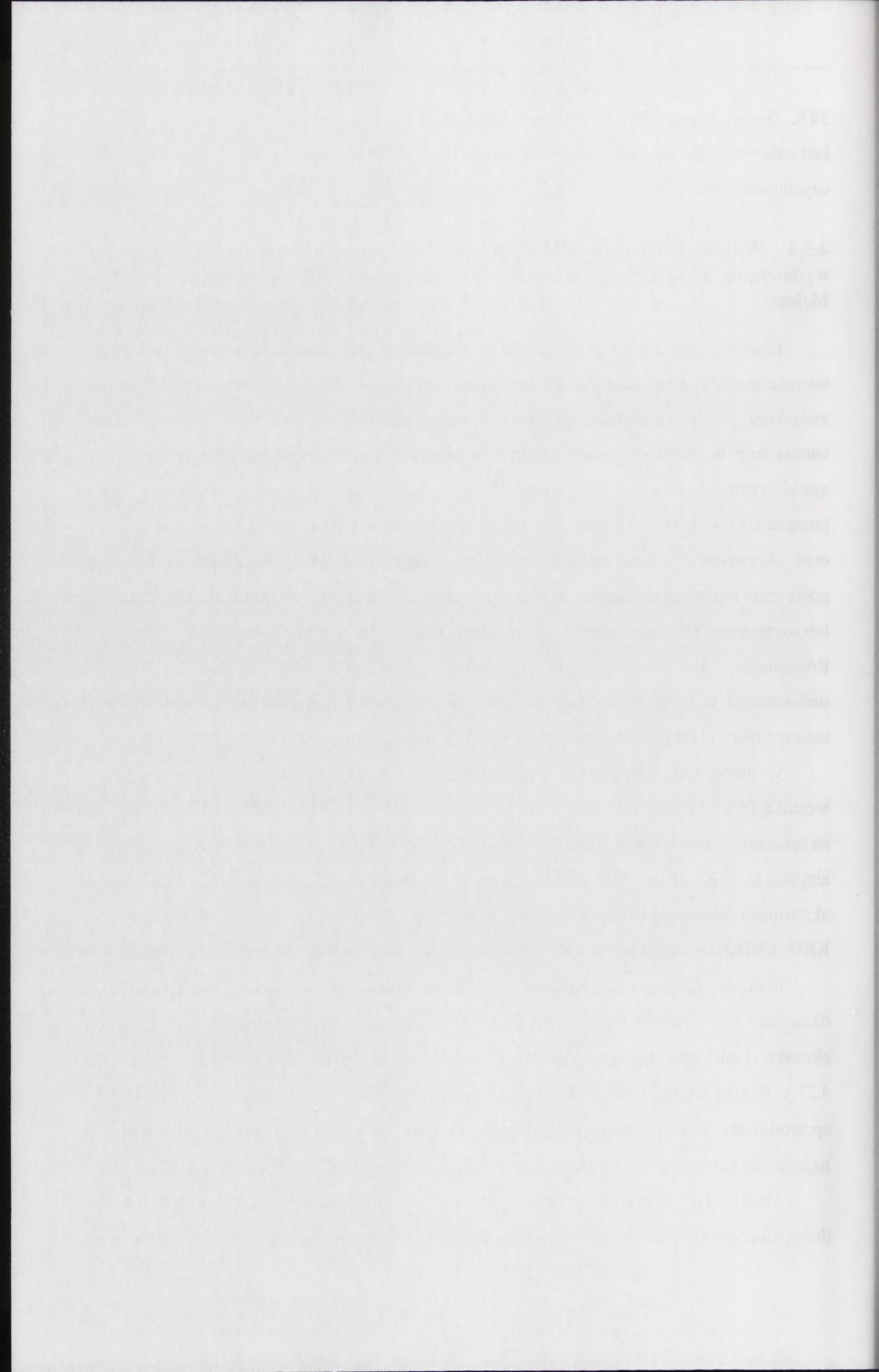
4.5.4. Wpływ preparatu YE oraz różnych form nawożenia azotowego na wydzielanie związków fenolowych oraz aktywność IGG w korzeniach łąbinu białego

Ponieważ największą aktywność IGG stwierdzono w ścianach komórkowych korzenia interesującym wydawało się pytanie, czy enzym ten może mieć udział w regulacji wydzielania związków fenolowych przez korzenie do otoczenia? Wydzielanie takie odgrywać może istotną rolę w oddziaływaniach roślin z mikroorganizmami, zarówno patogennymi, jak i symbiotycznymi. Dlatego też przeprowadzono doświadczenia, w których badano wpływ preparatu YE oraz różnych form nawożenia azotowego na wydzielanie związków fenolowych oraz aktywność IGG w korzeniach łąbinu białego. W doświadczeniach tych rośliny podlewano roztworami różnych form azotu: 9 mM KNO₃, 15 mM NH₄NO₃, 5 mM (NH₄)₂SO₄ lub roztworem YE o stężeniu 250 µg/ml. Jako kontrolę stosowano rośliny podlewane wodą. Równolegle, dla celów analizy wydzielanych związków fenolowych, część roślin umieszczano w kolbach, w których znajdowały się wyżej wymienione roztwory. Po 24 h rośliny zbierano i poddawano analizie. Doświadczenia takie powtarzano 2-krotnie.

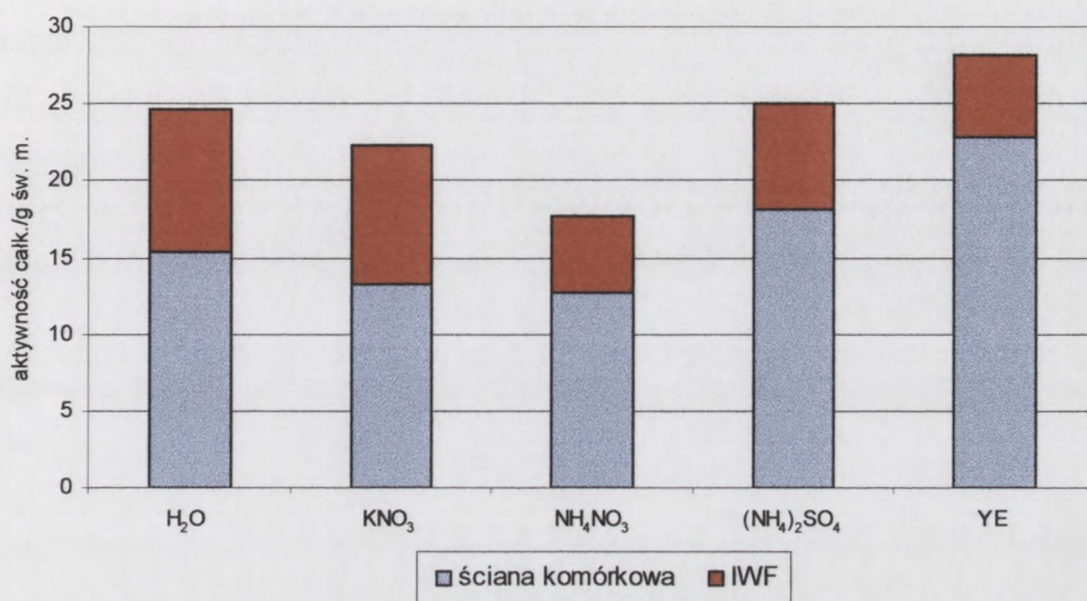
W pierwszym doświadczeniu (doświadczenie I) białka z korzeni izolowano najpierw techniką IWF, a następnie z tego samego materiału ekstrahowano pozostałe białka związane ze ścianami komórkowymi. Dla uzyskanych w ten sposób frakcji białek oznaczono całkowitą aktywność IGG (Rys. 4.21.). Stwierdzono, że preparat YE wywołał niewielki wzrost aktywności całkowitej badanego enzymu. Natomiast korzenie roślin podlewanych roztworami KNO₃ i NH₄NO₃ charakteryzowały się mniejszą aktywnością IGG niż korzenie kontrolne.

Podczas drugiego doświadczenia (doświadczenie II) aktywność całkowitą IGG oznaczano we frakcjach białek ścian komórkowych wyizolowanych metodą IWF i podczas ekstrakcji sekwencyjnej oraz dodatkowo we frakcjach białek cytoplazmatycznych (Rys. 4.21.). W tym wypadku stwierdzono, że zarówno wszystkie formy azotu, jak i preparat YE spowodowały wzrost całkowitej aktywności badanego enzymu w korzeniach. Wyraźnie największą aktywnością IGG charakteryzowały się korzenie roślin nawożonych KNO₃.

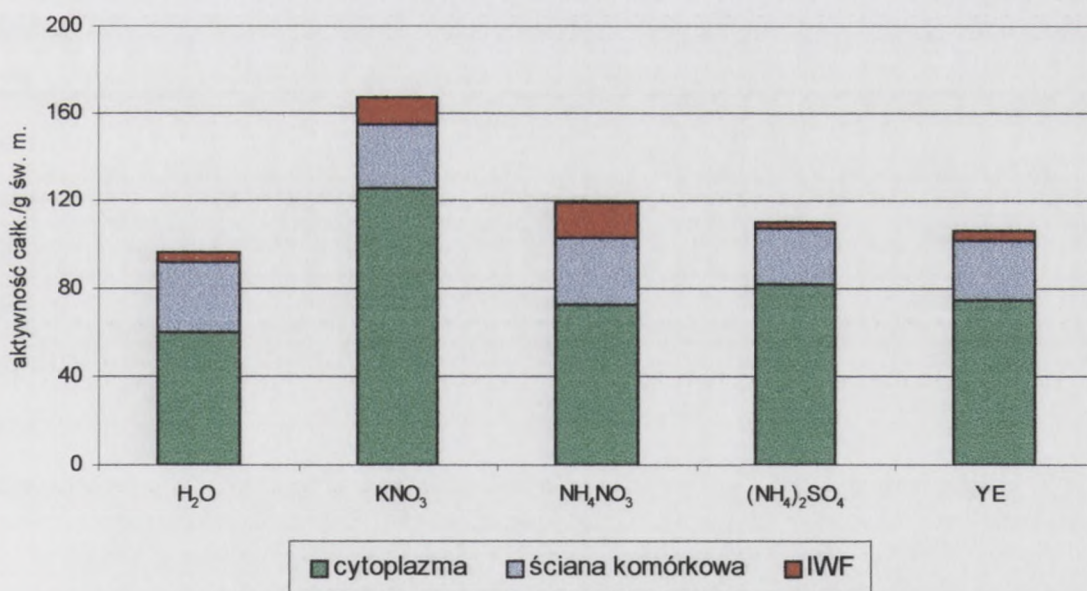
Analizy HPLC próbek związków fenolowych wydzielanych przez korzenie podczas doświadczenia I wykazały, że w wydzielinach występują głównie aglikony izoflawonoidów,



Doświadczenie I

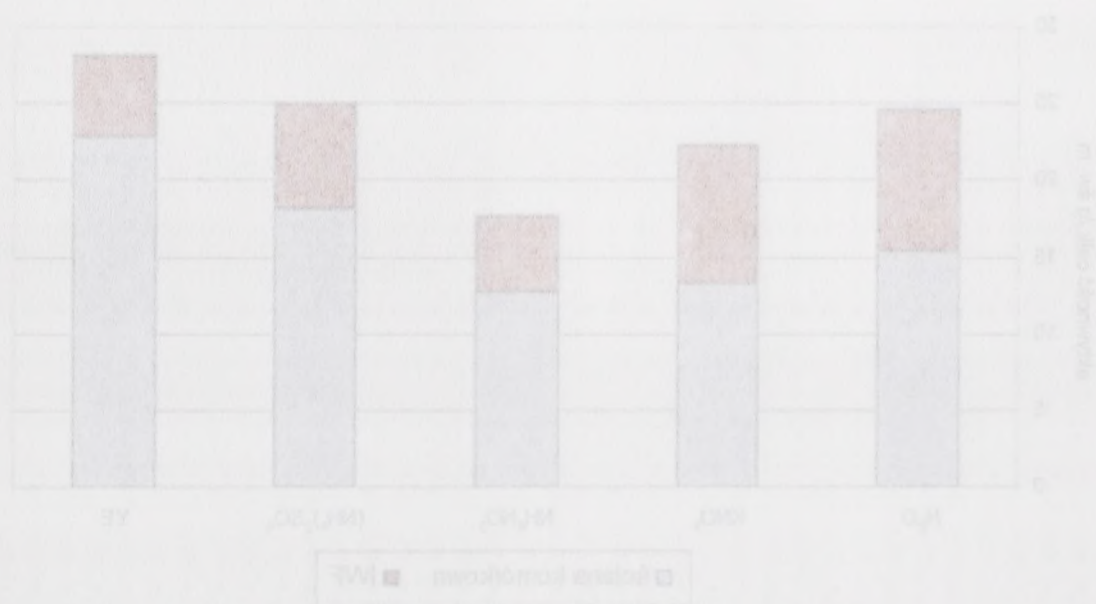


Doświadczenie II



Rys. 4.21. Zmiany całkowitej aktywności IGG [$\mu\text{mol pNPG}/\text{min}$] w korzeniach łubinu białego wywołane różnymi warunkami nawożenia azotowego oraz działaniem preparatu YE. Podczas dwóch niezależnych doświadczeń rośliny podlewane roztworami różnych form azotu: 9 mM KNO₃, 15 mM NH₄NO₃, 5 mM (NH₄)₂SO₄ lub roztworem YE o stężeniu 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$, kontrolę (H₂O) stanowiły rośliny podlewane wodą. Po 24 h aktywność IGG określano: w doświadczeniu I - dla płynów apoplastycznych i dla pozostałych wyekstrahowanych białek ścian komórkowych, w doświadczeniu II - dla płynów apoplastycznych, dla pozostałych wyekstrahowanych białek ścian komórkowych oraz dla białek cytoplazmatycznych. Prezentowane dane są średnimi z dwóch niezależnych pomiarów.

Dobudowa I



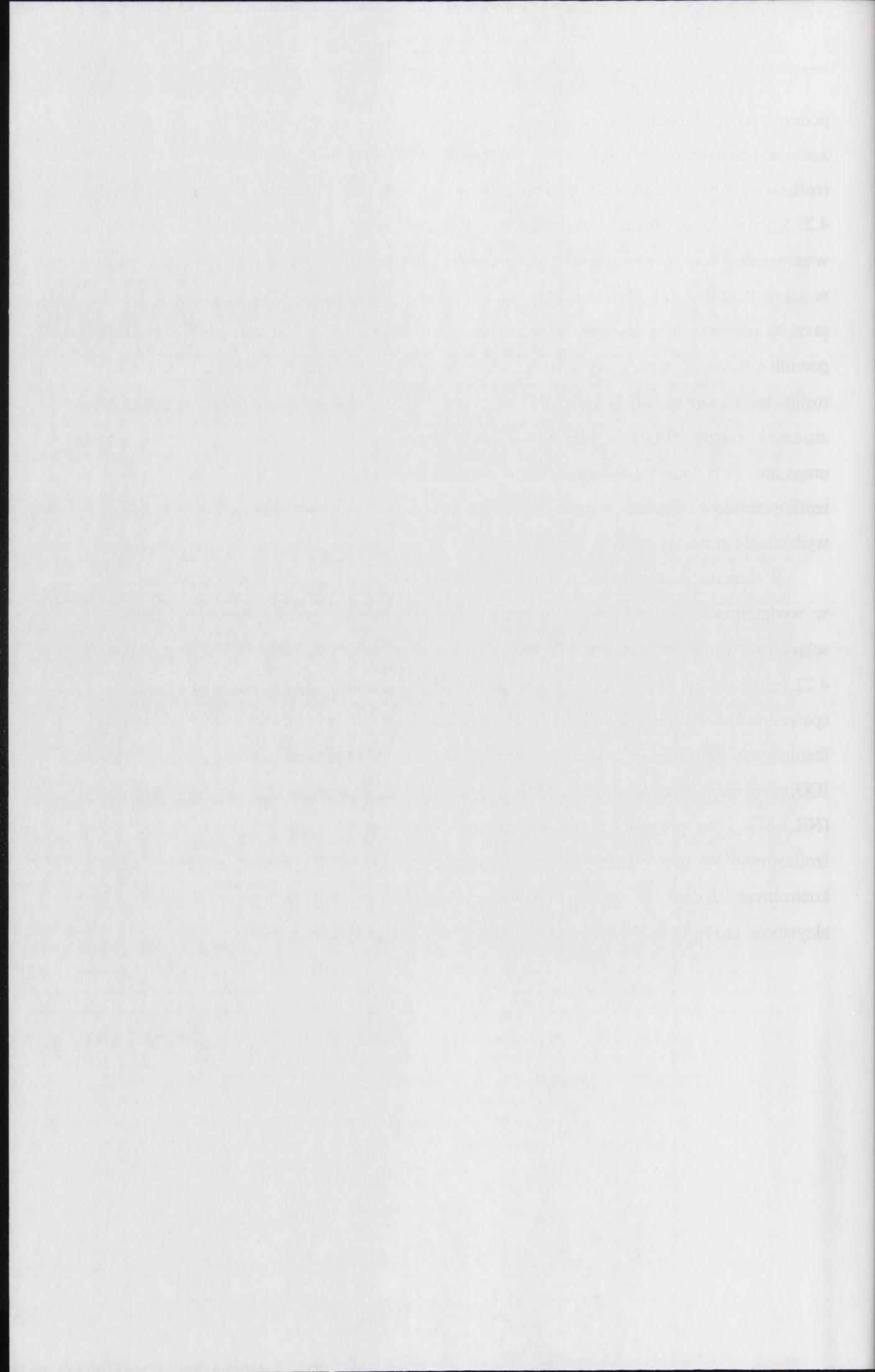
Dobudowa II



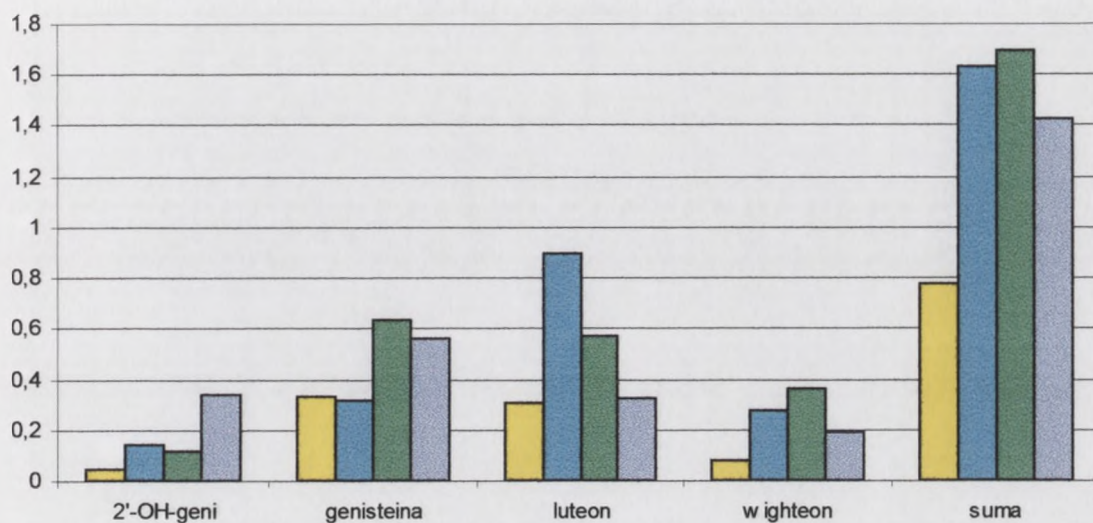
Wykres przedstawia wyniki pomiarów liczby komórek w koloniach bakterii (kolonia komarkowa) oraz w koloniach WFL (Włoczek) dla pięciu różnych linii komórkowych (YE, WFL, WFL, WFL, WFL) w dwóch warunkach (Dobudowa I i Dobudowa II). Wyniki przedstawiono w postaci wykresów słupkowych, gdzie każdy słupek składa się z dwóch części: dolnej części reprezentującej liczbę komórek w kolonii komarkowej (ciemnoniebieski) oraz górnej części reprezentującej liczbę komórek w kolonii WFL (szary). Wyniki są podane w tabeli poniżej.

podczas gdy glikozydy obecne są jedynie w śladowych ilościach. Stwierdzono ponad to, że zarówno nawożenie azotowe, jak i preparat YE mają wpływ na ilość wydzielanych izoflawonoidów. Wszystkie zastosowane formy azotu wywołały istotny wzrost sekrecji (Rys. 4.22.), jednak zdecydowanie największe wydzielanie związków fenolowych zaobserwowano w przypadku korzeni zanurzonych w roztworze elisytora (Rys. 4.23.). Obserwowane zmiany w sekrecji izoflawonoidów nie były skorelowane z aktywnością IGG (Rys. 4.21.). Gdyby przyjęta hipoteza była słuszna, to w korzeniach roślin nawożonych różnymi formami azotu powinien nastąpić spadek wydzielania wolnych aglikonów. Podobne różnice widoczne są u roślin traktowanych elisytorem, gdzie niewielkiej zmianie aktywności IGG towarzyszy znaczący wzrost ilości wydzielonych izoflawonoidów. Dla roślin poddanych działaniu preparatu YE zaobserwowano zarówno wzrost aktywności IGG, jak i sekrecji izoflawonoidów. Jednak różnica w aktywności enzymu była niewielka, podczas gdy wydzielanie zmieniło się w sposób znaczący.

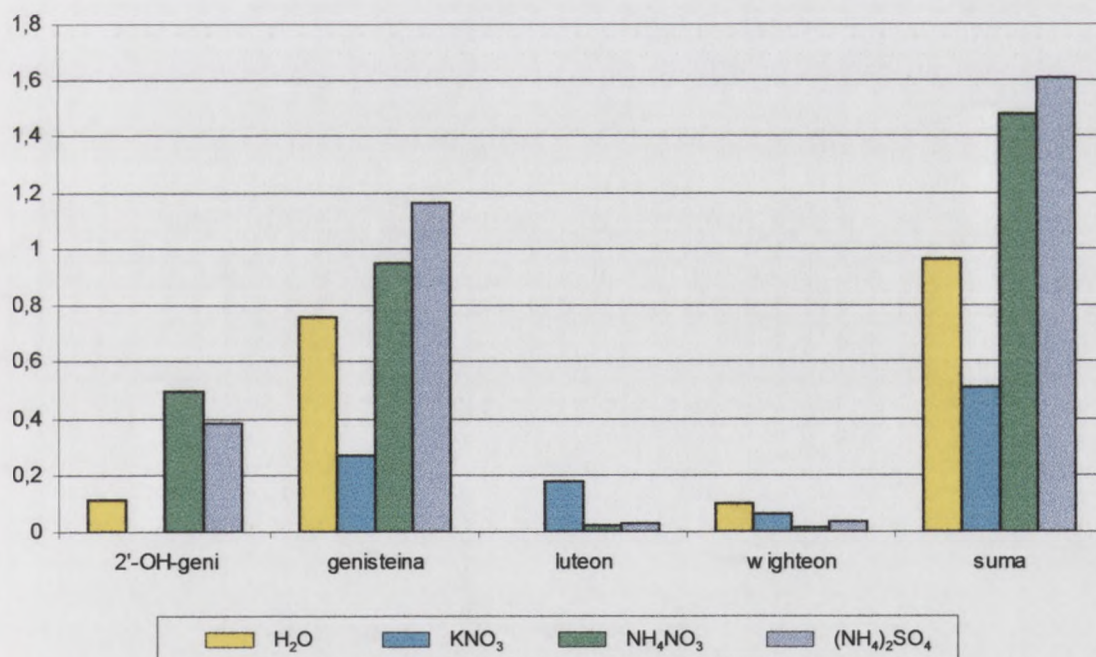
Wykonane w doświadczeniu II analizy HPLC potwierdziły wcześniejszą obserwację, że w wydzielinach korzeniowych występują głównie aglikony izoflawonoidów. Zmiany w sekrecji wywołane preparatem YE (Rys. 4.23.) oraz nawożeniem NH_4NO_3 i $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (Rys. 4.22.) zbliżone były do wyników uzyskanych w doświadczeniu I. Natomiast nawożenie KNO_3 spowodowało spadek, a nie, jak w doświadczeniu I wzrost wydzielania związków fenolowych. Podobnie, nie udało się zaobserwować wyraźnej korelacji pomiędzy aktywnością IGG, a sekrecją związków fenolowych. Korzenie roślin podlewanych roztworami NH_4NO_3 i $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ oraz preparatem YE charakteryzują się zarówno zwiększonym wydzielaniem izoflawonoidów, jak i podwyższoną aktywnością całkowitą IGG w porównaniu do roślin kontrolnych. Jednak w roślinach nawożonych KNO_3 , w których stwierdzono największą aktywność enzymu, zaobserwowano najniższą sekrecję izoflawonoidów.



Doświadczenie I



Doświadczenie II



Rys. 4.22. Zmiany w wydzielaniu związków fenolowych przez korzenie łubinu białego wywołane różnymi warunkami nawożenia azotowego. Podczas dwóch niezależnych doświadczeń rośliny umieszczano na 24 h w kolbach, w których znajdowały się następujące roztwory: 9 mM KNO₃, 15 mM NH₄NO₃ oraz 5 mM (NH₄)₂SO₄, kontrolę (H₂O) stanowiły rośliny, których korzenie zanurzone były w wodzie. Otrzymane próbki wydzielonych związków fenolowych analizowano metodą HPLC. Ilość poszczególnych flawonoidów określano jako stosunek powierzchni pików danego związku do powierzchni pików standardu wewnętrznego (kwas *p*-hydroksybenzoesowy).

Dowieszenie I

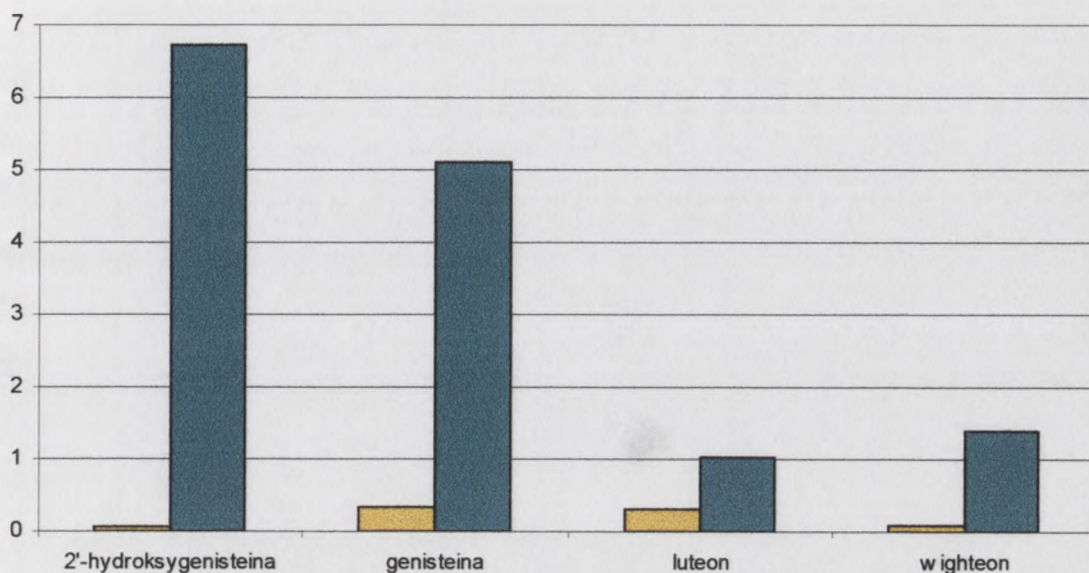


Dowieszenie II

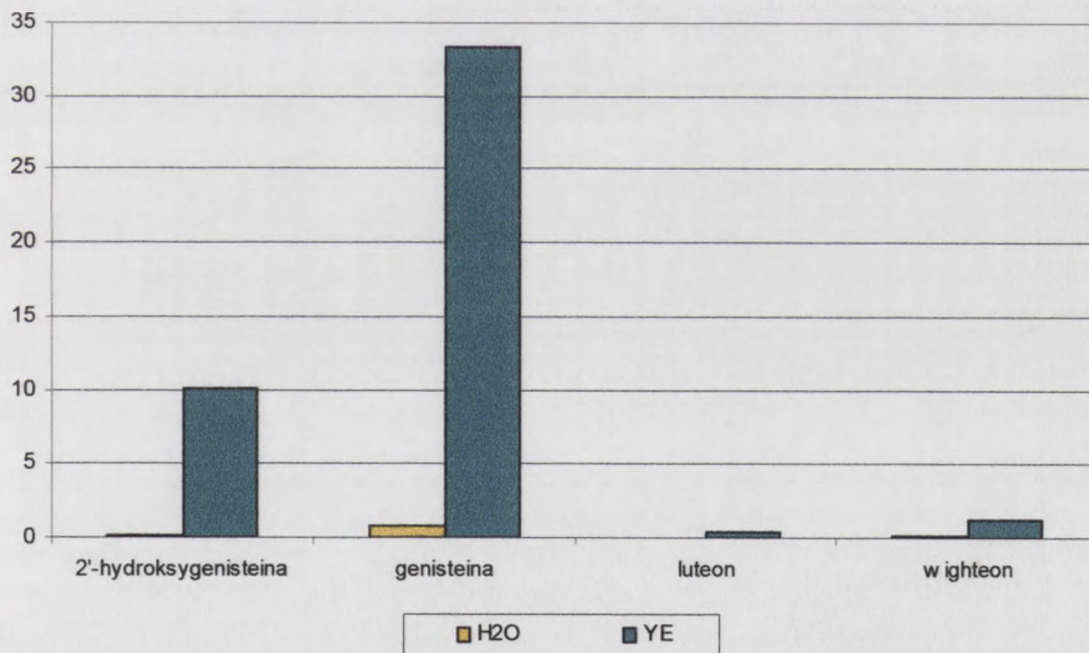


Wykres 1. Wyniki w badaniach w zakresie wpływu technologicznych procesów produkcyjnych na środowisko naturalne. Wyniki badań w zakresie wpływu na środowisko naturalne (średnia arytmetyczna) dla poszczególnych etapów technologicznych (I-IV) w skali od 0 do 1,5. Wyniki badań w zakresie wpływu na środowisko naturalne (średnia arytmetyczna) dla poszczególnych etapów technologicznych (I-IV) w skali od 0 do 1,5. Wyniki badań w zakresie wpływu na środowisko naturalne (średnia arytmetyczna) dla poszczególnych etapów technologicznych (I-IV) w skali od 0 do 1,5.

Doświadczenie I

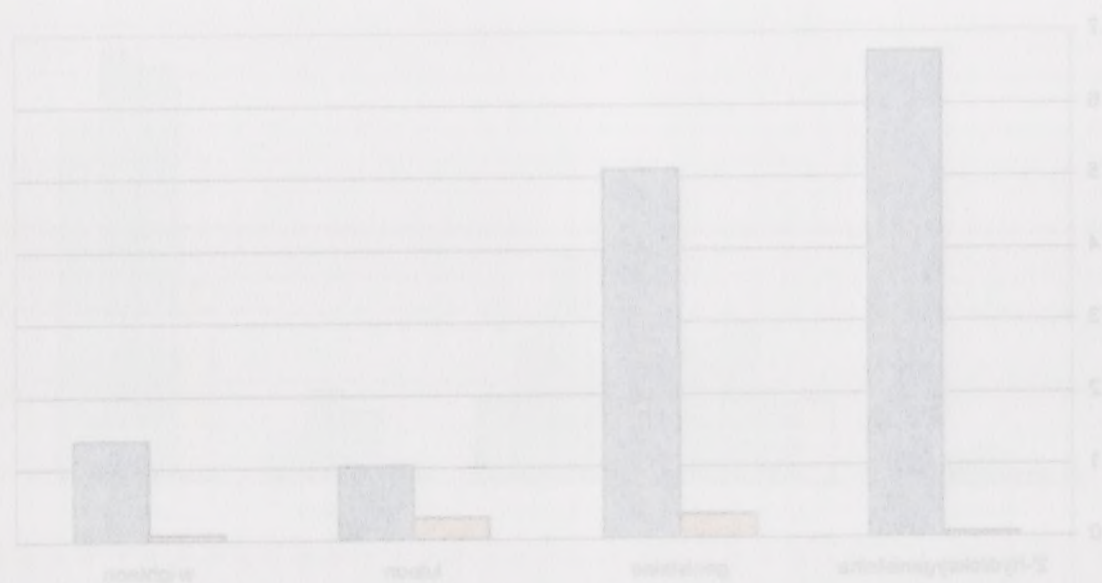


Doświadczenie II

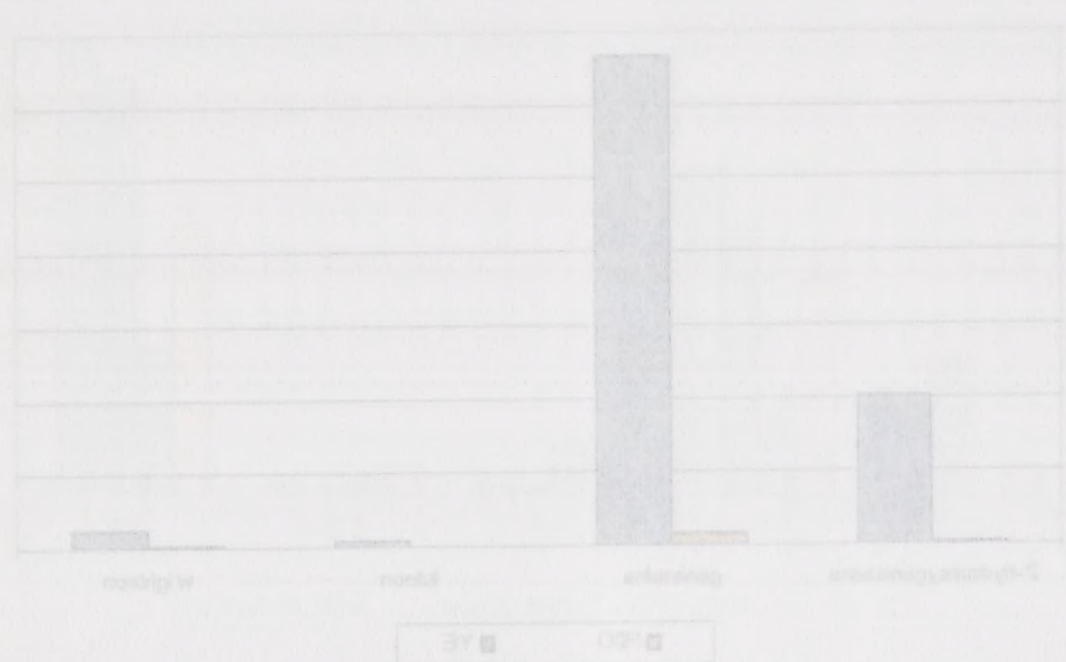


Rys. 4.23. Zmiany w wydzielaniu związków fenolowych przez korzenie łubinu białego wywołane działaniem YE. Podczas dwóch niezależnych doświadczeń rośliny umieszczano na 24 h w kolbach z roztworem YE o stężeniu 250 $\mu\text{g/ml}$, kontrolę (H_2O) stanowiły rośliny, których korzenie zanurzone były w wodzie. Otrzymane próbki wydzielonych związków fenolowych analizowano metodą HPLC. Ilość poszczególnych flawonoidów określano jako stosunek powierzchni piku danego związku do powierzchni piku standardu wewnętrznego (kwas *p*-hydroksybenzoesowy).

Doświadczenie I



Doświadczenie II



Rys. 4.52. Zmiany w wydajności zwłoków trawianych przez kaczki łabie podczas wywołania działania YF. Łabie dwa tygodnie przed rozpoczęciem badania umieszczono na 24 h w klatkach z nastawionym YF o stężeniu 250 mg/ml. Kontrolę (D0) stanowiły kaczki, które nie zostały zainfekowane YF. Wyniki wykładają zwłoków trawianych umieszczono w klatkach. Liczba zwłoków trawianych jako średnia powiększona pięć razy (wartości na osi pionowej reprezentują liczbę zwłoków trawianych w klatkach).

5. DYSKUSJA

Enzymy hydrolizujące β -glukozydy flawonoidów były już niejednokrotnie obiektem badań. Istnieje kilka doniesień na temat izolacji i charakterystyki fizykochemicznej białek o podobnej aktywności. Niektóre badania nad aktywnością i funkcją związków fenolowych w roślinach pośrednio wskazują na rolę, jaką te enzymy mogą odgrywać w oddziaływaniach z mikroorganizmami patogennymi i symbiotycznymi. Jak dotąd jednak nie przeprowadzono badań, które jednoczyłyby poznane właściwości fizykochemiczne enzymu z analizą roli, jaką IGG może odgrywać w roślinie. Prezentowane w niniejszej rozprawie wyniki są próbą takiego właśnie podejścia kompleksowego, które w połączeniu z danymi na temat izoflawonoidów w łubinie białym zmierza do określenia roli IGG w oddziaływaniach rośliny ze środowiskiem.

Dyskusję wyników podzielono na cztery zasadnicze części. W pierwszej omówiono zagadnienia związane z aktywnością biologiczną preparatu YE. Następnie przedstawiono badania lokalizacji tkankowej i subkomórkowej enzymu i jego substratów oraz właściwości fizykochemicznych IGG na tle wyników dotyczących innych enzymów o podobnej specyficzności substratowej. W ostatniej części omówiono wyniki testów biologicznych przeprowadzonych na siewkach łubinu i wskazano na rolę, jaką β -glukozydaza może odgrywać w oddziaływaniach łubinu z mikroorganizmami patogennymi i symbiotycznymi.

5.1. AKTYWNOŚĆ PREPARATU YE

Preparaty elisytarów z drożdży były już stosowane podczas badań prowadzonych przez różne zespoły (Basse & Boller 1992, Mackenbrock i współpr. 1993, Song i współpr. 1995, Yamamoto i współpr. 1995, Gagnon & Ibrahim 1997), jednak nie były to preparaty otrzymywane z oczyszczonych ścian komórkowych. We wszystkich tych przypadkach jako preparat elisytora stosowano komercyjnie dostępny autolizat drożdży (Yeast Extract). Elisytor ze ścian komórkowych tych grzybów, oczyszczonych według zmodyfikowanej procedury opisanej przez Hahna i współpr. (1992), po raz pierwszy został otrzymany i scharakteryzowany w Pracowni Fitochemii (Wojtaszek & Stobiecki 1997). Przeprowadzone wówczas analizy wykazały, że około 8% uzyskanego preparatu stanowią aminokwasy, natomiast na pozostałą część składają się cukry, w tym di- i trisacharydy oraz oligosacharydy o wyższym stopniu polimeryzacji. Wśród aminokwasów dominowały Ser i Gly, natomiast główne zidentyfikowane podjednostki cukrowe to glukoza i mannoza, stanowiące razem około 80% całkowitej puli cukrów. Taki właśnie skład monosacharydowy jest

charakterystyczny dla ścian komórkowych drożdży (Bulawa 1993). Preparat YE, wykorzystany w doświadczeniach opisanych w niniejszej pracy, został również otrzymany z oczyszczonych ścian komórkowych drożdży. Na podstawie wykonanych analiz TLC (Rys. 4.2.) można stwierdzić, że skład aminokwasowy i cukrowy uzyskanego preparatu jest podobny, jak w przypadku preparatu scharakteryzowanego przez Wojtaszka i Stobieckiego (1997).

Do określenia aktywności uzyskanego preparatu YE zastosowano test liścieniowy, który jest klasycznym testem używanym do badań nad aktywnością elisytarów, w których określa się zdolność elisytarów do indukcji syntezy fitoaleksyn (Ayers i współpr. 1976). Jest on stosunkowo prosty w przygotowaniu i daje jednoznaczne wyniki oparte na nieskomplikowanej metodzie analitycznej jaką jest pomiar absorbancji. W trakcie prowadzonych badań stwierdzono, że w przypadku łubinu białego wybór liścieni do testów z YE ma dodatkowe zalety, związane z charakterystycznym profilem konstytutywnych związków fenolowych (Rys. 4.18.). W liścieniach łubinu białego obserwuje się niską względną zawartość wolnych aglikonów izoflawonoidów, co prawdopodobnie ułatwia wykrycie, zmian w wydzielaniu i akumulacji tych związków wywołanych działaniem YE. W przypadku korzeni, które posiadają znacznie więcej wolnych aglikonów izoflawonoidów (Rys. 4.18.), wydzielanie tych związków wywołane samym zranieniem jest na tyle intensywne, że analizując tylko profil związków fenolowych nie można rozróżnić reakcji na zranienie i reakcji obronnych uruchamianych działaniem elisytora (Cosio i współpr. 1996).

Przeprowadzone testy liścieniowe wykazały, że uzyskany preparat YE wykazuje aktywność biologiczną. Świadczy o tym, wywołany działaniem preparatu, wzrost zawartości izoflawonoidów w dyfuzatach zbieranych z miejsca zranienia liścieni (Rys. 4.3., Rys. 4.4.). Należy zaznaczyć, że zarówno intensywność, jak i kinetyka wydzielania izoflawonoidów zależne są od zastosowanego stężenia YE. Trudno jest powiedzieć, które cząsteczki obecne w preparacie są odpowiedzialne za tą aktywność. Sugerować można dwie możliwości. Badania prowadzone na zawieszinowych hodowlach pomidora (Basse & Boller 1992) i pręśli dwukłosowej (*Ephedra distachya* L.) (Song i współpr. 1995) oraz na kalusach *Sophora flavescens* (Yamamoto i współpr. 1995) wykazały, że aktywność komercyjnych autolizatów drożdżowych związana jest z glikopeptydami zawierającymi mannozę lub z oligomannanami. Nie wiadomo jednak, czy w błonach komórkowych łubinu znajdują się receptory tego typu cząsteczek. Drugą możliwość sugerują badania prowadzone przez Cosio i współpr. (1996), którzy stwierdzili, że we frakcji mikrosomalnej uzyskanej z korzeni łubinu białego znajdują

Wskazywany jest na to, że w tym czasie
oczekiwano, iż w tym czasie
4.2) można było oczekiwać, iż
podobny, jak w tym czasie
(1907)

Do chwili obecnej
jest klasyczny, jak
się zdawało, że
stanowisko, jak
niezależnie, jak
prowadzone, jak
YE ma dobitnie
zwłaszcza, jak
względnie, jak
względnie, jak
przebieg, jak
(1907) 4.18) względnie, jak
intencyjnie, jak
zwiększenie i

Przebieg, jak
aktywność, jak
izolowanych, jak
Ważny, jak
zależnie, jak
preparacie, jak
prowadzone, jak
dwudziestu, jak
dwa, jak
nie, jak
wygłoszone, jak
nie, jak

się prawdopodobnie receptory dla β -1,3-, β -1,6-D-glukanów. Takie oligosacharydy identyfikowano w preparatach elisytarów uzyskiwanych z *Phytophthora sojae* (Ebel & Cosio 1994). Badania te pokazały, że cząsteczki β -1,3-, β -1,6-D-oligoglukanów uruchamiają mechanizmy obronne w roślinach różnych gatunków strączkowych (Ebel & Cosio 1994, Cosio i współpr. 1996). Ponieważ β -1,3-, β -1,6-D-glukany występują powszechnie w ścianach komórkowych różnych grzybów (Bartnicki-Garcia 1968), można przypuszczać, że takie właśnie cząsteczki obecne były w uzyskanym preparacie elisytora ze ścian komórkowych drożdży i że to właśnie one odpowiedzialne są za aktywność preparatu YE. Poparcie tej tezy wymagałoby jednak dalszych badań nad charakterystyką aktywności biologicznej i składu cząsteczkowego uzyskanego preparatu elisytora.

5.2. TKANKOWA I SUBKOMÓRKOWA LOKALIZACJA IGG I IZOFLAWONOIDÓW

Przeprowadzone doświadczenia wykazały, że zarówno we frakcjach białek ścian komórkowych, jak i białek cytoplazmatycznych izolowanych z korzeni, hypokotyli, liścieni i pędów łubinu białego występuje enzym lub enzymy hydrolizujące 7-O- β -glukozyd genisteiny (Rys. 4.7.). Największą aktywność specyficzną IGG wykazywały białka związane ze ścianami komórkowymi korzenia, dlatego też tą frakcją użyto do oczyszczenia enzymu i jego dalszej charakterystyki. Prowadzone przez Hösela i Barza (1975) badania nad ciecierzycą wykazały, że we wszystkich tkankach tej rośliny występuje aktywność IGG. Enzymy oczyszczone z puli białek cytoplazmatycznych korzeni, hypokotyli i liści wykazywały niewielkie różnice we właściwościach fizykochemicznych, a ich specyficzność substratowa była bardzo podobna. Można więc przypuszczać, że podobna sytuacja ma miejsce w łubinie białym, potwierdzenie takiej tezy wymagałoby jednak dalszych badań.

Porównanie takie mogłoby jednak dotyczyć tylko puli białek cytoplazmatycznych ponieważ, co należy podkreślić, podczas opisanych w niniejszej pracy badań po raz pierwszy wykryto aktywność enzymu hydrolizującego glukozydy izoflawonoidów i związanego ze ścianami komórkowymi. W przypadku ciecierzycy nigdy nie sprawdzano aktywności IGG we frakcji białek ścian komórkowych (Hösel & Barz 1975). Nie wiadomo więc, czy w tej frakcji białek występują enzymy hydrolizujące glukozydy izoflawonoidów, a jeśli tak, to czy są to te same izoenzymy co w cytoplazmie. Białkiem cytoplazmatycznym jest również enzym o aktywności IGG wyizolowany z soji (Matsuura i współpr. 1995) oraz enzym hydrolizujący glukozydy flawonoidów z rumianku (Maier i współpr. 1991, 1993).

W tym celu przeprowadzono badania nad wpływem różnych form i stężeń glikozydów na aktywność i specyficzność enzymów. Wyniki tych badań zostały opublikowane w pracach (Licht & Cossio 1994). Badania te pokazały, że cząsteczki β -1,3- β -1,6-D-oligoglukanów włączają się do aktywności enzymów w roślinach, szczególnie w kłączach (Cossio i wsp. 1994). Ponadto β -1,3- β -1,6-D-oligoglukan wykazuje podobną aktywność w kłączach kandydowanych roślin (Bartnik-Głuch 1998), można przypuszczać, że takie właśnie cząsteczki obecne były w używanym preparacie ekstraktu z kłącz kandydowanych roślin i że to właśnie one odpowiadały za aktywność preparatu YE. Pomimo tej cennej informacji, jednak dalszych badań nad charakterystyką aktywności biologicznej i składem chemicznym wspomnianego preparatu ekstraktu.

2.2. CHARAKTERYSTYKA FIZYKOCHEMICZNA I FIZJOLOGICZNA

Przygotowane ekstrakty wykazywały różnice w składzie chemicznym i fizjologicznym, jak i w efekcie działania na rośliny. Wyniki tych badań zostały opublikowane w pracach (Licht & Cossio 1994). Wyniki te pokazały, że cząsteczki β -1,3- β -1,6-D-oligoglukanów wykazywały podobną aktywność w kłączach kandydowanych roślin (Bartnik-Głuch 1998), można przypuszczać, że takie właśnie cząsteczki obecne były w używanym preparacie ekstraktu z kłącz kandydowanych roślin i że to właśnie one odpowiadały za aktywność preparatu YE. Pomimo tej cennej informacji, jednak dalszych badań nad charakterystyką aktywności biologicznej i składem chemicznym wspomnianego preparatu ekstraktu.

Porównanie tych ekstraktów wykazało, że ekstrakt z kłącz kandydowanych roślin wykazywał podobną aktywność w kłączach kandydowanych roślin (Bartnik-Głuch 1998), można przypuszczać, że takie właśnie cząsteczki obecne były w używanym preparacie ekstraktu z kłącz kandydowanych roślin i że to właśnie one odpowiadały za aktywność preparatu YE. Pomimo tej cennej informacji, jednak dalszych badań nad charakterystyką aktywności biologicznej i składem chemicznym wspomnianego preparatu ekstraktu.

Wiadomo jednak, że w ścianach komórkowych niektórych roślin występują enzymy hydrolizujące glukozydy innych grup związków fenolowych. Z badań przeprowadzonych na tytoniu wynika, że w ścianach komórkowych zlokalizowany jest enzym hydrolizujący β -glukozyd kwasu salicylowego (Hennig i współpracownicy 1993, Chen i współpracownicy 1995, Seo i współpracownicy 1995). Enzym ten nie został jednak dotąd wyizolowany i dokładnie scharakteryzowany. Ze ścianami komórkowymi mogą być również związane β -glukozydazy swoiste dla koniferyny. Taką lokalizację subkomórkową stwierdzono w ciecierzycy (Hösel i współpracownicy 1978), świerku pospolitym (Marcinowski & Grisebach 1978) oraz sośnie wydmowej (Dharmawardhana i współpracownicy 1995). Nie można jednak stwierdzić, że β -glukozydazy hydrolizujące koniferynę zlokalizowane są tylko i wyłącznie w ścianach komórkowych roślin, ponieważ w przypadku sosny Banksa dwa enzymy o takiej aktywności zostały wyizolowane z puli białek cytoplazmatycznych (Leinhos i współpracownicy 1994).

Z fizjologicznego punktu widzenia istotnym wydaje się lokalizacja zarówno enzymu, jak i jego substratów. Dobrą ilustracją takiej sytuacji są glukozydy cyjanogenne oraz swoiste dla nich enzymy (Rozdz. 2.2.4.). Dlatego też część prowadzonych badań dotyczyła również tkankowej i subkomórkowej lokalizacji izoflawonoidów i ich glukozydów. Jak wiadomo, poszczególne tkanki lub organy roślin różnią się zdolnością do syntezy i akumulowania metabolitów wtórnych, a co więcej zdolność ta może ulegać zmianom w trakcie rozwoju roślin (Wiermann 1981). Badania prowadzone na łubinie białym (Gagnon i współpracownicy 1995) oraz soi (Graham 1991) wykazały, że poszczególne części tych roślin charakteryzują się swoistym profilem flawonoidów, który dodatkowo zmienia się w trakcie ontogenezy. O wysokim stopniu zróżnicowania tkankowej akumulacji flawonoidów świadczą doświadczenia przeprowadzone na korzeniach ciecierzycy, w których wykazano, że biochanina A jest akumulowana głównie w rizodermie, podczas gdy formononetyna występuje w tkance korykalnej (Wiermann 1981).

Opisane w niniejszej pracy doświadczenia potwierdziły, że korzenie, hypokotyle, liścienie i pędy łubinu białego mają odmienne profile związków fenolowych (Rys. 4.18.). Najistotniejszy jednak wydaje się fakt, że obserwowany profil izoflawonoidów można skorelować z aktywnością IGG w danej części rośliny (Tab. 4.2., Tab. 4.3., Rys. 4.7.). Korzenie, w których stwierdzono najwyższą specyficzną aktywność IGG, charakteryzują się również największą względną zawartością wolnych aglikonów izoflawonoidów. Natomiast w liścieniach i pędach, które charakteryzują się mniejszą aktywnością IGG, w profilu związków fenolowych zdecydowanie przeważają glukozydy izoflawonoidów. Chociaż już wcześniej

The first part of the report deals with the general situation of the country and the progress of the war. It is followed by a detailed account of the military operations in the various theaters of war. The author then discusses the political and economic conditions of the country and the impact of the war on these aspects. The report concludes with a summary of the findings and a list of recommendations.

The second part of the report is a detailed analysis of the military operations. It covers the campaigns in the East, the West, and the South. The author provides a thorough account of the tactics used by the various armies and the results of the battles. He also discusses the logistical challenges faced by the armies and the impact of the weather on the operations. The analysis is supported by numerous maps and diagrams.

The third part of the report is a study of the political and economic conditions of the country. The author examines the role of the government in the war effort and the impact of the war on the economy. He discusses the social and political changes that have taken place since the outbreak of the war. The study is based on a wide range of sources, including official reports, newspaper articles, and interviews with key figures.

sugerowano, że różnice we względnych zawartościach aglikonów i glukozydów w różnych częściach łubinu białego mogą być związane ze zmianami aktywności IGG (Gagnon i wspópr. 1995), przypuszczenie to dotąd nie zostało udowodnione eksperymentalnie.

Zagadnienie subkomórkowej lokalizacji izoflawonoidów i ich glukozydów nie było do tej pory szeroko badane. W przypadku łubinu białego przeprowadzono jedynie immunocytochemiczną lokalizację 2'-hydroksylupalbigeniny w brodawkach korzeniowych. Stwierdzono, że związek ten występuje w przestworach międzykomórkowych kory wewnętrznej (Grandmaison & Ibrahim 1995, Gagnon i wspópr. 1995). Zastosowanie podczas prowadzonych badań zmodyfikowanej metody IWF pozwoliło wykazać, że w ścianach komórkowych korzeni, hypokotyli, liścieni i pędów łubinu białego występują konstytutywnie zarówno glukozydy, jak i aglikony izoflawonoidów (Rys. 4.13.). Biorąc pod uwagę fakt, że metabolity te mogą być wydzielane przez korzenie (Wojtaszek i wspópr. 1993) oraz przez komórki hodowli zawieszinowej łubinu białego (Gagnon i wspópr. 1992a, Hallard i wspópr. 1992), wynik ten nie powinien budzić zdziwienia. Jest on jednak o tyle istotny, że obecnie dominuje pogląd o magazynowaniu przez rośliny tych metabolitów w wakuoli. Taką lokalizację subkomórkową glukozydów flawonoidów u roślin motylkowatych potwierdzają badania prowadzone na ciecierzycy (Mackenbrock i wspópr. 1992), fasoli (Soriano-Richards i wspópr. 1998) oraz bobie (*Vicia faba* L.) (Hutzler i wspópr. 1998). Jediną rośliną, w której ścianach komórkowych stwierdzono obecność glukozydów flawonoidów jest świerk pospolity (Schnitzler i wspópr. 1996, Hutzler i wspópr. 1998). Wykrytym związkiem jest 3-O-glukozyd kempferolu, nie wiadomo jednak jakie znaczenie dla rośliny może mieć jego lokalizacja w ścianie komórkowej. Badania nad aktywnością biochemiczną flawonoidów wykazały, że związki te mogą być substratami dla peroksydaz roślinnych (Yamasaki i wspópr. 1997, Majewski 1999). Stwierdzono również, że genisteina może działać jako inhibitor w katalizowanej przez peroksydazę reakcji utleniania alkoholu koniferylowego, która jest pierwszym etapem biosyntezy lignin (Ferrer & Ros Barcelo 1994). Dodatkowo wykazano, że genisteina i jej glukozyd mają wpływ na reakcję tworzenia dimerów kwasu ferulowego (Buśko 1999). Można więc przypuszczać, że jedną z funkcji flawonoidów w ścianach komórkowych roślin jest regulacja procesu lignifikacji.

Podsumowując należy zaznaczyć, że podczas opisanych w niniejszej pracy badań po raz pierwszy wykazano, że IGG oraz glukozydy izoflawonoidów występują razem w ścianach komórkowych roślin. Uzyskanie takich wyników było możliwe dzięki odpowiedniemu dopracowaniu metodyki uzyskiwania płynów apoplastycznych (Rozdz. 4.1.1.), co pozwoliło

na izolację z przestworów międzykomórkowych zarówno białek, jak i metabolitów fenolowych.

5.3. WŁAŚCIWOŚCI FIZYKOCHEMICZNE IGG

W dostępnej literaturze opisane są parametry fizykochemiczne IGG wyizolowanych z ciecierzycy (Hösel & Barz 1975) i soi (Matsuura i współpracownicy 1995) oraz enzymu swoistego dla β -glukozydów flawonoidów wyizolowanego z kwiatów rumianku (Maier i współpracownicy 1991, 1993). Masa cząsteczkowa monomerów IGG ze ścian komórkowych korzeni łubinu białego (Rys. 4.10.) zbliżona jest do mas monomerów izoenzymów wyizolowanych z ciecierzycy (około 68 kDa) oraz enzymu z rumianku (60 kDa). Odbiega ona jednak od wartości wyznaczonej dla β -glukozydazy z soi (36 kDa). Należy zauważyć, że żaden z wymienionych powyżej enzymów nie jest trimerem. Natywne IGG z ciecierzycy i soi są dimerami, natomiast na podstawie wyników uzyskanych dla enzymu z rumianku przypuszcza się, że jest on heksa- lub oktamerem. Izoenzymy izolowane z ciecierzycy, podobnie jak IGG łubinu, wykazują dwa optima pH (Rys. 4.12.), jednak ich wartości przesunięte są bardziej w kierunku zasadowym i wahają się w granicach 4.5-5.0 oraz 7.0-7.5. Enzymy z soi i rumianku wykazują pojedyncze optima pH, których wartości wynoszą odpowiednio 4.5 i 5.6. Wartość pI IGG ze ścian komórkowych korzeni łubinu białego (Rys. 4.11.) podobna jest do wartości uzyskanych dla enzymów z ciecierzycy (pI 5.9-7.1) oraz z soi (pI 6.7). W przypadku rumianku wartość pI β -glukozydazy jest nieco niższa i wynosi ona 4.6.

Wyniki uzyskane podczas określania specyficzności substratowej wykazały, że łubinowa IGG jest mniej swoista niż inne enzymy hydrolizujące glukozydy flawonoidów lub izoflawonoidów. W przypadku enzymów z ciecierzycy (Hösel & Barz 1975) oraz rumianku (Maier i współpracownicy 1993) stałe K_M wyznaczone dla glukozydów flawonoidów były o około 1-2 rzędy wielkości mniejsze niż dla glukozydów innych związków fenolowych, takich jak *p*NPG, MUG lub arbutyna. IGG ze ścian komórkowych korzeni łubinu charakteryzuje się szerszą specyficznością w stosunku do glukozydów związków fenolowych (Tab. 4.5.). Podobne właściwości obserwowano dla IGG wyizolowanej z nasion soi (Matsuura i współpracownicy 1995). W przypadku tego enzymu wartość stałej K_M wyznaczona dla *p*NPG mieściła się pomiędzy wartościami wyznaczonymi dla 7-O-glukozydów genisteiny i daidzeiny. Dodatkowo, a w przeciwieństwie do enzymów z ciecierzycy (Hösel & Barz 1975) oraz soi (Graham 1998), które są swoiste jedynie dla 7-O- β -glukozydów izoflawonoidów, IGG ze ścian komórkowych korzeni łubinu białego hydrolizowała zarówno 7-, jak i 4'-O- β -glukozydy (Rys. 4.16.).

Podobną wysoką specyficzność substratową, jak IGG z ciecierzycy i soi, obserwowano również u enzymu z rumianku, który hydrolizował jedynie 7-O- β -glukozydy flawonoidów (Maier i współpr. 1993).

Interesującym wydaje się fakt, że różnice w specyficzności IGG z soi i ciecierzycy oraz łubinu można powiązać z różnicami w profilu konstytutywnie występujących w tych roślinach glukozydów izoflawonoidów. W tkankach ciecierzycy i soi stwierdzono obecność 7-O-glukozydów izoflawonoidów (Köster i współpr. 1983, Graham 1991, Kodu i współpr. 1991a, 1991b, Barz & Mackenbrock 1994), brak jest natomiast jakichkolwiek doniesień o występowaniu 4'-O-glukozydów w tych roślinach. Wysoka aktywność IGG z ciecierzycy i soi w stosunku do 7-O-glukozydów może więc wynikać z faktu, że jest to jedyny rodzaj glukozydów występujących w tych roślinach. Natomiast w łubinie białym, wykryto zarówno 7-, jak i 4'-O-glukozydy izoflawonoidów (Shibuya i współpr. 1990, Stobiecki i współpr. 1999, Stobiecki i współpr. dane niepublikowane). Przyjmując założenie, że glukozydy są formą zapasową wolnych aglikonów można się spodziewać, że w łubinie występują albo dwa enzymy, z których jeden jest swoisty dla wiązania 7-, a drugi dla 4'-O-glukozydowego, albo też jeden enzym hydrolizujący oba rodzaje glukozydów. Uzyskane podczas badań wyniki wskazują, że najprawdopodobniej mamy do czynienia z drugą z opisanych możliwości.

W łubinie białym, oprócz niepodstawionych glukozydów izoflawonoidów, występują również ich 6''-O-malonylowane pochodne (Stobiecki i współpr. 1999, Stobiecki i współpr. dane niepublikowane). Powstaje wobec tego pytanie, czy IGG hydrolizuje wiązanie glukozydowe w tego rodzaju połączeniach? Odpowiednich testów z 6''-O-malonylowanymi pochodnymi glukozydów izoflawonoidów nie można było wykonać, ponieważ nie udało się wyizolować takich związków w stanie czystym w wystarczającej ilości. Wynika to między innymi z faktu, że wiązanie estrowe pomiędzy cukrem, a kwasem malonowym bardzo łatwo ulega hydrolizie podczas izolacji (Köster i współpr. 1983, Shibuya i współpr. 1991). Biorąc pod uwagę doświadczenia z użyciem ramnozyloglukozydów flawonoidów jako substratów można jedynie przypuszczać, że podstawienie kwasu malonowego w pozycji 6''- zablokuje aktywność enzymatyczną IGG. W takim przypadku uwolnienie aglikonów z 6''-O-malonylowych pochodnych glukozydów izoflawonoidów wymagałoby wcześniejszego działania enzymu o aktywności malonyloesterazy. Enzym ten hydrolizowałby wiązanie estrowe, a uzyskany niepodstawiony glukozyd byłby substratem dla IGG. Taki właśnie mechanizm metabolizmu 6''-O-malonylowanych pochodnych glukozydów izoflawonoidów stwierdzono w ciecierzycy (Mackenbrock i współpr. 1993). Natomiast IGG z soi,

Podobną wysoką specyficzność substratów jak IGG z cholesterolem i saponinami obserwowano również w enzymie z roślinami krępy pochodzący z *7-O-β-D-glucosyl-β-D-glucosylidol* (Maita i wsp. 1993).

Interesującym wydaje się fakt, że również w specyficzności IGG z saponinami i cholesterolem podobna można powziąć z różnicami w podłożu konstrygującym występującym w tych roślinach. W badaniach izolowanych. W badaniach cholesterolem i saponinami obserwowano 3-O-β-D-glucosylidol izolowanych (Kumar i wsp. 1983, Graham 1981, Koda i wsp. 1991a, 1991b, Bar & Macdonald 1994) oraz jest natomiast jakichkolwiek doniesień o występowaniu 4-O-β-D-glucosylidol w tych roślinach. Wysoka specyficzność IGG z cholesterolem i saponinami do 3-O-β-D-glucosylidol może więc wynikać z faktu, że ten to jedyny rodzaj glikozydów występujących w tych roślinach. Natomiast w lubinie białym, występują zarówno 3- i 4-O-β-D-glucosylidol izolowanych (Shibuya i wsp. 1992, Szobacki i wsp. 1992, Szobacki i wsp. 1992) oraz dane niepublikowane). Przypuszczając, że glikozyd saponinowy woliński aglikonów może się sprowadzać, że w lubinie występują albo dwa rodzaje, a każdy z nich jest ewentualnie w składzie 3- i 4-O-β-D-glucosylidol, albo też jeden rodzaj hydrolyzujący obu rodzaj glikozydów. Użytkownik podczas badań wymagał, że najpierw hydrolyzacja ma być wykonana z drugą z opisanych możliwości.

W lubinie białym, oprócz niepublikowanych glikozydów izolowanych, występuje również też 6-O-malonylowane pochodne (Szobacki i wsp. 1992, Szobacki i wsp. 1992, dane niepublikowane). Powinno wobec tego pytanie czy IGG hydrolyzując saponin glikozydowe w tego rodzaju pochodnych? Odpowiedzią jest, że 6-O-malonylowaniami pochodnymi glikozydów izolowanych nie można było wykonać, ponieważ nie udało się wyizolować takich związków w stanie czystym w wystarczającej ilości. Wynika to między innymi z faktu, że w składzie estrów powstają cukrem, z kwasem malonowym, a także także glikozylacja podczas ekstrakcji (Kumar i wsp. 1983, Shibuya i wsp. 1991). Biorąc pod uwagę doświadczenia z utrudnieniem technologicznym związków jako substratów można jedynie przypuszczać, że podawanie kwasu malonowego w postaci 6-O-malonylowane czystym IGG. W takim przypadku uwolnienie aglikonów z 6-O-malonylowanych pochodnych glikozydów izolowanych wyrażałoby w rzeczywistości działanie enzymu o aktywności malonylowej. Czynniki ten hydrolyzowałyby właśnie estrów, a uzyskany niepublikowany glikozyd byłby substratem dla IGG. Taki właśnie mechanizm metabolizmu 6-O-malonylowanych pochodnych glikozydów izolowanych stwierdzono w cholesterolem (Macdonald i wsp. 1992), natomiast IGG z saponinami

hydrolizowała zarówno niepodstawione, jak i 6''-O-malonylowane glukozydy izoflawonoidów (Graham 1998).

5.4. ZMIANY AKTYWNOŚCI IGG W TESTACH BIOLOGICZNYCH

Testy biologiczne z użyciem YE lub nawożenia różnymi formami azotu miały na celu określenie wpływu tych czynników na aktywność IGG. Wcześniej istotne wyniki uzyskano podczas testów liścieniowych. Stwierdzono w nich wzrost aktywności IGG związanej ze ścianami komórkowymi liścieni pod wpływem YE (Rys. 4.15.), przy czym przebieg czasowy zmian aktywności zależny był od stężenia preparatu elisytora. Zmiany aktywności enzymu skorelowane były ze wzrostem ilości izoflawonoidów w dyfuzatach oraz w tkance, a także ze spadkiem zawartości ich glukozydów w liścieniach (Rys. 4.14., Rys. 4.16.). Podobne zmiany w profilu izoflawonoidów w liścieniach pod wpływem YE opisywane były już wcześniej (Wojtaszek & Stobiecki 1997). Stwierdzono wówczas wzrost zawartości izoflawonoidów w dyfuzatach spowodowany działaniem YE i dodatkowo wykazano, że w dyfuzatach występują głównie wolne aglikony tych metabolitów. Przeprowadzone analizy profilu izoflawonoidów w zdrowych roślinach łubinu białego wykazały natomiast, że w liścieniach konstytutywnie występują głównie glukozydy tych związków (Rys. 4.18.). Można więc stwierdzić, że obserwowany wzrost aktywności IGG związanej ze ścianami komórkowymi prowadzi do uwalniania aktywnych biologicznie aglikonów z ich glukozydowych połączeń zmagazynowanych w tkance.

Badania przeprowadzone na całych roślinach dostarczyły kolejnych wyników, które wskazują na udział IGG w reakcjach obronnych łubinu białego. W pierwszej serii doświadczeń (Rozdz. 4.5.3.) stwierdzono, że podlewanie roślin preparatem YE wywołuje zmiany aktywności specyficznej IGG we wszystkich częściach roślin (Rys. 4.19., Rys. 4.20.). Uzyskane wyniki pokazują, że sygnał o stresie biotycznym wywołanym preparatem YE może być przekazywany z korzeni do pozostałych części rośliny, gdzie następuje uruchomienie mechanizmów obronnych. Potwierdzają to badania dotyczące wpływu YE na aktywność dwóch grup białek obronnych zlokalizowanych w ścianach komórkowych łubinu białego: chitynaz (Burzyński 1999) i peroksydaz (Majewski 1999). W przypadku IGG wzrost aktywności specyficznej obserwowano po 24 h we frakcjach białek cytoplazmatycznych liścieni i pędów, a po 48 h we frakcjach białek ścian komórkowych korzeni i hypokotyli oraz ponownie we frakcji białek cytoplazmatycznych liścieni. Dodatkowo, w drugiej serii doświadczeń (Rozdz. 4.5.4.) wykazano, że preparat YE powoduje wzrost całkowitej

21. Nietzsche's "The Gay Science"

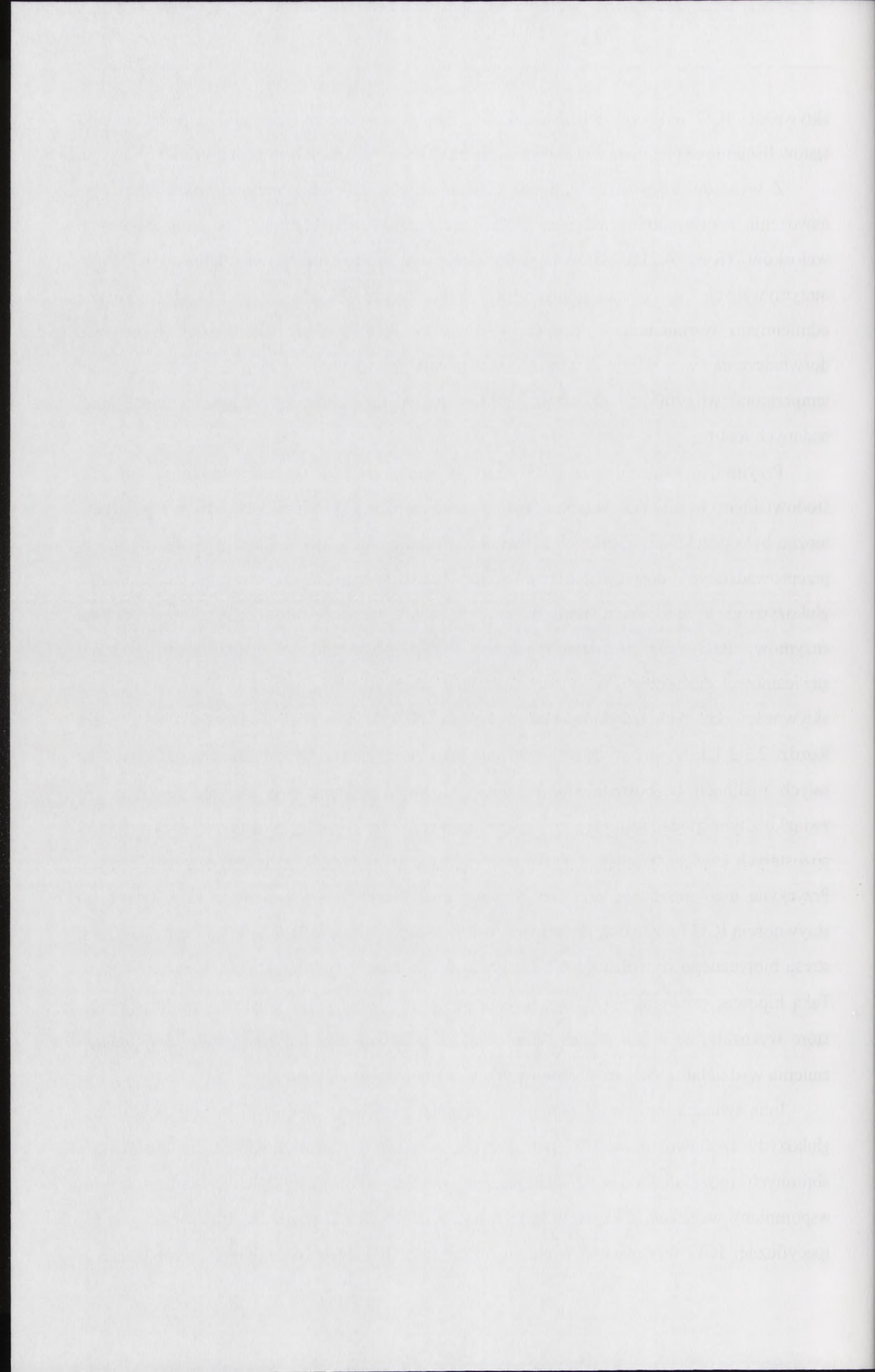
The book "The Gay Science" by Friedrich Nietzsche is a collection of aphorisms and essays. It is one of his most important works. The title is ironic, as Nietzsche often speaks of the "gay science" as a form of nihilism or a way of life that is based on the rejection of traditional values. The book is divided into several sections, each with its own title. The first section is "The Gay Science" itself, and it contains many of the most famous aphorisms from the book. The second section is "The Gay Science II" and the third is "The Gay Science III". The fourth section is "The Gay Science IV" and the fifth is "The Gay Science V". The sixth section is "The Gay Science VI" and the seventh is "The Gay Science VII". The eighth section is "The Gay Science VIII" and the ninth is "The Gay Science IX". The tenth section is "The Gay Science X" and the eleventh is "The Gay Science XI". The twelfth section is "The Gay Science XII" and the thirteenth is "The Gay Science XIII". The fourteenth section is "The Gay Science XIV" and the fifteenth is "The Gay Science XV". The sixteenth section is "The Gay Science XVI" and the seventeenth is "The Gay Science XVII". The eighteenth section is "The Gay Science XVIII" and the nineteenth is "The Gay Science XIX". The twentieth section is "The Gay Science XX" and the twenty-first is "The Gay Science XXI". The twenty-second section is "The Gay Science XXII" and the twenty-third is "The Gay Science XXIII". The twenty-fourth section is "The Gay Science XXIV" and the twenty-fifth is "The Gay Science XXV". The twenty-sixth section is "The Gay Science XXVI" and the twenty-seventh is "The Gay Science XXVII". The twenty-eighth section is "The Gay Science XXVIII" and the twenty-ninth is "The Gay Science XXIX". The thirtieth section is "The Gay Science XXX" and the thirty-first is "The Gay Science XXXI". The thirty-second section is "The Gay Science XXXII" and the thirty-third is "The Gay Science XXXIII". The thirty-fourth section is "The Gay Science XXXIV" and the thirty-fifth is "The Gay Science XXXV". The thirty-sixth section is "The Gay Science XXXVI" and the thirty-seventh is "The Gay Science XXXVII". The thirty-eighth section is "The Gay Science XXXVIII" and the thirty-ninth is "The Gay Science XXXIX". The fortieth section is "The Gay Science XL" and the forty-first is "The Gay Science XLI". The forty-second section is "The Gay Science XLII" and the forty-third is "The Gay Science XLIII". The forty-fourth section is "The Gay Science XLIV" and the forty-fifth is "The Gay Science XLV". The forty-sixth section is "The Gay Science XLVI" and the forty-seventh is "The Gay Science XLVII". The forty-eighth section is "The Gay Science XLVIII" and the forty-ninth is "The Gay Science XLIX". The fiftieth section is "The Gay Science L" and the fifty-first is "The Gay Science LI". The fifty-second section is "The Gay Science LII" and the fifty-third is "The Gay Science LIII". The fifty-fourth section is "The Gay Science LIV" and the fifty-fifth is "The Gay Science LV". The fifty-sixth section is "The Gay Science LVI" and the fifty-seventh is "The Gay Science LVII". The fifty-eighth section is "The Gay Science LVIII" and the fifty-ninth is "The Gay Science LIX". The sixtieth section is "The Gay Science LX" and the sixty-first is "The Gay Science LXI". The sixty-second section is "The Gay Science LXII" and the sixty-third is "The Gay Science LXIII". The sixty-fourth section is "The Gay Science LXIV" and the sixty-fifth is "The Gay Science LXV". The sixty-sixth section is "The Gay Science LXVI" and the sixty-seventh is "The Gay Science LXVII". The sixty-eighth section is "The Gay Science LXVIII" and the sixty-ninth is "The Gay Science LXIX". The seventieth section is "The Gay Science LXX" and the seventy-first is "The Gay Science LXXI". The seventy-second section is "The Gay Science LXXII" and the seventy-third is "The Gay Science LXXIII". The seventy-fourth section is "The Gay Science LXXIV" and the seventy-fifth is "The Gay Science LXXV". The seventy-sixth section is "The Gay Science LXXVI" and the seventy-seventh is "The Gay Science LXXVII". The seventy-eighth section is "The Gay Science LXXVIII" and the seventy-ninth is "The Gay Science LXXIX". The eightieth section is "The Gay Science LXXX" and the eighty-first is "The Gay Science LXXXI". The eighty-second section is "The Gay Science LXXXII" and the eighty-third is "The Gay Science LXXXIII". The eighty-fourth section is "The Gay Science LXXXIV" and the eighty-fifth is "The Gay Science LXXXV". The eighty-sixth section is "The Gay Science LXXXVI" and the eighty-seventh is "The Gay Science LXXXVII". The eighty-eighth section is "The Gay Science LXXXVIII" and the eighty-ninth is "The Gay Science LXXXIX". The ninetieth section is "The Gay Science LXXX" and the ninety-first is "The Gay Science LXXXI". The ninety-second section is "The Gay Science LXXXII" and the ninety-third is "The Gay Science LXXXIII". The ninety-fourth section is "The Gay Science LXXXIV" and the ninety-fifth is "The Gay Science LXXXV". The ninety-sixth section is "The Gay Science LXXXVI" and the ninety-seventh is "The Gay Science LXXXVII". The ninety-eighth section is "The Gay Science LXXXVIII" and the ninety-ninth is "The Gay Science LXXXIX". The hundredth section is "The Gay Science LXXX" and the hundred-first is "The Gay Science LXXXI".

aktywności IGG w korzeniach (Rys. 4.21.). Zaobserwowane zmiany, podobnie jak wyniki testów liścieniowych, mogą świadczyć o udziale IGG w reakcjach obronnych łubinu białego.

Z wyników uzyskanych podczas doświadczeń, w których starano się określić wpływ nawożenia azotowego na aktywność IGG nie można już wyciągnąć tak jednoznacznych wniosków (Rys. 4.21.). Główną przyczyną tego jest brak powtarzalności wyników otrzymywanych w poszczególnych doświadczeniach. Mogło być to spowodowane odmiennymi warunkami, w których wykonywano kolejne testy biologiczne. Prowadząc doświadczenia w szklarni trudno jest zapewnić powtarzalność takich czynników jak temperatura, wilgotność i naswietlenie, które mogą mieć znaczący wpływ na metabolizm badanych roślin.

Przyjmując założenie, że IGG odgrywa istotną rolę w oddziaływaniach rośliny ze środowiskiem uwalniając aktywne biologicznie aglikony z ich glikozydowych połączeń, można było oczekiwać większych zmian aktywności enzymu, niż te które zaobserwowano w przeprowadzonych doświadczeniach. Należy jednak pamiętać, że równowaga pomiędzy glukozydami a aglikonami izoflawonoidów zależy od aktywności co najmniej dwóch enzymów: IGG oraz glukozylotransferazy (GT). Wykazano to w badaniach hodowli zawieszinowej ciecierzycy, w których określano zmiany profilu związków fenolowych oraz aktywności obu tych enzymów pod wpływem YE (Mackenbrock i współpr. 1993, patrz Rozdz. 2.3.2.1.). Istotny wydaje się również fakt, że podczas doświadczeń prowadzonych na całych roślinach bezpośredniemu działaniu elisytora poddane były jedynie korzenie. W związku z tym spodziewano się, że zmiany aktywności IGG w korzeniach będą większe niż w pozostałych częściach roślin. Uzyskane wyniki nie potwierdziły jednak tych przypuszczeń. Przyczyną tego może być fakt, że korzenie charakteryzują się największą konstytutywną aktywnością IGG i względną zawartością wolnych aglikonów izoflawonoidów, stąd w wyniku stresu biotycznego wywołanego YE nie dochodzi do znacznego wzrostu aktywności enzymu. Taką hipotezę potwierdzają doświadczenia przeprowadzone przez Cosio i współpr. (1996), które wykazały, że w korzeniach łubinu białego dodatkowe podanie preparatu elisytora nie zmienia wydzielania związków fenolowych wywołanego zranieniem.

Inna sytuacja może mieć miejsce w liścieniach i pędach, w których występują głównie glukozydy izoflawonoidów. W tym przypadku wraz z uruchamianiem mechanizmów obronnych może dochodzić do znaczącego wzrostu aktywności IGG. Świadczy o tym wspomniany wcześniej fakt, że w testach na całych roślinach względne zmiany aktywności specyficznej IGG wywołane działaniem YE w pędach i liścieniach były porównywalne, a



nawet większe, niż te obserwowane w korzeniach (Rys. 4.19., 4.20.) mimo, że to właśnie korzenie poddane były bezpośredniemu działaniu preparatu YE. Tezę taką popierają również wyniki doświadczeń, w których wykazano, że infekcja liści łubinu białego grzybem *Pleiochaeta setosa* prowadzi do ponad 2-krotnego wzrostu aktywności β -D-glukozydazy w tej części rośliny (Rybus-Zajac & Kozłowska 1996).

Analizując sekrecję izoflawonoidów przez korzenie łubinu białego stwierdzono, że zarówno nawożenie azotowe, jak i YE mają wpływ na ilość i profil wydzielanych związków fenolowych (Rys. 4.23., Rys. 4.24.). Zaobserwowane zmiany w wydzielaniu pod wpływem różnych form azotu zbliżone były do wyników wcześniej uzyskanych w Pracowni Fitochemii (Wojtaszek i współpr. 1993). Największe zmiany ilościowe w sekrecji izoflawonoidów wywołane były jednak działaniem YE. We wszystkich analizowanych próbkach wydzielin korzeniowych stwierdzano głównie obecność wolnych aglikonów izoflawonoidów, podczas gdy glikozydy występowały jedynie w śladowych ilościach. Obserwacja ta jest zgodna z wynikami prac Wojtaszka i współpr. (1993), Gagnona i współpr. (1995) oraz Gagnona i Ibrahima (1997). Fakt dominacji aglikonów w profilu izoflawonoidów wydzielanych przez korzenie, w połączeniu z wynikami świadczącymi o obecności w ścianach komórkowych tej części rośliny zarówno aglikonów, jak i glikozydów tych metabolitów (Rys. 4.11.), może świadczyć o kluczowej roli, jaką IGG odgrywa w procesie wydzielania związków fenolowych do otoczenia. W takim układzie glikozydy izoflawonoidów są transportowane z wakuoli do ściany komórkowej, gdzie ulegają hydrolizie, a wolne aglikony wydzielane są do otoczenia. Możliwe jest również, że sekrecji ulegają zarówno wolne aglikony, jak i glikozydy, które następnie są hydrolizowane przez IGG uwolnioną do otoczenia ze ścian komórkowych korzeni. Wydzielanie enzymów o aktywności β -glukozydazy stwierdzono wcześniej dla kiełkujących nasion lucerny (Hartwig & Phillips 1991) oraz w sposób pośredni wykazano dla korzeni soi (Graham 1991). Wydaje się więc, że podobna sytuacja mogłaby mieć miejsce w przypadku łubinu.

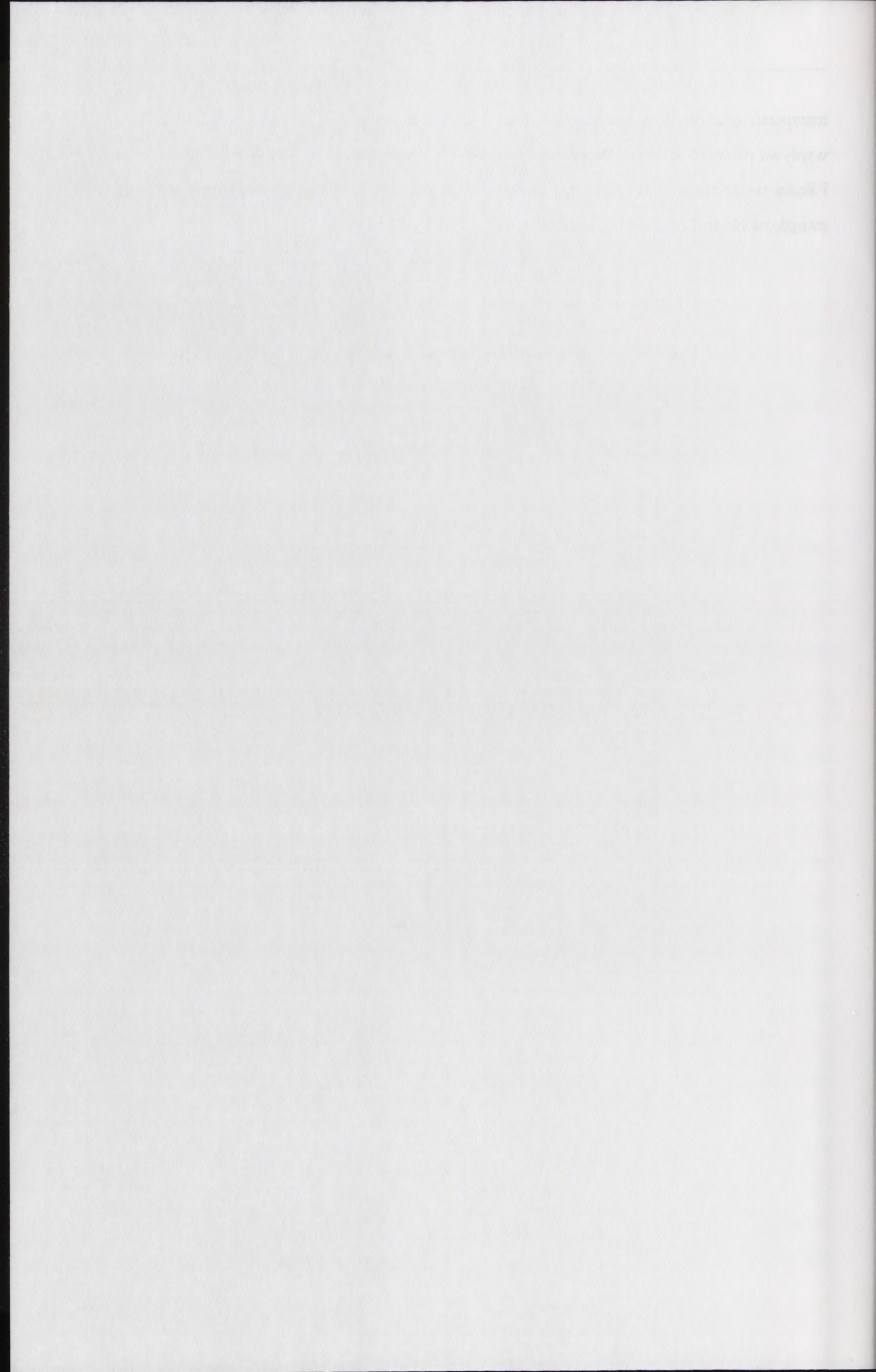
Sprzeczny z tezą o kluczowej roli IGG w sekrecji izoflawonoidów wydaje się fakt, że nie udało się zaobserwować żadnych istotnych korelacji pomiędzy zmianami w wydzielaniu tych związków a aktywnością IGG. Nawet w przypadku roślin poddanych działaniu YE, gdzie sekrecja związków fenolowych jest zdecydowanie najintensywniejsza (Rys. 4.23.), obserwuje się jedynie niewielki wzrost aktywności IGG (Rys. 4.21., Rys. 4.22.). Należy więc przypuszczać, że intensywność wydzielania izoflawonoidów regulowana jest przez inny mechanizm niż zmiana aktywności IGG. Regulacja taka mogłaby np. zachodzić na poziomie

nowej wiedzy, niż to obserwowane w korzeniach (rys. 4.19, 4.20), mimo że to właśnie korzenie podane były bezpośredniemu działaniu preparatu VE. Też tak popularną różnicą między różniczkami, w których wykazano, że infekcja liści roślin białego gryczki (Włochowski) wynikała z powodu do końca 2-tygodniowego wzrostu aktywności β -D-glukozydazy w tej części rośliny (Ryder-Lajda & Kowalska 1990).

Analityczne składowe izolowanocielów przez korzenie roślin białego siewczaka, ze zmianą zawieszenia korzeni, jak i 75 mg/l wody na liść i profil wychylenia związków (rys. 4.21, 4.22). Zmierzano zmiany w wychyleniu pod wpływem różnych form azotu chłonek, jak i zmian w wartościach uzyskanych w fazach fenologicznych (Włochowski & Wójcik 1993). Największe zmiany ilościowe w sekcjach izolowanocielów wykazano przy jednak działaniu VE. W sekcjach analizowanych próbkach wychylenia korzeniowych stwierdzano głównie obecność wolnych związków białkowych, podczas gdy glicyny występowały jedynie w śladowych ilościach. Odniesienie to jest zgodne z wyników prac Włochowska i Wójcik (1993), Gajana i Wójcik (1992) oraz Gajana i Lajda (1997). Fakt dominacji aminokwasów w profilu izolowanocielów wychylenia przez korzenie w połączeniu z wynikiem stwierdzonym o obecności w sekcjach korzeniowych tej części rośliny zarówno aminokwasów, jak i glikozydów tych metabolitów (rys. 4.11, 4.12) wskazuje o znaczeniu roli ICG odgrywane w procesie wychylenia związków białkowych do otoczenia. W takim układzie glikozydy izolowanocielów są transportowane z wewnątrz do strony zewnętrznej, gdzie ulegają hydrolizie, a wolne aminokwasy wychylenia są do otoczenia. Motyw ten również, że znaczny udział zarówno wolne aminokwasy, jak i glikozydy, które następuje na hydrolizowanie przez ICG rozłożone do cząstek ze ścian komórkowych roślin. Wychylenie związków o aktywności β -glukozydazy stwierdzono wcześniej dla niektórych roślin (Lajda & Phillips 1991) oraz w sposób pośredni wykazano dla korzeni roślin (Gajana 1991). Wyniki są więc, że podobna sytuacja mogłaby mieć miejsce w przypadku roślin.

Wskazano z tego o znaczeniu roli ICG w sekcjach izolowanocielów, wydaje się być, że nie udało się zaobserwować żadnych innych rodzajów pomiarów zmianami w wychyleniu tych związków z aktywnością ICG. Nawet w przypadku roślin podanych działaniu VE, gdzie sekcja związków białkowych jest obciążenie aminocynazy (rys. 4.23), obserwowano nie jedynie niewielki wzrost aktywności ICG (rys. 4.24), ale także wycięcie fragmentów, że znacząco wychylenie izolowanocielów regulowane jest przez inny mechanizm niż zmianę aktywności ICG. Wyniki te mogą być np. zachowanie im poziomu

transportu glukozydów izoflawonoidów z wakuoli do ściany komórkowej. Taki wniosek wypływa również z badań Wojtaszka i współprac. (1993), którzy wykazali, że zmiany w profilu i ilości wydzielanych izoflawonoidów nie mają odbicia w zmianach w całkowitej puli tych związków ekstrahowanych z korzeni.



6. PODSUMOWANIE

Celem niniejszej pracy było określenie roli β -glukozydazy ze ścian komórkowych łubinu białego w przemianach fenolowych metabolitów wtórnych. Rozwiązanie podstawowego problemu oparto na kompleksowej analizie danych biochemicznych i fitochemicznych skorelowanej z określeniem fizjologicznej roli IGG w oddziaływaniach łubinu białego ze środowiskiem. Najważniejsze wyniki i wnioski podsumować można następująco:

1. Enzym o aktywności β -glukozydazy glukozydów izoflawonoidów występuje zarówno we frakcjach białek cytoplazmatycznych, jak i frakcjach ścian komórkowych, izolowanych ze wszystkich części łubinu białego.
2. Aktywność IGG jest tkankowo specyficzna, najwyższą aktywność obserwuje się we frakcji białek ścian komórkowych korzenia.
3. Aktywność IGG w poszczególnych częściach rośliny jest skorelowana z profilem izoflawonoidów; wyższej aktywności IGG towarzyszy większy względny udział wolnych aglikonów w puli związków fenolowych.
4. W ścianach komórkowych łubinu białego występuje zarówno enzym – IGG, jak również jego substraty – glukozydy izoflawonoidów.
5. IGG z łubinu białego wykazuje szerszą specyficzność substratową niż opisane dotąd enzymy o podobnej aktywności z innych roślin.
6. Enzym odłącza pojedyncze β -anomery glukozy z końca nieredukującego, czyli jest egzo- β -glukozydazą.
7. Umieszczenie podstawników na pierścieniu fenolowym wpływa na powinowactwo IGG do substratu: najlepiej hydrolizowane są substraty z podstawnikiem w pozycji para-, a najgorzej te, które posiadają podstawnik w pozycji orto-.
8. IGG odgrywa istotną rolę w oddziaływaniu łubinu białego z mikroorganizmami, uwalniając aktywne biologicznie aglikony izoflawonoidów ze zmagazynowanych w tkance roślinnej glukozydów.
9. IGG bierze udział w wydzielaniu aglikonów izoflawonoidów przez korzenie łubinu białego.
10. Regulacja intensywności wydzielania izoflawonoidów nie odbywa się poprzez zmiany aktywności IGG, lecz prawdopodobnie poprzez regulację transportu odpowiednich glukozydów z wakuoli do ściany komórkowej.

Celem niniejszej pracy było określenie roli β -glukozylazy ze skłaniającego się do badania w procesach metabolicznych wewnątrz. Rozwiązanie podstawowego problemu opiera się na konkluzyjnej analizie danych biochemicznych i fizjologicznych składowych z określeniem fizjologicznej roli IGG w odkształcaniu tubulin białego ze środowiskiem. Najważniejsze wyniki i wnioski podsumowane zostały następująco:

1. Enzym o aktywności β -glukozylazy, glukozylaza kolagenazowa występuje zarówno w postaciach białek cytoplazmatycznych jak i białkach skłaniającego się, izolowanych ze wszystkich części tubulin białego.
2. Aktywność IGG jest bardzo specyficzna, najwyższą aktywność obserwuje się we białkach białek skłaniającego się.
3. Aktywność IGG w porównaniu z innymi białkami jest składowa z profilu kolagenazowy; wysoka aktywność IGG obserwuje się w białkach białek skłaniającego się, w białkach białek skłaniającego się.
4. W składowych białkach białego występuje zarówno enzym - IGG, jak również jego substraty - glukozylaza kolagenazowa.
5. IGG z tubulin białego wykazuje specyficzną substratową dla opisanego dotychczas o podłożu aktywności z innymi białkami.
6. Enzym odłącza podłoża β -amazy glukozy z kolumn metabolicznego, czyli jest β -glukozylaza.
7. Umieszczenie podłoża w białkach białego wpływa na powstawanie IGG do substratu, niekiedy hydrolyzacja z substratu z podłożem w postaci białka, a niekiedy z kolumn metabolicznej podłoża w postaci białka.
8. IGG odgrywa rolę w odkształcaniu tubulin białego z mikroorganizmami, uwzględniając aktywne biologiczne aglony kolagenazowe ze zmagazynowanych w tkance białek białych.
9. IGG bierze udział w wydaleniu aglony kolagenazowej przez komórki tubulin białego.
10. Regulacja intensywności wydalenia kolagenazowej nie odbywa się poprzez zmianę aktywności IGG, lecz prawdopodobnie poprzez regulację transportu odpowiednich glukozylaz z kolumn metabolicznej.

7. LITERATURA

- Akiyama T, Shibuya N, Hrmova M, Fincher G B** (1997) Purification and characterization of a (1→3)- β -D-glucan endohydrolase from rice (*Oryza sativa*) bran. *Carbohydr Res* **297**: 365-37
- Ayers A R, Ebel J, Finelli F, Berger N, Albersheim P** (1976) Host-pathogen interactions IX. Quantitative assays of elicitor activity and characterization of the elicitor present in the extracellular medium of cultures of *Phytophthora megasperma* var. *sojae*. *Plant Physiol* **57**: 751-759
- Barbour W M, Hattermann D R, Stacey G** (1991) Chemotaxis of *Bradyrhizobium japonicum* to soybean exudates. *Appl Environ Microbiol* **57**: 2635-2639
- Bartnicki-Garcia S** (1968) Cell wall chemistry, morphogenesis and taxonomy of fungi. *Annu Rev Microbiol* **22**: 87-108
- Barz W, Mackenbrock U** (1994) Constitutive and elicitation induced metabolism of isoflavones and pterocarpan in chickpea (*Cicer arietinum* L.) cell suspension cultures. *Plant Cell Tissue Organ Cult* **38**: 199-211
- Basse C W, Boller T** (1992) Glycopeptide elicitors of stress responses in tomato cells. N-linked glycans are essential for activity but act as suppressors of the same activity when released from the glycopeptides. *Plant Physiol* **98**: 1239-1247
- Bergmeyer H U** (1974a) Methods for determination of enzyme activity. *Methods of Enzymatic Analysis*. 2nd English Edition, Vol 1. Academic Press, New York
- Bergmeyer H U** (1974b) Methods for determination of enzyme activity. *Methods of Enzymatic Analysis*. 2nd English Edition, Vol 2. Academic Press, New York
- Berhow M A, Vaughn S F** (1999) Higher plant flavonoids: Biosynthesis and chemical ecology. W: Inderjit, Dakshini K M M, Foy C L, ed, *Principles and practices in plant ecology: Allelochemical interactions*. CRC Press, Boca Raton, 423-438
- Bolaños-Vásquez M C, Werner D** (1997) Effects of *Rhizobium tropici*, *R. etli*, and *R. leguminosarum* bv. *phaseoli* on *nod* gene-inducing flavonoids in root exudates of *Phaseolus vulgaris*. *Mol Plant-Microbe Interact* **10**: 339-346
- Biggs D R, Welle R, Grisebach H** (1990) Intracellular localization of prenyltransferases of isoflavonoid phytoalexin biosynthesis in bean and soybean. *Planta* **181**: 244-248
- Bolwell G P, Davies D R, Gerrish C, Auh C K, Murphy T M** (1998) Comparative biochemistry of the oxidative burst produced by rose and French bean cells reveals two distinct mechanisms. *Plant Physiol* **116**: 1379-1385
- Boudet A M** (1998) A new view of lignification. *Trends Plant Sci* **3**: 67-71
- Bradford M M** (1976) A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254
- Brewin N J** (1991) Development of the legume root nodule. *Annu Rev Cell Biol* **7**: 191-226
- Brummell D A, Bird C R, Schuch W, Bennett A B** (1997a) An endo-1,4-beta-glucanase expressed at high levels in rapidly expanding tissues. *Plant Mol Biol* **33**: 87-95

Algeria, J. (1985) *Journal of the Royal Society of Medicine*, 78, 100-105.

Algeria, J. (1986) *Journal of the Royal Society of Medicine*, 79, 100-105.

Algeria, J. (1987) *Journal of the Royal Society of Medicine*, 80, 100-105.

Algeria, J. (1988) *Journal of the Royal Society of Medicine*, 81, 100-105.

Algeria, J. (1989) *Journal of the Royal Society of Medicine*, 82, 100-105.

Algeria, J. (1990) *Journal of the Royal Society of Medicine*, 83, 100-105.

Algeria, J. (1991) *Journal of the Royal Society of Medicine*, 84, 100-105.

Algeria, J. (1992) *Journal of the Royal Society of Medicine*, 85, 100-105.

Algeria, J. (1993) *Journal of the Royal Society of Medicine*, 86, 100-105.

Algeria, J. (1994) *Journal of the Royal Society of Medicine*, 87, 100-105.

Algeria, J. (1995) *Journal of the Royal Society of Medicine*, 88, 100-105.

Algeria, J. (1996) *Journal of the Royal Society of Medicine*, 89, 100-105.

Algeria, J. (1997) *Journal of the Royal Society of Medicine*, 90, 100-105.

Algeria, J. (1998) *Journal of the Royal Society of Medicine*, 91, 100-105.

Algeria, J. (1999) *Journal of the Royal Society of Medicine*, 92, 100-105.

Algeria, J. (2000) *Journal of the Royal Society of Medicine*, 93, 100-105.

Algeria, J. (2001) *Journal of the Royal Society of Medicine*, 94, 100-105.

Algeria, J. (2002) *Journal of the Royal Society of Medicine*, 95, 100-105.

Algeria, J. (2003) *Journal of the Royal Society of Medicine*, 96, 100-105.

Algeria, J. (2004) *Journal of the Royal Society of Medicine*, 97, 100-105.

Algeria, J. (2005) *Journal of the Royal Society of Medicine*, 98, 100-105.

Algeria, J. (2006) *Journal of the Royal Society of Medicine*, 99, 100-105.

Algeria, J. (2007) *Journal of the Royal Society of Medicine*, 100, 100-105.

Algeria, J. (2008) *Journal of the Royal Society of Medicine*, 101, 100-105.

Algeria, J. (2009) *Journal of the Royal Society of Medicine*, 102, 100-105.

Algeria, J. (2010) *Journal of the Royal Society of Medicine*, 103, 100-105.

Algeria, J. (2011) *Journal of the Royal Society of Medicine*, 104, 100-105.

Algeria, J. (2012) *Journal of the Royal Society of Medicine*, 105, 100-105.

Algeria, J. (2013) *Journal of the Royal Society of Medicine*, 106, 100-105.

Algeria, J. (2014) *Journal of the Royal Society of Medicine*, 107, 100-105.

Algeria, J. (2015) *Journal of the Royal Society of Medicine*, 108, 100-105.

Algeria, J. (2016) *Journal of the Royal Society of Medicine*, 109, 100-105.

Algeria, J. (2017) *Journal of the Royal Society of Medicine*, 110, 100-105.

Algeria, J. (2018) *Journal of the Royal Society of Medicine*, 111, 100-105.

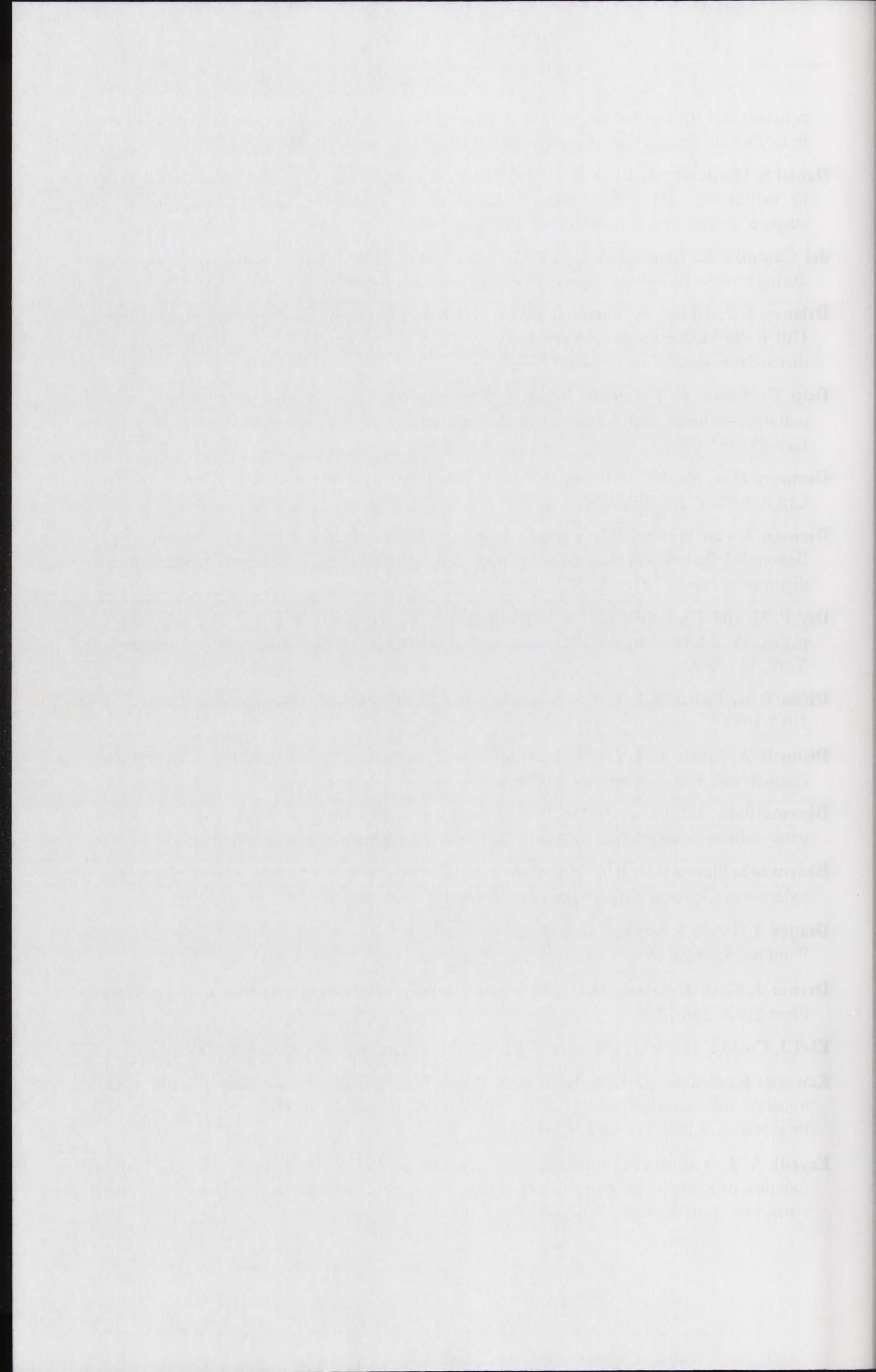
Algeria, J. (2019) *Journal of the Royal Society of Medicine*, 112, 100-105.

Algeria, J. (2020) *Journal of the Royal Society of Medicine*, 113, 100-105.

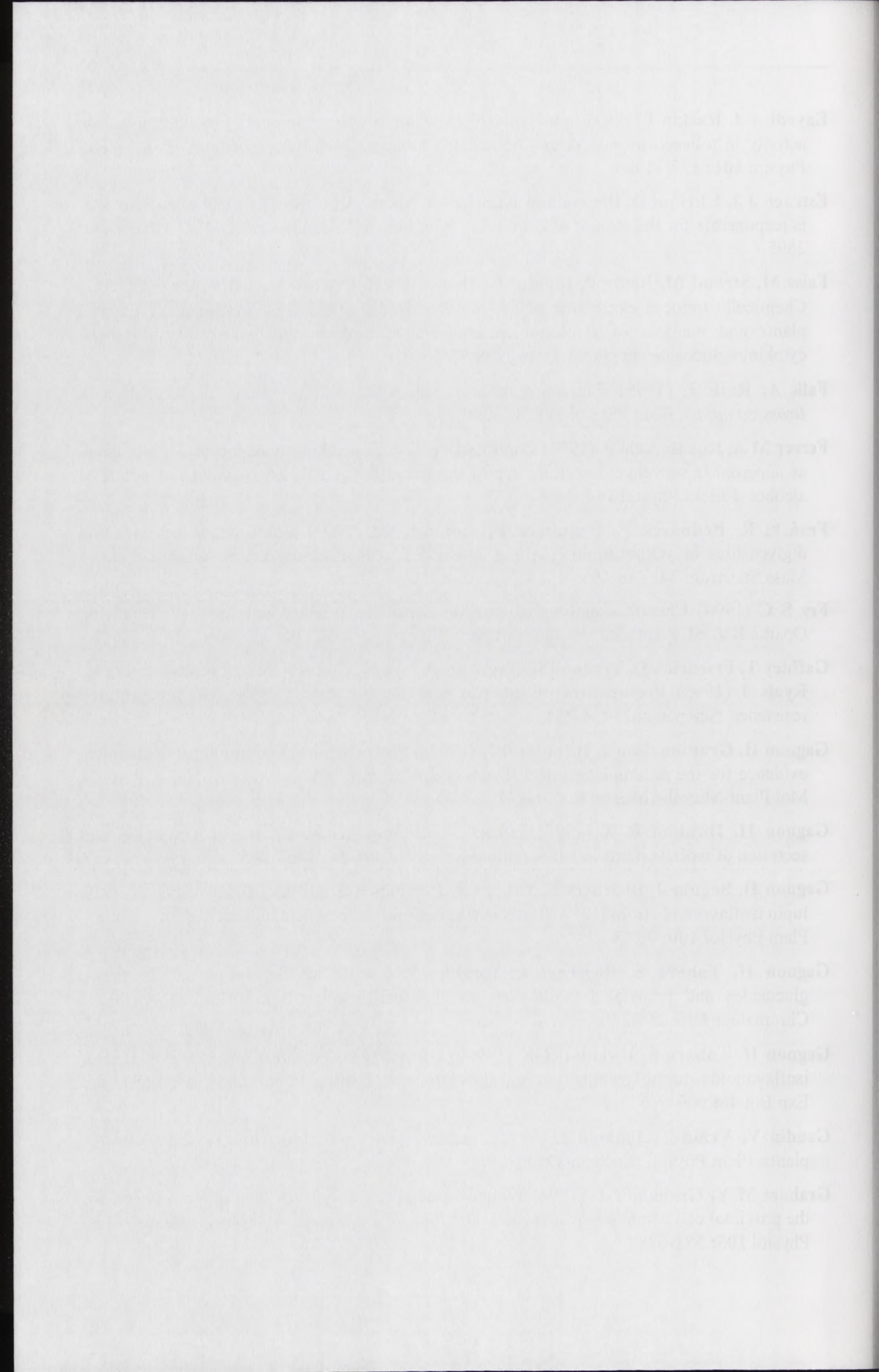
- Brummell D A, Catala C, Lashbrook C C, Bennett A B** (1997b) A membrane-anchored E-type endo-1,4- β -glucanase is localized on Golgi and plasma membranes of higher plants. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 4794-4799
- Brzobohatý B, Moore I, Kirstoffersen P, Bako L, Campos N, Schell J, Palme K** (1993) Release of active cytokinin by a β -glucosidase localized to the maize root meristem. *Science* **262**: 1051-1053
- Brzobohatý B, Moore I, Palme K** (1994) Cytokinin metabolism: implications for regulation of plant growth and development. *Plant Mol Biol* **26**: 1483-1497
- Bucciaglia P A, Smith A G** (1994) Cloning and characterization of *Tag 1*, a tobacco anther β -1,3-glucanase expressed during tetrad dissolution. *Plant Mol Biol* **24**: 903-914
- Bulawa C E** (1993) Genetics and molecular biology of chitin synthesis in fungi. *Annu Rev Microbiol* **47**: 505-534
- Burmeister G, Hösel W** (1980) Comparison of the β -glycosidases from *Cicer arietinum* L. cell cultures and whole seedlings. *Planta Med* **40**: 40-48
- Burmeister G, Hösel W** (1981) Immunohistochemical localization of β -glucosidases in lignin and isoflavone metabolism in *Cicer arietinum* L. seedlings. *Planta* **152**: 578-586
- Burzyński A** (1999) Charakterystyka aktywności enzymatycznej endogennych chitynaz łubinu białego (*Lupinus albus* L.) w roślinach zdrowych i w reakcjach obronnych. Praca dyplomowa Wydziału Biologii UAM wykonana w Instytucie Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu
- Buško M** (1999) Modelowanie reakcji biosyntezy dehydrodimerów kwasu ferulowego – analiza produktów reakcji metodą GC/MS. Praca dyplomowa Wydziału Biologii UAM wykonana w Instytucie Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu
- Campos N, Bako L, Feldwisch J, Schell J, Palme K** (1992) A protein from maize labelled with azido-IAA has novel β -glucosidase activity. *Plant J* **2**: 675-684
- Carpita N C, Gibeaut D M** (1993) Structural models of primary cell walls in flowering plants: Consistency of molecular structure with the physical properties of the walls during growth. *Plant J* **3**: 1-30
- Catala C, Rose J K C, Bennett A B** (1997) Auxin regulation and spatial localization of an endo-1,4-beta-D-glucanase and a xyloglucan endotransglycosylase in expanding tomato hypocotyls. *Plant J* **12**: 417-426
- Chaplin M F** (1986) Monosaccharides. W: Chaplin M F, Kennedy J F, ed, *Carbohydrate Analysis: A Practical Approach*. IRL Press, Oxford, 1-36
- Chen Z, Malamy J, Henning 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
- Chilton M D, Tepfer D A, Petit A, David C, Casse-Delbart F, Tempe J** (1982) *Agrobacterium rhizogenes* inserts T-DNA into the genomes of the host plant root cells. *Nature* **295**: 432-434
- Cho M-J, Harper J E** (1991a) Effect of inoculation and nitrogen on isoflavonoid concentration in wild-type and nodulation mutant soybean roots. *Plant Physiol* **95**: 435-442

- Cho M-J, Harper J E** (1991b) Effect of localized nitrate application on isoflavonoid concentration and nodulation in split-root systems of wild-type and nodulation-mutant soybean plants. *Plant Physiol* **95**: 1106-1112
- Conn E E** (1981) Cyanogenic glycosides. W: Stumpf P K, Conn E E, ed, *The Biochemistry of Plants: A Comprehensive Treatise, Vol 7: Secondary Plant Products*. Academic Press, New York, 479-500
- Conn E E** (1993) β -glucosidases in plants: Substrate specificity. W: Esen A, ed, *β -Glucosidases: Biochemistry and Molecular Biology*. ACS Symposium Series 533. American Chemical Society, Washington, 15-26
- Cordero M J, Raventós D, San Segundo B** (1993) Differential expression and induction of chitinases and β -1,3-glucanases in response to fungal infection during germination of maize seeds. *Mol Plant-Microbe Interact* **7**: 23-31
- Coronado C, Zuanazzi J A S, Sallaud C, Quirion J-C, Esnault R, Husson H-P, Kondorosi A, Ratet P** (1995) Alfalfa root flavonoid production is nitrogen regulated. *Plant Physiol* **108**: 533-542
- Cosgrove D J** (1997) Relaxation in a high-stress environment: the molecular bases of extensible cell walls and cell enlargement. *Plant Cell* **9**: 1031-1041
- Cosgrove D J** (1999) Enzymes and other agents that enhance cell wall extensibility. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **50**: 391-417
- Cosio E G, Feger M, Miller C J, Antelo L, Ebel J** (1996) High-affinity binding of fungal β -glucan elicitors to cell membranes of species of the plant family Fabaceae. *Planta* **200**: 92-99
- Crombie W M L, Crombie L, Green J B, Lucas J A** (1985) Pathogenicity of 'take-all' fungus to oats: its relationship to the concentration and detoxification of the four avenacins. *Phytochemistry* **25**: 2075-2083
- Currier W W, Strobel G A** (1976) Chemotaxis of *Rhizobium spp.* to plant root exudates. *Plant Physiol* **57**: 820-823
- Dakora F D, Joseph C M, Phillips D A** (1993a) Alfalfa (*Medicago sativa* L.) root exudates contain isoflavonoids in the presence of *Rhizobium meliloti*. *Plant Physiol* **101**: 819-824
- Dakora F D, Joseph C M, Phillips D A** (1993b) Common bean root exudates contain elevated levels of daidzein and coumestrol in response to *Rhizobium* inoculation. *Mol Plant-Microbe Interact* **6**: 665-668
- Dakora F D, Phillips D A** (1996) Diverse functions of isoflavonoids in legumes transcend anti-microbial definitions of phytoalexins. *Physiol Mol Plant Pathol* **49**:1-20
- Dalkin K, Edwards R, Edington B, Dixon R A** (1990) Stress responses in alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Plant Physiol* **92**: 440-446
- Daniel S, Barz W** (1990a) Elicitor - induced metabolic changes in cell cultures of chickpea (*Cicer arietinum* L.) cultivars resistant and susceptible to *Ascochyta rabiei*. II. Differential induction of chalcone - synthase - mRNA activity and analysis of in - vitro-translated protein patterns. *Planta* **182**: 279-286
- Daniel S, Tiemann K, Wittkamp U, Bless W, Hinderer W, Barz W** (1990) Elicitor - induced metabolic changes in cell cultures of chickpea (*Cicer arietinum* L.) cultivars

- resistant and susceptible to *Ascochyta rabiei*. I. Investigations of enzyme activities involved in isoflavone and pterocarpan phytoalexin biosynthesis. *Planta* **182**: 270-278
- Daniel S, Hinderer W, Barz W** (1988) Elicitor-induced changes of enzyme activities related to isoflavone and pterocarpan accumulation in chickpea (*Cicer arietinum* L.) cell suspension cultures. *Z Naturforsch* **43c**: 536-544
- del Campillo E, Bennett A B** (1996) Pedicel breakstrength and cellulase gene expression during tomato flower abscission. *Plant Physiol* **111**: 813-820
- Delaney T P, Uknes S, Vernooij B, Friedrich L, Weymann K, Negrotto D, Gaffney T, Gut-Rella M, Kessmann, Ward E, Ryals J** (1994) A central role of salicylic acid in plant disease resistance. *Science* **266**: 1247-1250
- Delp G, Palva E T** (1999) A novel flower-specific *Arabidopsis* gene related to both pathogen-induced and developmentally regulated plant β -1,3-glucanase genes. *Plant Mol Biol* **39**: 565-575
- Dempsey D A, Shah J, Klessig D F** (1999) Salicylic acid and disease resistance in plants. *Crit Rev Plant Sci* **18**: 547-575
- Derksen J, van Wenzel R, Knuiman B, Ylstra B, van Tunen A J** (1999) Pollen tubes of flavonol-deficient *Petunia* show striking alterations in wall structure leading to tube disruption. *Planta* **207**: 575-581
- Dey P M, del Campillo E** (1984) Biochemistry of the multiple forms of glycosidases in plants. W: Meister A, ed, *Advances in Enzymology*, Vol 56. John Wiley & Sons, New York, 143-249
- Dixon R A, Paiva N L** (1995) Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *Plant Cell* **7**: 1085-1097
- Dixon R A, Steele C L** (1999) Flavonoids and isoflavonoids - a gold mine for metabolic engineering. *Trends Plant Sci* **4**: 394-400
- Dharmatilake A J, Bauer W D** (1992) Chemotaxis of *Rhizobium meliloti* towards nodulation gene-inducing compounds from alfalfa roots. *App Environ Microbiol* **58**: 1153-1158
- Dharmawardhana D P, Ellis B E, Carlson J E** (1995) A β -glucosidase from lodgepole pine xylem specific for the lignin precursor coniferin. *Plant Physiol* **107**: 331-339
- Draper J** (1997) Salicylate, superoxide synthesis and cell suicide in plant defence. *Trends Plant Sci* **5**: 162-165
- Durner J, Shah J, Klessig D F** (1997) Salicylic acid and disease resistance in plants. *Trends Plant Sci* **2**: 266-274
- Ebel J, Cosio E G** (1994) Elicitors of plant defense responses. *Int Rev Cytol* **148**: 1-36
- Edwards K, Cramer C L, Bolwell G P, Dixon R A, Schuch W, Lamb C J** (1985) Rapid transient induction of phenylalanine ammonia-lyase mRNA in elicitor-treated bean cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **82**: 6731-6735
- Enyedi A J, Yalpini N, Silverman P, Raskin I** (1992) Localization, conjugation and function of salicylic acid in tobacco during the hypersensitive reaction to tobacco mosaic virus. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**: 2480-2484



- 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
- Estruch J J, Chriqui D, Drossmann K, Schell J, Spena A** (1991) The plant oncogene *rolC* is responsible for the release of cytokinins from glucoside conjugates. *EMBO J* **10**: 2889-2895
- Faiss M, Strand M, Redig P, Doležal K, Hanuš J, van Oncken H, Schmölling T** (1996) Chemically induced expression of the *rolC*-encoded β -glucosidase in transgenic tobacco plants and analysis of cytokinin metabolism: *rolC* does not hydrolyze endogenous cytokinin glucosides in planta. *Plant J* **10**: 33-46
- Falk A, Rask L** (1995) Expression of a zeatin-O-glucoside-degrading β -glucosidase in *Brassica napus*. *Plant Physiol* **108**: 1369-1377
- Ferrer M A, Ros Barceló A** (1994) Control of the lignification in *Lupinus* by genistein acting as superoxide scavenger and inhibitor of the peroxidase-catalysed oxidation of coniferyl alcohol. *J Plant Physiol* **144**: 64-67
- Frański R, Bednarek P, Wojtaszek P, Stobiecki M** (1999) Identification of flavonoid diglycosides in yellow lupin (*Lupinus luteus* L.) with mass spectrometric techniques. *J Mass Spectrom* **34**: 486-495
- Fry S C** (1994) Chemical analysis of components of the primary cell wall. W: Harris N, Oparka K J, ed, *Plant Cell Biology: A Practical Approach*. IRL Press, Oxford, 199-220
- Gaffney T, Friedrich L, Vernooij B, Negrotto 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**: 754-755
- Gagnon H, Grandmaison J, Ibrahim R K** (1995a) Phytochemical and immunocytochemical evidence for the accumulation of 2'-hydroxylupalbigenin in lupin nodules and bacteroids. *Mol Plant-Microbe Interact* **8**: 131-137
- Gagnon H, Ibrahim R K** (1997) Effects of various elicitors on the accumulation and secretion of isoflavonoids in white lupin. *Phytochemistry* **44**: 1463-1467
- Gagnon H, Seguin J, Bleichert E, Tahara S, Ibrahim R K** (1992a) Biosynthesis of white lupin isoflavonoids from [U - ^{14}C]L-phenylalanine and their release into the culture medium. *Plant Physiol* **100**: 76-79
- Gagnon H, Tahara S, Bleichert E, Ibrahim R K** (1992b) Separation of aglycones, glucosides and prenylated isoflavones by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr* **606**: 255-259
- Gagnon H, Tahara S, Ibrahim R K** (1995b) Biosynthesis, accumulation and secretion of isoflavonoids during germination and development of white lupin (*Lupinus albus* L.). *J Exp Bot* **46**: 609-616
- Gaudin V, Vrain T, Jouanin L** (1994) Bacterial genes modifying hormonal balances in plants. *Plant Physiol Biochem* **32**: 11-29
- Graham M Y, Graham T L** (1994) Wound-associated competency factors are required for the proximal cell responses of soybean to the *Phytophthora sojae* wall glucan elicitor. *Plant Physiol* **105**: 571-578



- Graham T L** (1991) Flavonoid and isoflavonoid distribution in developing soybean seedling tissues and in seed and root exudates. *Plant Physiol* **95**: 594-603
- Graham T L** (1995) Cellular biochemistry of phenylpropanoid responses of soybean to infection by *Phytophthora sojae*. W: Danile M, Purkayastha R P, ed, Handbook of phytoalexin metabolism and action. Marcel Dekker, New York, 85-116
- Graham T L** (1998) Flavonoid and flavonol glycoside metabolism in *Arabidopsis*. *Plant Physiol Biochem* **36**: 135-144
- Graham T L, Graham M Y** (1991) Glyceollin elicitors induce major but distinctly different shifts in isoflavonoid metabolism in proximal and distal soybean cell populations. *Mol Plant-Microbe Interact* **4**: 60-68
- Graham T L, Graham M Y** (1996) Signalling in soybean phenylpropanoid responses. *Plant Physiol* **110**: 1123-1133
- Graham T L, Graham M Y** (1999) Role of hypersensitive cell death in conditioning elicitation competency and defense potentiation. *Physiol Mol Plant Pathol* **55**: 13-20
- Graham T L, Graham M Y, Rose A R, Poling R S** (1998) Release of genistein by an isoflavone-specific glucosidase activates a peroxidase-like NADH oxidase which triggers the defense competency of soybean cells. 7th International Congress of Plant Pathology, Edynburg, Szkocja, 9-16. 08. 1998, Abstracts: 1.9.38
- Graham T L, Kim J E, Graham M Y** (1990) Role of constitutive isoflavone conjugates in the accumulation of glyceollin in soybean infected with *Phytophthora megasperma*. *Mol Plant-Microbe Interact* **3**: 157-166
- Grandmaison J, Ibrahim R** (1995) Ultrastructural localization of a diprenylated isoflavone in *Rhizobium lupini-Lupinus albus* symbiotic association. *J Exp Bot* **46**: 231-237
- Gross G G** (1977) Cell wall-bound malate dehydrogenase from horseradish. *Phytochemistry* **16**: 319-321
- Gunia W, Hinderer W, Wittkamp U, Barz W** (1991) Elicitor induction of cytochrome P - 450 monooxygenases in cell suspension cultures of chickpea (*Cicer arietinum* L.) and their involvement in pterocarpan phytoalexin biosynthesis. *Z Naturforsch* **46c**: 58-66
- Gus-Mayer S, Brunner H, Schneider-Poetsch H A W, Rüdiger W** (1994) Avenacosidase from oat: purification, sequence analysis and biochemical characterization of a new member of the BGA family of β -glucosidases. *Plant Mol Biol* **26**: 909-921
- Haberedder H, Schröder G, Ebel J** (1989) Rapid induction of phenylalanine ammonia-lyase and chalcone synthase mRNAs during fungus infection of soybean (*Glycine max*) roots or elicitor treatment of soybean cell cultures at the onset of phytoalexin synthesis. *Planta* **177**: 58-65
- Hahlbrock K** (1981) Flavonoids. W: Stumpf P K, Conn E E, ed, The Biochemistry of Plants: A Comprehensive Treatise, Vol 7: Secondary Plant Products. Academic Press, New York, 425-455
- Hahn M G, Darvill A, Albersheim P, Bergmann C, Cheong J J, Koller A, Lo V M** (1992) Preparation and characterization of oligosaccharide elicitors of phytoalexin accumulation. W: Gur S J, McPherson M J, Bowels D J, ed, Molecular Plant Pathology. A Practical Approach 2. IRL Press, Oxford, 103-147

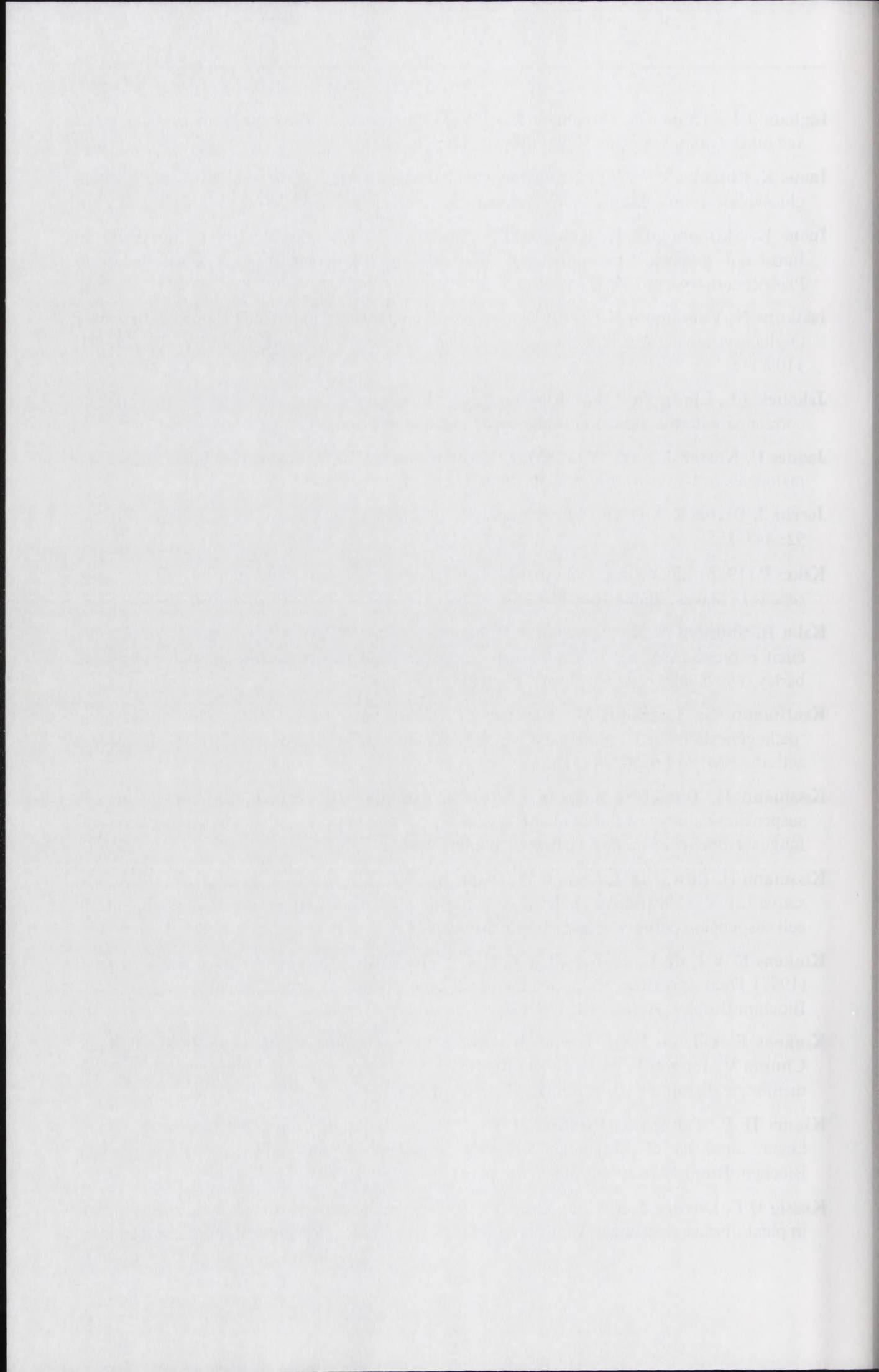
- Hagmann M, Grisebach H** (1984) Enzymatic rearrangement of flavanone to isoflavone. *FEBS* **175**: 199-202
- Hakamatsuka T, Noguchi H, Ebizuka Y, Sankawa U** (1990) Isoflavone synthase from cell suspension cultures of *Pueraria lobata*. *Chem Pharm Bull* **38**: 1942-1945
- Hallard D, Bleichert E, Gagnon H, Tahara S, Ibrahim R K** (1992) Production and release of isoflavonoids by lupin cell cultures. *Z Naturforsch* **47c**: 346-352
- Ham K S, Albersheim P, Darvill A G** (1995) Generation of β -glucan elicitors by plant enzymes and inhibition of the enzymes by a fungal protein. *Can J Bot* **73**: 1100-1103
- Hammond-Kosack K E** (1992) Preparation and analysis of intercellular fluid. W: Gurr S J, McPherson M J, Bowels D J, ed, *Molecular Plant Pathology: A Practical Approach* 2. IRL Press, Oxford, 15-21
- Harborne J, Ingham J L, King L, Payne M** (1976) The isopentenyl isoflavone luteone as a pre-infectious antifungal agent in the genus *Lupinus*. *Phytochemistry* **15**: 1485-1487
- Harpster M H, Brummell D A, Dunsmuir P** (1998) Expression analysis of a ripening-specific, auxin-repressed endo-1,4-beta-glucanase gene in strawberry. *Plant Physiol* **118**: 1307-1316
- Hartwig U A, Maxwell C A, Joseph C M, Phillips D A** (1989) Interactions among flavonoid *nod* gene inducers released from alfalfa seeds and roots. *Plant Physiol* **91**: 1138-1142
- Hartwig U A, Maxwell C A, Joseph C M, Phillips D A** (1990) Chrysoeriol and luteolin released from alfalfa seeds induce *nod* genes in *Rhizobium meliloti*. *Plant Physiol* **92**: 116-122
- Hartwig U A, Phillips D A** (1991) Release and modification of *nod*-gene-inducing flavonoids from alfalfa seeds. *Plant Physiol* **95**: 804-807
- Hashidoko Y, Tahara S, Mizutani J** (1986) New complex isoflavones in the roots of yellow lupin (*Lupinus luteus* L. cv. Barpine). *Agric Biol Chem* **50**: 1797-1807
- He X-Z, Dixon R A** (1996) Affinity chromatography, substrate/product specificity, and amino acid sequence analysis of an isoflavone *O*-methyltransferase from alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Arch Biochem Biophys* **336**: 121-129
- He X-Z, Reddy J T, Dixon R A** (1998) Stress responses in alfalfa (*Medicago sativa* L.). XXII. cDNA cloning and characterization of an elicitor-inducible isoflavone 7-*O*-methyltransferase. *Plant Mol Biol* **36**: 43-45
- Hennig J, Malamy J, Gryniewicz G, Indulski J, Klessig D F** (1993) Interconversion of the salicylic acid signal and its glucoside in tobacco. *Plant J* **4**: 593-600
- Hird D L, Worrall D, Hodge R, Smartt S, Paul W, Scott R** (1993) The anther-specific protein encoded by the *Brassica napus* and *Arabidopsis thaliana* A6 gene displays similarity to β -1,3-glucanases. *Plant J* **4**: 1023-1033
- Howieson J G, Fillery I R P, Legocki A B, Sikorski M M, Stępkowski T, Minchin F R, Dilworth M J** (1998) Nodulation, nitrogen fixation and nitrogen balance. W: Gladstones J S, Atkins C A, Hamblin J, ed, *Lupins as crop plants: Biology, production and utilization*. CAB International, Wallingford, New York 149-180
- Høj P B, Fincher G B** (1995) Molecular evolution of plant β -glucan endohydrolases. *Plant J* **7**: 367-379

- Hansen, H. (1958) ...
- Hansen, H. (1959) ...
- Hansen, H. (1960) ...
- Hansen, H. (1961) ...
- Hansen, H. (1962) ...
- Hansen, H. (1963) ...
- Hansen, H. (1964) ...
- Hansen, H. (1965) ...
- Hansen, H. (1966) ...
- Hansen, H. (1967) ...
- Hansen, H. (1968) ...
- Hansen, H. (1969) ...
- Hansen, H. (1970) ...
- Hansen, H. (1971) ...
- Hansen, H. (1972) ...
- Hansen, H. (1973) ...
- Hansen, H. (1974) ...
- Hansen, H. (1975) ...
- Hansen, H. (1976) ...
- Hansen, H. (1977) ...
- Hansen, H. (1978) ...
- Hansen, H. (1979) ...
- Hansen, H. (1980) ...
- Hansen, H. (1981) ...
- Hansen, H. (1982) ...
- Hansen, H. (1983) ...
- Hansen, H. (1984) ...
- Hansen, H. (1985) ...
- Hansen, H. (1986) ...
- Hansen, H. (1987) ...
- Hansen, H. (1988) ...
- Hansen, H. (1989) ...
- Hansen, H. (1990) ...
- Hansen, H. (1991) ...
- Hansen, H. (1992) ...
- Hansen, H. (1993) ...
- Hansen, H. (1994) ...
- Hansen, H. (1995) ...
- Hansen, H. (1996) ...
- Hansen, H. (1997) ...
- Hansen, H. (1998) ...
- Hansen, H. (1999) ...
- Hansen, H. (2000) ...
- Hansen, H. (2001) ...
- Hansen, H. (2002) ...
- Hansen, H. (2003) ...
- Hansen, H. (2004) ...
- Hansen, H. (2005) ...
- Hansen, H. (2006) ...
- Hansen, H. (2007) ...
- Hansen, H. (2008) ...
- Hansen, H. (2009) ...
- Hansen, H. (2010) ...
- Hansen, H. (2011) ...
- Hansen, H. (2012) ...
- Hansen, H. (2013) ...
- Hansen, H. (2014) ...
- Hansen, H. (2015) ...
- Hansen, H. (2016) ...
- Hansen, H. (2017) ...
- Hansen, H. (2018) ...
- Hansen, H. (2019) ...
- Hansen, H. (2020) ...

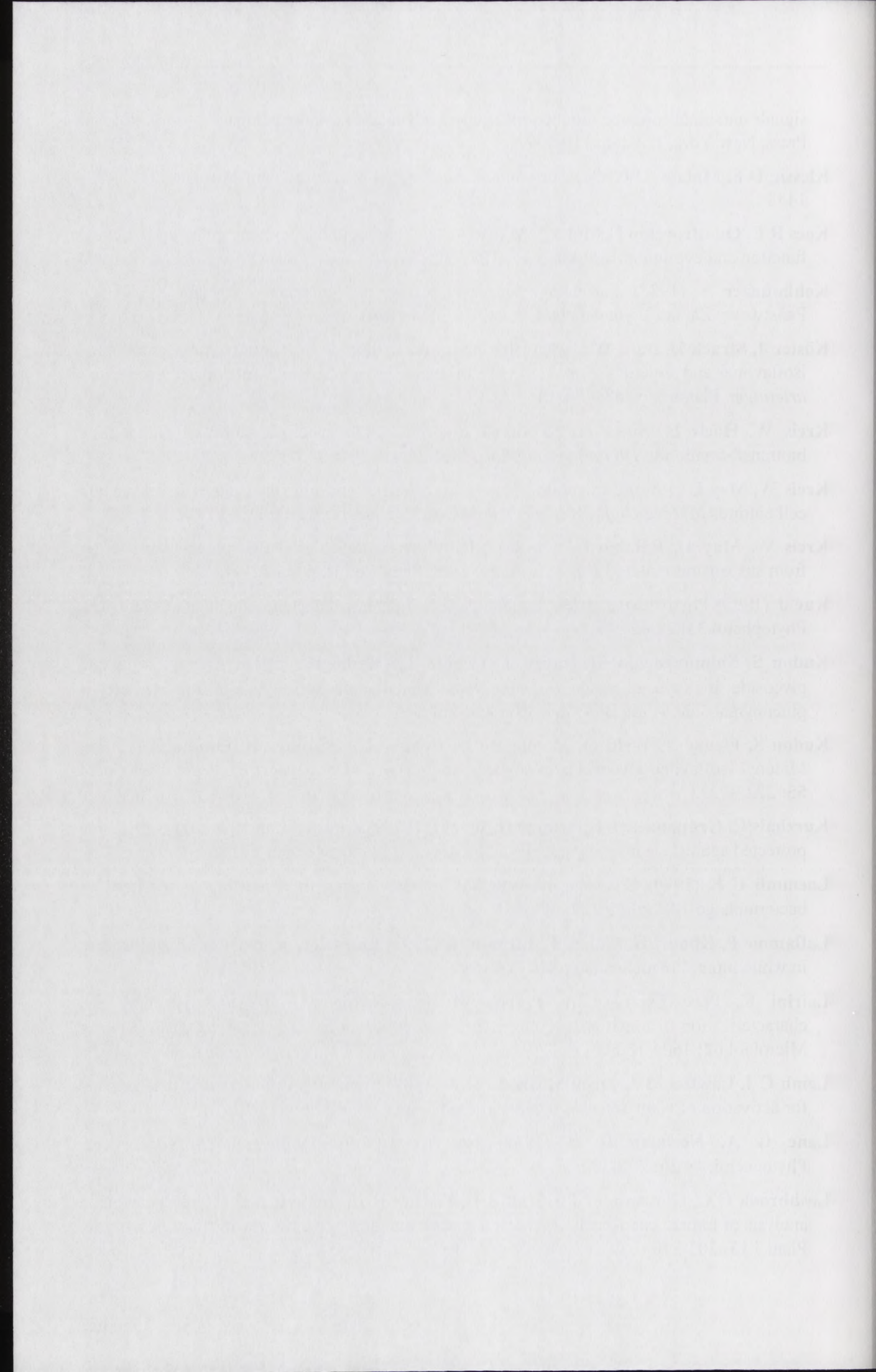
- Høj P B, Hartman D J, Morrice N A, Doan D N P, Fincher G B** (1989) Purification of (1 →3)- β -glucan endohydrolase isoenzyme II from germinated barley and determination of its primary structure from a cDNA clone. *Plant Mol Biol* **13**: 31-42
- Hösel W** (1976) Development and distribution of isoflavone 7-O- β -glycoside specific β -glucosidases in *Cicer arietinum*. *Planta Med* **30**: 97-103
- Hösel W** (1981) Glycosylation and Glycosidases. W: Stumpf P K, Conn E E, ed, *The Biochemistry of Plants: A Comprehensive Treatise, Vol 7: Secondary Plant Products*, Academic Press, New York 725-750
- Hösel W, Barz W** (1975) β -glucosidases from *Cicer arietinum* L. Purification and properties of isoflavone-7-O-glucoside-specific β -glucosidases. *Eur J Biochem* **57**: 607-616
- Hösel W, Conn E E** (1982) The aglycone specificity of plant β -glucosidases. *Trends Biochem Sci* **7**: 219-221
- Hösel W, Surholt E, Borgmann E** (1978) Characterization of β -glucosidase isoenzymes possibly involved in lignification from chick pea (*Cicer arietinum* L.), cell suspension cultures. *Eur J Biochem* **84**: 487-492
- Hösel W, Todenhagen R** (1980) Characterization of a β -glucosidase from *Glycine max* which hydrolyses coniferin and syringin. *Phytochemistry* **19**: 1349-1353
- Hrmova M, Banik M, Harvey A J, Garrett T P J, Varghese J N, Høj P B, Fincher G B** (1997) Polysaccharide hydrolases in germinated barley and their role in the depolymerization of plant and fungal cell walls. *Int J Biol Macromol* **21**: 67-72
- Hrmova M, Harvey A J, Wangs J, Shirley N J, Jones G P, Stone B A, Høj P B, Fincher G B** (1996) Barley β -D-glucan exohydrolases with β -D-glucosidase activity. *J Biol Chem* **271**: 5277-5286
- Hrmova M, Fincher G B** (1998) Barley β -D-glucan exohydrolases. Substrate specificity and kinetic properties. *Carbohydr Res* **305**: 209-221
- Hungria M, Joseph C M, Phillips D A** (1991a) Anthocyanidins and flavonols, major *nod* gene inducers from seed of a black-seeded common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Physiol* **97**: 751-758
- Hungria M, Joseph C M, Phillips D A** (1991b) *Rhizobium nod* gene inducers exuded naturally from roots of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Physiol* **97**: 759-764
- Hungria M, Phillips D A** (1993) Effects of a seed color mutation on rhizobial *nod*-gene-inducing flavonoids and nodulation in common bean. *Mol Plant-Microbe Interact* **6**: 418-422
- Hutzler P, Fischbach R, Heller W, Jungblut T P, Reuber S, Schmitz R, Veit M, Weissenböck G, Schnitzler J P** (1998) Tissue localization of phenolic compounds in plants by confocal laser scanning microscopy. *J Exp Bot* **49**: 953-965
- Ibrahim R K, De Luca V, Khouri H, Latchinian L, Brisson L, Charest P M** (1987) Enzymology and compartmentation of polymethylated flavonol glucosides in *Chrysosplenium americanum*. *Phytochemistry* **26**: 1237-1245
- Ingham J L, Keen N T, Mulheirn L J, Lyne R L** (1981) Inducibly-formed isoflavonoids from leaves of soybean. *Phytochemistry* **20**: 795-798

1875
1876
1877
1878
1879
1880
1881
1882
1883
1884
1885
1886
1887
1888
1889
1890
1891
1892
1893
1894
1895
1896
1897
1898
1899
1900

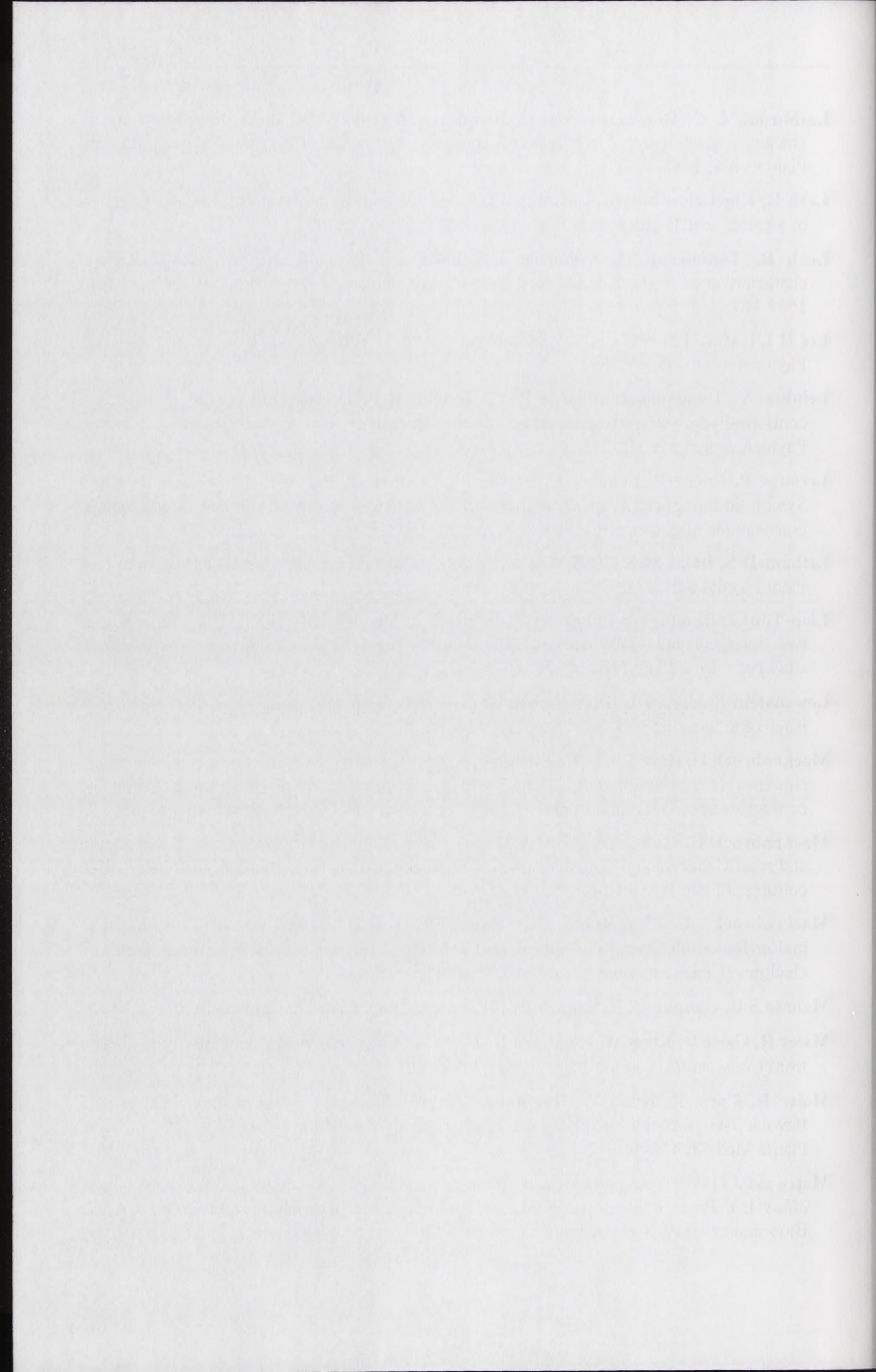
- Ingham J L, Tahara S, Harborne J B** (1983) Fungitoxic isoflavones from *Lupinus albus* and other *Lupinus* species. *Z Naturforsch* **38c**: 194-200
- Inoue K, Ebizuka Y** (1996) Purification and characterization of furostanol glycoside 26-O- β -glucosidase from *Costus speciosus* rhizomes. *FEBS Lett* **378**: 157-160
- Inoue K, Shimomoura K, Kobayashi S, Sankawa U, Ebizuka Y** (1996) Conversion of furostanol glycoside to spirostanol glycoside by β -glucosidase in *Costus speciosus*. *Phytochemistry* **41**: 725-727
- Ishikura N, Yamamoto K** (1990) Detection and characterization of UDP-glucose:flavonoid O-glucosyltransferases in the leaves of *Prunus x yedoensis* Matsum. *Plant Cell Physiol* **31**: 1109-115
- Jakobek J L, Lindgren P B** (1993) Generalized induction of defense responses in bean is not correlated with the induction of the hypersensitive reaction. *Plant Cell* **5**: 49-56
- Jaques U, Köster J, Barz W** (1985) Differential turnover of isoflavone 7-O-glucoside-6''-O-malonates in *Cicer arietinum* roots. *Phytochemistry* **24**: 949-951
- Jorriin J, Dixon R A** (1990) Stress responses in alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Plant Physiol* **92**: 447-455
- Kakes P** (1985) Linamarase and other β -glucosidases are present in the cell wall of *Trifolium repens* L. leaves. *Planta* **166**: 156-160
- Kaku H, Shibuya N, Xu P, Aryan A P, Fincher G B** (1997) *N*-acetylchitooligosaccharides elicit expression of a single (1 \rightarrow 3)- β -glucanase gene in suspension-cultured cells from barley (*Hordeum vulgare*). *Physiol Plant* **100**: 111-118
- Kauffmann S, Legrand M, Geoffroy P, Fritig B** (1987) Biological function of 'pathogenesis-related' proteins: four PR proteins of tobacco have 1,3- β -glucosidase activity. *EMBO J* **6**: 3209-3212
- Kessmann H, Daniel S, Barz W** (1988) Elicitation of pterocarpan phytoalexins in cell suspension cultures of different chickpea (*Cicer arietinum* L.) cultivars by elicitor from the fungus *Ascochyta rabiei*. *Z Naturforsch* **43c**: 529-535
- Kessmann H, Edwards R, Geno P W, Dixon A** (1990) Stress responses in alfalfa (*Medicago sativa* L.). V. Constitutive and elicitor-induced accumulation of isoflavonoid conjugates in cell suspension cultures. *Plant Physiol* **94**: 227-232
- Keukens E A J, de Vrije T, Fabrie C H J P, Demel R A, Jongen W M F, de Kruijff B** (1992) Dual specificity of sterol-mediated glycoalkaloid induced membrane disruption. *Biochim Biophys Acta* **1110**: 127-136
- Keukens E A J, de Vrije T, van den Boom C, de Waard P, Plasman H H, Thiel F, Chupin V, Jongen W M F, de Kruijff B** (1995) Molecular basis of glycoalkaloid induced membrane disruption. *Biochim Biophys Acta* **1240**: 216-228
- Khouri H E, Tahara S, Ibrahim R K** (1988) Partial purification, characterization, and kinetic analysis of isoflavone 5-O-methyltransferase from yellow lupin roots. *Arch Biochem Biophys* **262**: 592-598
- Klessig D F, Durner J, Shah J, Yang Y** (1998) Salicylic acid-mediated signal transduction in plant disease resistance. W: Romeo J T, Downum K R, Verpoorte R, ed, *Phytochemical*



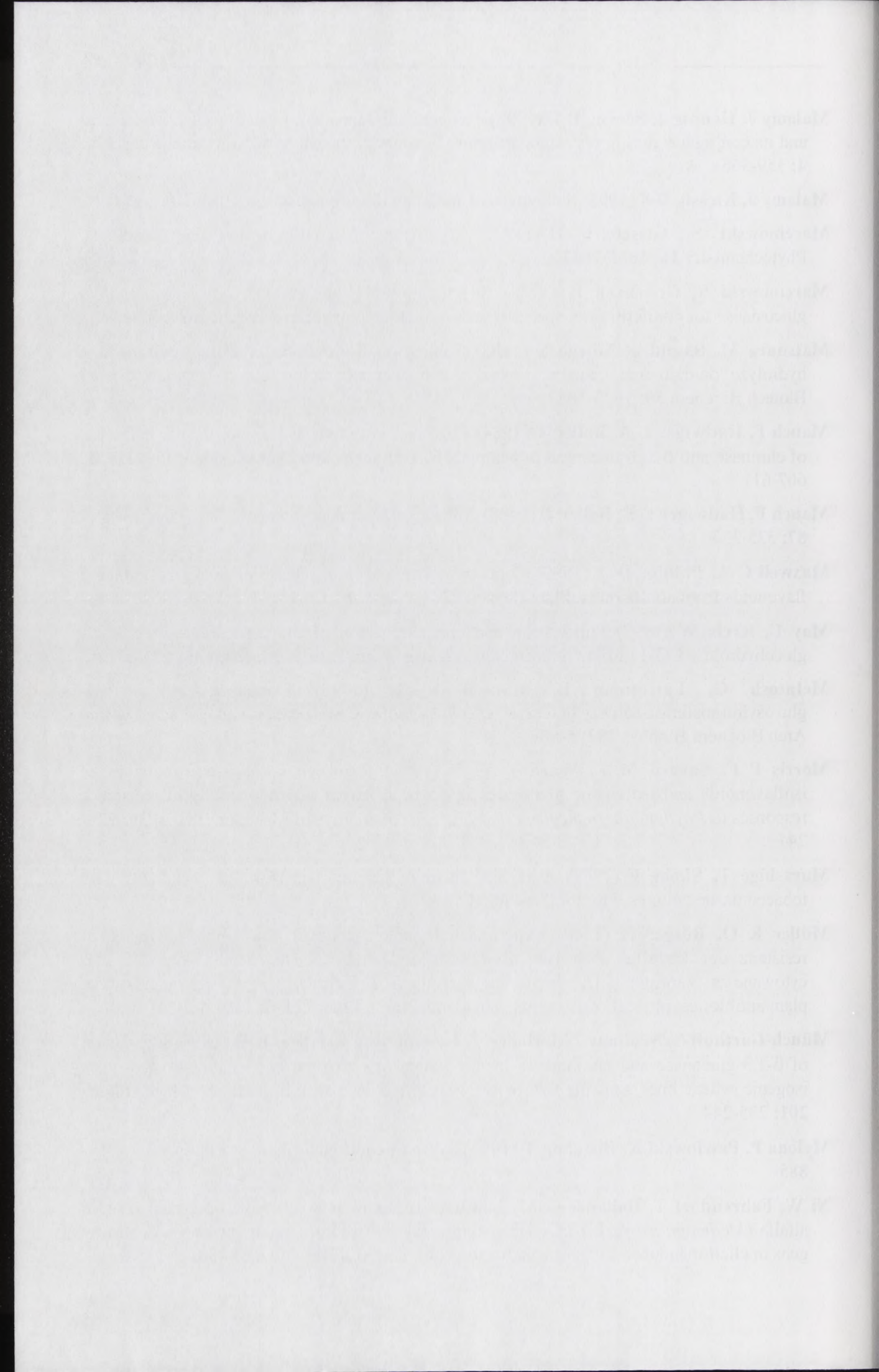
- signals and plant-microbe interactions. Recent advances in phytochemistry Vol 32. Plenum Press, New York, London, 119-137
- Klessig D F, Malamy J** (1994) The salicylic acid signal in plants. *Plant Mol Biol* **26**: 1439-1458
- Koes R E, Quattrocchio F, Mol J N M** (1994) The flavonoid biosynthetic pathway in plants: function and evolution. *BioEssays* **16**: 123-132
- Kohlmünzer S** (1985) *Farmakognozja: Podręcznik dla studentów farmacji*. Wyd III, Państwowy Zakład Wydawnictw Lekarskich, Warszawa
- Köster J, Strack D, Barz W** (1983) High performance liquid chromatographic separation of isoflavones and structural elucidation of isoflavone 7-O-glucoside 6''-malonates from *Cicer arietinum*. *Planta Med* **48**: 131-135
- Kreis W, Hoelz H, Sutor R, Reinhard E** (1993) Cellular organization of cardenolide biotransformation in *Digitalis grandiflora* Mill. *Planta* **191**: 246-251
- Kreis W, May U** (1990) Cardenolide glucosyltransferases and glucohydrolases in leaves and cell cultures of three *Digitalis* (*Scrophulariaceae*) species. *J Plant Physiol* **136**: 247-252
- Kreis W, May U, Reinhard E** (1986) UDP-glucose: digitoxin 16'-O-glucosyltransferase from suspension-cultured *Digitalis lanata* cells. *Plant Cell Rep* **5**: 442-445
- Kuč J** (1995) Phytoalexins, stress metabolism, and disease resistance in plants. *Annu Rev Phytopathol* **33**: 275-279
- Kudou S, Shimoyamada M, Imura T, Uchida T, Okubo K** (1991a) A new isoflavone glycoside in soybean seeds (*Glycine max* Merrill), glycitein 7-O- β -D-(6''-O-acetyl)-glucopyranoside. *Agric Biol Chem* **55**: 859-860
- Kudou S, Fleury Y, Welti D, Magnolato D, Uchida T, Kitamura K, Okubo K** (1991b) Malonyl isoflavone glycosides in soybean seeds (*Glycine max* Merrill). *Agric Biol Chem* **55**: 2227-2233
- Kurzahls C, Grützmacher H, Selmar D, Biehl B** (1989) Linustatin, the linamarin-glucoside protected against cleavage by apoplastic linamarase. *Planta Med* **55**: 673
- Laemmli U K** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685
- Laflamme P, Khouri H, Gulick P, Ibrahim R** (1993) Enzymatic prenylation of isoflavones in white lupin. *Phytochemistry* **34**: 147-151
- Lairini K, Perez-Espinosa A, Pineda M, Ruiz-Rubio M** (1996) Purification and characterization of tomatinase from *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* *Appl Environ Microbiol* **62**: 1604-1609
- Lamb C J, Lawton M A, Dron M, Dixon R A** (1989) Signals and transduction mechanisms for activation of plant defenses against microbial attack. *Cell* **56**: 215-224
- Lane G A, Newman R H** (1982) Isoflavones from *Lupinus angustifolius* root. *Phytochemistry* **26**: 295-300
- Lashbrook C C, Giovannoni J J, Hall B D, Fischer R L, Bennett A B** (1998) Transgenic analysis of tomato endo-beta-1,4-glucanase gene function. Role of cell in floral abscission. *Plant J* **13**: 303-310



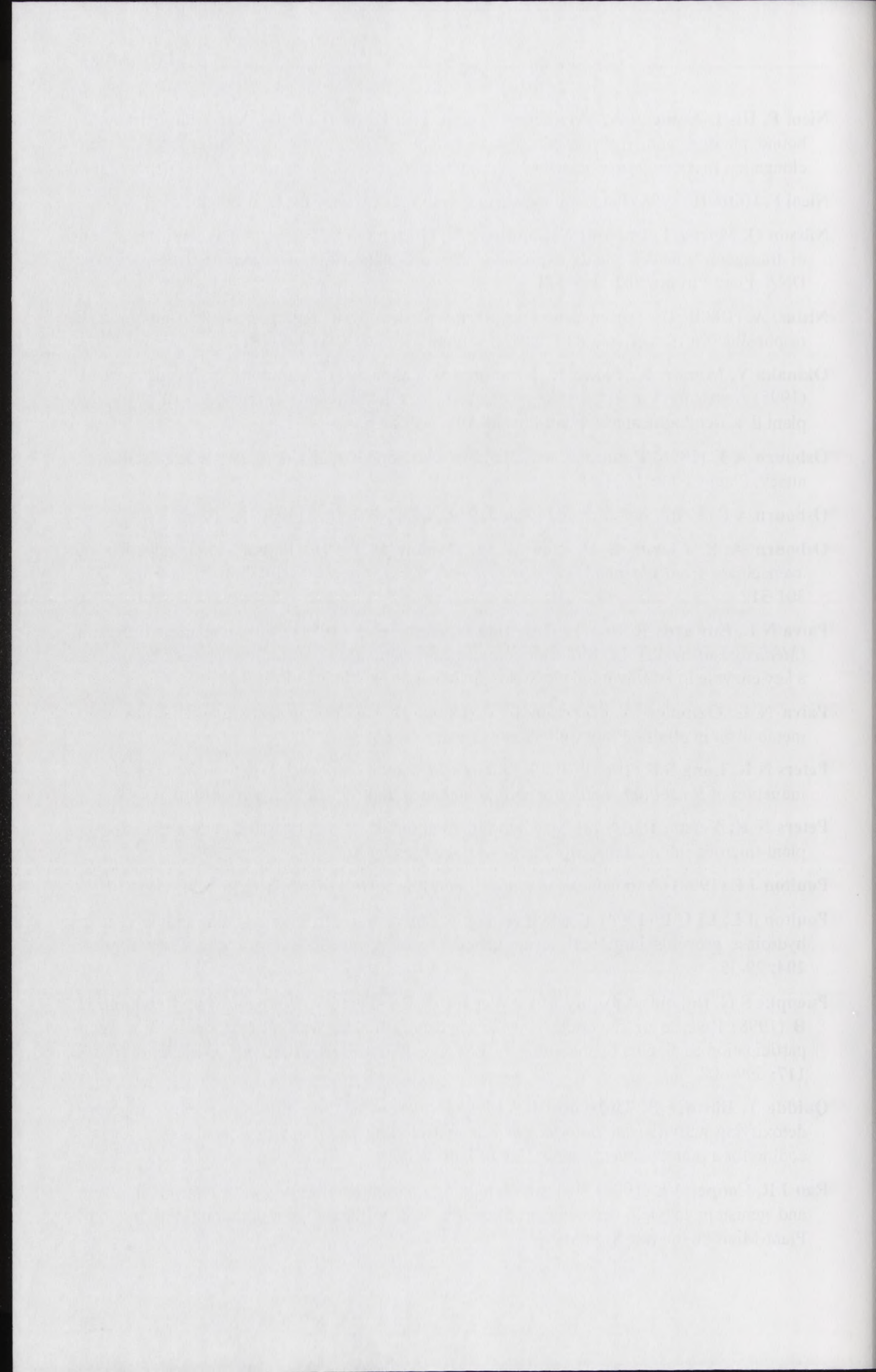
- Lashbrook C C, Gonzalez-Bosch C, Bennett A B** (1994) Two divergent endo-beta-1,4-glucanase genes exhibit overlapping expression in ripening fruit and abscising flowers. *Plant Cell* **6**: 1485-1493
- Leah R, Kigel J, Svendsen I, Mundy J** (1995) Biochemical and molecular characterization of a barley seed β -glucosidase. *J Biol Chem* **270**: 15789-15797
- Leah R, Tommerup H, Svendsen I, Mundy J** (1991) Biochemical and molecular characterization of three barley seed proteins with antifungal properties. *J Biol Chem* **266**: 1564-1573
- Lee H I, Raskin I** (1998) Glucosylation of salicylic acid in *Nicotiana tabacum* cv. *Xanthi-nc*. *Phytopathology* **88**: 692-697
- Leinhos V, Udagama-Randeniya P V, Savidge R A** (1994) Purification of an acidic coniferin-hydrolysing β -glucosidase from developing xylem of *Pinus banksiana*. *Phytochemistry* **37**: 311-315
- Lerouge P, Roche P, Faucher C, Maillet F, Truchet G, Promé J C, Dénarié J** (1990) Symbiotic host-specificity of *Rhizobium meliloti* is determined by a sulphated and acylated glucosamine oligosaccharide signal. *Nature* **344**: 781-784
- Letham D S, Palni M S** (1983) The biosynthesis and metabolism of cytokinins. *Annu Rev Plant Physiol* **34**: 163-197
- Llop-Tous I, Dominguez-Puigjaner E, Palomer X, Vendrell M** (1999) Characterization of two divergent endo-1,4-glucanase cDNA clones highly expressed in the nonclimacteric strawberry fruit. *Plant Physiol* **119**: 1415-1422
- Lowenstein Spielman L, Mowshowitz D B** (1982) A specific stain for α -glucosidases in isoelectric focusing gels. *Anal Biochem* **120**: 66-70
- Mackenbrock U, Barz W** (1991) Elicitor - induced formation of pterocarpan phytoalexins in chickpea (*Cicer arietinum* L.) cell suspension cultures from constitutive isoflavone conjugates upon inhibition of phenylalanine ammonia lyase. *Z Naturforsch* **46c**: 43-50
- Mackenbrock U, Gunia W, Barz W** (1993) Accumulation and metabolism of medicarpin and maackiain malonylglucosides in elicited chickpea (*Cicer arietinum* L.) cell suspension cultures. *J Plant Physiol* **142**: 385-391
- Mackenbrock U, Vogelsang R, Barz W** (1992) Isoflavone and pterocarpan malonylglucosides and β -1,3-glucan and chitin - hydrolases are vacuolar constituents in chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Z Naturforsch* **47c**: 815-822
- Mahato S B, Ganguly A N, Sahu N P** (1982) Steroid saponins. *Phytochemistry* **21**: 959-978
- Maier R, Carle R, Kreis W, Reinhard E** (1991) A flavone-glucoside-cleaving β -glucosidase from *Chamomilla recutita*. *Planta Med* **57**: 297-298
- Maier R, Carle R, Kreis W, Reinhard E** (1993) Purification and characterization of a flavone 7-O-glucoside-specific glucosidase from ligulate florets of *Chamomilla recutita*. *Planta Med* **59**: 436-441
- Majewski J** (1999) Rola peroksydaz w biologii ścian komórkowych łubinu białego (*Lupinus albus* L.). Praca dyplomowa Wydziału Biologii UAM wykonana w Instytucie Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu



- Malamy J, Hennig J, Klessig D F** (1992) Temperature-dependent induction of salicylic acid and its conjugates during 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
- Marcinowski S, Grisebach H** (1977) Turnover of coniferin in pine seedlings. *Phytochemistry* **16**: 1665-1667
- Marcinowski S, Grisebach H** (1978) Enzymology of lignification: Cell-wall-bound β -glucosidase for coniferin from spruce (*Picea abies*) seedlings. *Eur J Biochem* **87**: 37-44
- Matsuura M, Sasaki J, Murao S** (1995) Studies on β -glucosidases from soybeans that hydrolyze daidzin and genistin: isolation and characterization of an isozyme. *Biosci Biotech Biochem* **59**: 1623-1627
- Mauch F, Hadwiger L A, Boller T** (1984) Ethylene: symptom, not signal for the induction of chitinase and β -1,3-glucanase in pea pods by pathogens and elicitors. *Plant Physiol* **76**: 607-611
- Mauch F, Hadwiger L E, Boller T** (1988) Antifungal hydrolases in pea tissue. *Plant Physiol* **87**: 325-333
- Maxwell C A, Phillips D A** (1990) Concurrent synthesis and release of *nod*-gene-inducing flavonoids from alfalfa roots. *Plant Physiol* **93**: 1552-1558
- May U, Kreis W** (1997) Purification and characterisation of the cardenolide-specific β -glucohydrolase CGH I from *Digitalis lanata* leaves. *Plant Physiol Biochem* **35**: 523-532
- McIntosh C, Latchinian L, Mansell R L** (1990) Flavonone-specific 7-O-glucosyltransferase activity in *Citrus paradisi* seedlings: purification and characterization. *Arch Biochem Biophys* **282**: 50-57
- Morris P F, Savard M E, Ward E W B** (1991) Identification and accumulation of isoflavonoids and isoflavone glucosides in soybean leaves and hypocotyls in resistance responses to *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea*. *Physiol Mol Plant Pathol* **39**: 229-244
- Murashige T, Skoog F** (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* **66**: 473-497
- Müller K O, Börger H** (1940) Experimentelle untersuchungen über die *Phytophthora*-resistenz der kartoffel. *Arb Biol Reichsanstalt Landw Forstw Berlin* **23**: 189-231, cytowane za: VanEtten H D, Mansfield J W, Bailey J A, Farmer E E (1994) Two classes of plant antibiotics: phytoalexins versus „phytoanticipins”. *Plant Cell* **6**: 1191-1192
- Münch-Garthoff S, Neuhaus J M, Boller T, Kemmerling B, Kogel K H** (1997) Expression of β -1,3-glucanase and chitinase in healthy, stem-rust-affected and elicitor-treated near-isogenic wheat lines showing *Sr5*-or *Sr24*-specified race-specific rust resistance. *Planta* **201**: 235-244
- Mylona P, Pawlowski K, Bisseling T** (1995) Symbiotic nitrogen fixation. *Plant Cell* **7**: 869-885
- Ni W, Fahrendorf T, Ballance G M, Lamb C J, Dixon R A** (1996) Stress responses in alfalfa (*Medicago sativa* L.). XX. Transcriptional activation of phenylpropanoid pathway genes in elicitor-induced cell suspension cultures. *Plant Mol Biol* **30**: 427-438



- Nicol F, His I, Jauneau A, Vernhettes S, Canut H, Höfte H** (1998) A plasma membrane-bound putative endo-1,4- β -D-glucanase is required for normal wall assembly and cell elongation in *Arabidopsis*. *EMBO J* **17**: 5563-5576
- Nicol F, Höfte H** (1998) Plant cell expansion: scaling the wall. *Curr Opin Plant Biol* **1**: 12-17
- Nilsson O, Mortiz T, Imbault N, Sandberg G, Olsson O** (1993) Hormonal characterization of transgenic tobacco plants expressing the *rolC* gene of *Agrobacterium rhizogenes*T_L-DNA. *Plant Physiol* **102**: 363-371
- Nisius A** (1988) The stromacentre in *Avena* plastids: An aggregation of β -glucosidase responsible for the activation of oat-leaf saponins. *Planta* **173**: 474-481
- Okinaka Y, Mimori K, Takeo K, Kitamura S, Takeuchi Y, Yamaoka N, Yoshikawa M** (1995) A structural model for the mechanisms of elicitor release from fungal cell walls by plant β -1,3-endoglucanase. *Plant Physiol* **109**: 839-845
- Osborn A E** (1996) Preformed antimicrobial compounds and plant defense against fungal attack. *Plant Cell* **8**: 1821-1831
- Osborn A E** (1996) Saponins and plant defence - a soap story. *Trends Plant Sci* **1**: 4-9
- Osborn A E, Clarke B R, Dow J M, Daniels M** (1991) Partial characterization of avenacinase from *Gaeumannomyces graminis* var. *avenae*. *Physiol Mol Plant Pathol* **38**: 301-312
- Paiva N L, Edwards R, Sun Y, Hrazdina G, Dixon R A** (1991) Stress responses in alfalfa (*Medicago sativa* L.). 11. Molecular cloning and expression of alfalfa isoflavone reductase, a key enzyme of isoflavonoid phytoalexin biosynthesis. *Plant Mol Biol* **17**: 653-667
- Paiva N L, Oommen A, Harrison M J, Dixon R A** (1994) Regulation of isoflavonoid metabolism in alfalfa. *Plant Cell Tissue Organ Cult* **38**: 213-220
- Peters N K, Long S R** (1988) Alfalfa root exudates and compounds which promote or inhibit induction of *Rhizobium meliloti* nodulation genes. *Plant Physiol* **88**: 396-400
- Peters N K, Verma D P S** (1990) Phenolic compounds as regulators of gene expression in plant-microbe interactions. *Mol Plant-Microbe Interact* **3**: 4-8
- Poulton J E** (1990) Cyanogenesis in plants. *Plant Physiol* **94**: 401-405
- Poulton J E, Li C P** (1994) Tissue level compartmentation of (R)-amygdalin and amygdalin hydrolase prevents large-scale cyanogenesis in undamaged *Prunus* seeds. *Plant Physiol* **104**: 29-35
- Pueppke S G, Bolaños-Vásquez M C, Werner D, Bec-Ferté M-P, Promé J C, Krishnan H B** (1998) Release of flavonoids by the soybean cultivars McCall and Peking and their participation as signals by the nitrogen-fixing symbiont *Sinorhizobium fredii*. *Plant Physiol* **117**: 599-608
- Quidde T, Büttner P, Tudzyński P** (1999) Evidence for three different specific saponin-detoxifying activities in *Botrytis cinerea* and cloning and functional analysis of a gene coding for a putative avenacinase. *Eur J Plant Pathol* **105**: 273-283
- Rao J R, Cooper J E** (1995) Soybean nodulating rhizobia modify *nod* gene inducers daidzein and genistein to yield aromatic products that can influence gene-inducing activity. *Mol Plant-Microbe Interact* **8**: 855-862



- Recourt K, Schripsema J, Kijne J W, van Brussel A A N, Lugtenberg B J J** (1991) Inoculation of *Vicia sativa* subsp. *nigra* roots with *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae* results in release of *nod* gene activating flavanones and chalcones. *Plant Mol Biol* **16**: 841-852
- Recourt K, van Tunen A J, Mur L A, van Brussel A A N, Lugtenberg B J J, Kijne J W** (1992a) Activation of flavonoid biosynthesis in roots of *Vicia sativa* subsp. *nigra* plants by inoculation with *Rhizobium leguminosarum* biovar *viciae*. *Plant Mol Biol* **19**: 411-420
- Recourt K, Verkerke M, Schripsema J, van Brussel A A N, Lugtenberg B J J, Kijne J W** (1992b) Major flavonoids in uninoculated and inoculated roots of *Vicia sativa* subsp. *nigra* are four conjugates of the nodulation gene-inhibitor kaempferol. *Plant Mol Biol* **18**: 505-513
- Redmond J W, Batley M, Djordjevic M A, Innes R W, Kuempel P L, Rolfe B G** (1986) Flavones induce expression of nodulation genes in *Rhizobium*. *Nature* **323**: 632-635
- Rivera-Vargas L I, Schmitthenner A F, Graham T L** (1993) Soybean flavonoid effects on and metabolism by *Phytophthora sojae*. *Phytochemistry* **32**: 851-857
- Rolfe B G** (1988) Flavones and isoflavones as inducing substances of legume nodulation. *BioFactors* **1**: 3-10
- Rommewinkel M, Karwatzki B, Beerhues L, Wiermann R** (1992) Immunofluorescence localization of chalcone synthase in roots of *Pisum sativum* L. and *Phaseolus vulgaris* L. and comparable immunochemical analysis of chalcone synthase from pea leaves. *Protoplasma* **166**: 115-121
- Ryals J A, Neuenschwander U H, Willits M G, Molina A, Steiner H Y, Hunt M D** (1996) Systemic acquired resistance. *Plant Cell* **8**: 1809-1819
- Rybus-Zajac M, Kozłowska M** (1996) Activity of β -D-glucosidase of lupin leaves infected with *Pleiochaeta setosa* (Kirchn.) Huges. *Acta Physiol Plant* **18**: 211-216
- Ryder T B, Cramer C L, Bell J N, Robbins M P, Dixon R A** (1984) Elicitor rapidly induces chalcone synthase mRNA in *Phaseolus vulgaris* cells at the onset of the phytoalexin defense response. *Proc Natl Acad Sci USA* **81**: 5724-5728
- Sandrock R W, DellaPenna D, VanEtten H D** (1995) Purification and characterization of β_2 -tomatinase, an enzyme involved in the degradation of α -tomatine and isolation of the gene encoding β_2 -tomatinase from *Septoria lycopersici*. *Mol Plant-Microbe Interact* **8**: 960-970
- Savidge R A** (1988) A biochemical indicator of commitment to tracheid differentiation in *Pinus contorta*. *Can J Bot* **66**: 2009-2012
- Savidge R A** (1989) Coniferin, a biochemical indicator of commitment to tracheid differentiation in conifers. *Can J Bot* **67**: 2663-2668
- Savidge R A, Förster H** (1998) Seasonal activity of uridine 5'-diphosphoglucose: coniferyl alcohol glucosyltransferase in relation to cambial growth and dormancy in conifers. *Can J Bot* **76**: 486-493
- Schopfer C R, Kochs G, Lottspeich F, Ebel J** (1998) Molecular characterization and functional expression of dihydroxypterocarpan 6-hydroxylase, an enzyme specific for

- pterocarpanoid phytoalexin biosynthesis in soybean (*Glycine max* L.). FEBS Lett **432**: 182-186
- Schmid J Amrhein N** (1995) Molecular organization of the shikimate pathway in higher plants. *Phytochemistry* **39**: 737-749
- Schmidt P E, Broughton W J, Werner D** (1994) Nod factors of *Bradyrhizobium japonicum* and *Rhizobium* sp. NGR234 induce flavonoid accumulation in soybean root exudate. *Mol Plant-Microbe Interact* **7**: 384-390
- Schnitzler J P, Jungblut T P, Heller W, Köfferlein M, Hutzler P, Heinzmann U, Schmelzer E, Ernst D, Langebartels C, Sandermann H J R** (1996) Tissue localization of u.v.-B-screening pigments and of chalcone synthase mRNA in needles of Scots pine seedlings. *New Phytol* **132**: 247-258
- Schröder J, Schröder G** (1990) Stilbene and chalcone synthases: Related enzymes with key functions in plant-specific pathways. *Z Naturforsch* **45c**: 1-8
- Schultze M, Kondorosi A** (1998) Regulation of symbiotic root nodule development. *Annu Rev Genet* **32**: 33-57
- Selmar D** (1993) Apoplastic occurrence of cyanogenic β -glucosidases and consequences for the metabolism of cyanogenic glucosides. W: Esen A, ed, β -Glucosidases: Biochemistry and Molecular Biology. ACS Symposium Series 533. American Chemical Society, Washington, 191-204
- Selmar D, Lieberei R, Biehl B** (1988) Mobilization and utilization of cyanogenic glycosides. *Plant Physiol* **86**: 711-716
- Selmar D, Lieberei R, Biehl B, Nahrstedt A, Schmidtmann V, Wray V** (1987) Occurrence of the cyanogen linustatin in *Hevea brasiliensis*. *Phytochemistry* **26**: 2400-2401
- Selmar D, Lieberei R, Junqueira N, Biehl B** (1991) Changes in cyanogenic glucoside content in seeds and seedlings of *Hevea* species. *Phytochemistry* **30**: 2135-2140
- Sembdner G, Atzorn R, Schneider G** (1994) Plant hormone conjugation. *Plant Mol Biol* **26**: 1459-1481
- Seo S, Ishizuka K, Ohashi Y** (1995) Induction of salicylic acid β -glucosidase in tobacco leaves by exogenous salicylic acid. *Plant Cell Physiol* **36**: 447-453
- Shibuya Y, Sugimura Y, Tahara S, Mizutani J** (1992) Accumulation of isoflavones in lupin seedlings treated with copper chloride. *Biosci Biotech Biochem* **56**: 690-691
- Shibuya Y, Tahara S, Kimura Y, Mizutani J** (1991) New isoflavone glucosides from white lupin (*Lupinus albus* L.). *Z Naturforsch* **46c**: 513-518
- Shirasu K, Nakajima H, Rajasekhar V K, Dixon R A, Lamb C** (1997) Salicylic acid potentiates an agonist-dependent gain control that amplifies pathogen signals in the activation of defense mechanisms. *Plant Cell* **9**: 261-270
- Shirley B W** (1996) Flavonoid biosynthesis: 'new' functions for an 'old' pathway. *Trends Plant Sci* **1**: 377-382
- Shirley B W** (1998) Flavonoids in seeds and grains: physiological function, agronomic importance and the genetics of biosynthesis. *Seed Sci Res* **8**: 415-422

Journal of the American Medical Association

Volume 100, Number 1, July 1958

Editorial: The Role of the General Practitioner

Editorial: The Role of the General Practitioner

Editorial: The Role of the General Practitioner

Editorial: The Role of the General Practitioner

Editorial: The Role of the General Practitioner

Editorial: The Role of the General Practitioner

Editorial: The Role of the General Practitioner

Editorial: The Role of the General Practitioner

Editorial: The Role of the General Practitioner

Editorial: The Role of the General Practitioner

Editorial: The Role of the General Practitioner

Editorial: The Role of the General Practitioner

Editorial: The Role of the General Practitioner

Editorial: The Role of the General Practitioner

Editorial: The Role of the General Practitioner

Editorial: The Role of the General Practitioner

Editorial: The Role of the General Practitioner

Editorial: The Role of the General Practitioner

Editorial: The Role of the General Practitioner

- Smit G, Puvanesarajah V, Carlson R W, Barbour W M, Stacey G** (1992) *Bradyrhizobium japonicum nodD₁* can be specifically induced by soybean flavonoids that do not induce the *nodYABCSUIJ* operon. *J Biol Chem* **267**:310-318
- Smith D A, Banks S W** (1986) Biosynthesis, elicitation and biological activity of isoflavonoid phytoalexins. *Phytochemistry* **25**: 979-995
- Song K S, Tomoda M, Shimizu N, Sankawa U, Ebizuka Y** (1995) Mannan glycopeptide elicits *p*-coumaroyloamino acid in *Ephedera distachya* cultures. *Phytochemistry* **38**: 95-102
- Soriano-Richards E, Uribe-Salas D, Ibarra-Barrera G** (1998) Phaseollidin stored in vacuoles and the phytoalexin response in bean. *Plant Pathol* **47**: 480-485
- Spaink H P** (1992) Rhizobial lipo-oligosaccharides: answers and questions. *Plant Mol Biol* **20**: 977-986
- Spaink H P, Wijffelman C A, Pees E, Okker R J H, Lugtenberg B J J** (1987) *Rhizobium* nodulation gene *nodD* as a determinant of host specificity. *Nature* **328**: 337-340
- Stafford H A** (1990) Flavonoid metabolism. CRC Press, Boca Raton
- Stafford H A** (1991) Flavonoid evolution: an enzymatic approach. *Plant Physiol* **96**: 680-685
- Stafford H A** (1997) Roles of flavonoids in symbiotic and defense functions in legume roots. *Bot Rev* **63**: 27-39
- Stobiecki M, Malosse C, Kerhoas L, Wojtaszek P, Einhorn J** (1999) Detection of isoflavonoids and their glycosides by liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry in root extracts of lupin. (*Lupinus albus*). *Phytochem Anal* **10**: 198-207
- Stobiecki M, Wojtaszek P** (1990) Application of gas chromatography-mass spectrometry to the identification of isoflavonoids in lupine root extracts. *J Chromatogr* **508**: 391-398
- Stobiecki M, Wojtaszek P, Gulewicz K** (1997) Application of solid phase extraction for profiling quinolizidine alkaloids and phenolic compounds in *Lupinus albus*. *Phytochem Anal* **8**: 153-158
- Tahara S, Ibrahim R K** (1995) Prenylated isoflavonoids-an update. *Phytochemistry* **38**: 1073-1094
- Tahara S, Ingham J L, Nakahara S, Mizutani J, Harborne J B** (1984) Fungitoxic dihydrofuranoisoflavones and related compounds in white lupin, *Lupinus albus*. *Phytochemistry* **23**: 1889-1900
- Tahara S, Ingham J L, Mizutani J** (1985) New coumaronochromones from white lupin, *Lupinus albus* L. (Leguminosae). *Agric Biol Chem* **49**: 1775-1783
- Tahara S, Katagiri Y, Ingham J L, Mizutani J** (1994) Prenylated flavonoids in the roots of yellow lupin. *Phytochemistry* **36**: 1261-1271
- Tahara S, Moriyama M, Orihara S, Ingham J L, Kawabata J, Mizutani J** (1991) Naturally occurring coumaronochroman-4-ones: a new class of isoflavonoids from lupins and jamaican dogwood. *Z Naturforsch* **46c**: 331-340
- Tahara S, Orihara S, Ingham J L, Mizutani J** (1989) Seventeen isoflavonoids from *Lupinus albus* L. roots. *Phytochemistry* **28**: 901-911

Faint, illegible text covering the majority of the page, likely bleed-through from the reverse side of the document.

- Tahara S, Shibaki S, Ingham J L, Mizutani J** (1990) Further isoflavonoids from white lupin roots. *Z Naturforsch* **45c**: 147-153
- Tanaka M, Mizutani J, Tahara S** (1996) Cyclization of a prenylated isoflavone *via* enzymatic epoxidation. *Biosci Biotech Biochem* **60**: 171-172
- Theurer C, Treumann H-J, Faust T, May U, Kreis W** (1994) Glycosylation in cardenolide biosynthesis. *Plant Cell Tissue Org Cult* **38**: 327-335
- Trainotti L, Ferrarese L, Poznanski E, Dalla Vecchia F** (1998) Endo-beta-1,4-glucanase activity is involved in the abscission of pepper flowers. *J Plant Physiol* **152**: 70-77
- Truchet G, Roche P, Lerouge P, Vasse J, Camut S, de Billy F, Promé J C, Dénarié J** (1991) Sulphated lipo-oligosaccharide signals of *Rhizobium meliloti* elicit root nodule organogenesis in alfalfa. *Nature* **351**: 670-673
- Van Camp W, Van Montagu M Inze D** (1998) H₂O₂ and NO: redox signals in disease resistance. *Trends Plant Sci* **3**: 330-334
- van de Rhee M D, Linthorst H J M, Bol J F** (1994) Pathogen-induced gene expression. W: Basra A S, ed, *Stress-Induced Gene Expression in Plants*. Harwood Academic Publishers, Lausanne, New York, Philadelphia, Reading, 249-284
- van Rhijn P, Vanderleyden J** (1995) The *Rhizobium*-plant symbiosis. *Microbiol Rev* **59**: 124-142
- VanEtten H D, Mansfield J W, Bailey J A, Farmer E E** (1994) Two classes of plant antibiotics: phytoalexins versus „phytoanticipins”. *Plant Cell* **6**: 1191-1192
- Vogelsang R, Barz W** (1993) Purification, characterization and differential hormonal regulation of a β -1,3-glucanase and two chitinases from chickpea (*Cicer arietinum* L.). *Planta* **189**: 60-69
- Weidemann C, Tenhaken R, Höhl U, Barz W** (1991) Medicarpin and maackiain 3-O-glucoside-6'-O-malonate conjugates are constitutive compounds in chickpea (*Cicer arietinum* L.) cell cultures. *Plant Cell Rep* **10**: 371-734
- Welle R, Grisebach H** (1991) Properties and solubilization of the prenyltransferase of isoflavonoid phytoalexin biosynthesis in soybean. *Phytochemistry* **30**: 479-484
- Whetten R, Mackay J J, Sederoff R R** (1998) Recent advances in understanding lignin biosynthesis. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **49**: 585-609
- Whetten R, Sederoff R** (1995) Lignin biosynthesis. *Plant Cell* **7**: 1001-1013
- Wojtaszek P, Stobiecki M** (1997) Differential secretion and accumulation of isoflavonoids in *Lupinus albus* in response to fungal elicitor and CuCl₂. *Plant Physiol Biochem* **35**: 2 129-135
- Wojtaszek P, Stobiecki M, Gulewicz K** (1993) Role of nitrogen and plant growth regulators in the exudation and accumulation of isoflavonoids by roots of intact white lupin (*Lupinus albus* L.) plants. *J Plant Physiol* **142**: 689-694
- Wu S C, Blumer J M, Darvill A G, Albersheim P** (1996) Characterization of an endo-beta-1,4-glucanase gene induced by auxin in elongating pea epicotyls *Plant Physiol* **110**: 163-170

Wagner, J. (1987) ...
Wagner, J. (1988) ...
Wagner, J. (1989) ...
Wagner, J. (1990) ...
Wagner, J. (1991) ...
Wagner, J. (1992) ...
Wagner, J. (1993) ...
Wagner, J. (1994) ...
Wagner, J. (1995) ...
Wagner, J. (1996) ...
Wagner, J. (1997) ...
Wagner, J. (1998) ...
Wagner, J. (1999) ...
Wagner, J. (2000) ...
Wagner, J. (2001) ...
Wagner, J. (2002) ...
Wagner, J. (2003) ...
Wagner, J. (2004) ...
Wagner, J. (2005) ...
Wagner, J. (2006) ...
Wagner, J. (2007) ...
Wagner, J. (2008) ...
Wagner, J. (2009) ...
Wagner, J. (2010) ...
Wagner, J. (2011) ...
Wagner, J. (2012) ...
Wagner, J. (2013) ...
Wagner, J. (2014) ...
Wagner, J. (2015) ...
Wagner, J. (2016) ...
Wagner, J. (2017) ...
Wagner, J. (2018) ...
Wagner, J. (2019) ...
Wagner, J. (2020) ...

- Wubben J P, Price K R, Daniels M J, Osbourn A E** (1996) Detoxification of oat leaf saponins by *Septoria avenae*. *Phytopathology* **86**: 986-992
- Yamamoto H, Ichimura M, Inoue K** (1995) Stimulation of prenylated flavanone production by mannans and acidic polysaccharides in callus culture of *Sophora flavescens*. *Phytochemistry* **40**: 77-81
- Yamasaki H, Sakihama Y, Ikehara N** (1997) Flavonoid-peroxidase reaction as a detoxification mechanism of plant cells against H₂O₂. *Plant Physiol* **115**: 1405-1412
- Ylstra B, Touraev A, Benito Moreno R M, Ströger E, van Tunen A J, Vicente O, Mol J N M, Heberle-Bors E** (1992) Flavonols stimulate development, germination, and tube growth of tobacco pollen. *Plant Physiol* **100**: 902-907
- Zambryski P, Tempe J, Schell J** (1989) Transfer and function of T-DNA genes from *Agrobacterium* Ti and Ri plasmids in plants. *Cell* **56**: 193-201
- Zuanazzi J A S, Clergeot P H, Quirion J-C, Husson H P, Kondorosi A, Ratet P** (1998) Production of *Sinorhizobium meliloti nod* gene activator and repressor flavonoids from *Medicago sativa* roots. *Mol Plant-Microbe Interact* **11**: 784-794

