

MBR2 2017 1

5) Klíčení semen a mobilizace rezerv

a) Dormance
b) Klíčení semen
c) Mobilizace rezerv

2

a) Dormance

Zrání embrya se vyznačuje tím, že se embryo stává **dormantním**. Aby se buňka dostala do dormance musí dojít k 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.

3

Živá semena, která za vhodných podmínek nekličí (voda, kyslík) jsou ve stavu **dormance** (klid). Jako jiné dormantní struktury (dormantní pupeny), dormantní semena vyžadují další stimuly k tomu, aby kličila.

Ekodormance
- dormance, způsobená nedostatkem vhodných vnějších faktorů indukujících kličení

Endodormance
- inhibice sídlící v samotné dormantní struktuře

Paradormance (letní dormance)
- inhibice růstu vlivem jiných částí rostliny

4

Typy semenné dormance:

Primární dormance - semena jsou dormantní již v době, kdy se oddělují od mateřské rostliny

- pojistka, že semena nevykličí předčasně, pokud jsou spojena s mateřskou rostlinou

Sekundární dormance - semena ji získávají jako reakci na vnějším podmínkách, se kterými se semeno setká, když se oddělí od mateřské rostliny (vysoká teplota, přítomnost či naopak absence světla)

- zpožďuje kličení, dokud vnější podmínky nejsou pro kličení a růst příznivé

5

Dormantní vlastnosti mohou mít obaly semene nebo embrya

Seed coat-enhanced dormance - obalem řízená dormance; *Arabidopsis*, ječmen, salát, rýže, oves; když je embryo z dormantního semene odděleno od semených obalů a vloženo do vody, tak je schopno růst a vyvinout se v rostlinu

Mechanismy:

- mechanické omezení embrya
- nepropustnost semených obalů pro vodu a plyny
- obaly fungují jako bariéra zabrahující odstranění inhibičních komponent ze semene (ABA)
- kombinace těchto mechanismů

Embryo dormance – embryonální dormance; po odstranění obalů embryo neroste => řízena ABA z děloh (liska, jasan, broskev, cibule), po odstranění děloh normální růst

6

Podmínky prostředí, které mohou zrušit dormanci

Table 6.14 Termination of dormancy by various factors.

Species	Factor		
	After-ripening	Chilling (stratification)	Light
Colonial bent grass (<i>Alopecurus macrurus</i>)	+		+
Wild oat (<i>Avena fatua</i>)	+	+	
Bailey (<i>Hordium</i> spp.)	+	+	
Annual bluegrass (<i>Poa annua</i>)		+	+
Wheat (<i>Triticum aestivum</i>)	+	+	
Spartane (<i>Acer pennsylvanicum</i>)	+	+	
White birch (<i>Betula pubescens</i>)	+	+	+
Lamb's quarters (<i>Chenopodium album</i>)	+	+	+
Hazel nut (<i>Corylus avellana</i>)	+	+	
Lettuce (<i>Lactuca scariola</i> , <i>L. sativa</i>)	+	+	+
Tobacco (<i>Nicotiana glauca</i>)			+
Rum (<i>Pharus domestica</i>)	+	+	
Apple (<i>Malus domestica</i>)	+	+	(+?)
Savich pine (<i>Pinus sylvestris</i>)	+	+	

+, effective dormancy breaking.

Dormantní semena mohou za působení určitých vnějších podmínek kličít:

- nízká teplota
- světlo
- dlouhé skladování v suchu (after-ripening)

7

Rostlinné hormony hrají důležitou roli v udržování a překonání dormance

Mutanti s nadprodukcí GAS či konstitutivní reakcí k GAS } Dormance chybí
 Mutanti s deficitem ABA či necitlivostí k ABA }

Hladina ABA a GAS se dramaticky mění u semen dlouho skladovaných v suchu (after-ripened) a dále po imbibici. Reciproční změny v hladině ABA a GAS v dormantních a nedormantních embryích vedou k porušení dormance.

A Abscisic acid

B Gibberellin

Jak jsou změny v koncentraci ABA a GAS přeloženy dorůstu kořene v dormantních semenech?

V semenech zdravých GA3 mají endospermové buňky redukovanou (měkkou) buněčnou stěnu, zatímco přidání ABA naopak brání změknutí této buněčné stěny. Narušením buněčné stěny zmizí bariera pro růst kořene.

8

Vztah mezi nezralostí embrya a kapacitou klíčení je ovlivněn ABA

Semena některých druhů rostlin jsou dormantní, protože jejich embryo je nezralé, ještě v době, kdy se semeno odděluje od mateřské rostliny (sasanka, jasan – vývoj embrya potřebuje vhodnou teplotu a vlhkost)

V raných a středních fázích zrání je dominantní aktivita ABA sekretovaná z mateřských pletiv.

Izolování vyvíjejícího se embrya od vlivu ABA vede k předčasnému klíčení (**precocious germination**) - ABA inhibuje předčasné klíčení – **viviparil**.

U ABA-deficientních mutantů (vp2, vp5, vp7, vp9, vp14) dochází k parciální obnově fenotypu po aplikaci ABA.

Mutant vp1 – narušena signalizace ABA a syntéza antokyanů – klíčí viviparní zrna jsou nepigmentovaná

9

b) Klíčení semen

Vysychající semeno: [ABA] ↓ => citlivost k ABA ↓

Rehydratace: suché semeno přepíná vývojový program na program klíčení

↓

mRNAs spojené s klíčovým programem ↑
 mRNAs spojené s vývojovým programem ↓

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

10

Klíčení – začíná tehdy, když klidné a suché semeno začne nabírat vodu = imbibice

Imbibice = fyzikální proces spočívající v hydrataci zásobních polymerů => imbibice probíhá u živých i mrtvých semen.

Proud vody do semene začíná přede vším prostřednictvím mykopyly, což je nejtenčí část testy.

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

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

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

11

Protržení testy rostoucím kořínkem

Testa rupture control

Micropylar endosperm

Endosperm rupture control - 35h

Emerged radicle

Micropylar endosperm

12

Časový sled událostí spojených s klíčením a fází po ukončení klíčení

Uprávek ovocnice	Germination		Postgermination	Fáze I
	Phase I	Phase II	Phase III	
			Mobilization of stored reserves	Rychlé nasátí vody semenem => výtok rozpustných látek a metabolitů
			Elongation of cells in radicle	Fáze II Stabilizace množství vody v semeni => výtok ustává
			DNA repair	Oprava mitochondrií a opětovné zahájení jejich syntézy
			Cell division and DNA synthesis	Syntéza proteinů z nově vzniklé mRNA
			Protein synthesis using new mRNAs	Fáze III Buněčné dělení a prodloužení, syntéza DNA, mobilizace rezerv => zvyšování FW semen
			Protein synthesis using extant mRNAs	
			Repair of mitochondria	
			Leakage of solutes	
			Resumption of mitochondrial synthesis	

13

Prodlužování rostlinky:

Epigeal - prodlužování probíhá v hypokotylu => dělohy jsou nad zemí

Hypogeal - prodlužování probíhá v epikotylu => dělohy zůstávají pod zemí

Epigeal – prodlužování probíhá v hypokotylu (fazole, skopec, cibule)

Hypogeal – prodlužování probíhá v epikotylu (hrách, kukuřice)

14

Indukce klíčení semen (porušení dormance) světlem

Table 6.15 Illumination conditions required for the breaking of dormancy.

Illumination conditions	Examples
Seconds or minutes	Colonial bentgrass (<i>Agrostis tenuis</i>) Lamb's quarters (<i>Chenopodium album</i>) Lettuce (<i>Lactuca sativa</i> cv. Grand Rapids) Tobacco (<i>Nicotiana tabacum</i>)
Several hours	Pig nut (<i>Hyptis suaveolens</i>) Purple loosestrife (<i>Lythrum salicaria</i>)
Days	<i>Epilobium cephalostigma</i> <i>Kalanchoe blossfeldiana</i>
Long days	<i>Begonia evansiana</i> White birch (<i>Betula pubescens</i>) (at 15 °C) Jerusalem oak (<i>Chenopodium botrys</i>) (at 30 °C)
Short days	Jerusalem oak (> 30 °C) Eastern hemlock (<i>Tsuga canadensis</i>) White birch (~15 °C)

Světlo je velice důležitý faktor spouštějící klíčení.

15

Efekt červeného světla (R; 650-680 nm) je eliminován červeným světlem o větší vlnové délce (FR; 710-740 nm)

Dark R R FR

R FR R R FR R FR

Red light
Far-red light
Reversion in darkness (thermo)

Dormancy breakage

16

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

Tma

PIL5 Transkripční faktory (aktivátory)

Xs Neznámý faktor X

GA2ox2, GA2ox1 GA deaktivující geny

GA3ox1, GA3ox2 GA biosyntetické geny

GAI, RGA DELLA proteiny

ABA1, NCEDE6, NCEDE9 ABA biosyntetické geny

ABIS, ABIS Transkripční faktory indukované ABA

CYP707A2 ABA katabolický gen

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

17

Tma

PIL5 Transkripční faktory (aktivátory)

Xs Neznámý faktor X

GA2ox2, GA2ox1 GA deaktivující geny

GA3ox1, GA3ox2 GA biosyntetické geny

GAI, RGA DELLA proteiny

ABA1, NCEDE6, NCEDE9 ABA biosyntetické geny

ABIS, ABIS Transkripční faktory indukované ABA

CYP707A2 ABA katabolický gen

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

18

Tma

PIL5 Transkripční faktory (aktivátory)

Xs Neznámý faktor X

GA2ox2, GA2ox1 GA deaktivující geny

GA3ox1, GA3ox2 GA biosyntetické geny

GAI, RGA DELLA proteiny

ABA1, NCEDE6, NCEDE9 ABA biosyntetické geny

ABIS, ABIS Transkripční faktory indukované ABA

CYP707A2 ABA katabolický gen

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

19

Interakce délky dne a teploty v indukci klíčení

Klíčovým bodem je regulace biosyntézy GAs a proteinů DELLA.

20

c) Mobilizace rezerv

Semena obsahují:

- zásobní proteiny
- karbohydráty
- lipidy
- minerály - zdroj prvků, např. P, K, Mg a Fe

zdroj energie a uhlíkového skeletu

Během raného stádia růstu rostliny mobilizace proteinů zahrnuje enzymatické rozštěpení proteinů na AK

Aminokyseliny – pro růst nepostradatelné

- Syntéza proteinů
- Ztráta aminoskupiny, oxidace => uvolnění energie

21

Hydrolyza **zásobních proteinů** na aminokyseliny vyžaduje aktivitu různých proteáz.

Proteázy

- Hydrolyza proteinu na aminokyseliny
- Rozštěpení proteinu na malé polypeptidy => akce peptidáz

- 1) Endopeptidázy
- 2) Aminopeptidázy
- 3) Karbopeptidázy
- 4) Peptidázy

22

Thioredoxin - regulační disulfidový protein - usnadňuje mobilizaci proteinových a karbohydrátových rezerv ve vyvíjející se rostlině

Příklad: Obilný endosperm

Thioredoxin je redukován pomocí NADPH a flavinového enzymu NADP-thioredoxin reduktázy

$$\text{NADPH} + \text{thioredoxin}_{\text{ox}} \longrightarrow \text{thioredoxin}_{\text{red}} + \text{NADP}^+$$

(S-S) (SH HS-)

Redukovaný thioredoxin následně redukuje disulfidické skupiny (S-S) mnoha terčových semenných proteinů.

$$\text{thioredoxin}_{\text{red}} + \text{protein}_{\text{ox}} \longrightarrow \text{protein}_{\text{red}} + \text{thioredoxin}_{\text{ox}}$$

(-SH HS-) (S-S) (-SH HS-) (S-S)

Thioredoxin – redukuje zásobní proteiny => zvyšuje se jejich rozpustnost => citlivější k proteolýze.

Thioredoxin – redukuje enzymy => zvyšuje jejich aktivitu

23

Transgenní rostliny

Overexprese thioredoxinu – rychlé klíčení
Redukce thioredoxinu – pomalejší klíčení

Předčasné klíčení pšenice (preharvest sprouting) – problém v zemědělství (Čína – 10 až 20 %)

T – transgenní rostliny s redukovanou expresí thioredoxinu

24

Mobilizace **zásobních proteinů** ve dvouděložných probíhá v živých buňkách

Dělohy a endosperm dvouděložných rostlin - živé buňky – rezervy jsou lokalizovány ve vakuolách

Hypotéza:

pH ve vakuole – důležitý faktor v regulaci degradace zásobních proteinů

VPE - vakuolární procesní enzym - syntetizován v ER jako neaktivní prekurzor; je samo-aktivován při kyselém pH především ve vakuole; VPE aktivuje další proteázy

Mobilizace zásobního škrobu - hlavní karbohydrátová rezerva

25

Škrob = amyloza + amylopektin

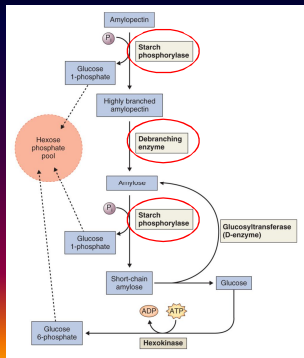
Štěpení škrobu:

- Fosforolytické enzymy**
 - používají P_i k rozštěpení glykosidických vazeb (glukóza-glukóza)
- Hydrolytické enzymy**
 - které využívají vodu k rozštěpení těchto vazeb

Fosforolytická degradace škrobu: 3 enzymy:

- škrobová fosforyláza (odštěpuje individuální glukózové rezidua od neredukujícího konce molekuly škrobu a vytváří glukóza-1-fosfát)
- odvětvovací enzym (pulluláza, R-enzym); štěpí α(1-6) vazby amylopektinu
- škrobová fosforyláza

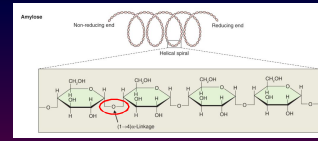
Regulace aktivity škrobové fosforylázy u rostlin není známa - dostupnost anorganického fosfátu?



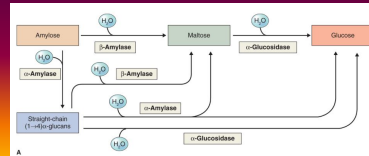
Úloha amyláz ve štěpení škrobu - štěpí lineární α(1-4)-glukozu

26

α-amyláza - katalyzuje rozštěpení vnitřních glykosidických vazeb => krátké glukany (dextriny)

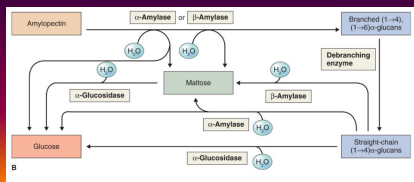
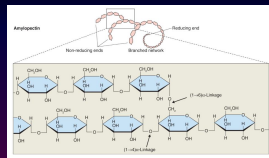


β-amyláza - hydrolyzuje škrob rozštěpením maltózových zbytků z ne-redukujícího konce molekuly škrobu. Maltóza a krátké glukánové molekuly - degradovány na molekuly glukózy tzv. α-glykosidázou.



Kompletní rozštěpení amylopektinů vyžaduje aktivitu odvětvovacích enzymů i amyláz a glukosidáz

27



Klíčení obilovin - rozklad škrobu v endospermu α-amylázou

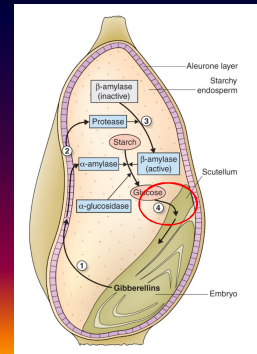
28

De novo syntéza α-amylázy – aleuron; stimulována GAS, potlačována ABA

Syntéza probíhá na ER a transport do exteriéru buňky je realizován vezikuly produkovanými v Golgiho aparátu.

β-amyláza obilných zrn není syntetizována *de novo* aleuronovou vrstvou - prekurzor se nachází ve vázané formě ve škrobovém endospermu ještě před klíčením; aktivována thioeredoxinem

Dělohy - škrobové zásoby v chloroplastech.



Buněčná stěna - hlavní zdroj zásobních polysacharidů v semenech

29

Dvouděložné rostliny

Semena s endospermem - enzymy, rozkládající buněčnou stěnu endospermu (např. mananázy), jsou sekretovány do buněčné stěny z živých buněk

Arabidopsis, salát, řepka - zeslabování buněčné stěny digestivními enzymy přerušuje dormancy a umožňuje klíčení

Buněčné stěny zásobních děloh jsou také silně degradovány - enzymy jsou syntetizovány *de novo* v cytozolu a sekretovány do buněčné stěny.

Jednoděložné rostliny

Obiloviny - aleuron a skutelum sekretují i glukánazy - rozkládají buněčnou stěnu endospermových buněk

Mobilizace zásobních lipidů

30

Klíčení a ranný růst - triacylglyceroly jsou degradovány a konvertovány do glukózy a dalších metabolitů

V buňkách zásobních pletiv - triacylglyceroly jsou konvertovány do sacharózy pro transport do dalších pletiv

Místa mobilizace triacylglycerolu:

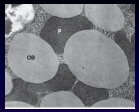
1) **Oleiová tělíska (oleozómy)** - zásobní triacylglycerol konvertován na glycerol a mastné kyseliny

2) **Specializované peroxizómy (glyoxyzómy)** - mastné kyseliny konvertovány β-oxidací na acetyl-koenzym A (CoA) a následně sukcinovány glyoxylátovým cyklem => sukcinát => cukry

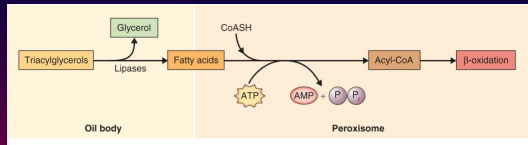
3) **Mitochondrie** - sukcinát respirován nebo konvertován na malát - transportován do cytozolu k finální konverzi na hexózy reakcí glukogeneze

Olejová tělíska (oleozómy) – zásobárna triacylglycerolu

Triacylglycerol – ve vodě nerozpustný => hydrolyza na glycerol a mastné kyseliny



31



Glycerol – konvertován v cytozolu na triázafosfáty - použity k syntéze sacharózy procesem glukoneogeneze.

Mastné kyseliny – transfer do peroxizomů; aktivovány přidáním koenzymu A použitím enzymu fatty acid-CoA syntáza; β -oxidace – 4 kroky (v 1. kroku vzniká H_2O_2 => rozštěpen katalázou na vodu a kyslík)

Zásobní minerály jsou mobilizovány rozložením kyseliny fytové

Minerální prvky v semenech – uchovávány v komplexu kyseliny fytové: **myo-inositol kyselina hexafosforečná (IP6)**

Klíčení semene – IP6 hydrolyzován enzymem fytázou = fosfatáza – uvolňuje fosfát a chelátované kationty; hladina fytáz se zvyšuje => dostupnost P a minerálů => růst a vývoj embrya

Hydrolyza IP6 – vznik série inositol fosfátů (např. IP3 – signální molekula)

Proteinové, škrobové a lipidové rezervy jsou mobilizovány a konvertovány do aminokyselin, jednoduchých cukrů a acetyl-CoA – transport ze zásobních pletiv do rostoucích pletiv.

Obiloviny – skutellum – prominentní úlohu v přenosu roztoků z endospermu do rostoucích výhonů a kořenů.

32