

STRESZCZENIE

Auksyny są fitohormonami regulującymi procesy wzrostowe i morfogenetyczne u roślin. Dlatego ich niedobór lub nadmiar skutkuje poważnymi zaburzeniami rozwojowymi. Rośliny wykształciły wiele mechanizmów, których celem jest regulacja poziomu aktywnej formy tych hormonów, w tym ich: ukierunkowany transport, lokalną biosyntezę i degradację, jak również odwracalną i nieodwracalną inaktywację poprzez wiązanie z dodatkowymi grupami chemicznymi. Pomimo upływu prawie stu lat od wykrycia auksyn, funkcjonowanie tych mechanizmów, zwłaszcza na poziomie metabolizmu, nadal pozostaje nie do końca poznane. W ostatnich latach, dzięki rozwojowi nowych metod badawczych, poczyniono znaczne postępy w tej dziedzinie. Dotyczy to zarówno identyfikacji ścieżek biosyntezy auksyn i genów biorących w nich udział, jak również wykrywania nowych metabolitów auksyn, ich wzajemnych powiązań i enzymów zaangażowanych w ich biosyntezę, przekształcanie i degradację. W niniejszej pracy skupiono się na podsumowaniu aktualnej wiedzy na ten temat, uwzględniając związek metabolizmu auksyn z procesami rozwojowymi i odpowiedzią na zmieniające się warunki środowiskowe.

WPROWADZENIE

Naturalne auksyny są kwasami organicznymi zawierającymi pierścień indolowy, jak w przypadku kwasu indolilo-3-octowego (IAA), kwasu indolilo-3-masłowego (IBA) i kwasu 4-chloro-3-indoliloctowego (4-Cl-IAA), lub pierścień fenolowy, który występuje w strukturze kwasu fenylooctowego (PAA) (Ryc. 1). Oprócz naturalnych auksyn, znane są również auksyny syntetyczne np.: kwas 2,4-dichlorofenoksyoctowy (2,4-D), kwas naftylo-1-octowy (NAA), picloram czy dicamba, które są często stosowane w rolnictwie, jako herbicydy (Ryc. 1) [1]. Auksyny naturalne, w tym najbardziej powszechna auksyna, jaką jest IAA, są hormonami roślinnymi regulującymi procesy związane ze wzrostem i rozwojem roślin, począwszy od podstawowych zjawisk morfogenetycznych takich jak: ustalanie polarności komórek, embriogeneza, organogeneza, rozwój tkanek waskularnych czy dominacja wierzchołkowa, poprzez reakcje tropiczne i dojrzewanie owoców, aż po odpowiedzi na stresi środowiskowe [2-5]. Kontrola właściwego, komórkowego i tkankowego poziomu aktywnej biologicznie auksyny jest więc kluczowa dla właściwego przebiegu tych procesów [4]. Może ona zachodzić na wielu poziomach, w tym na poziomie transportu wewnątrzkomórkowego i międzykomórkowego auksyny, jej lokalnej

mgr Aleksandra Sobiech,

dr hab. Alicja Banasiak, prof.
UWr[✉]

Zakład Biologii Rozwoju Roślin, Wydział
Nauk Biologicznych, Uniwersytet Wrocławski

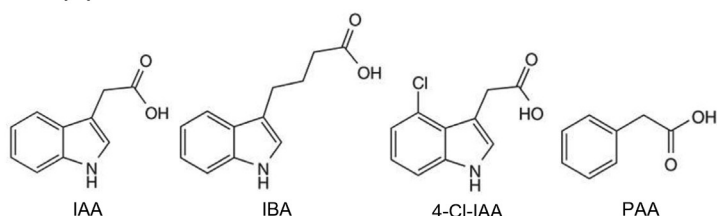
https://doi.org/10.18388/pb.2021_549

✉ autor korespondujący: alicja.banasiak@uwr.edu.pl

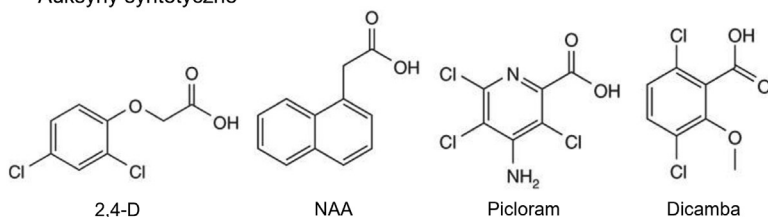
Słowa kluczowe: metabolizm auksyn, biosynteza, inaktywacja, oksydacja, koniugaty, polarny transport auksyn

Wykaz skrótów: GH3 – GRETCHEN HAGEN 3; ILR1 – IAA-LEUCINE-RESISTANT 1; ILL – ILLR1-like; IAR3 – IAA-ALANINE RESISTANT 3; UGT – UDP-glikozylotransferaza (ang. UDP-GLYCOSYLOTRANSFERASE); DAO – DIOXYGENASE FOR AUXIN OXIDATION; PAT – polarny transport auksyny (ang. *Polar Auxin Transport*)

Auksyny naturalne



Auksyny syntetyczne



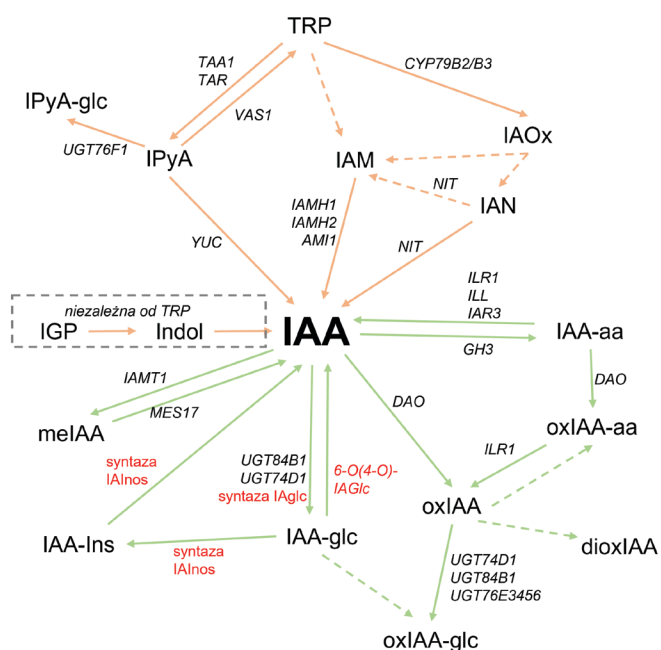
Rycina 1. Struktura chemiczna wybranych auksyn naturalnych i syntetycznych. IAA – kwas indolilo-3-octowy; IBA – kwas indolilo-3-masłowy; 4-Cl-IAA – kwas 4-chloro-3-indoliloctowy; PAA – kwas fenyloctowy; 2,4-D – kwas 2,4-dichlorofenoksyoctowy; NAA – kwas naftylo-1-octowy; picloram – kwas 4-amino-3,5,6-trichloropikolinowy; dicamba – kwas 2-metoksy-3,6-dichlorobenzoowy.

biosyntezy, ale także jej metabolicznej inaktywacji poprzez procesy oksydacji lub syntezy koniugatów, będących związkami auksyn z innymi grupami chemicznymi [6]. Uważa się, że inaktywowane pochodne auksyn nie mają aktywności biologicznej i zależnie od formy albo są elementem nieodwracalnej ścieżki katabolicznej, albo stanowią tymczasowy magazyn auksyn. W tym drugim przypadku, usunięcie podstawnika w wyniku działania enzymów hydrolitycznych, całkowicie przywraca auksynom wcześniejszą aktywność. Znaczenie metabolicznej inaktywacji auksyn w regulacji wzrostu i rozwoju roślin jest stosunkowo słabo poznane. Jednak w ostatnich latach, wraz z opracowaniem i udoskonaleniem metod detekcji metabolitów auksyn, ten kierunek badań dynamicznie się rozwija i pozwala na coraz lepsze zrozumienie złożoności tych procesów.

BIOSYNTENZA AUKSYN

Zapotrzebowanie komórek i tkanek roślinnych na auksynę zmienia się podczas rozwoju, w odpowiedzi na sygnały zewnętrzne i wewnętrzne [6]. Podstawowym źródłem auksyn są procesy jej biosyntezy *de novo*. Główna roślinna auksyna, IAA, może być syntetyzowana we wszystkich częściach rośliny, jednak głównym miejscem jej biosyntezy są rejony o wysokim indeksie mitotycznym, takie jak: merystem wierzchołkowy pędu (SAM), merystem wierzchołkowy korzenia (RAM) i młode liście [4].

W roślinach działa jednocześnie kilka szlaków biosyntezy IAA: co najmniej trzy zależne od tryptofanu (Trp) oraz co najmniej jeden niezależny od tryptofanu (Ryc. 2) [6,7]. W przypadku biosyntezy zależnej od Trp konwersja Trp do IAA zachodzi w szlakach, których nazwy pochodzą od ich produktów pośrednich: indolilo-3-pirogronianu (IPyA, ang. *indole-3-pyrrolic acid*), indolilo-3-acetaldoksymu (IAOx, ang. *indole-3-acetaloxime*) i indolilo-3-acetamidu (IAM, ang. *indole-3-acetamide*) [6,8,9], z czego szlak IPyA jest jedynym w pełni scharakteryzowanym [4,6]. W tym szlaku tryptofan jest przekształcany do IPyA przez aminotransferazy z rodziny TAA1/TAR (ang. *TRYPTOPHAN AMINOTRANSFERASE OF ARABIDOPSIS1/TRYPTOPHAN AMINOTRANSFERASE-RELATED*), a następnie monooksygenazy flawinowe z rodziny YUCCA (YUCCA) przeprowadzają dekarboksylację IPyA do auksyny (Ryc. 2) [4,10]. Pierwsza reakcja, z udziałem TAA1/TAR, jest odwracalna, IPyA może być ponownie przekształcony do Trp dzięki aminotransferazie VAS1 (REVERSAL OF SAV3 PHENOTYPE 1), co stanowi jeden z mechanizmów kontroli poziomu biosyntezy IAA na ścieżce IPyA [11]. Innym mechanizmem tej kontroli jest fosforylacja enzymu TAA1 na treoninie w pozycji 101 (T101), co obniża jego aktywność poprzez utrudnianie wiązania z kofaktorem PLP (fosforan pirydoksalu), który odpowiada za przenoszenie grupy aminowej z tryptofanu na pirogronian [9,12]. Odkryto, że tym negatywnym regulatorem, odpowiedzialnym za fosforylację T101, jest kinaza TMK4 [12]. Zidentyfikowano także inne inhibitory w szlaku IPyA. Jednym z nich jest L-kinurenina, która selektywnie wiąże się z kieszenią substratową białek TAA1/TAR, co hamuje pierwszy etap biosyntezy IAA czyli powstawanie jego prekursora – IPyA. Z kolei inny związek – jukasyna, jest silnym inhibitorem celującym w aktywność enzymów z rodziny YUC, hamując drugi etap biosyntezy auksyn w tym szla-



Rycina 2. Schemat obrazujący ścieżki metaboliczne uczestniczące w utrzymaniu homeostazy auksynowej. Strzałki pomarańczowe – szlaki biosyntezy IAA; strzałki zielone – szlaki odwracalnej i nieodwracalnej inaktywacji IAA; linie ciągłe – zidentyfikowane enzymy odpowiedzialne za reakcję; linie przerywane – brak zidentyfikowanych enzymów; obok strzałek podane nazwy enzymów *Arabidopsis thaliana* (kolor czarny) lub *Zea mays* (kolor czerwony). **Stosowane skróty:** 6-O(4-O)-IAGlc – 6-O(4-O)-indole-3-ylacetyl-beta-D-glucose, AMI1 – Amidase1, CYP79B2/B3 – monooksygenazy cytochromu P450, podrodzina B, polipeptydy 2 i 3, DAO – DIOXYGENASE FOR AUXIN OXIDATION, dioxIAA – 3-hydroksy-oxIAA, GH3 – GRETCHEN HAGEN3, IAA – kwas indolilo-3-octowy, IAA-aa – IAA-aminokwas, IAA-glc – IAA-glukoza, IAA-Ins – IAA-myoinozytol, IAM – indolo-3-acetamid, IAMH1/IAMH2 – IAM HYDROLASE 1/IAM HYDROLASE 2, IAMT1 – IAA CARBOXYL METHYLTRANSFERASE 1, IAN – indolilo-3-acetonitryl, IAOx – indolilo-3-acetaldoksym, IAR3 – IAA-ALANINE RESISTANT3, IGP – indolilo-3-glicerol, ILLs – ILR1-LIKE, ILR1 – IAA-LEUCINE-RESISTANT1, IPyA – indolilo-3-pirogronian, meIAA – kwas metylo-indolo-3-octowy, MES17 – METHYLESTERASE 17, NIT – nitrylaza, oxIAA – kwas 2-oksindolo-3-octowy, TAA1/TAR – Tryptophan Aminotransferase of Arabidopsis1/Tryptophan Aminotransferase-Related, TRP – tryptofan, UGT – glikozylotransferaza UDP, VAS1 – REVERSAL OF SAV3 PHENOTYPE1, YUC – monooksygenazy flawinowe z rodziny YUCCA.

ku, czyli przekształcenie IPyA do IAA [13]. Szlak IPyA jest najbardziej uniwersalnym i najważniejszym szlakiem biosyntezy auksyn u roślin lądowych, a ekspresja genów z nim związanych wykazuje dużą specyficzność komórkową i tkankową. Mutacje w genach kodujących enzymy tego szlaku prowadzą do znacznego obniżenia poziomu auksyny, co objawia się zaburzeniami rozwojowymi, np. zmienionym kształtem zarodków, ograniczeniem wzrostu, niewłaściwą waskularyzacją, zmienionym kształtem liści i zaburzonym rozwojem kwiatów [6].

Drugi szlak, z IAOx jako produktem pośrednim, jest ważną ścieżką metaboliczną w kontekście produkcji nie tylko IAA, ale również metabolitów wtórnych, jak np. kamaleksyny lub glukozynolany indolowe, które uczestniczą w mechanizmach obronnych roślin [14]. IAOx jest syntetyzowany z tryptofanu przy udziale dwóch izozymów z rodziny monooksygenaz cytochromu P450 (CYP): CYP79B2 i CYP79B3. Produktem pośrednim przemian IAOx może być indolilo-3-acetonitryl (IAN), który pod wpływem nitrylaz (NIT) jest przekształcany do IAA (Ryc. 2) [4]. Jednak geny

kodujące enzymy zaangażowane w biosyntezę IAOx zostały znalezione do tej pory tylko u gatunków z rodzaju *Brassica* [6], a aktywność enzymatyczną NIT wykazano tylko w roślinach z rodzin Brassicaceae, Poaceae i Musaceae [4].

W przypadku trzeciego szlaku, auksyna powstaje z IAM, który jest kolejnym produktem pośrednim w biosyntezie auksyny zależnej od Trp. IAM może powstawać z IAOx [4], ale jest obecny także u gatunków, u których IAOx nie wykryto, co sugeruje, że IAM może być produktem pośrednim również w odrębnym szlaku biosyntezy auksyny i powstawać np. bezpośrednio z tryptofanu lub poprzez przekształcenie IAN [6]. Niezależnie od tego, na jakiej ścieżce powstaje, IAM jest przekształcany do IAA dzięki działaniu hydrolaz, w tym AMI1 (AMIDASE1), IAMH1 (IAM HYDROLASE 1) i IAMH2 (IAM HYDROLASE 2) (Ryc. 2) [15,16]. Dotychczasowe badania wskazują, że szlak IAM nie odgrywa jednak istotnej roli w regulacji poziomu auksyny, ponieważ wadliwe działanie hydrolaz IAMH1 i IAMH2 nie powoduje poważnych zaburzeń w rozwoju roślin [15].

Najmniej wiadomo na temat biosyntezy auksyn w szlaku niezależnym od tryptofanu. Przede wszystkim nie zidentyfikowano komponentów molekularnych mogących uczestniczyć w syntezie auksyny bez jego udziału. Niemniej jednak u roślin z mutacją w genach kodujących enzymy odpowiedzialne za biosyntezę tryptofanu, nie zaobserwowano zmian we wzroście i rozwoju, co wskazuje, że istnieje ścieżka biosyntezy auksyn, od niego niezależna [4,6]. Dotychczasowe badania wskazują, że początkowym etapem biosyntezy IAA na tym szlaku mogłaby być bezpośrednia konwersja fosforanu indolilo-3-glicerolu (IGP) do indolu z udziałem cytozolowej syntazy indolowej (INS) [9,17,18].

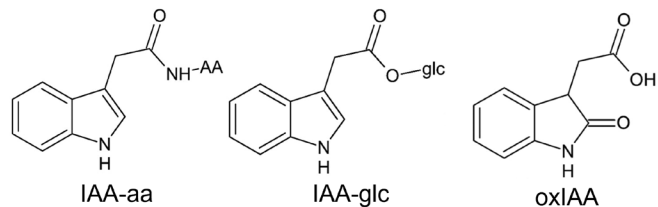
METABOLICZNA INAKTYWACJA AUKSYN

Główna naturalna auksyna – IAA, w formie niezwiązanej stanowi ok. 25% całkowitej jej ilości w roślinie, pozostała część to formy związane, niewykazujące aktywności biologicznej [9]. Główną rolą inaktywacji auksyn jest ochrona przed negatywnymi skutkami spowodowanymi jej nadmiernym gromadzeniem, a także szybka i precyzyjna regulacja stężenia aktywnego biologicznie IAA w komórkach i tkankach, poprzez magazynowanie bądź degradację tego hormonu [6,18]. Auksyny mogą być inaktywowane odwracalnie poprzez tworzenie koniugatów amidowych i estrowych [6,19] lub nieodwracalnie poprzez bezpośrednie utlenienie do kwasu 2-oksindolo-3-octowego (oxIAA), co kieruje IAA na ścieżkę nieodwracalnej degradacji (Ryc. 2) [6,9]. To, w jak precyzyjny sposób regulowany jest poziom wolnej auksyny, pokazują badania roślin z mutacjami genów wybranych szlaków inaktywacji. Zmniejszenie poziomu jednego z enzymów odpowiedzialnych za powstawanie nieaktywnych koniugatów często prowadzi do zwiększonej koniugacji auksyny w innym szlaku, podczas gdy poziom wolnego IAA tylko nieznacznie się waha [20].

ODWRACALNA INAKTYWACJA AUKSYN

Koniugaty amidowe

Koniugaty amidowe powstają przez połączenie auksyny z aminokwasami, małymi peptydami lub białkami, przy



Rycina 3. Struktury chemiczne przykładowych koniugatów kwasu-indolilo-3-octowego (IAA). IAA-aa – koniugat amidowy (połączenie z aminokwasem); IAA-glc – koniugat estrowy (połączenie z glukozą); oxIAA – oksydacja IAA (powstawanie kwasu 2-oksindolo-3-octowego).

czym koniugaty aminokwasowe są najlepiej poznanyimi w tej grupie (Ryc. 3). Najczęściej spotykanymi ich formami są połączenia IAA z kwasem glutaminowym (Glu), alaniną (Ala), leucyną (Leu), kwasem asparaginowym (Asp) czy też z tryptofanem (Trp) [18,21]. Za sprzęganie IAA z resztą amidową aminokwasów odpowiedzialne są syntetazy z rodziny GRETCHEN HAGEN3 (GH3) (Ryc. 2) [9,22]. U *Arabidopsis* występuje dziewiętnaście enzymów GH3, które sklasyfikowano w trzech grupach. W przypadku ośmiu białek GH3 należących do grupy II potwierdzono, że odpowiadają one za koniugację IAA z aminokwasami [23,9]. Proces dołączania IAA do określonych substratów aminokwasowych odbywa się w dwóch etapach. Najpierw dochodzi do adenylacji IAA w reakcji z udziałem MgATP, a następnie grupa IAA jest przenoszona na substrat aminokwasowy z uwalnianiem AMP [24]. Koniugaty aminokwasowe mogą być z powrotem hydrolizowane i przekształcane do wolnej auksyny dzięki działaniu amidohydrolaz, w tym zidentyfikowanych: ILR1 (IAA-LEUCINE-RESISTANT1), ILLs (ILR1-like) oraz IAR3 (IAA-ALANINE RESISTANT3) (Ryc. 2) [6,25]. Badania nad różnymi koniugatami aminokwasowymi pokazały, że mogą one powstawać w wyniku działania odmiennych syntetaz GH3, które przejawiają specyficzność substratową. Wykazano na przykład, że enzym GH3.17 wiąże preferencyjnie IAA do Glu, podczas gdy dwa inne enzymy: GH3.3 i GH3.4 preferują wiązanie auksyny do Asp [6,23]. Co ważne, enzymy GH3 grupy II nie są związane wyłącznie z homeostazą auksynową, ponieważ mogą reagować także z innymi substratami, takimi jak kwas salicylowy, kwas jasmonowy czy kwas benzoesowy [6]. Aktywność niektórych enzymów GH3 jest indukowana pod wpływem auksyny (GH3.1 – GH3.6), podczas gdy inne, takie jak izoenzymy GH3.17 i GH3.9, nie są wrażliwe na ten hormon. Na tej podstawie sugeruje się, że GH3.17 i GH3.9 są odpowiedzialne za zachowanie podstawowej homeostazy IAA, a enzymy, których indukcja jest zależna od auksyny, regulują zmiany w gradientach IAA zachodzące czasowo i przestrzennie [22].

Koniugaty aminokwasowe IAA-Asp i IAA-Glu przez długi czas uważano za nieodwracalną formę inaktywowanej auksyny [6]. Klasyfikowano te związki jako półprodukty uczestniczące w szlaku degradacji auksyny [18]. Nowsze badania wskazują, że zarówno IAA-Asp, jak i IAA-Glu są odwracalną formą inaktywowanej auksyny, mogą więc podobnie jak inne koniugaty amidowe pełnić rolę formy zapasowej IAA. Metabolizm tych koniugatów jest bardziej złożony niż początkowo sądzono. Mogą one być, podobnie

jak inne koniugaty aminokwasowe, bezpośrednio hydroli-
zowane do wolnej IAA, dzięki enzymom ILR1, ILL i IAR3,
znajdującym się w retikulum endoplazmatycznym [21].
Mogą także podlegać oksydacji i w tej formie wchodzić na
ścieżkę katabolizmu auksyn [6].

W ostatnim czasie opracowano inhibitor biosyntezy
koniugatów amidowych – kakeimid (KKI), który blokuje
specyficznie działanie enzymów GH3. Zastosowanie KKI
skutecznie hamuje wiązanie IAA do aminokwasów, przez
co uzyskuje się fenotypy charakterystyczne dla roślin z nad-
miarem auksyny jak i dla mutantów *gh3.1-gh3.6* z uszkodzo-
ną możliwością biosyntezy koniugatów amidowych IAA.
Znany jest również inny inhibitor związany z działaniem
enzymów GH3 – adenozylo-5'-[2-(1H-indol-3-ilo)etylo]fos-
foran (AIEP), który wiąże się z miejscem katalitycznym en-
zymów GH3.1 i GH3.6 o wiele silniej niż substraty, MgATP
i IAA. To uniemożliwia dalszy przebieg reakcji, a tym sa-
mym nie powstają koniugaty amidowe [24]. Wspomniane
inhibitory mogą być użytecznym narzędziem w dalszych
badaniach nad homeostazą auksynową u różnych gatun-
ków roślin [22].

Koniugaty estrowe

Równie powszechnie występującą grupą metabolitów
auksynowych są koniugaty estrowe. Jednym z nich, domi-
nującym u roślin, jest IAA-glc (Ryc. 2 i 3), w którym auksyna
jest sprzężona wiązaniem estrowym z glukozą [6,26]. Ko-
niugacja z resztą cukrową zapewnia auksynie wysoką sta-
bilność i rozpuszczalność w wodzie [27]. IAA-glc powstaje
w obecności enzymów z rodziny UGTs (UDP-Glycosyl-
transferases) [28]. W badaniach nad glikozylacją IAA i in-
nych auksyn u *Arabidopsis* testowano różne enzymy tej gru-
py: UGT84B1, UGT84B2, UGT75B1, UGT75B2 i UGT74D1.
Spośród nich, UGT84B1 wykazywał najsilniejsze działanie
glikozylotransferazy IAA, chociaż UGT74D1 również katali-
zował tę reakcję (Ryc. 2) [29].

Enzymy odpowiedzialne za biosyntezę IAA-glc (syntaza
IAGlc) znane są również u roślin jednoliściennych. Indolo-
3-acetylo-β-d-glukozylotransferaza (UDPG) występująca
u kukurydzy, była pierwszym odkrytym enzymem roślin-
nym, który katalizuje biosyntezę estrów IAA. Enzym ten
przekształcała IAA w 1-O-indolo-3-acetylo-β-d-glukozę
(1-O-IA-glc): UDPG + IAA ↔ 1-O-IAGlc + UDP [30]. Jest
to połączenie nietrwałe. Wykazano, że w roztworach wod-
nych, przy pH>7 ma miejsce samorzutna izomeryzacja 1-O-
-IAGlc do trwałych połączeń estrowych, w efekcie czego po-
wstają: 2-O-, 4-O- i 6-O-IAGlc. U jednoliściennych pokazano
również, że koniugaty IAA-glc mogą podlegać hydrolizie do
wolnej IAA i zidentyfikowano jeden z odpowiedzialnych za
to enzymów, hydrolazę 6-O(4-O)-IAGlc [6,31]. Hydrolazę
6-O(4-O)-IAGlc zidentyfikowano później także w bulwach
ziemniaka i nasionach fasoli (Ryc. 2) [32]. Koniugat 1-O-IA-
Glc jako nietrwały acetal alkilowo-acylowy (β-glukozyd)
może także służyć jako donator reszty indolowej do biosyn-
tezy innych estrów IAA np. IAA-myo-inozytolu (IAInos).
Reakcja taka zachodzi z udziałem enzymu syntazy IAINos.
Co istotne syntaza IAINos jest enzymem bifunkcyjnym i
może katalizować nie tylko syntezę IAINos, ale także prze-
kształcanie tego koniugatu z powrotem do aktywnej IAA

[9,30,31]. Dzięki temu, że glikozylacja IAA jest reakcją od-
wracalną, koniugaty estrowe uczestniczą nie tylko w samej
inaktywacji auksyn, ale również są łatwo dostępnym maga-
zynem energii oraz IAA, bez potrzeby włączania szlaku jej
biosyntezy [27].

Wśród odwracalnie inaktywowanych form auksyny
znajdują się również metabolity, które powstają przez me-
tylację auksyny i są to estry kwasu metylo-indolo-3-octowe-
go (meIAA). Za przekształcenie auksyny w meIAA odpow-
iedzialny jest enzym, który katalizuje przeniesienie grupy
metylowej z S-adenozylu-L-metioniny na substraty, które
zawierają kwas karboksylowy, tworząc estry metylowe [9].
U *Arabidopsis* tym enzymem jest metylotransferaza karbok-
sylowa IAA IAMT1 (IAA CARBOXYL METHYLTRANSFER-
ASE1) (Ryc. 2) [22,33]. Jednak mutacja genu kodującego ten
enzym nie wywołuje zmian w poziomie auksyny, a rośliny
nie wykazują zaburzonego fenotypu. Sugeruje się więc, że
w tę ścieżkę inaktywacji auksyny mogą być zaangażowa-
ne także inne homologu IAMT1 z rodziny metylotransferaz
karboksylowych SABATH [33]. Z kolei hydroliza meIAA
jest możliwa dzięki esterazom z rodziny AtMES (*Arabidopsis
thaliana* METHYLESTERASE), głównie MES17 (Ryc. 2) [6],
choć działanie hydrolizujące meIAA wykazano również
u innych enzymów z tej rodziny [3]. MeIAA uznano za nie-
aktywną formę IAA ze względu na fenotyp roślin z nadek-
spresją IAMT1, który przypomina mutanty z niedoborem
auksyny lub odpornych na auksynę [33]. Jednak egzogen-
na aplikacja meIAA daje takie same oznaki fenotypowe u
roślin, jak traktowanie egzogenną auksyną, co jest uzasad-
niane działaniem metyloesteraz, które hydrolizują meIAA
do aktywnej biologicznie auksyny [6]. Co ciekawe, meIAA
może pełnić rolę magazynu auksyny, jednak jego hydroliza
nie wpływa znacząco na zmianę poziomu IAA ani lokalnie,
ani w całych siewkach, przypuszcza się więc, że koniugat
ten może mieć jeszcze jakąś inną, odrębną, nie zidentyfiko-
waną funkcję [33].

NIEODWRACALNA INAKTYWACJA AUKSYN

Oprócz odwracalnej inaktywacji IAA, hormon ten może
być nieodwracalnie inaktywowany poprzez reakcję bez-
pośredniego utlenienia do kwasu 2-oksindolo-3-octowego
(oxIAA) (Ryc. 2 i 3). Za reakcję utlenienia IAA odpowiadają
enzymy z grupy oksygenaz, katalizujące proces wbudowy-
wania tlenu do substratu - DAO1 i DAO2 (DIOXYGENA-
SE FOR AUXIN OXIDATION 1/2) [9,27]. Utleniona forma
auksyny jest głównym katabolitem IAA, który może być
następnie substratem w reakcji katalizowanej przez gliko-
zylotransferazy UDP: UGT74D1, UGT84B1 i UGT76E3456,
które katalizują glikozylację oxIAA do oxIAA-glc [6,26,27].
Co istotne, reakcje oksydacji i glikozylacji mogą przebiegać
także w odwrotnej kolejności, wtedy najpierw powstają ko-
niugaty estrowe np. IAA-glc, a następnie mogą one ulegać
nieodwracalnemu utlenieniu do oxIAA-glc (Ryc. 2). To wła-
śnie ta, utleniona forma koniugatu IAA, jest dominująca u
Arabidopsis i to zarówno w tkankach pędowych, jak i w ko-
rzeniach [34].

Nieodwracalnemu procesowi utlenienia mogą podle-
gać również koniugaty aminokwasowe, takie jak IAA-
Asp i IAA-Glu. Reakcja ta jest katalizowana przez enzymy

DAO1 i DAO2, a w efekcie powstają oxIAA-Asp i oxIAA-Glu [9,35]. W ostatnim czasie w ryżu i kukurydzy odkryto dwa nowe metabolity auksynowe, które również powstają w wyniku utleniania koniugatów amidowych: oxIAA-Leu (z leucyną) i oxIAA-Phe (z fenyloalaniną). Co istotne, udało się także opracować generalną, efektywną metodę wykrywania utlenionych form metabolitów IAA, u różnych gatunków roślin, poprzez zastosowanie multi-ekstrakcji μ SPE połączonej z HPLC-MS/MS [34]. Utlenione koniugaty nie mogą ponownie przejść w stan wolnej auksyny, ale mogą być hydrolizowane do oxIAA przez hydrolazę ILR1 [22,25]. Z kolei oxIAA może być dalej utleniany do dioxIAA (3-hydroksy-oxIAA). U roślin jednoliściennych, takich jak ryż czy *Brachypodium distachyon*, gromadzi się 50–200 razy więcej dioxIAA niż oxIAA [25].

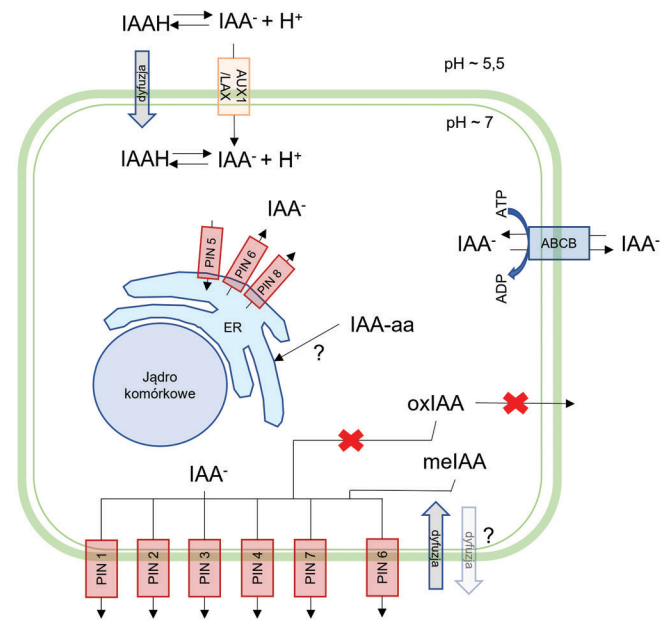
Wśród metabolitów auksyny występują również *N*-glukozydy IAA (*N*-IAGlc), które w przeciwieństwie do *O*-glukozydów IAA (*O*-IAGlc) uważane są za formę nieodwracalną auksyny, ponieważ nie zidentyfikowano dotąd enzymów odpowiedzialnych za ich hydrolizę. W ostatnim czasie zidentyfikowano natomiast pierwszą *N*-glukozylotransferazę (GbNGT), która jest odpowiedzialna za biosyntezę *N*-IAGlc u miłorzębu. Enzym ten wykazuje zdolności katalityczne również względem IAA-Ala i jest odpowiedzialny za występowanie w nasionach miłorzębu wyjątkowo wysokiego poziomu *N*-glukozydu IAA-Ala (IAA-Asp-*N*-glucoside). Biosynteza tego metabolitu integruje ze sobą dwa szlaki koniugacji, przy czym dotychczasowe badania wskazują, że najpierw dochodzi do sprzężenia IAA z resztą amidową aminokwasu z udziałem enzymów GH3, a następnie *N*-glukozylacja IAA-Ala z udziałem enzymów z rodziny UGTs [36]. Obecnie nie można jednak wykluczyć odwrotnej kolejności przebiegu obu reakcji.

TRANSPORT AUKSYN I ICH FORM INAKTYWOWANYCH

Utrzymanie homeostazy auksynowej w komórkach i tkankach roślinnych zależy również w dużym stopniu od ukierunkowanego transportu IAA. Powstawanie gradientów stężenia auksyny opiera się na pierwotnej syntezie IAA w młodych częściach roślin, a następnie jej transporcie do pozostałych tkanek [6]. O kierunku transportu auksyny decyduje zarówno miejsce jej biosyntezy, jak również położenie i właściwości komórek docelowych. Auksyna może być transportowana długodystansowo w roślinie w sposób bierny, wraz z przepływem soku floemowego lub aktywnie dzięki polarnemu transportowi auksyny (PAT, ang. *polar auxin transport*) [9,15]. PAT umożliwia ustalanie asymetrycznego rozkładu auksyny, co indukuje zróżnicowaną odpowiedź na auksynę w różnych częściach rośliny [37].

POLARNY TRANSPORT AUKSYNY

Auksyny mogą być przenoszone przez błony komórkowe przy pomocy białek błonowych należących do 3 rodzin: przenośników AUX1/LAX (AUX1/LIKE-AUX1), transporterów ABCB (ATP-BINDING CASSETTE SUBFAMILY B) i białek z rodziny PIN (PINFORMED) (Ryc. 4) [38]. Auksyna jest słabym kwasem o pKa wynoszącym 4,75, co pozwala jej występować w komórce w dwóch różnych postaciach:



Rycina 4. Transport auksyny i jej form inaktywowanych w komórce roślinnej. Strzałki – kierunki transportu auksyny i jej metabolitów; znaki zapytania – brak potwierdzenia transportu; przekreślone strzałki – wykazany brak transportu. **Stosowane skróty:** IAAH – auksyna w postaci niezdysojowanej, IAA⁻ – auksyna w formie zdysocjowanej IAA, ABCB – transportery ATP-BINDING CASSETTE SUBFAMILY B, PIN1-8 – transportery PINFORMED, AUX1/LAX – transportery AUX1/LIKE-AUX1, IAA-aa – koniugat amidowy, oxIAA – kwas 2-oksindolo-3-octowy, melIAA – kwas metylo-indolo-3-octowy, ER – retikulum endoplazmatyczne.

w postaci niezdysojowanej (IAAH) w środowisku o pH kwaśnym oraz w postaci jonowej (IAA⁻) w środowisku o pH neutralnym [4]. Auksyna w formie IAAH jest elektrycznie obojętną cząsteczką, która może w sposób bierny dyfundować z lekko kwaśnego środowiska zewnątrzkomórkowego (pH 5,5) do wnętrza komórki przez błonę [39]. Jednak tylko niewielka część auksyny ulega biernej dyfuzji, gdyż jej większość występuje w formie zdysocjowanej IAA⁻. W tej formie transport auksyny do komórki jest zależny od polarnie zlokalizowanych symporterów z rodziny AUX1/LAX [9,39]. W cytoplazmie, gdzie pH jest bardziej zasadowe i wynosi około 7, IAAH dyfundująca ze ściany komórkowej, ulega dysocjacji do IAA⁻ i jonu wodoru (H⁺). Przepuszczalność błony plazmatycznej dla anionów IAA jest od 100 do 1000 razy niższa niż dla IAAH, więc auksyna w formie jonowej nie może swobodnie przechodzić przez błonę komórkową i potrzebuje aktywnych transporterów, żeby ponownie wydostać się z komórki [39]. Białka ABCB są pierwotnymi, aktywnymi transporterami auksyny, wykazującymi aktywność hydrolazy ATP, zlokalizowanymi w błonie komórkowej w sposób niepolarny [40]. Transport z udziałem tych białek zachodzi tylko wtedy, kiedy auksyna ma postać zdysocjowaną i może zachodzić dwukierunkowo, na zewnątrz i do wnętrza komórki [9]. Gdy wewnątrzkomórkowe stężenie auksyny jest niskie, białka ABCB odpowiadają za napływ auksyny, a gdy stężenie jest wysokie, prowadzą do wypływu hormonu z komórki [41]. W procesie wpływu auksyny z komórki główną rolę odgrywają przenośniki z rodziny PIN. Posiadają one centralną pętlę hydrofilową pomiędzy końcem aminowym i karboksylowym, z pięcioma domenami transmembranowymi, rozciągającymi się w

blonie plazmatycznej [42]. U *Arabidopsis* rodzina PIN składa się z ośmiu różnych białek (PIN 1-8), które ze względu na różnice w budowie można podzielić na: „długie” (PIN 1-4, 7) i „krótkie” (PIN 5, 6, 8) [43]. Długie białka PIN charakteryzuje wyraźna długa centralna pętla hydrofilowa oddzielająca hydrofobowe domeny. Białka te są zlokalizowane w błonie komórkowej i odpowiadają za kierunkowy transport auksyny z komórki do ściany komórkowej, natomiast „krótkie” białka PIN, posiadające krótką, centralną pętlę hydrofilową, występują w błonie retikulum endoplazmatycznego i odpowiadają za wewnątrzkomórkowy transport auksyny [9,18,38,42]. Do grupy długich transporterów PIN zalicza się czasami również białka PIN6, ze względu na tylko częściową redukcję pętli hydrofilowej [44]. W niektórych źródłach podaje się jednak, że PIN6 może należeć do grupy białek krótkich lub że jest ono białkiem pośrednim [45,46].

TRANSPORT NIEAKTYWNYCH METABOLITÓW IAA

Obecna wiedza dotycząca mechanizmów transportu koniugatów oraz białek w zaangażowanych w ten proces jest ograniczona i jedynie przypuszcza się, że transport ten może odbywać się w podobny sposób jak w przypadku wolnej auksyny [6]. Badania nad koniugatem estrowym meIAA wskazują, że jego transport w roślinie może zachodzić właśnie na podobnej zasadzie jak IAA, drogą polarnego transportu z udziałem białek PIN, ale dzięki temu, że cząsteczka meIAA jako jedyny znany metabolit auksyny ma charakter niepolarny, może być również efektywnie transportowana na drodze biernej dyfuzji (Ryc. 4) [6,18]. Przypuszcza się także, że w przypadku innych, polarnych metabolitów IAA, to PAT jest sposobem ich transportu. Prawdopodobnie nie jest to jednak regułą, ponieważ wykazano, że utleniona forma auksyny oxIAA nie tylko nie wykazuje aktywności biologicznej, ale również nie jest transportowana przez system polarnego transportu auksyny (Ryc. 4) [26]. Koniugaty są prawdopodobnie transportowane również wewnątrzkomórkowo między kompartmentami. Hydrolazy z rodziny ILL, odpowiedzialne za hydrolizę koniugatów amidowych auksyny są zlokalizowane w ER [21], a to sugeruje, że koniugaty w celu ich hydrolizy do formy aktywnej IAA są transportowane do tego właśnie kompartmentu komórkowego [42].

ROLA METABOLIZMU IAA WE WZROŚCIE I ROZWOJU ROŚLIN

Zróznicowany metabolizm auksyn ma na celu precyzyjną, czasowo-przestrzenną kontrolę poziomu auksyny, co jest niezbędne zarówno dla rozwoju ontogenetycznego roślin jak i dla ich plastyczności fenotypowej, interakcji z innymi organizmami a także, co pokazują ostatnie badania, dla odpowiedzi roślin na warunki stresowe i indukcji ich odporności. Dostępne dane dotyczące tych aspektów są jednak na razie bardzo ograniczone [6]. Jak wspomniano wcześniej, jednym z kluczowych procesów w regulacji poziomu IAA jest jej biosynteza. Zaburzenia w działaniu enzymów zaangażowanych w ścieżki biosyntezy auksyny mogą prowadzić do poważnych defektów rozwojowych. Mutanty *taa1/tar* z brakiem funkcjonalnych enzymów, należących do ścieżki biosyntezy IPyA, mają ograniczony wzrost, nieprawidłowy rozwój zarodkowy, zmienioną waskularyzację

i dramatycznie zaburzony rozwój kwiatostanów i kwiatów, przez co rośliny stają się bezpłodne [6,47]. O pozostałych szlakach biosyntezy auksyny wiadomo znacznie mniej, ale przypuszcza się, że mogą mieć one znaczenie w regulacji biosyntezy auksyn zależnej od zmieniających się warunków środowiskowych. Wykazano na przykład, że ścieżka IAox może być zaangażowana w biosyntezę auksyny w warunkach stresu zwiększonej temperatury, ponieważ poza prekursorami auksyny (IAN, IAM) powstają wtedy również glukozynolany, które służą jako związki obronne [6]. Nie zostało do końca wyjaśnione w jaki sposób IAN jest przekształcany do IAA, ale przypuszcza się, że w proces ten mogą być zaangażowane nitylazy (NIT). Badania mutacji *nit1* u *Arabidopsis* pokazały, że wpływa ona negatywnie na konwersję IAN do IAA, a mutanty z nadekspresją *NIT1ox* wykazują zmiany fenotypowe, które objawiają się krótszymi korzeniami pierwotnymi i zwiększoną liczbą korzeni bocznych, cechami typowymi dla wysokiego poziomu auksyny [6,9]. Nie wyklucza się, że pozostałe szlaki biosyntezy auksyn mogą być również istotne w utrzymaniu prawidłowego rozwoju roślin, a każdy z nich być może aktywowany zależnie od panujących warunków środowiskowych.

Nadmiar gromadzonej auksyny jest przechowywany w formach inaktywowanych [6]. To, jak bardzo istotna jest inaktywacja IAA obrazują mutanty, u których procesy z tym związane są zaburzone. Wykazano, że mutacje w genach kodujących enzymy odpowiedzialne za koniugację IAA prowadzące do nadekspresji lub utraty funkcji zmieniają wiele procesów biologicznych zależnych od IAA, takich jak rozwój korzeni bocznych czy reakcje na stres [48]. U *Arabidopsis* co najmniej trzy glikozylotransferazy IAA (UGT75D1, UGT84B1, UGT84B2) oraz osiem amidosyntetaz GH3 (GH3.1-GH3.6, GH3.9, GH3.17) katalizuje koniugację IAA z cukrami lub aminokwasami. Przeanalizowano transkrypcję tych enzymów w warunkach stresu indukowanego wysokim poziomem NH_4^+ . Wykazano, że w obecności jonów amonowych zwiększa się indukcja wszystkich tych genów, zwłaszcza w korzeniach. Jednak nie jest do końca wyjaśnione dlaczego w warunkach stresu amonowego zwiększa się zapotrzebowanie roślin na enzymy koniugujące auksynę, być może przyczynia się to w jakimś stopniu do generalnej poprawy tolerancji na stesy [48]. Wskazuje na to fakt, że jeden z tych genów – *GH3.5*, jest szybko indukowany także w odpowiedzi na inne warunki stresowe, a jego wzmożona ekspresja przyczynia się do zyskania przez rośliny większej odporności na stesy biotyczne (infekcje *Pseudomonas syringae*) i abiotyczne (zasolenie) [49]. Rośliny z nadekspresją tego genu wykazywały znacznie zmniejszone wędnięcie i nekrozę w porównaniu do roślin typu dzikiego, kiedy zostały zainfekowane przez *P. syringae* [50]. Z kolei w pędach ryżu inna amidosyntetaza – *GH3.13*, jest indukowana przez stres deficytu wody [22,51]. Wyniki te wskazują na ważną rolę regulacji metabolizmu auksyny w odpowiedzi na stres, chociaż dokładne mechanizmy nie są jeszcze znane [49].

Zróznicowany metabolizm auksyny jest istotny również dla utrzymania homeostazy auksynowej podczas rozwoju. Zbyt wysoki poziom nieaktywnych form auksyny, np. akumulacja IAA-Ala i IAA-Leu, skutkuje zaburzeniami w rozwoju roślin. Wskazuje na to także fakt, że mutacje w genach kodujących enzymy odpowiedzialne za ich hydrolizę,

wywołują poważne zmiany fenotypowe. Potrójny mutant *ilr1iar3ill2* wykazuje na przykład cechy charakterystyczne dla obniżonego poziomu auksyn: zmniejszone wydłużenie hypocotyli, zmniejszoną produkcję korzeni bocznych i zmniejszone wydłużenie włośników [8]. Nadekspresja enzymu GH3.6, odpowiedzialnego za biosyntezę koniugatów amidowych u *Arabidopsis* także powoduje zmiany fenotypowe charakterystyczne dla roślin o obniżonym poziomie auksyn, w tym agrawitropizm. Przeciwnie działanie, czyli inaktywacja enzymów GH3 w wyniku mutacji wywołuje z kolei fenotypy charakterystyczne dla nadmiernej akumulacji auksyn: krótkie korzenie główne i zwiększoną liczbę korzeni bocznych i przybyszowych. Jest to szczególnie dobrze widoczne u siedmiokrotnego mutantu *gh3.1 2 3 4 5 6 17 (gh3-sept)*, u którego wyłączono są prawie wszystkie geny kodujące enzymy GH3, koniugujące auksynę z aminokwasami [25]. Wyniki tego typu badań pokazują, jak ważna dla prawidłowego rozwoju roślin jest równowaga między syntezą a hydrolizą koniugatów auksynowych.

Koniugaty estrowe, zarówno IAA-glc, jak i IAAIns, występują w dużych ilościach w nasionach roślin m.in. sosny zwyczajnej i kukurydzy [19], dlatego uważa się, że są głównym źródłem auksyn na wczesnych etapach rozwoju [6]. Po wykiełkowaniu korzenie gromadzą IAA-glc na poziomie ponad trzykrotnie wyższym w porównaniu z innymi rejonami siewek, takimi jak hypocotyle, liścienie, pierwsze liście czy też merystemy wierzchołkowe pędów [27,30]. To sugeruje, że korzenie mogą syntetyzować IAA-glc, w celu zapewnienia rezerwy IAA, w razie braku jej formy aktywnej. Szczegółowe znaczenie formowania IAA-glc dla wzrostu i funkcjonowania roślin nie zostało jednak dotąd wyjaśnione, ponieważ, co ciekawe, mutanty *Arabidopsis* z defektami formowania koniugatów estrowych *ugt74d1* i *ugt84b1* nie wykazują żadnych zmian morfologicznych [27]. Przypuszcza się jednak, że brak funkcji jednej z glikozylotransferaz IAA może być kompensowany przez inne enzymy tej grupy [29]. Najnowsze badania na siewkach kukurydzy wykazały, że metabolizm związany z biosyntezą i hydrolizą IAA-glc i IAA-Ins może pełnić funkcję w odpowiedzi roślin na stresy środowiskowe. Pokazały one, że w warunkach stresu suszy lub zimna dochodzi do zmian w ekspresji genów i aktywności enzymów związanych z syntezą tych koniugatów, w sposób zależny od organu. Podczas eksponowania kiełkujących nasion kukurydzy na 24 godzinny stres suszy lub zimna, znacznie spada w nich poziom transkryptyu *ZmlAGlc* (genu kodującego syntazę IAGlc), czemu towarzyszy utrata aktywności katalitycznej syntazy IAGlc. Podobna utrata aktywności enzymatycznej następuje w przypadku syntazy IAAIns, chociaż poziom transkryptyu *ZmlAAIn* (genu kodującego syntazę IAAIns) wzrasta, zwłaszcza w stresie zimna. To może świadczyć o aktywacji ekspresji genu *ZmlAAIns*, aby zrekompensować brak aktywnego enzymu [30]. Co ciekawe, w stresie suszy, kiedy obie syntazy są nieaktywne, poziom wolnej auksyny wzrasta prawie dwukrotnie we wszystkich częściach siewek, co wskazuje, że szlak biosyntezy IAAIns jest zaangażowany w regulację poziomu IAA w odpowiedzi na ten rodzaj stresu. W przypadku stresu zimna ta ścieżka wydaje się mniej istotna, ponieważ zarówno w nasionach, w których aktywność IAGlc i IAAIns jest obniżona lub zniesiona, jak i w koleoptylach, gdzie ich aktywność pod wpływem stresu zimna wzrasta, stężenie IAA pozostaje

niezmienione. Stres zimna nie zmienia więc poziomu IAA, ale zmienia aktywność obu enzymów. Te wyniki wskazują, że szlaki biosyntezy IAAIns i IAGlc odgrywają rolę w regulacji stężenia wolnego IAA podczas reakcji kukurydzy na stres środowiskowy. Poziomy wolnej auksyny nie zawsze korelują jednak z aktywnością IAAIns i IAGlc, dlatego też nie wyklucza się współdziałania w tych reakcjach także innych szlaków inaktywacji auksyny [30]. Co ciekawe, ostatnio pokazano, że glikozylacji może ulegać nie tylko IAA, ale również jego bezpośredni prekursor IPyA i że jest to proces zaangażowany w regulację poziomu auksyny, związaną z adaptacją do zmieniających się warunków środowiskowych. Za formowanie koniugatu IPyA-Glc odpowiada jedna z UDP-glikozylotransferaz – UGT76F1, a jej aktywność jest negatywnie regulowana przez PIF4, integrujący ścieżki sygnalizacyjne światła i temperatury. PIF4 był wcześniej zidentyfikowany jako pozytywny regulator ekspresji genów YUC, odpowiedzialnych za biosyntezę auksyn. Tak więc PIF4 może kontrolować na poziomie transkrypcyjnym zarówno ekspresję UGT76F1 jak i genów YUC, utrzymując w ten sposób odpowiednią równowagę pomiędzy formowaniem koniugatów IPyA-Glc, a biosyntezą auksyn, zależnie od panujących warunków środowiskowych [52]

Metylowana forma auksyny (meIAA) występuje w tkankach roślinnych na stosunkowo niskim poziomie, a jej rola w regulacji rozwoju roślin, mimo że wydaje się bardzo istotna, pozostaje niezrozumiała. Pojawiają się sugestie, że dzięki ułatwionemu transportowi przez bierną dyfuzję w poprzek błony może ona działać jako forma transportowa auksyny, dzięki czemu IAA może znacznie szybciej docierać do miejsca docelowego niż podczas transportu na drodze PAT [6]. W ostatnich latach pojawiły się badania, w których stwierdzono wzrost ekspresji IAAIns skorelowany ze wzrostem poziomu meIAA w korzeniach *Lotus japonicus* po zakażeniu *Rhizobium*, co sprzyja rozwojowi brodawek korzeniowych. Z kolei konstytutywna ekspresja hydrolazy MES17 u *L. japonicus* powoduje spadek poziomu meIAA i zmniejsza liczbę brodawek. Dokładny mechanizm działania nie został jeszcze wyjaśniony, ale wyniki sugerują, że metylacja auksyny jest ważnym procesem wspomagającym powstawanie tego typu układów symbiotycznych [53]. Przy obecnym stanie wiedzy rola meIAA w rozwoju i funkcjonowaniu roślin pozostaje ciągle dyskusyjna [6,54].

PODSUMOWANIE

Metabolizm auksyny jest bardzo złożoną siecią różnych reakcji biochemicznych począwszy od biosyntezy, przez odwracalną i nieodwracalną koniugację do form nieaktywnych, aż po katabolizm. W każdym z tych procesów istnieje wiele ścieżek metabolicznych, które dodatkowo mogą wykazywać specyficzność dla określonych grup roślin. Nie wszystkie one zostały dotąd w pełni wyjaśnione, a w wielu z nich nie zidentyfikowano enzymów, które mogłyby katalizować poszczególne reakcje. Z kolei odkrywanie nowych metabolitów auksyny wraz z rozwojem nowych metod detekcji wskazuje, że wiele możliwych przekształceń tego hormonu może być dotąd nieznanych. Wszystko jednak dowodzi, że biorą one udział w ścisłej czasowo-przestrzennej regulacji komórkowego i tkankowego poziomu auksyny w roślinie i jego bieżącym dostosowywaniu do zmieniających

się warunków wewnętrznych i zewnętrznych. Dokładne mechanizmy tej regulacji nie są jednak jeszcze dobrze poznane.

Równie ważny dla regulacji poziomu aktywnej auxyny jest jej transport. Współpraca między lokalną biosyntezą IAA a transportem generuje gradienty stężeń auxyny, które wpływają na procesy na poziomie komórkowym, a te powodują zmiany we wzroście i rozwoju roślin. Transport aktywnej auxyny może być ograniczony do określonych szlaków, ze względu na konieczność występowania odpowiednich transporterów błonowych. Pod tym względem bardzo interesujące są badania, które wykazują, że niektóre koniugaty auksynowe mogą być transportowane w sposób ułatwiony, a tym samym mogą dostarczać auksynę szybciej i być może do innych rejonów, niż jest transportowana wolna auksyna. Badania nad koniugatami ciągle się rozwijają, a wiedza o nich jest aktualizowana. I tak np. niektóre koniugaty amidowe, które były wcześniej uznawane za formę nieodwracalną okazały się być substratem dla enzymów hydrolitycznych, podczas gdy inne wykazały ścisły związek z odpowiedzią na stres i indukcją tolerancji u roślin. Te wszystkie odkrycia choć stanowią dopiero początek poznawania roli metabolitów auxyny, już teraz są bardzo obiecujące i oferują nowe spojrzenie na skomplikowaną sieć kontrolującą lokalne poziomy auxyny, kluczowe dla wzrostu i funkcjonowania roślin. Rozwój badań nad metabolizmem IAA, jak również innych hormonów, ma ogromne znaczenie dla zrozumienia, w jaki sposób rośliny regulują ich poziomy i lokalizację, a co się z tym wiąże, jak radzą sobie z różnorodnymi czynnikami wewnętrznymi i zewnętrznymi, jak również warunkami stresowymi.

PIŚMIENNICTWO

1. Raggi S, Doyle SM, Robert S (2020) Auxin: At the crossroads between chemistry and biology. *The Chemical Biology of Plant Biostimulants*, John Wiley & Sons, Ltd, str. 123-153
2. Rahman A (2012) Auxin: a regulator of cold stress response. *Physiol Plantarum* 147(1): 28-35
3. Zhang Q, Gong M, Xu X, Li H, Deng W (2022) Roles of auxin in the growth, development, and stress tolerance of horticultural plants. *Cells* 11(17): 2761
4. Gomes GLB, Scortecci KC (2021) Auxin and its role in plant development: structure, signalling, regulation, and response mechanisms. *Plant Biol* 23(6): 894-904
5. Sosnowski J, Truba M, Vasileva V (2023) The impact of auxin and cytokinin on the growth and development of selected crops. *Agriculture* 13(3): 724
6. Casanova-Sáez R, Mateo-Bonmatí E, Ljung K (2021) Auxin Metabolism in Plants. *CSH Perspect Biol* 13(3): a039867
7. Kucko A, Wilmowicz E, Frankowski K, Piotrowski K, Keszy J, Marciniak K, Kopcewicz J (2014) Szlaki biosyntezy auksyn. *Postępy Biologii Komórki* 41(1): 121-128
8. Korasick DA, Enders TA, Strader LC (2013) Auxin biosynthesis and storage forms. *J Exp Bot* 64(9): 2541-2555
9. Solanki M, Shukla LI (2023) Recent advances in auxin biosynthesis and homeostasis. *3 Biotech* 13(9): 290
10. Luo P, Di DW (2023) Precise regulation of the TAA1/TAR-YUCCA auxin biosynthesis pathway in plants. *Int J Mol Sci* 24(10): 8514
11. Zheng Z, Guo Y, Novák O, Dai X, Zhao Y, Ljung K, Noel JP, Chory J (2013) Coordination of auxin and ethylene biosynthesis by the aminotransferase VAS1. *Nat Chem Biol* 9(4): 244-246
12. Wang Q, Qin G, Cao M, Chen R, He Y, Yang L, Zeng Z, Yu Y, Gu Y, Xing W, Tao AW, Xu T (2020) A phosphorylation-based switch

- controls TAA1-mediated auxin biosynthesis in plants. *Nat Commun* 11(1): 679
13. Kakei Y, Yamazaki C, Suzuki M, Nakamura A, Sato A, Ishida Y, Kikuchi R, Higashi S, Kokudo Y, Ishii T, Soeno K, Shimada Y (2015) Small-molecule auxin inhibitors that target YUCCA are powerful tools for studying auxin function. *Plant J* 84(4): 827-837
14. Naik J, Tyagi S, Rajput R, Kumar P, Pucker B, Bisht NC, Misra P, Stracke R, Pandey A (2024) Flavonols contrary affect the interconnected glucosinolate and camalexin biosynthesis pathway in *Arabidopsis thaliana*. *J Exp Bot* 75(1): 219-240
15. Gao Y, Dai X, Aoi Y, Takebayashi Y, Yang L, Guo X, Zeng Q, Yu H, Kasahara H, Zhao Y (2020) Two homologous INDOLE-3-ACETAMIDE (IAM) HYDROLASE genes are required for the auxin effects of IAM in *Arabidopsis*. *J Genet Genomics* 47(3): 157-165
16. Ortiz-García P, González Ortega-Villaizán A, Ludwig-Müller J, Wilkinson MD, Pérez-Alonso MM, Sánchez-Parra B, Pollmann S (2022) The indole-3-acetamide-induced *Arabidopsis* transcription factor MYB74 decreases plant growth and contributes to the control of osmotic stress responses. *Front Plant Sci* 13: 928386
17. Wang B, Chu J, Yu T, Xu Q, Sun X, Yuan J, Xiong G, Wang G, Wang Y, Li J (2015) Tryptophan-independent auxin biosynthesis contributes to early embryogenesis in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112(15): 4821-4826
18. Eckstein A (2017) Auksyny: wszechstronne cząsteczki sygnałowe. *Postępy Biologii Komórki* 44(3): 231-250
19. Ludwig-Müller J (2011) Auxin conjugates: their role for plant development and in the evolution of land plants. *J Exp Bot* 62(6): 1757-1773
20. Korver RA, Koevoets IT, Testerink C (2018) Out of shape during stress: a key role for auxin. *Trends Plant Sci* 23(9): 783-793
21. Sanchez Carranza A, Singh A, Steinberger K, Panigrahi K, Palme K, Dovzhenko A, Dal Bosco C (2016) Hydrolases of the ILR1-like family of *Arabidopsis thaliana* modulate auxin response by regulating auxin homeostasis in the endoplasmic reticulum. *Sci Rep* 6:24212
22. Fukui K, Arai K, Tanaka Y, Aoi Y, Kukshal V, Jez JM, Kubes MF, Napier R, Zhao Y, Kasahara H, Hayashi KI (2022) Chemical inhibition of the auxin inactivation pathway uncovers the roles of metabolic turnover in auxin homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 119(32): e2206869119
23. Casanova-Sáez R, Mateo-Bonmatí E, Šimura J, Pěnčík A, Novák O, Staswick P, Ljung K (2022) Inactivation of the entire *Arabidopsis* group II GH3s confers tolerance to salinity and water deficit. *New Phytol* 235(1): 263-275
24. Böttcher C, Dennis EG, Booker GW, Polyak SW, Boss PK, Davies C (2012) A novel tool for studying auxin-metabolism: the inhibition of grapevine indole-3-acetic acid-amido synthetases by a reaction intermediate analogue. *PLoS One* 7(5): e37632
25. Hayashi KI, Arai K, Aoi Y, Tanaka Y, Hira H, Guo R, Hu Y, Ge C, Zhao Y, Kasahara H, Fukui K (2021) The main oxidative inactivation pathway of the plant hormone auxin. *Nat Commun* 12(1): 6752
26. Porco S, Pěnčík A, Rashed A, Voř U, Casanova-Sáez R, Bishopp A, Golebiowska A, Bhosale R, Swarup R, Swarup K, Peňáková P, Novák O, Staswick P, Hedden P, Phillips AL, Vissenberg K, Bennett MJ, Ljung K (2016) Dioxygenase-encoding AtDAO1 gene controls IAA oxidation and homeostasis in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113(39): 11016-11021
27. Mateo-Bonmatí E, Casanova-Sáez R, Šimura J, Ljung K (2021) Broadening the roles of UDP-glycosyltransferases in auxin homeostasis and plant development. *New Phytol* 232(2): 642-654
28. Aoi Y, Hira H, Hayakawa Y, Liu H, Fukui K, Dai X, Tanaka K, Hayashi K, Zhao Y, Kasahara H (2020) UDP-glycosyltransferase UGT84B1 regulates the levels of indole-3-acetic acid and phenylacetic acid in *Arabidopsis*. *Biochem Biophys Res Commun* 532(2): 244-250
29. Jin S, Hou B, Zhang G (2021) The ectopic expression of *Arabidopsis* glucosyltransferase UGT74D1 affects leaf positioning through modulating indole-3-acetic acid homeostasis. *Sci Rep* 11(1): 1154
30. Ciarkowska A, Wojtaczka P, Kęsy J, Ostrowski M (2023) Auxin homeostasis in maize (*Zea mays*) is regulated via 1-O-indole-3-acetyl-my-

- inositol synthesis at early stages of seedling development and under abiotic stress. *Planta* 257(1): 23
31. Jakubowska A, Kowalczyk S (2005) A specific enzyme hydrolyzing 6-O(4-O)-indole-3-ylacetyl-beta-D-glucose in immature kernels of *Zea mays*. *J Plant Physiol* 162(2): 207-213
 32. Ostrowski M, Hetmann A, Jakubowska A (2015) Indole-3-acetic acid UDP-glucosyltransferase from immature seeds of pea is involved in modification of glycoproteins. *Phytochemistry* 117: 25-33
 33. Takubo E, Kobayashi M, Hirai S, Aoi Y, Ge C, Dai X, Fukui K, Hayashi K, Zhao Y, Kasahara H (2020) Role of *Arabidopsis* indole-3-acetic acid carboxyl methyltransferase 1 in auxin metabolism. *Biochem Biophys Res Commun* 527(4): 1033-1038
 34. Hladík P, Petřík I, Žukauskaitė A, Novák O, Pěňčík A (2023) Metabolic profiles of 2-oxindole-3-acetyl-amino acid conjugates differ in various plant species. *Front Plant Sci* 14: 1217421
 35. Zhang J, Lin JE, Harris C, Campos Mastrotti Pereira F, Wu F, Blakeslee JJ, Peer WA (2016) DAO1 catalyzes temporal and tissue-specific oxidative inactivation of auxin in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113(39): 11010-11015
 36. Yin Q, Zhang J, Wang S, Cheng J, Gao H, Guo C, Ma L, Sun L, Han X, Chen S, Liu A (2021) N-glucosyltransferase GbNGT1 from ginkgo complements the auxin metabolic pathway. *Hortic Res* 8(1): 229
 37. Abbas M, Hernández-García J, Pollmann S, Samodelov SL, Kolb M, Friml J, Alabadi D (2018) Auxin methylation is required for differential growth in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 115(26): 6864-6869
 38. Geisler MM (2021) A retro-perspective on auxin transport. *Front Plant Sci* 12: 756968
 39. Dubey SM, Serre NBC, Oulehlová D, Vittal P, Fendrych M (2021) No time for transcription – rapid auxin responses in plants. *CSH Perspect Biol* 13(8): a039891
 40. Cho M, Cho HT (2013) The function of ABCB transporters in auxin transport. *Plant Signal Behav* 8(2): 642-54
 41. Feng Y, Bayaer E, Qi Y (2022) Advances in the Biological Functions of Auxin Transporters in Rice. *Agriculture* 12(7): 989
 42. Sauer M, Kleine-Vehn J (2019) PIN-FORMED and PIN-LIKES auxin transport facilitators. *Development* 146(15): dev168088
 43. Sanchez-Garcia AB, Ibanez S, Cano A, Acosta M, Perez-Perez JM (2018) A comprehensive phylogeny of auxin homeostasis genes involved in adventitious root formation in carnation stem cuttings. *PLoS One* 13(4): e0196663
 44. Křeček P, Skůpa P, Libus J, Naramoto S, Tejos R, Friml J, Zažímalová E (2009) The PIN-FORMED (PIN) protein family of auxin transporters. *Genome Biol* 10: 1-11
 45. Jiang Z, Li J, Qu LJ (2017) Auxin transport, W: Li J, Li C, Smith SM (red), *Hormone metabolism and signaling in plants*, Academic Press, UK, London, str. 51-56
 46. Ung KL, Winkler M, Schulz L, Kolb M, Janacek DP, Dedic E, Stokes DL, Hammes UZ, Pedersen BP (2022) Structures and mechanism of the plant PIN-FORMED auxin transporter. *Nature* 609(7927): 605-610
 47. Chen Q, Dai X, De-Paoli H, Cheng Y, Takebayashi Y, Kasahara H, Kamiya Y, Zhao Y (2014) Auxin overproduction in shoots cannot rescue auxin deficiencies in *Arabidopsis* roots. *Plant Cell Physiol* 55(6): 1072-1079
 48. Di DW, Li G, Sun L, Wu J, Wang M, Kronzucker HJ, Fang S, Chu J, Shi W (2021) High ammonium inhibits root growth in *Arabidopsis thaliana* by promoting auxin conjugation rather than inhibiting auxin biosynthesis. *J Plant Physiol* 261: 153415
 49. Naser V, Shani E (2016) Auxin response under osmotic stress. *Plant Mol Biol* 91: 661-672
 50. Park JE, Park JY, Kim YS, Staswick PE, Jeon J, Yun J, Kim SY, Kim J, Lee YH, Park CM (2007) GH3-mediated auxin homeostasis links growth regulation with stress adaptation response in *Arabidopsis*. *J Biol Chem* 282(13): 10036-10046
 51. Staswick PE, Serban B, Rowe M, Tiryaki I, Maldonado MT, Maldonado MC, Suza W (2005) Characterization of an *Arabidopsis* enzyme family that conjugates amino acids to indole-3-acetic acid. *Plant Cell* 17(2): 616-627
 52. Chen L, Huang X-X, Zhao S-M, Xiao D-W, Xiaob L-T, Tongb J-H, Wang W-S, Lia Y-J, Dinga Z, Houa B-K (2020) IpyA glucosylation mediates light and temperature signaling to regulate auxin-dependent hypocotyl elongation in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 117(12): 6913.
 53. Goto T, Soyano T, Liu M, Mori T, Kawaguchi M (2022) Auxin methylation by IAMT1, duplicated in the legume lineage, promotes root nodule development in *Lotus japonicus*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 119(10): 2116549119
 54. Li L, Hou X, Tsuge T, Ding M, Aoyama T, Oka A, Gu H, Zhao Y, Qu LJ (2008) The possible action mechanisms of indole-3-acetic acid methyl ester in *Arabidopsis*. *Plant Cell Rep* 27: 575-584

Biosynthesis and metabolic inactivation of auxins

Aleksandra Sobiech, Alicja Banasiak✉

Department of Plant Developmental Biology, Faculty of Biological Sciences, University of Wrocław

✉corresponding author: alicja.banasiak@uwr.edu.pl

Keywords: auxin metabolism, biosynthesis, inactivation, oxidation, conjugates, polar auxin transport

ABSTRACT

Auxins are a phytohormones that regulates of processes related to plant growth and morphogenesis, therefore their deficiency or excess results in severe developmental disorders. Plants have developed mechanisms aimed at regulating the level of the active form of these hormones, including their: directional transport, local biosynthesis, and degradation, as well as reversible and irreversible inactivation by binding to additional chemical groups. Despite almost a hundred years since the discovery of auxins, the functioning of these mechanisms, especially at the level of metabolism, is still not fully understood. In recent years, thanks to the development of new research methods, significant progress has been made in this field. This applies to both the identification of auxin biosynthetic pathways and the genes involved in them, as well as the detection of new auxin metabolites, their mutual connections and enzymes involved in their biosynthesis, transformation, and degradation. This work focuses on summarizing the current knowledge on this topic, considering the relationship of auxin metabolism with developmental processes and the response to changing environmental conditions.

