

MARTA BAŁABUSTA, KRYSZYNA MARIA JANAS

Katedra Ekofizjologii i Rozwoju Roślin
Uniwersytet Łódzki
Banacha 12/16, 90-237 Łódź
E-mail: kjanas@biol.uni.lodz.pl

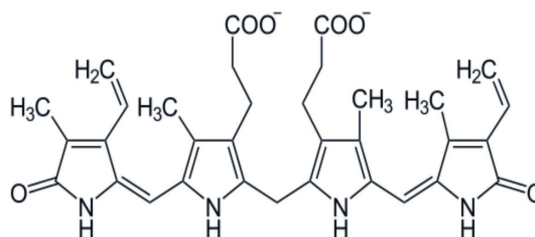
DO CZEGO ROŚLINIE POTRZEBNY JEST BARWNIK ZWIERZĘCY – BILIRUBINA?

WSTĘP

W 2009 r. Cary Pirone, z Institute of Biological Science, Florida International University, opublikował sensacyjne doniesienie, że w osnówce nasion (zgrubienie rozwijające się wokół nasienia i stanowiące jego otoczkę) strelicji (*Strelitzia nicolai* Regel & Koern.), zwanej białym rajskim ptakiem, znajduje się bilirubina (PIRONE i współaut. 2009), znana jako związek syntetyzowany tylko u zwierząt.

Bilirubina (Ryc. 1) jest produktem degradacji hemoglobiny u zwierząt. Część białka hemoglobiny ulega rozpadowi do aminokwasów, natomiast z hemu powstaje liniowy tetrapiol biliwerdyna, która następnie redukowana jest do bilirubiny (MURRAY i współaut. 1990). Atom żelaza zostaje włączony do ogólnej puli żelaza obecnej w organizmie. U człowieka przekształcenie hemu do bilirubiny przez komórki siateczkowo-śródbłonkowe można zaobserwować *in vivo* na przykładzie krwika, w którym czerwona barwa przechodzi powoli w żółte zabarwienie, spowodowane przemianą czerwonego hemu do żółtej bilirubiny.

Strelitzia nicolai jest rośliną naturalnie występującą w Południowej Afryce, szeroko



Ryc. 1. Struktura bilirubiny-IX α .

rozpowszechnioną w klimacie tropikalnym. Owoce jej są skórzaste, suche, pękające, z intensywnie pomarańczowymi wypustkami i licznymi nasionami w środku (PIERCE i WSLER 1995). Identyfikacja barwników występujących w osnówce nasion, przy wykorzystaniu wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) wykazała, że w ekstraktach pojawiał się jeden główny związek, który pochłaniał światło UV o maksimum 444 nm. Związek ten zidentyfikowano jako bilirubinę-IX α wykorzystując w tym celu metodę spektroskopii magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR) oraz sprzężenie spektrometru masowego z chromatografem cieczowym (LC-ESI) (PIRONE i współaut. 2009).

WYSTĘPOWANIE BILIRUBINY

Wykazano, że występowanie bilirubiny nie jest ograniczone tylko do *S. nicolai*. Jej obecność stwierdzono u innych gatunków należących do Strelitziaceae jak np. *Phenakospermum guyanense* Endl. i strelicji królewskiej (*Strelitzia reginae* Ait.) (PIRONE i współ-

aut. 2009). Wyniki analiz ekstraktów otrzymanych z tych roślin jednoznacznie wykazały obecność w nich barwników, których czas retencji i zakres absorpcji promieniowania UV były porównywalne z tym, które uzyskano dla bilirubiny (PIRONE i współaut. 2010a).

Analiza chromatograficzna barwnika z dziesięciu badanych gatunków roślin wykazała, że związek ten występuje w ośmiu gatunkach: *Musa balbisiana* (rodz. Musaceae; rząd Zingiberales), *Heliconia collinsiana* (rodz. Heliconiaceae; rząd Zingiberales), *Costus lucanusianus* (rodz. Costaceae; rząd Zingiberales), *Ravenala madagascariensis* (rodz. Strelitziaceae; rząd Zingiberales), *Phenakospermum guyanense* (rodz. Strelitziaceae; rząd Zingiberales), *Hedychium coronarium* (rodz. Zingiberaceae; rząd Zingiberales), *Gastrococcus crista* (rodz. Arecaceae; rząd Arecales) i *Eugenia luschnathiana* (rodz. Myrtaceae; rząd Myrtales). Stwierdzono natomiast, że nadaje on kolor tylko w gatunkach należących do rodziny strelicjowatych (Strelitziaceae).

W większości badanych roślin bilirubina występowała w owocach, łącznie ze skórką, osnówce nasion oraz w niewielkich stężeniach w działkach kielicha a także kwiatkach. W *S. reginae* stężenie tego związku w ekstraktach wahało się w granicach od $<44 \text{ ng g}^{-1}$ świeżej masy w działkach kielicha do $21,97 \text{ mg g}^{-1}$ świeżej masy w osnówce nasion (PIRONE i współaut. 2010). Zatem bilirubina wydaje się być najważniejszym pigmentem osnówki i to ona jest odpowiedzialna za jej kolor. Natomiast za żółte zabarwienie działek kielicha odpowiedzialne są głównie karotenoidy, występujące w wysokich stężeniach, maskujących bilirubinę (SIMPSON i współaut. 1975).

W dojrzałych tkankach osnówki nasion bilirubina kumuluje się w komórkach w postaci ziarnistych ciał rozmieszczonych nierównomiernie. Natomiast w preparatach mikroskopowych z dojrzałych działek kielicha obserwowano występowanie wydłużonych struktur, które, jak wcześniej wykazano, zawierają karotenoidy (SIMPSON i współaut. 1975), ale jest wysoce prawdopodobne, że również i bilirubinę, aczkolwiek żadnych, specjalnych struktur zawierających ten pigment nie znaleziono (PIRONE i współaut. 2010).

Z dotychczas przeprowadzonych badań wynika, że na rozpad bilirubiny wpływają podwyższona temperatura, światło i tlen. Jednak wstępne analizy wykazały, że związek ten jest stabilny nawet przez wiele lat w osnówce nasion i przez kilka miesięcy w działkach kielicha strelicji. Przypuszcza się, że utrzymanie zabarwienia może wynikać z wysokiej zawartości lipidów w tych organach (PIRONE i współaut. 2010).

Synteza bilirubiny w roślinach może też zależeć od innych czynników takich jak np. stadium rozwojowe rośliny. Stwierdzono najwyższą zawartość bilirubiny w osnówce dojrzałych nasion *S. nicolai* (PIRONE i współaut. 2010a). Można zatem wysunąć hipotezę, że brak bilirubiny u niektórych gatunków roślin może być wynikiem zróżnicowanej intensywności syntezy barwnika w czasie wzrostu i rozwoju (PIRONE i współaut. 2010b).

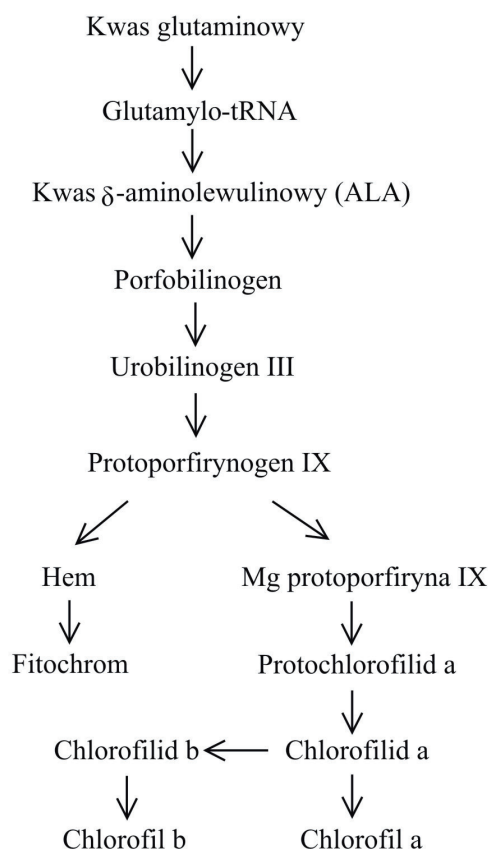
SYNTEZA BILIRUBINY W ROŚLINACH

Tetrapiole są związkami szeroko rozpowszechnionymi w świecie roślin, syntetyzowanymi wyłącznie w plastydach. Pełnią bardzo istotne funkcje, stąd niekiedy określa się je mianem barwników życia. Do najbardziej rozpowszechnionych pochodnych tetrapiolu należą chlorofil oraz hem. Barwniki pirolowe są związkami barwnymi, zawierającymi 5-członowe pierścienie pirolowe z atomem azotu (MŁODZIŃSKA 2009). Początkowe etapy syntezy chlorofilu i hemu są wspólne (Ryc. 2). Najpopularniejszym barwnikiem roślinnym jest chlorofil, wyjściowo syntetyzowany z kwasu glutaminowego. Zostaje on przekształcony do kwasu δ -aminolewulinowego (ALA), który jest prekursorem dla syntezy chlorofilu i hemu. Kolejnym etapem w biosyntezie tetrapiole jest kondensacja 2 cząsteczek ALA do 4 cząsteczek porfobilinogenu, w wyniku czego powstaje uroporfirinogen III. Na-

stępnie, po wbudowaniu atomu magnezu, powstaje protoporfiryna IX. Ten układ przekształca się w protochlorofilid, który w wyniku szeregu reakcji, katalizowanych światłem, ulega przemianom w chlorofil (Ryc. 2) (MŁODZIŃSKA 2009).

Obok chlorofilu, w komórkach roślinnych występują jeszcze dwie ważne grupy barwników, które określa się mianem barwników pomocniczych: karotenoidy i fikobiliny. Fikobiliny, występujące u niektórych glonów, są zbudowane z 4 pierścieni pirolowych połączonych liniowo, podobnie jak bilirubina. W swojej budowie nie zawierają one ani atomu magnezu ani fitolu (nienasycony alkohol diterpenowy występujący w cząsteczce chlorofilu) (DEMMEYER i FRANKENBERG-DINKEL 2008).

Karotenoidy należą do grupy terpenoidów. Dzielą się na pomarańczowe – karoteny i żółtopomarańczowe – ksantofile.



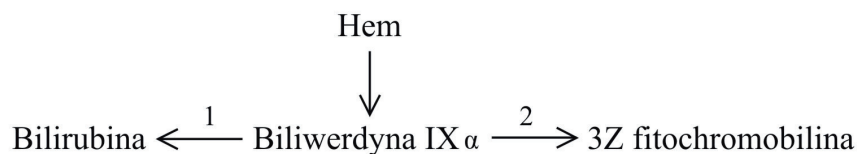
Ryc. 2. Schemat biosyntezy chlorofilu i hemu w roślinach.

Biosynteza tych barwników rozpoczyna się od połączenia dwóch cząsteczek pirofosforanu geranylogeranylu, co prowadzi do powstania fitoenu. Następnie w wyniku szeregu przemian dochodzi do wytworzenia likopenu, który stanowi substrat w reakcjach cyklizacji prowadzących do wytworzenia pierścieniowych form karotenoidów (MŁODZIŃSKA 2009).

U kręgowców, podobnie jak u roślin, biliwerdyna jest pochodną hemu, z tą różnicą, że jest przekształcana bezpośrednio do żółto-pomarańczowego barwnika – bilirubiny (TANAKA i TANAKA 2007), a nie jak ma to miejsce

u roślin – do chromobiliny. U roślin rozpad hemu prowadzi do powstania biliwerdyny, która następnie przekształcana jest do fitochromobiliny, prekursora chromoforowej części fitochromu (receptor światła czerwonego i dalekiej czerwieni u roślin) (PIRONE i współaut. 2010a).

Prowadzone w ostatnich latach badania doprowadziły do odkrycia bilirubiny u *S. nicolai* oraz *S. reginae*, co zrewolucjonizowało dotychczasowy stan wiedzy. Bilirubina została uznana za pierwszy, odpowiadający za nadanie barwy związek, syntetyzowany na drodze szlaku tetrapiroli (PIRONE i współaut. 2010a). Biochemiczny szlak syntezy bilirubiny u roślin wciąż jednak jest niepoznany. U zwierząt biliwerdyna-IX α jest redukowana do bilirubiny-IX α przez reduktazę biliwerdyny-IX α zależną od NADPH (MAINES i TRAKSHEL 1993). Odwrotnie natomiast jest u roślin. Tutaj biliwerdyna-IX α jest przekształcana do strukturalnego izomeru bilirubiny, 3Z-fitochromobiliny, prekursora chromoforowej części fitochromu (TANAKA i TANAKA 2007), przez enzym reduktazę biliny zależną od ferredoksyny (Ryc. 3) (TERRY i współaut. 1995, KOHCHI i współaut. 2001). U cyjanobakterii i glonów, biliwerdyna-IX α jest także redukowana do fikobiliny przez reduktazę biliny zależną od ferredoksyny (BEALE 1993, FRANKENBERG i współaut. 2001, DEMMEYER i FRANKENBERG-DINKEL 2008). Zwierzęcy enzym reduktaza biliwerdyny-IX α zależna od NADPH została zidentyfikowana i sklonowana u cyjanobakterii *Synechocystis* oraz u różnych gatunków bakterii (SCHLUCHTER i GLAZER 1997). Jest więc możliwe, że u roślin także bilirubina-IX α powstaje poprzez redukcję biliwerdyny-IX α , z udziałem enzymu reduktazy biliwerdyny-IX α zależnej od NADPH. Jest prawdopodobne, że jest ona syntetyzowana w zupełnie inny, dotąd jeszcze niepoznany sposób (PIRONE i współaut. 2010b).



Ryc.3. Biosynteza bilin w organizmach fotosyntetyzujących (wg DEMMEYERA i FRANKENBERG-DINKLA 2008, zmieniony).

1 – reduktaza biliwerdyny IX α zależna od NADPH, 2 – reduktaza biliny zależna od ferredoksyny

ROLA BILIRUBINY W ROŚLINACH

Wysokie stężenie bilirubiny w osnówce nasion *Phenakospermum guyanense* wskazuje na jej rolę jako barwnika (PIRONE i współaut. 2010b). Wcześniejsze badania udowodniły, że za kolor dwóch gatunków strelicji odpowiedzialny jest właśnie ten metabolit wtórny (PIRONE i współaut. 2010a). Kolorowe owoce i nasiona są doskonałym bodźcem przyciągającym zwierzęta, dlatego jest prawdopodobne, że nagromadzona bilirubina może przyczyniać się do zwabiania ptaków żywiących się nasionami, a także zwierząt przenoszących pyłek i roznoszących nasiona (VAN DER PIJL 1982, PIRONE i współaut. 2010a).

Pytanie, czy bilirubina odgrywa jeszcze jakąś inną rolę poza determinowaniem koloru

pozostaje wciąż bez odpowiedzi. Przypuszcza się, że może ona pełnić u roślin podobne funkcje fizjologiczne jak u człowieka, a także może działać jako silny antyoksydant (STOCKER i współaut. 1987). Uzyskane wyniki badań jednoznacznie wykazują, że bilirubina znacznie efektywniej przeciwdziała utlenianiu lipidów, niż uważany dotąd za silny antyoksydant – α -tokoferol (STOCKER i współaut. 1987).

W stężeniach mikromolarnych bilirubina efektywnie neutralizuje anionorodnik ponadtlenkowy. Nie jest jednak wykluczone, że bilirubina może być po prostu zbędnym produktem metabolizmu roślin (PIRONE i współaut. 2010a).

PODSUMOWANIE

Bilirubina-IX α została zidentyfikowana jako główny barwnik w pomarańczowej osnówce nasion strelicji *Strelitzia nicolai* oraz w działkach kielicha strelicji królewskiej (*Strelitzia reginae* Ait.) popularnie zwanej rajskim ptakiem. Zmieniło to dotychczasowy pogląd, że bilirubina jest związkiem występującym jedynie w królestwie zwierząt. Została

ona okrzyknięta pierwszym związkiem, syntetyzowanym na drodze szlaku tetrapiroli w roślinach wyższych, odpowiadającym za nadanie barwy organom reprodukcyjnym roślin. Pytanie, czy bilirubina oprócz nadawania koloru kwiatom pełni jeszcze jakąś inną rolę u roślin pozostaje nadal bez odpowiedzi.

DO CZEGO ROŚLINIE POTRZEBNY JEST BARWNIK ZWIERZĘCY – BILIRUBINA?

Streszczenie

Bilirubina jest związkiem występującym w królestwie zwierząt, ale niedawno został wykryty u roślin wyższych. Chociaż biochemiczny szlak jej syntezy nie został jeszcze poznany, istnieją spekulacje co do jej funkcji fizjologicznej. Ten syntetyzowany na drodze szlaku tetrapiroli związek odpowiada za nadanie barwy organom reprodukcyjnym niektórych roślin.

Przypuszcza się, że może on także działać jako antyoksydant. Chociaż nie wiele wiadomo o bilirubinie u roślin to jej odkrycie zrewolucjonizowało dotychczasowy stan wiedzy i skłania do prowadzenia dalszych badań nad innymi jeszcze funkcjami, które może pełnić w świecie roślin.

WHY BILIRUBIN, AN ANIMAL PIGMENT, IS NEEDED FOR PLANTS?

Summary

Bilirubin-IX α was found as the main pigment in orange seed arils of the bird-of paradise tree *Strelitzia nicolai* and in sepals in *Strelitzia reginae*. It changed the idea that bilirubin is the compound which is only synthesized in animals. Bilirubin is

present as the primary pigment synthesized in the tetrapyrrole pathway which functions to produce color in plants. Whether providing colour for plants is the only function of bilirubin or it may play other roles still needs elucidation.

LITERATURA

- BEALE S. I., 1993. *Biosynthesis of phycobilins*. Chem. Rev. 93, 785–802.
- DEMMEYER T., FRANKENBERG-DINKEL N., 2008. *Function and distribution of bilin biosynthesis enzymes in photosynthetic organisms*. Phytochem. Phytobiol. Sci. 7, 1121–1131.
- FRANKENBERG N., MUKOUGAWA K., KOHCHI T., LAGARIS J. C., 2001. *Functional genomic analysis of the HY2 family of ferredoxin-dependent bilin reductases from oxygenic photosynthetic organisms*. Plant Cell 13, 965–978.
- KOHCHI T., MUKOUGAWA K., FRANKENBERG N., MARUDA M., KOKOTA A., LAGARIS J. C., 2001. *The Arabidopsis HY2 gene encodes phytochromobilin synthase, a ferredoxin-dependent biliverdin reductase*. Plant Cell 13, 425–436.
- MAINES M. D., TRAKSHEL G. M., 1993. *Purification and characterization of human biliverdin reductase*. Arch. Biochem. Biophys. 300, 320–326.
- MŁODZIŃSKA E., 2009. *Survey of plant pigments: Molecular and environmental determinants of plants colors*. Acta Biol. Cracoviensia Ser. Botanica 51, 7–16.
- MURRAY R. K., GRANNER D. K., MAYES P. A., RODWELL V. W., 1990. *Harper's biochemistry*. Wyd. 22. Prentice-Hall International Inc.
- PIERCE S. M., WSLER R. M., 1995. *Smoke induced germination of succulents (Mesembryanthemaceae) from fire-prone and fire-free habitats in South Africa*. Oecologia 102, 520–522.
- PIRONE C. L., QUIRKE J. M. E., PRIESTAP H., LEE D. W., 2009. *Animal pigment bilirubin discovered in plants*. J. Am. Chem. Soc. 131, 2830.
- PIRONE C. L., QUIRKE J. M. E., PRIESTAP H., LEE D. W., 2010a. *The animal pigment bilirubin identified in Strelitzia reginae, the bird of paradise flower*. HortSci. 45, 1411–1415.
- PIRONE C., JOHNSON J. V., QUIRKE J. M. E., PRIESTAP H. A., LEE D., 2010b. *Bilirubin present in diverse angiosperms*. AoB Plants Advance Access (2010) published October 28, 2010, doi: 10.1093/aob-pla/plq020.
- SIMPSON D. J., BAQAR M.R., LEE T. H., 1975. *Ultrastructure and carotenoid composition of chromoplasts of the sepals of Strelitzia reginae Ait on during floral development*. Ann. Bot. (Lond.) 39, 175–183.
- SCHLUCHTER W. M., GLAZER A.N. 1997. *Characterization of cyanobacterial biliverdin reductase*. J. Biol. Chem. 272, 13562–13569.
- STOCKER R., YAMAMOTO Y., MCDONAGH, GLAZER A. N., AMES B. N., 1987. *Bilirubin is an antioxidant of possible physiologic importance*. Science 235, 1043–1046.
- TANAKA R., TANAKA A., 2007. *Tetrapyrrole biosynthesis in higher plants*. Ann. Rev. Plant Biol. 58, 321–346.
- TERRY M., MCDOWELL M. T., LAGARIAS C., 1995. *(3Z) and (3E) – Phytochromobilin are intermediates in the biosynthesis of the phytochrome chromophore*. J. Biol. Chem. 270, 1111–1119.
- VAN DER PIJL L., 1982. *Principles of dispersal in higher plants*. Wyd. 3. Berlin, Springer.