

Přírodovědecká fakulta Jihočeské univerzity



Diplomová práce:

DESICCATION TOLERANCE OF *SPHAGNUM*: A PUZZLE SOLVED

Bc. Eliška Vicherová

2012

Vedoucí práce: RNDr. Tomáš Hájek, Ph.D.

Vicherová E. (2012) Desiccation tolerance of *Sphagnum*: A puzzle solved. Mgr. Thesis, in English – 33 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Annotation: Desiccation tolerance of *Sphagnum* species (mature shoots and protonemata) was studied in detail. Their ability to harden (e.g. induce desiccation tolerance) was tested in field and laboratory experiments focusing on the effect of slow drying, abscisic acid and cold and freezing temperatures.

Prohlašuji, že svoji diplomovou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své diplomové práce, a to v úpravě vzniklé vypuštěním vyznačených částí archivovaných Přírodovědeckou fakultou elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 14. 12. 2012

.....

Ráda bych poděkovala svému školiteli, Tomáši Hájkovi, za trpělivost, přátelský přístup a stálou a obětavou pomoc. Honzovi Kučerovi, Táně Štechové, studentům z naší pracovny a ostatním bryologům a botanikům na naší katedře děkuji za příjemné prostředí v průběhu celého studia. Blance Shaw za mnoho užitečných rad a za poslání nedostupných článků, Janu Lepšovi a Petru Šmilauerovi za rady při statistickém zpracování dat. Můj velký dík patří rovněž mé rodině za podporu a zázemí

1. Obecný úvod do tolerance rostlin k vysychání

1.1 Vývoj tolerance k vysychání

Při výstupu na souš, zhruba před 480 miliony let (Kenrick and Crane 1997), se rostliny musely adaptovat na nestálý vodní režim, velké teplotní výkyvy a zvýšenou radiaci, která zvláště v kombinaci s výše zmíněnými stresovými faktory vede k poškození fotosyntetického aparátu a případně dalších buněčných kompartmentů (Nishiyama et al. 2006). Srovnáním fylogeneze vyšších rostlin se schopností jednotlivých skupin tolerovat vysychání (Oliver 2000) lze předpokládat, že nejprimitivnější suchozemské vyšší rostliny byly ještě před fylogenetickým oddělením mechorostů schopny tolerovat vysychání. S vývojem cévních svazků však přestalo být udržování mechanismu tolerance energeticky výhodné a u cévnatých rostlin tak byla tolerance k vysušení v průběhu evoluce ztracena.

Narozdíl od cévnatých rostlin, mechorosty ve svém vývoji sledovaly odlišnou strategii. Jejich příjem vody je vázán na celý povrch stélek. Udržení turgoru, růst a metabolismus buněk je tak přímo spojen s vlhkostí okolního prostředí. To s sebou přináší velká rizika, neboť voda v buňkách má důležitou strukturní funkci. Kromě fyziologických procesů udržuje strukturu a funkci proteinů a dalších polárních makromolekul, integritu biomembrán (Steponkus et al. 1993; Wolfe and Bryant 1999) a omezuje vznik kyslíkových radikálů, jež ve zvýšené míře vznikají při nefunkčním metabolismu. Udržení či vylepšení tolerance k vysychání tak bylo pro mechorosty evolučně nesmírně důležité a vývoj tolerance pravděpodobně souvisel s dostupností vody na daných stanovištích (Wood 2005).

V současné době jsou u mechorostů známy dva odlišné mechanismy, na jejichž základě jsou druhy schopny přežít vysychání: (i) trvalá ochrana buněk (*constitutive cellular protection*) spojená s rychlou opravou při rehydrataci (Wood & Oliver 2004; Oliver et al. 2009), (ii) indukovaná ochrana (*inducible desiccation tolerance*), kterou si buňky vytvoří v až průběhu vysychání, je-li dostatečně pomalé (Werner 1991; Wang et al. 2009).

1.2 Konstitutivní tolerance k vysychání

Mechanismus konstitutivní tolerance byl podrobně zkoumán u xerofytního mechu *Syntrichia* (= *Tortula*) *ruralis*, je však pravděpodobné, že stejný druh tolerance má i většina ostatních mechorostů tolerujících velké vysušení (ekvivalent 30% relativní vzdušné vlhkosti či méně; Wood 2007). Jedná se o druhy obývající extrémně suchá stanoviště, tedy osluněné skály –

epilitické rody řádů Andreales (*Andrea*), Encalyptales (*Encalypta*), Pottiales (*Syntrichia*, *Tortula*, *Didymodon*), Grimmiales (*Grimia*, *Racomitrium*, *Schistidium*), Hedwigiales (*Hedwigia*) či suché borky stromů – epifitické rody Orthotrichales (*Orthotrichum*, *Ulota*), Hypnales (*Neckera*, *Leucodon*) (Proctor and Pence 2002; Wood 2007).

Vysychání a tedy i ztráta metabolické aktivity má na takto extrémních stanovištích velmi rychlý průběh a buňky tedy nemají v průběhu vysychání možnost syntézy žádných obranných mechanismů, jež by jim umožnily přežít (Oliver 1991). Konstitutivní ochrana tak spočívá v udržení stálé hladiny makromolekul, jež jsou nezbytné pro přežití ztrát téměř veškeré volné vody (voda, která není pevně vázána s makromolekulami) a v aktivním rychlém procesu obnovy buněk při navlhčení.

Jedněmi ze strukturních molekul chránících buňky při vysychání jsou dehydriny, podtřída LEA proteinů (*Late Embriogenesis Abundant proteins*; Bewley et al. 1993). Díky své schopnosti vázat se s polárními molekulami hrají pravděpodobně důležitou roli při stabilizaci membrán a udržují strukturu a funkci proteinů (Campbell and Close 1997; Allagulova et al. 2003). Mimo dehydriny a další skupiny LEA proteinů udržují buňky tolerantních mechorostů stálou hladinu cukrů, především sacharózy (10% sušiny u mechu *Syntrichia ruralis*; Bewley et al. 1978), jež je důležitou složkou při formování tzv. „biologického skla“, které chrání strukturu buněčných membrán při jejich vysychání a rehydrataci. Mimoto je v buňkách přítomna stálá zásoba antioxidantů (Seel et al. 1992), vychytávajících kyslíkové radikály, jež ve zvýšené míře vznikají v průběhu vysychání díky nefunkčním metabolickým procesům a mohou vážně poškodit nukleové kyseliny či další buněčné makromolekuly.

Rychlá obnova buněk při navlhčení je umožněna díky stálé zásobě molekul m-RNA (Oliver 2005). V průběhu vysušení jsou ribonukleové kyseliny chráněny asociací s proteiny – mRNPs (*messenger ribonucleoprotein particles*; Wood and Oliver 1999). Při navlhčení tak dochází k okamžité translaci proteinů (sloužících hlavně při obnově membránových struktur a metabolismu; Oliver et al. 2004) a buňky jsou tak uchráněny od dalšího poškození hrozící při nekontrolované rehydrataci.

Výše popsaný mechanismus konstitutivní tolerance k vysychání je v současné době nejúčinnějším známým prostředkem tolerance vodního stresu u vyšších rostlin a mechorosty jež investovaly do jeho tvorby přežívají nejen extrémní ale i dlouhé vysušení po dobu několika let (*Syntrichia ruralis*, Maheu 1922; *Grimia laevigata*, Keever 1957) či několika desítek let (*Riccia macrocarpa*, Breuil-Sée 1993).

1.3 Indukovaná tolerance k vysychání

Udržení stálé hladiny metabolitů potřebných pro ochranu buněk proti vysychání je energeticky náročný proces (Proctor et al. 2007). Řada druhů mechorostů z mezických (*Aulacomnium androgynum*, *Physcomitrella patens*) i poměrně xerických stanovišť (játrovka *Exormothea holstii*, mech *Funaria hygrometrica*) proto zvolila alternativní způsob, jak přežít vysychání. Spočívá ve spuštění procesů buněčné ochrany až při prvních ztrátách buněčné vody, kdy dochází především k transkripci a následné translaci specifických stresových genů (proces je částečně řízen kyselinou abscisovou) a syntéze sacharidů (Bianchi et al. 1991; Wang et al. 2009). Vzhledem k časové náročnosti všech procesů nemají druhy s touto tolerancí schopnost přežít náhlé rychlé vysušení (Hellwege et al. 1994; Werner 1991). Při dostatečně pomalém vysychání jsou však schopny tolerovat podobné ztráty vodního potenciálu jako druhy s konstitutivní tolerancí (Frank et al. 2005; Wood 2007).

Molekulární mechanismus indukované tolerance se zdá být stejný či velmi podobný toleranci cévnatých rostlin nazývaných *resurrection plants* (Khandelwal et al. 2010). Na počátku vysychání dochází k expresi „stresových“ genů (*stres responsive genes*), jež je následován syntézou odpovídajících proteinů a to hlavně z energetických a metabolických procesů (Wang et al. 2009). Exprese je z velké části řízena kyselinou abscisovou (ABA), jejíž koncentrace se zvyšuje v počátečních fázích dehydratace. Samotná kyselina abscisová indukuje syntézu přibližně poloviny „stresových“ proteinů vznikajících při dehydrataci (Wang et al. 2012) a je sama o sobě schopná indukovat buňkám toleranci k vysychání (Werner 1991; Koster et al. 2010). Jednou ze skupin indukovaných stresových proteinů jsou dehydriny a další LEA proteiny (převážně skupina LEA 3 proteinů; Cuming et al. 2007). Jak již bylo zmíněno u mechů s konstitutivní tolerancí k vysychání, mají tyto proteiny společně s cukry důležitou roli v ochraně proteinů a dalších polárních makromolekul a udržení integrity membrán. Zvýšená tvorba cukrů byla zaznamenána na příkladu mechu *Physcomitrella patens*, jež v průběhu vysychání zvýšil obsah sacharózy v buňkách ze 4% na 20% (Oldenhof et al. 2006).

Předpokládá se, že přežití prvních vyšších rostlin na zemském povrchu bylo umožněno právě díky indukované toleranci k vysychání. Proto druhy mechů a játrovek, jež v průběhu evoluce nezískaly ještě „účinnější“ mechanismus konstitutivní tolerance by měly být vybaveni indukovanou tolerancí a být tak schopni přežít pomalé vysychání. Zdá se však, že některé druhy vlhkého prostředí tuto schopnost téměř či úplně postrádají (Abel 1956) a je tedy možné, že podobně jako cévnaté rostliny indukovanou toleranci v průběhu evoluce ztratily. Vhodným příkladem k této úvaze jsou rašeliníky (rod *Sphagnum*). Tento rod investoval do tvorby

zvláštních buněčných struktur – hyalocytů, mrtvých buněk schopných zadržet velké množství vody (několikanásobek suché váhy lodyžky). S jejich pomocí se tak vyhýbá vyschnutí a je pravděpodobné, že právě díky této strategii se postupně stal jedním z rodů nejméně tolerantních k vysychání (Abel 1956; Green 1968; Clymo 1973).

Údaje o schopnosti rašeliníků tolerovat ztráty vody se však značně liší. Zatímco v některých pracích nepřežily ani pomalé vysychání za velkých relativních vzdušných vlhkostí (Abel 1956; Clymo 1973), jiné údaje uvádí jejich schopnost přežít i poměrně velké ztráty vody (ekvivalent 60% či dokonce 30% relativní vzdušné vlhkosti; Sagot and Rochefort 1996). Schopnost rašeliníků přežít vysychání je tak stále nedořešeným tématem.

Předložená práce si klade za cíl objasnění tolerance k vysychání druhů rodu *Sphagnum*, jednoho z ekologicky i kulturně nejvýznamnějších rodů mechorostů.

1.4. Seznam citované literatury

- Abel W. O. (1956): Die Austrocknungsresistenz der Laubmoose. – Österreichische Akademie der Wissenschaften, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Klasse, Sitzungsberichte, Abteilung I (Biologie) 165: 619–707.
- Allagulova C. R., Gimalov F. R., Shakirova F. M. (2003): The plant dehydrins: structure and putative functions. – *Biochemistry* 68: 945–9
- Bewley J. D., Halmer P., Krochko J. E., Winner W. E. (1978): Metabolism of a drought-tolerant and a drought-sensitive moss: respiration, ATP synthesis and carbohydrate status. In J. H. Crowe J. H., Clegg J. S. (eds.), *Dry Biological Systems*. Academic Press. New York. pp. 185–203.
- Bewley J. D., Reynolds T. L., and Oliver M. J. (1993): Evolving strategies in the adaptation to desiccation. In Close T. J., Bray E. (eds). *Response of plants to cellular dehydration during environmental stress*. American Society for Plant Physiology. Rockville. pp. 193–201.
- Bianchi, G., Gamba A., Murelli C., Salamini F., Bartels D. (1991): Novel carbohydrate metabolism in the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*. – *Plant Journal* 1: 355–359.
- Breuil-Sée A. (1993): Recorded desiccation-survival times in bryophytes. – *Journal of Bryology* 17: 679–680.
- Campbell S. A., Close T. J. (1997): Dehydrins: genes, proteins, and associations with phenotypic traits. – *New Phytologist* 37: 61–74.
- Clymo R. S. (1973): The growth of *Sphagnum*: some effects of environment. – *The Journal of Ecology* 61: 849–869.
- Cuming A.C., Cho S.H., Kamisugi Y., Graham H., Quatrano R.S. (2007): Microarray analysis of transcriptional responses to abscisic acid and osmotic, salt, and drought stress in the moss *Physcomitrella patens*. – *New Phytologist* 176: 275–287.

- Frank W., Ratnadewi D., Reski, R. (2005): *Physcomitrella patens* is highly tolerant against drought, salt and osmotic stress. – *Planta* 220: 384–394.
- Green B.H. (1968): Factors influencing the spatial and temporal distribution of *Sphagnum imbricatum* Hornsch. ex Russ. in the British. – *The Journal of Ecology* (56): 47–58.
- Hellwege E. M., Dietz K. J., Volk O. H., Wolfram Hartung W. (1994): Abscisic acid and the induction of desiccation tolerance in the extremely xerophilic liverwort *Exormotheca holstii*. – *Planta* 194: 525–531.
- Keever C. (1957): Establishment of *Grimmia laevigata* on bare granite. – *Ecology* 38: 422–429.
- Kenrick R., Crane P. R. (1997): The origin and early evolution of plants on land. – *Nature* 389: 33–39.
- Khandelwal A., Cho S.H., Marella H., Sakata Y., Perroud P.F., Pan A., Quatrano R.S. (2010): Role of ABA and ABI3 in desiccation tolerance. – *Science* 327: 546.
- Koster, K.L., Balsamo, R.A., Espinoza, C., Oliver, M.J. (2010) : Desiccation sensitivity and tolerance in the moss *Physcomitrella patens*: assessing limits and damage. – *Plant Growth and Regulation* 62: 293–302.
- Maheu J. (1922): Régénération du *Barbula ruralis* après quatorze ans de sécheresse par protonémas foliaires primaires propagulifères et protonémas secondaires bulbigènes. – *Bulletin de la Société Botanique de France* 69: 330–334.
- Nishiyama Y., Allakhverdiev S. I., Murata N. (2006): A new paradigm for the action of reactive oxygen species in the photoinhibition of photosystem II. – *Biochimica et Biophysica Acta* 1757: 742–749.
- Oldenhof H., Wolkers W.F., Bowman J. L., Tablin F., Crowe J. H. (2006): Freezing and desiccation tolerance in the moss *Physcomitrella patens*: An in situ Fourier transform infrared spectroscopic study. – *Biochimica et Biophysica Acta* 1760: 1226–1234.
- Oliver, M. J. (1991): Influence of protoplasmic water loss on the control of protein synthesis in the desiccation-tolerant moss *Tortula ruralis*: Ramifications for a repair-based mechanism of desiccation tolerance. – *Plant Physiology* 97: 1501–1511.
- Oliver M. J., Dowd S. E., Zaragoza J., Mauget S. A., Payton P. R. (2004): The rehydration transcriptome of the desiccation-tolerant bryophyte *Tortula ruralis*: transcript classification and analysis. – *BMC Genomics* 5: 89–108.
- Oliver M. J., Hudgeon J., Scot E. Dowd S. E., Payton P. R. (2009): A combined subtractive suppression hybridization and expression profiling strategy to identify novel desiccation response transcripts from *Tortula ruralis* gametophytes. – *Physiologia Plantarum* 136: 437–460.
- Oliver M. J., Tuba Z., Mishler B. D. (2000): The evolution of desiccation tolerance in land plants. – *Plant Ecology* 151: 85–100.
- Proctor M. C. F., Oliver M. J., Wood A. J., Alpert P., Stark L. R., Cleavitt N. L., Mishler B. D. (2007): Desiccation-tolerance in bryophytes: a review. – *The Bryologist* 110: 595–621.
- Proctor M. C. F., Pence V. C. (2002): Vegetative tissues: bryophytes, vascular resurrection plants and vegetative propagules. In Black M., Pritchard H. W. (eds). *Desiccation and survival in plants: Drying without dying*. CAB International. New York. pp. 207–273.

- Ruffing N. A., Steponkus P. L., Pitt R. E., Parks J. E. (1993): Osmometric behavior, hydraulic conductivity and incidence of intracellular ice formation in bovine oocytes at different developmental stages. – *Cryobiology* 30: 562–580.
- Sagot C., Rochefort L., (1996): Tolérance des sphaignes à la dessiccation. – *Cryptogamie, Bryologie et Lichénologie* 17: 171–183
- Seel, W. E., Hendry G. A. F., Lee J. A. (1992): Effects of desiccation on some activated oxygen processing enzymes and antioxidants in mosses. – *Journal of Experimental Botany* 43: 1031–1037.
- Wang, X.Q., Yang, P.F., Liu, Z., Liu W.Z., Hu Y., Chen H., et al. (2009): Exploring the mechanism of *Physcomitrella patens* desiccation tolerance through a proteomic strategy. – *Plant Physiology* 149: 1739–1750.
- Wang X., Liu Y., Yang P. (2012): Proteomic studies of the abiotic stresses response in model moss—*Physcomitrella patens*. – *Frontiers in Plant Sciences* 3: 258–265.
- Werner O., Espin R. M. R., Bopp M., and Atzorn R. (1991): Abscisic-acid-induced drought tolerance in *Funaria hygrometrica* Hedw. – *Planta* 186: 99–103.
- Wolfe J., Bryant G. (1999): Freezing drying and/or vitrification of membrane-solute-water systems. – *Cryobiology* 39: 103–129.
- Wood A. J., & M. J. Oliver. (1999): Translational control in plant stress: The formation of messenger ribonucleoprotein particles (mRNPs) in response to desiccation of *Tortula ruralis* gametophytes. *Plant Journal* 18: 359–370.
- Wood A. J., Oliver M. J. (2004): Molecular biology and genomics of the desiccation-tolerant moss *Tortula ruralis*. In Wood A. J., Oliver M. J., Cove D. J. (eds.), *New Frontiers in Bryology: Physiology, Molecular Biology and Functional Genomics*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Boston, London. pp. 71–90.
- Wood, A. J. (2005): Eco-physiological adaptations to limited water environments. In Haegawa P. M., Jenks M. A. (eds.), *Plant Abiotic Stress*. Blackwell Press, Oxford, U.K. pp. 1–13.
- Wood, A. J. (2007): The nature and distribution of vegetative desiccation-tolerance in hornworts, liverworts and mosses. – *The Bryologist* 110: 163–177.

2. Rukopis článku

Desiccation tolerance of *Sphagnum*: A puzzle solved

Eliška Vicherová¹, Tomáš Hájek^{1,2}

¹University of South Bohemia, Faculty of Science, České Budějovice, Czech Republic

²Institute of Botany AS CR, Třeboň, Czech Republic

Abstract

As ecosystem engineers, mosses of genus *Sphagnum* control their surroundings through water retention, acidification and peat accumulation. Due to the water retention that avoids desiccation, *Sphagnum* mosses are generally intolerant to severe drought stress. Yet, there are several studies reporting opposite findings. Anyway, the mechanism of desiccation tolerance (DT) of *Sphagnum* has not been studied in detail; however, the contrasting literature result indicate that the DT may be inducible.

To solve the puzzle of *Sphagnum* desiccation tolerance (DT), we have acclimated (hardened) a variety of *Sphagnum* species and other mesic bryophytes to drought by (i) controlled drying in high relative air humidity (RH), (ii) extracellular addition of abscisic acid (ABA), and (iii) cultivation in cold or mild freezing temperatures. Moreover, we surveyed seasonal changes in bryophytes acclimation to severe desiccation in a bog.

Our results show that *Sphagnum* shoots are able to induce DT (e.g. harden to drought stress) by all treatments apart from cold acclimation. Once hardened, they survive severe desiccation as well as other bryophytes tested. Since ABA caused similar effect as drying in high RH, the mechanism behind hardening is probably related to “resurrection” vascular plants and some bryophytes.

Species from dry hollows and lawns remain hardened almost for the whole growing season while hummock forming spagna and species from permanently wet pools hardened only in autumn, probably due to freezing nights temperature.

Species from wet habitats are more susceptible to rapid desiccation due to lose shoot morphology (section Cuspidata). As a trade of, they are able to induce better DT than species avoiding desiccation by forming compact hummocks (Acutifolia). As a result, the ability to induce DT is a process of adaptation that coevolved with *Sphagnum* morphology and water availability.

Surprisingly, *Sphagnum* protonemata were not able to induce DT by any hardening treatment. We expect this may be the limitation for establishment of *Sphagnum* in rich fens, where the humid microhabitats are unsuitable due to water chemistry while the moss hummocks are too dry for *Sphagnum* establishment. Therefore, we assume drought extremes limit sphagnum expansion and thus slow down the natural succession from rich to poor fens, maintaing the species diversity.

NÁLEŽITOSTI PRO PREZENTACI PUBLIKACE VE STAGU

Bibliografické údaje:

Vicherová E. (2012) Desiccation tolerance of Sphagnum: A puzzle solved. Mgr. Thesis, in English, – 33 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Stav publikace v procesu vedoucím k publikaci:

Publikace bude odeslána do vědeckého časopisu během jednoho měsíce.

Prohlášení studenta o podílu na publikaci:

Na publikaci jsem se podílela přibližně z 60 %. Měla jsem hlavní podíl na sběru dat v terénu a provedení experimentů v laboratoři a práci jsem za pomoci školitele a zároveň spoluautora článku napsala.