

2024

6) Reakce rostlin k abiotickým stresům

- a) Vodní deficit
- b) Zasolení. Úloha osmotického přizpůsobení v toleranci k suchu a zasolení.
- c) Vliv vodního deficitu a zasolení na membránový transport
- d) Geny indukované vodním stresem (suchem)
- e) Chladový stres

Hirt H, Shinozaki K (2010)
Plant Responses to Abiotic
Stress. Springer



Nejnovější review:

Obecné:

Dietz K-J, Vogelsang L (2023) Trends in Plant Science, August 23, 1-10

Munns R, Millar AH (2023) Journal of Experimental Botany 74: 4308-4323,

Zasolení:

Ali A et al. (2023) Trends in Plant Science 28: 1060-1069

Chladový stres:

Kidokoro S et al. (2022) Trends in Plant Science 27: 922-935

Martin Fellner

Laboratoř růstových regulátorů
PřF UP v Olomouci a ÚEB AVČR

Stresové faktory působící na rostliny:

Stres = vnější faktor, který vykonává vliv nevýhodný pro rostlinu

Biotické – vyvolané jinými organizmy

Abiotické – vznikají vlivem přemíry či deficitu fyzikálních
či chemických vlivů

- přebytek vody či sucho
- vysoká a nízká teplota
- mnoho či málo světla
- zasolení

Rychle působící (minuty): tepelný stres

**Pomalou působící (dny až měsíce) : nedostatek vody v půdě,
nedostatek minerálních látek**

**Pochopení mechanismů adaptace, aklimatizace a fyziologických procesů
fungujících při stresech je důležité v zemědělství a ekologii.**

Tolerance ke stresu = schopnost rostliny překonat pro ni nepříznivé podmínky

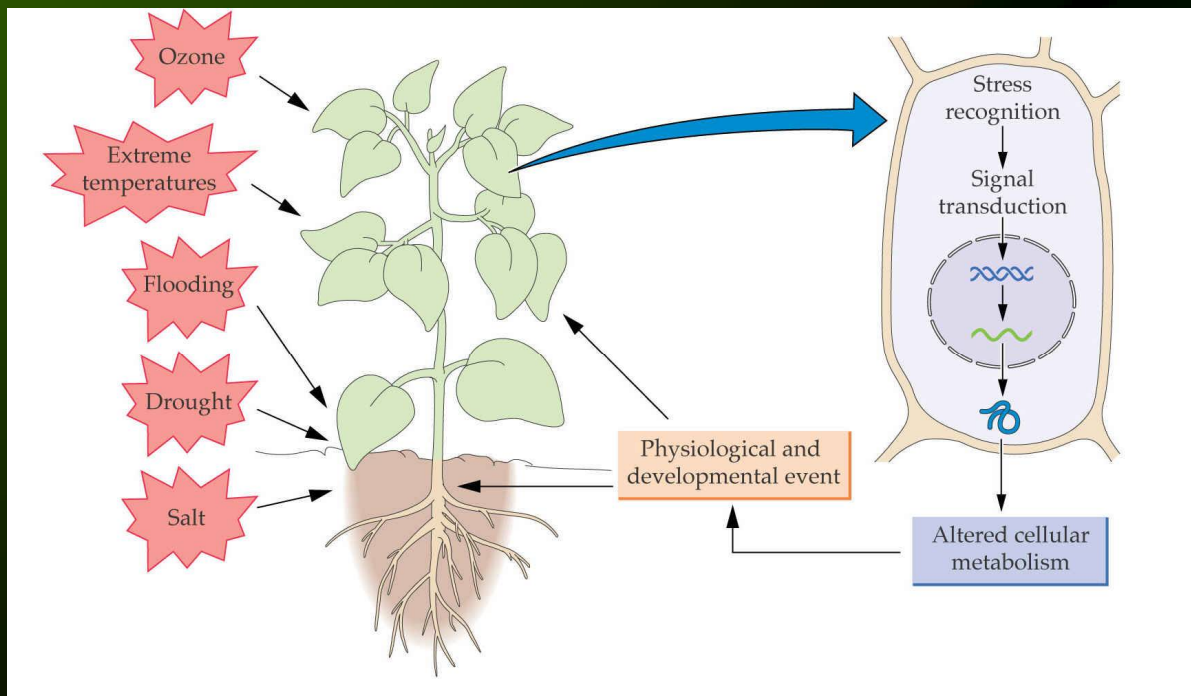
Pojmy tolerance a rezistence se často používají jako ekvivalenty – tolerance je správnější

Aklimatizace – zvýšení tolerance rostliny ke stresu jako výsledek postupného vystavení stresovým podmínkám

Adaptace – geneticky determinovaná hladina tolerance získaná během selekce v průběhu mnoha generací

Stresy → změna exprese genů a buněčného metabolismu

Změny v buněčném cyklu a buněčném dělení, změny v endomembránovém systému a vakuolizaci buněk, změny v architektuře buněčné stěny.

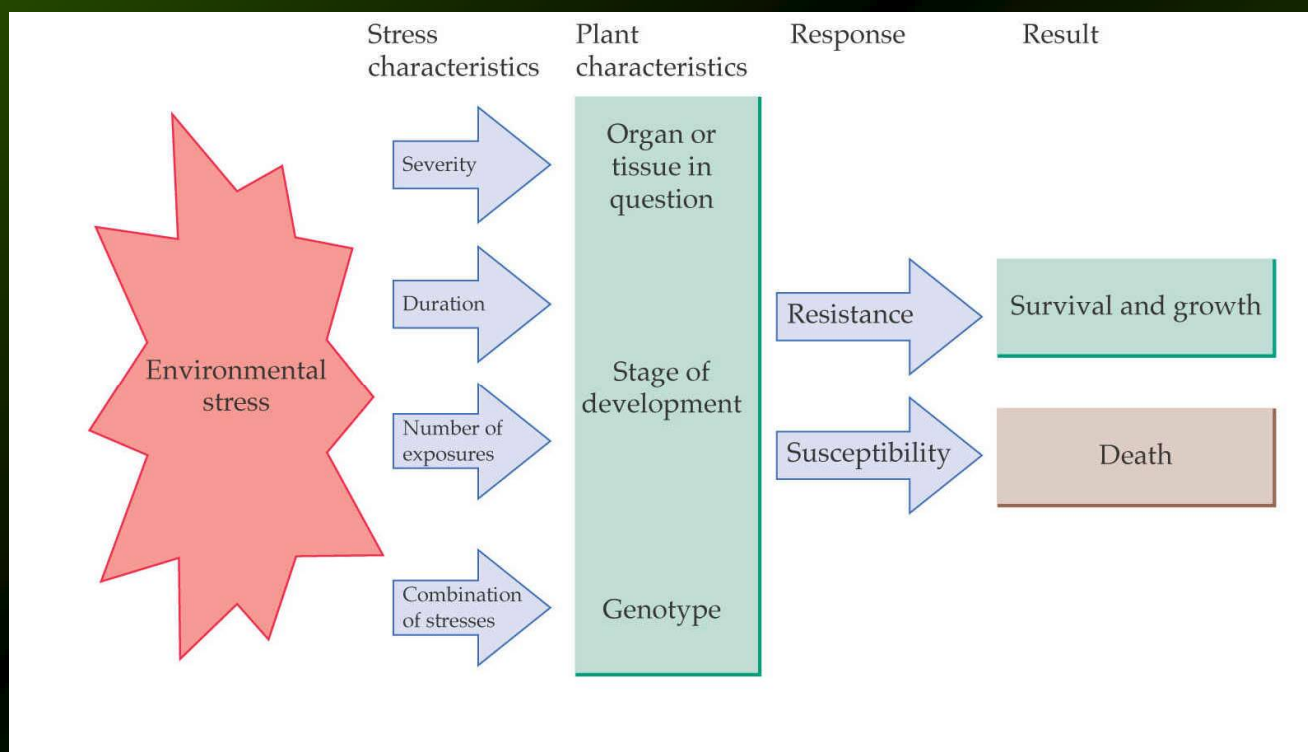


Změny v expresi genů zahrnují indukci signálních drah. V nich jsou zapojeny:

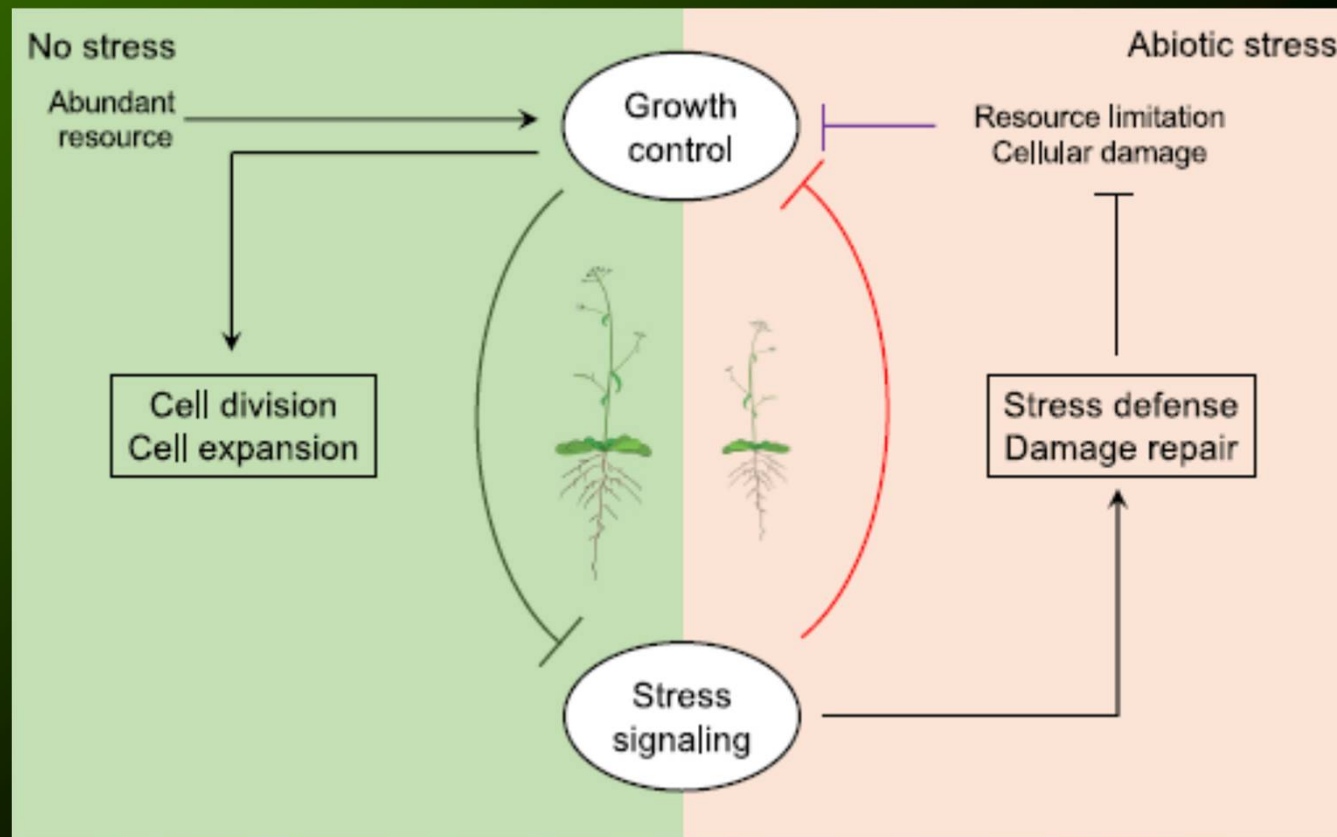
- hormony (ABA, JA, etylén, ...)
- sekundární přenašeče (Ca^{2+})

Schopnost rostlin tolerovat stres závisí na:

- intenzitě stresu
- délce působení stresu
- rychlost příchodu stresu
- orgánu rostliny



Vztah mezi stresovou signalizací a růstem rostlin



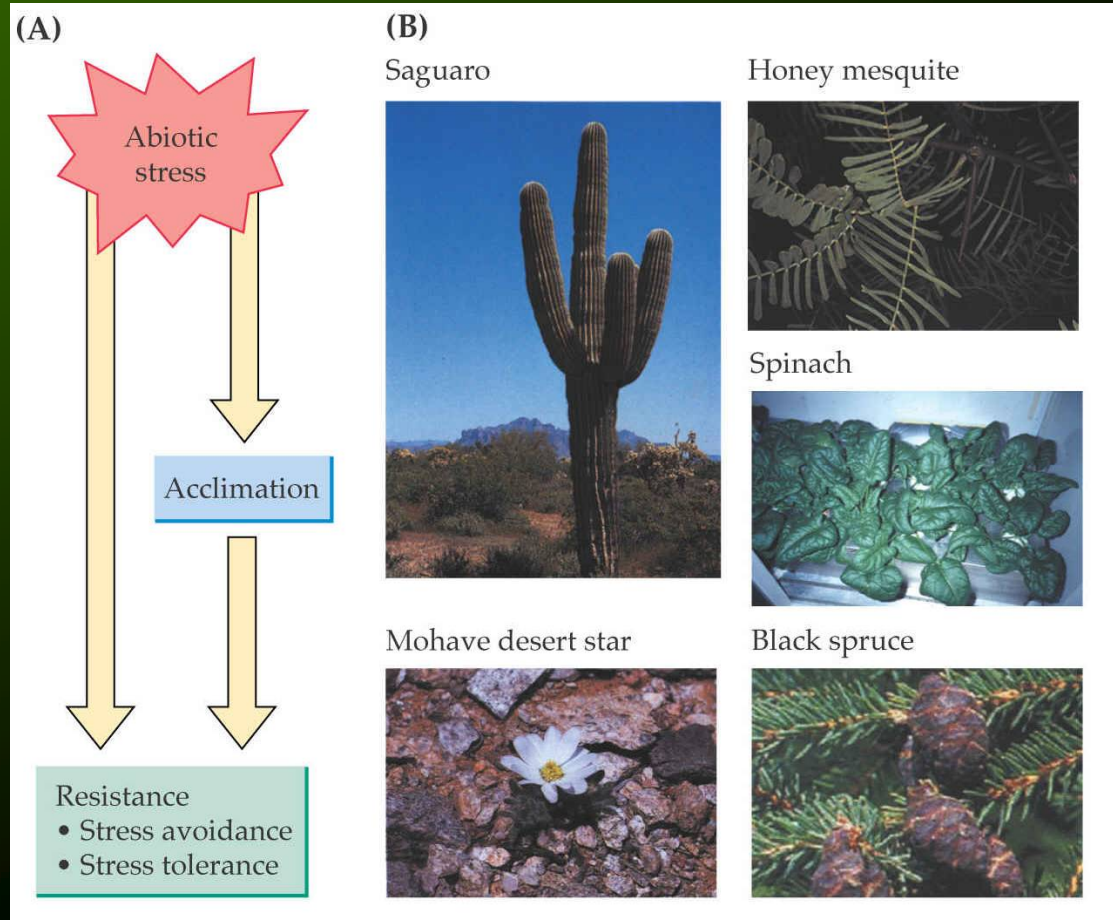
Abiotický stres pasivně inhibuje růst rostlin (**fialová linka**) tím, že způsobuje poškození buněk a omezením zdrojů (např. CO₂, živiny, energie). Při vnímání stresu a jeho signalizaci, abiotický stres aktivně inhibuje růst (**červená linka**) a také aktivuje stresovou reakci. Tím dochází k nastartování obrany a opravě buněk poškozených stresem. Pokud má rostlina hodně živin a není stresovaná, je aktivovaná signalizace růstu, která vede kromě stimulace růstu i k potlačení stresové signalizace (**zelená linka**).

Update 2020

Zhang H et al. (2020) *Developmental Cell* 55: 529-543

Ztráty na zemědělské produkci způsobené abiotickými stresy: 65 – 80%

Mechanismy rezistence










Znalost mechanismů rezistence

Aplikace biotechnologických metod

- časování životního cyklu
- hluboké kořeny
- vývoj stomat, trnů

Sedm schopností rostliny adaptovat se na abiotický stress

Seven Capacities to adapt under Abiotic Stress	ASSET MANAGEMENT 	SUPPLY CHAIN 	SHAPE SHIFTING 	COMMUNICATION 	ENERGY 	REPAIR 	SELECTIVE UPTAKE 
DROUGHT	Decreased leaf area to reduce transpiration	Sustained movement of sugars from sources to sinks	Altered leaf morphology and root development	Shoot to root signalling of water status	Maximising photosynthesis versus respiration	Replacement of ROS damaged proteins and phospholipids	
SALINITY	Reduced spatial pattern of cell division and expansion	Exclusion of Na from phloem to protect growing tissues	Altered root systems to supply fresh water and nutrients	Root signals reduce shoot growth and water loss	Increased ATP provision for Na exclusion and sequestration	Replacement of ROS damaged proteins and phospholipids	Excluding 95% of the salt from water taken up by roots
HEAT OR COLD		Induction of cold tolerant pathways of phloem loading	Maintenance of pollen fertility	Cold and heat perception for respiratory acclimation	Changed rate of ATP and NAD(P)H generation as metabolism slows	Replacement of aggregated proteins	
FLOODING	Lateral root proliferation near the soil surface		Changes in root anatomy to allow oxygen to reach root tips	Hormonal changes in ethylene biosynthesis	Alternatives to oxygen-dependent metabolism	Recovery of oxygen dependent processes post-anoxia	Exclusion of reduced Mn, Fe and S in soils
NUTRIENT	Investment into roots to explore the soil profile	Maintenance of sugar transport by P signalling		N, P and S signalling pathways	Storage of photosynthate while nutrients limit growth		Soil nutrient scavenging by selective transporters

Update 2023

Munns R, Millar AH (2023) Journal of Experimental Botany 74: 4308-4323

Reciproční regulace reakce ke stresu a znovuobnovení růstu

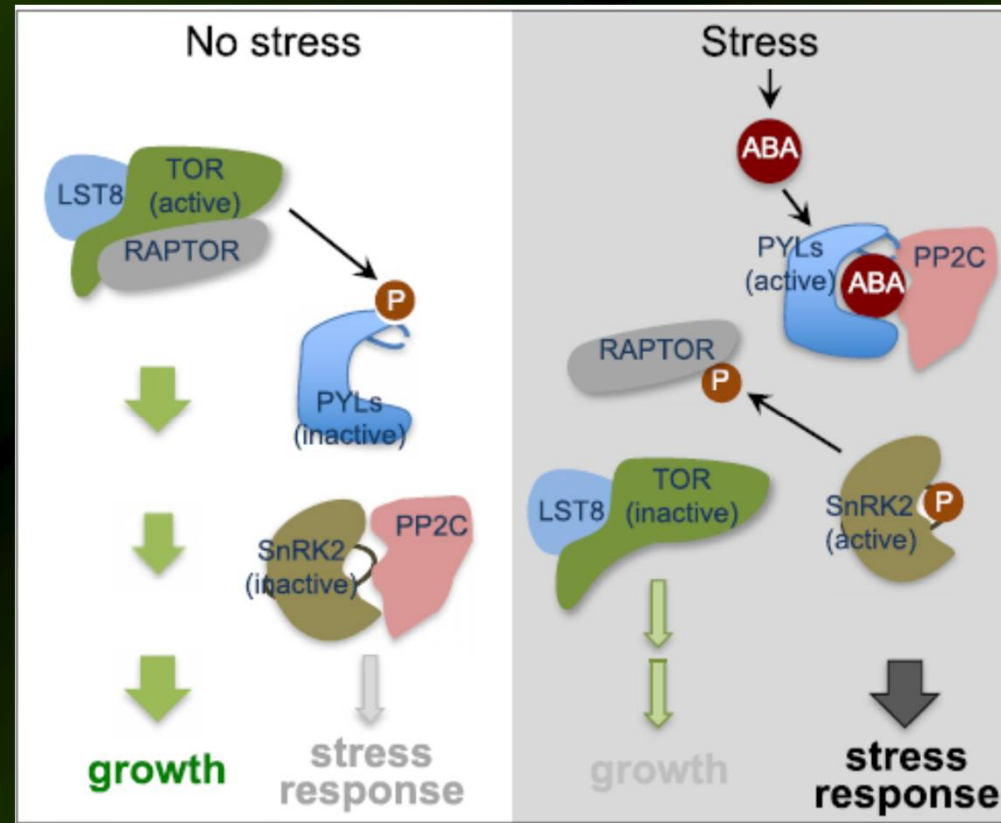
Precizní kontrola přepínače mezi stresovou reakcí a znovuobnovením růstu v optimálních podmínkách je kritická pro přežití rostlin a optimální růst.

Optimální podmínky

TORC1 kináza (TOR, Raptor and LST8) stimuluje růst a současně inhibuje stresové reakce fosforylací ABA receptoru PYL => inhibice SnRK2 prostřednictvím PP2C (viz přednáška SFR8 - ABA signalizace).

Stresové podmínky

Akumuluje se ABA, která se váže k receptoru PYL => odloučení PP2C => aktivace SnRK2 => spuštění stresové reakce. Aktivní SnRK2 současně fosforyluje protein Raptor => disociace TORC1 a inhibice růstu.



Update 2017

Wang P et al. (2017) Mol Cell 69: 100-112

Rosenberger CL and Chen J (2018) Mol Cell 69: 3-4

a) Vodní deficit

- nedostatek vody v prostředí
- množství vody není omezeno, ale voda je pro rostlinu nedostupná (zasolení, nízké teploty, vysoká transpirace rostliny)

Parametry popisující vodní stav rostliny:

- vodní potenciál Φ_w
- relativní obsah vody (RWC – relative water content)

Vodní potenciál – vyjadřuje úroveň s jakou je buňka, orgán, celá rostlina hydratovaná (schopnost odevzdávat vodu)

$$\Phi_w = \Phi_s + \Phi_p + \Phi_g + \Phi_m$$

$$\Phi = [f\ddot{f}]$$

Φ_s = potenciál rozpuštěné látky (osmotický potenciál, solute potential)

Je určen počtem částic rozpuštěných ve vodě; $\Phi_s = -RTC_s$

$$\Phi_s \uparrow \Rightarrow \Phi_w \downarrow$$

Φ_p = tlakový potenciál (press potential)

Odráží fyzikální síly působící na vodu v jejím prostředí.

Pozitivní tlak (turgor) – PM tlačí na buněčnou stěnu

Negativní tlak (tenze) – PM tlačí na vodu v buňce, odchlpuje se od buněčné stěny

$$\Phi_p \uparrow \Rightarrow \Phi_w \uparrow$$

Φ_g = gravitační potenciál (gravitational potential)

Projevuje se pouze při transportu vody v rostlině na vzdálenost 5-10 m

Φ_m = matriční potenciál (matric potential)

Vysvětluje jak tvrdé povrchy interagují s vodou a potlačují Φ_w . Prakticky je velice malý.

Vodní potenciál - dovoluje předpovědět pohyb vody do a z rostlinné buňky

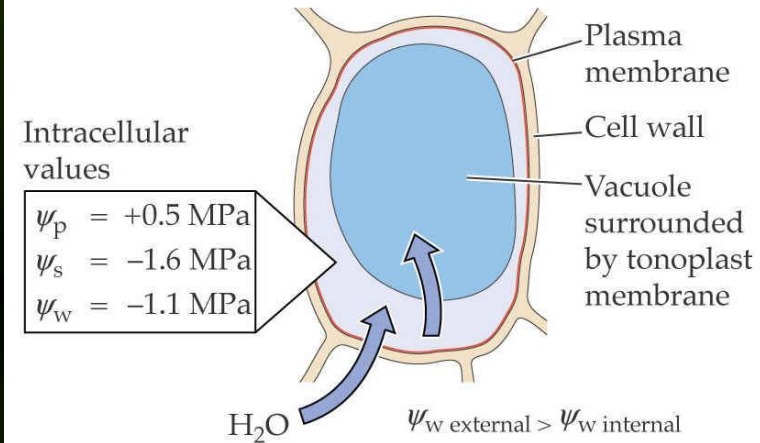
Spontánní pohyb vody:

vysoký Φ_w $\xrightarrow{\text{H}_2\text{O}}$ nízký Φ_w

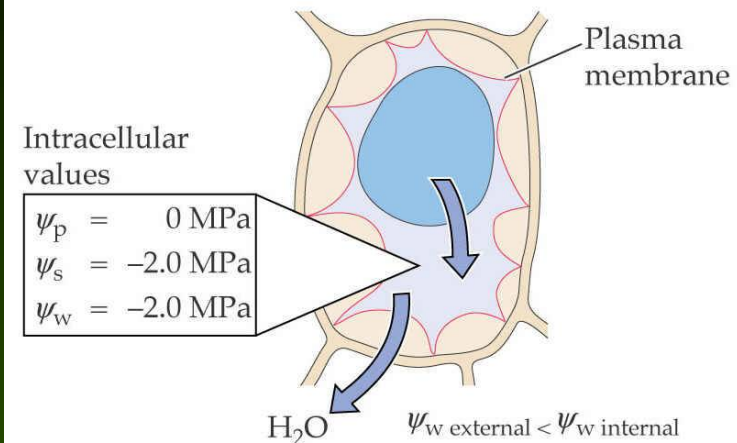
1. Buňka umístěna do čisté H₂O

2. Buňka umístěna do koncentrovaného roztoku soli

Turgid cell: $\psi_w \text{ external} = 0 \text{ MPa}$



Plasmolyzed cell: $\psi_w \text{ external} = -2.5 \text{ MPa}$



Fyziologické a metabolické změny detekované v rostlinách vystavených vodnímu stresu ne vždy korelují se změnami Φ_w .



Relativní obsah vody (RWC – relative water content)

Příjem vody kořeny pokrývá ztrátu vody listy => RWC = 85-95%

Kritická hladina RWC < 50% => pletivo odumírá

Obecně platí: $\Phi_w \downarrow \Rightarrow \text{RWC} \downarrow$

Vyjimky – rostliny schopné udržovat vysoké RWC i při klesajícím Φ_w

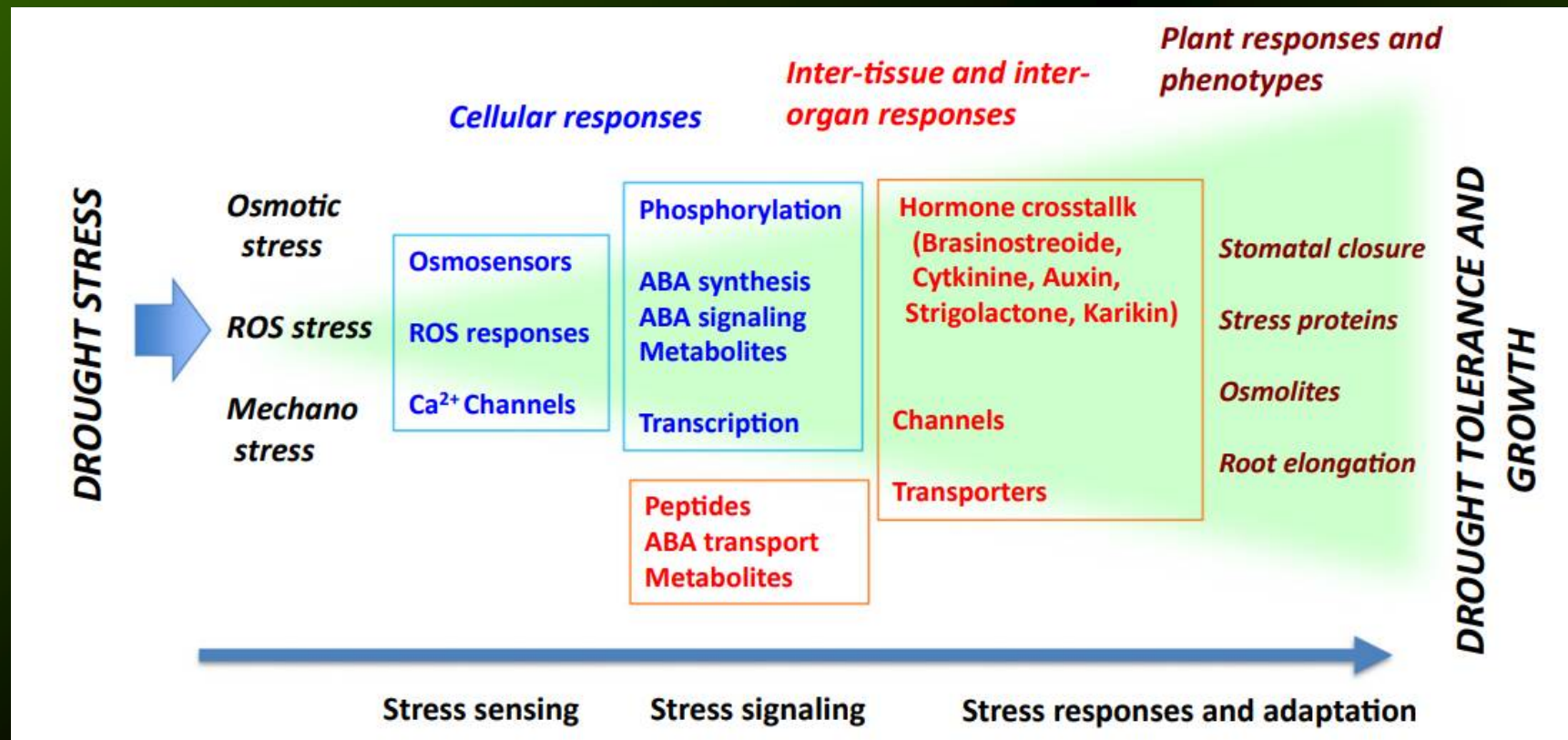
Rostliny schopné se osmoticky přizpůsobovat



Update 2022

Kuromori T et al. (2022) Plant J 109: 342-358

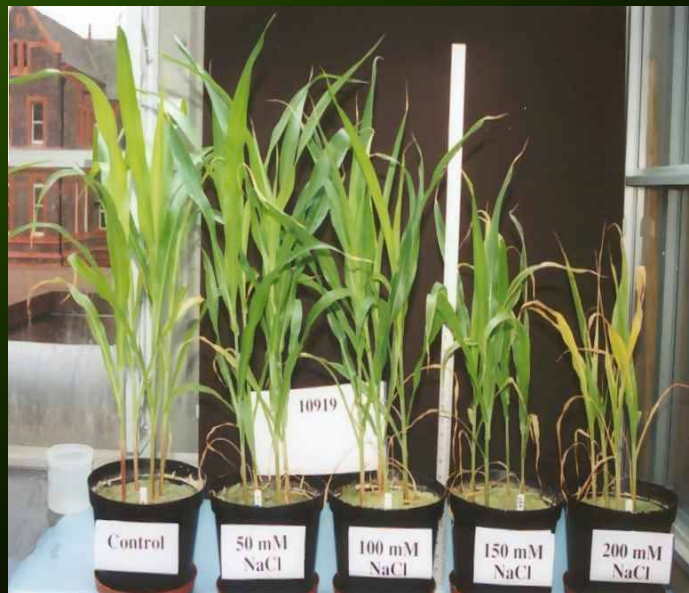
Signální dráha vodního stresu od příjmu signálu k finálním reakcím na buněčné úrovni a na úrovni orgánů a celé rostliny, až po získání tolerance.



b) Zasolení. Úloha osmotického přizpůsobení v toleranci k suchu a zasolení.

Zasolení (salinity stress)

Vážný problém v zemědělství – zasolení půdy drasticky snižuje výnos: pobřežní oblasti, záplavová území, nízko položená území



Salinita se stanovuje měřením vodivosti půdy – čistá voda má velice nízkou vodivost; konduktivita se zvyšuje se zvyšující se koncentrací solí

TABLE 25.6
Properties of seawater and of good quality irrigation water

Property	Seawater	Irrigation water
Concentration of ions (mM)		
Na ⁺	457	<2.0
K ⁺	9.7	<1.0
Ca ²⁺	10	0.5–2.5
Mg ²⁺	56	0.25–1.0
Cl ⁻	536	<2.0
SO ₄ ²⁻	28	0.25–2.5
HCO ₃ ⁻	2.3	<1.5
Osmotic potential (MPa)	-2.4	-0.039
Total dissolved salts (mg L ⁻¹ or ppm)	32,000	500

Kvalita (obsah solí) záplavové vody se liší

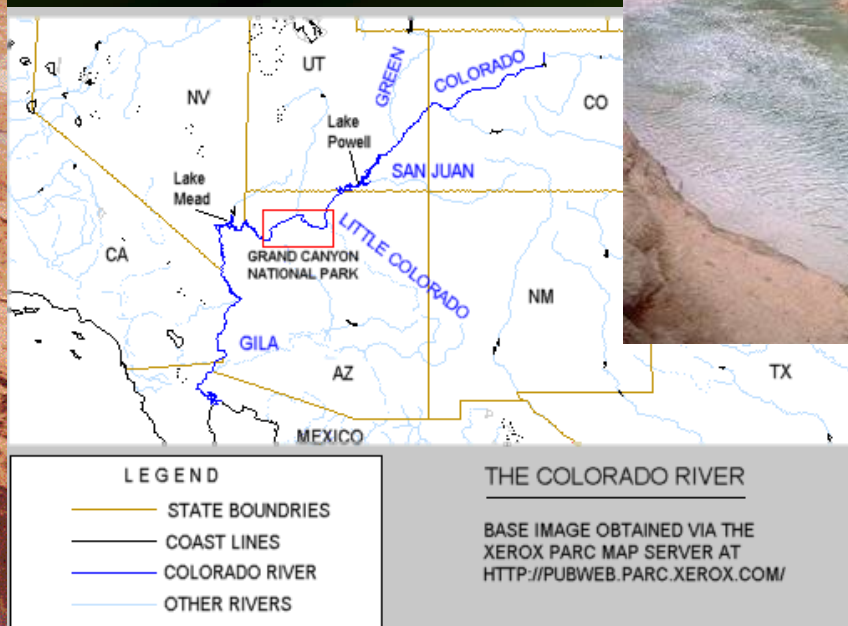
Střední tok: 900 mg/L



Hoover dam

Horní tok:

50 mg/L



LEGEND

- STATE BOUNDARIES
- COAST LINES
- COLORADO RIVER
- OTHER RIVERS

THE COLORADO RIVER

BASE IMAGE OBTAINED VIA THE
XEROX PARC MAP SERVER AT
[HTTP://PUBWEB.PARC.XEROX.COM/](http://pubweb.parc.xerox.com/)

Podle schopnosti tolerovat vyšší hladinu soli rozdělujeme rostliny na:

- halofyty (halophytes) – velice tolerantní k zasolení (~ 1% světové flóry)
- glykofyty (glycophytes; nonhalophytes) – citlivé k zasolení

Zemědělské plodiny citlivé k zasolení:

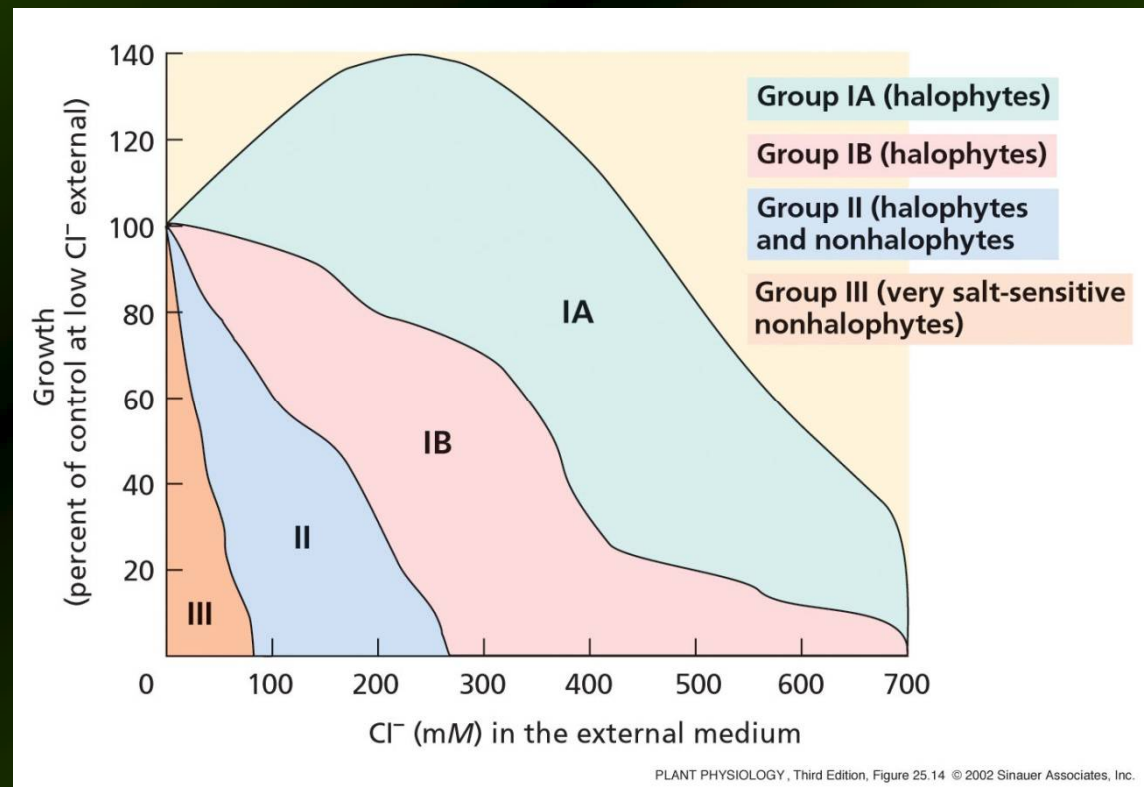
- kukuřice
- cibule
- citrusy
- salát
- fazole

Zemědělské plodiny méně citlivé k zasolení:

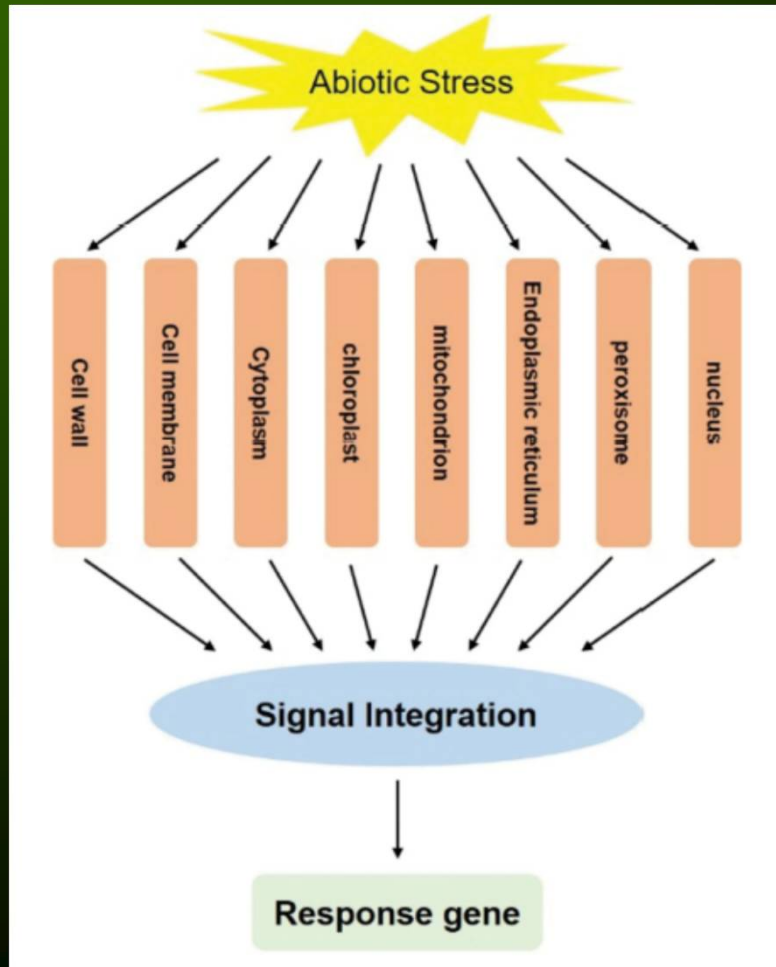
- bavlník
- ječmen

Zemědělské plodiny tolerantní k zasolení:

- cukrovka
- palma datlová



V rostlinách existuje komplikovaná regulační síť, kterou halofyty koordinují adaptaci ke stresům.



Update 2019

Fan C (2019) Plant Signaling & Behavior 15: 1704528

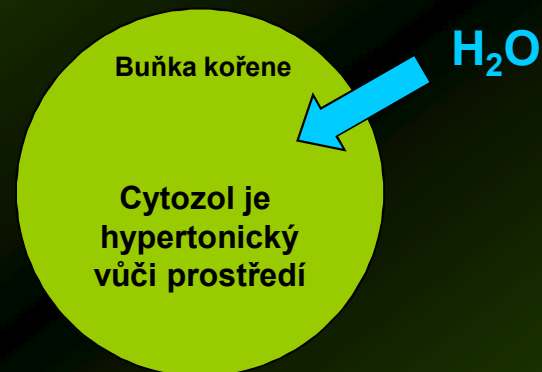
Příkladem složitosti regulační sítě je fakt, že ke stresům reagují jednotlivé organely buňky, které zprostředkují signální dráhy. Ty spolu interagují a vedou k regulaci stres-responzivních genů a následně k regulaci výsledných reakcí rostliny ke stresům.

Halofyty jsou ideálními modelovými organizmy pro studium molekulárních mechanismů tolerance k zasolení.

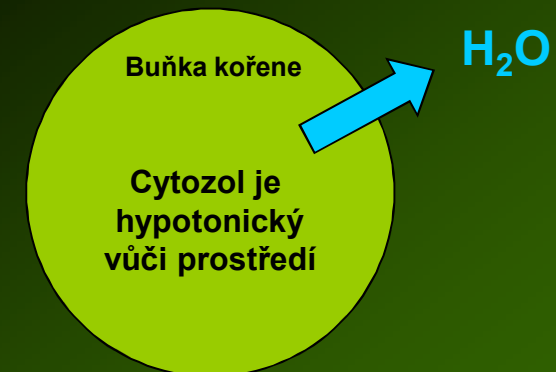
Negativní efekt zasolení na rostliny:

- nepřímý – osmotický stres: kolem kořenů se zvyšuje osmotický tlak => snižuje se schopnost kořenů brát vodu, protože prostředí kořenových buněk se stává hypotonickým vůči roztoku kolem kořene

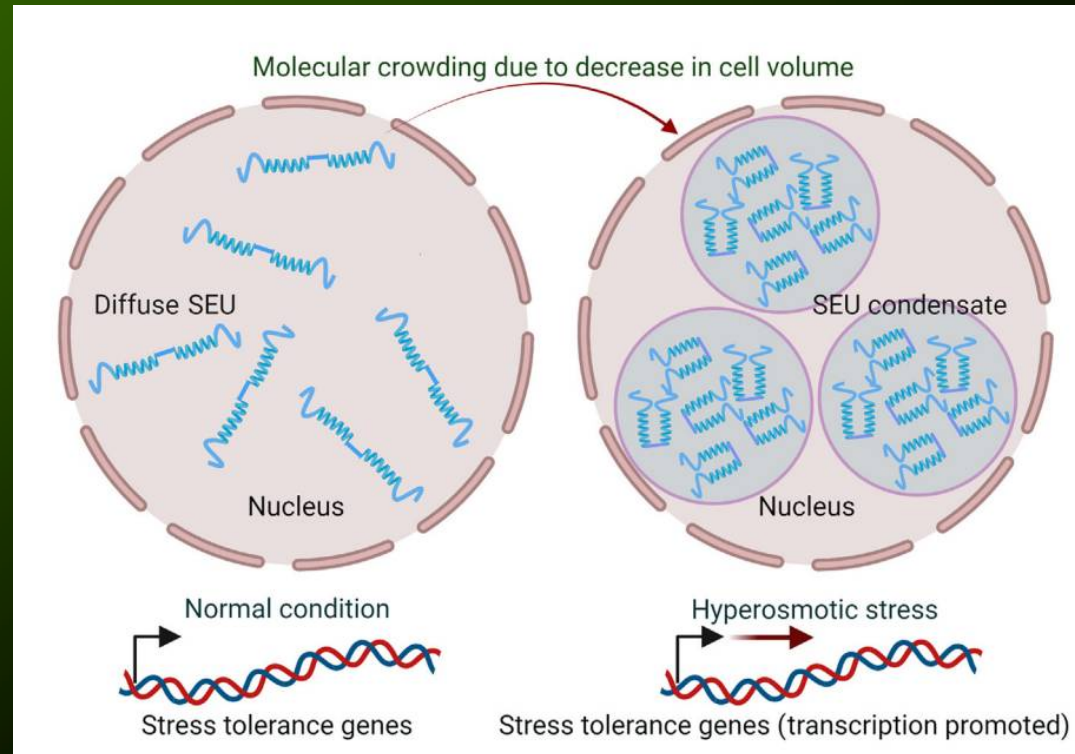
Normální prostředí



Zasolené prostředí



Vnímání osmotického stresu – nový objev – kondenzace SEUSS



Mechanismus fungování transkripčního ko-regulátoru SEUSS (SEU). SEU je za normálních podmínek difúzně přítomný v jádře. Při hyperosmotickém stresu dochází ke smrštění buňky, což vede naopak ke zvýšení molekulární tláčenice (zahuštění). Toto následně vede k tvorbě kondenzátů proteinu SEU. SEU proteiny pak indukují transkripci genů zapojených v tolerance ke stresům.

Update 2022

Wang B et al. (2022) Nature Chemical Biology 18: 1361-1369

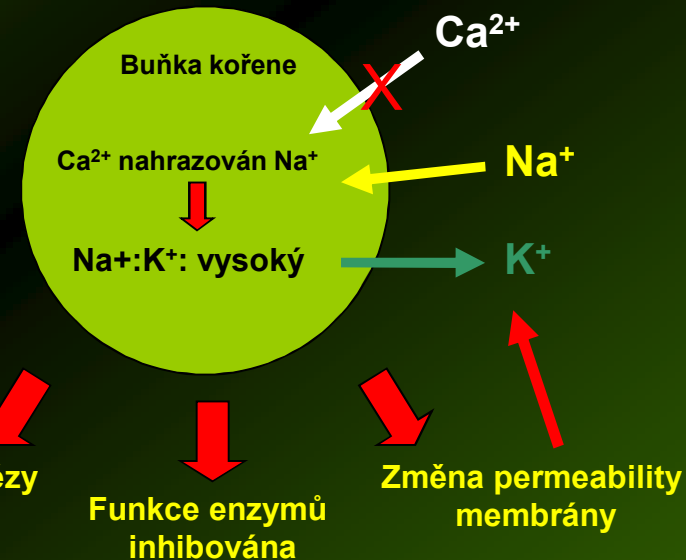
- **přímý toxický efekt iontů akumulujících se v buňce: Na^+ , Cl^- , SO_4^{2-}**

Normální prostředí



↓
Optimální funkce enzymů

Zasolené prostředí



↓
Inhibice syntézy proteinů

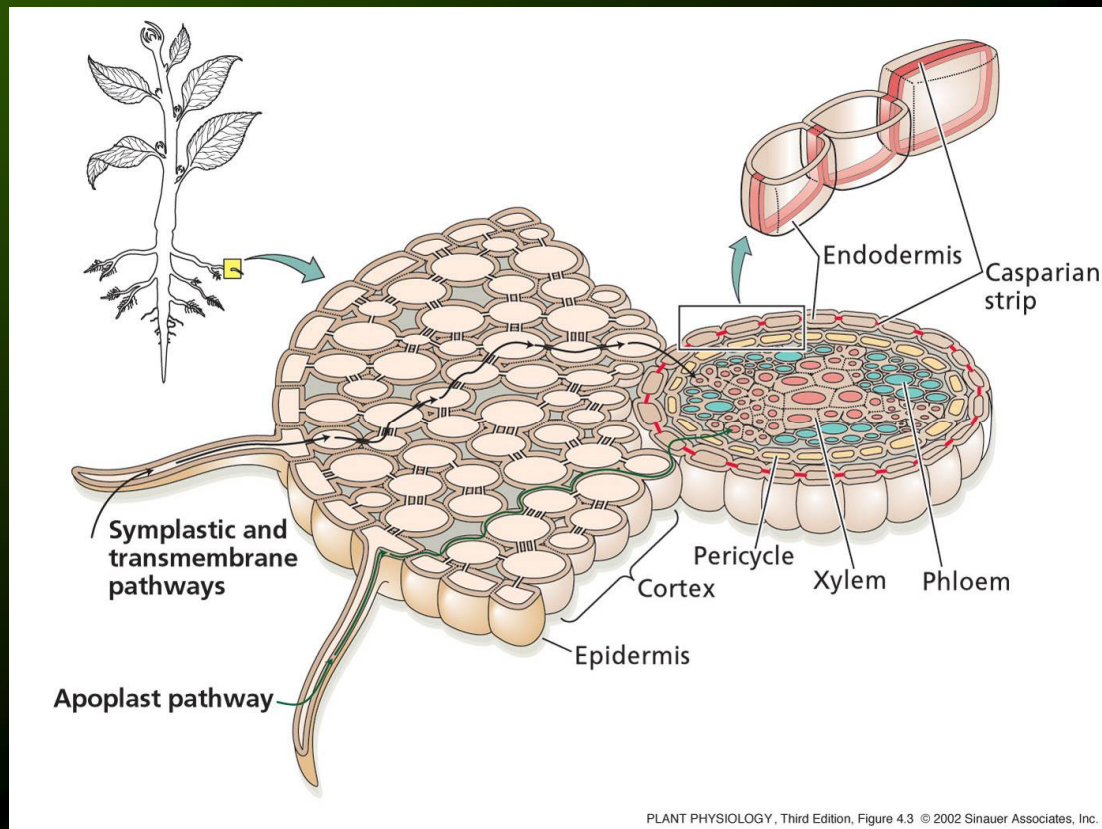
↓
Funkce enzymů inhibována

Inhibice fotosyntézy: Na^+ a Cl^- se akumulují v chloroplastech => metabolismus nebo fosforylace jsou inhibovány (e^- transport je necitlivý k solím).

Enzymy izolovány z halofytů mají stejnou citlivost k solím jako enzymy glykofytů => rezistence halofytů je důsledkem jiných mechanismů, než je rezistence metabolismu

Rostliny citlivé k zasolení se brání nadměrnému množství solí v půdě omezením transportu iontů do stonku a listů

Aby se ionty dostaly do xylému musí místo apoplastické cesty (Casparian proužky brání v pohybu iontů) použít cestu symplastickou přes membránu. Na^+ se dostávají do kořene pasivně (díky elektrochem. potenciálu) => buňky musí transportovat Na^+ z buňky aktivně.



PLANT PHYSIOLOGY, Third Edition, Figure 4.3 © 2002 Sinauer Associates, Inc.

Buňky jsou schopny samy regulovat množství Na^+ v buňce

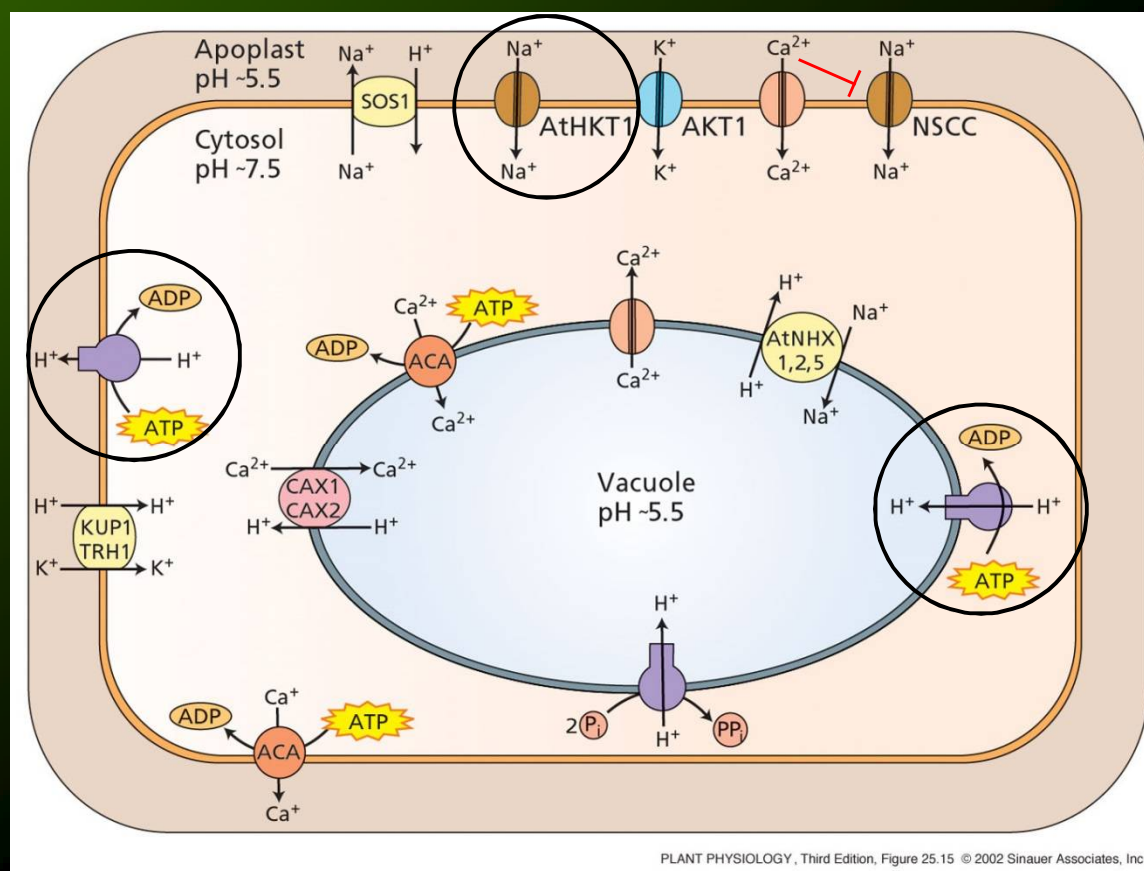
Část Na^+ je rovněž absorbována z transpiračního proudu

Další redukce množství Na^+ v listu

Atriplex – solné žlázy

NaCl – nejběžnější sůl, která vyvolává stres => transportní systém umožňuje kompartmentaci Na^+ do vakuoly (transportér NHX) - velmi důležitý.

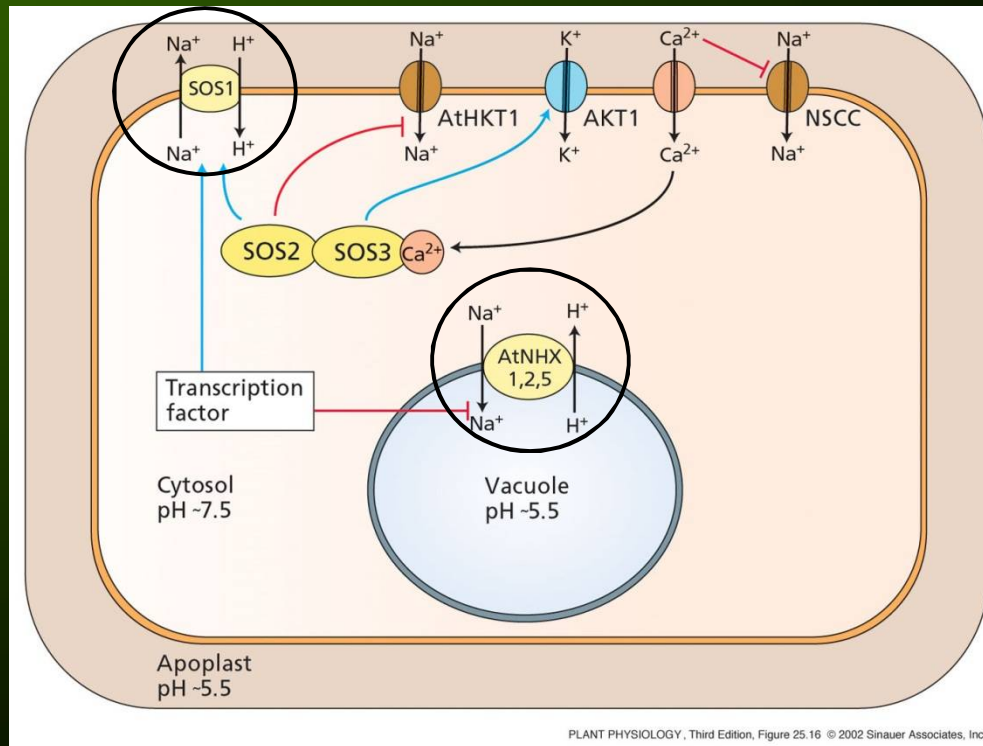
Vysoká $[\text{Na}^+]$ \rightarrow Příjem K^+ buňkou pomocí high-affinity transportéru HKT1 je inhibován. Tímto transportérem je následně pouštěn pouze Na^+ .



ALE: Ca^{2+} zvyšuje K^+ / Na^+ selektivitu => K^+ je přednostně transportován do buňky => zvyšuje toleranci k zasolení

Důležitá úloha protonové pumpy: H^+ -ATPáza

H⁺-ATPáza iniciuje rozdíl pH a membránový potenciál přes plazmatickou membránu a tonoplast. Zajišťuje sílu (H⁺ elektrochemický potenciál) pro sekundární transport iontů. Aktivita H⁺ pumpy se zvyšuje salinitou a indukovanou expresi genů.



Buňka má sílu bránit se nadměrnému zasolení tím, že transportuje nadbytečný Na⁺ z buňky ven a do vakuoly

SOS1 Na⁺-H⁺ antiporter

SOS1 - regulován produkty SOS2, SOS3

SOS2 - serine/threonine kináza aktivovaná Ca²⁺ přes SOS3

SOS3 - protein fosfatáza regulována Ca²⁺

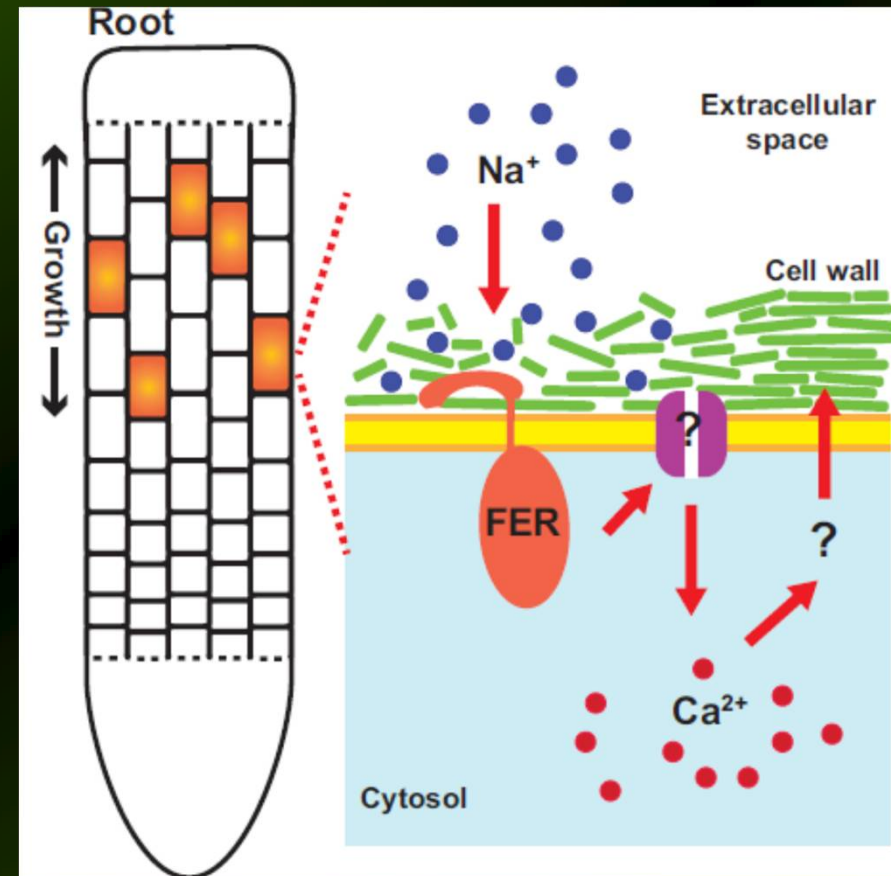
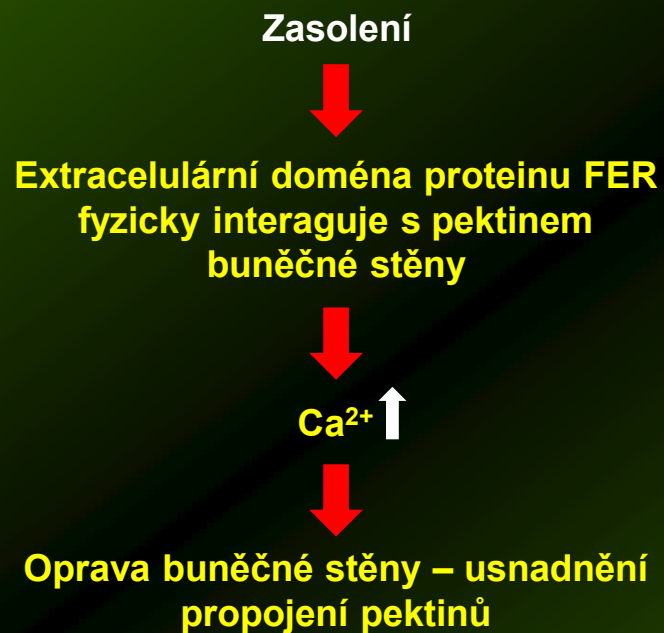
Vakuolární kompartmentace Na⁺ je zprostředkována Na⁺- H⁺ antiportem AtNHX1.

Navrhované molekulární mechanismy vnímání zasolení rostlinnou buňkou

Update 2018

Feng W et al. (2018) Current Biology 28: 666-675

Rostlinné buňky potřebují pro svůj růst integritu buněčné stěny. Zasolení vyvolává extracelulární toxicitu = změkčení buněčné stěny => narušení integrity => inhibice růstu.



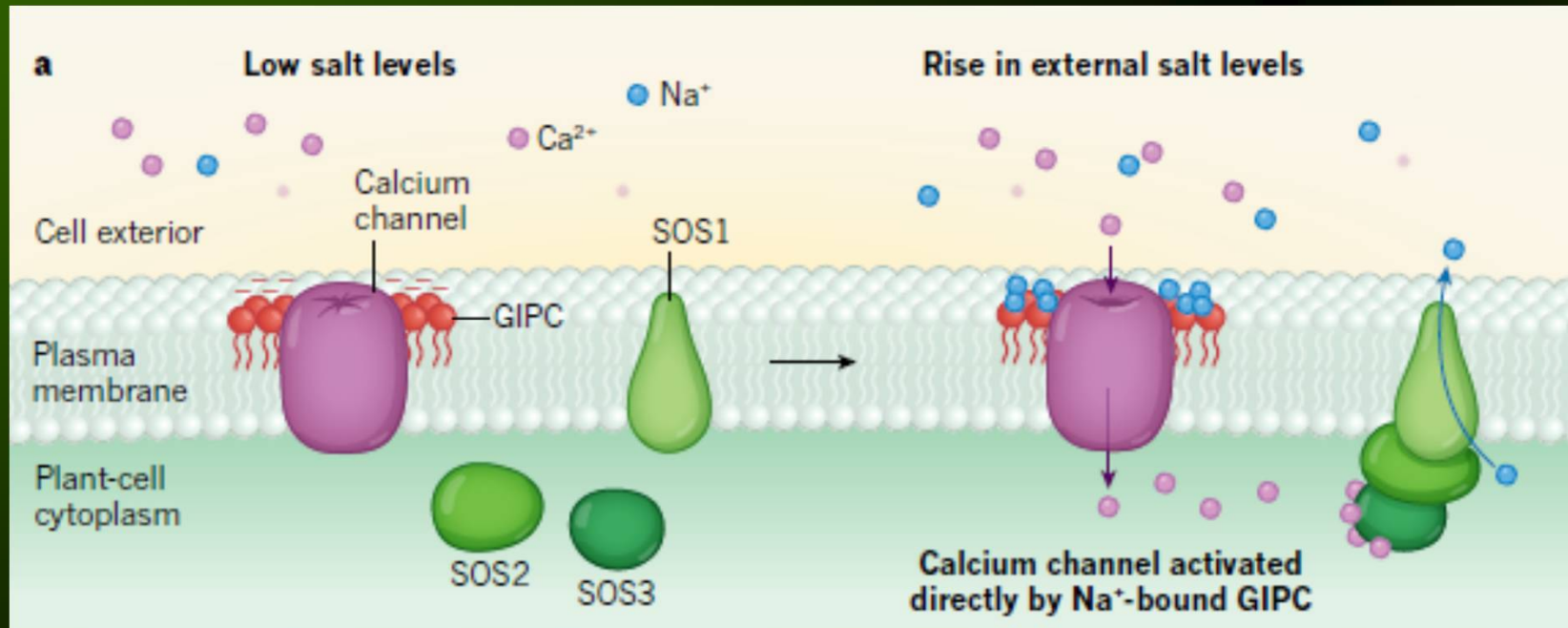
FERONIA = receptor-like kináza

Mutant *fer* - defekt v integritě buněčné stěny; opraven aplikací Ca²⁺ nebo B⁺.

Update 2019

Steinhorst L and Kudla J (2019) Nature 572: 318-320

Jiang Z et al. (2019) Nature 572: 341-346

Již známo:**Percepce Na^+ => aktivace neznámého Ca^{2+} kanálu => Ca^{2+} vstupují do buňky****Nové:****Percepce Na^+ přímo lipidem GIPC = glycosyl inositol phosphorylceramide = negativně nabitý membránový lipid. Přímá interakce GIPC+ Na^+ s Ca^{2+} kanálem => aktivace Ca^{2+} kanálu.** **Ca^{2+} influx do buňky => vazba Ca^{2+} k SOS3 => aktivace SOS2 => aktivace SOS1 => transport Na^+ ven z buňky.**

Osmotické přizpůsobení a jeho role v toleranci k suchu a zasolení

Osmotické přizpůsobení – biochemický mechanismus umožňující aklimatizaci k suchu a zasolené půdě

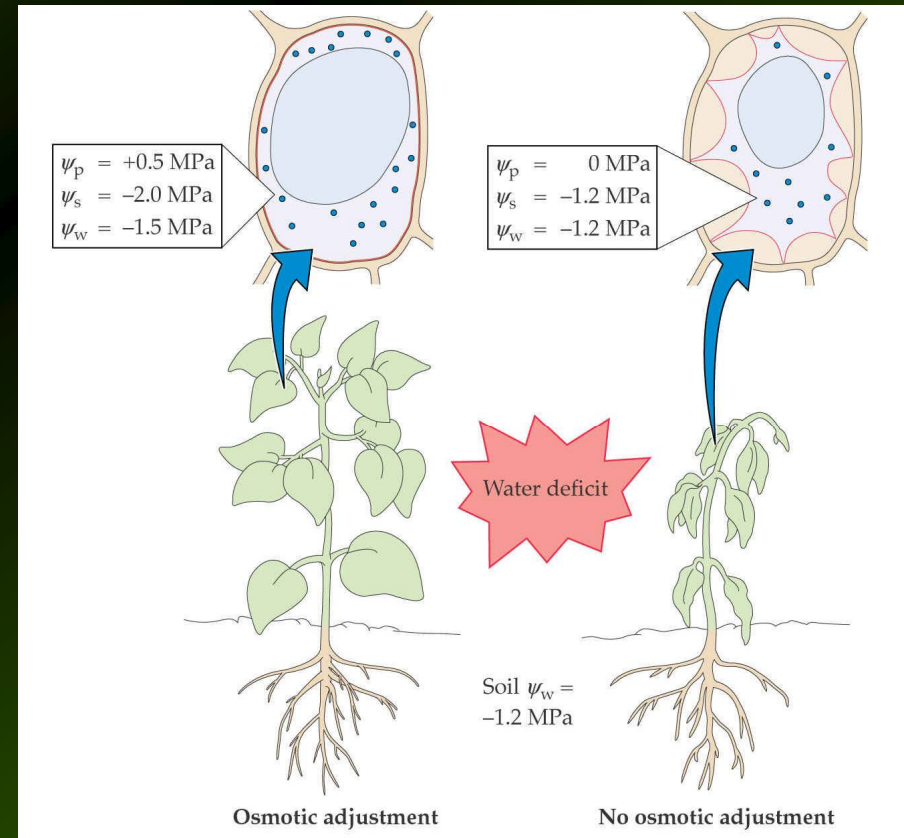
Φ_w v kořenech $<$ Φ_w v půdě



Rostlina je schopna brát vodu z půdy

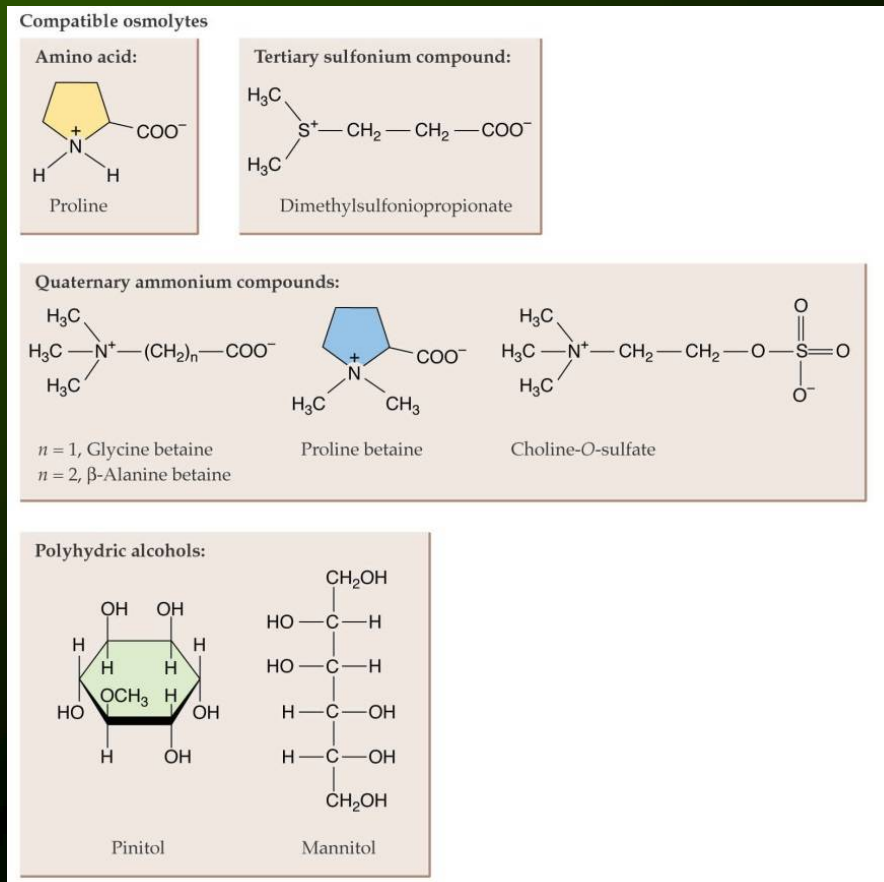
Rostlina je schopna se osmoticky přizpůsobovat: je schopna regulovat svůj potenciál rozpuštěné látky (Φ_s)

- 1) zvyšuje počet rozpuštěných látek v buňce
- 2) snižuje vodní potenciál v buňce.



- Osmotické přizpůsobení zahrnuje:**
- metabolické změny
 - zvýšení asimilace nízkomolekulárních org. sloučenin
 - zvýšení syntézy nízkomolekulárních org. sloučenin

Kompatibilní rozpuštěné látky = osmolyty



- prolin

- alanin betain, glycin betain, prolin betain

- dymetylsulfoniopropionát

- manitol, pinitol

Osmoticky aktivní anorganické látky – ionty:

Nabité, váží se ke kofaktorům,
substrátům, membránám, enzymům

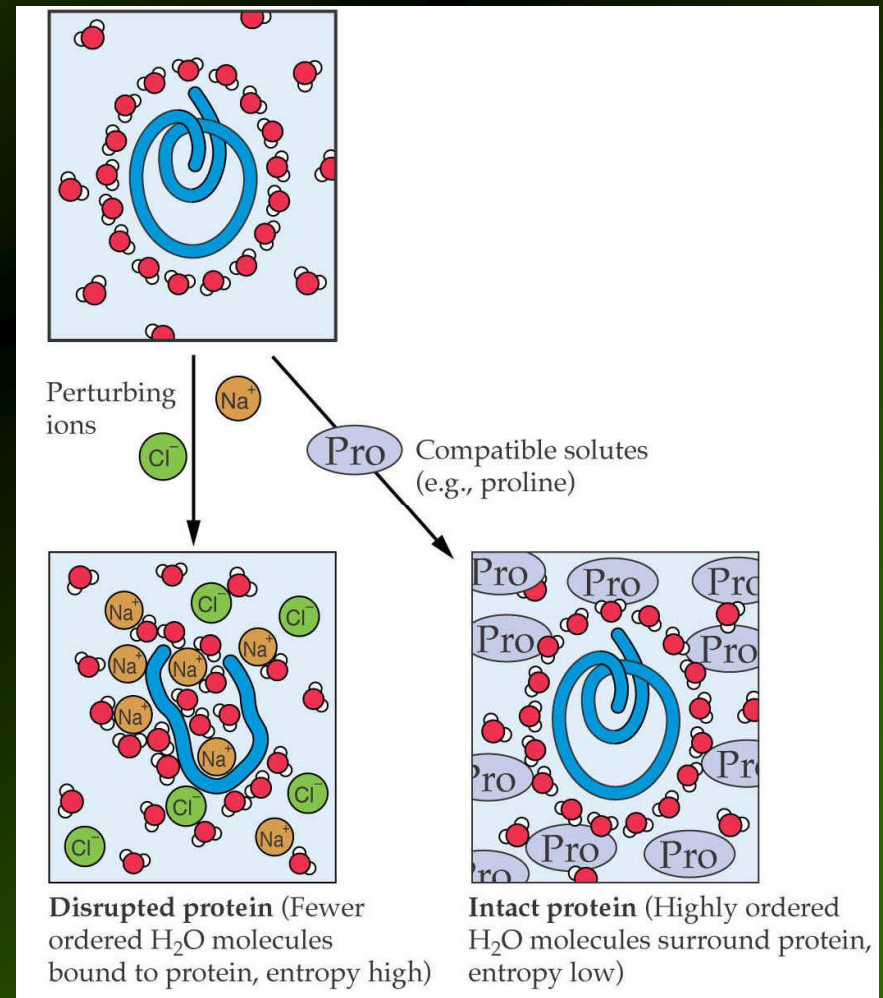


Toxické - mění vlastnosti,
vstupují do hydratační obálky proteinů
=> denaturace proteinů

Organické osmolyty – tendenci být
nabity neutrálně při fyziol. pH



Nevstupují do hydratační
obálky proteinů



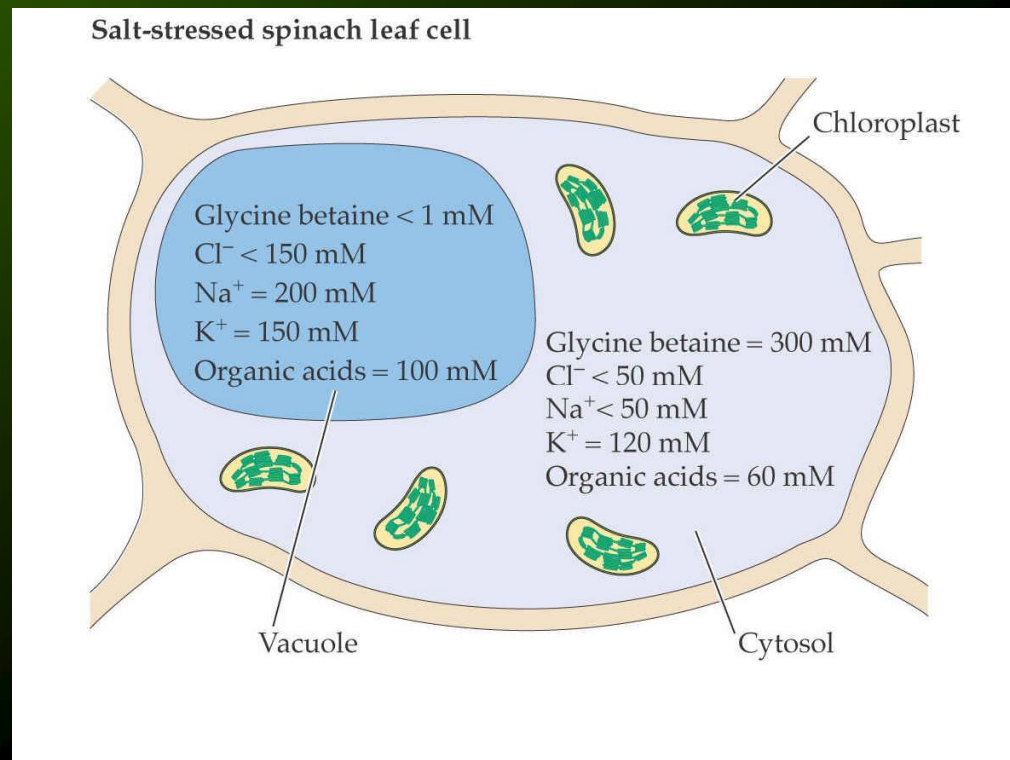
Kompatibilní osmolyty



Zůstávají v cytoplazmě



Schopnost cytoplazmy dosáhnout osmotické rovnováhy s vakuolou



**Kompatibilní osmolyty se
akumulují i v jiných
organelách, podle
potřeby**



**Existence přenašečů a
transportérů**

(např. transportéry prolinu)


Ochranná funkce některých kompatibilních osmolytů - **osmoprotekce**

Přímé důkazy osmoprotekce u bakterií.

Rostliny – transgenní rostliny syntetizující vysokou hladinu glycin betainu se vyznačují zvýšenou tolerancí k abiotickým stresům

- Glycin betain chrání Rubisco enzym před inaktivacemi solemi a tak před destabilizací komplexu fotosystému II
- Antioxidační aktivity – likvidace $\text{OH}\cdot$ sorbitolem, manitolem, prolinem

c) Vliv vodního deficitu a zasolení na membránový transport

Sucho, zasolení  Aklimatizace k nízkému vodnímu potenciálu Φ_w

Toxický efekt iontů – Na⁺



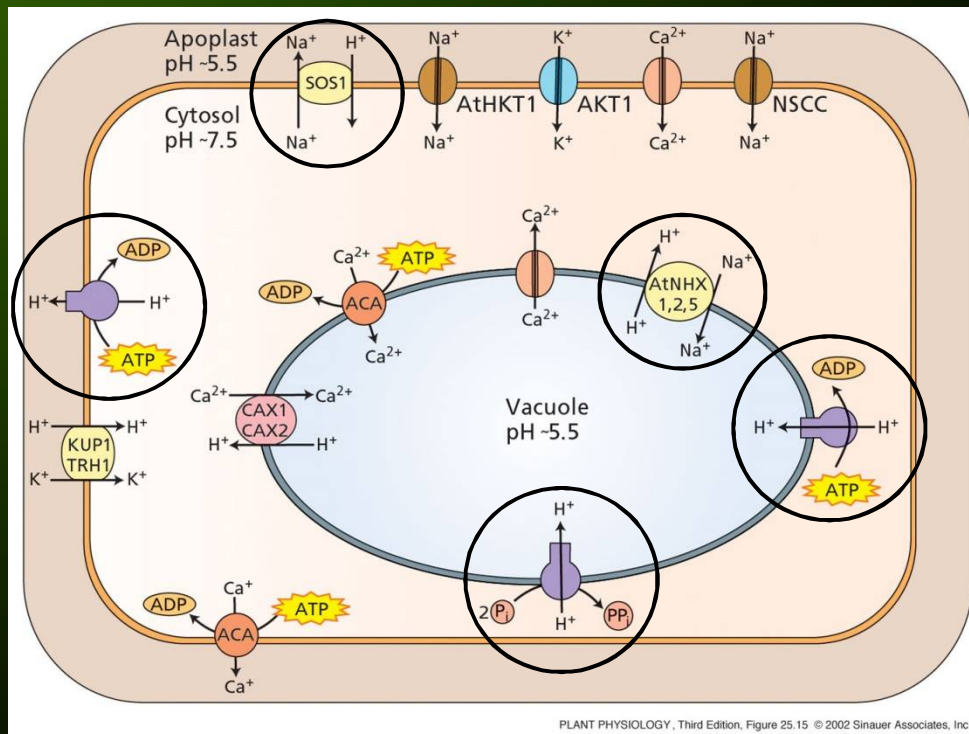
Regulace koncentrace, složení a distribuce iontů



Přenašeče, pumpy, kanály

Vysoká koncentrace NaCl → Pasivní transport Na⁺ do buněk

Obrana buňky proti akumulaci Na⁺ ← Akumulace Na⁺ v buňce



Overexpresse antiportu Na⁺/H⁺ v *Arabidopsis* umožňuje růst při 200 mM NaCl (1/2 koncentrace soli mořské vody)

1) Přednostní transport K⁺ do buňky.

ALE při vysokých externích konc. Na⁺ je kanál pro K⁺ je blokován => přednostní transport Na⁺ do buňky

2) Transport Na⁺ z cytozolu ven mimo buňku (Na⁺/H⁺ antiport)

3) Transport Na⁺ z cytozolu do vakuoly (tonopastový antiport Na⁺/H⁺)

Nutnost elektrochem. potenciálu



H⁺ pumpy: H⁺-ATPázy, H⁺-pyrofosfatáza

Lipidová dvouvrstva – hydrofobní charakter → bariéra pro volný pohyb H₂O



Syntéza a aktivita aquaporinů (vodní kanály)

Vodní deficit → Indukce exprese aquaporinu Rd28 (*Arabidopsis* MIP) na PM

Transkripce koreluje se změnami turgoru v listech rostlin při stresu 400 mM NaCl

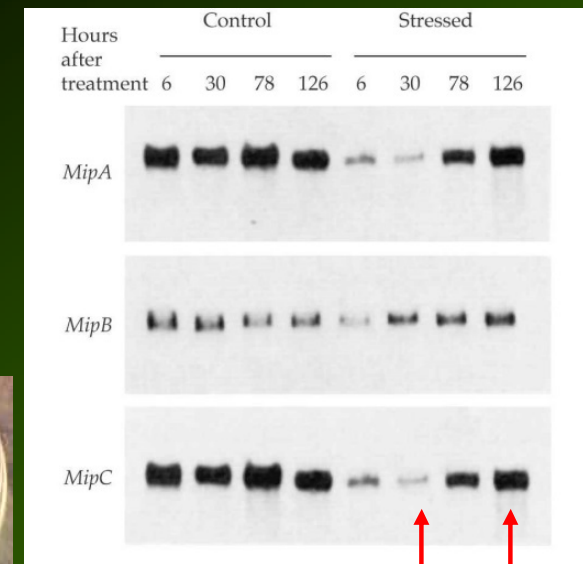
Mechanismy regulace aktivity aquaporinů:

fosforylace aquaporinu (α -TIP)

Zvýšení aktivity aquaporinů = permeability
membrány pro H₂O



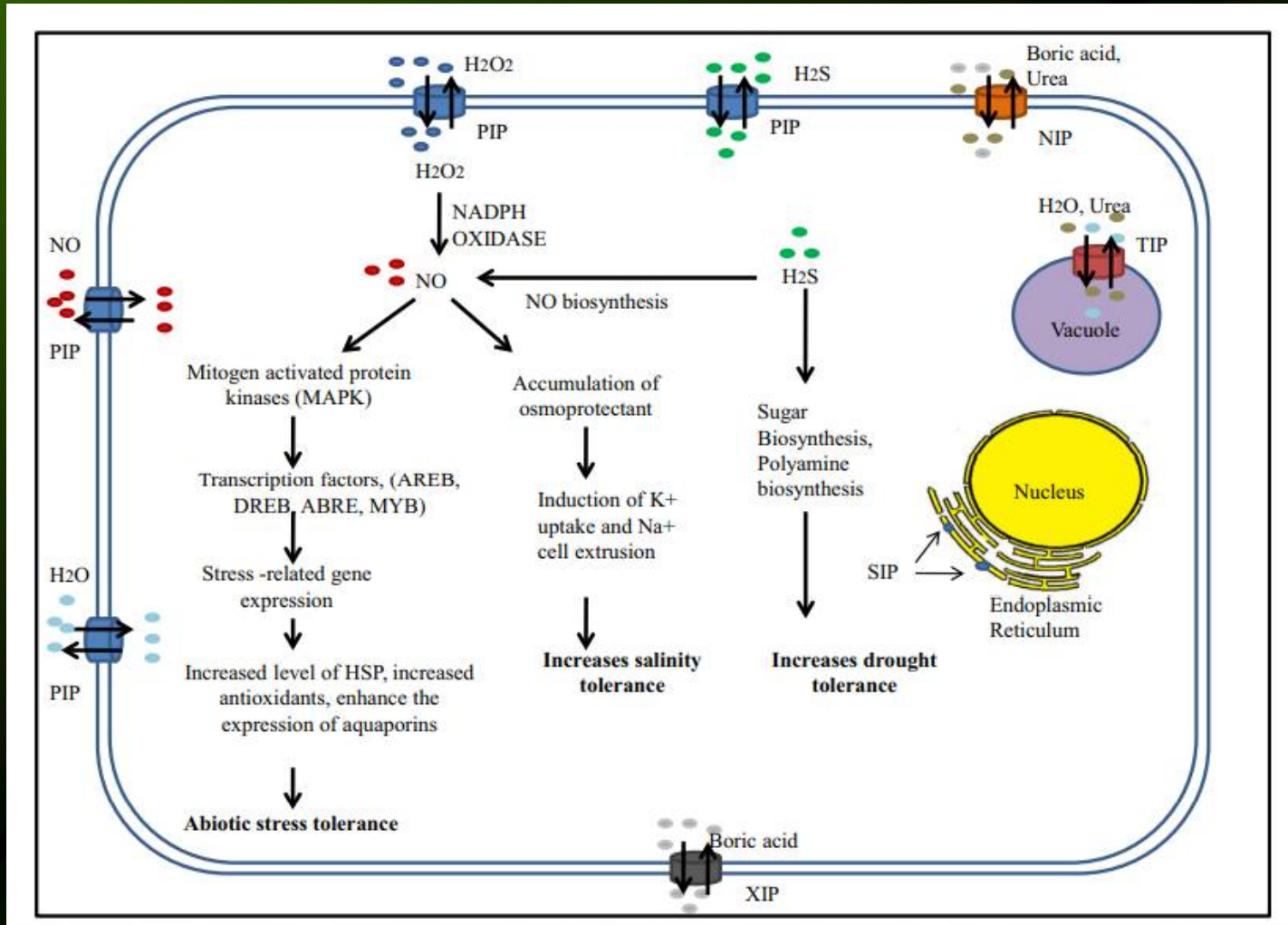
Vajíčka *Xenopus* – výzkum aquaporinů



Update 2021

Gautam A and Pandey AK (2021) Botanical Review 87: 467-495

Funkce aquaporinů v buněčných kompartmentech a jejich zapojení v toleranci k abiotickým stresům



d) Geny indukované vodním stresem (suchem)

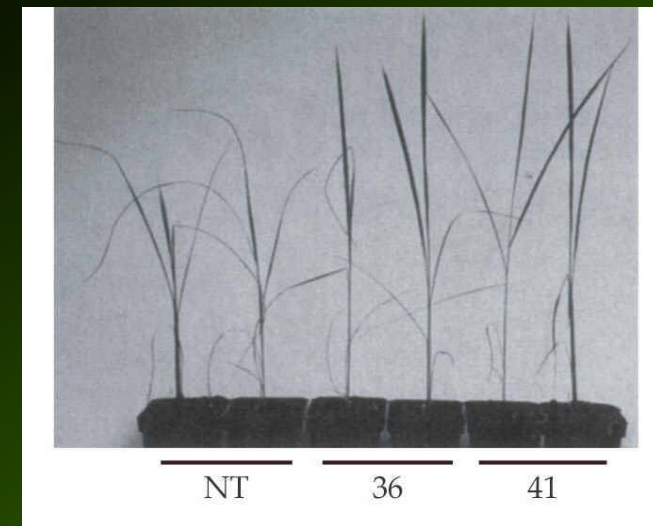
Nedostatek vody indukuje expresi genů, jejichž produkty minimalizují negativní účinky stresu

1) LEA proteiny (Late Embryogenesis Abundant) – poprvé identifikovány v semenech během vysušení

LEA jsou exprimovány ve vegetativních pletivech vystavených stresu.
Overexprese koreluje s rezistencí k vodnímu stresu

- LEA proteiny:
- hydrofilní charakter => lokalizace v cytoplazmě
 - bohaté na alanin a glycin, chybí cystein a tryptofan
 - důležitost tkví v jejich množství a způsobu exprese

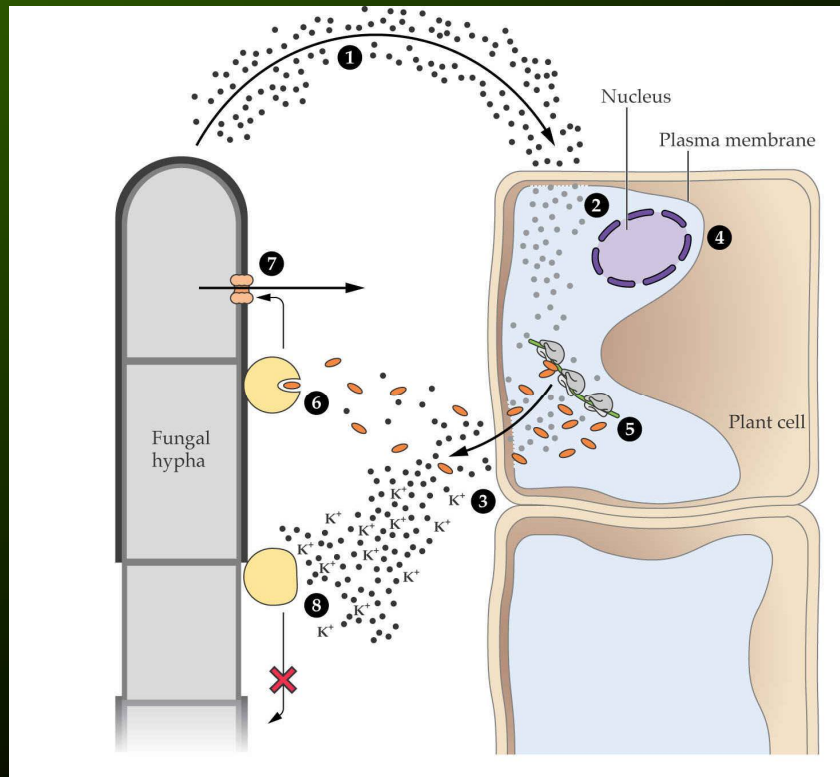
5 základních skupin LEA proteinů



Transgenní linie rýže overexprimující HVA1 protein (LEA protein 3. skupiny) během zasolení

2) OSMOTIN – alkalický protein objeven v buněčné kultuře tabáku vystavené stresu 428 mM NaCl

- spojený primárně s patogenezí (PR - protein related) - antifungální aktivita - inhibuje růst houbových spor
- transkripce indukována mnoha faktory: ABA, etylén, auxin, infekce virem tab. mozaiky, zasolení, nedostatek vody, chlad, UV záření, poranění, houbová infekce



1. Houbový toxin produkováný houbou
2. Narušení membrány
3. Únik nutričních látek, které houba využívá
4. Rostlinná buňka ztrácí turgor
5. Akumulace osmotinu
6. Osmotin se váže na houbový receptor
7. Osmotin usnadňuje tvorbu póru v membráně houby, membrána se stává permeabilní, vede k inhibici růstu houby
8. Uvolněné ionty K^+ omezují efekt osmotinu

3) ABI1, ABI3 – kódují protein fosfatázy, zapojené v přenosu ABA signálu

Úloha hormonů v reakcích rostlin k suchu a zasolení

Update 2022

Waadt R et al. (2022) Nature Reviews Molecular Cell Biology 23: 680–694

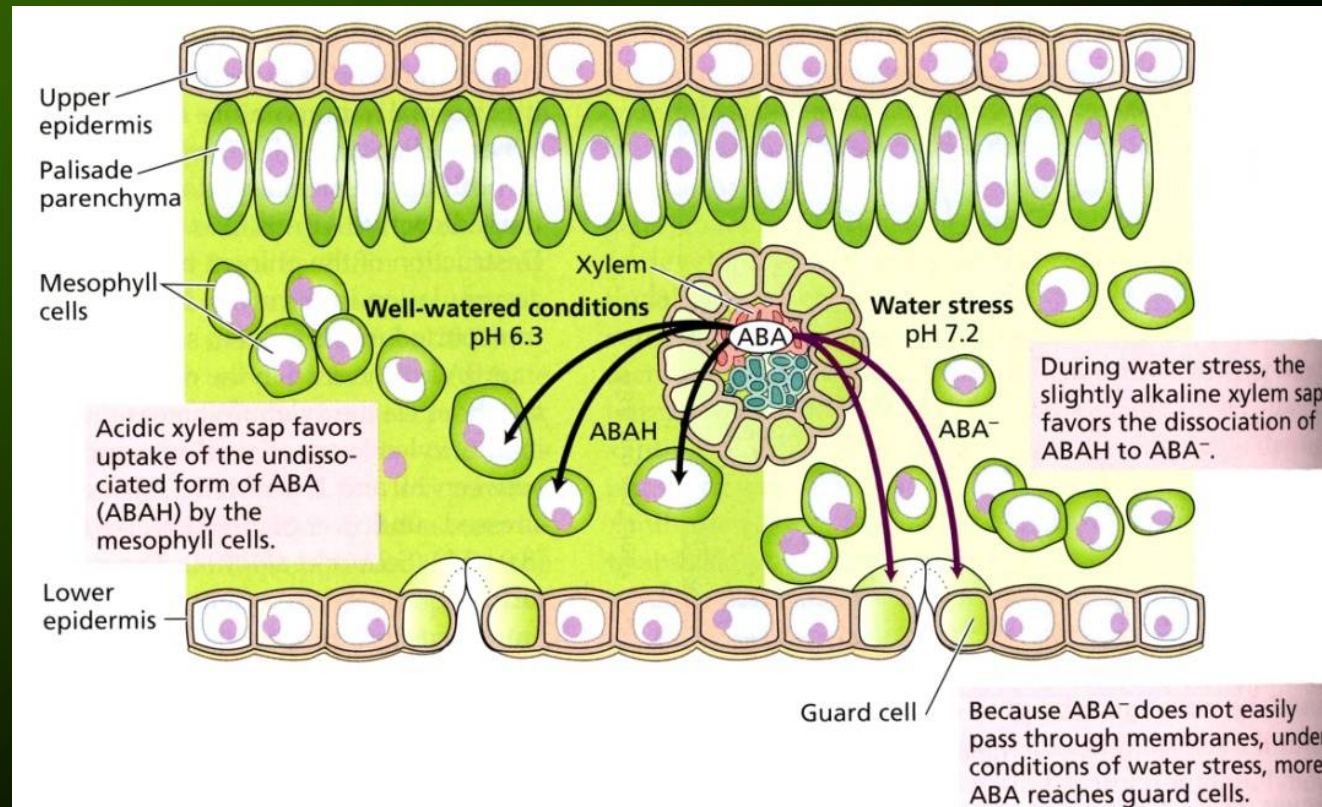
Kyselina abscisová (ABA) – hladina ABA se zvyšuje při vodním stresu => zavírání průduchů, inhibice růstu nadzemní části rostliny, indukce růstu kořenů; indukuje expresi genů zapojených v toleranci k suchu a zasolení.

Mutant *flacca* (deficit v ABA) je extrémně citlivý k suchu. Má neustále otevřené průduchy => zvadlý fenotyp i při mírném nedostatku vody; po aplikaci ABA dochází k obnovení tolerance mutanta *flacca* k suchu a současně k expresi genů:

- LEA proteiny – skupina 2 a 5
- lipid transfer protein
- izotyp histonu H1
- ABI1, ABI2 – 2C protein fosfatázy

Expese těchto genů je spojena se zvýšenou tolerancí k suchu.

ABA uzavírá průduchy (stomata) v závislosti na vodním stresu

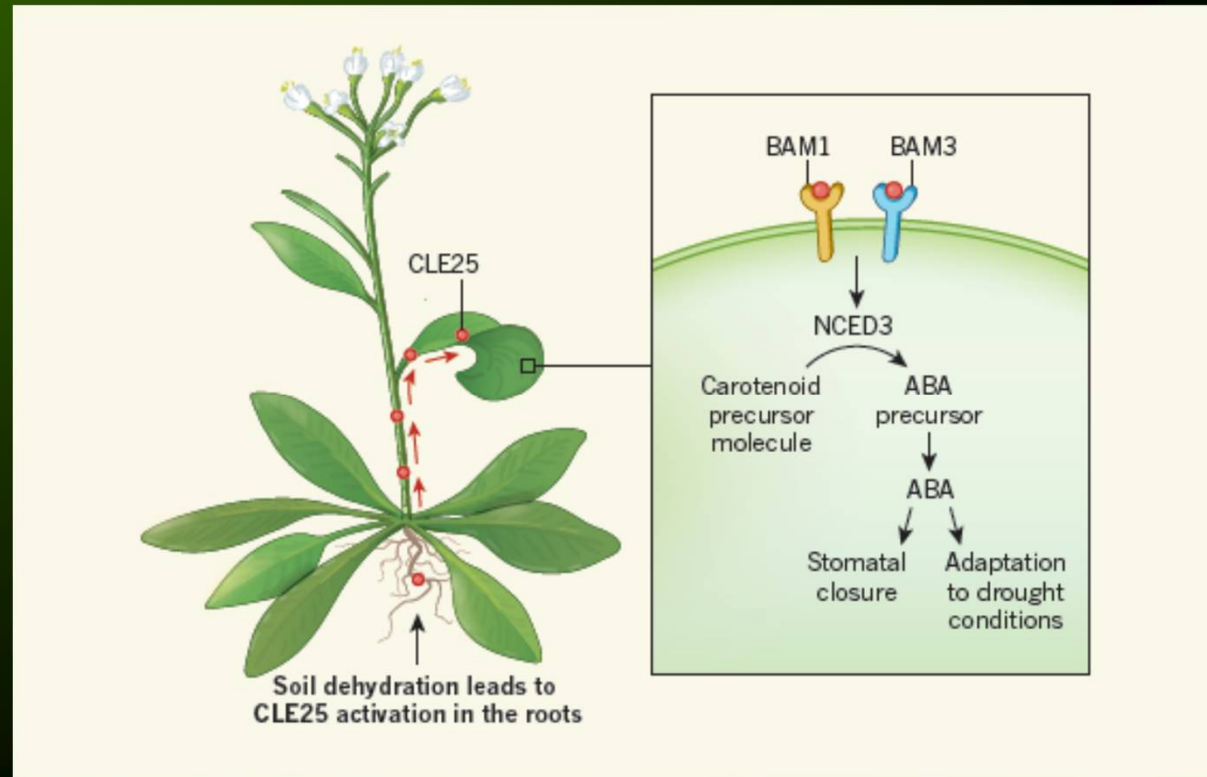


Zavodněné rostliny: pH xylémového roztoku se pohybuje kolem 6.3 => pohlcování ABA mezofylovými buňkami, protože ABA se nachází v nedisociované (protonované) podobě ABAH.

Vodní stres: pH xylémového roztoku roste na 7.2 => stresem indukovaná alkalizace apoplastu upřednostňuje tvorbu disociované formy ABA, ABA⁻. Dehydratace současně vede k okyselení cytozolu => ABA⁻ se dostává do mezofylových buněk špatně => více ABA⁻ se dostává ke svěracím buňkám, kde se váže na membránový receptor.

Nový koncept – ABA je syntetizována v listech

Komunikace mezi kořenem a stonkem během dehydratace je zprostředkována peptidem CLE25 a LRR receptor-like kinázami BAM1 a BAM3



Update 2018

Takahashi F et al. (2018) Nature 556: 235-238

Christmann A and Grill E (2018) Nature 556: 178-179

CLE25 – peptidy ze skupiny CLE (CLAVATA3, TDIF)

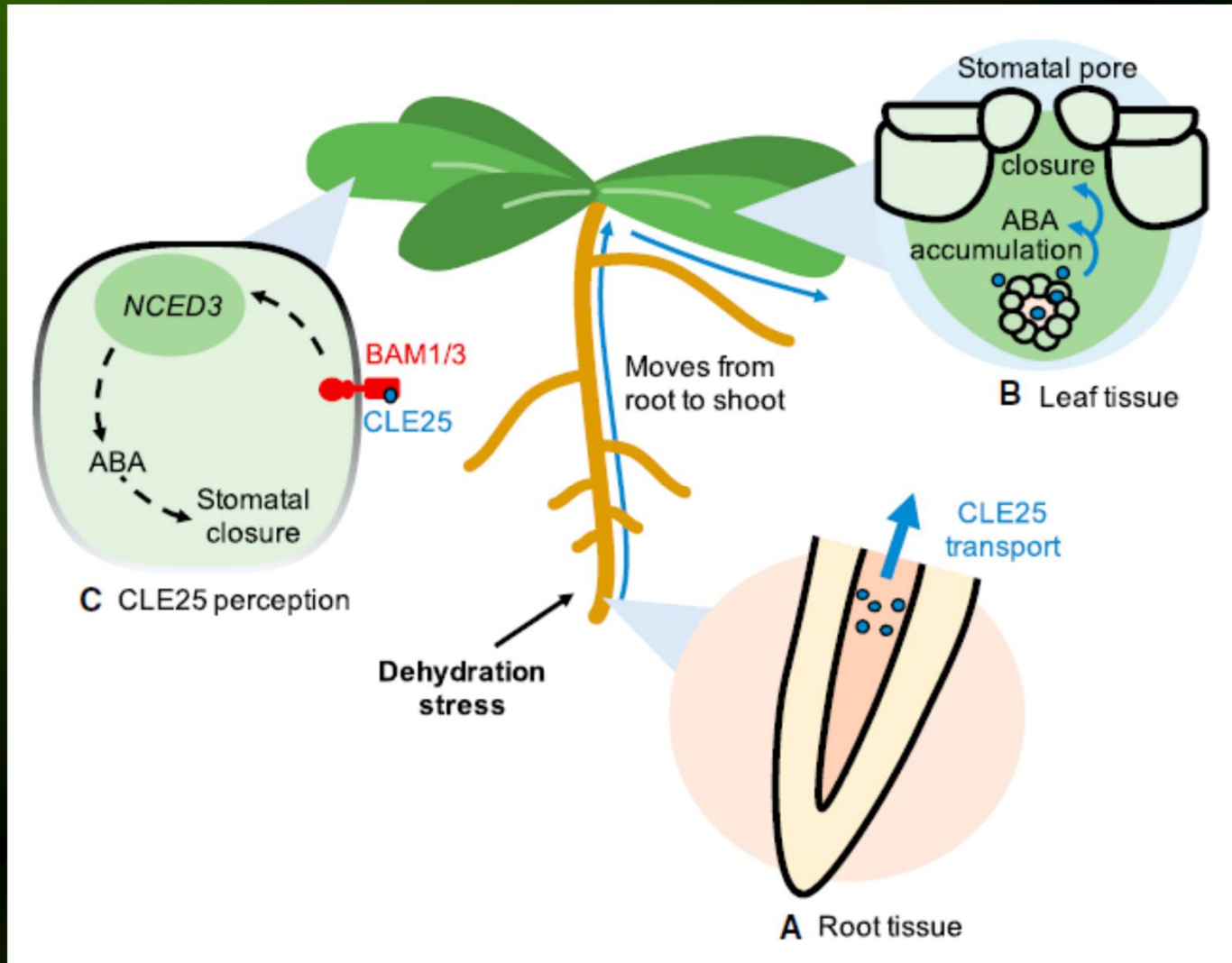
BAM1, BAM3 – receptory rozpoznávající peptidy CLE

NCED3 – 9-*cis*-epoxycarotenoid dioxygenase

Katalyzuje syntézu xantoxinu (z *cis*-neoxanthinu) během abiotického stresu

Update 2018

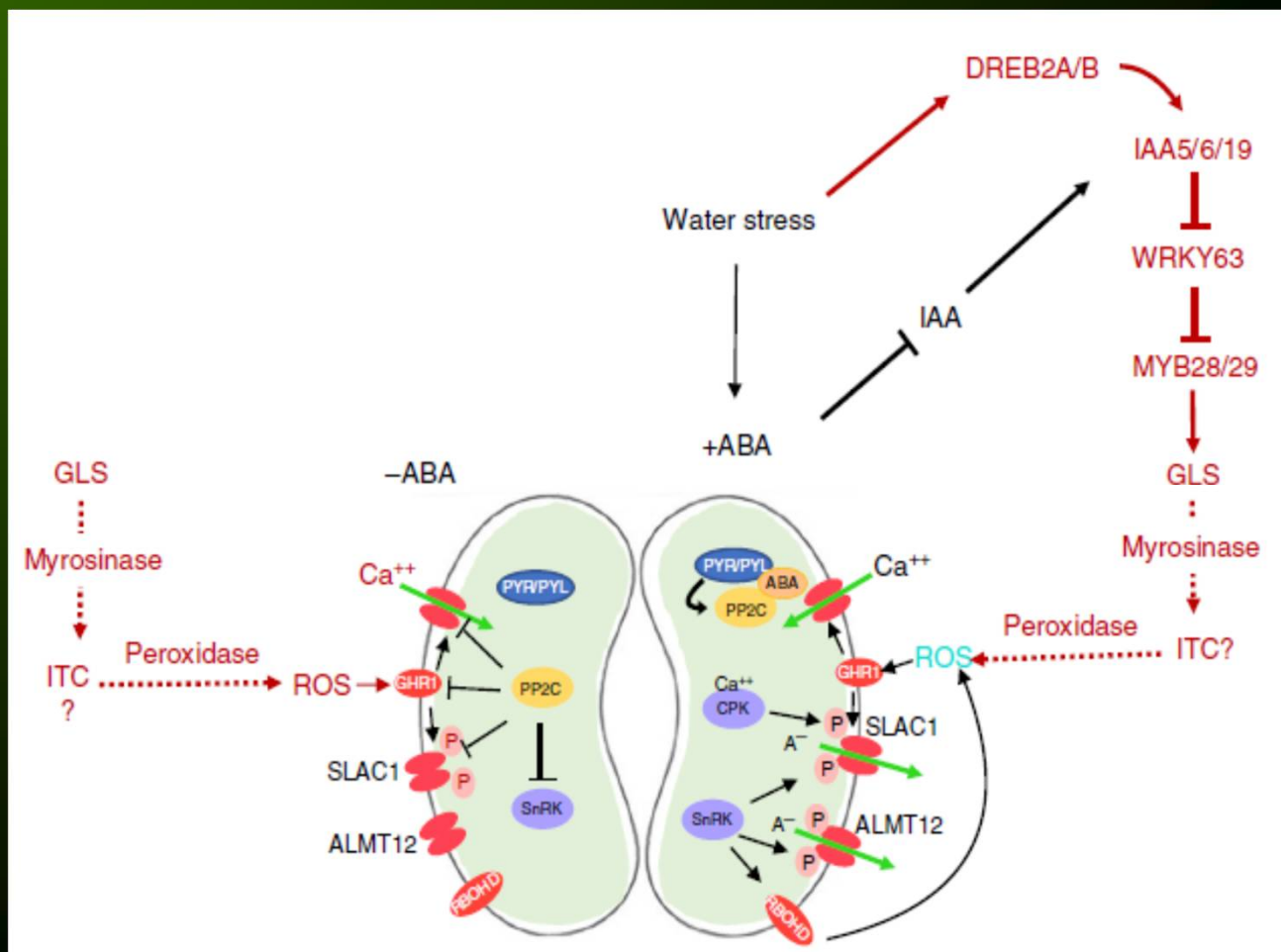
McLachlan DH et al. (2018) Molecular Cell 70: 991-992



Auxiny – transkripční represory Aux/IAA jsou nutné k toleranci rostlin k abiotickým stresům. Při působení abiotických stresů transkripční faktory DREB/CBF přímo stimulují transkripci genů IAA5 a IAA19; ABA blokuje tvorbu auxinu.

Update 2019

Salehin M et al. (2019) Nature Communications 10: art. no. 4021



DREB – transkripční faktory
Dehydration Responsive Element Binding factors)

WRKY – transkripční faktory
s typickým motivem WRKYGQK

MYB – transkripční faktory
(Avian MYeloBlastosis virus)

GLS – Glukosinoláty,
sekundární metabolity - chrání
rostlinu před býložravci
a patogeny

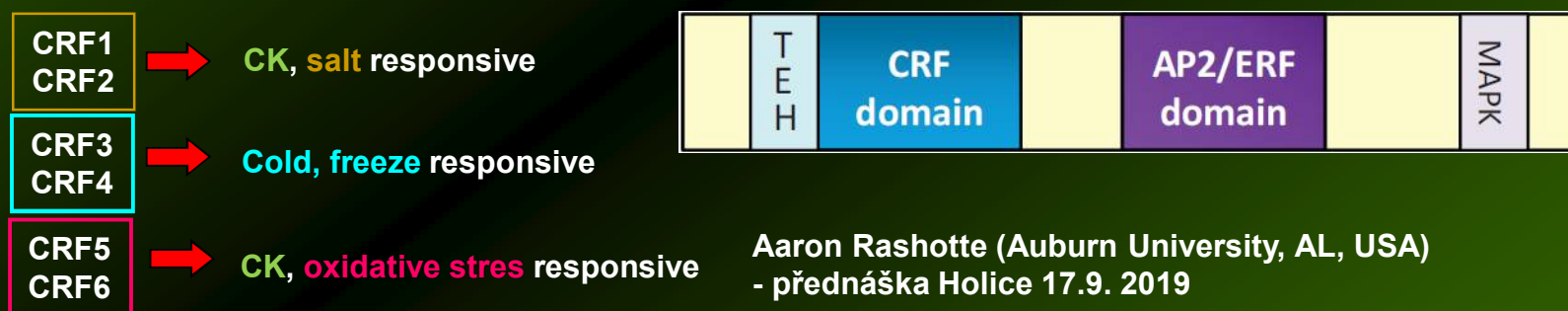
Myrosinase – enzymy glycosid
hydrolázy - chrání rostliny před
býložravci

ITC – isothiocyanáty

Cytokininy (CKs) – exprese genů zapojených v syntéze CKs se při suchu a zasolení snižuje

Snížená hladina CKs v kořenech => zvýšení velikosti kořenového systému => => zvýšená schopnost absorbovat H₂O

CYTOKININ RESPONSE FACTORS (CRFs) – transkripční faktory patřící do skupiny proteinů APETALA2/ETHYLENE RESPONSE FACTOR (AP2/ERF) – hrají důležitou úlohu v reakcích rostlin k abiotickým stresům

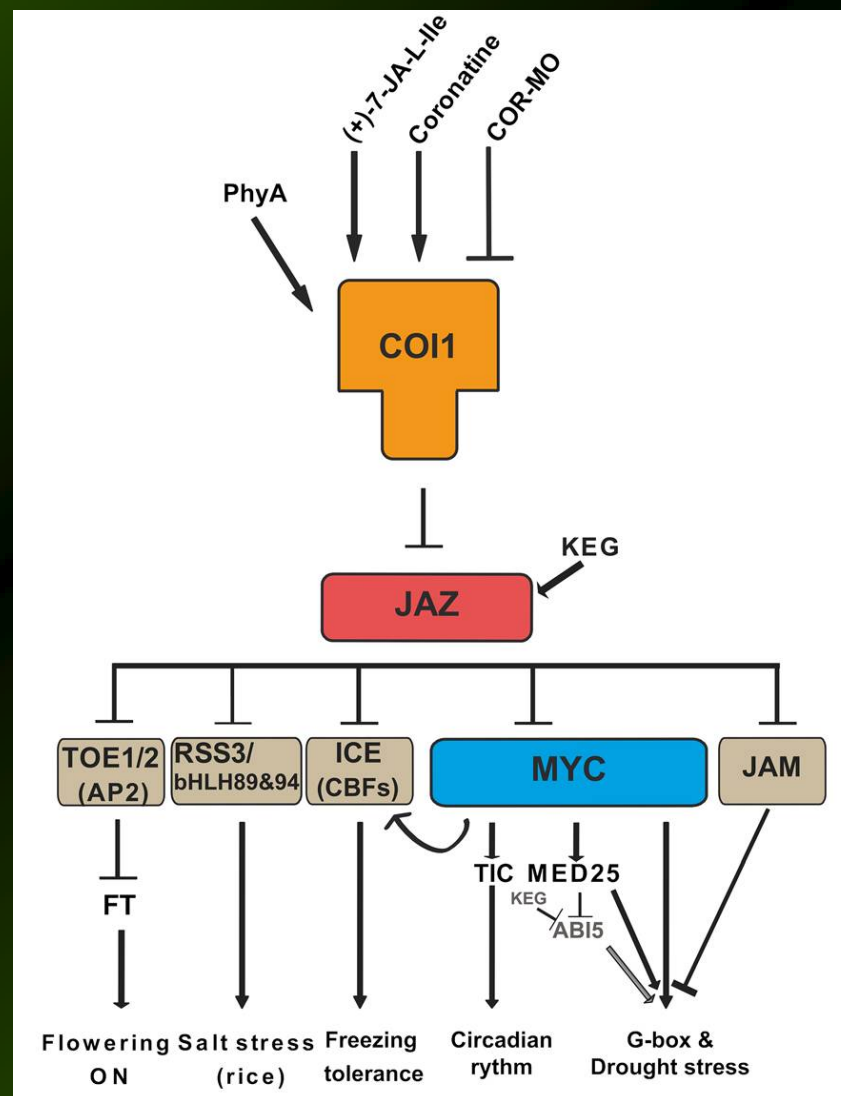


2016 – zvýšená hladina CKs => tolerance k zasolení a suchu: CKs udržují expresi genů spojených s růstem a metabolismem, genů, jejichž exprese se jinak typicky při stresu snižuje (transgenni rostliny).

Kyselina jasmonová (JA)

Standartní podmínky: **JAZ** proteiny potlačují proteiny a TF, které kontrolují řadu aspektů reakcí k abiotickým stresům modulovaných JA, jako je zasolení (prostřednictvím RSS3), chlad (ICE TFs), a tolerance k suchu (MYC and JAM TFs), ale také přechod na kvetení (AP2-type TOE TFs a FT).

Vazba JA: Po vazbě k receptorovému komplexu COI1-JAZ, jasmonáty ((+)-7-JA-L-Ile) nebo COR (coronatin) spouští COI1-zprostředkovanou degradaci represoru JAZ. Tím se uvolní TFs, které nastartují transkripční změny indukované JA.



Update 2016

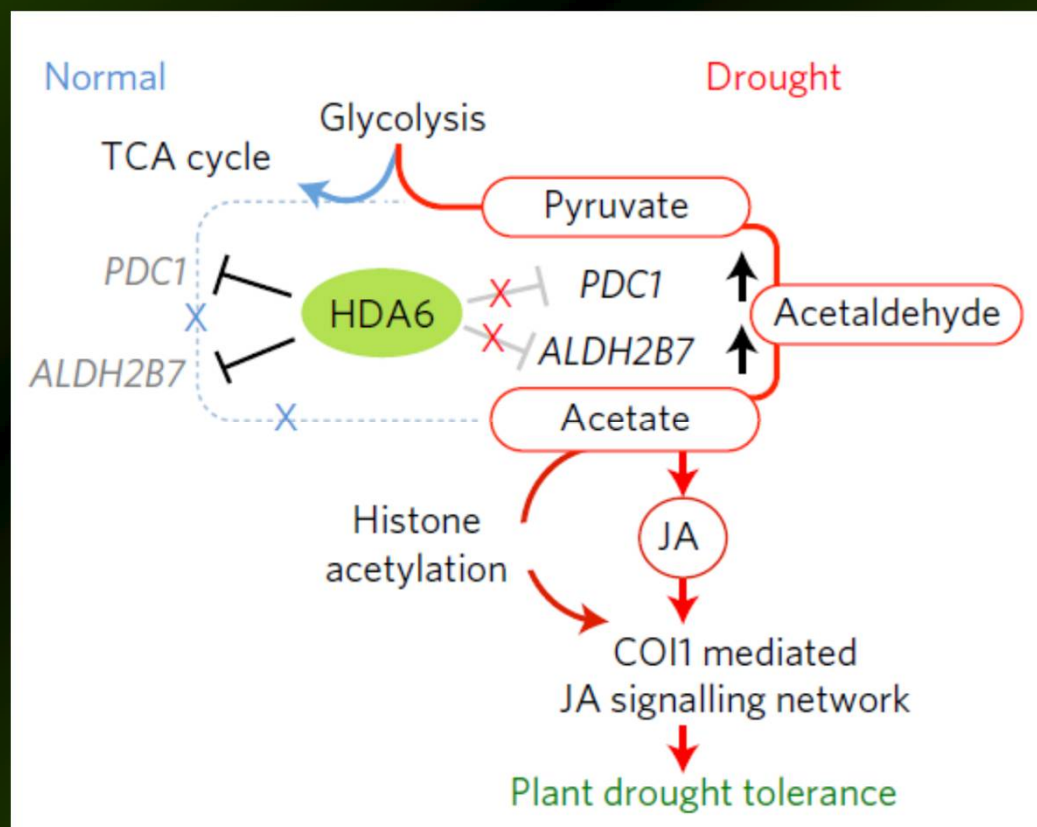
Goossens J et al. (2016) Plant Mol Biol 91: 673-689

Objevena nová strategie obrany rostlin proti suchu

Za sucha rostliny spouští metabolickou přeměnu glykolýzy na syntézu acetátu, který stimuluje signalizaci kyseliny jasmonové (JA).

PDC1 = pyruvát dekarboxyláza

ALDH2B7 = acetaldehyd dehydrogenáza



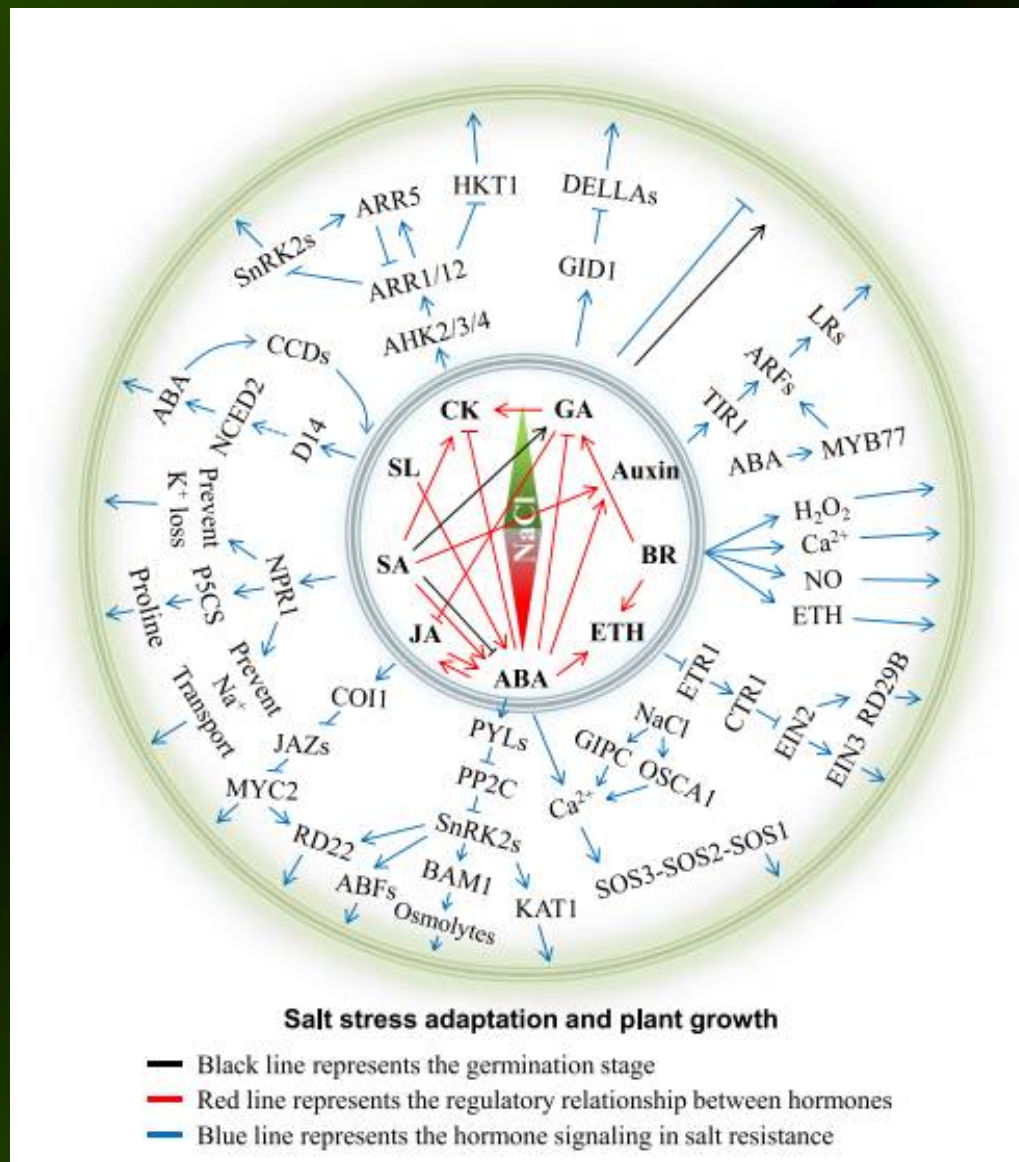
Update 2017

Kim J-M J et al. (2017) Nature Plants 3: 1-7

Komplexní zapojení hormonů v toleranci rostlin k zasolení

Update 2020

Yu Z et al. (2020) TIPS 25: 1117-1130



e) Chladový stres

Chlad = teplota příliš nízká pro normální růst a příliš vysoká pro vznik ledu

Tropické a subtropické rostliny – citlivé k chladu

Zemědělské plodiny citlivé k chladu: kukuřice, fazole, rajče, rýže



25-35 °C :  10-15 °C :



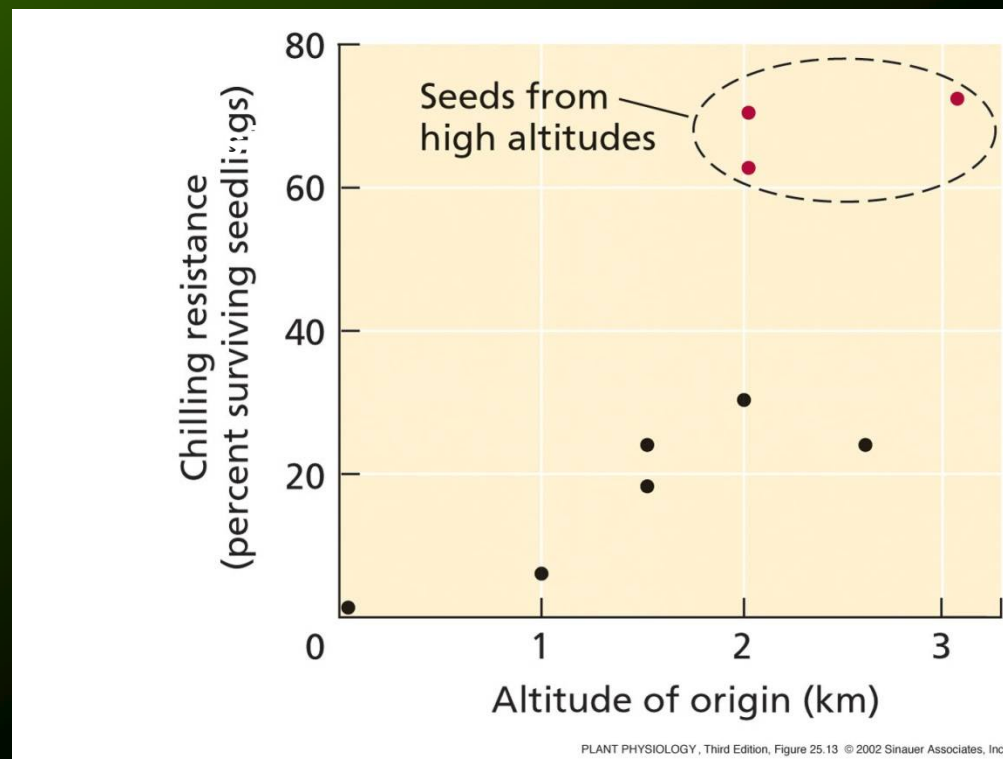
Chladové poškození:

- zpomalen růst
- odbarvení listů
- výskyt poranění

Druhy citlivé k chladu ukazují variabilitu v reakcích k chladu

Tolerance rostlin k chladu se zvyšuje častým vystavením rostliny chladnému (neletálnímu) prostředí

Rostliny z vyšších nadmořských výšek lépe aklimatizované na chladový stres



Arabidopsis

Teplota +1 až +5°C po dobu 1 až 5 dnů



Schopnost přežít teploty -8 až -12°C

Mechanismus aklimatizace intenzivně studován



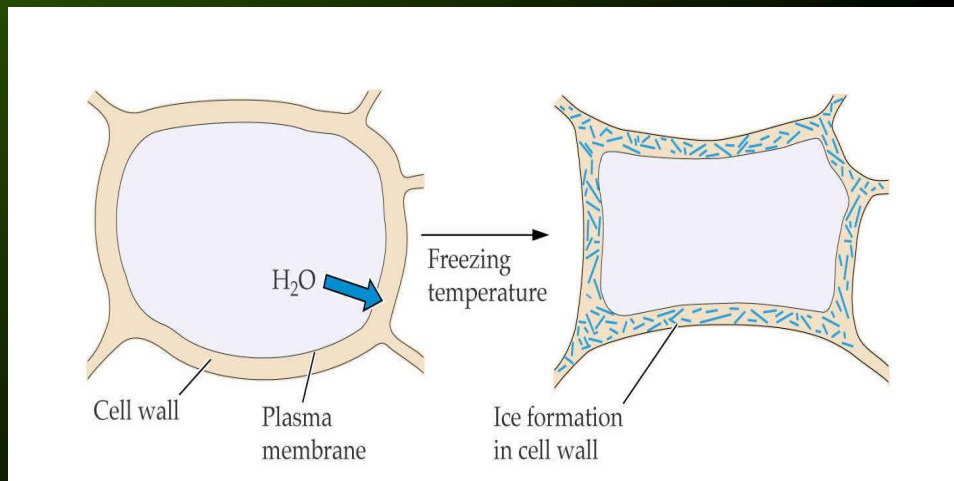
Modelová rostlina pro studium aklimatizace - smrk

Chladový šok – náhlé vystavení rostlin teplotám kolem 0 °C; zvyšuje riziko poškození

Mrazové poškození – nastává při teplotě nižší než 0 °C

Nízká teplota → vznik ledu v intercelulárním prostoru

Vodní deficit ← H₂O se pohybuje z buňky ven k ledu



Rostliny tolerantní k mrazu:

- tvorba intercelulárního ledu => netvoří se krystaly v cytoplasmě
- +
- akumulace antifreezing proteinů v apoplastu => zpomalení tvorby ledu

- Procesy v průběhu tolerance k mrazu:**
- stabilizace membrány
 - akumulace cukrů, dalších osmolytů a antifreezing proteinů
 - změny v expresi genů

Mrazové poškození:

- poškození listů
- inhibice fotosyntézy
- nižší translokace karbohydrátů
- nižší respirace
- inhibice syntézy proteinů
- zvýšená degradace existujících proteinů

Ztráta funkce
plazma membrány,
tonoplastu,
membrány chloroplastů
a mitochondrií

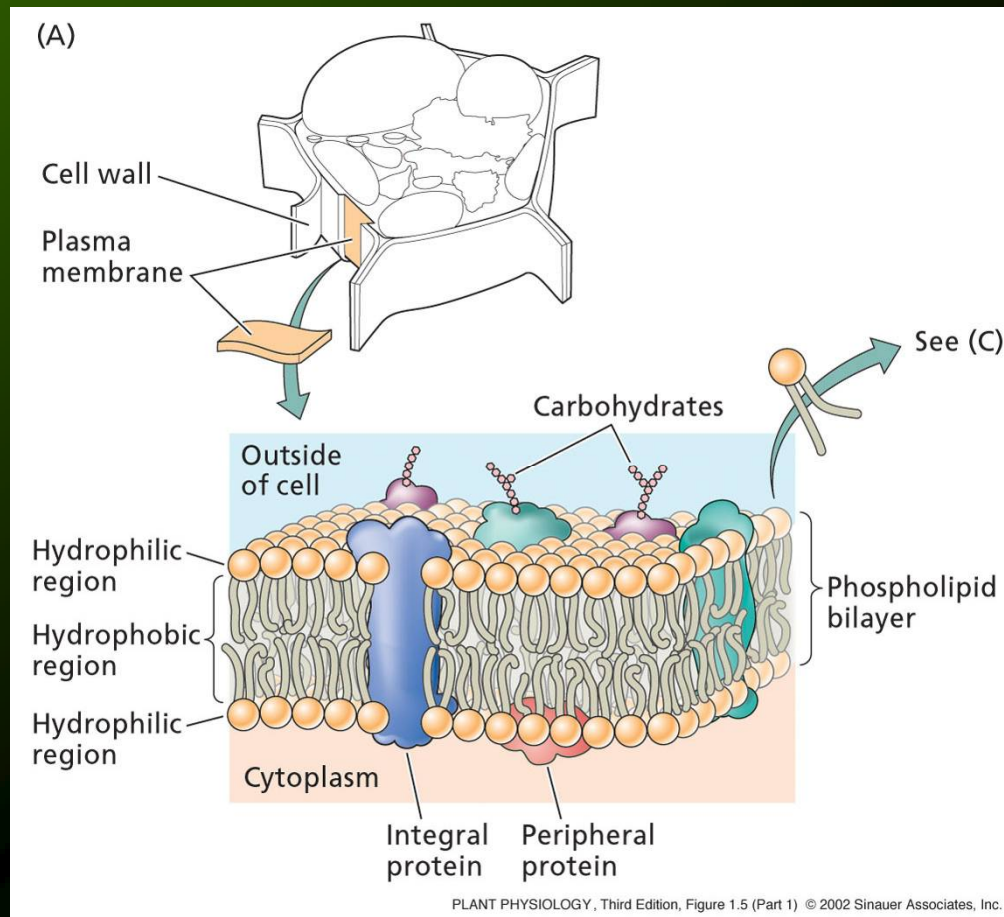
Únik roztoků z buněk

Dehydratace

Proč jsou funkce membrán poškozeny chladem?

Plazmatická membrána – lipidová dvojvrstva, obsahující proteiny a steroly

Fyzikální vlastnosti lipidů ovlivňují aktivitu integrálních proteinů, včetně H⁺-ATPázy, přenašečů, kanálů



Chladový stres



Snižuje se fluidita membrány



Špatná funkce proteinů

Membránové lipidy rostlin rezistentních k chladu – vyšší podíl nenasycených mastných kyselin (dvojná vazba => membrána je tekutější => tuhne při nižší teplotě ve srovnání s membránami s vyšším podílem nasycených mastných kyselin)

TABLE 25.5

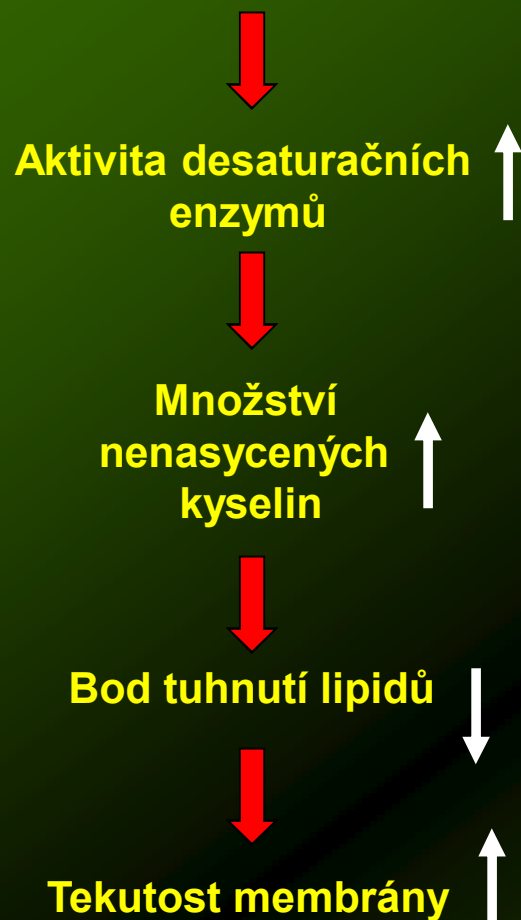
Fatty acid composition of mitochondria isolated from chilling-resistant and chilling-sensitive species

Major fatty acids ^a	Percent weight of total fatty acid content					
	Chilling-resistant species			Chilling-sensitive species		
	Cauliflower bud	Turnip root	Pea shoot	Bean shoot	Sweet potato	Maize shoot
Palmitic (16:0)	21.3	19.0	12.8	24.0	24.9	28.3
Stearic (18:0)	1.9	1.1	2.9	2.2	2.6	1.6
Oleic (18:0)	7.0	12.2	3.1	3.8	0.6	4.6
Linoleic (18:2)	16.4	20.6	61.9	43.6	50.8	54.6
Linolenic (18:3)	49.4	44.9	13.2	24.3	10.6	6.8
Ratio of unsaturated to saturated fatty acids	3.2	3.9	3.8	2.8	1.7	2.1

^a Shown in parentheses are the number of carbon atoms in the fatty acid chain and the number of double bonds.

Source: After Lyons et al. 1964.

Aklimatizace



Důležitost membránových lipidů:

Transgenní rostliny *Arabidopsis* obsahující gen z *E. coli*, který zvyšuje podíl nasycených kyselin

Transgenní rostliny citlivější k chladu

Arabidopsis mutant *fab1* má zvýšenou hladinu nasycených kyselin

Zničení chloroplastů při nižší teplotě

Schopnost tolerovat mráz se liší v různých pletivech.

Dehydratovaná pletiva (semena, spory hub) – velice odolné (i $-273\text{ }^{\circ}\text{C}$)

Hydratované vegetativní buňky – citlivé; mohou však přežít při rychlém zmražení

Rychlé zmražení



Tvorba malých
krystalů



Neschopnost
mechanického
poškození buňky

Přirozené podmínky – pomalé zmražování; led se tvoří v intercelulárních prostorách a v xylému, kde nedojde k poškození buněk.

Dlouhotrvající mráz – růst intercelulárních krystalů vede k odčerpávání vody z buněk => dehydratace protoplastu => smrt buněk.

Geny indukované chladem u *Arabidopsis* jsou homologické ke genům nalezeným u ryb



Rostliny a živočichové – podobný mechanismus omezení růstu krystalů

Cukry – kryoprotektivní efekt – stabilizují proteiny a membrány během dehydratace indukované nízkou teplotou (kapusta – kryoprotektivní glykoproteiny).

Více cukru => větší tolerance k mrazu – rozpustné cukry se akumulují v buněčné stěně, kde omezují růst krystalů ledu.

Prolin – akumulace až po vyvinutí tolerance k mrazu => nejsou primární determinanty

Arabidopsis mutant *eskimo1* – tolerantní k mrazu, overexprimuje cukry a prolin

Někteří mutanti akumulují cukr, ale nejsou tolerantní k mrazu

Pouhá akumulace cukrů není dostatečná k vytvoření tolerance k mrazu



Deep supercooling (hluboké podchlazení) – mechanismus aklimatizace k mrazu – zabránění (potlačení) tvorby ledových krystalů zmražením hluboko pod bod mrazu (pod $-35\text{ }^{\circ}\text{C}$).

Stromy v Rocky Mountains, Colorado – borovice, jedle



**Stromy JV Kanada,
východ USA – dub,
jilm, javor, bříza**



**Aklimatizace prudce
klesá na jaře, kdy nastává
jarní růst. Stejně stromy
mohou být zničeny
i teplotami kolem $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$.**

Rostlinný hormon ABA navozuje rezistenci rostlin k mrazu.

ABA indukuje změny ve skladbě proteinů. Indukuje syntézu proteinů, často shodných s proteiny indukovanými chladem.

Analýza genů indukovaných ABA či chladem

Proteiny homologní s LEA proteiny indukované rovněž osmotickým stresem.



Hladina ABA v pletivech rostlin a citlivost k ABA je spojena s tolerancí rostlin k mrazu (ozimá pšenice, žito, špenát, *Arabidopsis*)

Mutant *abi1* (*ABA insensitive*) – necitlivý k ABA

Mutant *aba1* (*ABA deficient*) – nízká hladina ABA

Nejsou schopny aklimatizovat se k mrazu



Ne všechny geny indukované chladem jsou indukované ABA



Exprese genů indukovaných ABA není kritická pro založení tolerance k mrazu

Update 2020

Lim CW and Lee SC (2020) *Frontiers in Plant Science* 11, Art. no: 587620

Chladový stres prostřednictvím ABA a ABA receptoru PYL11 způsobuje zpomalení klíčení semen *Arabidopsis*, ale indukuje zavírání průduchů nezávisle na ABA.

Tolerance k mrazu je indukována nízkými teplotami působícími na rostlinu po určitou dobu (brambory ~ 15 dnů)



Schopnost rostlin přežít extrémně náhlé výkyvy teplot (JZ USA: California, Arizona, Nevada, Utah, New Mexico, Colorado; ve dne teplo, v noci pod bod mrazu)



Od poloviny 80. let → Identifikováno mnoho genů indukovaných nízkou teplotou

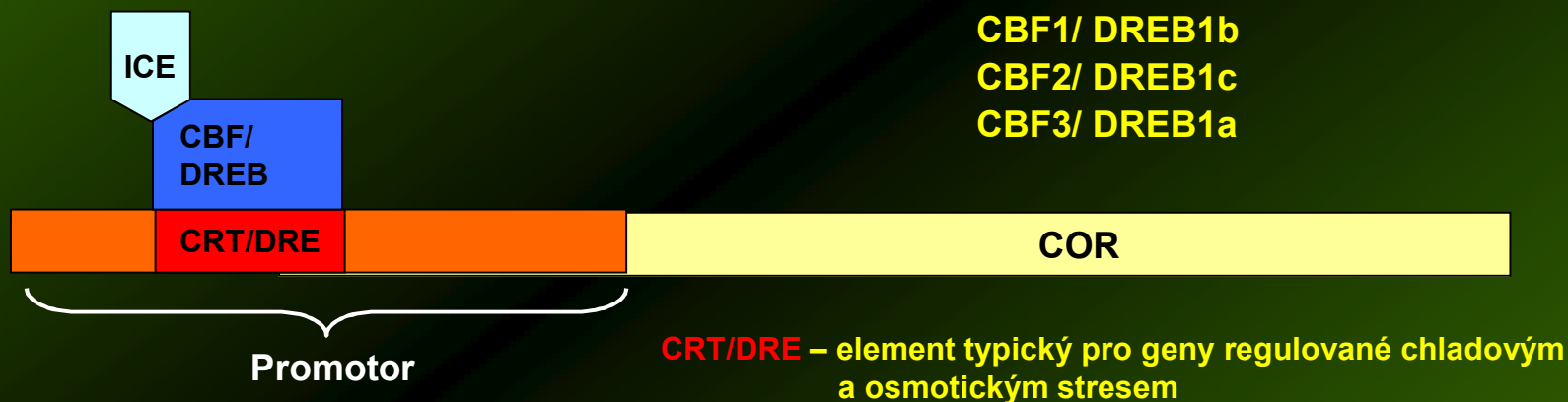
Geny indukovány chladem:

- Geny kódující proteiny s vlastností chaperones; jsou indukovány i tepelným stresem
- Geny kódující THP – thermal hysteresis proteins – dávají vodným roztokům vlastnosti termální hystereze = přechod z fáze kapalné na pevnou je indukován nižší teplotou než je teplota potřebná k přechodu pevné fáze na fázi tekutou; patří k antifreezing proteinům – zabraňují tvorbě krystalů

- Transkripční faktory regulující expresi genů indukovaných chladem

~ 100 genů indukovaných chladovým stresem; jejich exprese je aktivována transkripčními faktory CBF (C-repeat Binding Factors) (DREB – Dehydration Responsive Element Binding factors)

CBF1 obsahuje 60ti aminokys. DNA-binding doménu; konstitutivní exprese CBF1 => zvýšená exprese COR (COLD Regulated, COLD Responsive) transkriptů => tolerance k mrazu



CBF1/DREB1b – kontrolován transkripčními faktory ICE (Inducer of CBF Expression)

Update 2019

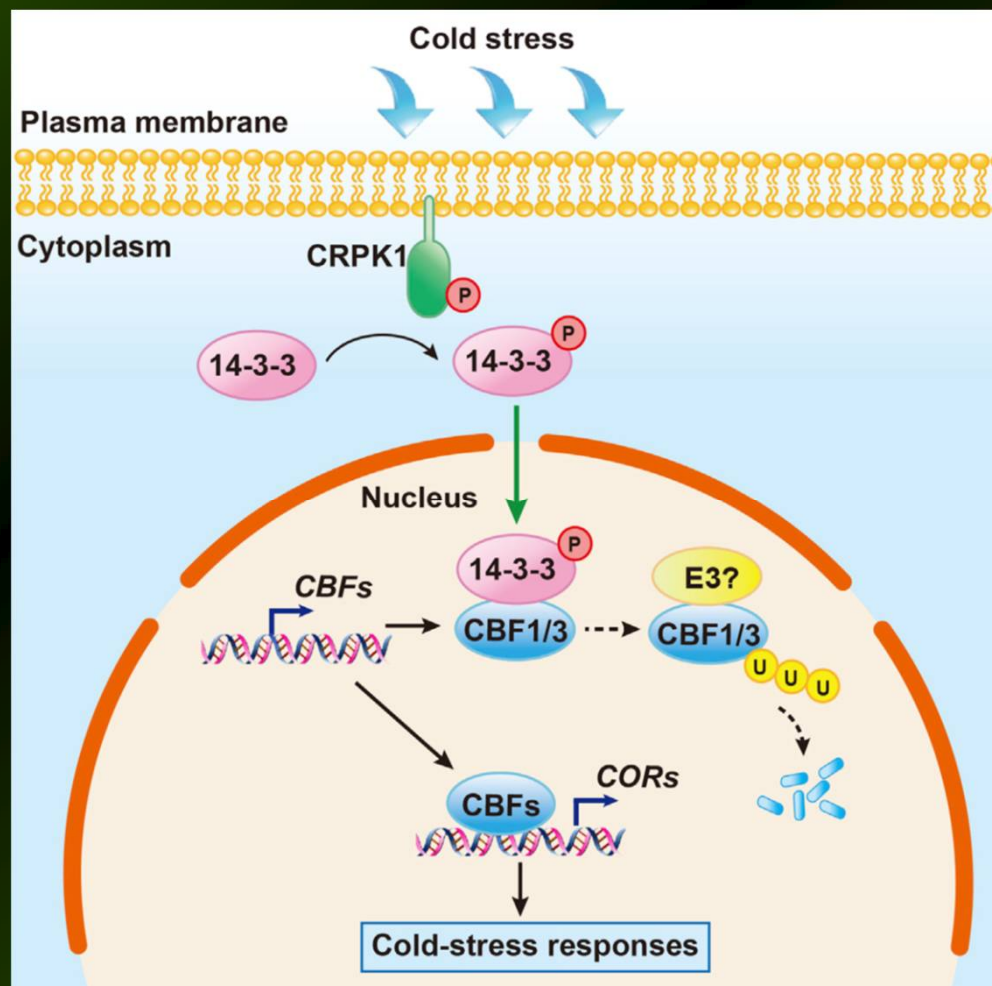
Xie H et al. (2019) Plant Cell Physiol 60: 152-165

Regulace transkripce CBF genů vlivem metylace ICE vede k rozmanitosti tolerance rostlin k chladovému stresu.

Fine-tuning (jemná regulace) CBF signalizace při chladovém stresu

CRPK1 = Cold-Responsive Protein Kinase 1 (plazmatická membrána)

CRPK1-14-3-3 systém zajišťuje jemnou regulaci odezvy k chladovému stresu



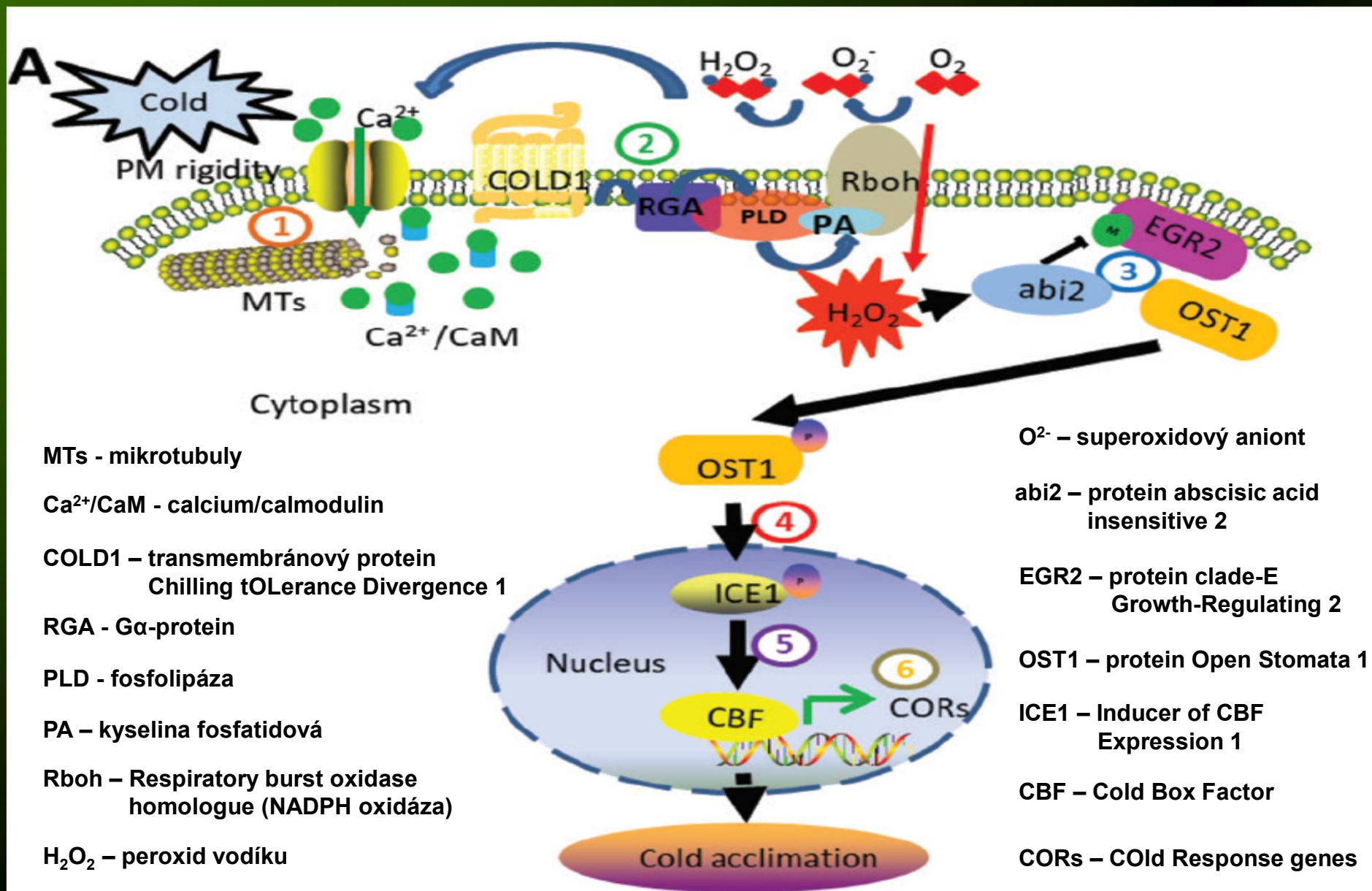
Update 2017

Liu Z et al. (2017) Molecular Cell 66: 117-128

Nejnovější model chladové signalizace

Update 2020

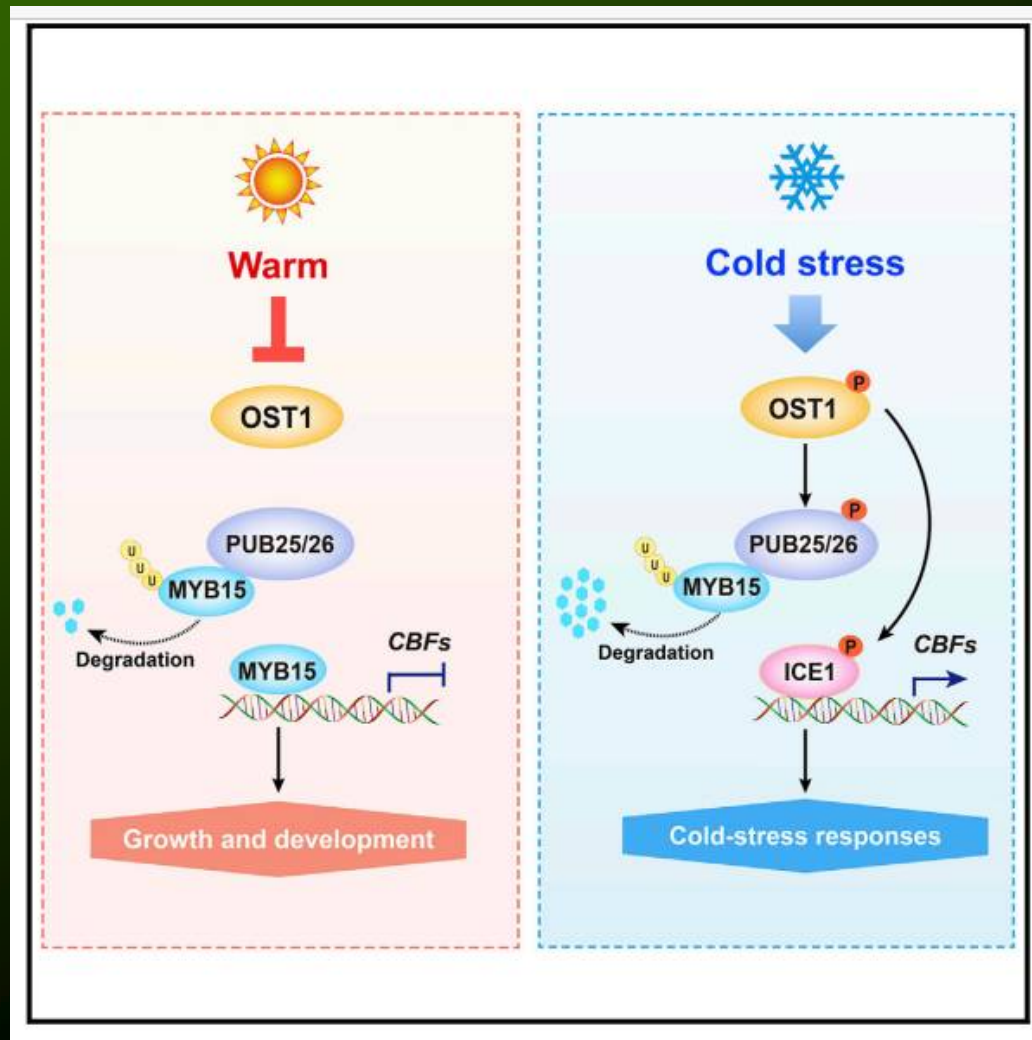
Wang L et al. (2020) J Exp Botany 71: 36 - 48



Update 2020

Wang X et al. (2019) Developmental Cell 51: 1-14

Regulace chladové tolerance vlivem OST1



PUB25, PUB26 – U-Box E3 ligázy

OST1 fosforysluje PUB25/26

PUB25/26 – aktivované fosforylací stimulují degradaci MYB15

MYB15 (myeloblastosis) – transkripční faktor = klíčový negativní regulátor exprese Cold Box Faktoru CBF

Update 2018

Liu Y, Zhou J (2018) TIPS 23: 91-93

Regulace chladové tolerance Ca^{2+} dráhou a prostřednictvím protein kináz (MEKK, MAPKKK, MKK a MAPK)

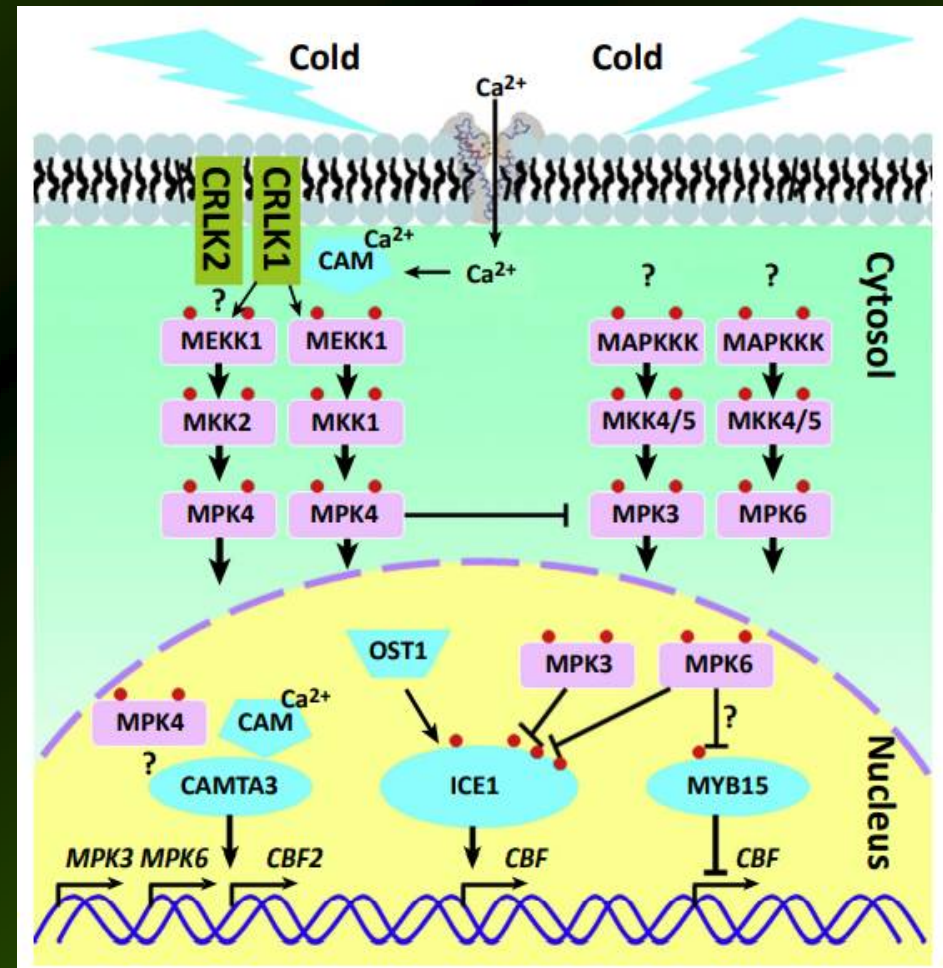
CRLK1 a CRLK2 = Ca^{2+} /calmodulin (CAM)-regulovaná receptor-like kináza 1 a 2

CRLK1/2 rychle aktivuje kaskádu MEKK1 - MKK1/2-MPK4. Tato kaskáda potlačuje nezávislou kaskádu MPK3/6.

Chladem aktivované kinázy MPK3/6 jsou transportovány do jádra, kde stimuluji degradaci ICE1.



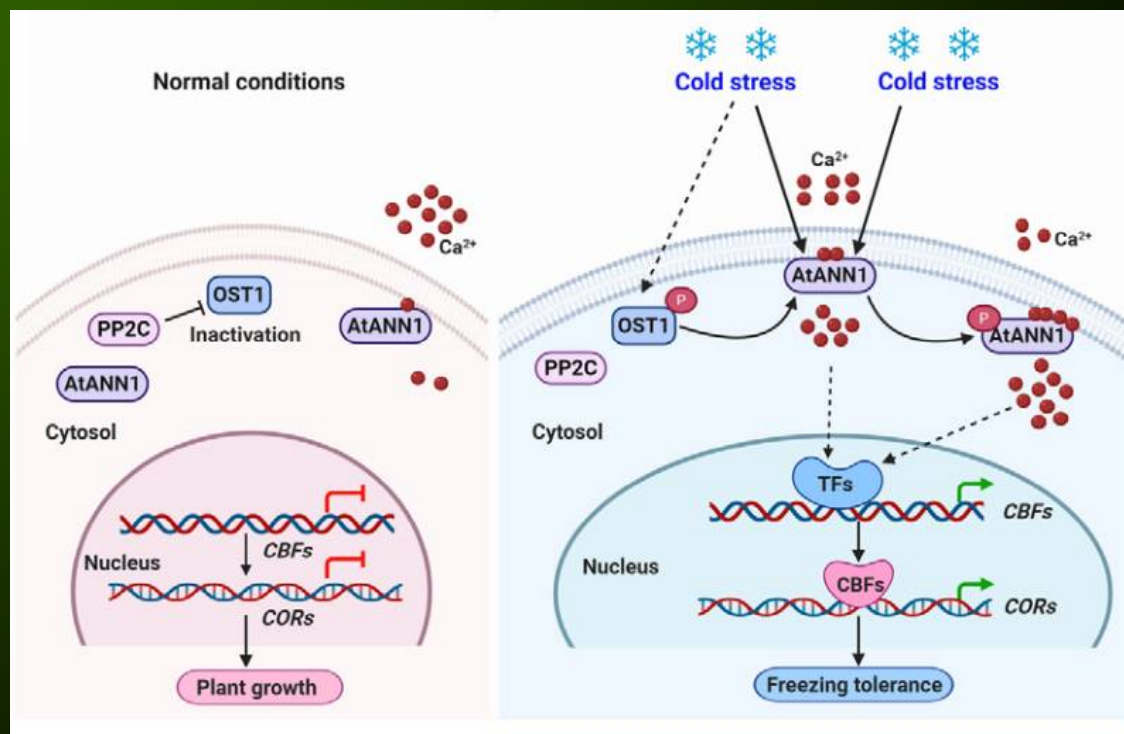
Indukce tolerance k chladu



Update 2021

Liu Q et al. (2021) EMBO J 40: e104559

Ca²⁺ transportér ANNEXIN1 zprostředkuje chladem-indukovanou signalizaci a toleranci k mrazu



Annexin – protein, který váže fosfolipidy a Ca²⁺ - skupina proteinů konzervovaná mnoha organizmech.

Chladový stres – fosforylace
OST1 = aktivace OST1 a
fosforylace AtANN1

Zesílený
transport Ca²⁺
annexinem

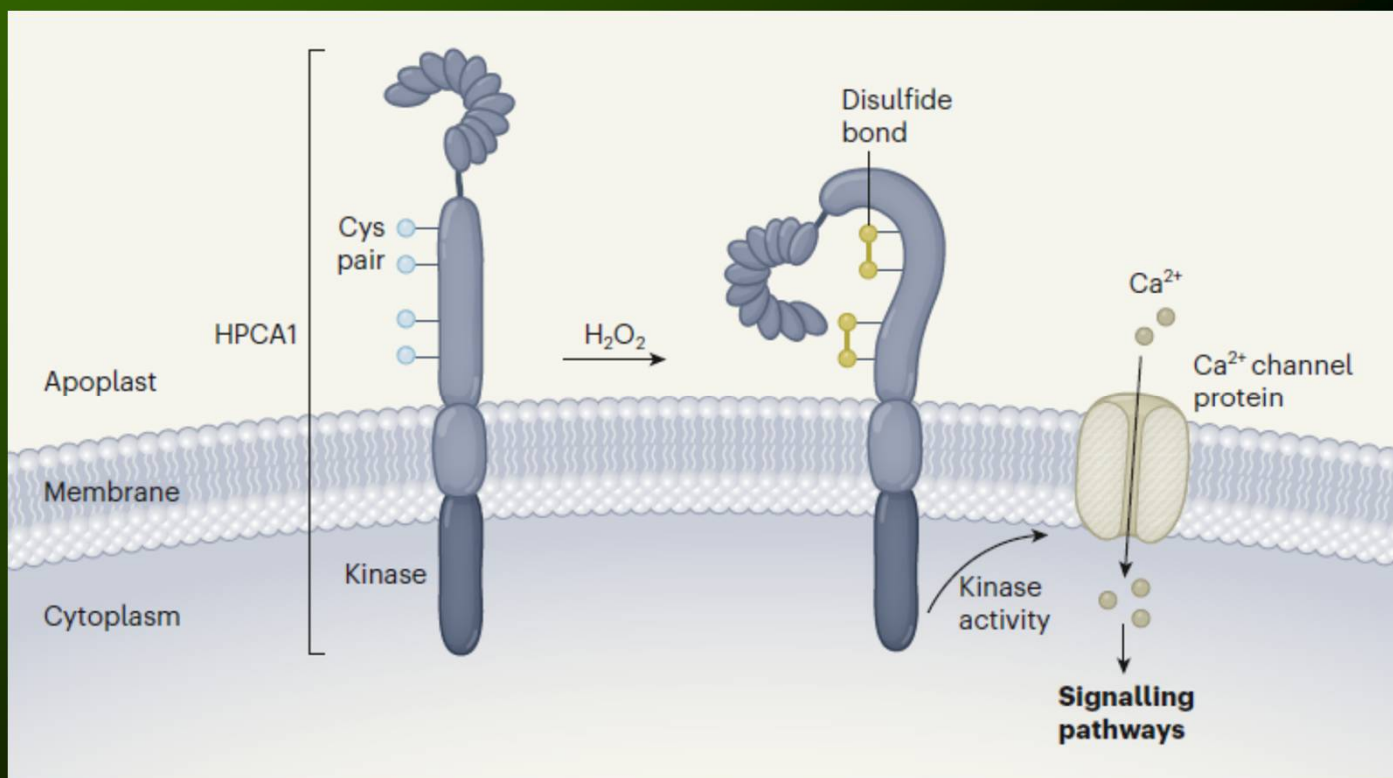
Stimulace
vazby Ca²⁺ k
annexinu

[Ca²⁺]_{cyt}

Exprese CBF a COR

Tolerance k chladu

Identifikace prvního povrchového receptoru H_2O_2 - HPCA1



HPCA1 – **H**ydrogen-**P**eroxide-induced **Ca²⁺** - transmembránový protein

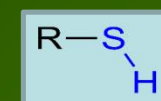
Update 2020

Wu F et al. (2020) Nature 578: 577-581

Foyer CH F (2020) Nature 578: 518-519

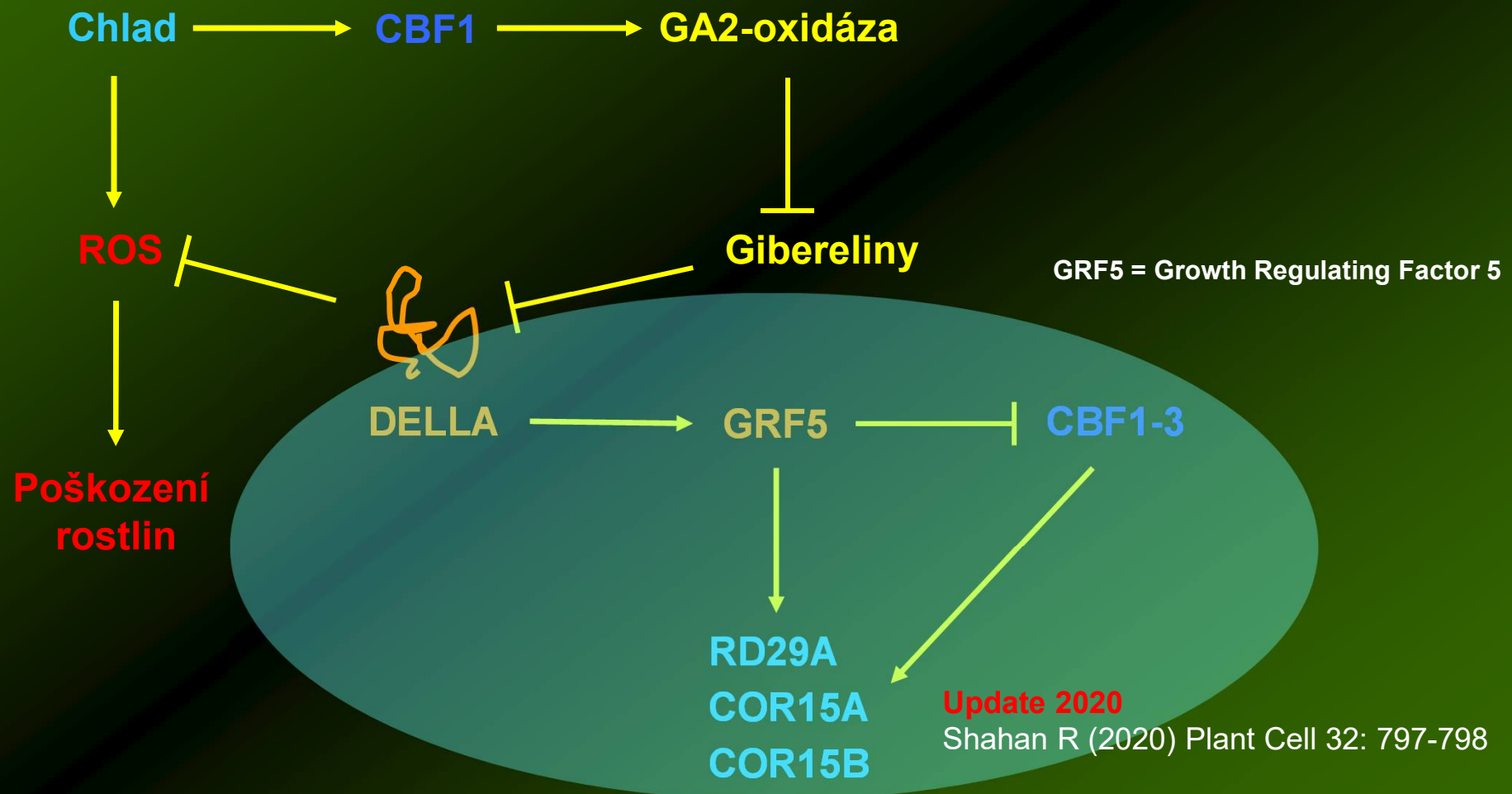
H_2O_2 oxiduje thiolové skupiny (-SH) na cysteinových reziduích, vytváří kyselinu sulfenovou (SOH) a disulfidové vazby. Tato oxidace spouští konformační změnu apoplastové části proteinu a spouští kinázovou aktivitu intracelulární domény. To vede neznámými mechanismy k otevření Ca^{2+} kanálů a transportu Ca^{2+} do buňky. Dochází ke spuštění signálních drah.

Thiolová skupina



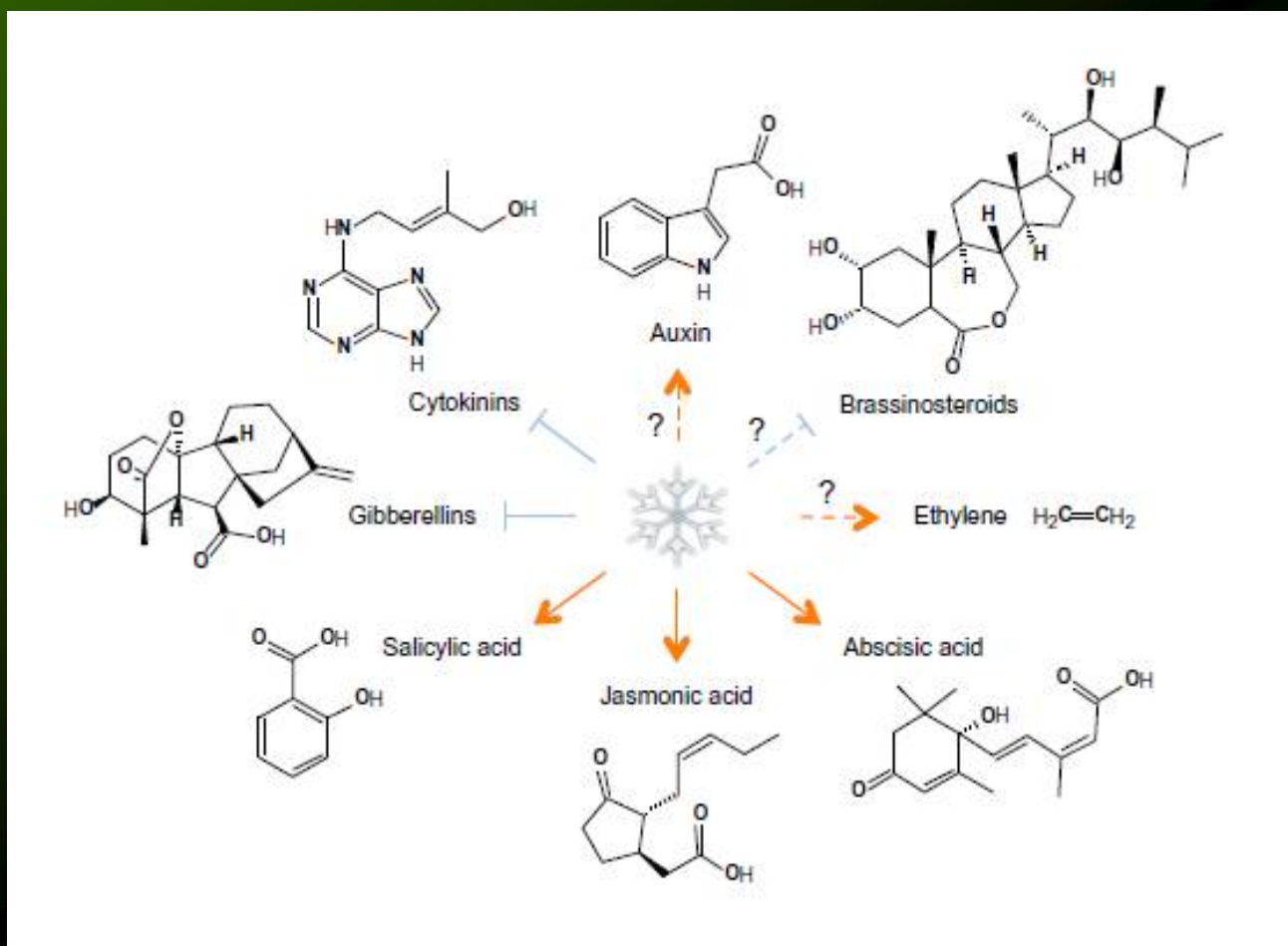
Mechanismy tolerance rostlin k chladu zapojující gibereliny

2008



Hormonální kontrola reakcí rostlin k chladovému stresu

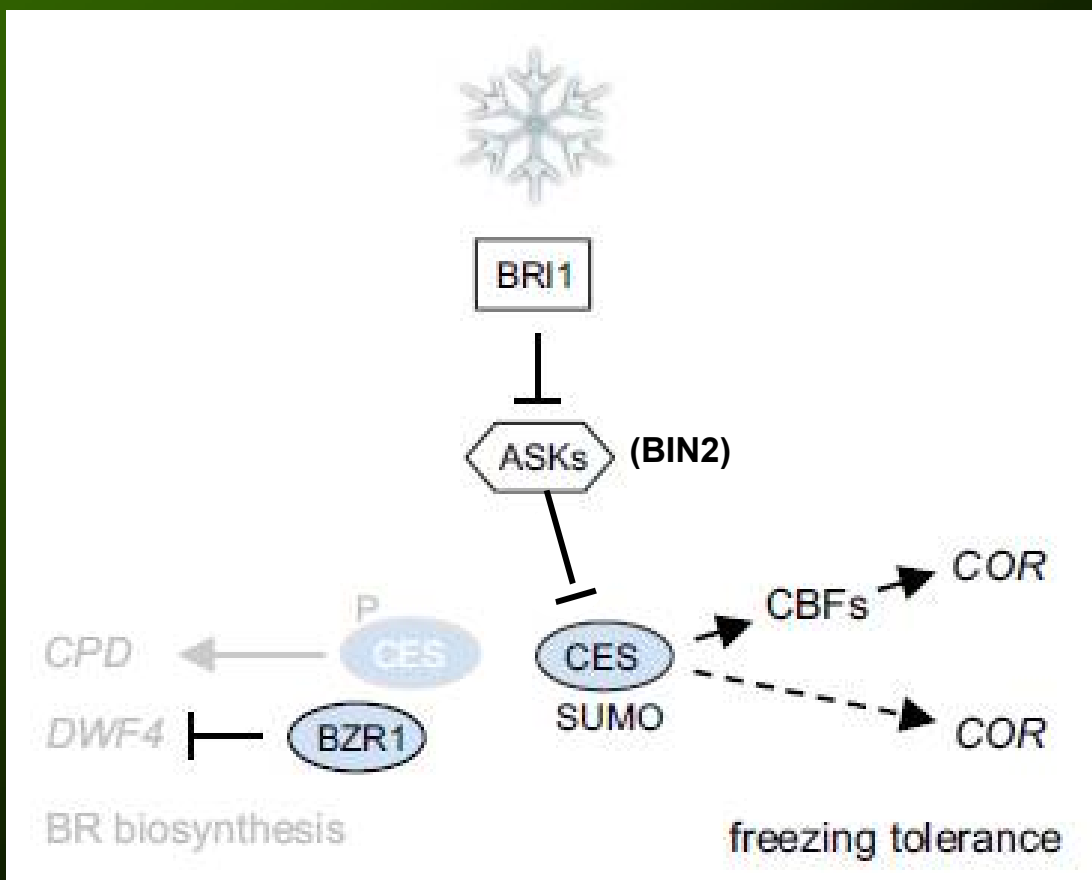
Dopad chladového stresu na hladinu hormonů v rostlině



Update 2016

Eremina M et al. (2016) Cell Mol Life Sci 73: 797-810

Úloha **brassinosteroidů** v reakcích rostlin k chladovému stresu

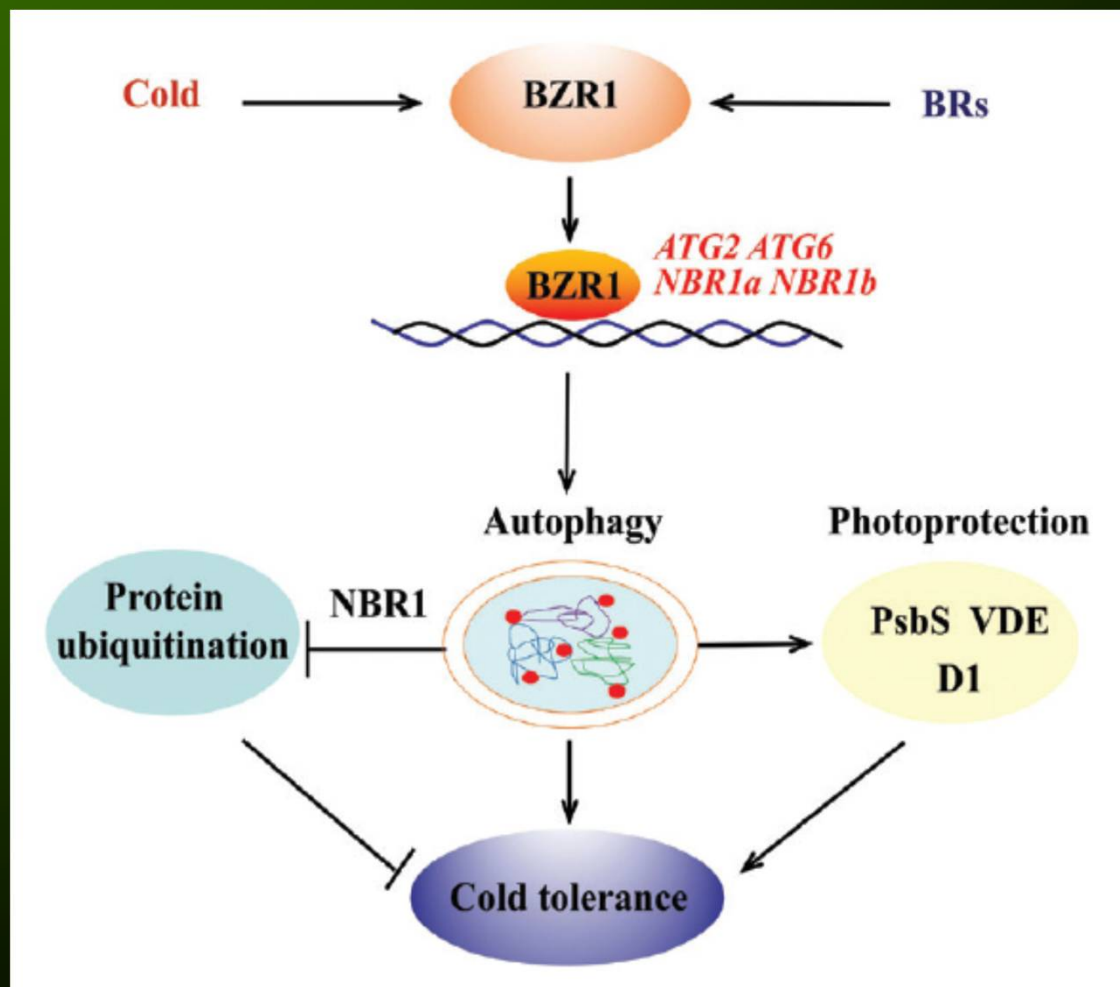


Update 2016

Eremina M et al. (2016) PNAS
113: 5982-5991

Chladový stress stimuluje BR signalizaci a tím indukuje defosforylaci a SUMOylaci proteinů CES a aktivuje CBF-závislou a CBF-nezávislou cestu regulace genů COR (COLD Responsive). Následkem aktivace signální dráhy BRs je syntéza BRs zpětnou vazbou potlačena, a to regulací aktivátorů (CES) a represorů (BZR1) transkripce genů zapojených v biosyntéze BRs.

Brasinosteroidy indukují toleranci k chladu prostřednictvím autofagie



BZR1 – transkripční faktor

Autofágny geny:

ATG2, ATG6, NBR1A, NBR1b

Fotoprotektivní geny:

PsbS, VDE, D1

Autofágny receptor: NBR1

Update 2020

Chi C et al. (2020) J Exp Botany 71: 1092-1106

Update 2018

Anwar A et al. (2018) Biological Research 51: 46

Úloha BRs v chladovém stresu