

STRESNI UVJETI I ČIMBENICI KOJI UZROKUJU MANJAK VODE U BILJCI

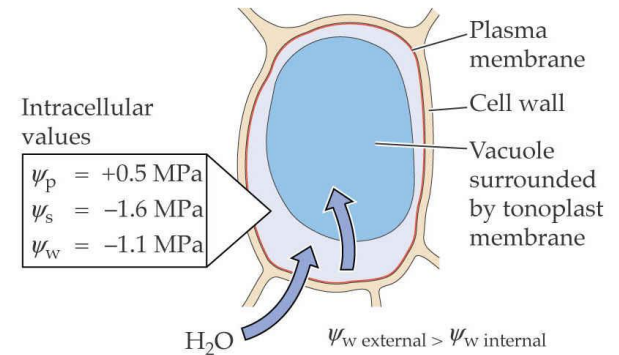
NEDOSTATAK VODE U TLU (SUŠA)

POVIŠENI SALINITET TLA

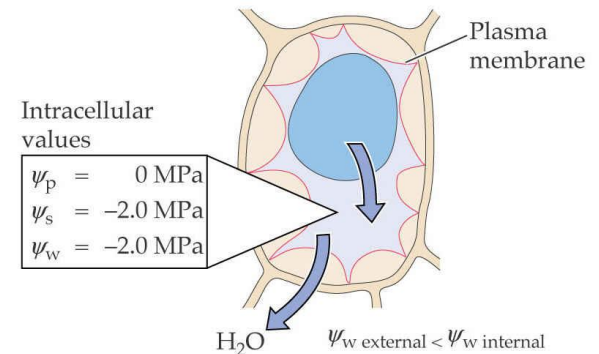
HLADNOĆA I SMRZAVANJE

TOPLINSKI STRES

Turgid cell: $\psi_{w \text{ external}} = 0 \text{ MPa}$



Plasmolyzed cell: $\psi_{w \text{ external}} = -2.5 \text{ MPa}$



HLADNOĆA I SMRZAVANJE

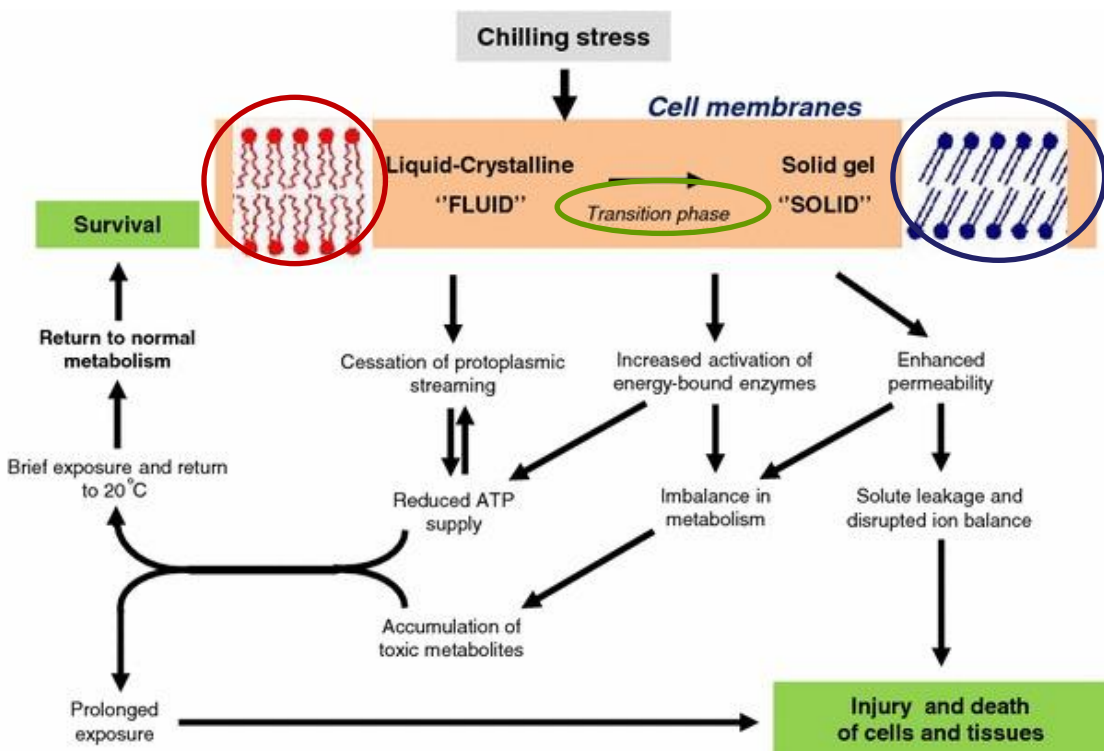
- 1. STRES UZROKOVAN HLADNOĆOM** (*chilling stress*)
-fiziološke i/ili strukturne promjene uzrokovane temperaturama nižim od optimalnih koje ne uzrokuju smrzavanje (za većinu biljaka 0-12 °C)
- 2. STRES UZROKOVAN SMRZAVANJEM** (*freezing stress*)
-fiziološke i/ili strukturne promjene uzrokovane stvaranjem kristala leda u tkivima i organima



1. UČINCI HLADNOĆE I SMRZAVANJA NA BILJKE

Promjena funkcije membrana

-utjecaj fluidnosti biomembrana na njihovu strukturu i funkciju



-toplina - ubrzava kretanje molekula, međumolekularne sile su slabije, membrane su fluidnije (**semifluidno stanje**)

-hladnoća - biomembrane su „krute” (**semikristalinično stanje**)

-potrebno više energije za aktivaciju biokemijskih procesa

→ promjena fizikalnih svojstava lipidnog dvosloja te svojstava i aktivnosti membranskih proteina

Temperatura tranzicije – temp. pri kojoj semifluidno stanje prelazi u semikristalinično (promjena faze)

Formiranje kristala leda → poremećaj vodne ravnoteže

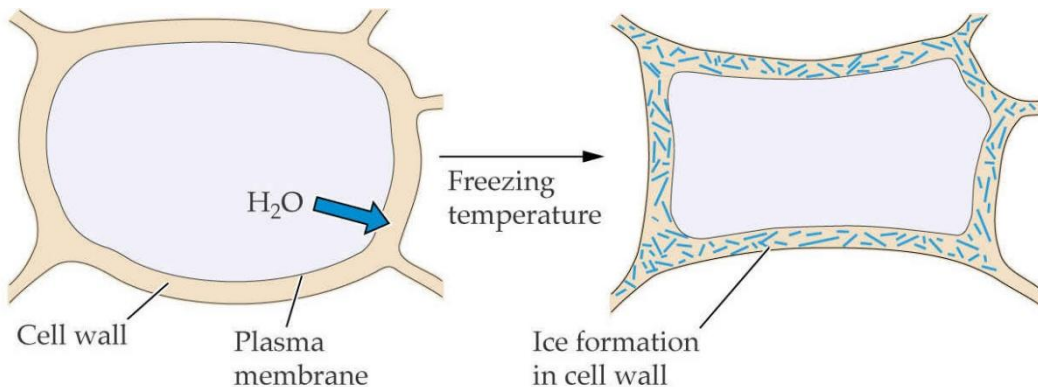
-oštećenje stanica dehidracijom

-kemijski potencijal vode u čvrstom (smrznutom) stanju je niži u odnosu na kemijski potencijal vode u tekućem stanju

Dehidracija stanica i mehaničko oštećenje membrane

1. formiranje kristala u međustaničnim prostorima i ksilemskim provodnim elementima (zbog niže koncentracije otopljenih tvari u tim prostorima u odnosu na citosol)

2. gibanje vode iz protoplasta u međustanične prostore (stanica gubi vodu → dehidracija)



3. daljnje povećanje postojećih kristala u međustaničnom prostoru i mehanička oštećenja membrane i stanične stijenke → **“prokapavanje”** membrane

4. Dodatna oštećenja zbog postojanja veze između membrane i stijenke

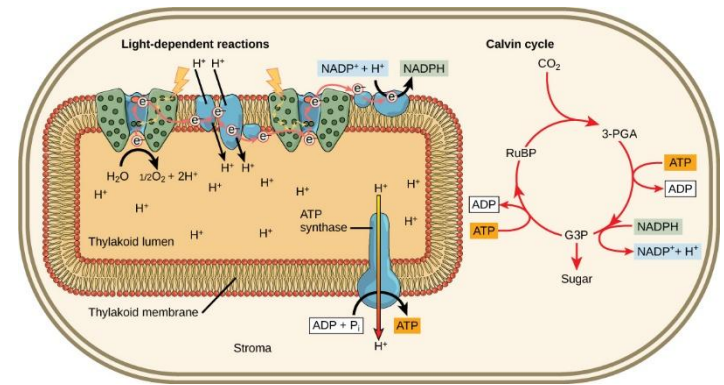
-djelovanje niskih temperatura na dehidrirana tkiva (npr. sjemenke i spore) ne uzrokuje oštećenja

Oksidacijski stres

- glavni izvor ROS su kloroplasti
- hladnoća ima manji učinak na apsorpciju svjetlosne energije, ali djeluje na prijenos elektrona → smanjena stopa fiksacije CO_2 u Calvinovu ciklusu je uzrok nastajanja ROS (osobito izraženo u uvjetima visokog intenziteta svjetlosti)
- porast staničnog H_2O_2 i ostalih ROS dovodi do oštećenja membrana (lipidne peroksidacije) → oštećenje plazmatske membrane kao i membrana organela

ROS kao signalne molekule

- pokretanje prijenosa signala - akumulacija ROS ("oxidative burst" – oksidacijski prasak) unutar nekoliko sati nakon izlaganja hladnoći (dio procesa aklimatizacije)
- regulacija brojnih gena koji se aktiviraju u uvjetima hladnoće i smrzavanja (*cold-responsive genes*) je povezana s prijenosom signala u kojem sudjeluju ROS



Ostale promjene

-zakiseljavanje citosola zbog narušavanja prijenosa H^+ -iona preko plazmatske membrane i tonoplasta → učinak na metaboličke reakcije

-promjene metabolizma ugljikohidrata

→ smanjena stopa rasta listova,
venuće, kloroza, nekroza



2. AKLIMATIZACIJA I OTPORNOST

-maksimalni stupanj tolerancije smrzavanja nije „konstitutivno” svojstvo već se inducira tijekom aklimatizacije, kao odgovor na temperature koje ne uzrokuju smrzavanje (temp. niže oko 10 °C od optimalne)

- glavni okolišni uvjeti koji potiču aklimatizaciju: niska temperatura te fotoperiod
- promjene kvalitete i intenziteta svjetlosti - putem fotoreceptora fitokroma
- Arabidopsis thaliana* – fitokrom B (PhyB) osim u percepciji svjetlosti sudjeluje i u odgovoru na temperaturne promjene (reverzija aktivnog P_{fr} u inaktivni P_r kontrolirana je i promjenom temp.)

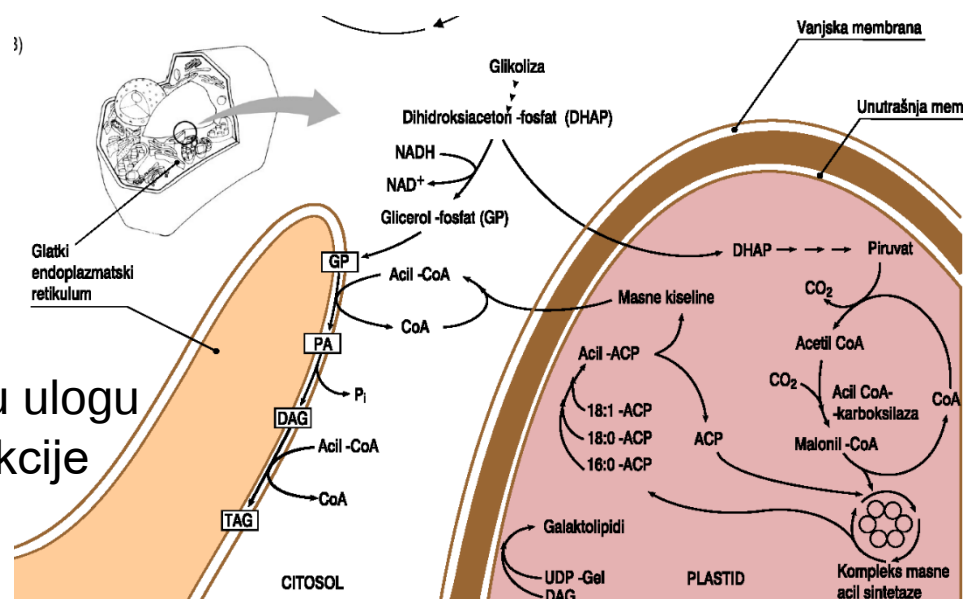
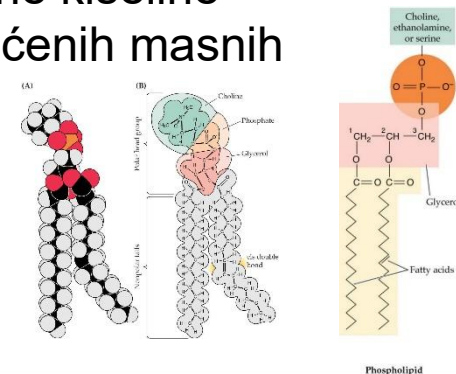
AKLIMATIZACIJA NA HLADNOĆU, tj. povećavanje tolerancije smrzavanja uslijed prethodnog izlaganja niskim temperaturama koje ne uzrokuju smrzavanje uključuje sljedeće mehanizme:

- stabilizaciju membrana
- akumulaciju kompatibilnih osmolita
- aktivaciju antioksidacijskog sustava
- biosintezu proteina koji imaju krioprotektivnu ulogu
- promjenu ekspresije gena (*cold-responsive genes*)

Stabilizacija membrana

- promjena sastava membranskih lipida → održavanje fluidnosti membrana i pri nižim temperaturama
- ubrzan proces **desaturacije** (uvođenje dvostrukih veza u masne kiseline glicerolipida uz enzime desaturaze → povećanje udjela nezasićenih masnih kiselina) → promjena faze (prelazak u semikristalinično stanje) pri nižoj temperaturi
- selekcija masne kiseline** za sintezu fosfatidne kiseline (PA) i njezinih derivata (uz acil-transferaze koje prenose aktivirane masne kiseline na hidroksilne skupine glicerol-3-fosfata)
- povećanje udjela fosfolipida i pad udjela sfingolipida glukocerebrozida
- promjena udjela membranskih sterola

Promjene količine i aktivnosti membranskih proteina; npr. imaju ulogu „senzora” hladnoće i unosa kalcija, interakcije s citoskeletom, zaštite od oštećenja (dehidracije) i popravka membrane



PA – fosfatidna kiselina (diacilglicerol-fosfat)

Akumulacija šećera i drugih kompatibilnih osmolita (krioprotektivna uloga)

- šećeri i drugi osmoliti** (npr. prolin, poliamini, glicin-betain, saharoza, glukoza, fruktoza, rafinoza, stahioza, šećerni alkoholi)
- krioprotektivna uloga - akumuliraju se u citosolu
- ublažavanje učinka dehidracije, a neki imaju i ulogu zaštite membrana
- krioprotektivna uloga nekih **proteina** – stabiliziraju proteine i membrane za vrijeme dehidracije uzrokovane niskim temperaturama

Aktivacija antioksidacijskog sustava

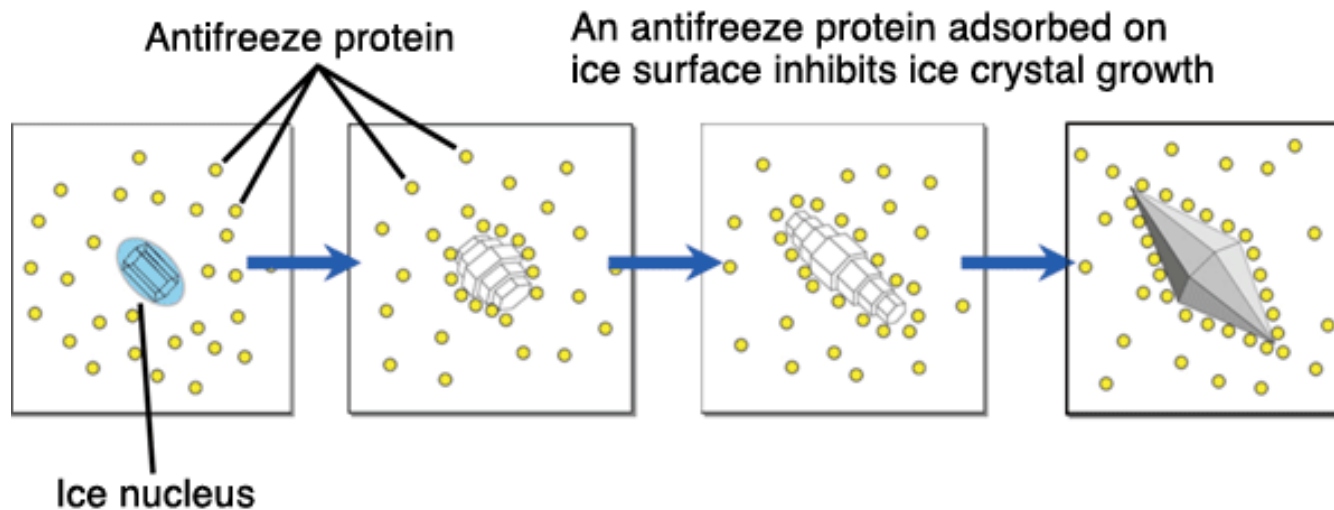
- tijekom aklimatizacije na hladnoću dokazana je povišena aktivnost antioksidacijskih enzima APX, GR, MDAR, DHAR i povišena ekspresija gena za te enzime
- genski modificirane biljke koje pokazuju povećanu ekspresiju Cu/Zn SOD, APX vezane uz tilakoide te GPX i GR su tolerantnije na stres uzrokovan hladnoćom i povišenim intenzitetom svjetlosti u odnosu na biljke divljeg tipa

Akumulacija antocijana

- vidljiva reakcija na hladnoću (i neke druge stresne uvjete)
- aktivacija fenil-propanoidnog i drugih putova biosinteze sekundarnih metabolita
- sinteza regulirana enzimima fenilalanin amonijska lijaza (PAL) i halkon sintaza
- uloga nije u potpunosti objašnjena, ali postoje naznake o povećanoj zaštiti od visokih intenziteta svjetlosti i ROS

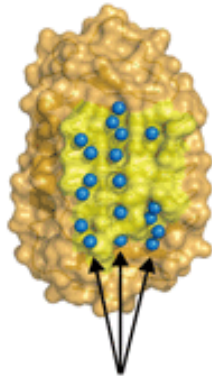
Pojava “antifreeze” proteina

- ograničavaju rast kristala leda na područje apoplasta (vežu se na površinu kristala leda, ograničavaju daljnji rast i sprečavaju širenje leda u unutrašnjost stanice)
- npr. apoplastni PR (*pathogenesis related*) proteini
- endohitinaze, $(1\rightarrow3)\beta$ -endoglukanaze i osmotin su *antifreeze* proteini u ozime raži



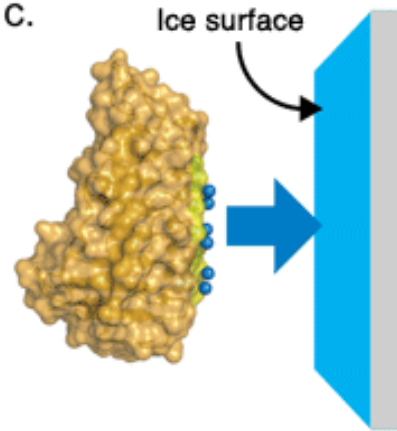
- za vrijeme aklimatizacije ozimih žitarica akumuliraju se toplivi šećeri u području staničnih stijenki i ograničavaju rast kristala leda

b.



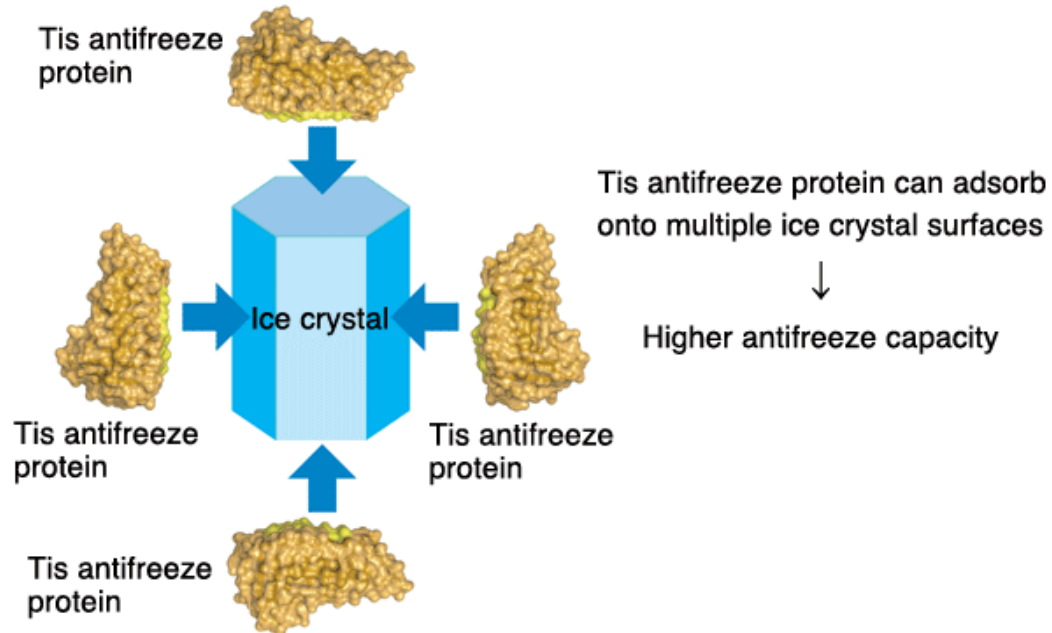
Water molecules coordinated on the adsorption site of the protein

c.



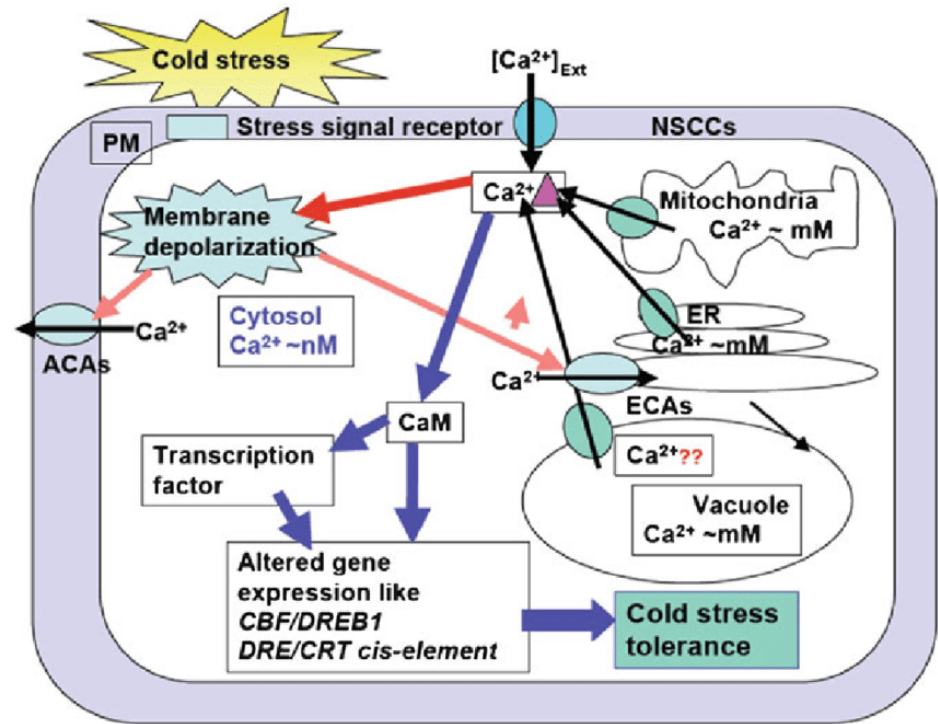
Adsorption model illustrating adsorption between an antifreeze protein and ice crystal

d.



Prijenos signala

- primarno mjesto percepcije hladnoće je vjerojatno vezano uz promjenu fluidnosti membrane (specifični receptor još nije poznat)
- tretman agensima koji mijenjaju fluidnost membrana dovodi do promjene tolerancije smrzavanja i aktivacije gena induciranih hladnoćom
- uloga kalcija u prijenosu signala – brza promjena koncentracije citosolnog kalcija (uglavnom uslijed ulaska Ca iz izvanstaničnog prostora)
- promjena organizacije citoskeleta
- reakcija Ca s proteinima koji vežu Ca (*Ca-binding proteins*) i interakcija s ostalim sastavnicama signalnog puta
 - kaskada fosforilacija proteina → transkripcijski faktori i geni (cold responsive genes)
- ostale sastavnice prijenosa signala: ROS, proteinske kinaze, proteinske fosfataze, lipidne molekule (npr. fosfatidna kiselina), ABA, etilen, salicilna kiselina
- uloga prolina u ekspresiji gena koji imaju *proline-responsive element* u promotoru



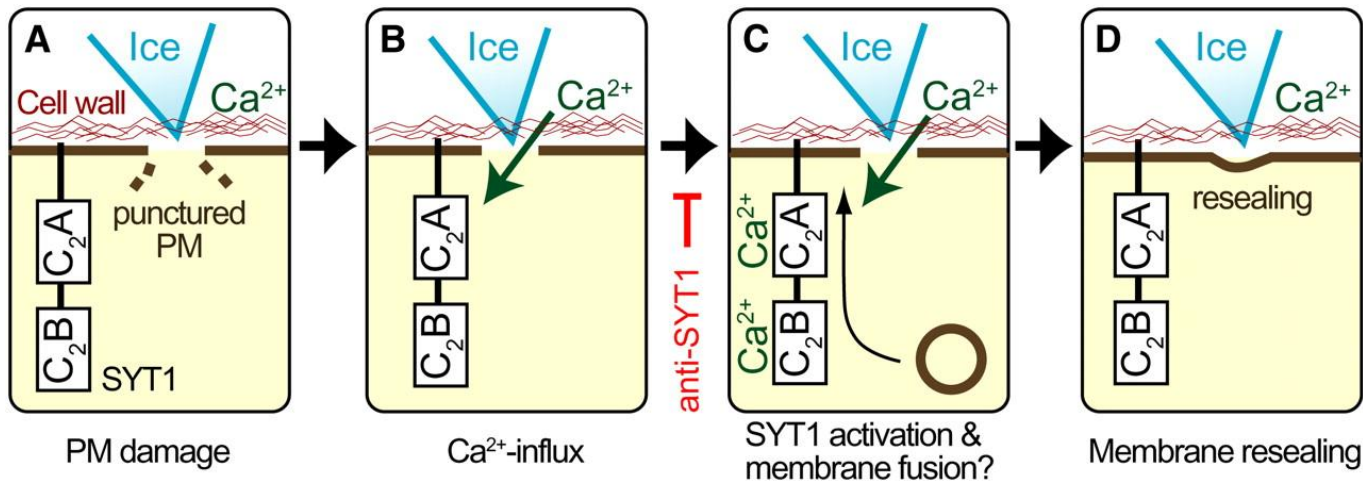
DREB - Dehydration-responsive element-binding transcription factor

Lindberg, S., Kader, M.A. and Yemelyanov, V., 2012. Calcium signalling in plant cells under environmental stress. In: Environmental adaptations and stress tolerance of plants in the era of climate change (pp. 325-360). Springer, New York, NY.

Primjer:

Uloga membranskog proteina sinaptotagmina u toleranciji smrzavanja

- sinaptotagmini djeluju kao senzori za kalcij
- u *A. thaliana* protein SYT1 naglo poraste tijekom aklimatizacije na hladnoću



A – mehaničko oštećenje plazmatske membrane kristalom leda

B – ulazak kalcija u stanicu na mjestu oštećenja

C – nakon vezanja Ca na SYT, fuzioniraju se endomembrane na oštećenom mjestu

D – “popravak” membrane na mjestu oštećenja

Tomokazu Yamazaki et al. (2008). Calcium-dependent freezing tolerance in Arabidopsis involves membrane resealing via synaptotagmin SYT1. *The Plant Cell* 20: 3389–3404.

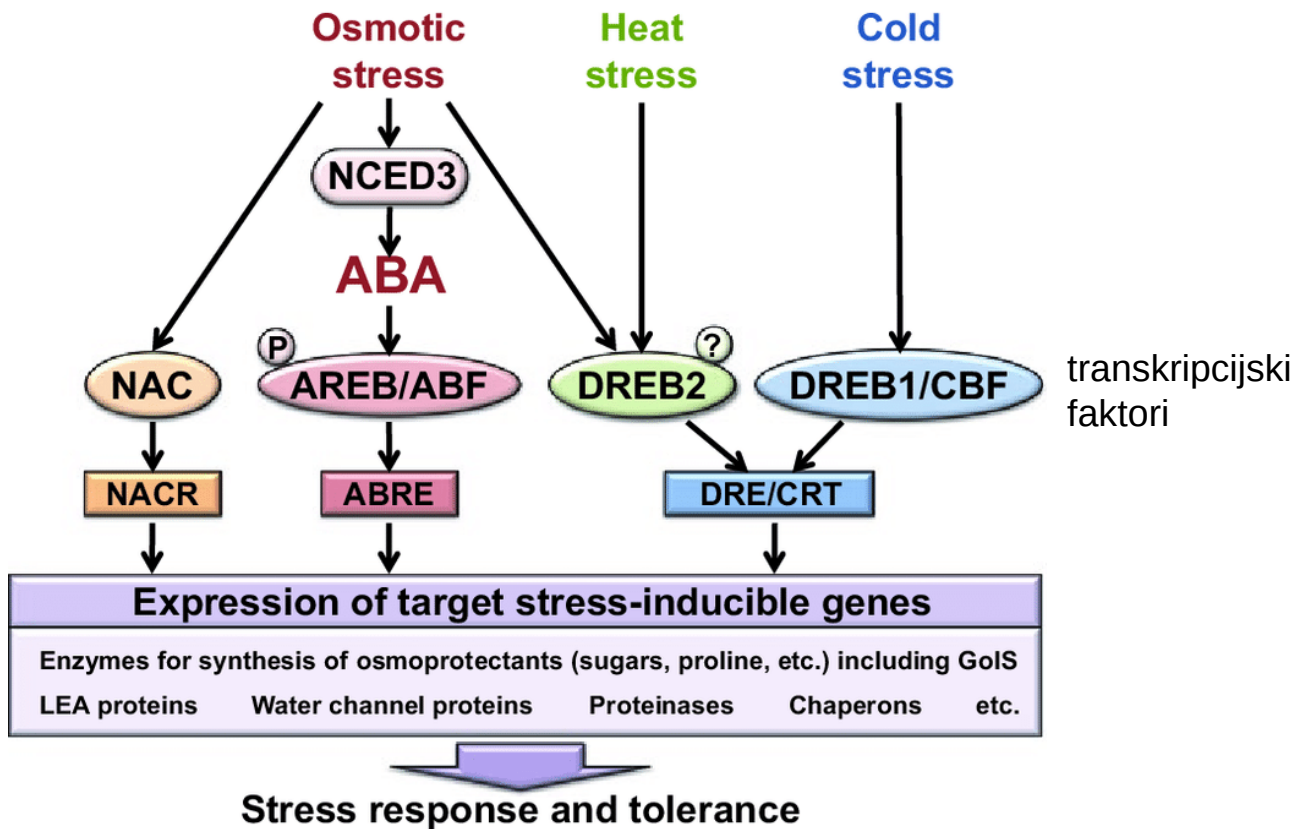
Promjena ekspresije gena

- tijekom **aklimatizacije na hladnoću** događa se promjena ekspresije gena (tzv. *cold-inducible genes* i *cold-responsive genes*)
- neki geni koji se induciraju pod utjecajem niske temp. također se induciraju u uvjetima manjka vode ili pod utjecajem ABA

Primjeri:

- gen koji kodira desaturazu masnih kiselina (gen za *FAD8* u vrste *Arabidopsis*)
FAD – *fatty acid desaturase*
- geni koji kodiraju molekularne šaperone - *HSP70* i *HSP90* (ublažavanje denaturacije izazvane hladnoćom), enzime za biosintezu osmolita, detoksifikacijske enzime...
- geni koji kodiraju regulatorne proteine i proteine koji sudjeluju u prijenosu signala (npr. kinaze i proteine srodne kalmodulinu)
- proteini koji se sintetiziraju pod utjecajem hladnoće su homologni proteinima iz sljedećih proteinskih familija:
 - RAB (*responsive to ABA*)
 - LEA (*late embryo abundant*) – sintetiziraju se i kao odgovor na osmotski stres
 - DHN (*dehydrin*) – ubrajaju se u LEA

Prijenos signala u odgovoru na osmotski i toplinski stres te hladnoću -neki transkripcijski faktori mogu sudjelovati u više signalnih puteva



Nakashima, K. et al. (2018). Application of biotechnology to generate drought-tolerant soybean plants in Brazil: development of genetic engineering technology of crops with stress tolerance against degradation of global environment. In: Crop Production under Stressful Conditions (pp. 111-130). Springer, Singapore.

Osmotski, toplinski i stres uzrokovan hladnoćom induciraju biosintezu ili aktivaciju transkripcijskih faktora koji reguliraju ekspresiju gena. Proteini koje ti geni kodiraju omogućuju toleranciju stresa.

GoS - *galactinol synthase*
 -enzim u biosintezi rafinoze

Povećanje oštećenja hladnoćom uzrokovano bakterijama

- bakterije *Pseudomonas syringae* i *Erwinia herbicola* – na površini listova u prirodnim uvjetima
- pri temp. -3 do -5 °C utječu na formiranje kristala leda na površini listova (mraz, inje)
- neki njihovi proteini djeluju kao nukleatori (vežu molekule vode duž repetitivnih aminokiselinskih domena u proteinu)
- površinski led se brzo širi u međustanične prostore lista → dehidracija stanica

Lindow, S. E., Arny, D. C., Upper, C. D. (1982). Bacterial ice nucleation: a factor in frost injury to plants. *Plant. Physiol.* 70, 1084-1089.

- Daljnja istraživanja: u *P. syringae* – proteini-nukleatori od oko 150 kDa;
- potvrđena je ekspresija modificiranih proteina koji nemaju svojstvo nukleatora, ali za sada nisu strukturno opisani

Juurakko, C. L., Walker, V. K. (2021). Cold acclimation and prospects for cold-resilient crops. *Plant Stress*, 2, 100028.

LITERATURA

Buchanan, B., Gruissem, W., Jones, R. L. (2015). Biochemistry and Molecular Biology of Plants. American Society of Plant Biologists. Wiley Blackwell.

Shilpi Mahajan, Narendra Tuteja (2005). Cold, salinity and drought stresses: An overview. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 444, 139–158.

Sudesh Kumar Yadav (2010). Cold stress tolerance mechanisms in plants. A review. *Agronomy for Sustainable Development* 30, 515–527.