

Plantehormoner styrer planter vækst og udvikling

Selvom plantehormoner produceres i meget små koncentrationer er de centrale for planter vækst og udvikling. Måling af hormoner, specielt cytokininer, i planter har i mange år været en af naturstofkemiens store udfordringer, men nye målemetoder synes at have løst dette problem

Af Rikke Nørbæk, Lars Porskjær Christensen og Niels Bent Bredmose, Danmarks JordbrugsForskning (DJF), Forskningscenter Årsløv, Jens Hansen-Møller, DJF, Forskningscenter Foulum, Hanne Rasmussen, KVL, Skov og Landskab og Bjarke Veierskov, KVL, Plantefysiologi

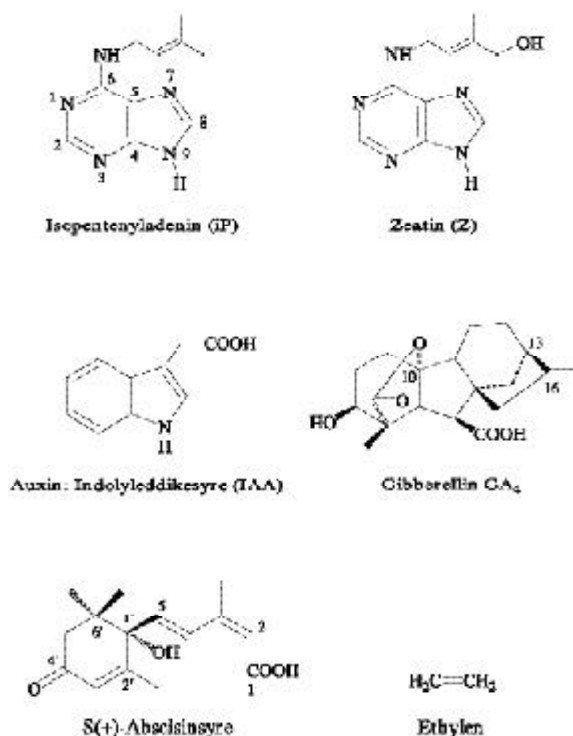
Plantehormoner er lavmolekylære organiske forbindelser, der syntetiseres i meget lave koncentrationer, og som er essentielle for plantens vækst og udvikling. Der findes flere grupper af plantehormoner, hvis kemiske strukturer og virkemåde kan være vidt forskellige. Tilstedeværelsen af vækstregulerende stoffer i planter blev allerede forudset af Darwin, men det var først i 1928, at plantehormonet auxin (indolyddikesyre, IAA) første gang blev isoleret og karakteriseret. Man beskrev auxin som et stof, der fik havren til at krumme mod lyset [1]. Den sidste hormongruppe, der blev identificeret, var cytokininer (figur 1). I 1955 blev cytokinetin kinetin (N^6 -furfuryladenin) isoleret og identificeret fra silde-DNA. Det viste sig senere at være et artefakt dannet ved dehydrering af deoxyribose og dets migration fra 9-positionen af adenin til N^6 -positionen under autoklavering [2]. Kinetin forekommer ikke i planter, men andre cytokininer med tilsvarende biologisk aktivitet har vist sig at være vidt udbredt i planter. Disse forbindelser blev tidligere omtalt som kininer.

Selvom man allerede ved opdagelsen af kinetin kendte til tilstedeværelsen af cytokininer i planter, var det først i 1963, at det første naturligt forekommende cytokinin blev isoleret og identificeret. Letham [3] identificerede i 1963 zeatin fra majs og beskrev det som et hormon, der fremmede celledeling. Det har senere vist sig at være det mest almindeligt forekommende cytokinin i planter.

Arbejdet med at bestemme virkemåden af plantehormoner har været vanskeligt. Det skyldes:

- (i) at biosyntesen ikke foregår i specifikke organer,
- (ii) at mange af hormonerne findes i forsvindende små mængder og derfor er svære at detektere og kvantificere,
- (iii) at samme hormon kan have forskellig virkning på forskellige planter og
- (iv) at der kan være tale om en antagonistisk effekt, hvor hormoner påvirker hinanden med en modsatrettet virkning.

Indfaldsviklen har i de fleste videnskabelige undersøgelser været at undersøge plantehormoners virkning ved anvendelse og observation. Det kan være en plantedel, der fjernes og erstattes med kombinationer af hormoner, et organ eller væv der dyrkes *in vitro* eller ved eksogen tilførsel af et plantehormon. Det er dog først med de moderne bioteknologiske metoder, at

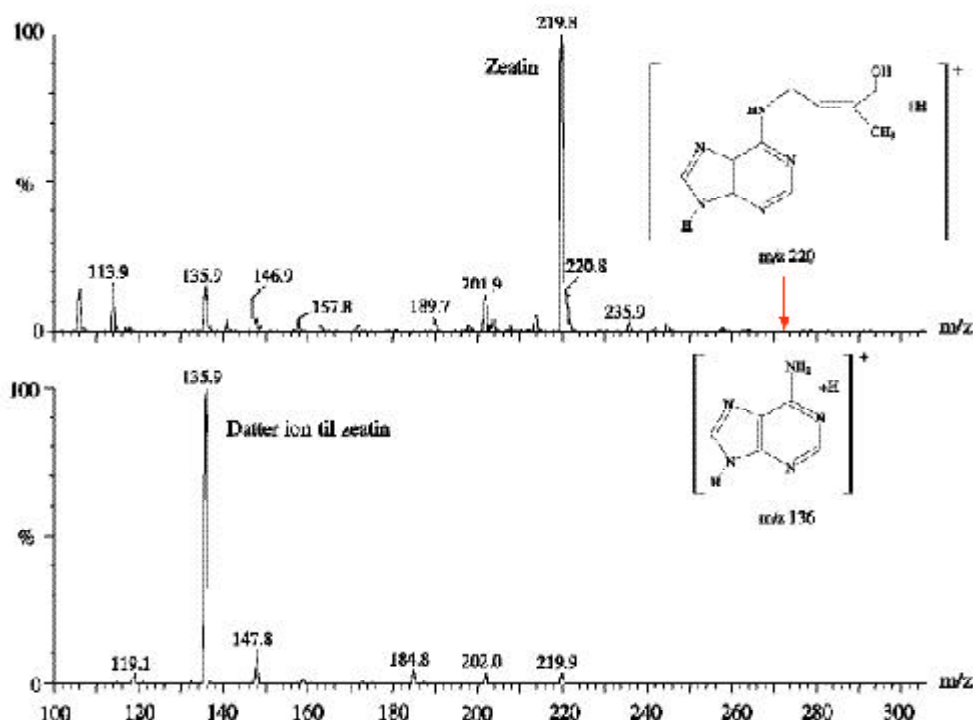


Figur 1. Kemiske strukturer af udvalgte cytokininer fra planter.

AAS · ICP/MS
UV-VIS · LC/MS
GC/MS · FT-IR/NIR

**Nyt Laboratorium?
- Så er det også os!**

Thermo
FISHER CORPORATION
48 16 62 00 · Gydevang 17-19 · 3450 Allerød



▲ Figur 2. LC-MS/MS af zeatin (Z) og fragmenteringsmønstret af dette cytokinin.

det er blevet muligt at identificere de naturlige biosynteseveje til dannelsen af de forskellige plantehormoner, herunder især cytokininer og auxiner. I den nyeste forskning introduceres følgende og selektive målemetoder, der kan detektere og bestemme den kemiske struktur af størstedelen af hormonerne og efterfølgende kvantificere mængden af disse. Man kan i dag detektere hormonzoncentrationer helt ned til 10^{-9} mol/g plantemateriale. Det giver mulighed for at studere, hvilken betydning hvert enkelt hormon har og klarlægge, hvilket samspil der er mellem flere hormoner i forbindelse med plantens udvikling.

Typer af plantehormoner

De klassiske grupper af plantehormoner, som hovedsagelig fremmer vækst og udvikling af planter, er cytokininer, auxiner, gibberelliner, abscisinsyre og ethylen (figur 1 og 2). Andre hormontyper er kumarin, jasmonsyre, brassinosteroider, oligosaccharider og salicylsyre [4].

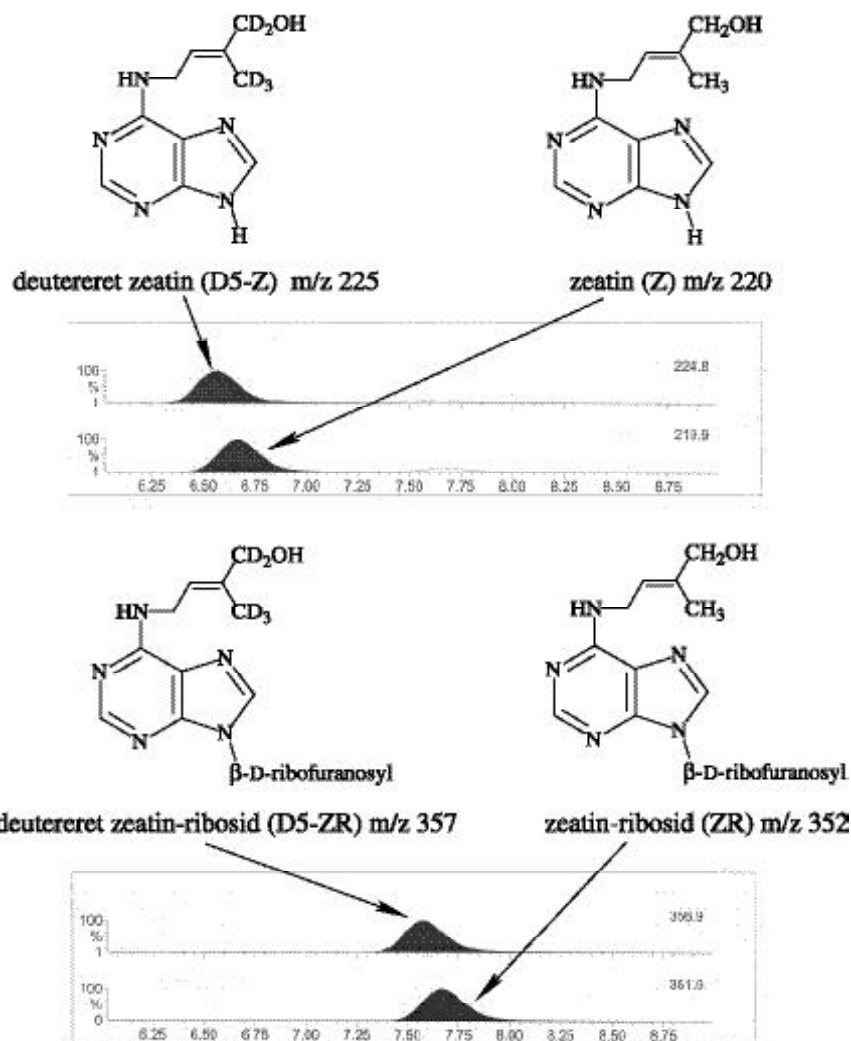
Cytokininer er purinforbindelser, der oftest er derivater af adenin med en substituent ved N^6 . Cytokininer, der produceres i planter, er med enkelte undtagelser derivater af de frie cytokininer isopentenyladenin (iP), zeatin (Z) eller dihydrozeatin (DHZ) (figur 1). De frie cytokininer, men også deres respektive ribosider og O-glucosider (nucleosider) anses sammen med nucleotiderne (phosphatester af nucleosider) for at være aktive cytokininformer [5]. Derimod er 7- og 9 C-glucosider af Z og DHZ (figur 1) inaktive. Aromatiske cytokininer har hidtil kun været kendt som syntetiske, men er nyligt fundet i planter [6]. Cytokininer er plantehormoner med virkning på celledeling og vævsdifferentiering, og de

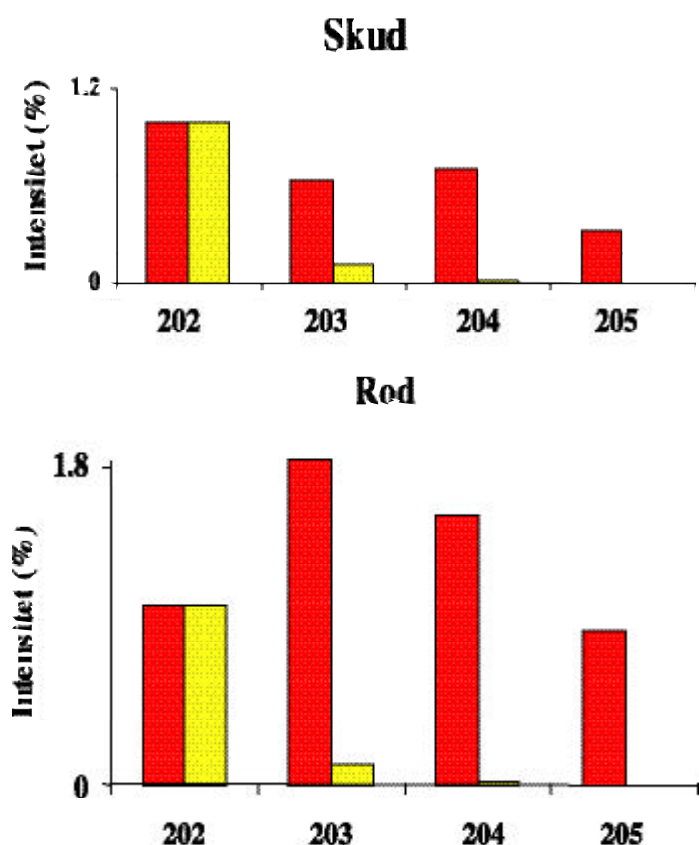
fremmer bl.a. anlæggelse af plante-skud.

Auxiner er tryptophanforbindelser, som i deres virkemåde minder om indolyleddikesyre (auxin) (figur 1). Auxiner er nødvendige, for at planter kan vokse, idet hormonet fremmer cellestrækning og styrer skudenes drejning mod lyset. Auxiner, der påføres ikke-befrugtede blomster, kan starte vækst af frugtknuden og danne frøløse frugter. Således produceres frøløse tomater og vindruer.

Gibberelliner (GA) er tetracykliske diterpenoider. Biosyntesen følger den sædvanlige biosyntesevej for terpenoider via addition af isopentenylpyrophosphat til dimethylallylpyrophosphat. Der kendes over 110 forskellige GA-strukturer, men mange af dem er intermediater i biosyntesen af aktivstofferne. Der fin-

▼ Figur 3. LC-MS kromatogram af hhv. deutereret zeatin (m/z 225) og zeatin (m/z 220) og af deutereret zeatin-ribosid (m/z 356) og zeatin-ribosid (m/z 352). Der ses en lille forskel i retentionsid på kolonnen for hhv. den deutererede og naturlige form af cytokinet.





Figur 4. Biosyntese i skud og rod af zeatin-ribosid-5'-monophosphat (ZRMP) mærket med deuterium efter inkubering i D_2O . Røde kolonner viser isotopfordelingen efter deuteriummærkning af ZRMP $m/z + 1$ (202) til $m/z + 3$ (m/z 205). Gule kolonner viser ikke mærket ZRMP (m/z 202) med kun små signaler fra de naturlige isotop toppe $m/z + 1$ (m/z 203) og $m/z + 2$ (m/z 204).

des normalt ikke over 15 GA i en plante. De forskellige GA-strukturer har forskellige substituentter i position 10, 13, og 16 og kan have en γ -lacton-bro (figur 1, GA_4). Gibberelliner kan bl.a. stimulere blomstring. Når gibberellin GA_4 og GA_7 tilføres til nåletræer, blomstrer de efter 4–6 år i stedet for de normale 20 år.

Abscisinsyre er en sesquiterpen (figur 1) med et asymmetrisk kulstofatom i 1'-positionen, hvilket giver mulighed for en $S(+)$ og $R(-)$ -enantiomer. Det er S -enantiomeren, der er naturlig forekommende. Abscisinsyre er et stresshormon, der produceres, når planten udsættes for stress, dvs. ved tørke, høje saltkoncentrationer eller frost. Ved tørke får abscisinsyre bladenes spalteåbninger til at lukke sig, og rodens hydrauliske ledningsevne øges, hvorved vandbalancen forbedres.

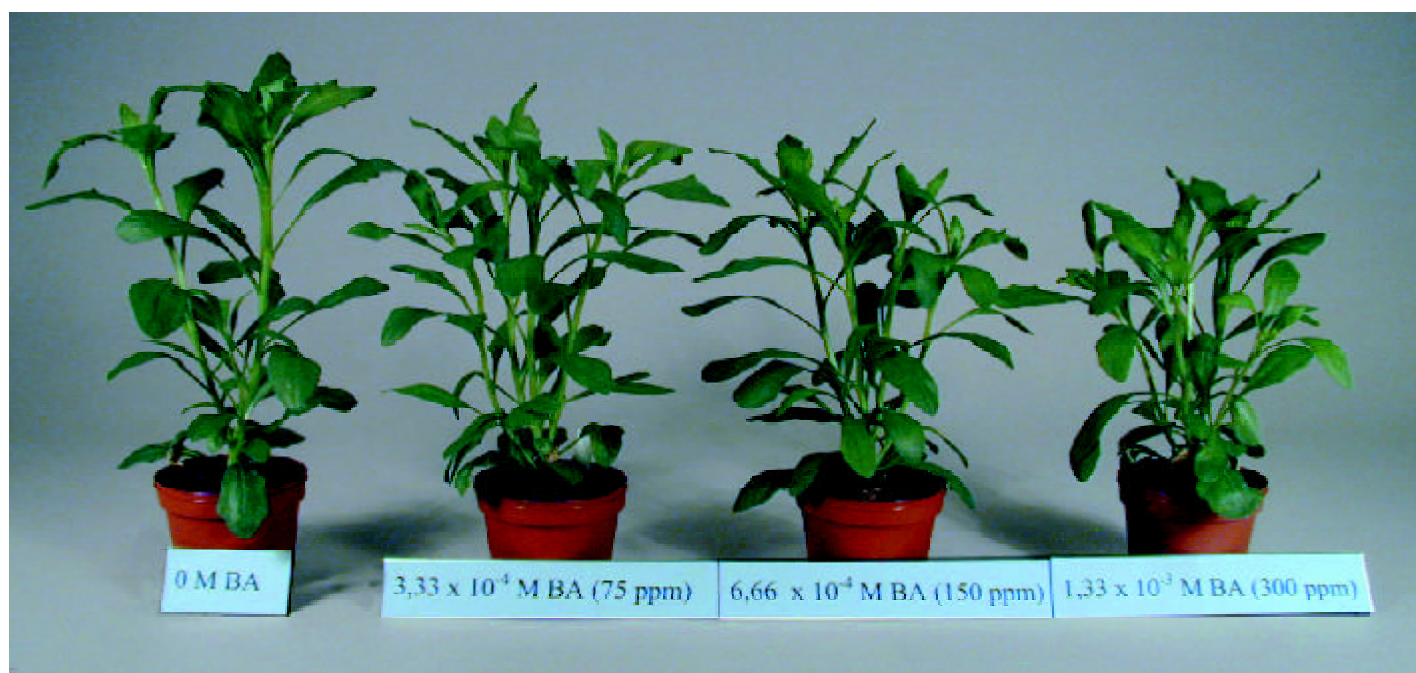
Plantehormonet ethylen afgives især i store mængder fra modnende frugter og rådende plantedele. Det er dog kun ethylen opløst i celledsaft, der udøver hormonvirkning. Ethylen stimulerer bl.a. frugtmodning, så et modent æble kan inducere modning af andre frugter og få blomster til at visne. Det benyttes ved modning af bananer, idet bananerne plukkes grønne, afskibes og behandles med ethylen undervejs, så de netop er modne ved ankomsten til modtagerlandet.

Cytokininer og auxiner er uden tvivl de væsentligste hormoner i relation til planterens vækst og udvikling. Det er også disse plantehormoner, der er sværest at måle, idet de optræder i forsvindende små mængder. Nye målemetoder har imidlertid givet gode resultater.

Nyeste målemetoder af cytokininer og auxiner

Cytokininer og auxiner oprenses fra planteekstraktet på en kolonne indeholdende et C_{18} -coated materiale. Derved fjernes aminosyrer og sukker, så de ikke generer analysen. Hvert enkelt hormon kvantificeres nu vha. LC-MS/MS (højtryksvæskeskromatografi kombineret med tandem massespektrometri). Ved at koble væskeskromatografi, hvor hvert plantehormon fremkommer som en separat top på et kromatogram og massespektrometri, hvor den eksakte masse af hvert hormon og dets overordnede fragmentmønster kan bestemmes (figur 2), er det muligt at opnå tilstrækkelig in-

Figur 5. Syntetisk cytokinin (benzyladenin (BA)) fremmer brydninger og kompaktthed. Benzyladenin tilført kapmargeritplanter i forskellige koncentrationer.





Figur 6. Småplanter af julekaktus. Til højre: Uden behandling med syntetisk cytokinin benzyladenin. Til venstre: Med tilførsel af $6,66 \times 10^{-4}$ M benzyladenin. Begge stiklinger er blevet behandlet med 10^{-3} M IBA (syntetisk auxin).

formation til at identificere hver enkelt hormon i et planteekstrakt. Forholdet mellem arealenheder og koncentration af hvert hormon bestemmes ud fra en standardkurve baseret på cytokinin- og auxinstandarde, toppens størrelse viser, hvor meget der er af det pågældende plante-hormon.

Ved at bruge interne standarder (de deutererede former af hhv. cytokinin og auxin) kan man finde frem til hormonerne i en kompleks matrix af naturstoffer i et planteekstrakt. Standarderne tilsættes ekstraktet og svarer til hvert sit cytokinin, hvor H-atomerne på de endestillede CH_2 - og CH_3 -grupper i sidekæden er byttet ud med deuterium (figur 3). Det bevirker en forskel i molekyllvægten og derved en lille forskel i retentionstid på HPLC-kolonnen for hhv. den deutererede og naturlige form (figur 3). Herved kan man følge toppene parvis, cytokinin i planteekstraktet og dets tilsvarende deutererede forbindelse som standard. Metoden er finindstillet til måling af auxin, auxinkonjugatet indol-3-asparat og ni forskellige cytokininer. Der kan måles koncentrationer ned til $0,2\text{--}12 \cdot 10^{-15}$ mol [7].

Syntesested og transport af cytokininer og auxiner

Cytokininer syntetiseres i ekstremt lave koncentrationer (10^{-9} mol/g plantemateriale). Forestillingen, der stadig ses i plantefysiologiske lærebøger, om at cytokinin hovedsageligt dannes i rodsystemet, er ved at blive opgivet. Efter at man er begyndt at anvende LC-MS/MS til at detektere de små mængder hormoner, har man kunnet måle, at der også andre steder i planten sker en opkoncentrering af hormoner, og at cytokininer dannes ganske tæt på deres virkningssted. Den nyeste forskning viser, at cytokininbiosyntesen i gåsemad (*Arabidopsis thaliana*) sker i både rødder og skud [8]. Ved at lade planterne optage et næringsmedium med 30% D_2O blev de mærkede vandmolekyler indbygget i zeatin-ribosid-5'-monophosphat (ZRMP). Denne *in vivo* mærkning med tungt vand kunne detekteres ud i blade og rødder ved brug af LC-MS (figur 4).

Auxin produceres i skudspidsen og mange andre steder i planten. Auxin eksisterer i en fri og antagelig aktiv form, men kan også forekomme som et konjugat med sukker eller aminosyrer. Konjugaterne er stabile og oplagres eksempelvis i frø. Hormonet transporteres via parenchymaceller med en hastighed af 1 cm i timen [9]. Den polære transport er en aktiv proces medieret af bærerproteiner.

Cytokininer og auxiner i pryddplanter og nåletræer

En stor del af de danskproducerede pryddplanter formeres ved at et stængelstykke afskæres og induceres til at danne nye rødder (stiklingeformering). Der er dog tab under formeringen, fordi en del stiklinger ikke danner rødder. Senere i produktionen kan der pga. uens vækst og udvikling forekomme spild. Forholdet mellem auxiner og cytokininer regulerer sideskudsvækst (cytokininer fremmer, auxiner hæm-



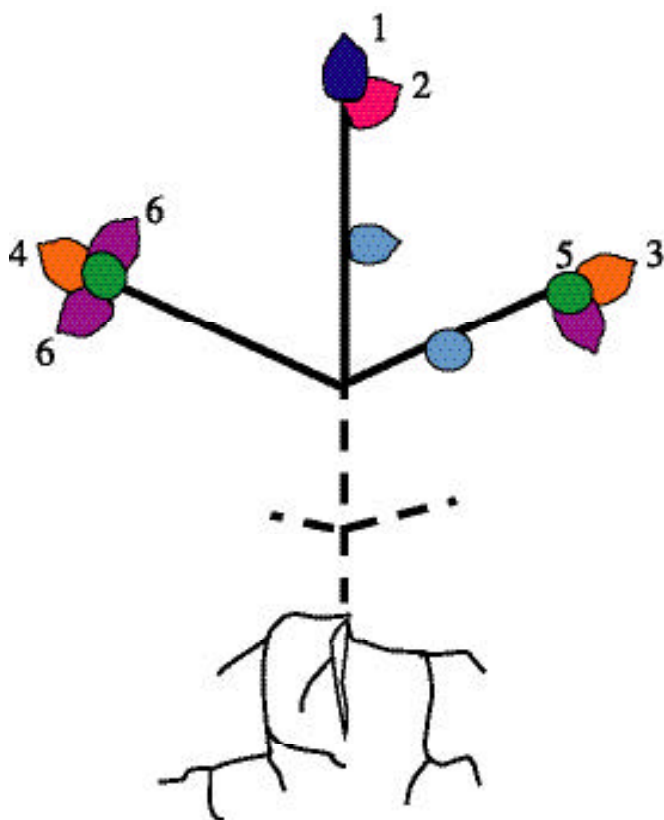
Figur 7. Nordmannsgran, hvor toppen er beskadiget, måske som følge af frost. Det er karakteristisk, at en eller flere grene søger opad for med tiden at erstatte topskuddet. Især knopplaceringen og nålestillingen vil dog i flere år endnu afsløre det nye »topskuds« grenkarakter, og det er svært at få en harmonisk kronestruktur på træet efter en sådan skade.

mer) og roddannelse hos stiklingerne (auxiner fremmer, cytokinin hæmmer) [10]. De nyeste resultater viser, at der ved at tilføre syntetisk cytokinin (benzyladenin) opnås dannelse af flere vækstpunkter hos kapmargerit (figur 5) og novemberkaktus (figur 6), men ikke hos potteroser. Auxinbehandling har en positiv virkning på roddannelse hos alle tre typer pryddplanter, der danner et bredt rodnet, når auxin-cytokinkoncentrationsforholdet er højt (her vist på julekaktus, figur 6). Bedste auxintype og koncentration af-

ADEPTSCIENTIFIC
 Analytisk & Teknisk Service
 4826 1170

- Kemi & Laboratorie
- Dataanalyse & Visualisering
- Kvalitetstyring - SPC/SQC
- Matematik & Simulering
- Bibliografi & Referencehåndtering
- Teleskærme & Tekniske Ordre

www.adeptscientific.dk

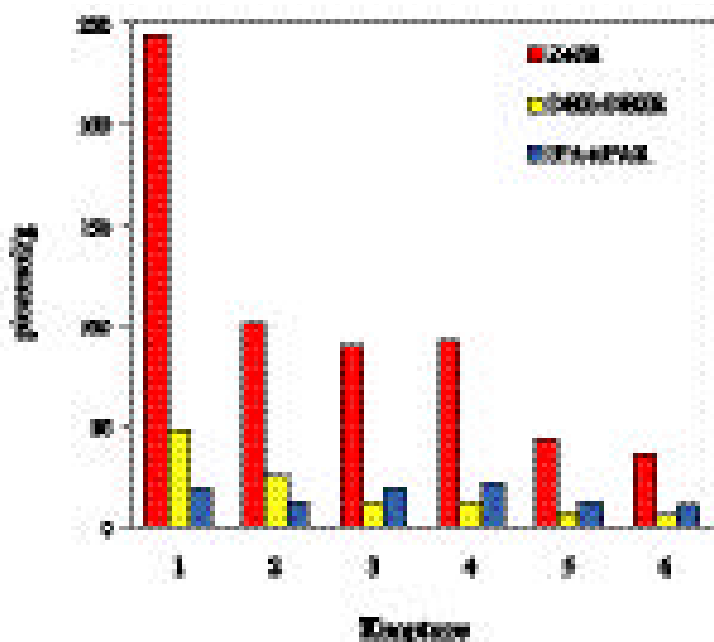


Figur 8. Knophierarki i Nordmannsgran. 1: Topknop, 2: Kransknop, 3-4: Endeknoppe på 1 grenkrans, 5-6: Sideknoppe, 1 grenkrans.

hænger af plantearten [11]. Forsøgene med tilsætning af syntetisk cytokinin og auxin til stiklinger førte til mere ensartede planter.

Juletræer kan afhængig af andelen af førsteklases træer

Figur 9. Fordelingen af cytokinin i Nordmannsgranknoppe angivet i picomol pr. gram frisk plantemateriale. Z: zeatin, ZR: zeatin-ribosid, DHZ: dihydrozeatin, DHZR: dihydrozeatin-ribosid, IP: isopentenyladenin, IPA: isopentenyladenosin. Nummereringen af søjlegrupperne svarer til knop typerne i figur 8.



være en god eller en meget dårlig forretning. En udbytteprocent på 85 eller på 50 gør en stor økonomisk forskel. Træerne kasseres oftest pga. defekter i deres kroneform (figur 7). Derfor er det vigtigt for juletræsproducenten at kunne stimulere eller hæmme højdetilvæksten, tætheden af sidegrene, eller måske forvandle en sidegren til nyt topskud. Forudsætningen er, at man får en forståelse for, hvordan træet selv administrerer alle sine vækstpunkter. Inddelingen af knopperne på en Nordmannsgran er skitseret i figur 8. De første resultater i et igangværende projekt viser, at lokaliseringen af cytokinin ændres dramatisk gennem årstiden, samt at cytokininmængden i knopperne afhænger meget af deres placering på træet. Jo højere position på træet, jo mere cytokinin indeholder knoppen (figur 9). Det indikerer, at cytokininhormongruppen styrer knoppens udvikling og dermed tilvækstfordelingen i trækronen.

Tak til Villum Kann Rasmussen Fonden for støtte til projekt »Vækstregulering og arkitektur i træer, med *Abies nordmanniana* som model« og Statens Jordbrugs- og Veterinærvidenskabelige Forskningsråd.

E-mail adresser:

Rikke Nørhæk: rnb@fertin.com

Lars Porskjær Christensen: larsp.christensen@agrsci.dk

Niels Bent Bredmose: niels.bredmose@agrsci.dk

Jens Hansen-Møller: jens.hansen-moeller@agrsci.dk

Hanne Rasmussen: hnr@kvl.dk

Bjarke Veierskov: bjarke.veierskov@plbio.kvl.dk

Referencer:

- Went, F.W. *Wuchsstoff und Wachstum*. Rec. Trav. Bot. Neerl. 1928; 25: 1-116.
- Miller, C.O., Skoog, F., von Saltza, F.M. & Strong, F.M. *Kinetin, a cell division factor from deoxyribonucleic acid*. J. Amer. Chem. Soc. 1955; 77: 1329-1334.
- Letham, D.S. *Zeatin, a factor inducing cell division isolated from Zea mays*. Life Sci. 1963; 8: 569-573.
- Davies, P.J. *The plant hormones: their nature, occurrence, and functions*. In *Plant Hormones: Physiology, Biochemistry and molecular Biology*, 2nd edition. (Davies, P.J., ed.). Dordrecht, the Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1995; 1-12.
- Letham, D.S., Palni, L.M.S. *The biosynthesis and metabolism of cytokinins*. Ann. Rev. Plant Physiol. 1983; 34:163-197.
- Auer, C.A. *Cytokinin conjugation: Recent advances and patterns in plant evolution*. Plant Growth Regulation 1997; 23: 17-32.
- Rasmussen, H.N., Veierskov B., Nørhæk, R., Hansen-Møller, J. *Cytokinin and auxin distribution in the conifer tree crown*. Proceedings of the Plant Growth Regulation Society of America 31 annual Conference, Charleston SC 2004; (i tryk).
- Nordström, A., Tarkowski, P., Tarkowska, D., Nørhæk, R., Åstot, C., Dolezal, K., Sandberg, G. *Auxin regulation of cytokinin biosynthesis in Arabidopsis thaliana: A factor of potential importance for auxin-cytokinin-regulated development*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 2004; 101: 21: 8039-8044.
- Lomax, T.L., Muday, G.K., Rubery, P.H. *Auxin transport*. *Plant Hormones: Physiology, Biochemistry, and Molecular Biology*. (ed. Davies, P.J.) Dordrecht, Kluwer Academic Publishers. 1995; p. 509-530.
- Brault, M., Maldiney, R. *Mechanisms of cytokinin action*. Plant Physiol. Biochem. 1999; 37: 403-412.
- Bredmose, N., Kristiansen, K., Nørhæk, R. *Rod-Skud-Cytokinin relationer*. Gartnertidende 2003; 32: 9-11.
- Hooykaas, P.J.J., Hall, M.A., Libbenga, K.R. (Eds.) *Biochemistry and Molecular Biology of Plant Hormones. New comprehensive biochemistry*. Elsevier Science B.V. Amsterdam, The Netherlands. 1995; p. 1-564.

