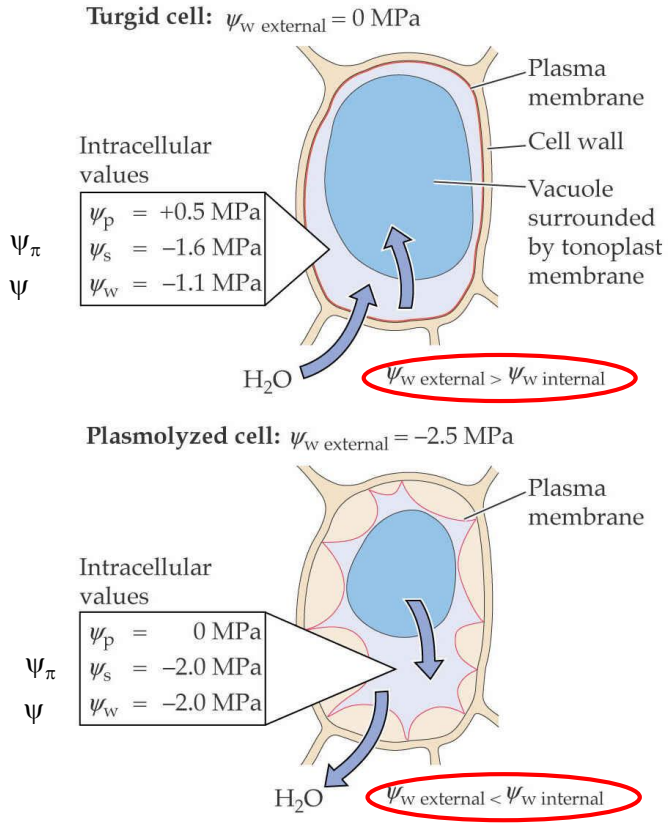
STRESNI UVJETI KOJI UZROKUJU MANJAK VODE U BILJCI

NEDOSTATAK VODE U TLU (SUŠA)

POVIŠENI SALINITET TLA

HLADNOĆA I SMRZAVANJE

TOPLINSKI STRES

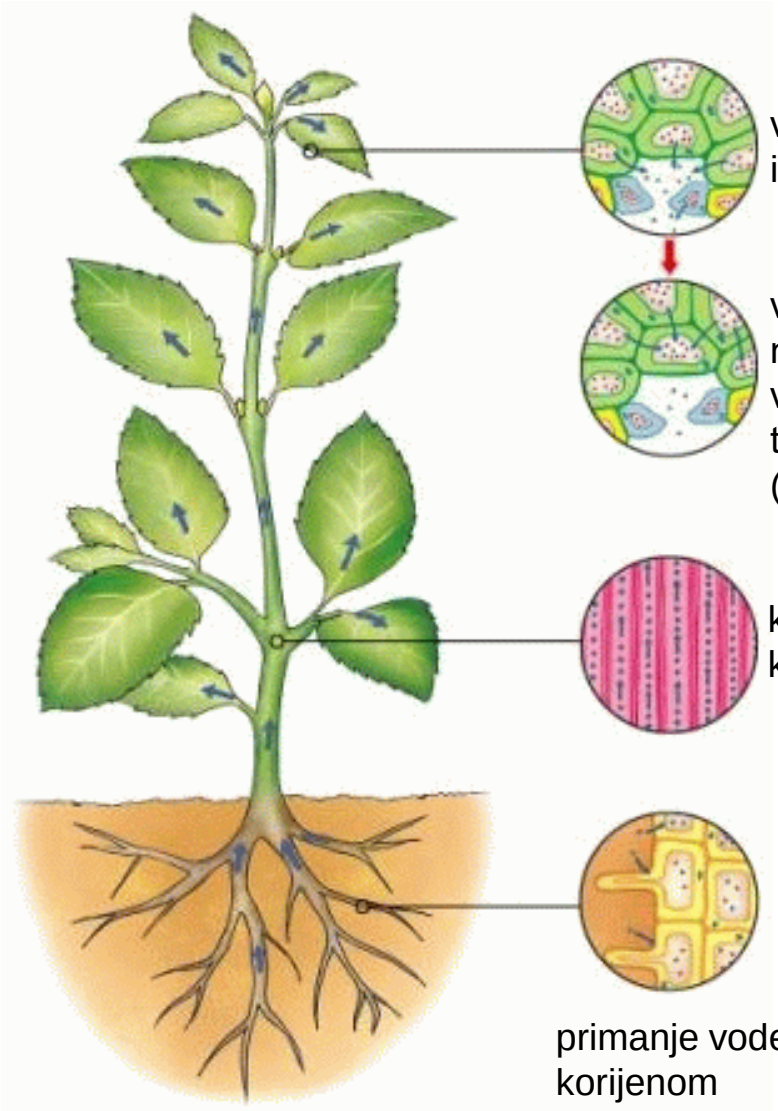


$$(-)\psi = (-)\psi_\pi + \psi_p$$

$$(-)\psi_\pi = -cRT$$

oznake: $\psi = \psi_w$; $\psi_\pi = \psi_s$

PRIMANJE I PRIJENOS VODE U BILJCI U OVISNOSTI O KOLIČINI RASPOLOŽIVE VODE



vodena para izlazi kroz puči

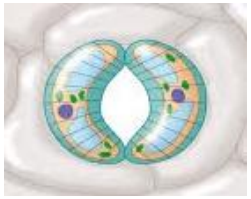
vodena para se nadomješta vodom iz unutrašnjosti biljke (ksilema)

kretanje vode ksilemom

primanje vode korijenom

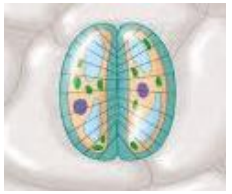
a) dobra opskrbljenost vodom

puči su otvorene



b) manjak vode

puči su zatvorene



$\Psi_{(tla)} > \Psi_{(stanica\ korijena)}$

$\Psi_{(stanica)}$ ~ -0,5 MPa

(-0,2 do -1,1 MPa)

tla dobro opskrbljena vodom

$\Psi_{\pi\ (tla)}$ ~ -0,02 do -0,04 MPa

slana tla:

$\Psi_{\pi\ (tla)}$ ~ -0,1 do -0,3 MPa

NEDOSTATAK VODE U TLU (SUŠA)

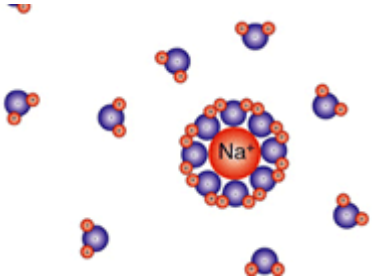
-nizak vodni potencijal u tlu (ψ)

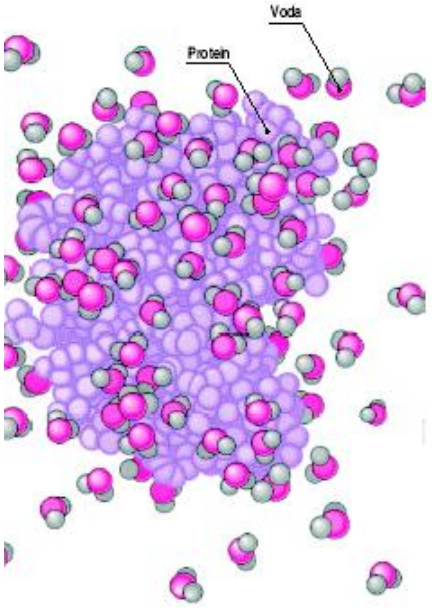
-nizak osmotski potencijal u tlu ($\psi_\pi = -cRT$)
(visoka osmotska vrijednost)

POVIŠENI SALINITET TLA

1. Nizak osmotski potencijal - visoka koncentracija ukupnih iona u tlu (Na^+, Ca^{2+}, Mg^{2+}, Cl^-, SO_4^{2-})

2. Specifični učinak pojedinih iona (najčešće natrija)





PRILAGODBE UVJETIMA MANJKA VODE I POVIŠENOG SALINITETA TLA

1. Uloga ABA

-uzrokuje zatvaranje puči (smanjenje transpiracije)
-sudjeluje i u drugim odgovorima na manjak vode - npr. indukciji gene čiji produkti doprinose toleranciji dehidracije

1. 1. Preraspodjela ABA

kloroplast $\rightarrow$ citosol $\rightarrow$ apoplast

$ABAH \leftrightarrow ABA^-$

Preraspodjela ABA

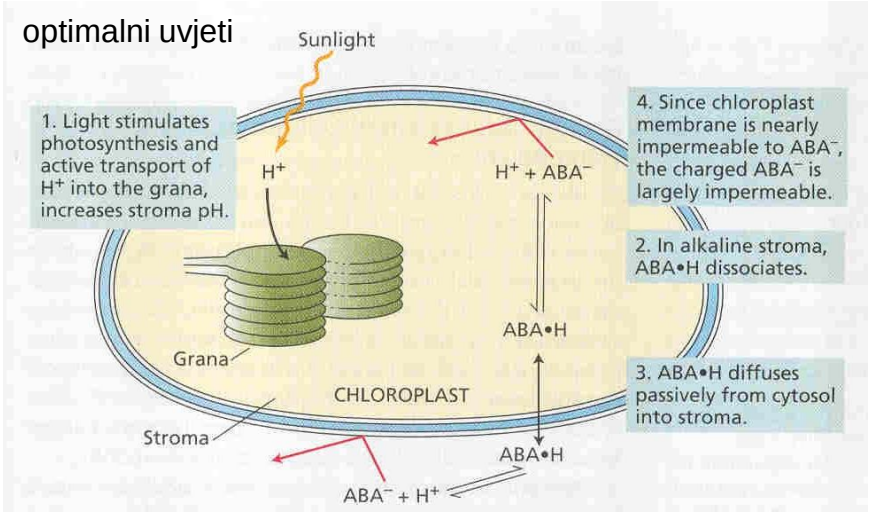
a) u stanici

-u optimalnim uvjetima – ABA se zadržava u kloroplastu (ABA^-)

dehidracija →
pad pH vrijednosti strome i izlazak ABAH u citosol i apoplast

b) u listu

dehidracija →
porast pH vrijednosti apoplasta
-disocijacija ABAH u ABA^-



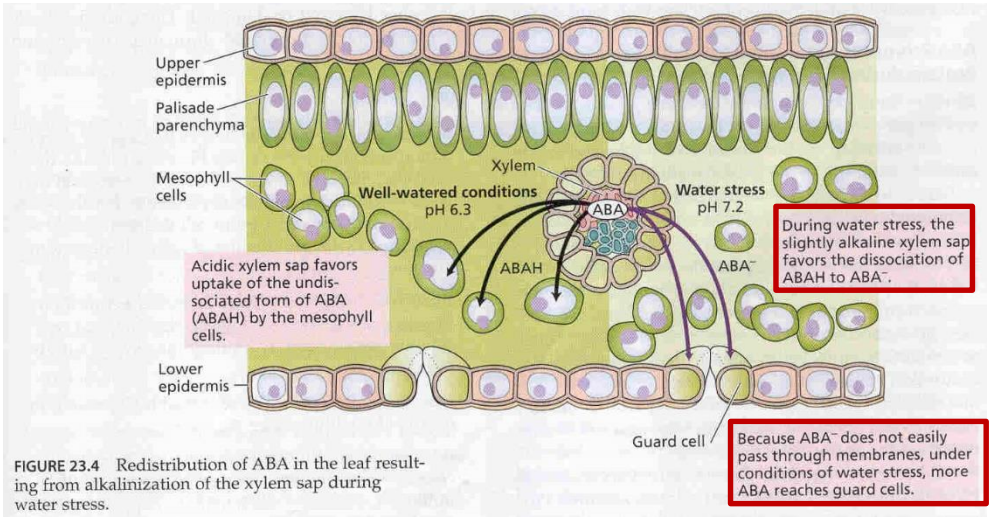
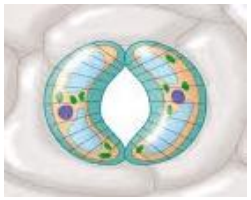


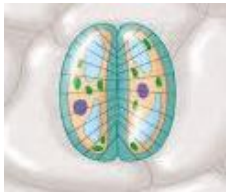
FIGURE 23.4 Redistribution of ABA in the leaf resulting from alkalinization of the xylem sap during water stress.

Taiz, L., Zeiger, E. (2002). Plant Physiology.

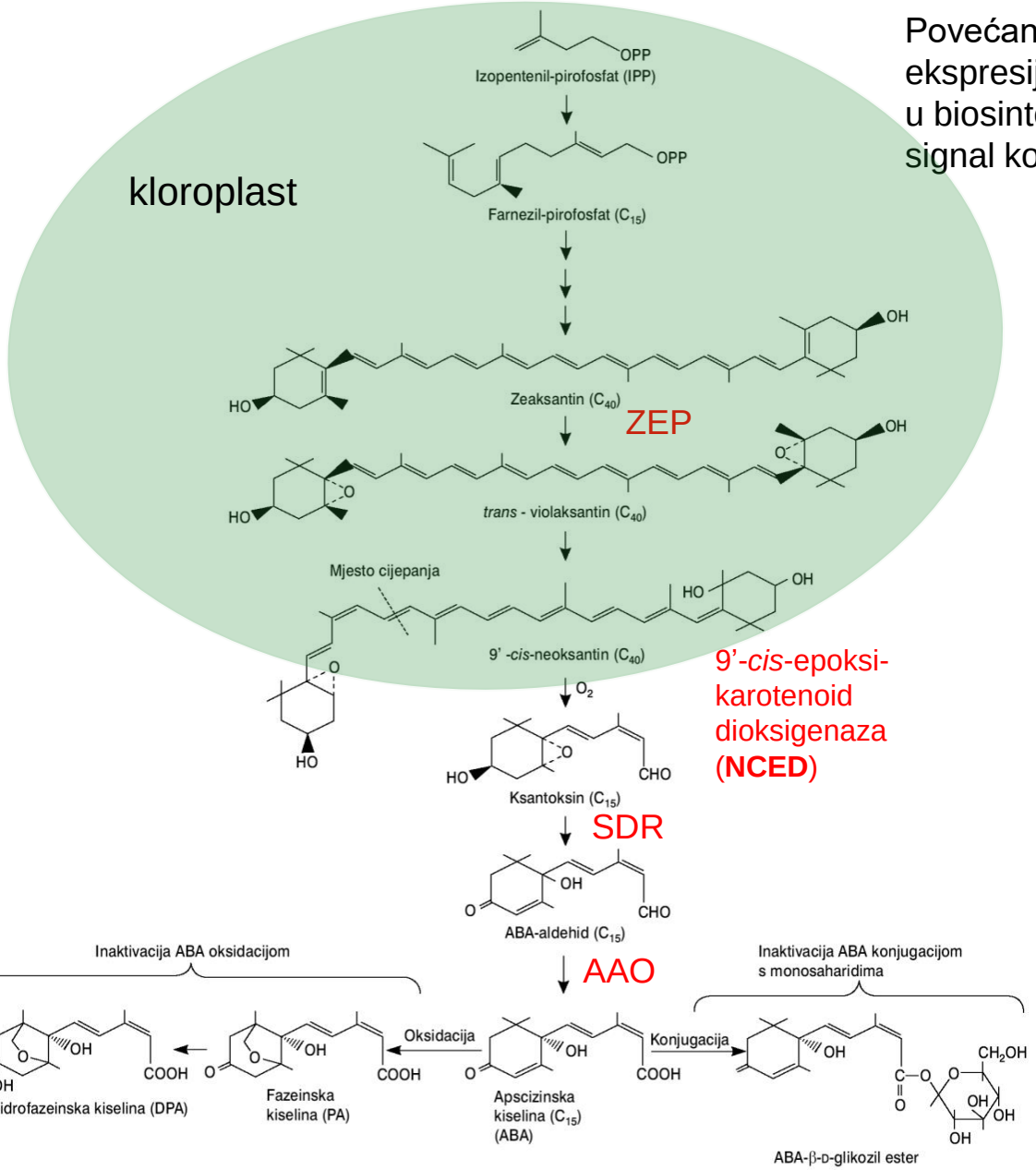
transpiracijskom se strujom prenosi do stanica zapornica



ABA →



1. 2. Povećanje stope biosinteze ABA



Povećanju stope biosinteze ABA doprinosi ekspresija gena za enzime koji sudjeluju u biosintezi (odgovor je specifičan za tkivo i signal koji ga uzrokuje)

ZEP (zeaksantin-epoksidaza) se inducira u sjemenkama te u korijenu u uvjetima manjka vode

NCED – ekspresija gena za taj enzim se inducira u svim tkivima u uvjetima manjka vode

9'-*cis*-epoksi-karotenoid dioksigenaza (**NCED**)

SDR (short-chain dehydrogenase/ reductase-like enzyme) se inducira pod utjecajem šećera, a ne dehidracije

AAO (abscisic aldehyde oxidase) se u različitoj mjeri inducira u tkivima u stresnim uvjetima

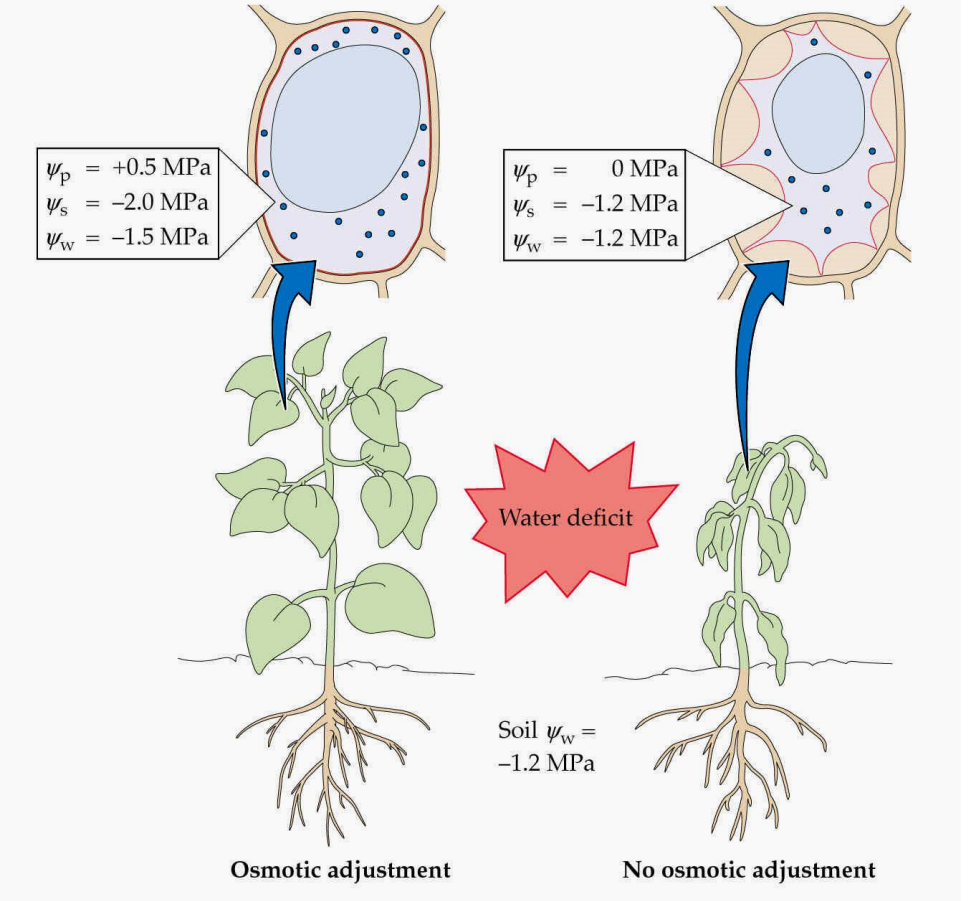
2. Osmotska prilagodba stanice

Kako se može sniziti vodni potencijal stanice (a da se istovremeno ne smanji vrijednost turgora)?

$$(-)\psi = (-)\psi_\pi + \psi_p$$

osmotska prilagodba
→ aktivna regulacija osmotskog potencijala
(povećanje koncentracije osmotski aktivnih tvari i sprečavanje dehidracije stanice)

-uloga u procesu aklimatizacije biljaka na sušu i povišeni salinitet



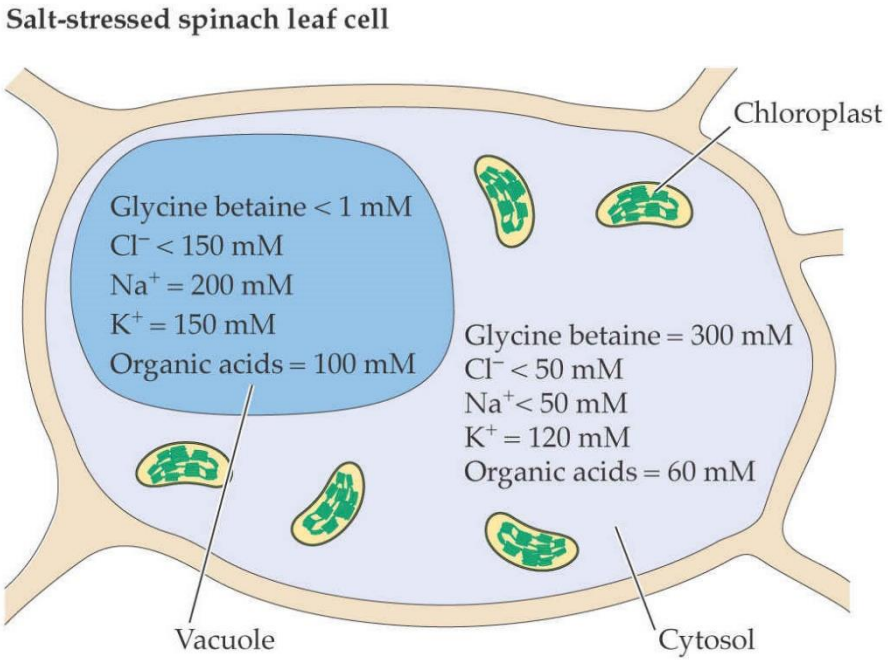
Buchanan, B., Gruissem, W., Jones, R. L. (2002): **Biochemistry and Molecular Biology of Plants**. John Wiley and Sons.

Osmotska prilagodba uključuje:

1. primanje iona i akumulaciju u vakuolu
2. sintezu niskomolekularnih organskih tvari u citosolu – kompatibilni osmoliti
3. smanjenje stope reakcija asimilacije

Osmotska prilagodba mezofilne stanice špinata

-osmotski aktivne tvari koje mogu utjecati na stanični metabolizam uklanjaju se u vakuolu
-u citoplazmi ostaju i sintetiziraju se samo one molekule koje ne ometaju metabolizam → **održavat će osmotsku ravnotežu s vakuolom**



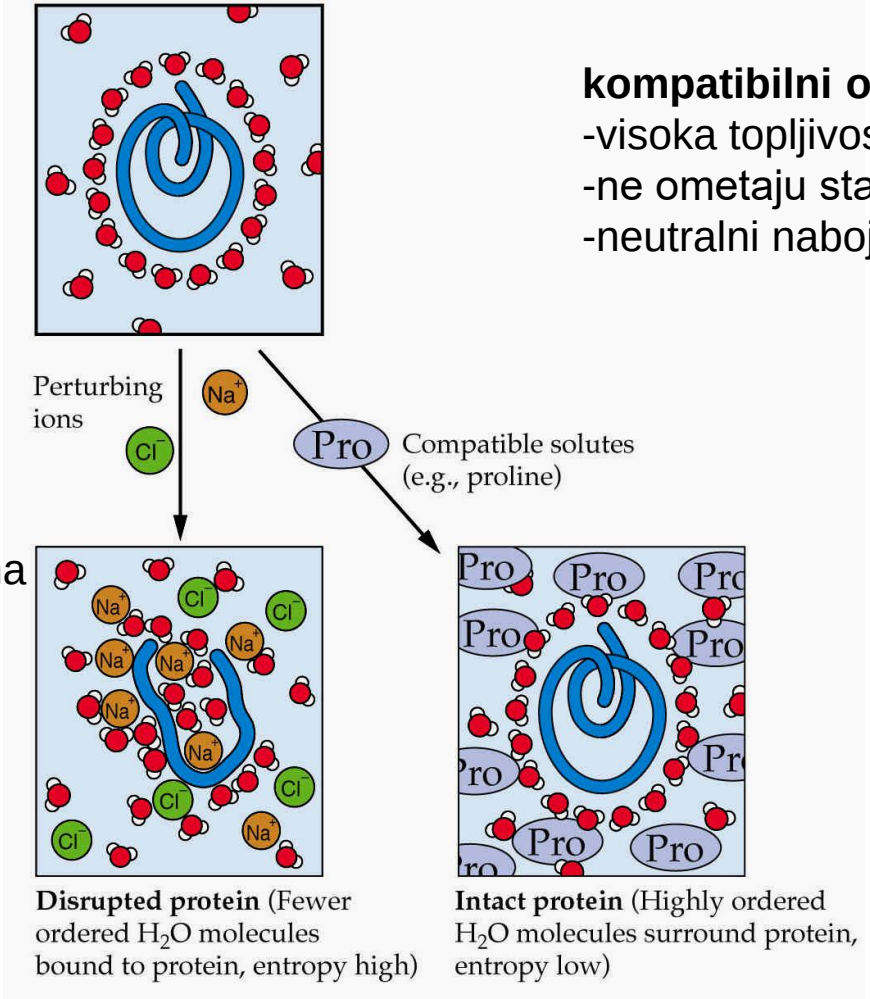
2. 1. Kompatibilni osmoliti u citoplazmi

Kompatibilni osmoliti - molekule koje se mogu akumulirati do visokih koncentracija u citosolu, a da pritom ne narušavaju staničnu aktivnost. Omogućuju smanjenje vodnog potencijala u stanici i zadržavanje turgora u uvjetima manjka vode i/ili povišenog saliniteta.

Svojstva kompatibilnih osmolita (primjer: prolin)

kompatibilni osmoliti –
-visoka topljivost
-ne ometaju stanični metabolizam
-neutralni naboj

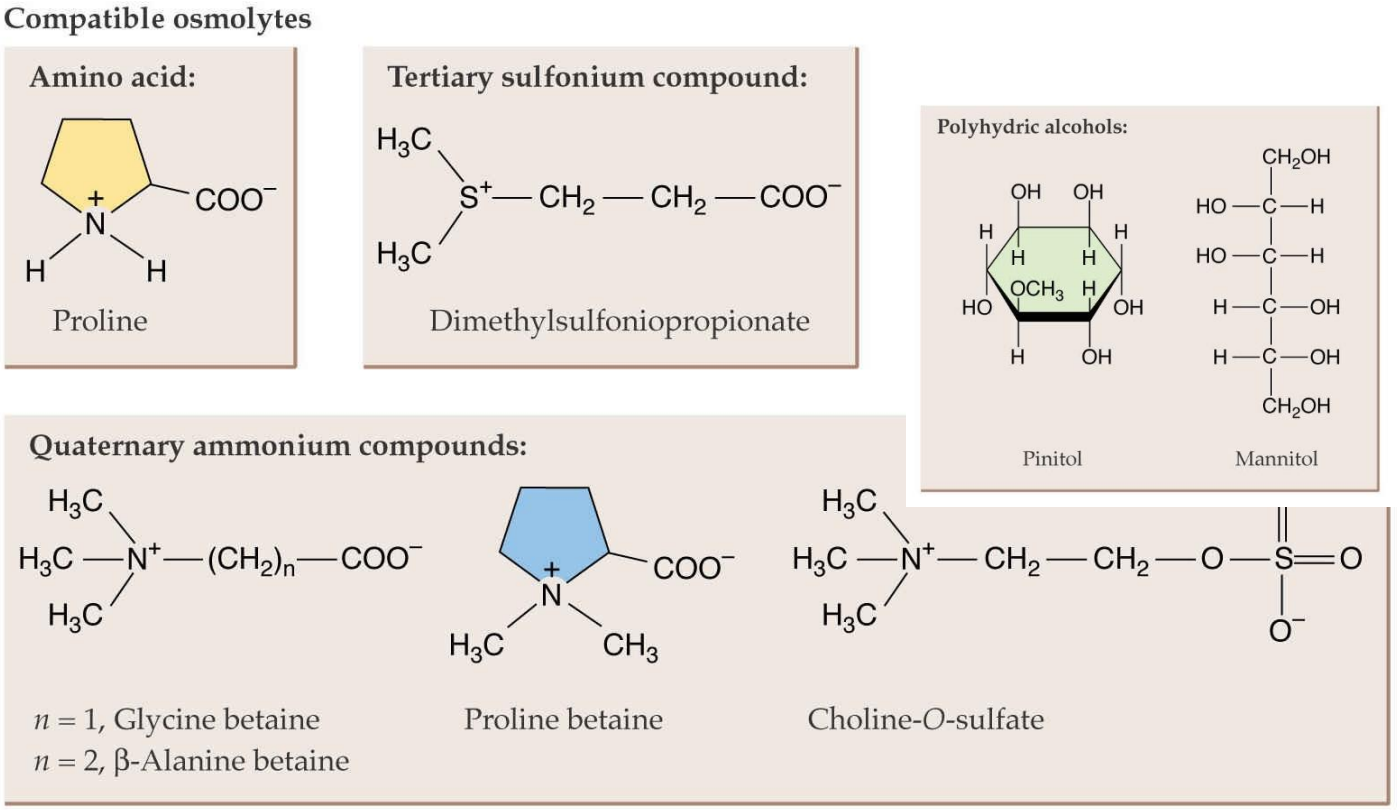
anorganski ioni –
ulaze u hidratacijske plašteve proteina
→ mijenjaju aktivnost enzima



Buchanan, B., Gruissem, W., Jones, R. L. (2002): **Biochemistry and Molecular Biology of Plants**.

Primjeri kompatibilnih osmolita

-aminokiseline (prolin)
-šećerni alkoholi - polioli (pinitol, manitol, sorbitol, glicerol, *myo*-inozitol)
-kvarterni amonijevi spojevi (glicin betain, prolin betain, kolin-O-sulfat)
-šećeri (trehaloza, saharoza, rafinoza), monomeri (glukoza i fruktoza iz šećernih polimera)



Buchanan, B., Gruissem, W., Jones, R. L. (2002): **Biochemistry and Molecular Biology of Plants**. John Wiley and Sons.

Povećanje količine kompatibilnih osmolita u stanici (mehanizmi)

1. Ireverzibilna biosinteza
2. Održavanje potrebne koncentracije osmolita kombinacijom biosinteze i katabolizma (npr. prolin)
3. Oslobađanje šećernih monomera (npr. glukoza i fruktoza) iz polimernih oblika (škroba, fruktana)

Biosinteza kompatibilnih osmolita

-istraženi su npr. putevi biosinteze prolina, glicin betaina i šećernih alkohola (manitola i pinitola)

-istraživanje mogućnosti manipuliranja aktivnošću enzima u cilju povećanja biosinteze kompatibilnih osmolita

PROLIN

-višestruka uloga u biljci
  -kompatibilni osmolit
  -stabilizira proteine i membrane i druge stanične strukture
  -neutralizira neke ROS
  -regulira stanični metabolizam ublažavajući fluktuacije redoks-stanja i pH vrijednosti
-ekspresija brojnih gena koji se aktiviraju u uvjetima solnog stresa je pod kontrolom promotora koji imaju regiju koja odgovara na prolin

-regulacija akumulacije prolina u biljaka:
  -na razini aktivnosti enzima
  -na razini promjene ekspresije gena

Biosinteza prolina

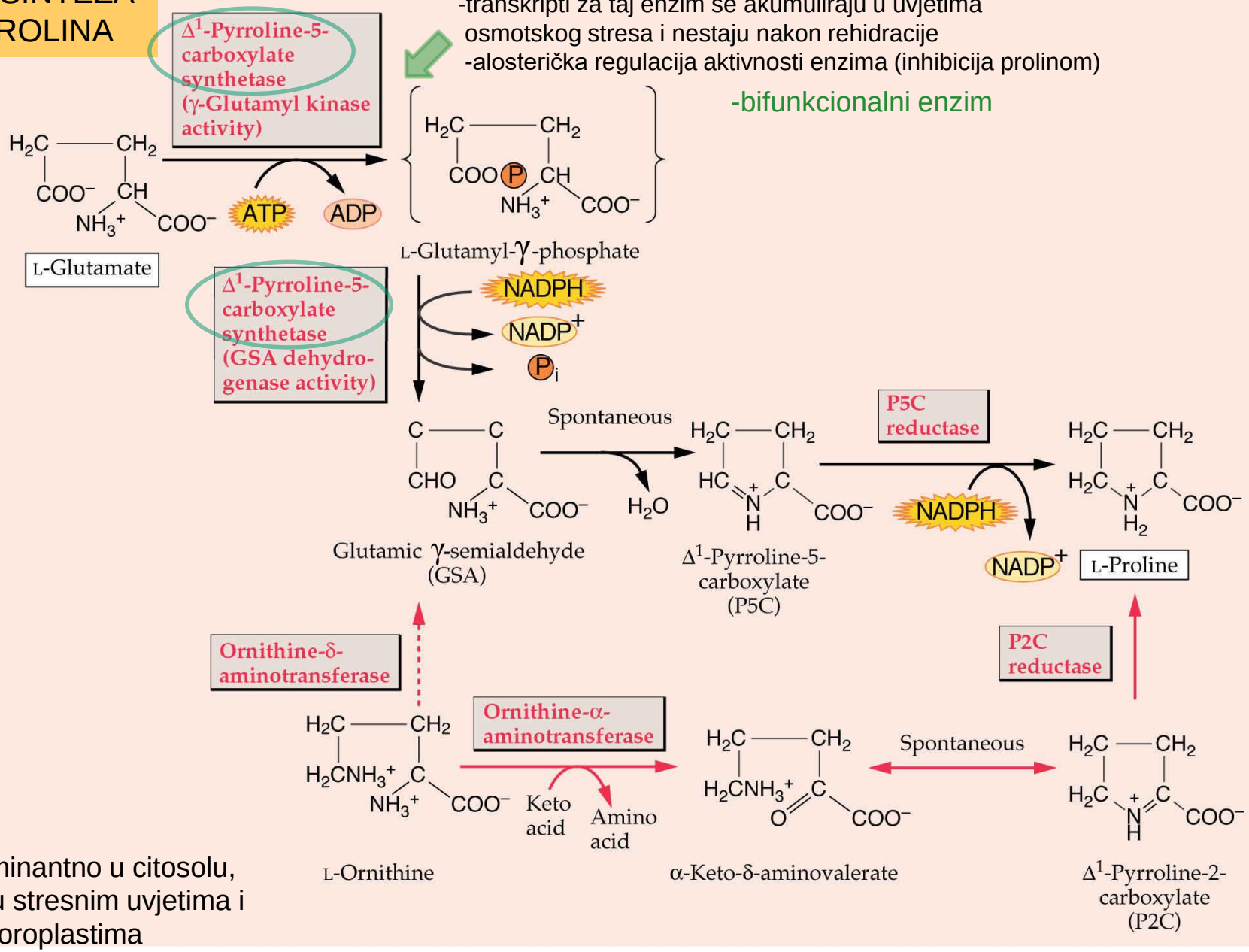
- dva biosintetska puta u biljaka

1. započinje glutamatom (identičan biosintetskom putu u *E. coli*)
2. započinje ornitinom (slabije istražen)

BIOSINTEZA PROLINA

-transkripti za taj enzim se akumuliraju u uvjetima osmotskog stresa i nestaju nakon rehidracije
-alosterička regulacija aktivnosti enzima (inhibicija prolinom)

-bifunkcionalni enzim



-dominantno u citosolu, ali u stresnim uvjetima i u kloroplastima

-katabolizam prolina: L-Pro —(prolin dehidrogenaza)→ P5C

BIOSINTEZA GLICIN-BETAINA

-porodica *Chenopodiaceae* (npr. *Spinacia oleracea, Beta vulgaris*) te kukuruz (*Zea mays*) i ječam (*Hordeum vulgare*)

-sinteza - u kloroplastima

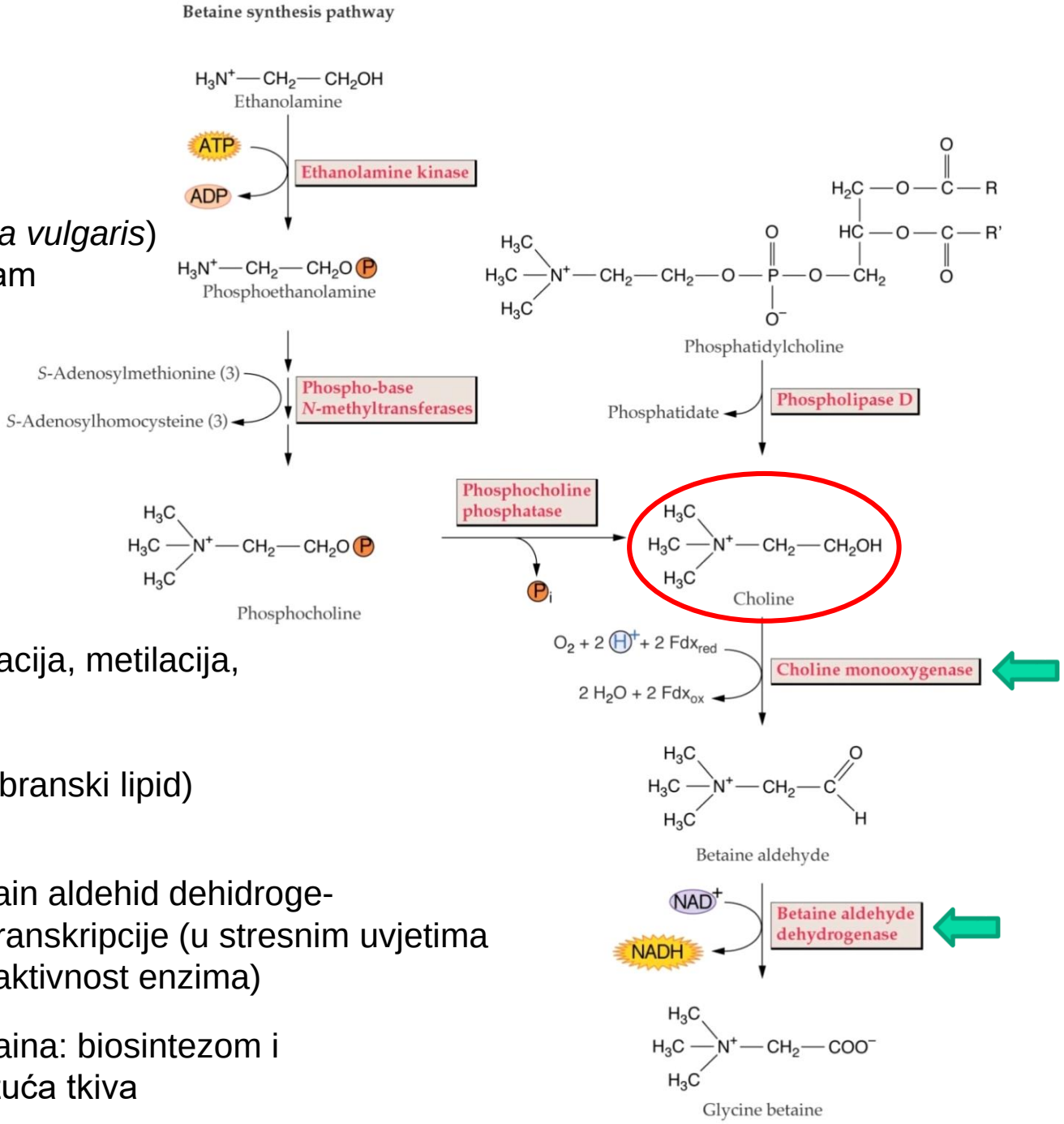
-prekursor: **kolin**

-biosinteza kolina – 2 puta:

1. iz etanolamina (fosforilacija, metilacija, hidroliza)
   -špinat, cikla
2. iz fosfatidilkolina (membranski lipid)
   -ječam

-kolin monooksigenaza i betain aldehid dehidrogenaza – regulacija na razini transkripcije (u stresnim uvjetima poveća se količina mRNA i aktivnost enzima)

-regulacija količine glicin-betaina: biosintezom i floemskim prijenosom u rastuća tkiva



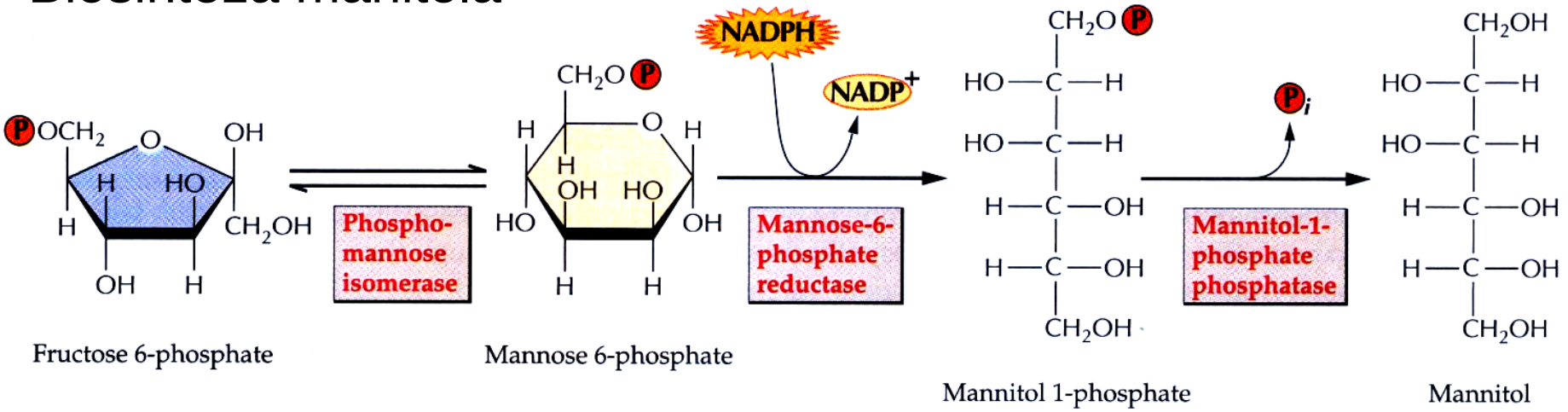
BIOSINTEZA MANITOLA

-reducirani oblik šećera manoze

-u nekih biljaka (npr. celer), mannitol je (uz saharozu) transportni oblik šećera

-količina u biljkama raste u uvjetima osmotskog stresa

Biosinteza manitola

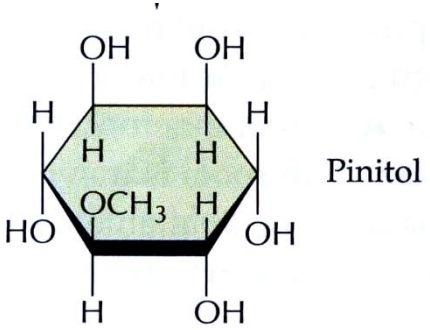


Regulacija biosinteze:

-inhibicija kompetirajućih puteva (biosinteze saharoze)

-smanjen katabolizam (smanjena aktivnost NAD^+-ovisne manitol dehidrogenaze)

BIOSINTEZA PINITOLA

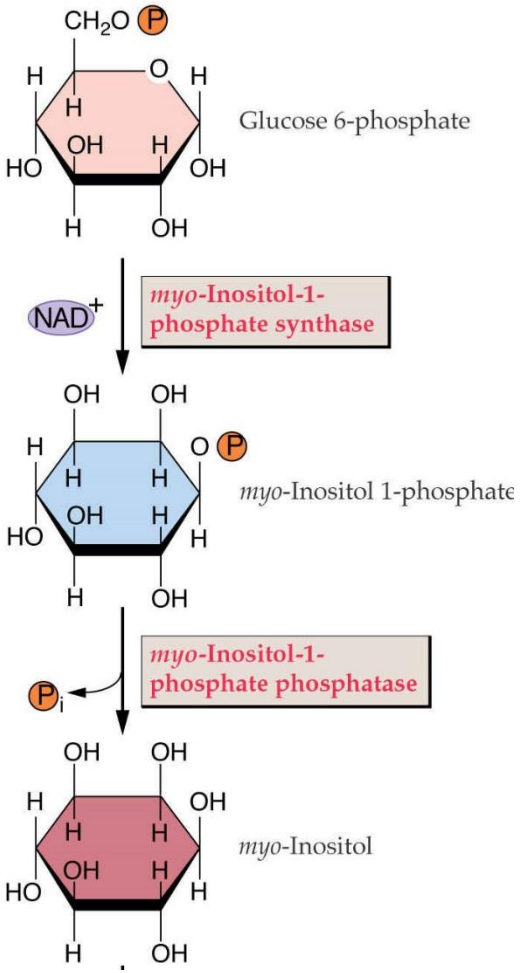


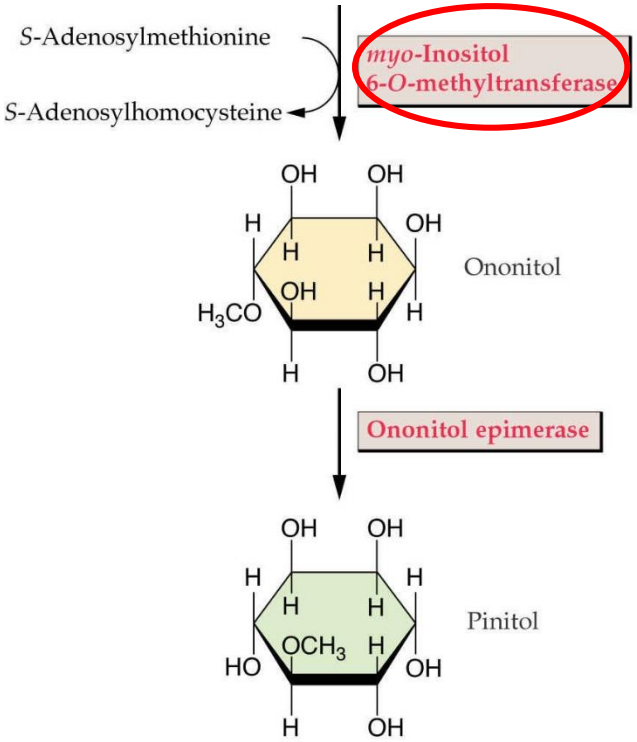
Pinitol

-ciklički šećerni alkohol

-u biljkama iz porodica *Pinaceae*, *Fabaceae* i *Caryophylaceae*
-u kloroplastima i citosolu; u vakuoli nije detektiran

-u halofita *Mesembryanthemum crystallinum* u uvjetima solnog stresa na pinitol otpada više od 70% topivih ugljikohidrata, u normalnim fiziološkim uvjetima samo 5%





-O-metilacijom *myo*-inozitola u kritosjemenjača nastaje ononitol, a u golosjemenjača ononitolni izomer sekvojitol
-oba se intermedijera epimeriziraju u pinitol

-u uvjetima povišenog saliniteta povećava se aktivnost ***myo*-inozitol 6-O-metiltransferaze** (60 puta), regulacija na razini transkripcije

2. 2. Regulacija sadržaja iona u stanici i njihove raspodjele

-uloga membranskog prijenosa

U uvjetima solnog stresa: povišena količina natrija u apoplastu

Ulazak Na^+ u stanicu —

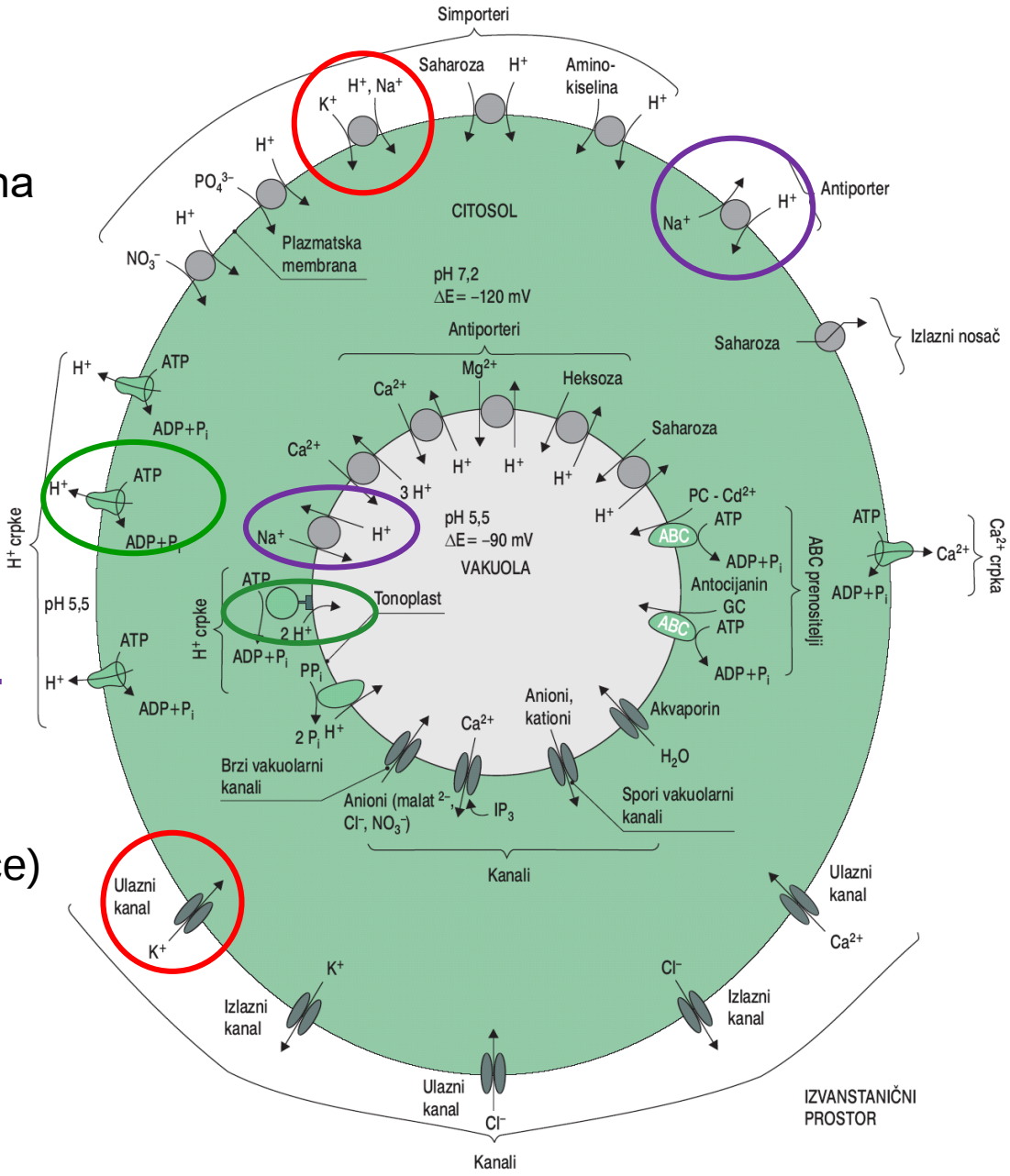
-ulazak kroz kationske kanale i nosačima

-K^+-Na^+ kotransport

Uklanjanje Na^+ iz citosola —

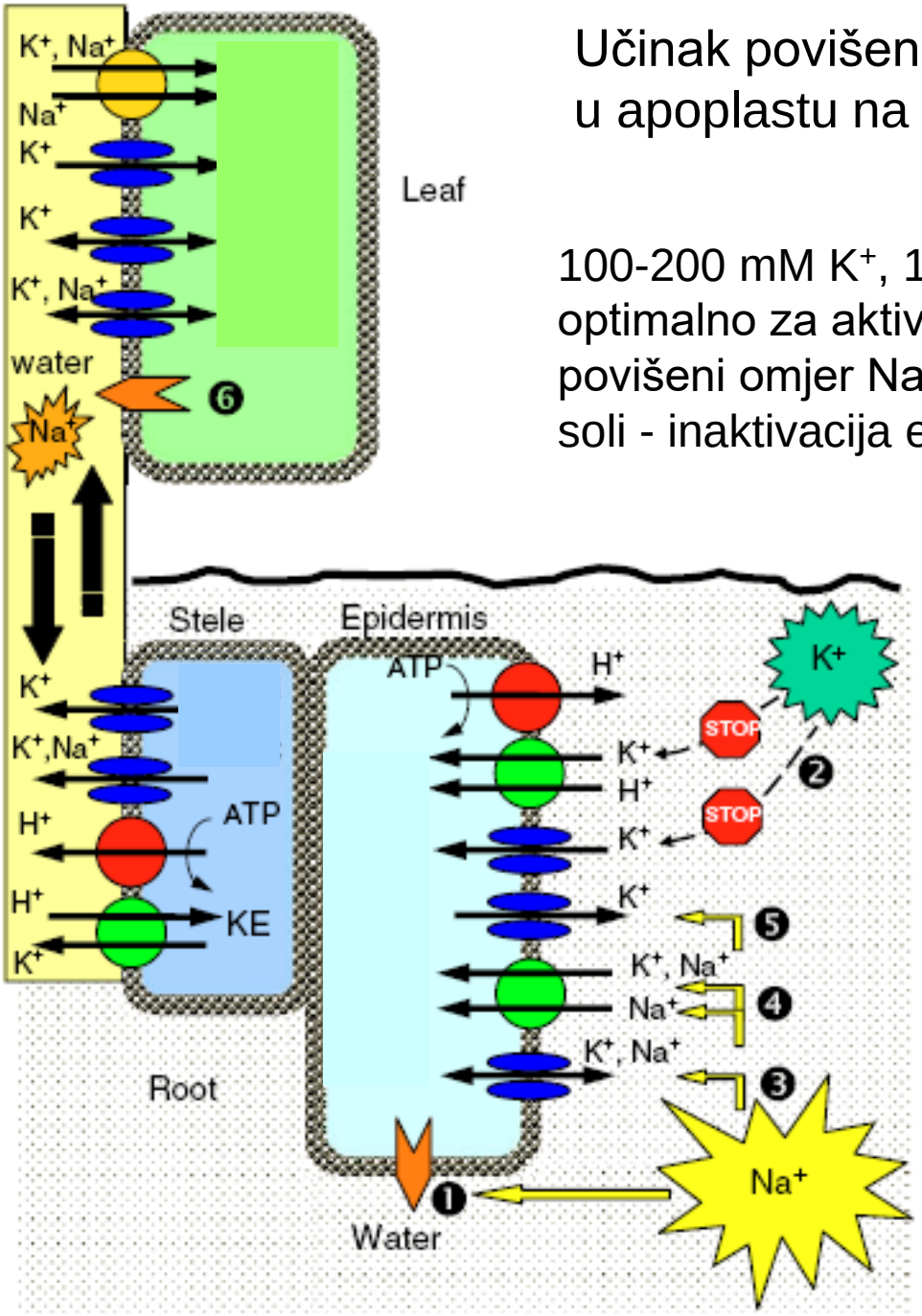
-povećana ekspresija i povišena aktivnost Na^+/H^+ antiportera (prijenos Na^+ u vakuolu i iz stanice)

-povećana aktivnost membr. i tonoplastne H^+-ATP-aze —



Učinak povišene koncentracije natrija u apoplastu na primanje kalija

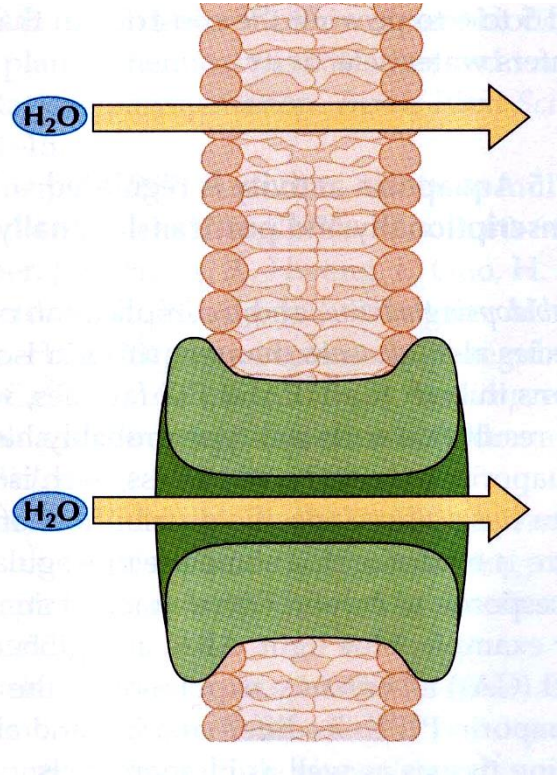
100-200 mM K^+, 1-10 nM Na^+ u citosolu – optimalno za aktivnost većine enzima
povišeni omjer Na^+/K^+ i visoka koncentracija ukupnih soli - inaktivacija enzima i inhibicija sinteze proteina



Povišeni salinitet – poremećeno primanje vode u korijen (1), ali i u nadzemna tkiva (6) zbog prisutnosti Na u apoplastu; smanjeno Primanje K u prisutnosti drugih iona (2), također i kompeticija Na i K za membranske prijenosnike (3 i 4); povećan izlazak K kroz kanale aktivirane depolarizacijom membrane (5)

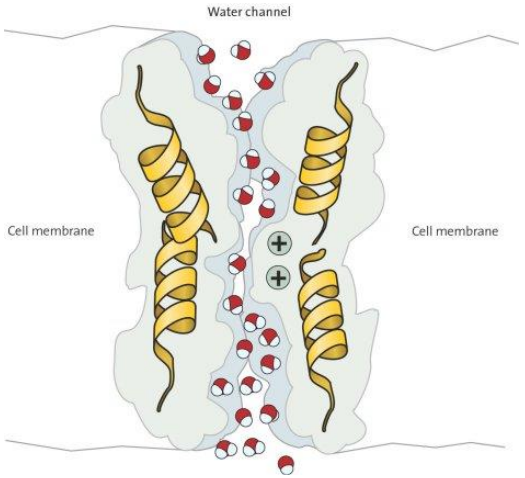
Sergey Shabala and Tracey A. Cuin (2007). Potassium transport and plant salt tolerance. Physiologia Plantarum 133, 651-669.

2.3. Biosinteza i aktivnost akvaporina



akvaporini – olakšavaju propusnost za vodu

sinteza i aktivnost povećana u sušnim uvjetima → povećani transport vode → ponovno uspostavljanje turgora



Primjer: indukcija ekspresije gena *Rd28* u *A. thaliana* u uvjetima manjka vode
-akvaporin RD28 nalazi se u plazmatskoj membrani i član je MIP (**m**ajor **i**ntrinsic **p**rotein) familije proteina

3. Ostali mehanizmi i geni inducirani u uvjetima manjka vode

3.1. Indukcija CAM fotosinteze

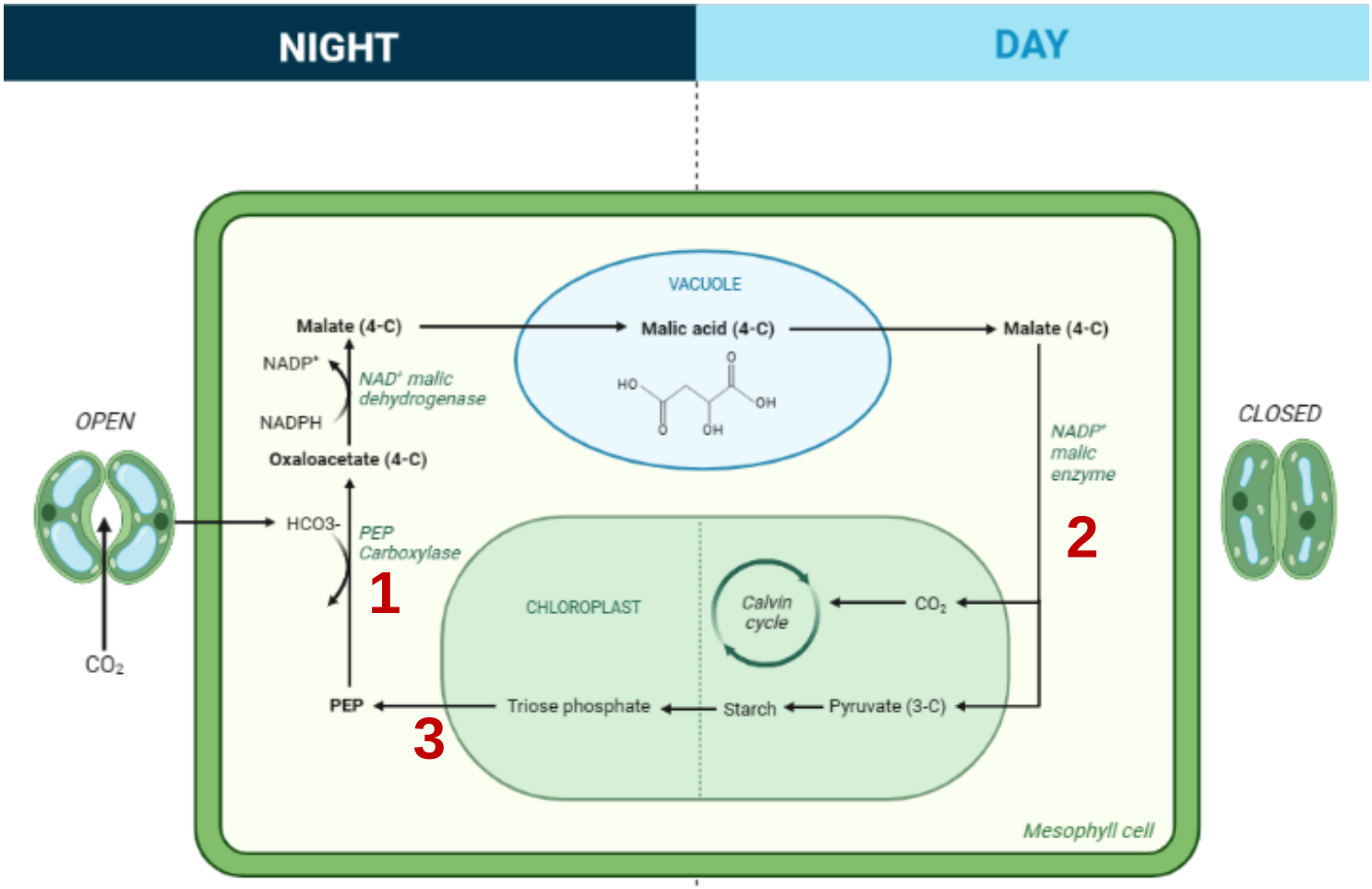
-tzv. fakultativne CAM biljke (npr. *Mesembryanthemum crystallinum* i neki kaktusi)
-prelaze na CAM samo u izrazito sušnim uvjetima i uvjetima povišenog saliniteta

-indukcija ključnih enzima CAM puta
-CAM specifičnog izoenzma PEP-karboksilaze (PPC), piruvat-ortofosfat dikinaze i $NADP^+$-malatnog enzima

-*ppc1* – kodira mRNA za CAM-specifični izoenzim PPC

-*ppc2* – osigurava C4 intermedijere za Krebsov ciklus (niska razina konstitutivne ekspresije)

-manjak vode – 5x veća transkripcija gena *ppc1,* i 100x veća akumulacija mRNA



1 PEP-karboksilaza

2 $NADP^+$-ovisni malatni enzim
(u kloroplastu)

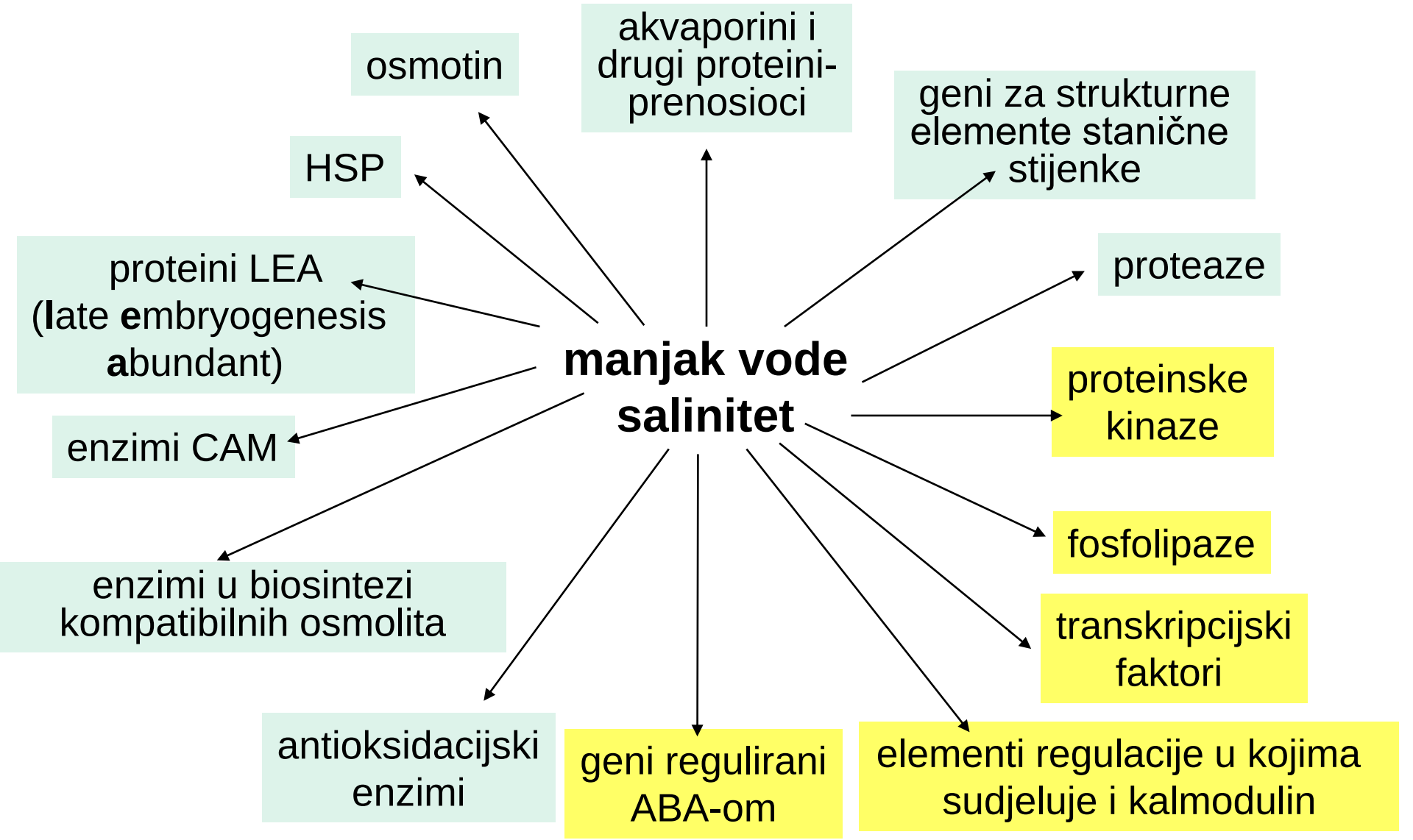
3 piruvat-ortofosfat dikinaza

Preuzeto i prilagođeno prema:
https://www.biorender.com/template/cam-photosynthesis-2

3.2. Inducibilni geni pod utjecajem manjka vode

Funkcionalni proteini (sudjeluju u odgovoru na stres)

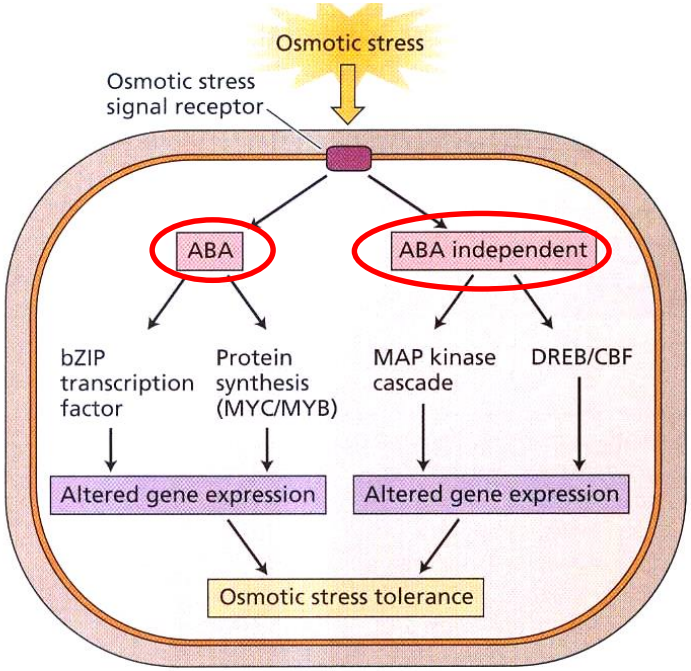
Regulatorni proteini (sudjeluju u prijenosu signala i kontroliraju ekspresiju gena)



PRIMJERI

-receptor za osmotski stres – nije u potpunosti opisan

a) Ekspresija gena ovisnih o ABA i gena neovisnih o ABA



-prijenos signala u uvjetima osmotskog stresa

Put neovisan o ABA – npr. biosinteza rafinoze i drugih ugljikohidrata koji imaju ulogu kompatibilnih osmolita

Put ovisan o ABA – npr. aktivacija gena za Δ^1-pirolin-5-karboksilat sintetazu, neke proteine LEA, neke šaperone, proteine za neutralizaciju ROS, proteine metabolizma ugljikohidrata

-uloga ABA - aktivacija brojnih gena posredstvom transkripcijskih faktora

MAPK – mitogen activated protein kinase cascade
DREB – dehydration response element binding factor
CBF – C-repeat binding factor
bZIP – basic leucine zipper domain proteins
MYC/MYB transcription factor

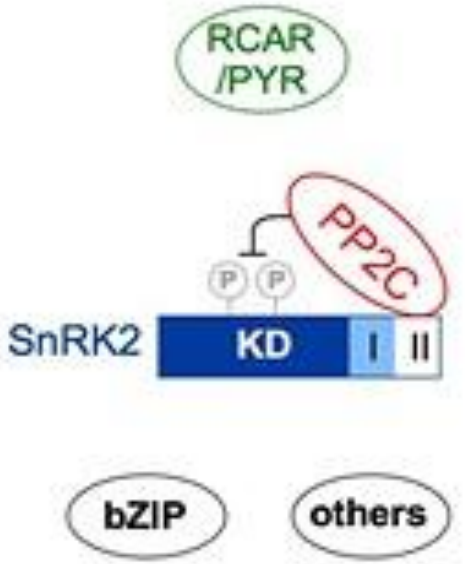
Predloženi model indukcije odgovora na ABA

RCAR/PYR – receptor za ABA

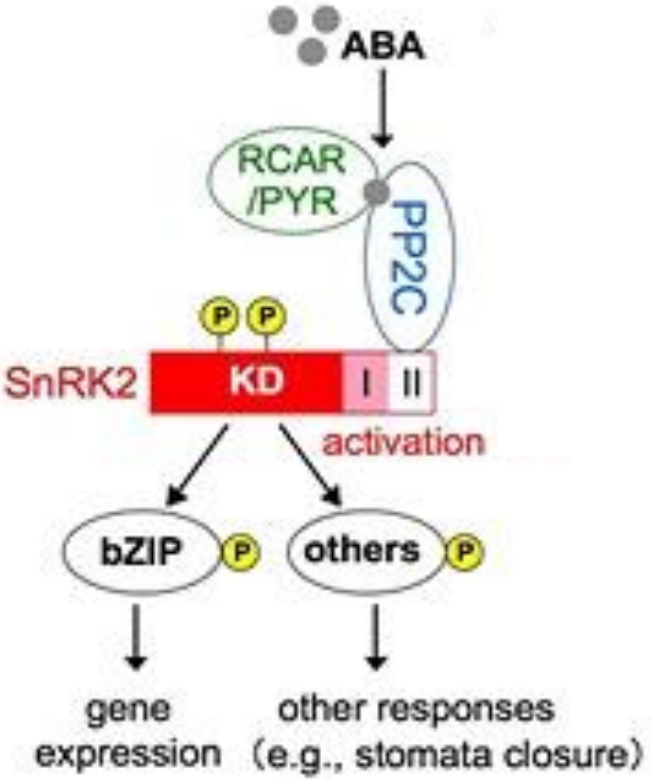
PP2C – fosfataza
SnRK2 – kinaze
bZIP – transkripcijski faktor

T. Umezawa et al. (2009) PNAS, 17588–17593.

Normalni okolišni uvjeti



Stresni uvjeti (uz djelovanje ABA)



U odsutnosti ABA: fosfataza PP2C defosforilira i inaktivira kinaze SnRK2
U prisutnosti ABA: ABA se veže na receptor RCAR/PYR koji stupa u interakciju s PP2C i blokira njezinu fosfataznu aktivnost pa kinaza SnRK2 ostaje fosforilirana, tj. aktivna. Aktivirana SnRK2 fosforilira transkripcijske faktore i neke druge supstrate (npr. proteinske kanaliće)

b) Prijenos natrija, kalija i kalcija kroz membrane u uvjetima povišenog saliniteta – ekspresija gena i regulacije

SOS1 – Na^+-H^+ antiporter (*s*alt *o*verly *s*ensitive1)

proteini obojeni žuto – aktivirani solnim stresom

Membranski prijenosnici

SOS1 – Na^+/H^+ antiporter na plazmatskoj membrani (SALT OVERLY SENSITIVE)

ACA – Ca^{2+}-ATP-aza na tonoplastu

KUP1/TRH1 – visokoafinitetni K^+-H^+ kotransporter

AtHKT1 – visokoafinitetni kanal za K^+ (high-affinity K^+ transporter)

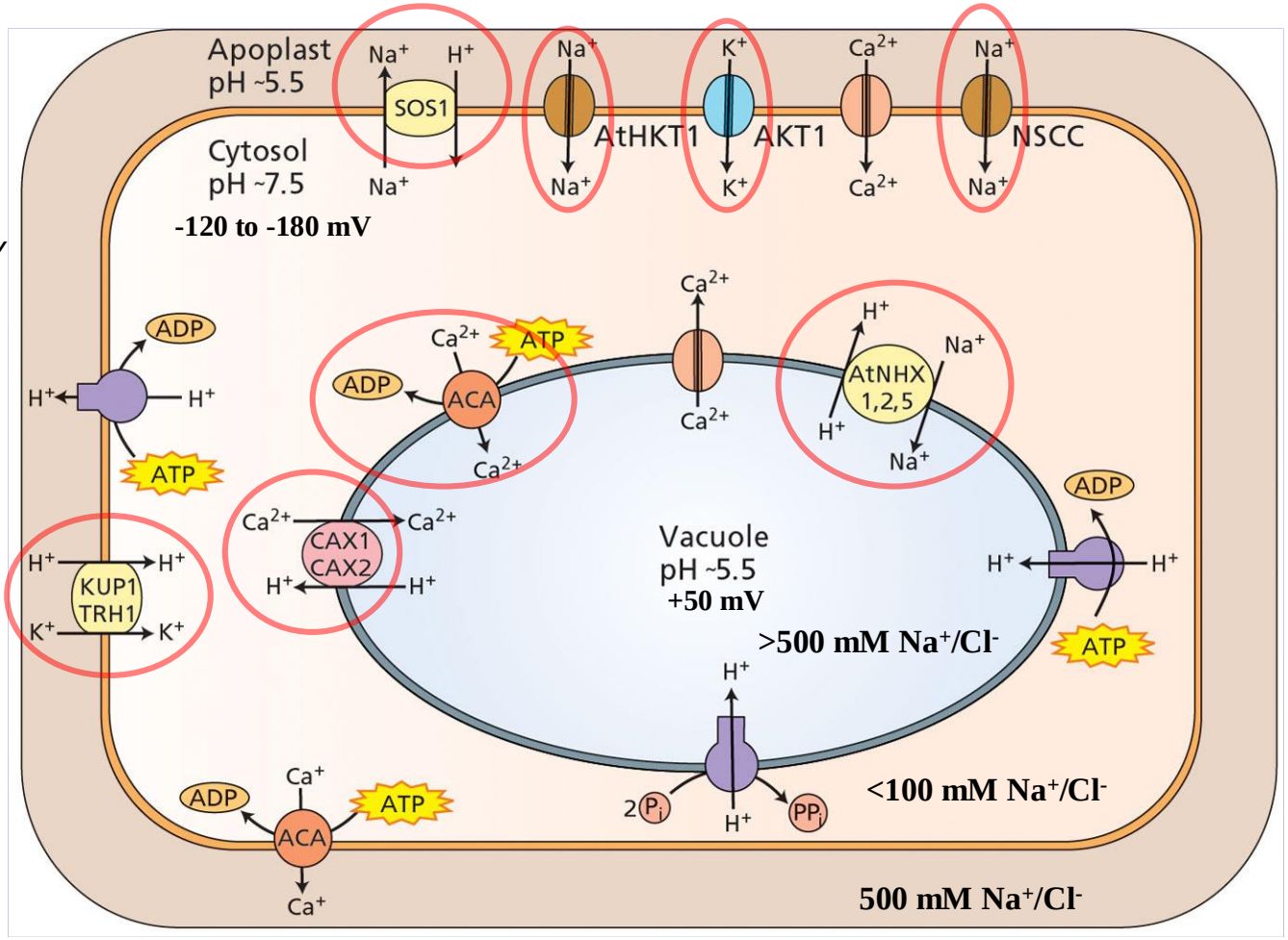
AKT1 – kalijev kanal

NSCC – neselektivni kationski kanal

CAX1 ili 2 – Ca^{2+}/H^+ antiporter

AtNHX1, 2 ili 5 – endomembranski Na^+/H^+ antiporter

AHA – H^+-ATP-aza na plazmatskoj membrani



Taiz, L., Zeiger, E. (2002). Plant Physiology.

b) Prijenos natrija, kalija i kalcija kroz membrane u uvjetima povišenog saliniteta – ekspresija gena i regulacije

SOS1 – Na^+-H^+ antiporter (*s*alt *o*verly *s*ensitive1)

proteini obojeni žuto – aktivirani solnim stresom

Membranski prijenosnici

SOS1 – Na^+/H^+ antiporter na plazmatskoj membrani (SALT OVERLY SENSITIVE)

ACA – Ca^{2+}-ATP-aza na tonoplastu

KUP1/TRH1 – visokoafinitetni K^+-H^+ kotransporter

AtHKT1 – visokoafinitetni kanal za K^+ (high-affinity K^+ transporter)

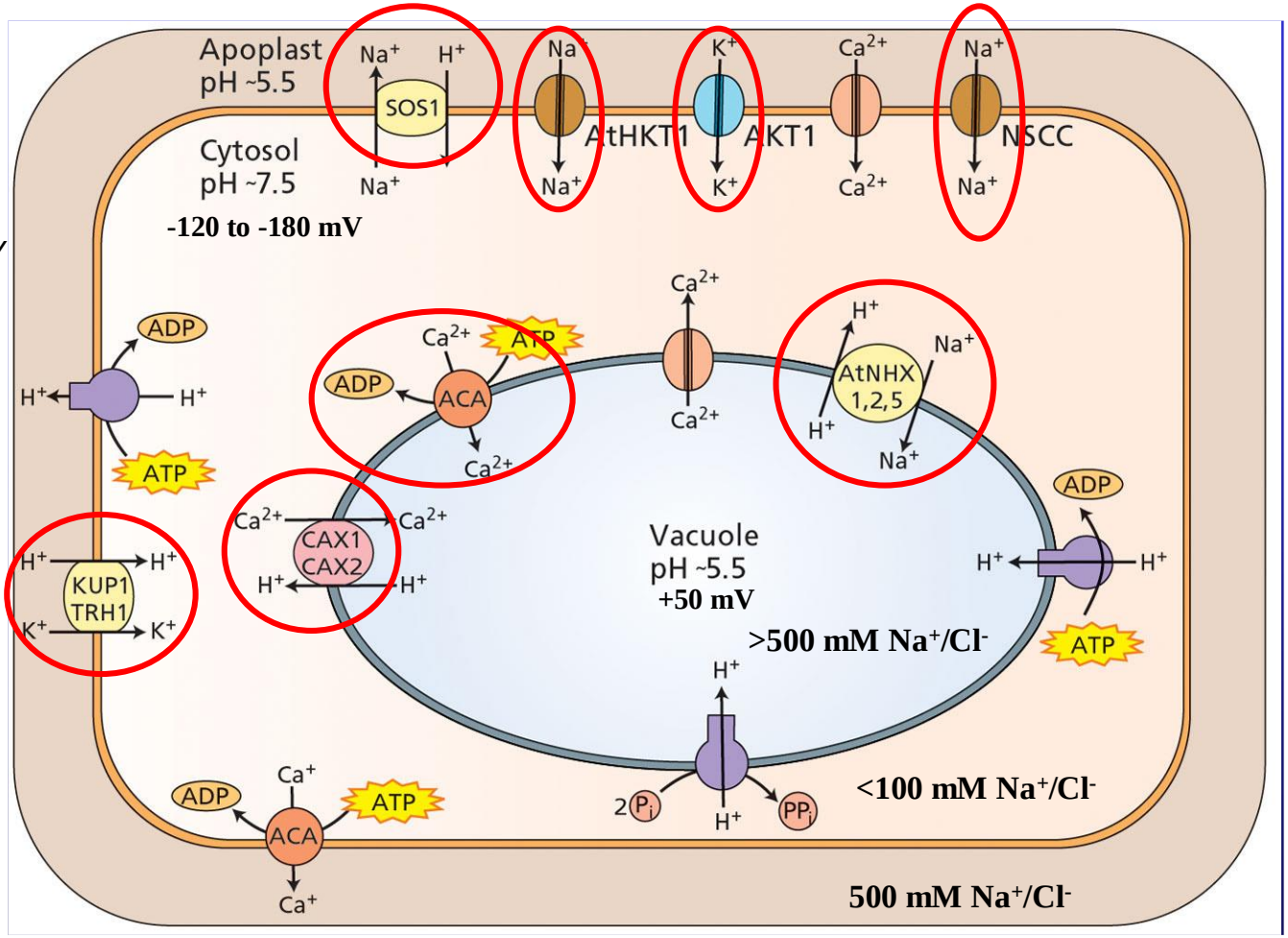
AKT1 – kalijev kanal

NSCC – neselektivni kationski kanal

CAX1 ili 2 – Ca^{2+}/H^+ antiporter

AtNHX1, 2 ili 5 – endomembranski Na^+/H^+ antiporter

AHA – H^+-ATP-aza na plazmatskoj membrani



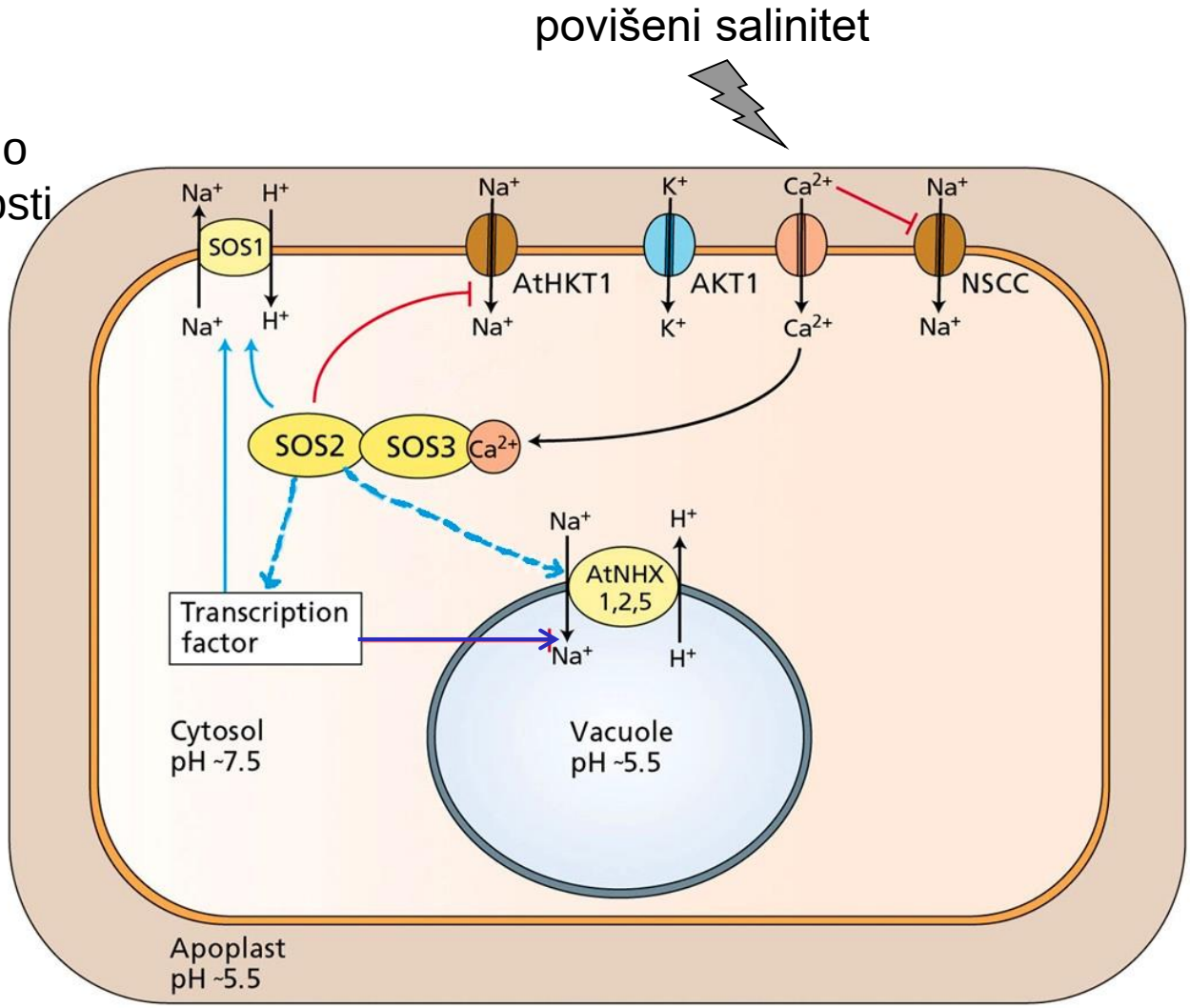
Taiz, L., Zeiger, E. (2002). Plant Physiology.

SOS - sustav prijenosa signala u regulaciji tolerancije povišenog saliniteta

-suvišak Na – pokreće prijenos signala koji dovodi do ekspresije i promjene aktivnosti membranskih prijenosnika

-povišeni salinitet aktivira Ca^{2+}-kanal; povišena konc. kalcija u citosolu aktivira prijenos signala putem SOS

SOS2 – serin/treonin kinaza koju aktivira SOS3
SOS3 – fosfataza regulirana kalcijem



Prijenos signala aktiviran Ca-SOS3-SOS2 regulira i ekspresiju i aktivaciju prijenosnika za Na

ABA, potaknuta osmotskim stresom, sudjeluje u transkripciji gena za AtNHX1 i druge prijenosnike

Taiz, L., Zeiger, E. (2002). Plant Physiology.

Literatura

Buchanan, B., Gruissem, W., Jones, R. L. (2015): **Biochemistry and Molecular Biology of Plants**.

Taiz, L., Zeiger, E. (2010): **Plant Physiology**. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Massachusetts. (www.plantphys.net)

Mahajan, S., & Tuteja, N. (2005). Cold, salinity and drought stresses: an overview. Archives of biochemistry and biophysics, 444(2), 139-158.

Gupta B, Huang, B. (2014) Mechanism of Salinity Tolerance in Plants: Physiological, Biochemical, and Molecular Characterization. International Journal of Genomics, Volume 2014, Article ID 701596, 18 pages.

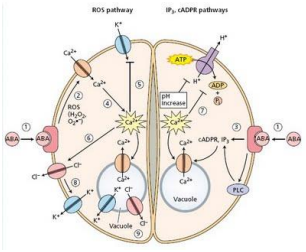
Zašto u uvjetima manjka vode i saliniteta nastaju ROS?

osmotski i/ili ionski stres

indukcija aktivnosti NAD(P)H oksidaze (respiratory burst oxidase homolog – RBOH)

-neki RBOH sudjeluju u stvaranju ROS za zatvaranje puči, a neki pokreću signal koji u konačnici dovodi do akumulacije prolina

otežano primanje vode

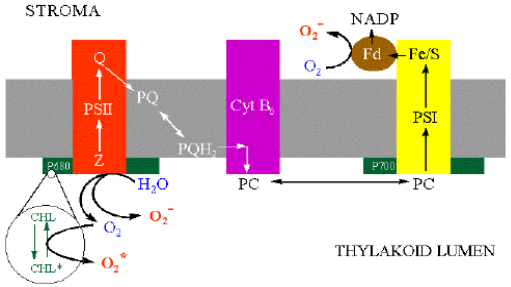


zatvaranje puči

pad unutarstaničnog CO_2 (usporen Calvinov ciklus)

porast stope fotorespiracije

previsoka reduciranost sastavnica lanca prijenosa elektrona



Hossain, M. S., & Dietz, K. J. (2016). Tuning of redox regulatory mechanisms, reactive oxygen species and redox homeostasis under salinity stress. *Frontiers in Plant Science 7*, 548.