

**Univerzita Karlova v Praze**

**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Speciální biologicko-chemické obory  
Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Iveta Dvořáková

**Role sorbitolu při reakci rostlin na abiotický stres**

**Sorbitol role in abiotic stress response**

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

Vedoucí práce: RNDr. Hana Konrádová, Ph.D.

Praha, 2014

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 13. 5. 2014

Podpis

**Poděkování:**

Ráda bych poděkovala své školitelce RNDr. Haně Konrádové, Ph.D. a doc. RNDr. Heleně Lipavské, Ph.D. za trpělivost, cenné rady a připomínky, nesmírnou ochotu a čas, který mi věnovaly během psaní této práce.

## ABSTRAKT

Na rostliny během jejich životního cyklu působí řada nepříznivých faktorů. Tato bakalářská práce je zaměřena na vliv abiotického stresu na rostliny. Důraz je kladen na stresy sucha a zasolení jakožto hlavní příčiny vzniku osmotického stresu, a na mechanismy, kterými rostliny na tyto nepříznivé podmínky reagují. Na osmotický stres obvykle rostliny odpovídají syntézou a akumulací látek, které pomáhají udržet buněčnou integritu - kompatibilních solutů. Mezi tyto látky patří i cukerný alkohol sorbitol, kterému se věnuje tato práce. Rostlinám, které jej přirozeně produkují, poskytuje sorbitol při působení abiotického stresu významné výhody, neboť plní funkci osmotika, osmoprotektantu a též zmírňuje oxidativní stres. Závěrem jsou nastíněny možné směry vedoucí k zvýšení odolnosti kulturních plodin k abiotickému stresu využívající znalosti o účasti cukerných alkoholů při stresové reakci.

**Klíčová slova:** sorbitol, abiotický stres, kompatibilní soluty, zasolení, halofyty, osmotické přizpůsobení

## ABSTRACT

Many adverse factors affect plants during their life cycle. This bachelor thesis is focused on the influence of abiotic stress on plants. Attention is paid to drought and salinity stresses which are the main causes of osmotic stress, and to the mechanisms which help plants to cope with these adverse factors. Common reaction of plants to osmotic stress is synthesis and accumulation of substances which contribute to keeping cell integrity. These substances are called compatible solutes. This thesis is focused on sorbitol - sugar alcohol belonging to this group of substances. In plants that synthesize sorbitol naturally, it provides advantage under exposure to abiotic stresses as it serves as an osmoticum and/or an osmoprotectant and reduces oxidative stresses. Finally, based on the knowledge about participation of sugar alcohols in the stress reactions, modifications of plant metabolisms potentially increasing stress tolerance are discussed.

**Key words:** sorbitol, abiotic stress, compatible solutes, salinity, halophytes, osmotic adjustment

## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

<b>ABA</b>	kyselina abscisová
<b>ATP</b>	adenosin trifosfát
<b>CDK</b>	cyklin-dependentní kináza
<b>DAG</b>	diacylglycerol
<b>IP<sub>3</sub></b>	inositoltrifosfát
<b>H<sup>+</sup>- ATPáza</b>	protonová pumpa
<b>MdSOT1</b>	transportér sorbitolu v jabloni
<b>MdSOT2</b>	transportér sorbitolu v jabloni
<b>MdSOT3</b>	transportér sorbitolu v jabloni
<b>MdSOT4</b>	transportér sorbitolu v jabloni
<b>MdSOT5</b>	transportér sorbitolu v jabloni
<b>MdSOT6</b>	transportér sorbitolu v jabloni
<b>NAD</b>	nikotinamid adenin dinukleotid
<b>PA</b>	kyselina fosfatidová
<b>PcSOT1</b>	transportér sorbitolu ve višni
<b>PcSOT2</b>	transportér sorbitolu ve višni
<b>PmPLT1</b>	transportér sorbitolu v jitroceli
<b>PmPLT2</b>	transportér sorbitolu v jitroceli
<b>PmSUC2</b>	transportér sacharózy v jitroceli
<b>PpSOT2</b>	transportér sorbitolu v hrušni
<b>ROS</b>	reaktivní formy kyslíku (Reactive Oxygen Species)
<b>S6PDH</b>	sorbitol-6fosfátdehydrogenáza
<b>SDH</b>	sorbitoldehydrogenáza
<b>SOS (SOS1, SOS2, SOS3)</b>	složky signalizační dráhy při zasolení (Salt Overly Sensitive)

# OBSAH

<b>1. ÚVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>2. ABIOTICKÝ STRES</b> .....	<b>2</b>
2.1 VODNÍ DEFICIT .....	2
2.2 ZASOLENÍ .....	2
2.2.1 Osmotický stres .....	3
2.2.2 Iontová toxicita.....	4
2.2.3 Oxidativní stres .....	5
<b>3. MECHANISMUS TOLERANCE K ZASOLENÍ</b> .....	<b>7</b>
3.1 TRANSPORT A KOMPARTMENTACE IONTŮ VE VAKUOLE .....	7
3.2 SIGNALIZACE PŘI STRESU .....	7
3.3 KOMPATIBILNÍ SOLUTY .....	9
3.4 HALOFYTY.....	9
<b>4. SORBITOL</b> .....	<b>11</b>
4.1 METABOLISMUS SORBITOLU.....	12
4.2 TRANSPORT SORBITOLU V ROSTLINĚ .....	14
4.2.1 Transportéry sorbitolu .....	15
4.3 ÚČAST SORBITOLU NA TOLERANCI ROSTLIN K ABIOTICKÉMU STRESU.....	16
4.3.1 Teplota.....	16
4.3.2 Nedostatek vody .....	17
4.3.3 Zasolení.....	18
<b>5. MODIFIKACE ENDOGENNÍ HLADINY SORBITOLU JAKO NÁSTROJ KE ZVÝŠENÍ ODOLNOSTI ROSTLIN KE STRESU</b> .....	<b>20</b>
5.1 EXOGENNÍ DODÁVÁNÍ SORBITOLU ROSTLINÁM.....	20
5.2 GENETICKÉ MANIPULACE .....	21
<b>6. ZÁVĚR</b> .....	<b>23</b>
<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY</b> .....	<b>24</b>

# 1. ÚVOD

Lidská populace již přesáhla počet 7 miliard a s jejím růstem se zvyšuje i poptávka po potravě. Z velké části je lidská potrava tvořena rostlinnou složkou, a proto se klade velký důraz na výnosnost kulturních plodin. Produktivita rostlin je ovlivněna biotickými i abiotickými stresy. Rostliny jakožto přisedlé organismy nemohou nepříznivým podmínkám narozdíl od živočichů uniknout. Ze všech abiotických stresů ohrožuje rostliny nejvíce sucho a zasolení. Ke zhoršení situace přispívají i probíhající postupné změny klimatu. Se zvyšující se frekvencí suchých let je zemědělství stále více závislé na zavlažování. S umělým zavlažováním ale souvisí postupné zasolování půdy, které způsobují minerální látky obsažené v závlahové vodě. Zasoleno je okolo 23 % obdělávané půdy (Chen a Jiang, 2010).

Rostliny si v průběhu evoluce vyvinuly mnoho mechanismů jak stresu odolávat. Pro toleranci rostlin k abiotickému stresu jsou zásadní změny sacharidového metabolismu (Krasensky a Jonak, 2012). Řada rostlin produkuje mimo nejběžnější rozpustné sacharidy (sacharóza, glukóza, fruktóza) také cukerné alkoholy, jejichž akumulace se ukazuje jako další významná složka stresových reakcí. Cukerné alkoholy pomáhají k osmotickému přizpůsobování, slouží jako osmoprotektanty i jako zhášedce volných radikálů. Jedním ze zástupců cukerných alkoholů je sorbitol, který patří mezi hlavní fotosyntetické produkty rostlin čeledi *Rosaceae* a *Plantaginaceae*. Těmto rostlinám poskytuje výhody při působení abiotických stresů.

Tato práce se zabývá vlivem abiotického stresu (hlavně zasolení a sucha) na rostliny, a dále rolí, kterou hraje sorbitol v toleranci rostlin k tomuto typu stresu.

## 2. ABIOTICKÝ STRES

Rostliny jsou běžně vystaveny v průběhu svého života nepříznivým podmínkám. Tyto nepříznivé podmínky (stresory) způsobují rostlinám stres, který může být abiotický nebo biotický. Abiotický stres je fyzikální nebo chemické povahy. Mezi abiotické stresy patří nedostatek i nadbytek vody, zasolení, extrémní teploty (vysoké i nízké), nedostatek i nadbytek minerálních prvků, ozáření (vysoká i nízká) a dalších. V této práci se zaměřím hlavně na stres zasolení, nedostatku vody a teplotní stres. Zasolení, stres z nedostatku vody i teplotní stres mají mnoho společného a jejich účinky se prolínají. Zasolení půdy snižuje vodní potenciál půdního roztoku, a znemožňuje tak příjem vody kořeny. I teplotní extrémy způsobují vodní deficit v rostlině. V mrazu se tvoří ledové krystalky v mezibuněčných prostorech nebo ve vakuolách, a dochází tak k dehydrataci cytosolu. Ve vysokých teplotách je riziko zvýšené transpirace, kdy rostliny nestíhají přijímat dostatečné množství vody kořeny. Situaci komplikuje i fakt, že na rostlinu většinou nepůsobí pouze jeden typ stresoru.

### 2.1 VODNÍ DEFICIT

Voda je nezbytnou součástí rostliny. Rostliny obsahují až 90 % vody. Je velmi důležitá pro metabolické reakce, jako univerzální rozpouštědlo, pro rozvod minerálních a organických látek po rostlině atd. Vodní deficit způsobuje mírnější formu tzv. vodního stresu. Vodní deficit je stav rostliny nebo buňky, kdy je aktuální obsah vody nižší než při maximálním nasycení. Dochází ke ztrátě turgoru, což způsobí zastavení růstu a vadnutí rostliny. Pokud dojde ke ztrátě většiny vody z protoplastu, jedná se o desikaci. Jak jsem se již v úvodu této kapitoly zmínila, zhoršenou dostupnost vody způsobují i salinita a teplotní stres (McElrone et al., 2013).

### 2.2 ZASOLENÍ

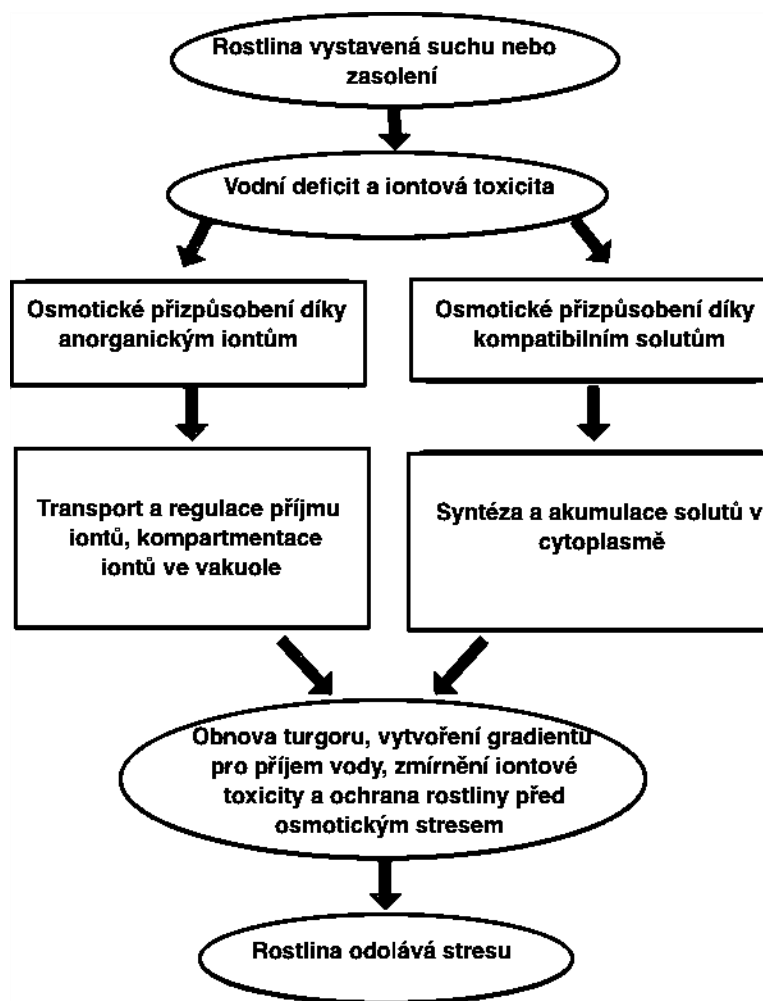
Zasolení je charakterizováno jako stav půdy, který se vyznačuje vysokou koncentrací rozpustných solí. Může se jednat o ionty  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ . Nejčastější je však působení  $\text{Na}^+$  a  $\text{Cl}^-$ . Koncentrace rozpustných solí v půdě je měřena pomocí elektrické vodivosti. Pokud je elektrická vodivost vyšší než 4 dS/m, což odpovídá přibližně 40 mM NaCl, je půda označena za

zasolenou (Munns a Tester, 2008). Zasolená půda je velmi častá na pobřeží a v ústí řek, které se vlévají do moře (tzv. vody brakické). K zasolení dochází také na většině zavlažovaných míst. Rostliny můžeme rozdělit podle tolerance k zasolení na halofyty, které jsou tolerantní a dokáží se vypořádat se všemi dopady zasolení, a na glykofyty, které jsou citlivé. Zasolení způsobuje rostlinám několik typů problémů. Sůl snižuje vodní potenciál půdního roztoku pod hodnotu vodního potenciálu buněk kořene, a tím způsobuje rostlině problém s příjmem vody. Buňky ztrácí vodu, koncentruje se obsah buněk, a z toho vyplývá, že rostlina se musí vyrovnat s osmotickým stresem. Nahromadění iontů působí na rostlinu toxicky. Navíc se rostliny musí potýkat s vytvářením ROS (Reactive Oxygen Species, reaktivní formy kyslíku) (Apel a Hirt, 2004).

### *2.2.1 Osmotický stres*

Hodnota vodního potenciálu určuje vodní bilanci buňky, tedy zda dochází k příjmu nebo výdeji vody. Voda se v rostlině pohybuje ve směru snižujícího se vodního potenciálu. Vodní potenciál se skládá z několika složek, hlavními složkami je osmotický a tlakový (turgorový) potenciál. Nabývá záporných hodnot, nejčastěji se pohybuje do -0,5 MPa. Hodnoty turgorového tlaku nabývají kladných hodnot (cca 1 - 0,5 MPa). Osmotický potenciál závisí na aktivitě rozpuštěných látek (solutů). Proces, kdy rostlina reaguje na osmotický stres změnou koncentrace kompatibilních solutů a anorganických iontů v protoplastu, se nazývá osmotické přizpůsobení (viz obr. 1) (Gagneul et al., 2007). Pokud se buňka nachází v prostředí, kde je v apoplastu vyšší koncentrace solutů, dochází k plazmolýze, kdy voda z protoplastu přechází do apoplastu. Již malé změny vodního potenciálu (0,1 MPa) mohou způsobit velké fyziologické změny v rostlině. Dochází k inhibici růstu listů a stonků, zatímco kořeny se mohou dále prodlužovat (růst kořene za sucha je velmi důležitý pro získávání vody z hlubších vrstev půdy a při zasolení je důležitý jako další prostor pro ukládání toxických iontů). Inhibice růstu závisí na délce působení osmotického stresu a na tom, zda se jedná o změnu náhlou nebo postupnou. Vodní stres negativně ovlivňuje aktivitu CDK (cyklin-dependentních kináz), a proto se snižuje rychlost buněčného dělení (Bartels a Sunkar, 2005).





Obr. 1: Mechanismus osmotického přizpůsobení ve stresovaných rostlinách. Upraveno podle Chen a Jiang, 2010.

### 2.2.2 Iontová toxicita

Nahromadění iontů probíhá postupně, proto se rostliny zpočátku dokáží se zvýšenou koncentrací iontů vypořádat. První příznaky dosažení kritických koncentrací iontů v rostlině se projevují na starších listech, které podléhají předčasné senescenci. Toxických koncentrací mohou dosahovat vedle nejčastěji působícího  $\text{Na}^+$  a  $\text{Cl}^-$  například ionty  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$  (Munns a Tester, 2008).

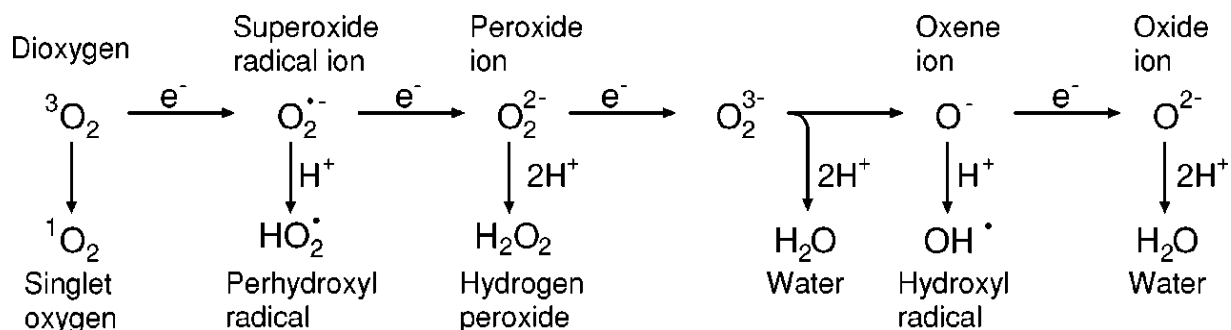
Sodíkové ionty mají silný inhibiční účinek na příjem draselných iontů kořeny. Rostliny používají pro příjem draslíku vysokoafinitní a nízkoafinitní transportéry. Draslíkové i sodíkové

kationty mají podobné chemické vlastnosti, a proto mají sodíkové kationty nepříznivý vliv na příjem  $K^+$  nízkoafinitním transportérem. Nedostatek draslíku vede k inhibici růstu, protože kationt draslíku je za normálních podmínek v buňce ve vysokých koncentracích a je důležitý pro udržování turgoru, membránového potenciálu a enzymových aktivit. Jakmile se dostane  $Na^+$  do cytoplasmy, inhibuje aktivitu enzymů. Míra inhibice je závislá na poměru  $Na^+$  a  $K^+$  iontů. Cytosolické enzymy halofytních rostlin jsou pravděpodobně stejně citlivé k  $Na^+$  jako enzymy glykofytů, ale protože halofytní rostliny mají mechanismy pro odstranění těchto iontů z cytoplasmy, nejsou enzymy inhibovány. Sodíkové ionty také vytěsňují  $Ca^{2+}$  z buněčné stěny a snižují aktivitu  $Ca^{2+}$  v apoplastu (Zhu, 2003; Zhu, 2007).

$Cl^-$  ionty nezpůsobují většině rostlin problémy. Chlór se normálně v buňce vyskytuje v koncentraci okolo  $188 \mu M$  a pro rostlinu je esenciálním mikroprvkem. Je zapojen do stabilizace membránového potenciálu, reguluje acidobazickou rovnováhu. V cytoplasmě reguluje aktivitu klíčových enzymů. Rostliny jsou také vybaveny mnohými transportními systémy specializovanými přímo na chloridové ionty. Některé rostliny jsou ke zvýšené koncentraci chloridových iontů více citlivé, například citrusy nebo sója (White a Broadley, 2001).

### 2.2.3 Oxidativní stres

Doprovodným jevem dehydratace a stresu ze zasolení je tvorba reaktivních forem kyslíku -ROS (z angl. reactive oxygen species). Mezi ROS patří superoxidový radikál, singletový kyslík, hydroxylový radikál a peroxid vodíku (Obr. 2).



Obr. 2: Schéma generování ROS přenosem energie ze základního tripletního stavu kyslíku. Převzato z Apel a Hirt, 2004.

ROS jsou vytvářeny převážně v chloroplastech, dále pak v mitochondriích a peroxizomech (Bartels a Sunkar, 2005). ROS reagují s mnoha biomolekulami a mohou způsobit jejich ireverzibilní poškození. V krajním případě může přítomnost ROS vést až k nekrotám, které mohou způsobit odumření rostliny (Bartels a Sunkar, 2005). Peroxid vodíku není reaktivní sám o sobě, ale pokud je v jeho přítomnosti kovové redukční činidlo, vzniká velmi reaktivní hydroxylový radikál. Na druhou stranu ROS ovlivňují expresi mnoha genů a spouští signální dráhy (Apel a Hirt, 2004).

### 3. MECHANISMUS TOLERANCE K ZASOLENÍ

Zasolení způsobuje mnohé fyziologické, morfologické i biochemické změny v rostlině. Rostliny si vyvinuly mnoho mechanismů, aby se s tímto typem stresu vyrovnaly. Rostliny, které zasolení odolávají, se nazývají halofyty. V této kapitole jsou shrnuty základní principy tolerance rostlin k zasolení.

#### 3.1 TRANSPORT A KOMPARTMENTACE IONTŮ VE VAKUOLE

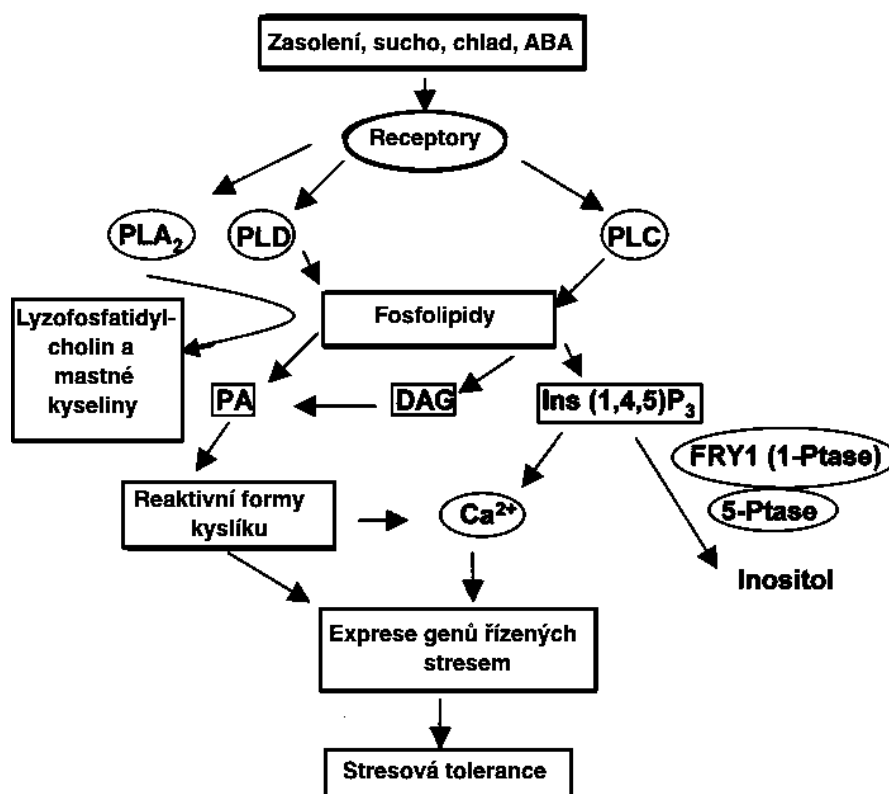
Pro adaptaci rostlin na vysoké koncentrace NaCl je zásadní odstranění sodíku z cytoplasmy a jeho akumulace ve vakuole. Centrální vakuola hraje v rostlinách důležitou roli pro regulaci množství iontů v cytoplasmě. Transport sodíku do vakuoly se děje díky antiporteru  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  na tonoplastu (Apse et al., 1999). Energii pro transport do vakuoly dodává protonmotivní síla, která je tvořena  $\text{H}^+$  ATPázou (tzv. V-ATPáza) a  $\text{H}^+$  pyrofosfatázou (V-PPáza). Tsiantis et al. (1996) provedli analýzu regulace aktivity V-ATPázy v reakci na zasolení u halofytické rostliny *Mesembryanthemum crystallinum*. Aktivita V-ATPázy v této rostlině se v přítomnosti NaCl zvýšila. *Mesembryanthemum crystallinum*, česky kosmatec oledněný, je sukulentní rostlina rostoucí na písčínách a útesech v blízkosti moře a slouží jako modelová rostlina v experimentech, kde se zjišťuje odpověď rostlin na abiotický stres (Tsiantis et al., 1996). Je zvláštní také tím, že je možné u ní vyvolat CAM metabolismus při působení stresu ze sucha nebo zasolení (Struve et al., 1985). Na této rostlině byl prováděn také další experiment, který vedl k závěru, že aktivita V-ATPázy (stejně jako ve výše zmíněném experimentu) vzrostla, ale aktivita pyrofosfatázy se v přítomnosti NaCl snížila (Bremberger et al., 1988).

#### 3.2 SIGNALIZACE PŘI STRESU

Změny v turgoru aktivují v cytoplazmatické membráně kanály pro vstup  $\text{Ca}^{2+}$ .  $\text{Ca}^{2+}$  se v cytosolu váže na protein SOS3 a spouští tzv. kaskádu SOS genů (Salt Overly Sensitive). Proteinová fosfatáza SOS3 aktivuje serin/threoninovou proteinkinázu SOS2. Když je proteinkináza SOS2 aktivní, blokuje s nízkou specifitou kationtové kanály v plazmatické membráně. SOS2 a SOS3 regulují expresi genu *SOS1*. *SOS1* je gen kódující antiporter  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  na

plazmatické membráně. Zvýšení aktivity SOS1 vedlo pouze k mírnému zvýšení tolerance k zasolení. Zásadní pro toleranci k zasolení je koexprese *SOS3* a *SOS2* spolu se *SOS1*. Výsledkem exprese je změna aktivity iontových transportérů (například pro  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  nebo  $\text{H}^+$ ) (Zhu, 2002; Shi et al., 2002).

Další signalizační systém uplatňující se při vnímání abiotického stresu je fosfolipidová signalizace. V průběhu osmotického stresu dochází ke zvýšení tekutosti membrán a ke změnám fosfolipidů (Obr. 3) Fosfolipidy jsou štěpeny fosfolipázami za vzniku druhých poslů (IP<sub>3</sub>, DAG, PA) (Bartels a Sunkar, 2005).



Obr. 3: Fosfolipidová signalizace při zasolení, suchu, chladu. Osmotický stres, chlad nebo ABA aktivují fosfolipázy, které štěpí fosfolipidy, a tak generují druhé posly (jako je PA-kyselina fosfatidová, DAG-diacylglycerol, a IP<sub>3</sub>-inositoltrifosfát). Tito poslové regulují toleranci ke stresu hlavně díky modulaci genů řízených stresem (označovaných jako "stress responsive"). FRY1 a 5-fosfatáza zprostředkují degradaci IP<sub>3</sub>. Upraveno podle Zhu, 2002.

Zvýšení koncentrace soli vyvolává zvýšení hladiny rostlinných hormonů jako je kyselina abscisová (ABA) a cytokininy (Vaidyanathan et al., 1999). ABA má mnoho funkcí ve vývoji a růstu rostlin. Reguluje mimo jiné vodní rovnováhu i toleranci rostlin k osmotickému stresu. Role ABA byla studována na několika ABA deficientních mutantech *Arabidopsis thaliana*. Mutanty *Arabidopsis thaliana* rostly a vyvíjely se relativně normálně, pokud na ně nebylo působeno stresem. Ale pokud na ně působil stres sucha a zasolení, tak vadly a při déle trvajícím stresu uschly (Koorneef et al., 1998).

### 3.3 KOMPATIBILNÍ SOLUTY

Kompatibilní soluty jsou nízkomolekulární sloučeniny, které neinterferují s biochemickými reakcemi v buňce a mohou nahrazovat při stresových situacích molekuly vody. Nemají iontový charakter, ale mohou být polární. Fungují jako osmolyty v osmotickém přizpůsobování buňky, jako osmoprotektanty, které stabilizují proteiny, multiproteinové komplexy a membránové struktury. Mohou fungovat i jako nízkomolekulární chaperony (Singer a Lindquist, 1998). Také jsou často důležité jako zhášedce volných radikálů (Smirnoff a Cumbes, 1988). Kompatibilní soluty můžeme z chemického hlediska rozdělit na aminokyseliny a jejich deriváty (Khan et al., 2000), cukry a cukerné alkoholy (Koyro, 2006). Prolin a trehalóza hrají roli jako signální molekuly v regulaci genové exprese a v procesech, které jsou důležité pro adaptaci a zotavení se z působení stresu (Paul et al., 2008; Szabados a Savouré, 2010).

### 3.4 HALOFYTY

Definice halofytů je velmi složitá. Terminologie, která se snaží popsat vztah mezi rostlinou a zasolením, je heterogenní. Existuje stupnice odolnosti rostlin vůči zasolení, od rostlin velmi citlivých až po rostliny extrémně halofytní. Definice, která je dnes nejvíce používaná, označuje za halofyty rostliny, které přirozeně žijí ve slaném prostředí, a dokáží dokončit svůj životní cyklus při koncentracích až 200 mM NaCl. Aby přežily v těchto koncentracích soli, mají vyvinuty výše zmíněné mechanismy pro získání tolerance k zasolení.

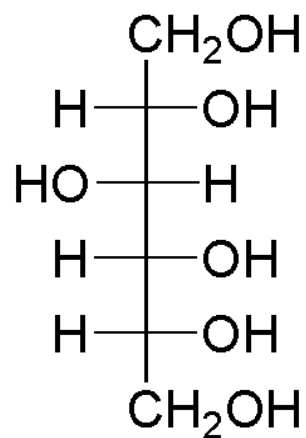
První záznamy o suchozemských rostlinách pocházejí ze středního ordoviku (cca před 470 miliony lety). Byly nalezeny mikrofosílie obsahující spóry a části rostlin, avšak zřetelné důkazy o suchozemských rostlinách jsou mnohem mladší (cca před 40 miliony lety). Na těchto fosilních záznamech, které spadají do pozdního siluru, můžeme pozorovat například pozůstatky rostlin rodu *Cooksonia*. Původ těchto Embryofyt je velmi důležitý pro datování tolerance k zasolení u suchozemských rostlin, které se vyvinuly z rostlin žijících buď ve sladké, nebo ve slané vodě. Dřívější oceán byl méně slaný než je ten současný (26-29 g oproti dnešním 30-40 g NaCl na 1000 g mořské vody) (Welman a Gray, 2000). Studie zabývající se analýzou rostlin rodu *Rhynia* ze Skotska poukazuje na možnost, že již v mladším devonu (před 400 miliony lety) byly některé suchozemské rostliny tolerantní k zasolení (Channing a Edwards, 2009).

V roce 1980 vytvořil James Aronson seznam halofytů čítající 1554 druhů, které jsou nyní součástí databáze spravované Univerzitou v Sussexu, pojmenované eHALOPH. Nejvíce halofytních druhů je v čeledi *Chenopodiaceae*, kde více než polovina rostlin z této čeledi odolává zasolení. Dále jsou halofyty více zastoupeny v čeledích *Poaceae*, *Asteraceae* a *Fabaceae*.

## 4. SORBITOL

Cukerné alkoholy (často nazývané polyoly) jsou redukované formy aldóz a ketóz. Aldehydická nebo ketonová skupina cukru je redukována na skupinu hydroxylovou. Sloučeniny mohou být lineární, pak se nazývají acyklické polyoly - alditoly; nebo cyklické, nazývané cyklické polyoly - cyklitoly. Nejjednodušším polyolem je glycerol se třemi uhlíky v řetězci. Cukerné alkoholy se vyskytují v mnoha organismech, v prokaryotech i eukaryotech. V cévnatých rostlinách se vyskytuje 17 cukerných alkoholů, z toho v krytosemenných jich bylo nalezeno 13. U krytosemenných rostlin se nejčastěji vyskytují šestiuhlíkaté alditoly- sorbitol, manitol a galaktitol (Noiraud et al., 2001).

Sorbitol byl poprvé izolován z jeřábu ptačího (*Sorbus aucuparia*) v roce 1872. Od latinského pojmenování jeřábu je odvozen i jeho triviální název. Racionální název je hexan-1,2,3,4,5,6-hexaol. Pro sorbitol můžeme nalézt i pojmenování glucitol, protože se jedná o redukovanou formu glukózy, kdy je aldehydická skupina glukózy přeměněna na hydroxylovou.



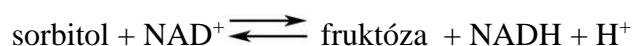
Obr. 4: Strukturní vzorec sorbitolu.

Sorbitol patří mezi hlavní fotosyntetické produkty u rostlin čeledi *Rosaceae* (Růžovité) a u čeledi *Plantaginaceae* (Jitrocelovité). V čeledi *Rosaceae* se jedná zvláště o podčeledi *Maloideae* (Jabloňovité), *Spiroideae* (Tavolníkovité) a *Prunoideae* (Slivoňovité). U jabloně (*Malus domestica*) je 70 % uhlíku transportováno ve formě sorbitolu (Klages et al., 2001). U broskvoně (*Prunus persica*) je až 90 % uhlíku transportováno ze zdrojových listů ve formě sorbitolu (Moing et al., 1997).

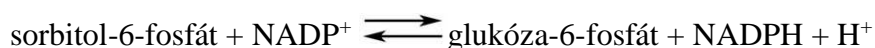


#### 4.1 METABOLISMUS SORBITOLU

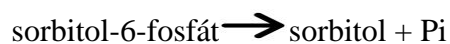
Sorbitoldehydrogenáza (SDH) a aldóza-6-fosfátreduktáza jsou klíčové enzymy v metabolismu sorbitolu. Tyto enzymy byly u vyšších rostlin detekovány a detailně charakterizovány např. v jabloni (*Malus domestica*) (Negm a Loescher, 1979 a 1981). Sorbitoldehydrogenáza oxiduje sorbitol v přítomnosti NAD (viz rovnice). Sorbitoldehydrogenáza je mimo svůj základní substrát sorbitol schopna metabolisovat i některé další cukerné alkoholy (xylitol, arabitol, ribitol a threitol).



Aldóza-6-fosfátreduktáza, dříve nazývána sorbitol-6-fosfátdehydrogenáza, byla kromě jabloně detekována i v listech *Prunus persica*, *Pyrus communis* a *Prunus armeniaca* z čeledi *Rosaceae* (Negm a Loescher, 1981). Enzym katalyzuje reverzibilní reakci:



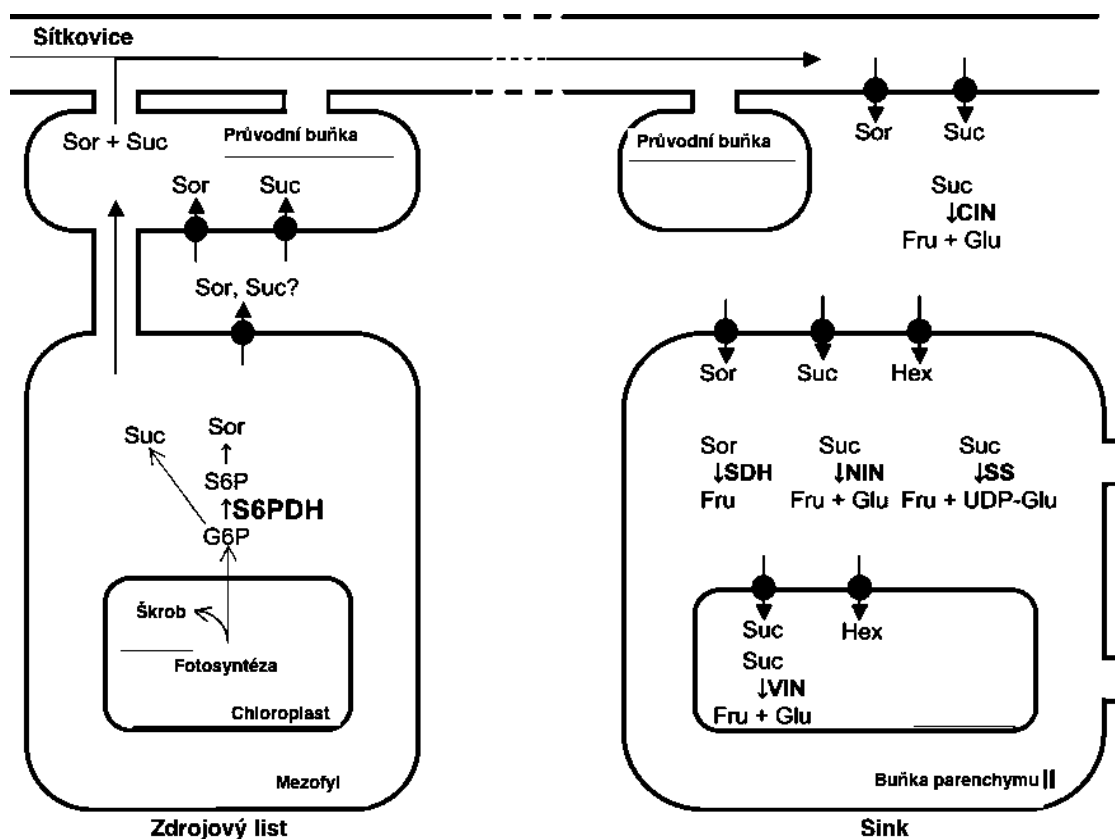
Finální krok v syntéze sorbitolu katalyzuje sorbitol-6-fosfátfosfatáza (Zhou et al., 2003).



Sorbitoldehydrogenáza byla detekována i v rostlinách nepatřících do čeledi *Rosaceae* (*Arabidopsis thaliana*, *Zea mays* L., *Lycopersicon esculentum* Mill., *Glycine max*), kde cukerné alkoholy nejsou majoritními produkty fotosyntézy. Zde se předpokládá, že polyoly mají funkci osmolytů a osmoprotektantů buněčných struktur (Bohnert et al., 1995). U *Arabidopsis thaliana* byl nalezen protein, který je kódován genem *At5g51970* a vykazuje charakteristiky SDH.

Nosarzewski et al. (2012) a Ayuayo et al. (2013) porovnávali wild type a *sdh*-mutanty huseníčku (*Arabidopsis thaliana*). Bylo potvrzeno, že *At5g51970* kóduje SDH v *Arabidopsis thaliana*. U tohoto druhu je SDH cytosolický protein, který se akumuluje jak ve zdrojových, tak v sinkových orgánech. SDH je primární enzym zapojený do katabolismu sorbitolu a proto *sdh*-mutanty vykazovaly značné růstové defekty.

SDH je primární (možná jediný) enzym metabolizující sorbitol v huseníčku, který aktivně reguluje koncentraci sorbitolu v průběhu působení sucha a hraje roli i v metabolismu ribitolu. Aldóza-6-fosfátoreduktáza zatím nebyla v rostlinách huseníčku detekována. Enzymatický systém zodpovědný za syntézu sorbitolu, který se zde akumuluje, tedy není znám (Nosarzewski et al., 2012).



Obr. 5: Metabolismus uhlíku v jabloni. Sorbitol (Sor) a sacharóza (Suc) jsou syntetizovány v listech z glukóza-6-fosfátu. Sorbitol je syntetizován enzymem sorbitol-6-fosfátdehydrogenáza (S6PDH). CIN (cytoplasmatic invertase). Po translokaci do sinkového orgánu je sorbitol konvertován na fruktózu (pomocí enzymu SDH) a sacharóza je konvertována na fruktózu (Fru) a glukózu (Glu) invertázami NIN (neutral/alkaline invertase) a VIN (vacuolar invertase). Upraveno podle Teo et al., 2006.

Rostliny, kde sorbitol není hlavním produktem fotosyntézy, obsahují pouze malé množství sorbitolu, ale i toto malé množství je velmi důležité pro růst. Sorbitol je mimo jiné asociován s transportem boru v rostlině. Bor patří mezi mikrobiogenní minerální prvky. Pro rostliny je bor

esenciální, jeho nedostatek způsobuje inhibici růstu a odumírání pletiv. U většiny rostlin je bor imobilní a ukládá se v listech, ale u druhů, které produkují polyoly (hlavně sorbitol a manitol) je transportován na dlouhé vzdálenosti floémem (Brown a Hu, 1996). S polyoly tvoří bor mobilní komplexy (Hu et al., 1997).

#### 4.2 TRANSPORT SORBITOLU V ROSTLINĚ

Sorbitol je syntetizován ve zralých listech, odkud je transportován floémem do sinkových orgánů (mladé listy a plody). Nadwodnik a Lohaus (2008) se ve svém experimentu zaměřili na měření subcelulárních koncentrací sorbitolu u jitrocele většího (*Plantago major*), jitrocele přímořského (*Plantago maritima*) a broskvoně obecné (*Prunus persica*). Sorbitol byl v jitroceli větším a v broskvoni obecné lokalizován ve vakuole (48-73 %), ve stroma (19-27 %) i v cytosolu (8-25 %). Distribuce sorbitolu se lišila v jitroceli přímořském, kde byl sorbitol lokalizován z 88 % ve vakuole.

V sinkových orgánech nebyly nalezeny enzymy důležité pro syntézu sorbitolu, což znamená, že sorbitol je transportován na dlouhé vzdálenosti (Moing et al., 1992). U broskvoně (*Prunus persica*) byl sorbitol spolu se sacharózou detekován ve floémové šťávě. Koncentrace sacharózy zde byla o něco málo vyšší než koncentrace sorbitolu. Koncentrace sorbitolu ve floémové šťávě se lišila pouze minimálně od koncentrace sorbitolu v intracelulárním kompartmentu listové čepele. Z toho vyplývá, že neexistuje koncentrační gradient, a tedy není potřeba energie pro nakládání sorbitolu do floému. Nakládání do floému se u broskvoně (a zřejmě stejně tak jako u jabloně) za normálních podmínek děje pravděpodobně symplastickou cestou pomocí plasmodesmů (Moing et al., 1997, Reidel et al., 2009). Naopak pro jitrocelovité je navržen model apoplastického nakládání do floému, protože byl popsán velký rozdíl koncentrací sorbitolu mezi floémovou šťávou a cytolem mezofylových buněk (ve floémové šťávě až 40krát vyšší koncentrace) (Nadwodnik a Lohaus, 2008).

### 4.2.1 Transportéry sorbitolu

V distribuci polyolů v rostlině hrají významnou roli transportéry. V poslední době bylo identifikováno mnoho genů kódujících transportéry cukrů a cukerných alkoholů u vyšších rostlin. Sorbitolové transportéry byly identifikovány například v jitroceli (*Plantago major*). A ačkoliv se nejčastěji pro *Rosaceae* uvažuje symplastický transport, byly nalezeny sorbitolové transportéry i ve višni (*Prunus cerasus*) a v jabloni (*Malus domestica*). Jejich role v těchto systémech ještě není plně vyjasněná. Podobná situace je i u huseničku (*Arabidopsis thaliana*), kde byly geny pro sorbitolové transportéry také identifikovány, zde ale není identifikována ani biosyntetická dráha syntézy sorbitolu.

V listech a plodech višně (*Prunus cerasus*) byly identifikovány dva sorbitolové transportéry PcSOT1 a PcSOT2. Jedná se o proton-dependentní transportéry, které jsou velmi specifické. *PcSOT1* se nejvíce exprimuje ve zrajících plodech, kde je nejvyšší koncentrace sorbitolu. Přítomnost PcSOT2 je charakteristická pro časná stadia vývoje plodu, kde hraje důležitou roli v jeho růstu (Gao et al., 2003).

Z jabloně (*Malus domestica*) bylo izolováno 6 transportérů MdSOT1-MdSOT6. MdSOT1 a MdSOT2 jsou přítomny ve všech pletivech až na pletiva postižená sklenatostí (Gao et al., 2005). *MdSOT3*, *MdSOT4* a *MdSOT5* jsou hojně exprimovány ve zdrojových listech, *MdSOT4* a *MdSOT5* jsou exprimovány především v květech. V plodech buď neprobíhá žádná nebo pouze minimální exprese genů kódujících transportéry MdSOT (Watari et al., 2004).

Bylo publikováno několik prací, které se zabývají tím, zda jsou sorbitolové transportéry ovlivňovány abiotickými stresy, a v případě, že ovlivněny jsou, jakým způsobem. Li et al. (2012) vystavili rostliny jabloně suchu. Autoři zjistili vztah mezi zvýšenou expresí genů pro transportéry sorbitolu MdSOT3, MdSOT4, MdSOT5 a akumulací sorbitolu. Exprese genů *MdSOT3*, *MdSOT4*, *MdSOT5* v jabloni je posílena stresem sucha. Pommerening et al. (2007) došli ke srovnatelnému závěru v experimentech na jitroceli (*Plantago major*), kdy měřili hladiny mRNA pro transportéry sorbitolu PmPLT1 a PmPLT2 a pro transportér sacharózy PmSUC2. Transportéry PmPLT1 a PmPLT2 jsou H<sup>+</sup> symportéry, které nevykazují vysokou substrátovou specifitu a dokáží transportovat i manitol (Ramsperger-Gleixner et al., 2004). Při zasolení se výrazně zvýšila hladina mRNA pro tyto transportéry (zvláště pro PmPLT2, který bude mít pravděpodobně důležitější roli v odpovědi na stres, protože se exprimuje rychleji). Naopak hladina mRNA pro transportér sacharózy zůstala při působení zasolením po 24 hodin stejná a pak klesala. U rostlin jitrocele při

zasolení je tedy významná účast sorbitolových transportérů. Ty jsou pravděpodobně zodpovědné za zvýšení poměru sorbitolu ku sacharóze ve floémové šťávě a je tedy preferováno nakládání sorbitolu do floému (Pommerening et al., 2007).

Rostliny huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*) transportují na delší vzdálenosti sacharózu a malé množství rafinózy, ale žádné polyoly. Přesto byly v huseníčku nalezeny geny (*At2g16120*, *At2g16130*, *At2g18480*, *At2g20780*, *At3g18830* a *At4g36670*), které jsou homologní genům pro transportéry výše zmíněné. Prvním popsáním transportérem patřícím do superrodiny MST-like (MonoSacharide Transport-like) je AtPLT5. Tento transportér je kódován v huseníčku genem *At3g18830*. Jedná se o H<sup>+</sup> symportér, který je lokalizován na plazmatické membráně, transportuje lineární polyoly jako je sorbitol, xylitol, erythritol a glycerol. Avšak není zde zatím známa jeho přesná fyziologická funkce (Klepek et al., 2005).

### 4.3 ÚČAST SORBITOLU NA TOLERANCI ROSTLIN K ABIOTICKÉMU STRESU

Tolerance rostlin k zasolení a dalším abiotickým stresům je závislá mimo jiné na schopnosti akumulovat kompatibilní soluty v cytoplasmě. Mnoho stresorů nepůsobí za běžných podmínek jednotlivě, ale v kombinaci s dalším stresem (častá je kombinace vysoké teploty a zasolení, nedostatek vody a zasolení atd.). Mechanismy reakce rostlin na teplotní stres, nedostatek vody i zasolení jsou podobné. Jak již bylo zmíněno výše, rostlina se musí vypořádat se snižujícím se osmotickým potenciálem, s nahromaděním toxických iontů i s tvorbou ROS. Tento problém řeší některé rostliny syntézou a akumulací cukerných alkoholů. Cukerné alkoholy kompenzují snižující se osmotický potenciál půdního roztoku (účastní se na osmotickém přizpůsobení) a fungují i jako zhášecí volných radikálů (Loescher, 1987, Smirnov a Cumbes, 1989). Následující kapitoly shrnují poznatky o vlivu nejdůležitějších abiotických stresů na metabolismus sorbitolu.

#### 4.3.1 Teplota

V broskvoni (*Prunus persica*) jsou sorbitol a sacharóza hlavními produkty fotosyntézy. Vliv nízké teploty na syntézu sorbitolu byl potvrzen v listech broskvoně. Přeměna glukózy na sorbitol byla posílena nízkou teplotou. Hladina mRNA, kódující S6PDH byla vyšší v rostlinách ošetřovaných nízkou teplotou oproti kontrolním rostlinám. Na základě výsledků tohoto

experimentu bylo navrženo, že akumulace sorbitolu je indukována nízkou teplotou díky nárůstu biosyntézy sorbitolu z glukózy (Deguchi et al., 2002). Kanayama et al. (2006) zjišťovali vliv nízkých teplot a ABA na expresi genu pro S6PDH v listech jabloně (*Malus domestica*). Získali podobné výsledky jako Deguchi et al. (2002) u broskvoně, tedy že při působení nízké teploty je zvýšena exprese *S6PDH*. Navíc zjistili, že i ABA zvyšuje hladiny S6PDH mRNA.

Xylémový transport je u dřevin velmi důležitý v zimních měsících, protože v tomto období je omezen transport floémový. Xylémový transport je tedy podstatný pro dostupnost uhlíku, protože se jedná o hlavní transportní dráhu rozpustných cukrů do sinkových orgánů v období, kdy rostliny nemají listy (Loescher et al., 1990). U hrušně (*Pyrus pyrifolia*) vedlo snížení teploty z 6 °C na 0 °C ke zvýšení koncentrace sorbitolu v xylému. Nejvyšší nárůst koncentrace sorbitolu v xylému byl zaznamenán v průběhu prosince, kdy se teploty blíží k 0 °C. V chladu se zvyšuje exprese genu *PpSOT2* pro transport sorbitolu (Ito et al., 2013).

#### 4.3.2 Nedostatek vody

Role sorbitolu při suchu byla studována také ve zdrojových zralých listech a v sinkových vrcholcích výhonů broskvoně (*Prunus persica*). Osmotické přizpůsobení bylo pozorováno po dvou týdnech v listech a po třech týdnech ve výhonech. Sorbitol se podílel až na 80 % osmotického přizpůsobení v listech a 76 % ve výhonech. Bylo pozorováno snížení hladiny SDH, což pravděpodobně vedlo k akumulaci sorbitolu, a tím i k osmotickému přizpůsobení (Lo Bianco et al., 2000). Tyto výsledky se neshodují s jiným experimentem, ve kterém autoři zjistili, že se zvýšila aktivita aldóza-6-fosfátoreduktázy, a z toho vyvodili závěr, že broskvoň nevyužívá akumulaci sorbitolu pro aktivní osmotické přizpůsobení (Escobar-Gutiérrez et al., 1998). Možné rozdíly ve výsledcích experimentů mohou být způsobeny odlišnou délkou působení sucha (osm dní oproti čtyřem týdnům), odlišnou metodou, jakou byly rostliny vystaveny suchu nebo různými světelnými podmínkami. V jiném experimentu Cui et al. (2004) pozorovali vliv sucha na obsah sorbitolu v listech a kořenech broskvoně. Autoři v experimentu rozdělili rostliny do čtyř skupin (kontrolní rostliny, rostliny slabě, mírně a velmi stresované), které simulovaly délku působení sucha. Nedostatek vody způsobil mírné zvýšení obsahu sorbitolu v listech, v kořenech nebyla pozorována signifikantní změna. Obsah sorbitolu se měnil podle délky působení stresu. Hned první den po zalití rostlin se obsah sorbitolu v listech dostal na původní hladiny. Všechny listy

rostlin patřící do skupin pod slabým a mírným stresem se obnovily, ale u rostlin velmi stresovaných mnoho listů odpadlo, dokonce i některé celé rostliny uhynuly.

Myšpulník japonský (*Eriobotrya japonica*) je dřevina, která patří stejně jako broskvoň a jabloň do čeledi *Rosaceae*, a je odolná k vodnímu deficitu. Při působení sucha se zvyšuje obsah sorbitolu v listech i v kořenech. Zalití obnovuje původní koncentrace sorbitolu (Cui et al., 2003). Ranney et al. (1991) porovnávali osmotický potenciál a obsah kompatibilních solutů v třešni ptačí (*Prunus avium* X *pseudocerasus*, odrůda Colt) a višni obecné (*Prunus cerasus*, odrůda Meteor) při působení stresu z nedostatku vody. Vodní stres způsobil snížení osmotického potenciálu v listech i kořenech obou druhů. Ve zralých listech višně byl v průběhu experimentu nižší osmotický potenciál než v třešni. Sorbitol byl nalezen u obou kultivarů a byl hlavním kompatibilním solutem indukovaným stresem. V jabloni (*Malus domestica*, odrůda Jonathan) byl zjišťován vodní potenciál a obsah kompatibilních solutů při nedostatku vody. V průběhu působení stresu byl měřen obsah cukrů v rostlině. Aktivní osmotické přizpůsobení bylo pozorováno po 3 až 5 dnech ve zralých listech. Při působení sucha se zvýšila koncentrace sorbitolu, glukózy i fruktózy. Sorbitol se podílí na více než 50 % osmotického přizpůsobení (Wang a Stutte, 1992).

#### 4.3.3 Zasolení

Jitrocel vraní nožka (*Plantago coronopus*) je jedlá trvalka, která má velký potenciál stát se tržní plodinou, běžně roste na všech kontinentech. Právě na tomto druhu byl popsán vliv zasolení na růst rostliny i na její fotosyntézu. Růst i fotosyntéza jsou stimulovány koncentracemi NaCl do 25 % slanosti mořské vody (slanost mořské vody odpovídá koncentraci přibližně 600 mM NaCl). Tato hranice (25 % slanosti mořské vody) se nazývá práh slanosti a je typická pro tento druh. Při vyšších koncentracích soli je v tomto jitroceli ale snížena vodivost průduchů, redukuje se listová plocha, tím se snižuje i transpirace a fotosyntéza. Zasolení NaCl vede k významnému nárůstu obsahu sorbitolu v kořenech i v listech. Oproti kontrolním rostlinám byl obsah sorbitolu v kořeni až čtyřikrát vyšší (Koyro, 2006). Velký nárůst obsahu sorbitolu za přítomnosti NaCl byl detekován i v rostlinách jitrocele přímořského (*Plantago maritima*). Dokonce pro koncentrace v rozmezí od 260 do 1250 mM NaCl platila lineární závislost mezi koncentrací soli a obsahem sorbitolu. Zasolení neinhibovalo aktivitu vybraných enzymů extrahovaných z prýtu (Ahmad et al., 1979). Gil a kol. (2011) provedli studii na několika halofytních rostlinách (*Plantago crassifolia*, *Juncus acutus*, *Juncus maritimus*, *Inula crithmoides*,

*Sarcocornia fruticosa*) a zjišťovali sezónní vliv na množství osmolytů v rostlině. V jitroceli (*Plantago crassifolia*) detekovali jako hlavní sacharid sorbitol, hladiny ostatních cukrů i polyolů byly velmi nízké. V létě byl obsah sorbitolu nejvyšší. Změny v obsahu sorbitolu odpovídaly změnám ve slanosti půdy. Podle autorů výše zmíněných experimentů plní sorbitol v rostlinách jitrocele funkci kompatibilního solutu.

K odlišným závěrům ohledně funkce sorbitolu u rostlin jitrocele (*Plantago crassifolia*) došli Vicente et al. (2004). V jejich experimentu ošetřili mladé rostliny různými koncentracemi soli. V koncentracích soli od 0 mM NaCl do 200 mM NaCl se obsah sorbitolu v listech nezvyšoval, a dokonce byl zaznamenán jeho pokles, teprve v koncentracích od 200 mM NaCl do 500 mM NaCl se obsah sorbitolu mírně zvyšoval. Na druhou stranu se s rostoucí koncentrací NaCl zvyšoval obsah prolinu. Na závěr proto autoři navrhli, že je nepravděpodobné, aby sorbitol plnil u této rostliny funkci kompatibilního solutu a navrhují, že právě prolin je kompatibilním solutem pro tento druh jitrocele (*Plantago crassifolia*). V později publikované práci na stejném rostlinném druhu Gil et al. (2011) (viz předchozí odstavec) rozpor mezi těmito a svými výsledky pouze zmiňují, ale dále se jeho možným vysvětlením bohužel nezabývají.



## 5. MODIFIKACE ENDOGENNÍ HLADINY SORBITOLU JAKO NÁSTROJ KE ZVÝŠENÍ ODOLNOSTI ROSTLIN KE STRESU

### 5.1 EXOGENNÍ DODÁVÁNÍ SORBITOLU ROSTLINÁM

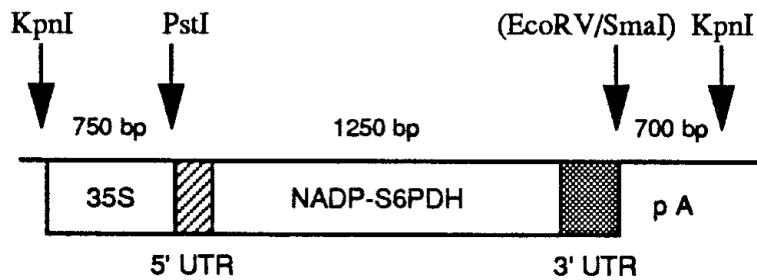
Několik studií z posledních let se zabývalo tím, zda exogenní dodávání sorbitolu rostlinám může pomoci zlepšit jejich odolnost k abiotickým stresům. Vliv sorbitolu na kukuřici byl popsán v experimentu, kde byla položena semena kukuřice na roztokem sorbitolu navlhčený filtrační papír na Petriho misce. Sorbitol měl negativní účinek na růstové vlastnosti klíčících rostlin. Délka kořene i prýtu se zmenšila. I obsah chlorofylu (chlorofylu A i chlorofylu B) se snížil. Vyšší koncentrace sorbitolu (0,6 a 1 M) utlumily klíčení. Pouze na obsah prolinu a aktivitu nitrátreduktázy sorbitol působil pozitivně (Jain et al., 2010).

Dvěma rýžovým kultivarům (citlivému a tolerantnímu k zasolení) byl exogenně dodáván sorbitol a trehalóza. Senzitivní kultivar vykazoval při zasolení výrazné snížení růstu a zvýšení množství peroxidu vodíku. Na tolerantnější kultivar zasolení také působilo negativně, ale změny nebyly tak výrazné. Oba kultivary rostly na médiu s přidáním sorbitolu a trehalózy. Při exogenním dodávání sorbitolu a trehalózy kultivaru citlivému bylo zmírněno působení zasolení na růst a snížilo se i množství vytvořeného peroxidu vodíku. Na tolerantní kultivar neměl sorbitol spolu s trehalózou výraznější vliv (Theerakulpisut a Gunnula, 2012).

Pozitivní vliv exogenní aplikace sorbitolu byl pozorován i na rostlinách sóji, které byly vystaveny suchu. Sucho za normálních podmínek velice ovlivňuje růst sóji. Pokud byl sorbitol nasprejován na rostliny, zvýšila se rezistence k suchu. Experiment probíhal tak, že jednou za pět dní byl sorbitol nasprejován na povrch nejspodnějšího listu. Za přítomnosti sorbitolu měly stresované rostliny větší množství listů a byly vyšší (Amirah et al., 2013).

## 5.2 GENETICKÉ MANIPULACE

Z předchozích kapitol vyplývá, že sorbitol je v rostlinách, které ho dokáží syntetizovat důležitým faktorem v toleranci k abiotickému stresu. I jeho exogenní aplikace má potenciál ovlivnit stresovou reakci rostliny. Proto se předpokládá, že pokud by byly vloženy geny pro syntézu cukerných alkoholů do rostlin, které je normálně nesyntetizují, mohlo by dojít ke zvýšení jejich odolnosti. Bylo publikováno několik prací, které se tímto tématem zabývají.



Obr. 6: Schéma genového konstruktů, který vedl u transgenního tabáku k expresi sorbitol-6-fosfátdehydrogenázy. Převzato z Sheveleva et al., 1998.

Sheveleva et al. (1998) vložili do tabáku (*Nicotiana tabacum* L.) cDNA kódující S6PDH z jabloně (viz obr. 6). Autoři vytvořili několik desítek transformovaných rostlin, které akumulovaly různé množství sorbitolu. Rostliny tabáku, které obsahovaly do 2 až do 3  $\mu\text{mol}$  sorbitolu na g čerstvé hmotnosti, byly fenotypově normální, vykazovaly pouze mírné zpomalení růstu. Rostliny akumulující 3 až 5  $\mu\text{mol}$  sorbitolu na g čerstvé hmotnosti tvořila chlorotická místa. Při větších množstvích sorbitolu se chlorotická místa vytvářela na celých mladých listech a začala se vytvářet nekrotická místa. Při překročení 15  $\mu\text{mol}$  na g čerstvé hmotnosti se rostliny staly sterilními a nemohly vytvářet kořeny. Autoři zjistili, že akumulace sorbitolu negativně koreluje s akumulací *myo*-inositolu, který rostlinu chrání před vytvářením nekrotických míst. Na tento experiment navázali Deguchi et al. (2006), kteří vyvrátili dřívější tvrzení, že akumulace sorbitolu je pro transgenní rostliny škodlivá a inhibuje růst. Zjistili, že pokud byl do rostliny vložen pouze gen pro S6PDH, sorbitol se akumuloval a nebyl dále metabolizován. Proto vytvořili transformované rostliny tabáku nejen s vloženým cDNA pro S6PDH, ale i pro SDH. V rostlinách nedocházelo ke změnám obsahu *myo*-inositolu a jejich růst byl normální. Odolnost rostlin k abiotickým stresům nebyla bohužel v tomto pokusu zjišťována.

Do tomelu japonského (*Diospyros kaki*) byla také vložena cDNA z jabloně kódující S6PDH. V listech netransformovaných rostlin tomelu sorbitol detekován nebyl. Pro zjišťování tolerance k zasolení byly porovnávány dvě transformované linie, dále pak kontrolní transformované rostliny (produkující S6PDH, ale enzym není aktivní) a rostliny netransformované. Rostliny produkující nejvyšší množství sorbitolu byly nejodolnější vůči zasolení (Gao et al., 2001).

## 6. ZÁVĚR

Produktivita kulturních plodin je výrazně limitována působením sucha a zasolení, tedy stresy, které ve svém důsledku snižují dostupnost vody pro rostlinu. Existují však rostliny, které jsou těmto nepříznivým podmínkám v průběhu svého života vystaveny a jsou schopny jim odolávat. Porozumění mechanismům jejich tolerance ke stresu by tak mohlo být klíčem ke zvýšení odolnosti i u jinak citlivých rostlin. Pravděpodobně ještě nejsou známy všechny mechanismy, kterými rostliny disponují při odpovědi na abiotický stres. Z mnohých experimentů ale víme, že akumulace cukerných alkoholů (např. posílením syntézy a/nebo snížením jejich degradace) je jednou z cest, která vede k vyšší odolnosti u rostlin. Proto jedním z možných způsobů, jak zvýšit odolnost kulturních rostlin ke stresu, by mohlo být vkládání genů spojených s metabolismem sorbitolu. Situace ale pravděpodobně bude složitější, význam cukerných alkoholů pro rostliny rozhodně není dořešen. Recentní práce totiž navrhuje, že sorbitol plní nejen funkce, které jsou v této práci diskutovány, ale že funguje i jako signální molekula, ovlivňující expresi mnoha genů (Suzuki a Dandekar, 2014). Toto zjištění otevírá zcela nový pohled na funkci sorbitolu, který ale bude vyžadovat další studium.

Případné výsledky budoucích experimentů by mohly vézt ke zvýšení odolnosti kulturních plodin k abiotickému stresu, a tak alespoň z části vyřešit problém dostupnosti potravy v zemích třetího světa.

## SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Aguayo, M. F., Ampuero, D., Mandujano, P., Parada, R., Muñoz, R., Gallart, M., Altabella, T., Cabrera, R., Stange, C. & Handford, M. (2013). Sorbitol dehydrogenase is a cytosolic protein required for sorbitol metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Science*, 205-206, 63–75.
- Ahmad, I., Larher, F., Stewart, G.R. (1979). Sorbitol, a compatible osmotic solute in *Plantago maritima*, *New Phytologist*, 82, 671-678.
- Amirah, Jusoff, K., Hadijah, St., Nuraeni, Reta, Marliana, S. P., Muchtar, A. H. & Nonci, M. (2013). Increasing Soybean (*Glycine max* L.) Drought Resistance With Osmolite Sorbitol. *Modern Applied Science*, 7(9), 78-85.
- Apel, K., & Hirt, H. (2004). Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology*, 55, 373–399.
- Apse, M. P., Aharon, G. S., Snedden, W. A., & Blumwald, E. (1999). Salt Tolerance Conferred by Overexpression of a Vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Antiporter in *Arabidopsis*. *Science*, 285, 1256–1258.
- Bartels, D., & Sunkar, R. (2005). Drought and Salt Tolerance in Plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 24(1), 23–58.
- Bianco, R. Lo, Rieger, M., & Sung, S. (2000). Effect of drought on sorbitol and sucrose metabolism in sinks and sources of peach. *Physiologia Plantarum*, 108, 71–78.
- Bohnert, H. J., Nelson, D. E., & Jensen, R. G. (1995). Adaptations to Environmental Stresses. *The Plant Cell*, 7, 1099-1111
- Bremberger, C., Haschke, H., & Liittge, U. (1988). Separation and purification of the tonoplast ATPase and pyrophosphatase from plants with constitutive and inducible Crassulacean acid metabolism. *Planta*, 465–470.
- Brown, P. H., & Hu, H. (1996). Phloem Mobility of Boron is Species Dependent : Evidence for Phloem Mobility in Sorbitol-rich Species. *Annals of Botany*, 77, 497–506.

- Channing, A., & Edwards, D. (2009). Yellowstone hot spring environments and the paleo-ecophysiology of Rhynie chert plants: towards a synthesis. *Plant Ecology & Diversity* 2, 111–143.
- Chen, H., & Jiang, J.-G. (2010). Osmotic adjustment and plant adaptation to environmental changes related to drought and salinity. *Environmental Review*, 18, 309–319.
- Cui, S.M., Chen, G. L. & Nii, N. (2003) Effects of water stress on sorbitol production and anatomical changes in the nuclei of leaf and root cells of young loquat trees. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 72, 359-365
- Cui, S.M., Sadayoshi, K., Ogawa, Y. & Nii, N. (2004) Effects of water stress on sorbitol content in leaves and roots, anatomical changes in cell nuclei, and starch accumulation in leaves of young peach trees. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 73, 25- 30
- Deguchi, M., Saeki, H., Ohkawa, W., Kanahama, K., & Kanayama, Y. (2002). Effect of low temperature on sorbitol biosynthesis in peach leaves. *Japan. Soc. Hort. Sci.*, 71(3), 446–448.
- Deguchi, M., Bennett, A. B., Yamaki, S., Yamada, K., Kanahama, K., & Kanayama, Y. (2006). An engineered sorbitol cycle alters sugar composition, not growth, in transformed tobacco. *Plant, Cell & Environment*, 29(10), 1980–1988.
- Escobar-Gutiérrez, A.J., Zipperlin, B., Carbonne, F., Moing, A. & Gaudillère, J.P. (1998) Photosynthesis, carbon partitioning and metabolite content during drought stress in peach seedlings, *Aust. J. Plant Physiol.*, 25, 197–205.
- Gao, M., Tao, R., Miura, K., Dandekar, a M., & Sugiura, a. (2001). Transformation of Japanese persimmon (*Diospyros kaki* Thunb.) with apple cDNA encoding NADP-dependent sorbitol-6-phosphate dehydrogenase. *Plant Science : An International Journal of Experimental Plant Biology*, 160(5), 837–845.
- Gao, Z., Jayanty, S., Beaudry, R., & Loescher, W. (2005). Sorbitol Transporter Expression in Apple Sink Tissues : Implications for Fruit Sugar Accumulation and Watercore Development. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 130(2), 261–268.

- Gao, Z., Maurousset, L., Lemoine, R., Yoo, S.-D., van Nocker, S., & Loescher, W. (2003). Cloning, expression, and characterization of sorbitol transporters from developing sour cherry fruit and leaf sink tissues. *Plant Physiology*, *131*(4), 1566–1575.
- Gagneul, D., Ainouche, A., Duhazé, C., Lugan, R., Larher, R. F., & Bauchereau, A. (2007). A Reassessment of the Function of the So-Called Compatible Solutes in the Halophytic Plumbaginaceae *Limonium latifolium*. *Plant Physiology*, *144*, 1598–1611.
- Gil, R., Lull, C., Boscaiu, M., Bautista, I., Lidón, A., & Vicente, O. (2011). Soluble Carbohydrates as Osmolytes in Several Halophytes from a Mediterranean Salt Marsh. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici*, *39*(2), 9–17.
- Hu, H., Penn, S. G., Lebrilla, C. B., & Brown, P. H. (1997). Isolation and characterization of soluble boron complexes in higher plants. The mechanism of phloem mobility of boron. *Plant Physiology*, *113*(2), 649–655.
- Ito, A., Sugiura, T., Sakamoto, D., & Moriguchi, T. (2013). Effects of dormancy progression and low-temperature response on changes in the sorbitol concentration in xylem sap of Japanese pear during winter season. *Tree Physiology*, *33*, 398–408.
- Jain, M., Tiwary, S., & Gadre, R. (2010). Sorbitol-induced changes in various growth and biochemical parameters in maize. *Plant Soil Environment*, *56*(6), 263–267.
- Kanayama, Y., Sato, K., Ikeda, H., Tamura, T., Nishiyama, M., & Kanahama, K. (2013). Seasonal changes in abiotic stress tolerance and concentrations of tocopherol, sugar, and ascorbic acid in sea buckthorn leaves and stems. *Scientia Horticulturae*, *164*, 232–237.
- Kanayama, Y., Watanabe, M., Moriguchi, R., Deguchi, M., Kanahama, K., & Yamaki, S. (2006). Effects of Low Temperature and Abscisic Acid on the Expression of the Sorbitol-6-phosphate Dehydrogenase Gene in Apple Leaves. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, *75*(1), 20–25.
- Khan, M. A., Ungar, T. A., Showalter, A. M. (2000). Effects of sodium chloride treatments on growth and ion accumulation of the halophyte *Halaxylon recurvum*. *Common Soil Sci Plant Anal*, *31*, 2763-2774

- Klages, K., Donnison, H., Wunsche, J. & Boldingh, H. (2001). Diurnal changes in non-structural carbohydrates in leaves, phloem exudate and fruit in 'Braeburn' apple. *Aust J Plant Physiol*, 28, 131–139.
- Klepek, Y.-S., Geiger, D., Stadler, R., Klebl, F., Landouar-Arsivaud, L., Lemoine, R., Hedrich R. & Sauer, N. (2005). Arabidopsis POLYOL TRANSPORTER5, a new member of the monosaccharide transporter-like superfamily, mediates H<sup>+</sup>-Symport of numerous substrates, including myo-inositol, glycerol, and ribose. *The Plant Cell*, 17(1), 204–218.
- Koorneef, M., Léon-Kloosterziel, K. M., Schwartz, S. H., & Zeevaart, J. A. D. (1998). The genetic and molecular dissection of abscisic acid biosynthesis and signal transduction in Arabidopsis. *Plant Physiology and Biochemistry*, 36(1-2), 83–89.
- Koyro, H.W. (2006) Effect on salinity on growth, photosynthesis, water relations and solute composition of the potential cash crop halophyte *Plantago coronopus* (L.). *Environ Exp Bot*, 56, 136-146.
- Krasensky, J., & Jonak, C. (2012). Drought, salt, and temperature stress-induced metabolic rearrangements and regulatory networks. *Journal of Experimental Botany*, 63(4), 1593–1608.
- Li, F., Lei, H., Zhao, X., Shen, X., Liu, A., & Li, T. (2012). Isolation and characterization of two sorbitol transporter gene promoters in micropropagated apple plants (*Malus × domestica*) regulated by drought stress. *Plant Growth Regulation*, 68(3), 475–482.
- Loescher, W. H. (1987). Physiology and metabolism of sugar alcohols in higher plants, *Physiol. Plantarum* 70, 553–557.
- Loescher, W. H., McCamant, T., & Keller, J. D. (1990). Carbohydrate Reserves, Translocation, and Storage in Woody Plant Roots. *HortScience*, 25(3), 274–281.
- McElrone, A. J., Choat, B., Gambetta, G. A. & Brodersen, C. R. (2013). Water Uptake and Transport in Vascular Plants. *Nature Education Knowledge* 4(5), 6
- Moing, a, Carbonne, F., Rashad, M. H., & Gaudillère, J. P. (1992). Carbon fluxes in mature peach leaves. *Plant Physiology*, 100(4), 1878–1884.



- Moing, A., Carbonne, F., Zipperlin, B., Svanella, L., & Gaudillère, J.-P. (1997). Phloem loading in peach: Symplastic or apoplastic? *Physiol Plant*, *101*(3), 489–496.
- Munns, R., & Tester, M. (2008). Mechanisms of salinity tolerance. *Annual Review of Plant Biology*, *59*, 651–681.
- Nadwodnik, J., & Lohaus, G. (2008). Subcellular concentrations of sugar alcohols and sugars in relation to phloem translocation in *Plantago major*, *Plantago maritima*, *Prunus persica*, and *Apium graveolens*. *Planta*, *227*(5), 1079–1089.
- Negm, F.B., & Loescher, W.H. (1979). Detection and characterization of sorbitol dehydrogenase from apple callus tissue. *Plant Physiology*, *64*(1), 69–73.
- Negm, F.B. & Loescher, W.H. (1981). Characterization and partial purification of aldose- 6-phosphate reductase (alditol-6-phosphate: NADP 1-oxidoreductase) from apple leaves, *Plant Physiol.* *67*, 139–142.
- Noiraud, N., Maurousset, L., & Lemoine, R. (2001). Transport of polyols in higher plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, *39*(9), 717–728.
- Nosarzewski, M., Downie, A.B., Wu, B. & Archbold D.D. (2012). The role of sorbitol dehydrogenase in *Arabidopsis thaliana*, *Funct. Plant Biol.*, *39*, 462–470.
- Paul, M. J., Primavesi, L. F., Jhurrea, D., & Zhang, Y. (2008). Trehalose Metabolism and Signaling. *Annual Review of Plant Biology*, *59*, 417–441.
- Pommerrenig, B., Papini-Terzi, F. S., & Sauer, N. (2007). Differential regulation of sorbitol and sucrose loading into the phloem of *Plantago major* in response to salt stress. *Plant Physiology*, *144*(2), 1029–1038.
- Ramsperger-Gleixner, M., Geiger, D., Hedrich, R., & Sauer, N. (2004). Differential expression of sucrose transporter and polyol transporter genes during maturation of common plantain companion cells. *Plant Physiology*, *134*(1), 147–160.
- Ranney T. G. & Bassuk NL, Whitlow TH (1991) Osmotic adjustment and solute constituents in leaves and roots of water-stressed cherry (*Prunus*) trees. *J Am Soc Hortic Sci*, *116*, 684–688.

- Reidel, E. J., Rennie, E. a, Amiard, V., Cheng, L., & Turgeon, R. (2009). Phloem loading strategies in three plant species that transport sugar alcohols. *Plant Physiology*, *149* (3), 1601–1608.
- Ricardo, G., Lull, C., Boscaiu, M., Bautista, I., Lidón, A., & Vicente, O. (2011). Soluble Carbohydrates as Osmolytes in Several Halophytes from a Mediterranean Salt Marsh. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici*, *39*(2), 9–17.
- Sheveleva, E. V., Marquez, S., Chmara, W., Zegeer, A., Jensen, R. G., & J., B. H. (1998). Sorbitol-6-Phosphate Dehydrogenase Expression in Transgenic Tobacco. *Plant Physiology*, *117*, 831–839.
- Shi, H., Quintero, F. J., Pardo, J. M., Zhu, J-K. (2002). The Putative Plasma Membrane Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Antiporter SOS1 Controls Long-Distance Na<sup>+</sup> Transport in Plants, *The Plant Cell*, *14*, 465-477
- Singer, M. a, & Lindquist, S. (1998). Multiple effects of trehalose on protein folding in vitro and in vivo. *Molecular Cell*, *1*(5), 639–648.
- Smirnoff, N., & Cumbes, Q. J. (1989). HYDROXYL RADICAL SCAVENGING ACTIVITY OF COMPATIBLE SOLUTES. *Phytochemistry*, *28*(4), 1057–1060.
- Suzuki, Y., & Dandekar, A. M. (2014). Sucrose induces expression of the sorbitol-6-phosphate dehydrogenase gene in source leaves of loquat. *Physiologia Plantarum*, *150*, 355–362.
- Struve, I., Weber, A., Ltittge, U., Ball, E. & Smith, J.A.C. (1985). Increased vacuolar ATPase activity correlated with CAM induction in Mesembryanthemum crystallinum L. and Kalanchoe blossfeldiana cv. Tom Thumb. *J. Plant Physiol.* *117*(5), 451-468
- Szabados, L., & Saviouré, A. (2010). Proline: a multifunctional amino acid. *Trends in Plant Science*, *15*(2), 89–97.
- Teo, G., Suzuki, Y., Uratsu, S. L., Lampinen, B., Ormonde, N., Hu, W. K., DeJong, T. M. & Dandekar, A. M. (2006). Silencing leaf sorbitol synthesis alters long-distance partitioning and apple fruit quality. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *103*(49), 18842–18847.

- Theerakulpisut, P., & Gunnula, W. (2012). Exogenous Sorbitol and Trehalose Mitigated Salt Stress Damage in Salt-sensitive but not Salt-tolerant Rice Seedlings. *Asian Journal of Crop Science*, 4(4), 165–170.
- Tsiantis, M. S., Bartholomew, D. M., & Smith, J. a. (1996). Salt regulation of transcript levels for the c subunit of a leaf vacuolar H(+)-ATPase in the halophyte *Mesembryanthemum crystallinum*. *The Plant Journal : For Cell and Molecular Biology*, 9(5), 729–736.
- Vaidyanathan, R., Kuruvilla, S., & Thomas, G. (1999). Characterization and expression pattern of an abscisic acid and osmotic stress responsive gene from rice. *Plant Science*, 140(1), 21–30.
- Vicente, O., Boscaiu, M., Naranjo, M. Á., Estrelles, E., Bellés, J. M., & Soriano, P. (2004). Responses to salt stress in the halophyte *Plantago crassifolia* (Plantaginaceae). *Journal of Arid Environments*, 58(4), 463–481.
- Wang, Z., & Stutte, G. W. (1992). The Role of Carbohydrates in Active Osmotic Adjustment in Apple under Water Stress. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 117(5), 816–823.
- Watari, J., Kobae, Y., Yamaki, S., Yamada, K., Toyofuku, K., Tabuchi, T., & Shiratake, K. (2004). Identification of sorbitol transporters expressed in the phloem of apple source leaves. *Plant & Cell Physiology*, 45(8), 1032–1041.
- Wellman, C. H., & Gray, J. (2000). The microfossil record of early land plants. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 355(1398), 717–732.
- White, P. J., & Broadley, M. R. (2001). Chloride in Soils and its Uptake and Movement within the Plant: A Review. *Annals of Botany*, 88, 967–988.
- Zhou, R., Cheng, L., & Wayne, R. (2003). Purification and characterization of sorbitol-6-phosphate phosphatase from apple leaves. *Plant Science*, 165(1), 227–232.
- Zhu, J. K. (2002). Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 53, 247–273.

Zhu, J. K. (2003). Regulation of ion homeostasis under salt stress. *Current Opinion in Plant Biology*, 6, 441–445

Zhu, J. K. (2007). Plant Salt Stress. *Encyclopedia of Life Sciences*, 1–3.

