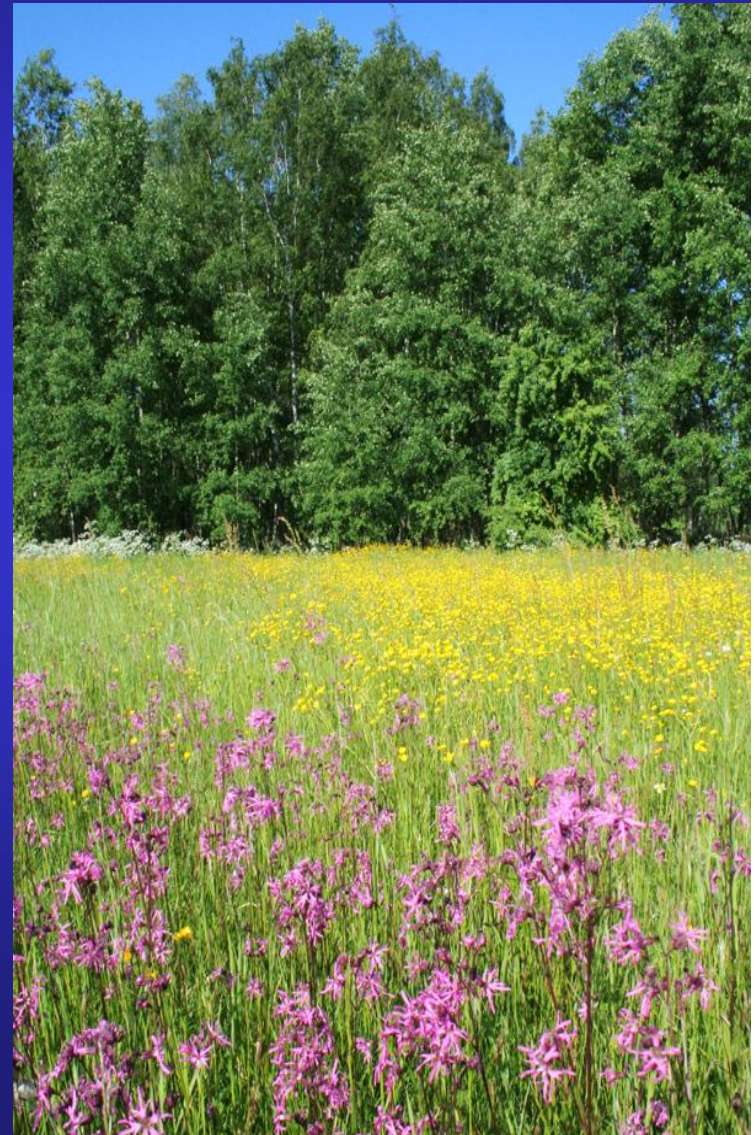


2) Reprodukce rostlin

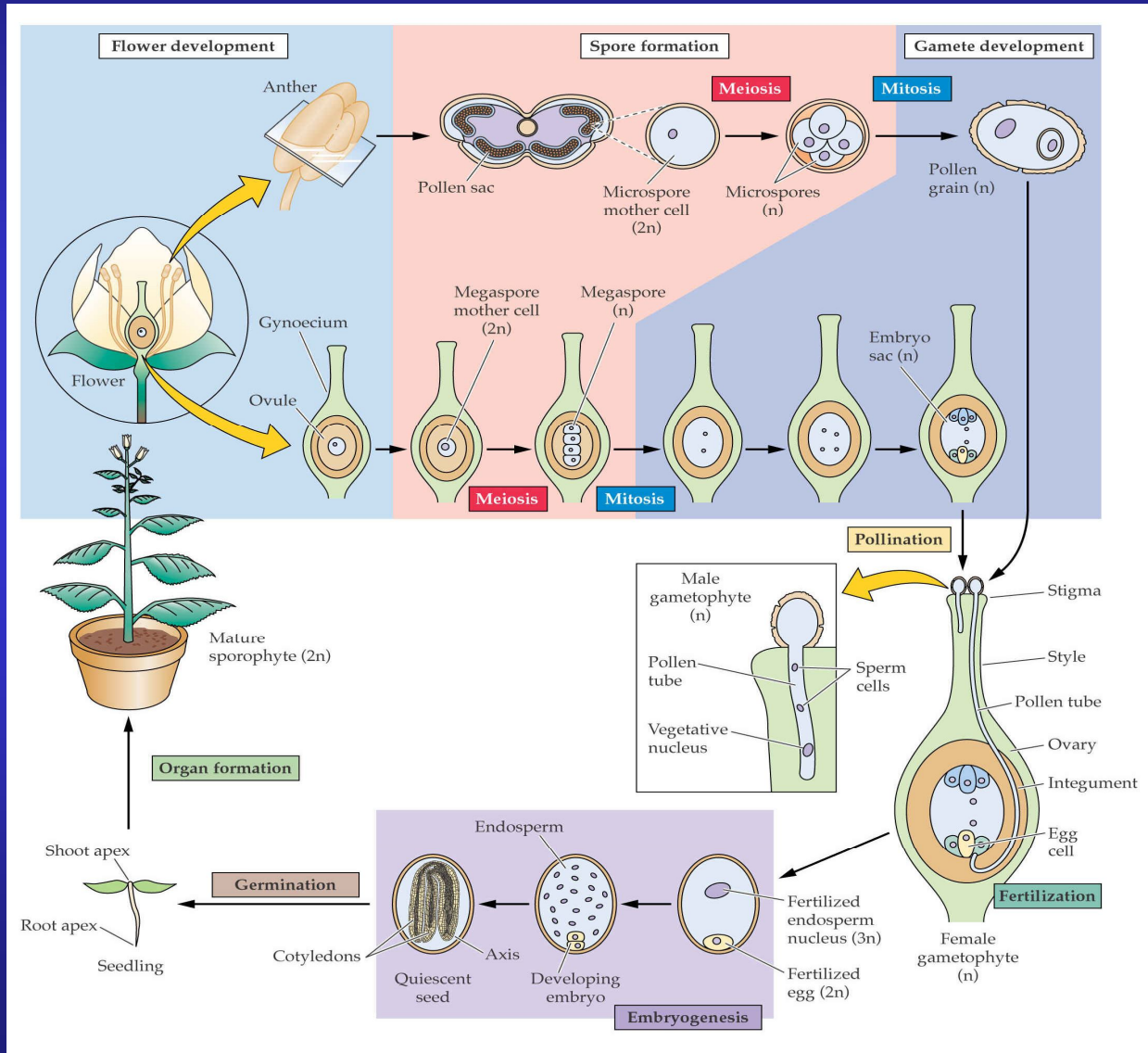
a) Indukce kvetení

b) Vývoj květu - stručná morfologie

c) Genetická a molekulární analýza
vývoje květu



Životní cyklus rostliny



a) Indukce kvetení

Indukce kvetení – přeprogramování vegetativních meristémů:
místo sekundárních výhonků se tvoří květní orgány

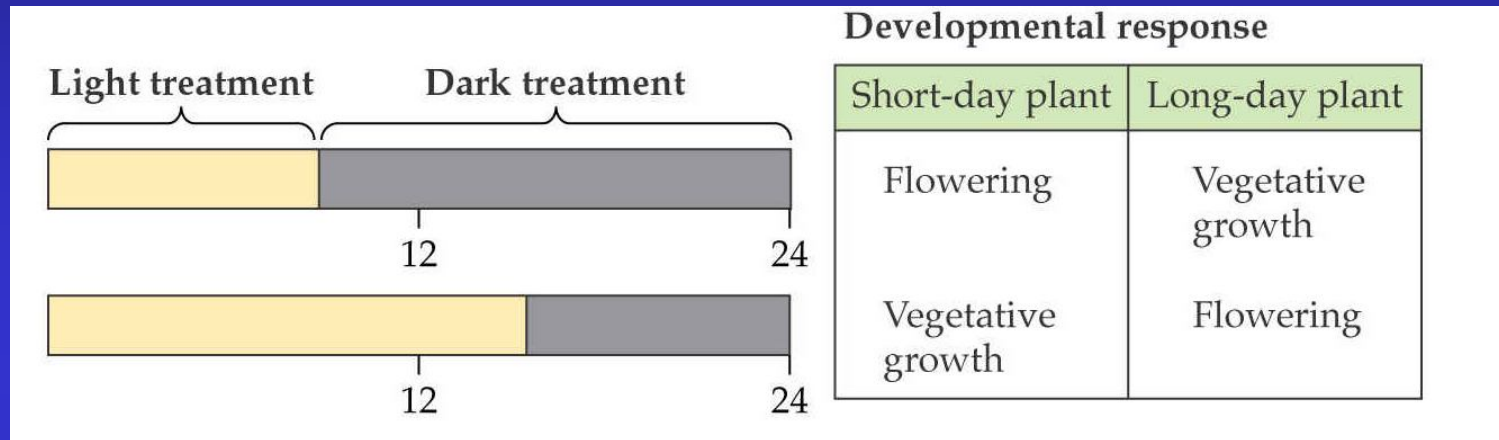
Schopnost rostlin přepnout vývoj vegetativní na reprodukční ukazuje důležitý vývojový rozdíl mezi rostlinami a živočichy.

Rostlina tímto přepnutím nastartuje svoje stárnutí a smrt

Přeprogramování musí být přesně načasováno



Kvetení je indukováno fotoperiodou = poměrem mezi délkou dne a noci

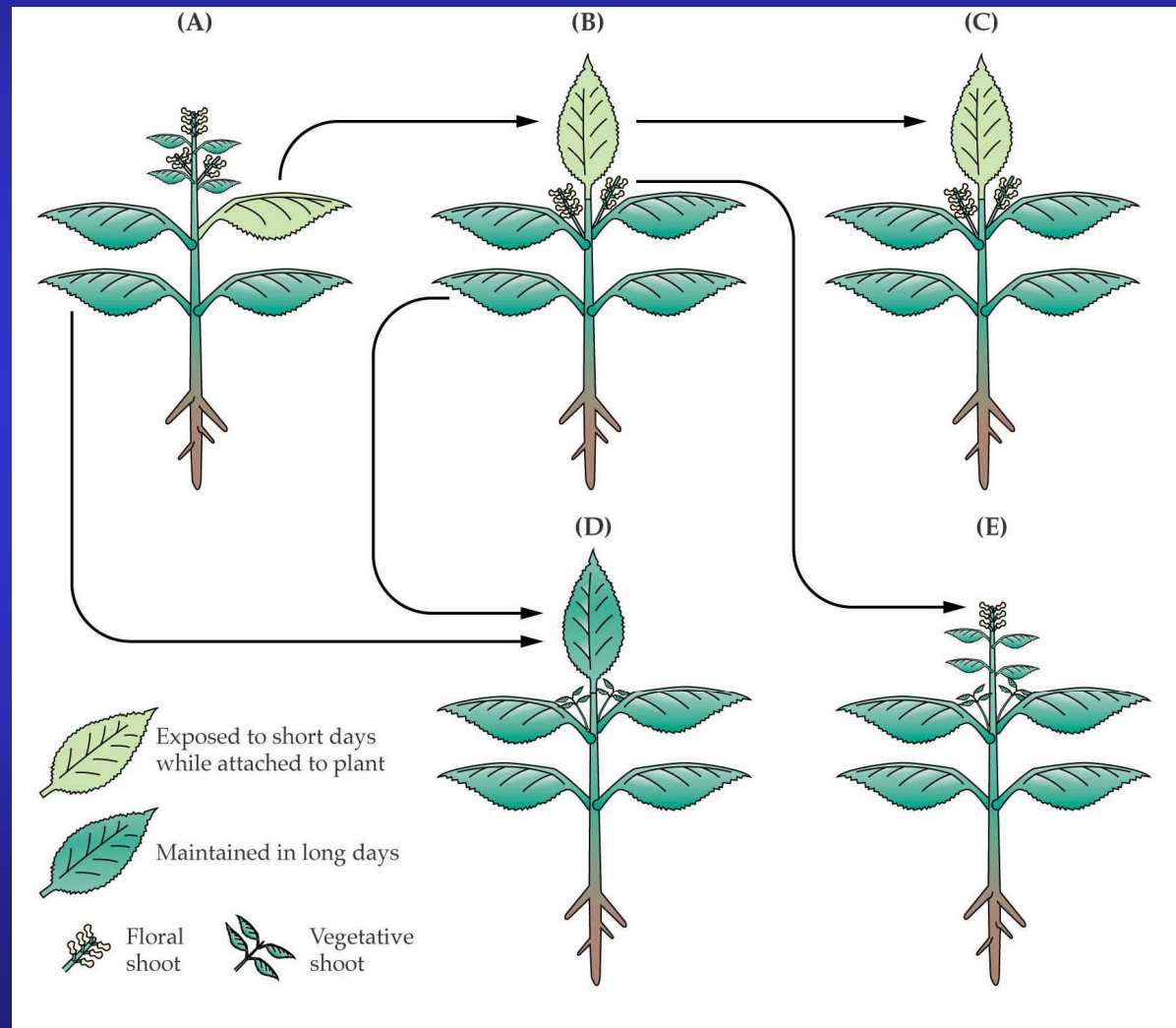


Krátkodenní rostliny – kvetení je indukováno krátkým dnem a dlouhou nocí (např. chryzantémy, odrůdy jahod, špenát)

Dlouhodenní rostliny – kvetení je indukováno dlouhým dnem a krátkou nocí (např. pšenice, *Arabidopsis*)

Neutrální rostliny – kvetení není indukováno fotoperiodou (např. rajče)

List - vnímá fotoperiodický signál indukující přechod rostlin do fáze kvetení



Fytochromy = fotosensitivní pigmenty v cytoplazmě – absorbují červené světlo; jsou zapojeny v indukci kvetení, klíčení a ve vnímání fotoperiody.

Fytochromy jsou kódovány pěti geny: *PHYA*, *PHYB*, *PHYC*, *PHYD*, *PHYE*

PHYA a *PHYB* regulují čas kvetení

Mutant phyB kvete brzy

Mutant phyA kvete pozdě

Mutant phyAphyB kvete dříve než *phyB*

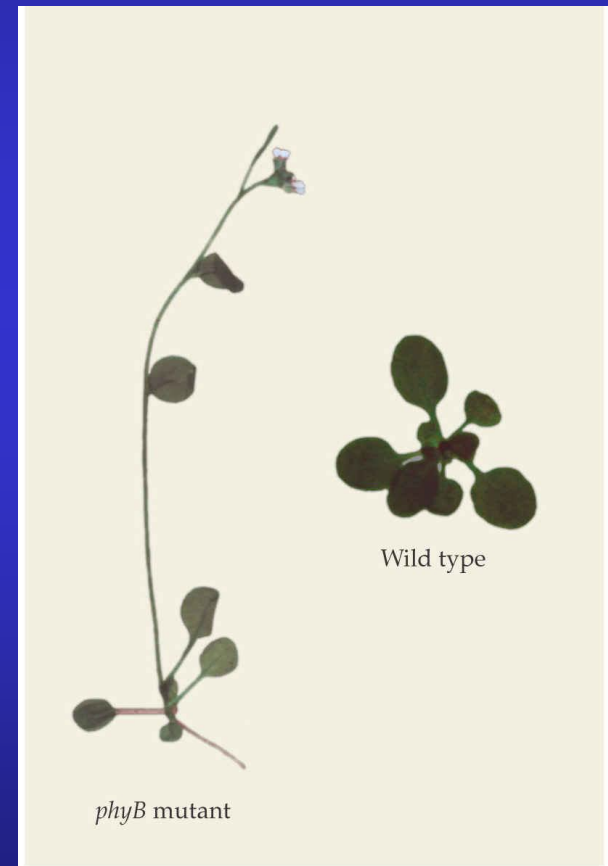


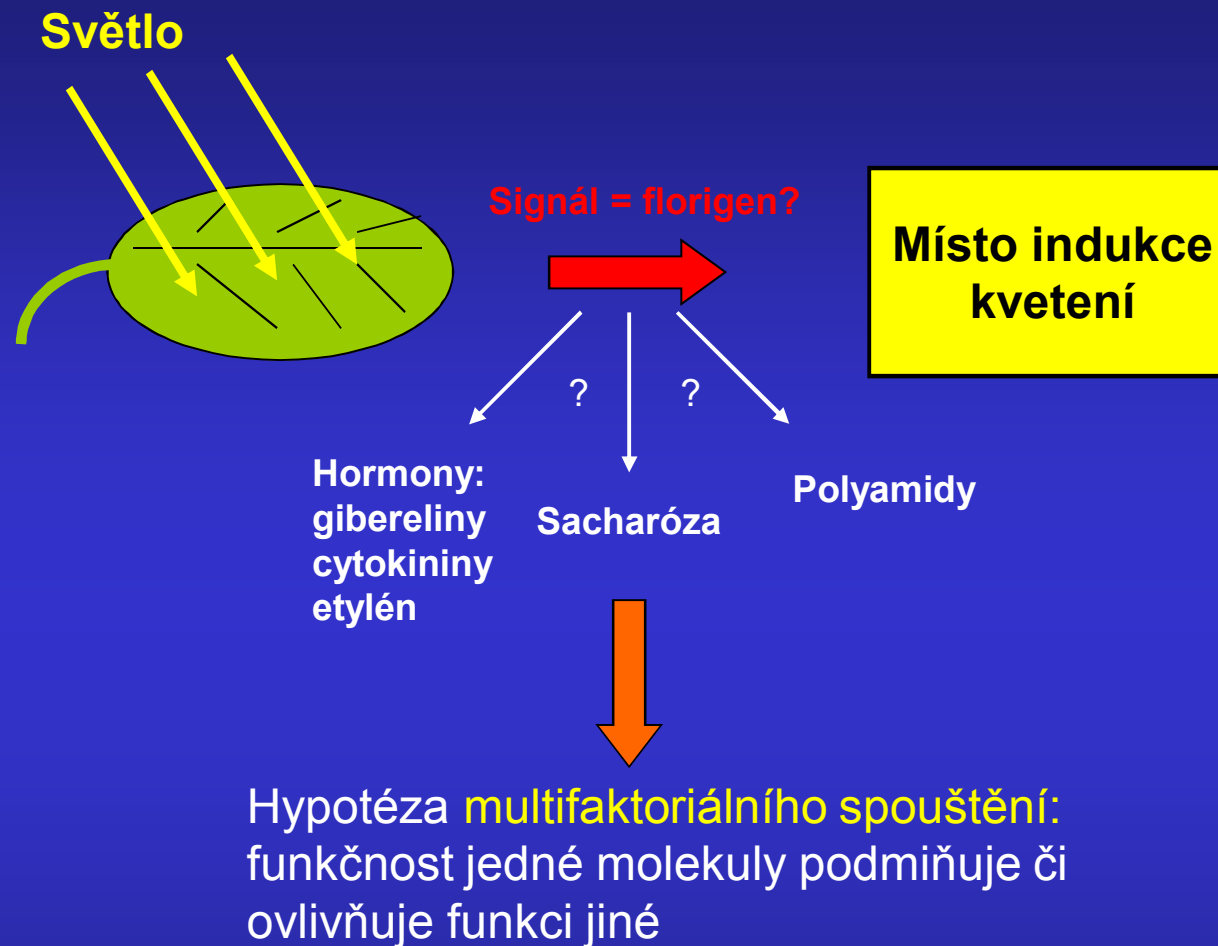
Kvetení je složitý proces



Kryptochromy – vnímají modré světlo

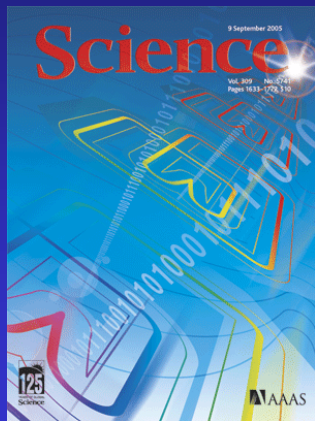
Fotosyntetické pigmenty





Pojem **florigen** – Mikhail Chailakhyan, Rusko 1936 (experimenty 1932-1934)

Corbesier and Coupland (2005) – hypotéza: **Florigen je RNA či protein translokován z listů do meristému**



Huang T *et al.* (2005)
Science 309: 1633-1772



Abe M *et al.* (2005)
Science 309: 1052-1056

Wigge PA *et al.* (2005)
Science 309: 1056-1059

Světlo (dlouhý den)

CO (CONSTANS)

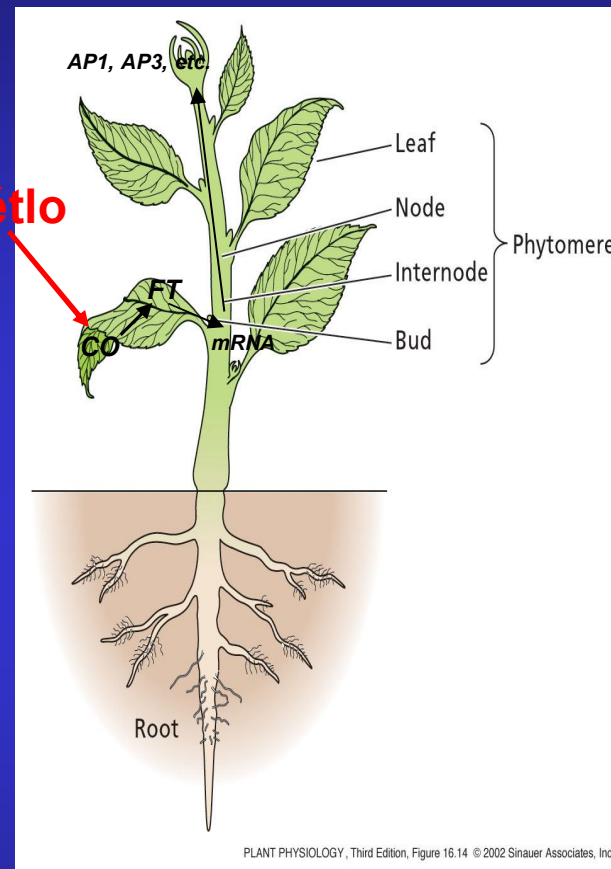


CO protein
(transkripční faktor)

FT (FLOWERING LOCUS T)

Expres *FT*

mRNA of *FT*



PLANT PHYSIOLOGY, Third Edition, Figure 16.14 © 2002 Sinauer Associates, Inc.

Indukce kvetení

AP1
AP3
LFY
CAL



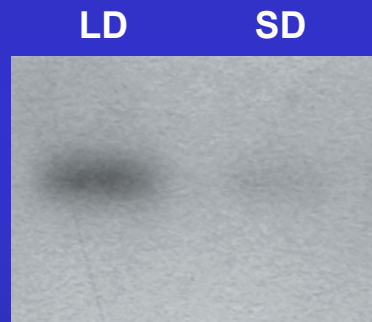
FD (FLOWERING LOCUS D)

Stonkový vrchol

! UPDATE 2007
Jaeger KE, Wigge PA (2007) Cur Biol 17: 1-5
Mathieu J *et al.* (2007) Cur Biol 17: 1055-1060
Protein FT transportovaný z listů
postačuje k indukci kvetení

CONSTANS (CO) – identifikován analýzou pozdě kvetoucího mutanta;
Normální CO kóduje transkripční faktor a je up-regulován za dlouhého dne (LD = long day); CO aktivuje expresi květních genů

Northern blot = množství RNA

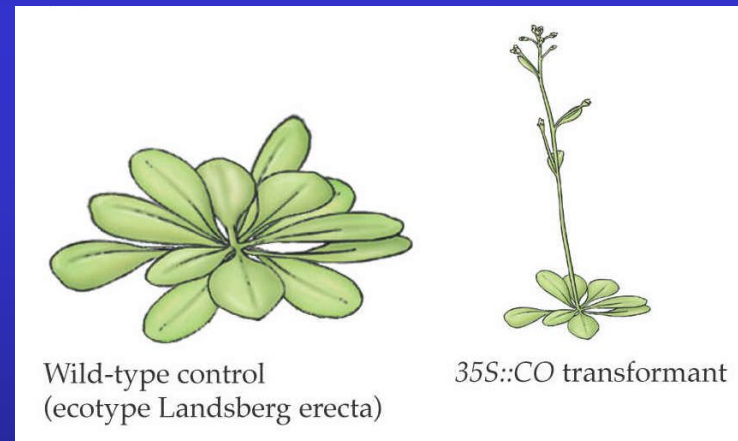


Indukce kvetení

Konstrukt: silný promotor 35S + gen CO



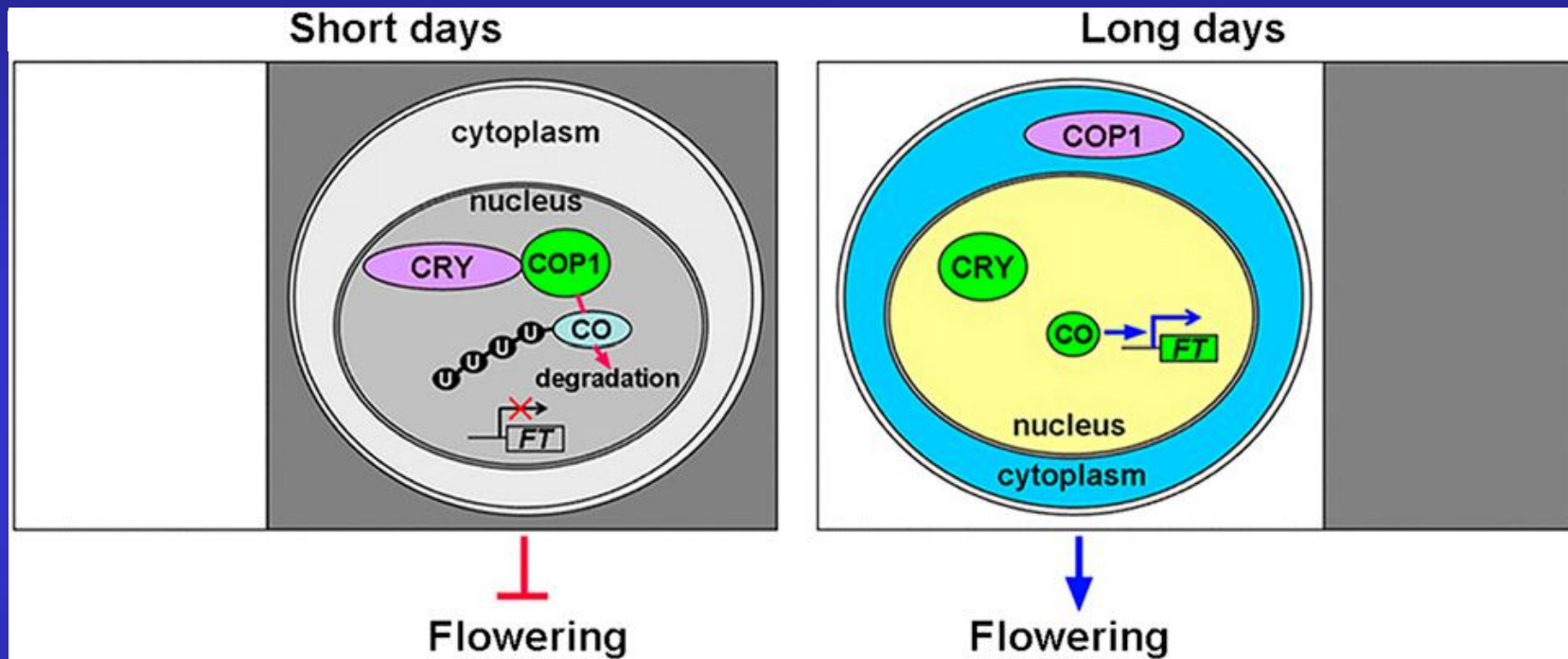
Kvetení indukováno i za krátkého dne



CO funguje jako transkripční faktor i jako co-aktivátor

UPDATE 2008

Liu L-J et al. (2008) Plant Cell 20: 292-306



Krátký den (SD) CRY1 neaktivní => akumulace COP1 v jádře => ubiquitínuje CO => FT není exprimován => inhibice kvetení

Dlouhý den (LD) CRY1 aktivní => translokace COP1 do cytoplazmy => akumulace CO v jádře => => FT je exprimován – indukce kvetení

Geny určující identitu květních meristémů

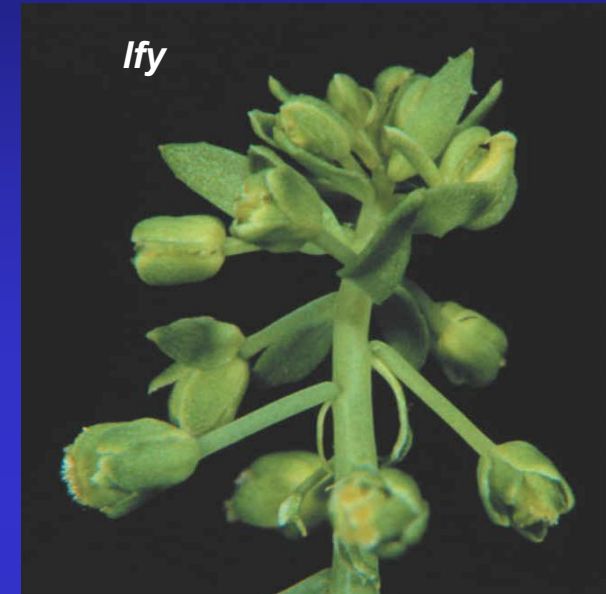
LEAFY (LFY)

TERMINAL FLOWER1 (TFL1)

APETALA1 (AP1)

CAULIFLOWER (CAL)

LEAFY (LFY) – mutant *lfy* produkuje více květních stvolů než WT; květy jsou zelené a mají pouze orgány podobné sepal a petals



Ektopická (a konstitutivní) exprese *LFY1* => předčasné kvetení; stonky se mění v květy



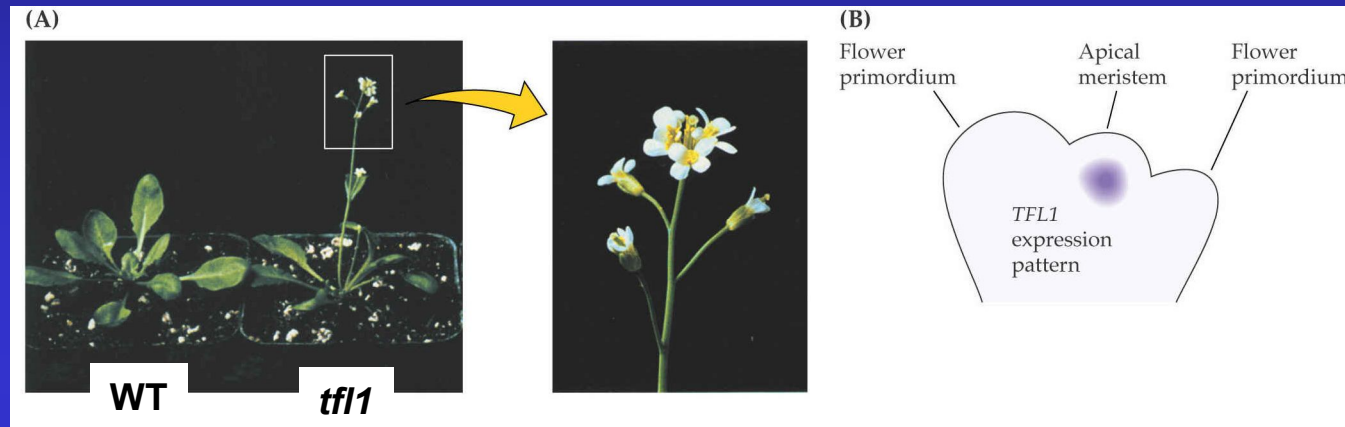
Normální funkce *LFY* = **přepíná**
nedeterminovaný růst
na **determinovaný**



NEdeterminovaný
růst

Determinovaný růst

TFL1 – mutant *tfl1* kvete brzy; vytváří primární květní stvol, netvoří boční stvoly = fenotyp opačný k *lfy*; *TFL1* exprimován v apikálním meristému, místo v květních primordiích



Normální funkce *TFL1*: udržuje **Ne**determinovaný růst



Funkce *LFY* se v ranných fázích vývoje květu podobá funkcím genů *AP1*, *AP2* a *CAL* a vzájemně se zesilují.

Indukce kvetení – 5 vývojových drah

1. Fotoperiodická (fytochromy, kryptochromy, *CO*, *FT*, mRNA *FT*, *FT*/*FD* protein, *SOC1*)

SOC1 = **S**uppressor **O**f **C**onstans1;
transkripční faktor obsahující MADS box

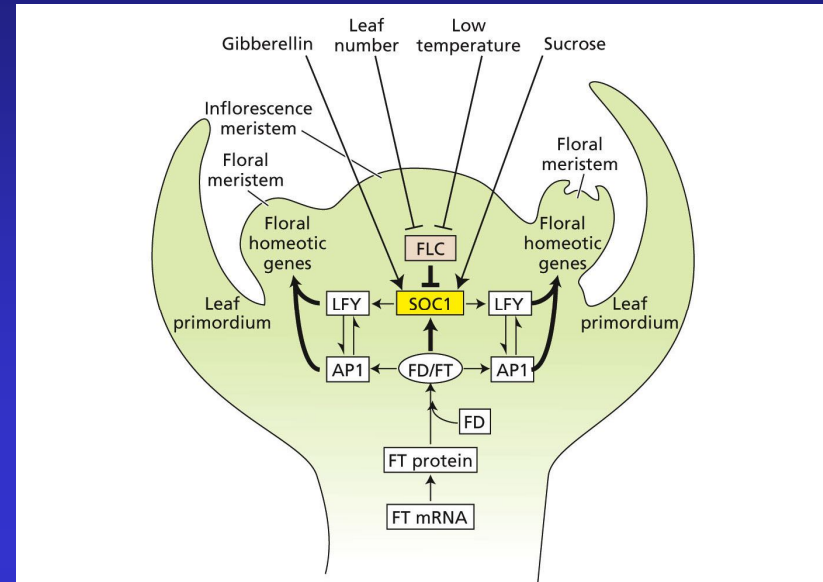
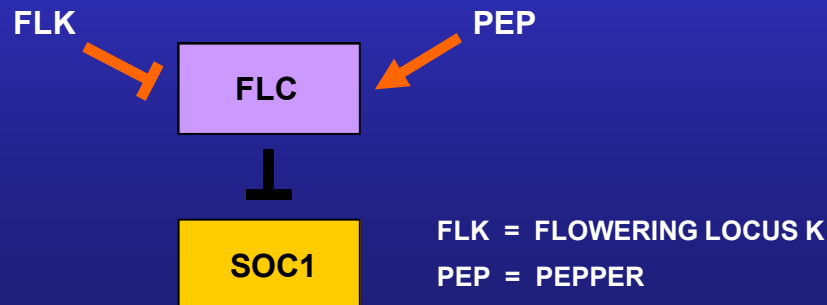
2. Autonomní a vernalizační

Autonomní

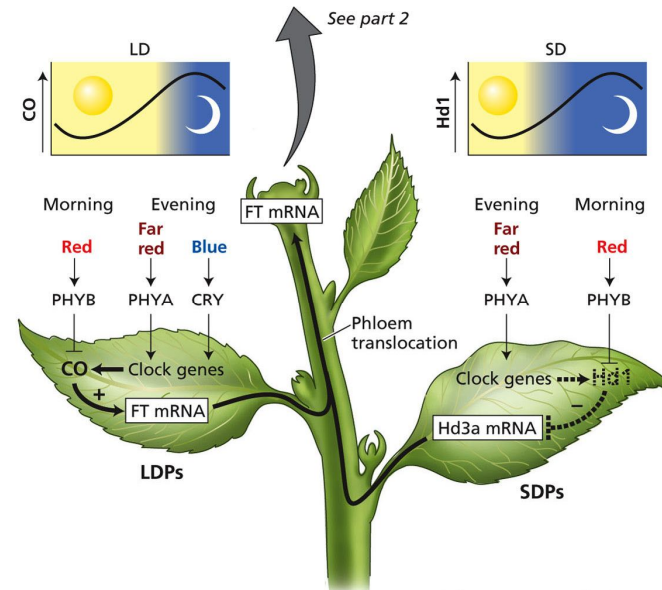
Interní signály = počet listů – redukuje expresi *FLOWERING LOCUS C (FLC)* => stimulace *SOC1*

UPDATE 2009

Ripoll JJ et al. (2009) *Developmental Biology* 333: 251-262



PLANT PHYSIOLOGY, Fourth Edition, Figure 25.33 (Part 2) © 2008 Sinauer Associates, Inc.



PLANT PHYSIOLOGY, Fourth Edition, Figure 25.33 (Part 1) © 2008 Sinauer Associates, Inc.

Vernalizační: nízká teplota

- redukce represoru *FLOWERING LOCUS C (FLC)* => stimulace *SOC1*

3. Karbohydrátová

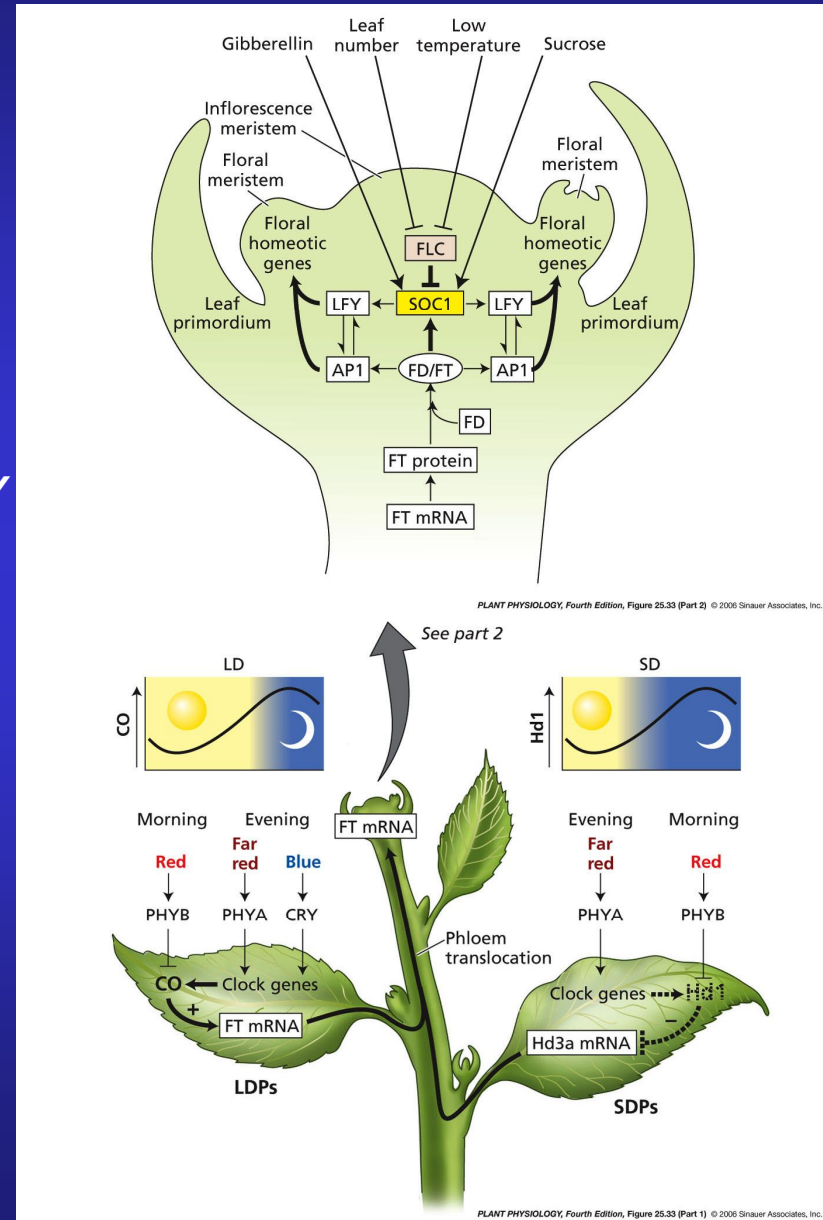
- odráží metabolický stav rostliny = cukr stimuluje kvetení indukcí *SOC1* => exprese *LFY*

4. Giberelinová – vyžadována pro předčasné kvetení a pro kvetení za krátkého dne

- gibereliny indukují transkripční faktor typu *GAMYB* => stimulace *LFY*

- gibereliny interagují přímo se *SOC1* => aktivace *LFY*

- aktivním giberelinem je *GA₄*



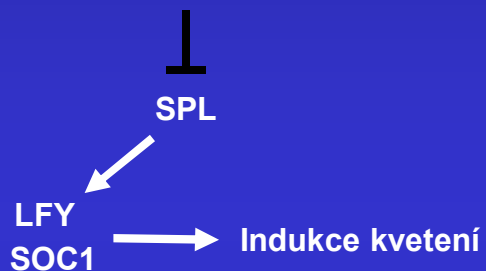
UPDATE 2010

Fornava et al. (2010) Cell 14: 550-550e

5. Věková

- odráží věk rostliny

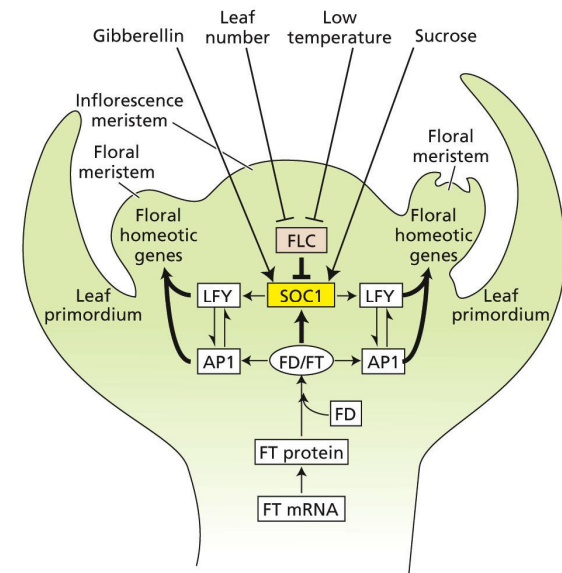
Mladá rostlina => vysoká hladina **miR-156**



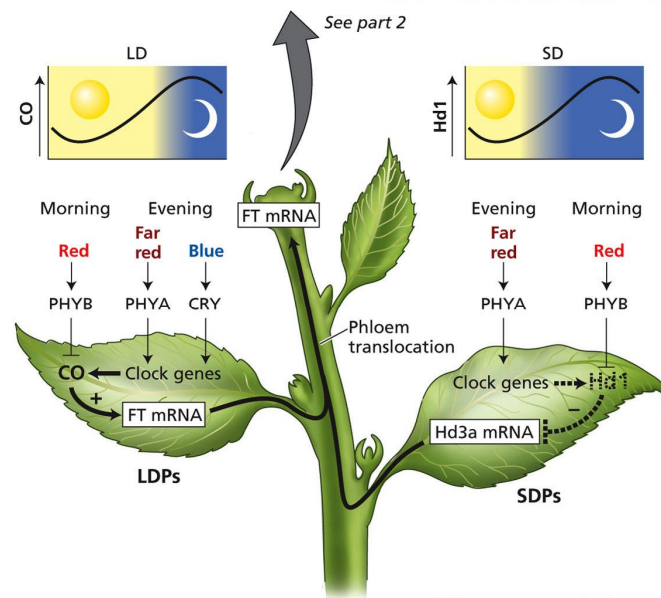
Dráhy 1 – 5 se soustředují v **SOC1**

Indukce LFY a AP1

Indukce květních homeotických genů (**model ABC**)



PLANT PHYSIOLOGY, Fourth Edition, Figure 25.33 (Part 2) © 2006 Sinauer Associates, Inc.



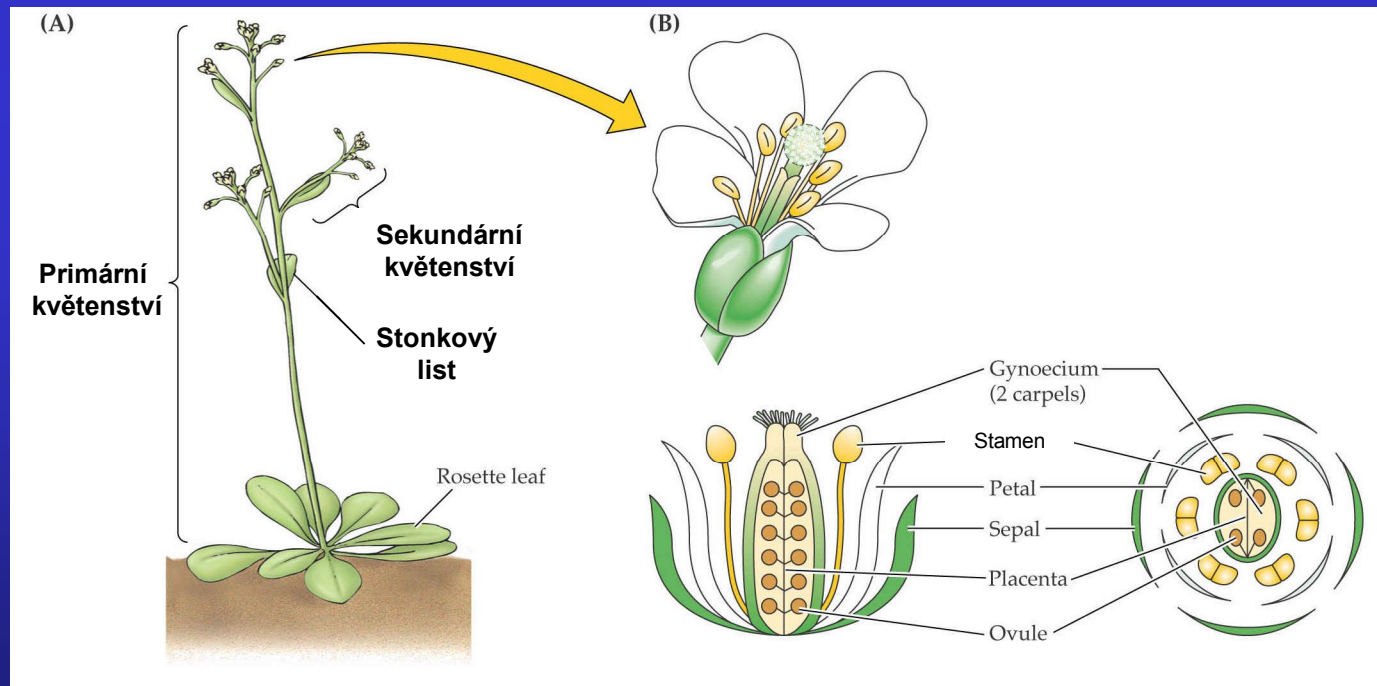
PLANT PHYSIOLOGY, Fourth Edition, Figure 25.33 (Part 1) © 2006 Sinauer Associates, Inc.

b) Vývoj květu – stručná morfologie

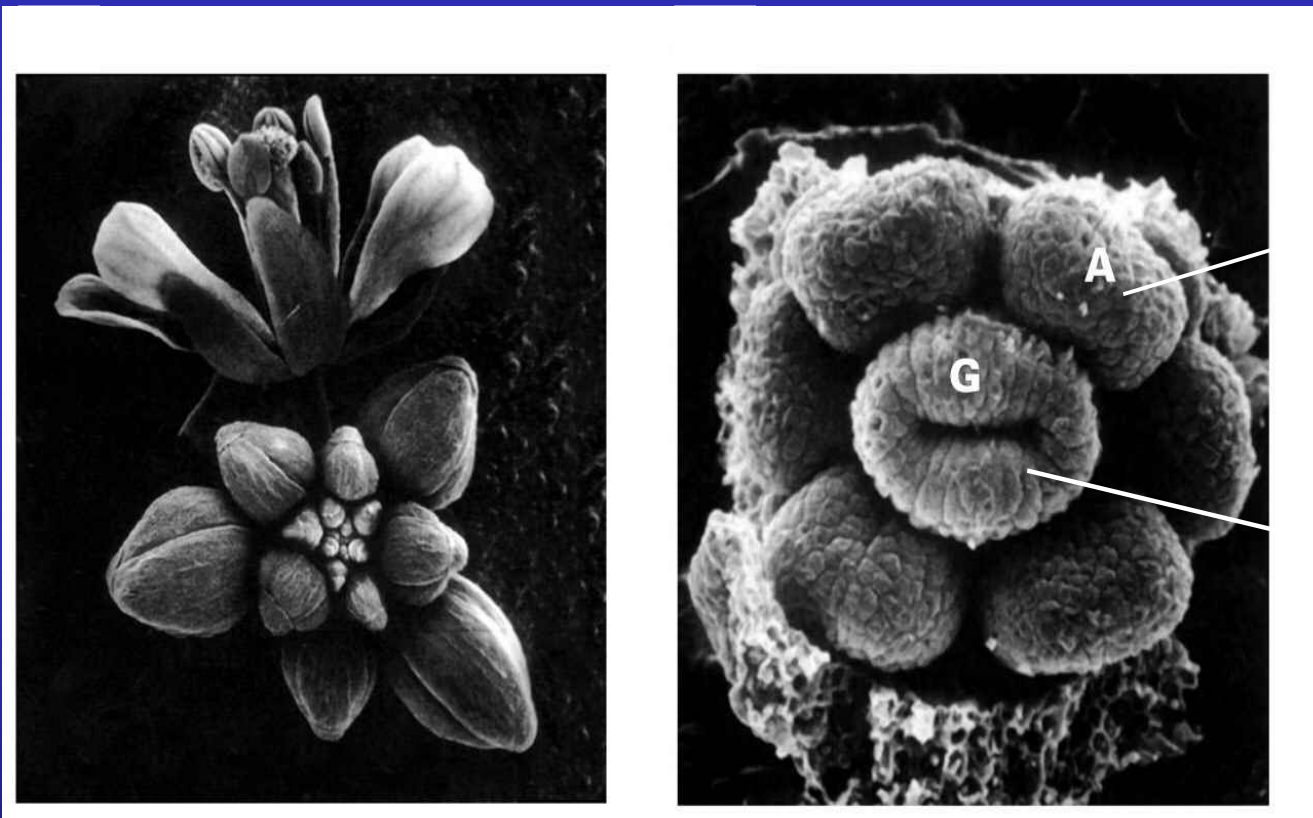
Modelová rostlina *Arabidopsis* => 1. přednáška MBR

Struktura květu *Arabidopsis* a jeho vývoj

Signál => indukce kvetení => apikální meristém produkuje květy



Květy se tvoří ve spirále kolem centrálního meristému



Anther
(prašník)

Gynoecium
(carpels = pestíky)

c) Genetická a molekulární analýza vývoje květu

Analýza genetických mutací, které mění specifikaci vývoje květu umožňuje definovat a odlišit základní procesy na molekulární úrovni

ABC model

Díky mutacím (knihovna T-DNA mutantů), které vedou k redukci, změně či změně polohy květních orgánů, byly nalezeny 4 geny, které hrají klíčovou roli ve vývoji květních orgánů: **AP2, AP3, PI, AG**.

Izolace a charakterizace mutantů



Klonování genů a návrh ABC modelu

Bowman JL et al. (1991) Development 112: 1-20

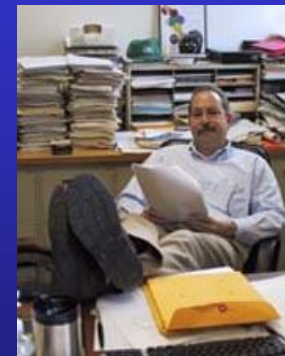


Prof. M. Koornneef
(Wageningen, Holandsko)



Prof. John Bowman

<http://www.dbs.ucdavis.edu/>

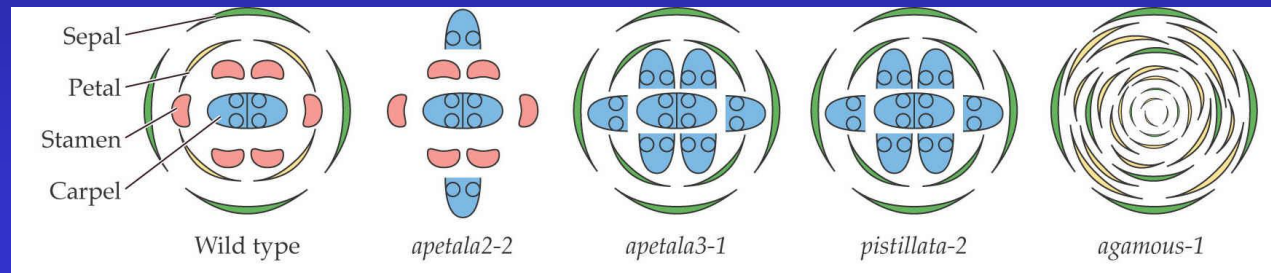


Prof. Elliot Meyerowitz

<http://www.its.caltech.edu/~plantlab/>

Geny hrající klíčovou roli ve vývoji květních orgánů (květní homeotické geny, flower homeotic genes):

Květní fenotypy mutantů



Mutant *ap2* : sepals \longrightarrow carpels petals \longrightarrow stamens

Mutant *ap3* :

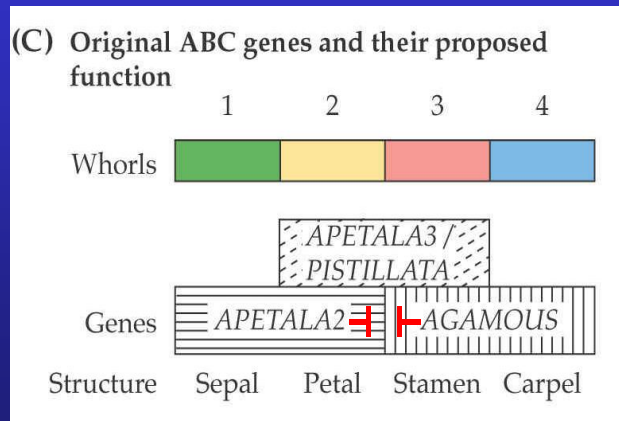
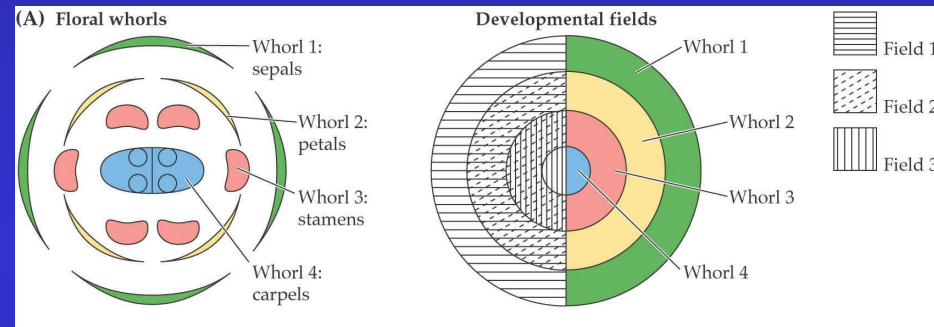
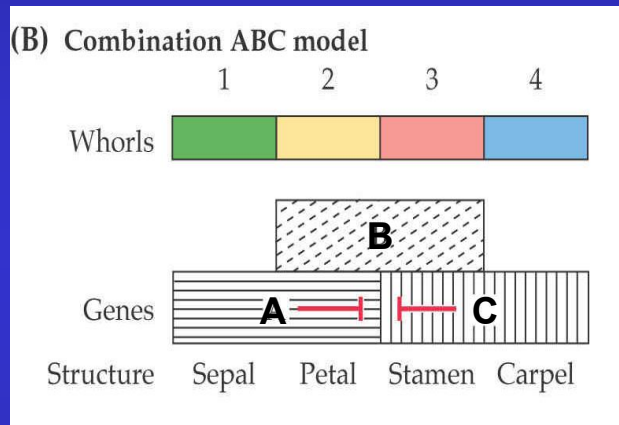
Mutant *pi* : petals \longrightarrow sepals stamens \longrightarrow carpels

Mutant *ag* : stamens \longrightarrow petals carpels \longrightarrow 2. *ag* květ

AP2, AP3, PI, AG byly nazvány **homeotické geny**, protože byly nalezeny i u jiných rostlinných druhů. Na rozdíl od klasických homeotických genů však nekódují proteiny s homeodoménou.

ABC model vývoje květních orgánů

Květní primordium jsou 3 koncentrické a překrývající se pole genové aktivity: A, B, C

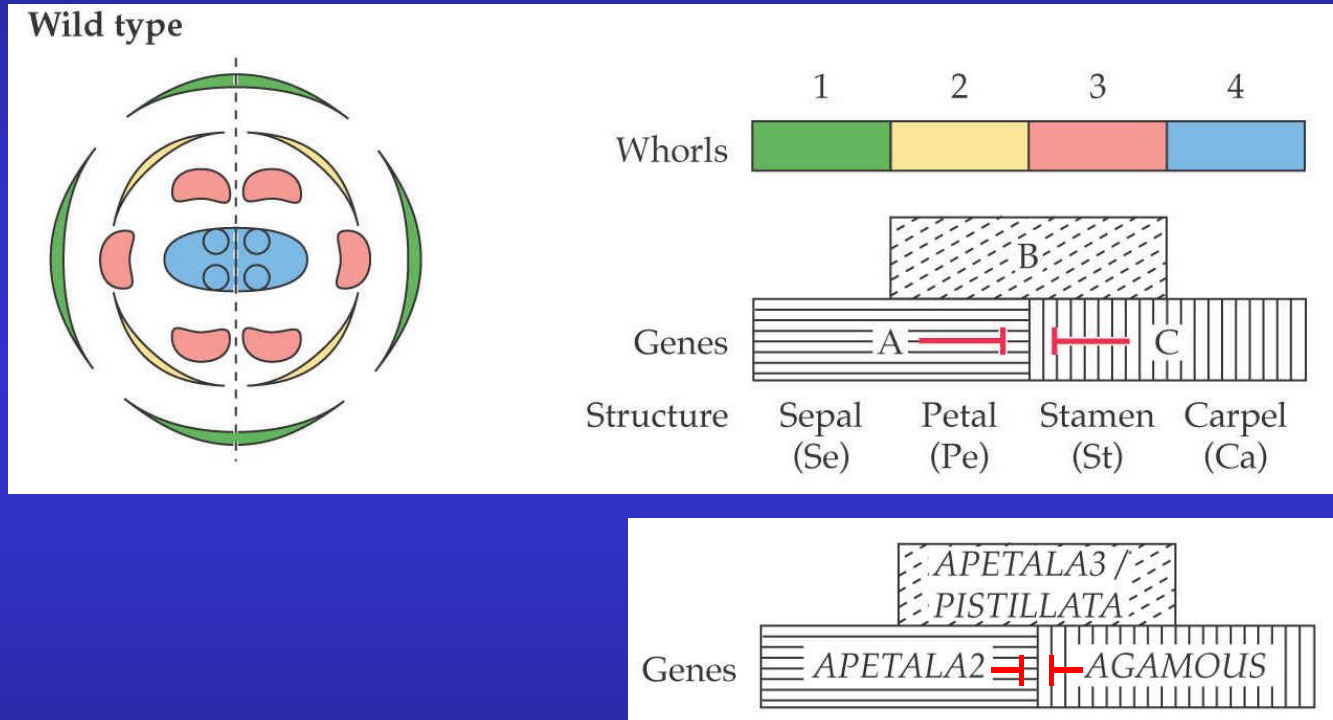


AP2 řídí pole **A** = **sepals** + **petals**

AP3 / PI řídí pole **B** = **petals** + **stamens**

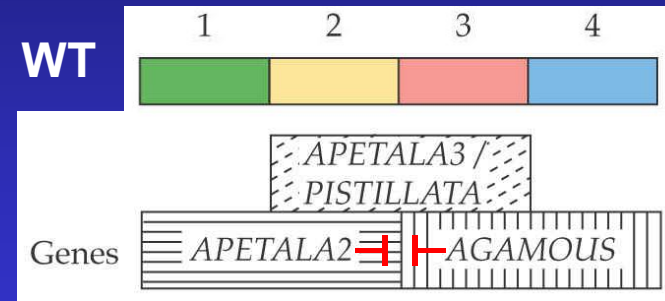
AG řídí pole **C** = **stamens** + **carpels**

ABC model vysvětluje vývoj jednotlivých orgánů v mutantech

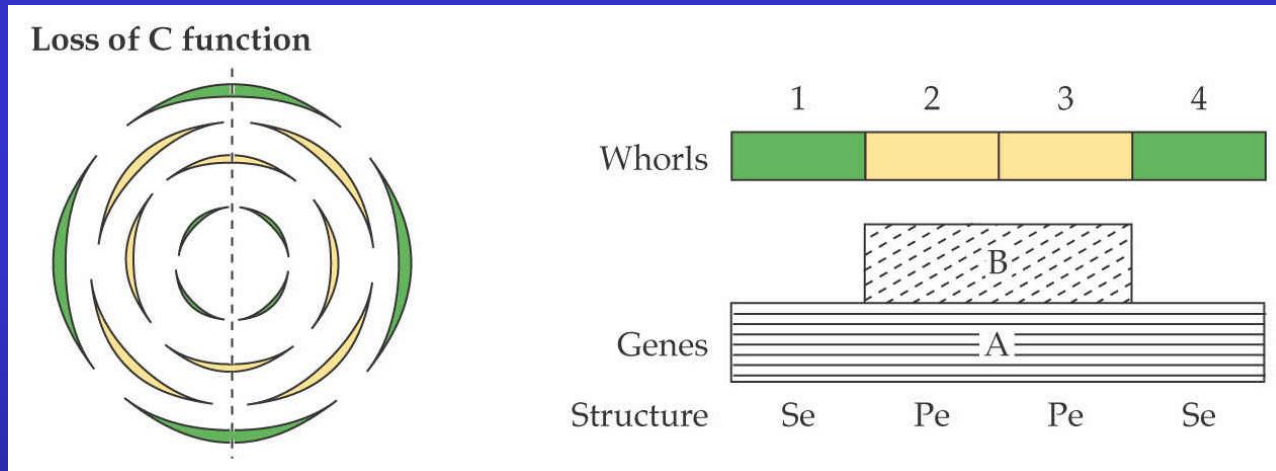


WT : všechny geny fungují normálně

ABC model vysvětluje vývoj jednotlivých orgánů v mutantech



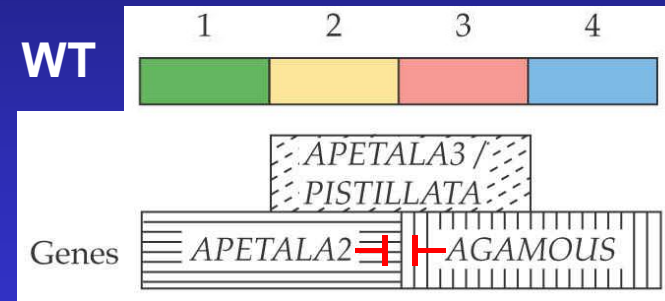
ag



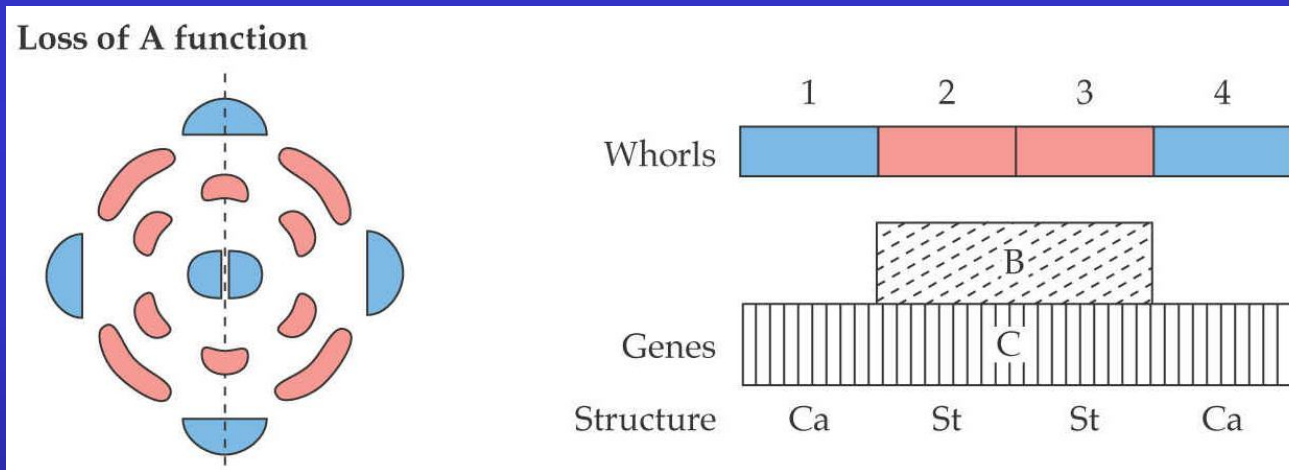
AG gen je off => AG nepůsobí proti AP2 => AP2 expanduje do části

3 a 4 => **stamens** → **petals** **carpels** → **sepals**

ABC model vysvětluje vývoj jednotlivých orgánů v mutantech



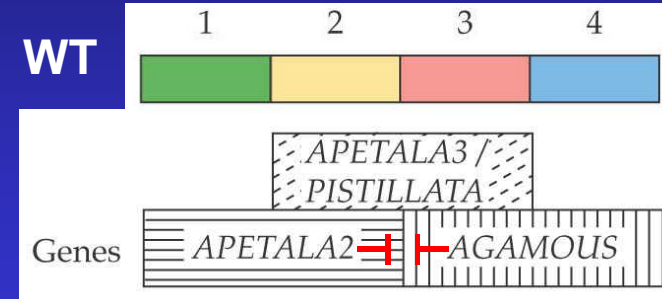
ap2



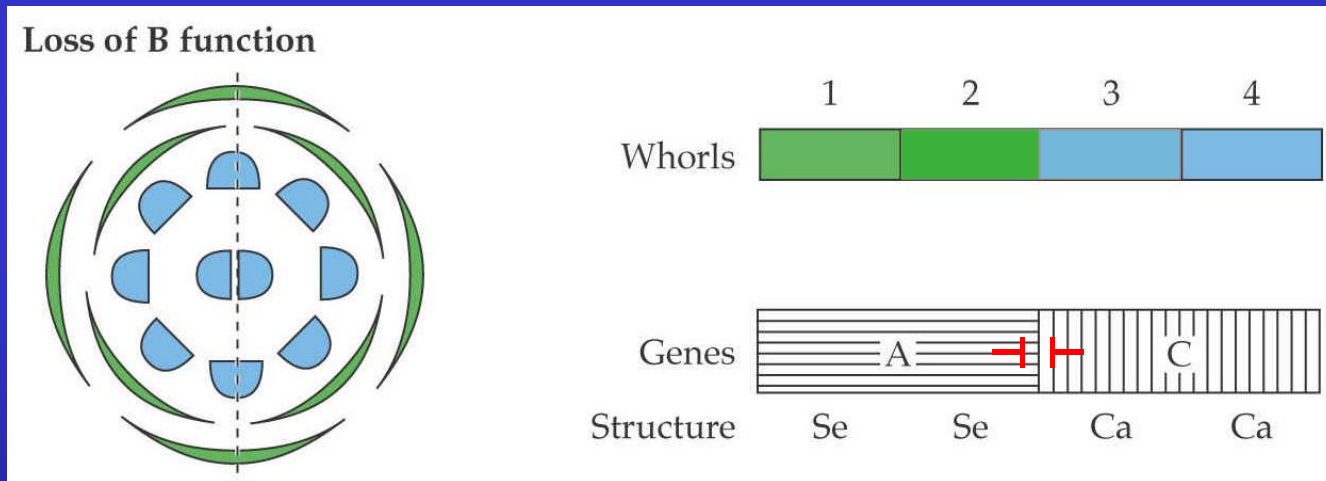
AP2 gen je off => *AP2* nepůsobí proti *AG* => *AG* expanduje do části

1 a 2 => **sepals** → **carpels** **petals** → **stamens**

ABC model vysvětluje vývoj jednotlivých orgánů v mutantech

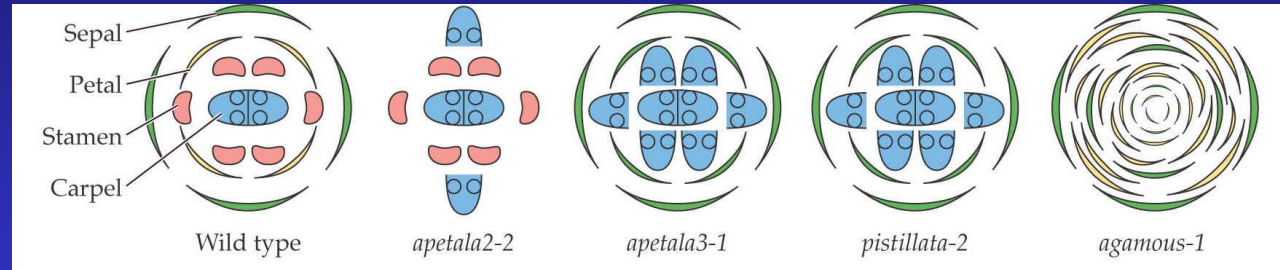


ap3 / pi

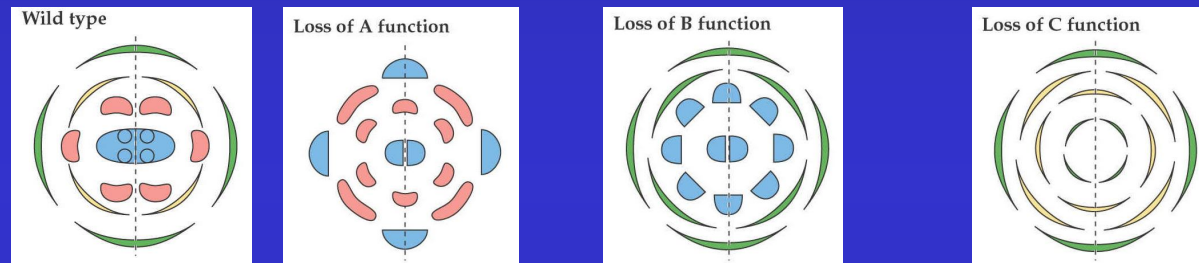


AP3 / PI geny jsou off => AP3/PI nepůsobí v kombinaci s AP2 v 2 ani v kombinaci s AG v části 3: **petals** → **sepals** **stamens** → **carpels**

Pozorované fenotypy



Fenotypy na základě ABC modelu



Odchylka od pozorovaného fenotypu

Odchylka od pozorovaného fenotypu

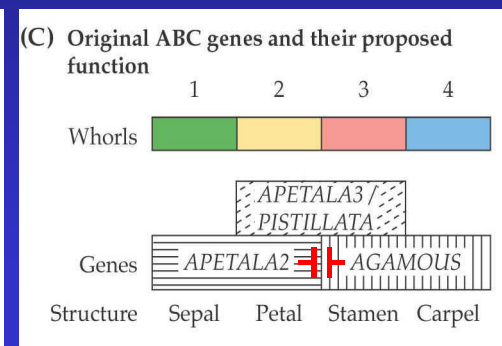
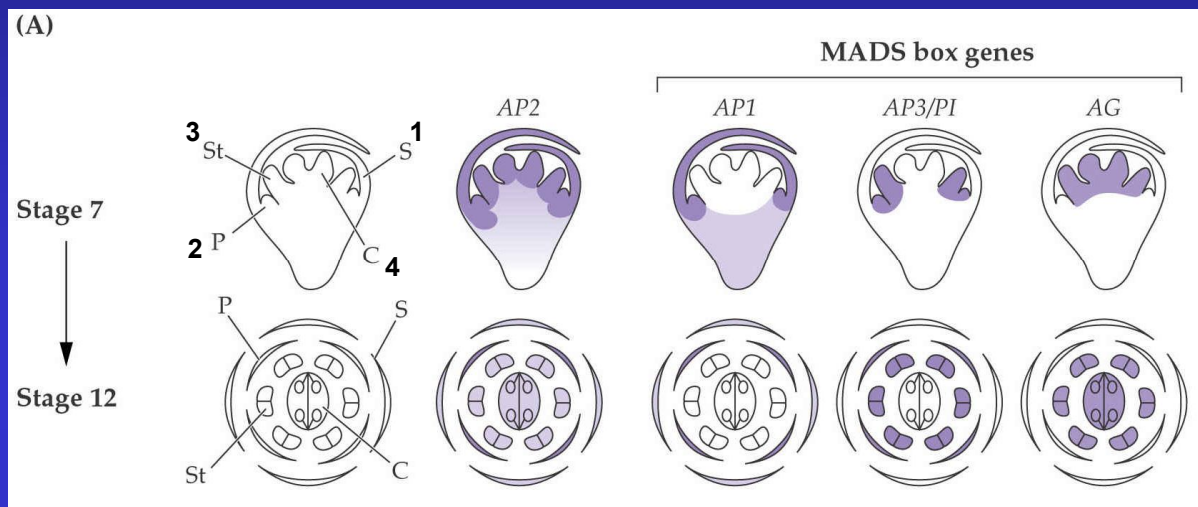
ABC model dobře koresponduje z pozorovanými fenotypy mutantů. Ne však na 100%.



Revize modelu

ABC model byl revidován na základě studie exprese genů pomocí *in situ* hybridizace v průběhu vývoje květu.

Expresí genů v orgánech WT rostlin

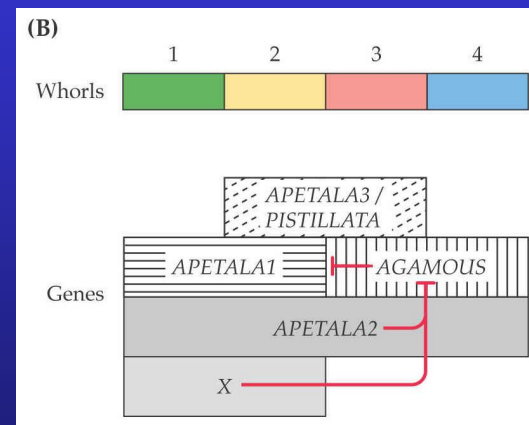


Expresí AP2 v 1 a 2 **OK. Ale**, expresí v 3 a 4 nečekaná; model předpokládá potlačení vlivem AG

Avšak, když je AP2 exprimován v 3 a 4, pak by měl v těchto částech potlačit expresi genu AG – ale nepotlačuje!

OK, AP3 / PI je exprimován ve 2 a 3

Revize modelu: neznámý gen X + gen AP1

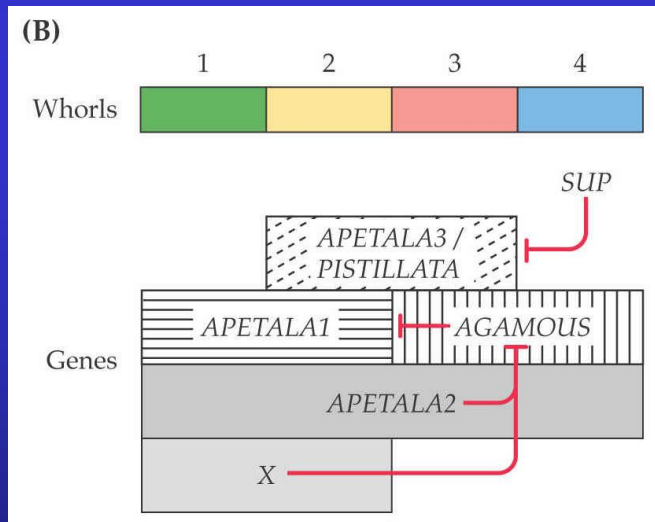


Další revize ABC modelu

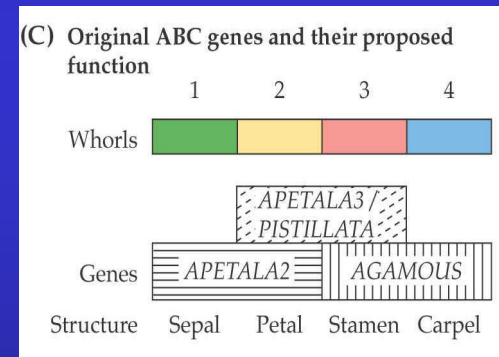
Nalezen mutant *sup* (*superman*) – exprese genu *AP3 / PI* je rozšířena do kruhu 4, kde se začaly tvořit **stamens**. Tzn., že gen *SUP* negativně reguluje *AP3 / PI*



Revidovaný ABC model



Původní ABC model

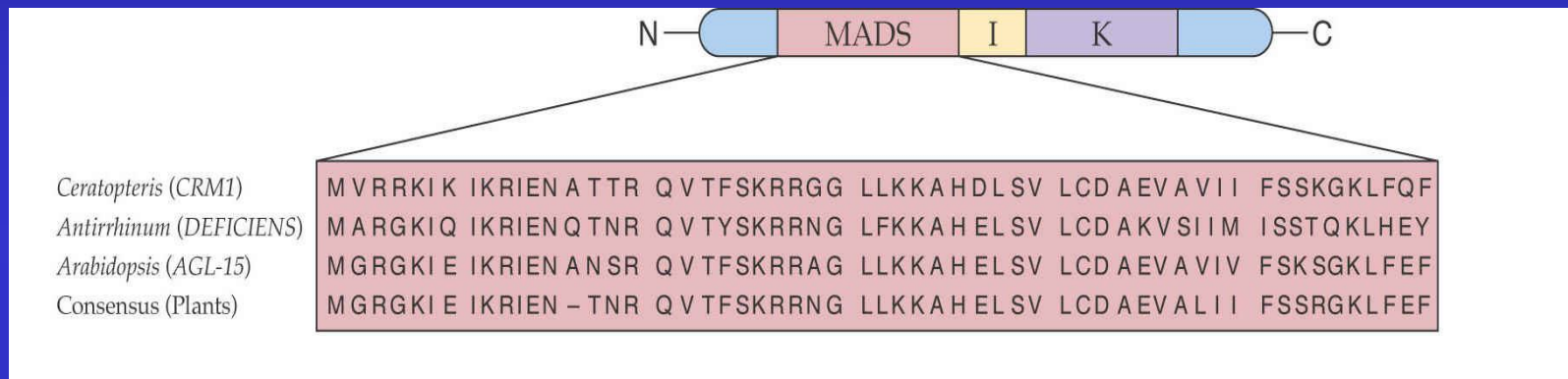


Sakai H et al. (2000) Plant Cell 12: 1607-1618

Nakagawa H et al. (2004) Plant Cell 16: 920-932

Produkty homeotických genů = proteiny

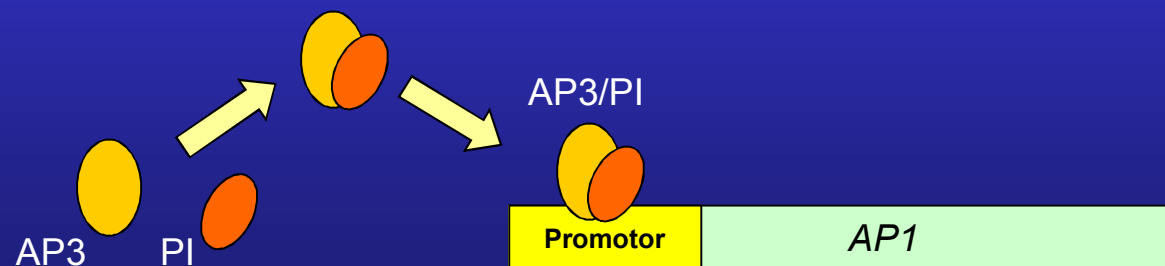
AG, PI, AP1, AP3 – skupina evolučně konzervovaných transkripčních faktorů. Každý z nich obsahuje konzervovanou DNA-binding doménu: **MADS box**.



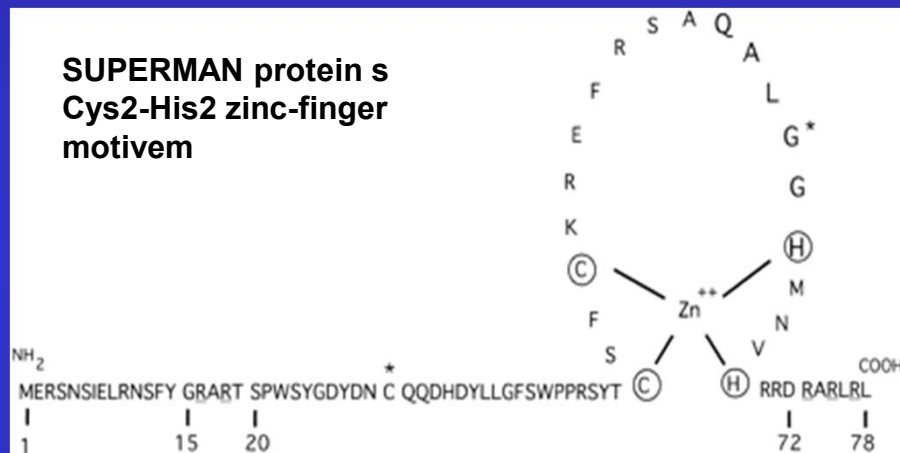
Tyto transkripční faktory kontrolují expresi jiných genů specifických pro květní orgány.

UPDATE 2006:

Sundström et al. 2006,
Plant Journal 46: 593-600



SUP – transkripční faktor, který se váže specificky pomocí Cys2 – His2 zinc-finger motiv, a tak kontroluje utváření rozhraní **stamen** – **carpel** u *Arabidopsis*.



Dathan N et al. (2002) *Nucleic Acids Research* 15: 4945-4951

<http://nar.oupjournals.org/cgi/content/full/30/22/4945>

AP2 – není podobný žádnému ze známých proteinů. Patří k nové velké skupině proteinů schopných vázat se k DNA. Obsahuje serine-rich acidic doménu, která se váže k DNA.

Okamuro JK et al. (1997) *PNAS USA* 94: 7076-7081

<http://www.pubmedcentral.gov/picrender.fcgi?tool=pmcentrez&action=stream&blobtype=pdf&artid=21287>

Základní principy kontroly vývoje květů na základě genetické a molekulární analýzy homeotických genů:

- 1) Geny, kódující transkripční faktory kontrolují celou řadu genů, které specifikují osud květů
- 2) Tyto geny fungují ve vzájemné kombinaci
- 3) Produkty některých z těchto genů (např. AP2 a AG; AP3/PI a AP1) kontrolují vzájemně svoji aktivitu

Negativní regulátory genové exprese

CLF (curly leaf) – vypnutí funkce genu *CLF* uvolňuje expresi *AG*

EMF (embryonic flower) – vypnutí funkce genu *EMF* uvolňuje expresi genů *AG* a *AP1*

TFL (terminal flower) – normální gen *TFL* brzdí kvetení

Pozitivní regulátory genové exprese

LFY a AP1 – normální geny urychlují kvetení

Další geny regulující počet a tvar květních orgánů

CLAVATA1 – kóduje povrchovou receptor-kinázu; zvyšují počty orgánů

CLAVATA3, ETTIN – kódují faktor citlivý k hormonu auxinu, auxin-response factor; zvyšují počty orgánů

TOUSLED – snižuje počet a velikost orgánů a jejich tvar

Použitá literatura

Buchanan BB et al. (2000) Biochemistry and Molecular Biology of Plants. American Society of Plant Physiologists, Rockville, Maryland

Taiz L, Zeiger E (2006) Plant Physiology. 4th Edition, Sinauer Associates, Inc. Publishers, Sunderland, Massachusetts

Review shrnující informace o molekulárních mechanismech vývoje květu:

Krizek BA and Fletcher JC (2005) Molecular mechanisms of flower development: an armchair guide. Nature Reviews - Genetics 6: 688 - 698