



## Etylen a bakterie

Ewa Kępczyńska<sup>1</sup>, Sylwia Zielińska<sup>1</sup>, Jan Kępczyński<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Zakład Biotechnologii

<sup>2</sup>Zakład Fiziologii Roślin

Uniwersytet Szczeciński, Szczecin

### Ethylene and bacteria

#### Summary

The review article presents data on the ethylene emanation by bacteria, the two different pathways of its biosynthesis in these microorganisms and the role of ethylene in plant pathogenesis. ACC deaminase from *Pseudomonas* and *Enterobacter* spp., which catalyses the hydrolytic cleavage of ACC in higher plants was also discussed.

#### Key words:

ethylene production, biosynthesis of ethylene, plant pathogenesis, ACC deaminase, ACC deaminase gene, plant transformation.

## 1. Wprowadzenie

Etylen ( $C_2H_4$ ), najprostszy węglowodór nienasycony, jest bardzo ważnym związkiem wyjściowym w przemyśle petrochemicznym. Otrzymywany jest on z naturalnego gazu lub ropy naftowej. Gaz ten występuje powszechnie; jego obecność wykryto w powietrzu, wodzie i glebie. Historia badań nad etylenem zaczęła się na początku naszego stulecia, w 1901 r., kiedy to Neljubow udowodnił, że znana od dawna modyfikacja wzrostu roślin pod wpływem gazu świetlnego wiąże się z obecnością w nim etylenu (1,2). Pierwszy dowód, że etylen jest produkowany przez tkankę roślinną zawdzięczamy Gane'owi, który w 1934 r. wykazał produkcję etylenu przez owoce. Etylen jest produkowany przez wszystkie rośliny, wydzielają go pędy, korzenie, kwiaty, owoce, bulwy, siewki oraz nasiona. Jest najprostszym do tej pory poznany hormonem roślinnym. Uczestniczy on w wielu procesach fizjologicznych takich jak: somatyczna embriogeneza (3), kiełkowanie i ustępowanie spoczynku nasion (4), dojrzewanie owoców, epinastia, kwitnienie, starzenie, opadanie (1). Związek ten wy-

#### Adres do korespondencji

Ewa Kępczyńska,  
Katedra Fiziologii Roślin,  
Uniwersytet Szczeciński,  
ul. Wąska 13,  
71-415 Szczecin.

#### biotechnologia

1 (48) 147-155 2000

dzielany jest także przez mikroorganizmy np. grzyby i bakterie (1,5,6), dla niektórych z nich jest niezbędny dla ich rozwoju (6-8).

Celem pracy jest przedstawienie najnowszych danych dotyczących syntezy etylenu przez bakterie oraz roli tego fitohormonu w patogenezie roślin. Mikroorganizmy te cieszą się coraz większym zainteresowaniem biotechnologów i biologów molekularnych. Bakterie z rodzaju *Agrobacterium* wykorzystywane są powszechnie jako wektory do przenoszenia pożądanych genów odpowiedzialnych za odporność roślin na choroby, szkodniki, tolerancję na herbicydy lub geny kodujące określone cechy użytkowe. Natomiast inne bakterie, z rodzaju *Pseudomonas* i *Enterobacter* stanowią źródło genu deaminazy ACC, enzymu służącego do obniżenia puli endogennego etylenu w stransformowanych roślinach.

## 2. Wydzielanie etylenu przez bakterie

Pierwsze doniesienie o produkcji etylenu przez bakterie (*Pseudomonas solanacearum*) zostało opublikowane przez Freebairna i Buddenhagena w 1964 r., a zatem aż 30 lat później od informacji o wydzielaniu etylenu przez tkanki roślinne. Kilkanaście lat później Primrose (9-11) oraz Primrose i Dilworth (12) wykazali, że wiele patogenicznych bakterii charakteryzuje się zdolnością do produkcji etylenu (tab. 1). Według Goto i wsp. (13) najbardziej wydajnym producentem etylenu wśród bakterii jest gatunek *Pseudomonas syringae*, który obejmuje kilkanaście patowarów (pv.) czyli form różniących się między sobą zakresem roślin żywicielskich. Najwięcej etylenu wytwarzały dwa szczepy *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* oraz wszystkie szczepy *P. syringae* pv. *glycinea* (14). Weingart i Volksch (15) wykazali zdolność do wydzielania etylenu przez szczepy *P. syringae* pvs. *phaseolicola* i *glycinea* wyizolowane z opornika łąkowego (*Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi.) oraz pv. *pisi* z grochu zwyczajnego (*Pisum sativum* L.). *Pseudomonas syringae* pvs. *phaseolicola* i *glycinea* produkowały podobne ilości etylenu (ok.  $500 \times 10^{-9}$  nl/ h/ komórkę), natomiast pv. *pisi* 10 razy mniej. Sato i wsp. (16) wykazali również, że trzy szczepy *P. syringae* pv. *sesami* i jeden szczep *P. syringae* pv. *cannabina* produkują taką samą ilość etylenu jak *P. syringae* pv. *glycinea* szczep MAFF 301683, tj.  $69,2 \times 10^{-9}$  nl/ h/ komórkę. Natomiast Weingart i Volksch (15) udowodnili, że badane przez nich szczepy *P. syringae* pv. *cannabina* nie produkują etylenu. Również inne patowary *Pseudomonas syringae* nie produkują etylenu (1). Otrzymane wyniki świadczą o tym, że szczepy tych samych bakterii różnią się zdolnością do produkcji etylenu. Małą ilość etylenu wydzielali także inny gatunek *Pseudomonas* – *P. solanacearum*. Weingart i Volksch (15) uważają, że produkcja etylenu przez szczepy *Pseudomonas syringae* pvs. *phaseolicola* i *cannabina* *in vitro* i w roślinach była ściśle związana ze wzrostem tych mikroorganizmów, ponieważ w fazie ich namnażania stężenie etylenu stopniowo podwyższało się. Zależność taką stwierdzili wcześniej Freebairn i Buddenhagen w doświadczeniach z wykorzystaniem *Pseudomonas solanacearum* (1). Bakterie należące do innych rodzajów charakteryzowały się niewielką zdolnością do produkcji etylenu (14,16). W literaturze brak jest danych dotyczących wydzielania etylenu przez bakterie wykorzystywane do transformacji roślin, a mianowicie z rodzaju *Agrobacterium*. W badaniach własnych wykazano, że szczepy A4 i LBA 9402 bakterii *Agrobacterium rhizogenes*, zawierające plazmid Ri, wykorzystywane do indukcji korzeni włosowatych, rów-

niez produkują etylen (8). Jest to cenna informacja, ponieważ transformacje roślin przy użyciu tych bakterii wykonywane są w warunkach *in vitro*. Eksplanty roślin, które poddawane są transformacji, przetrzymywane są w zamkniętych pojemnikach w celu zabezpieczenia ich przed patogenami i wysychaniem. W takich warunkach wzrasta stężenie etylenu pozabiologicznego, którego źródłem może być agar oraz biologicznego, pochodzącego z uszkodzonego, transformowanego eksplantu roślinnego, a także wydzielanego przez bakterie (8). Hormon ten skumulowany w pojemnikach hodowlanych może zatem modyfikować wzrost korzeni zaindukowanych przez *Agrobacterium rhizogenes*. Wpływ etylenu na proces ukorzenia jest dyskusyjny i prawdopodobnie zależy od stężenia tego gazu i fizjologicznego stadium eksplantu (17). Wiadomo, że etylen hamuje tworzenie korzeni w warunkach *in vitro* na pędach jabłoni (18), czereśni (19), na fragmentach liści pomidora (20) lub stymuluje ich wzrost na fragmentach hypocotyli słonecznika (21). Znany też jest fakt, że etylen albo stymuluje albo hamuje ukorzenie liścieni pomidora i mikrosadzonek lawendy w zależności od zastosowanego stężenia; przyspieszenie ukorzenia miało miejsce tylko w obecności etylenu w wąskim zakresie stężeń (22). Zatem etylen, wydzielany przez bakterie *A. rhizogenes* wykorzystywane do transformacji roślin, może modyfikować proces ukorzenia w zależności od wrażliwości tkanki stosowanego eksplantu w stosunku do tego fitohormonu. Zdaniem Abelesa i wsp. (1) patogeny, np. *Agrobacterium rhizogenes*, *Erwinia carotovora* przyczyniały się głównie do indukcji wydzielania przez tkankę roślinną tzw. etylenu stresowego, jednak same nie produkowały tego gazu.

Tabela 1

## Bakterie produkujące etylen

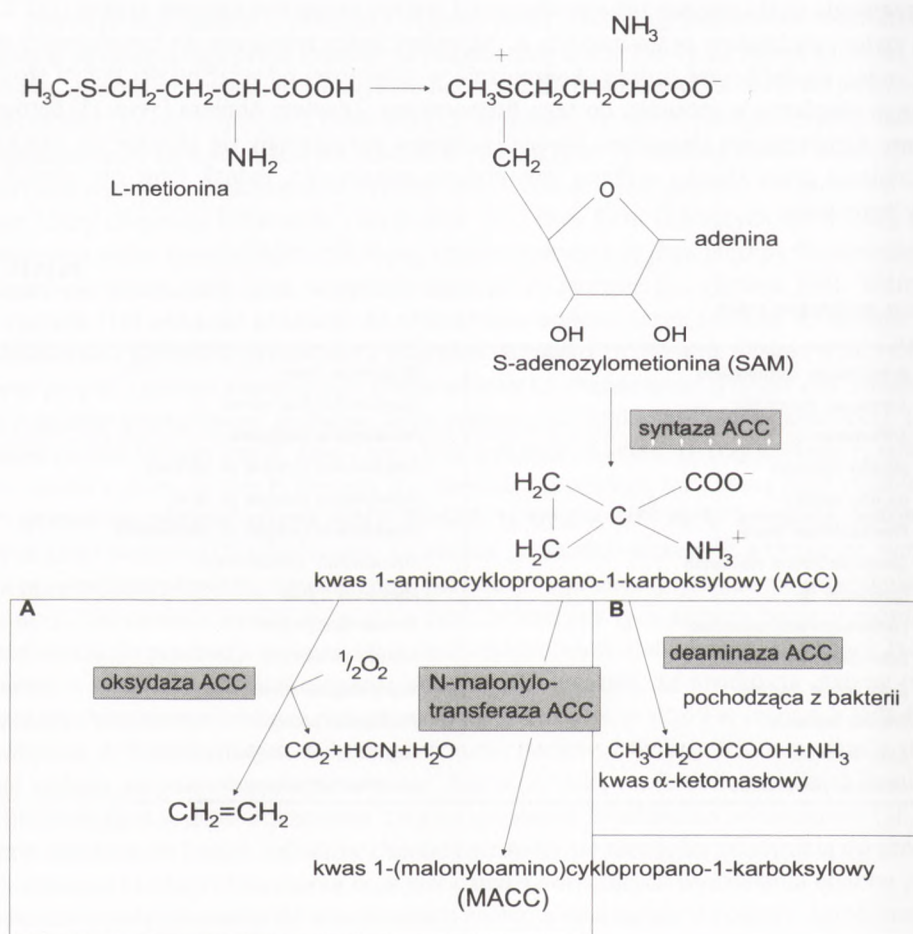
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	<i>Micrococcus luteus</i>
<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
<i>Arthrobacter</i> sp.	<i>Pseudomonas indigofera</i>
<i>Bacillus mycoides</i>	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>glycinea</i>
<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>mori</i>
<i>Brevibacterium linens</i>	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>phaseolicola</i>
<i>Chromobacterium violaceum</i>	<i>Pseudomonas solanacearum</i>
<i>Citrobacter</i> sp.	<i>Rhizobium trifolii</i>
<i>Corynebacterium aquaticum</i>	<i>Serratia liquefaciens</i>
<i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>Serratia marcescens</i>
<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Erwinia herbicola</i>	<i>Thiobacillus novellus</i>
<i>Escherichia coli</i>	<i>Thiobacillus ferrooxidans</i>
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Xanthomonas campestris</i>

### 3. Biosynteza etylenu

Bakterie i rośliny wyższe syntetyzują etylen poprzez różne szlaki biochemiczne (rys. 1) (1).

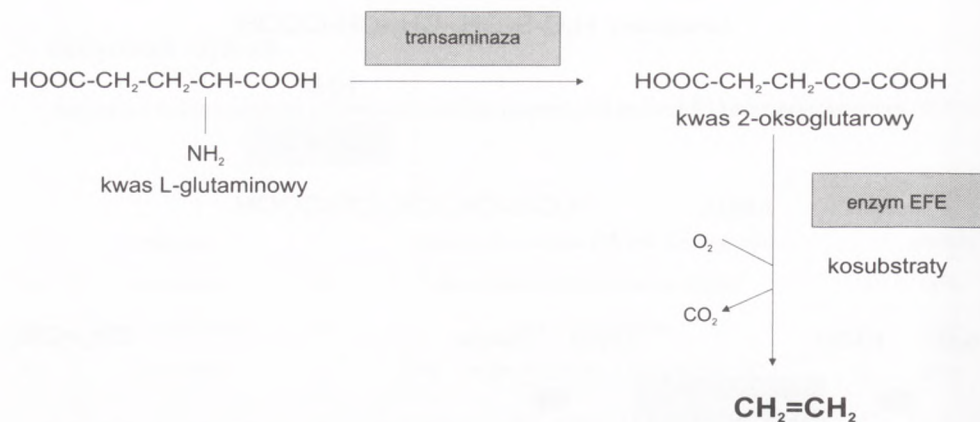
	prekursor		substrat dla enzymu EFE lub oksydazy ACC		produkt
A.	L-metionina	→	kwas 2-keto-4-metylotiomasłowy (KMBA)	→	etylen
B.	kwas L-glutaminowy	→	kwas 2-oksoglutarowy	→	etylen
C.	L-metionina	→	kwas 1-aminocyklopropano-1-karboksylowy (ACC)	→	etylen

Rys. 1. Porównanie szlaków biosyntezy etylenu: A, B – bakterii, C – roślin wyższych.



Rys. 2. Metabolizm ACC u roślin nie transformowanych (A) i transgeniczných (B) (34, zmodyfikowany).





Rys. 4. Schemat szlaku biosyntezy etylenu z kwasu L-glutaminowego.

nie wyizolowany), kosubstraty: L-arginina, Fe<sup>2+</sup>, O<sub>2</sub>, które tworzą z nim związek przejściowy, uwalniający etylen (5).

Niedawno sklonowano i zsekwencjonowano gen kodujący enzym EFE z *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* PK2 (5,15). Ponadto wykazano obecność tego genu w plazmidach bakteryjnych *Pseudomonas syringae* pvs. *cannabina* i *sesami* (16) oraz pv. *glycinea* (25). Przyjmuje się, że nazwa EFE jest wspólna dla szeregu enzymów katalizujących syntezę etylenu w mikroorganizmach (np. oksydoreduktaza NADH : Fe(III)EDTA), natomiast w roślinach enzym biorący udział w przekształcaniu ACC do etylenu nazwano oksydazą ACC.

#### 4. Rola etylenu w patogenezie

Do tej pory niewiele jest danych dotyczących roli etylenu we wzroście bakterii. Uważa się, że etylen nie ma znaczenia dla rozwoju tych mikroorganizmów (1). Natomiast hormon ten odgrywa ważną, chociaż niejednoznaczną rolę w patogenezie.

Etylen jest przyczyną nekroz tkanek roślinnych oraz przyspiesza rozwój objawów chorobowych (1). Hormon ten powoduje zwiększenie przepuszczalności błon komórkowych, co jest jednym z głównych skutków infekcji (27). Istnieje korelacja między nasilającym się wydzielaniem etylenu w odpowiedzi na infekcję a rozwojem symptomów takich jak: chloroza i więdnienie u wielu gatunków roślin. W badaniach prowadzonych przez Lunda i wsp. (28) z wykorzystaniem zmutowanych roślin pomidora *Never ripe*, nie zdolnych do wydzielania etylenu, wykazano, że symptomy choroby wywoływanej przez wirulentne szczepy *Xanthomonas campestris* pv. *versicatoria* i *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* zostały dzięki tej mutacji zredukowane. Podwyższenie wydzielania etylenu przez tkanki kalafiora zainfekowanego przez *Erwinia carotovora* związane było z produkcją przez te bakterie enzymów pektynolitycznych, głównie poligalaktouronaz przyczyniających się do rozpadu tkanek miękkiszowych (29). Podobne zwiększenie wydzielania etylenu obserwowano przez eksplanty marchwi zainfekowane przez *Agrobacterium tumefaciens*.

*faciens* i *rhizogenes*. Był to jednak efekt wtórny wywołany syntezą auksyn w tkance roślinnej na skutek transformacji przy użyciu genów *tms* pochodzących z odcinka T-DNA plazmidu *Agrobacterium* sp. Aloni i wsp. (30) stwierdzili, że rozwój wydzielających etylen tumorów wywołanych przez *A. tumefaciens* prowadzi do patologicznych zmian w ksylemie: zwężenia naczyń, powiększenia promieni, zaniku włókien. Choć rola etylenu w patogenezie nie została jeszcze do końca określona, Weingart i Volksch (15) wykazali, że *Pseudomonas syringae* pvs. *phaseolicola* i *glycinea* produkują także etylen w zainfekowanych roślinach oraz zasygnalizowali, że etylen może być jednym z głównych czynników patogenezы. Prawdopodobnie spełnia on funkcję fitotoksyny, która przyspiesza chlorozę, nekrozę i opadanie liści towarzyszące rozwijającej się chorobie, jednakże w warunkach *in vitro* patogeny bakteryjne nie wydzielają takiej ilości etylenu, która mogłaby być nekrogena dla tkanki roślinnej. Lund i wsp. (28) stwierdzili, że etylen jest głównym elementem złożonego mechanizmu regulującego rozprzestrzenianie się nekrozy, która pojawia się w późniejszym stadium odpowiedzi na infekcję w liściach pomidora, oraz odpowiedzialnego za rozrywanie komórek, wyciek elektrolitów i ostatecznie opadanie liści.

Przyпуска się także, że etylen powoduje zwiększenie syntezy oraz aktywności niektórych enzymów lub składników sygnałnych, które mogą brać udział w nabywaniu przez roślinę odporności na infekcję (23). W badaniach nad udziałem etylenu w patogenezie wykazano, że niskie stężenia tego gazu wywołują zmiany w metabolizmie gospodarza, takie jak wzrost aktywności enzymów i formowanie składników niszczących patogeny, skorelowane z mechanizmami odpornościowymi roślin (26). Produkcja etylenu przez zainfekowaną tkankę jest wczesną reakcją roślin na atak patogena. Już w 1966 r. Stahmann i wsp. sugerowali, że może ona indukować reakcje obronne (29). Do reakcji tych należą: wzrost aktywności chitynaz i  $\beta$ -1,3-glukanaz, amoniakolizy fenyloalaniny (PAL), syntazy chalkonu (CHS) oraz akumulacja białek PR (z ang. *pathogenesis-related proteins*) (29). Jednak obecność etylenu nie jest wymagana do ekspresji genów obronnych, kodujących białka PR (28). Jeśli etylen odgrywa rolę w odporności na choroby, prostym sposobem, aby chronić rośliny byłoby traktowanie ich tym fitohormonem.

## 5. Deaminaza ACC

Bakterie należą do organizmów, które z jednej strony mogą przyczynić się do zwiększenia stężenia etylenu w roślinie – gospodarzu, ale z drugiej mogą poziom tego hormonu obniżyć. Niektóre bowiem z tych mikroorganizmów, głównie *Pseudomonas* sp., zawierają enzym zwany deaminazą ACC (tab. 2), który degraduje ACC do kwasu  $\alpha$ -ketomasłowego i amoniaku (31-36). Deaminaza ACC została wyekstrahowana także z innych bakterii izolowanych z gleby (5). Aktywność deaminazy ACC stwierdzono dzięki zdolności tych mikroorganizmów do wzrostu na podłożu minimalnym zawierającym ACC jako jedyne źródło azotu. *Pseudomonas putida* GR 12-2, zawierający ten enzym, stymulował wydłużanie korzeni i znacznie redukował poziom ACC w pojawiających się korzeniach i pędach (36).

Enzym ten został po raz pierwszy wykryty w 1978 r. u *Pseudomonas* sp. szczep ACP (36). Deaminaza ACC u większości bakterii charakteryzuje się podobną budową i masą

molekularną np. dla enzymu z *Pseudomonas* sp. szczep ACP masa wynosi w przybliżeniu 104-112 kDa, a 105 kDa dla *P. putida* GR 12-2. Deaminaza ACC składa się z trzech podjednostek o przybliżonej masie 36,5 kDa.

Tabela 2

## Bakterie glebowe posiadające deaminazę ACC

Rodzaj	Gatunek	Szczep	$K_m$ [mmol]
<i>Pseudomonas</i>	sp.	ACP	15
<i>Pseudomonas</i>	<i>chloroaphis</i>	6G5	90
<i>Pseudomonas</i>	sp.	3F2	58
<i>Pseudomonas</i>	<i>putida</i>	GR 12-2	–
<i>Pseudomonas</i>	<i>putida</i>	UW1	–
<i>Enterobacter</i>	<i>cloacae</i>	UW2	–
<i>Pseudomonas</i>	<i>putida</i>	UW3	–
<i>Enterobacter</i>	<i>cloacae</i>	UW4	–
<i>Pseudomonas</i>	<i>fluorescens</i>	CAL1	–
<i>Enterobacter</i>	<i>cloacae</i>	CAL2	–
<i>Enterobacter</i>	<i>cloacae</i>	CAL3	–

Geny kodujące deaminazę ACC sklonowano z *Pseudomonas* sp. szczep ACP, *P. chloroaphis* 6G5 i *P. sp.* szczep 3F2 (31). Wykazują one wysoki poziom homologii. Geny te wprowadzono także do roślin. Deaminaza ACC, pochodząca z *Pseudomonas* sp. szczep ACP, została wykryta immunologicznie w protoplastach tytoniu poddanych elektroporacji i w transformowanych liściach petunii. Ekstrakty z tych stransformowanych tkanek roślinnych wykazywały aktywność deaminazy ACC, a tkanka jednego z transformantów posiadała obniżoną zdolność do przekształcania ACC w etylen (36). Ekspresja genu deaminazy ACC podczas dojrzewania owoców transgenicznych pomidorów hamowała syntezę etylenu w 90-97% (31) (rys. 2B).

Deaminaza ACC jest bardzo obiecującym enzymem, stanowiącym wartościowe „narzędzie” do regulacji stężenia etylenu w tkankach roślinnych. W praktyce gen deaminazy ACC jest wykorzystywany w celu opóźnienia dojrzewania owoców, warzyw i kwiatów.

## Literatura

1. Abeles F. B., Morgan P. W., Saltveit M., (1992), *Ethylene in plant biology*, Academic Press, New York.
2. Kępczyński J., Kępczyńska E., (1977), *Fruit Sci. Rep.*, 4, 31-35.
3. Kępczyński J., McKersie B. D., Brown C. W., (1992), *J. Exp. Bot.*, 43, 1199-1202.
4. Kępczyński J., Kępczyńska E., (1997), *Physiol. Plant.*, 101, 720-726.
5. Fukuda H., Ogawa T., Tanase S., (1993), *Adv. Microb. Physiol.*, 35, 275-305.
6. Kępczyńska E., (1995), *Rola etylenu w rozwoju Botrytis i Alternaria spp.*, Wydawnictwo Naukowe Uniwersytetu Szczecińskiego, Rozprawy i Studia, (CCLXXIII).
7. Kępczyńska E., (1989), *Physiol. Plant.*, 77, 369-372.



8. Zielińska S., Kępczyńska E., Łojkowska E., (1998), *Materiały III Ogólnopolskiej Konferencji: Zastosowanie kultur in vitro w fizjologii roślin*, Zakład Fizjologii Roślin PAN, Kraków, 217-220.
9. Primrose S. B., (1976), *J. Gen. Microbiol.*, 95, 159-163.
10. Primrose S. B., (1976), *J. Gen. Microbiol.*, 97, 343-346.
11. Primrose S. B., (1977), *J. Gen. Microbiol.*, 98, 519-528.
12. Primrose S. B., Dilworth M. J., (1976), *J. Gen. Microbiol.*, 93, 177-181.
13. Goto M., Ishida Y., Takikawa Y., Hyodo H., (1985), *Plant Cell Physiol.*, 26, 141-150.
14. Sato M., Urushizaki K., Nishiyama K., Sakai F., Ota Y., (1987), *Agric. Biol. Chem.*, 51, 1177-1178.
15. Weingart H., Volksch B., (1997), *Appl. Environ. Microbiol.*, 63, 156-161.
16. Sato M., Watanabe K., Yazawa M., Takikawa Y., Nishiyama K., (1997), *Phytopathology*, 87, 1192-1196.
17. Buddendorf-Joosten J. M. C., Woltering E. J., (1994), *Plant Growth Regul.*, 15, 1-16.
18. Ma J.-H., Yao J.-L., Cohen D., Morris B., (1998), *Plant Cell Rep.*, 17, 211-214.
19. Biondi S., Diaz T., Iglesias I., Gamberini G., Bagni N., (1990), *Physiol. Plant.*, 78, 474-483.
20. Coleman W., Hunter T. J., Reid D. M., Thorpe T. A., (1980), *Physiol. Plant.*, 48, 519-525.
21. Liu J. H., Reid D. M., (1992), *J. Exp. Bot.*, 43, 1191-1198.
22. Mensuali-Sodi A., Panizza M., Tognoni F., (1995), *Plant Growth Regul.*, 17, 205-212.
23. Pegg G. F., (1985), *Encycl. Plant Physiol.*, 599-624, Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York-Tokyo, 24.
24. Ogawa T., Takahashi M., Fujii T., Tazaki M., Fukuda H., (1990), *J. Ferment. Bioeng.*, 69, 287-291.
25. Watanabe K., Nagahama K., Sato M., (1998), *Phytopathology*, 88, 1205-1209.
26. Fukuda H., Ogawa T., (1991), *The plant hormone ethylene*, Eds. A. K. Mattoo and J. C. Suttle, 279-292, CRC Press, Boca Raton, Fl.
27. Agrios G. N., (1997), *Plant pathology*, Academic Press, San Diego.
28. Lund S. T., Stall R. E., Klee H. J., (1998), *Plant Cell*, 10, 371-382.
29. Boller T., (1991), *The plant hormone ethylene*, Eds. A. K. Mattoo and J. C. Suttle, 293-314, CRC Press, New York.
30. Aloni R., Wolf A., Feigenbaum P., Avni A., Klee H. J., (1998), *Plant Physiol.*, 117, 841-849.
31. Klee H. J., Hayford M. B., Kretzmer K. A., Barry G. F., Kishore G. M., (1991), *Plant Cell*, 3, 1187-1193.
32. Yao M., Tanaka I., Hikichi K., (1994), *J. Struct. Biol.*, 113, 251-253.
33. Yao M., Horiuchi A., Tanaka I., Honma M., (1995), *Protein and Peptide Lett.*, 2, 305-306.
34. *Plant hormones. Physiology, biochemistry and molecular biology*, (1995), Davies J., Ed. 343-348, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
35. Campbell B. G., Thomason J. A., (1996), *FEMS Microbiol. Lett.*, 138, 207-210.
36. Penrose D. M., Glick B. R., (1997), *Indian J. Exp. Biol.*, 35, 1-17.