PROGRESS IN PLANT PROTECTION
57 (1): 27-35, 2017
ISSN 1427-4337

DOI: 10.14199/ppp-2017-004
Published online: 16.02.2017

Received: 23.11.2016 / Accepted: 23.01.2017

Stilbenes and their role in disease resistance

Stilbeny i ich znaczenie w odporności roślin

Monika Kozłowska*, Łukasz Czekała

Summary

Phenylpropanoid pathway allows plants to withstand different stress conditions; biotic and abiotic. Some plants are able to synthesize stilbene derivatives based on a 1,2-diphenylethylene backbone. Stilbene synthase (STS) is an enzyme responsible for stilbene accumulation and it is generally believed that it evolved several times from chalcone synthase (CHS) during the evolution. However, STS unlike the commonly occurring CHS, is plant specific and occurs in approximately 70 unrelated plant species. Stilbenes have a range of functions, which mainly include strong antimicrobial properties, and thus are considered as phytoalexins. These compounds may also be involved in plant-herbivore relationships and allelopathy, and their antioxidant activities were evaluated. Stilbenes are still produced in small quantities, but the increase in their synthesis occurs due to infection, and moreover after injury, UV radiation and ozone. More effective elicitors are tested *in vitro*. The most widely reported plant stilbene is resveratro (3,5,4'-trihydroxy-*trans*-stilbene).

Key words: stilbenes; disease resistance; resveratrol; stilbene synthase (STS)

Streszczenie

Powszechnym zjawiskiem w warunkach stresu biotycznego i abiotycznego jest aktywacja szlaku fenylopropanoidowego. Metabolitami tego szlaku są między innymi stilbeny, związki o szkielecie 1,2-difenyloetylenowym. Tylko niektóre, niespokrewnione gatunki roślin, są zdolne do syntezy i gromadzenia stilbenów. Enzymem umożliwiającym syntezę jest syntaza stilbenowa (STS – stilbene synthase), która na drodze ewolucji mogła ewaluować z syntazy chalkonowej (CHS – chalcone synthase), powszechnego enzymu w świecie roślin. Stilbeny spełniają w roślinach szereg funkcji, z których najistotniejsza wynika z silnych właściwości antymikrobowych, stąd zaliczane są do fitoaleksyn. Znane jest też ich działanie odstraszające względem roślinożerców oraz właściwości allelopatyczne i antyoksydacyjne. Stilbeny są wytwarzane w niewielkich ilościach, jednak aktywacja biosyntezy następuje przede wszystkim poinfekcyjnie, a ponadto pod wpływem zranienia, promieniowania UV, ozonu i jonów glinu. W warunkach *in vitro* poszukiwane są jeszcze skuteczniejsze induktory. Do najszerzej opisywanych stilbenów należy resweratrol (3,5,4'-trihydroksy-*trans*-stilben).

Słowa kluczowe: stilbeny; odporność roślin; resweratrol; syntaza stilbenowa (STS)

Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu
Katedra Fizjologii Roślin
Wołyńska 35, 60-637 Poznań
*corresponding author: monika.kozlowska@up.poznan.pl

The Polish Society of Plant Protection
The Institute of Plant Protection – National Research Institute

Wstęp / Introduction

Rośliny w toku ewolucji wykształciły wyspecjalizowane mechanizmy odporności na niekorzystne czynniki środowiska. Ze względów poznawczych oraz możliwości aplikacyjnych mechanizmy te budzą od lat zrozumiałe zainteresowanie. Powszechne są przystosowania rozwojowo-morfologiczne i fizjologiczne roślin do funkcjonowania w niekorzystnych warunkach. Ponadto, w okresie aklimatyzacji do warunków niekorzystnych lub w sytuacji pojawiającego się stresu środowiskowego, w roślinach uruchamiane są mechanizmy prowadzące między innymi do akumulacji białek stresowych, krioprotektantów, substancji osmotycznych, związków antymikrobowych, itp.

Od lat sześćdziesiątych ubiegłego stulecia nastąpił intensywny rozwój badań nad poznaniem mechanizmów obronnych przeciwko patogenom roślin. Kutykula lub warstwa woskowa na powierzchni liści, lignina i suberyna w tkankach wewnętrznych oraz liczne substancje swoiste, zwane prohibitynami – stanowią barierę konstytutywną chroniącą przed infekcją. Poinfekcyjne reakcje obronne, aktywowane z udziałem specyficznych receptorów, są złożonymi procesami metabolicznymi. Po rozpoznaniu czynnika chorobotwórczego następuje transdukcja powstałego sygnału, prowadząca do uruchomienia mechanizmu obronnego (Li i wsp. 2013).

Jednym z centralnych ogniw tego mechanizmu jest synteza metabolitów szlaku fenylopropanoidowego. Poczynając od reakcji deaminacji L-fenyloalaniny (Phe) do kwasu *trans*-cynamonowego, katalizowanej przez amoniakoliazę fenyloalaniny (PAL), szlak ten generuje ogromny wachlarz metabolitów wtórnych, z których szczególnie powszechne są związki fenolowe, a w obrębie nich – flawonoidy (Emiliani i wsp. 2009). Metabolity te umożliwiają roślinom obronę nie tylko przed organizmami chorobotwórczymi, ale też czynnikami abiotycznymi (Dixon i Paiva 1995; Solecka 1997).

Niskocząsteczkowe fenylopropanoidy o właściwościach antybiotycznych należą do związków zwanych fitoaleksynami, czyli substancji indukowanych poinfekcyjnie, które chronią przed rozwojem choroby (gr. *phyton* – roślina, *aleksein* – ochraniać). W warunkach naturalnych rośliny zawierają znikome ilości tych substancji, jednak ich stężenie wzrasta w następstwie infekcji (Harborne 1999).

Fitoaleksyny to niezmiernie cenne metabolity warunkujące odporność (Ahuja i wsp. 2012). Od lat są przedmiotem wielu badań naukowych, w tym z punktu widzenia agrosystemów ekologicznych i rolnictwa biodynamicznego. Szczególnie wysoką toksycznością względem mikroorganizmów chorobotwórczych cechują się fitoaleksyny o budowie stilbenowej, uczestniczące w konstytutywnych i indukowanych mechanizmach obronnych. Mają właściwości antybakteryjne i antygrzybowe (Morales i wsp. 2000).

Spośród wszystkich stilbenów, najwięcej doniesień dotyczy *trans*-resweratrolu i jego pochodnych, zarówno w aspekcie odporności roślin, ale także ze względu na aktywność biomedyczną (Soleas i wsp. 1997; Jeandet i wsp. 2002; Pezzuto 2008). Resweratrol budzi zainteresowanie wielu grup badawczych i firm biotechnologicznych na całym świecie. Znane są też liczne aplikacje farmakologiczne tej substancji.

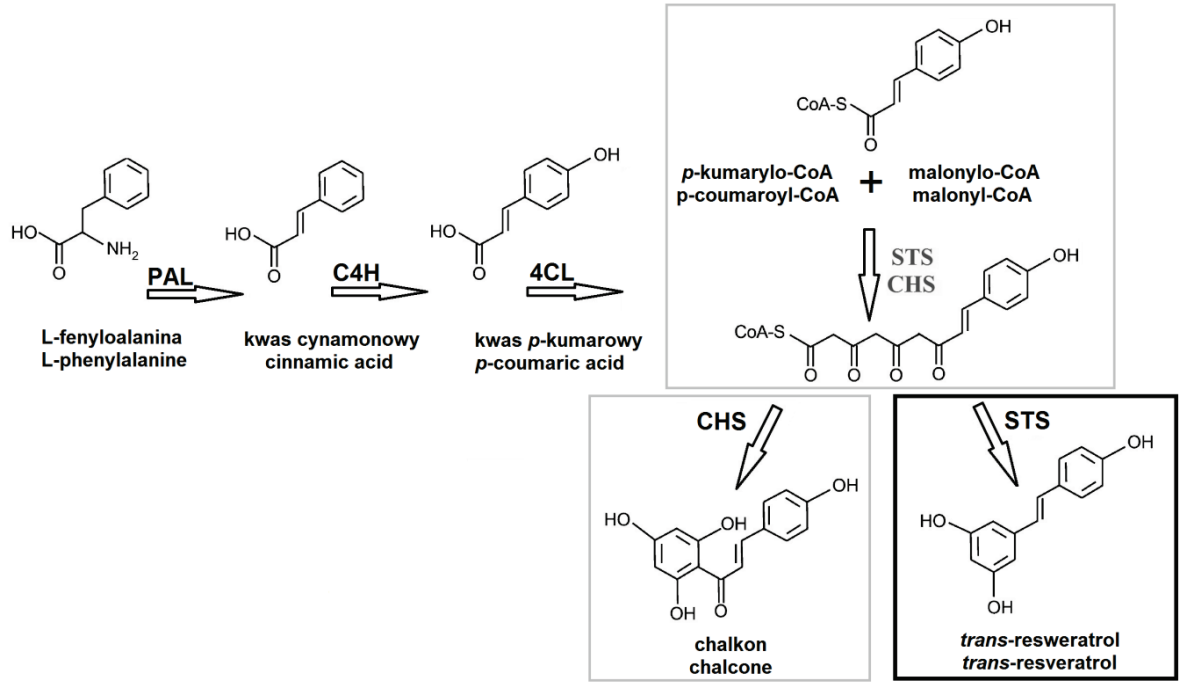
Synteza i modyfikacje stilbenów / Biosynthesis and stilbene modifications

Stilbeny stanowią stosunkowo mało liczną grupę roślinnych metabolitów wtórnych o szkielecie 1,2-difenyletylenu. W większości są pochodnymi *trans*-resweratrolu, który może podlegać dalszym przemianom. Powstają na drodze szlaku fenylopropanoidowego (rys. 1). Pierwszym prekursorem tych metabolitów jest *p*-kumaroilo-CoA, wywodzący się z fenyloalaniny. Drugim – malonylo-CoA, wywodzący się ze szlaku kwasu malonowego. Dalsze reakcje są zależne od aktywności odpowiednio – syntazy chalkonowej (CHS – chalcone synthase) lub syntazy stilbenowej (STS – stilbene synthase), w efekcie czego powstają flawonoidy o budowie chalkonowej (C6-C3-C6) lub stilbeny (C6-C2-C6).

Syntaza stilbenowa odgrywa kluczową rolę w kumulacji omawianych metabolitów, jednak w koordynacji z enzymami „otwierającymi" szlak fenylopropanoidowy, takimi jak amoniakoliaza fenyloalaniny (PAL – phenylalanine ammonia lyase), cynamoilo–4-hydrolaza (C4H) oraz ligaza kumaroilo-CoA (4CL – 4-coumarate:CoA ligase). STS wykazuje wysoką homologię do CHS; sekwencja aminokwasowa białek obu tych enzymów jest w 75–90% identyczna. Jednak STS występuje u niewielu taksonów, podczas gdy CHS jest enzymem bardzo rozpowszechnionym w świecie roślin (Chong i wsp. 2009). Na podstawie struktury krystalicznej i wyżej wskazanego podobieństwa wykazano, że w toku ewolucji STS mogła kilkakrotnie ewaluować z CHS (Tropf i wsp. 1994). Centrum aktywne obu enzymów zawiera konserwatywne reszty cysteinowe, niezbędne do katalitycznej aktywności tych białek. Jest też miejscem wiązania tego samego substratu (Lanz i wsp. 1991).

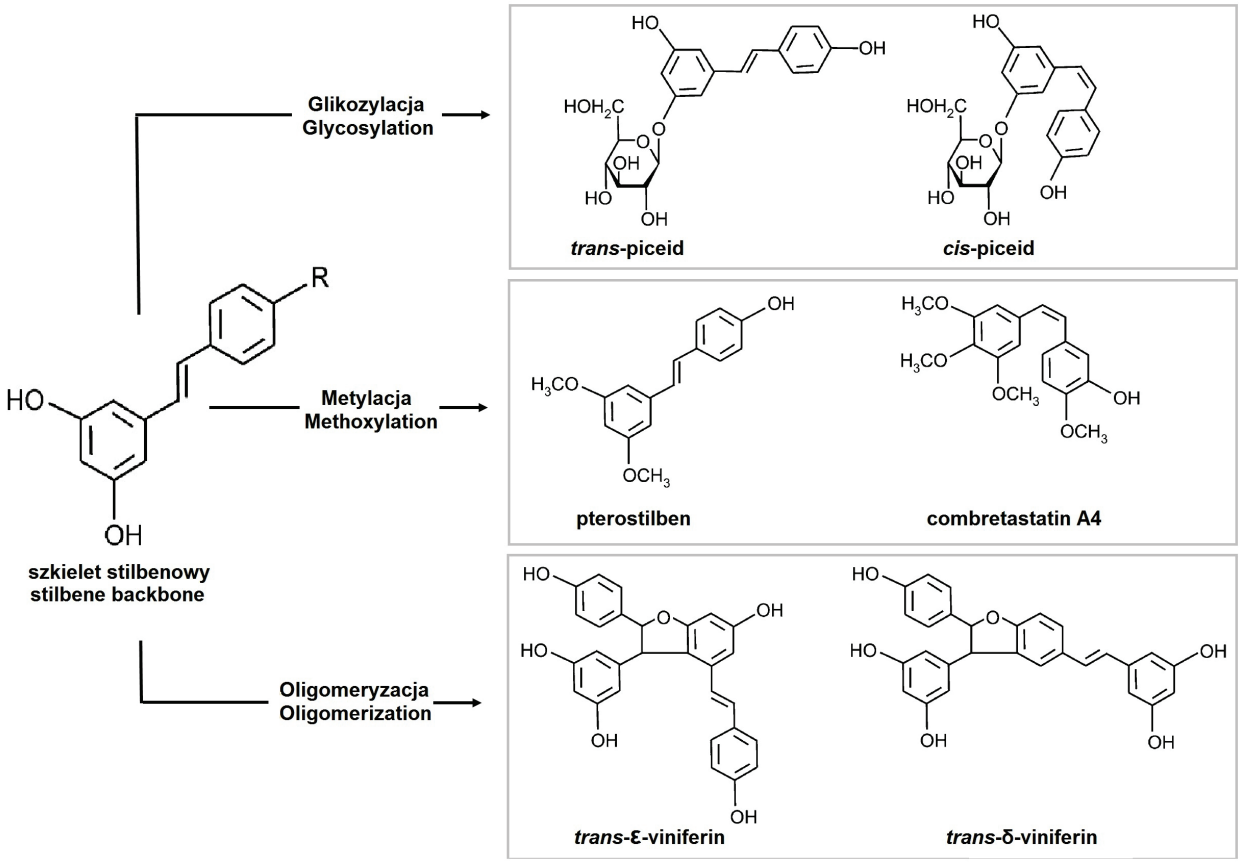
Choć reakcje katalizowane przez obydwa enzymy przebiegają z udziałem tych samych substratów, w proporcji: jedna cząsteczka *p*-kumaroilo-CoA i trzy malonylo-CoA, ich produkty są różne. STS tworzy tetraketydowy związek pośredni poprzez kondensację aldolową, połączoną z dodatkową dekarboksylacją i utratą jednego węgla, natomiast CHS przeprowadza analogiczną reakcję poprzez tzw. kondensację Claisena (Chong i wsp. 2009). W warunkach eksperymentalnych stwierdzono możliwość reakcji krzyżowej pomiędzy obu enzymami, tj. syntezę szkieletu stilbenowego przez CHS, a chalkonowego przez STS, przypuszczalnie z powodu plastyczności konformacyjnej centrum aktywnego (Yamaguchi i wsp. 1999).

W zależności od preferowanej molekuły, do jakiej na pierwszym etapie szlaku fenylopropanoidowego ulega przekształceniu kwas cynamonowy, wyróżnia się STS specyficzną do p-kumaroilo-CoA (np. syntaza resweratrolu) lub specyficzną do cynamoilo-CoA (np. syntaza pinosylwinu). Pierwszy typ najczęściej występuje u roślin okrytonasiennych, a drugi u nagonasiennych. W warunkach *in vitro*, w komórkach igieł świerka stwierdzono też syntezę piceatannolu z kawoilo-CoA. Natomiast STS



Rys. 1. Szlak syntezy stilbenów z udziałem amoniakoliazy fenyloalaniny (PAL), cynamoilo–4-hydrolazy (C4H), ligazy kumarylo-CoA (4CL), syntazy chalkonowej (CHS) i syntazy stilbenowej (STS) (Chong i wsp. 2009 – zmodyfikowano)

Fig. 1. Stilbene biosynthesis including phenylalanine ammonia lyase (PAL), cinnamate-4-hydroxylase (C4H), CoA ligase (4CL), chalcone synthase (CHS) and stilbene synthase (STS) activities (Chong *et al*. 2009 – modified)



Rys. 2. Diagram charakteryzujący modyfikacje stilbenów

Fig. 2. Schematic diagram of stilbene modifications

sosny zwyczajnej ma jeszcze wyższą preferencję substratową do dihydrocynamoilo-CoA niż do cynamoilo-CoA (Chong i wsp. 2009). Pomimo licznych informacji dotyczących STS, regulacja aktywności i transkrypcji tego enzymu – to zagadnienia nadal nie w pełni poznane.

Produkty aktywności STS podlegają bezpośredniej kumulacji albo ulegają modyfikacjom, które zmieniają właściwości i funkcje stilbenów. Modyfikacje mogą być następujące (rys. 2):

- glikozylacja – powszechna wśród roślinnych metabolitów wtórnych, w której poprzez przyłączenie reszty sacharydowej do szkieletu stilbenowego następuje zmiana hydrofilności, bioaktywności i przede wszystkim stabilności związku (Gachon i wsp. 2005). Glikozydy są gromadzone w soku wakuolarnym i mogą być transportowane z cytoplazmy do apoplastu (Morales i wsp. 1998). Duża grupa roślinnych stilbenów jest akumulowana w postaci glikozydów, takich jak *cis*- lub *trans*-piceid, którego aglikonem jest resweratrol lub astringina z aglikonem astringeniną,
- metylacja – reakcja zachodząca z udziałem *S*-adenozylo-*L*-metionino-*O*-metylotransferaz metylujących ogromny wachlarz metabolitów wtórnych, z których wiele pochodzi ze szlaku fenylopropanoidowego (Noel i wsp. 2003). W wyniku tej modyfikacji powstają związki od mono- do polimetylowanych. Przykładami metylowanych stilbenów są: 3-*O*-metylo eter pinosylwinu, pterostilben i kombretastatyna A4 (kolejno o wzrastającym stopniu metylacji). Dwa ostatnie, to związki o szczególnie obiecujących właściwościach farmakologicznych. Stwierdzono bowiem hamowanie proliferacji komórek nowotworowych przez kombretastatynę A4 (Kingston 2009) oraz właściwości antynowotworowe, hipolipidemiczne i przeciwcukrzycowe pterostilbenu, występującego między innymi w owocach borówek i żurawiny (Roupe i wsp. 2006),
- oligomeryzacja – prowadząca do tworzenia dimerów, trimerów lub tetramerów (Morales i wsp. 2000). Przykładem tego typu związków są winiferyny – dimery występujące u winorośli, szczególnie silnie akumulowane w następstwie infekcji patogenów grzybowych lub promieniowania UV (Langcake i Pryce 1977; Jeandet i wsp. 2002).

Do pewnego typu modyfikacji, której może podlegać resweratrol, zaliczyć można izomeryzację formy *trans* o wysokiej aktywności biologicznej, do formy *cis* o znacznie niższej aktywności. Proces ten w roślinach zachodzi spontanicznie, między innymi pod wpływem światła i jest nieodwracalny (Chong i wsp. 2009).

Występowanie w świecie roślin / Occurrence in plants

Stilbeny są metabolitami wtórnymi stosunkowo mało powszechnymi w przyrodzie. Dotychczas ich obecność stwierdzono u blisko 70 niespokrewnionych ze sobą gatunków roślin, należących do około 30 rodzajów i 12 rodzin. Największą zawartością stilbenów cechują się rośliny z rodziny sosnowatych (Pinaceae), winoroślowatych (Vitaceae), bukowatych (Fagaceae), morwowatych (Moraceae) i wiechlinowatych (Poaceae) (Morales i wsp. 2000).

W ostatnich latach, w wyniku intensywnych badań fitochemicznych roślin tropikalnych, różnorodne oligomery resweratrolu zidentyfikowano u drzew dwuskrzydłowatych (Dipterocarpaceae) – największych i najważniejszych drzew tej strefy klimatycznej oraz u pnączy z rodziny gniotowatych (Gnetaceae) (Riviere i wsp. 2012). Rośliny, które konstytutywnie gromadzą stilbeny w najwyższym stężeniu podano w tabeli 1.

Tabela 1. Rośliny gromadzące stilbeny w najwyższym stężeniu
Table 1. List of plants cumulating stilbenes at the highest concentration

Roślina – Plant	Stilbeny – Stilbenes (główne zidentyfikowane – main identified)
1	2
Sosna pospolita – *Pinus sylvestris* Sosna wejmutka – *Pinus strobus* Sosna gęstokwiatowa – *Pinus densiflora*	pinosylvin, pinosylvin 3-*O*-methyl ether
Świerk – *Picea* sp.	*trans*-piceatannol, astringin
Rdestowiec japoński – *Fallopia japonica* (*Polygonum cuspidatum*)	piceid (resveratrol-3-*O*-glucoside), resveratrol
Winorośl właściwa – *Vitis vinifera* Winorośl lisia – *Vitis labrusca* Winorośl amerykańska – *Vitis rotundifolia*	*trans*-resveratrol, *cis*-resveratrol viniferins, pterostilbens *trans*, *cis*-piceid, *trans*-astringine
Winobluszcz – *Parthenocissus laetevirens* (gatunek endemiczny w Chinach – endemic plant in China)	laetevirenols
Orzech ziemny – *Arachid hypogaea*	*trans*-resveratrol, *trans*-arachidin
Pistacja właściwa – *Pistacja vera*	*trans*-resveratrol, *trans*-piceid
Olsza zielona – *Alnus crispa*	pinosylvin 3-*O*-methyl ether
Morwa – *Morus* sp.	resveratrol
Chmiel zwyczajny – *Cumulus lupulus*	resveratrol, piceid

1	2
Sandałowiec czerwony – *Pterocarpus santalinus*	pterostilben
Borówki, żurawina – *Vaccinium* spp.	pterostilben, *trans*-resveratrol
Rabarbar ogrodowy – *Rheum rhaponticum*	piceatannol, rhapontin
Ciemiężyca – *Veratrum grandiflorum*	*trans*-resveratrol
Combretum caffrum (wierzbopodobne drzewo endemiczne w południowej Afryce – endemic willow-like tree in South Africa)	combretastatin A4
Sitowiec nadmorski – *Scirpus maritimus*	piceatannol

Większość roślin gromadzących stilbeny ma znaczenie konsumpcyjne lub farmakologiczne. Spośród wymienionych, szczególnym zainteresowaniem cieszy się winorośl, nie tylko ze względu na rolę stilbenów w odporności na choroby. Ten gatunek, poza wysoką zawartością resweratrolu, zawiera dimery tego związku zwane winiferynami, metylowaną pochodną – pterostilben oraz glikozydy: *trans*- i *cis*-piceid, a także *trans*-astringinę (Langcake 1981; Das i wsp. 2010; Mikulski i wsp. 2010). Warto też wspomnieć, że winorośl, to obok zbóż najstarsza roślina uprawna, wszechobecna w kulturze starożytnej, a jej fermentowany produkt zawsze był towarem wyjątkowej wartości, choć stilbeny nie były znane.

Akumulacja stilbenów w winogronach dotyczy głównie egzokarpu owoców, tj. skórki, w której ich zawartość sięga 50–100 µg/g świeżej masy. U roślin uprawianych w klimacie chłodniejszym zawartość tych metabolitów jest jeszcze wyższa. W trakcie dojrzewania owoców następuje glikozylacja resweratrolu do piceidu, czyli jak już wspomniano, formy o lepszej rozpuszczalności w soku owoców. Ponadto, mono- i oligomery resweratrolu stwierdzono w pędach i korzeniach tego gatunku (Jeandet i wsp. 2002; Chong i wsp. 2009).

Rośliny bogate w stilbeny to także rdestowiec japoński (*Fallopia japonica*), którego korzenie zawierają do 16 mg piceidu i 1,8 mg resweratrolu w gramie suchej masy oraz sosna, której drewno twardzieli zawiera nawet do 40 mg/g suchej masy (Chong i wsp. 2009). Natomiast największe znaczenie w medycynie ludowej mają: wspomniany powyżej rdestowiec japoński oraz winobluszcz (*Parthenocissus laetevirens*) i wierzba afrykańska (*Combretum caffrum*).

Niezależnie od zawartości konstytutywnej, poziom stilbenów wzrasta pod wpływem stresów środowiskowych. Szczególny wpływ na akumulację ma infekcja patogenicznymi bakteriami i grzybami (Albert i wsp. 2011; Ahuja i wsp. 2012), zranienie mechaniczne (Chiron i wsp. 2000), promieniowanie UV (Wang i wsp. 2010), ozon (Rosemann i wsp. 1991) oraz jony glinu (Adrian i wsp. 1996). Aplikowanie niektórych związków w warunkach doświadczalnych, np. cyklodekstryn (Bru i wsp. 2006) lub cyklodekstryn w połączeniu z niespecyficznym nukleotydem – diadenozyno-trifosforanem (Pietrowska-Borek i wsp. 2014) także indukowało gromadzenie stilbenów.

W królestwie roślin, najpowszechniej występującym stilbenem jest resweratrol oraz jego glikozydowa pochodna – piceid. Inne, najczęściej specyficzne dla wybranych roślin, to: pterostilben, piceatannol, winiferyny i astringina (Riviere i wsp. 2012).

Właściwości i funkcje fizjologiczne / Properties and physiological functions

Zainteresowanie stilbenami wywodzi się od wykrycia ich właściwości antymikrobowych. Pierwsze rośliny, u których stwierdzono odporność zależną od tej grupy metabolitów to: orzech ziemny, sosna pospolita, winorośl właściwa i rdest japoński – gatunki niespokrewnione, o różnej przynależności systematycznej. Wykazano, że stilbeny warunkują odporność konstytutywną oraz pełnią rolę fitoaleksyn. Są akumulowane w następstwie infekcji, ale także inne czynniki stresowe podnoszą ich zawartość w roślinach. Z tego też względu, w warunkach naturalnych mogą być elementem odporności indukowanej lub tzw. odporności krzyżowej. Gromadzenie stilbenów jest skutkiem ekspresji genów syntezy tych metabolitów (Chiron i wsp. 2000; Chong i wsp. 2009).

Ze względów gospodarczych, trwałość i odporność drewna drzew iglastych od lat budziła duże zainteresowanie. W latach 80–90. ubiegłego stulecia wykazano jednoznacznie, że to stilbeny chronią drewno przez patogenami (Schultz i wsp. 1990). W warunkach *in vitro* potwierdzono, że zarówno pinosylwin, jak i 3-*O*-metylo eter pinosylwinu są bardzo silnymi inhibitorami dwóch kluczowych grzybów rozkładających drewno – *Coriolus versicolor* i *Gloephyllum trabeum* (Chong i wsp. 2009). Co więcej, także niektóre gatunki sosny odporne na nicienie zawierają w korze oraz w twardzieli drewna substancje nicieniobójcze, z których najbardziej skutecznym okazał się 3-*O*-metylo eter pinosylwinu (Suga i wsp. 1993).

Znane są inne przykłady świadczące o insektobójczej roli stilbenów, np. w badaniach modelowych stilbeny wyizolowane z kory jukki (*Yucca periculosa*) działały toksycznie względem szkodnika kukurydzy – rolnicy gwoździkowatej (*Spodoptera frugiperda*) (Torres i wsp. 2003). Substancje te mogą też funkcjonować jako związki allelochemiczne, np. piceatannol sitowca nadmorskiego (*Scirpus maritimus*), poprzez wpływ na fotosyntezę, hamuje wzrost roślin sąsiednich (Fiorentino i wsp. 2008).
Ze względu na akumulację resweratrolu i jego pochodnych u winorośli, także ta roślina była i jest nadal przedmiotem licznych badań w aspekcie odporności na czynniki środowiska. Odmiany uprawne *Vitis vinifera*, a badano ich ponad 70, znacznie różnią się zawartością stilbenów. Jednak wysoki poziom resweratrolu był skorelowany z nadekspresją genów odporności, w tym kodujących białka PR (pathogenesis-related), tj. – chitynazy i traumatyny (Bezier i wsp. 2002).

Odporność gatunkowa i odmianowa winorośli względem patogenów nekrotroficznych (*Botrytis cinerea*) oraz biotroficznych (*Erysiphe necator* i *Plasmopara viticola*) jest zależna nie tylko od zdolności do syntezy stilbenów, ale i ich dalszego metabolizmu. Syntezę resweratrolu w następstwie infekcji patogenów biotroficznych stwierdzono u odmian odpornych i podatnych. Jednak u tych pierwszych metabolit ten podlegał szybkiemu utlenianiu do wysoce toksycznych winiferyn. Natomiast u podatnych podlegał glikozylacji do mało toksycznego piceidu (Pezet i wsp. 2004; Schnee i wsp. 2008). W badaniach *in vitro* potwierdzono, że resweratrol hamował kiełkowanie zarodników *B. cinerea* – czynnika sprawczego szarej pleśni i *P. viticola* – patogena wywołującego mączniaka rzekomego winorośli. Ponadto, kilkukrotnie wyższą aktywność niż sam resweratrol wykazywały ε-winiferyny, czyli dimery resweratrolu, a szczególnie pterostilbeny – dimetylowane formy resweratrolu (Langcake 1981; Jeandet i wsp. 2002).

W innych badaniach resweratrol aplikowany do jabłek, tj. owoców rośliny pozbawionej tego metabolitu, hamował rozwój parcha jabłoni *Venturia inaequalis*. Podobnie działał nawet piceid, uznawany za mało toksyczny względem innych grzybów (Schulze i wsp. 2005).

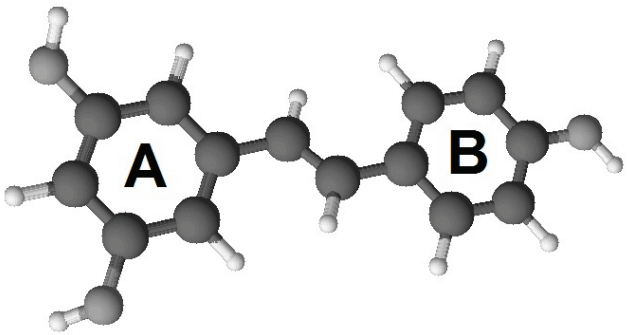
Dokładny mechanizm działania stilbenów pozostaje wciąż w sferze badań. Należy jednak podkreślić, że syntaza stilbenowa – kluczowy enzym odpowiedzialny za syntezę tych metabolitów, jest zlokalizowany między innymi w apoplaście, co ma istotne znaczenie w ich oddziaływaniu na pojawiające się pasożyty (Fornara i wsp. 2008).

Poza bezpośrednim hamowaniem organizmów chorobotwórczych, stilbeny cechuje zdolność do obniżania poziomu wolnych rodników, w tym generowanych w niekorzystnych warunkach środowiska (Privat i wsp. 2002). Biorąc pod uwagę, że grzyby i bakterie oraz szkodniki mogą generować stres oksydacyjny, ta właściwość stilbenów ma więc dodatkowe znaczenie. Silniejsze właściwości antyoksydacyjne mają stilbeny cykliczne (o strukturze fenantrenu – węglowodoru trójcyklicznego) niż formy niecykliczne. Postulowano też, że tworzenie tej formy, np. pod wpływem promieniowania UV, może odgrywać ważną rolę w adaptacji do warunków stresu oksydacyjnego. Co ciekawe, na skutek transgenicznej ekspresji cDNA winorośli kodującego syntazę stilbenową, w owocach pomidora, pod kontrolą specyficznego promotora TomLoxB zaobserwowano wzrost zawartości kwasu askorbinowego i tym samym wzrost właściwości antyoksydacyjnych (D´Introno i wsp. 2009). Transformacja roślin z wykorzystaniem syntazy stilbenowej mogłaby więc przyczynić się do uzyskania genotypów nie tylko o wyższej odporności na stresy środowiskowe, ale też bogatszych w antyoksydanty.

Niezależnie od powyższego wątku, liczne są doniesienia na temat transformacji roślin z wykorzystaniem syntazy stilbenowej, w aspekcie odporności na patogeny. Większość ważnych gospodarczo roślin użytkowych nie posiada bowiem tego enzymu. Pionierskie osiągnięcia dotyczącego wprowadzenia genu STS orzecha ziemnego do tytoniu zostały opublikowane w roku dziewięćdziesiątym ubiegłego stulecia i należą do grupy badaczy niemieckich (Hain i wsp. 1990). Pomimo obiecujących możliwości podniesienia odporności, w szczególności względem patogenów grzybowych, większość uzyskanych efektów nie jest jednak jednoznaczna; objawy chorobowe w liniach transgenicznych były najczęściej tylko w pewnym stopniu redukowane lub gromadzenie stilbenów nie warunkowało pełnej odporności roślin. Przykładowo, wysoka odporność transformowanego pomidora przeciwko *Phytophthora infestans* nie chroniła roślin przed *Botrytis cinerea* i *Alternaria solani* (Delaunois i wsp. 2009; Rook 2016).

Resweratrol – nie tylko w mechanizmie obronnym / Resveratrol – not only in disease resistance

Podstawowe znaczenie stilbenów dotyczy ich udziału w mechanizmach odporności roślin. Jednak w ostatnich dziesięcioleciach te fitozwiązki wzbudziły nowe zainteresowanie, głównie ze względu na szerszą aktywność biologiczną i możliwości aplikacyjne (Morales i wsp. 2000). Uwaga jest koncentrowana głównie na resweratrol (3,5,4'-trihydroksy-*trans*-stilben) (rys. 3), najpowszechniej występujący w przyrodzie i szeroko opisywany w literaturze. Resweratrol został wyizolowany po raz pierwszy



Rys. 3. Model izomeru geometrycznego *trans*-resweratrolu (3,5,4'-trihydroksy-*trans*-stilbenu) o wzorze sumarycznym $C_{14}H_{12}O_3$

Fig. 3. Model of *trans*-resveratrol (3,5,4'-trihydroxy-*trans*-stilbene) with molecular formula $C_{14}H_{12}O_3$

w 1940 roku z korzeni ciemiężycy *Veratrum grandiflorum* O. Loes (Takaoka 1940). W azjatyckiej medycynie ludowej, ze względu na ten metabolit, wysuszone korzenie rdestowca japońskiego są szeroko stosowane do leczenia zaburzeń chorobowych. W kulturze europejskiej resweratrol jest kojarzony z właściwościami prozdrowotnymi czerwonego wina. Z tego powodu, już na początku dziewiętnastego wieku opisano tzw. „paradoks francuski" polegający na mniejszej zapadalności mieszkańców Francji na choroby układu krążenia. Za główny powód tego zjawiska uznano wysoką konsumpcję czerwonego wina gronowego, zawierającego dużo związków fenolowych, w tym resweratrolu (Grønbæk i wsp. 2000).

Rola resweratrolu w odporności roślin, jak i jego korzystny wpływ na zdrowie człowieka, w szczególności zależą od właściwości antyoksydacyjnych (Ndiaye i wsp.

2011). Ta aktywność jest warunkowana obecnością grup hydroksylowych w pierścieniu fenolowym, bowiem w następstwie ich metylacji następuje obniżenie właściwości antyutleniających (Stivala i wsp. 2001). Forma *trans*-resweratrolu charakteryzuje się znacznie większym działaniem antyoksydacyjnym niż mniej powszechna konformacja *cis*- (Mikulski i wsp. 2010).

Resweratrol ma jeszcze szereg innych właściwości i jest interesujący ze względu na możliwości zastosowania farmakologicznego. Wykazano jego działanie przeciwzapalne i antymutagenne (Busch i wsp. 2012), neuroprotekcyjne (Quincozes-Santos i Gottfried 2012) i przeciwnowotworowe (Pezzuto 2008), a także chemoprewencyjne (Soleas i wsp. 1997). Zapobiega chorobom sercowo-naczyniowym i układu krążenia (Wu i wsp. 2001) oraz wielu innym. Jednak jak dotąd, jego wykorzystanie następuje głównie przez rynek nutraceutyków, a więc środków spożywczych, łączących właściwości żywieniowe z farmaceutycznymi (Donnez i wsp. 2009).

Resweratrol jest pozyskiwany przede wszystkim z upraw polowych rdestowca japońskiego (*F. japonica*), a Chiny są jego głównym producentem. Jego synteza na dużą skalę i o wysokim stopniu oczyszczenia – to kolejne wyzwania, związane z tą interesującą substancją. Takim rozwiązaniem mogą być metody biotechnologiczne, z wykorzystaniem mikroorganizmów lub komórek roślinnych w hodowlach *in vitro*.

Synteza dużych ilości *trans*-resweratrolu jest możliwa z udziałem modyfikowanych bakterii i drożdży. Te ostatnie, w sposób naturalny są zdolne do syntezy niektórych substratów niezbędnych do powstania szkieletu stilbenowego, jak na przykład malonylo-CoA (Becker i wsp. 2003; Donnez i wsp. 2009). Natomiast metodą inżynierii genetycznej można wprowadzać geny ligazy kumaroilo-CoA (4CL) i/lub syntazy stilbenowej (STS). Dodatkowe zwiększenie w pożywce poziomu aminokwasów aromatycznych – L-fenyloalaniny czy L-tyrozyny, jako substratów – może dać jeszcze lepszy efekt. Komórki *Saccharomyces cerevisiae* transformowane genem 4CL z *Nicotiana tabacum* i STS z *V. vinifera* syntetyzowały trans-resweratrol do stężenia 5,8 mg/l pożywki (Beekwilder i wsp. 2006), a komórki *Escherichia coli* transformowane genem 4CL z *Lithospermum erythrorhizon* i STS z *A. hypogaea* były zdolne do wytworzenia nawet 170 mg/l pożywki (Katsuyama i wsp. 2007).

Biologiczne systemy do produkcji *trans*-resweratrolu bazujące na mikroorganizmach ustępują technologiom opartym na roślinnych kulturach komórkowych, gatunków naturalnie zdolnych do syntezy stilbenów. Do takich należą np. kultury komórkowe niektórych odmian *V. vinifera* (Gamay rouge i Monastrell), które bez dodatkowego pobudzenia mogą syntetyzować *trans*-resweratrol dużo wydajniej niż mikroorganizmy. Ponadto, poprzez elicytację metylowanymi β-cyklodekstrynami (cykliczne oligosacharydy), zwiększono produkcję nawet do 5 g/l pożywki (Bru i wsp. 2006). Możliwości w zakresie biotechnologii i inżynierii genetycznej pozwalają sądzić, że mogą zostać opracowane jeszcze efektywniejsze metody pozyskiwania tego związku.

Literatura / References

Adrian M., Jeandet P., Bessis R., Joubert J.M. 1996. Induction of phytoalexins (resveratrol) synthesis in grapevine leaves treated with aluminium chloride ($AlCl_3$). Journal of Agricultural and Food Chemistry 44 (8): 1979–1981.

Ahuja I., Kissen R., Bones A.M. 2012. Phytoalexins in defense against pathogens. Trends in Plant Science 17 (2): 73–90.

Albert S., Horbach R., Deising H.B., Siewert B., Csuk R. 2011. Synthesis and antimicrobial activity of (E) stilbene derivatives. Bioorganic and Medical Chemistry 19 (17): 5155–5166.

Becker J.V.W., Armstrong G.O., Van der Merwe M.J., Lambrechts M.G., Vivier M.A., Pretorius I.S. 2003. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for the synthesis of the wine-related antioxidant resveratrol. FEMS Yeast Research 4 (1): 79–85.

Beekwilder J., Wolswinkel R., Jonker H., Hall R., De Rievos C.H., Bovy A. 2006. Production of resveratrol in recombinant microorganisms. Applied and Environmental Microbiology 72 (8): 5670–5672.

Bezier A., Lambert B., Baillieul F. 2002. Study of defense-related gene expression in grapevine leaves and berries infected with *Botrytis cinerea*. European Journal of Plant Pathology 108 (2): 111–120.

Bru M.R., Selles S., Casado-Vela J., Belchi-Navarro S., Pedreno M.A. 2006. Modified cyclodextrins are chemically defined glucan inducers of defense responses in grapevine cell cultures. Journal of Agricultural and Food Chemistry 54 (1): 65–71.

Busch F., Mobasheri A., Shayan P., Lueders C., Stahlmann R., Shakibaei M. 2012. Resveratrol modulates interleukin-1β-induced phosphatidylinositol 3-kinase and nuclear factor κB signaling pathways in human tenocytes. The Journal of Biological Chemistry 287 (45): 38050–38063.

Chiron H., Drouet A., Lieutier F., Payer H.D., Ernst D., Sandermann H. 2000. Gene induction of stilbene biosynthesis in *Scots pine* in response to ozone treatment, wounding and fungal infection. Plant Physiology 124 (2): 865–872.

Chong J., Poutaraud A., Hugueney P. 2009. Metabolism and roles of stilbenes in plants. Plant Science 177 (3): 143–155.

Das S., Vasanthi H.R., Das D.K. 2010. Resveratrol: biochemistry and function. p. 229–330. In: "Plant Phenolics and Human Health: Biochemistry, Nutrition, and Pharmacology" (C.G. Fraga, ed.). John Wiley & Sons, INC Publication, 565 pp.

Delaunois B., Cordelier S., Conreux A., Clements C. 2009. Molecular engineering of resveratrol in plants. Plant Biotechnology Journal 7 (1): 2–12.

D´Introno A., Paradiso A., Scoditti E., D´Amico L., De Paolis A., Carluccio M.A., Nicoletti I., Degara L., Santino A., Giovinazzo G. 2009. Antioxidant and anti-inflammatory properties of tomato fruits synthesizing different amounts of stilbenes. Plant Biotechnology Journal 7 (5): 422–429.

Dixon R.A., Paiva N.L. 1995. Stress-induced phenylpropanoid metabolism. The Plant Cell 7 (7): 1085–1097.

Donnez D., Jeandet P., Clemènt C., Courot E. 2009. Bioproduction of resveratrol and stilbene derivatives by plant cells and microorganisms. Trends in Biotechnology 27 (12): 706–713.

Emiliani G., Fondi M., Fani R., Gribaldo S. 2009. A horizontal gene transfer at the origin of phenylpropanoid metabolism: a key adaptation of plants to land. Biology Direct 4: 7.

Fiorentino A., D´Abrosca B., Pacifico S., Izzo A., Letizia M., Esposito A., Monaco P. 2008. Potential allelopatic effects of stilbenoids and flavonoids from leaves of *Carex distachya* Desf. Biochemical Systematics and Ecology 36 (9): 691–698.

Fornara V., Onelli E., Sparvoli F., Rossoni M., Aina R., Marino G., Citterio S. 2008. Localization of stilbene synthase in *Vitis vinifera* L. during berry development. Protoplasmata 233 (1): 83–93.

Gachon C.M., Langlois-Meurinne M., Saindrenan P. 2005. Plant secondary metabolism glycosyltransferases: the emerging functional analysis. Trends in Plant Science 10 (11): 542–549.

Grønbæk M., Becker U., Johansen D., Gottschau A., Schnohr P., Olehein H., Jensen G., Sørensen T.I.A. 2000. Type of alcohol consumed and mortality from all causes, coronary heart disease and cancer. Annals of Internal Medicine 133 (6): 411–419.

Hain R., Bieseler B., Kindl H., Schröder G., Stöcker R. 1990. Expression of a stilbene synthase gene in *Nicotiana tabacum* results in synthesis of the phytoalexin resveratrol. Plant Molecular Biology 15 (2): 325–335.

Harborne J.B. 1999. The comparative biochemistry of phytoalexins induction in plants. Biochemical Systematics and Ecology 27: 335–367.

Jeandet P., Douillet-Breuil A.C., Bessis R., Debord S., Sbaghi M., Adrian M. 2002. Phytoalexins from the *Vitaceae*: biosynthesis, phytoalexin gene expression in transgenic plants, antifungal activity, and metabolism. Journal of Agricultural Food Chemistry 50 (10): 2731–2741.

Katsuyama Y., Funa N., Miyahisa I., Horinouchi S. 2007. Synthesis of unnatural flavonoids and stilbenes by exploiting the plant biosynthetic pathway in *Escherichia coli*. Chemistry and Biology 14 (6): 613–621.

Kingston D.G. 2009. Tubulin-interactive natural products as anticancer agents. Journal of Natural Products 72 (3): 507–515.

Langcake P. 1981. Disease resistance of *Vitis* spp. and the production of stress metabolites resveratrol, ε-viniferin, α-viniferin and pterostilbene. Physiological Plant Patholology 18 (2): 213–226.

Langcake P., Pryce R.J. 1977. A new class of phytoalexins from grapevines. Experientia 33 (2): 151–152.

Lanz T., Tropf S., Marner F.J., Schröder J., Schröder G. 1991. The role of cysteines in polyketide synthases. Site-directed mutagenesis of resveratrol and chalcone synthases, 2 key enzymes in different plant-specific pathways. The Journal of Biological Chemistry 266 (15): 9971–9976.

Li Y., Huang F., Lu Y., Shi Y., Zhang M., Fan J., Wang W. 2013. Mechanism of plant–microbe interaction and its utilization in disease-resistance breeding for modern agriculture. Physiological and Molecular Plant Pathology 83: 51–58.

Mikulski D., Górniak R., Molski M. 2010. A theoretical study of the structure – radical scavenging activity of trans-resveratrol analogues and cis-resveratrol in gas phase and water environment. European Journal of Medicinal Chemistry 45 (3): 1015–1027.

Morales M., Bru R., Garcia-Carmona F., Ros Barcelo A., Pedreno M.A. 1998. Effect of dimethyl-β-cyclodextrins on resveratrol metabolism in Gamay grapevine cell cultures before and after inoculation with *Xylophilus ampelinus*. Plant Cell Tissue Organ Culture 53 (3): 179–187.

Morales M., Ros Barcelo A., Pedreno M.A. 2000. Plant stilbenes: recent advances in their chemistry and biology. Advances in Plant Physiology 3: 39–70.

Ndiaye M., Philippe C., Mukhtar H., Ahmad N. 2011. The grape antioxidant resveratrol for skin disorders: promise, prospects, and challenges. Archives of Biochemistry and Biophysics 508 (2): 164–170.

Noel J.P., Dixon R.A., Pichersky E., Zubieta C., Ferrer J.L. 2003. Structural, functional, and evolutionary basis for methylation of plant small molecules. Recent Advances in Phytochemistry 37: 37–58.

Pezet R., Gindro K., Viret O., Richter H. 2004. Effect of resveratrol, viniferins and pterostilbene on *Plasmopara viticola* zoospore mobility and disease development. Vitis – Journal of Grapevine Research 43 (3): 145–148.

Pezzuto J.M. 2008. Resveratrol as an inhibitor of carcinogenesis. Pharmaceutical Biology 46 (7–8): 443–573.

Pietrowska-Borek M., Czekała Ł., Belchi-Navarro S., Pedreno M.A., Guranowski A. 2014. Diadenosine triphosphate is a novel factor which in combination with cyclodextrins synergistically enhances the biosynthesis of resveratrol in *Vitis vinifera* cv. Monastrell suspension cultured cells. Plant Physiology and Biochemistry 84: 271–276.

Privat C., Telo J.P., Bernardes-Genisson V., Vieira A., Souchard J.P., Nepveu F. 2002. Antioxidant properties of trans-epsilon-viniferin as compared to stilbene derivatives in aqueous and non-aqueous media. Journal of Agricultural Food Chemistry 50: 1213–1217.

Quincozes-Santos A., Gottfried C. 2012. Resveratrol modulates astroglial functions: neuroprotective hypothesis. Annals of the New York Academy of Science 1215: 72–78.

Riviere C., Pawlus A.D., Merillon J.M. 2012. Natural stilbenoids: distribution in the plant kingdom and chemotaxonomic interest in *Vitaceae*. Natural Product Report 29: 1317–1333.

Rook F. 2016. Metabolic engineering of chemical defense pathways in plant disease control. p. 71–90. In: "Plant Pathogen Resistance Biotechnology" (D.B. Collinge, ed.). John Wiley & Sons, Inc. Haboken, New Jersey, 405 pp.

Rosemann D., Heller W., Sandermann H. 1991. Biochemical plant responses to ozone: II induction of stilbene biosynthesis in *Scots pine* (*Pinus sylvestris* L.) seedlings. Plant Physiology 97 (4): 1280–1286.

Roupe K.A., Remsberg C.M., Yanes J.A., Davies N.M. 2006. Pharmacometrics of stilbenes: seguing towards the clinic. Current Clinical Pharmacology 1: 81–101.

Schnee S., Viret O., Gindro K. 2008. Role of stilbenes in the resistance of grapevine to powdery mildew. Physiological and Molecular Plant Pathology 72: 128–133.

Schultz T.P., Hubbard T.F., Jin L., Fisher T.H., Nicholaus D.D. 1990. Role of stilbenes in the natural durability of wood: fungicidal structure activity relationships. Phytochemistry 29 (5): 1501–1507.

Schulze K., Schreiber L., Szankowski I. 2005. Inhibiting effects of resveratrol and its glucoside piceid against *Venturia inaequalis*, the causal agent of apple scab. Journal of Agricultural Food Chemistry 53: 356–362.

Soleas G.J., Diamandis E.P., Goldberg D.M. 1997. Wine as a biological fluid: history, production, and role in disease prevention. Journal of Clinical Laboratory 11: 287–313.

Solecka D. 1997. Role of phenylpropanoid compounds in plant responses to different stress factors. Acta Physiologia Plantarum 19 (3): 257–268.

Stivala L.A., Savio M., Carafoli F., Perucca P., Bianchi L., Maga G., Forti L., Pagnoni U.M., Albini A., Prosperi E., Vannini V. 2001. Specific structural determinants are responsible for the antioxidant activity and the cell cycle effects of resveratrol. The Journal of Biological Chemistry 276: 22586–22594.

Suga T., Ohta S., Munesada K., Ide N., Kurokawa M., Shimizu M., Ohta E. 1993. Endogenous pine wood nematicidal substances in pines, *Pinus massoniana*, *P. strobus* and *P. palustris*. Phytochemistry 33 (6): 1395–1401.

Takaoka M.J. 1940. Of the phenolic substances of white hellebore (*Veratrum grandiflorum* Loes. Fil.). HUSCAP – Journal of the Faculty of Science, Hokkaido University 3: 1–16.

Torres P., Avila J.G., Romo De Vivar A., Garcia A.M., Marin J.C., Aranda E., Cespedes C.L. 2003. Antioxidant and insect growth regulatory activities of stilbenes and extracts from *Yucca periculosa*. Phytochemistry 64 (2): 463–473.

Tropf S., Lanz T., Rensing S.A., Schröder J., Schröder G. 1994. Evidence that stilbene synthases have developed from chalcone synthases several times in the course of evolution. Journal of Molecular Evolution 38 (6): 610–618.

Wang W., Tang K., Yang H.R., Wen P.F., Zhang P., Wang H.L., Huang W.D. 2010. Distribution of resveratrol and stilbene synthase in young grape plants (*Vitis vinifera* L. cv. Cabernet Sauvignon) and the effect of UV-C on its accumulation. Plant Physiology and Biochemistry 48 (2–3): 142–152.

Wu J.M., Wang Z.R., Hsieh T.C., Bruder J.L., Zou J.G., Huang Y.Z. 2001. Mechanism of cardioprotection by resveratrol, a phenolic antioxidant present in red wine. International Journal of Molecular Medicine 8 (1): 3–17.

Yamaguchi T., Kurosaki F., Suh D.Y., Sankawa U., Nishioka M., Akiyama T., Shibuya M., Ebizuka Y. 1999. Cross-reaction of chalcone synthase and stilbene synthase overexpressed in *Escherichia coli*. FEBS Letters 460 (3): 457–461.