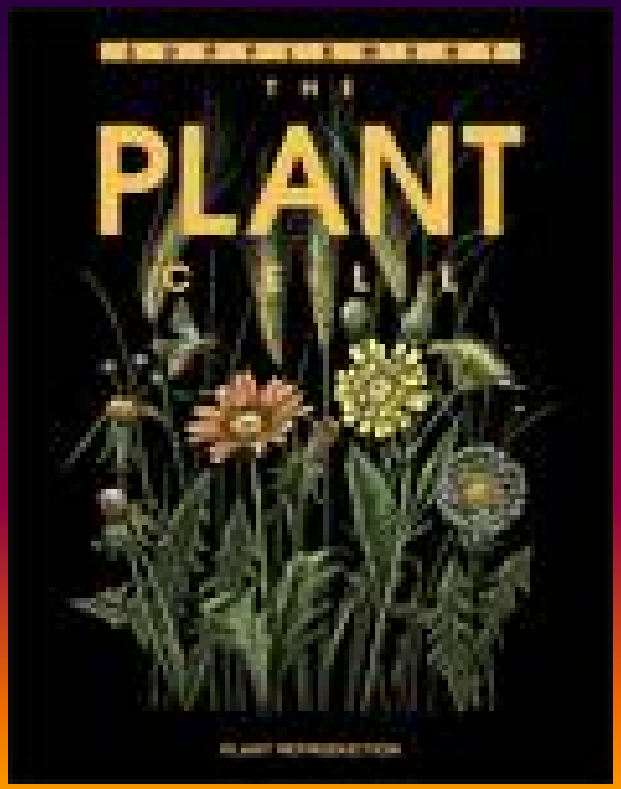
4) Reprodukce rostlin

g) Tvorba semen
h) Dozrávání embrya
i) Vývoj endospermu

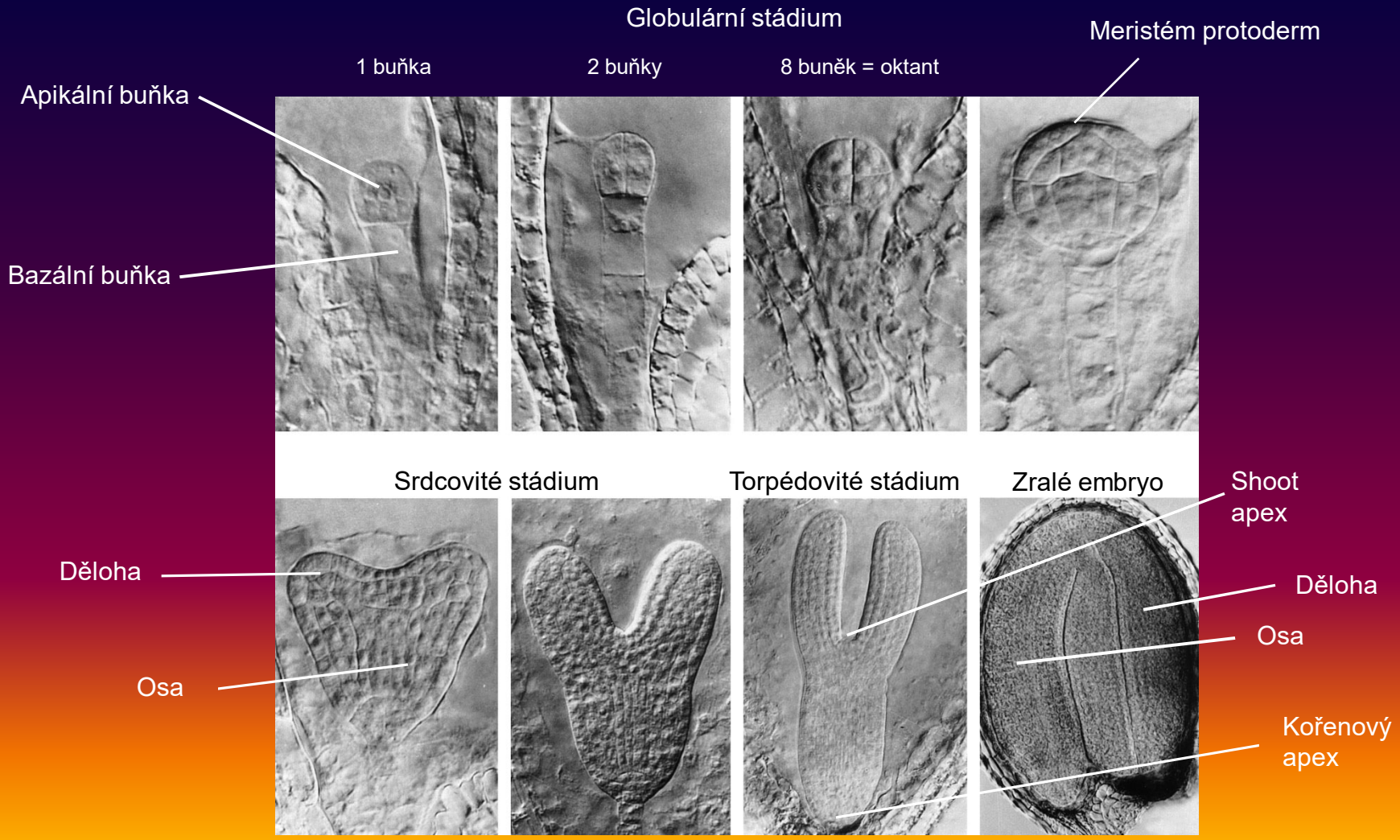


Martin Fellner
Laboratoř růstových regulátorů
PřF UP v Olomouci a ÚEB AVČR

g) Tvorba semen

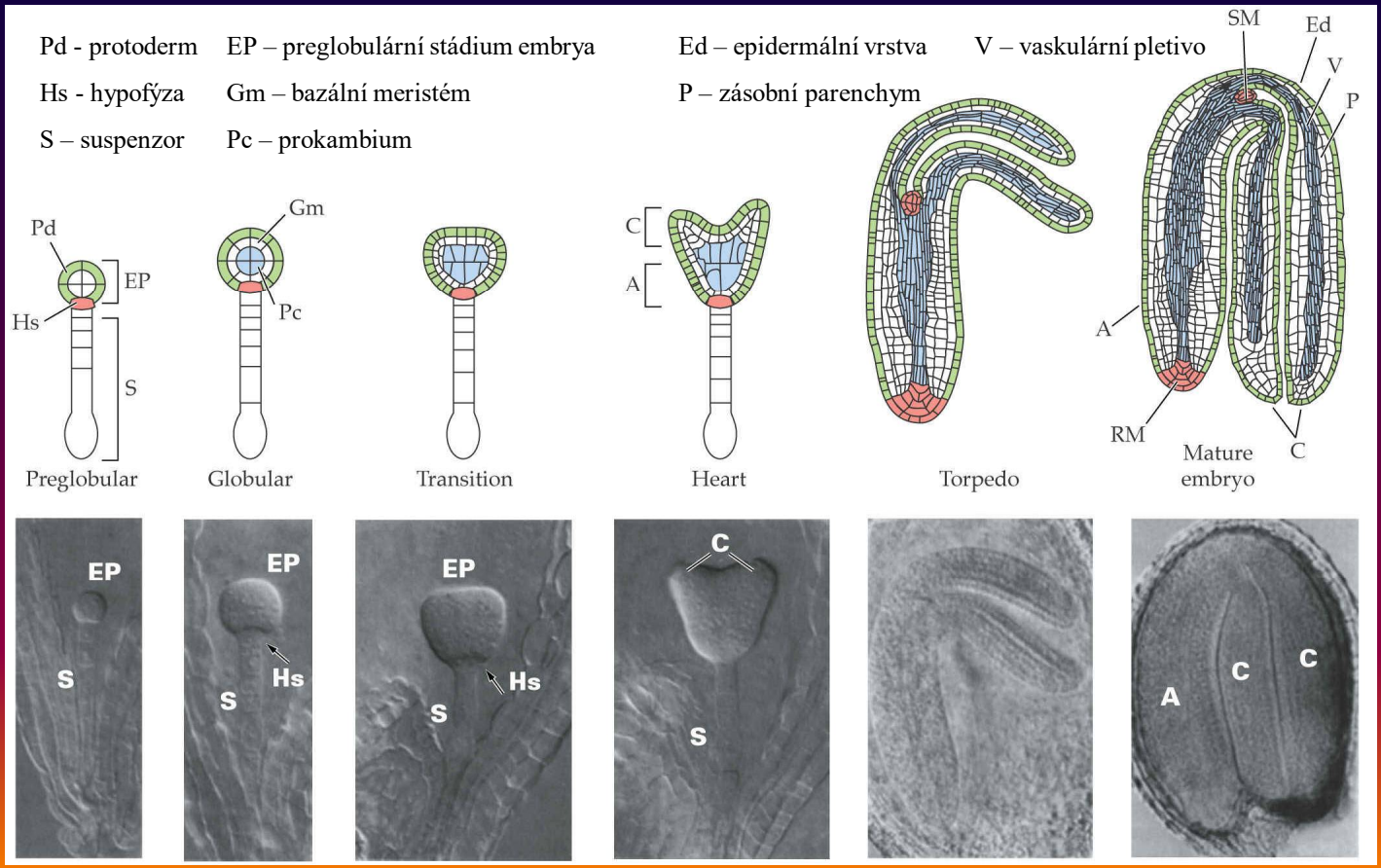
Semeno krytosemenných:
- **embryo**
- **endosperm**
- **testa (obal)**

Vývoj embrya



3 fáze embryogeneze na histologické úrovni:

- diferenciace pletiv
- zvětšování buněk
- zrání embrya



Diferenciace pletiv:

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

Zvětšování buněk:

- ukládání rezerv během torpédovitého stádia

Zrání embrya:

- ukončení vývojových procesů; embryo připraveno k vysychání

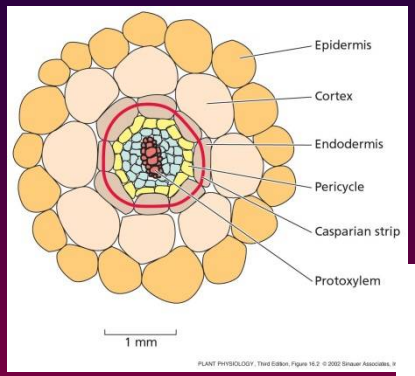
Identifikace mutantů s defektem v regulaci vývoje embrya

Genetická a molekulární charakteristika mutantů

Identifikace genů kontrolujících: ranný vývoj embrya
dozrávání embrya

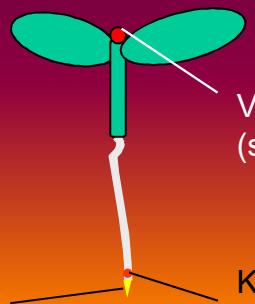
Embryogeneze zakládá:

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



Radiální polarita

Axiální polarita

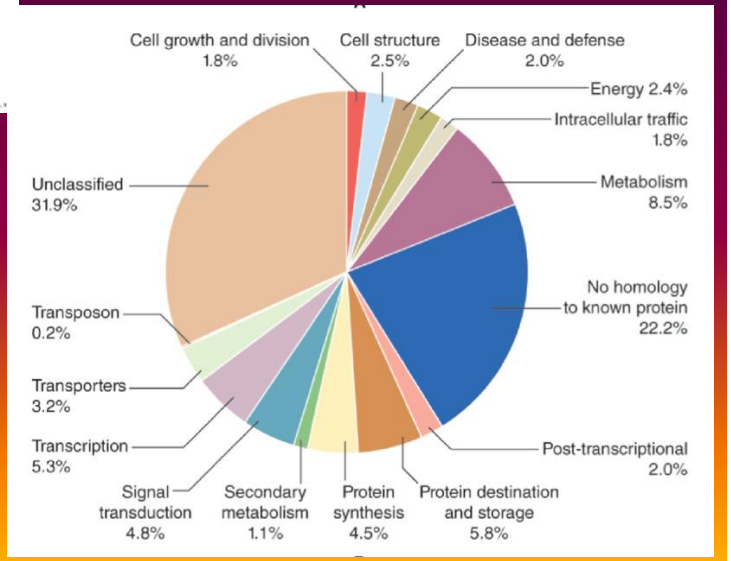


Výhonkový apikální meristém
(shoot apical meristem)

Kořenová čepička (root cap)

Kořenový apikální meristém
(root apical meristem)

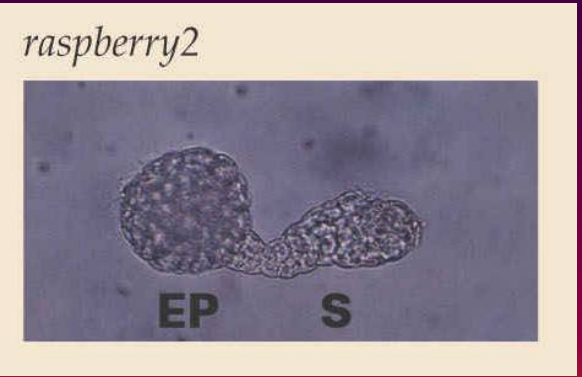
Spektrum exprese genů v suspenzoru během vývoje globulárního stádia embrya sóji.



Geny nutné v ranných stádiích vývoje embrya

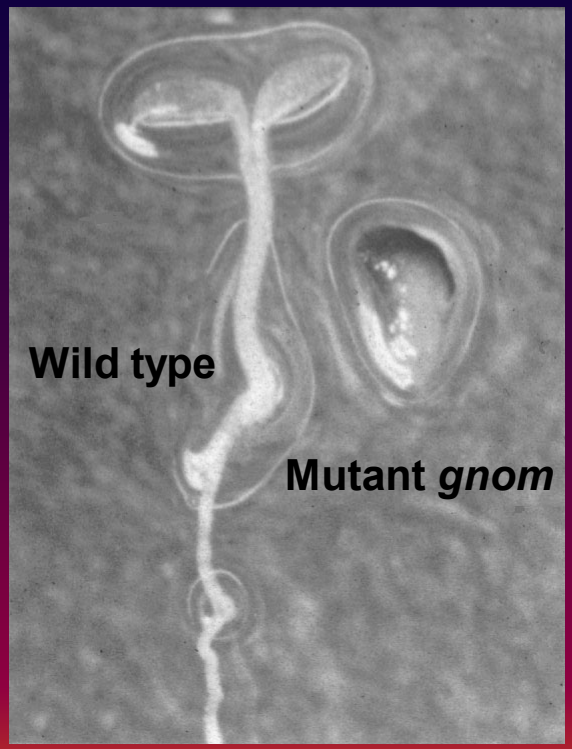
Mutant *raspberry2* – morfologická zástava vývoje embrya v globulárním stádiu; vytváří se však meristémy, které dokončují buněčnou diferenciaci; abnormální vývoj suspenzoru

***RASPBERRY2* – kontroluje diferenciaci pletiv a morfologický vývoj**



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

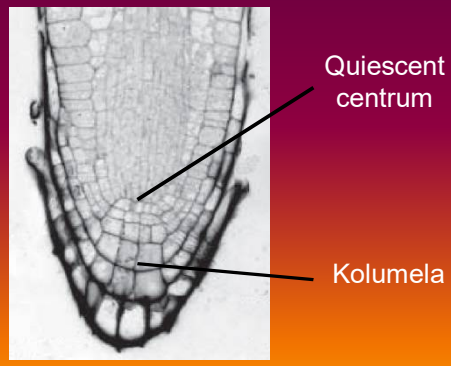
Geny zapojené v axilální polaritě



gnom - mutant
GNOM - gen
GNOM - protein

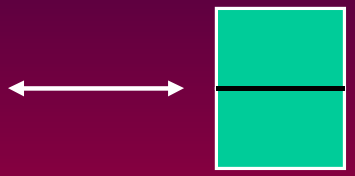
Mutant ***gnom*** nevytváří dělohy a kořen = chybí axiální polarita

Gen ***GNOM*** kontroluje apikálně-bazální polaritu

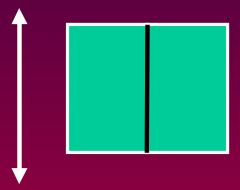


U mutanta ***hobbit (hbt)*** se buňky prekurzoru hypofýzy dělí vertikálně místo horizontálně => hypofýza se nevytváří => kořenový meristém nemá quiescent centrum a kolumelu = kořen se neprodlužuje

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



Horizontální dělení

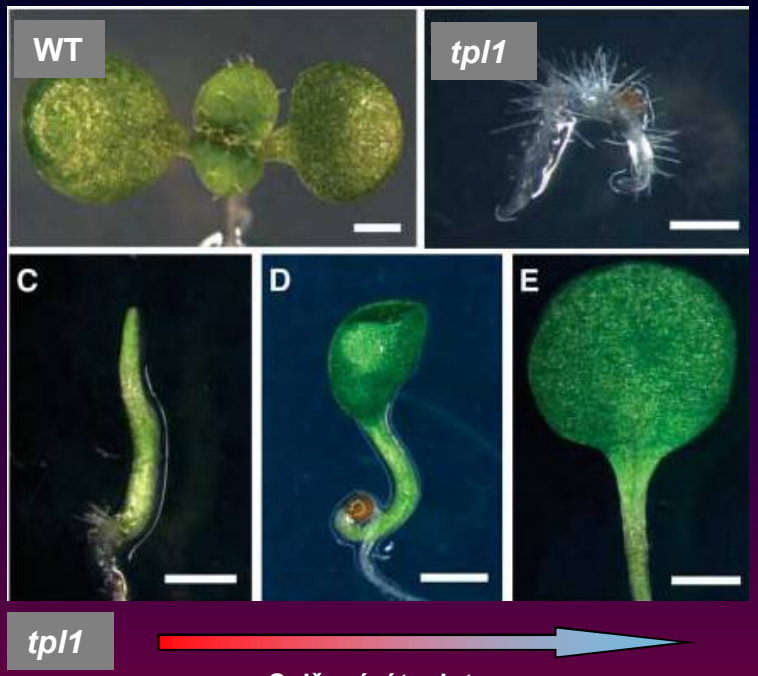


Vertikální dělení

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.

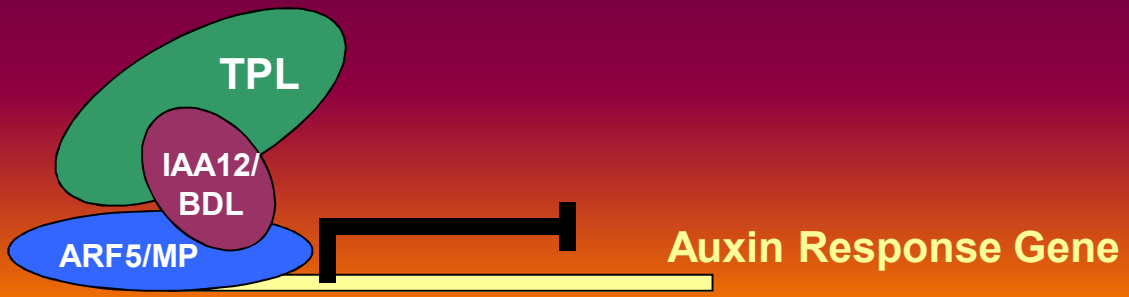
TOPLESS1 (TPL1) **- nutný k potlačení exprese genů indukujících vývoj kořenů v apikální části embrya = umožňuje správný vznik stonkového pólu embrya (rostliny)**



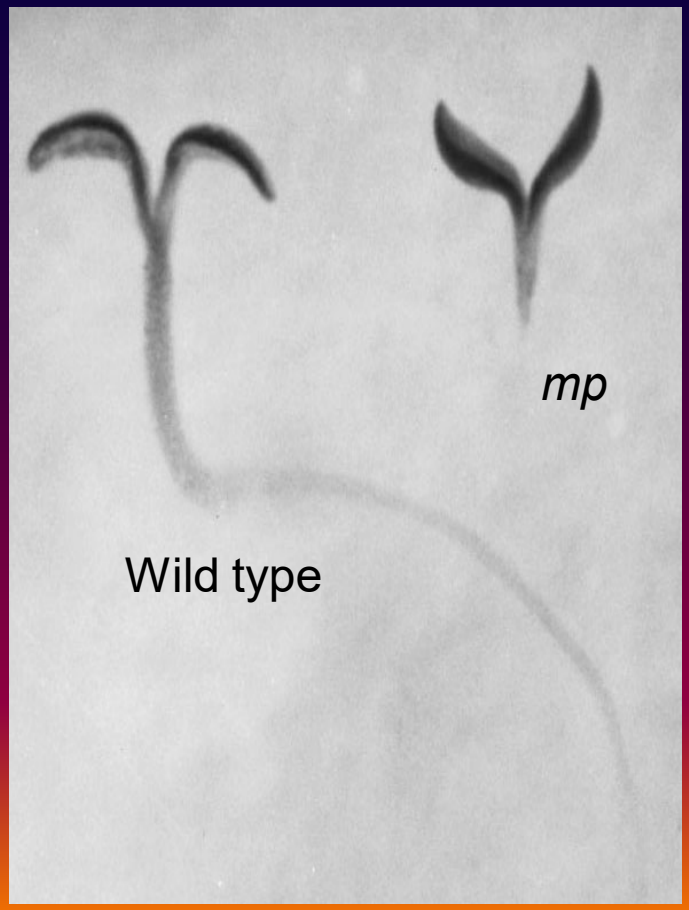
ARF5/MP - transkripční faktor (auxin-responsive faktor)

IAA12/BDL - represor

TPL - co-represor

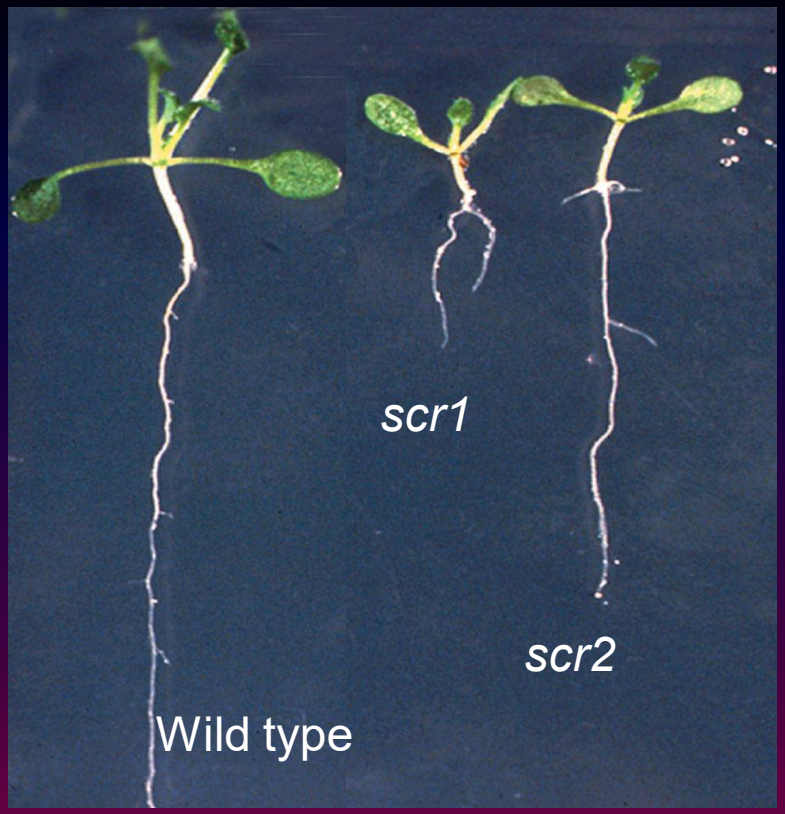


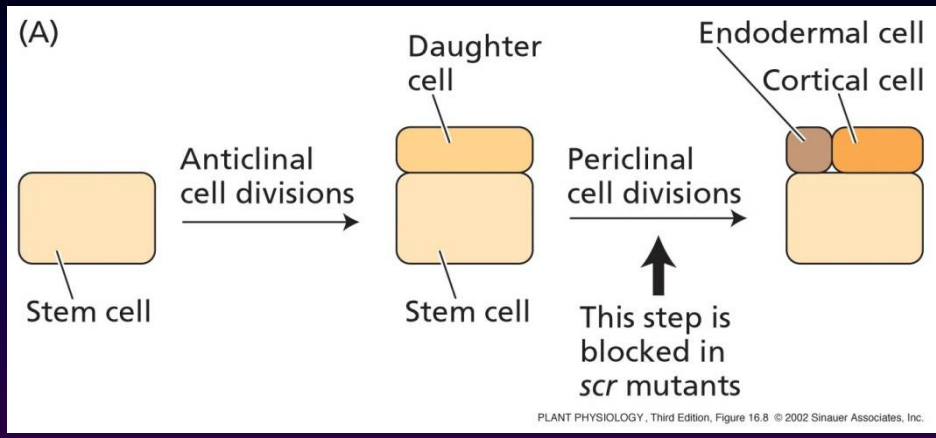
Geny zapojené v radiální polaritě



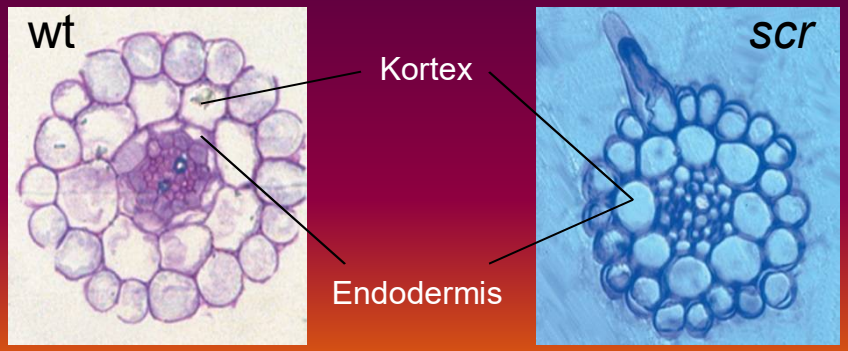
Mutant ***monopteros (mp)*** nevytváří kořen; globulární embryo netvoří prokambium = část, která dává vznik embryonálnímu kořenu

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

Update 2018

Salvi E et al. (2018) Plant Signaling & Behavior 13: e1507402

SCR a SHR kontrolují rovnováhu auxinů a cytokininů nutnou pro specifikaci kmenových buněk.

Další geny určující vývoj embrya

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

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

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

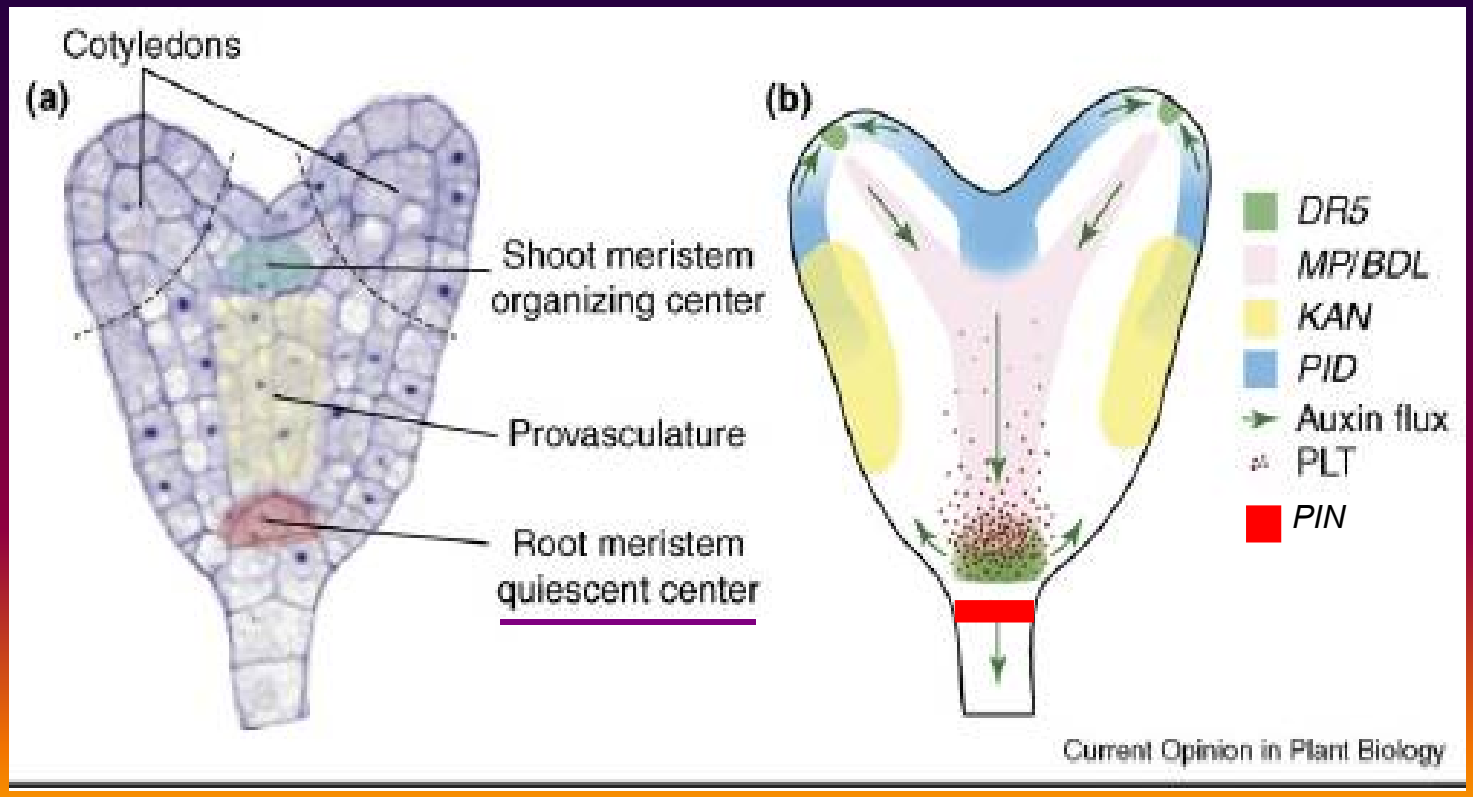
Nízká - stimulace mitotické aktivity dceřiných kmenových buněk

Nejnižší - diferenciace kmenových buněk

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

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

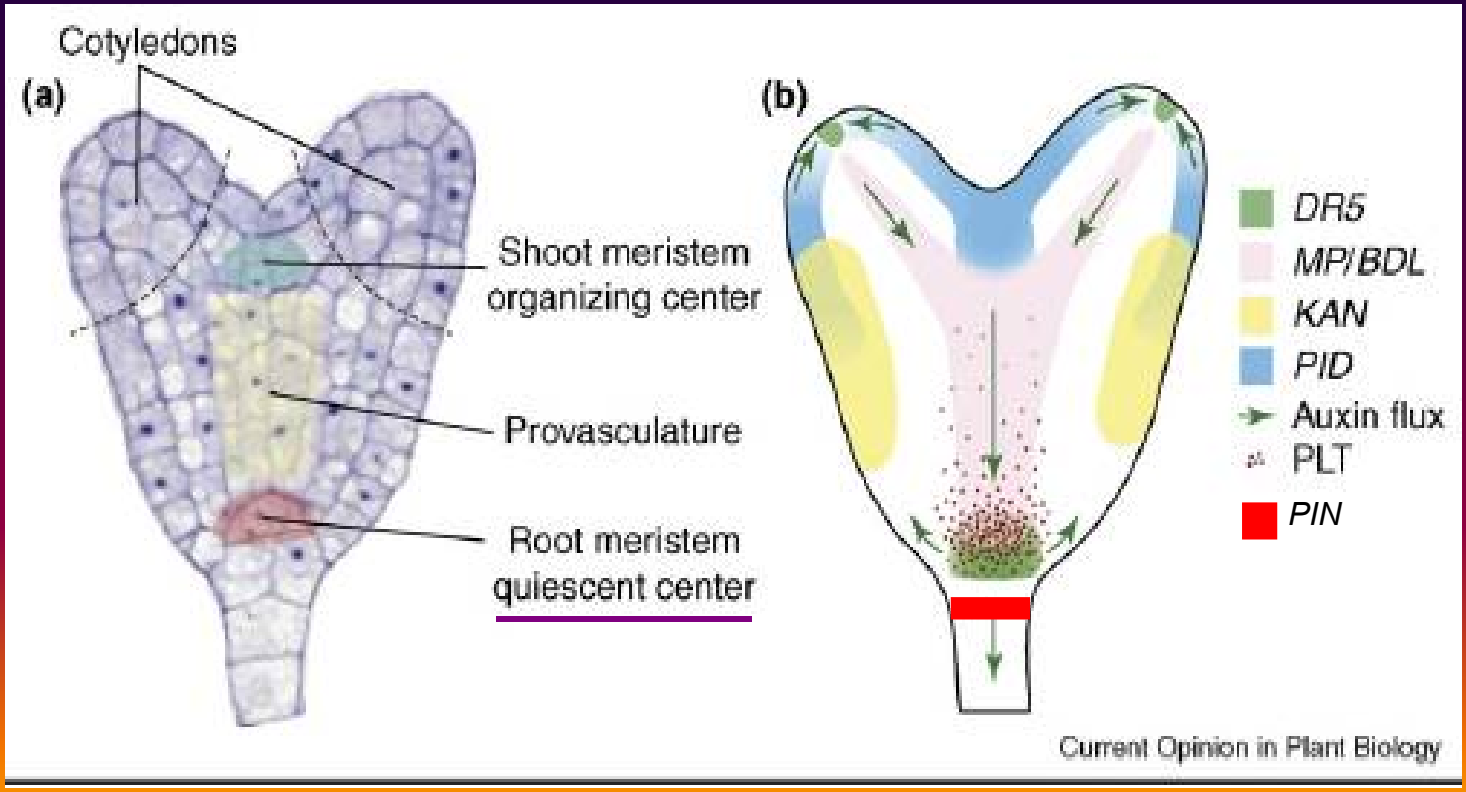
Exprese *PLETHORA* – pravděpodobně určována auxinem prostřednictvím *MONONOPTEROS*



***KANADI* – kontroluje radiální polaritu embrya**

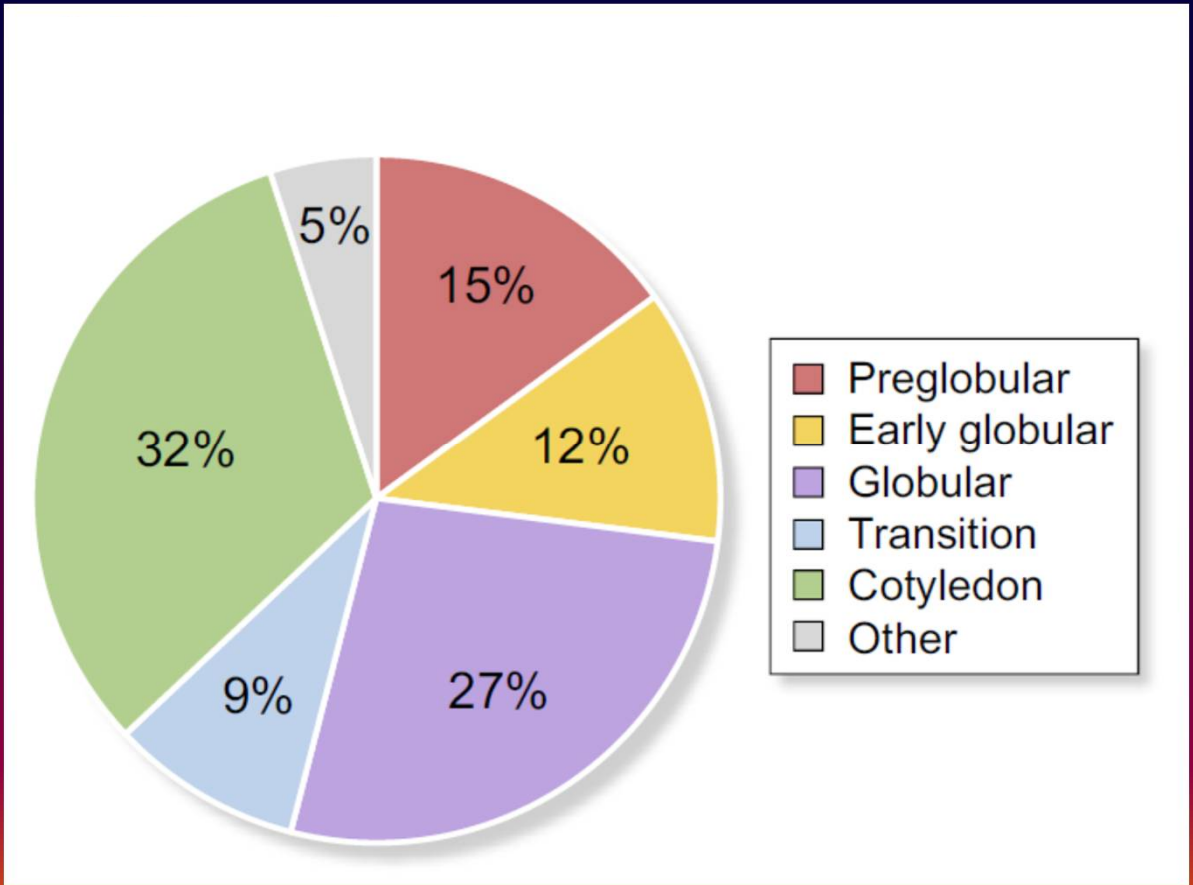
Časová a prostorová exprese *KANADI* je kontrolována auxinem prostřednictvím PIN proteinů

***KANADI* potlačuje citlivost k auxinu na okrajích děloh**



Update 2019

Meinke DW (2019) New Phytologist 226: 306-325



David Meinke
Oklahoma State University

510 genů zapojených do vývoje embrya (EMB –Embryo-Defective)

h) Dozrávání embrya

Zrání embrya se vyznačuje tím, že se embryo stává dormantním – má asi 20 tisíc buněk. Dormance nastává při ztrátě vody, zastavení transkripce a syntézy určitých proteinů v embryu. Naopak, dochází k expresi jiných genů a proteinů spojených s tolerancí k vysychání.

Geny kontrolující pozdní fázi vývoje embrya - dozrávání

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 (transkripční faktory), které fungují jako kritické komponenty v přenosu vnějších i vnitřních signálů během vývoje embrya; exprese je kontrolována transkripčními faktory WRKY.

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.

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

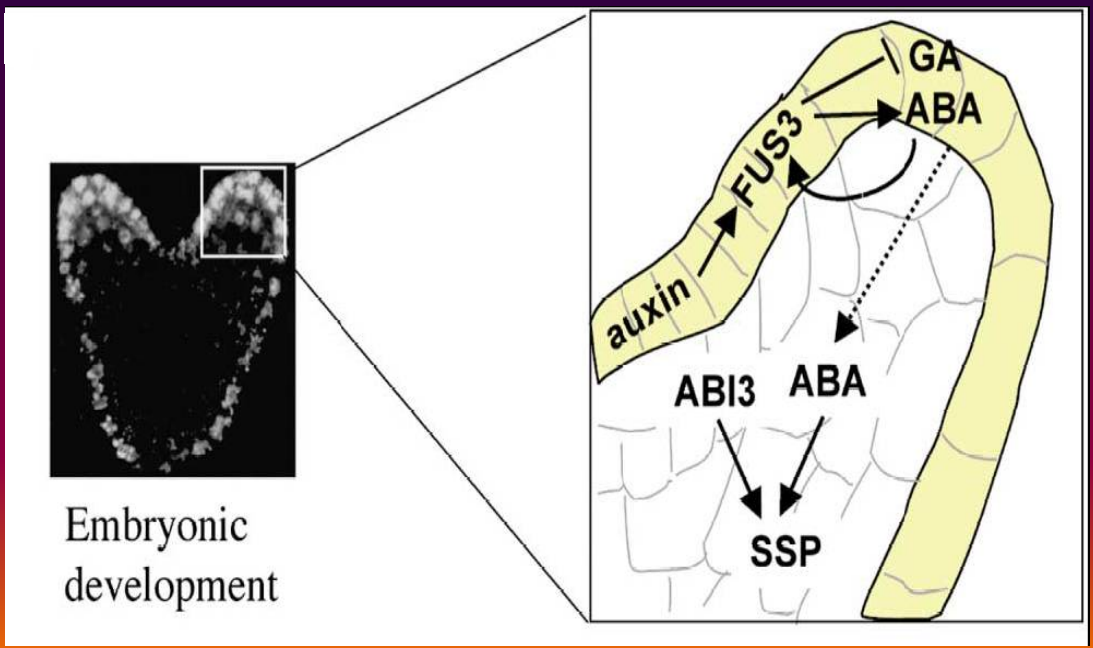
FUS3 **reguluje embryogenezi dvěma cestami:**

1) Kontrolou hladin hormonů ABA, giberelinů, cytokininů a auxinů.

2) Přímou aktivací genů zapojených v dozrávání semene včetně zásobních proteinů a oleosinů a transkripčních regulátorů WRINKLED1, ABI3 a AGL15/18.

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

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



Update 2022

Yang S, Chen Q (2022)
Plant Cell, Tissue and Organ Culture 150: 1-13

Review o funkcích proteinu FUS3 v rostlinách.

- *FUS3* kontroluje hladinu auxinů prostřednictvím YUCCA4

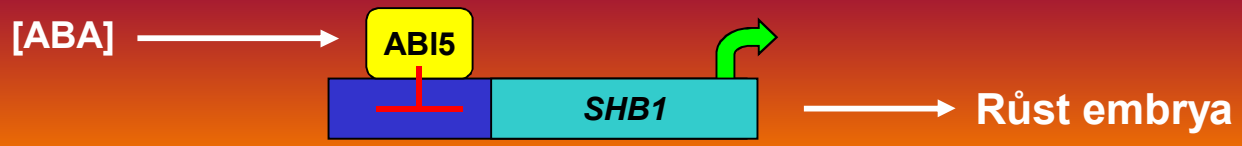
Vliv ABA na vývoj embrya – funkce ABI5 a SHB1

ABA stimuluje tvorbu endospermu.
ABA redukuje růst embrya – mechanizmus není znám.

Mutant aba2 (*abscisic acid-deficient 2*) – overexprese *SHB1* a downregulace *ABI5*

ABI5 (*ABscisic acid Insensitive 5*) – transkripční faktor typu basic/region leucine zipper; potlačuje expresi *SHB1*

SHB1 (*Short Hypocotyl under Blue 1*) – kóduje nukleární a cytoplazmatický protein zapojený ve světelné signalizaci, vývoji semen a kvetení. Jeho funkce však není známa.



Další ABA-indukované proteiny pozdní fáze embryogeneze zapojené v indukci tolerance k vysychání

- heat-shock proteiny

- LEA proteiny (Late Embryogenesis-Abundant)

- proteiny příbuzné LEA – geny obsahují ABRE motiv

Mechanismus tolerance k vysychání? → LEA proteiny mohou vázat buněčné komponenty formováním amorfních spirál, chránících obsah buňky před poškozením.

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

LEC1 (LEAFY COTYLEDON1) – embryo rostliny s mutací v tomto genu není schopno přežít vysušení a proto není schopno vstoupit do dormance; chybí zásobní protein 7S.

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

Protein **LEC1** je atypická subjednotka jaderného transkripčního faktoru Y (NF-Y) – **CCAAT-binding transkripční faktor.** Centrální regulátor mnoha aspektů vývoje semene.

Update 2015

Huang M et al. (2015) Plant Cell 27: 3099 – 3111

LEC1 stimuluje expresi genů spojených s prodlužováním hypokotylu. **LEC1** interaguje s proteinem PIF4 (PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR 4; hlavní transkripční modulátor v post-embryonickém vývoji) prostřednictvím přímé vazby s G-box elementem.

***LEAFY COTYLEDON2* (*LEC2*)**– nezbytný pro embryogenezi v pozdní dozrávací fázi vývoje embrya

LEC2

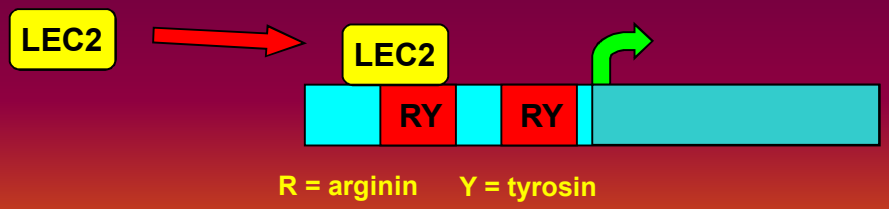
Známé proteiny,
pozdní fáze embryogeneze

Neznámé proteiny,
pozdní fáze embryogeneze
(RY motivy)

Proteiny akumulované v ranné fázi embryogeneze (vzniká zygota)

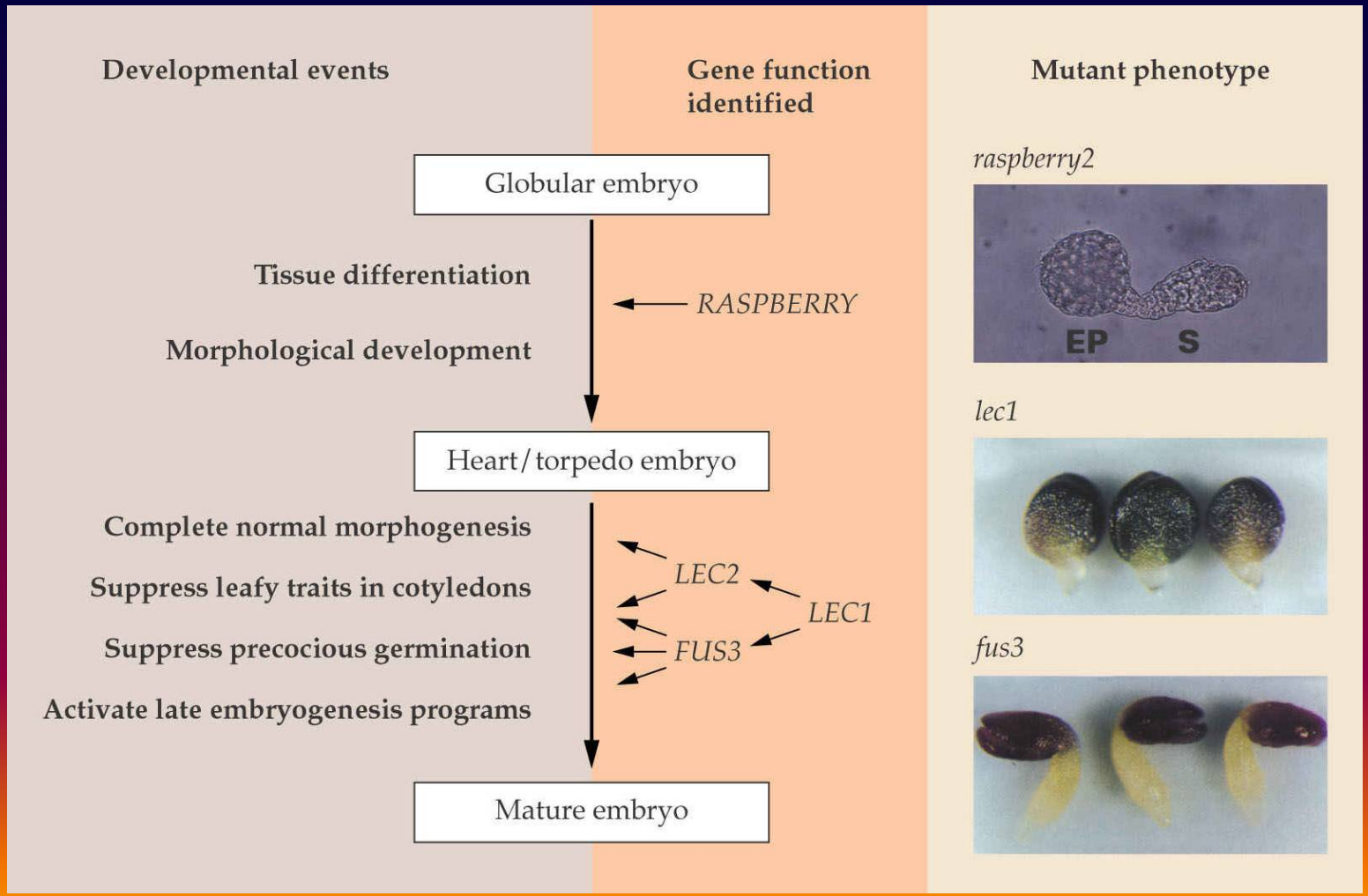
AGL15 – v pletivech procházejících zygotickou či somatickou embryogenezí

IAA30 – kóduje skupinu proteinů zapojených v signální dráze auxinů a obsažených v buňkách kořenového apikálního meristému



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

Geny kontrolující ranný a pozdní vývoj embrya

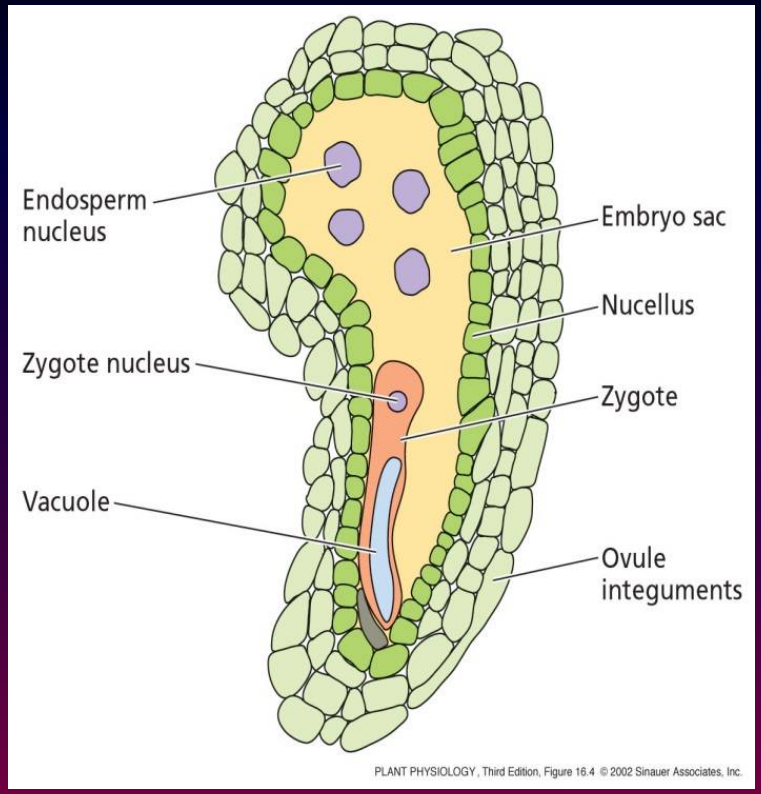


i) Vývoj endospermu

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

Nevýrazný endosperm (sója, hrách, salát, rajče) – minimální zásobní funkce endospermu

Výrazný endosperm (fazole) – endosperm je hlavní zásobárna; obsahuje živé buňky s proteiny a tuky; obsahuje mobilizační enzymy



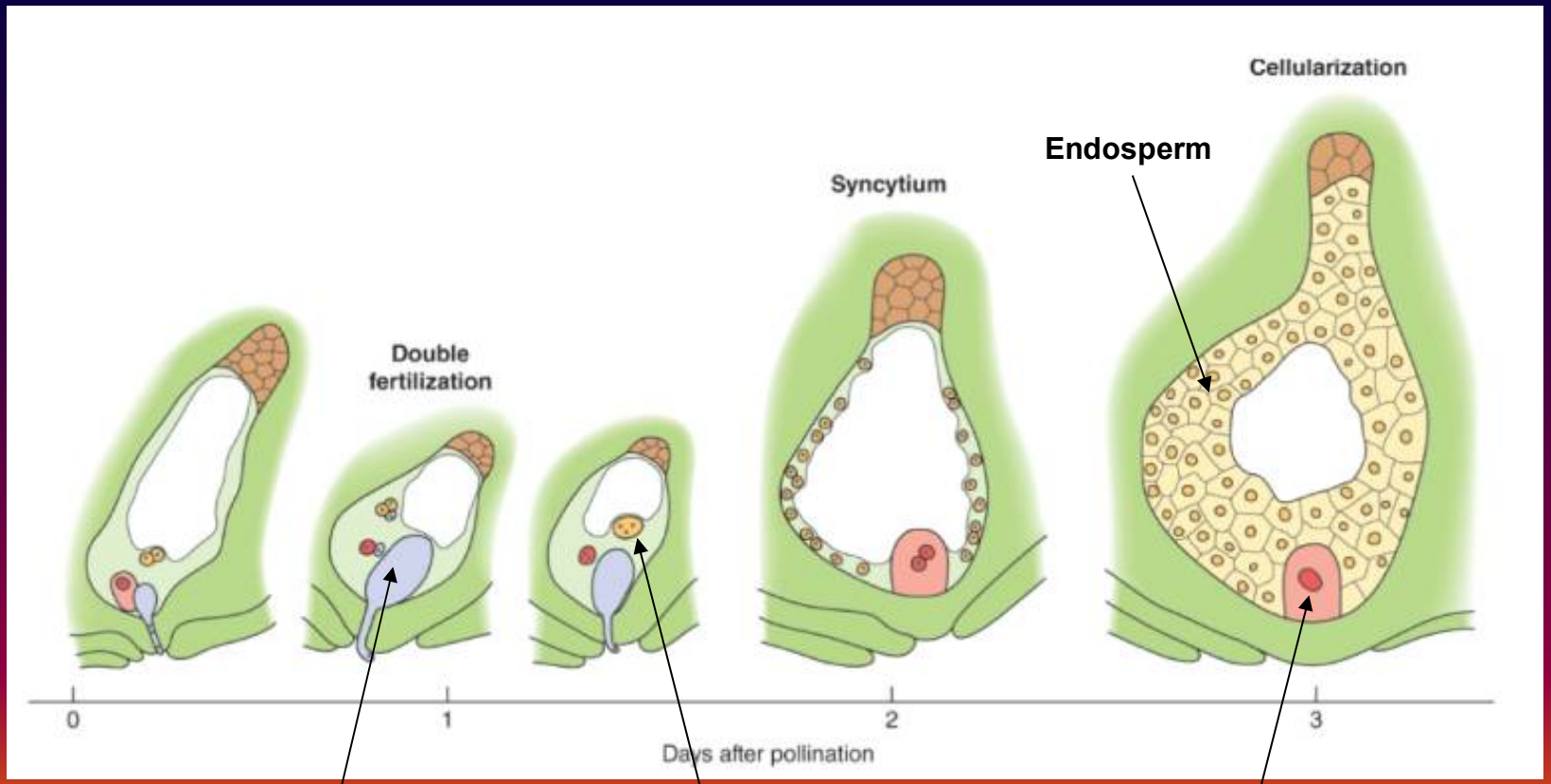
Buněčný endosperm – s dělením jader buněk endospermu se vyvíjí i buněčná stěna

Jaderný endosperm – jádra buněk se dělí, ale netvoří buněčná stěna, vzniká **syncytium** – pletivo, které se skládá z cytoplazmy obsahující mnoho jader, která však nejsou oddělená v buňkách. Buněčná stěna se může tvořit později.

Příklad: kokosový ořech – rostlina s jaderným endospermem; bílá část je syncytiální endosperm, který začíná tvořit buňky, kokosové mléko je syncytium.

Tvorba kukuřičného endospermu

1. Dělení endospermového jádra bez tvorby buněčné přepážky – tvorba syncytia
2. Celularizace – vznik endospermu směrem do středu endospermální dutiny



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 zeinu v endospermu kukuřice. Gen ***DE*** kontroluje tvorbu signálního peptidu v 19 kD α-zein proteinu

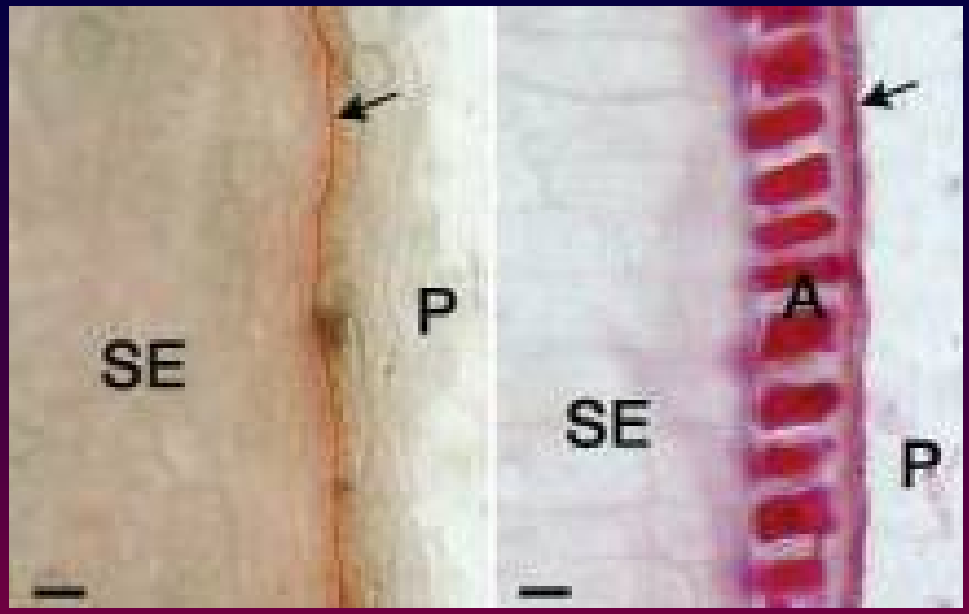
Mutant *crinkly 4* (*cr4*) – nevytváří aleuronovou vrstvu; gen ***CR4*** kóduje receptor-like kinázu

Update 2016

Czyzewicz N et al. (2016) J Exp Botany 67: 4835 – 4847

Review o funkci CR4 u *Arabidopsis*: vývoj embrya, stonku, kořene, obrana rostlin; struktura proteinu CR4, jeho substráty a transkripční regulace.

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

Update 2016

Bernardi J et al. (2016) J Plant Regul 35: 770 – 777

Mutant ***dek18*** – defekt ve vývoji zrna kukuřice; nízká hladina auxinu; vegetativní vývoj opožděn; snížení exprese genů zapojených v biosyntéze auxinů => **DEK18** je zapojen v biosyntéze auxinů.

Update 2019

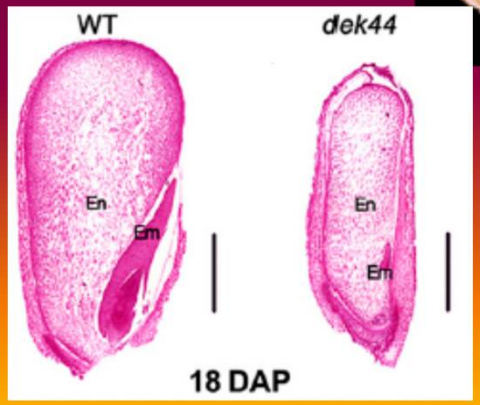
Qi W et al. (2019) Plant Physiology 180: 2106-2119

Mitochondriální respirace závisí na proteinech kódovaných nukleárním a mitochondriálním genomem. Mnoho proteinů spojených s respirací je kódováno mitochrodriálním genomem a prochází translací na mitochondriálních ribozomech.

Mutant ***defective kernel 44* (*dek44*)** – produkuje malá zrna ukazující embryo-letální fenotyp; *DEK44* kóduje ribozomální 50S protein L9; lokalizován v mitochondriích a pouze v zrnech

Ztráta proteinu DEK44 narušuje expresi řady proteinů zapojených v dýchacím řetězci a kódovaných jaderným i mitochondiálním genomem.

Klas kukuřice F2 *dek44* x B73



Parafínové řezy zrna

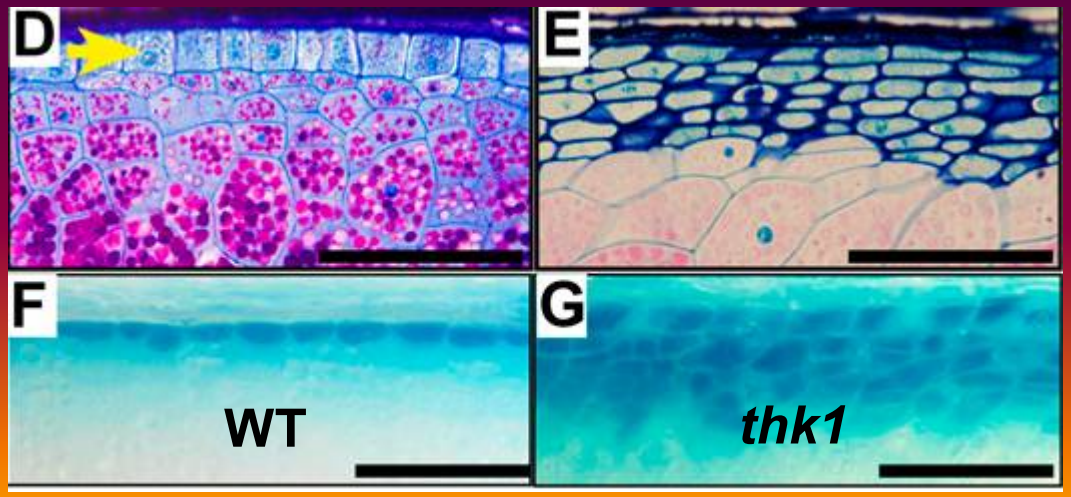
Mutant *supernumerary aleurone layers 1* (*sal1*) – místo jedné vytváří 7 aleuronových vrstev; gen ***SAL1*** kóduje protein homologní s lidským CHMP1 proteinem zapojeným v transportu membránových vezikul

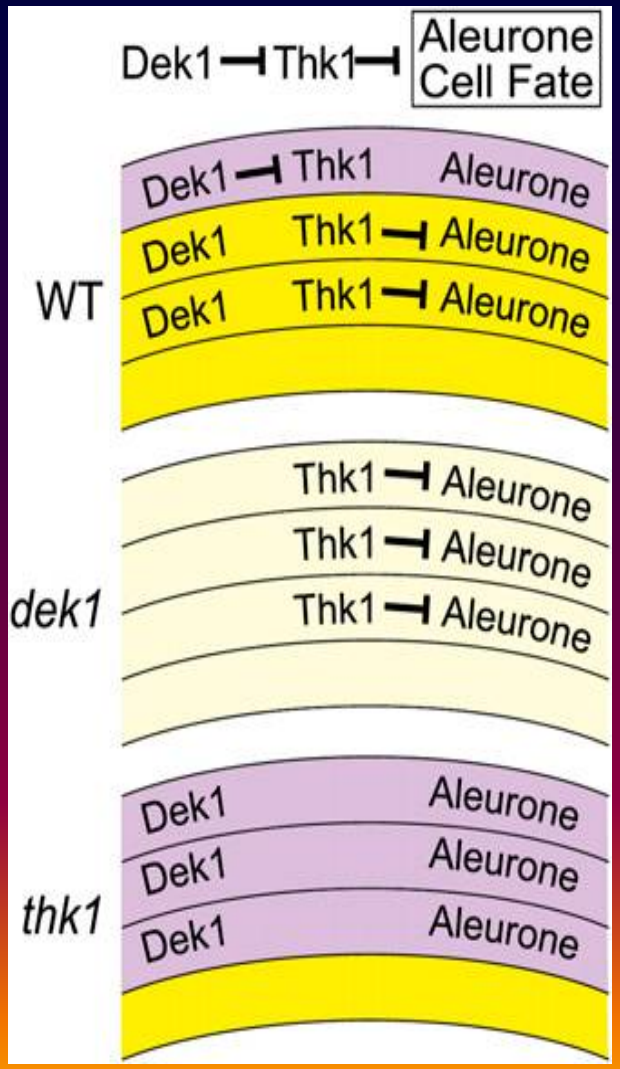
Shen B et al (2003) PNAS 100: 6552-6557

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 plazmamembráně pomocí recyklace či degradace endozomů.**

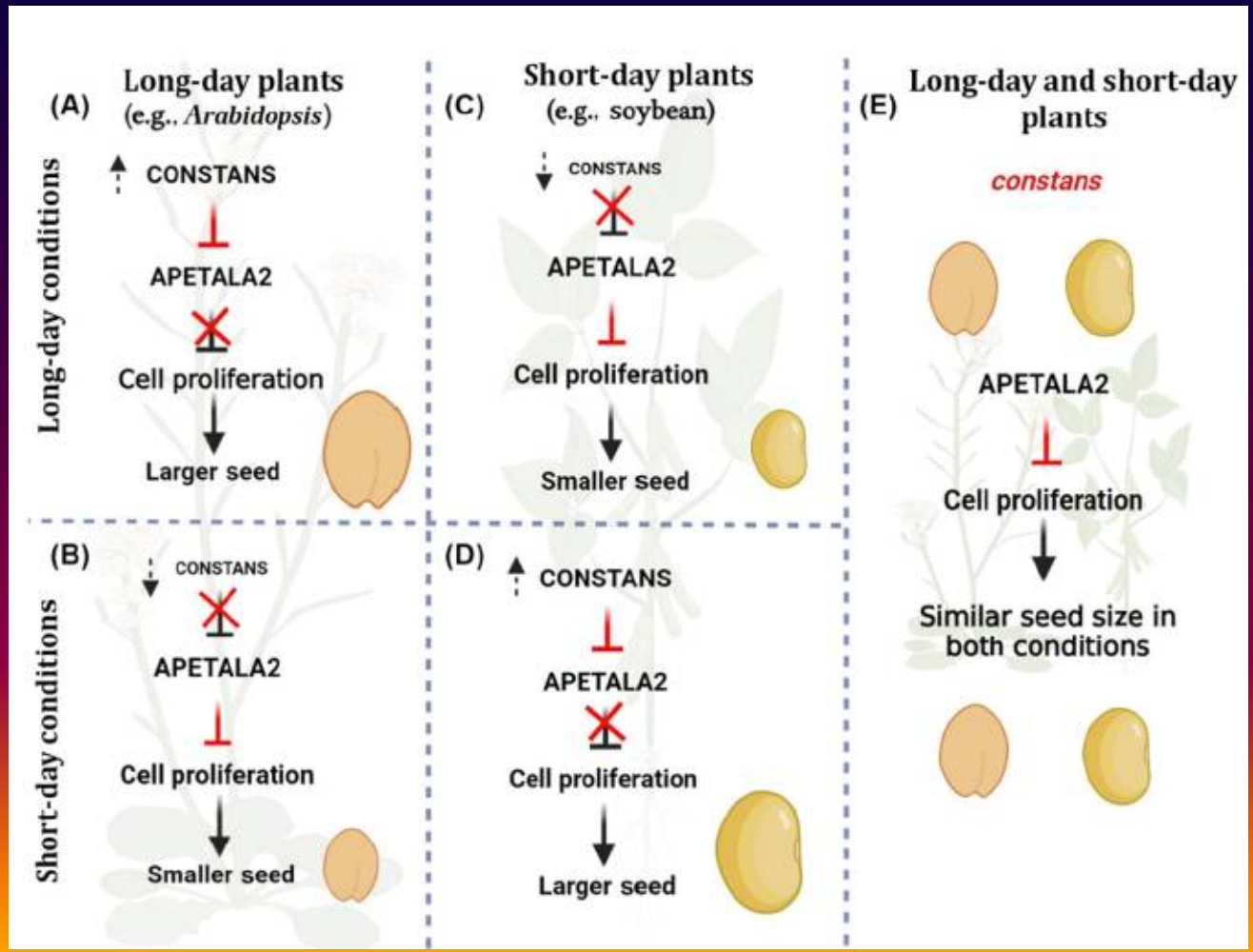
Mutant *thick aleurone 1* (*thk1*) – definuje novou negativní funkci v regulaci diferenciace aleuronu





Update 2023

Yu B et al. (2023) Nature Plants 9: 343–354

Achary RK, Majee M (2023) TIPS 28: 975-977

Pracovní model regulace proteinu CONSTANS při určování velikosti semen v závislosti na fotoperiodě.