

**Univerzita Karlova v Praze**

**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie



Jaromír Hamet

**Genové manipulace trehalosového metabolismu a zvyšování  
odolnosti rostlin k abiotickým stresům**

**Trehalose metabolism gene manipulations and improving plant  
abiotic stress tolerance**

Bakalářská práce

Vedoucí práce: Doc. RNDr. Helena Lipavská, Ph.D.

Praha, 2014

**Poděkování:**

Rád bych poděkoval mé školitelce Doc. RNDr. Heleně Lipavské, PhD. i konzultantce RNDr. Haně Konrádové, PhD. za cenné rady, věcné připomínky, odborný dohled a zejména vstřícnost a ochotu, kterou mi v průběhu zpracování bakalářské práce věnovaly.

**Prohlášení:**

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

V Praze, dne 14. května 2014

.....

podpis studenta

## **Abstrakt**

Genetické modifikace zemědělských plodin jsou v dnešní době již běžně využívány v boji proti škůdcům a plevelům. Čím dál tím častěji se také objevují snahy využít genetické modifikace i ke zvýšení odolnosti k abiotickým stresům, které celosvětově ovlivňují výnosy mnohem více než stresy biotické. Jednou z intenzivně studovaných možností jak zvýšení stresové tolerance dosáhnout, je manipulace s trehalosovým metabolismem. Tato práce shrnuje dosavadní poznatky o ochranných účincích trehalosy v buňkách a zabývá se přirozenou signální funkcí trehalosy a meziprojektu její syntézy trehalosa-6-fosfátu u rostlin. Dále popisuje již dosažené úspěchy při zvyšování odolnosti rostlin k abiotickým stresům pomocí genetických zásahů do trehalosového metabolismu, ale i doprovodné problémy. V závěru je pak zhodnocen potenciál využití této metody do budoucna.

**Klíčová slova:** genetické modifikace, trehalosa, trehalosa-6-fosfát, abiotický stres, stresová odolnost

## **Abstract**

In these days, genetic modifications of crops are commonly used in the fight against pests and weeds. More and more often there are also efforts to use genetic modifications to increase tolerance to abiotic stresses that affect worldwide yields much more than biotic ones. Manipulation of trehalose metabolism represents one of the frequently studied options of abiotic stress tolerance enhancement. This work summarizes current knowledge on the protective effects of trehalose in cells and describes signaling functions of trehalose and its metabolic intermediate trehalose-6-phosphate in plants. It also describes current achievements in increasing abiotic stress tolerance through genetic modifications of trehalose metabolism together with accompanying problems. Finally, the potential of this method for future exploitation is discussed.

**Key Words:** genetic modification, trehalose, trehalose-6-phosphate, abiotic stress, stress tolerance

## **Seznam zkratek:**

**6-SFT** - sacharosa:fruktan-6-fruktosyltransferasa

**ADP** - adenosindifosfát

**ApL3** - gen kódující velkou podjednotku ADP-glukosapyrofosforylasy

**ATP** - adenosintrifosfát

**bZIP11 (ATB2)** – (basic leucine zipper 11) transkripční faktor z rodiny bZIP

**CaMV35S** - (cauliflower mosaic virus 35S) promotor z viru květákové mozaiky

**DPPC** - dipalmitoylfosfatyldylcholin

**F26BP** - fruktosa-2,6-bisfosfát

**F6P** - fruktosa-6-fosfát

**G1P** - glukosa-1-fosfát

**G6P** - glukosa-6-fosfát

**KIN10/KIN11** - katalytické podjednotky SnRK1

**otsA** - (osmoregulatory trehalose synthesis A ) gen kódující TPS u *Escherichia coli*

**otsB** - (osmoregulatory trehalose synthesis B ) gen kódující TPP u *Escherichia coli*

**rd29A** – (responsive to dehydration 29A) suchem indukovaný promotor z *Arabidopsis thaliana*

**ROS** - (reactive oxygen species) reaktivní formy kyslíku

**RuBisCO** - ribulosa-1,5-bisfosfát-karboxylasa/oxygenasa

**SNK1** – (sucrose non-fermenting kinase 1) serin/threoninová kinasa z kvasinek

**SnRK1** – (sucrose non-fermenting related kinase 1) rostlinná kinasa homologní k SNK1

**StDS2** - (*Solanum tuberosum* Drought Specific 2) promotor z bramboru s předpokládanou suchem indukovanou expresí

**T6P**- trehalosa-6-fosfát

**TaMYB13-1** - jeden z genů kódujících transkripční faktor z rodiny MYB u pšenice

**TPH** - trehalosafosfáthydrolasa

**TPP** - trehalosa-6-fosfátfosfathasa

**TPS** - trehalosa-6-fosfátsynthasa

**TPSP** - trehalosa-6-fosfátsynthasa/fosfathasa

**TRE1** - gen kódující enzym trehalasu

**Ubi1** - ubiquitinový promotor z kukuřice

**UDP** - uridindifosfát

**WT** - wild type

## Obsah

1. Úvod.....	1
2. Ochranné funkce kompatibilních solutů.....	3
3. Trehalosa .....	4
3.1. Ochrana membrán a proteinů.....	4
3.2. Výskyt a syntéza trehalosy u rostlin .....	6
3.3. Signální funkce trehalosové dráhy.....	8
3.3.1. Vliv trehalosy na sacharidový metabolismus.....	8
3.3.2. Trehalosa-6-fosfát jako klíčová signální molekula.....	9
3.3.3. Interakce s jinými signálními drahami.....	11
4. Zvyšování odolnosti rostlin modulací trehalosového metabolismu .....	16
4.1. Zvýšení syntézy trehalosa-6-fosfátu .....	16
4.2. Ovlivnění rovnováhy intermediátů trehalosové dráhy .....	18
5. Závěr.....	19
6. Seznam použité literatury .....	22

# 1. Úvod

Abiotické stresy jako je sucho, zasolení, extrémní teploty, ale i nedostatečná minerální výživa nebo naopak přítomnost toxických látek, způsobují morfologické, fyziologické, biochemické a molekulární změny, které ve výsledku omezují růst, vývoj a produktivitu rostlin (Wang et al. 2003). Zásadní význam pro člověka mají tato omezení u hospodářsky významných plodin. Špatné fyzikální a chemické podmínky prostředí snižují průměrné výnosy těchto plodin často až o více než 50 % (Boyer 1982). Podle průměrných odhadů Organizace spojených národů dosáhne světová populace do roku 2025 počtu 8,1 miliardy, a do roku 2050 pak 9,6 miliardy (United Nations 2013). Pro zajištění výživy obyvatelstva bude tedy nezbytné zvýšit produkci potravin. Vzhledem k současným klimatickým změnám, které způsobují značné výkyvy v teplotách i srážkových úhrnech na mnoha územích, je zajištění potravinových zdrojů již dnes velmi obtížné. Problém se týká nejvíce rozvojových zemí v jižní Asii a subsaharské Africe, kde je očekáván největší nárůst populace do budoucna. Je navíc pravděpodobné, že klimatické změny budou pokračovat i nadále (Kirtman et al. 2013) a rozšiřování suchých a zavlažováním zasolených území snižší množství využitelné zemědělské půdy. I samo zavlažování suchých oblastí může způsobit velké ekologické škody na okolních ekosystémech, jako tomu bylo například u dobře známého případu Aralského jezera. Pokud bychom jako možné řešení problému vyloučili zabírání posledních přirozených ekosystémů pro hospodářské využití, nabízí se jako další možnost intenzifikace zemědělství v oblastech, které již hospodářsky využívány jsou a mají k tomu vhodné podmínky. Podle některých předpovědí vzroste v důsledku této intenzifikace spotřeba minerálních hnojiv do roku 2050 více než dvojnásobně, což může vést k nezvratným škodám na životním prostředí (Tilman et al. 2001). Problémem je nejen eutrofizace přirozených ekosystémů, ale i velká spotřeba energie a vyprodukované emise spojené s výrobou hnojiv.

Velmi účinným a ekologicky přijatelným řešením prohlubujícího se problému lokálního nedostatku potravin by bylo zvýšit efektivitu, s jakou by rostliny dokázaly využívat současně dostupné zdroje. Tento postup je samozřejmě již dlouhou dobu využíván v klasickém šlechtění nových odrůd, které dokáží efektivněji využívat dostupné živiny, lépe hospodaří s vodou a i při zhoršených abiotických podmínkách udržují fotosyntézu na úrovni dostačující k produkci požadovaných výnosů. Klasické šlechtění nicméně naráží na určité bariéry, jako je například vazba genů nebo absence požadovaného genu v genofondu populace konkrétní rostliny. Tyto bariéry často zabraňují dalšímu vylepšování rostlin. Mohou být ovšem

překonány pomocí genetických modifikací, které umožňují přenos jakéhokoliv známého genu mezi libovolnými organismy. Tento postup je již velmi úspěšně využíván při vnášení genů pro rezistenci k herbicidům či škůdcům. Při zvyšování odolnosti k abiotickým stresům je největším problémem komplexnost mechanismů, které si rostliny i jiné organismy během svého vývoje za tímto účelem vyvinuly. Konkrétně u rostlin se velmi často setkáváme s morfologickými, anatomickými a fyziologickými adaptacemi, které jim umožňují přežít a růst i v extrémních podmínkách. Genetická podstata takovýchto adaptací je ovšem založena na aktivitě obrovského množství genů a často není ani dostatečně prozkoumána. Proto zatím nejsme schopni tyto vlastnosti přenášet mezi rostlinnými druhy. Existují ovšem i obranné mechanismy, které jsou zajišťovány pouze jedním nebo několika málo genovými produkty. Mezi ně patří například syntéza kompatibilních solutů (Yancey et al. 1982). Ty pomáhají rostlinám bojovat s osmotickým stresem, který je důsledkem většiny hlavních abiotických stresů, a mohly by tedy najít široké uplatnění při tvorbě nových, odolnějších transgenních linií zemědělských plodin. Mezi známými kompatibilními soluty se jako velmi vhodná pro tento účel jeví trehalosa, která díky svým unikátním vlastnostem umožňuje některým organismům včetně několika druhů rostlin přežít i úplnou dehydrataci (Elbein et al. 2003). S přibývajícimi informacemi začalo být ovšem zřejmé, že trehalosa a zvláště pak meziproduct její syntézy, trehalosa-6-fosfát, ovlivňují metabolické a signální dráhy u rostlin a že využití trehalosy ke zvýšení odolnosti k abiotickým stresům je podmíněno hlubším porozuměním této interakci.

## 2. Ochranné funkce kompatibilních solutů

Kompatibilní soluty jsou malé, organické, elektricky neutrální molekuly, které jsou netoxické i při vyšších koncentracích. Pomáhají zachovávat integritu buňky při osmotických výkyvech (Yancey et al. 1982).

Lze je rozdělit do tří skupin (Rontein et al. 2002):

- 1) betainy (trimethylamoniové deriváty aminokyselin) a příbuzné sloučeniny jako dimethylsulfopropionát a cholin-O-sulfát
- 2) některé aminokyseliny (např. prolin a ectoin)
- 3) neredukující cukry a cukerné alkoholy

Primární funkcí kompatibilních solutů je úprava vodního potenciálu v buňce při změnách osmotických poměrů okolního prostředí (tzv. osmotické přizpůsobení), což je nezbytné pro zadržení potřebného množství vody v buňce, a tím i udržování turgoru. Zvláště důležitý je tento mechanismus u organismů vystavovaných osmotickým výkyvům při zvýšené salinitě, vysychání, ale i při zamrzání (pokud část vody zmrzne v krystalech, rozpuštěné látky se zkoncentrují ve zbylé kapalině). Na udržování vodního potenciálu nemohou organismy efektivně využívat anorganické ionty, protože ty při změnách koncentrací ovlivňují metabolické funkce (snižují katalytickou účinnost enzymů a narušují membránový potenciál). Existence enzymů, které by fungovaly se stejnou efektivitou při výrazně odlišných koncentracích anorganických iontů, je velmi nepravděpodobná. Kompatibilní soluty naproti tomu nesnižují účinnost enzymů a nenarušují membránový potenciál ani při měnících se koncentracích. (Yancey et al. 1982)

Kompatibilní soluty mají další vlastnosti, díky kterým se podílejí na ochraně buněčných struktur před osmotickým stresem. Nejdůležitější z nich je stabilizace proteinů a membrán. Mechanismus, kterým je tato stabilizace vysvětlována, vychází z modelu preferenčního vylučování z hydratačního obalu (Timasheff 2002). Hydratační obal kolem proteinů není pevný a stálý, ale je tvořen fluktuujícími molekulami vody a ostatních látek v roztoku. V kontaktu s okolním prostředím je celý povrch proteinu a jeho jednotlivé části interagují s okolními molekulami přitažlivými nebo odpudivými interakcemi různé síly. Molekuly interagující s proteinem silně přitažlivými interakcemi (mající vysokou afinitu k proteinu) jsou s ním asociovány po většinu času, zatímco molekuly s nižší afinitou více fluktuují. Kompatibilní soluty mají ve srovnání s vodou nižší afinitu k proteinům. Jejich výskyt



v hydratačním obalu je tedy termodynamicky znevýhodněn a protein interaguje přednostně s vodou. I tak ale kompatibilní soluty v určité míře s proteinem interagují. Při denaturaci proteinu se zvětšuje jeho povrch, a tím i počet nutných interakcí s kompatibilními soluty, které jsou termodynamicky nevýhodné. Důsledkem je termodynamické znevýhodnění celé denaturace proteinu, a tím i zvýšení jeho stability. Částice s vyšší afinitou k proteinům, jako jsou anorganické ionty, mají opačný efekt, a proteiny tedy naopak destabilizují. Bylo prokázáno, že přednostní vylučování osmolytů z hydratačního obalu chrání strukturu proteinu i proti denaturaci zvýšenými teplotami (Arakawa & Timasheff 1985).

U několika kompatibilních solutů bylo prokázáno, že se uplatňují i jako zhášeci volných kyslíkových radikálů (ROS). Potvrzena byla tato vlastnost například u sorbitolu, manitolu, myo-inositolu a prolinu, ovšem například glycinbetain tuto vlastnost neprokázal (Smirnov & Cumbes 1989). Velkou výhodou je, že žádný z ochranných efektů osmolytů není druhově specifický, a fungují tedy univerzálně ve všech organismech. Díky tomu je možné využívat transgenní přenos mezi nepříbuznými organismy při zachování účinků osmolytu (Rontein et al. 2002).

### **3. Trehalosa**

Trehalosa, systematickým názvem  $\alpha$ -D-glukopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 1)- $\alpha$ -D-glukopyranosid, je neredukující disacharid složený ze dvou molekul glukosy. Ve srovnání s většinou ostatních sacharidů je fyzikálně stabilnější v širokém rozmezí teplot a pH. Odolává také kyselá hydrolyze i štěpení  $\alpha$ -glukosidasou (Richards et al. 2002).

#### **3.1. Ochrana membrán a proteinů**

U trehalosy byly kromě ochranných mechanismů společných všem osmolytům nalezeny ještě jiné stabilizační funkce uplatňující se při dalším snižování obsahu vody v buňce. Při dehydrataci stabilizuje fosfolipidovou dvouvrstvu biomembrány. Snižuje její teplotu tání, čímž udržuje fluiditu i při nižších teplotách (Crowe et al. 1984). Pro pokusy zkoumající vlastnosti membrán je často jako model využívána umělá fosfolipidová jednovrstva, vytvořená z dipalmitoylfosfatydlcholinu (DPPC), který je jedním z hlavních komponentů biologických membrán (Kraeva et al. 2001). Při vysoké koncentraci (3,1 molu trehalosy na mol DPPC) byla teplota tání membrány dokonce nižší než u hydratovaného DPPC. Podobný

efekt byl zaznamenán i po přidání glycerolu, ten ovšem nechránil membránu před poškozením při vysoušení. Nejpravděpodobnějším vysvětlením bylo, že glycerol fungoval pouze jako interkalační činidlo a snižoval van der Waalsovy síly mezi molekulami DPPC. Naproti tomu trehalosa tvořila vodíkové vazby mezi svými OH skupinami a fosfátovými skupinami DPPC, a tím nahrazovala funkci vody v membráně (Crowe et al. 1984).

Podobné stabilizační účinky byly v přítomnosti trehalosy zaznamenány i při dehydrataci proteinů. Ve vodném roztoku zabraňuje voda molekulám trehalosy ve vzájemné interakci tím, že s nimi sama tvoří vodíkové vazby. Podobně interaguje voda s povrchem proteinů a tvoří tak jejich hydratační obal. Při dehydrataci má hlavní negativní vliv na proteiny právě odstranění hydratačního obalu, které může u labilnějších proteinů vést k nevratnému poškození. Při dehydrataci proteinů za přítomnosti vysoké koncentrace trehalosy dochází ke vzniku vodíkových vazeb mezi trehalosou a polárními skupinami proteinů, čímž je alespoň do určité míry zajištěna potřeba těchto vazeb pro udržení funkční proteinové struktury (Carpenter & Crowe 1989). U kvasinek (*Saccharomyces cerevisiae*) bylo popsáno, že trehalosa při zvýšení teploty také pomáhá udržovat již denaturované proteiny ve stavu, umožňujícím jejich reaktivaci. Zabraňuje jejich agregaci, což usnadňuje resolubilizaci pomocí heat shock proteinů (HSP). Tato funkce trehalosy se uplatňuje zejména, pokud jsou hlavní reparační mechanismy zprostředkovávané HSP přehlcené. Efektivita samotné reaktivace je na druhou stranu přítomností trehalosy omezena. To je pravděpodobně důvod, proč kvasinky snižují obsah trehalosy okamžitě po odeznění stresových podmínek (Singer & Lindquist 1998).

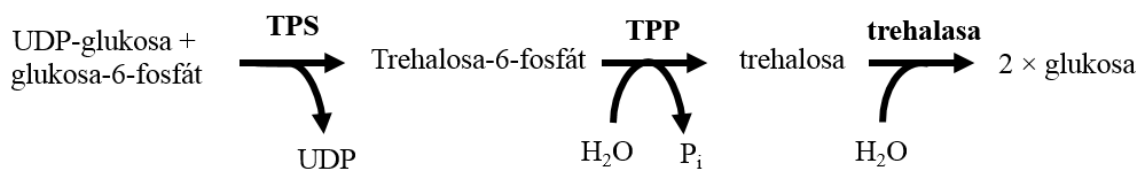
Později byla vyslovena hypotéza dalšího ochranného účinku trehalosy. Při snižování obsahu vody trehalosa namísto krystalizace tuhne a přechází do amorfního stavu, označovaného jako sklo (Crowe & Crowe 2000). Tato amorfní hmota obalující proteiny napomáhá jejich stabilizaci a výrazným zvýšením viskozity omezuje interakce s ostatními látkami v blízkosti proteinu (Ma et al. 2013). Schopnost vytvářet sklo mají i další sacharidy, nicméně trehalosa ve srovnání s nimi zůstává v amorfním stavu i při mnohem vyšších teplotách a při extrémním vysoušení (Crowe & Crowe 2000). Součástí hypotézy je i předpoklad, že pokud by trehalosa přešla do krystalického stavu, byl by její ochranný účinek velmi snížen nebo dokonce ztracen (Ma et al. 2013). Díky výše zmíněným vlastnostem lze také trehalosu ve vysoké koncentraci použít jako velmi efektivní kryoprotektant při kryoprezervaci (Bhandal et al. 1985).

Nebylo zjištěno, že by trehalosa sama o sobě byla zhášedčem ROS (Ma et al. 2013), jako je tomu u některých jiných sacharidů, například sacharosy, maltosy, fruktosy nebo glukosy

(Morelli et al. 2003). Zvyšuje ale aktivitu glutathionreduktasy a množství redukováného askorbátu, čímž velmi napomáhá odstraňování kyslíkových radikálů. Mechanismus, kterým trehalosa zprostředkovává tuto ochrannou funkci, ovšem zatím nebyl popsán (Ma et al. 2013).

### 3.2. Výskyt a syntéza trehalosy u rostlin

Mezi živými organismy je trehalosa poměrně rozšířenou látkou. Vyskytuje se u bakterií, hub, bezobratlých živočichů i rostlin. Nejčastěji je syntetizována z UDP-glukosy a glukosa-6-fosfátu, ze kterých za pomoci enzymu trehalosa-6-fosfátsynthasy (TPS) vznikne trehalosa-6-fosfát (T6P) a UDP. T6P je poté pomocí trehalosa-fosfátfosfatasy (TPP) defosforylován na trehalosu (obrázek 1). U některých bezobratlých živočichů a hub je trehalosa ukládána a využívána jako zdroj uhlíku a energie. Její akumulace je také spojena se stavem anhydrobiosy, tedy přežívání organismů v dehydratovaném stavu, při kterém funguje jako osmoprotektant. (Elbein et al. 2003)



**Obrázek 1:** Nejčastější metabolická dráha trehalosy. Upraveno podle Wingler 2002

Akumulace trehalosy byla potvrzena i v poikilohydrických rostlinách *Selaginella lepidophylla*, kde může při dehydrataci tvořit až 10 % hmotnosti sušiny, a *Myrothamnus flabellifolia*, kde obsah trehalosy v prýtech dosahoval až 3 % hmotnosti sušiny (Müller et al. 1995). U většiny krytosemenných rostlin nebyla dlouhou dobu trehalosa detekována, a proto u nich nebyla předpokládána ani schopnost její syntézy. Ovšem při pokusu s rostlinami tabáku (*Nicotiana tabacum*) bylo zjištěno, že po přidání validamycinu A je v pletivech rostlin detekovatelné malé množství trehalosy. Validamycin A působí jako inhibitor enzymu trehalasy, který hydrolyzuje trehalosu. Na základě těchto výsledků autoři vyslovili hypotézu, že schopnost syntetizovat trehalosu je mezi krytosemennými rostlinami široce rozšířena, ale zároveň většina rostlin tvoří trehalasu, která udržuje množství trehalosy na velmi nízké úrovni, a proto je obtížné ji v rostlinách detekovat (Goddijn et al. 1997). Později byl u *Arabidopsis thaliana* potvrzen gen *AtTPS1*, kódující funkční trehalosa-6-fosfátsynthasu (*AtTPS1*), který je v malém množství konstitutivně exprimován ve všech částech rostliny

(Blázquez et al. 1998). Tato rostlinná TPS má ale mnohem nižší katalytickou účinnost než například TPS z kvasinek *Saccharomyces cerevisiae* (van Dijck et al. 2002). To je pravděpodobně alespoň zčásti způsobeno pro rostliny specifickou N-koncovou oblastí enzymu, při jejímž odstranění se zvýšila katalytická účinnost TPS až desetinásobně (stále však nedosahovala stejné účinnosti jako kvasinková TPS). N-koncová oblast tedy nejspíše funguje jako inhibiční doména a reguluje syntasovou aktivitu (van Dijck et al. 2002). Snížená aktivita rostlinné TPS je, vedle působení trehalasy, další příčinou velmi nízkého obsahu trehalosy v rostlinách. U *Arabidopsis thaliana* byly také nalezeny geny *AtTPPA* a *AtTPPB*, oba kódující funkční trehalosa-6-fosfátfosfatasu (TPP), které jsou exprimovány hlavně v mladých vyvíjejících se rostlinách a ve vyvíjejících se květech (Vogel et al. 1998). Se zdokonalováním detekčních metod byl u několika rostlin přímo potvrzen i obsah trehalosy v pletivech. S použitím plynové chromatografie a hmotnostní spektrometrie byla její přítomnost zjištěna například v axenicky pěstovaných rostlinách *Arabidopsis thaliana* (Vogel et al. 2001) nebo i v hlízách bramboru (*Solanum tuberosum*) (Roessner et al. 2000).

S rozvojem sekvenování byla u *Arabidopsis thaliana* nalezena celá rodina genů (*AtTPSI-11*) homologních ke kvasinkovým genům *ScTPS1* a *ScTPS2* kódujícím enzymy pro syntézu trehalosy (Leyman et al. 2001). Komplementační analýzou s kvasinkovými mutanty defektními v genech *TPS1* a *TPS2* bylo zjištěno, že proteiny kódované geny *AtTPS6* a *AtTPS11* z *Arabidopsis thaliana* mají syntasovou i fosfatasovou aktivitu a jsou schopné syntetizovat trehalosu (Chary et al. 2008; Singh et al. 2011). Tyto výsledky nicméně vyžadují další přezkoumání, protože například Ramon et al. (2009) při podobné studii s těmito geny syntasovou ani fosfatasovou aktivitu neprokázali. Podobné výsledky jako u *Arabidopsis thaliana* přinesla i analýza genové rodiny *OsTPS* u rýže (*Oryza sativa*), kde bylo nalezeno 11 *OsTPS* genů a 9 *OsTPP* genů (Zang et al. 2011). Ovšem zde komplementační analýza ukázala, že pouze gen *OsTPS1* kódoval protein se syntasovou aktivitou a gen *OsTPP1* protein s fosfatasovou aktivitou. U proteinů kódovaných geny *OsTPS5* a *OsTPS8* bylo navíc prokázáno, že interagují s proteinem *OsTPS1* za vzniku komplexu. To naznačuje, že mohou fungovat jako regulační podjednotky. Obdobně je regulační funkce předpokládána i u zbylých proteinů z rodiny *OsTPS*, které postrádají enzymatickou aktivitu v metabolismu trehalosy (Zang et al. 2011).

### 3.3. Signální funkce trehalosové dráhy

Přítomnost velkého množství homologních enzymů trehalosového metabolismu ukazuje spíše na důležitost trehalosové dráhy jako regulačního mechanismu v sacharidovém metabolismu a v expresi genů stresové odpovědi než na důležitost samotné trehalosy. Podporuje to i fakt, že trehalosa se zjevně u většiny rostlin neakumuluje ve vyšším množství. Předpokladem je, že rostliny si vyvinuly specifické TPS a TPP enzymy, protože představují nejúčinnější způsob, jak přesně regulovat hladinu T6P, který je silnou regulační molekulou (Leyman et al. 2001). Naproti tomu trehalasa je často kódována jen jedním genem, jako například u sóji (*Glycine max*) kde byl pro trehalasu nalezen pouze gen (*GmTRE1*) bez dalších homologů (Aeschbacher et al. 1999). Toto zjištění vedlo k vyslovení myšlenky, že odbourávání trehalosy je důležité hlavně proto, aby její akumulace neovlivňovala hladinu T6P, a samotná trehalosa pak slouží pouze jako rychlý zdroj glukosy (Leyman et al. 2001). Jiné práce ovšem ukazují, že i trehalosa má velmi pravděpodobně signální funkci (Müller et al. 1998; Müller et al. 2000; Wingler et al. 2000).

#### 3.3.1. Vliv trehalosy na sacharidový metabolismus

Při externím dodávání trehalosy sterilně pěstovaným rostlinkám sóji (*Glycine max*) došlo k ovlivnění štěpení sacharosy (podobně jako dodáváním sacharosy samotné, jen s mírně slabším účinkem). Byla zaznamenána zvýšená aktivita sacharosasyntasy a také zvýšená aktivita alkalické invertasy, aktivita kyselá invertasy byla překvapivě naopak snížena. V celkovém důsledku došlo k poklesu obsahu sacharosy v buňce (Müller et al. 1998). V tomto experimentu byl díky přidání validamycinu A vyloučen vliv zvýšeného obsahu glukosy způsobeného štěpením trehalosy. Nebyl ovšem brán v úvahu možný vliv zvýšení T6P v důsledku zvýšeného množství trehalosy. K odlišným výsledkům došli Redillas et al. (2011) s transgenními rostlinami rýže (*Oryza sativa*). Rostliny exprimující fúzní enzym TPSP složený z enzymů TPS a TPP z *E. coli* vykazovaly v důsledku zvýšeného obsahu trehalosy zvýšení obsahu sacharosy, glukosy, fruktosy i škrobu.

V dalším experimentu s externě dodávanou trehalosou, tentokrát rostlinám ječmene (*Hordeum vulgare* cv. Baraka), byla zaznamenána zvýšená katalytická účinnost sacharosa:fruktan-6-fruktosyltransferasy (6-SFT), a také její zvýšená exprese (obdobný, ale silnější efekt měla i sacharosa). Efekt byl opět stejný i po inhibici trehalosy. Výsledný obsah fruktanů nebyl při dodávání samotné trehalosy zvýšen, zřejmě kvůli nedostatku substrátu pro

jejich syntézu (Müller et al. 2000). Nicméně přesný způsob regulace fruktanového metabolismu není dosud známý (Kooiker et al. 2013). U pšenice (*Triticum aestivum*) byl objeven gen *TaMYB13-1* kódující transkripční faktor, který reguluje expresi genů fruktanového metabolismu včetně genu pro 6-SFT. *TaMYB13-1* je up-regulován sacharosou, ale na jiné úrovni než gen pro 6-SFT, což ukazuje na další faktory uplatňující se v této regulační dráze (Xue et al. 2011).

Výsledky experimentů s externím dodáváním trehalosy dovedly jejich autory k hypotéze, že trehalosa vzhledem ke své strukturní podobnosti se sacharosou funguje v signalizaci jako její analog a spouští alternativní dráhy ukládání sacharidů (Müller et al. 2000). Tato hypotéza byla podpořena další prací, ve které bylo zjištěno, že externě dodávaná trehalosa zvyšovala u *Arabidopsis* expresi genu *ApL3*, který kóduje velkou podjednotku ADP-glukosapyrofosforylasy, což je první enzym dráhy syntézy škrobu. Navíc byla i zvýšena aktivita tohoto enzymu. Výsledkem byla nadměrná akumulace škrobu ve fotosyntetizujících pletivech produkujících sacharidy a nedostatečné zásobení sinkových pletiv, zejména mladých vyvíjejících se listů (Wingler et al. 2000). Podobně i v další práci bylo zjištěno, že při pěstování semenáčků *Arabidopsis* na médiu se 100mM trehalosou docházelo k akumulaci škrobu v děložních lístcích. Rostlinky měly velmi krátké kořeny a nedocházelo u nich k vývoji listů z listových primordií, což naznačovalo, že sinková pletiva nejsou dostatečně zásobena. Nicméně ve stejných podmínkách byl inhibován růst i u mutantů neschopných syntetizovat škrob. Tím byla vyloučena možnost, že omezení růstu na médiu obsahujícím trehalosu je způsobené akumulací škrobu ve fotosyntetizujících pletivech (Delatte et al. 2011).

### **3.3.2. Trehalosa-6-fosfát jako klíčová signální molekula**

Výše popsané výsledky velmi názorně dokumentují vliv trehalosy na modulaci sacharidového metabolismu rostlin. Ta může být důvodem vývojových změn a růstových omezení u rostlin akumulujících trehalosu ve vyšších koncentracích (Goddijn et al. 1997; Yeo et al. 2000). Jako pravděpodobnější se ale ukazuje, že omezení růstu je způsobeno zvýšenou hladinou T6P v důsledku zvýšené koncentrace trehalosy (Schluepmann et al. 2004).

U rostlin *Arabidopsis thaliana* pěstovaných na médiu se 100mM koncentrací trehalosy se rychle zvýšil obsah T6P a zastavil se růst. Naproti tomu rostliny exprimující enzym trehalosa-fosfáthydrolasu (TPH) z *E. coli*, který štěpí T6P na glukosu a glukosa-6-fosfát (G6P), rostly na stejném médiu bez omezení (Schluepmann et al. 2004). Růst byl obnoven také zvýšenou expresí trehalasy, zatímco zvýšení exprese TPP bylo bez efektu. Vysvětlením autorů bylo, že

kvůli zvýšené koncentraci trehalosy je defosforylace T6P termodynamicky nevýhodná, a proto zůstává jeho koncentrace vysoká. Zatímco při snížení obsahu trehalosy trehalasou nebo při hydrolytickém štěpení T6P pomocí TPH se obsah T6P sníží, a negativní vliv na růst rostlin je tak odstraněn (Schluepmann et al. 2004). Přesný mechanismus, kterým T6P omezuje růst, není stále známý (O'Hara et al. 2013). Zpočátku se nabízela myšlenka, že u rostlin funguje obdobná regulace jako u kvasinek. Tam T6P výrazně inhibuje hexokinasu II a mírně také hexokinasu I (Blázquez et al. 1993). V souladu s touto myšlenkou bylo i pozorování, kdy zvýšený obsah T6P indukovaný dodáváním sacharosy způsobil snížení obsahu fruktosa-6-fosfátu (F6P) a G6P a naopak. To ukazovalo, že vstup sacharidů do glykolýzy je krokem, který je ovlivňován T6P (Schluepmann et al. 2004). Nicméně, na rozdíl od kvasinek, u rostlin nebyl potvrzen přímý inhibiční efekt T6P na hexokinasovou aktivitu, ať už se jednalo o *Arabidopsis thaliana* (Eastmond et al. 2002) nebo o *Spinacia oleracea* (Wiese et al. 1999).

Omezení růstu způsobené zvýšenou koncentrací trehalosy může být také odstraněno externím dodáváním sacharidů, což ukazuje, že T6P omezuje růst, jen pokud je jeho zvýšení v nerovnováze s dostupností sacharidů (Schluepmann et al. 2004). Při zvýšeném obsahu T6P, který byl způsoben vložením genu *otsA* (osmoregulatory trehalose synthesis A - gen z *E. coli* kódující TPS) a externím dodáváním sacharidů (glukosy, fruktosy nebo sacharosy), byl růst rostlin *Arabidopsis thaliana* dokonce výrazně zlepšený oproti kontrolním WT rostlinám bez dodávaných sacharidů (Schluepmann et al. 2003). Obsah T6P ovlivňuje expresi genů pro enzymy TPS a TPP a ty poté regulují syntézu a defosforylaci T6P. Tento zpětnovazebný regulační mechanismus je ale potlačen při dostatečném zásobování rostliny sacharidy a následně dochází ke zvyšování koncentrace T6P. Tím je zajištěn přenos informace o dostatečné zásobě sacharidů a rostlina následně spouští anabolické reakce (Schluepmann et al. 2004). Zvýšení koncentrace T6P bylo prokázáno při externím dodávání sacharosy, kdy po přemístění rostlin *Arabidopsis* z média bez sacharosy do média s 15mM sacharosou došlo během tří hodin k 26 násobnému zvýšení T6P. Obdobně docházelo ke zvýšení koncentrace T6P i při zvýšení endogenní produkce sacharidů. Po přechodu ze tmy na světlo se u rostlin zvýšil obsah T6P během čtyř hodin až dvanáctkrát (Lunn et al. 2006).

Jedním z příkladů dokumentujících zvýšený anabolismus je i vliv zvýšeného množství T6P na expresi genů kódujících enzymy pro syntézu složek buněčné stěny. U *Arabidopsis thaliana* s *otsA* genem byly zjištěny zvýšené hladiny transkriptu pro enzymy syntetizující prekurzory hemicelulosy a pektinů (Paul et al. 2010). Nejvíce byl zvýšen obsah transkriptu pro UDP-glukosa-6-dehydrogenasu, která oxiduje UDP-glukosu na UDP-glukuronidovou

kyselinu. Ta je prekurzorem ostatních složek hemicelulóz a pektinů (Tenhaken & Thulke 1996). Koncentrace T6P má také vliv na fotosyntetickou kapacitu rostlin. Tabák (*Nicotiana tabacum*) se zvýšeným obsahem T6P, zajištěným expresí genu *otsA*, měl zvýšenou fotosyntetickou kapacitu na jednotku listové plochy. Aktivita enzymu RuBisCO byla u těchto rostlin zvýšena až o 40 % (Pellny et al. 2004). Zvýšená fotosyntetická aktivita byla sice spojena se snížením listové plochy a nevedla tedy ke zvýšené produkci biomasy, nicméně autoři podotýkají, že zvýšený poměr mezi fotosyntetickou aktivitou a velikostí listové plochy může být za určitých podmínek výhodný. Například při nedostatku vody může snížená listová plocha omezit její ztráty způsobené transpirací.

T6P se také ukázal jako nezbytný pro normální vývoj rostliny. U rostlin *Arabidopsis* s mutací v genu kódujícím enzym TPS1 se synthasovou aktivitou bylo zjištěno, že recesivní homozygoti nejsou životaschopní. Embrya měla zpomalený vývoj, který se ve fázi torpédovitého embrya, kdy se akumulují zásobní látky, zastavil úplně. Výsledná semena byla svraštělá a neschopná vyklíčit (Eastmond et al. 2002). Nedostatek T6P negativně ovlivňuje růst a vývoj rostlin i v dalších vývojových fázích. Snížená exprese *AtTPS1* u mladých rostlin způsobila zpomalení růstu a výrazně omezený růst kořenů. Rostliny navíc i po delší době zůstávaly ve vegetativní fázi a vůbec u nich nedošlo k indukci kvetení (Dijken et al. 2004). Růstová a vývojová omezení způsobená nedostatkem T6P byla vysvětlena tím, že rostliny nemohly efektivně využívat dodávané sacharidy. Vliv na omezení růstu může mít kromě změn v sacharidovém metabolismu i exprese některých stresových genů indukovaná T6P (O'Hara et al. 2013).

### 3.3.3. Interakce s jinými signálními drahami

Důležitou molekulou, jejíž činnost je inhibována pomocí T6P, je SnRK1 (sucrose non-fermenting related kinase 1). Je to rostlinná serin/threoninová kinasa, která je homologní ke kvasinkové SNK1 (sucrose nonfermenting kinase 1) a může dokonce nahradit její funkci (Alderson et al. 1991). O SNK1 bylo již poměrně dlouho známo, že se u kvasinek uplatňuje v regulaci sacharidového metabolismu. Konkrétně dereprimuje glukosou reprimované geny (Carlson et al. 1981). Později bylo zjištěno, že i rostlinná SnRK1 je zapojena v energetické a stresové signalizaci rostlin (Baena-González et al. 2007). Tam slouží jako centrální signální molekula při přenosu informace o hladovění, které je často následkem různých abiotických stresů. Ovlivňuje expresi velkého množství genů s různými funkcemi. Přes 300 genů zahrnutých v biosyntetických procesech, jako je syntéza aminokyselin, proteinů, nukleotidů,



lipidů, sacharosy, škrobu nebo buněčné stěny, je při hladovění jejím prostřednictvím reprimováno. Téměř 300 genů uplatňujících se v katabolických procesech, jako je degradace škrobu nebo glukoneogeneze, které štěpením složitějších makromolekul zajišťují alternativní přísun energie a metabolitů, je při nedostatku energie pomocí SnRK1 naopak indukováno (Baena-González & Sheen 2008; Zhang et al. 2009).

Změny v metabolismu nejsou ovšem způsobené pouze změnou exprese genů pro metabolické dráhy. Při pokusech *in vitro* bylo zjištěno, že SnRK1 přímo fosforyluje (a tím inaktivuje) některé důležité enzymy (Polge & Thomas 2007): 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reduktasu uplatňující se v mevalonátové dráze při syntéze isoprenoidů, sacharosa-fosfátsynthasu katalyzující syntézu sacharosa-6-fosfátu, nitrátreduktasu katalyzující první krok asimilace dusíku, a také jednu z trehalosa-6-fosfátsynthas (TPS5), u které je předpokládána regulační aktivita (Zang et al. 2011).

Signální funkce SnRK1 je v souladu s pozorováním, že při nízké hladině sacharidů v embryích pšenice (*Triticum aestivum*) je dostatečná koncentrace SnRK1 nezbytná pro dereprimování genu pro  $\alpha$ -amylázu a následné štěpení škrobu (Laurie et al. 2003). Zde je navíc funkce SnRK1 v dereprimování glukosou reprimovaných genů analogická k funkci SNK1 u kvasinek. Na druhou stranu u hlíz bramboru (*Solanum tuberosum* cv. Prairie) bylo zjištěno, že zvýšená exprese *SnRK1* způsobuje zvýšení syntézy škrobu. Byla zvýšena exprese genů pro sacharosasyntázu a ADP-glukosafosforylasu. Oba tyto enzymy, uplatňující se v dráze syntézy škrobu, měly také zvýšenou aktivitu. Sacharosa-fosfátsynthasa a  $\alpha$ -amylasa, zajišťující odbourávání škrobu, naopak nevykazovaly změny v množství ani aktivitě (McKibbin et al. 2006). Tento rozpor v regulačním efektu SnRK1 na metabolismus škrobu je možné vysvětlit například závislostí na dalších regulačních faktorech nebo metabolitech, které zajišťují orgánově specifickou odpověď na zvýšení koncentrace SnRK1 (O'Hara et al. 2013).

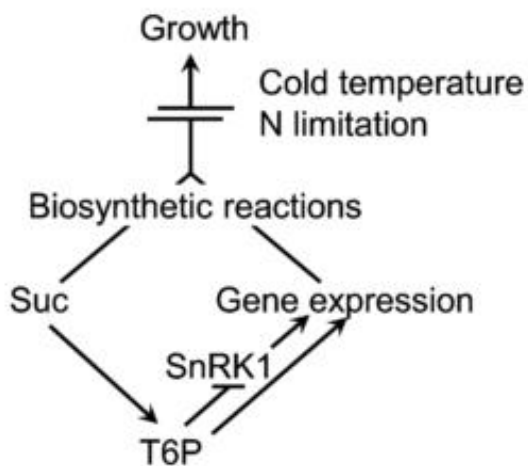
Vliv T6P na aktivitu SnRK1 byl měřen v extraktu z pletiv mladých rostlinek *Arabidopsis thaliana* při pokusu *in vitro* (Zhang et al. 2009). Inhibiční efekt T6P byl prokázán už při 1  $\mu$ M koncentraci. Při koncentraci 20  $\mu$ M T6P došlo ke snížení aktivity SnRK1 o 50 %. Žádný z ostatních testovaných sacharidů a jejich fosfátů neměl na SnRK1 takto silný inhibiční účinek. G1P při koncentraci 1 mM inhiboval aktivitu SnRK1 o 15 %, glukosa, sacharosa, trehalosa, fruktosa-6-fosfát (F6P) ani fruktosa-2,6-bisfosfát (F26BP) neměly na aktivitu SnRK1 výraznější vliv (Zhang et al. 2009). Již dříve byl také dokázán inhibiční efekt G6P na aktivitu SnRK1, i když opět výrazně slabší než u T6P (Toroser et al. 2000). Inhibice pomocí T6P a G1P je nekompetitivní vzhledem k ATP. Oba inhibitory se pravděpodobně váží na jiné

místo než ATP a nesnižují afinitu SnRK1 k ATP, ale pouze rychlost tvorby produktu (fosforylovaného proteinu). G6P na druhou stranu snižuje afinitu SnRK1 k ATP i rychlost tvorby produktu. Při kombinaci více inhibitorů je inhibiční efekt ještě zesílen (Nunes, Primavesi, et al. 2013).

U mladých rostlin *Arabidopsis* exprimujících bakteriální geny *otsA* a *otsB* pro TPS a TPP, byla také sledována exprese genů, u kterých Baena-González et al. (2007) prokázali, že jsou ovlivňovány pomocí SnRK1. Tímto způsobem byl nepřímě dokázán inhibiční efekt T6P na SnRK1 i *in vivo* (Zhang et al. 2009). Ke stejnému závěru došli ve své práci i Nunes, O'Hara, et al. (2013) při sledování stejných markerových genů u rostlin *Arabidopsis*, které měly zvýšený obsah T6P v důsledku dodávání externí sacharosy a snížení kultivační teploty. Změny v transkriptu se začaly objevovat při cytosolických koncentracích 3 – 5  $\mu\text{M}$  T6P, což odpovídá disociační konstantě enzym-inhibitorového komplexu, jejíž hodnota byla experimentálně určena na  $K_i = 4 \mu\text{M}$  (Nunes, Primavesi, et al. 2013). Zajímavé bylo, že inhibiční efekt nebyl pozorován u dospělých listů, a to ani při pokusech *in vitro*. Stejně tak při pokusech s extrakty z jiných než rostlinných organismů (*Saccharomyces cerevisiae*, *Musca domestica*, *Caenorhabditis elegans*) neměla koncentrace T6P na aktivitu SnRK1 vliv. Tato pozorování dovedla autory k myšlence, že ve zprostředkování signálu se uplatňuje ještě další faktor, který je přítomný pouze ve vyvíjejících se rostlinných pletivech. To bylo podpořeno také faktem, že izolované katalytické podjednotky SnRK1 (KIN10 a KIN11) nebyly pomocí T6P inhibovány (inhibice je tedy fyzicky oddělena od katalytické aktivity), ale po přidání extraktu z mladých rostlinek nebo semen byla inhibice indukována. Po zahřátí extraktu byla schopnost indukovat inhibici odstraněna, což napovídá, že zprostředkující faktor je proteinové povahy (Zhang et al. 2009). Více informací o tomto proteinu zatím není známo a bude potřeba dalších výzkumů pro objasnění jeho přesné funkce.

V nedávné době byla také studována regulace metabolismu pomocí T6P a SnRK1 při takzvaném sinkem limitovaném růstu, kdy je růst omezen navzdory vysoké dostupnosti sacharidů v pletivech. Taková situace nastává například při výraznějším poklesu teploty, kdy dochází k akumulaci sacharidů v pletivech (Usadel et al. 2008). Růst rostlin je v tomto případě omezen neschopností sinkových pletiv využívat dodávané sacharidy, což se rozchází s modelem regulace růstu pomocí T6P v reakci na hladovění. Při měření obsahu sacharidů a T6P u rostlinek *Arabidopsis* vystavených snížené teplotě a nedostatku dusíku bylo zjištěno, že množství T6P odpovídalo hladině sacharosy za všech podmínek. Množství T6P také ve všech případech korelovalo se změnami v expresi genů, o kterých je známo, že jsou ovlivňovány

pomocí T6P/SnRK1 dráhy. Vzájemná korelace ale nebyla nalezena mezi množstvím T6P a změnami růstu. U transgenních rostlin s vneseným bakteriálním genem *otsB* pro enzym TPP, které měly snížený obsah T6P, nedocházelo po obnovení aktivity sinku k obnovení růstu



**Obrázek 2:** Model mechanismu ovlivnění růstu pomocí T6P. Převzato z Nunes, O'Hara, et al. 2013

(Nunes, O'Hara, et al. 2013). Na základě těchto pozorování autoři vytvořili nový model fungování regulace růstu v závislosti na dostupnosti sacharidů (obrázek. 2). T6P zde neindukuje růst přímo, ale pouze pomocí změn v expresi některých genů umožňuje jeho aktivaci. Na nižších úrovních regulace se pak uplatňují další faktory jako nízká teplota a nedostatek dusíku, které zabraňují růstu i v případě, že je koncentrace T6P zvýšena. Po odstranění těchto omezení pak může být růst pomocí T6P aktivován.

Dalším významným proteinem uplatňujícím se v regulaci genové exprese v reakci na hladovění je transkripční faktor bZIP11 (basic leucine zipper 11), dříve označovaný jako ATB2 (Hanson et al. 2008). Již dříve bylo zjištěno, že v signálních kaskádách vyvolávaných zvýšenou expresí KIN10 a KIN11 (katalytické podjednotky SnRK1) v odpovědi na nedostatek energie, je transkripční aktivace cílových genů alespoň z části zprostředkována bZIP transkripčními faktory (Baena-González et al. 2007).

Konkrétně bZIP11 se jeví jako velmi důležitý v souvislosti s trehalosovým metabolismem, protože jeho zvýšená exprese v rostlinách *Arabidopsis thaliana* kompenzovala omezení růstu způsobená externím dodáváním trehalosy (Delatte et al. 2011). Jako nejjednodušší vysvětlení tohoto jevu se nabízel vliv transkripčního faktoru bZIP11 na zvýšenou expresi trehalasy a následné snížení obsahu T6P. Tento mechanismus byl ale vyloučen pozorováním zvýšeného obsahu sacharidů i T6P při zvýšené expresi bZIP11. Navíc omezení růstu bylo odstraněno i u rostlin s mutovaným genem *TRE1*, neschopných štěpit trehalosu. Stejný efekt na fenotyp rostlin jako zvýšená exprese bZIP11 měla i zvýšená exprese KIN10 (Delatte et al. 2011). Autoři také porovnali soubory genů, u kterých bylo dříve zjištěno, že jejich exprese je ovlivňována pomocí KIN10 (Baena-González et al. 2007) a bZIP11 (Hanson et al. 2008). U genů, které byly přítomné v obou souborech, bylo zjištěno, že převážná část z nich byla

regulována stejným směrem, zatímco pouze minimum směrem opačným. Výsledky získané tímto srovnáním podpořily hypotézu, že bZIP11 může být cílem SnRK1 a zprostředkovávat část jejího efektu v nižší úrovni signální kaskády, ale také pravděpodobně reguluje transkripci souboru genů, které nejsou zahrnuty v regulaci pomocí SnRK1 (Delatte et al. 2011).

Přesný způsob, jakým je exprese bZIP11 regulována, není známý. Co se týče interakce s SnRK1, byl navržen model, ve kterém SnRK1 fosforyluje bZIP11 a tím umožňuje jeho vstup do jádra (Delatte et al. 2011). Tento model by vysvětloval i pozorování, že současné zvýšení exprese SnRK1 a bZIP má synergický efekt (Baena-González et al. 2007). Nicméně celkový regulační mechanismus bude pravděpodobně složitější. Je totiž známo, že zvýšená koncentrace sacharosu způsobuje indukci transkripce bZIP11 (Rook, Gerrits, et al. 1998). To bylo podpořeno i zjištěním, že při přenesení rostlin *Arabidopsis thaliana* ze tmy na světlo došlo k prudkému zvýšení transkripce bZIP11 (Rook, Weisbeek, et al. 1998). Zároveň ovšem sacharosa inhibuje translaci bZIP11 (Rook, Gerrits, et al. 1998). Tento způsob regulace ale nesouvisí s T6P/SnRK1 dráhou (Hummel et al. 2009). To dokládá i pozorování, že zvýšené množství trehalosy v rostlinách nemělo na translaci bZIP11 vliv (Delatte et al. 2011).

Jako velmi důležitý se jeví také vliv dráhy T6P/SnRK1 na senescenci rostlin. Ta je spouštěna vysokým poměrem obsahů uhlíku a dusíku, a lze ji tedy vyvolat zvýšením obsahu sacharidů (exogenně i endogenně), nebo nedostatečným zásobováním rostliny dusíkatými látkami (Ono et al. 1996). V listech podléhajících senescenci dochází ke zvyšování obsahu sacharidů a následně i ke zvyšování obsahu T6P (Wingler et al. 2012). U transgenních rostlin *Arabidopsis thaliana* s vneseným bakteriálním genem *otsB* kódujícím enzym TPP docházelo při zvýšení množství sacharidů v listech také ke zvýšení T6P, ale v mnohem menší míře než u WT rostlin. Listy transgenních rostlin zároveň vykazovaly zpožděný nástup senescence indukované externě dodávanými sacharidy (Wingler et al. 2012). Oddálení senescence, indukované tentokrát prodlouženou fotoperiodou, bylo zaznamenáno také u *Arabidopsis thaliana* se zvýšenou expresí KIN10 (katalytická podjednotka SnRK1). Tyto rostliny také méně podléhaly senescenci způsobované nedostatkem živin. Při snížení exprese KIN10 byl nástup senescence naopak rychlejší (Baena-González et al. 2007). K podobným výsledkům došli i Cho et al. (2012) v experimentu se zvyšováním a snižováním exprese všech podjednotek SnRK1. Listy rostliny se zvýšenou expresí všech podjednotek tohoto enzymu měly za stejných podmínek delší životnost než listy WT, listy rostlin se sníženou expresí měly životnost naopak kratší. Vzhledem k tomu, že v dospělých listech není SnRK1 inhibována

pomocí T6P v důsledku absence zprostředkujícího faktoru (Zhang et al. 2009), byla navržena teorie, že zpožděný nástup senescence u rostlin se sníženým obsahem T6P je následkem dřívějších vývojových změn v raných fázích vývoje (Wingler et al. 2012).

## 4. Zvyšování odolnosti rostlin modulací trehalosového metabolismu

V minulých letech již bylo provedeno mnoho experimentů s cílem zvýšit odolnost rostlin k abiotickým stresům pomocí genetických modifikací trehalosového metabolismu. Většina z nich přinesla pozitivní výsledky, a to nejen u modelových organismů, ale i u zemědělsky využívaných plodin.

### 4.1. Zvýšení syntézy trehalosa-6-fosfátu

Při vnesení kvasinkového genu *TPS1* kódujícího enzym TPS pod silným konstitutivním promotorem CaMV35S (promotor z viru kvěťákové mozaiky) do rostlin bramboru (*Solanum tuberosum* cv. Dejima) došlo ke zvýšení odolnosti k suchu (Yeo et al. 2000). U takto modifikovaných rostlin pěstovaných *in vitro* se oproti WT rostlinám projevovaly fenotypové změny jako omezený růst, špatný vývoj kořenů a zažloutlé listy. Nicméně při přesazení do substrátu byla většina negativních změn odstraněna. Jako vysvětlení těchto rozdílů mezi pěstováním *in vitro* a *ex vitro* navrhuje autoři možný rozdíl v akumulaci a degradaci trehalosy v závislosti na způsobu pěstování, případně také vliv samotné kultivace *in vitro* jako dalšího interferujícího stresového faktoru (Yeo et al. 2000). Vnesení stejného genu pod stejným promotorem do rostlin rajčete (*Solanum lycopersicum*, syn. *Lycopersicon esculentum*, cv. UC82B) způsobilo u těchto rostlin při pěstování *ex vitro* vyšší odolnost k suchu, zasolení a oxidativnímu stresu a také vyšší obsah chlorofylu a škrobu v listech. Rostliny měly ale pozměněný vývoj a stavbu kořenů i prýtů (Cortina



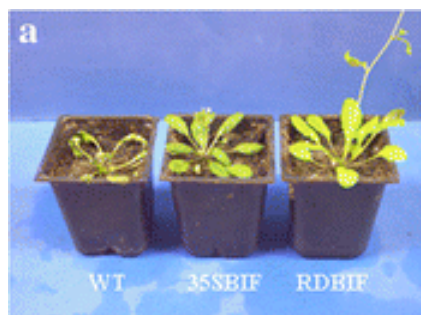
**Obrázek 3:** Pozměněný vývoj rostlin rajčete (*Solanum lycopersicum*, cv. UC82B), vlevo: wild type rostlina, vpravo: rostlina s vneseným kvasinkovým genem *TPS1* pod promotorem CaMV35S. Převzato z Cortina & Culiáñez-Macià 2005.

& Culiáñez-Macià 2005) (obrázek 3). Gen *TPSI* byl dále vložen do rostlin bramboru (cv. White Lady) pod promotorem StDS2 (*Solanum tuberosum* Drought Specific 2), u kterého byla předpokládána stresem indukovaná exprese. U transgenních rostlin bylo ale zjištěno, že gen *TPSI* byl na nízké úrovni exprimován konstitutivně a exprese se nezvyšovala působením stresových podmínek. I tato nízká konstitutivní exprese ovšem způsobila fenotypové změny ve formě nižší hustoty průduchů. To mělo za následek delší udržování fotosyntetické aktivity při nedostatku vody, a tím i větší odolnost k suchu. Na druhou stranu za optimálních podmínek fixovaly transgenní rostliny méně CO<sub>2</sub> než WT rostliny (Stiller et al. 2008).

Výsledky výše uvedených experimentů ukazují, že zvýšená exprese genu pro enzym TPS přispívá ke zlepšení odolnosti k různým abiotickým stresům. Často ale také způsobuje fenotypové změny, které mohou snižovat výnosy transgenních rostlin za optimálních podmínek. Nicméně právě tyto změny mohou být výhodné při stresových podmínkách, jako v případě snížené hustoty průduchů (Stiller et al. 2008). Podobně i v experimentu, kdy byl do rostlin tabáku (*Nicotiana tabacum*) vložen bakteriální gen *otsA* kódující enzym TPS, došlo ke snížení celkové listové plochy, ale zvýšila se fotosyntetická aktivita na jednotku plochy, což může být výhodné při nedostatku vody (Pellny et al. 2004). Je znám příklad, kdy konstitutivně zvýšená exprese kvasinkového genu *TPSI* (s promotorem CaMV35S) v rostlinách *Arabidopsis thaliana* měla za optimálních podmínek silně negativní efekt. Modifikované rostliny měly zpomalený růst, menší listy, méně semen a homozygoti byli dokonce neživotoschopní (Miranda et al. 2007). Na druhou stranu jsou ale známy i případy, kdy zvýšená exprese genu pro enzym TPS způsobila zvýšení odolnosti rostlin k abiotickým stresům bez jakýchkoli znevýhodnění při optimálních podmínkách. Při vložení genu *OsTPSI* s konstitutivním promotorem Actin1 do rýže (*Oryza sativa* ssp. *japonica* cv. ZH11) došlo ke zvýšení obsahu prolinu a trehalosy v rostlinách, a tím i ke zvýšení jejich odolnosti k chladu, salinitě a suchu. Jedinou morfologickou změnou transgenních rostlin přitom bylo mírné zkrácení listů (Li et al. 2011). Žádná výrazná omezení růstu za optimálních podmínek nebyla pozorována ani při vložení bakteriálních genů *otsA* a *otsB* kódujících oba enzymy trehalosového metabolismu TPS a TPP pod konstitutivní promotor CaMV35S do rostlin tabáku (*Nicotiana tabacum* cv. Petit Havana SR1). Transgenní rostliny přitom měly při nedostatku vody větší listy, lepší růst a efektivnější fotosyntézu než WT rostliny (Pilon-Smits et al. 1998).

## 4.2. Ovlivnění rovnováhy intermediátů trehalosové dráhy

V několika dalších experimentech byl pro transgenní úpravy použit genový konstrukt vytvořený fúzí genů *otsA* a *otsB*. Jeho produktem je fúzní enzym TPSP se synthasovou i fosfatasovou aktivitou, který má až čtyřikrát vyšší katalytickou účinnost než ekvimolární směs enzymů TPS a TPP (Seo et al. 2000). Další výhodou fúzního enzymu TPSP oproti odděleným enzymům TPS a TPP je snížení akumulace T6P (Jang et al. 2003). Vytvořený fúzní genový konstrukt s promotorem indukovaným kyselinou abscisovou byl vložen do rýže (*Oryza sativa* ssp. *Indica* cv. Pusa Basmati 1). Získané transgenní rostliny měly zvýšený obsah trehalosy a ostatních sacharidů, vykazovaly lepší odolnost k suchu a zasolení, byly bez negativních vývojových projevů, a měly vyšší fotosyntetickou aktivitu než WT rostliny i za optimálních podmínek (Garg et al. 2002). Fúzní gen pro enzym TPSP byl vnesen do rýže (*Oryza sativa* cv. Nakdong) také se silným konstitutivním promotorem Ubi1 (ubiquitinový promotor z kukuřice). Výsledné transgenní rostliny měly lepší odolnost k suchu, zasolení a chladu. Byl u nich také zjištěn zvýšený obsah trehalosy, koncentrace ostatních sacharidů byly ale změněné pouze v semenech (Jang et al. 2003). Velmi podobné výsledky se stejnými rostlinami a stejnou genetickou úpravou získali i Redillas et al. (2011). Zde byly ovšem opět pozorovány zvýšené koncentrace sacharidů (konkrétně glukosy, fruktosy, sacharosy a škrobu) v listech. Zvýšený obsah trehalosy i celkově zvýšený obsah sacharidů způsobila exprese genu pro enzym TPSP i u rajčat (*Solanum lycopersicum* cv. Joyful), tentokrát s promotorem CaMV35S. Transgenní rostliny měly zvýšenou toleranci k suchu a salinitě, a při stresových podmínkách



**Obrázek 4:** Tolerance k suchu u transgenních rostlin *Arabidopsis thaliana*. WT, 35SBIF (linie s genovým konstruktem TPS1-TPS2 pod promotorem 35S) a RDBIF (linie s TPS1-TPS2 pod promotorem rd29A) Převzato z Miranda et al. 2007.

vykazovaly vyšší fotosyntetickou aktivitu než WT rostliny. Za optimálních podmínek nebyl pozorován žádný rozdíl v růstu ani vývoji (Lyu et al. 2013).

Podobně jako z bakteriálních genů *otsA* a *otsB*, byl i z kvasinkových genů *TPS1* a *TPS2* kódujících také enzymy TPS a TPP vytvořen genový konstrukt označovaný jako *TPS1-TPS2* (Miranda et al. 2007). Produktem vytvořeného konstruktů byl opět fúzní enzym se synthasovou i fosfatasovou aktivitou. *TPS1-TPS2* byl vložen do rostlin *Arabidopsis thaliana* pod kontrolou konstitutivního promotoru CaMV35S nebo stresem indukovaného promotoru rd29A (responsive to dehydration 29A). V obou případech byly výsledkem rostliny se zvýšeným obsahem

trehalosy a zlepšenou odolností k suchu (obrázek 4), zasolení, vysoké i nízké teplotě. Ani v jednom případě nebyly pozorovány změny v růstu nebo morfologii za optimálních podmínek (Miranda et al. 2007). Stejná genetická úprava včetně obou promotorů byla použita i u rostlin tolíce vojtěšky (*Medicago sativa* cv. Regen SY27x) (Suárez et al. 2009). Rostliny s promotorem CaMV35S měly za optimálních podmínek zpomalený růst a menší produkci biomasy než WT rostliny. Zajímavé bylo, že při použití promotoru rd29A rostly transgenní rostliny naopak rychleji než WT a i jejich produkce biomasy byla výrazně vyšší. Nicméně všechny rostliny exprimující *TPS1-TPS2* bez ohledu na použitý promotor měly opět zvýšenou odolnost k suchu, zasolení a zvýšené i snížené teplotě (Suárez et al. 2009).

## 5. Závěr

Kompatibilní soluty, mezi něž patří i trehalosa, mají v buňkách určité ochranné funkce jako je úprava vodního potenciálu a stabilizace proteinů (Yancey et al. 1982; Timasheff 2002). Konkrétně u trehalosy byly nalezeny ještě specifické vlastnosti napomáhající další stabilizaci proteinů a také membrán při silné dehydrataci (Crowe et al. 1984; Carpenter & Crowe 1989; Ma et al. 2013). Zřejmě díky těmto vlastnostem je trehalosa mnoha organismy akumulována a využívána jako osmoprotektant pro přežívání stavu anhydrobiosy (Elbein et al. 2003). Na druhou stranu při dostatečné hydrataci snižuje trehalosa efektivitu reaktivace denaturovaných proteinů (Singer & Lindquist 1998). To může být důvodem, proč většina vyšších rostlin trehalosu nekumuluje, i když jsou schopny její syntézy. Jako nejpravděpodobnější důvod se ale ukazuje potřeba přesné regulace obsahu T6P, který je prekurzorem trehalosy a zároveň velmi důležitou signální a regulační molekulou u rostlin. T6P zprostředkovává informaci o dostatečné zásobě sacharidů a indukuje anabolické reakce (Schluepmann et al. 2004). Inhibuje také rostlinnou kinázu SnRK1 (Zhang et al. 2009). Ta je zapojena v energetické a stresové signalizaci rostlin, ovlivňuje aktivitu některých klíčových enzymů a mění expresi několika stovek genů (Baena-González et al. 2007; Polge & Thomas 2007).

Ačkoliv v posledních desetiletích proběhlo mnoho výzkumů zabývajících se otázkami mechanismů fungování trehalosového metabolismu a jeho vlivu na ostatní procesy v rostlinném těle, stále existuje v tomto směru mnoho neznámých. Například dodnes nebylo objasněno, jakým mechanismem T6P ovlivňuje vstup sacharidů do glykolýzy, jakým mechanismem ovlivňuje senescenci rostlin, co je neznámým faktorem zprostředkovávajícím interakci mezi T6P a SnRK1 nebo jakým mechanismem trehalosa zvyšuje aktivitu



glutathionreduktasy. Velmi málo je také známo o některých drahách regulace genové exprese a zvláště o jejich propojení.

I přes nedostatečné porozumění signálním a regulačním drahám spojeným se syntézou trehalosy byly zásahy do trehalosového metabolismu použity v řadě experimentů s cílem zlepšit odolnost rostlin k abiotickým stresům. Převážná většina těchto experimentů byla alespoň do určité míry úspěšná. Při vkládání genů pro TPS bylo zvýšení odolnosti často spojeno s negativními fenotypovými efekty, které byly výraznější při silnější expresi těchto genů (Yeo et al. 2000; Cortina & Culiáñez-Macià 2005; Stiller et al. 2008). Nabízejícím se vysvětlením přítomnosti negativních efektů je narušení regulačních drah ovlivňovaných koncentrací T6P. Ve snaze těmto efektům předejít byl v několika experimentech použit gen pro fúzní protein TPSP. Ten měl zvýšit syntézu trehalosy a zároveň omezit akumulaci T6P (Seo et al. 2000; Jang et al. 2003). Výsledkem těchto experimentů bylo až na výjimky opravdu zvýšení stresové odolnosti bez negativních vedlejších efektů (Garg et al. 2002; Jang et al. 2003; Miranda et al. 2007; Suárez et al. 2009; Redillas et al. 2011; Lyu et al. 2013). Při současné úrovni poznání se tedy jeví zvyšování obsahu trehalosy bez výraznějších změn v obsahu T6P jako účinný způsob zvyšování odolnosti rostlin k abiotickým stresům. Určitých pozitivních výsledků bylo sice dosaženo i při zvýšení koncentrace T6P (Pellny et al. 2004), nicméně pro širší využití této modifikace bude třeba podrobnější porozumění signálními a regulačními drahami napojenými na T6P.

Účinky vloženého genu na fenotyp rostliny jsou samozřejmě také ovlivněny použitým promotorem, který určuje, v jakých orgánech, v jakých vývojových fázích, za jakých podmínek a v jaké míře bude gen exprimován. Z dosavadních výsledků lze říci, že v případě zásahů do trehalosového metabolismu přinášejí lepší výsledky stresem indukované promotory (Garg et al. 2002; Suárez et al. 2009). Vliv na výsledný efekt genetické modifikace má pravděpodobně také druh použité rostliny. Například rýže na rozdíl od dvouděložných rostlin nevykazuje negativní změny ani při zvýšených koncentracích T6P (Li et al. 2011; Redillas et al. 2011).

Většina autorů se shoduje na tom, že i přes existenci případných negativních fenotypových změn lze zásahem do trehalosového metabolismu efektivně zvýšit odolnost rostlin k abiotickým stresům. Objevují se samozřejmě i opačné názory. Například tvrzení, že udržování turgoru pomocí kompatibilních solutů je vlastně negativním efektem, protože zpomaluje ostatní mechanismy zabraňující ztrátám vody, a tím dochází k rychlejší dehydrataci rostliny. Nebo také, že stabilizační účinky kompatibilních solutů se uplatňují až v pozdějších

fázích dehydratace, kdy napomáhají přežití rostlin, ale mají velmi malý vliv na zvýšení výnosů (Serraj & Sinclair 2002). Nicméně trehalosa ve většině případů neplní funkci kompatibilního solutu. Její účinky se zdají být mnohem komplexnější a uplatňují se při koncentracích, které mají jen malý vliv na změny vodního potenciálu. Je pravdou, že velká část transgenních rostlin se zvýšenou stresovou odolností má za optimálních podmínek snížené výnosy a za silně stresových podmínek, kdy je rostlina na pokraji smrti, jsou i u transgenních linií výnosy velmi nízké. Ovšem už jen to, že lze pomocí změny v trehalosovém metabolismu získat rostlinu, která je schopna přežít extrémnější podmínky, je při současných klimatických a ekologických změnách velkou nadějí do budoucna. Zdá se tedy, že genetické manipulace ovlivňující metabolismus trehalosy a T6P mají potenciál k vytvoření zemědělských plodin, které budou přežít i tam, kde toho současně pěstované odrůdy nejsou schopny a které snad budou mít i v těchto nepříznivých podmínkách dostatečné výnosy.

## 6. Seznam použité literatury

Souhrnné články (review) jsou v seznamu zvýrazněny tučným písmem.

- Aeschbacher, Roger A, J Müller, T Boller, and A Wiemken. 1999. "Purification of the Trehalase GMTRE1 from Soybean Nodules and Cloning of Its cDNA. GMTRE1 Is Expressed at a Low Level in Multiple Tissues." *Plant Physiology* 119 (2) (February): 489–96.
- Alderson, Alison, Paolo A Sabellit, J Richard Dickinsont, Deborah Coleo, Michael Richardson, Martin Kreis, Peter R Shewryt, and Nigel G Halford Ii. 1991. "Complementation of Snfl , a Mutation Affecting Global Regulation of Carbon Metabolism in Yeast , by a Plant Protein Kinase cDNA." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88 (19): 8602–8605.
- Arakawa, T, and S N Timasheff. 1985. "The Stabilization of Proteins by Osmolytes." *Biophysical Journal* 47 (3) (March): 411–4.
- Baena-González, Elena, Filip Rolland, Johan M Thevelein, and Jen Sheen. 2007. "A Central Integrator of Transcription Networks in Plant Stress and Energy Signalling." *Nature* 448 (7156) (August 23): 938–42.
- Baena-González, Elena, and Jen Sheen. 2008. "Convergent Energy and Stress Signaling." *Trends in Plant Science* 13 (9) (October): 474–82.**
- Bhandal, I S, R M Hauptmann, and J.M Widholm. 1985. "Trehalose as Cryoprotectant for the Freeze Preservation of Carrot and Tobacco Cells." *Plant Physiology* 78 (2) (June): 430–2.
- Blázquez, Miguel A, Rosario Lagunas, Carlos Gancedo, and Juana M Gancedo. 1993. "Trehalose-6-Phosphate, New Regulator of Yeast Glycolysis That Inhibits Hexokinases." *FEBS LETTERS* 329 (1): 51–54.
- Blázquez, Miguel A, E Santos, C L Flores, J M Martínez-Zapater, J Salinas, and C Gancedo. 1998. "Isolation and Molecular Characterization of the Arabidopsis TPS1 Gene, Encoding Trehalose-6-Phosphate Synthase." *The Plant Journal : For Cell and Molecular Biology* 13 (5) (March): 685–9.
- Boyer, J S. 1982. "Plant Productivity and Environment." *Science (New York, N.Y.)* 218 (4571) (October 29): 443–8.
- Carlson, Marian, Barbara C Osmond, and David Botstein. 1981. "MUTANTS OF YEAST DEFECTIVE IN SUCROSE UTILIZATION." *Genetics* 98 (1): 25–40.
- Carpenter, J F, and J H Crowe. 1989. "An Infrared Spectroscopic Study of the Interactions of Carbohydrates with Dried Proteins." *Biochemistry* 28 (9) (May 2): 3916–22.
- Chary, S Narasimha, Glenn R Hicks, Yoon Gi Choi, David Carter, and Natasha V Raikhel. 2008. "Trehalose-6-Phosphate Synthase/phosphatase Regulates Cell Shape and Plant Architecture in Arabidopsis." *Plant Physiology* 146 (1) (January): 97–107.

- Cho, Young-Hee, Jung-Woo Hong, Eun-Chul Kim, and Sang-Dong Yoo. 2012. "Regulatory Functions of SnRK1 in Stress-Responsive Gene Expression and in Plant Growth and Development." *Plant Physiology* 158 (4) (April): 1955–64.
- Cortina, Carolina, and Francisco A Culiñez-Macià. 2005. "Tomato Abiotic Stress Enhanced Tolerance by Trehalose Biosynthesis." *Plant Science* 169 (1) (July): 75–82.
- Crowe, John H, and Lois M Crowe. 2000. "Preservation of Mammalian Cells — Learning Nature ' S Tricks." *Nature Biotechnology* 18 (2): 145–146.
- Crowe, John H, Lois M Crowe, and Dennis Chapman. 1984. "Preservation of Membranes in Anhydrobiotic Organisms : The Role of Trehalose." *Science* 223 (4637): 701–703.
- Delatte, Thierry L, Prapti Sedijani, Youichi Kondou, Minami Matsui, Gerhardus J de Jong, Govert W Somsen, Anika Wiese-Klinkenberg, Lucia F Primavesi, Matthew J Paul, and Henriette Schlupepmann. 2011. "Growth Arrest by Trehalose-6-Phosphate: An Astonishing Case of Primary Metabolite Control over Growth by Way of the SnRK1 Signaling Pathway." *Plant Physiology* 157 (1) (September): 160–74.
- Dijken, Anja J H Van, Henriette Schlupepmann, and Sjeff C M Smeekens. 2004. "Arabidopsis Trehalose-6-Phosphate Synthase 1 Is Essential for Normal Vegetative Growth and Transition to Flowering 1." *Plant Physiology* 135 (2): 969–977.
- Eastmond, Peter J, Anja J H Van Dijken, Melissa Spielman, Aimie Kerr, Alain F Tissier, Hugh G Dickinson, Jonathan D G Jones, Sjeff C Smeekens, and Ian A Graham. 2002. "Trehalose-6-Phosphate Synthase 1 , Which Catalyses the 1st Step in Trehalose Synthesis , Is Essential for Arabidopsis Embryo Maturation." *Plant Journal* 29 (2): 225–235.
- Elbein, Alan D, Y T Pan, Irena Pastuszak, and David Carroll. 2003. "New Insights on Trehalose: A Multifunctional Molecule." *Glycobiology* 13 (4) (April): 17R–27R.**
- Garg, Ajay K, Ju-kon Kim, Thomas G Owens, Anil P Ranwala, Yang Do Choi, Leon V Kochian, and Ray J Wu. 2002. "Trehalose Accumulation in Rice Plants Confers High Tolerance Levels to Different Abiotic Stresses." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (25): 15898–15903.
- Goddijn, Oscar J M., Theo C Verwoerd, Eline Voogd, Ronny W H H Krutwagen, Peggy T H M de Graaf, Kees van Dun, Juul Poels, Anne S Ponstein, Brigitte Damm, and Jan Pen. 1997. "Inhibition of Trehalase Activity Enhances Trehalose Accumulation in Transgenic Plants." *Plant Physiology* 113 (1) (January): 181–90.
- Hanson, Johannes, Micha Hanssen, Anika Wiese, Margriet M W B Hendriks, and Sjeff Smeekens. 2008. "The Sucrose Regulated Transcription Factor bZIP11 Affects Amino Acid Metabolism by Regulating the Expression of ASPARAGINE SYNTHETASE1 and PROLINE DEHYDROGENASE2." *The Plant Journal : For Cell and Molecular Biology* 53 (6) (March): 935–49.
- Hummel, Maureen, Fatima Rahmani, Sjeff Smeekens, and Johannes Hanson. 2009. "Sucrose-Mediated Translational Control." *Annals of Botany* 104 (1) (July): 1–7.

- Jang, In-cheol, Se-jun Oh, Ju-seok Seo, Won-bin Choi, Sang Ik Song, Chung Ho Kim, Youn Shic Kim, Hak-Soo Seo, Yang Do Choi, Baek Hie Nahm, and Ju-Kon Kim. 2003. "Expression of a Bifunctional Fusion of the Escherichia Coli Genes for Trehalose-6-Phosphate Synthase and Trehalose- 6-Phosphate Phosphatase in Transgenic Rice Plants Increases Trehalose Accumulation and Abiotic Stress Tolerance without Stunting Growth 1." *Plant Physiology* 131 (February): 516–524.
- Kirtman, B., S B Power, J A Adedoyin, G J Boer, R Bojariu, I Camilloni, F J Doblas-Reyes, A M Fiore, M Kimoto, G A Meehl, M Prather, A Sarr, C Schär, R Sutton, G J van Oldenborgh, G Vecchi and H J Wang, 2013. Near-term Climate Change: Projections and Predictability. In: *Climate Change 2013: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change* [Stocker, T F, D Qin, G-K Plattner, M Tignor, S K Allen, J Boschung, A Nauels, Y Xia, V Bex and P M Midgley (eds.)]. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA.
- Kooiker, Maarten, Janneke Drenth, Donna Glassop, C Lynne McIntyre, and Gang-Ping Xue. 2013. "TaMYB13-1, a R2R3 MYB Transcription Factor, Regulates the Fructan Synthetic Pathway and Contributes to Enhanced Fructan Accumulation in Bread Wheat." *Journal of Experimental Botany* 64 (12) (September): 3681–96.
- Krasteva, N, D Vollhardt, G Brezesinski, and H Møhvald. 2001. "Effect of Sugars and Dimethyl Sulfoxide on the Structure and Phase Behavior of DPPC Monolayers." *Langmuir* 17 (4): 1209–1214.
- Laurie, Sophie, Rowan S McKibbin, and Nigel G Halford. 2003. "Antisense SNF1-Related (SnRK1) Protein Kinase Gene Represses Transient Activity of an Alpha-Amylase (alpha-Amy2) Gene Promoter in Cultured Wheat Embryos." *Journal of Experimental Botany* 54 (383) (February 1): 739–747.
- Leyman, Barbara, Patrick Van Dijck, and Johan M Thevelein. 2001. "An Unexpected Plethora of Trehalose Biosynthesis Genes in Arabidopsis Thaliana." *Trends in Plant Science* 6 (11) (November): 510–3.
- Li, H W, B S Zang, X W Deng, and X P Wang. 2011. "Overexpression of the Trehalose-6-Phosphate Synthase Gene OsTPS1 Enhances Abiotic Stress Tolerance in Rice." *Planta* 234 (5): 1007 – 1018.
- Lunn, John E, Regina Feil, Janneke H M Hendriks, Yves Gibon, Rosa Morcuende, Daniel Osuna, Wolf-Rüdiger Scheible, Petronia Carillo, Mohammad-Reza Hajirezaei, and Mark Stitt. 2006. "Sugar-Induced Increases in Trehalose 6-Phosphate Are Correlated with Redox Activation of ADPglucose Pyrophosphorylase and Higher Rates of Starch Synthesis in Arabidopsis Thaliana." *The Biochemical Journal* 397 (1) (July 1): 139–48.
- Lyu, J I, S R Min, J H Lee, and Y H Lim. 2013. "Overexpression of a Trehalose-6-Phosphate Synthase/phosphatase Fusion Gene Enhances Tolerance and Photosynthesis during Drought and Salt Stress without Growth." *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 112 (2): 257–262.

- Ma, Chao, Zhiqiang Wang, Beibei Kong, and Tongbao Lin. 2013. "Exogenous Trehalose Differentially Modulate Antioxidant Defense System in Wheat Callus during Water Deficit and Subsequent Recovery." *Plant Growth Regulation* 70 (3) (March 3): 275–285.
- McKibbin, Rowan S, Nira Muttucumaru, Matthew J Paul, Stephen J Powers, Michael M Burrell, Steve Coates, Patrick C Purcell, Axel Tiessen, Peter Geigenberger, and Nigel G Halford. 2006. "Production of High-Starch, Low-Glucose Potatoes through over-Expression of the Metabolic Regulator SnRK1." *Plant Biotechnology Journal* 4 (4) (July): 409–18.
- Miranda, José a, Nelson Avonce, Ramón Suárez, Johan M Thevelein, Patrick Van Dijck, and Gabriel Iturriaga. 2007. "A Bifunctional TPS-TPP Enzyme from Yeast Confers Tolerance to Multiple and Extreme Abiotic-Stress Conditions in Transgenic Arabidopsis." *Planta* 226 (6) (November): 1411–21.
- Morelli, R, S Russo-Volpe, N Bruno, and R Lo Scalzo. 2003. "Fenton-Dependent Damage to Carbohydrates : Free Radical Scavenging Activity of Some Simple Sugars." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51 (25): 7418–7425.
- Müller, Joachim, Roger A Aeschbacher, Norbert Sprenger, Thomas Boller, and Andres Wiemken. 2000. "Disaccharide-Mediated Regulation of Sucrose:fructan-6-Fructosyltransferase, a Key Enzyme of Fructan Synthesis in Barley Leaves." *Plant Physiology* 123 (1) (May): 265–74.
- Müller, Joachim, Thomas Boller, and Andres Wiemken. 1995. "Trehalose and Trehalase in Plants : Recent Developments." *Plant Science* 112 (1): 1–9.**
- Müller, Joachim, Thomas Boller, and Andres Wiemken. 1998. "Trehalose Affects Sucrose Synthase and Invertase Activities in Soybean (*Glycine Max* [L.] Merr.) Roots." *Journal of Plant Physiology* 153 (1-2) (January): 255–257.
- Nunes, Cátia, Liam E O'Hara, Lucia F Primavesi, Thierry L Delatte, Henriette Schluempmann, Govert W Somsen, Anabela B Silva, Pedro S Fevereiro, Astrid Wingler, and Matthew J Paul. 2013. "The Trehalose 6-phosphate/SnRK1 Signaling Pathway Primes Growth Recovery Following Relief of Sink Limitation." *Plant Physiology* 162 (3) (July): 1720–32. doi:10.1104/pp.113.220657.
- Nunes, Cátia, Lucia F Primavesi, Mitul K Patel, Eleazar Martinez-Barajas, Stephen J Powers, Ram Sagar, Pedro S Fevereiro, Benjamin G Davis, and Matthew J Paul. 2013. "Inhibition of SnRK1 by Metabolites: Tissue-Dependent Effects and Cooperative Inhibition by Glucose 1-Phosphate in Combination with Trehalose 6-Phosphate." *Plant Physiology and Biochemistry : PPB / Société Française de Physiologie Végétale* 63 (February): 89–98.
- O'Hara, Liam E, Matthew J Paul, and Astrid Wingler. 2013. "How Do Sugars Regulate Plant Growth and Development? New Insight into the Role of Trehalose-6-Phosphate." *Molecular Plant* 6 (2) (March): 261–74.**

- Ono, Kiyomi, Ichiro Terashima, and Akira Watanabe. 1996. "Interaction between Nitrogen Deficit of a Plant and Nitrogen Content in the Old Leaves." *Plant and Cell Physiology* 37 (8): 1083–1089.
- Paul, Matthew J, Deveraj Jhurreea, Yuhus Zhang, Lucia F Primavesi, Thierry Delatte, Henriette Schluepmann, and Astrid Wingler. 2010. "Upregulation of Biosynthetic Processes Associated with Growth by Trehalose 6-Phosphate." *Plant Signaling and Behavior* 5 (4): 386–392.
- Pellny, Till K, Oula Ghannoum, Jann P Conroy, Henriette Schluepmann, Sjeef Smeekens, John Andralojc, Klaus Peter Krause, Oscar Goddijn, and Matthew J Paul. 2004. "Genetic Modification of Photosynthesis with E. Coli Genes for Trehalose Synthesis." *Plant Biotechnology Journal* 2 (1): 71–82.
- Pilon-Smits, Elizabeth A H, Norman Terry, Tobin Sears, Hyeong Kim, Adel Zayed, Seongbin Hwang, Kees van Dun, Eline Voogd, Theo C Verwoerd, Ronny W H H Krutwagen, and Oscar J M Goddijn. 1998. "Trehalose-Producing Transgenic Tobacco Plants Show Improved Growth Performance under Drought Stress." *Journal of Plant Physiology* 152 (4-5) (January): 525–532.
- Polge, Cécile, and Martine Thomas. 2007. "SNF1/AMPK/SnRK1 Kinases, Global Regulators at the Heart of Energy Control?" *Trends in Plant Science* 12 (1) (January): 20–8.**
- Ramon, Matthew, Ive De Smet, Lies Vandesteene, Mirande Naudts, Barbara Leyman, Patrick Van Dijck, Filip Rolland, Tom Beeckman, and Johan M Thevelein. 2009. "Extensive Expression Regulation and Lack of Heterologous Enzymatic Activity of the Class II Trehalose Metabolism Proteins from Arabidopsis Thaliana." *Plant, Cell & Environment* 32 (8) (August): 1015–32.
- Redillas, Mark C F R, Su-Hyun Park, Jang Wook Lee, Youn Shic Kim, Jin Seo Jeong, Harin Jung, Seung Woon Bang, Tae-Ryong Hahn, and Ju-Kon Kim. 2011. "Accumulation of Trehalose Increases Soluble Sugar Contents in Rice Plants Conferring Tolerance to Drought and Salt Stress." *Plant Biotechnology Reports* 6 (1) (December 30): 89–96.
- Richards, A B, S Krakowka, L B Dexter, H Schmid, A P M Wolterbeek, D H Waalkens-Berendsen, A Shigoyuki, and M Kurimoto. 2002. "Trehalose: A Review of Properties, History of Use and Human Tolerance, and Results of Multiple Safety Studies." *Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association* 40 (7) (July): 871–98.**
- Roessner, Ute, Cornelia Wagner, Joachim Kopka, Richard N Trethewey, and Lothar Willmitzer. 2000. "Simultaneous Analysis of Metabolites in Potato Tuber by Gas Chromatography ± Mass Spectrometry." *Plant Journal* 23 (1): 131–142.
- Rontein, Denis, Gilles Basset, and Andrew D Hanson. 2002. "Metabolic Engineering of Osmoprotectant Accumulation in Plants." *Metabolic Engineering* 4 (1) (January): 49–56.
- Rook, F, N Gerrits, A Kortstee, M van Kampen, M Borrias, P Weisbeek, and S Smeekens. 1998. "Sucrose-Specific Signalling Represses Translation of the Arabidopsis ATB2 bZIP

- Transcription Factor Gene.” *The Plant Journal : For Cell and Molecular Biology* 15 (2) (July): 253–63.
- Rook, F, P Weisbeek, and S Smeekens. 1998. “The Light-Regulated Arabidopsis bZIP Transcription Factor Gene ATB2 Encodes a Protein with an Unusually Long Leucine Zipper Domain.” *Plant Molecular Biology* 37 (1) (May): 171–8.
- Schluepmann, Henriette, Anja Van Dijken, Mahnaz Aghdasi, Barry Wobbes, and Matthew Paul. 2004. “Trehalose Mediated Growth Inhibition of Arabidopsis Seedlings Is Due to Trehalose-6-Phosphate Accumulation.” *Plant Physiology* 135 (June): 879–890.
- Schluepmann, Henriette, Till Pellny, Anja van Dijken, Sjeff Smeekens, and Matthew Paul. 2003. “Trehalose 6-Phosphate Is Indispensable for Carbohydrate Utilization and Growth in Arabidopsis Thaliana.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (11) (May 27): 6849–54.
- Seo, Hak Soo, Yeon Jong Koo, Jae Yun Lim, Jong Tae Song, Chung Ho Kim, Ju Kon Kim, Jong Seob Lee, and Yang Do Choi. 2000. “Characterization of a Bifunctional Enzyme Fusion of Trehalose-6-Phosphate Synthetase and Trehalose-6-Phosphate Phosphatase of Escherichia Coli Characterization of a Bifunctional Enzyme Fusion of Trehalose-6-Phosphate Synthetase and Trehalose-6-Phosphate P.” *Applied and Environmental Microbiology* 66 (6): 2484–2490.
- Serraj, R, and T R Sinclair. 2002. “Osmolyte Accumulation : Can It Really Help Increase Crop Yield under Drought Conditions ?” *Plant Cell and Environment* 25 (2): 333–341.
- Singer, Mike A, and Susan Lindquist. 1998. “Multiple Effects of Trehalose on Protein Folding in Vitro and in Vivo.” *Molecular Cell* 1 (5) (April): 639–48.
- Singh, Vijay, Joe Louis, Brian G Ayre, John C Reese, Venkatramana Pegadaraju, and Jyoti Shah. 2011. “TREHALOSE PHOSPHATE SYNTHASE11-Dependent Trehalose Metabolism Promotes Arabidopsis Thaliana Defense against the Phloem-Feeding Insect Myzus Persicae.” *The Plant Journal : For Cell and Molecular Biology* 67 (1) (July): 94–104.
- Stiller, Ibolya, Sándor Dulai, Mihály Kondrák, Réka Tarnai, László Szabó, Ottó Toldi, and Zsófia Bánfalvi. 2008. “Effects of Drought on Water Content and Photosynthetic Parameters in Potato Plants Expressing the Trehalose-6-Phosphate Synthase Gene of Saccharomyces Cerevisiae.” *Planta* 227 (2) (January): 299–308.
- Suárez, Ramón, Cecilia Calderón, and Gabriel Iturriaga. 2009. “Enhanced Tolerance to Multiple Abiotic Stresses in Transgenic Alfalfa Accumulating Trehalose.” *Crop Science* 49 (5): 1791.
- Tenhaken, Raimund, and Oliver Thulke. 1996. “Cloning of an Enzyme That Synthesizes a Key Nucleotide-Sugar Precursor of Hemicellulose Biosynthesis from Soybean: UDP-Glucose Dehydrogenase.” *Plant Physiology* 112 (3): 1127–1134.
- Tilman, D, J Fargione, B Wolff, C D’Antonio, A Dobson, R Howarth, D Schindler, W H Schlesinger, D Simberloff, and D Swackhamer. 2001. “Forecasting Agriculturally



- Driven Global Environmental Change.” *Science (New York, N.Y.)* 292 (5515) (April 13): 281–4.
- Timasheff, Serge N. 2002. “Protein Hydration , Thermodynamic Binding , and Preferential Hydration.” *Biochemistry* 41 (46): 13473–13482.
- Toroser, Dikran, Zvi Plaut, and Steven C Huber. 2000. “Regulation of a Plant SNF1-Related Protein Kinase by.” *Plant Physiology* 123 (1): 403–411.
- United Nations, Department of Economic and Social Affairs, Population Division (2013). *World Population Prospects: The 2012 Revision, Volume I: Comprehensive Tables ST/ESA/SER.A/336.*
- Usadel, Björn, Oliver E Bläsing, Yves Gibon, Fabien Poree, Melanie Höhne, Manuela Günter, Richard Trethewey, Beate Kamlage, Hendrik Poorter, and Mark Stitt. 2008. “Multilevel Genomic Analysis of the Response of Transcripts, Enzyme Activities and Metabolites in Arabidopsis Rosettes to a Progressive Decrease of Temperature in the Non-Freezing Range.” *Plant, Cell & Environment* 31 (4) (April): 518–47.
- Van Dijck, Patrick, Jose O Mascorro-gallardo, Martien de Bus, Katrien Royackers, Gabriel Iturriaga, and Johan M Thevelein. 2002. “Truncation of Arabidopsis Thaliana and Selaginella Lepidophylla Trehalose-6-Phosphate Synthase Unlocks High Catalytic Activity and Supports High Trehalose Levels on Expression in Yeast.” *Biochemical Journal* 366 (1): 63–71.
- Vogel, Guido, Roger A Aeschbacher, Joachim Müller, Thomas Boller, and Andres Wiemken. 1998. “Trehalose-6-Phosphate Phosphatases from Arabidopsis Thaliana: Identification by Functional Complementation of the Yeast tps2 Mutant.” *The Plant Journal : For Cell and Molecular Biology* 13 (5) (March): 673–83.
- Vogel, Guido, Oliver Fiehn, Louis Jean-richard-dit-bressel, Thomas Boller, Andres Wiemken, Roger A Aeschbacher, and Astrid Wingler. 2001. “Trehalose Metabolism in Arabidopsis : Occurrence of Trehalose and Molecular Cloning and Characterization of Trehalose-6-Phosphate Synthase Homologues.” *Journal of Experimental Botany* 52 (362): 1817–1826.
- Wang, Wangxia, Basia Vinocur, and Arie Altman. 2003. “Plant Responses to Drought, Salinity and Extreme Temperatures: Towards Genetic Engineering for Stress Tolerance.” *Planta* 218 (1) (November): 1–14. doi:10.1007/s00425-003-1105-5.**
- Wiese, Anika, Ferdi Gro, Uwe Sonnewald, Heike Deppner, Jens Lerchl, Ulrike Hebbeker, Ulf-ingo Flu, and Andreas Weber Y. 1999. “Spinach Hexokinase I Is Located in the Outer Envelope Membrane of Plastids.” *FEBS LETTERS* 461 (1-2): 13–18.
- Wingler, Astrid. 2002. “The Function of Trehalose Biosynthesis in Plants.” *Phytochemistry* 60 (5) (July): 437–40.**
- Wingler, Astrid, Thierry L Delatte, Liam E O’Hara, Lucia F Primavesi, Deveraj Jhurreea, Matthew J Paul, and Henriette Schluepmann. 2012. “Trehalose 6-Phosphate Is Required

- for the Onset of Leaf Senescence Associated with High Carbon Availability.” *Plant Physiology* 158 (3) (March): 1241–51.
- Wingler, Astrid, Thorsten Fritzius, Andres Wiemken, Thomas Boller, and Roger A Aeschbacher. 2000. “Trehalose Induces the ADP-Glucose Pyrophosphorylase Gene, ApL3, and Starch Synthesis in Arabidopsis.” *Plant Physiology* 124 (1) (September): 105–14.
- Xue, Gang-Ping, Maarten Kooiker, Janneke Drenth, and C Lynne McIntyre. 2011. “TaMYB13 Is a Transcriptional Activator of Fructosyltransferase Genes Involved in B-2,6-Linked Fructan Synthesis in Wheat.” *The Plant Journal : For Cell and Molecular Biology* 68 (5) (December): 857–70.
- Yancey, P H, M E Clark, S C Hand, R D Bowlus, and G N Somero. 1982. “Living with Water Stress: Evolution of Osmolyte Systems.” *Science (New York, N.Y.)* 217 (4566) (September 24): 1214–22.
- Yeo, E T, H B Kwon, S E Han, and J T Lee. 2000. “Genetic Engineering of Drought Resistant Potato Plants by Introduction of the Trehalose-6-Phosphate Synthase (TPS1) Gene from *Saccharomyces Cerevisiae*.” *Molecules and Cells* 10 (3): 263–268.
- Zang, B, H Li, W Li, X W Deng, and X Wang. 2011. “Analysis of Trehalose-6-Phosphate Synthase (TPS) Gene Family Suggests the Formation of TPS Complexes in Rice.” *Plant Molecular Biology* 76 (6): 507–522.
- Zhang, Yuhua, Lucia F Primavesi, Deveraj Jhurrea, P John Andralojc, Rowan a C Mitchell, Stephen J Powers, Henriette Schluempmann, Thierry Delatte, Astrid Wingler, and Matthew J Paul. 2009. “Inhibition of SNF1-Related Protein kinase1 Activity and Regulation of Metabolic Pathways by Trehalose-6-Phosphate.” *Plant Physiology* 149 (4) (April): 1860–71.