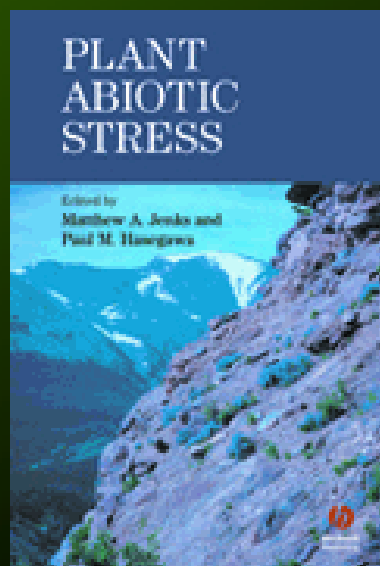


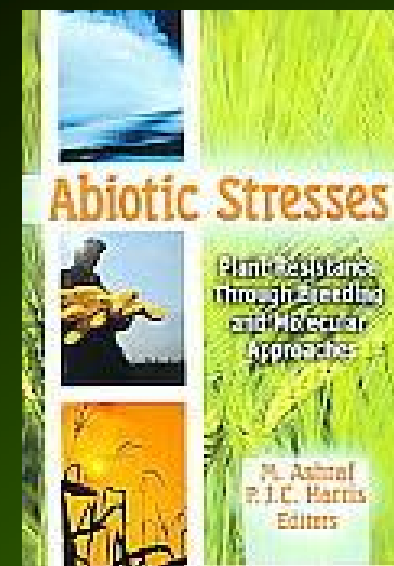
4) Reakce rostlin k abiotickému stresu

- c) Vliv vodního deficitu a zasolení na membránový transport
- d) Geny indukované vodním stresem
- e) Chladový stres



Jenks M *et al.* (2005)
Plant Abiotic Stress.
Blackwell Publishing


Ashraf M *et al.* (2005)
Abiotic Stresses. The
Haworth Press Inc.



<http://www.haworthpress.com/store/product.asp?sku=5288>

<http://www.blackwellpublishing.com/book.asp?ref=1405122382>

c) Vliv vodního deficitu a zasolení na membránový transport

Sucho, zasolení  Aklimatizace k nízkému vodnímu potenciálu Φ_w

Toxický efekt iontů – Na⁺



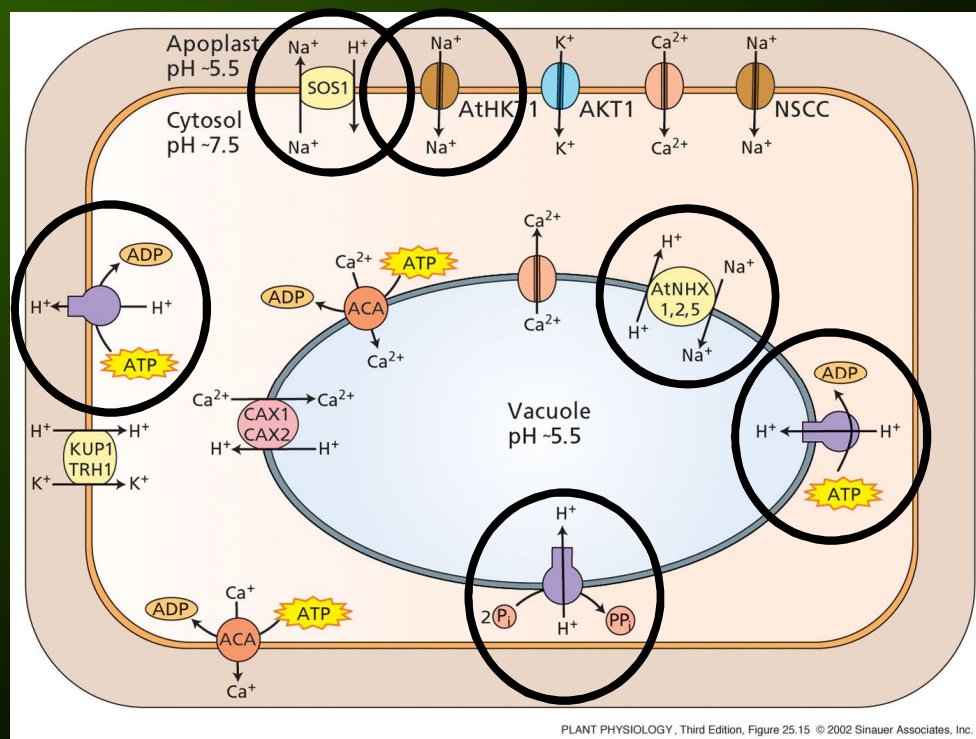
Regulace koncentrace, složení a distribuce iontů



Přenašeče, pumpy, kanály

Vysoká koncentrace NaCl → Pasivní transport Na⁺ do buněk

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



1) Přednostní transport K⁺ do buňky.

ALE při vysokých externích konc. Na⁺ je kanál pro K⁺ je blokván => 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

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

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

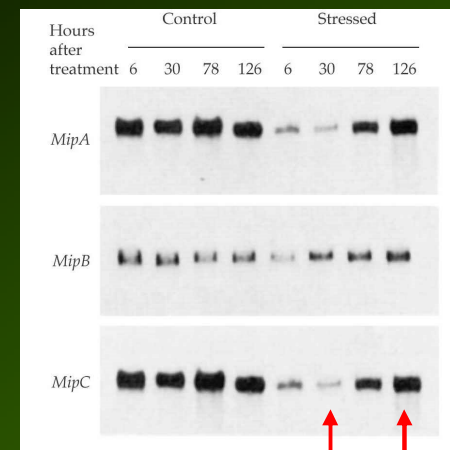
Mechanismy regulace aktivity aquaporinů:

fosforylace aquaporinu (α-TIP)

Zvýšení aktivity aquaporinů = permeability membrány pro H₂O



Vajíčka *Xenopus* – výzkum aquaporinů



d) Geny indukované vodním stresem

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

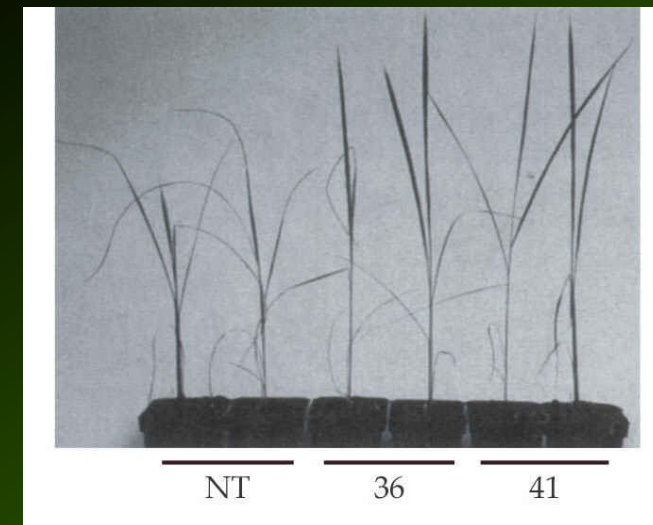
LEA proteiny (**L**ate **E**mbyogenesis **A**bundant) – poprvé identifikovány v semenech během vysušení

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:

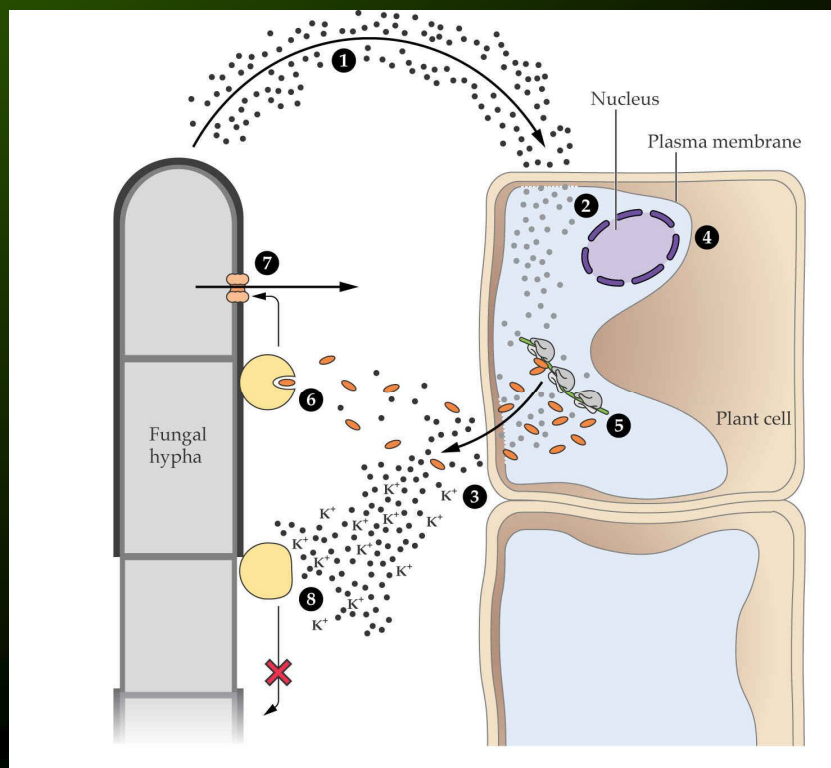
1. **D-19** (např. protein Em, pšenice)
2. **D-11** (protein DHN1, kukuřice; D11, balvna)
3. **D-7** (protein HVA1, ječmen; D7, balvna)
4. **D-95** (protein D95, sója)
5. **D-113** (protein LE25, rajče; D113, balvna)



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

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

- 26 kDa, vakuola
- 3 izoformy
- spojený primárně s patogenezí (PR - protein related)
- antifungální aktivita – inhibuje růst houbových hyf a spor
- transkripce indukována 10 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

Geny indukované vodním stresem mohou být regulovány i ABA

Hladina ABA se zvyšuje při vodním stresu

Regulace zavírání průduchů a exprese genů



Mutanti v biosyntéze ABA vyžadují exogenní ABA, aby mohly vydržet vodní stress (*flacca* – rajče)

- 4 *FLACCA* produkty:
- 2x LEA proteiny – skupina 2 a 5
 - 1x lipid transfer protein
 - 1x izotyp histonu H1

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

ABI1, *ABI3* – komplementují mutanty kvasinek s mutací v genu *PCT1* (2C-protein fosfatáza)

Geny kódující tyrozin kinázy, podobné MAPK (mitogen-activated protein kinase) (funkce ?)

Ne všechny geny indukované vodním stresem jsou regulované ABA

Další signální dráhy zapojené do reakcí k vodnímu stresu



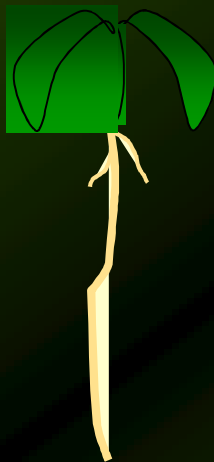
e) Chladový stres

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 :



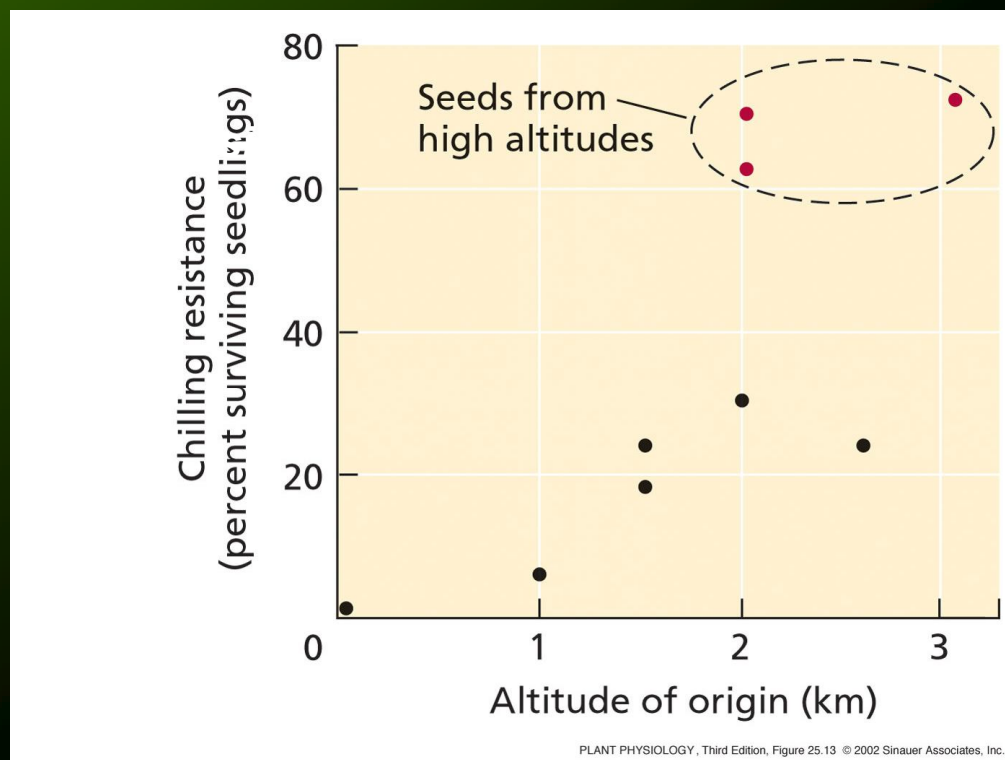
Chladové poškození:

- 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



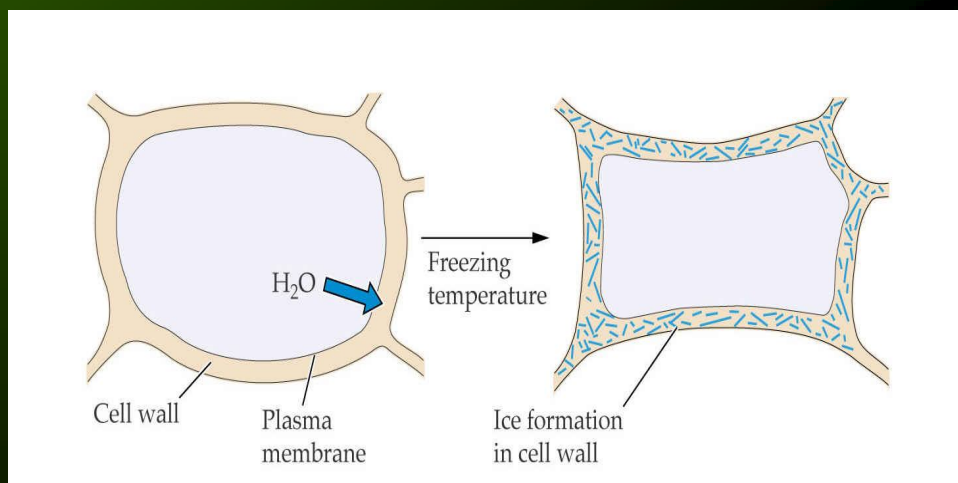
Modelová rostlina pro studium aklimatizace - smrk

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



Mechanismy tolerance:

- tvorba extracelulárního ledu => netvoří se krystaly v cytoplazmě
- 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

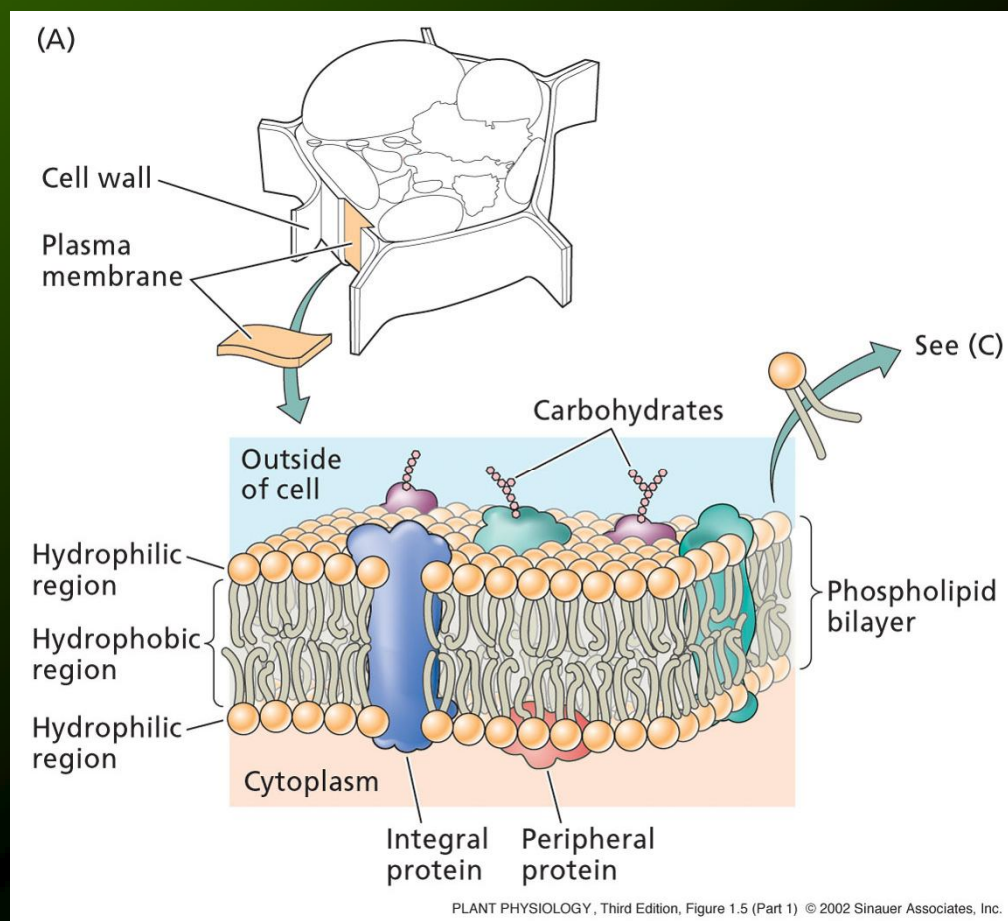
Únik roztoků z buněk

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



Aktivita desaturačních enzymů



Množství nenasycených kyselin



Bod tuhnutí lipidů



Tekutost membrány



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 extracelulárních 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

Některé mutanty 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

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

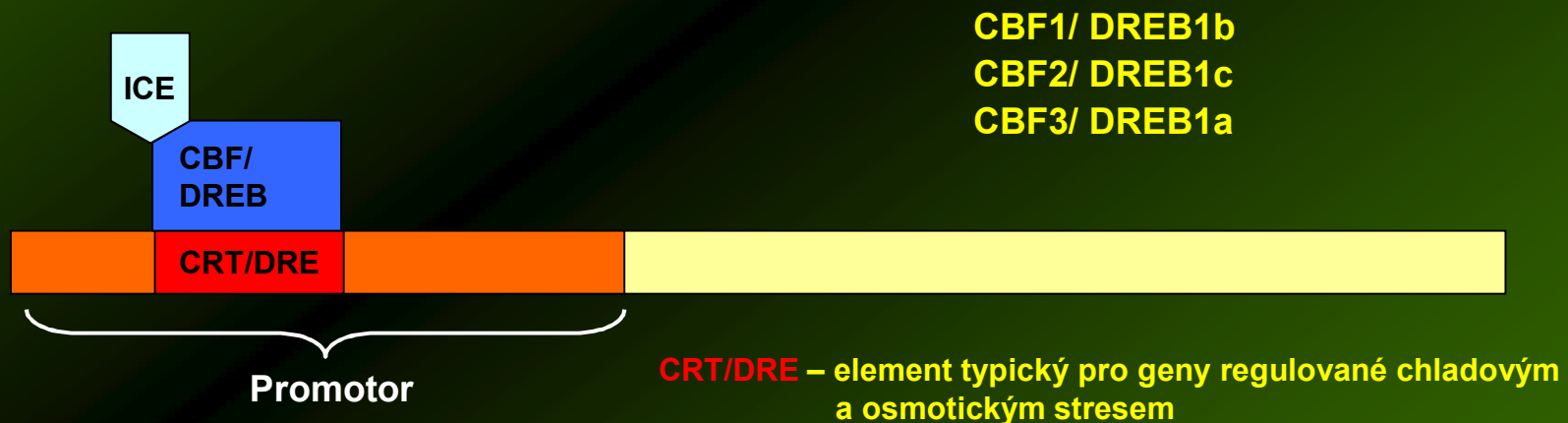
Geny indukovány chladem:

- 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 transkriptů => tolerance k mrazu



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

Update 2008

Achard P et al. (2008) Plant Cell 20: 2117 - 2129

Nový mechanismus tolerance rostlin k chladu

