

2) Reprodukce rostlin

- g) Tvorba semen
- h) Dozrávání embrya
- i) Klíčení semen

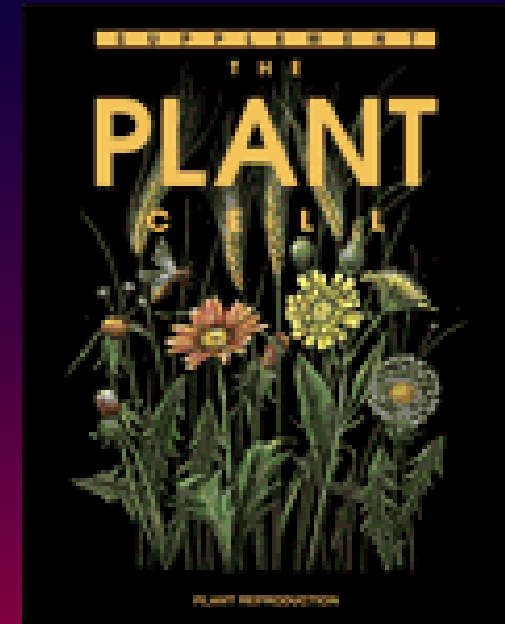
Speciální číslo Plant Cell, vol. 216 (June 2004) Supplement, pp. S1 – S245, zaměřené na Plant Reproduction (Reprodukce rostlin)

http://www.plantcell.org/content/vol16/suppl_1/index.shtml

UPDATE 2005

Ma H (2005) Annual Review of Plant Biology, Vol. 56: 393-434

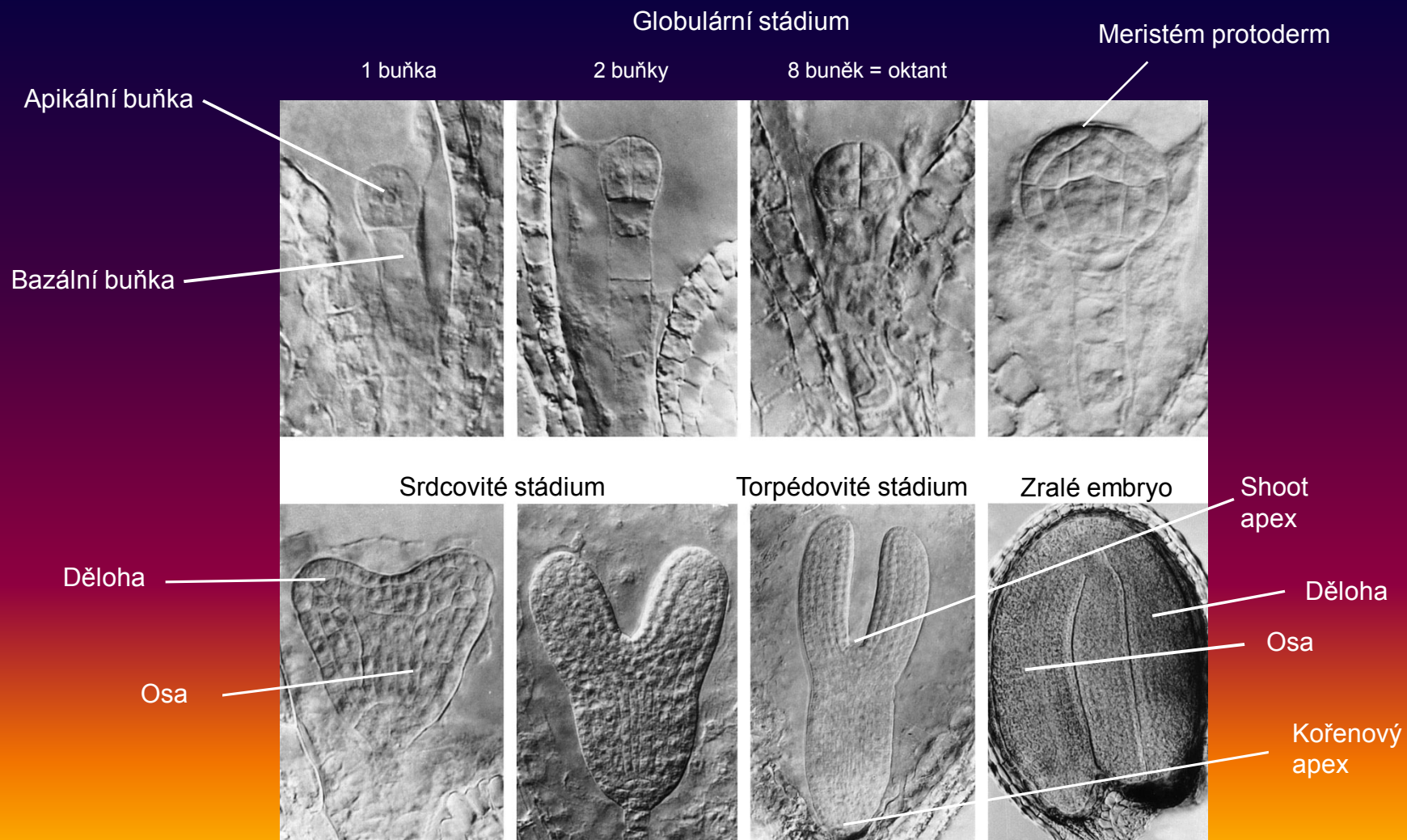
<http://arjournals.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.arplant.55.031903.141717>



g) Tvorba semen

Semeno krytosemenných: - embryo
- endosperm
- testa (obal)

Vývoj embrya

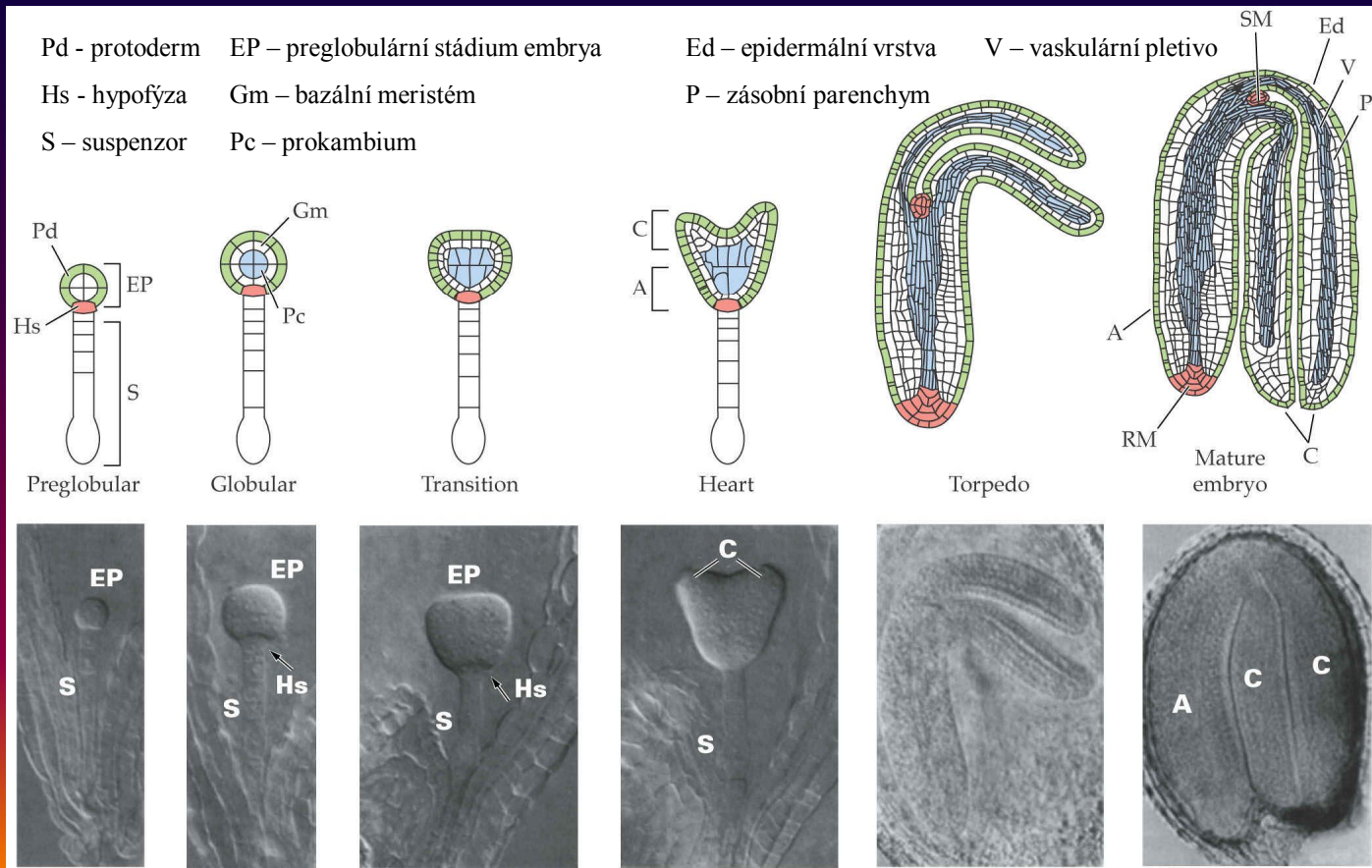


3 fáze embryogeneze na histologické úrovni:

- diferenciacie pletiv
- zväčšovanie buniek
- zrání embrya

Pd - protoderm EP – preglobulárne štádium embrya
 Hs - hypofýza Gm – bazálny meristém
 S – suspenzor Pc – prokambium

Ed – epidermálna vrstva V – vaskulárne pletivo
 P – zásobný parenchým



Diferenciace pletiv:

- několikanásobné dělení oplodněného vajíčka
- diferenciace a formování embryonických pletiv (4 stádia) včetně suspensoru

Zvětšování buněk:

- ukládání rezerv během torpédovitého stádia

Zrání embrya:

- ukončení vývojových procesů; embryo připraveno k vysychání

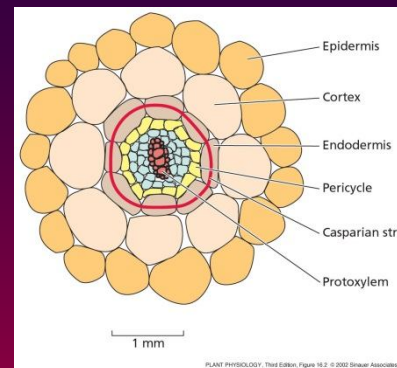
Identifikace mutantů s defektem v regulaci vývoje embrya

Genetická a molekulární charakteristika mutantů

Identifikace genů kontrolujících: **ranný vývoj embrya**
dozrávání embrya

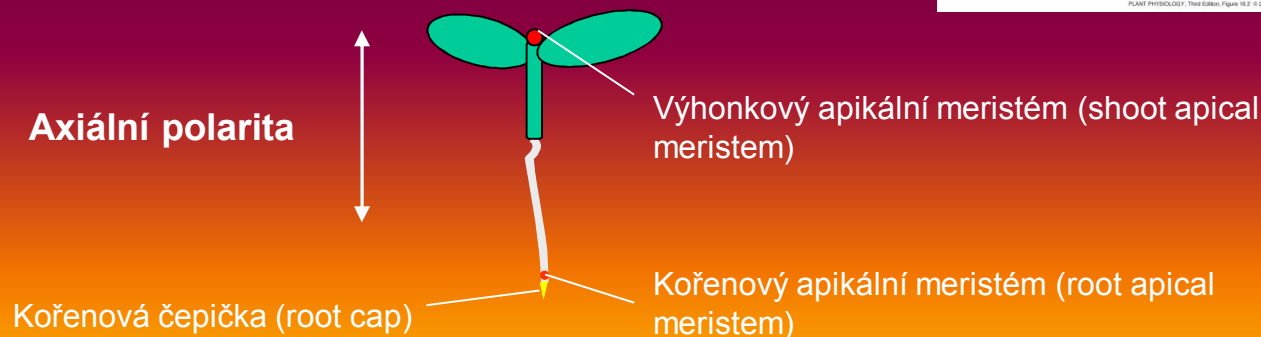
Embryogeneze zakládá:

- axiální (apical-basal) orientaci rostliny
- radiální podobu rostliny
- meristémy - aktivní až po klíčení



Radiální polarita

Axiální polarita



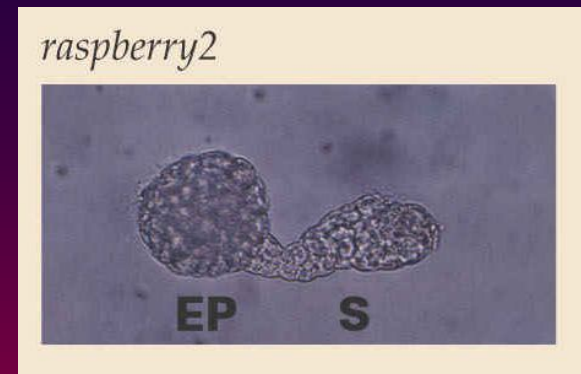
Geny nutné v ranných stádiích vývoje embrya

Mutant *raspberry2* – morfologická zástava vývoje embrya v globulárním stádiu; vytváří se však meristémy, které dokončují buněčnou diferenciaci; abnormální vývoj suspensoru



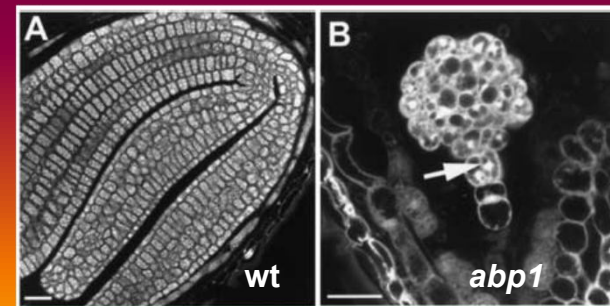
RASPBERRY2 – kontroluje diferenciaci pletiv a morfologický vývoj

Yadegari R (1994) Plant Cell 6: 1713-1729

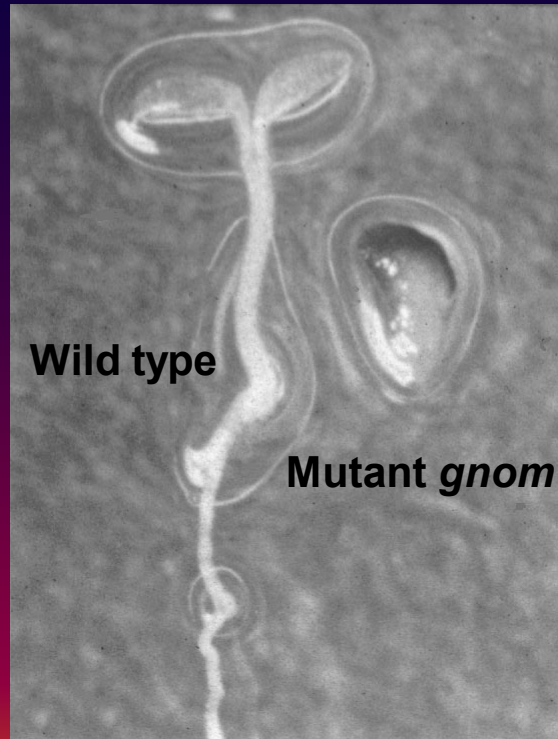


Ztráta funkce **ABP1 (Auxin-Binding Protein1)**: zastavení vývoj embrya *Arabidopsis* v globulárním stádiu

Chen JG (2001) Genes & Development 15: 902-911



Geny zapojené v axilární polaritě

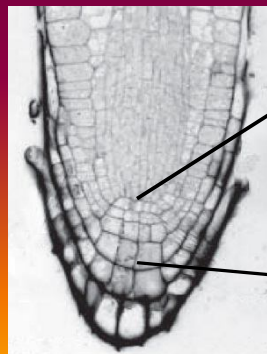
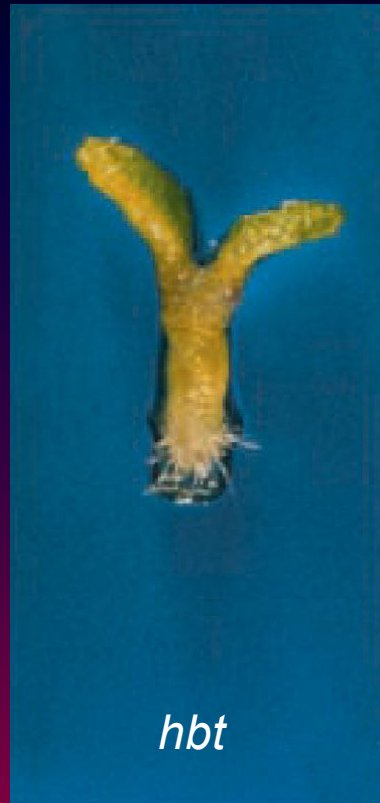


gnom - mutant
GNOM - gen
GNOM - protein

Mutant *gnom* nevytváří dělohy a kořen = chybí axilární polarita



Gen *GNOM* kontroluje apikálně-bazální polaritu



Quiescent centrum

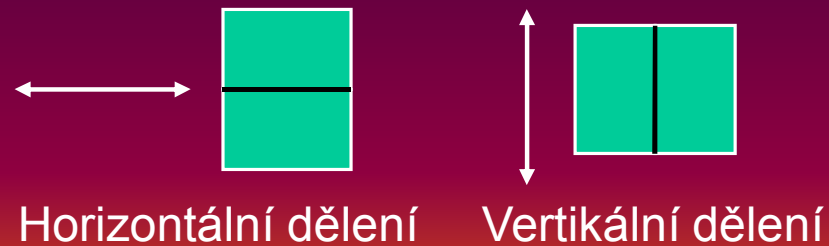
Kolumela



U mutanta **hobbit (hbt)** se buňky prekursoru hypofýzy dělí vertikálně místo horizontálně => hypofýza se nevytváří => kořenový meristém nemá **quiescent centrum** a kolumelu = kořen se neprodužuje



Gen **HOBBIT (HBT)** hraje roli ve formování apikálního kořenového meristému

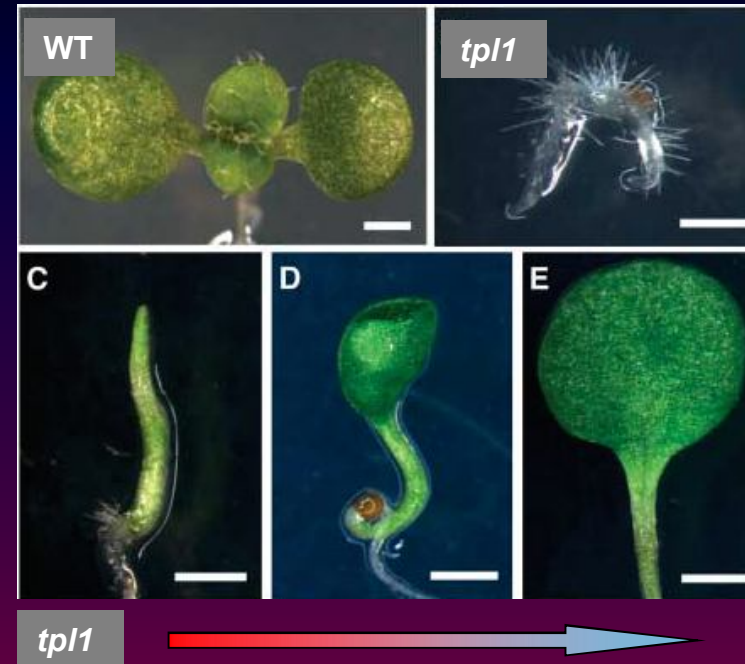


Quiescent (klidné) centrum = centrální buňky meristému, které se dělí pomaleji než buňky okolní.

Mutant *topless1* – místo děloh se tvoří kořen; chybí exprese genů spojených s vývojem apikální části embrya, kdežto exprese genů spojených s vývojem bazální části embrya expanduje do apikální části.



TOPLESS1 (TPL1) - nutný k potlačení exprese genů indukujících vývoj kořenů v apikální části embrya = umožňuje správný vznik stonkového pólu embrya (rostliny)



Snižování teploty

UPDATE 2008

Szemenyei et al. (2008) Science 319: 1384-1386

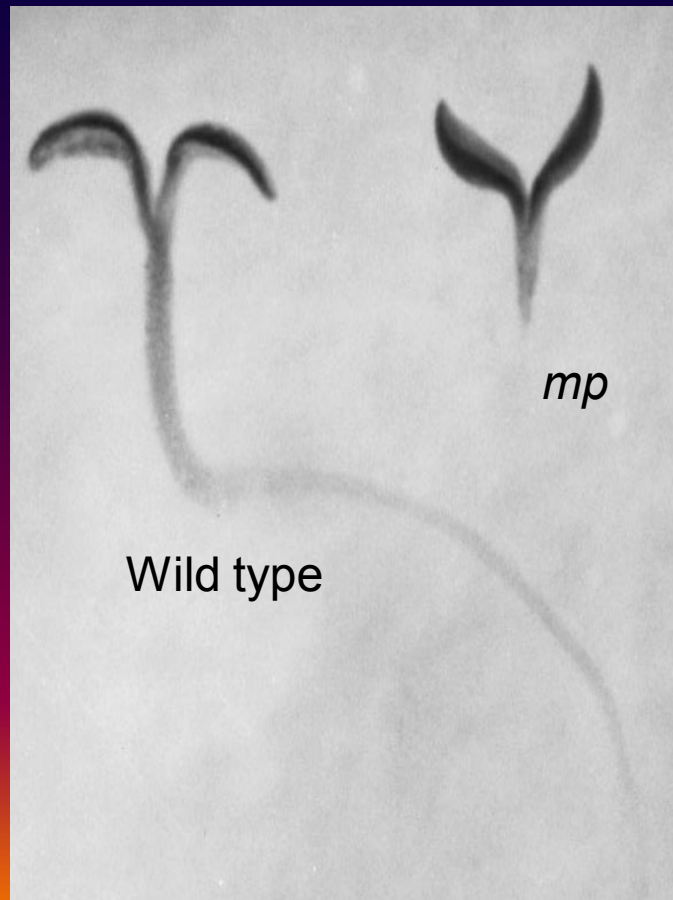
ARF5/MP - transkripční faktor
(auxin-responsive faktor)

IAA12/BDL - represor

TPL - co-represor



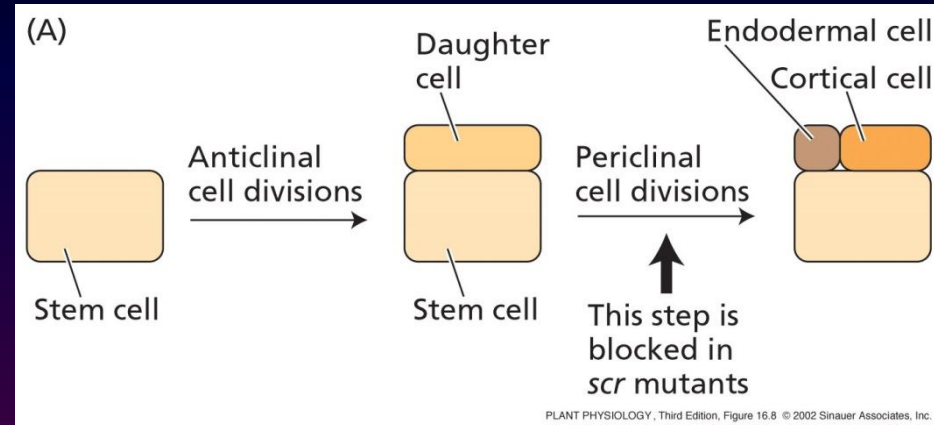
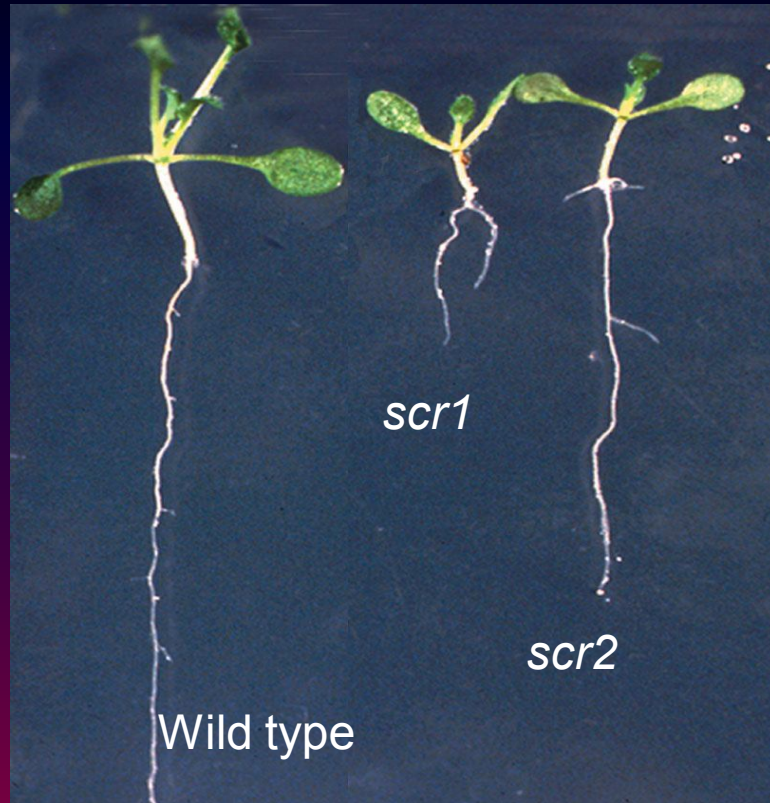
Geny zapojené v radiální polaritě



Mutant ***monopteros (mp)*** nevytváří kořen; globulární embryo netvoří prokambium = část, která dává vznik embryonálnímu kořenu



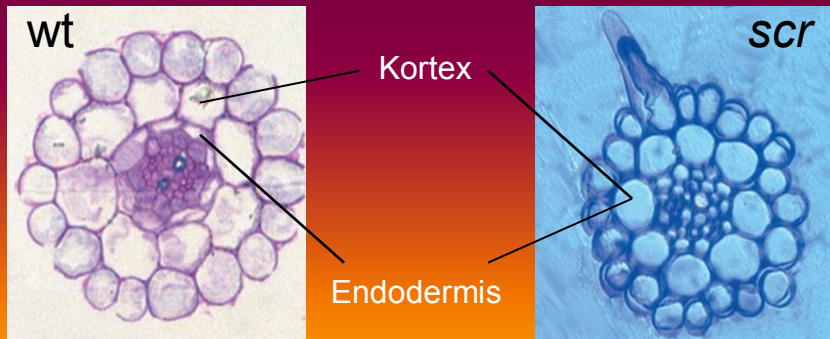
Gen ***MONOPTEROS (MP)*** je nutný k formování embryonálního kořene



Mutanti **scarecrow (*scr*)** a **short root (*shr*)** ukazují blokádu periklinálního dělení kmenových buněk v kořeni => kortikální a endodermální buňky splývají => kořen je křehký => roste pomalu



Geny **SCR** a **SHR** jsou nutné k založení radiálního uspořádání kořene během embryogeneze a post-embryogeneze



Další geny určující vývoj embrya

PLETHORA (PLT) – funkčně doplňuje *SCR* a *SHR*; transkripční faktor - hraje roli v určení pozice kořenových kmenových buněk

UPDATE 2007

Galinka C et al. (2007) Nature 449: 1053-1057

Proteiny *PLT1* – *PLT4* spolu interagují – síla interakce (= gradient exprese) určuje osud kmenových buněk

Hladina exprese *PLT* genů: **Vysoká** - udržování identity kmenových buněk

Nízká - stimulace mitotické aktivity dceřiných kmenových buněk

Nejnižší - diferenciaci kmenových buněk

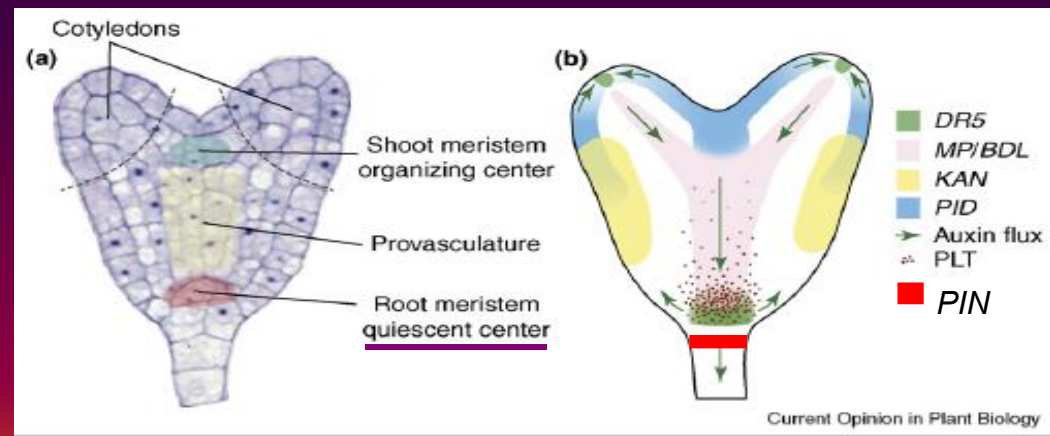
PLT1 - *PLT3* kontrolují expresi genů *PIN* **PLETHORA** → **PIN**

UPDATE 2008

Nawy T et al. (2008) *Curr Opin Plant Biol* 11: 28-33

Maximum akumulace proteinů PLETHORA v **quiescent centru** – gradient akumulace určuje osud kmenových buněk

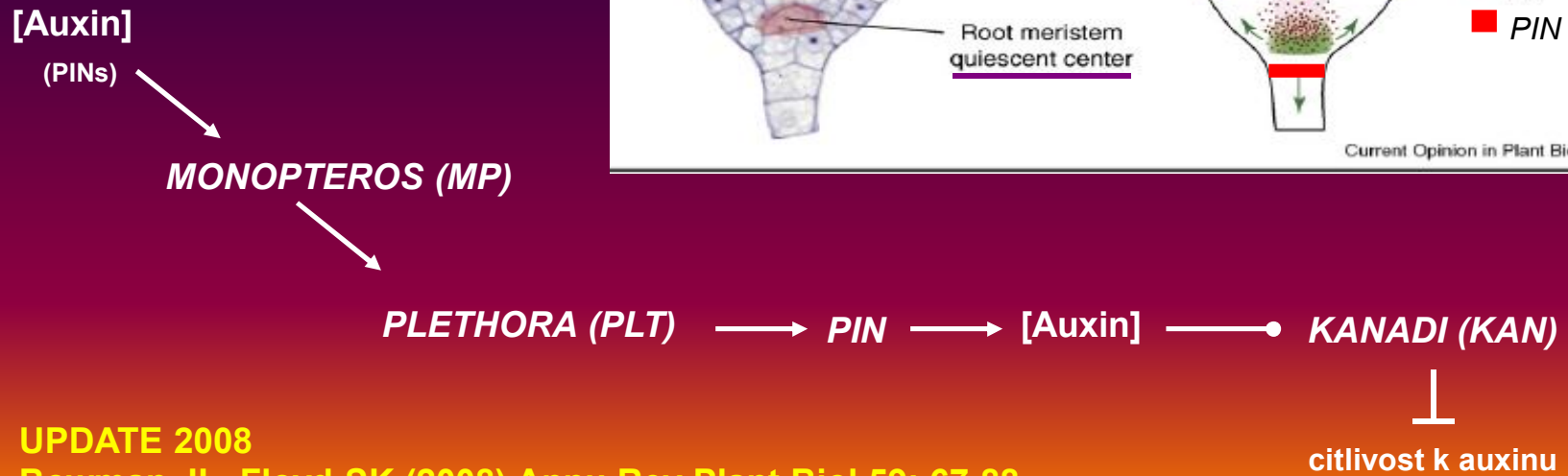
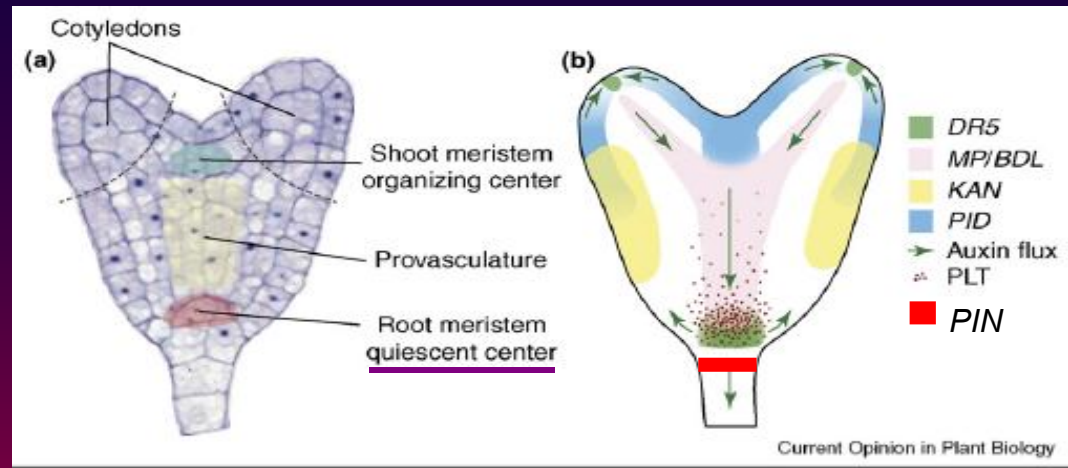
Exprese *PLETHORA* – pravděpodobně určována auxinem prostřednictvím *MONOPTEROS*



KANADI – kontroluje radiální polaritu embrya

Časová a prostorová exprese **KANADI** je kontrolována auxinem prostřednictvím PIN proteinů

KANADI potlačuje citlivost k auxinu na okrajích děloh



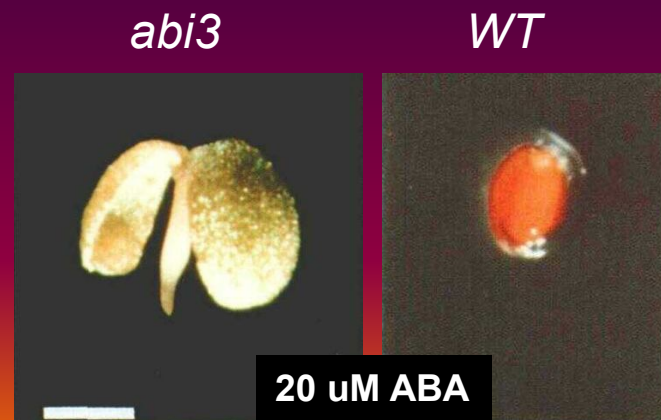
UPDATE 2008

Bowman JL, Floyd SK (2008) Annu Rev Plant Biol 59: 67-88

Geny kontrolující pozdní fázi vývoje embrya - dozrávání

Embryo se stává dormantním, když má asi 20 tisíc buněk. Dormance nastává při ztrátě vody a zastavení transkripce a syntézy proteinů v embryu a semeni. Aby se buňka dostala do dormance musí dojít k expresi určitých genů:

ABI3 (*abscisic acid insensitive 3*) – kontroluje expresi zásobních proteinů, které se ukládají v dělohách během dozrávací fáze embryogeneze; mutant je necitlivý k ABA



Rohde A et al. (2000) Plant Cell 12: 35-52

FUSCA3 (FUS3) a ***LEAFY COTYLEDON1 (LEC1)*** – kódují proteiny, které fungují jako kritické komponenty v přenosu vnějších i vnitřních signálů během vývoje embrya. Mutace v těchto genech mají za následek neschopnost syntetizovat zásobní proteiny a lipidy => neschopnost vydržet vysušení => předčasné klíčení

Gen ***FUS3*** – sensitivní k hormonu ABA, gibberellinům a auxinu; defekt v genu *FUS3* má za následek špatné dozrání embrya a tím špatné formování děloh. Místo děloh se vytváří vegetativní listy.

Gazzarrini S et al. (2004) *Developmental Cell* 7: 373-385

<http://www.developmentalcell.com/content/article/abstract?uid=PIIS1534580704002746>



Transgenní rostlina s overexprimovaným genem *FUS3* (8 týdnů)

Interakce *FUS3*, *ABI3* a hormonů během embryonického vývoje

- Exprese *FUS3* v epidermis je závislá na gradiendu auxinu
- *FUS3* inhibuje funkce zprostředkované gibereliny => inhibice programu klíčení
- *FUS3* indukuje syntézu ABA => zpětná vazba = ABA stabilizuje funkci *FUS3*
- ABA migruje do mezofylu a indukuje spolu s *ABI3* akumulaci zásobních proteinů (SSP – seed storage proteins)

UPDATE 2010

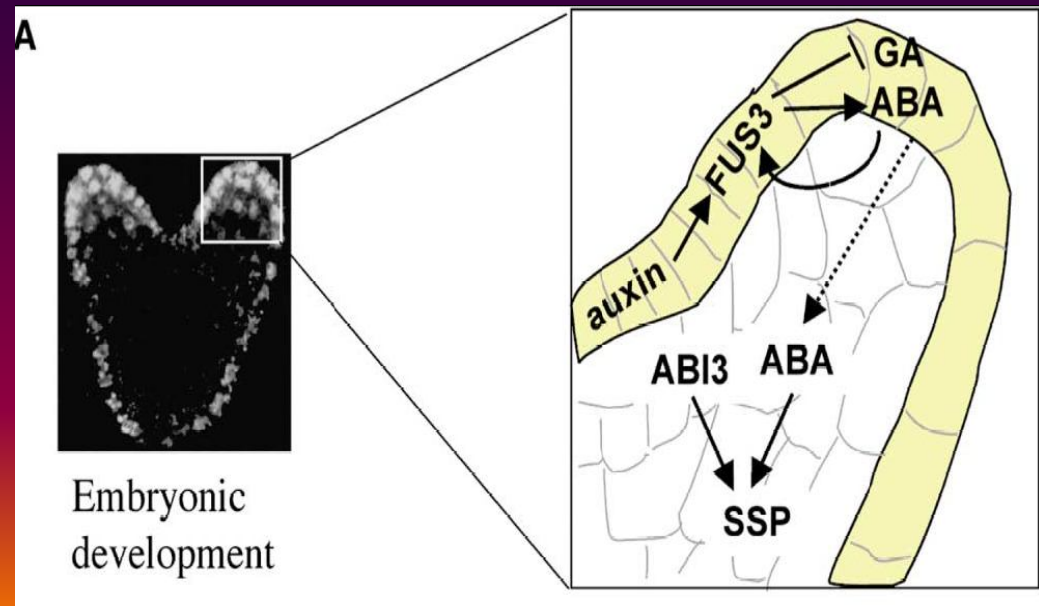
Lu QS et al. (2010) *Plant Journal* 64: 100-113

C-terminální doména proteinu *FUS3* inhibuje hladinu své vlastní mRNA a následně syntézu proteinu *FUS3*.

Ranná fáze vývoje embrya: [protein *FUS3*] ↑

Prostřední a pozdní fáze vývoje embrya:
[protein *FUS3*] ↓

C-terminální doména proteinu *FUS3* zprostředkuje citlivost k ABA a GAs.

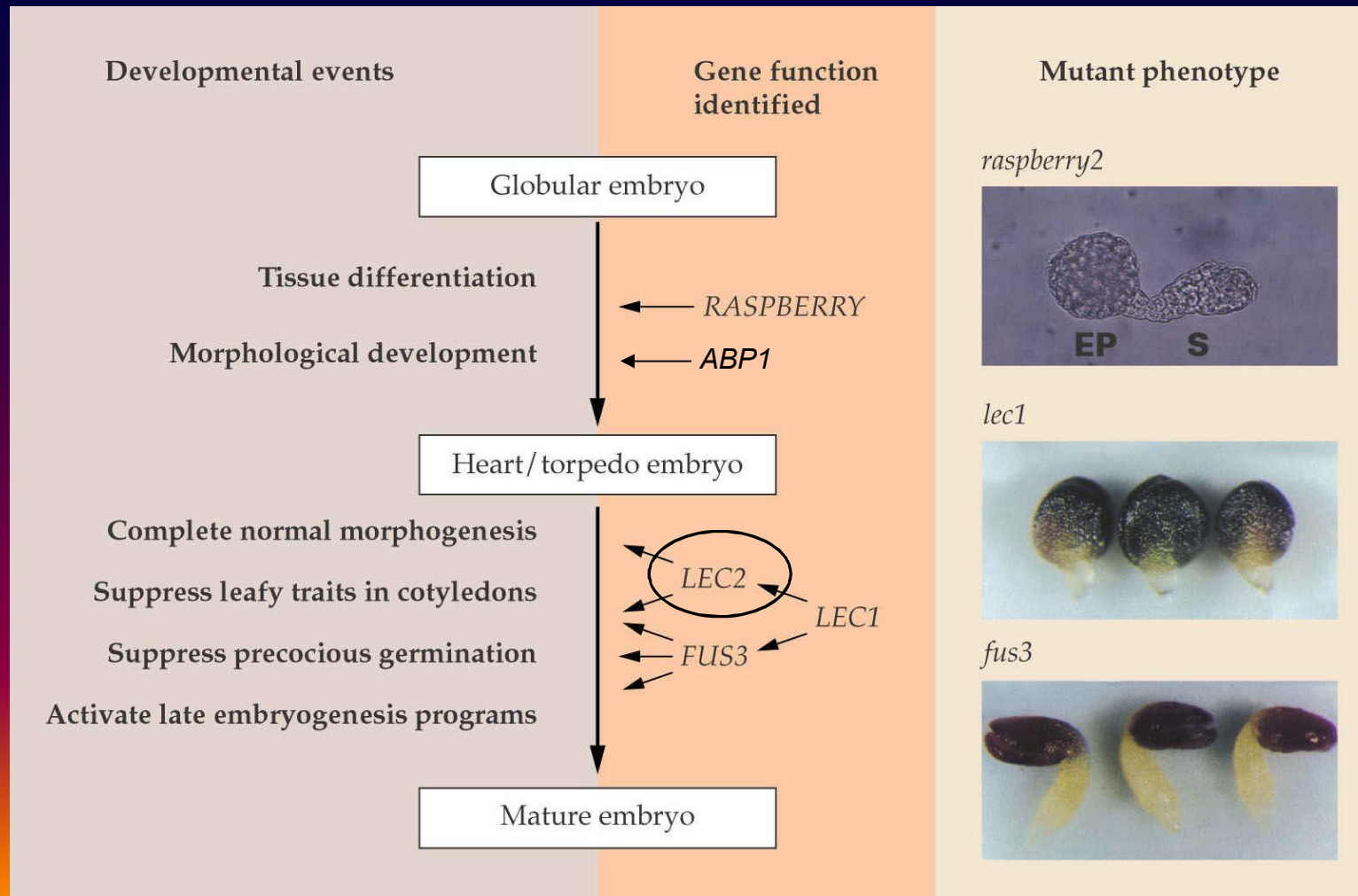


LEC1 – embryo rostliny s mutací v tomto genu není schopno přežít vysušení a proto není schopno vstoupit do dormance; uměle vypěstované embryo se vyvine v rostlinku, která má místo děloh listy a chybí jí zásobní protein 7S.

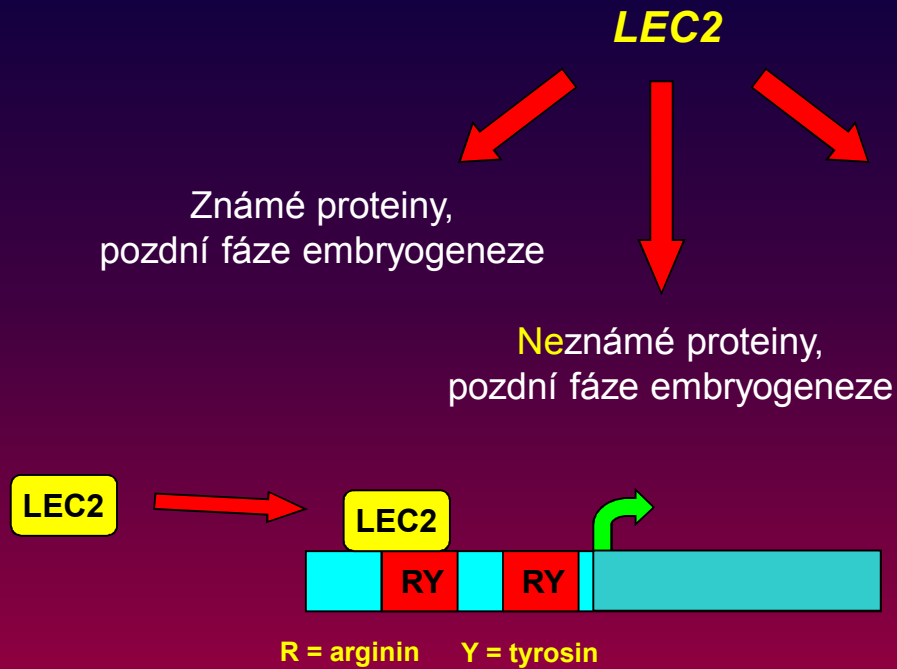
Gen **LEC1** je nutný pouze pro embryogenezi a funguje jako represor vegetativního vývoje.



Geny kontrolující ranný a pozdní vývoj embrya



LEAFY COTYLEDON2 – nezbytný pro embryogenezi v pozdní dozrávací fázi vývoje embrya



LEC2 hraje pravděpodobně roli v somatické embryogenezi, a to prostřednictvím auxinů

Vývoj endospermu

Endosperm – tkáň shromažďující rezervy do doby, kdy je vyvíjející se embryo absorbuje do svých děloh

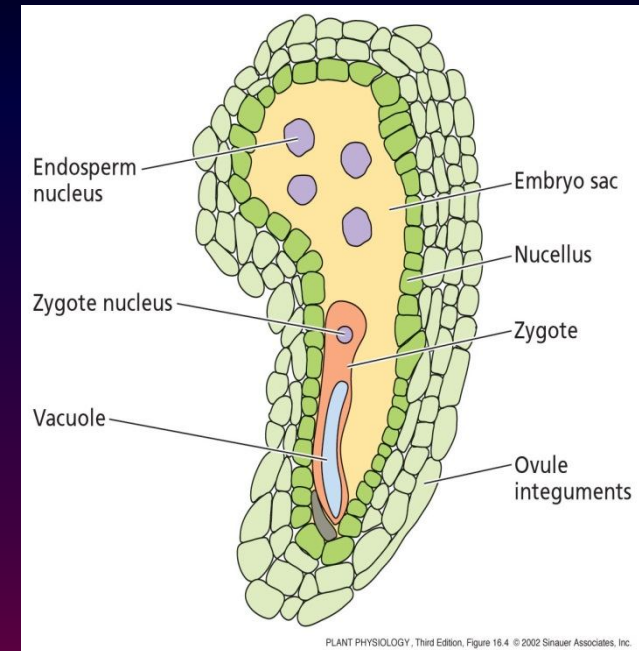
Semena s **nevýrazným endospermem** (salát, rajče) – minimální zásobní funkce endospermu

Semena s **výrazným endospermem** (fazole) – endosperm je hlavní zásobárna; obsahuje živé buňky s proteiny a tuky; obsahuje mobilizační enzymy

Jaderný vývoj endospermu – endosperm prodělává volná jaderná dělení před tím, než se vytvoří buněčná stěna - obiloviny

Buněčný vývoj endospermu – neexistuje stádium volného jádra

MEDEA – protein kontrolující vývoj endospermu a navíc expresi sama sebe (MEDEA v ♀ kontroluje MEDEA v ♂ = udržuje ho v klidu)



Mutace ve vývoji endospermu

- zasahující biosyntézu rezerv
- zasahující morfologii endospermu

Mutant **defective endosperm (de)** – ukazuje potlačenou tvorbu proteinu zein v endospermu kukuřice. **DE** gen kontroluje tvorbu signálního peptidu v 19 kD α -zein proteinu

Kim CS et al (2004) Plant Physiol 134: 380-387 <http://www.plantphysiol.org/cgi/reprint/134/1/380>

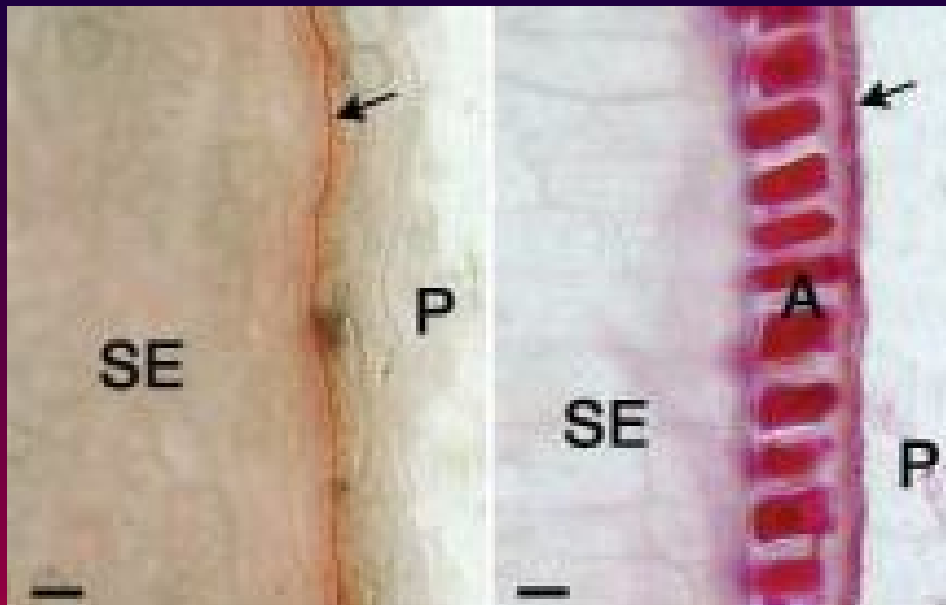
Mutant **crinkly 4 (cr4)** – nevytváří aleuronovou vrstvu; gen **CR4** kóduje receptor-like kinázu

UPDATE 2008

Bethke PC et al. (2008) Plant Physiology 143: 1173 - 1188

Aleuronová vrstva reaguje k NO, GAs, ABA a je dostatečná a zároveň nezbytná pro dormanci semene

Mutant **defective kernel 1 (dek1)** – nevytváří aleuronovou vrstvu, místo ní vytváří škrobové buňky; gen **DEK1** udržuje a omezuje osud aleuronových buněk daný genem **CR4**.

*dek1*

WT

SE = buňky endospermu

P = perikarp

A = aleuronové buňky

Mutant ***supernumerary aleurone layers 1 (sal1)*** – místo jedné vytváří 7 aleuronových vrstev; gen ***SAL1*** kóduje protein homologní s lidským CHMP1 proteinem zapojeným v transportu membránových vezikul



Shen B et al (2003) PNAS 100: 6552-6557

UPDATE 2008

Tian Q et al. (2008) Plant Cell 19: 3127 - 3145

Model vzájemné kooperace genů *DEK1*, *CR4* a *SAL1* ve vývoji aleuronu a endospermu:

- *DEK1* přijímá a přenáší signál o tom, kde se aleuronová vrstva má tvořit.
- *CR4* zprostředkuje pohyb tohoto signálu mezi aleuronovými buňkami.
- *SAL1* udržuje potřebnou koncentraci proteinů *DEK1* a *CR4* v plazma membráně pomocí recyklace či degradace endozomů.

Ukládání rezerv během vývoje semene

Uhlík (C) a dusík (N)

Mezi embryem nebo endospermem a mateřskou rostlinou neexistuje přímé vaskulární spojení. Vaskulární systém končí na povrchu semene.

Transport asimilátů z rodičovských pletiv do apoplastu a pak endospermu se děje pasivním transportem



Zásobní proteiny

Albuminy – ve vodě rozpustné proteiny

Globuliny - proteiny extrahovatelné v solných roztocích

Prolaminy - proteiny rozpustné ve směsi vody a alkoholu

Gluteliny - proteiny rozpustné v kyselinách a zásadách

h) Dozrívání embrya

Zrání embrya se vyznačuje tím, že se embryo stává dormantním. Aby se buňka dostala do dormance musí dojít k expresi genů a syntéze proteinů spojených s tolerancí proti vysychání. Exprese těchto genů je indukována ABA.

- heat-shock proteiny
- LEA proteiny
- proteiny příbuzné LEA – geny obsahují ABRE motiv

Mechanismus tolerance
k vysychání?



LEA proteiny mohou vázat buněčné komponenty formováním amorfních spirál, chránících obsah buňky od poškození


Syntéza těchto proteinů se zvyšuje v embryu torpédovitého stádia, kdy se syntéza zásobních proteinů snižuje.


Tolerance k vysychání může být indukována akumulací oligosacharidů – rafinózy. Poměr sacharóza : rafinóza = 20 : 1 => tolerance k vysychání.

Vysychající semeno: [ABA]  => citlivost k ABA 

Rehydratace: suché semeno přepíná vývojový program na program klíčící



mRNAs spojené s klíčícím programem 

mRNAs spojené s vývojovým programem 

Přepínání programů je regulováno několika cestami, včetně regulací změn v citlivosti genů (promotorů) k ABA

Změny při přepnutí programu z vývojového na klíčící

Hormonal level

- Decline in ABA production
- Increase in ABA destruction/sequestration
- Decline in ABA sensitivity



Genomic level

Storage protein, *Lea* genes, etc.:

- Transcriptional inactivation
- Loss of promoter activity
- Loss of trans-acting factors

Germination/postgermination genes:

- Transcriptional activation
- Activation of promoters
- Synthesis of trans-acting factors



Cytoplasmic level

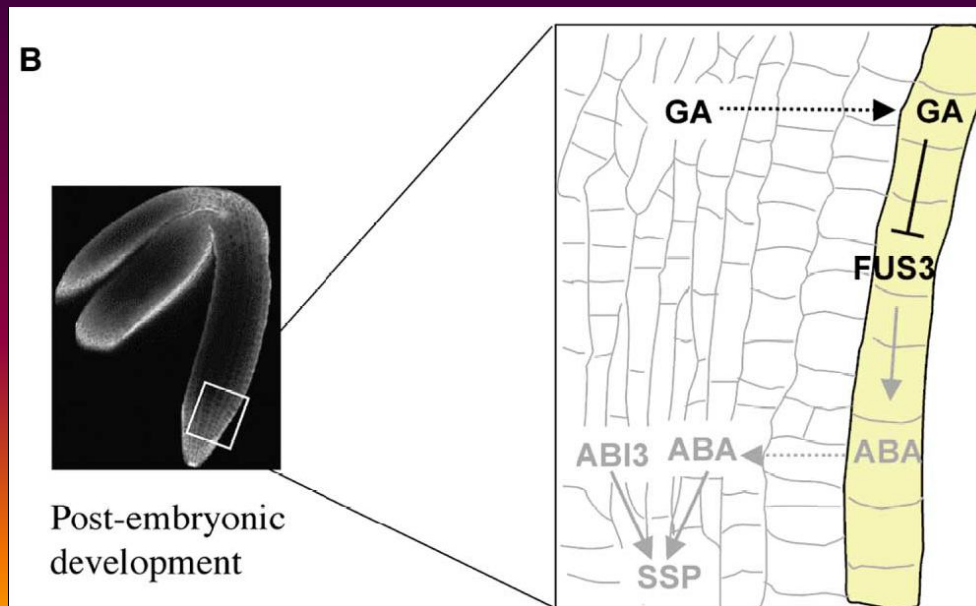
- Destruction of residual developmental mRNAs
- Translation of stored and newly synthesized germination-related mRNAs
- Expression of postgermination genes

i) Klíčení semen

Klíčení – začíná tehdy, když klidné a suché semeno začne nabírat vodu = **imbibice**; končí prodlužováním embryonické osy.

Funkce **FUS3** během postembryonického vývoje - klíčení embrya

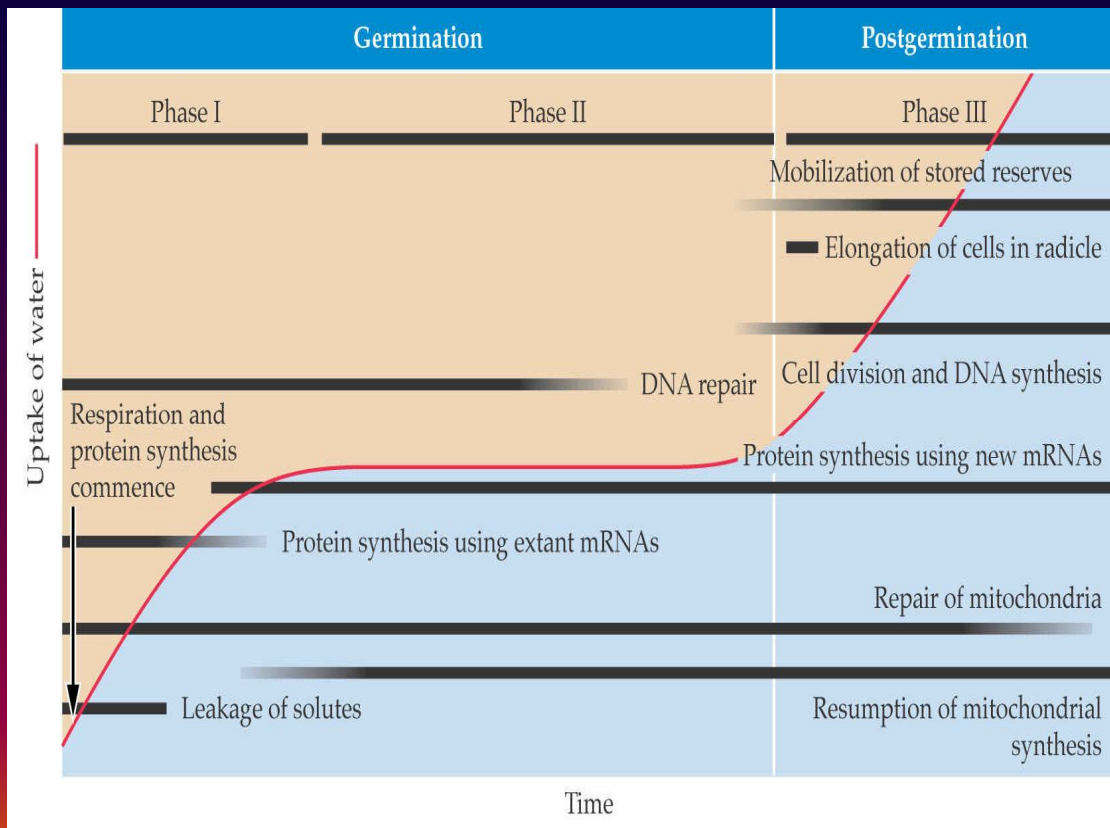
- Po imbibici se zvyšuje hladina giberelinů (GA) v embryu.
- GA migrují do epidermis a zastavují funkci **FUS3** => potlačení embryonického vývoje kontrolovaného genem **FUS3** => nastartování vegetativního vývoje = klíčení (růstu)



Viditelné klíčení je ukončeno tehdy, když struktury obklopující embryo jsou protrženy kořínkem.

Po ukončení klíčení jsou rezervy v zásobních pletivech mobilizovány – podpora růstu rostliny.

Časový sled událostí spojených s klíčením a fází po ukončení klíčení



Fáze I

Rychlé nasátí vody semenem => výtok rozpuštěných látek a metabolitů

Fáze II

Stabilizace množství vody v semeni => výtok ustává

Oprava mitochondrií a opětovné zahájení jejich syntézy

Syntéza proteinů z nově vzniklé mRNA

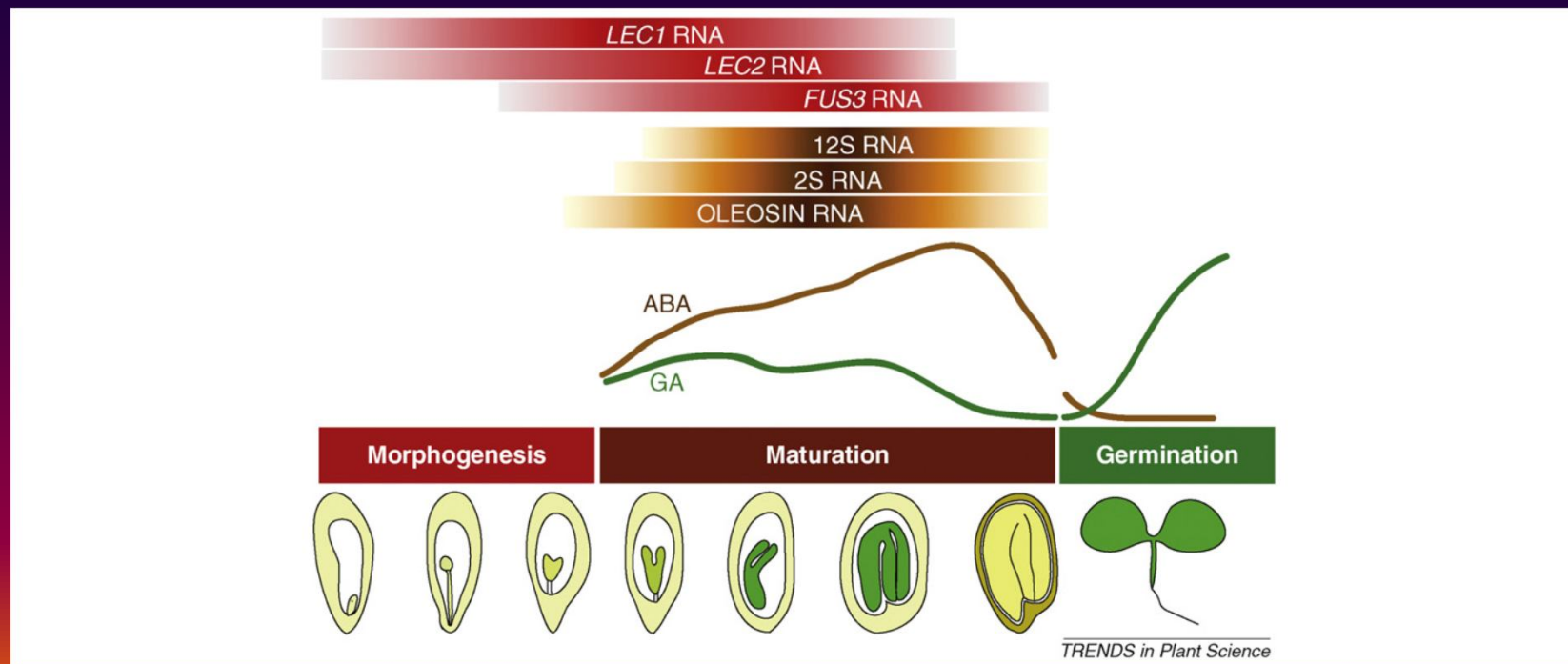
Fáze III

Buněčné dělení a prodlužování, syntéza DNA, mobilizace rezerv => zvyšování FW semen

UPDATE 2008

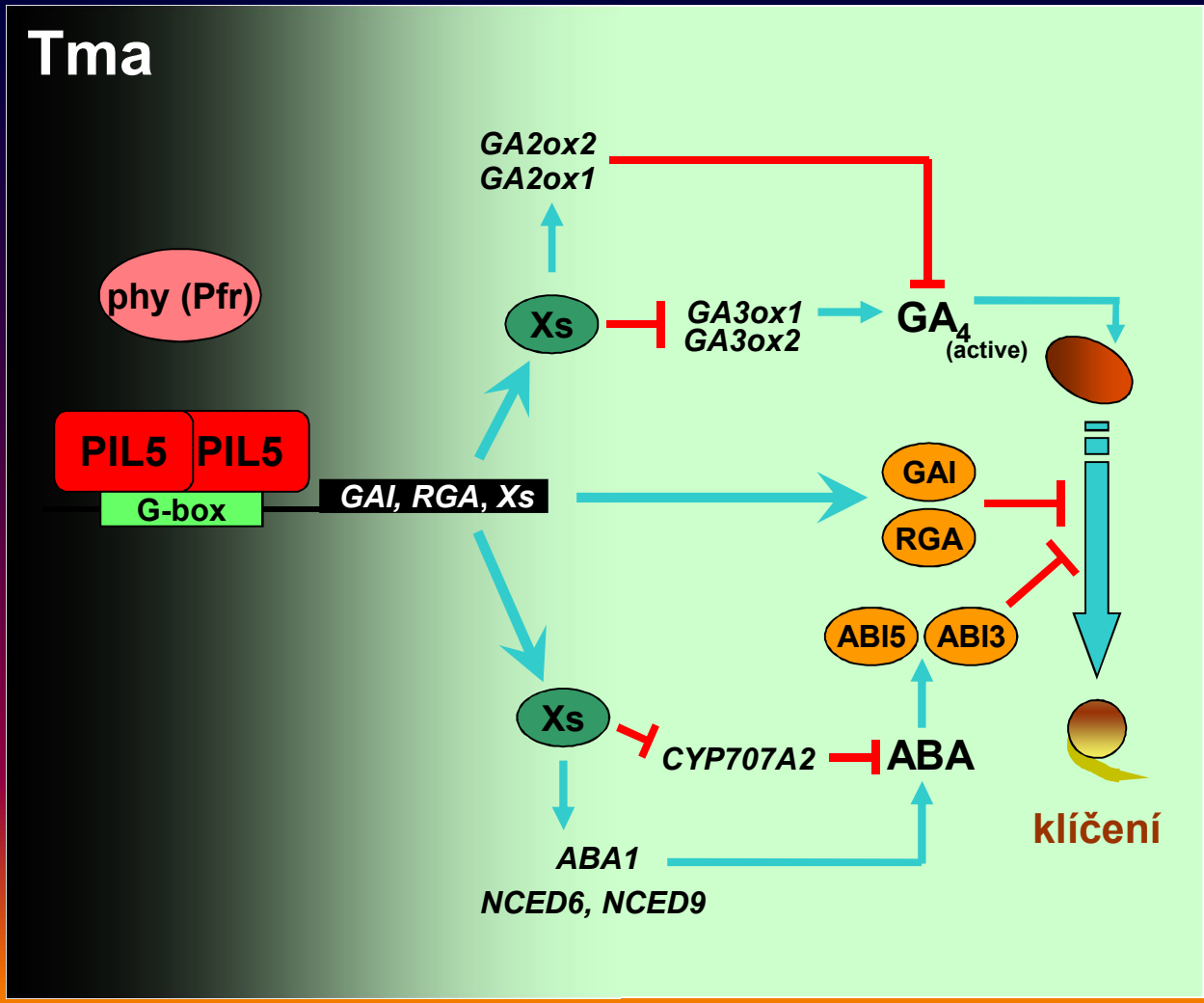
Bryabrook SA, Harada JJ (2008) TIPS 13: 148: 624 - 630

Nové review o úloze transkripčních faktorů LEC ve vývoji embrya



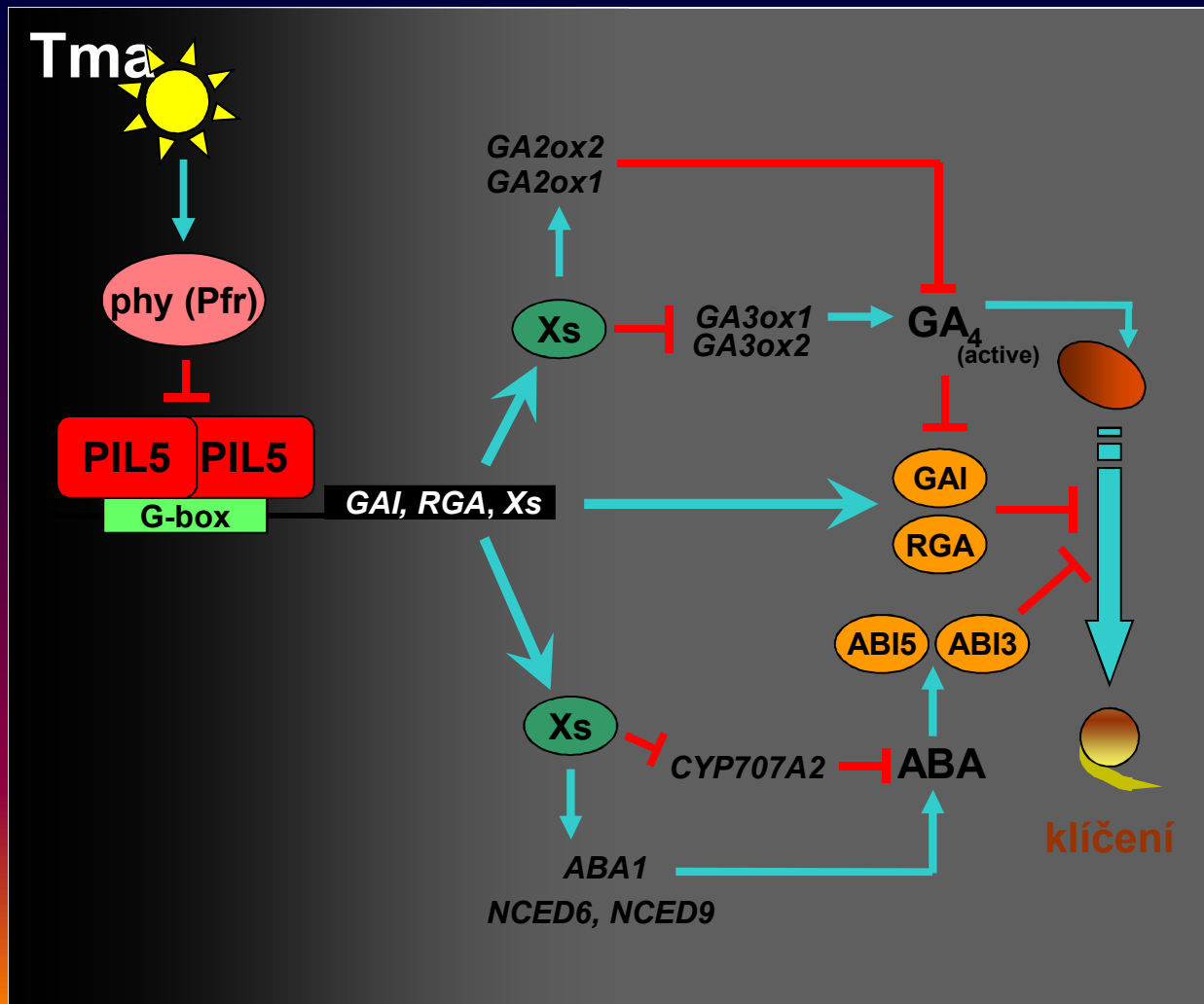
Indukce klíčení světlem - regulace biosyntézy a signalizace giberelinů a ABA (*Arabidopsis*)

Tma



- PIL5** Transkripční faktory (aktivátory)
- Xs** Neznámý faktor X
- GA2ox2 } GA deaktivující geny
- GA2ox1 }
- GA3ox1 } GA biosyntetické geny
- GA3ox2 }
- GAI } DELLA proteiny
- RGA }
- ABA1 } ABA biosyntetické geny
- NCED6 }
- NCED9 }
- ABI5 } Transkripční faktory indukované ABA
- ABI3 }
- CYP707A2 ABA katabolický gen

Upraveno podle: Oh et al. (2007) Plant Cell 19: 1192-1208



PIL5 Transkripční faktory (aktivátory)

Xs Neznámý faktor X

GA2ox2 } GA deaktivující geny
GA2ox1 }

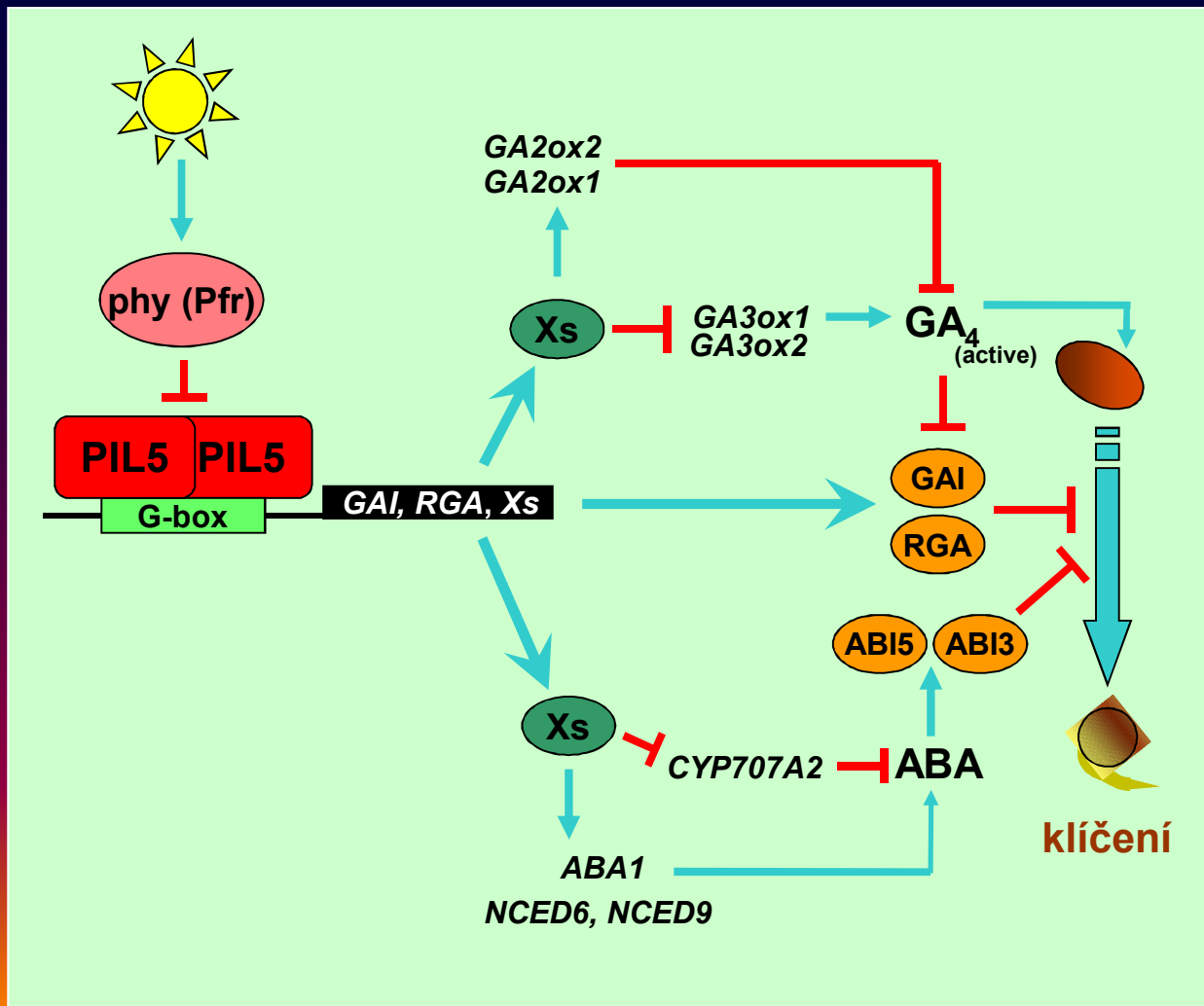
GA3ox1 } GA biosyntetické geny
GA3ox2 }

GAI } DELLA proteiny
RGA }

ABA1 } ABA biosyntetické geny
NCED6
NCED9 }

ABI5 } Transkripční faktory indukované ABA
ABI3 }

CYP707A2 ABA katabolický gen



- PIL5** Transkripční faktory (aktivátory)
- Xs** Neznámý faktor X
- GA2ox2 } GA deaktivující geny
- GA2ox1 }
- GA3ox1 } GA biosyntetické geny
- GA3ox2 }
- GAI** } DELLA proteiny
- RGA** }
- ABA1 } ABA biosyntetické geny
- NCED6 }
- NCED9 }
- ABI5** } Transkripční faktory indukované ABA
- ABI3** }
- CYP707A2 ABA katabolický gen