

Strigolaktoni – signalne molekule v arbuskularni mikorizi in regulatorji rasti in razvoja rastlin

Strigolactones – signal molecules in arbuscular mycorrhiza and regulators of plant growth and development

Benjamin Justin, Dominik Vodnik*

Oddelek za agronomijo, Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani

*korespondenca: dominik.vodnik@bf.uni-lj.si

Izveček: Strigolaktoni so bili najprej odkriti kot rizosferne signalne molekule, s katerimi parazitske rastline prepoznajo prisotnost svojih gostiteljev. Kasneje je bilo ugotovljeno, da imajo ključno vlogo pri nastanku arbuskularne mikorize (AM), ki je pomembna za mineralno prehrano več kot 80 % kopenskih rastlin. Šele nedavno pa so dognali, da strigolaktoni sodelujejo tudi pri regulaciji različnih rastno-razvojnih procesov v rastlini. Tako sodelujejo pri apikalni prevladi oz. kontroli stranskega obraščanja, razvoju korenin, nodulaciji in drugje. Članek predstavlja vlogo strigolaktonov pri razvoju AM, ter njihovo vlogo endogenih regulatorjev. Izpostavlja jih kot snovi, ki z regulacijo procesov udeleženih pri pridobivanju mineralnih hranil in razporejanju virov sodelujejo pri uravnavanju ravnotežja med koreninami in nadzemnim delom rastline.

Ključne besede: simbioza, razvoj, apikalna prevlada, transport avksina

Abstract: Strigolactones were first discovered as rhizosphere signals by which parasitic weeds detect the presence of host plant species. It was later recognized that they play a critical role in facilitating the formation of arbuscular mycorrhiza (AM), symbiosis with fungi, crucial for the acquisition of plant nutrients in over 80% of land plant species. Recently, strigolactones have also been shown to participate in regulation of several plant developmental processes. They are involved in the control of apical dominance (shoot branching), root development, nodulation, etc.. The paper presents the role of strigolactones in development of AM and their implication in other physiological processes. It discusses a possible role of strigolactones as integrators of the root-to-shoot balance, nutrient acquisition, and resource allocation.

Keywords: symbiosis, development, apical dominance, auxin transport

Uvod

Rastline lahko zaradi pritrjenega načina življenja razpolagajo le z viri, do katerih lahko dostopajo s svojimi organi. Korenine rastlini omogočajo sprejem vode in mineralnih hranil iz tal. Ko je razpoložljivost teh virov omejena, obstajajo tri možnosti odziva: rast korenin v neizkoriščene

predele tal, povečanje učinkovitosti koriščenja obstoječih virov s pomočjo lastnih kemičnih mehanizmov (npr. s koreninskim izločkom), ali pa simbioza z organizmi, ki imajo lažji dostop do virov v pomanjkanju. Pomembna oblika tovrstne simbioze je mikoriza – asociacija rastline in glive. Mikorizne glive z zunajkoreninskim micelijem izkoriščajo hranila iz dodatnega volumna tal,

poleg tega pa izločajo ekstracelularne encime in druge spojine, ki mobilizirajo hranila iz za rastlino nedostopnih oblik, npr. iz organske snovi. Te procese lahko gliva vrši v območjih, ki so tudi več metrov oddaljena od korenin rastline in z mineralnimi hranili, ki jih tam pridobi, oskrbuje rastlino. Tako si rastlina z mikorizo močno poveča razpoložljivost hranil.

Mikorizna simbioza se pojavlja v več tipičnih oblikah, ki so značilne za posamezne kombinacije simbiontov in se prevladujoče pojavljajo v različnih tipih ekosistemov. Za funkcionalno mikorizo se morajo razviti različne strukture. Posebej so pomembne tiste, ki omogočajo transportne procese in izmenjavo snovi med obema partnerjema (npr. arbuskuli pri arbuskularni mikorizi, Hartigova mreža pri ektomikorizi). Te in ostale strukture mikorize se razvijajo v rastno-razvojnih procesih, ki so pod kontrolo rastnih hormonov, sladkorjev ter mineralnih hranil (Gogala 1991). Prvi koraki pri razvoju mikorize pa so povezani s prepoznavanjem kompatibilnih simbiontov. Pri iskanju kemičnega signala rastline, ki vzpodbuja rast hif arbuskularnih mikoriznih gliv h koreninam, so ugotovili, da v tem procesu sodelujejo strigolaktoni (Akiyama in sod. 2005). Zanimivo je, da so kmalu zatem prepoznali tudi regulatorni pomen teh molekul v nekaterih razvojnih procesih v sami rastlini (Gomez-Roldan in sod. 2008; Umehara in sod. 2008). To je strigolaktone v relativno kratkem času postavilo ob bok glavnim skupinam rastlinskih rastnih hormonov.

Članek obravnava biosintezo strigolaktonov, njihove funkcije pri vzpostavitvi arbuskularne mikorize in regulatorno vlogo, ki jo imajo v rastno-razvojnih procesih v rastlini.

Regulatorna vloga strigolaktonov pri razvoju arbuskularne mikorize

Arbuskularna mikoriza (AM) je endotrofna oblika mikorize, pri kateri gliva, v celicah koreninske skorje rastline gostiteljice, oblikuje strukture imenovane arbuskuli, ki služijo izmenjavi snovi med simbiontskima partnerjema. Arbuskuli so povezani z zunaj-koreninskim prepletom hif glive. Po hifah se transportirajo snovi od micelija do arbuskulov in obratno.

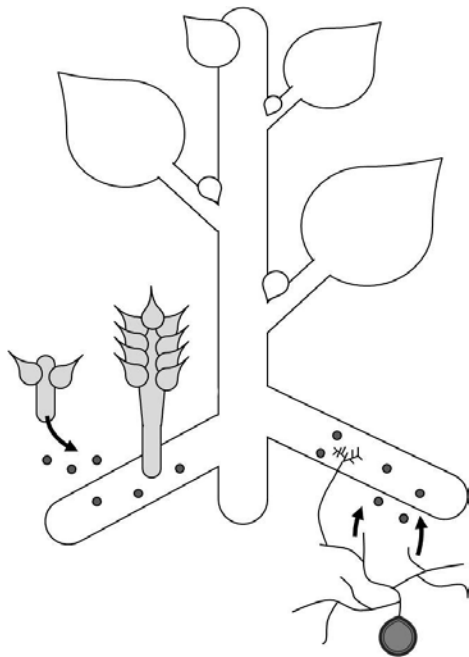
Koreninski eksudat, ki ga izloča rastlina gostiteljica, vpliva na presnovo mikorizne glive.

Zaradi vzbujene presnove se hifa glive začne podaljševati v dolžino in diferencira, ko doseže gostiteljsko rastlino. Na stiku oblikuje apresorij, strukturo, s katero se pritrdi na korenino in služi penetraciji hife v celice koreninske skorje. 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. 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 periarbuskularne medmembranskega prostora (Parniske 2008).

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 enake signalne molekule eksudata. Dokler skupina teh molekul ni bila kemijsko identificirana, so bile molekule imenovane razvejitveni faktorji; hifa AM glive se je namreč ob stiku z rastlinskim eksudatom razvejila. Predpostavljali so, da gre za flavonoide, do leta 1995, ko so Bécard in sodelavci pri mutantih koruze (*Zea mays*) z manjkajočimi encimi za sintezo flavonoidov, dokazali normalno kolonizacijo z arbuskularnimi mikoriznimi glivami (Bécard in sod. 1995). Za tem je bilo testiranih več sekundarnih metabolitov eksudata, dokler niso leta 2005 Akiyama in sodelavci, izolirali in iden-

tificirali 5-deoksi-strigol kot razvejitveni faktor. Ta spojina pripada skupini molekul, imenovanih strigolaktoni (Slika 1).



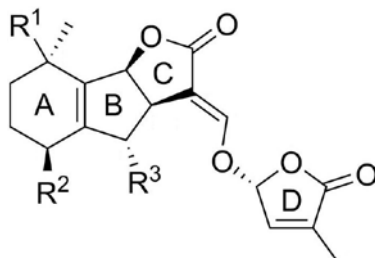
Slika 1: Strigolactones delujejo kot signalne molekule, s katerimi nekatere parazitske rastline prepoznajo prisotnost gostiteljskih rastlin (levo) ter s pomočjo katerih poteka prepoznavanje partnerjev in regulacija razvoja pri arbuskularni mikorizi (desno).

Figure 1: Strigolactones act as signal molecules, by which parasitic plants detect the presence of the hosts (left) and which are involved in the recognition of arbuscular mycorrhizal symbionts and regulation of AM development (right).

Izolacijo 5-deoksi-strigola so izvedli iz metuljnice *Lotus japonicus*. Postopek je bil zahteven, ker gre za precej nestabilno spojino, zastopano v izredno majhni koncentraciji. 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. 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 so predvidevali, da fosfor vpliva na biosintezo te spojine. 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. Ekstrakt so ločili na kisle, bazične in nevtralne frakcije. Učinkovitost se je pokazala le za nevtralno frakcijo. Iz hidroponske raztopine so s pomočjo aktivnega oglja ekstrahirali nevtralne lipofilne molekule, na aktivno oglje vezane substance raztopili v acetonu in opravili kromatografsko ločbo. Pri tem so sproti preizkušali aktivnost posameznih frakcij. Kot aktivno molekulo so določili 5-deoksi-strigol, strigolakton, katerega osnovna struktura je prikazana na sliki 2 (Akiyama in sod. 2005).

Do sedaj je bilo odkritih več molekul strigolaktonov in znano je, da so te spojine široko razširjene po rastlinskem kraljestvu. Nadaljnje raziskave so potrdile, da so strigolaktoni neobhodni pri vzpostavitvi arbuskularne mikorize.



Slika 2: Strukturna (stereokemijska) formula osnovne molekule strigolaktona z označenim ABC tricikličnim obročem in nanj, z enol-etersko vezi, vezanim, metil-butenolidnim, laktonskim D obročem (Akiyama in sod. 2005).

Figure 2: Structure (stereochemical formula) of a basic strigolactone molecule. Methylbutenolide, lactone D ring is coupled to tricyclic ABC ring via the enol ether double bond (Akiyama et al. 2005).

Biosinteza strigolaktonov

Kmalu po odkritju strigolaktonov so Maturova in sodelavci (2005) ugotovili, da triciklični ABC obroč strigolaktonov nastane s cepitvijo C_{40} karotenoidov, ki so po svojem izvoru tetraterpeni. Za sintezo terpenov v rastlini sta znani dve presnovni poti. Presnovna pot mevalonske kisline

citosolu in metileritrol-fofatna (MEP) presnovna pot v plastidih. Matusova in sodelavci (2005) so ugotovili, da strigolaktoni najverjetneje izhajajo iz metileritrol-fofatne presnovne poti.

Vhodni molekuli za metileritrol-fofatno presnovno pot sta piruvat in gliceraldehid-3-fosfat. Ob njuni kondenzaciji nastane C_5 spojina, 1-deoksi-D-ksiluloze-5-fosfat. Reakcijo katalizira encim 1-deoksi-D-ksiluloze-5-fosfatna sintaza (DXS). Sledi izomerizacija metilne skupine in hidrogeniranje dvojne vezi med ogljikom in kisikom, kar katalizira encim 1-deoksi-D-ksiluloze-5-fosfatna reduktioizomeraza (DXR). Reakcija vodi do nastanka metileritrol-fofata (MEP). Iz MEP nastane izopentenil-difosfat (IPP) in njegova izomera dimetilalil-difosfat (DMAPP), ki sta fosforilirana izoprena. Sledi polimerizacija izoprena do C_{40} karotenoidnega prekurzorja, fitoena (Taiz in Zeiger 2006). Nastanek nenasičenih vezi v verigi fitoena katalizirata encima fitoen-desaturaza (PDS) in ζ -karoten-desaturaza (ZDS). Nastanejo fitofluen, ζ -karoten in končno likopen, s konjugirano dvojno vezjo, ki absorbira svetlobo. S ciklizacijo končnih delov verige likopena nastane α -karoten in njegova izomera β -karoten, ki je prekurzor za sintezo z mikorizo povezanih karotenoidov; strigolaktonov, mikoradicina in cikloheksenonskih derivatov. S hidroksilacijo cikloheksenonskih obročev nastane iz α -karotena lutein, iz β -karotena pa zeaksantin (Strack in Fester 2006; Anh-Tuan in sod. 2011).

Katalizo C_{40} karotenoidnega prekurzorja vrši encim karotenoid-cepitvena-dioksidgenaza (CCD). Do sedaj še ni jasno, kateri karotenoid je substrat za encim CCD. Delovanje CCD je specifično, na vez med C9-10 (C9'-10') in vez med C11-12 (C11'-12'). S cepitvijo, metilacijo ter drugimi strukturnimi spremembami nastane iz molekule karotenoida C_{15} prekurzor 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 mikoradicin. 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 prekurzorja.

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 inhibirno 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).

Cikloheksenonski obroč β -karotena ostane po cepitvi intakten in predstavlja A obroč strigolaktona. Matusova in sodelavci (2005) so predvideli, da C_{15} aldehidnemu intermedijatu 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).

Posamezna rastlina verjetno vsebuje najmanj dva do pet različnih strigolaktonov (Rochange 2010). 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 prekurzor za biosintezo drugih, kompleksnejših molekul strigolaktonov, saj se pojavlja v eksudatu mnogih rastlin, tako enokalični (Awad in sod. 2006), kot dvokalični (Yoneyama in sod. 2008). 5-deoksi-strigol je bil dokazan tudi v mahu vrste *Physcomitrella patens* (Proust in sod. 2011).

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). V tleh je ta kemotaktični odziv pogojen z razdaljo, kar je možno povezati s podvrženostjo strigolaktonov razgradnji. V vodi enol-esterska vez med C in D obročem, ki predstavljata aktivno mesto molekule, 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).

Učinek strigolaktonov na hife AM gliv so testirali s pomočjo fluorescenčnega označevanja mitohondrijev hif kalečih spor. Besserer in sodelavci (2006) so opazili povečano gostoto mitohondrijev na enoto površine pri hifah AM glive *Gigaspora rosea* tretiranih z analogom strigolaktona GR24, glede na kontrolo. Mitohondrije so fluorescenčno označili na tri različne načine in ugotavljali gostoto po eni in po petih urah. V vseh primerih je bila gostota mitohondrijev tretiranih hif večja. Učinek strigolaktonov na AM glive so potrdili tudi s štetjem razvejitev in merjenjem dolžine hif. Besserer in sodelavci (2006) so hife AM glive *Gigaspora rosea* tretirali z analogom strigolaktona GR7. Razvejanje in rast tretiranih hif je bila ves čas trajanja poskusa močnejša kot pri kontroli. Ker so omenjene raziskave potekale le na eni vrsti AM gliv v *in vitro* razmerah, je potrebno preverjanje teh učinkov tudi na drugih vrstah gliv.

Pomen karotenoidne presnovne poti, iz katere izhajajo strigolaktoni, 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 fitoenu 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 koruze (*Zea mays*), 'pale yellow 9' (y9), z manjkajočimi geni za sintezo encimov karotenoidnih izomeraz, ki katalizirajo konverzijo ζ -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 (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, aminokislina 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).

Razmislek o možnem poteku dogodkov, povezanih z vzpostavitvijo arbuskularne mikorize, je sledeč. Rastlina proizvaja strigolaktone, katerih sinteza je, kot so pokazale nedavne transkriptomске raziskave, stimulirana ob pomanjkanju mineralnih hranil (Bonneau in sod. 2013). Izloča jih v rizosfero, kjer vplivajo na energetsko presnovo spor gliv na način, da pospešijo oksidacijo njihovih založnih lipidov. 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 organi, 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 sledih, močno pa poraste količina cikloheksenonskih derivatov – skupni prekurzor 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 inhibítorni.

Cikloheksenonski derivati in njihovi nadaljnji produkti zavirajo 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.

Vloga strigolaktonov pri uravnavanju rasti rastline

Spoznanje, da nekatere rastline, kot sta navadni repnjakovec (*Arabidopsis thaliana*) in beli volčji bob (*Lupinus albus*), proizvajajo in izločajo strigolaktone, kljub temu, da ne tvorijo arbuskularne mikorize, je postavljalo vprašanje, zakaj bi rastlina sintetizirala spojine, ki spodbujajo rast parazitskih rastlin in od katerih nima nobene potencialne koristi. Ali to pomeni, da strigolaktoni sodelujejo tudi pri procesih, ki se dogajajo v rastlini? Raziskave so pokazale, da so strigolaktoni udeleženi pri hormonalni regulaciji aktivacije in rasti stranskih poganjkov (Gomez-Roldan in sod. 2008; Umehara in sod. 2008; Xie in sod. 2010), ki je, kot kaže, mnogo bolj kompleksna, kot je bilo znano do sedaj. Poleg tega so kasneje ugotovili, da so strigolaktoni vpleteni tudi v regulacijo rasti korenin, elongacije koreninskih laskov, tvorbe adventivnih korenin, sekundarne rasti, fotomorfogeneze, kalitve in nodulacije (Foo in Reid 2013).

Mehanizem kontrole aktivacije stranskih brstov je že dolgo znan kot apikalna prevlada. Glavni poganjek proizvaja hormon avksin, ki potuje s polarnim transportom po stebelu navzdol, in preprečuje rast stranskih poganjkov. 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 hipoteze glede aktivnosti stranskih brstov. Hipoteza temelji na predpostavki, da obstaja molekula, ki vpliva na koncentracijo avksina, ki potuje s polarnim transportom po stebelu in preprečuje stranskemu brstu, da bi svoj lasten tok avksina priključil polarnemu transportu, zaradi česar je rast stranskega brsta zavirana. Hipotezi v prid govori odkritje hormona, ki ustreza delovanju omenjene molekule. Ta hormon je strigolakton (Domagalska in Leyser 2011).

Za aktivacijo brsta je nujna vzpostavitev odvodnega sistema za avksin iz brsta, kar je regulirano z intenziteto toka polarnega transporta avksina v stebelu. Polarni transport avksina, po parenhimu ksilema, nadzirajo PIN proteini (Petrášek in sod. 2006). Povečan tok avksina je bilo opaziti pri 'more axillary growth' (MAX) mutantih navadnega

repnjakovca (*Arabidopsis thaliana*), z okvarjenimi geni za sintezo strigolaktonov, kar je povzročilo močnejše stransko obraščanje in s tem večjo koncentracijo avksina v glavnem stebelu. Pri teh mutanthih je bilo opaziti tudi povečanje količine PIN proteinov (Bennett in sod. 2006). Ta izid je bil glede na prejšnji koncept apikalne prevlade nepričakovan in nakazuje na vlogo strigolaktonov pri uravnavanju stranskega obraščanja, saj zaradi povečane koncentracije avksina sicer ne bi smelo priti do stranskega obraščanja.

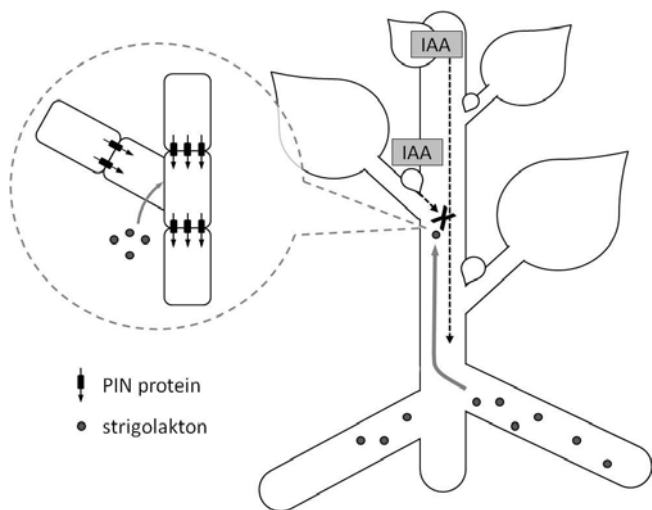
Strigolaktoni se sintetizirajo v koreninah in v poganjkih in potujejo akropetalno, najverjetneje po parenhimu ksilema. Vlogo strigolaktonov pri stranskem obraščanju so poskušale razjasniti številne raziskave, na podlagi poskusov s cepljenjem. Uporabljale se je MAX mutante različnih rastlin. V osnovi sta dva tipa MAX mutantov. MAX2 mutanti lahko proizvajajo strigolaktone, vendar so okvarjeni v signalni poti, odvisni od strigolaktonov. MAX1, MAX3 in MAX4 mutanti pa imajo okvarjene gene za sintezo strigolaktonov, zato strigolaktonov ne proizvajajo. Natančneje, gre za okvaro genov za encim karotenoid-cepivtenadioksigenaza (CCD), ki vrši katalizo C₄₀ karotenoidnega prekursorja, posledično izostane sinteza strigolaktonov. Rastline, cepljene na korenine divjega tipa ali pa MAX2 mutanta, ki niso imele okvarjenih genov za signalizacijo s strigolaktoni, se niso obraščale, ker se je strigolakton transportiral iz korenin v nadzemni del in preprečeval obraščanje. MAX2 mutanti so se obrasli v vsakem primeru, ker kljub prisotnosti strigolaktonov v koreninah, le-teh niso mogli transportirati v nadzemni del. MAX1, MAX3 in MAX4 mutanti pa so se obrasli v primeru, ko so bili cepljeni na korenine, ki niso proizvajale strigolaktonov. Rastline divjega tipa cepljene na podlago, ki ni proizvajala strigolaktonov se niso obrasle, kar lahko pomeni, da se strigolaktoni proizvajajo tudi v nadzemnem delu rastline (Domagalska in Leyser 2011).

Za razumevanje mehanizma delovanja strigolaktonov pri stranskem obraščanju je bilo potrebno natančneje opredeliti mehanizem delovanja avksina. Ta mehanizem so poskušali 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. Posledično nastane sloj celic z relativno visoko koncentracijo avksina, ki se odvaja od vira k ponoru. Celice se kasneje diferencirajo v sistem žile (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 prevlade. 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. 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, viša koncentracijo 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).

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



Slika 3: Strigolaktoni sodelujejo pri kontroli stranskega obraščanja oz. pri apikalni prevladi (za razlago glej besedilo!).

Figure 3: Strigolactones participate in the regulation of lateral growth and apical dominance (see text for explanation!).

transporta avksina iz brstov in povečujejo kompeticijo med brsti (Prusinkiewicz in sod. 2009; Crawford in sod. 2010). Na spodnji del stebela, z dvema stranskima brstoma, nanešen strigolaktolon povzroči prevlado enega brsta nad drugim, kar pomeni, da strigolaktolon 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 strigolaktolona na bazalni del stebela ne prepreči aktivacije tega brsta. Če pa se na bazalni del stebela brez glavnega brsta, z dvema stranskima brstoma, nanese strigolaktolon, na mesto glavnega brsta pa avksin, je inhibični učinek avksina ojačan z inhibičnim učinkom strigolaktolona, zato stranska brsta ne odženet (Domagalska in Leyser 2011).

Strigolaktoni torej dopolnjujejo regulacijo stranskega obraščanja z avksinom. Kadar je koncentracija strigolaktolona 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 strigolaktolonov 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 strigolaktolonov, pa bo preprečila aktivacijo ostalih brstov (Slika 3).

Sklepi

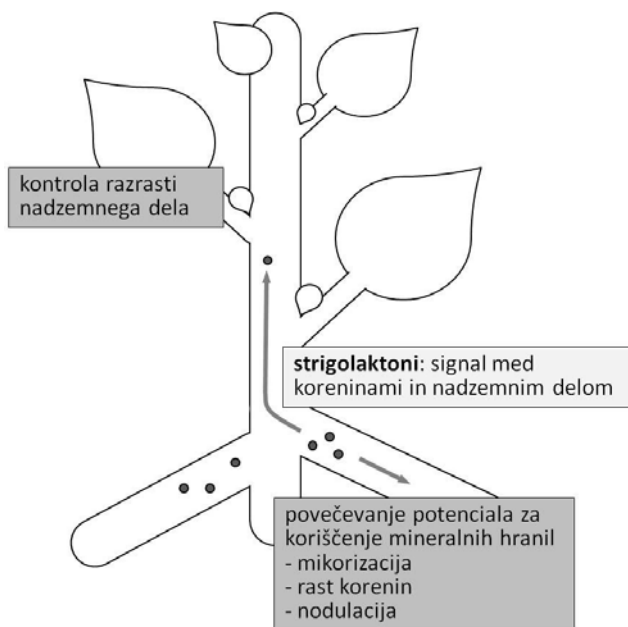
Strigolaktoni vplivajo na vzpostavitev mikorize. Vplivajo tudi na razrast poganjkov. Ista skupina molekul kontrolira dva procesa, ki močno vplivata na razvoj rastline ter njeno sposobnost kljubovanja razmeram v okolju in ki sta na prvi pogled popolnoma neodvisna drug od drugega. Kakšna je torej možna povezava med tema procesoma? Znano je, da pomanjkanje hranil v tleh vpliva na razmerje

med nadzemnim delom rastline in koreninami. Zato bi lahko bila razlaga »dvojnega delovanja« strigolaktolonov naslednja: pomanjkanje fosforja v tleh povzroči povečano tvorbo strigolaktolonov v rastlini. Strigolaktoni potujejo navzgor po rastlini in omejujejo razraščanje. Zaradi povečane koncentracije v koreninah, začnejo strigolaktoni 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 pridobi simbiotskega partnerja, ki ji priskrbi nove zaloge fosfata. Zaradi povečane količine fosforja se zmanjša sinteza strigolaktolonov. Njihova koncentracija v koreninah upade, posledično se zmanjša transport v nadzemni del. Zmanjšana represija PIN proteinov zaradi manjše koncentracije strigolaktolonov omogoči stranskim brstom vzpostavitev lastnega polarnega toka avksina in njihovo aktivacijo.

Ob tem pa se postavlja še eno vprašanje. Strigolaktoni preprečujejo vgradnjo PIN proteinov v membrano in s tem zavirajo tok avksina iz brsta ter preprečujejo njegovo aktivacijo. Ali to pomeni, da lahko z oviranjem toka avksina iz apikalnega meristema v glavnem brstu, upočasnjujejo njegovo rast? To bi pomenilo, da so strigolaktoni obveščevalne molekule, ki jih podzemni del pošilja

nadzemnemu, da ga obvešča o stanju fosforja v tleh ter posledično o možnosti izgrajevanja novih celičnih struktur in energijskih molekul, torej o možnosti nadaljnje rasti (Slika 4, glej tudi Foo in Reid 2013).

Strigolaktoni so le eden od mnogih primerov kompleksnosti procesov živega sveta. Po skoraj stoletje veljavnem prepričanju, da razrast poganjkov uravnava izključno avksin, je danes jasno, da proces še zdaleč ni tako preprost, in da je morda povezan tudi z drugimi, nadceličnimi nivoji regulacije, kot so mikoriza in tudi ostale ekološke funkcije ekosistema. Regulacija mikorize in rasto-razvojnih procesov rastline s pomočjo strigolaktinov obstaja že milijone let in vprašanje je, kakšne interakcije v tej zvezi so se še razvile v milijonih let zemeljske evolucije.



Slika 4: Strigolaktini uravnavajo rast nadzemnega dela in korenin glede na razpoložljivost mineralnih hranil.

Figure 4: Strigolactones regulate the growth of shoots and roots with respects to availability of mineral nutrients.

Summary

Strigolactones are metabolites ubiquitously present in higher plants. They derive from a carotenoid-based pathway. Their basic structural unit is a tricyclic lactone that is connected to a butyrolactone by an enol ester bridge.

Strigolactones have been first identified as germination stimulants for root parasitic weeds, such as witchweeds (*Striga* spp.) and broomrapes (*Orobancha* spp.). The ability of non-host plants to germinate parasitic plant seeds suggested strigolactones may exist and may have role(s) that are independent of host-parasite interactions. The first evidence for this came from the studies of mycorrhiza, symbiosis between plants and fungi. During initial stages of formation of arbuscular mycorrhiza (AM) – a type of mycorrhiza which can be found in > 80% of land plants – strigolactone, 5-deoxy-strigol, is required as a branching factor to help arbuscular mycorrhizal fungi to interact with plant roots (Akyama et al. 2005). It was also found that at later stages of infection

there are other compounds of the carotenoid-based pathway involved in the control development of arbuscules, intraradical structures of AM.

Further studies were motivated since it was known that strigolactones are produced also by non-mycorrhizal plants. These studies revealed that strigolactones participate in regulation of several plant developmental processes. In less than five years, roles for strigolactones have been defined in shoot branching, secondary growth, root growth and nodulation. Great progress has been made in understanding the mechanisms of shoot branching control, where it has been shown that endogenous strigolactones suppress development of axillary buds. It is known that these buds must export auxin to be activated, and they compete for the common auxin transport pathway through the main stem to the root. Strigolactones act systemically to dampen polar auxin transport stream from the buds to the stem reducing the accumulation of auxin transporters (PIN1) on cell membranes. This enhances competition between buds for the

common auxin sink in the stem (Domagalska and Leyser 2011).

Strigolactones are fascinating as signaling molecules as they can act both inside the plant as an endogenous hormone and in the soil as a rhizosphere signal (Foo et al. 2011). Being involved in regulation of the processes related to the acquisition of mineral nutrients and in the control of the growth of above ground plant parts, they could

be regarded as integrators of the root-to-shoot balance and resource allocation.

Posvetilo

Avtorja članek posvečata nedavno preminuli zaslužni profesorici dr. Nadi Gogala, mentorici in začetnici raziskav mikorize v Sloveniji.

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 *Orobanche*, 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.
- Bonneau, L., Huguet, S., Wipf, D., Pauly, N., Truong, H. N. 2013. Combined phosphate and nitrogen limitation generates a nutrient stress transcriptome favorable for arbuscular mycorrhizal symbiosis in *Medicago truncatula*. *New Phytologist*, 199, 188–202.
- 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.
- Foo, E., Reid, J. B., 2013. Strigolactones: New Physiological Roles for an Ancient Signal. *Journal of Plant Growth Regulation*, 32, 429–442.
- Gogala, N., 1991. Regulation of mycorrhizal infection by hormonal factors produced by hosts and fungi. *Experientia*, 47, 331–340.
- 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 *Orobanchae* 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.
- Petrášek, J., Mravec, J., Bouchard, R., Blakeslee, J. J., Abas, M., Seifertová, D., Wiśniewska, J., Tadele, Z., Kubeš, M., Čovanová, M., Dhonukshe, P., Skůpa, P., Benková, E., Perry, L., Křeček P., Lee, O. R., Fink, G. R., Geisler, M., Murphy, A. S., Luschnig, C., Zažímalová, E., Friml, J. 2006. PIN Proteins Perform a Rate-Limiting Function in Cellular Auxin Efflux. *Science*, 312, 914–918.
- Proust, H., Hoffmann, B., Xie, X., Yoneyama, K., 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.
- 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. Sinauer Associates, Massachusetts, 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., Takeda-Kamiya, N., Magome, H., Kamiya, Y., Shirasu, K., Yoneyama, K., Kyojuka, J., Yamaguchi, S., 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., Akiyama, K., Hayashi, H., Yoneyama, K., 2008. Strigolactones, host recognition signals for root parasitic plants and arbuscular mycorrhizal fungi, from *Fabaceae* plants. *New Phytologist*, 179, 484–494.