

# Uloga brasinosteroida u toleranciji abiotičkog stresa

---

Rendulić, Toni

Undergraduate thesis / Završni rad

2015

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:217:902960>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-10-06**



Repository / Repozitorij:

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



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU**  
**PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET**  
**BIOLOŠKI ODSJEK**

Uloga brasinosteroida u toleranciji abiotičkog stresa

The Role of Brassinosteroids in Abiotic Stress Tolerance

**SEMINARSKI RAD**

Toni Rendulić

Preddiplomski studij molekularne biologije

(Undergraduate Study of Molecular Biology)

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

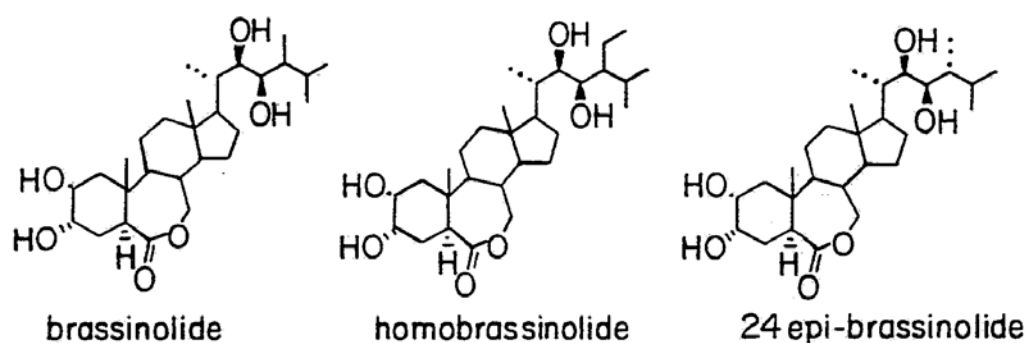
Zagreb, 2015.

# SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. BRASINOSTEROIDI – BIOSINTEZA I PRIJENOS SIGNALA.....	2
3. ULOGA BRASINOSTEROIDA U TOLERANCIJI ABIOTIČKOG STRESA.....	5
3.1 Odgovor na oksidativni stres.....	5
3.2 Tolerancija vodnog stresa.....	6
3.3 Tolerancija povišenog saliniteta.....	7
3.4 Tolerancija povišenih temperatura.....	8
3.5 Tolerancija hladnoće.....	9
3.6 Tolerancija teških metala.....	9
4. ZAKLJUČAK.....	10
5. LITERATURA.....	10
6. SAŽETAK.....	12
7. SUMMARY.....	12

## 1. UVOD

Biljni rast, razvoj i odgovori na promjene u okolišu su složeni procesi. Za dobru organizaciju i upravljanje takvim procesima potrebne su brojne signalne molekule, među kojima i biljni hormoni. Uz auksine, gibereline, citokinine, abscizinsku kiselinu i etilen, brasinosteroidi su šesta te ujedno i zadnja otkrivena skupina biljnih hormona (Sl. 1.). Naziv im potječe od biljke *Brassica napus* L. za čiji je ekstrakt polena sedamdesetih godina prošlog stoljeća utvrđeno da potiče rast biljaka (Mitchell i sur. 1970) te iz kojeg su zatim brasinosteroidi uspješno i izolirani.



**Slika 1.** Kemijske strukture brasinolida, 28-homobrasinolida i 24-epibrasinolida, tri najzastupljenija brasinosteroida u znanstvenim istraživanjima. Preuzeto i prilagođeno s [www.google.com/patents/WO1993007142A1](http://www.google.com/patents/WO1993007142A1)

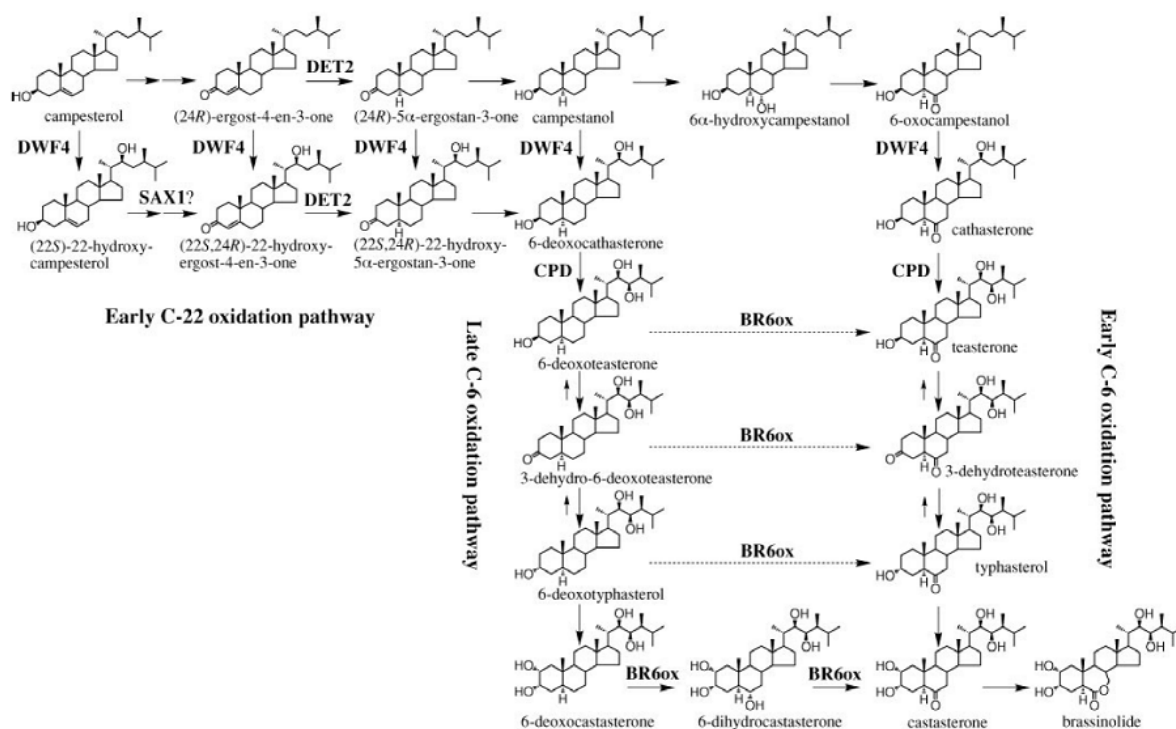
Brasinosteroidi su  $C_{27}$ ,  $C_{28}$  i  $C_{29}$ -steroidni hormoni i biljke ih stvaraju biosintezom iz kampesterola. Imaju značajnu ulogu u raznim procesima u biljci kao što su dioba i produžni rast stanica u stabljici i korijenu, fotosinteza, reprodukcija, starenje listova te odgovor na stres (Fariduddin i sur. 2014). Mlado rastuće tkivo sadrži više brasinosteroida od zrelog tkiva, pa tako 1 kg svježje mase polena i nezrelog sjemenja sadrži 1 – 100  $\mu\text{g}$  brasinosteroida, dok ih 1 kg svježje mase stabljika i lišća sadrži 0.01 – 0.1  $\mu\text{g}$ . Upravo ovako niske koncentracije su glavni uzrok njihovog kasnog otkrića.

Cilj ovog rada je osvrtno na djelovanje brasinosteroida u biljkama koje su izložene abiotičkom stresu, što uključuje sušu, povišeni salinitet, ekstremne temperature i povišene koncentracije toksičnih teških metala. Zbog svojeg još u potpunosti nerazriješenog mehanizma djelovanja, kao i povoljnih rezultata u povećanju prinosa kod biljaka pod

biotičkim i abiotičkim stresom, brasinosteroidi nisu samo zanimljivi zbog novih znanstvenih spoznaja, nego i zbog potencijalne primjene u proizvodnji hrane i ostalih biljnih proizvoda.

## 2. BRASINOSTEROIDI - BIOSINTEZA I PRIJENOS SIGNALA

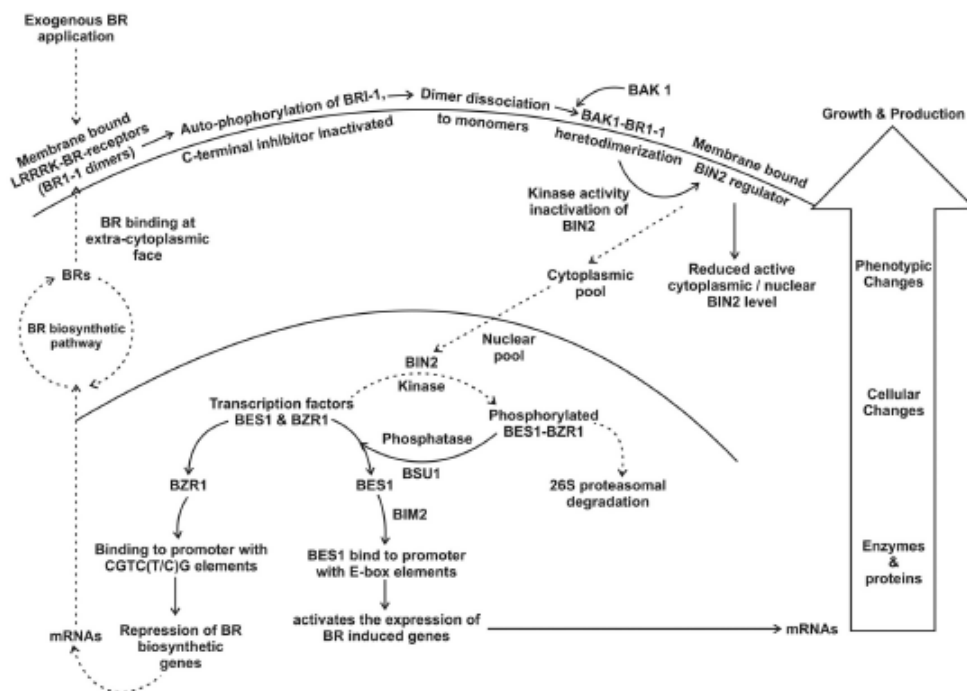
Zajednički prekursor svih steroidnih spojeva, pa tako i brasinosteroida, jest 2,3-oksidoskvalen. Biosintezom, biljke iz 2,3-oksidoskvalena stvaraju fitosterole. Utvrđeno je da za njihovu sintezu biljke pritom posjeduju dva paralelna biosintetska puta, cikloartenolni i lanosterolni (Ohyama i sur. 2008). Jedan od fitosterolnih spojeva je i kampesterol, glavni prekursor za daljnju biosintezu brasinosteroida. Istraživanjem i karakterizacijom mutanata patuljastog fenotipa biljke *Arabidopsis thaliana*, utvrđeno je da su brojni mutanti deficitarni upravo za enzime koji sudjeluju u biosintezi kampesterola i brasinosteroida, što ukazuje da su brasinosteroidi esencijalni za normalan rast i razvoj u životnom ciklusu biljaka (Cheon i sur. 2013). Fenotip mutanata deficitarnih za navedene enzime jednak je fenotipu divljeg tipa nakon tretmana brasinosteroidima.



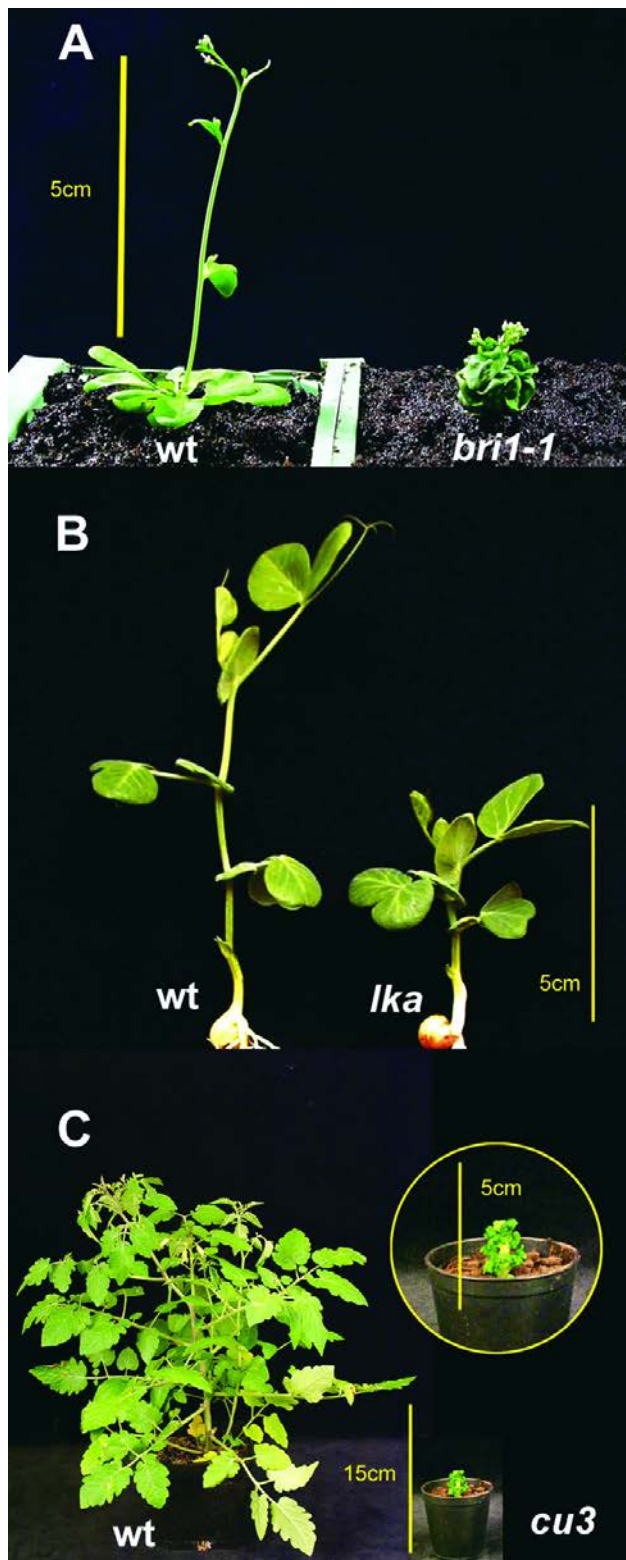
**Slika 2.** Poznati putevi biosinteze brasinolida u biljci *Arabidopsis thaliana* L. Preuzeto iz Fujioka i Yokota (2003).

Istraživanja metabolizma brasinosteroida su pokazala kako postoji više paralelnih puteva biosinteze, tzv. rani i kasni C-6 oksidativni putevi, te rani C-22 put (Sl. 2.). Također je pokazano da među tim putevima postoje veze, što znači da nisu posve autonomni (Fujioka i Yokota 2003). Većina enzima u putu biosinteze brasinosteroida pripada porodici citokroma P450. Funkcioniraju kao monooksigenaze i kataliziraju hidroksilaciju svojih supstrata (Cheon i sur. 2013)

Brasinosteroidi se vežu na receptor na površini stanice nazvan brassinosteroid-insensitive 1 (BRI1), serinsko-treoninsku kinazu. Vezanje brasinolida na BRI1 pokreće interakciju između BR1 i kinaze nazvane BR1 associated receptor kinase 1 (BAK1). Signal se zatim prenosi u citoplazmu nepoznatim mehanizmom gdje inhibira negativni regulator brassinosteroidnog signalnog puta nazvan brassinosteroid-insensitive 2 (BIN2). BIN2 je proteinska kinaza koja fosforilira dva vrlo slična transkripcijska faktora, BRI 1-EMS supressor 1 (BES1) i brassinazole resistant 1 (BZR1), negativno regulirajući njihovu aktivnost. BRI 1 supressor 1 (BSU1) defosforilira transkripcijske faktore BRI 1-EMS i BES1 i ima suprotan učinak od BIN2. BES1 zatim aktivira ekspresiju brassinosteroidno-inducibilnih gena. BZR1 suprimira aktivnost brassinosteroidnih biosintetskih gena te na taj način sudjeluje u negativnoj povratnoj sprezi brassinosteroidnog odgovora (Sl. 3.). Mutacije u genu za BRI1 receptor također uzrokuju patuljasti fenotip (Sl. 4.).



**Slika 3.** Predloženi model staničnog odgovora nakon vezanja brasinosteroida na BRI1 stanični receptor. Preuzeto iz Fariduddin i sur. (2014).



**Slika 4.** Usporedba divljeg tipa i patuljastih *bri1* mutanata s nefunkcionalnim brasinosteroidnim staničnim receptorom u tri različite biljne vrste. A) *Arabidopsis thaliana* L. B) *Pisum sativum* L. C) *Solanum lycopersicum* L. Preuzeto iz Bishop i Koncz (2002).

### 3. ULOGA BRASINOSTEROIDA U TOLERANCIJI ABIOTIČKOG STRESA

#### 3.1 Odgovor na oksidativni stres

Tijekom fotosinteze i staničnog disanja konstantno dolazi do stvaranja štetnih reaktivnih kisikovih oblika kao što su superoksidni radikal ( $O_2^-$ ), vodikov peroksid ( $H_2O_2$ ) i hidroksilni radikal ( $OH\cdot$ ). Biljke stoga posjeduju mehanizme kojima održavaju svoju redoks-homeostazu. Abiotički stres može omesti te obrambene mehanizme te na taj način prouzročiti oksidativna oštećenja u stanici kao i staničnu smrt.

U obrambenim mehanizmima za održavanje redoks-homeostaze sudjeluju antioksidativni enzimi poput superoksid-dismutaze (SOD), katalaze (CAT), gvajakol-peroksidaze (POX), askorbat-peroksidaze (APX), monodehidroaskorbat-reduktaze (MDHAR), glutation-reduktaze (GR) i glutation-peroksidaze (GPX) te neenzimski antioksidansi poput askorbinske kiseline, glutationa,  $\alpha$ -tokoferola i karotenoida. Iako se ne zna mnogo o točnoj ulozi brasinosteroida u odgovoru biljke na oksidativni stres, istraživači su dokazali da se tretiranjem biljaka brasinosteroidima utječe na aktivnost antioksidativnih enzima kao i koncentraciju neenzimskih antioksidansa.

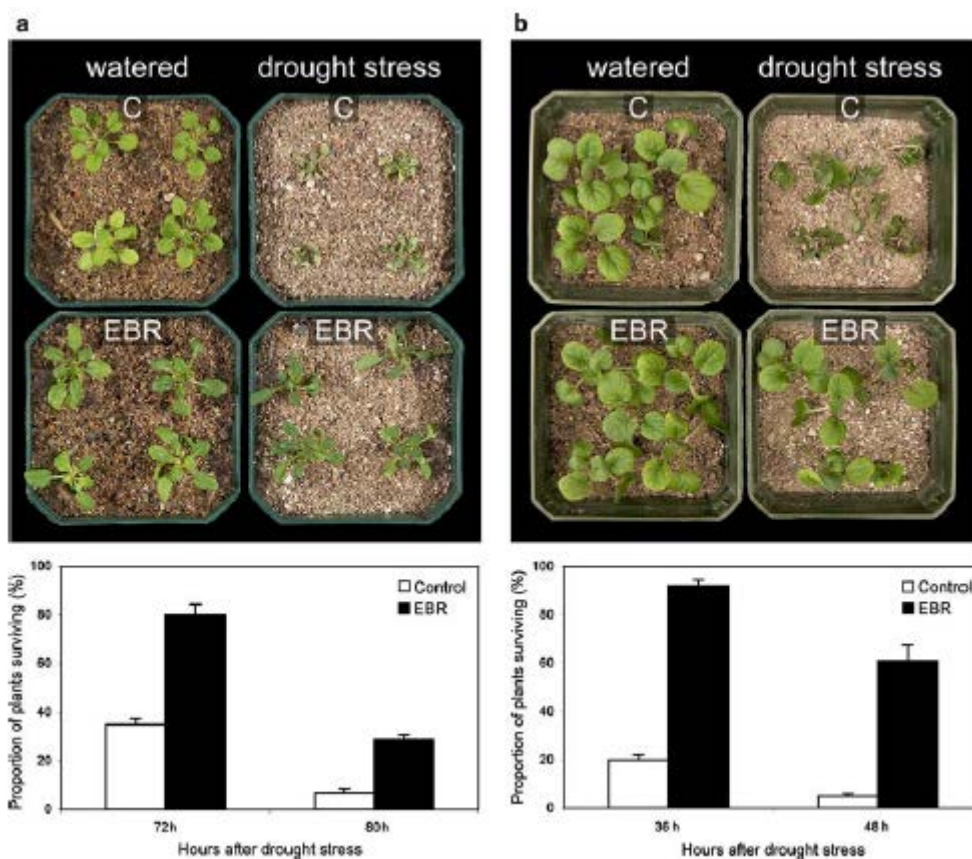
Nakon što klijanci kukuruza (*Zea mays* L.) tretirani brasinosteroidima budu podvrgnuti vodnom stresu, dolazi do povećanja aktivnosti SOD, CAT, APX te povišenja koncentracije askorbinske kiseline i karotenoida (Li i sur. 1998). Klijanci riže (*Oryza sativa* L.) podvrgnuti povišenom salinitetu i tretirani brasinosteroidima pokazuju značajni porast aktivnosti CAT, SOD i GR te blagi porast aktivnosti APX (Nunez i sur. 2003). Zanimljivo je da *Arabidopsis mutant det-2*, koji nema mogućnost biosinteze brasinosteroida, također posjeduje povišenu toleranciju na oksidativni stres, koja je u korelaciji s konstitutivnim porastom aktivnosti SOD i transkripcijom CAT gena. Moguće pojašnjenje jest da dugotrajni nedostatak brasinosteroida rezultira konstantnim fiziološkim stresom koji uzrokuje aktivaciju konstitutivne ekspresije nekih od obrambenih gena. Iz toga se može pretpostaviti da endogeni brasinosteroidi u biljkama divljeg tipa na neki način suprimiraju ekspresiju obrambenih gena, kako bi osigurali normalan rast i razvoj biljaka. Međutim, još uvijek je nejasno moduliraju li brasinosteroidi odgovor biljke na oksidativni stres direktno ili indirektno (Fariduddin i sur. 2014).



### 3.2 Tolerancija vodnog stresa

Vodni stres je uzrokovan manjkom vode (sušom) te također povišenim sadržajem soli u tlu. Očituje se smanjenjem relativnog sadržaja vode u biljci, smanjenjem vodnog potencijala listova, zatvaranjem puči i smanjenim rastom biljke. Krajnji ishod izrazitog vodnog stresa može biti prestanak fotosinteze i smrt biljke.

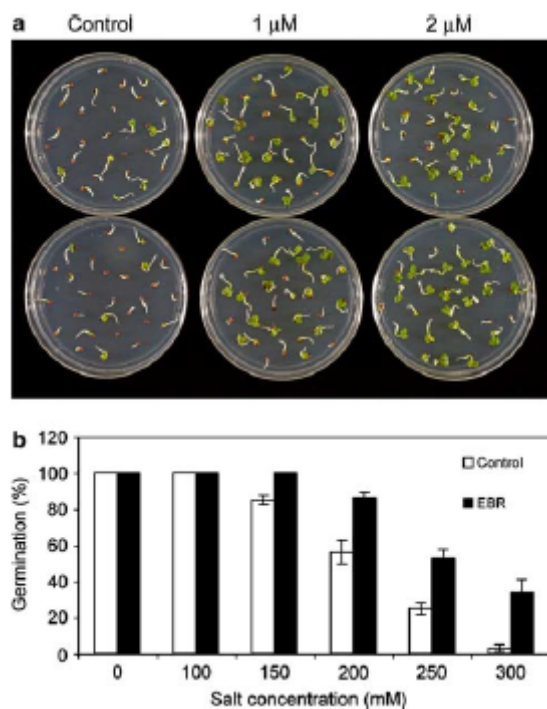
U biljaka pod vodnim stresom koje su prethodno tretirane brasinosteroidima posljedice su manje nego u netretiranih. *Phaseolis vulgaris* L. prije vodnog stresa, a tretiran brasinosteroidima, pokazuje povećanu nodulaciju korijena, sadržaj zeatina i nitrogenaznu aktivnost, a isti čimbenici su povišeni i nakon izlaganja vodnom stresu (Upreti i Murti 2004). Klijanci *Arabidopsis thaliana* L. i *Brassica napus* L. uzgajani u mediju s 1  $\mu$ M 24-epibrasinolidom i zatim presađeni u pijesak i izloženi suši, pokazali su veću toleranciju na sušu od kontrolnih klijanaca (Sl. 5.) (Kagale i sur. 2007).



**Slika 5.** Klijanci a) *Arabidopsis thaliana* L. i b) *Brassica napus* L. tretirani i netretirani 24-epibrasinolidom te uzgajani u pijesku uz zalijevanje i bez zalijevanja vodom (gore). Udio preživjelih tretiranih i netretiranih klijanaca nakon 72 h i 82 h odnosno 36 h i 48 h (dolje).

### 3.3 Tolerancija povišenog saliniteta

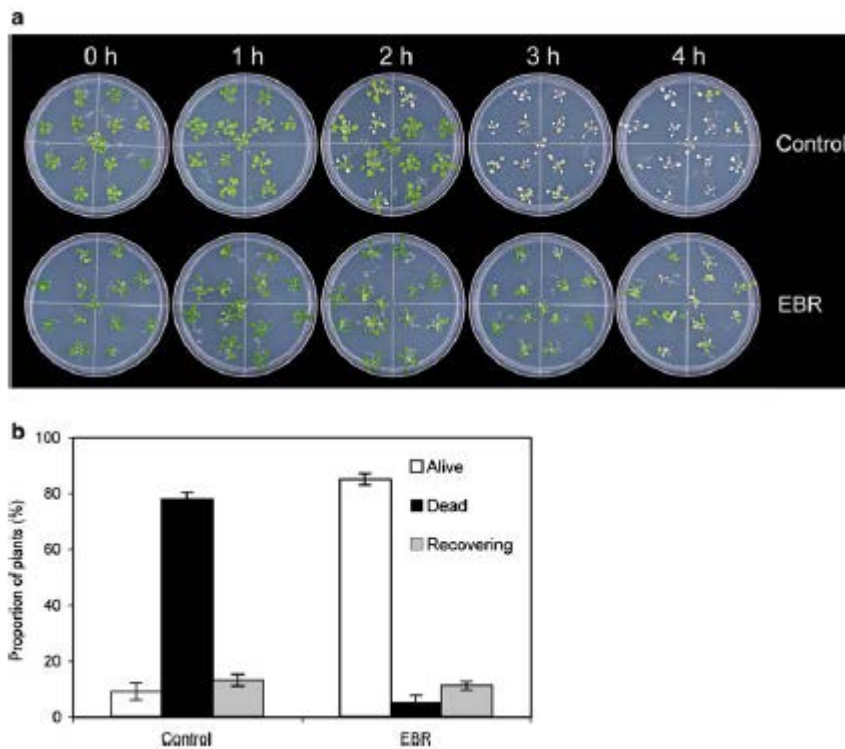
Povišeni salinitet je snažan abiotički stres za biljku koji također utječe na rast, razvoj i produktivnost biljaka. Uzrokuje osmotski stres, ionsku toksičnost i ometa unos i transport vode i mineralnih tvari. U biljkama pod takvim uvjetima se nakuplja prolin, djelujući kao osmolit i kao signal za stres. Nakupljanje prolina ovisi o aktivnosti enzima  $\Delta^1$ -pirolin-5-karboksilat sintetaze (P5CS) koja sudjeluje u biosintezi prolina te o prolin-dehidrogenazi (PDH) koja katalizira degradaciju prolina. Povišeni salinitet također potiče biljke na proizvodnju apscizinske kiseline. S obzirom da brasinolid inhibira indukciju transkripcije P5CS putem apscizinske kiseline i povišenog saliniteta, brasinosteroidi vjerojatno imaju ulogu u negativnoj regulaciji ta dva puta staničnog odgovora (Bajguz i Hayat 2009). 24-epibrasinolid umanjuje inhibitory učinak soli na klijanje uljane repice *Brassica napus* L. (Sl. 6.) (Kagale i sur. 2007).



**Slika 6.** a) Klijanci *Brassica napus* L. u mediju s 250 mM NaCl te bez dodatka odnosno s dodatkom 1 μM i 2 μM 24-epibrasinolida b) Udio prokljalih sjemenki *Brassica napus* L. u mediju bez odnosno s dodatkom 100 mM, 150 mM, 200 mM, 250 mM i 300 mM NaCl. Preuzeto iz Kagale i sur. (2007).

### 3.4 Tolerancija povišenih temperatura

Visoke temperature su vrlo opasne za biljke, a najvažniji procesi koji su na njih izuzetno osjetljivi su fotosinteza i održavanje sadržaja vode u listovima i drugim tkivima. Biljke tretirane 24-epibrasinolidom pokazuju veću toleranciju povišenih temperatura. Mogući razlozi su veće nakupljanje malih mitohondrijskih proteina toplotnog šoka te očuvanje enzima uključenih u Kalvinov ciklus. Klijanci *Arabidopsis thaliana* L. tretirani 24-epibrasinolidom i izloženi temperaturi od 43 °C imaju mogućnost dugotrajnije tolerancije i oporavka (Sl. 7.) (Kagale i sur. 2007).



**Slika 7.** a) Klijanci *Arabidopsis thaliana* L. netretirani i tretirani 24-epibrasinolidom te izloženi temperaturi od 43 °C nakon 1, 2, 3 i 4 sata b) Udio netretiranih i tretiranih živih, oporavljajućih i mrtvih klijanaca izloženih temperaturi od 43 °C u trajanju od 3h, nakon 7 dana oporavka pri normalnoj temperaturi. Preuzeto iz Kagale i sur. (2007).

### 3.5 Tolerancija hladnoće

Niske temperature su ograničavajući faktor produktivnosti biljaka svojstvenih za tropsku i suptropsku klimu. Niske temperature ometaju fotosintezu i vodnu ravnotežu te isto uzrokuju povećanu akumulaciju šećera i peroksidaciju lipida. Klijanci izloženi temperaturi od 2 °C i tretirani 24-epibrasinolidom imaju značajno jaču pigmentaciju od kontrolnih klijanaca. Također je utvrđeno da klijanci *Arabidopsis thaliana* L. tretirani 24-epibrasinolidom i izloženi niskoj temperaturi imaju povišenu ekspresiju gena povezanih s hladnoćom u odnosu na kontrolne klijance (Kagale i sur. 2007). Oštećenja uslijed izloženosti ubranog ploda rajčice niskim temperaturama kao i gubitak elektrolita i sadržaj malondialdehida uspješno su reducirani nakon tretiranja plodova brasinosteroidima (Aghdam i sur. 2012).

### 3.6 Tolerancija teških metala

Brasinosteroidi mogu biti korišteni pri smanjenju nakupljanja teških metala u biljkama kao i u umanjenju toksičnih učinaka teških metala na biljke. Jedan od načina detoksifikacije je heliranje metalnih iona ligandima poput fitohelatina. Brasinosteroidi stimuliraju biosintezu fitohelatina u algi *Chlorella vulgaris* te je uslijed toga utvrđena manja količina bioakumulacije olova u algi (Bajguz 2002). 24-epibrasinolid i 28-homobrasinolid umanjuju toksični efekt kadmija na klijavost sjemenja i rast klijanaca rotkvice *Raphanus sativus* L. uz povišenu aktivnost antioksidativnih enzima CAT, SOD, APX i GPX te umanjenju peroksidaciju lipida (Anuradha i Rao 2007). Vjerojatno jedan od mehanizama umanjenja toksičnog učinka teških metala na biljke je upravo povišenje aktivnosti antioksidativnih enzima. Tretiranje sjemenja *Brassica juncea* L. 24-epibrasinolidom prije klijanja smanjuje unos i akumulaciju bakra u klijance (Sharma i Bhardwaj 2007).

## 4. Zaključak

Brasinosteroidi imaju širok spektar djelovanja na biljke - od poticanja rasta i razvoja do veće tolerancije abiotičkog stresa i sve su to poželjne promjene. Znanstvenici se uglavnom bave istraživanjem mutanata deficitarnih za biosintezu brasinosteroida ili utjecanjem brasinosteroida na biljku nakon vanjskog tretiranja. Bilo bi zanimljivo usporediti fenotip genetski modificirane biljke s povišenom ekspresijom gena za biosintezu brasinosteroida i samim time njihovom većom endogenom proizvodnjom u odnosu na fenotip divljeg tipa biljke. Također je potrebno još detaljnije razjasniti sudjelovanje brasinosteroida u signalnim putevima, koliko puteva postoji, koliko su umreženi i utječu li na pojedini tip staničnog odgovora direktno ili indirektno. Iako postoji još niz neodgovorenih pitanja o načinu djelovanja ove zadnje otkrivene skupine hormona, predvidljivo je da uz smanjenje troškova njihove proizvodnje postoji visoki potencijal njihove primjene u gospodarstvu, posebice u svrhu povećanja tolerancije na abiotički stres, a samim time i prinosa u ovo doba klimatskih promjena i prekomjernog zagađenja.

## 5. Literatura

- Aghdam M.S., Asghari M., Farmani B., Mohayjeji M., Moradbeygi H. 2012. Impact of postharvest brassinosteroids treatment on PAL activity in tomato fruit in response to chilling stress. *Sci. Hortic.* 144: 116-120.
- Anuradha S., Rao S.S.R. 2007. Effect of brassinosteroids on radish (*Raphanus sativus* L.) seedlings growing under cadmium stress. *Plant Soil Environ.* 53: 465-472.
- Bajguz A., Hayat S. 2009. Effects of brassinosteroids on the plant responses to environmental stresses. *Plant. Physiol. Biochem.* 47: 1-8.
- Bajguz A. 2002. Brassinosteroids and lead as stimulators of phytochelatin synthesis in *Chlorella vulgaris*. *J. Plant Physiol.* 159: 321–324.
- Bishop G.J., Koncz C. 2002. Brassinosteroids and plant steroid hormone signaling. *Plant Cell* S97–S110 (Supplement 2002).

- Cheon J., Fujioka S., Dilkes B.P., Choe S. 2013. Brassinosteroids regulate plant growth through distinct signaling pathways in *Selaginella* and *Arabidopsis*. PLoS ONE 8 (12): e81938.
- Fariduddin Q., Yusuf M., Ahmad I., Ahmad A. 2014. Brassinosteroids and their role in response of plants to abiotic stresses. Biol. Plantarum 58 (1): 9-17.
- Fujioka S., Yokota T. 2003. Biosynthesis and metabolism of brassinosteroids. Plant. Biol. 54: 137-164.
- Kagale S., Divi U.K., Krochko J.E., Keller W.A., Krishna P. 2007. Brassinosteroids confers tolerance in *Arabidopsis thaliana* and *Brassica napus* to a range of abiotic stresses. Planta 225: 353-364.
- Li L., van Staden J., Jäger A.K. 1998. Effects of plant growth regulators on the antioxidant system in seedlings of two maize cultivars subjected to water stress. Plant Growth Regul. 25: 81-87.
- Mitchell J.W., Mandhava N.B., Worley J.F., Plimmer J.R., Smith M.V. 1970. Brassins – a new family of plant hormones from rape pollen. Nature 255: 1065-1066.
- Nunez M., Mazzafera P., Mazorra L.M., Siqueira W.J., Zullo M.A.T. 2003. Influence of a brassinosteroid analogue on antioxidant enzymes in rice grown in culture medium with NaCl. Biol. Plantarum 47: 67-70.
- Ohyama K., Suzuki M., Kikuchi J., Kazuki Saito K., Muranaka T. 2009. Dual biosynthetic pathways to phytosterol via cycloartenol and lanosterol in *Arabidopsis*. PNAS 106 (3): 725-730.
- Sharma P., Bhardwaj R. 2007. Effects of 24-epibrassinolide on growth and metal uptake *Brassica juncea* L. under copper metal stress. Acta Physiol. Plant. 29: 259-263.
- Upreti K.K., Murti G.S.R. 2004. Effects of brassinosteroids on growth, nodulation, phytohormone content and nitrogenase activity in French bean under water stress. Biol. Plantarum 48: 407-411.
- [www.google.com/patents/WO1993007142A1](http://www.google.com/patents/WO1993007142A1)

## **SAŽETAK**

Brassinosteroidi su biljni steroidni hormoni uključeni u regulaciju biljnog rasta, razvoja i odgovora na okolišni stres. U ovom radu prikazana je uloga brassinosteroida u toleranciji abiotičkog stresa. Brassinosteroidi mogu učiniti biljke otpornijima na nepovoljne uvjete poput suše, visokog saliniteta, ekstremnih temperatura i izloženosti toksičnim teškim metalima. Zbog svojeg pozitivnog učinka na biljke izložene abiotičkom stresu, brassinosteroidi imaju visoki potencijal za primjenu u modernoj poljoprivredi.

## **SUMMARY**

Brassinosteroids are steroid plant hormones involved in regulation of plant growth, development and response to environmental stress. In this paper the role of brassinosteroids in abiotic stress tolerance is shown. Brassinosteroids can make plants more tolerant to unfavourable conditions such as drought, salinity, extreme temperatures and exposure to toxic heavy metals. Because of its positive effect on plants exposed to abiotic stress, brassinosteroids have a high potential for application in modern agriculture.

