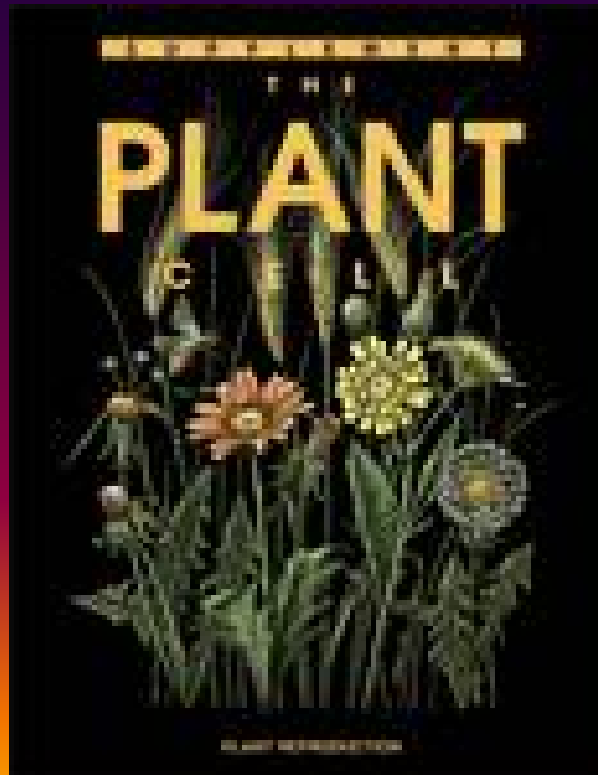


4) Reprodukce rostlin

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

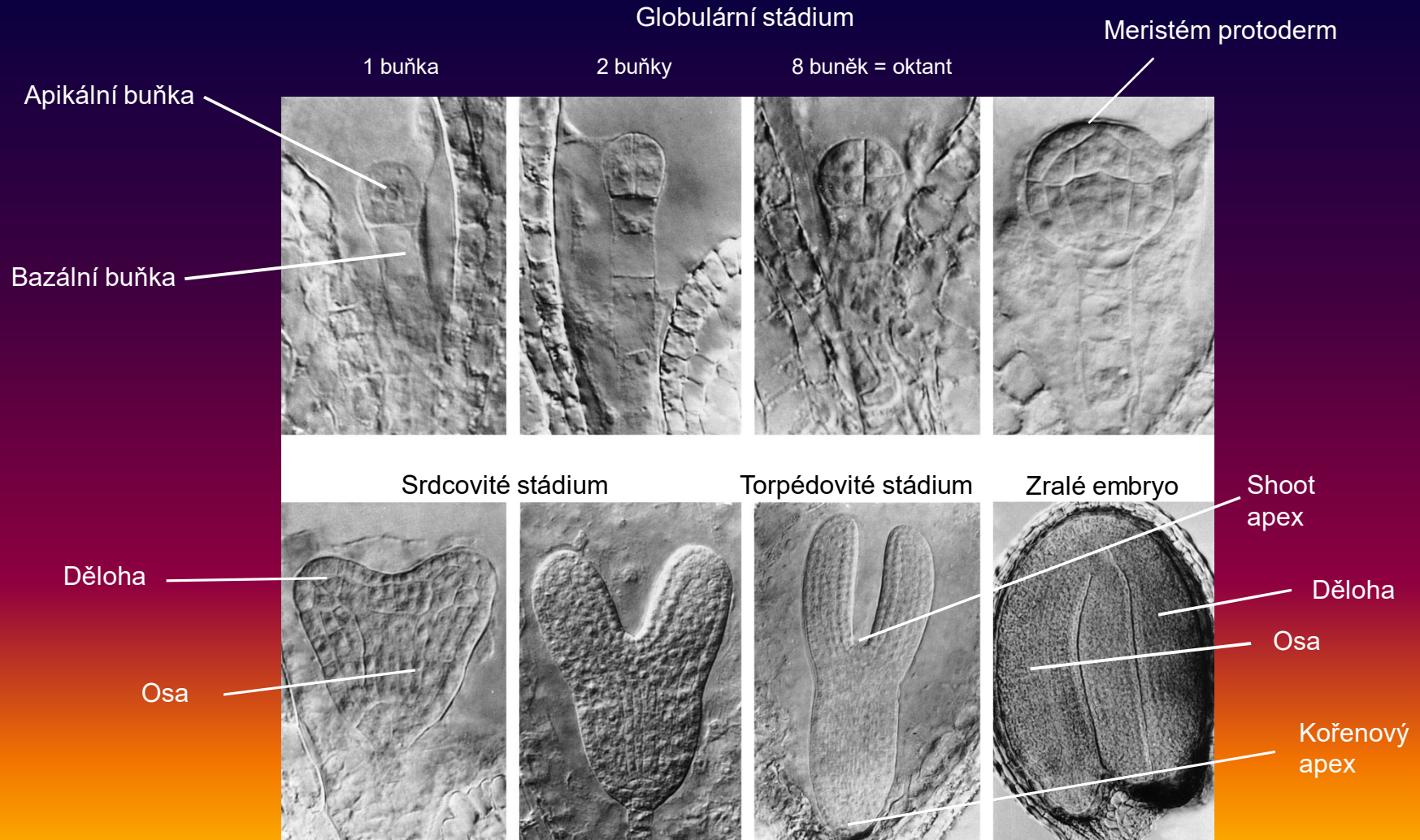


Martin Fellner
Laboratoř růstových regulátorů
PřF UP v Olomouci a ÚEB AVČR

g) Tvorba semen

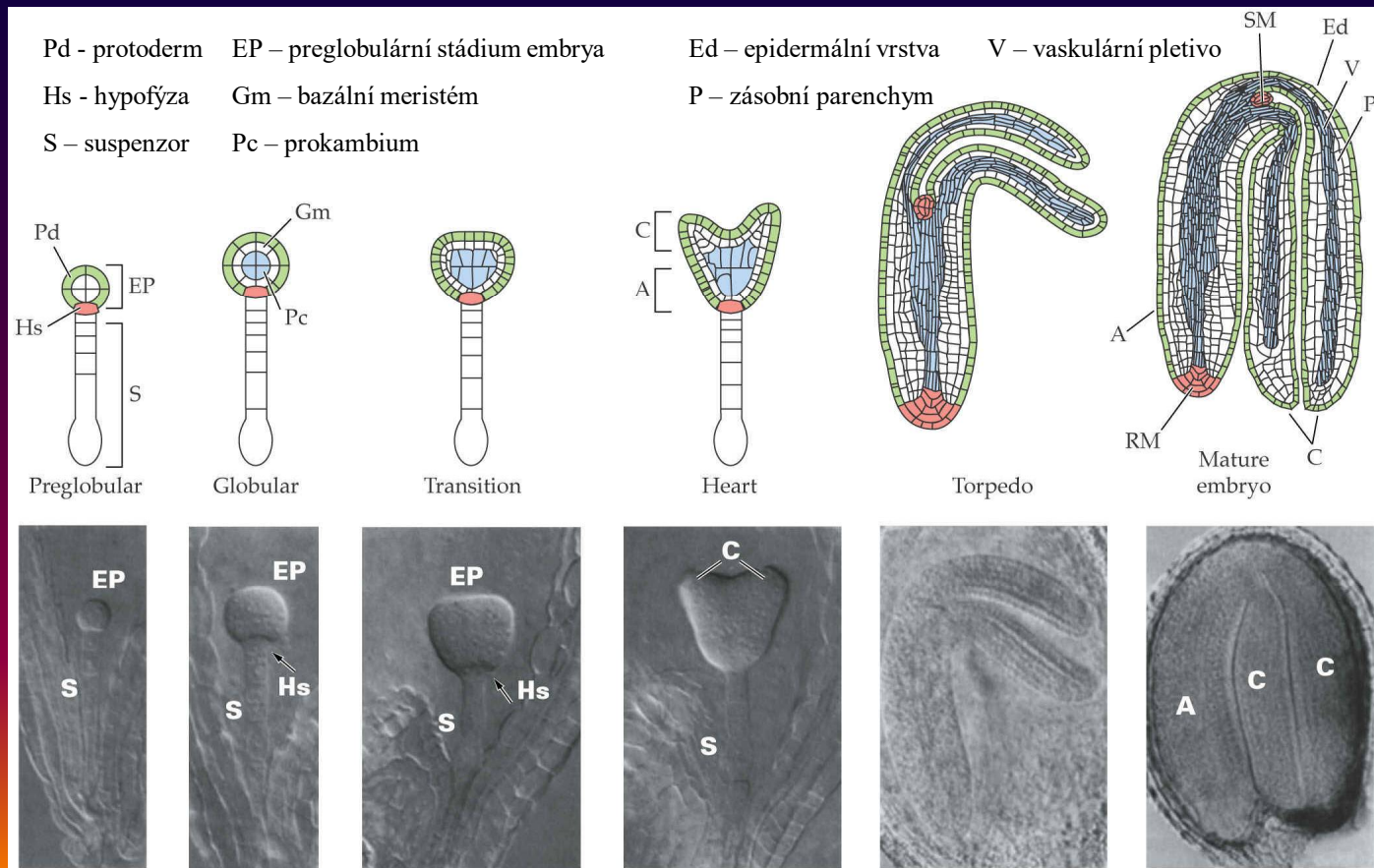
Semeno krytosemenných: - embryo
- endosperm
- testa (obal)

Vývoj embrya



3 fáze embryogeneze na histologické úrovni:

- diferenciacie pletív
- zväčšovanie buniek
- zrání embrya



Diferenciace pletiv:

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

Zvětšování buněk:

- ukládání rezerv během torpédovitého stádia

Zrání embrya:

- ukončení vývojových procesů; embryo připraveno k vysychání

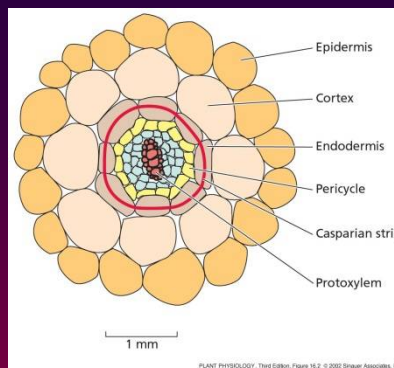
Identifikace mutantů s defektem v regulaci vývoje embrya

Genetická a molekulární charakteristika mutantů

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

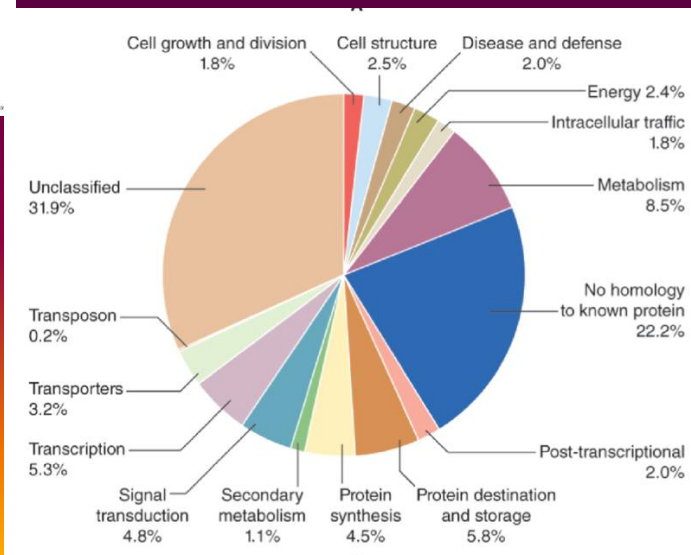
Embryogeneze zakládá:

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

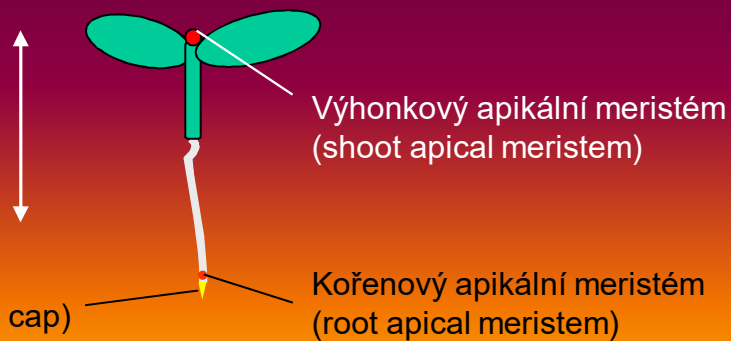


Radiální polarita

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



Axiální polarita

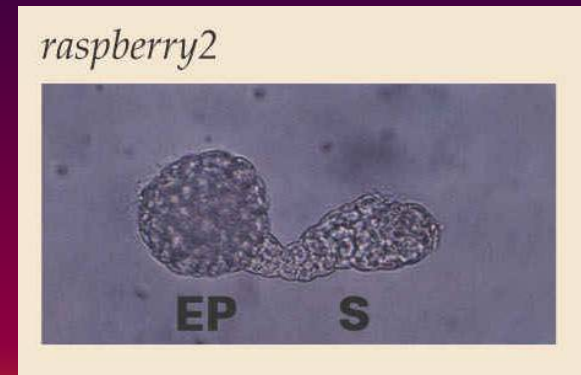


Geny nutné v ranných stádiích vývoje embrya

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

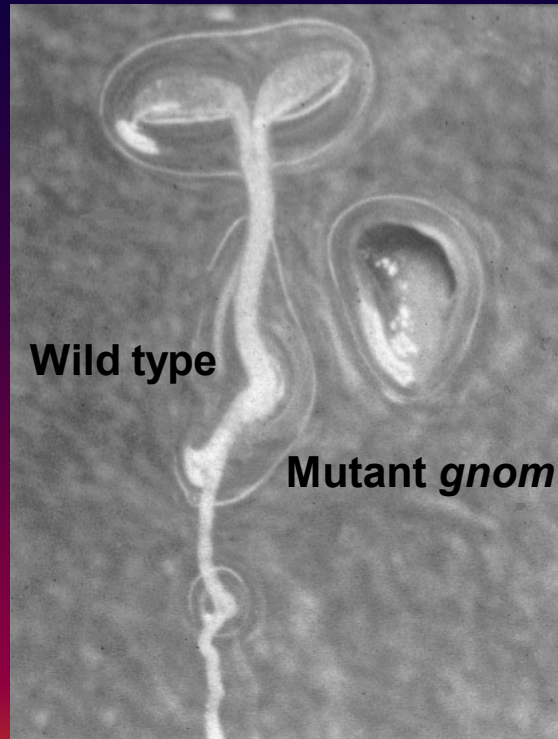


RASPBERRY2 – kontroluje diferenciaci pletiv a morfologický vývoj



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

Geny zapojené v axilální polaritě

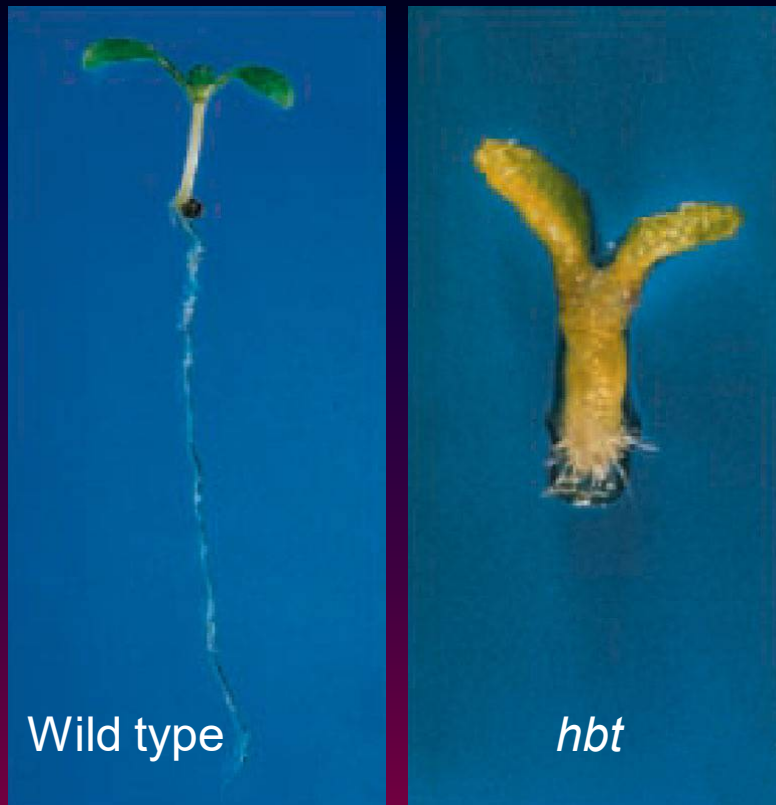


gnom - mutant
GNOM - gen
GNOM - protein

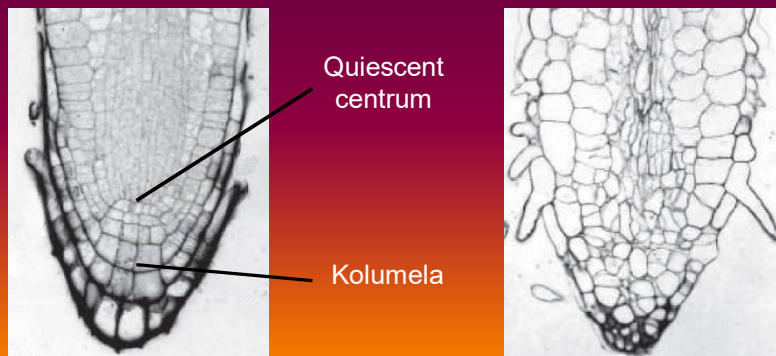
Mutant *gnom* nevytváří dělohy a kořen = chybí axiální polarita



Gen *GNOM* kontroluje apikálně-bazální polaritu



Wild type

hbt

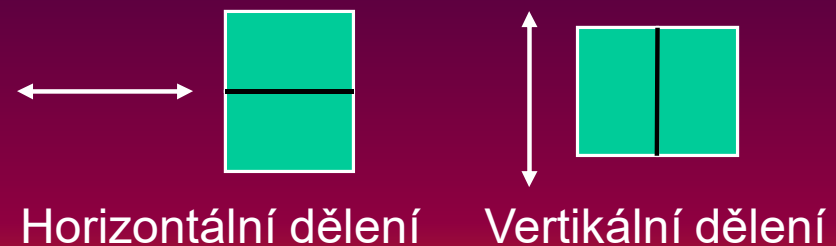
Quiescent centrum

Kolumela

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



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



Horizontální dělení

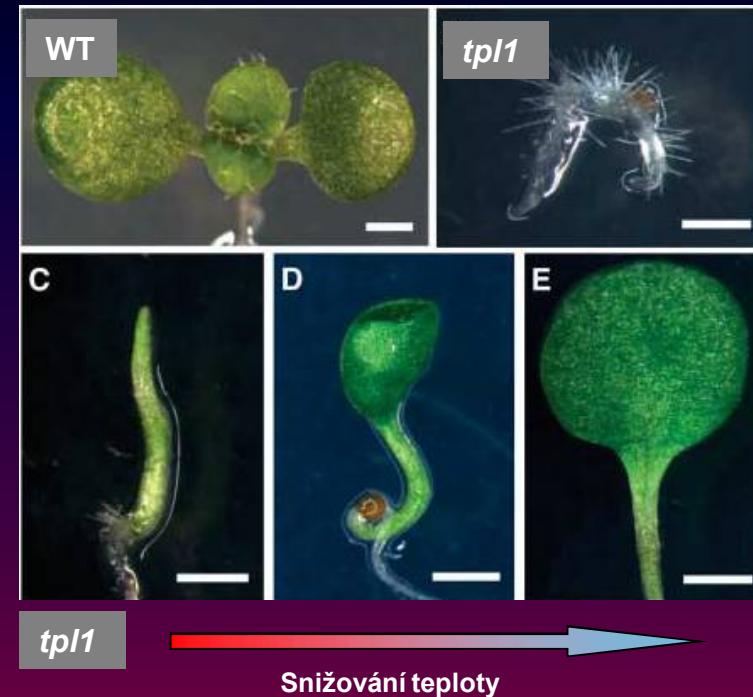
Vertikální dělení

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)



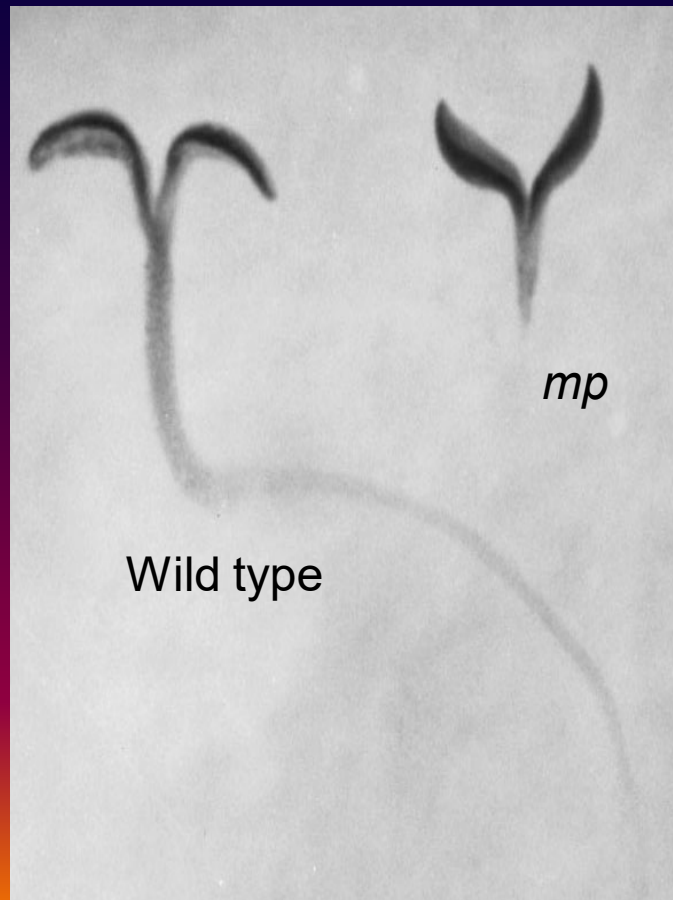
ARF5/MP - transkripční faktor
(auxin-responsive faktor)

IAA12/BDL - represor

TPL - co-represor



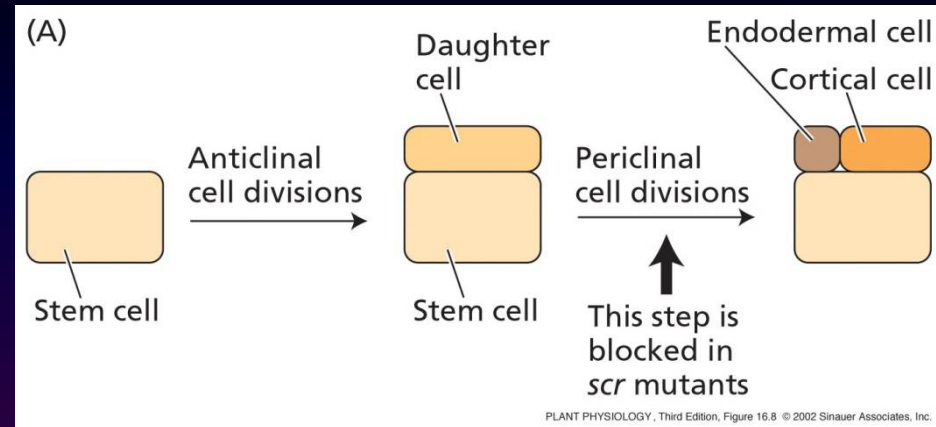
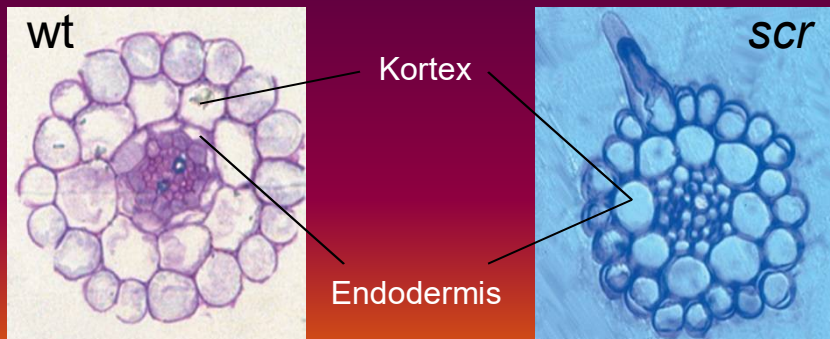
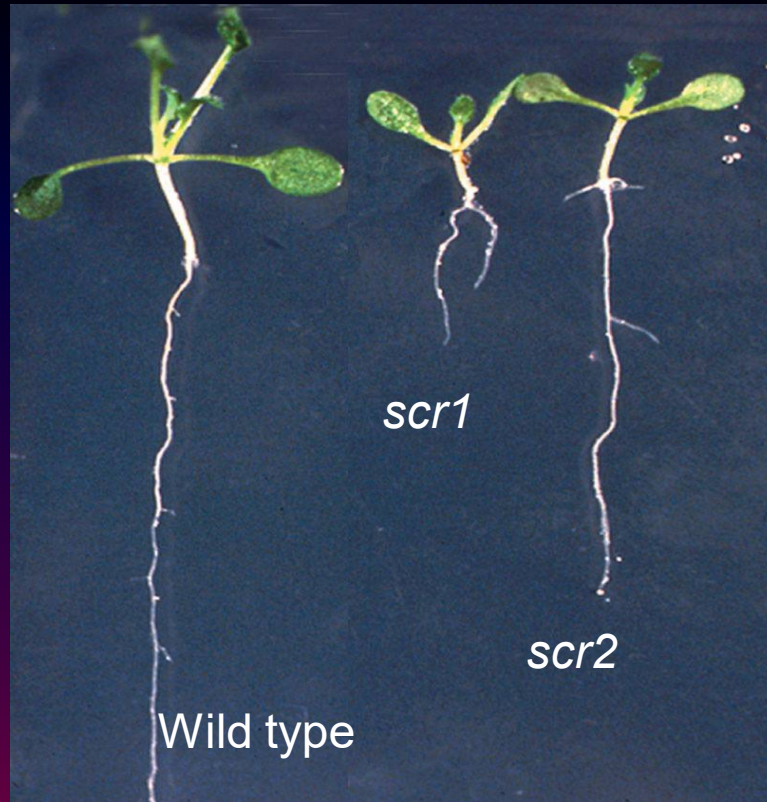
Geny zapojené v radiální polaritě



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 2016

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

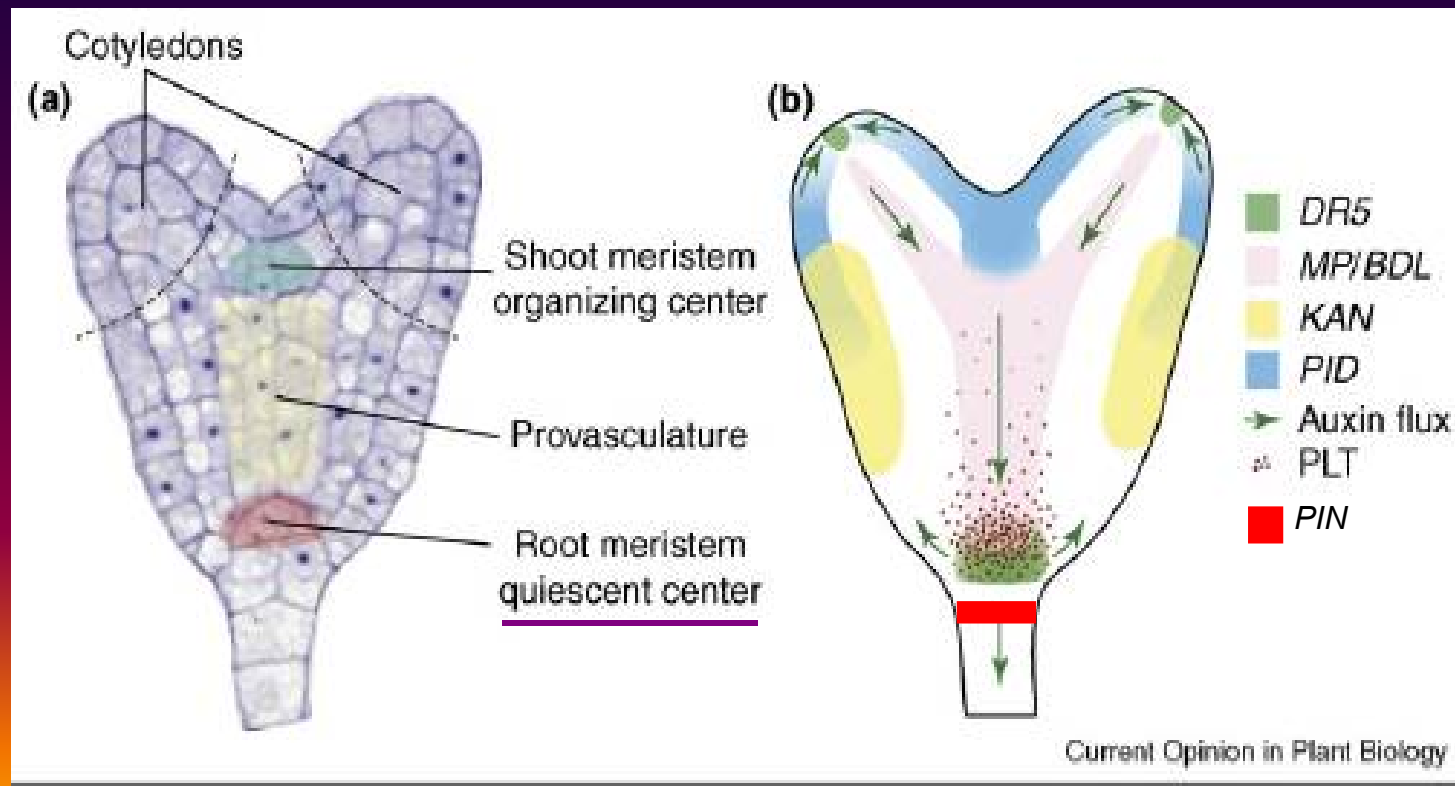
Nejnižší - diferenciaci kmenových buněk

PLT1 - PLT3 kontrolují expresi genů *PIN*

PLETHORA → **PIN**

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

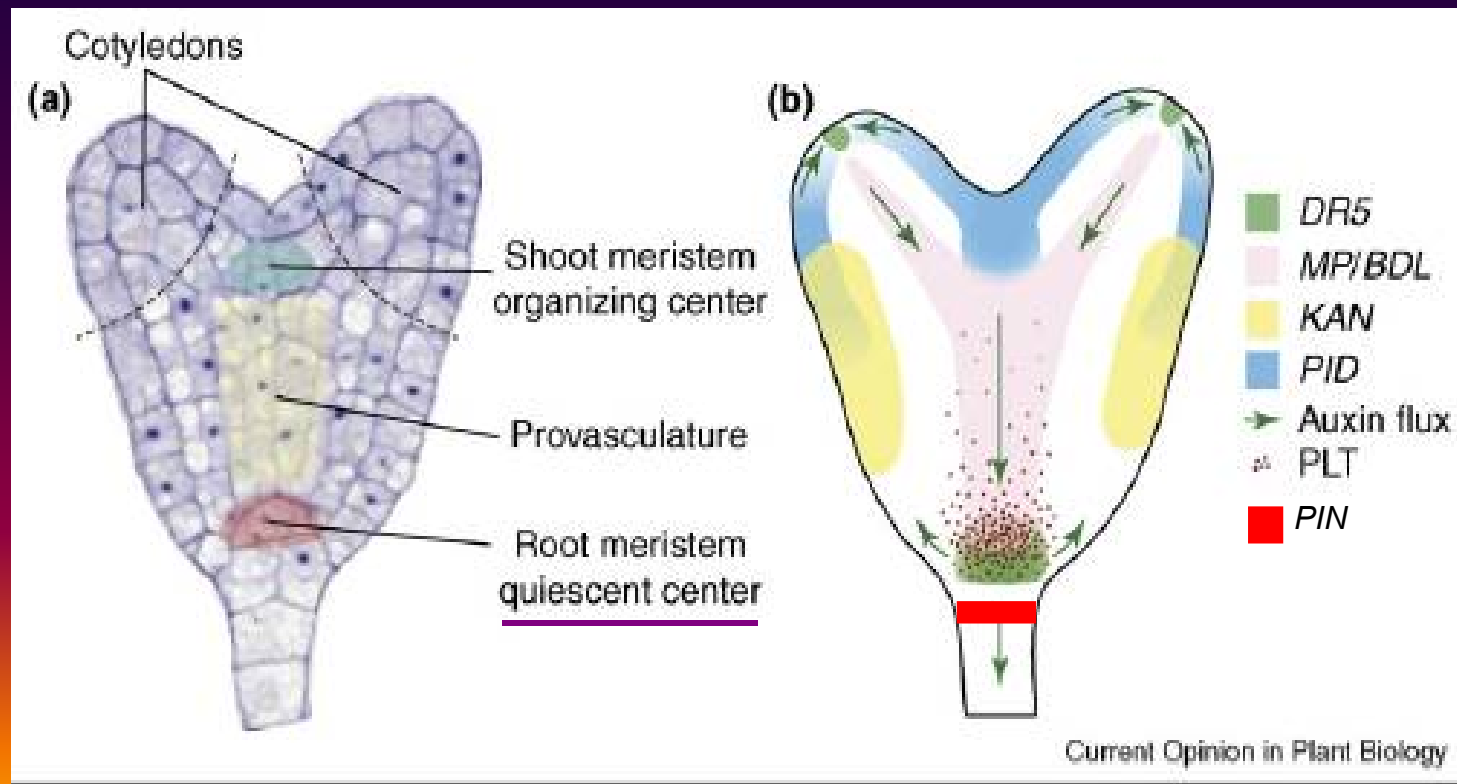
Exprese *PLETHORA* – pravděpodobně určována auxinem prostřednictvím *MONOPTEROS*



KANADI – kontroluje radiální polaritu embrya

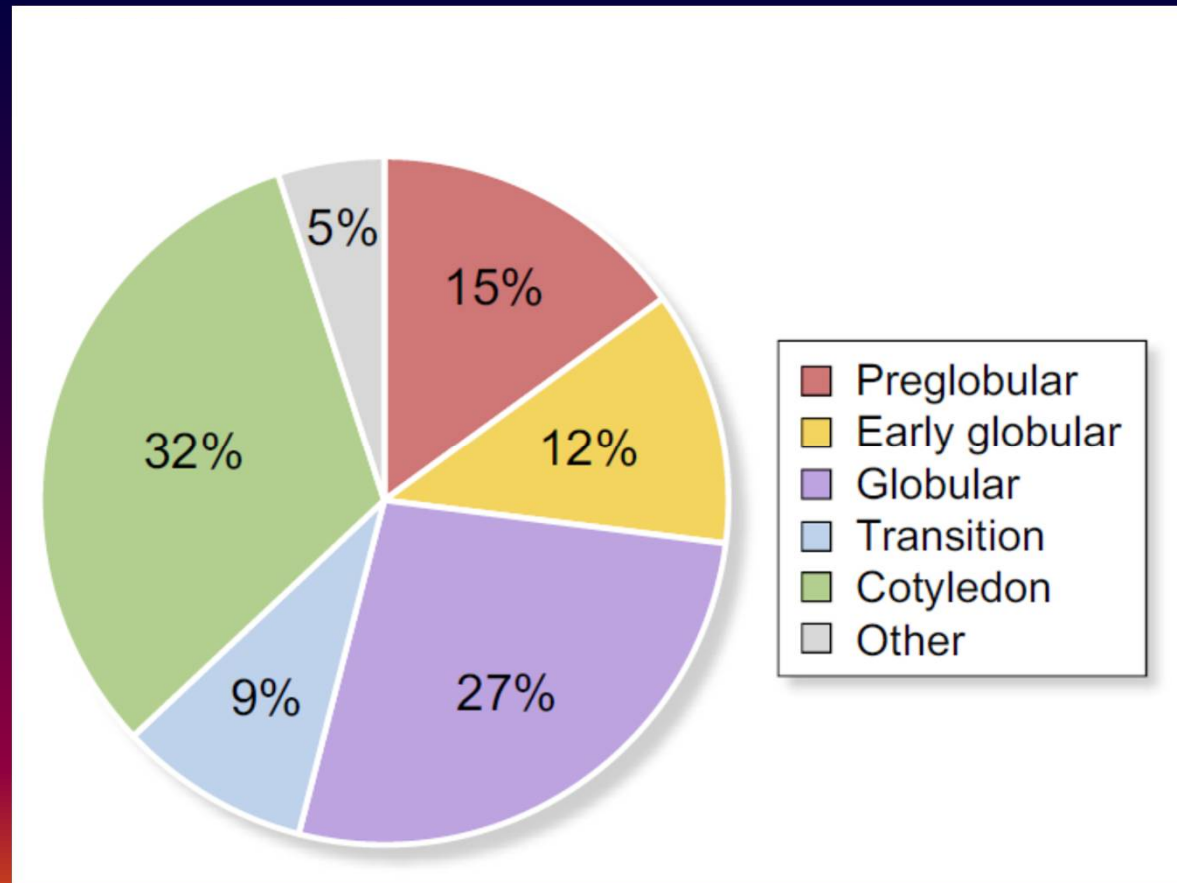
Časová a prostorová exprese *KANADI* je kontrolována auxinem prostřednictvím PIN proteinů

KANADI potlačuje citlivost k auxinu na okrajích děloh



Update 2019

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



David Meinke
Oklahoma State
University

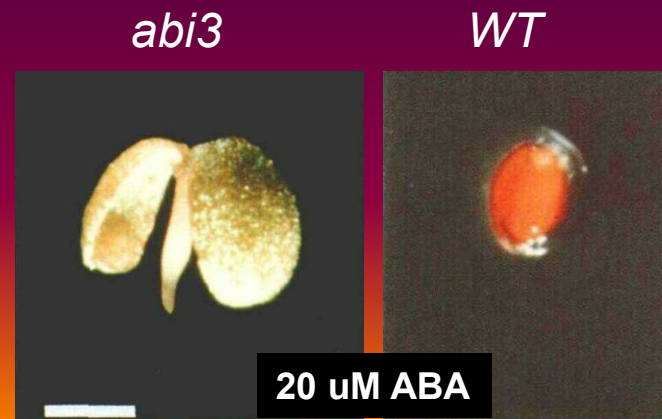
510 genů zapojených do vývoje embrya (EMB –Embryo-Defective)

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 (**AB**scisic acid **I**nsensitive **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.



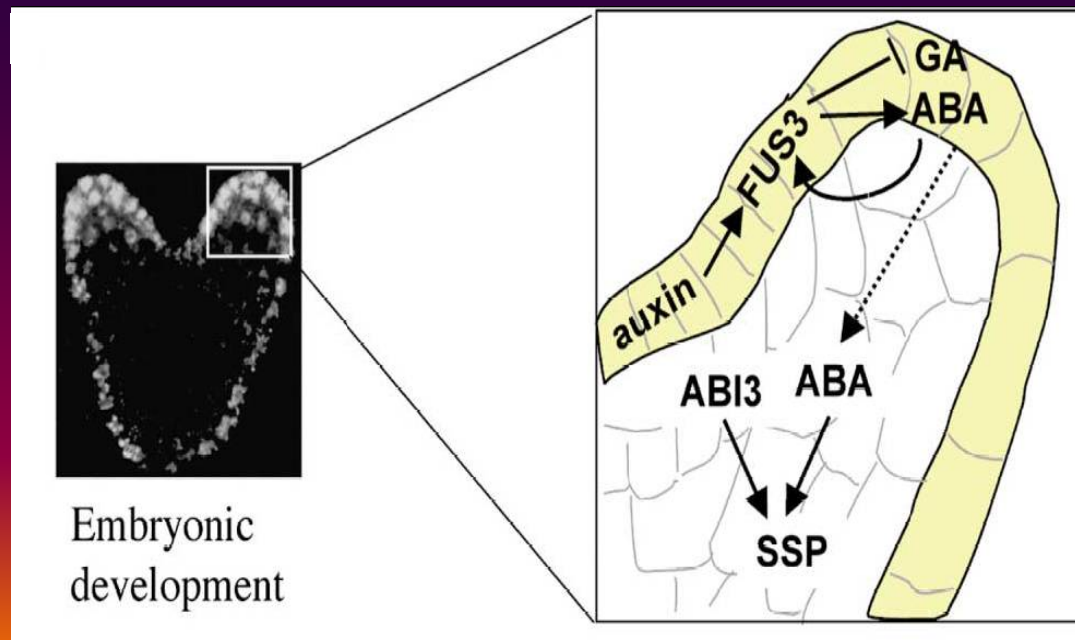
FUS3 reguluje embryogenezi dvěma cestami:

- 1) Kontrolou hladin hormonů ABA, gibberelinů, cytokininů a auxinů.
- 2) Přímou aktivací genů zapojených v dozrávání semene včetně zásobních proteinů a oleosinů a transkripčních regulátorů WRINKLED1, ABI3 a AGL15/18.

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

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

- Exprese *FUS3* v epidermis je závislá na gradiendu auxinu
- *FUS3* 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 – **mechanismus 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 proti vysychání

- heat-shock proteiny
- **LEA proteiny** (Late Embryogenesis-**A**bundant)
- 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.

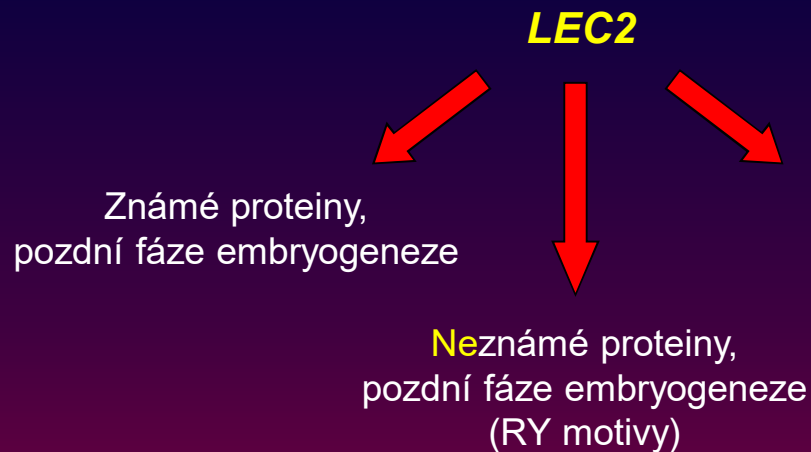


Update 2015

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

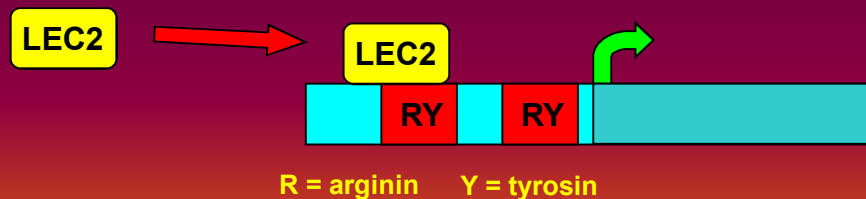
LEC1 stimuluje expresi genů spojených s prodlužováním hypokotylu. **LEC1** interaguje s proteinem PIF4 (PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR 4; hlavní transkripční modulátor v post-embryonickém vývoji) prostřednictvím přímé vazby s G-box elementem.

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



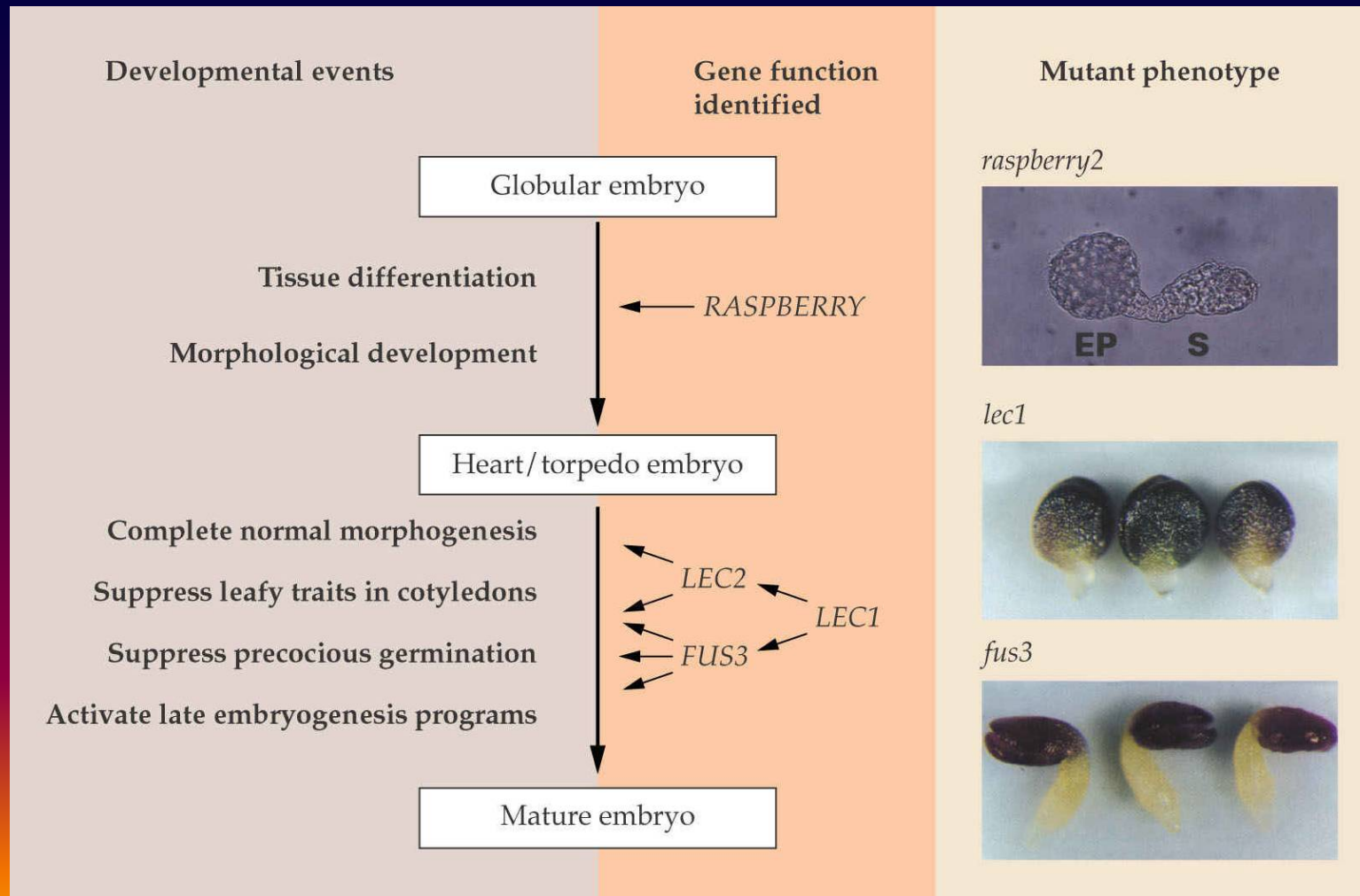
AGL15 – v pletivech procházejících zygotickou či somatickou embryogenezí

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

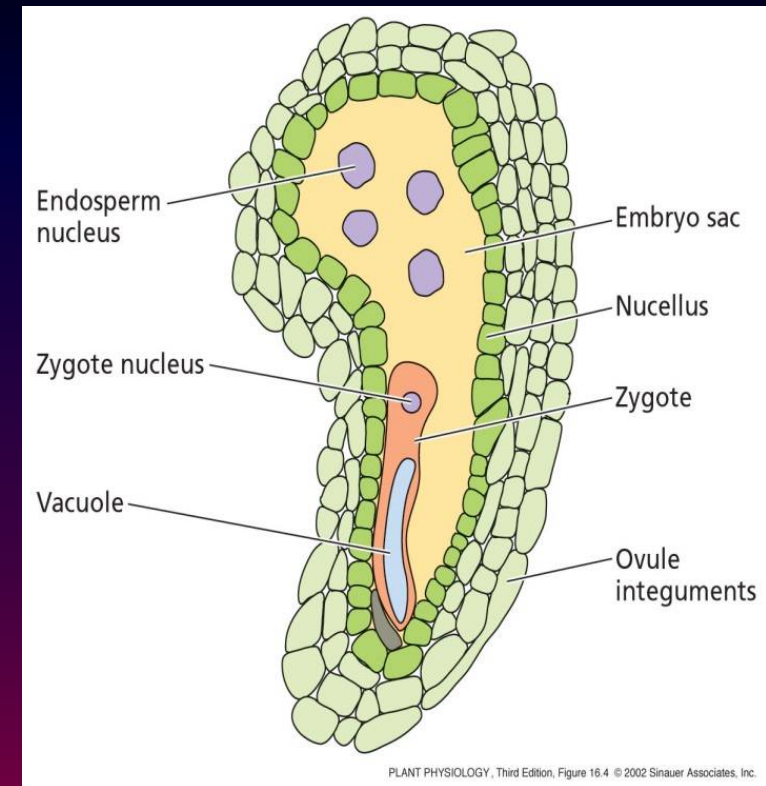


i) Vývoj endospermu

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



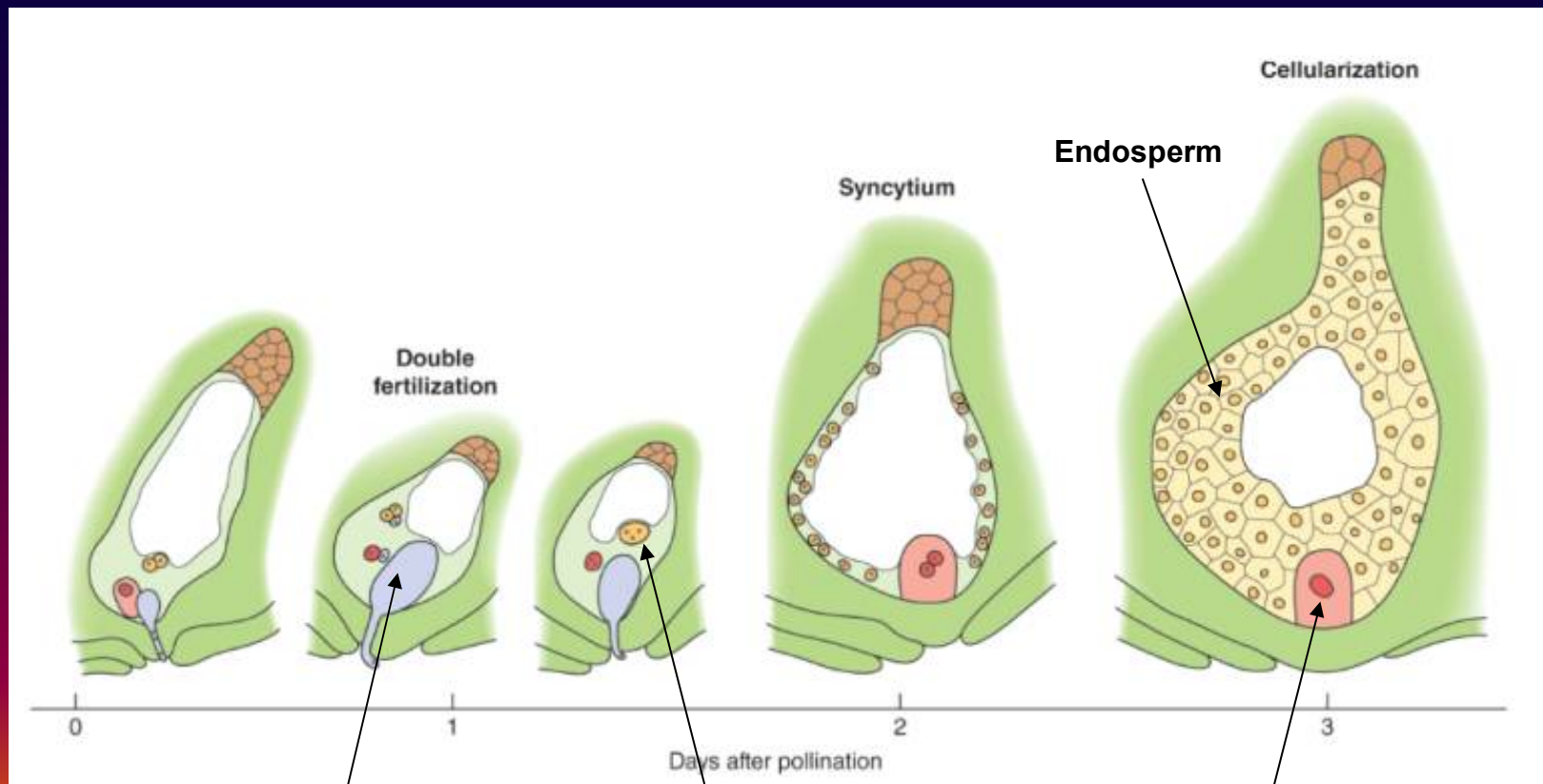
Buněčný endosperm – s dělením jader buněk endospermu se vyvíjí i buněčná stěna

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



Pylová láčka

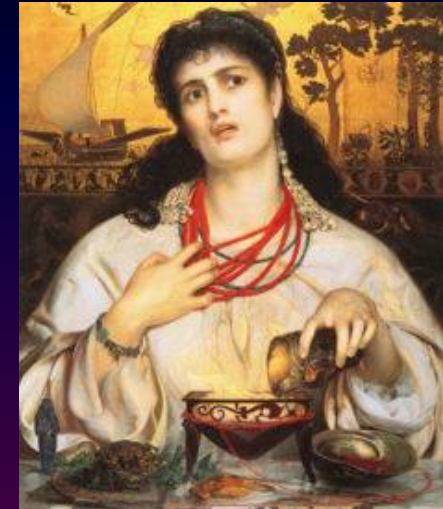
Centrální buňka

Embryo

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

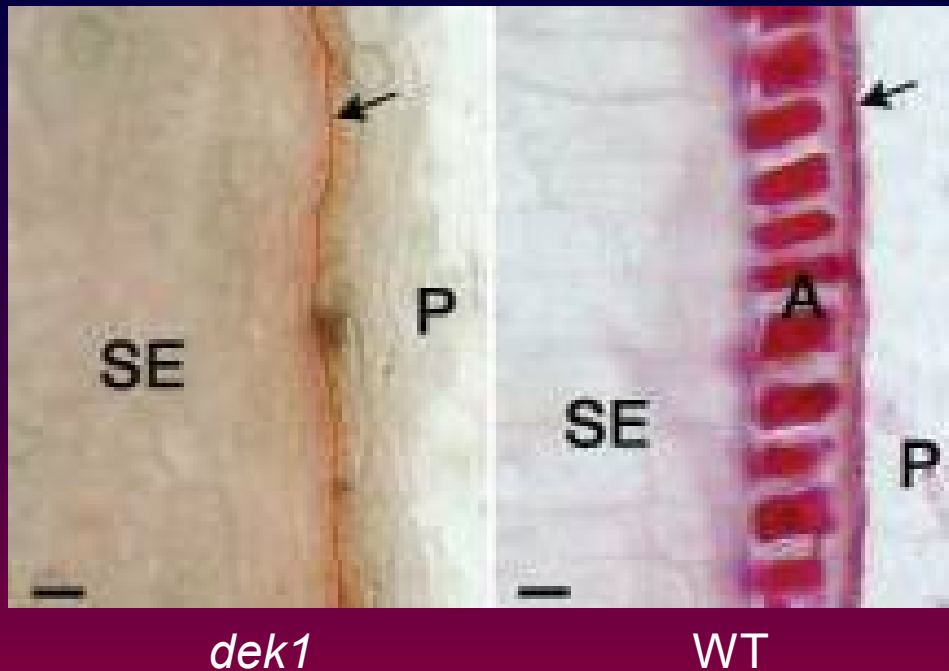
Mutant **crinkly 4 (cr4)** – nevytváří aleuronovou vrstvu; gen **CR4** kóduje receptor-like kinázu

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**.



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

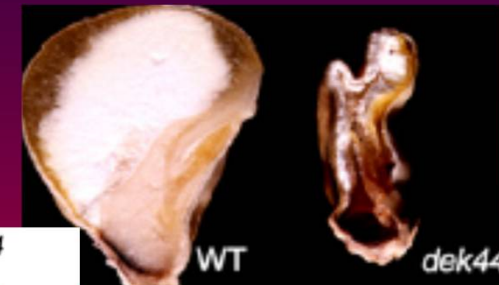
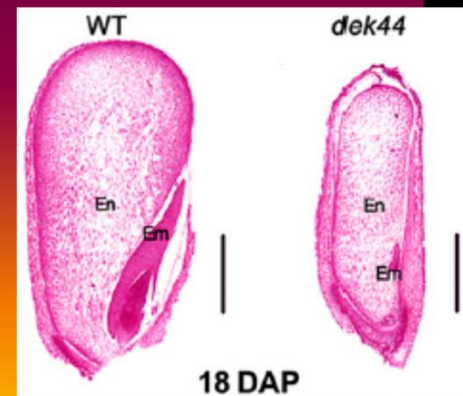
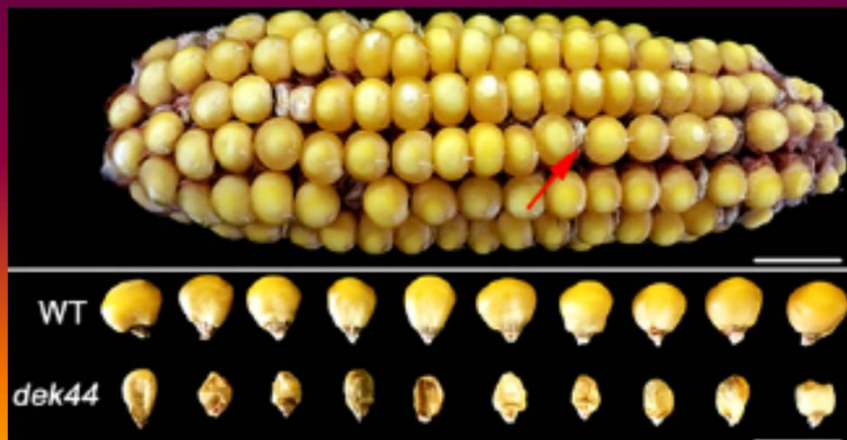
Qi W et al. (2019) *Plant Physiology* 180: 2106-2119

Mitochondriální respirace závisí na proteinech kódovaných nukleárním a mitochondriálním genomem. Mnoho proteinů spojených s respirací je kódováno mitochondriálním 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 mitochondriálním 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

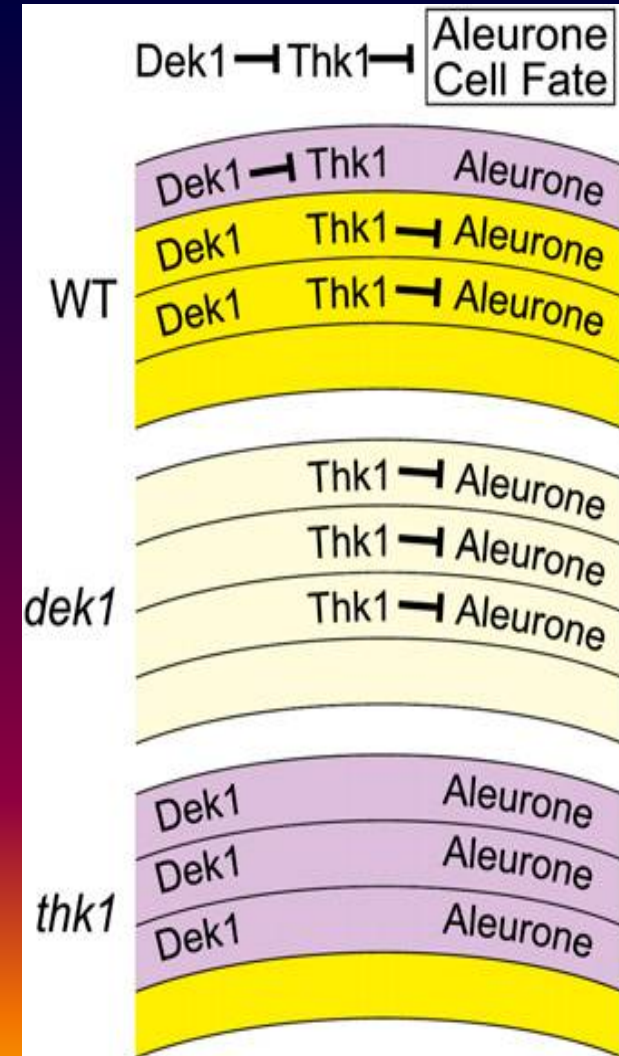
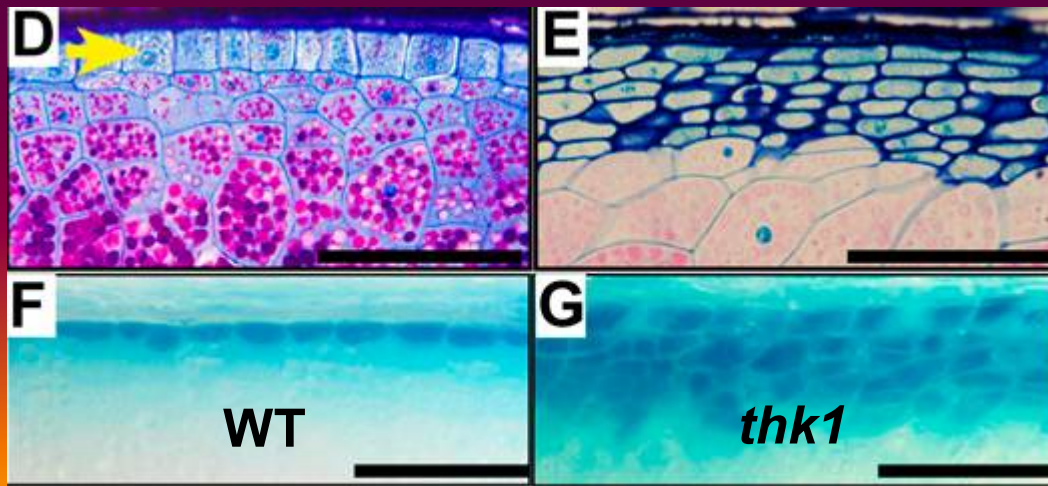
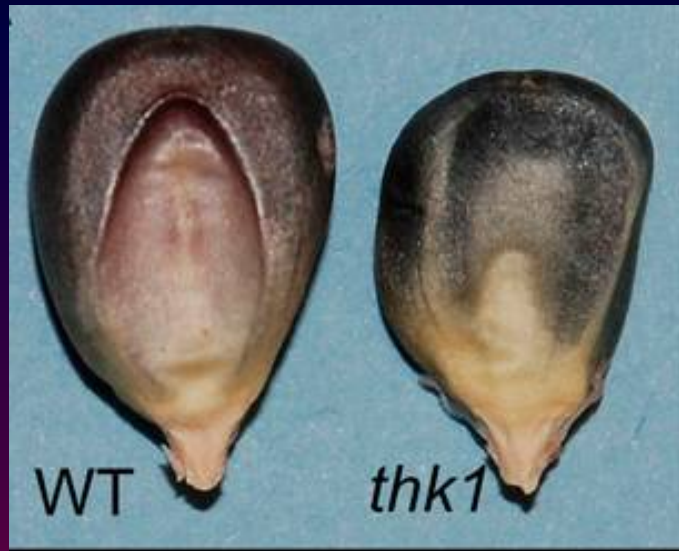


Shen B et al (2003) PNAS 100: 6552-6557

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



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

