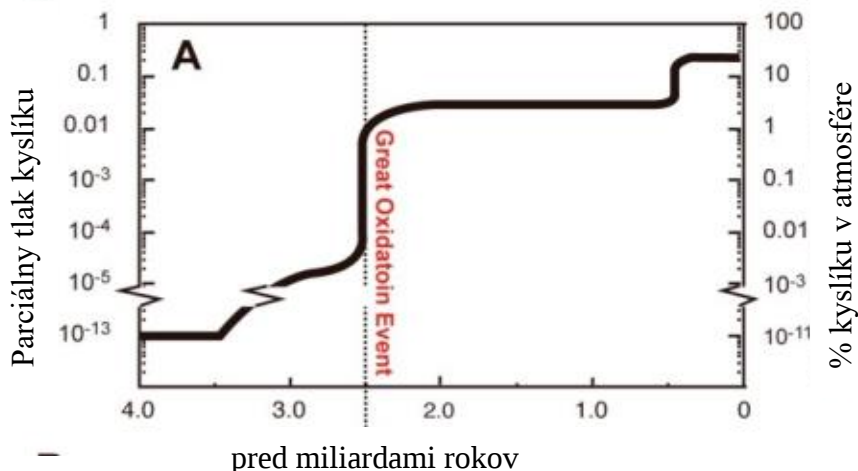


Praktická úloha č. 2**Téma: Evolúcia a fyziológia rastlín**

Milí študenti! Dnes sa spoločne pozrieme na adaptácie, ktoré sa v evolúcii museli vyvinúť, aby mohli rastliny osídliť súš. Na ceste nás bude sprevádzať rastlinný hormón auxín. Je to látka zapojená v takmer všetkých procesoch, ktoré v rastlinnom tele prebiehajú. Má obzvlášť veľký význam vo vytvorení polarity rastlinného tela. Umožňuje rastlinám adekvátne reagovať na podmienky prostredia, napríklad na zmenu svetelného alebo gravitačného stimulu.

Jednou z kľúčových udalostí v evolúcii bolo osídlenie súše rastlinami. Život s najväčšou pravdepodobnosťou vznikol v moriach a zostal tam takmer 3 miliardy rokov. Na súš sa život dostal až pred 500-600 miliónmi rokov po tom, ako sa v atmosfére ustálila vyššia koncentrácia kyslíku. Na Obrázku 1 vidíte tradičný model, ktorý znázorňuje obsah kyslíka v zemskej atmosfére v historickom čase.

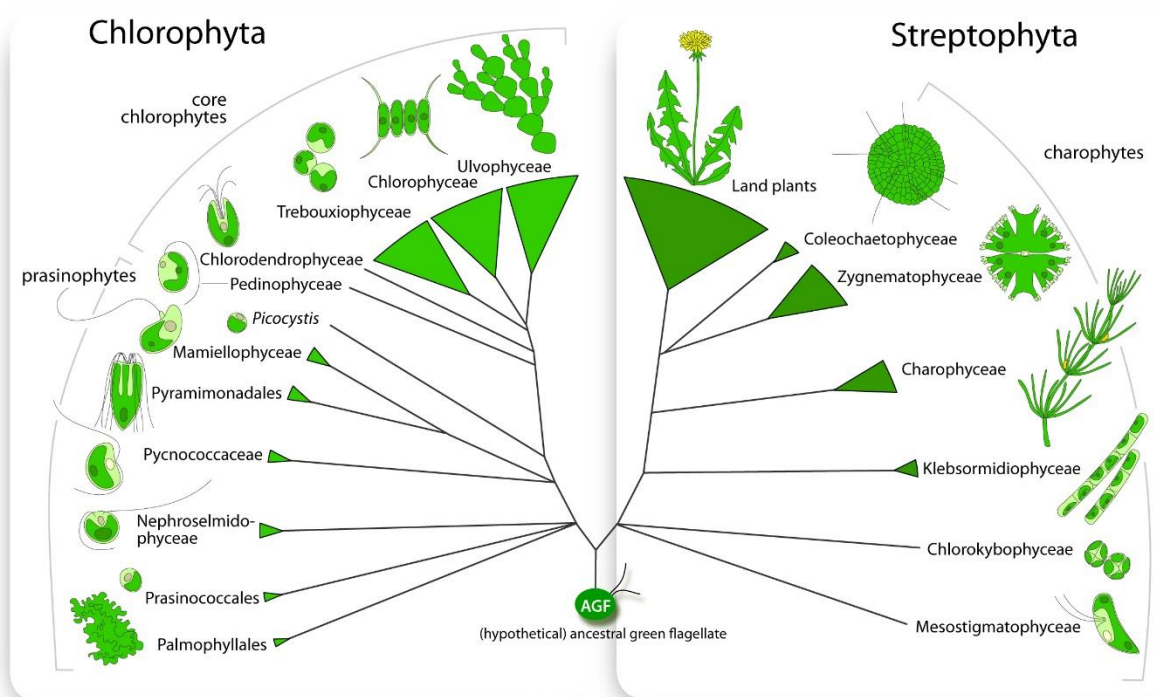


Obrázok 1: Prevzaté z Fujita Y, Tsujimoto R, Aoki R. Evolutionary Aspects and Regulation of Tetrapyrrole Biosynthesis in Cyanobacteria under Aerobic and Anaerobic Environments. *Life (Basel)*. 2015;5(2):1172-203. Published 2015 Mar 30. doi:10.3390/life5021172

V súčasnosti kyslík tvorí 21% vzduchu v atmosfére a jeho parciálny tlak je 0,21 atm.

Úloha 1: Skúste sa zamyslieť, prečo nebol život na súši možný pred nárastom koncentrácie kyslíku v atmosfére. Pri úvahe zoberte do úvahy všetky možné formy, v akých sa kyslík v atmosfére vyskytuje.

Línia zelených rias divergovala pred 725-1200 miliónmi rokov na dve sesterské línie – primárne morské *Chlorophyta* a primárne sladkovodné *Streptophyta*. Práve v streptofytnej línii sa vyvinuli suchozemské rastliny. *Streptophyta* boli evolučne pravdepodobne prvé sladkovodné riasy vôbec.



Modified from Leliaert et al., *Crit. Rev. Plant Sci.* 31:1-46 (2012)
updated 25 Oct 2013

Obrázok 2: Prevzaté z Leliaert F, Smith DR, Moreau H, Herron MD, Verbruggen H, Delwiche CF & De Clerck O (2012) Phylogeny and molecular evolution of the green algae. *Critical Reviews in Plant Sciences* 31: 1-46. pdf

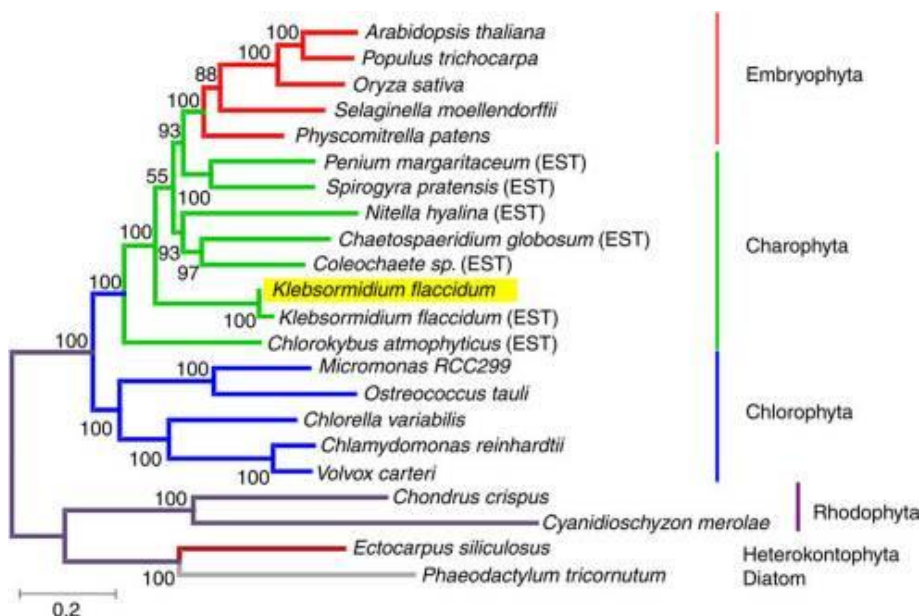
Úloha 2: Život na súši sa od života vo vode líši. Pouvažujte a pokúste sa vymyslieť aspoň 2 výzvy, ktorým rastliny čelili pri prechode na súš.

Úloha 3: Súš bola kolonizovaná zo sladkovodného prostredia. V evolúcii do terestrického prostredia neskôr prenikli aj ďalšie riasové skupiny (napríklad *Trebouxiophyceae*). Napadlo by Vám, prečo pravdepodobne nedali vznik druhej línii suchozemských rastlín?

Je zrejmé, že pred tým, ako mohlo dôjsť ku kolonizácii súše rastlinami, muselo dôjsť k prechodu vodných rias na riasy schopné prežívať na súši. Prechodné riasy vtedy získali škálu geneticky podmienených adaptívnych mechanizmov, ktoré im umožňovali prežiť drsné podmienky terestrického prostredia a prekonať výzvy, nad ktorými ste sa zamýšľali v úlohe číslo 2. Znaky, ktoré potenciálne umožnili rastlinám kolonizovať súš, by mohlo byť možné odhaliť komparatívnou genomickou analýzou, ktorá by zahŕňala suchozemské rastliny (*Embryophyta*) a im fylogeneticky najpríbuznejšiu líniu.

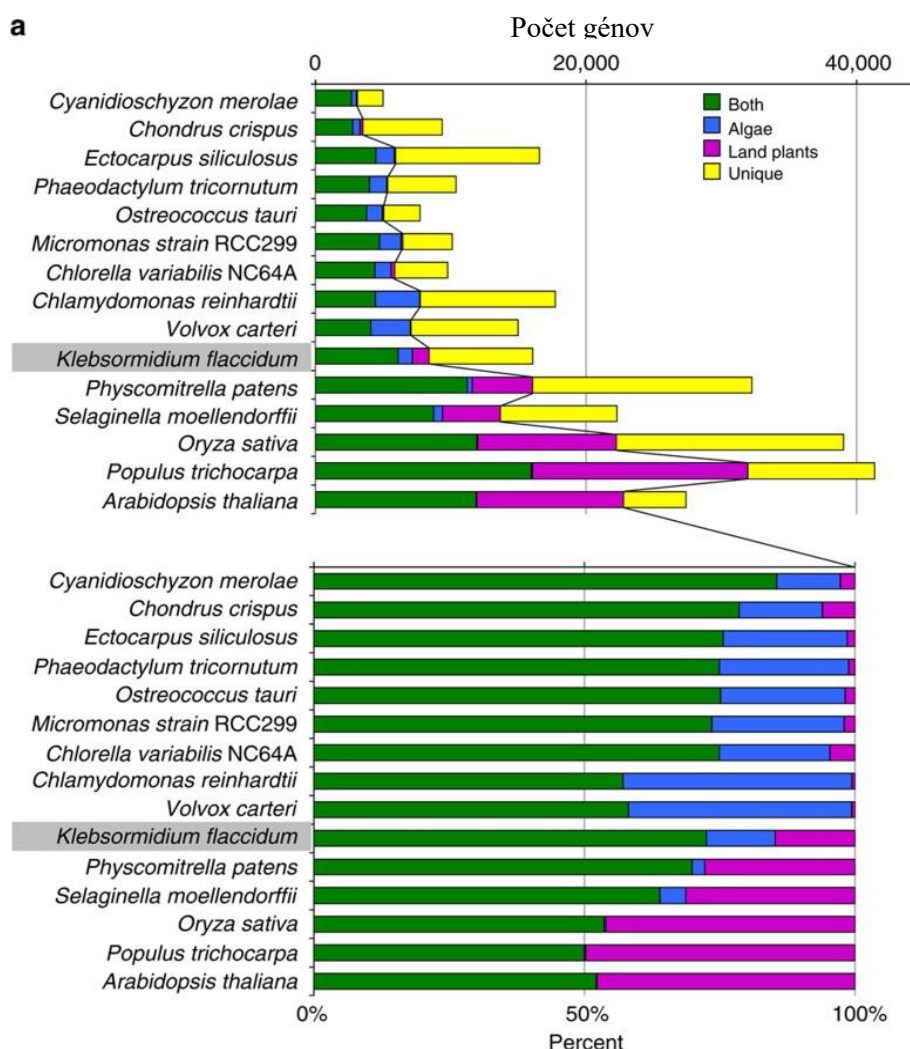
Úloha 4: Na základe fylogenetického stromu (Obrázok 3) zostaveného na základe analýzy 31 génov u 22 rôznych druhov označte správne tvrdenia:

- A. Fylogeneticky najbližšie príbuznou líniou k suchozemským rastlinám sú *Chlorophyta*
- B. *Populus trichocarpa* je si s *Arabidopsis thaliana* rovnako fylogeneticky príbuzný ako *Oryza sativa*
- C. *Volvox carteri* je si s *Arabidopsis thaliana* rovnako fylogeneticky príbuzný ako *Chlamydomonas reinhardtii*
- D. taxón *Charophyta* je monofyletický taxón



Obrázok 3: Prevzaté z Hori K, Maruyama F, Fujisawa T, et al. *Klebsormidium flaccidum* genome reveals primary factors for plant terrestrial adaptation. *Nat Commun.* 2014;5:3978. Published 2014 May 28. doi:10.1038/ncomms4978

Ukázalo sa, že niektoré druhy rodu *Klebsormidium* tolerujú terestrické stresory. To značí, že u predka *Klebsormidiales* sa vyvinuli zásadné mechanizmy, ktoré umožňujú prežitie v terestrických podmienkach. Po osekvenovaní genómu a fylogenetickej analýze, ktorej výsledky ste videli v úlohe číslo 4, boli porovnané proteín kódujúce gény u *Klebsormidium flaccidum* s génmi suchozemských rastlín (*Embryophyta*) a iných rias. Na Obrázku 4 vidíme grafické znázornenie výsledkov – zelená znázorňuje gény, ktoré sa vyskytujú u rias aj u suchozemských rastlín, modrá znázorňuje gény, ktoré sa vyskytujú predovšetkým u rias, fialová gény, ktoré sa vyskytujú predovšetkým u suchozemských rastlín a žltá znázorňuje unikátne gény. Analýza bola spracovaná v programe OrthoMCL. Horný graf znázorňuje počet jednotlivých génov, dolný graf znázorňuje podiel jednotlivých skupín, unikátne gény boli z tohto spracovania vylúčené.



Obrázok 4: Prevzaté a upravené z: Hori K, Maruyama F, Fujisawa T, et al. *Klebsormidium flaccidum* genome reveals primary factors for plant terrestrial adaptation. *Nat Commun.* 2014;5:3978. Published 2014 May 28. doi:10.1038/ncomms4978

Úloha 5: Na základe informácií v Obrázku 3 a Obrázku 4 vyberte druh v štúdiu, ktorý:

- A. má najväčší počet génov -
- B. nepatrí síce medzi suchozemské rastliny (*Embryophyta*), ale má najväčší počet suchozemských génov -
- C. patrí medzi suchozemské rastliny a má v porovnaní s ostatnými zástupcami v štúdiu relatívne menej unikátnych génov -

Autori štúdie ešte preukázali, že 90,7% domén z databázy Pham, ktoré sa bežne vyskytujú u suchozemských rastlín, sú zastúpené aj v genóme *Klebsormidium flaccidum*.

Úloha 6: Výsledky štúdie zobrazené v grafe 3 a 4 ukazujú, že *Klebsormidium flaccidum* je vhodný druh pre skúmanie mechanizmov, ktoré umožnili osídlenie súše, lebo:

- A. obsahuje pomerne málo unikátnych sekvencií
- B. je fylogeneticky najpríbuznejším druhom štúdie k suchozemským rastlinám
- C. v genóme má najmenší podiel riasových génov v štúdiu
- D. ani jedna z uvedených možností nie je správna

Následne sa autori štúdie rozhodli preskúmať gény potrebné pre život na súši. Mnohé z týchto génov sa podieľajú na regulácii transkripcie, prenose signálov, odpovedi na stres, syntéze bunkovej steny a funkciách spojených s hormónmi. Predovšetkým hormonálne signálne dráhy boli pravdepodobne zásadné pre evolúciu odpovedí na rôzne stresory u suchozemských rastlín. *K. flaccidum* vytvára aj niektoré rastlinné hormóny – kyselinu abscisovú, ktorá pravdepodobne bola kľúčovou molekulou v procese prechodu na súš, keďže je hlavnou signálnou molekulou potrebnou na adaptáciu na abiotické stresory. Syntetizujú sa aj hormóny auxín a cytokinín. *K. flaccidum* syntetizuje aj niektoré receptory a prenášače, v prípade auxínu sú to receptory *ABP1*, *GTG*, *CRE1* a *ETR* a transportéry *AUX* a *PIN*. Tieto prenášače pravdepodobne slúžia na transport auxínu vo vnútri bunky.

Štúdium *Klebsormidium flaccidum* nám tak ukázalo, že niektoré adaptácie na suchozemský život sa vyvinuli už u riasových predkov.

Z línie suchozemských rastlín ako prvé divergovali línie rožtekov, machov a pečeňoviek. Fosílie pečeňoviek sa v zázname objavujú skôr ako fosílie machov a rožtekov, a to by mohlo znamenať, že pečeňovky majú viac ancestrálnych znakov suchozemských rastlín ako machy a rožteky.

Pečeňovky sú monofyletická skupina, dominuje u nich gametofyt a je na ňom závislý sporofyt. Nemajú prieduchy. Do tohto taxónu patrí *Marchantia polymorpha*, je to zástupca jednoducho kultivovateľný v laboratórnych podmienkach, je možné ju geneticky modifikovať a je dobre prebádaná. Jej genóm bol osekvenovaný v roku 2017.



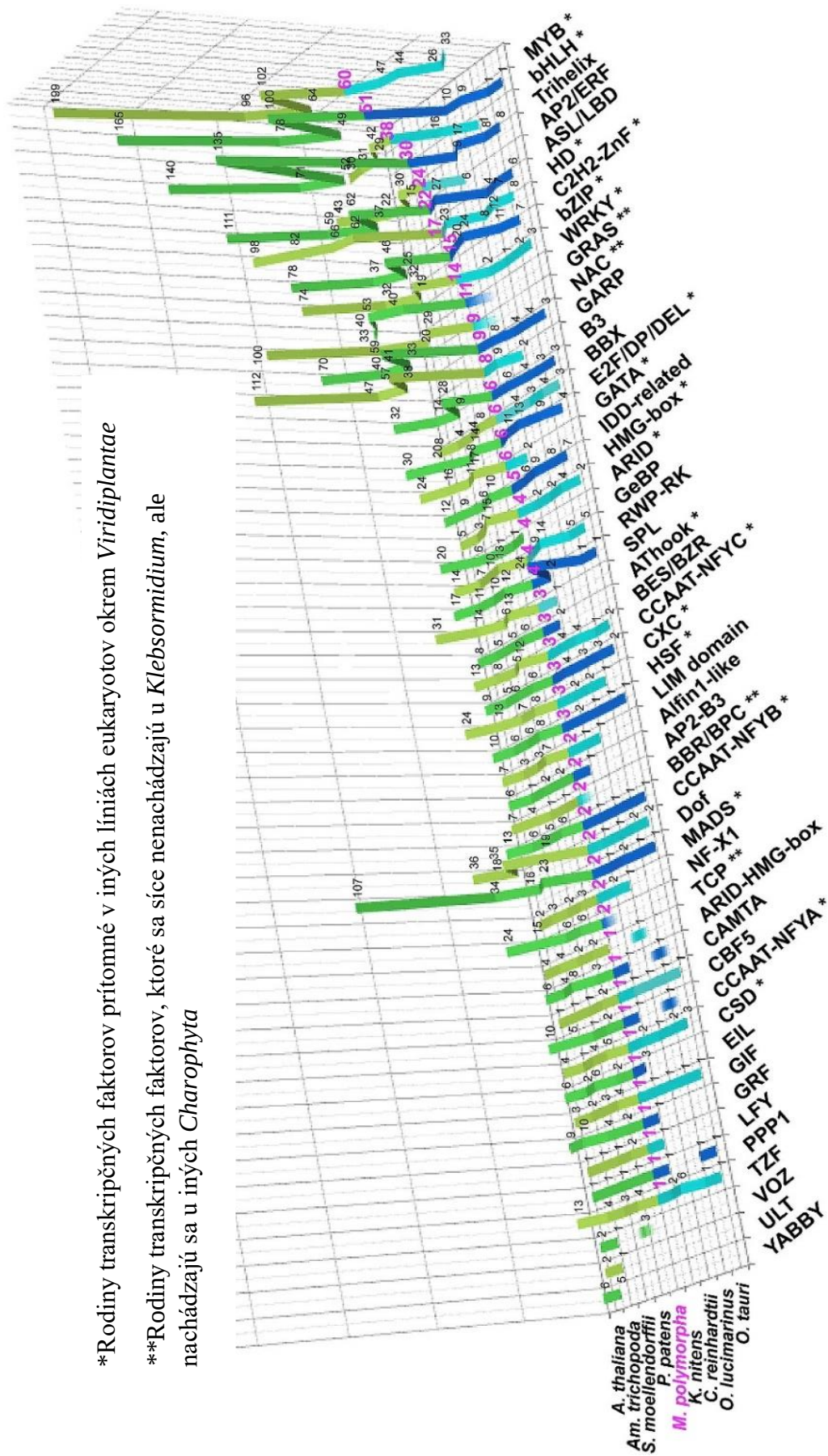
Úloha 7: Sekvenovanie genómu *Marchantia polymorpha* identifikovalo 394 génov pre transkripčné faktory, ktoré patria do 47 rodín transkripčných faktorov. Graf (Obrázok 5) znázorňuje počet transkripčných faktorov v jednotlivých rodinách transkripčných faktorov u 9 druhov, a to u zástupcov suchozemských rastlín – *Embryophyta* – *Arabidopsis thaliana*, *Amborella trichopoda*, *Selaginella moellendorffii*, *Physcomitrella patens*, *Marchantia polymorpha*, zástupcu charofytných rias *Klebsormidium nitens* a zástupcov *Chlorophyta* – *Ostreococcus lucimarinus* a *Ostreococcus tauri*. Všetky tieto skupiny patria do línie *Viridiplantae*.

Označte správne tvrdenia:

- A. iba rodina transkripčných faktorov GeBP sa vyvinula spolu so vznikom suchozemských rastlín
- B. v evolúcii suchozemských rastlín došlo skôr k diverzifikácii transkripčných faktorov v jednotlivých rodinách ako k vzniku nových rodín transkripčných faktorov
- C. transkripčné faktory rodiny B3 sa vyskytujú iba v línii *Viridiplantae*
- D. spomedzi génov kódujúcich transkripčné faktory v genóme *M. polymorpha* dominujú gény pre transkripčné faktory rodiny MYB

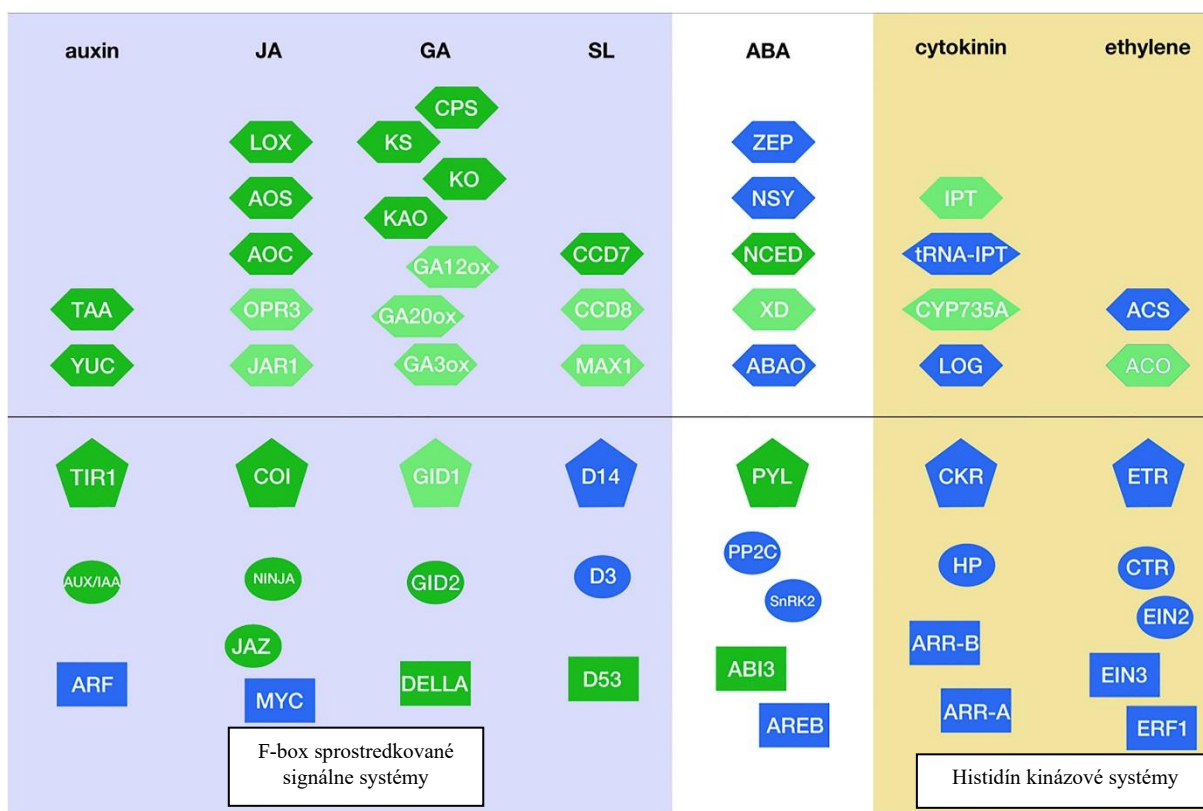
*Rodiny transkripčných faktorov prítomné v iných líniách eukaryotov okrem *Viridiplantae*

**Rodiny transkripčných faktorov, ktoré sa síce nenachádzajú u *Klebsormidium*, ale nachádzajú sa u iných *Charophyta*



Obrázok 5: Prevzaté a upravené z: John L. Bowman et al, Insights into Land Plant Evolution Garnered from the *Marchantia polymorpha* Genome, Cell, Volume 171, Issue 2, 2017, Pages 287-304.e15

Genóm *Marchantia polymorpha* zároveň kóduje síce minimálny, ale predsa úplný súbor signálnych molekúl, ktoré nachádzame u suchozemských rastlín – hormónové dráhy a receptor kinázové kaskády, čo znázorňuje Obrázok 6. Šesťuholníky značia biosyntetické enzýmy, päťuholníky značia receptory, ovály značia komponenty signálnej dráhy a obdĺžniky značia transkripčné faktory. Modrá farba značí prítomnosť u rias, zelená farba vznik spolu so suchozemskými rastlinami a bledo zelená farba značí vznik v línii suchozemských rastlín. (auxin – auxín, JA – kyselina jasmínová, GA – giberelíny, SL – strigolaktóny, ABA – kyselina abscisová, cytokinin – cytokinín, ethylene – etylén).



Obrázok 6: Prevzaté a upravené z: John L. Bowman et al, Insights into Land Plant Evolution Garnered from the *Marchantia polymorpha* Genome, Cell, Volume 171, Issue 2, 2017, Pages 287-304.e15

Úloha 8: Označte pravdivé tvrdenia:

- A. histidín kinázové systémy pravdepodobne vznikli v evolúcii až so vznikom suchozemských rastlín
- B. predkovia suchozemských rastlín neboli schopní syntetizovať kyselinu jasmínovú
- C. u *Klebsormidium* by sme pravdepodobne našli gén pre YUC
- D. giberelínová dráha sa kompletne vyvinula už spolu so vznikom suchozemských rastlín

Spolu s prechodom rastlín na súš sa vyvinula aj schopnosť syntetizovať lignín, terpény, kyselinu salicylovú. Zásadnú úlohu pri kolonizácii súše ale mali aj pozitívne interakcie rastlín s inými organizmami, konkrétne mykoríza.

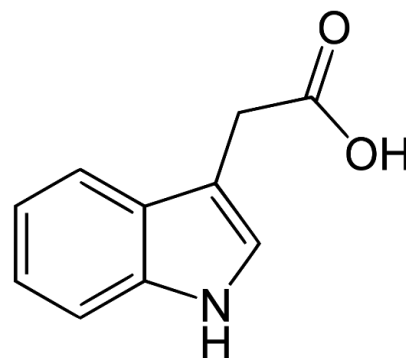
Úloha 9:

- a) Vysvetlite, čo je mykoríza a aký má význam pre suchozemské rastliny.
- b) Menujte aspoň dve ďalšie pre rastliny pozitívne interakcie s iným organizmom.

V nasledujúcej časti úlohy sa podrobnejšie zameriame na rastlinný hormón auxín. Zatiaľ ste sa dozvedeli, že aj keď bol auxín zrejme syntetizovaný už u riasových predkov suchozemských rastlín, evolúcia transkripčnej signálnej dráhy bola zásadná a zrejme umožnila morfológické rozrôznenie suchozemských rastlín.

Auxín je hlavná koordinačná signálna molekula v regulácii rastlinného vývinu. Jeho funkcia býva závislá na nerovnomernom rozdelení v rastlinných pletivách, čo o chvíľu uvidíte v procese embryogenézy.

Najprv sa však spoločne oboznámime s konceptom polárneho transportu auxínu. Auxín je jediný rastlinný hormón, ktorý je transportovaný polárne.



Úloha 10: Auxín je slabá kyselina, a to znamená, že jeho disociácia na ióny je rovnovážna reakcia, ktorú schématicky môžeme zapísať ako:

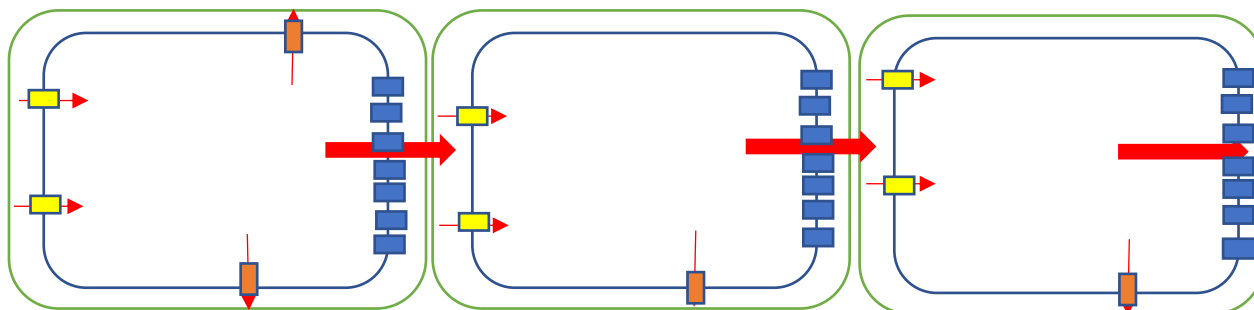


Ióny nedokážu pasívne prechádzať plazmatickou membránou, avšak v nedisociovej forme dokáže auxín prechádzať membránou. pH bunkovej steny je 5,5 a pH cytosolu je 7,2. Rozhodnite, kde bude auxín skôr v nedisociovej forme a či bude pasívne skôr vchádzať alebo vychádzať z rastlinnej bunky. Pomôcka: čím nižšie je pH, tým vyššia je koncentrácia H^+ iónov v prostredí.

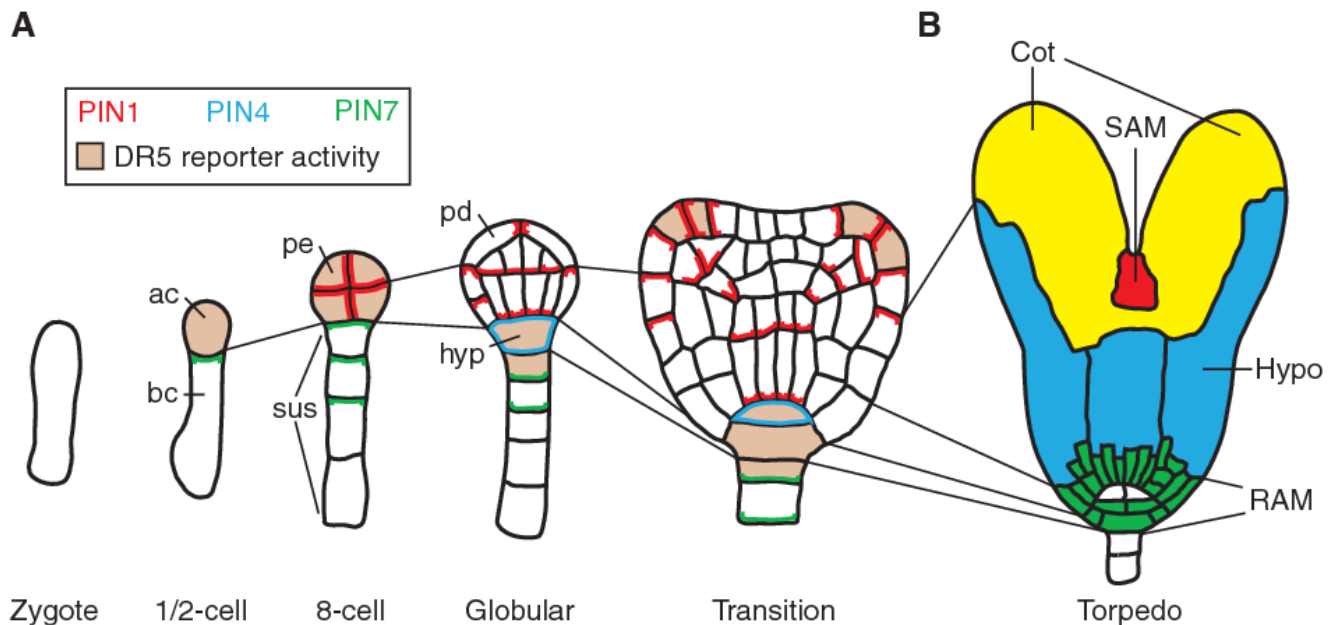
Odpoveď: Auxín bude v skôr NEDISOCIOVANEJ FORME v **cytosole/bunkovej stene** a pasívne tak preto bude skôr **vchádzať do/vychádzať z** bunky.

Na transporte sa však zúčastňujú aj transportné proteíny:

AUX1 proteíny (na obrázku žlté obdĺžniky) sú transportéry, ktoré umožňujú tok auxínu do bunky, PIN prenášače (na obrázku modré obdĺžniky) umožňujú tok auxínu z bunky, odtok posilňujú aj ABCB prenášače (oranžové obdĺžniky). Práve PIN transportéry sa často nachádzajú iba na jednej strane plazmatickej membrány – auxín bunku opúšťa iba jedným smerom a jeho tok je tak usmernený. Tok auxínu je naznačený šípkami.



Úloha 11: Na základe umiestnenia PIN prenášačov v embryu označte správne tvrdenia, ktoré sa týkajú toku auxínu v rôznych fázach embryogenézy *Arabidopsis thaliana*.



Vysvetlivky: ac – apikálna bunka, bc – bazálna bunka, sus – suspenzor, pe – proembryo, pd – protoderm, hyp – hypofýza, cot – kľúčny list, hypo – hypokotyl, RAM – apikálny meristém koreňa, SAM – apikálny meristém výhonku

DR5 je promotor, ktorý odpovedá na auxín

Veľmi doporučujem si tok auxínu zakresliť do obrázku!

- A. v dvoj bunkovej fáze auxín tečie z apikálnej bunky do bazálnej bunky
- B. v 8bunkovom štádiu embrya je auxín v embryu mimo suspenzor ešte rozmiestnený rovnomerne, nevytvára maximá
- C. v globulárnom štádiu auxín už začína vytvárať maximá, a to v miestach, kde sa neskôr vyvinú apikálne meristémy výhonku a koreňa
- D. v prechodnom štádiu (v obrázku transition) auxín tečie smerom z koreňa do kľúčnych listov

Počas vývinu sa tok auxínu ďalej zachováva.

Autor: Oliver Pitoňak

Recenzia: Bc. Lukáš Jánošík