



UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA AGRONOMIJO

Benjamin JUSTIN

**STRIGOLAKTONI – VZPOSTAVITEV MIKORIZE  
IN VLOGA PRI URAVNAVANJU RASTI**

DIPLOMSKI PROJEKT

Univerzitetni študij - 1. stopnja

Ljubljana, 2012

UNIVERZA V LJUBLJANI  
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA  
ODDELEK ZA AGRONOMIJO

Benjamin JUSTIN

**STRIGOLAKTONI – VZPOSTAVITEV MIKORIZE IN VLOGA PRI  
URAVNAVANJU RASTI**

DIPLOMSKI PROJEKT  
Univerzitetni študij - 1. stopnja

**STRIGOLACTONES – MYCORRHIZA ESTABLISHMENT AND  
GROWTH CONTROL**

B. SC. THESIS  
Academic Study Programmes

Ljubljana, 2012

Diplomski projekt je zaključek Univerzitetnega študija Kmetijstvo – agronomija – 1. stopnja. Delo je bilo opravljeno na Katedri za aplikativno botaniko, ekologijo, fiziologijo rastlin in informatiko.

Študijska komisija Oddelka za agronomijo je za mentorja diplomskega dela imenovala prof. dr. Dominika Vodnika.

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Borut Bohanec  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, oddelek za agronomijo

Član: prof. dr. Dominik Vodnik  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, oddelek za agronomijo

Član: doc. dr. Irena Maček  
Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, oddelek za agronomijo

Datum zagovora: 30. 8. 2012

Diplomski projekt je rezultat lastnega dela. Podpisani se strinjam z objavo svojega diplomskega projekta na spletni strani Digitalne knjižnice Biotehniške fakultete. Izjavljam, da je delo, ki sem ga oddal v elektronski obliki, identično tiskani verziji.

Benjamin Justin

## KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Du1
- DK UDK 581.557 (043.2)
- KG Strigolaktini/ vzpostavitev mikorize/ razrast poganjkov rastline
- AV JUSTIN, Benjamin
- SA VODNIK, Dominik (mentor)
- KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo
- LI 2012
- IN STRIGOLAKTONI – VZPOSTAVITEV MIKORIZE IN VLOGA PRI  
URAVNAVANJU RASTI
- TD Diplomski projekt (Univerzitetni študij - 1. stopnja)
- OP V, 20 str., 10 sl., 25 vir.
- IJ sl
- JI sl/en
- AI Strigolaktini so, iz karotenoidne presnovne poti izhajajoči, rastlinski sekundarni presnovni produkti s funkcijo hormonov. Njihovo biosintezo v koreninah rastline povzroči nizka koncentracija fosfata v tleh. Nastali strigolaktini potujejo do nadzemnega dela rastline, kjer preprečijo razrast stranskih poganjkov. Iz korenin se izločijo strigolaktini tudi v tla, kjer delujejo kot kemični signali. Dokazano vplivajo na kalitev semen parazitskih rastlin (*Striga*, *Orobanche*) ter na mikorizne glive. Vzpodbudijo rast mikoriznih gliv do korenin rastline in s tem regulirajo zgodnje faze razvoja mikorize. Strigolaktini in ostali produkti cepitve C<sub>40</sub> karotenoidnega prekursorja so nadalje udeleženi pri oblikovanju znotraj-koreninskih mikoriznih struktur. Mikorizna gliva priskrbi rastlini nove zaloge fosfata. Fosfor vpliva na zmanjšanje biosinteze in transporta strigolaktonov v nadzemni del, kar omogoči stransko obraščanje. Naloga obravnava vlogo strigolaktonov 1) pri vzpostavitvi mikorize in 2) pri regulaciji stranskega obraščanja.

## KEY WORDS DOCUMENTATION

- ND Du1
- DC UDC 581.557 (043.2)
- CX Strigolactones/ mycorrhiza establishment/ plant shoot branching
- AU JUSTIN, Benjamin
- AA VODNIK, Dominik (supervisor)
- PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Agronomy
- PY 2012
- TY STRIGOLACTONES – MYCORRHIZA ESTABLISHMENT AND GROWTH CONTROL
- DT B. Sc. Thesis (Academic Study Programmes)
- NO V, 20 p., 10 fig., 25 ref.
- LA sl
- Al sl/en
- AB Strigolactones are carotenoid metabolic pathway derived plant secondary metabolites with function of hormones. Their biosynthesis in plant roots is induced by low concentration of phosphate in the soil. Strigolactones are transported to the above ground part of the plant where they inhibit shoot branching. Plant roots exude strigolactones also to the soil where they act as chemical signals. It has been proven that they affect germination of some parasitic plants (*Striga*, *Orobancha*) and development of mycorrhizal fungi. They induce mycorrhizal fungi to grow towards plant roots and they regulate the early stages of symbiosis. Furthermore, strigolactones and other products of C<sub>40</sub> carotenoid precursor cleavage are involved in development of intra-radical mycorrhizal structures. Mycorrhizal fungus provides plant with new sources of phosphate. This reduces biosynthesis and transport of strigolactones to the above ground part of the plant and consequently enables shoot branching. This work concerns the role of strigolactones 1) in the formation of mycorrhiza and 2) in the regulation of shoot branching.

## KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA.....	III
KEY WORDS DOCUMENTATION .....	IV
KAZALO VSEBINE.....	V
KAZALO SLIK.....	VI
<b>1 UVOD .....</b>	<b>1</b>
<b>2 ARBUSKULARNA MIKORIZA.....</b>	<b>2</b>
2.1 ZAČETEK INTERAKCIJ IN NJIHOV POMEN .....	2
2.2 VZPOSTAVITEV ARBUSKULARNE MIKORIZE IN SUKCESIJA ARBUSKULOV.....	2
<b>3 REGULATORNA VLOGA STRIGOLAKTONOV PRI RAZVOJU ARBUSKULARNE MIKORIZE .....</b>	<b>4</b>
3.1 ODKRITJE STRIGOLAKTONOV .....	4
3.2 BIOSINTEZA STRIGOLAKTONOV .....	6
3.3 NADALJEVANJE METILERITROL-FOSFATNE PRESNOVNE POTI DO STRIGOLAKTONOV .....	7
3.4 VLOGA STRIGOLAKTONOV IN KAROTENOIDNIH DERIVATOV PRI NASTANKU ARBUSKULARNE MIKORIZE .....	8
<b>4 VLOGA STRIGOLAKTONOV PRI URAVNAVANJU RASTI RASTLINE .....</b>	<b>12</b>
4.1 UČINEK APIKALNE DOMINANCE.....	12
4.2 VPLIV STRIGOLAKTONOV NA STRANSKO OBRAŠČANJE .....	13
4.3 MODEL USMERJENEGA TRANSPORTA AVKSINA .....	15
4.4 HIPOTEZA SEKUNDARNE OBVEŠČEVALNE MOLEKULE.....	17
<b>5 SKLEPI .....</b>	<b>18</b>
<b>6 VIRI .....</b>	<b>19</b>

## KAZALO SLIK

Slika 1: Arbuskul .....	3
Slika 2: Razvejitev hif AM glive <i>Gigaspora margarita</i> .....	5
Slika 3: Strukturna formula osnovne molekule strigolaktona .....	5
Slika 4: Hifa AM glive <i>Gigaspora rosea</i> .....	8
Slika 5: Odziv kalečih spor AM glive <i>Gigaspora rosea</i> na analog strigolaktona, GR24 .....	8
Slika 6: Potek razvejanja in rasti hif AM glive <i>Gigaspora rosea</i> .....	9
Slika 7: Fluorescenčno označeni plastidi korenin navadnega tobaka.....	10
Slika 8: Shematski prikaz in elektronska mikroskopija arbuskula in obdajajočih plastidov .....	10
Slika 9: Apikalna dominanca in vpliv strigolaktonov na stransko obraščanje .....	14
Slika 10: Transport avksina iz brsta v steblo .....	15

## 1 UVOD

Rastline so pritrjeni organizmi. Razpolagajo z viri, ki so jim na voljo v prostoru, ki ga zaobjemajo s svojim telesom. Ko je razpoložljivost virov omejena, obstajajo tri možnosti odziva: rast v neizkoriščene predele tal, povečanje učinkovitosti koriščenja obstoječih virov s pomočjo lastnih mehanizmov, ali pa simbioza z organizmi, ki imajo dostop do virov v pomanjkanju.

Ena izmed pomembnih oblik simbioz je simbioza med rastlinami in glivami imenovana mikoriza. Mikoriza se vedno vzpostavi z več glivnimi partnerji, ki istočasno kolonizirajo več rastlin. Temelji na izmenjavi hranil in organskih molekul med simbionti. V tleh se oblikuje obsežen preplet hif, preko katerih so rastline povezane med seboj. Istočasno so rastline povezane z različnimi vrstami mikoriznih gliv. V nadaljevanju je zaradi lažjega razumevanja tega zelo kompleksnega pojava obravnavan odnos med eno rastlino in eno arbuskularno mikorizno glivo.

Arbuskularno mikorizna gliva dobiva od rastline ogljikove hidrate, kar ji omogoča močno razraščanje. To je koristno tudi za rastlino. Gliva poleg tega, da izkorišča vodo in hranila iz dodatnega volumna tal, izloča ekstracelularne encime, ki razgradijo organsko snov ali pa težje dostopne anorganske oblike hranil, ki so sicer rastlini nedostopne. Zaradi delovanja takšnih encimov se izločijo hranila v talno raztopino in postanejo dostopna glivi, posledično pa tudi rastlini. Te procese lahko gliva vrši v območjih, ki so tudi več metrov oddaljena od korenin rastline in z viri, ki jih tam dobi, oskrbuje rastlino. Tako si rastlina z mikorizo močno poveča razpoložljivost hranil.

Za vzpostavitev mikorize je ključna komunikacija med partnerjema v simbiozi. Rastlina komunicira z okoljem preko izločanja produktov lastne presnove. Izločanje se imenuje eksudacija. Koreninski eksudat ima več funkcij. Izboljša stik korenine s talnimi delci, kar poveča hidravlično prevodnost in posledično izboljša preskrbo rastline z vodo, predstavlja hrano za rizosferne mikroorganizme, vsebuje organske spojine, ki služijo mobilizaciji hranil, v koreninskem eksudatu pa se nahajajo tudi molekule, ki imajo pomembno vlogo pri vzpostavitvi mikorize. Gre za skupino molekul imenovanih strigolaktoni, ki vplivajo na fiziološki odziv simbiotskih gliv v bližini korenin in sodelujejo pri vzpostavitvi arbuskularne mikorize.

Namen te naloge je predstaviti biosintezo strigolaktonov, njihove funkcije pri vzpostavitvi arbuskularne mikorize in funkcije strigolaktonov kot hormonov v rastlini.



## 2 ARBUSKULARNA MIKORIZA

### 2.1 ZAČETEK INTERAKCIJ IN NJIHOV POMEN

Simbioza je način življenja, pri katerem partnerja živita v tesnem stiku drug z drugim. Med njima prihaja do razpona interakcij od kompeticije, pri čemer med sabo tekmujeta, do mutualizma, ko sodelujeta na način, da imata od tega oba korist. Na primeru mikorize gre za simbiozo, pri kateri prihaja do različnih stanj koristi za rastlino in glivo, neto učinek te simbioze pa je koristen za obe. Rastlina je povezana z izven-koreninskim prepletom hif, ki ji predstavlja povečanje dostopnih zalog fosfata in vode ter verjetno tudi drugih hranil iz tal. Glivi pa mikoriza, poleg vira ogljikovih hidratov in posledično močne razrasti, omogoči oblikovanje naslednje generacije.

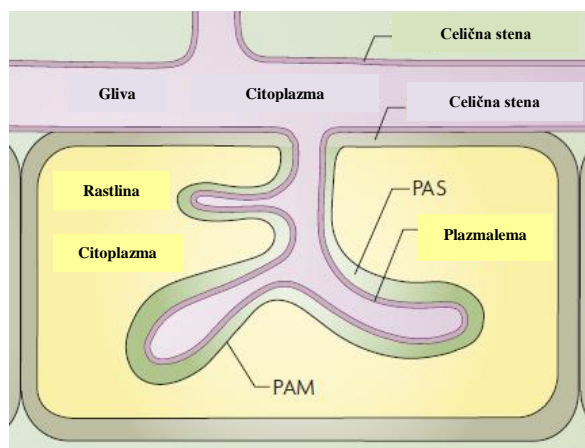
Obstaja več oblik mikorize, ki se med seboj razlikujejo po načinu povezave med rastlino in glivo. Mikorize, pri katerih gliva vstopa v kortikalne celice korenin gostiteljice so endotrofne. Takšna je tudi arbuskularna mikoriza (AM), pri kateri gliva v celicah koreninske skorje rastline gostiteljice oblikuje strukture imenovane arbuskuli, ki služijo izmenjavi snovi med simbiotskima partnerjema. Arbuskuli predstavljajo znotraj-koreninsko strukturo arbuskularnih mikoriznih (AM) gliv in so povezani z zunaj-koreninskim prepletom hif glive, imenovanim zunaj-koreninski micelij. Po hifah se transportirajo snovi od micelija do arbuskulov in obratno.

### 2.2 VZPOSTAVITEV ARBUSKULARNE MIKORIZE IN SUKCESIJA ARBUSKULOV

Preden pride do vzpostavitve fizičnega kontakta med rastlino in glivo, se morata simbiota prepoznati in približati. Ta faza je pred-simbiotska faza. V pred-simbiotski fazi poteka med partnerjema izmenjava signalnih molekul, ki služijo mutualistični prepoznavi. Koreninski eksudat gostiteljske rastline vsebuje poleg drugih molekul tudi takšne spojine, ki vplivajo na presnovo mikorizne glive. Zaradi vzbujene presnove se hifa glive začne podaljševati v dolžino in diferencira, ko doseže gostiteljsko rastlino. Na stiku oblikuje apresorij, strukturo, s katero se hifa pritrdi na korenino in služi penetraciji hife v kortikalne celice. Štiri do pet ur po nastanku apresorija se oblikuje predpenetracijski aparat, struktura, ki definira pot rasti hif skozi rastlinske celice. Sledi proces oblikovanja arbuskula (Parniske, 2008).

Pred nastankom predpenetracijskega aparata potuje jedro rastlinske celice proti pričakovani točki vstopa glive. Jedro rastlinske celice se potem premika pred nastajajočim predpenetracijskim aparatom, kot da kontrolira njegovo pot nastajanja skozi celico. Mikrotubuli in mikrofilamenti skupaj z gostimi cisternami endoplazmatskega retikuluma oblikujejo votlo cev, ki poveže jedro z mestom apresorija. Šele potem lahko hifa vstopi v gostiteljsko celico. Ni znano, kateri signali povzročijo formiranje predpenetracijskega aparata, znano pa je, da lahko popolnoma mehanski dražljaj, ki je povzročen s šivanko, sproži gibanje jedra celice v smeri proti dražljaju (Parniske, 2008). Kot rezultat koordiniranega razvoja se znotraj rastlinske celice razvije razvejana struktura hif imenovana arbuskul. Arbuskul je ločen od citoplazme gostiteljske celice. Hranila in signalne molekule se izmenjujejo preko površine, sestavljene iz periarbuskularne membrane, membrane hife in periarbuskularnega medmembranskega prostora. Tako

nastala struktura se v splošnem imenuje simbiosom (Parniske, 2008). Pri oblikovanju simbiosoma in nadaljnjem razvoju arbuskula imajo pomembno vlogo tudi plastidi, kar bo opisano v nadaljevanju.



Slika 1: Arbuskul – razvejana struktura hife znotraj rastlinske celice in izoblikovan simbiosom, sestavljen iz periarbuskularne membrane (PAM), membrane hife in periarbuskularnega medmembranskega prostora (PAS). Hifa je ločena od citoplazme rastlinske celice. Med njima poteka izmenjava. (Parniske, 2008)

Arbuskuli imajo krajšo življenjsko dobo kot gostiteljska celica. V gostiteljski celici se lahko razvije več zaporednih arbuskulov. Posamezen arbuskul raste, dokler ne doseže končne velikosti. Sledi inducirana senescenca, pri čemer se arbuskul oddvoji od ostale citoplazme z izgraditvijo prečne stene, septe, znotraj hife. Dalje se arbuskul postopno razgradi in popolnoma izgine. Proces je označen kot sukcesija arbuskula. V primeru, da arbuskul za rastlinsko celico predstavlja večje stroške, kot pa prinaša koristi, lahko rastlina sproži mehanizem inducirane senescence in lize arbuskula (Parniske, 2008). To pomeni, da razpolaga z encimi, s katerimi je sposobna razgraditi celico glive. Z mikorizo pridobi rastlina večjo odpornost proti patogenim glivam, saj lahko te encime uporabi tudi za obrambo. Z razgradnjo arbuskula se v celico sprostijo gradniki, ki jih rastlina lahko uporabi za rast.

### 3 REGULATORNA VLOGA STRIGOLAKTONOV PRI RAZVOJU ARBUSKULARNE MIKORIZE

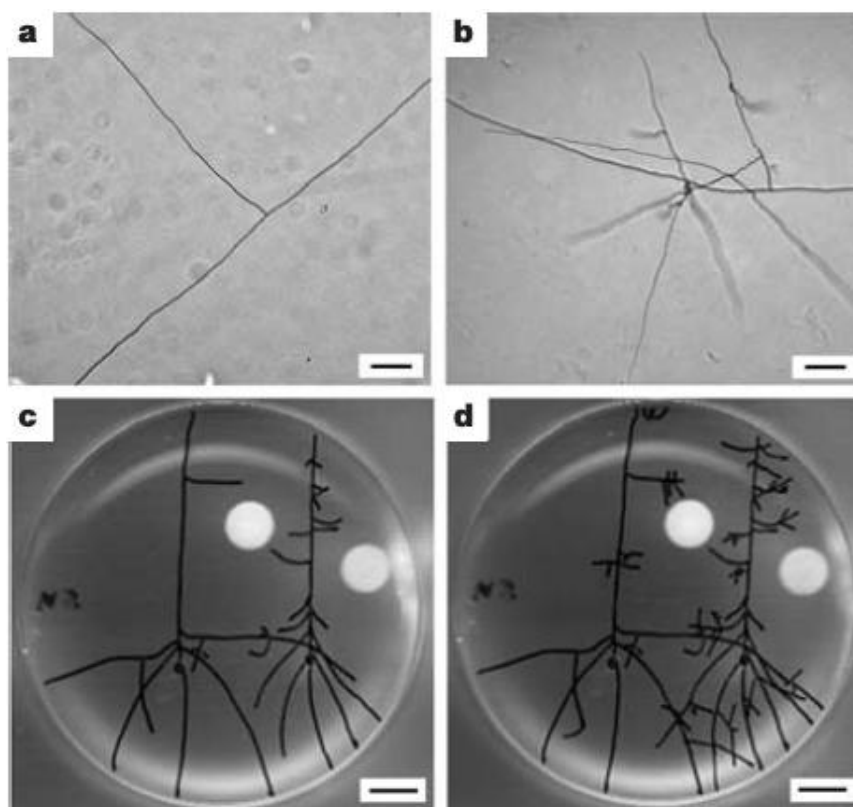
Regulacija vzpostavitve mikorize je bila predmet številnih raziskav. Osrednje vprašanje, ki še vedno ni popolnoma razjasnjeno, je bilo, na kakšen način poteka komunikacija med rastlino in glivo; kateri so tisti kemijski signali, ki omogočijo prepoznavo in privedejo do oblikovanja kompleksne povezave med njima.

#### 3.1 ODKRITJE STRIGOLAKTONOV

Raziskovanja povezana s strigolaktoni so se začela, ko je bilo opaženo, da semena parazitskih rastlin rodov *Striga* in *Orobanche* ne kalijo, če niso izpostavljena koreninskemu eksudatu gostiteljske rastline. Koreninski eksudat pospešuje njihovo kalitev. Enak učinek je bilo opaziti tudi pri sporah AM gliv. Če so spore AM gliv izpostavili koreninskemu eksudatu, so kalile in se začele razraščati. Te ugotovitve so napeljevale na domnevo, da koreninski eksudat vsebuje določene signalne molekule, ki vplivajo na parazitske rastline in na AM glive, ter da AM glive in parazitske rastline reagirajo na iste signalne molekule eksudata. Kasnejše raziskave so potrdile to domnevo.

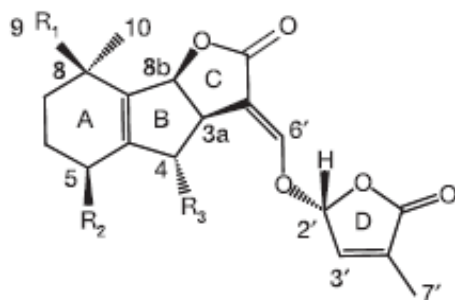
Dokler skupina teh signalnih molekul ni bila kemijsko identificirana, so bile molekule imenovane razvejitveni faktorji; hifa AM glive se je namreč ob stiku z rastlinskim eksudatom razvejila (slika 2b). Predpostavljalo se je, da gre za flavonoide, do leta 1995, ko so Bécard in sodelavci pri mutantih koruze (*Zea mays*) z manjkajočimi encimi za sintezo flavonoidov, zaradi česar ti niso bili prisotni v eksudatu, dokazali normalno kolonizacijo z arbuskularnimi mikoriznimi glivami (Besserer in sod., 2006). Za tem je bilo testiranih več sekundarnih metabolitov eksudata, dokler niso leta 2005, Akiyama in sodelavci, izolirali in identificirali 5-deoksi-strigol kot razvejitveni faktor, pripadajoč skupini molekul, poimenovanih strigolaktoni.

Izolacijo so izvedli iz metuljnice *Lotus japonicus*. Postopek je bil zahteven, ker gre za molekulo, zastopano v izredno majhni koncentraciji, poleg tega je molekula relativno nestabilna. Vedelo se je, da gre za nizkomolekularno spojino, saj je koreninski eksudat, filtriran skozi polprepustno membrano, še vedno učinkoval na AM glive. Analize topnosti so pokazale, da je molekula lipofilna, topna v maščobah. Znano je bilo tudi, da koreninski eksudat rastlin, ki rastejo v pomanjkanju fosforja, močnejše učinkuje na AM glive, kot eksudat dobro prehranjenih rastlin, iz česar se je dalo zaključiti, da fosfor vpliva na biosintezo te molekule. Zato so rastline za namen izolacije gojili hidroponsko, v razmerah pomanjkanja fosfata. Lipofilne molekule, izločene v hranilno raztopino, so ekstrahirali z etil-acetatom in testirali učinkovitost ekstrakta, pri čemer so dobili pozitivne rezultate, kar je pomenilo, da je iskana molekula prisotna v tem ekstraktu. Ekstrakt so ločili na kisle, bazične in nevtralne frakcije. Učinkovitost se je pokazala le za nevtralno frakcijo. Iz hidroponske raztopine so ekstrahirali nevtralne lipofilne molekule s pomočjo aktivnega oglja. Na aktivno oglje vezane substance so raztopili v acetonu. Dalje so aktivno molekulo izolirali s pomočjo kromatografskih tehnik, pri čemer so sproti preizkušali aktivnost posameznih frakcij. Aktivno molekulo so določili kot 5-deoksi-strigol, ki pripada molekulam strigolaktonov (Akiyama in sod., 2005).



Slika 2: Razvejitev hif AM glive *Gigaspora margarita*, inducirana s pomočjo lipofilne frakcije koreninskega eksudata metuljnice *Lotus japonicus*. Primer testa, s katerim so Akiyama in sodelavci ugotavljali učinek ekstrakta na glive. a) Kontrola – na gojišču ni prisotnih aktivnih molekul, zato se hifa ne razveji. b) Etil-acetatni ekstrakt koreninskega eksudata, ki vsebuje aktivne molekule – hife se razvejijo. Črta na sliki a in b predstavlja 300  $\mu\text{m}$ . Na sliki c in d je prikazano spremljanje razvejitve hife po tretiranju papirnatih diskov z nevtralno frakcijo etil-acetata. c) Ob času 0h. d) Po 24h. Viden je učinek nevtralne frakcije etil-acetata na hife, kar pomeni, da je aktivna molekula v tej frakciji prisotna. Črta na sliki c in d predstavlja 6 mm. (Akiyama in sod., 2005)

Do sedaj je bilo odkritih več molekul strigolaktonov in znano je, da so te spojine široko razširjene po rastlinskem kraljestvu. Strigolaktoni so neobhodni pri vzpostavitvi arbuskularne mikorize, zadnje raziskave pa nakazujejo, da gre verjetno za pomembno skupino rastlinskih hormonov udeleženih pri kontroli razrasti poganjkov (Xie in sod., 2010).



Slika 3: Strukturna formula osnovne molekule strigolaktona z označenim ABC tricikličnim obročem in nanj, z enol-etersko vezjo, vezanim, metil-butenolidnim, laktonskim D obročem. (Akiyama in sod., 2005)

### 3.2 BIOSINTEZA STRIGOLAKTONOV

Kmalu po odkritju strigolaktonov so Matusova in sodelavci (2005) ugotovili, da triciklični ABC obroč strigolaktonov nastane s cepitvijo  $C_{40}$  karotenoidov, kar pomeni, da so strigolaktoni apokarotenoidi. Apokarotenoidi so oksidacijski produkti karotenov, ki pa so po svojem izvoru tetraterpeni. Za sintezo terpenov v rastlini sta znani dve presnovni poti. Presnovna pot mevalonske kisline v citosolu in metileritrol-fofatna (MEP) presnovna pot v plastidih. Matusova in sodelavci (2005) so ugotovili, da so strigolaktoni najverjetneje produkt  $C_{40}$  karotenoidov, ki izhajajo iz metileritrol-fofatne presnovne poti.

Piruvat, končni produkt glikolize in gliceraldehid-3-fofat, intermediat glikolize, glukoneogeneze ali pa Calvinovega cikla, sta vhodni molekuli za metileritrol-fofatno presnovno pot. Ob kondenzaciji gliceraldehid-3-fofata in piruvata nastane  $C_5$  spojina, 1-deoksi-D-ksiluloze-5-fofat. Reakcijo katalizira encim 1-deoksi-D-ksiluloze-5-fofatna sintaza (DXS). Sledi izomerizacija metilne skupine in hidrogeniranje dvojne vezi med ogljikom in kisikom, kar katalizira encim 1-deoksi-D-ksiluloze-5-fofatna reduktoizomeraza (DXR). Reakcija vodi do nastanka metileritrol-fofata (MEP).

Iz MEP nastane izopentenil-difosfat (IPP) in njegova izomera dimetilalil-difosfat (DMAPP), ki sta fosforilirana izoprena. Z združitvijo IPP in DMAPP nastane geranil-difosfat (GPP),  $C_{10}$  molekula, prekursor monoterpenov. Če se GPP poveže z molekulo IPP, nastane  $C_{15}$  farnezil-difosfat (FPP), prekursor seskviterpenov. Z vezavo še ene molekule IPP nastane  $C_{20}$  geranilgeranil-difosfat (GGPP), prekursor diterpenov. Z dimerizacijo FPP oziroma GGPP nastanejo triterpeni ( $C_{30}$ ) oziroma tetraterpeni ( $C_{40}$ ) (Taiz in Zeiger, 2006).

Dimerizacijo GGPP katalizira encim fitoen-sintaza (PYS). Nastane  $C_{40}$  molekula, fitoen, ki je prvi intermediat biosintetske presnovne poti karotenoidov. Nastanek nenasičenih vezi v verigi katalizirata encima fitoen-desaturaza (PDS) in  $\zeta$ -karoten-desaturaza (ZDS). Nastanejo fitofluen,  $\zeta$ -karoten in končno likopen, s konjugirano dvojno vezjo, ki absorbira svetlobo. S ciklizacijo končnih delov verige likopena nastane  $\alpha$ -karoten in njegova izomera  $\beta$ -karoten, ki je prekursor za sintezo z mikorizo povezanih karotenoidov; strigolaktonov, mikoradicina in cikloheksenonskih derivatov. S hidroksilacijo cikloheksenonskih obročev nastane iz  $\alpha$ -karotena lutein, iz  $\beta$ -karotena pa zeaksantin (Strack in Fester, 2006; Anh-Tuan in sod., 2011).

Katalizo  $C_{40}$  karotenoidnega prekursorja vrši encim carotenoid-cleavage-dioksidgenaza (CCD). Do sedaj še ni jasno, kateri karotenoid je substrat za encim CCD. Delovanje CCD je specifično, na vez med  $C_9-10$  ( $C_9'-10'$ ) in vez med  $C_{11}-12$  ( $C_{11}'-12'$ ). S cepitvijo, metilacijo ter drugimi strukturnimi spremembami nastane iz molekule karotenoida  $C_{15}$  prekursor strigolaktonov,  $C_{14}$  dialdehid iz katerega nastane mikoradicin in  $C_{13}$  keton, cikloheksenon (Akiyama, 2007). Strigolaktone rastline sintetizirajo v sledih, mikoradicin in cikloheksenonske derivate pa, v primeru mikorize, v velikih količinah (Strack in Fester, 2006).

Na koreninah mnogih rastlin je, zaradi kolonizacije z arbuskularnimi mikoriznimi glivami, opazno rumeno obarvanje. Za obarvanje je odgovoren do sedaj še neidentificiran rumen pigment, katerega kromofor je mikoradin. Rumena pigment se v obliki hidrofobnih kapljic akumulira v vakuolah kortikalnih celic korenine, v fazi degradacije arbuskula (Akiyama, 2007). Njegova vloga ni znana, je pa očitno rezultat cepitve karotenoidnega prekursorja.

Tudi akumulacija cikloheksenonskih derivatov je močno pogojena z mikorizacijo, saj na porast ne vpliva niti biotski stres, kot je infekcija s patogeni ali endofiti, niti abiotski stres kot so vročina, mraz, velika intenziteta svetlobe, težke kovine in suša (Maier, 1997). Glikozilirani cikloheksenon, blumenol C, je aglikon blumenina. Blumenin je v sledih prisoten tudi v nemikoriziranih koreninah, vendar njegov delež znatno naraste v mikoriziranih koreninah. Blumenin inhibitorno vpliva na zgodnje faze razvoja arbuskula, iz tega sledi, da bi cikloheksenonski derivati lahko bili endogeni negativni regulatorji kolonizacije, ki služijo koordiniranemu razvoju simbioze (Akiyama, 2007).

### 3.3 NADALJEVANJE METILERITROL-FOSFATNE PRESNOVNE POTI DO STRIGOLAKTONOV

Cikloheksenski obroč  $\beta$ -karotena ostane po cepitvi intakten in predstavlja A obroč strigolaktona. Matusova in sodelavci (2005) so predvideli, da  $C_{15}$  aldehydnu intermediatu sledi hidroksilacija, hidrogeniranje, oksidacija, epoksidacija, oksidativna dekarboksilacija in ciklizacija, s čimer nastane  $C_{14}$ , ABC – triciklični obroč. Za D obroč se predpostavlja, da je produkt druge presnovne poti. Z vezavo na ABC triciklični obroč nastane 5-deoksi-strigol. Ta spojina je prvi produkt biosinteze, ki učinkuje kot strigolakton (Akiyama, 2007).

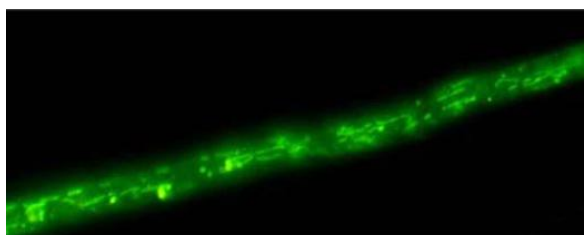
Vsi do sedaj znani strigolaktoni so sestavljeni iz tricikličnega ABC obroča. C obroč izkazuje funkcije laktona. Z enol-etersko vezjo se povezuje z metil-butenolidnim, laktonskim D obročem. 5-deoksi-strigol je verjetno najenostavnejši strigolakton in predpostavlja se, da je prekursor za biosintezo drugih, kompleksnejših molekul strigolaktonov, saj se pojavlja v eksudatu mnogih rastlin, tako enokaličnic (Awad in sod., 2006), kot dvokaličnic (Yoneyama in sod., 2008). 5-deoksi-strigol je bil dokazan tudi v mahu vrste *Physcomitrella patens* (Proust in sod., 2011).

Strigolaktoni so zelo aktivne molekule. Kalitev semen parazitskih rastlin inducirajo pri koncentraciji od  $10^{-7}$  do  $10^{-15}$  M (Xie in sod., 2010). Aktivno mesto molekule sta C in D obroč, povezana z enol-etersko vezjo. Enol-eterska vez v vodi hidrolizira. To pojasni upad sicer močnega vpliva strigolaktonov na arbuskularne mikorizne glive ob prisotnosti vode (Akiyama, 2007). V tleh ta lastnost strigolaktonov povzroči, da se koncentracija z oddaljevanjem od korenine hitro zmanjšuje, zato je učinek na AM glive prisoten le v neposredni bližini gostiteljske rastline (Parniske, 2008). Sbrana in Giovannetti (2005) opisujeta kemotaktični odziv hife na signalne molekule eksudata nekaterih rastlin. Kemotaktični odziv je pogojen z razdaljo, kar je možno povezati s hidrolizo strigolaktonov. V primeru, da so vzrok strigolaktoni, jim je mogoče pripisati lastnosti kemoatraktantov (Akiyama, 2007).

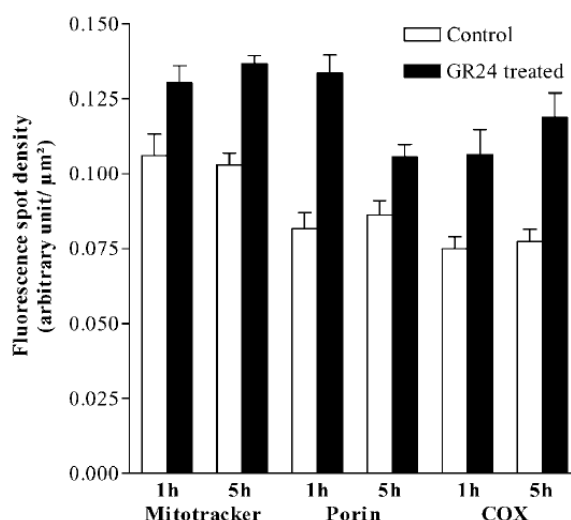
Posamezna rastlina verjetno vsebuje najmanj dva do pet različnih strigolaktonov. Do sedaj ni podatka, da jih katera rastlina ne bi vsebovala. Posebno pozornost vzbujajo rastline, ki nimajo mikorize; navadni repnjakovec (*Arabidopsis thaliana*) in beli volčji bob (*Lupinus albus*), ki kljub temu proizvajata strigolaktone, kar zanju predstavlja potencialno nevarnost napada parazitskih rastlin. Razlaga za to, da so v teh rastlinah strigolaktoni kljub temu prisotni, je odkritje učinkovanja strigolaktonov kot hormonov (Rochange, 2010).

### 3.4 VLOGA STRIGOLAKTONOV IN KAROTENOIDNIH DERIVATOV PRI NASTANKU ARBUSKULARNE MIKORIZE

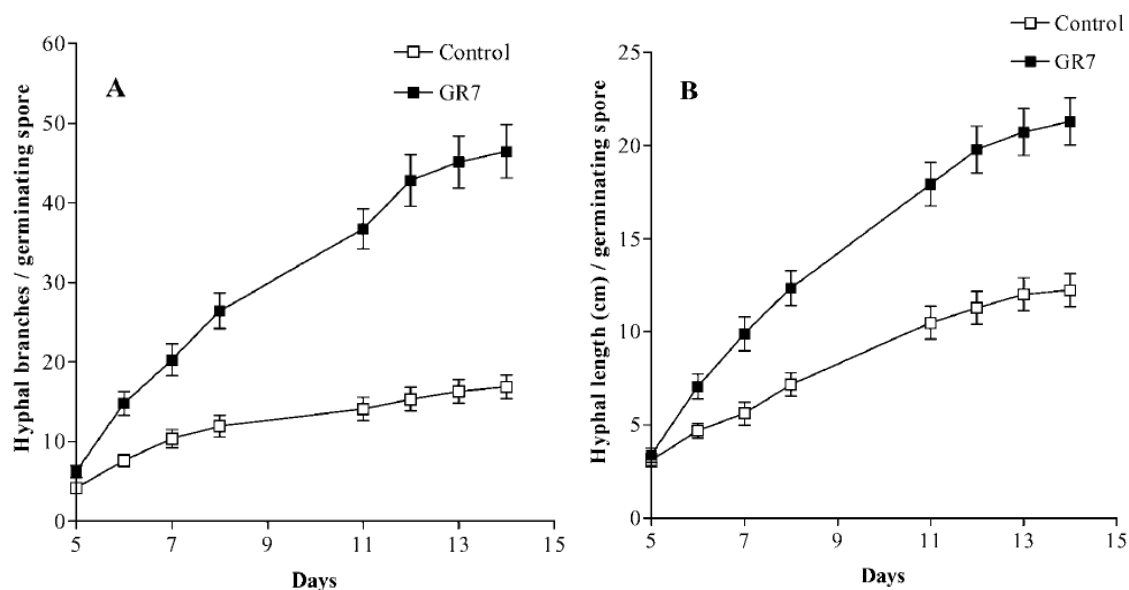
Strigolaktoni vplivajo na kalitev spor arbuskularnih mikoriznih gliv, poleg tega so sprožilci zaporedja molekularnih in celičnih dogodkov, ki so potrebni, da hifa postane fiziološko infektivna (Akiyama, 2007). Sprožijo ekspresijo mitohondrijskih genov in posledično vplivajo na povečano respiratorno aktivnost (Tamasloukht, 2003). Aktivacija mitohondrijev povzroči oksidacijo lipidov, ki so glavni vir ogljika spor mikoriznih gliv. To omogoči pospešeno rast in podaljševanje hife do korenin gostiteljske rastline (Besserer in sod., 2006).



Slika 4: Hifa AM glive *Gigaspora rosea*, tretirana z analogom strigolaktona, GR24, s fluorescenčno označenimi mitohondriji. Zaradi učinkovanja analoga se povečuje aktivnost in število mitohondrijev. (Besserer in sod., 2006)



Slika 5: Odziv kalečih spor AM glive *Gigaspora rosea* na analog strigolaktona, GR24, 1h in 5h po tretiranju. Mitohondriji so bili označeni na tri različne načine (Mitotracker, Porin, COX), za večjo zanesljivost rezultatov. Gostota mitohondrijev tretiranih hif je v vseh primerih večja, kot pri kontroli. (Fluorescence spot density – gostota fluorescenčnih točk na enoto površine; enota za ta parameter je arbitrarna; control – kontrola; GR24 treated – tretirano z GR24.) (Besserer in sod., 2006)



Slika 6: Potek razvejanja (slika A) in rasti hif (slika B) AM glive *Gigaspora rosea*, tretiranih z analogom strigolaktona GR7. Razvejanje in rast tretiranih hif je močnejša, kot pri kontroli. Na y-osi levega grafa je prikazano število razvejitev hif glede na število kalečih spor, na y-osi desnega grafa pa dolžina hif glede na število kalečih spor. (Besserer in sod., 2006)

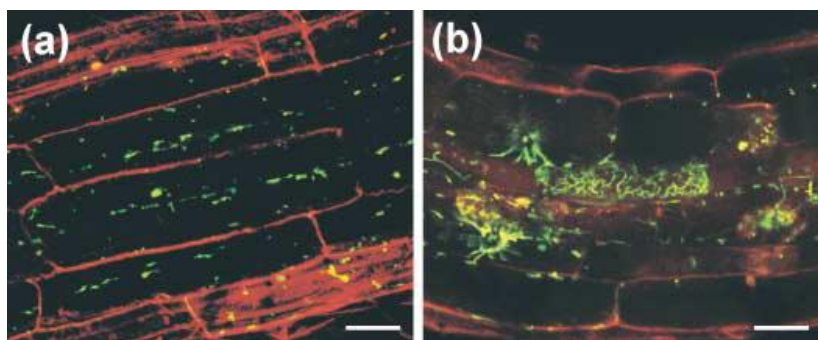
Pomen karotenoidne presnovne poti pri vzpostavljanju arbuskularne mikorize so dokazali s proučevanjem genov za encime, ki sodelujejo pri pretvorbi nekaterih intermediatov. Raziskave genov, ki kodirajo encim 1-deoksi-D-ksiluloze-5-fosfatna sintaza (DXS), mikoriziranih korenin trnate meteljke (*Medicago truncatula*) so pokazale, da obstajata dva izogena DXS; DXS1 in DXS2. DXS1 se izraža na konstitutivnem nivoju po celi rastlini, še posebej v fotosintezno aktivem tkivu. DXS1 izoforma encima je vključena v presnovne poti primarne presnove. Ekspresija izogena DXS2 je inducirana z mikorizacijo in sicer le v koreninskem sistemu rastline, izoforma encima DXS2 pa je vključena v presnovne poti sekundarne presnove (Strack in Fester, 2006). Utišanje mikorizno specifičnega izogena DXS2 s pomočjo RNAi je imelo za posledico drastičen upad prisotnosti cikloheksenonskih derivatov in mikorizno specifičnih fosfatnih transporterjev. Iz tega sledi, da imajo karotenoidni derivati pomembno vlogo pri uspešni vzpostavitvi arbuskularne mikorize in nadaljnjem razvoju arbuskulov (Akiyama, 2007).

Povečana transkripcijska aktivnost gena za encim fitoen-desaturazo (PDS) med vzpostavitvijo arbuskularne mikorize in povečana količina fitoena v mikoriziranih koreninah, tretiranih z inhibitorjem encima PDS, nakazuje, da je aktivacija biosinteze karotenoidov v mikoriziranih koreninah splošen pojav (Strack in Fester, 2006).

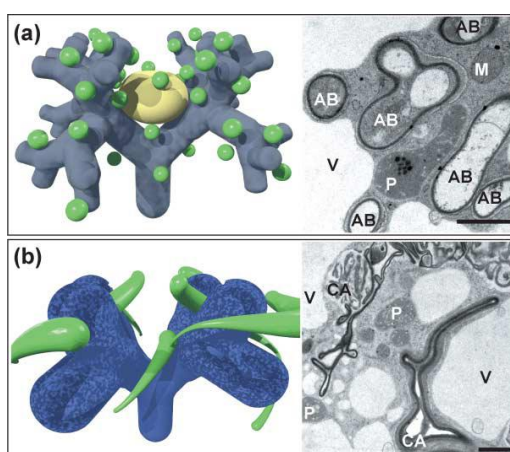
Pri mutantih korusi (*Zea mays*), 'pale yellow 9' (y9), z manjkajočimi geni za sintezo encimov karotenoidnih izomeraz, ki katalizirajo konverzijo  $\zeta$ -karotena v likopen, je bilo opaziti občuten upad kolonizacije korenin z arbuskularnimi mikoriznimi glivami in eksudacije strigolaktonov. V koreninah ni bilo zaznati mikoradicina. Prisotni arbuskuli sicer niso izkazovali očitnih anomalij, vendar se je njihovo število močno zmanjšalo.



Metileritrol-fosfatna presnovna pot ter njeno nadaljevanje, karotenoidna presnovna pot, potekata v plastidih. Plastidi gostiteljskih celic rastline imajo pomembno vlogo pri oblikovanju arbuskula. Spremembe v presnovi plastidov, ki jih inducira mikorizacija, omogočijo rast in razmnoževanje plastidov. Njihovo število se poveča. Med seboj se povežejo s posebnimi strukturami, imenovanimi stromuli. Stromuli so s stromo plastida napolnjeni tubularni podaljški plastidov in služijo komunikaciji med plastidi. Na ta način tvorijo plastidi obsežen preplet, ki obda predpenetracijski aparat in kontrolira vstop hife in oblikovanje arbuskula (Slika 4b; Strack in Fester, 2006). V plastidih okoli arbuskula se poveča količina encima DXR, ki je udeležen v metileritrol-fosfatni presnovni poti. Posledično se poveča količina karotenoidnih derivatov. Količina DXR je posebno velika v plastidih okrog senescentnega arbuskula. Poleg biosinteze karotenoidov se v celici poveča biosinteza maščobnih kislin in aminokislin. To je pomembno, predvsem v zgodnji fazi razvoja arbuskula, ko rastlina oblikuje periarbuskularno membrano okoli rastočega arbuskula, saj maščobne kisline sodelujejo pri tvorbi lipidnega dvosloja, aminokisliline pa gradijo membranske proteine. V fazi razvoja arbuskula so plastidi majhni, lečaste oblike, v fazi degradacije arbuskula pa izdolženi, nepravilnih oblik (Strack in Fester, 2006).



Slika 7: Fluorescenčno označeni plastidi korenin navadnega tobaka (*Nicotiana tabacum*) a) Nemikorizirane celice – plastidi so razporejeni po citoplazmi. b) Mikorizirane celice – plastidi povezani s stromuli tvorijo preplete. Črta predstavlja 50  $\mu\text{m}$ . (Strack in Fester, 2006)



Slika 8: Shematski prikaz (levo) in elektronska mikroskopija (desno) arbuskula (modro) in obdajajočih plastidov (zeleno) a) Začetna faza razvoja arbuskula. Jedro (rumeno) rastlinske celice in obdajajoči plastidi kontrolirajo vstop hife v celico in njeno razvejanje. Plastidi so v tej fazi majhni, lečaste oblike. b) Arbuskul v fazi senescence. Plastidi so izdolženi, nepravilnih oblik. AB – razvejitev arbuskula, CA – senescenten arbuskul, P – plastid, M – mitohondrij, V – vakuola. Črta predstavlja 1  $\mu\text{m}$ . (Strack in Fester, 2006)

Razmislek o možnem poteku dogodkov povezanih z vzpostavitvijo arbuskularne mikorize je sledeč. Rastlina proizvaja strigolaktone, ki ji služijo kot hormoni. Izloča jih tudi v koreninski eksudat, torej prehajajo v rizosfero; tla v okolici korenin. V tleh so prisotne spore gliv. Strigolaktoni vplivajo na njihovo energetsko presnovo na način, da pospešijo oksidacijo lipidov, ki so glavni vir ogljika spor gliv. To omogoči rast hif in njihovo razvejanje, s čimer gliva najde gostiteljico. Na stiku korenine in hife se oblikuje apresorij, ki služi penetraciji hife do celic gostiteljice. Rastlina odreagira na fizičen dražljaj. Jedra celic, na katere pritiska hifa s svojo rastjo, se pomaknejo v smer proti dražljaju. Odreagirajo tudi drugi organeli, posledično nastane predpenetracijski aparat. Za tem hifa vstopi v celico. Obdajo jo plastidi, v katerih se aktivirajo geni metileritrol-fosfatne presnovne poti. Oblikujejo se stromuli, s katerimi se plastidi povežejo med sabo. Tako nastala struktura kontrolira razrast hife. V plastidih se začne intenzivna biosinteza karotenoidnih derivatov; strigolaktonov v sledeh, močno pa poraste količina cikloheksenonskih derivatov – skupni prekursor je  $C_{13}$  molekula, ki nastane s cepitvijo  $C_{40}$  karotenoida. Rastlina verjetno lahko aktivno regulira količinsko vsebnost enega in drugega produkta, ki pa imata na glivo nasprotujoč si učinek; strigolaktoni stimulatívni, cikloheksenonski derivati pa inhibitornega.

Cikloheksenonski derivati in njihovi nadaljnji produkti inhibitorno vplivajo na razrast arbuskula, s čimer verjetno lahko preprečijo, da bi hifa zavzela preobsežen del celice, sočasna povečana biosinteza maščobnih kislin in aminokislin pa omogoča nastanek periarbuskularne membrane, s katero rastlina omeji prostor glivi in izoblikuje površino preko katere poteka izmenjava snovi. Plastidi potem kontrolirajo tudi nadaljnje procese sukcesije arbuskula.

## 4 VLOGA STRIGOLAKTONOV PRI URAVNAVANJU RASTI RASTLINE

Spoznanje, da nekatere rastline proizvajajo in izločajo strigolaktone, kljub temu, da ne tvorijo arbuskularne mikorize, je postavljalo vprašanje, zakaj bi se rastlina izpostavljala nevarnosti napada parazitskih rastlin, če pa od tega nima potencialne koristi. Očitno imajo strigolaktoni vlogo tudi pri drugih procesih. Postavljena je bila domneva, da strigolaktoni sodelujejo pri procesih, ki se dogajajo v rastlini. Izkazalo se je, da gre za zelo kompleksno hormonalno regulacijo aktivacije in rasti stranskih poganjkov.

### 4.1 UČINEK APIKALNE DOMINANCE

Kontrola razrasti stranskih poganjkov je ena od pomembnih dejavnikov, ki definira razvoj rastline in njeno končno obliko. Pogosto se v brstih stranskih poganjkov razvije zasnova za nekaj prvih listov, preden brst preide v dormantno stanje. Stranski brst ostane dormanten, lahko pa se aktivira in se iz njega razvije stranski poganjek. Stranski poganjek prevzame funkcijo glavnega poganjka, če je glavni poganjek poškodovan. Število stranskih poganjkov, ki odženejo iz stranskih brstov, je povezano z aktivnostjo stranskih brstov. Rastlina lahko aktivno regulira aktivnost stranskih brstov.

Vzrok neaktivnost stranskih brstov so procesi, ki se jih opredeli kot paradormanco, ekodormanco in endodormanco. Paradormanca je neaktivnost brsta zaradi endogenih signalov v rastlini, kot so hormoni, ki nastanejo izven brsta in preprečujejo njegovo aktivacijo. Ekodormanca je neaktivnost brsta, ki je posledica razmer v okolju. Endodormanca pa je neaktivnost brsta, ki nastane kot posledica notranjega fiziološkega stanja brsta.

Mehanizem kontrole aktivacije stranskih brstov je že dolgo znan kot apikalna dominanca. Glavni poganjek proizvaja hormon avksin, ki potuje navzdol po stebelu in preprečuje rast stranskih poganjkov. Potovanje avksina navzdol po stebelu, bazipetalni transport, je opredeljeno kot polarni transport avksina. Avksin potuje striktno bazipetalno in ne vstopa v stranske brste, kar pomeni, da je njegova vloga pri regulaciji aktivnosti brstov posredna. To dejstvo je odprlo področje intenzivnih raziskav. Večletne fiziološke, genetske in biokemijske študije so privedle do oblikovanja dveh hipotez glede aktivnosti stranskih brstov.

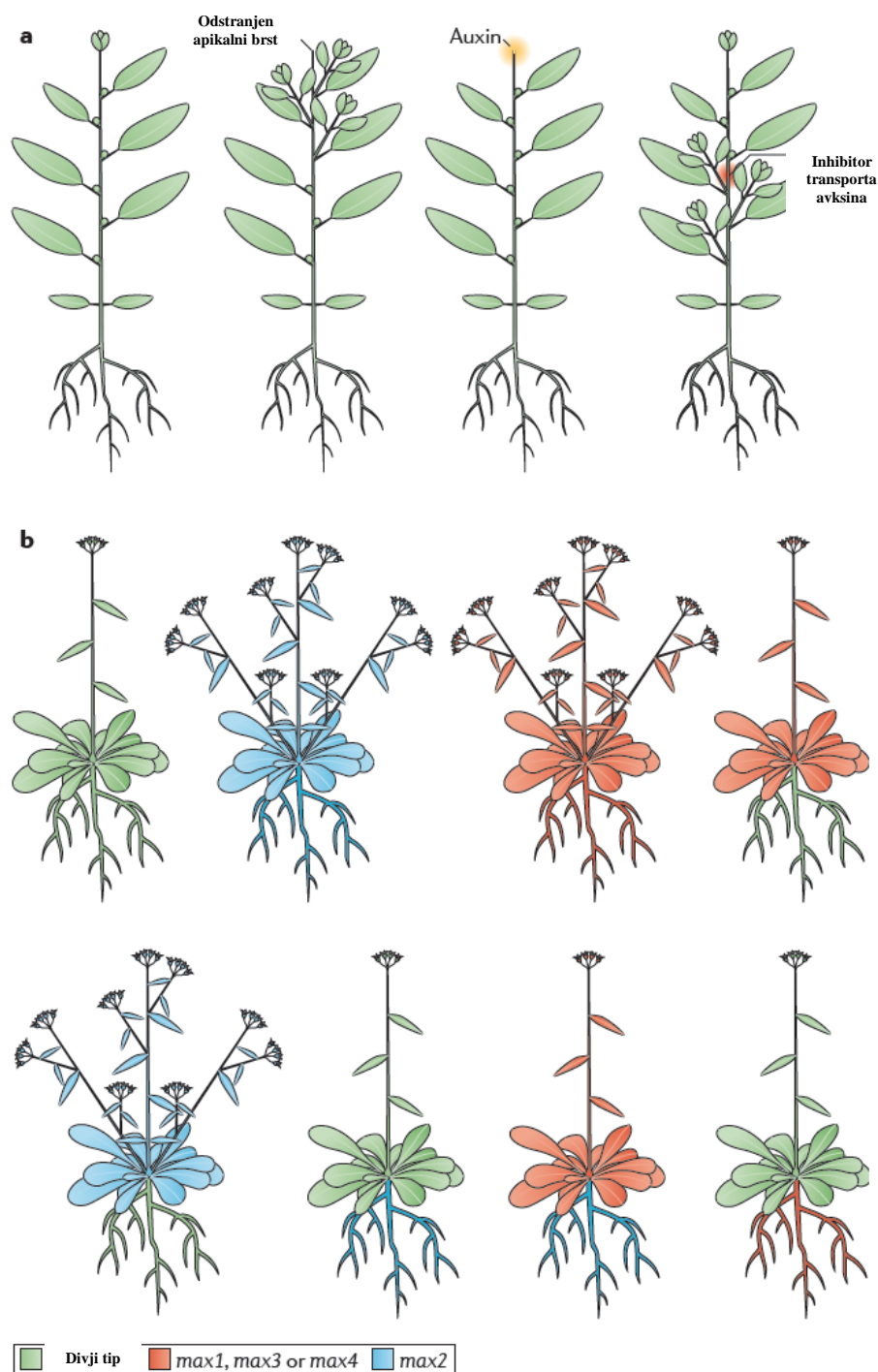
Prva hipoteza temelji na predpostavki, da koncentracija avksina, ki potuje s polarnim transportom po stebelu, preprečuje stranskemu brstu, da bi svoj lasten tok avksina priključil toku avksina po stebelu navzdol, zaradi česar je rast stranskega brsta zavrt. Druga hipoteza pa predpostavlja, da avksin vpliva na koncentracijo sekundarne informacijske molekule, ki potuje navzgor, akropetalno, v stranski brst in neposredno vpliva na njegovo aktivnost. Dejansko stanje verjetno opisujeta obe hipotezi. K razumevanju procesa pa je močno pripomoglo odkritje hormona, ki potuje z akropetalnim transportom in vpliva na razrast poganjkov. Ta hormon je strigolakton (Domagalska in Leyser, 2011).

## 4.2 VPLIV STRIGOLAKTONOV NA STRANSKO OBRAŠČANJE

V regulacijo rasti stanskih poganjkov so vključene najmanj tri skupine hormonov. Avksini, strigolaktini in citokinini. Avksini se sintetizirajo po večini v listih rastočega poganjka. Njihovo potovanje navzdol, po parenhimu ksilema, nadzirajo PIN proteini. Njihov učinek na rast stranskih poganjkov je inhibitoren. Strigolaktini se sintetizirajo v koreninah in v poganjkih in potujejo navzgor, najverjetneje po parenhimu ksilema. Njihov učinek na rast stranskih poganjkov je prav tako inhibitoren. Citokinini se sintetizirajo v koreninah, delno tudi v poganjkih. Potujejo po ksilemu navzgor in pospešujejo rast stranskih brstov.

Za aktivacijo brsta je nujna vzpostavitev odvodnega sistema za avksin iz brsta, kar je regulirano z intenziteto toka polarnega transporta avksina v steblo. Povečan tok avksina je bilo opaziti pri 'more axillary growth' (MAX) mutantih navadnega repnjakovca (*Arabidopsis thaliana*), z okvarjenimi geni za sintezo strigolaktinov, kar je povzročilo močnejše stransko obraščanje in s tem večjo koncentracijo avksina v glavnem steblo. Pri teh mutantih je bilo opaziti tudi povečanje količine PIN proteinov (Bennett in sod., 2006). Ta izid je bil glede na prejšnji koncept apikalne dominancije nepričakovan in nakazuje na vlogo strigolaktinov pri uravnavanju stranskega obraščanja, saj zaradi povečane koncentracije avksina sicer ne bi smelo priti do stranskega obraščanja.

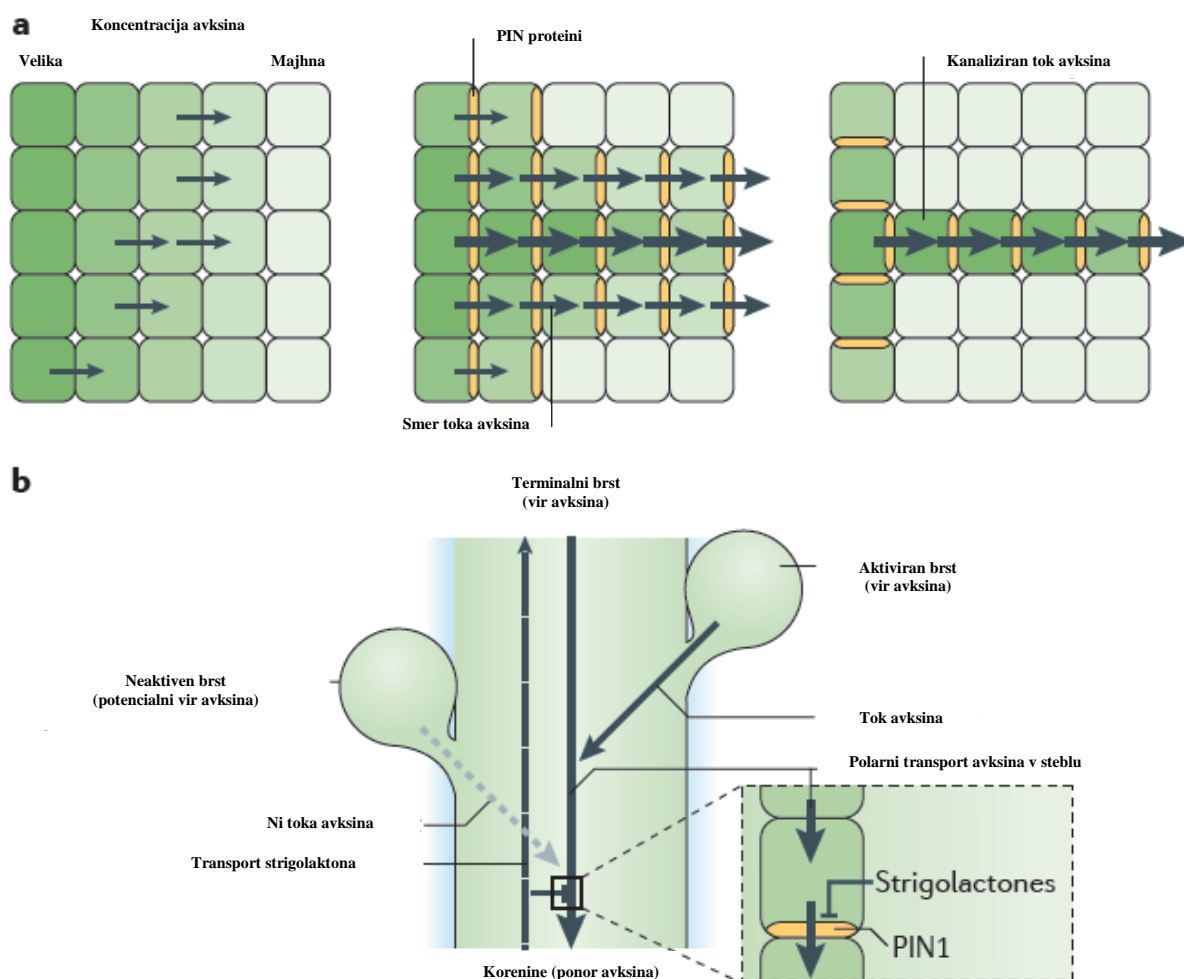
Vlogo strigolaktinov pri stranskem obraščanju so poskušale razjasniti številne raziskave, na podlagi poskusov s cepljenjem. Uporabljalo se je mutante z okvarjenimi geni za sintezo strigolaktinov in geni za signalizacijo povezano s strigolaktini; MAX mutante različnih rastlin. V osnovi sta dva tipa MAX mutantov. MAX2 mutanti lahko proizvajajo strigolaktine, vendar jih ne morejo pošiljati po rastlini, ker imajo okvarjene gene povezane s signalizacijo s strigolaktini. MAX1, MAX3 in MAX4 mutanti pa imajo okvarjene gene za sintezo strigolaktinov, zato strigolaktinov ne proizvajajo. Natančneje, gre za okvaro genov za encim carotenoid-cleavage-dioksidogenazo (CCD), ki vrši katalizo C<sub>40</sub> karotenoidnega prekursorja, posledično izostane sinteza strigolaktinov. Spodnja slika prikazuje izid različnih kombinacij cepljenja. Divji tip je rastlina, ki nima okvarjenih genov, zato lahko proizvaža strigolaktine in jih lahko pošilja navzgor po rastlini.



Slika 9: Apikalna dominanca in vpliv strigolaktonov na stransko obraščanje a) Apikalna dominanca; avksin preprečuje stransko obraščanje. b) Vpliv strigolaktonov na stransko obraščanje; poskus s cepljenjem, na primeru navadnega repnjakovca (*Arabidopsis thaliana*). Divji tip tvori strigolaktone, ki preprečujejo stransko obraščanje. Max 2 tvori strigolaktone, vendar jih ne more pošiljati po rastlini. Max 1, 3 in 4 ne tvorijo strigolaktonov. Iz slike je razvidno, da se strigolaktoni sintetizirajo tudi v nadzemnem delu rastline. (Domagalska in Leyser, 2011)

### 4.3 MODEL USMERJENEGA TRANSPORTA AVKSINA

Za razumevanje mehanizma delovanja strigolaktonov pri stranskem obračanju je bilo potrebno najprej opredeliti mehanizem delovanja avksina. Ta mehanizem poskušajo pojasniti z modelom usmerjenega transporta avksina. Model opisuje proces, pri katerem se začetni tok avksina od vira k ponoru postopno omeji na tisto zaporedje celic, katerih avksinski transporterji so visoko aktivni. Na tak način se ustvari neprekinjen tok avksina od brsta do stebela. To pomeni, da brst, ko se aktivira, začne proizvajati avksin, ki se poskuša odvesti v steblo na način, da se poveže s polarnim transportom avksina po stebelu. Proces temelji na pozitivni povratni zanki, avksin namreč usmerja in nadzoruje lasten transport v smeri toka k ponoru (Sachs, 1981, cit. po Domagalska in Leyser, 2011). Posledično nastane sloj celic z relativno visoko koncentracijo avksina, ki se odvaja od vira k ponoru. Celice se kasneje diferencirajo v sistem žile (Slika 10a; Domagalska in Leyser, 2011).



Slika 10: Transport avksina iz brsta v steblo a) Model usmerjenega transporta avksina. b) Aktivirani brst predstavlja vir avksina, ki se mora odvesti do stebela, da se lahko razvije stranski poganjek. Dodaten avksin v stebelu preprečuje aktivacijo ostalih brstov. Strigolakton, ki potuje akropetalno povečuje kompeticijo vzpostavljanja lastnega polarnega transporta avksina med brsti, z zmanjševanjem akumulacije PIN proteinov v membrani in s posledično lokalno povečano koncentracijo avksina v stebelu. (Domagalska in Leyser, 2011)

Molekularne raziskave so z odkritjem PIN proteinov potrdile pozitivno povratno zanko avksina. Avksin inducira izražanje genov za PIN proteine in preprečuje odstranjevanje že vgrajenih proteinov iz membrane celic. Model usmerjenega transporta avksina ustreza konceptu apikalne dominancje. Avksin, ki se nahaja v epidermalnem sloju brsta, se mora odvesti iz brsta. Ta faza je sestavni del iniciacije lista in njegove ekspanzije. Zato je nujna vzpostavitev polarnega transporta avksina od nastajajočega lista preko nastajajočih prevajalnih elementov brsta do glavnega stebela rastline. Vzpostavitev tega toka je mogoča le, če je koncentracija avksina v epidermalnem sloju brsta dovolj visoka, da inducira prepisovanje genov za PIN proteine, saj morajo biti ti prisotni v membrani, da avksin lahko potuje od ene celice do druge. Če je koncentracija avksina prenizka, brst ostane dormanten (Domagalska in Leyser, 2011).

Koncentracija avksina v stebelu naj bi določala kapaciteto ponora in s tem možnost vzpostavitve polarnega transporta avksina iz brsta v steblo. Višja koncentracija avksina kot je v stebelu, manj ima stranski brst možnosti za aktivacijo. Stranski brst, ki se aktivira, z vzpostavitvijo toka avksina v steblo višja koncentracija avksina v stebelu in s tem preprečuje drugim stranskim brstom, da bi se aktivirali. Če je glavni brst odstranjen, se koncentracija avksina v stebelu zniža, kar omogoči stranskim brstom, da se aktivirajo (Domagalska in Leyser, 2011).

Ena od predpostavk tega modela je tudi ta, da se aktivacija stranskega brsta ne zgodi le zaradi povečanja kapacitete ponora za avksin v stebelu, ampak tudi zaradi povečanja koncentracije avksina v brstu. To bi pomenilo, da bi aplikacija avksina na brst morala inducirati aktivacijo brsta, vendar se to ne zgodi. Razlog je lahko ta, da se mora avksin najprej odvesti iz epidermalnega sloja brsta, preden se brst lahko aktivira. Aplikacija avksina na brst že aktivnega poganjka stranskega brsta, ne povzroči njegove inaktivacije, kar pomeni, da se nanešeni avksin verjetno odvede s polarnim transportom (Domagalska in Leyser, 2011).

Do tu pa še ni jasno, kaj omogoča stransko obraščanje MAX mutantov, glede na to, da prihaja do stranskega obraščanja kljub visoki koncentraciji avksina v glavnem stebelu rastline. Umehara in sodelavci (2008) ter Gomez-Roldan in sodelavci (2008) so pokazali pomen strigolaktonov kot endogenih hormonov, ki preprečujejo stransko obraščanje. Ugotovili so, da strigolaktoni zmanjšujejo akumulacijo PIN proteinov v membrani. Na ta način onemogočajo vzpostavitev polarnega transporta avksina iz brstov in povečujejo kompeticijo med brsti (Slika 10b; Prusinkiewicz in sod., 2009; Crawford in sod., 2010). Na spodnji del stebela, z dvema stranskima brstoma, nanešen strigolakton povzroči prevlado enega brsta nad drugim, kar pomeni, da strigolakton ne preprečuje aktivacije obeh brstov, ampak omogoča kompeticijo med njima na način, da se eden od njiju aktivira, drugi pa ostane dormanten. V primeru, da je na stebelu brez glavnega poganjka prisoten le en stranski brst, aplikacija strigolaktona na bazalni del stebela ne prepreči aktivacije tega brsta. Če pa se na bazalni del stebela brez glavnega brsta, z dvema stranskima brstoma, nanese strigolakton, na mesto glavnega brsta pa avksin, je inhibitorni učinek avksina ojačan z inhibitornim učinkom strigolaktona, zato stranska brsta ne odženeta (Domagalska in Leyser, 2011).

Strigolakton torej dopolnjuje regulacijo stranskega obraščanja z avksinom. Kadar je koncentracija strigolaktona v rastlini nizka in koncentracija avksina to dopušča, odžene več stranskih brstov, ki povišajo koncentracijo avksina z vzpostavitvijo lastnega polarnega toka avksina. Ko pa je koncentracija strigolaktonov v rastlini visoka in avksini dopustijo aktivacijo stranskih poganjkov, bo odgnal le brst, ki bo prvi vzpostavil lasten polaren tok avksina, dodatna koncentracija avksina v stebelu ob sočasnem delovanju strigolaktonov, pa bo preprečila aktivacijo ostalih brstov.

#### 4.4 HIPOTEZA SEKUNDARNE OBVEŠČEVALNE MOLEKULE

Poleg opisanega modela regulacije stranskega obraščanja, zgoraj omenjena druga hipoteza predpostavlja obstoj sekundarne obveščevalne molekule, na katero vpliva avksin. Ta naj bi potovala v brst akropetalno in povzročila njegovo aktivacijo neposredno. Dva hormona sta kandidata za takšno sekundarno obveščevalno molekulo. To sta strigolakton in citokinin. Strigolakton potuje akropetalno in vpliva na aktivnost brstov, vprašanje pa je, ali lahko avksin vpliva na koncentracijo strigolaktona. Avksin naj bi vplival na koncentracijo strigolaktonov z aktivacijo genov za sintezo strigolaktonov. To potrjuje dejstvo, da ob odstranitvi glavnega brsta, in s tem vira avksina, močno upade transkripcija genov za encime za sintezo strigolaktonov in posledično količina strigolaktonov (Domagalska in Leyser, 2011). Avksini vplivajo tudi na sintezo citokininov, vendar ravno nasprotno, saj zmanjšujejo transkripcijo genov adenilatnih-izopentenil-transferaz (IPT), ki imajo ključno vlogo pri sintezi citokininov ali pa pospešujejo transkripcijo citokinin oksidaze, ki razgradi aktivne citokinine (Nordström in sod., 2004; Tanaka in sod., 2006). Aplikacija citokininov na brst neposredno, sproži odganjanje brsta, ne glede na prisotnost avksina iz glavnega brsta.

Ni še jasno, kakšna je dejanska regulacija stranskega obraščanja rastlin. Mogoč je tako model usmerjenega toka avksina, ob sočasnem sodelovanju strigolaktonov, kot tudi obstoj sekundarne obveščevalne molekule, ki neposredno aktivira brst. Morda delujeta oba sistema sočasno, ali pa se različno izražata ob različnih razmerah okolja (Domagalska in Leyser, 2011).

Očitno je, da avksin in strigolakton tvorita povratno zanko, pri čemer strigolakton inhibira transport avksina, avksin pa pospešuje transkripcijo genov za sintezo strigolaktonov. Znižana koncentracija avksina, zniža koncentracijo strigolaktona, kar omogoči aktivacijo brsta. Vzpostavitev polarnega transporta avksina iz aktiviranega brsta v steblo dvigne koncentracijo avksina, posledično se zviša koncentracija strigolaktona in povratna zanka se zaključí.



## 5 SKLEPI

Strigolaktioni vplivajo na vzpostavitev mikorize. Vplivajo tudi na razrast poganjkov. Kakšna pa je povezava med mikorizo in razrastjo poganjkov? Znano je, da pomanjkanje hranil v tleh vpliva na razmerje med nadzemnim delom rastline in koreninami. Procesi, s katerimi rastlina, v primeru pomanjkanja hranil, zavre rast nadzemnega dela in usmeri gradnike v izgradnjo korenin, s katerimi bi morda prišla do dodatnih hranil, so uravnavani s hormoni. Pomanjkanje fosforja v tleh povzroči povečano tvorbo strigolaktonov v rastlini. Strigolaktioni potujejo navzgor po rastlini in preprečijo razraščanje. Verjetno na tak način dobi nadzemni del tudi signal, da je premalo hranila za rast. Zaradi povečane koncentracije v koreninah, začnejo strigolaktioni prehajati v rizosfero s koreninskim eksudatom. V rizosferi prisotne arbuskularne mikorizne glive se na strigolaktone odzovejo s povečano presnovno aktivnostjo in posledično pospešeno rastjo. Rastlina na tak način pridobi simbiotskega partnerja, ki ji priskrbi nove zaloge fosfata. Zaradi povečane količine fosforja se zmanjša sinteza strigolaktonov. Njihova koncentracija v koreninah upade, posledično se zmanjša transport v nadzemni del. To omogoči stransko obraščanje, nadzemni del pa verjetno dobi tudi informacijo, da je novih zalog hranila spet dovolj, kar pomeni, da lahko rastlina nadaljuje z rastjo.

Zgodba o strigolaktionih je le eden od mnogih primerov, ki govorijo o kompleksnosti procesov živega sveta. Morda je celo poučen primer. Po tem, ko je skoraj stoletje veljalo prepričanje, da razrast poganjkov uravnava izključno avksin, je razvoj analitskih tehnik omogočil vpogled v dimenzije, ki so se prej zdele popolnoma nepomembne. Ne le, da se je odkrilo molekule, ki so pomembno vključene v regulacijo razrasti rastlin, odkrilo se je tudi proces, mikorizo, ki je v neposredni povezavi z najmanj eno vrsto teh regulatornih molekul, s strigolaktioni, in močno vpliva na razvoj rastline in njeno sposobnost kljubovanja razmeram v okolju. Še danes ni jasno, kako kompleksen je ta proces v resnici in kakšne interakcije v tej zvezi so še razvili milijoni let zemeljske evolucije.

## 6 VIRI

- Akiyama K. 2007. Chemical identification and functional analysis of apocarotenoids involved in the development of arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 71: 1405-1414
- Akiyama K., Matsuzaki K., Hayashi H. 2005. Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature*, 435: 824-827
- Anh-Tuan P., Kwang-Kim J., Hoon-Kim H., Young-Lee S., Il-Park N., Un-Park S. 2011. Carotenoid accumulation and characterization of cDNAs encoding phytoene synthase and phytoene desaturase in garlic (*Allium sativum*). *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 59: 5412-5417
- Awad A.A., Sato D., Kusumoto D., Kamioka H., Takeuchi Y., Yoneyama K. 2006. Characterization of strigolactones, germination stimulants for the root parasitic plants *Striga* and *Orobancha*, produced by maize, millet and sorghum. *Plant Growth Regulation*, 48: 221-227
- Bécard G., Taylor L., Douds D., Pfeffer P., Doner L. 1995. Flavonoids are not necessary plant signal compounds in arbuscular mycorrhizal symbioses. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 8: 252-258
- Bennett T., Sieberer T., Willett B., Booker J., Luschnig C., Leyser O. 2006. The *Arabidopsis* MAX pathway controls shoot branching by regulating auxin transport. *Current Biology*, 16: 553-563
- Besserer A., Puech-Pagés V., Kiefer P., Gomez-Roldan V., Jauneau A. in sod. 2006. Strigolactones stimulate arbuscular mycorrhizal fungi by activating mitochondria. *PLoS Biology*, 4: 1239-1247
- Crawford S., Shinohara N., Sieberer T., Williamson L., George G., Hepworth J., Müller D., Domagalska M. A., Leyser O. 2010. Strigolactones enhance competition between shoot branches by dampening auxin transport. *Development*, 137: 2905-2913
- Domagalska M. A., Leyser O. 2011. Signal integration in the control of shoot branching. *Nature reviews; molecular cell biology*, 12: 211-221
- Gomez-Roldan V., Fermas S., Brewer P. B., Puech-Pagés V., Dun E. A. in sod. 2008. Strigolactone inhibition of shoot branching. *Nature*, 455: 189-195
- Maier W., Hammer K., Dammann U., Schulz B., Strack D. 1996. Accumulation of sesquiterpenoid cyclohexenone derivatives induced by an arbuscular mycorrhizal fungus in members of the *Poaceae*. *Planta*, 202: 36-42
- Matusova R., Rani K., Verstappen F., Franssen M., Beale M., Bouwmeester H. 2005. The strigolactone germination stimulants of the plant-parasitic *Striga* and *Orobancha* spp. are derived from the carotenoid pathway. *Plant Physiology*, 139: 920-934
- Nordström A., Tarkowski P., Tarkowska D., Norbaek R., Astot C., Dolezal K., Sandberg G. 2004. Auxin regulation of cytokinin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*: A factor of potential importance for auxin-cytokinin-regulated development. *PNAS*, 101: 8039-8044

- Parniske M., 2008. Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbioses. *Nature reviews; microbiology*, 6: 763-775
- Proust H., Hoffmann B., Xie X., Yoneyama Kaori, Schaefer G.D., Yoneyama Koichi, Nogue F., Rameau C. 2011. Strigolactones regulate protonema branching and act as a quorum sensing-like signal in the moss *Physcomitrella patens*. *Development*, 138: 1531-1539
- Prusinkiewicz P., Crawford S., Smith R. S., Ljung K., Bennett T., Ongaro V., Leyser O. 2009. Control of bud activation by an auxin transport switch. *PNAS*, 106:17431-17436
- Rochange S. 2010. Strigolactones and their role in arbuscular mycorrhizal symbiosis. V: *Arbuscular mycorrhizas: Physiology and function*. Koltai H., Kapulnik Y. New York, Springer: 323 str.
- Sbrana C., Giovannetti M. 2005. Chemotropism in the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. *Mycorrhiza*, 15: 539-545
- Strack D., Fester T. 2006. Isoprenoid metabolism and plastid reorganization in arbuscular mycorrhizal roots. *New Phytologist*, 172: 22-34
- Taiz L., Zeiger E. 2006. *Plant Physiology*. 4. Izdaja. Massachusetts, Sinauer Associates: 764 str.
- Tamasloukht B., Sejalon-Delmas N., Kluever A., Jauneau A., Roux C., Bécard G., Franken P. 2003. Root factor induce mitochondrial-related gene expression and fungal respiration during the developmental switch from asymbiosis to presymbiosis in the arbuscular mycorrhizal fungus *Gigaspora rosea*. *Plant Physiology*, 131: 1468-1478
- Tanaka M., Takei K., Kojima M., Sakakibara H., Mori H. 2006. Auxin controls local cytokinin biosynthesis in the nodal stem in apical dominance. *The Plant Journal*, 45: 1028-1036
- Umehara M., Hanada A., Yoshida S., Akiyama K., Arite T. in sod. 2008. Inhibition of shoot branching by new terpenoid plant hormones. *Nature*, 455: 195-201
- Xie X., Yoneyama K., Yoneyama K. 2010. The strigolactone story. *Annual Review of Phytopathology*, 48: 93-117
- Yoneyama K., Xie X., Sekimoto H., Takeuchi Y., Ogasawara S. in sod. 2008. Strigolactones, host recognition signals for root parasitic plants and arbuscular mycorrhizal fungi, from *Fabaceae* plants. *New Phytologist*, 179: 484-494