Uloga kompatibilnih osmolita u odgovoru biljaka na osmotski stres

Bonassin, Lena

Undergraduate thesis / Završni rad

2018

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:144938

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PRIRODOSLOVNO – MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

ULOGA KOMPATIBILNIH OSMOLITA U ODGOVORU BILJAKA NA OSMOTSKI STRES

THE ROLE OF COMPATIBLE OSMOLYTES IN PLANT RESPONSE TO OSMOTIC STRESS

SEMINARSKI RAD

Lena Bonassin
Preddiplomski studij molekularne biologije
(Undergraduate Study of Molecular Biology)
Mentor: izv. prof. dr. sc. Mirta Tkalec

Zagreb, 2018.

SADRŽAJ

1. Uvod 1
2. Kompatibilni osmoliti 3
2.1. Uloga kompatibilnih osmolita 4
2.2. Aminokiseline 5
2.2.1. Prolin 5
2.3. Kvarterni amonijevi spojevi 7
2.3.1. Glicin betain 7
2.3.2. ß-alanin betain 8
2.3.3. Prolin betain 9
2.3.4. Kolin-O-sulfat 9
2.4. Tercijarni sulfonijevi spojevi 10
2.5. Šećeri 11
2.5.1. Trehaloza 11
2.6. Šećerni alkoholi 12
2.6.1. Manitol 12
2.6.2. Myo-inozitol 12
3. Istraživanje i primjena znanja o kompatibilnim osmolitima 14
4. Zaključak 16
5. Literatura 17
6. Sažetak 20
7. Summary 20

1. Uvod

Biljke su tijekom rasta i razvoja izložene različitim okolišnim uvjetima, od kojih neki predstavljaju stres za samu biljku. Nepovoljni uvjeti mijenjaju fiziološke procese biljke, utječu na metabolizam, rast i razvoj te dovode do promjena na staničnoj i molekularnoj razini. Osmotski stres predstavlja uvjete u kojima je smanjena dostupnost vode za biljku, smanjena je apsorpcija vode ili povećana dehidracija stanica. Do osmotskog stresa mogu dovesti razni abiotički faktori kao što su povišeni salinitet, suša ili ekstremne temperature (Szekely, 2007; Zhu i sur., 1997). Takvi uvjeti narušavaju vodni potencijal u biljci te je primanje vode otežano. Smanjena količina vode dovodi do smanjenja stanica i opuštanja stanične stijenke. Jedan od prvih učinaka osmotskog stresa je smanjenje turgora (Taiz i Zeiger, 2002). U osmotskom stresu dolazi do smanjenja rasta biljke, ekspanzije listova i razvoja korijena, smanjenja mase te smanjenja stope fotosinteze što otežava preživljavanje biljke. Također dolazi do promjene u lipidnom i proteinskom sastavu membrana te funkciji membranskih proteina, nosača i signalnih molekula (Slama i sur., 2015).

Odgovor na stres se javlja na morfološkoj, molekularnoj i staničnoj razini, na razini ekspresije gena te na razini cijele biljke u obliku razvojnih promjena, prilagodbe transporta iona te metaboličkih promjena (Xiong i Zhu, 2002). Ekspresija gena koji se aktiviraju u odgovoru na stres ovisi i o razvojnim čimbenicima, dobi i vrsti tkiva. Tijekom osmotskog stresa dolazi do aktivacije raznih signalnih puteva koji dovode do promjena u staničnom odgovoru, sinteze proteina uključenih u odgovor na stres, antioksidansa ili nakupljanja kompatibilnih osmolita (Szekely, 2007; Zhu i sur., 1997).

Geni koji se induciraju pod uvjetima stresa kako bi se smanjile štetne posljedice osmotskog stresa kodiraju proteine LEA (engl. *late embryogenesis abundant*). Proteini LEA se eksprimiraju u vegetativnim tkivima tijekom uvjeta manjka vode. Uloga proteina LEA je zadržavanje vode, sekvestracija iona te molekulskih šaperona. Također dolazi do ekspresije mnogih membranskih transportera i kanala koji prenose vodu kako bi se kontrolirao prijenos vode u uvjetima kada nedostaje. Kako osmotski stres proteine čini podložnijima agregaciji i denaturaciji dolazi i do nakupljanja proteina toplinskog šoka (HSP, engl. *heat shock protein*) koji štite stanične proteine (Zhu, i sur., 1997). Dolazi i do povećane sinteze antioksidacijskih enzima i spojeva koji neutraliziraju reaktivne oblike kisika (ROS, engl. *reactive oxygen species*) stvorene zbog sekundarnog oksidativnog stresa (Xiong i Zhu, 2002).

Jedan od važnijih odgovora je i osmotska prilagodba u kojoj sudjeluju kompatibilni osmoliti. Kako bi se u biljci primanje vode odvijalo nesmetano, vodni potencijal stanica mora biti niži od potencijala tla. Osmotska prilagodba omogućava smanjenje vodnog potencijala bez smanjenja turgora i smanjenja volumena stanica (Taiz i Zeiger, 2002). Kako bi se osmolarnost povećala i smanjio vodni potencijal, u stanicama dolazi do sinteze kompatibilnih osmolita, povećava se ulazak vode u stanicu što održava turgor pozitivnim i omogućava normalno odvijanje fizioloških procesa (Hare i sur., 1998). Također, tijekom uvjeta stresa, povećana je koncentracija nabijenih molekula u citosolu koje narušavaju hidratacijske plašteve makromolekula te utječu na promjenu konformacije i funkciju. Osmoliti koji se sintetiziraju zadržavaju konformaciju makromolekula stabilnom. Takvi spojevi ne utječu na samu funkciju makromolekula već smanjuju osmotski potencijal olakšavajući apsorpciju vode i održavajući ionsku homeostazu (Xiong i Zhu, 2002). Za razliku od osmolita, ioni koji se također nakupljaju za održavanje osmotskog potencijala, se zbog interferencije sa staničnim aktivnostima, destabilizacije proteina i nukleinskih kiselina, kompartimentiziraju u vakuolu (Yancey, 2005; Zhu i sur., 1997).

Sinteza svih proteina i osmolita pod indukcijom je okolišnih uvjeta. Smanjeni vodni potencijal stanice, uzrokovan gubitkom vode, dovodi do smanjenja turgora što je mehanizam kojim stanica percipira osmotski stres. Osim promjene turgora dolazi do narušavanja interakcija između membrane i stanične stijenke te promjena u konformaciji membranskih proteina. Takve promjene djeluju kao signal stanici za uvjete u kojima se nalazi. Osim primarnih promjena i signala, postoje sekundarni signali koji sudjeluju u aktivaciji odgovora na stres, razni hormoni, sekundarni glasnici i reaktivni oblici kisika (Xiong i Zhu, 2002; Zhu i sur., 1997).

2. Kompatibilni osmoliti

Osmoliti su organske molekule niske molekulske mase. Molekule koje imaju ulogu osmolita su raznolika skupina spojeva koji mogu biti aminokiseline, tercijarni sulfonijevi spojevi, kvarterni amonijevi spojevi, šećeri i šećerni alkoholi. Nakupljaju se u citoplazmi, gdje održavaju osmotski potencijal i fiziološku aktivnost stanice te je njihova biosinteza pod utjecajem okolišnih signala. Kompatibilni osmoliti su visoko topljive molekule koje ne narušavaju normalne metaboličke reakcije u stanici te nisu toksične za stanicu i biljku po čemu i dobivaju ime jer su u skladu sa staničnim metabolizmom. Njihova se sinteza može regulirati, povećavati i smanjivati bez negativnog utjecaja na stanicu (Yancey, 2005).

Spojevi koji u biljci imaju ulogu kompatibilnog osmolita pokazuju određena, zajednička svojstva. U uvjetima stresa, kada dolazi do smanjenja u vodnom potencijalu, uočljiv je porast koncentracije organskih molekula male molekulske mase. Takve molekule pokazuju ulogu u zaštiti od dehidracije te smanjuju negativne učinke stresa na biljku. Važna je karakteristika da se sporo kataboliziraju kako bi biljka što duže mogla tolerirati stresne uvjete bez potrebe za potrošnjom energije za sintezu novih osmolita (Rathinasabapathi i sur., 1997). Osim zaštitne uloge, kompatibilni osmoliti mogu služiti u redukcijskim reakcijama i kao izvor ugljika i dušika nakon prestanka stresnih uvjeta (Hare i sur., 1998). Unutar stanice, osim regulacije osmotskog potencijala, osmoliti imaju važnu ulogu u očuvanju makromolekulskih i staničnih struktura te neutralizaciji reaktivnih oblika kisika. U uvjetima niske temperature sprječavaju smrzavanje unutarstanične tekućine (Hare i sur., 1998; Slama i sur., 2015; Yancey, 2005).

U biljkama dolazi do akumulacije više vrsta osmolita istovremeno, a njihova količina ovisi o staničnom odjeljku i organu biljke u kojem dolazi do nakupljanja, razvojnom stadiju biljke i okolišnim uvjetima u kojima se biljka nalazi: količini svjetlosti, dostupnosti kisika i količini prisutnih ugljikohidrata (Hare i sur., 1998). Način na koji kompatibilni osmoliti sudjeluju u obrani od stresnih uvjeta određen je nakupljanjem, reguliranom biosintezom i katabolizmom te kraćim ili dužim vremenskim periodom nakupljanja. Neki se osmoliti sintetiziraju brzo, a kataboliziraju sporo te se njihove koncentracije učestalo mijenjaju dok je katabolizam drugih spor te se nakupljaju na duže vrijeme. Osim krajnjeg produkta biosinteze osmolita, ulogu u toleranciji stresa mogu imati nusprodukti raznih koraka puta biosinteze (Slama i sur., 2015).

Različite biljke mogu akumulirati različite osmolite, a takva raznolikost može biti posljedica različitog metabolizma biljke i tla na kojem se nalazi. Na primjer, biljke koje imaju ograničen izvor i korištenje dušika nakupljaju šećere i sulfonijeve spojeve kao osmolite (Yancey, 2005). Biljke koje rastu na tlu visokog saliniteta nakupljaju kvarterne amonijeve spojeve kao što su kolin-O-sulfat, glicin betain ili ß-alanin betain. U suhim tlima biljke najviše nakupljaju glicin betain, dok u tlima koja sadrže sulfate biljke najviše akumuliraju kolin-O-sulfat. Šećeri se kao kompatibilni osmoliti više nakupljaju u jednosupnicama nego u dvosupnicama. U sušnim uvjetima žitarice nakupljaju najviše šećera i aminokiselinu prolin, a mahunarke šećerne alkohole i prolin (Szabados i sur., 2011).

Osim sinteze u uvjetima osmotskog stresa, osmoliti se sintetiziraju uslijed raznih drugih stresnih uvjeta za biljku, tako na primjer pružaju zaštitu od oštećenja uzrokovanih UV svjetlom ili smanjuju stopu lipidne peroksidacije uzrokovanu prisutnošću teških metala (Szabados i sur., 2011).

2.1. Uloga kompatibilnih osmolita

Nakupljanje osmolita predstavlja specifični odgovor na uvjete stresa u kojima se biljka nalazi. Osmoliti smanjuju osmotski i vodni potencijal u stanici u odnosu na onaj izvan stanice kako bi pridonijeli stabilnosti i na taj način očuvali sadržaj vode u tkivu. Također, smanjeni vodni potencijal u odnosu na tlo omogućava primanje vode koje je u uvjetima stresa onemogućeno. U slučaju kad bi se vodni potencijal stanice regulirao samo smanjenjem sadržaja vode, došlo bi do oštećenja tkiva i smanjenja turgora, a održavanje turgora konstantnim omogućava kontinuirani rast stanice i biljke u cjelini (Hare i Cress, 1997; Slama i sur., 2015).

Regulacija osmotskog i vodnog potencijala postiže se kompartimentacijom iona u vakuoli te sintezom i nakupljanjem kompatibilnih osmolita u citoplazmi. Osim u citoplazmi, osmoliti se mogu nalaziti u kloroplastima ili drugim staničnim odjeljcima u manjim količinama.

Uloga osmolita je i u stabilizaciji makromolekulskih struktura i održavanju nativne strukture proteina i membrana u uvjetima u kojima dolazi do denaturacije proteina. Povećanjem koncentracije osmolita, povećan je broj vodikovih veza koje daju termodinamičku stabilnost u odnosu na hidrofobne interakcije koje istu narušavaju. Osmoliti ostvaruju interakcije s kosturom proteina, a ne s bočnim ograncima proteina što omogućava nespecifičnost i vezanje na mnoge različite proteine unutar stanice (Szabados i sur., 2011). Neki od osmolita imaju ulogu molekulskih šaperona, mogu regulirati smatanje proteina, sprječavati agregaciju proteina,

stabilizirati enzime u uvjetima visoke temperature i drugim stresnim uvjetima (Slama i sur., 2015).

U uvjetima osmotskog stresa, suše i visokog saliniteta dolazi do stvaranja i nakupljanja ROS. Osmoliti mogu onemogućiti stvaranje ROS, tako da ih direktno neutraliziraju ili štiteći antioksidativne enzime te se zbog toga mogu smatrati neenzimatskim antioksidansima (Ozgur i sur., 2012). Također, prolin i glicin betain, regulacijom metaboličkih procesa i aktivnosti gena, kao što je indukcija ekspresije gena enzima katalaze i peroksidaze, sudjeluju u sprječavanju stanične smrti tijekom stresa (Szabados i sur., 2011).

2.2. Aminokiseline

U uvjetima abiotičkog stresa dolazi do nakupljanja raznih aminokiselina koji imaju ulogu kompatibilnih osmolita: prolin, arginin, glicin, glutamin, asparagin, valin te neproteinske aminokiseline. Kao inaktivne molekule sintetiziraju se primarnim metaboličkim putevima te se njihova koncentracija može povećati zbog katabolizma koji je učestaliji u uvjetima stresa (Burg i Ferraris, 2008; Hildebrandt i sur., 2015). U biljkama koje su izložene osmotskom stresu povećava se koncentracija slobodnih aminokiselina u citoplazmi te u vakuoli. U biljci špinata je pokazano kako dolazi do porasta koncentracije prolina, glicina i serina u listovima u prvim fazama solnog stresa, no kada je stres produženog trajanja i razine soli jako visoke, nije uočena uloga tih aminokiselina u regulaciji osmotskog potencijala (Di Martino i sur., 2003). U stresu, aminokiseline mogu imati i uloge signalnih molekula te su prekursori biljnih hormona i sekundarnih metabolita (Hildebrandt i sur., 2015). Prolin se najčešće akumulira kao kompatibilni osmolit, najraširenij je među biljnim vrstama i zato je najviše proučavan.

2.2.1. Prolin

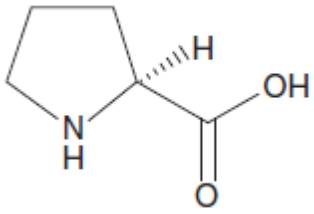
U biljkama u uvjetima stresa je nakupljanje prolina posljedica samog stresa, ali i dio metaboličkog sustava za obranu od stresa (Szabados i sur., 2011). Prolin (slika 1) se sintetizira iz glutamata ili iz ornitina, međutim u uvjetima osmotskog stresa glavni prekursor za sintezu je glutamat. Enzimi za sintezu lokalizirani su u citosolu i plastidima, dok se razgradnja odvija u mitohondrijima. Kontrola nakupljanja prolina kao kompatibilnog osmolita uključuje povećanu sintezu i smanjenu razgradnju regulacijom transkripcije enzima Δ^1-pirulin-5-karboksilat reduktaza, zadnjeg enzima u biosintezi i smanjenjem ekspresije prolin dehidrogenaze, prvog enzima u razgradnji (Rhodes i sur., 2002; Verbruggen i Hermans, 2008). Istraživanjem na vrsti *Arabidopsis thaliana* pokazalo se da inaktivacijom enzima Δ^1-pirulin-5-karboksilat reduktaze,

dolazi do smanjenja sinteze i nakupljanja prolina, biljke su postale osjetljive na stres te je došlo do stvaranja više reaktivnih oblika kisika i produkta lipidne peroksidacije. S druge strane, povećanjem ekspresije enzima za sintezu prolina povećalo se nakupljanje te aminokiseline (Szabados i sur., 2011). U drugim istraživanjima proučavano je kako prolin, koji se egzogeno dodaje u medij u kojem biljke rastu, utječe na njih. Međutim, pokazalo se da egzogeno dodavanje prolina za biljku *Arabidopsis thaliana* ima negativan utjecaj jer je utvrđeno povećano nakupljanje reaktivnih oblika kisika, smanjeni rast i smanjena tolerancija na stresne uvjete. Dodavanje prolina može uzrokovati i staničnu smrt zbog toksičnosti, no nije poznato uzrokuje li toksičnost egzogeni prolin ili nakupljanje razgradnog produkta pirulin-5-karboksilata (Verbruggen i Hermans, 2008).

Prolin sudjeluje u smanjenju kiselosti citoplazme te održavanju omjera $NADP^+$/NADPH povoljnim za odvijanje metaboličkih reakcija kao što su stanično disanje, fotosintetske reakcije te reakcije puta pentoza fosfata. Naime, tijekom uvjeta stresa puči su zatvorene, čime je smanjena dostupnost atmosferskog CO_2 te je smanjeno iskorištavanje NADPH u Calvinovom ciklusu. Aktivnost pirulin-5-karboksilat sintaze reciklira $NADP^+$, zadnjeg akceptora u lancu prijenosa elektrona kako bi se fotosintetski procesi odvijali neometano i smanjila količina reaktivnih oblika kisika. Također, $NADP^+$ je potreban za enzime puta pentoze fosfata što omogućava normalnu sintezu purina i cjeloukupni metabolizam biljke (Slama i sur., 2015; Verbruggen i Hermans, 2008). Prolin sudjeluje i u neutralizaciji reaktivnih oblika stabilizacijom antioksidacijskih enzima kao što su askorbat peroksidaza i glutation reduktaza (Szabados i sur., 2011). Prolin ne pokazuje ulogu neenzimatskog antioksidansa u prisutnosti svih ROS jer je utvrđeno da neutralizira hidroksilni radikal i vodikov peroksid (Szabados i Savoure, 2009), dok u prisutnosti singletnog kisika ne pokazuje takvu funkciju (Ozgur i sur., 2012).

Prolin kao molekulski šaperon stabilizira strukturu proteina, a ima ulogu i u prijenosu reducirajućih ekvivalenata između staničnih odjeljaka te služi za skladištenje dušika i ugljika (Rhodes i sur., 2002). Osim u uvjetima osmotskog stresa, do nakupljanja prolina dolazi u uvjetima oksidativnog stresa te zbog prisutnosti viška teških metala (Szabados i Savoure, 2009), zaraze patogena, onečišćenja atmosfere i UV zračenja. Izlaganje teškim metalima dovodi do stvaranja ROS u stanicama i smanjenja vodnog potencijala što dovodi do sinteze prolina kao kompatibilnog osmolita (Schat i sur., 1997). Prisutnost vodikovog peroksida u stanici u uvjetima stresa također inducira ekspresiju gena Δ^1-pirulin-5-karboksilat reduktaze (Yang i sur., 2009). U uvjetima stresa koncentracije prolina u stanici mogu biti i do 100 puta veće nego u normalnim uvjetima. Prolin se tijekom stresa u najvećim koncentracijama nakuplja u

cvjetovima i polenu u koje se, transportom prolina, prenose dušik i ugljik, a najmanjim u korijenu iz kojeg se transportira ksilemom u izdanke (Verbruggen i Hermans, 2008).



Slika 1. Molekulska struktura prolina. Preuzeto iz Slama i sur. (2015).

2.3. Kvarterni amonijevi spojevi

U biljkama se kao kompatibilni osmoliti nakupljaju i kvarterni amonijevi spojevi: glicin betain, ß-alanin betain, prolin betain, kolin-O-sulfat, hidroksiprolin betain (Slama i sur., 2015). To su spojevi koji imaju u potpunosti supstituirani dušikov atom, tvoreći pozitivan naboj na tom atomu (Rhodes i Hanson, 1993).

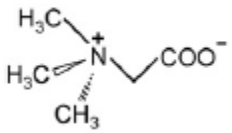
2.3.1. Glicin betain

Glicin betain (slika 2) je kvarterni amonijev spoj koji se najčešće sintetizira u biljkama kao kompatibilni osmolit u uvjetima osmotskog stresa, posebice u uvjetima visokih ili niskih temperatura. Pretežito se sintetizira iz kolina pomoću enzima kolin monooksigenaze i betain aldehid dehidrogenaze koji se nalaze u stromi kloroplasta. Nakuplja se u kloroplastu gdje ima ulogu u očuvanju fotosintetskog sustava, posebice fotosustava II i proteina D1 te u stabilizaciji tilakoidnih membrana. Stvaranjem slabih interakcija s karboksilnim skupinama membranskih proteina, glicin betain štiti tilakoidne membrane od negativnog utjecaja sniženih temperatura (Fariduddin i sur., 2013). Očuvanjem fotosintetskog aparata, smanjuje se nakupljanje reaktivnih oblika kisika što čini glicin betain neenzimatskim antioksidansom. Također može pojačati aktivnost antioksidacijskog enzima katalaze i tako smanjiti razinu reaktivnih oblika kisika i oštećenja uslijed stresa. U korijenu štiti membrane od povišene temperature i destabilizacije (Rhodes i Hanson, 1993; Szabados i sur., 2011).

Glicin betain se u biljkama ne katabolizira aktivno, stoga se kontrola koncentracije odvija na razini sinteze (Rhodes i sur., 2002; Slama i sur., 2015). Djelovanje glicin betaina važno je tijekom razmnožavanja jer štiti reproduktivne organe koji su posebno osjetljivi na

okolišne stresne uvjete (Szabados i sur., 2011). U korijenu, nakupljanjem glicin betaina, dolazi do povećanja broja vakuola u koje se skladišti višak iona te tako sprječava njihov prijenos u izdanke (Ashraf i Foolad, 2007).

Glicin betain se nakuplja u mnogim biljkama kao što su *Hordeum vulgare*, *Zea mays* i *Spinacia oleracea* te halofitske vrste iz roda *Limonium* u kojima ima ulogu kompatibilnih osmolita (Fariduddin i sur., 2013; Szabados i sur., 2011). Međutim mnoge biljke koje imaju važnu ulogu u poljoprivredi, kao što su riža (*Oryza sativa*), krumpir (*Solanum tuberosum*), rajčica (*Solanum lycopersicum*), ne nakupljaju glicin betain što ih čini podložnima nepovoljnim uvjetima koji uzrokuju osmotski stres (Park i sur., 2004; Wani i sur., 2013).

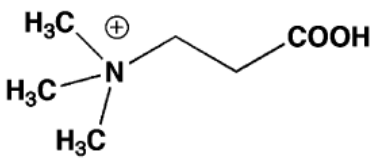


Slika 2. Molekulska struktura glicin betaina. Preuzeto iz Larher i sur. (2009).

2.3.2. ß-alanin betain

ß-alanin betain (slika 3) se sintetizira u uvjetima osmotskog stresa, ali i u uvjetima nedostatka kisika (Szabados i sur., 2011). Postoji više različitih puteva sinteze ß-alanin betaina, a najčešći je N-metilacijom neproteinske aminokiseline ß-alanina (Rathinasabapathi i sur., 1997). Smatra se da je kao osmolit prikladniji za zaštitu od visokog saliniteta u anoksičnim uvjetima od glicin betaina jer za prvi korak sinteze nije potreban kisik te predstavlja adaptaciju na anoksične uvjete. Također sintezom ß-alanin betaina izbjegava se kompeticija za kolin koji je prekursor sintetize glicin betaina i kolin-O-sulfata. Put biosinteze ß-alanin betaina aktivan je u listovima i korijenu (Rhodes i sur., 2002; Rhodes i Hanson, 1993).

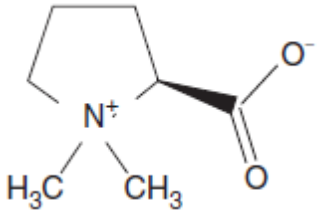
U biljkama se ß-alanin betain sintetizira s istim ulogama kao i glicin betain što je pokazano na biljkama roda *Limonium* koje nakupljaju samo jedan od ta dva osmolita (Hanson i sur., 1991).



Slika 3. Molekulska struktura ß-alanin betaina. Preuzeto iz Li i sur. (2010).

2.3.3. Prolin betain

Prolin betain (Slika 4) se kao kompatibilni osmolit nakuplja u mnogim biljnim vrstama iz različitih porodica. Sintetizira se N-metilacijom iz prolina, a nakuplja se kao dugoročni odgovor na uvjete povišenog saliniteta (Rhodes i sur., 2002; Slama i sur., 2015). Sintetizira se i sudjeluje u osmotskoj regulaciji tek nakon nakupljanja drugih osmolita kao što je prolin, no razlog takvog mehanizma nakupljanja nije razjašnjen. U vrsti *Medicago sativa* pokazano je kako se prolin nastavlja nakupljati i nakon što je sintetiziran prolin betain. Prolin betain ima ulogu održavanja turgora kako bi se omogućio normalan rast tijekom stresnih uvjeta (Trinchant i sur., 2004).

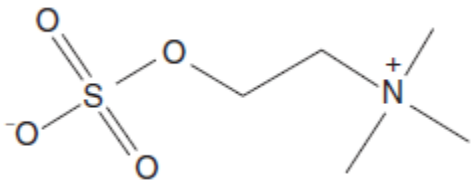


Slika 4. Molekulska struktura prolin betaina. Preuzeto iz Slama i sur. (2015).

2.3.4. Kolin-O-sulfat

Kolin-O-sulfat (slika 5) se sintetizira u vrstama porodice Plumbaginaceae iz kolina pomoću enzima kolin sulfotransferaza koji je induciran u stresnim uvjetima. Sinteza se odvija u korijenu i u listovima (Rhodes i sur., 2002). Konjugacija sulfata s kolinom predstavlja mehanizam detoksifikacije sulfata (Hanson i sur., 1991). Prekursor sinteze kolin-O-sulfata, kao i glicin betaina je kolin što dovodi do kompeticije u biosintezi.

Zbog te kompeticije u biljkama su evoluirali alternativni putevi biosinteze betaina koji ne koriste kolin kao početni supstrat nego se sintetizira ß-alanin betain i prolin betain (Rhodes i sur., 2002).



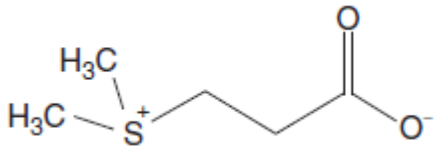
Slika 5. Molekulska struktura kolin-O-sulfata. Preuzeto iz Slama i sur. (2015).

2.4. Tercijarni sulfonijevi spojevi

Tercijarni sulfonijev spoj koji se u biljkama sintetizira kao kompatibilni osmolit je dimetilsulfonijpropionat (DMSP) koji sadrži potpuno metilirani sumporov atom (Rhodes i Hanson, 1993).

Dimetilsulfonijpropionat (slika 6) je osmolit kojeg u velikim količinama sintetizira samo mali broj viših biljaka, vrste iz rodova *Spartina* i *Saccharum* te dvosupnica *Wolastonia biflora*. Sintetizira se iz S-metil metionina, a ima ulogu detoksikacije viška sumpora i ulogu antioksidansa. Sinteza se odvija u citoplazmi i u kloroplastu. DMSP je lokaliziran najviše u fotosintetskom tkivu, međutim prisutan je u manjim količinama u korijenu i stabljici (Otte i sur., 2004).

Njegova moguća uloga u osmoregulaciji uočena je zbog velike strukturne sličnosti s glicin betainom. Ulogu u osmoregulaciji DMSP ostvaruje bez promjene koncentracije na razini tkiva već transportom između citoplazme i vakuole ovisno o osmotskom potencijalu (Slama i sur., 2015). S obzirom da spoj ne sadrži dušik, smatra se da se kao kompatibilni osmolit nakuplja u biljkama koje se nalaze u okolišu s manjkom dušika te ne mogu sintetizirati osmolite koje sadrže dušik kao što su prolin ili betaini (Rhodes i sur. 2002). S obzirom da se spoj sintetizira najviše u morskim algama, a malo je biljnih vrsta koje sintetiziraju DMSP, njegove uloge mogu biti raznolike u različitim vrstama te nisu u potpunosti istražene. Nakupljanje DMSP u algama polarnih regija, može ukazivati na ulogu ovog spoja u zaštiti od hladnoće, što još nije dokazano (Otte i sur., 2004).



Slika 6. Molekulska struktura dimetilsulfopropionata. Preuzeto iz Slama i sur. (2015).

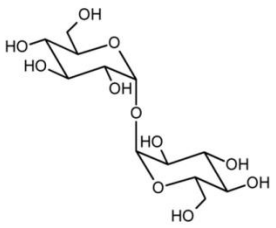
2.5. Šećeri

Šećeri koji se nakupljaju u uvjetima abiotičkog stresa osim uloge u osmotskoj prilagodbi i stabilizaciji membrana, imaju važne regulatorne funkcije. Održavaju rast provodnog tkiva, pomažu u regulaciji transkripcije te ekspresiji gena uključenih u fotosintezu, stanično disanje i metabolizam škroba i saharoze. Najviše se pojavljuju kod onih biljaka koje se nalaze u okolišu gdje je potrebna tolerancija na niske temperature. Dodatno, nakupljanjem šećera biljka skladišti spojeve bogate energijom koje može iskoristiti tijekom produljenih uvjeta stresa. S obzirom na različite uloge koje šećeri imaju u metabolizmu biljaka, otežano je razjašnjavanje njihove uloge i mehanizama u kojima djeluju kao kompatibilni osmoliti. Šećeri koji imaju ulogu osmolita u biljkama su saharoza, trehaloza te monomeri glukoza i fruktoza (Slama i sur., 2015; Yancey, 2005).

2.5.1. Trehaloza

Trehaloza (slika 7) je nereducirajući disaharid, visoke topljivosti, ali kemijski nereaktivan što omogućava njegovu ulogu kompatibilnog osmolita s obzirom da ne ometa stanični metabolizam niti u visokim koncentracijama. Trehalozu nakupljaju mnoge biljke u uvjetima osmotskog stresa, ali i u raznim interakcijama s mikrobima. Sintetizira se iz UDP glukoze i glukoze-6-fosfata, a razgrađuje u glukozu (Slama i sur., 2015).

Trehaloza stabilizira membrane zamjenjujući molekule vode u strukturi (Yancey, 2005), štiti proteine u dehidriranom tkivu te ima funkciju molekulskog šaperona. Povećanjem koncentracije trehaloze u stanici, biljka postaje otpornija na uvjete povišenog saliniteta, suše i hladnoće te su smanjena fotooksidativna oštećenja. Međutim, transgenične biljke koje konstitutivno nadeksprimiraju gene za sintezu trehaloze, pokazuju smanjeni rast i abnormalnu strukturu korijena. Takve promjene se događaju zbog signalne uloge trehaloze u regulaciji homeostaze ugljikohidrata i energije, stoga se smatra da trehaloza ima zaštitnu ulogu samo u nekim tkivima (Szabados i sur., 2011).



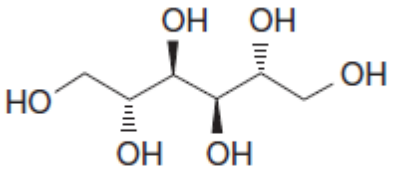
Slika 7. Molekulska struktura trehaloze. Preuzeto iz Walmagh i sur. (2015).

2.6. Šećerni alkoholi

Šećerni alkoholi su reducirani oblici šećera aldoze i ketoze (Noiraud i sur., 2001). Mogu biti ciklički ili aciklički polioli. U biljkama se nakupljaju manitol, pinitol, sorbitol, glicerol, inozitol, myo-inozitol te je njihova uloga dvojaka. Sintetiziraju se u listovima iz kojih se transportiraju u sva ostala tkiva. Osim što održavaju osmotsku ravnotežu, sudjeluju u regulaciji redoks sustava i sprječavaju aktivaciju enzima induciranu toplinom. Njihove hidroksilne skupine zamjenjuju vodu u vodikovim vezama u uvjetima dehidracije stanice štiteći enzimsku aktivnost i membrane. Myo-inozitol je najviše proučavan među poliolima jer se nakuplja u najvećim količinama (Noiraud i sur., 2001; Slama i sur., 2015; Szabados i sur., 2011).

2.6.1. Manitol

Manitol, aciklički poliol (slika 8) , najčešći je šećerni alkohol u biljkama te je važan fotosintetski produkt. Prekursor sinteze je fruktoza-6-fosfat, dok je produkt katabolizma manoza. Njegova uloga je stabilizacija strukture makromolekula i neutralizacija reaktivnih oblika kisika. Uloga manitola u zaštiti biljke od osmotskog stresa dokazana je nadekspresijom enzima za sintezu u biljkama duhana i pšenice, što je povećalo nakupljanje manitola i toleranciju biljaka na stres (Slama i sur., 2015; Szabados i sur., 2011).



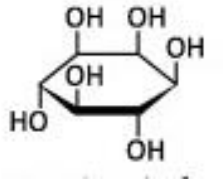
Slika 8. Molekulska struktura manitola. Preuzeto iz Slama i sur. (2015).

2.6.2. Myo-inozitol

Myo-inozitol je esencijalan poliol (slika 9) u biljkama, najčešći među izomerima inozitola. Prekursor sinteze je glukoza-6-fosfat, a konačni produkt se koristi za sintezu svih spojeva koji sadrže inozitol. Gen za enzim myo-inozitol-1-fosfat sintazu koji sudjeluje u biosintetskom putu myo-inozitola je reguliran okolišnim signalima u uvjetima suše, topline, hladnoće, povećane količine svjetlosti i apscizinskom kiselinom.

Indukcija gena myo-inozitol-1-fosfat sintaze i nakupljanje myo-inozitola u uvjetima solnog stresa dokazana je u halofitu *Mesembryanthemum crystallinum*, koji može rasti u tlima povećanog saliniteta, dok u glikofitu *Arabidopsis thaliana,* koji nije tolerantan na takve uvjete, nije prisutno nakupljanje (Szabados i sur., 2011).

Myo-inozitol ima ulogu u zaštiti biljnih struktura te signalnu ulogu za unos natrija u korijen i prijenos do listova s obzirom da je natrij potreban za indukciju gena za sintezu myo-inozitola. Fosforilirani derivati myo-inozitola su važni signalni spojevi i sudjeluju u mnogim regulatornim putevima, kontroli razvoja biljke te u mehanizmima odgovora na biotičke i abiotičke stresove (Rhodes i sur., 2002; Szabados i sur., 2011).



Slika 9. Molekulska struktura myo-inozitola. Preuzeto iz Schneider (2015).

3. Istraživanje i primjena znanja o kompatibilnim osmolitima

Osmotski stres uzrokovan sušom, visokim salinitetom ili ekstremnim temperaturama, predstavlja problem u poljoprivredi i proizvodnji biljaka i hrane. Genskom manipulacijom gena za sintezu i razgradnju osmolita, hormona i transkripcijskih faktora biljaka povećava se izdržljivost biljaka u stresnim uvjetima, smanjuju se oštećenja na samoj biljci, ali i plodovima te se povećava produktivnost biljke. Većina istraživanja je provedena u laboratorijskim uvjetima gdje su biljke uzgajane u različitim hranjivim medijima, dok je mali broj biljaka uzgajan u uvjetima u polju. Biljke duhana i pamuka uspješno su transformirane i pokazale su toleranciju na uvjete osmotskog stresa (Verbruggen i Hermans, 2008). Iz tih razloga u današnje se vrijeme provode mnoga istraživanja kako bi se objasnila uloga kompatibilnih osmolita i kako bi se saznanja primijenila u zaštiti biljaka od stresa. Takva istraživanja provode se usporedbom visoko srodnih halofita, koji mogu rasti u tlima povećanog saliniteta i glikofita koji nisu tolerantni na takve uvjete, posebice onih srodnih biljnom modelu vrste *Arabidopsis* koji je najviše proučavan (Slama i sur., 2015; Szabados i sur., 2011).

Mutacije u genima koji sudjeluju u odgovoru na stres razjašnjavaju mehanizme odgovora na stres, regulaciju gena i uloge proteina koji sudjeluju u istom. Povećano nakupljanje osmolita u biljci može se postići aktivacijom biosintetskog puta, inhibicijom kataboličkog puta ili stvaranjem novih puteva uvođenjem gena iz drugih vrsta (Slama i sur., 2015). Tako je, na primjer, stvaranjem mutanata i transgeničnih biljaka duhana sa smanjenom ili povećanom sintezom prolina, dokazana njegova uloga kao zaštitnog spoja. Biljke sa smanjenom sintezom prolina pokazuju veću osjetljivost na osmotski stres, stvaraju više reaktivnih oblika kisika i produkta lipidne peroksidacije (Szabados i sur., 2011). Također, unošenjem gena odgovornih za sintezu osmolita u biljke koje ih ne posjeduju, moguće je povećati njihovu toleranciju, poboljšati rast i razvoj te povećati prinos. Simultanom nadekspresijom više gena koji sudjeluju u različitim biosintetskim putevima kompatibilnih osmolita moguće je pojačati toleranciju biljke na stres u odnosu na promjenjenu ekspresiju samo jednog gena. Tako je, na primjer, nadekspresijom gena odgovornog za sintezu inozitola u biljci duhana povećana tolerancija na povišeni salinitet, međutim dvostruko transgenične biljke koje nakupljaju više inozitola i pinitola kao osmolita pokazuju bolji rast, veću fotosintetsku aktivnost i manje oksidativnih oštećenja tijekom stresnih uvjeta. Bolja prilagodba dvostrukih mutanata na stresne uvjete je moguća jer se geni za sintezu eksprimiraju te se inozitol i pinitol istovremeno nakupljaju u citoplazmi (Szabados i sur., 2011).

Osim uvođenjem mutacija, ulogu kompatibilnih osmolita moguće je istraživati i njihovim egzogenim dodavanjem. Na taj način poboljšan je rast biljaka riže, duhana, ječma, pšenice dok u vrsti *Arabidopsis thaliana* egzogeni dodatak glicin betaina ili prolina potiče ekspresiju gena uključenih u antioksidacijske mehanizme obrane (Slama i sur., 2015). Različiti učinak osmolita ovisi o vrsti biljke i osmolitu koji je dodan, ali i koncentraciji u kojoj se dodaje. Istraživanjem je pokazano da betain destabilizira dvostruku uzvojnicu molekule DNA i snižava temperaturu mekšanja molekule *in vitro*. Takvo svojstvo može ukazivati na ulogu u povećanju transkripcije i replikacije u uvjetima stresa. Također, moguća je uloga betaina u ubrzanju sinteze proteina *de novo* tijekom oporavka od stresa (Sakamoto i Murata, 2000).

4. Zaključak

Kompatibilni osmoliti su organske molekule niske molekulske mase, sintetizirane u stanicama tijekom uvjeta osmotskog stresa koje omogućavaju biljci preživljavanje i toleranciju nepovoljnih uvjeta. U različitim biljnim vrstama može doći do nakupljanja aminokiselina, od kojih je najčešći prolin, kvarternih amonijevih spojeva (betain), tercijarnih sulfonijevih spojeva, šećera (trehaloza i saharoza) te šećernih alkohola (manitol, pinitol i myo-inozitol). Akumulacijom kompatibilnih osmolita kao neutralnih spojeva koji ne narušavaju metaboličke reakcije u citoplazmi i vakuoli, snizuje se osmotski i vodni potencijal u stanici što omogućuje primanje vode u biljku i održavanje turgora. Osim osmotske prilagodbe, osmoliti kao molekulski šaperoni smanjuju agregaciju i denaturaciju proteina te stabiliziraju makromolekule i stanične strukture potrebne za odvijanje metaboličkih reakcija. Osim u citoplazmi, osmoliti kao glicin betain se mogu nakupljati i u kloroplastu gdje imaju ulogu očuvanja tilakoidnih membrana i reakcija fotosinteze te smanjenja stvaranja reaktivnih oblika kisika. Osmoliti kao prolin ili dimetilsulfonijpropionat mogu imati i ulogu neenzimskih antioksidansa koji neutraliziraju reaktivne oblike kisika i smanjuju razinu oksidativnog stresa u stanici ili detoksificiraju višak sumpora.

Mutacijama u raznim genima koji sudjeluju u sintezi osmolita moguće je razjasniti mehanizme odgovora biljaka na stres i njihovu regulaciju, ali i stvoriti biljke koje akumuliraju osmolite u povišenim koncentracijama te tako poboljšati njihovu sposobnost tolerancije stresnih uvjeta. Takva istraživanja primjenjiva su u poljoprivredi za poboljšanje prinosa biljaka koje rastu u različitim okolišnim uvjetima. Međutim, do sada provedena istraživanja o ulozi osmolita temelje se na malom broju vrsta biljaka i uglavnom su analizirani samo spojevi koji se u biljkama sintetiziraju u najvećim količinama. Potrebna su daljnja istraživanja kako bi se u potpunosti razjasnila uloga osmolita, mehanizmi djelovanja, mjesta sinteze i nakupljanja te utvrdile biljne vrste u kojima dolazi do sinteze.

5. Literatura

Ashraf, M., i Foolad, M. (2007). Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. *Environmental and Experimental Botany, 59*, 206-216.

Burg, M. B., i Ferraris, J. D. (2008). Intracellular organic osmolytes: function and regulation. *The Journal of Biological Chemistry, 283*(12), 7309-7313.

Di Martino, C., Delfine, S., Pizzuto, R., Loreto, F., i Fuggi, A. (2003). Free amino acids and glycine betaine in leaf osmoregulation of spinach responding to increasing salt stress. *New phytologist, 158*, 455-463.

Fariduddin, Q., Varshney, P., Yusuf, M., Ali, A., i Ahmad, A. (2013). Dissecting the role of glycine betaine in plants under abiotic stress. *Plant Stress, 7*(1), 8-18.

Hanson, A. D., Rathinasabapathi, B., Chamberlin, B., i Gage, D. A. (1991). Comparative physiological evidence that ß-alanine betaine and cholin-O-sulfate act as compatible osmolytes in halophytic Limonium species. *Plant Physiology, 97*, 1199-1205.

Hare, P., i Cress, W. (1997). Metabolic implications of stress-induced proline accumulation in plants. *Plant Growth Regulation, 21*, 79-102.

Hare, P., Cress, W., i Van Staden, J. (1998). Dissecting the roles of osmolyte accumulation during stress. *Plant, Cell and Environment, 21*, 535-553.

Hildebrandt, T. M., Nunes Nesi, A., Araujo, W. L., i Braun, H.-P. (2015). Amino acid catabolism in plants. *Molecular Plant, 8*, 1563-1579.

Larher, F. R., Lugan, R., Gagneul, D., Guyot, S., Monnier, C., Lespinasse, Y., i dr. (2009). A reassessment of the prevalent organic solutes constitutively accumulated and potentially involved in osmotic adjustment in pear leaves. *Environmental and Experimental Botany, 66*, 230-241.

Li, C., Hill, R. W., Jones, D. A. (2010). Determination of betaine metabolites and dimethylsulfoniopropionate in coral tissues using liquid chromatography-time-of-flight mass spectrometry and stable isotope-labeled internal standards. *Journal of Chromatography B, 878*, 1809-1816

Noiraud, N., Maurousset, L., i Lemoine, R. (2001). Transport of polyols in higher plants. *Plant Physiology and Biochemistry, 39*, 717-728.

Otte, M. L., Wilson, G., Morris, J. T., i Moran, B. M. (2004). Dimethylsulphoniopropionat (DMSP) and related compounds in higher plants. *Journal of Experimental Botany, 55*(404), 1919-1925.

Ozgur, R., Uzilday, B., Sekmen, A. H., i Turkan, I. (2012). Reactive oxygen species regulation and antioxidant defence in halophytes. *Functional Plant Biology, 40*(9), 832-847.

Park, E.-J., Jeknić, Z., Sakamoto, A., DeNoma, J., Yuwansiri, R., Murata, N., i dr. (2004). Genetic engineering of glycinebetaine synthesis in tomato protects seeds, plants and flowers from chilling damage. *The Plant Journal, 40*, 474-487.

Rathinasabapathi, B., Raman, S. B., Sigua, C., i Aly, M. (1997). ß-alanine betaine: A nitrogenous osmoprotectant implicated in plant tolerance to salinity and hypoxic stress. U: Wood, A. (ur.) *Biochemical and Molecular Responses of Plants to the Environment*, str. 69-77.

Rhodes, D., i Hanson, A. (1993). Quaternary ammonium and tertiary sulfonium compounds in higher plants. *Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 44*, 357-384.

Rhodes, D., Nadolska-Orczyk, A., i Rich, P. (2002). Salinity, osmolytes and compatible solutes. U: Läuchli, A. i Lüttge, U. (ur.) *Salinity: Environment - Plants - Molecules*, str. 181-204.

Sakamoto, A., i Murata, N. (2000). Genetic engeneering of glycinebetaine synthesis in plants: current status and implications for enhancement of stress tolerance. *Journal of Experimental Botany, 51*(342), 81-88.

Schat, H., Sharma, S. S., i Vooijs, R. (1997). Heavy metal-induced accumulation of free proline in a metal-tolerant and a nontolerant ecotype of Silene vulgaris. *Physiologia Plantarum, 101*, 477-482.

Schneider, S. (2015). Inositol transport proteins. *Federation of European Biochemical Societies letters, 589*, 1049-1058.

Slama, I., Abdelly, C., Bouchereau, A., Flowers, T., i Savoure, A. (2015). Diversity, distribution and roles of osmoprotective compounds accumulated in halophytes under abiotic stress. *Annals of Botany, 115*, 433-447.

Szabados, L., i Savoure, A. (2009). Proline: a multifunctional amino acid. *Trends in Plant Science, 15*(2), 89-97.

Szabados, L., Kovacs, H., Zilberstein, A., i Bouchereau, A. (2011). Plants in extreme environments: importance of protective compounds in stress tolerance. U: Kader, J-C i Delseny, M. (ur.) *Advances in Botanical Research, 57*, str. 105-150.

Szekely, G. (2007). Osmotic stress in plants. *Acta Scientiarum Transylvanica, 15*, 5-25.

Taiz, L., i Zeiger, E. (2002). *Plant Physiology* (3 izd.). Sinauer Associates.

Trinchant, J.-C., Boscari, A., Spennato, G., Van de Sype, G., i Le Rudulier, D. (2004). Proline betaine accumulation and metabolism in alfalfa plants under sodium chloride stress. Exploring its compartmentalization in nodules. *Plant Physiology, 135,* 1583-1594.

Verbruggen, N., i Hermans, C. (2008). Proline accumulations in plants: a review. *Amino Acids, 35*, 753-759.

Walmagh, M., Zhao, R., i Desmet, T. (2015). Trehalose analogues: latest insights in properties and biocatalytic production. *International Journal of Molecular Sciences, 16*(6), 13729-13745.

Wani, S. H., Singh, N. B., Haribhushan, A., i Mir, J. I. (2013). comaptible solute engineering in plants for abiotic stress tolerance - role of glycine betaine. *Current Genomics, 14*, 157-165.

Xiong, L., i Zhu, J.-K. (2002). Molecular and genetic aspects of plant responses to osmotic stress. *Plant, Cell and Environment, 25,* 131-139.

Yancey, P. H. (2005). Organic osmolytes as compatible, metabolic and counteracting cytoprotectants in high osmolarity and other stresses. *The Journal of Experimental Biology, 208*, 2819-2830.

Yang, S.-L., Lan, S.-S., i Gong, M. (2009). Hydrogen peroxide-induced proline and meatbolic pathway of its accumulation in maize seedlings. *Journal of Plant Physiology, 166,* 1694-1699.

Zhu, J.-K., Hasegawa, P. M., Bressan, R. A., i Bohnert, H. J. (1997). Molecular aspects of osmotic stress in plants. *Critical Reviews in Plant Sciences, 16*(3), 253-277.

6. Sažetak

Biljke su tijekom rasta i razvoja izložene različitim okolišnim uvjetima. Nepovoljni uvjeti mijenjaju fiziološke procese, metabolizam, rast i razvoj biljke te dovode do promjena na staničnoj i molekularnoj razini. Osmotski stres se javlja zbog abiotičkih faktora kao što su povišeni salinitet, suša ili ekstremne temperature. Tijekom takvih uvjeta narušen je vodni potencijal biljke. Kako bi se osmolarnost povećala i smanjio gubitak vode, dolazi do sinteze kompatibilnih osmolita koji su organske molekule niske molekulske mase. Biljke nakupljaju različite spojeve: aminokiseline, tercijarne sulfonijeve spojeve, kvarterne amonijeve spojeve, šećere i šećerne alkohole. Osmoliti se nakupljaju u citoplazmi, gdje održavaju osmotski potencijal i fiziološku aktivnost stanice te je njihova biosinteza pod utjecajem okolišnih signala. Takvi spojevi ne utječu na stanične reakcije, a pomažu u toleranciji stresnih uvjeta stabilizacijom makromolekula i staničnih struktura, detoksifikacijom reaktivnih oblika kisika i održavanjem redoks sustava u stanici. Genskom manipulacijom gena za sintezu osmolita moguće je stvoriti biljke koje akumuliraju osmolite u povišenim koncentracijama te tako poboljšati njihovu sposobnost tolerancije stresnih uvjeta.

7. Summary

During growth and development plants are exposed to different environmental factors. Adverse conditions change the physiological processes, the metabolism, growth and development of the plant which affect the organism at a cellular and molecular level. Osmotic stress is a consequence of abiotic factors such as high salinity, drought or extreme temperatures. Those conditions disturb the water potential of the cell. To increase the potential and decrease water loss, compatible osmolytes are synthesized. Osmolytes are low molecular mass organic compounds. Plants accumulate different compounds: amino acids, tertiary sulphonium compounds, quaternary ammonium compounds, sugars and sugar alcohols which accumulate in the cytoplasm. Compatible osmolytes maintain the osmotic potential and physiological activity of the cell and are synthesized under control of environmental cues. Additionally, they stabilize the macromolecule and cell structure, scavenge reactive oxygen species and maintain the cell redox system without affecting the metabolic reactions of the cell. With genetic engineering of osmolytes biosynthetic pathways, it is possible to create plants accumulating osmolytes in high concentration which can improve their stress tolerance.