

Uloga i metabolizam askorbinske kiseline u biljaka

Matić, Dajana

Undergraduate thesis / Završni rad

2014

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:019593>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-20**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO – MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

ULOGA I METABOLIZAM ASKORBINSKE KISELINE U BILJAKA

THE FUNCTION AND METABOLISM OF ASCORBIC ACID IN PLANTS

SEMINARSKI RAD

Dajana Matić

Preddiplomski studij molekularne biologije
(Undergraduate Study of Molecular Biology)

Mentor: izv. prof. dr. sc. Željka Vidaković-Cifrek

ZAGREB, 2014.

POPIS KRATICA

AsA – askorbinska kiselina

AO – askorbat oksidaza

APX – askorbat peroksidaza

ATP – adenozin trifosfat

CAT - katalata

DHA – dehidroaskorbinska kiselina

DHAR – DHA reduktaza

DKG – 2,3-diketogulonat

GDP – gvanozin difosfat

GR – glutathion reduktaza

GSH - glutathion

GSSG – glutathion disulfid, oksidirani glutathion

HRGP – glikoproteini bogati hidroksiprolinom

MDHA – monodehidroaskorbinska kiselina

MDHAR – MDHA reduktaza

NADP⁺ – nikotinamid adenin dinukleotid fosfat

OxA – oksalna kiselina

OxT – oksalil treonat

ROS – reaktivni oblici kisika

SAG – geni koji sudjeluju u procesu senescencije

SOD – superoksid dismutaza

ThrO – L-treonat

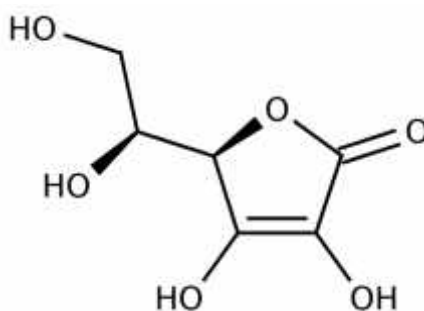
vtc-mutante – genetički promijenjene biljke vrste *Arabidopsis thaliana* sa smanjenom biosintezom askorbinske kiseline

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. BIOSINTEZA ASKORBINSKE KISELINE.....	2
3. KATABOLIZAM ASKORBINSKE KISELINE.....	5
4. PRIJENOS ASKORBINSKE KISELINE.....	8
5. ULOGE ASKORBINSKE KISELINE.....	10
5.1. Rast i razvoj biljaka.....	10
5.2. Uloga u fotosintezi.....	14
5.3. Kofaktor enzima.....	15
5.4. Antioksidativno djelovanje askorbinske kiseline.....	15
5.5. Regulacija odgovora na stres.....	17
5.6. Detoksikacija teških metala.....	18
6. ZAKLJUČCI.....	19
7. LITERATURA.....	20
8. SAŽETAK.....	22
9. SUMMARY.....	23

1. UVOD

Askorbinska kiselina (vitamin C; (R)-3,4-dihidroksi-5-((S)-1,2-dihidroksietil) furan-2(5H)-on; $C_6H_8O_6$) je jedan od najviše proučavanih i prvi sintetski proizveden vitamin. Građena je od šest ugljikovih atoma, pa je po strukturi slična glukozu (Slika 1.). Kao čista tvar u čvrstom stanju bijeli je do slabo žućkasti kristaliničan prašak, gotovo bez mirisa, kisela okusa, lako topljiv u vodi i etanolu, gotovo netopljiv u eteru, a netopljiv u mastima i uljima. Vrlo je nestabilna molekula, osjetljiva na svjetlost i visoke temperature, a na zraku podložna oksidaciji, posebno u otopinama. U biološkim se sustavima nalazi u protoniranom obliku samo pri niskim pH vrijednostima, a u neutralnim otopinama iznad pH 5 se predominantno nalazi u ioniziranom obliku, askorbatu (Moser i Bendich 1991, cit. Davey i sur. 2000).



Slika 1. Struktura askorbinske kiseline

(preuzeto s <http://www.glenthams.com/en/products/product/GV5017/>)

Askorbinska kiselina je multifunkcionalna molekula od iznimne važnosti za biljni i životinjski svijet. Najjači je antioksidans među vitaminima topljivim u vodi koji u suradnji s ostalim komponentama antioksidacijskog sustava djelotvorno štiti stanice od oksidativnih oštećenja. Također sudjeluje u različitim metaboličkim reakcijama kao kofaktor enzima. Većina životinja je sposobna sintetizirati askorbinsku kiselinu iz glukoze, ali ljudi, uz još neke vrste, su izgubili tu mogućnost jer imaju nefunkcionalni gen za L-gulono-1,4-lakton oksidazu koja katalizira zadnji korak u biosintezi askorbinske kiseline (Naidu 2003, cit. Gallie 2013). Manjak ovog vitamina u organizmu uzrokuje različita oboljenja. Najbolji način njegova nadoknađivanja jest redovita konzumacija svježeg voća i povrća.

Istraživanja uloge askorbinske kiseline u biljaka, a tako i u životinja, dulje vrijeme su bila vezana isključivo za njena antioksidativna svojstva i neutralizaciju

reaktivnih oblika kisika. Međutim, u novije vrijeme sakupljeni su brojni dokazi o širokoj lepezi djelovanja askorbinske kiseline na biljni organizam. Ona je esencijalni metabolit uključen u rast i razvoj biljaka. Sudjeluje u hormonskoj signalizaciji i modifikaciji genske ekspresije, te regulaciji širokog spektra staničnih mehanizama usmjerenih protiv štetnih utjecaja iz okoliša. Djeluje kao kofaktor enzima uključenih u regulaciju fotosinteze, biosintezu hormona i regeneraciju drugih antioksidansa kao što su glutation i vitamin E. Regulira diobu stanica, uključena je u prijenos signala, a ima ulogu i u senescenciji, obrani od patogena i detoksikaciji (Smirnoff 2000, cit. Gallie 2013).

Askorbinska kiselina se nalazi u različitim tkivima biljaka, a količina varira među biljnim vrstama, te ovisi o klimatskim uvjetima u kojima je biljka rasla i razvijala se, o kakvoći tla, stupnju zrelosti ubrane biljke ili ploda, te načinu obrađivanja biljke u svrhu konzumacije jer se stajanjem vitamin C oksidira. U biljnoj stanici askorbat je kvantitativno dominantni antioksidans i njegova prisutnost je utvrđena u različitim staničnim odjeljcima uključujući citoplazmu, jezgru, kloroplaste, mitohondrije, vakuolu te apoplast. Prosječna stanična koncentracija se kreće između 2-25 mM ili više, npr. u stromi kloroplasta može biti do oko 50 mM. Najviše koncentracije askorbinske kiseline obično su prisutne u potpuno razvijenim listovima, meristemskim tkivima i nekim plodovima. Primijećeno je da neke vrste biljaka s veoma visokim koncentracijama unutarstanične askorbinske kiseline istu akumuliraju u veliku centralnu vakuolu unutar koje je stabilizirana niskom pH vrijednošću (Davey i sur. 2000).

2. BIOSINTEZA ASKORBINSKE KISELINE

Za razliku od životinja koje imaju jedan put biosinteze askorbinske kiseline, biljke koriste više puteva što upućuje na važnost ove molekule za biljni metabolizam, a time i za biljku u cjelini (Slika 2.). Doprinos svakog od njih varira među biljnim vrstama, organima i razvojnim stadijima. Karakterizacija mutanti uročnjaka (*Arabidopsis thaliana*) koje imaju smanjenu mogućnost biosinteze askorbinske kiseline u odnosu na divlji tip, *vtc*-mutanti, omogućila je bolje razumijevanje uloga enzima uključenih u biosintezu askorbata (Davey i sur. 2000; Kotchoni i sur. 2009).

Glavni put biosinteze askorbinske kiseline u biljaka predložen je i prihvaćen 1998. godine (Wheeler i sur. 1998). To je D-manoza/L-galaktozni put (Smirnoff-Wheelerov put) u kojemu je izravni prekursor askorbinske kiseline L-galaktono-1,4-

lakton, a intermedijeri su fosforilirani i nukleotidni šećeri. Početna tri koraka do D-manoza-6-fosfata uključuju pretvorbu D-glukoze, djelovanjem enzima heksokinaze, do D-glukoza-6-fosfata koja zatim prelazi u D-fruktoza-6-fosfat djelovanjem fosfoglucoza izomeraze. Od nje, djelovanjem mannoza-6-fosfat izomeraze, dobivamo D-manoza-6-fosfat iz koje nastaje D-manoza-1-fosfat djelovanjem fosfomannoza mutaze. GDP-D-mannoza fosforilaza prevodi D-manoza-1-fosfat do GDP-D-mannoze. Dvostruku epimerizaciju od nje do GDP-L-galaktoze katalizira GDP-D-mannoza-3',5'-epimeraza. Ona prelazi u L-galaktoza-1-fosfat djelovanjem GDP-L-galaktoza fosforilaze. L-galaktoza-1-fosfat fosfataza ju potom prevodi u L-galaktozu. L-galaktono-1,4-lakton nastaje oksidacijom L-galaktoze djelovanjem NAD^+ -ovisne L-galaktoza dehidrogenaze. L-galaktono-1,4-lakton se zatim oksidira do L-askorbinske kiseline, a reakciju katalizira enzim L-galaktono-1,4-lakton dehidrogenaza koji je smješten s vanjske strane unutrašnje membrane mitohondrija i u reakciji predaje elektrone citokromu *c* koji je u lancu prijenosa elektrona u mitohondriju smješten između kompleksa III i IV. Oksidacija L-galaktono-1,4-laktona u mitohondriju upućuje na povezanost sinteze askorbinske kiseline s energetskeim metabolizmom i redoks-stanjem u stanici. Ostatak puta odvija se u citoplazmi. Ovaj put je preko svojih intermedijera, GDP-šećera, povezan sa sintezom polisaharida stanične stijenke, te sintezom određenih glikoproteina (Smirnoff i sur. 2004).

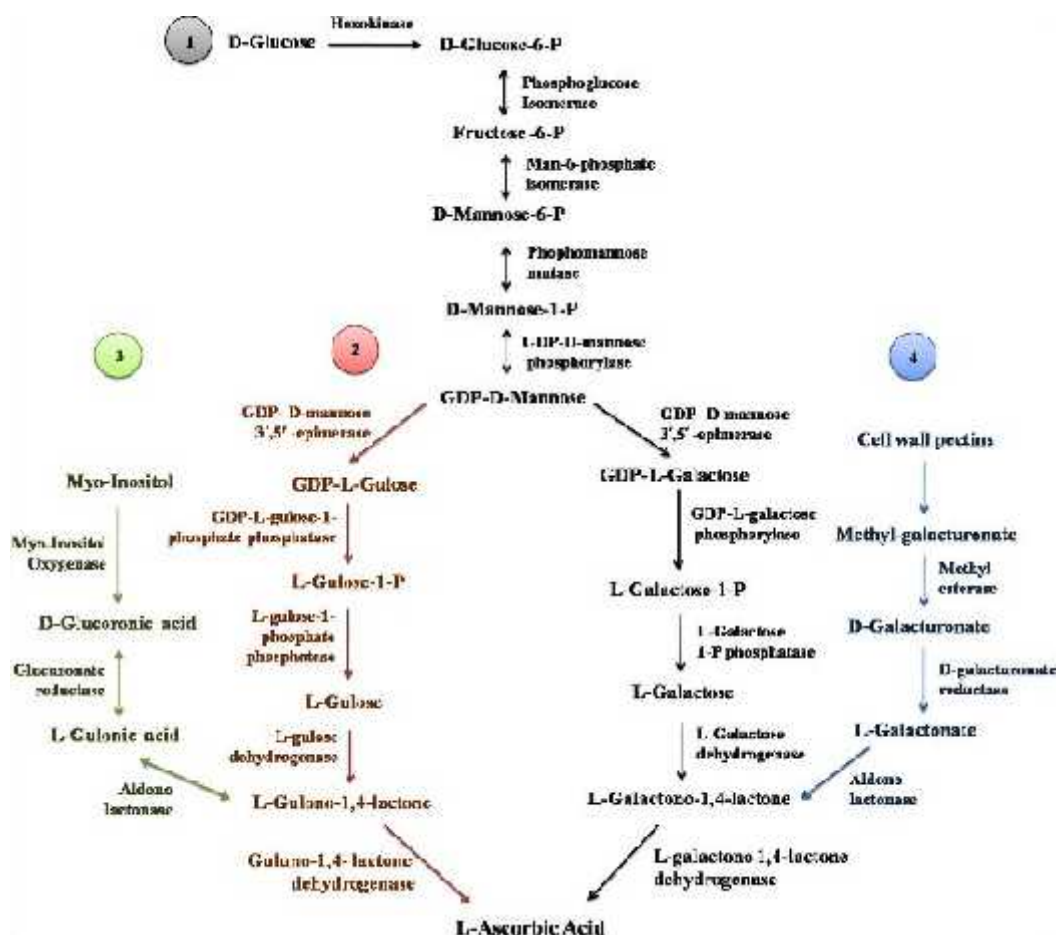
Identificirana su tri alternativna puta sinteze askorbata, a to su put L-guloze (Wolucka i Van Montagu 2003), D-galakturonatni put (Agius i sur. 2003) i *myo*-inozitolni put (Lorence i sur. 2004). Enzim GDP-mannoza-3',5'-epimeraza ne katalizira samo pretvorbu GDP-D-mannoze u GDP-L-galaktozu u putu L-galaktoze, već može proizvesti GDP-L-gulozu 5'-epimerizacijom GDP-D-mannoze. GDP-L-guloza se prevodi u L-guloza-1-fosfat djelovanjem enzima GDP-L-guloza-1-fosfat fosfataze, a zatim u L-gulozu djelovanjem L-guloza-1-fosfat fosfataze. Pretvorbu od L-guloze do L-gulono-1,4-laktona katalizira L-guloza dehidrogenaza. Konačno, L-gulono-1,4-lakton prevodi se u askorbinsku kiselinu djelovanjem gulono-1,4-lakton dehidrogenaze. Ovaj enzim je, kao i L-galaktono-1,4-lakton dehidrogenaza iz Smirnoff-Wheelerova puta, smješten u unutrašnjoj membrani mitohondrija. L-gulono-1,4-lakton je također i izravni prekursor za sintezu askorbata u sisavaca. Zasad nije poznato u kojoj je mjeri ovaj put zastupljen u biljaka.

D-glukuronska kiselina, intermedijer u sintezi askorbinske kiseline u sisavaca, može nastati u biljkama iz *myo*-inozitola, koji je esencijalan za normalan razvoj biljke,

djelovanjem *myo*-inozitol oksigenaze. U biljci se dalje D-glukuronska kiselina pretvara u L-gulonsku kiselinu pomoću enzima glukuronat reduktaze. Aldono laktonaza prevodi L-gulonsku kiselinu u L-gulono-1,4-lakton koji se opet oksidira u L-askorbinsku kiselinu djelovanjem gulono-1,4-lakton dehidrogenaze. Ipak, *myo*-inozitol oksigenaza je uključena uglavnom u regulaciju metaboličke razine *myo*-inozitola i ima zanemarljivu ulogu u biosintezi askorbata (Endres i Tenhaken 2009).

D-galakturonatni put sastoji se od pretvorbe D-galakturonske kiseline, produkta razgradnje pektina iz stanične stijenke, do L-galaktonske kiseline djelovanjem NADPH ovisne reduktaze D-galakturonske kiseline, a koju zatim aldono laktonaza prevodi u L-galaktono-1,4-lakton, izravni prekursor askorbinske kiseline.

Smirnoff-Wheelerov put je odgovoran za sintezu većine askorbinske kiseline u biljkama dok ostali putevi nisu dovoljni za kompenzaciju manjka askorbinske kiseline u *vtc*-mutanti. Pretvorba D-glukuronske kiseline i D-galakturonske kiseline u askorbat ima ulogu u recikliranju ugljika koji se oslobađa razgradnjom stanične stijenke. Usporedba učinkovitosti povećanja sinteze askorbinske kiseline u staničnim suspenzijama vrste *Arabidopsis thaliana* nakon dodavanja različitih prekursora askorbinske kiseline rezultirala je sljedećim poretkom prekursora: L-galaktoza > L-galaktono-1,4-lakton = D-galakturonska kiselina > L-gulono-1,4-lakton = D-glukuronska kiselina > D-glukuronolakton (Gallie 2013). Enzimi Smirnoff-Wheelerovog puta prisutni su u algama što sugerira da je ovaj put evoluirao prije pojave kopnenih biljaka. Kako bi opstale u atmosferi obogaćenoj kisikom, prve kopnene biljke morale su se uvelike osloniti na antioksidanse, što je rezultiralo povećanjem njihove biosinteze.

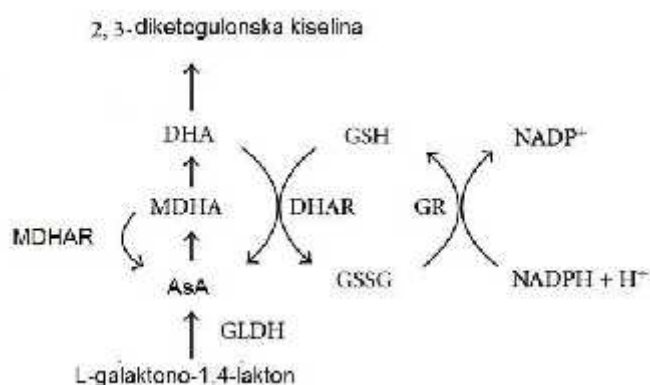


Slika 2. Putevi biosinteze askorbinske kiseline u biljaka: (1)Smirnoff-Wheelerov put, (2)put L-guloze, (3)Myo-inozitolni put, (4) D-galakturonatni put (preuzeto s <http://www.as-botanicalstudies.com/content/55/1/38/figure/F1?highres=y>)

3. KATABOLIZAM ASKORBINSKE KISELINE

Optimalne količine askorbinske kiseline (AsA) u stanicama održavaju se ravnotežom između sinteze, recikliranja i katabolizma. U aerobnim uvjetima AsA u stanicama oksidira u monodehidroaskorbatni radikal (MDHA), koji se može reducirati natrag u AsA djelovanjem NAD(P)-ovisne monodehidroaskorbat reduktaze (MDHAR) ili se disproporcionirati neenzimatski na AsA i dehidroaskorbinsku kiselinu (DHA). Ta reakcija je posebno brza pri niskoj pH vrijednosti. DHA se spontano i ireverzibilno hidrolizira u 2,3-diketogulonsku kiselinu ako se prije ne reciklira natrag u AsA djelovanjem dehidroaskorbat reduktaze (DHAR) koja koristi glutation (GSH) kao reducens. Budući da je DHA vrlo nestabilna pri pH vrijednosti višoj od 7, potrebno je održavati zalihe AsA u reducirajućem obliku kako bi se spriječio njen gubitak i na taj način DHAR doprinosi regulaciji redoks stanja u stanicama. DHAR povezuje askorbat i glutation, još jedan važan antioksidans u biljnoj stanici. Te reakcije zajedno čine

askorbat-glutationski ciklus (Foyer 1993, cit. Smirnoff 1996). Antioksidativno djelovanje AsA ima za posljedicu nakupljanje MDHA i DHA. Dva enzima kataliziraju oksidaciju askorbata: askorbat oksidaza (AO) i askorbat peroksidaza (APX). AsA se sintetizira u reducirajućem obliku, a zatim ju oksidira AO ili APX. AO je smještena u apoplastu i oksidira AsA u MDHA istovremeno reducirajući molekularni kisik u vodu, a povezana je s metabolizmom sastojaka stanične stijenke i rastom stanice. APX je prisutna u različitim staničnim odjeljcima, a oksidira askorbat i istovremeno reducira vodikov peroksid (H_2O_2) u vodu pri čemu se opet nakuplja MDHA. Ta reakcija je važna u zaštiti od oksidativnog oštećenja. MDHA i DHA, koji se nakupljaju kao rezultat aktivnosti AO i APX, moraju biti učinkovito reciklirani kako bi se održavala zaliha AsA u reducirajućem obliku (Slika 3.).



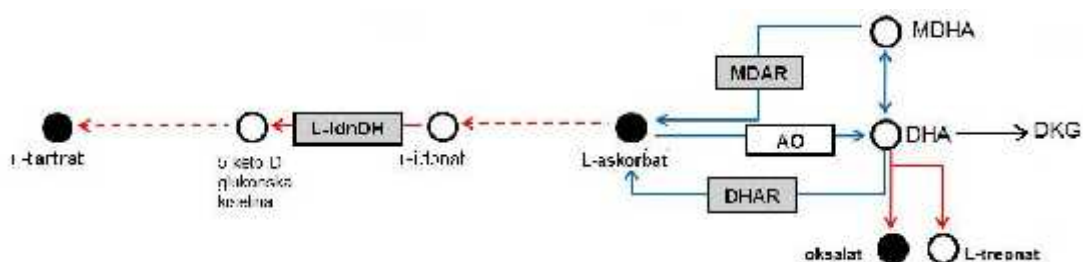
Slika 3. Recikliranje askorbinske kiseline (AsA) djelovanjem enzima MDHAR i DHAR (prilagođeno prema <http://www.hindawi.com/journals/scientifica/2013/795964/fig2/>)

Iako je biosinteza AsA raspodijeljena između citoplazme i mitohondrija, njezin katabolizam vezan je uz apoplast (Green i Fry 2005). U većini biljaka degradacija askorbata, preko DHA, daje kao produkte oksalnu kiselinu (OxA) i L-treonat (ThrO). Kristali kalcijeva oksalata akumuliraju se u specijaliziranim stanicama, idioblastima. Smatra se da je sinteza kalcijeva oksalata u biljnim tkivima povezana s regulacijom koncentracije kalcija u stanici, zaštitom od herbivora i detoksikacijom teških metala. U nekim biljkama kao što je npr. vinova loza (*Vitis vinifera*) iz porodice *Vitaceae*, točnije u njenu plodu, grožđu, askorbat degradacijom preko L-idonata daje L-tartrat (Slika 4.). Grožđe također akumulira i oksalat. Askorbat je prekursor za tartrat i u vrsti *Pelargonium crispum*, ali tu je intermedijer L-treonat, a ne L-idonat, i oksalna kiselina je nusprodukt (Franceschi i Nakata 2005). Važnost akumulacije tartrata u biljkama nije

do kraja razjašnjena. Poznato je njegovo značenje u procesu proizvodnje vina. Tartrat regulira pH vrijednost soka grožđa prilikom nastajanja vina, a dodatak tartrata minimalizira oksidativno i mikrobiološko kvarenje i pridonosi boljim organoleptičkim svojstvima vina.

Jasno je da postoji više puteva ireverzibilnog katabolizma AsA ili DHA u biljaka koji su specifični za pojedine vrste biljaka, ali točne razlike još nisu utvrđene. Iako oksalat može nastati i iz glikolata, glavni izvor za njegovu sintezu je AsA. Oksalat nastaje kada se ugljični skelet AsA cijepa između 2. i 3. ugljikovog atoma i formira se od 1. i 2. C-atoma. Za neke druge vrste, 3.-6. C-atomi formiraju L-treonsku kiselinu koja se može dalje oksidirati u tartrat. Kod npr. vrste *Vitis vinifera*, u mezokarpu grožđa, tartrat se formira od 1.-4. C-atoma nakon cijepanja intermedijera 5-keto-D-glukonske kiseline između 4. i 5. C-atoma (Green i Fry 2005).

Degradacija askorbata koja uključuje enzimatsku i/ili neenzimatsku oksidaciju do DHA može završiti, osim ireverzibilnom oksidacijom, i hidrolizom u 2,3-diketogulonat (DKG). DHA i DKG se mogu dalje oksidirati pod onakvim fiziološkim uvjetima kakvi vladaju u apoplastu. U prisustvu H_2O_2 , DHA se neenzimatski oksidira u monoanion (ciklo-oksalil-treonat) i dianion (oksalil-treonat [OxT] izomere, 3-OxT i 4-OxT) preko reaktivnog intermedijera ciklo-2,3-O-oksalil-L-treonolaktone. Samo u prisustvu esteraza iz apoplasta esteri su značajni prekursori slobodnog oksalata. Bez dodanog H_2O_2 , DHA se sporo hidrolizira u DKG. U odsutnosti H_2O_2 , DKG je relativno stabilan, ali polako prelazi 2-karboksi-L-ksilonolakton koji se reverzibilno delaktonizira u 2-karboksi-L-treo-pentonat. Dokazi za enzimsku aktivnost u katabolizmu DKG su nedostatni. Prisutnost ili AsA ili H_2O_2 onemogućuje formiranje 2-karboksi-L-ksilonolaktone što upućuje da je DKG preusmjeren u prisutnosti kompetirajućih oksidativnih puteva. Moguće je da je ovaj put prisutan u apoplastu svih biljaka (Parsons i sur. 2011). Neenzimatska oksidacija AsA je združena s produkcijom H_2O_2 što doprinosi njenoj ulozi kao prooksidansa, u ovom slučaju, koji sudjeluje u mekšanju stanične stijenke (Green i Fry 2005).



Slika 4. Katabolizam (crvene strelice) i recikliranje (plave strelice) askorbinske kiseline u biljaka. Jedini dosad poznati enzim u biosintezi tartrata je L-idonat dehidrogenaza (L-IdnDH na slici).

(prilagođeno prema

<http://www.biomedcentral.com/14712229/9/145/figure/F1?highres=y>)

4. PRIJENOS ASKORBINSKE KISELINE

Udio AsA u biljkama varira između različitih tkiva i biljnih vrsta. Fotosintetizirajuća tkiva, tkiva koja aktivno rastu (meristemi), cvjetovi, vrškovi korijenja, neki plodovi i spremišni organi obično imaju više koncentracije AsA (Gest i sur. 2013). Njezin udio se smanjuje starenjem biljke, dok je u zrelijim plodovima rajčice, *Solanum lycopersicum*, zabilježen veći udio AsA u odnosu na nezrele (Smirnoff 1996). Koncentracija AsA u biljkama ovisi o razvojnim stadijima, fiziološkom statusu biljke i okolišnim čimbenicima.

Nakon završetka biosinteze AsA u mitohondriju, ona se prenosi i akumulira u različitim staničnim odjeljcima, uključujući i apoplast. Prijenos u biljkama uključuje dva puta: unutarstanični prijenos između staničnih odjeljaka i izvanstanični prijenos u apoplast preko stanične membrane. Dobra regulacija prijenosa AsA omogućuje njezino brzo premještanje između različitih staničnih dijelova ovisno o fiziološkim, razvojnim ili metaboličkim potrebama biljke. Smatra se da je prijenos AsA od unutrašnje membrane mitohondrija do citoplazme rezultat jednostavne difuzije, dok prijenos kroz staničnu membranu i membranu kloroplasta zahtijeva specifične nosače (proteine prenositelje). Način prijenosa AsA od citoplazme do strome kloroplasta pomoću nosača je olakšana difuzija. Prijenos na tilakoidnim membranama se, međutim, ne odvija pomoću nosača već pH vrijednost i koncentracijski gradijent uvjetuju jednostavnu difuziju. Udio apoplastne AsA u listu je oko 10% ukupne koncentracije. Budući da u apoplastu nema DHAR, NADPH i glutaciona, AsA se u njemu ne može reciklirati. DHA je dominirajući oblik i mora se prenijeti kroz membranu u citosol za redukciju do AsA.

Većina AsA pri fiziološkoj pH vrijednosti je negativno nabijena pa difuzija kroz fosfolipidni dvosloj nije moguća. Iako nenabijen, DHA nije dovoljno hidrofoban za difuziju. Postoji više načina za prijenos AsA i DHA kroz membranu, a uključuje olakšanu difuziju, aktivne prenositelje koji koriste energiju pohranjenu u elektrokemijskom gradijentu protona preko membrane i AsA/DHA izmjenični prijenos. Neka istraživanja potvrdila su postojanje nosača u membranama za AsA, za njezin oksidirani oblik, DHA ili oboje iako nisu identificirani na molekularnoj razini. Ipak, pokazalo se da imaju veći afinitet za DHA (Horemans i sur. 1997). Ti proteini nosači sudjeluju u regulaciji razine i redoks-statusa AsA u apoplastu. Postoje dokazi za transmembranski prijenos elektrona u kojem sudjeluje membranski protein citokrom *b* koji može direktno reducirati MDHA nastao oksidacijom AsA u apoplastu koristeći AsA iz citoplazme kao izvor elektrona. Regulacijom prijenosa AsA održava se ravnoteža redoks para AsA/DHA između različitih staničnih odjeljaka što omogućuje koordiniranu kontrolu ključnih fizioloških procesa uključenih u odgovor na promjenu okolišnih uvjeta, stanični ciklus i promjene u staničnoj stijenci. Mehanizmi prijenosa AsA nisu do kraja razjašnjeni.

Prijenos AsA postoji i između različitih organa i tkiva i odvija se u skladu s potrebama biljke u razvoju. Iako sve stanice u biljci imaju potencijal same sintetizirati AsA, velika razlika u koncentraciji između različitih tkiva upućuje na postojanje različitog kapaciteta sinteze AsA ili određenog prijenosnog sustava. Listovi koji aktivno fotosintetiziraju imaju više koncentracije AsA od ostalih organa što im pomaže i u zaštiti od svjetlosnog stresa. Dokazano je da postoji prijenos akumuliranog askorbata iz zrelih listova-izvora putem floema do tkiva ili organa izljeva kao što su npr. vrškovi korijenja, mladi izdanci i cvjetni organi (Franceschi i Tarlyn 2002). Dodatak L-galaktono-1,4-laktona, izravnog prekursora AsA, listovima vrste *Arabidopsis* rezultirao je povećanjem koncentracije AsA u tretiranim listovima i umjereno povećanje u netretiranim tkivima izljeva iste biljke. Istraživanja o sposobnosti organa za sintezu AsA iz L-galaktono-1,4-laktona pokazala su da zreli listovi imaju veći biosintetski kapacitet i manji obrat AsA od tkiva izljeva. Rezultati upućuju da su prenositelji AsA od listova izvora do tkiva izljeva smješteni u floemu i da premještanje AsA ovisi o potrebama brzorastućih nefotosintetskih tkiva koja potrebu za njom ne mogu zadovoljiti samo putem vlastite sinteze. Biosinteza AsA u listovima izvora najvjerojatnije je ograničena dostupnošću supstrata, prije nego biosintetskim kapacitetom, a akumulacija u tkivima izljeva je u određenoj mjeri kontrolirana produkcijom u izvoru. Povećana

akumulacija AsA u nekim organima kombinacija je biosinteze *in situ* i prijenosa AsA na velike udaljenosti (Franceschi i Tarlyn 2002). Također, biosinteza AsA koja se događa u tkivu floema putem D-manoza/L-galaktoznog puta doprinosi njezinoj akumulaciji u spremišnim organima biljke (Hancock i sur. 2003).

5. ULOGE ASKORBINSKE KISELINE

5.1. Rast i razvoj biljaka

Askorbinska kiselina je važan regulator rasta biljaka koji djeluje kao kofaktor nekoliko metaboličkih enzima te uz biljne hormone sudjeluje u složenoj mreži prijenosa signala. Ona je kofaktor enzima u biosintezi etilena, giberelina i apscizinske kiseline. Osim što je antioksidans i stanični reducent, AsA utječe na prijelaz iz vegetativne u reproduktivnu fazu, te na posljednji stadij razvoja, senescenciju. Sudjeluje u regulaciji stanične diobe, rastu stanica i metabolizmu sastojaka stanične stijenke. *Vtc*-mutante vrste *Arabidopsis* i različite genetički modificirane biljke sa smanjenom biosintezom AsA imaju negativno promijenjen rast i razvoj u odnosu na divlje tipove, te su osjetljivije na stresne uvjete okoliša. Mutante bez AsA imaju letalni fenotip što ukazuje na njenu važnost u preživljavanju biljke. Razine AsA mijenjaju se s različitim razvojnim stadijima biljke. Tijekom nastanka sjemena količine AsA i njeno redoks-stanje se značajno mijenjaju od visokih razina AsA koja je tijekom ranog razvoja embrija uglavnom u reduciranom stanju, nakon čega je tijekom izduživanja stanica primijećeno povećanje razine DHA i na kraju potpuna oksidacija AsA u zrelih sjemenki. DHA se tijekom klijanja brzo reducira do askorbata što je združeno s povećanjem biosinteze AsA. Njena biosinteza se nastavlja tijekom razvoja listova, a opada smanjenjem njihove funkcije što je dio procesa starenja (Gallie 2013). Genetički modificirane biljke s iznimno niskim koncentracijama AsA imaju abnormalni razvoj vršnih pupova čime se dokida apikalna dominacija i ranije započinje razvoj bočnih pupova. Ostale promjene uključuju smeđe obojene regije na pupovima, kraće internodije, ponegdje i abnormalan rast bočnih pupova. Citološkom analizom vršnog meristema otkrivene su stanice u apoptozi. AsA je povezana i s razvojem korijena i njegovim odgovorom na gravitaciju, a u potvrdi su opet poslužile *vtc*-mutante vrste *Arabidopsis*. Glavna razlika u odnosu na divlji tip jest ta da je kod mutanti s jako niskim udjelom AsA primarno korijenje izgubilo normalan odgovor na gravitaciju, te su razvili

veći broj duljeg bočnog korijenja (Zhang 2013). AsA i enzimi vezani uz njen metabolizam moduliraju biljni rast putem nekoliko osnovnih bioloških procesa: biosinteze glikoproteina bogatih hidroksiprolinom (HRGP) potrebnih za napredovanje G1 i G2 faze staničnog ciklusa, povezivanja glikoproteina stanične stijenke i drugih polimera, te redoks reakcija na plazmatskoj membrani uključenih u izduživanje stanica.

Regulacija staničnog ciklusa

Udio AsA u meristemskim tkivima je veći nego u tkivima s neaktivnim diobama stanica kao što je npr. mirujući centar korijena u kojem su stanice u mirovanju u G1 fazi staničnog ciklusa. U tom tkivu visoka razina auksina inducira ekspresiju AO što ima za posljedicu nisku ili teško mjerljivu razinu AsA. AsA je uključena u regulaciju stanične diobe time što utječe na napredovanje iz G1 u S fazu staničnog ciklusa. Smanjenje endogenih razina AsA nepovoljno utječe na stanični ciklus i usporava rast biljke. Povećanje razine DHA ima inhibitorski učinak na napredovanje staničnog ciklusa i to samo tijekom G1 faze, ali ne G2 faze. Učinak DHA je povezan s njegovom brзом redukcijom u AsA i trošenjem GSH koji je kofaktor enzima DHAR, te s promjenama u redoks stanju stanice. Inhibicija biosinteze GSH također inhibira stanični ciklus. Međutim, povećanje razine GSH ne sprječava inhibiciju stanične diobe uzrokovanu DHA, a smanjenje razine GSH u kombinaciji s povećanom razinom DHA ima aditivan učinak u inhibiciji staničnog ciklusa, što ukazuje da su njihovi učinci neovisni. AsA utječe na napredovanje staničnog ciklusa samo u stanica koje su sposobne prijeći G1/S kontrolnu točku, a učinak je nedovoljan kod onih koje to nisu, bar u nekih vrsta (Gallie 2013). Smatra se da povećava aktivnost deoksiribonukleotid reduktaze potrebne za replikaciju molekule DNA (Mazid i sur. 2011). AsA ima utjecaj i na kalusno tkivo, podržava njegovu formaciju i preživljavanje izdanaka dobivenih iz takvog tkiva (Zhang 2013).

Utjecaj kojeg AsA ima na staničnu diobu možda najbolje predočava njezin učinak na prvu diobu zigote u tijeku ranog razvoja embrija. Povećanje endogenih razina AsA u tom slučaju dovodi do stvaranja više od dva kotiledona te dva embrija jednake veličine koji nastaju kao rezultat promijenjene polarnosti stanice i longitudinalne umjesto transverzalne diobe zigote. Spomenuti učinak AsA ograničen je na kratko razdoblje nakon formiranja zigote, te neposredno prije formiranja kotiledona (Gallie 2013).

Promjene stanične stijenke i izduživanje stanica

Askorbinska kiselina i/ili enzimi uključeni u njezinu biosintezu i metabolizam su tijesno povezani s metabolizmom sastojaka stanične stijenke i izduživanjem stanica. Enzim L-galaktoza-1-fosfat fosfataza je bifunkcionalni enzim uključen u biosintezu *myo*-inozitola i AsA. *Myo*-inozitol je metabolit s brojnim ulogama u biljnoj stanici, između ostaloga, povezan je s nastajanjem signalnih molekula potrebnih za normalan rast i razvoj biljaka, te neceluloznih polisaharida stanične stijenke. U biljaka sa smanjenom aktivnošću enzima L-galaktono-1,4-lakton dehidrogenaze, koji katalizira zadnji korak biosinteze AsA u biljaka, rast je usporen, a listovi i plodovi smanjene veličine, što je uglavnom posljedica smanjenog rasta stanica. Enzim AO je smješten u staničnoj stijenci i katalizira oksidaciju AsA u MDHA. Uključen je u rast stanica preko nekoliko mehanizama, a to su posttranslacijska dorada proteina stanične stijenke, reakcija između DHA i bočnih ogranaka aminokiselina lizina i arginina koja onemogućuje povezivanje sastojaka stanične stijenke, kontrola oksidacijskog stanja AsA/DHA redoks para. Visoka aktivnost ovog enzima zabilježena je u tkivima s brzorastućim stanicama, a može ga se inducirati svjetlošću i hormonom auksinom. To za posljedicu ima nakupljanje MDHA i DHA u staničnoj stijenci. MDHA se može reducirati transmembranskim transportom elektrona preko citokroma *b* što uzrokuje depolarizaciju plazmatske membrane i stimulira H^+ -ATP-aznu aktivnost. Prema tome, rast stanica je rezultat pojačanog mekšanja stanične stijenke i unosa iona. AsA pomaže ukloniti slobodne radikale uključene u sintezu ksilogena, regulira polimerizaciju njegovih monomera i lignifikaciju stanične stijenke. Enzim APX održava plastičnost stanične stijenke redukcijom H_2O_2 . AsA reverzibilno inhibira aktivnost apoplastnog APX, sprječava oslobađanje slobodnih radikala u apoplast i regulira lignifikaciju stanične stijenke (Zhang 2013). Lignifikacija čini staničnu stijenu čvrstom i ograničava rast stanica. AsA i DHA utječu na povezivanje proteina i polisaharida stanične stijenke dovodeći do njenog mekšanja. AsA reducira O_2 u H_2O_2 i Cu^{2+} u Cu^+ , te H_2O_2 i Cu^+ reagiraju stvarajući hidroksilne radikale koji uzrokuju cijepanje polisaharidnih lanaca, a važni su u specifičnom mekšanju stanične stijenke kao npr. pri zrenju plodova ili opadanju lišća. AsA je supstrat u biosintezi oksalata, a apoplastni oksalat utječe na povezivanje molekula pektina i na jačanje stanične stijenke vezanjem iona kalcija. Oksalat oksidaza katalizira cijepanje oksalata do CO_2 i H_2O_2 oslobađajući kalcij i H_2O_2 koji oboje doprinose čvrstoći stanične stijenke. AsA je kofaktor prolil hidroksilaze koja posttranslacijski hidroksilira prolin u strukturnim proteinima stanične stijenke, tj.

glikoproteinima bogatim hidroksiprolinom (HRGP), koji su uključeni u staničnu diobu i rast stanica (Davey i sur 2000).

Regulacija cvjetanja

Razine AsA u biljci djeluju kao endogeni signal koju utječe na vrijeme cvjetanja modulacijom ekspresije gena i metaboličkih procesa. *Vtc*-mutante vrste *Arabidopsis* ranije cvjetaju u odnosu na divlji tip neovisno o duljini dana. Takav odgovor ne može biti isključivo vezan uz malo povišenu razinu H_2O_2 i oksidativni stres u mutanti. Međutim, neke dvostruke mutante koje imaju nedovoljne količine citosolnog i tilakoidnog enzima APX podložnije su oksidativnom stresu i ranije cvjetaju (Miller i sur. 2007). Analiza transkripata pokazala je da su geni povezani sa cirkadijanim ritmom i fotoperiodizmom značajnije eksprimirani u *vtc*-mutantama nego u divljim tipovima i da to vrijedi u uvjetima i kratkog i dugog dana. Dvostruke mutante koje su i *vtc*-mutante i mutante za gene uključene u cirkadijani ritam i fotoperiodizam imale su odgođeno cvjetanje unatoč niskim razinama AsA. Niske razine AsA ne utječu na cirkadijani ritam već umjereno mijenjaju transkripciju svjetlosnih receptora što utječe na ekspresiju gena vezanih za fotoperiodizam i uzrokuje ranije cvjetanje, a tome pridonose i nešto niže razine represora cvjetanja. Egzogeno dodavanje AsA odgađa cvjetanje neovisno o fotoperiodu. Trenutno se smatra da AsA ne djeluje specifično niti u jednom procesu vezanom uz cvjetanje i možda ima općenitu ulogu u odgovoru na signale iz okoliša. Smanjivanje zaliha AsA u biljkama ima za posljedicu hormonalne promjene, promjene ekspresije gena i redoks-stanja koji se očituju u fenotipu *vtc*-mutanti (Kotchoni i sur. 2009).

Regulacija senescencije listova

Senescencija je posljednji stadij u razvoju listova. AsA sudjeluje u senescenciji biljaka stimuliranjem ekspresije SAG gena (SAG – senescence-associated genes), moduliranjem razine reaktivnih oblika kisika, te preko signalne mreže u kojoj sudjeluju i fitohormoni jer je kofaktor u njihovoj biosintezi. Niske razine AsA ubrzavaju senescenciju biljaka, a visoke odgađaju. U *vtc*-mutanti se događa rana ekspresija SAG gena, imaju manje listova i njihovo propadanje je ubrzano u usporedbi s divljim tipom, neovisno o fotoperiodu. Reaktivni oblici kisika potiču ekspresiju SAG gena. Dodavanje AsA smanjuje njihov nastanak i štetu koju prouzrokuju na fotosintetskom tkivu, te tako posljedično odgađa proces starenja. Genetički modificirane biljke u kojih je

značajno smanjena aktivnost enzima GDP-D-manoza pirofosforilaze, koji sudjeluje u biosintezi AsA, razvijaju smeđe regije po listovima i stabljikama i iznimno rano ulaze u senescenciju. To može biti i posljedica negativne regulacije gena uključenih u sintezu stanične stijenke i/ili glikozilaciju proteina (Zhang 2013).

5.2. Uloga u fotosintezi

Visoka koncentracija AsA u kloroplastima povezana je s njezinom značajnom ulogom u fotosintetskim procesima. Izloženi svjetlu, kloroplasti proizvode reaktivne oblike kisika, ROS (eng. *reactive oxygen species*), kao posljedicu prijenosa elektrona od reduciranog feredoksina u lancu prijenosa elektrona na kisik umjesto na NADP^+ . Ova fotoredukcija kisika u fotosustavu I i sveukupni prijenos elektrona od vode do molekularnog kisika predstavlja pseudociklički tok elektrona. Biljke se na ovaj način oslobađaju viška reducirajuće snage (i stvaraju ATP) u uvjetima kad je fiksacija ugljika ograničena. Taj proces ima za posljedicu stvaranje kisikovih radikala i nakupljanje H_2O_2 . Njihov suvišak u odnosu na antioksidanse dovodi do oksidativnih oštećenja. Daljnja detoksikacija H_2O_2 je nužna za normalno funkcioniranje kloroplasta. Enzim katalaza (CAT) katalizira razgradnju H_2O_2 na molekule kisika i vode. Međutim, kloroplastima nedostaje ovaj enzim, pa je AsA od esencijalne važnosti jer služi kao supstrat APX u reakciji koja reducira peroksid u vodu. Reakcija je slijedeća: $\text{H}_2\text{O}_2 + 2 \text{AsA} \rightarrow 2 \text{H}_2\text{O} + 2 \text{MDHA}$. Nastali MDHA se reducira natrag u AsA izravnim primanjem elektrona od reduciranog feredoksina ili alternativno, putem askorbat-glutationskog ciklusa. Ovaj ciklus povezuje H_2O_2 s oksidacijom NADPH nastalog fotofosforilacijom. MDHA se reducira u AsA djelovanjem NAD(P)H-ovisnog enzima MDHAR. Dio MDHA koji izbjegne ovu redukciju disproporcionira se na AsA i DHA, te se DHA reducira u AsA djelovanjem enzima DHAR što je združeno s oksidacijom dvije molekule GSH u oksidirani glutation (GSSG). Konačno, GSH se regenerira iz GSSG djelovanjem NADPH-ovisnog enzima, glutation reduktaze. Ovaj ciklus je glavni način detoksikacije H_2O_2 u kloroplastima, ali djeluje i u citosolu, peroksisomima i mitohondrijima (Gallie 2013).

AsA je kofaktor enzima violaksantin de-epoksidaze koji je smješten na luminalnoj strani tilakoida i koji stvara pigment zeaksantin de-epoksidacijom violaksantina i anteraksantina. U uvjetima ograničene količine CO_2 zeaksantin sudjeluje u rasipanju viška apsorbirane energije u obliku topline na kompleksima za hvatanje

svjetla ("antenama"). To sprječava pretjeranu redukciju feredoksina i fotooštećenje reakcijskog centra fotosustava II. U prilog tome ide i činjenica da se biosinteza AsA u biljkama povećava izlaganjem jačem osvjetljenju, a u *vtc*-mutantama je izražena fotoinhibicija i oksidativna šteta. AsA doprinosi regeneraciji α -tokoferola (vitamin E) koji je prisutan u visokim koncentracijama u fotosintetskim membranama gdje je glavni lipofilni antioksidans (Davey i sur. 2000).

5.3. Kofaktor enzima

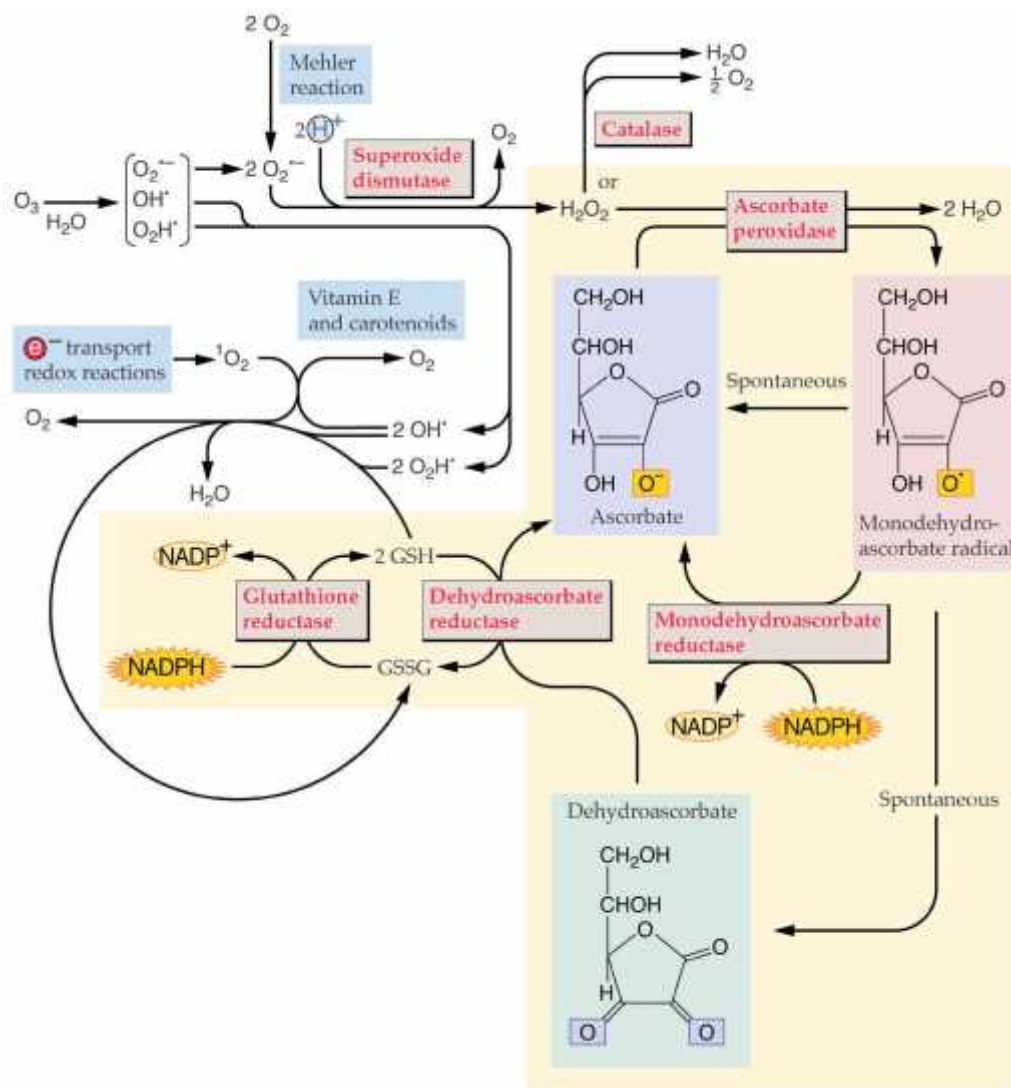
Askorbinska kiselina kao kofaktor enzima regulira i olakšava brojne neophodne reakcije u biljnom organizmu. Enzimi mono- i dioksigenaze koji imaju Cu^+ ili Fe^{2+} u aktivnom mjestu zahtijevaju AsA za maksimalnu aktivnost, a njena svrha je održavanje metalnih iona u reduciranom stanju. AsA kao kofaktor Fe^{2+} -ovisne dioksigenaze sudjeluje u posttranslacijskoj modifikaciji proteina stanične stijenke. DHA može ući u interakciju s bočnim ograncima lizina i arginina u enzimu i onemogućiti povezivanje proteina. AsA djeluje kao prostetička skupina za prolil i lizil hidroksilaze u kataliziranju sinteze hidroksiprolina i hidroksilizina, strukturnih proteina stanične stijenke. Kao kofaktor violaksantin de-epoksidaze sudjeluje u biosintezi zaštitnih pigmenata u ksantofilskom ciklusu. AsA je kofaktor različitim enzimima uključenim u sintezu etilena, giberelina i antocijanina, a također i specifično aktivira mirozinaze, obitelj enzima uključenih u obranu biljaka od herbivora. Promjena redoks-stanja AsA može imati utjecaj na aktivnost enzima kojima je ona potrebna kao kofaktor (Zhang 2013).

5.4. Antioksidativno djelovanje askorbinske kiseline

Za opstanak aerobnih organizama ključno je postojanje mehanizama koji održavaju ravnotežu oksido-redukcijskih procesa. Oksidansi su slobodni radikali tj. čestice s nesparenim elektronom u vanjskoj elektronskoj ljusci. Reaktivni oblici kisika, ROS, su superoksidni radikal (O_2^-), hidroksilni radikal ($\cdot\text{OH}$), peroksilni radikal ($\text{R}\cdot\text{O}_2$), alkoksilni ($\text{RO}\cdot$), hipokloritna kiselina (HClO), ozon (O_3), singletni kisik ($^1\text{O}_2$) i vodikov peroksid (H_2O_2). Hidroksilni radikal je najreaktivniji, a odlikuje se niskom specifičnošću prema supstratu i kratkim vremenom poluživota. On najlakše oduzima elektron okolnim molekulama. Pojam oksidativni stres označava poremećaj ravnoteže između stvaranja oksidansa i uspješnosti obrambenih sustava u organizmu da te oksidanse eliminiraju. Toksičnost koju ROS izazivaju leži u njihovoj sposobnosti da

izazivaju kaskade reakcija u kojima nastaju različiti radikali i spojevi koji dovode do oštećenja proteina, lipidne peroksidacije, oštećenja genetičkog materijala i konačno, smrti stanice. U biljaka ROS nastaju tijekom aerobnog staničnog metabolizma i fotosinteze, te pod utjecajem različitih biotičkih i abiotičkih stresnih čimbenika kao što su suša, UV zračenje, ekstremne temperature, ranjavanje, ozon i različiti patogeni organizmi. Antioksidativni mehanizmi detoksikacije ovakvih čestica mogu biti enzimski i neenzimski (Slika 5.). Enzimi koji izravnom katalizom uklanjaju ROS su superoksid dismutaza (SOD), APX, glutation peroksidaza (GPX) i CAT. AsA izravno neenzimski reagira s O_2^- , H_2O_2 , i 1O_2 , daje elektrone radikalima stvarajući pritom MDHA i DHA. Ostali niskomolekularni antioksidansi kao što su glutation, vitamin E, karotenoidi, flavonoidi, fenoli itd. također neenzimski reagiraju sa slobodnim radikalima, ali sami postaju slabo reaktivni radikali. AsA djeluje i kao sekundarni antioksidans sudjelujući u regeneraciji α -tokoferola, te zeaksantina u ksantofilskom ciklusu (Davey i sur. 2000; Zhang 2013). AsA nije najvažniji antioksidans samo u biljaka, već također sudjeluje u zaštiti sisavaca od različitih kroničnih bolesti koje imaju svoj izvor u oksidativnom stresu, pa predstavlja važan dio njihove prehrane.

Razine AsA kao i aktivnosti enzima uključenih u njezinu biosintezu brzo se mijenjaju pod utjecajem oksidativnog stresa. Niske razine antioksidansa ne mogu učinkovito spriječiti nastajanje ROS što ubrzava starenje i senescenciju. Stanične zalihe reducirane AsA koje su djelotvorne u detoksikaciji ROS su određene stopom biosinteze AsA i stopom recikliranja reducirane AsA iz njenih oksidiranih oblika u askorbat–glutationskom ciklusu. U tom ciklusu ključnu ulogu u detoksikaciji H_2O_2 ima enzim APX koji katalizira pretvorbu H_2O_2 u H_2O u kojoj je askorbat specifični donor elektrona. Udio oksidirane AsA je veći u apoplastu nego u citoplazmi. Daljnja degradacija produkata AsA rezultira stvaranjem H_2O_2 . Iako DHA može biti prenesena u citoplazmu, dio tih molekula se nastavlja dalje degradirati u staničnoj stijenci bilo enzimski ili neenzimski s konstantnom proizvodnjom H_2O_2 . To ima učinak na rast, primjerice listova ili korijena jer od H_2O_2 nastaju $^{\bullet}OH$ radikali koji sudjeluju u mekšanju stanične stijenske. Uz to, produkti daljnje degradacije DHA uključuju komponentu koja inhibira peroksidaznu aktivnost što umanjuje stopu detoksikacije H_2O_2 i vodi do njegove akumulacije u apoplastu. H_2O_2 je i signalna molekula u procesima promjene genske ekspresije, inducira direktne fiziološke učinke, a njegova uravnotežena proizvodnja ima i važnu ulogu u obrani od patogena i indukciji lokaliziranog hipersenzitivnog odgovora (Kärkönen i Fry 2006).



Slika 5. Procesi detoksikacije reaktivnih kisikovih čestica u biljaka (preuzeto iz Buchanan i sur. (2000): Biochemistry and Molecular Biology of Plants. John Wiley and Sons Ltd., Maryland.)

5.5. Regulacija odgovora na stres

Izlaganje biljaka nepovoljnim okolišnim uvjetima pospješuje nastanak ROS što može prouzročiti značajne štete unutar stanica. Stresni čimbenici mogu biti biotički (insekti, patogeni organizmi, druge biljke) i abiotički (suša, salinitet, ekstremne temperature, UV zračenje, teški metali, ozon, SO₂), a uzrokuju redoks neravnotežu i oksidativna oštećenja u biljkama. Biljke koriste enzimske i neenzimske antioksidanse u eliminaciji viška ROS. Najvažniji antioksidans koji povećava toleranciju biljaka na različite stresne uvjete je AsA. Kao što je ranije spomenuto, ona je izravno uključena u eliminaciju ROS kao donor elektrona, a u tom procesu također sudjeluju enzimi vezani

uz njen metabolizam. Oni djeluju pozitivno u obrambenom odgovoru biljke regulirajući akumulaciju AsA. Ključni enzim askorbat–glutathionskog ciklusa koji djeluje u detoksikaciji H_2O_2 je APX, a prisutan je u citoplazmi, kloroplastima, mitohondrijima i peroksisomima. Indukcija APX u citoplazmi poboljšava detoksikaciju peroksida koji je izbjegao redukciju u kloroplastima i peroksisomima. Aktivnost APX je inducirana abiotičkim stresnim čimbenicima, a rezultira povećanjem tolerancije na te čimbenike održavanjem zaliha reducirane AsA. Povećava se i aktivnost enzima CAT, SOD i GSH reduktaze. Stres izazvan povišenim koncentracijama soli naprotiv, smanjuje udio AsA u biljkama djelomično zbog ionskih i osmotskih promjena. Smatra se da je AsA u apoplastu uključena u percepciju i provođenje signala iz okoliša, te zaštitu stanične membrane. Reducirano stanje AsA kao i oksidirano stanje DHA djeluju kao signali u regulaciji interakcije između biljke i stresnih čimbenika u svrhu postizanja veće otpornosti na stres. Biljke s niskom proizvodnjom AsA su osjetljivije na različite stresne uvjete što utječe na njihov rast, razvoj i produktivnost (Zhang 2013).

Metabolizam AsA mijenja se u uvjetima infekcije patogenima i utječe na aktivaciju gena uključenih u obranu. Lokalna aktivnost CAT i APX se smanjuje tijekom napada patogena, što dovodi do supresije detoksikacije peroksida. Salicilna kiselina, koja se stvara kao odgovor na infekciju, također inhibira CAT i APX što doprinosi lokalnoj supresiji eliminacije H_2O_2 (Smirnoff 2000). Osim što ima izravni citotoksični učinak na patogene, H_2O_2 također stimulira povezivanje proteina i lignina stanične stijenke, inducira različite gene uključene u obranu, a povećana akumulacija dovodi do stanične smrti čime se sprječava širenje patogena u tkivima. *Vtc*-mutante su otpornije na infekcije, rast patogena je usporen, jače su inducirani obrambeni proteini, a razine salicilne kiseline povišene što sugerira bržu indukciju obrambenog odgovora kada su razine AsA niže (Gallie 2013).

5.6. Detoksikacija teških metala

Izlaganje biljaka višim koncentracijama teških metala (Cd, Pb, Cu, Co, Fe, Mn, Mo, Ni, Zn, Hg) dovodi do pojačanog stvaranja ROS i oksidativnog stresa što utječe na biosintezu AsA i/ili funkcionalnost AsA-GSH ciklusa. Više koncentracije metala ometaju fiziološke procese u koje je uključena AsA. Kratkotrajnim (± 24 sata) izlaganjem biljaka metalima udio reducirane AsA se povećava što upućuje na njezinu aktivnu ulogu u detoksikaciji teških metala ili ROS koji nastaju u takvim uvjetima.

Omjer DHA/AsA se pritom smanjuje. Nasuprot tome, prilikom duljeg izlaganja metalima primijećeno je smanjivanje reducirane AsA i/ili porast DHA. Dakle, povećanje vremena izlaganja i koncentracije metala rezultira smanjenjem učinkovitosti antioksidativnih mehanizama. Povećanje omjera DHA/AsA se događa i kada su biljke izložene esencijalnim elementima kao što su Cu i Zn. Međutim, postoji razlika u procesima u listu i korijenu. U korijenu uglavnom dolazi do manjeg smanjenja reducirane AsA s porastom omjera DHA/AsA dok u listovima dolazi do porasta razine AsA. Činjenica da zalihe AsA u listovima ostaju reducirane upućuje na učinkovito korištenje AsA-GSH ciklusa u listovima i postojanje signalnih molekula uključenih u indukciju odgovora na oksidativni stres koji je posljedica primanja metala korijenom. Uz to, aktivnost enzima APX i GR je pojačana. Izlaganje metalima negativno utječe na AsA-GSH ciklus stvarajući više oksidirano redoks-stanje. To potencijalno utječe na uloge AsA u staničnim diobama, sintezi stanične stijenke, diferencijaciji stanica, senescenciji i neutralizaciji ROS (Bielen i sur. 2013).

6. ZAKLJUČCI

Posljednjih godina znanje o metabolizmu i ulogama askorbinske kiseline se uvelike povećalo, te je konačno dokazano da je ona esencijalna za normalan razvoj ne samo životinja već i biljaka. Napredak genetičkog inženjerstva i genetički modificirane biljke olakšali su identifikaciju gena uključenih u metabolizam AsA i otkrivanje njenih uloga. AsA ima značajno mjesto u fiziologiji biljaka zahvaljujući prije svega svojim antioksidativnim i reduktivnim svojstvima, zatim različitim utjecajima na rast i razvoj biljaka, od klijanja sjemenki do senescencije, te regulacijom širokog spektra staničnih mehanizama reakcije na stresne čimbenike iz okoliša. Mehanizmi kojima AsA smanjuje štetne učinke abiotičkih stresnih čimbenika ipak nisu do kraja razjašnjeni. Doprinos alternativnih puteva biosinteze AsA, te pod kojim uvjetima imaju značajniju ulogu također nije do kraja istražen. Poznavanje intermedijera, gena i enzima uključenih u metabolizam AsA, te točnih mehanizama regulacije uz biotehnološka dostignuća omogućit će povećanje razine AsA u biljkama, što može osobito biti značajno za prehranu ljudi koji su evolucijski izgubili sposobnost biosinteze AsA. Osim nutritivne vrijednosti, povišenjem količine AsA u biljkama zastupljenim u poljoprivrednoj proizvodnji mogla bi se povećati njihova otpornost na stresne uvjete, a time i produktivnost usjeva. Međutim, promjene razine AsA mijenjaju ekspresiju različitih

gena u biljkama, pa se moraju uzeti u obzir sve posljedice koje bi to imalo na životni ciklus biljaka, te na mehanizme obrane od patogena. Minimaliziranje eventualnih negativnih posljedica možda može biti postignuto lokaliziranim promjenama udjela AsA u određenim stanicama ili tkivima uzimajući u obzir načine prijenosa AsA u biljkama. Od iznimne je važnosti i kontrola ekspresije gena za enzime koji sudjeluju u njenom recikliranju, posljedične promjene redoks-stanja u stanicama i interakcije s drugim antioksidansima. Kompeticija između procesa biosinteze, recikliranja i katabolizma AsA određuje udio reducirane AsA u stanicama. AsA je u nekih vrsta prekursor za sintezu oksalata i tartrata, ali točni načini regulacije i uvjeti pod kojima dolazi do njihove sinteze, te pojačane akumulacije u određenih vrsta tek trebaju biti istraženi.

7. LITERATURA

- Agius F., González-Lamothe R., Caballero J. L., Muñoz-Blanco J., Botella M. A., Valpuesta V. (2003): Engineering increased vitamin C levels in plants by overexpression of a D-galacturonic acid reductase. *Nature Biotechnology* **21**: 177-181
- Bielen A., Remans T., Cuypers A. (2013): The influence of metal stress on the availability and redox state of ascorbate, and possible interference with its cellular functions. *The International Journal of Molecular Sciences* **14**: 6382-6413
- Buchanan B., Gruissem W., Jones R. (2000): *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. John Wiley and Sons Ltd., Maryland.
- Davey M. W., Van Montagu M., Inze D., Sanmartin M. (2000): Plant L-ascorbic acid: chemistry, function, metabolism, bioavailability and effects of processing. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **80**: 825-860
- Endres S., Tenhaken R. (2009): *Myo*-inositol oxygenase controls the level of *myo*-inositol in *Arabidopsis*, but does not increase ascorbic acid. *Plant Physiology* **149**: 1042-1049
- Foyer C. H. (1993): Ascorbic acid. U: Alscher R. G., Hess J. L. (ur.) *Antioxidants in Higher Plants*. Boca Raton, CRC Press, str. 31-58.
- Franceschi V. R., Nakata P. A. (2005): Calcium oxalate in plants: formation and function. *Annual Review of Plant Biology* **56**: 41-71

- Franceschi V. R., Tarlyn N. M. (2002): L-Ascorbic acid is accumulated in source leaf phloem and transported to sink tissues in plants. *Plant Physiology* **130**: 649–656
- Gallie D. R. (2013): L-ascorbic acid: a multifunctional molecule supporting plant growth and development. *Scientifica*, volume 2013, Article ID 795964, 24 pages
- Gest N., Gautier H., Stevens R. (2013): Ascorbate as seen through plant evolution: the rise of a successful molecule? *Journal of Experimental Botany* **64**: 33–53
- Green M. A., Fry S. C. (2005): Vitamin C degradation in plant cells via enzymatic hydrolysis of 4-O-oxalyl-L-threonate. *Nature* **433**: 83-7
- Hancock R. D., McRae D., Haupt S., Viola R. (2003): Synthesis of L-ascorbic acid in the phloem. *BMC Plant Biology* **24**: 3-7
- Horemans N., Asard H., Caubergs R. J. (1997): The ascorbate carrier of higher plant plasma membranes preferentially translocates the fully oxidized (dehydroascorbate) molecule. *Plant Physiology* **114**: 1247-1253
- Kotchoni S. O., Larrimore K. E., Mukherjee M. (2009): Alterations in the endogenous ascorbic acid content affect flowering time in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **149**: 803-815
- Kärkönen A., Fry S. (2006): Effect of ascorbate and its oxidation products on H₂O₂ production in cell-suspension cultures of *Picea abies* and in the absence of cells. *Journal of Experimental Botany* **57**: 1633-1644
- Lorence A., Chevone B. I., Mendes P., Nessler C.L. (2004): Myo-inositol oxygenase offers a possible entry point into plant ascorbate biosynthesis. *Plant Physiology* **134**: 1200–1205
- Mazid M., Khan T. A., Khan Z. H., Quddusi S., Mohammad F. (2011): Occurrence, biosynthesis and potentialities of ascorbic acid in plants. *International Journal of Plant, Animal and Environmental Sciences* **1**: 167-184
- Miller G., Suzuki N., Rizhsky L., Hegie A., Koussevitzky S., Mittler R. (2007): Double mutants deficient in cytosolic and thylakoid ascorbate peroxidase reveal a complex mode of interaction between reactive oxygen species, plant development, and response to abiotic stresses. *Plant Physiology* **149**: 803–815

- Moser U., Bendich A. (1991): Vitamin C, Handbook of Vitamins. New York, Marcel Dekker, str. 195-232.
- Naidu K. A. (2003): Vitamin C in human health and disease is still a mystery? An overview. Nutrition Journal **2**: 7-16
- Parsons H. T., Yasmin T., Fry S. C. (2011): Alternative pathways of dehydroascorbic acid degradation in vitro and in plant cell cultures: novel insights into vitamin C catabolism. Biochemical Journal **440**: 375–383
- Smirnoff N., Running J. A., Gatzek S. (2004): Ascorbate biosynthesis: a diversity of pathways. In: Asard H, May JM, Smirnoff N, Vitamin C: its Functions and Biochemistry in Animals and Plants, BIOS Scientific Publishers 7-29
- Smirnoff N. (2000): Ascorbic acid: metabolism and functions of a multi-faceted molecule. Current Opinion in Plant Biology **3**: 229–235
- Smirnoff N. (1996): The function and metabolism of ascorbic acid in plants. Annals of Botany **78**: 661-669
- Wheeler G. L., Jones M. A., Smirnoff N. (1998): The biosynthetic pathway of vitamin C in higher plants. Nature **393**: 365-369
- Wolucka B. A., Van Montagu M. (2003): GDP-mannose 3',5'-epimerase forms GDP-L-gulose, a putative intermediate for the *de novo* biosynthesis of vitamin C in plants. The Journal of Biological Chemistry **278**: 47483-47490
- Zhang, Y. (2013): Ascorbic Acid in Plants: Biosynthesis, Regulation and Enhancement. New York, Springer, str. 7-28.

<http://www.as-botanicalstudies.com/content/55/1/38/figure/F1?highres=y>

<http://www.biomedcentral.com/14712229/9/145/figure/F1?highres=y>

<http://www.glenthams.com/en/products/product/GV5017/>

<http://www.hindawi.com/journals/scientifica/2013/795964/fig2/>

8. SAŽETAK

Askorbinska kiselina (AsA) je važan biljni metabolit zastupljen u biljkama u značajnim količinama i prisutan u svim staničnim odjeljcima. Ima različite esencijalne uloge u biljkama. Glavni je antioksidans, kofaktor enzima uključenih u regulaciju fotosinteze, biosintezu hormona i regeneraciju drugih antioksidansa. AsA je uključena u kontrolu stanične diobe, rasta stanica, rasta i razvoja cijele biljke što obuhvaća cvjetanje, senescenciju i razvoj korijena, te također regulira obrambeni odgovor i preživljavanje biljaka u uvjetima abiotičkog i biotičkog stresa. AsA i redoks par AsA/DHA te vezani enzimi (MDHAR, DHAR i APX) zajedno čine AsA-redoks sustav koji učinkovito štiti biljke od oksidativnog stresa uzrokovanog egzogeno- i endogeno-nastalim ROS i njihovim produktima. Dodatno, biljke mogu povisiti udio AsA kao posljedicu izloženosti stresnim uvjetima.

U biljaka su prisutni različiti putevi biosinteze AsA što odražava važnost ove molekule za biljke. Glavni je tzv. Smirnoff-Wheelerov put gdje je L-galaktono-1,4-lakton izravni prekursor AsA.

Zbog složenosti njenih brojnih uloga, svi pokušaji povišenja udjela AsA u biljkama zahtijevat će temeljito istraživanje mogućih utjecaja takvih promjena na metabolizam i razvoj biljke. Nadalje, poznavanje mehanizama regulacije metabolizma AsA još je uvijek ograničeno, a i njena uloga u prijenosima signala još treba biti razjašnjena.

9. SUMMARY

Ascorbic acid (AsA) is an abundant metabolite in plants, present in all subcellular compartments, that fulfils multiple essential functions in plants. It is a major antioxidant, cofactor for enzymes involved in regulation of photosynthesis, hormone biosynthesis and regeneration of other antioxidants. AsA is implicated in the control of cell division, cell expansion, growth and development including flowering, senescence and root development and also regulates defense response and survival of plants under abiotic and biotic stress. AsA, its redox couple AsA/DHA and related enzymes (MDHAR, DHAR and APX) together form an AsA redox system to efficiently protect plants from oxidative stress caused by exogenous and endogenously-generated ROS and

its products. In addition, plants can increase their AsA content as consequence of stress conditions.

Multiple AsA biosynthetic pathways are present in plants which reflects the importance of this molecule to plant health. The main one is so called Smirnoff-Wheeler pathway, where L-galactono-1,4-lactone is the immediate precursor of AsA.

Because of the complexity of its multiple roles, any attempts to increase AsA content in plants will require close examination of how such changes might impact the overall metabolism and plant development. Furthermore, the knowledge of regulatory mechanisms of AsA metabolism still remains limited and also, its role in signal transduction needs to be clarified.