

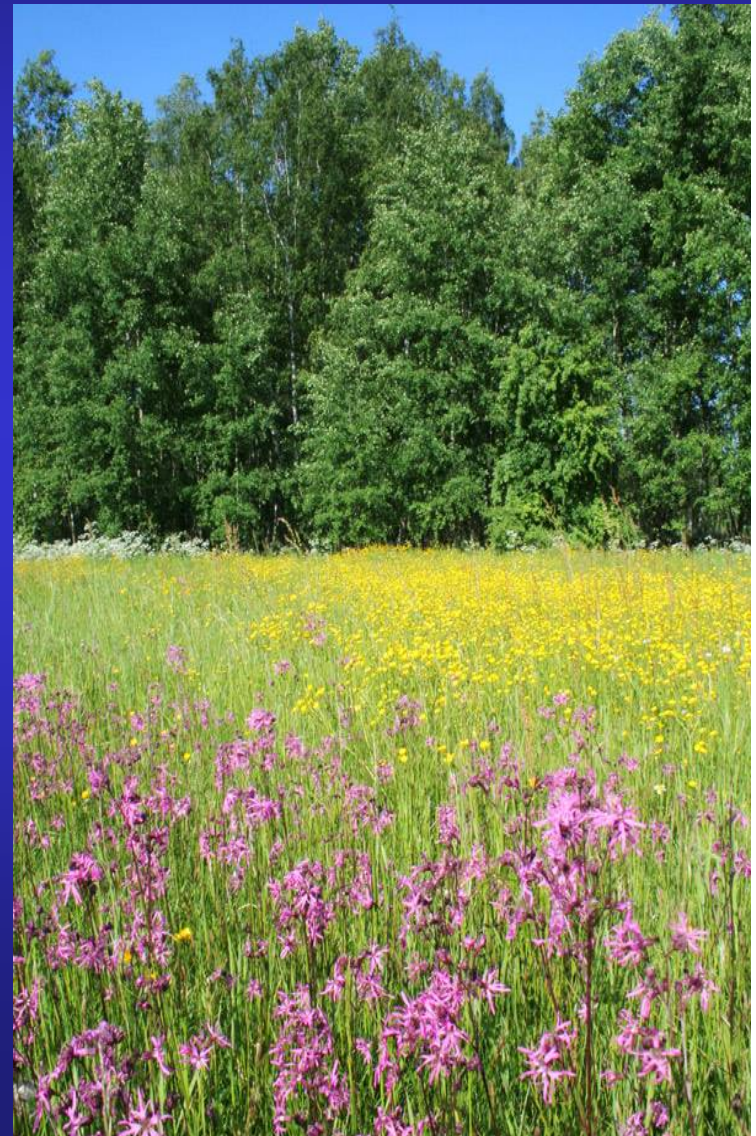
4) Reprodukce rostlin

- a) Indukce kvetení
- b) Vývoj květu - stručná morfologie
- c) Genetická a molekulární analýza vývoje květu

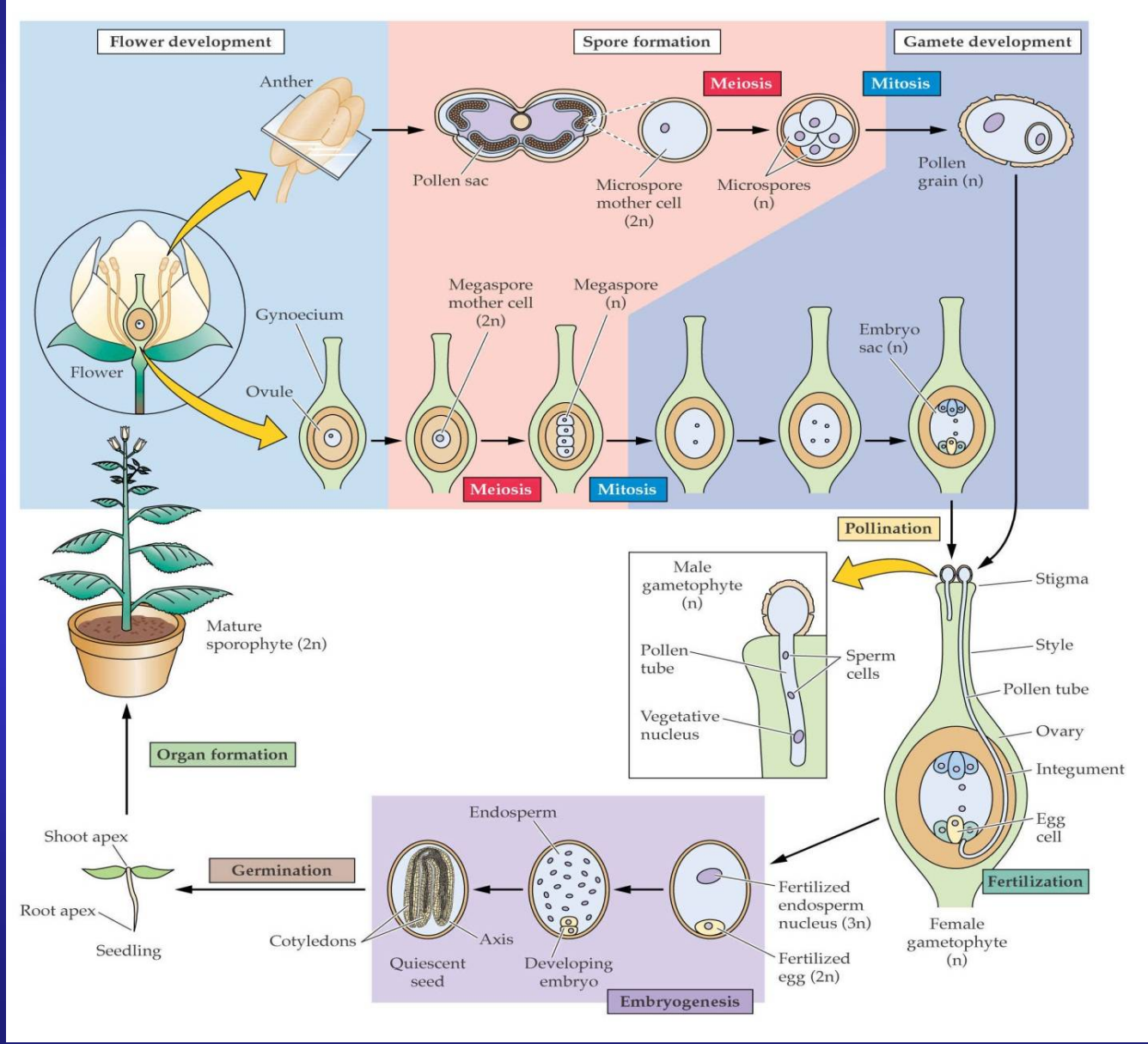
Martin Fellner

Laboratoř růstových regulátorů

PřF UP v Olomouci a ÚEB AVČR



Životní cyklus rostliny



a) Indukce kvetení

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

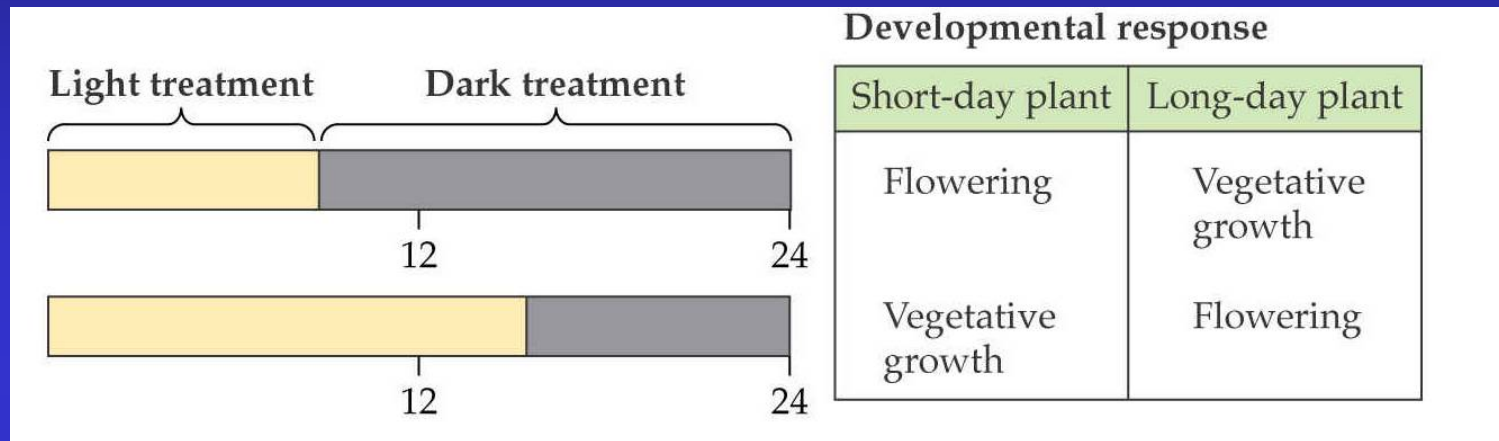
Schopnost rostlin přepnout vývoj vegetativní na reprodukční ukazuje důležitý vývojový rozdíl mezi rostlinami a živočichy.

Rostlina tímto přepnutím nastartuje svoje stárnutí a smrt

Přeprogramování musí být přesně načasováno



Kvetení je indukováno fotoperiodou = poměrem mezi délkou dne a noci

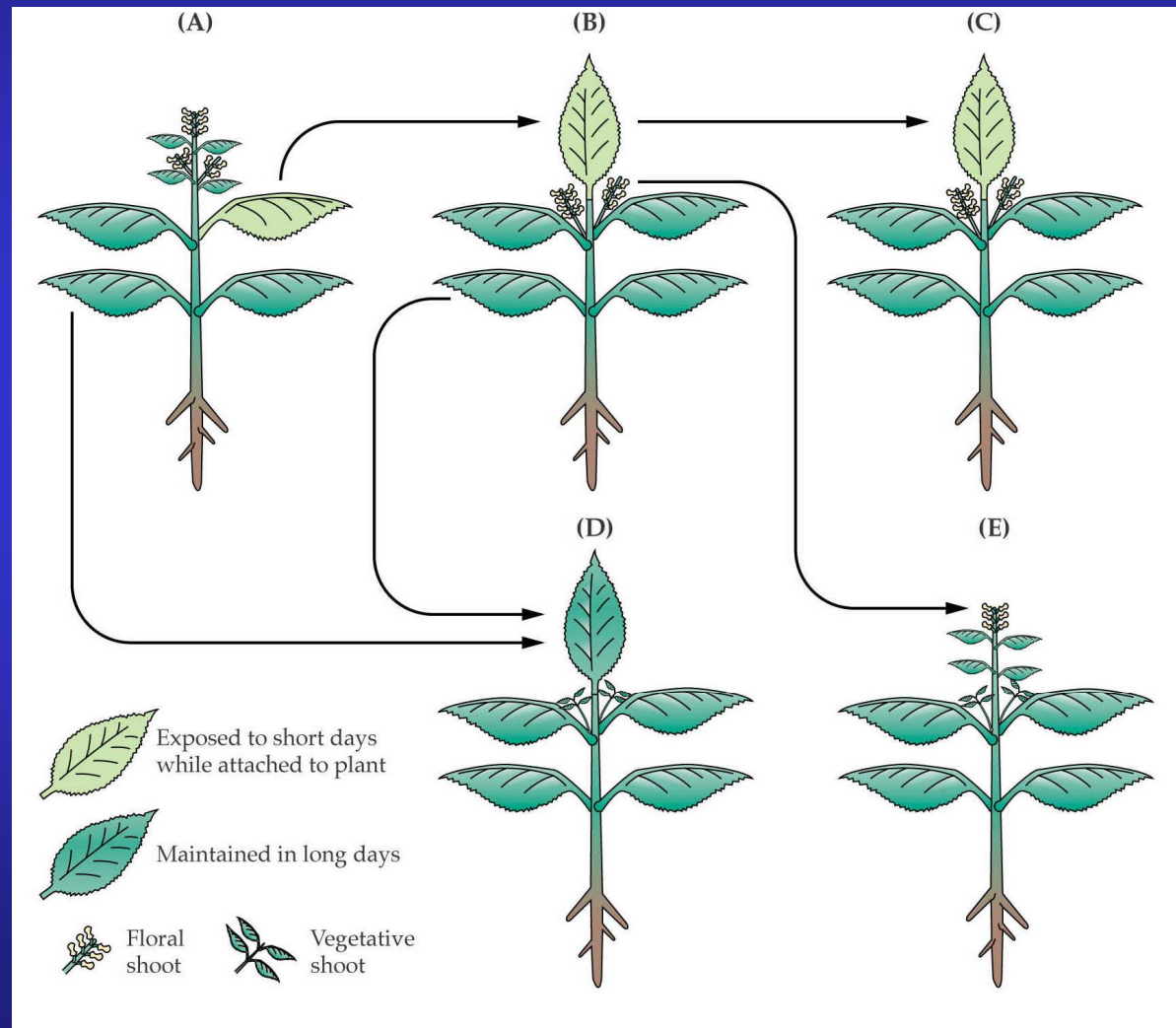


Krátkodenní rostliny – kvetení je indukováno krátkým dnem a dlouhou nocí (např. chryzantémy, odrůdy jahod, špenát)

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*

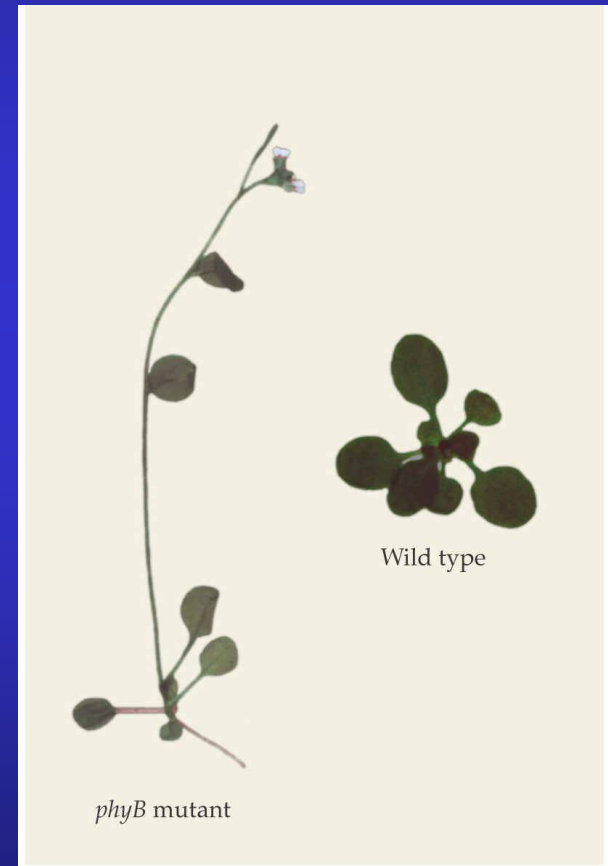


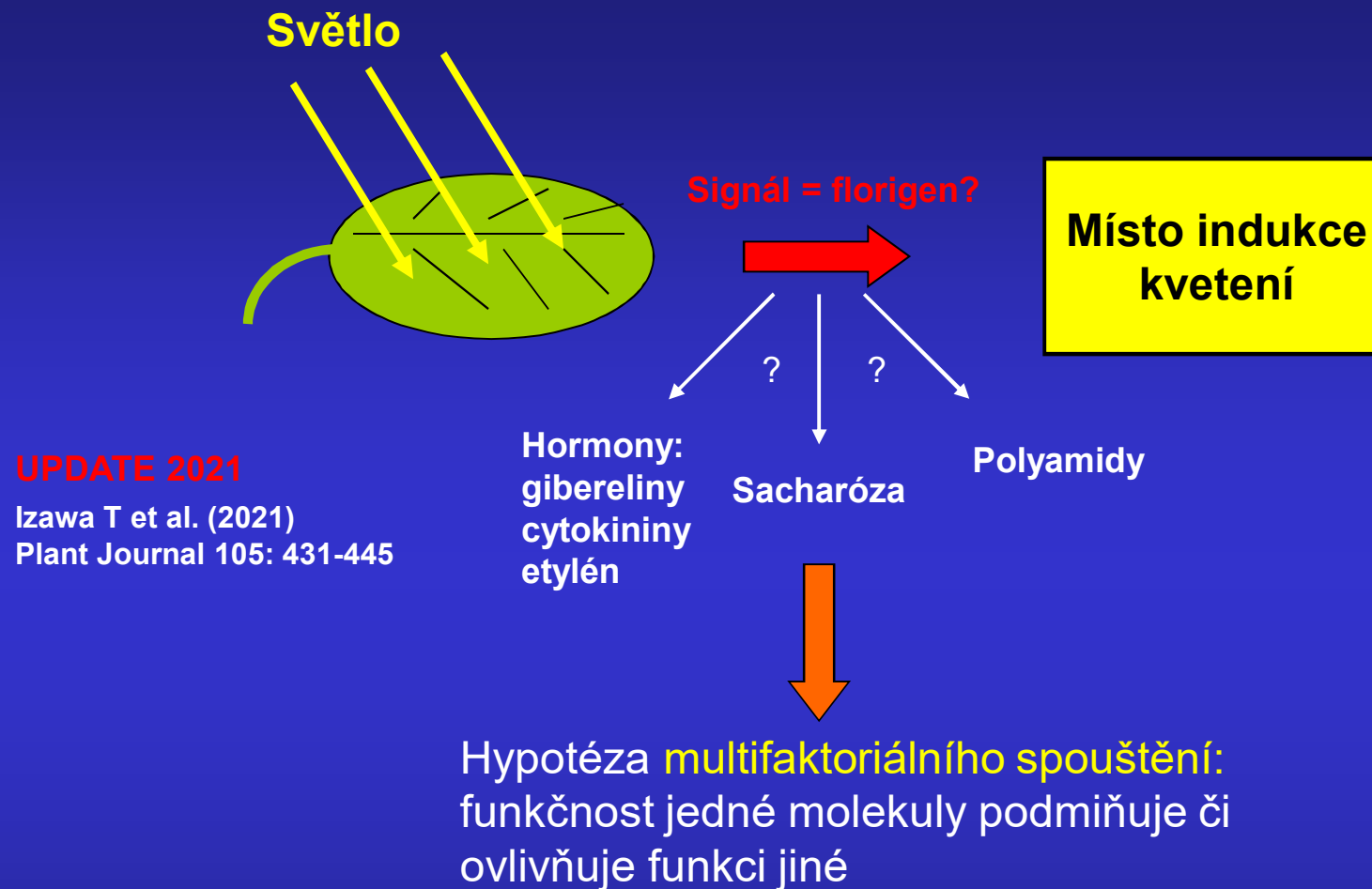
Kvetení je složitý proces



Kryptochromy – vnímají modré světlo

Fotosyntetické pigmenty



**UPDATE 2021**

Izawa T et al. (2021)
Plant Journal 105: 431-445

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

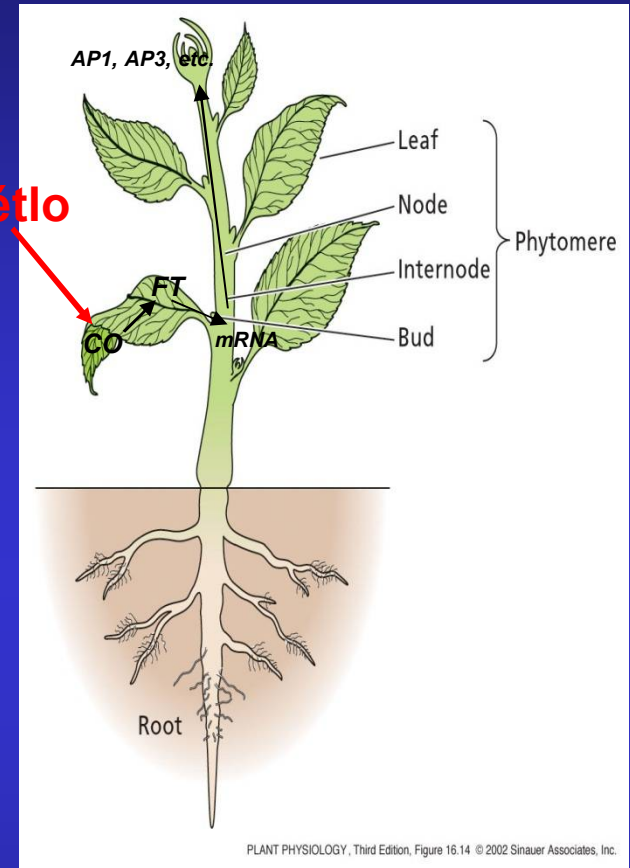
Wigge PA et al. (2005)
Science 309: 1056-1059

Světlo (dlouhý den)

CO (CONSTANS)



Světlo



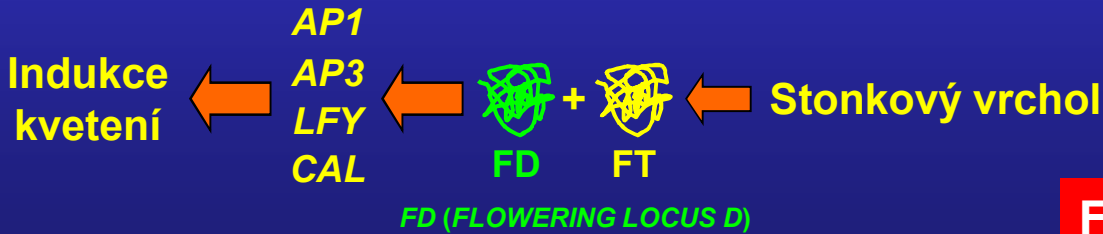
FT (FLOWERING LOCUS T)

Expres FT

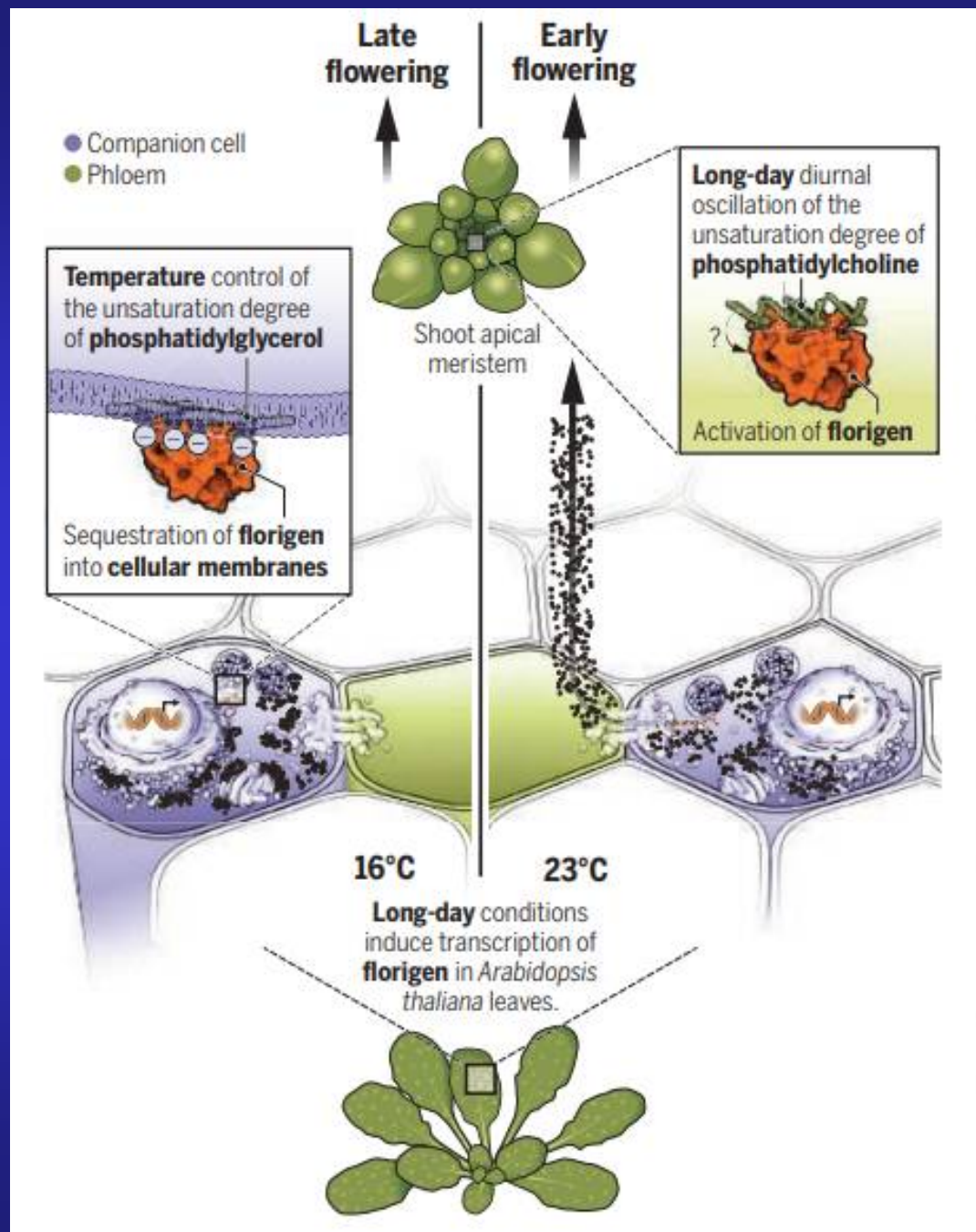
mRNA of FT

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.



FT protein = FLORIGEN



Update 2021

Susila H et al. (2021) Science 373: 1137 – 1142

Florigen FLOWERING LOCUS T (FT) interaguje s negativně nabitým fosfolipid fosfatidylglycerolem (PG) na plazmatické membráně (PM) a váže se k lipidové dvouvrstvě PM.

Nízká teplota – vazba FT k PM

Vysoká teplota – oddělení FT od PM



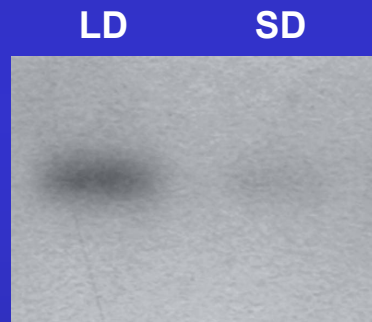
Transport FT do apikálního meristému

Jaillas Y and Parcy F (2021)

Science 373: 1086 – 1087

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

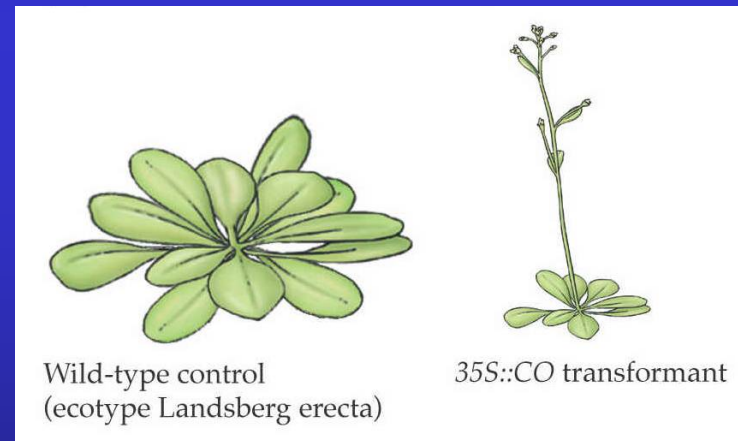


Indukce kvetení

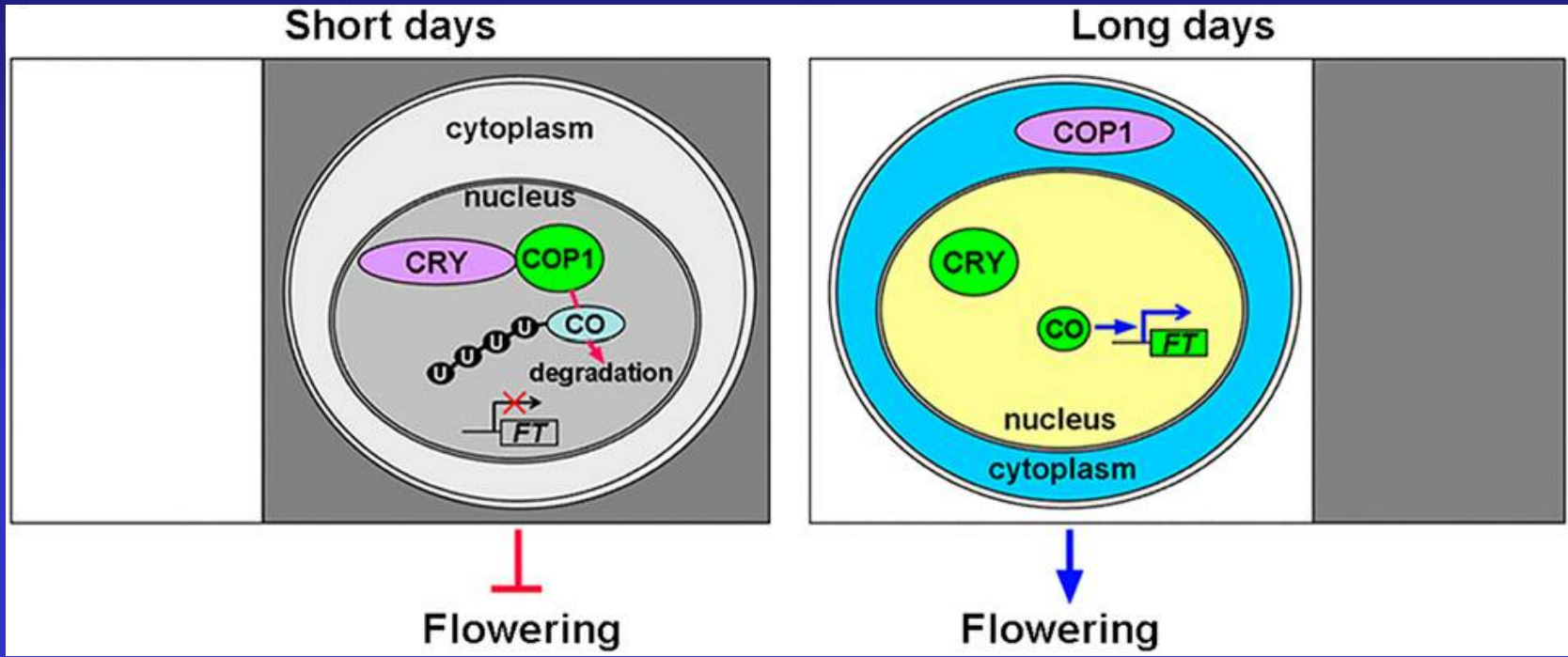
Konstrukt: silný promotor 35S + gen CO



Kvetení indukováno i za krátkého dne



CO funguje jako transkripční faktor i jako co-aktivátor



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

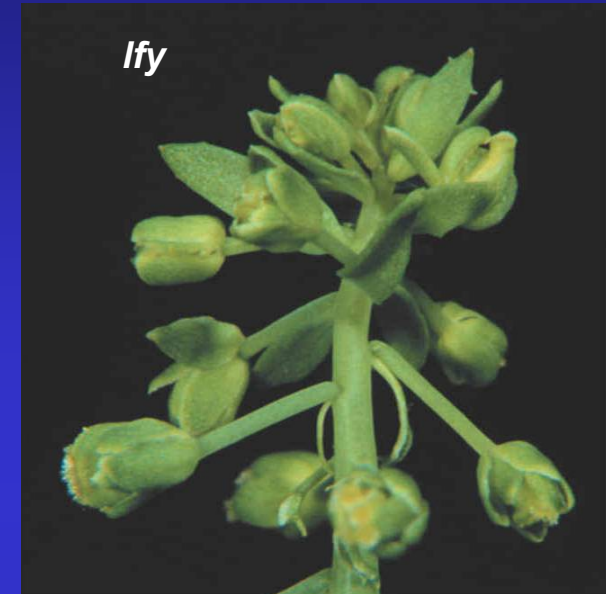
LEAFY (LFY)

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



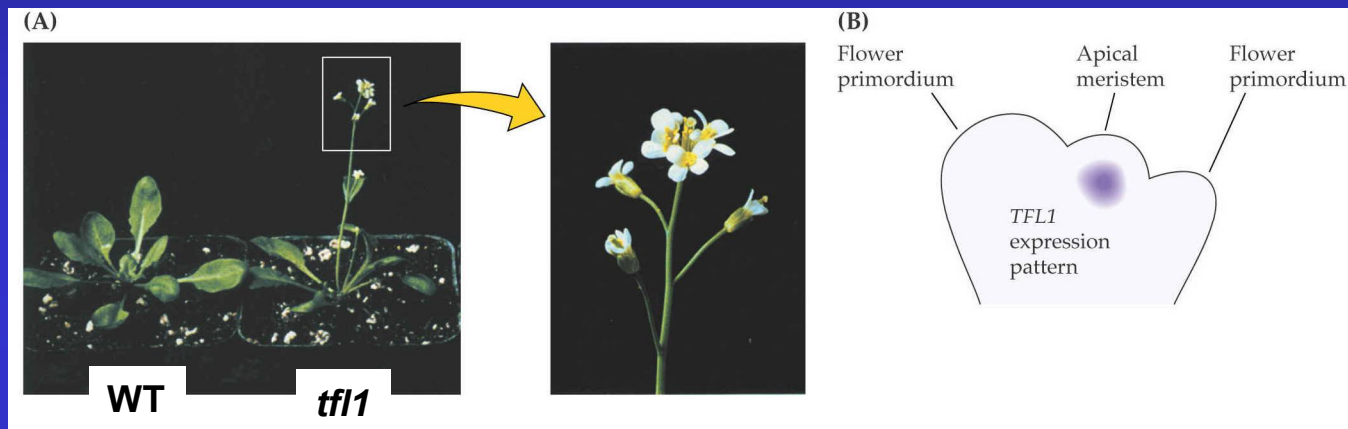
Normální funkce *LFY* = **přepíná**
nedeterminovaný růst
na **determinovaný**



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**: **udrzuje** nedeterminovaný růst

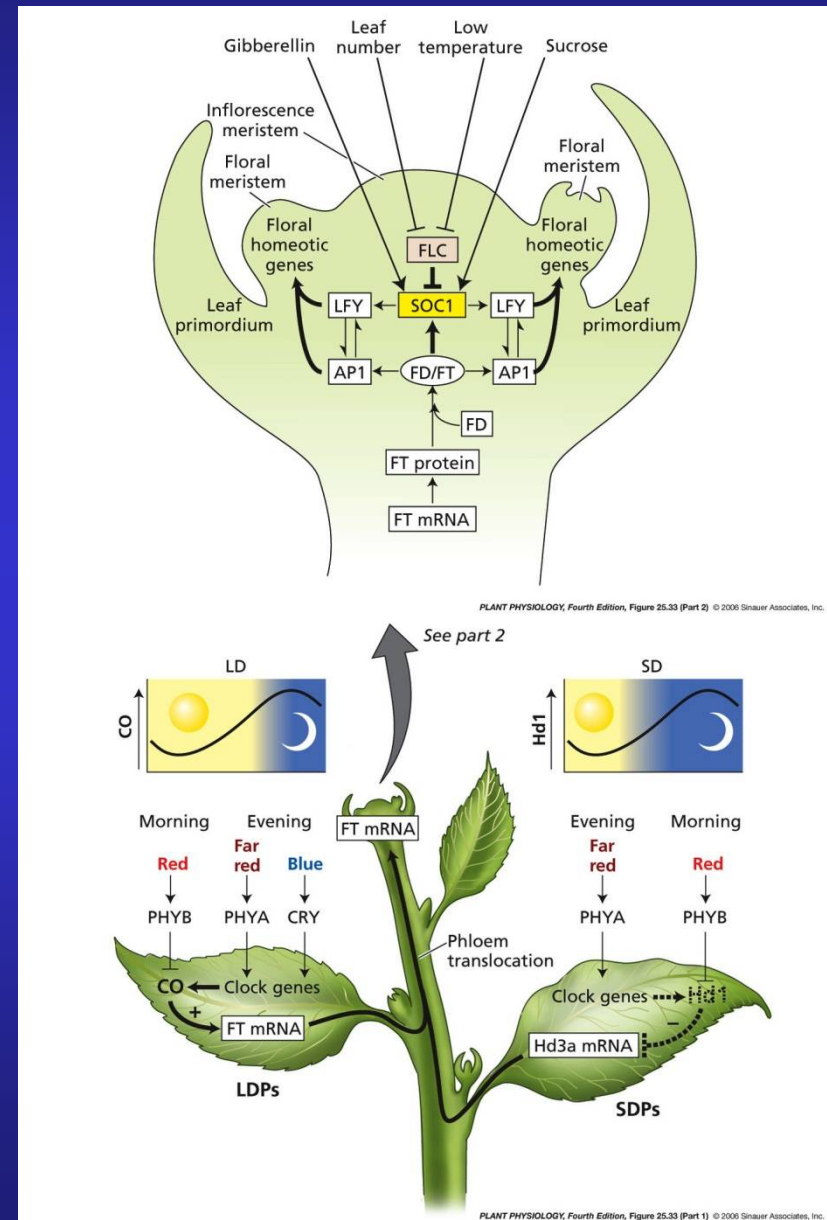
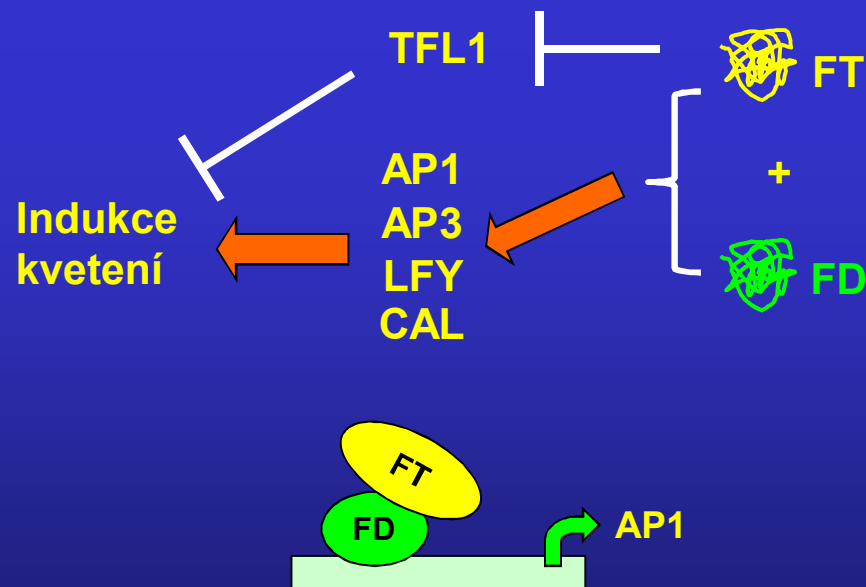


Indukce kvetení – 5 vývojových drah

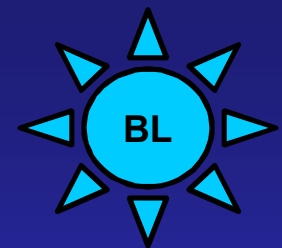
1. Fotoperiodická

Fytochromy, kryptochromy, *CO*, *FT*, mRNA *FT*, *FT*/*FD* protein, *SOC1*)

SOC1 = **S**uppressor **O**f **C**onstans**1**;
transkripční faktor obsahující MADS box



Dlouhý den



FKF1 + ZTL1 + GI



CO (CONSTANS)



FT (FLOWERING LOCUS T)



Expresse FT

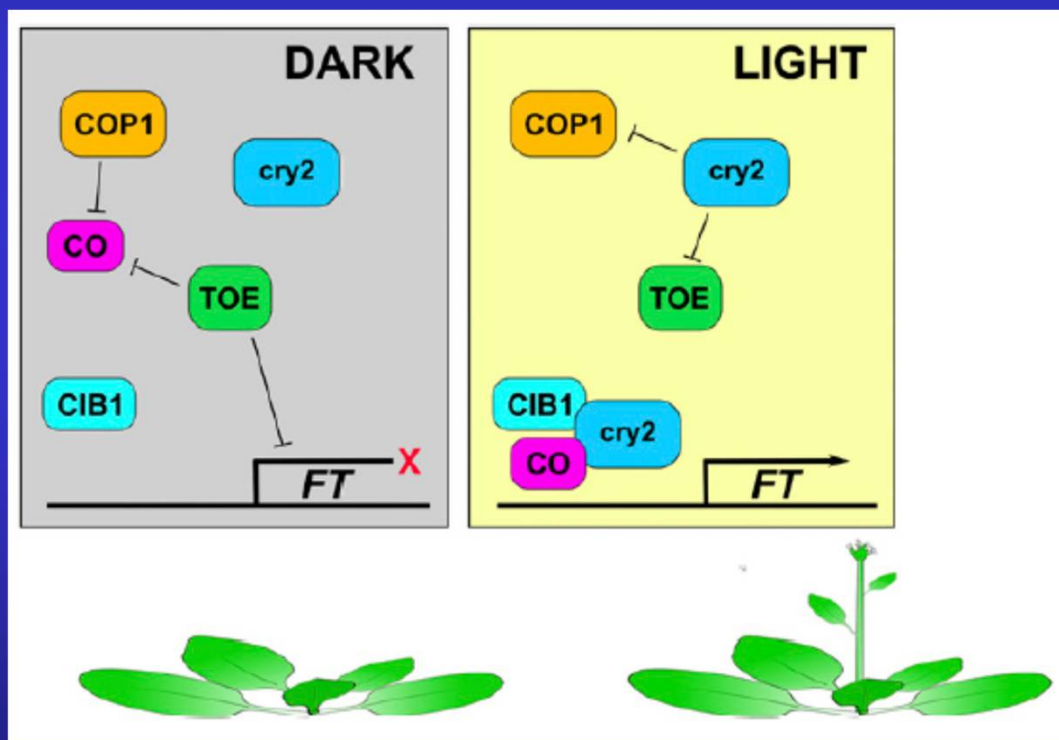


FKF1 a ZTL1 receptory interagují s proteinem GIGANTEA a komplex stabilizuje protein CONSTANS. Stabilizace je posilována modrým světlem.

UPDATE 2020

Du S-S et al. (2020) Plant Physiology 184: 487-505

Molekulární mechanismus indukce kvetení prostřednictvím kryptochromu CRY2 a jeho interakce s TOE



TOE (Target Of Eat) = transkripční faktor ze skupiny AP2-like; blokuje expresi FT

CRY2 inhibuje TOE a redukuje jeho interakci s CO

CIB1 (CRY2 INTERACTING bHLH 1)

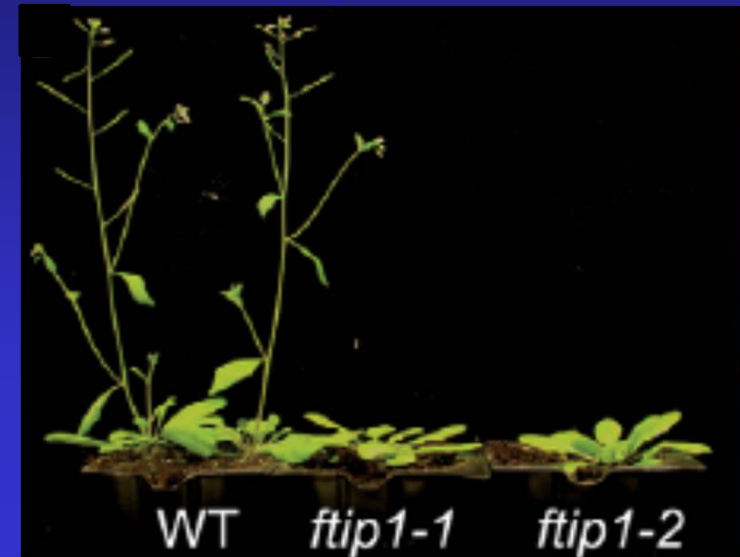
UPDATE 2012

Liu L et al. (2012) Plos Biology 10(4): e1001313.

FTIP1 = FT-INTERACTING PROTEIN 1

Lokalizován v ER – nezbytný regulátor nutný pro transport FT; ovlivňuje transport FT floémem do apikálního meristému.

FTIP1 je vyžadován pro transport FT z doprovodných buněk do sítkovic a tak ovlivňuje transport FT floémem do apikálního meristému.



Ztráta funkce FTIP1 vede za dlouhého dne ke zpožděnému kvetení.

UPDATE 2016

Zhu Y et al. (2016) Nature Plants, May 26, art. no. 16075

CONSTANS aktivuje **NaKR1** protein. NaKR1 reguluje pohyb FT na dlouhou vzdálenost až do stonkového vrcholu

NaKR1 - SODIUM POTASSIUM ROOT DEFECTIVE 1

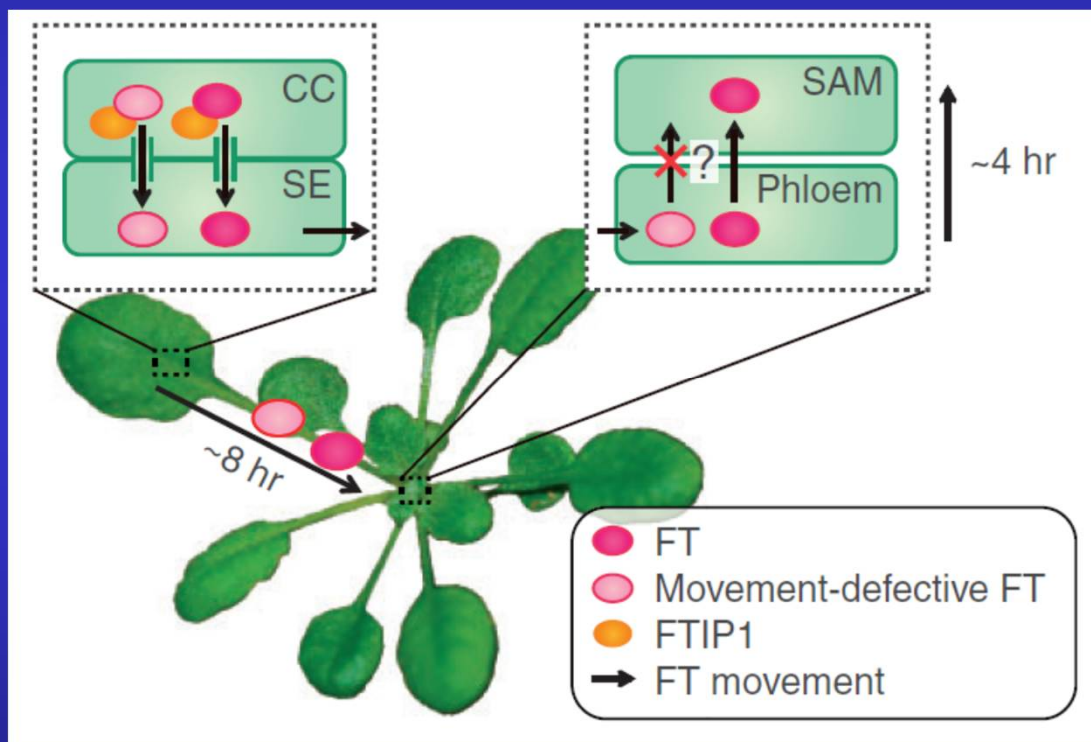
NaKR1 – protein obsahující heavy-metal-associated (HMA) doménu; typ proteinu s důležitou úlohou v transportu iontů kovů do specifických míst buňky

UPDATE 2018

Endo M et al. (2018) Plant Cell Physiol 59: 1621-1629

Lee N and Imaizumi T (2018) Plant Cell Physiol 59: 1487-1489

Časový průběh pohybu FT z doprovodných buněk floému (CCs) v listech do stonkového apikálního meristému (SAM).



Aminokyseliny **V70**, **S76** a **R83** – missense mutace vedou ke ztrátě pohyblivosti FT z floému do stonkového apikálního meristému. Tyto mutované FT si však uchovávají schopnost regulace kvetení.

2. Autonomní a vernalizační

Autonomní

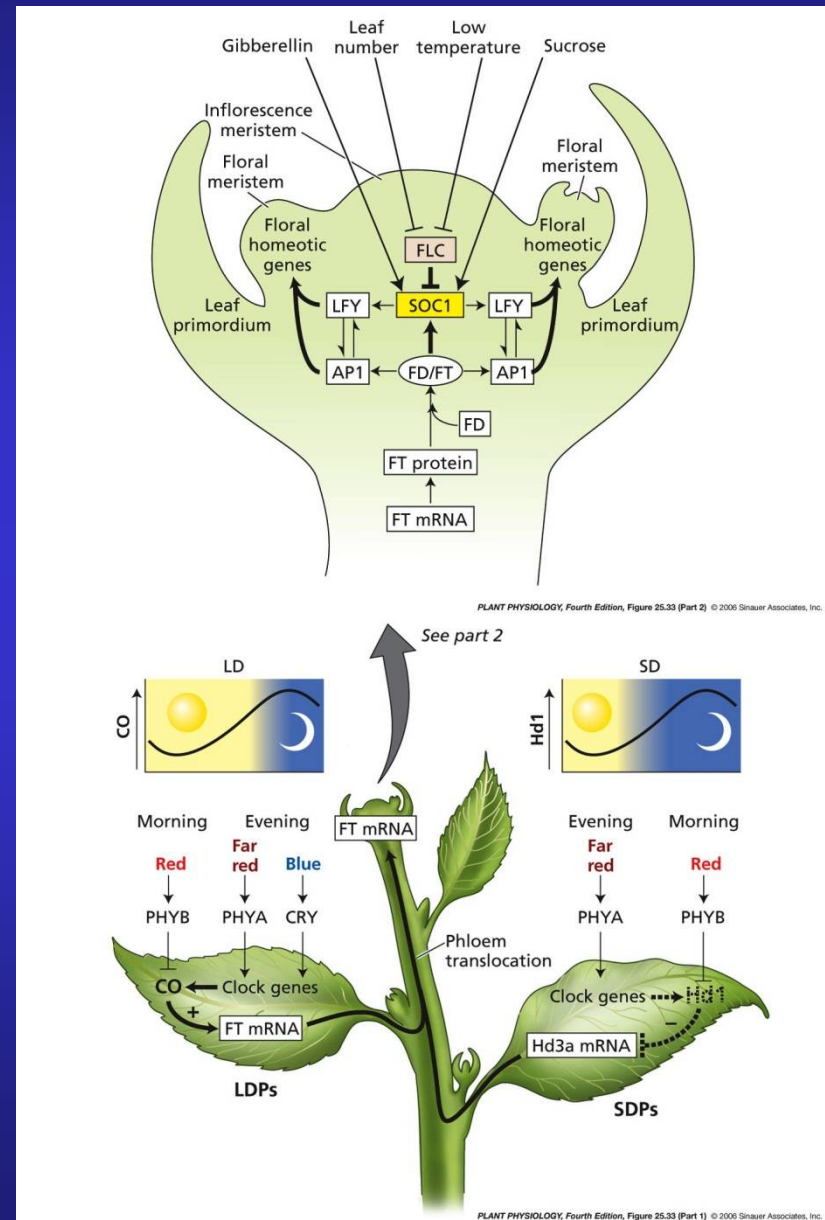
Interní signály = počet listů – redukuje expresi *FLOWERING LOCUS C (FLC)* => stimulace *SOC1*

Vernalizační: nízká teplota
Redukce represoru *FLC* => stimulace *SOC1*

Pokud nedojde k vernalizaci, tak je kvetení blokováno proteinem FRIGIDA, který stimuluje FLC.

UPDATE 2016

Nízká teplota rovněž přímo indukuje expresi genů *CONSTANS* a *FT*.



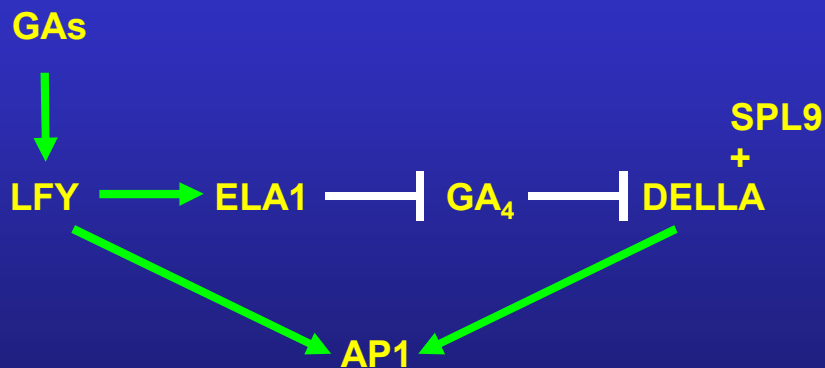
3. Karbohydrátová

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

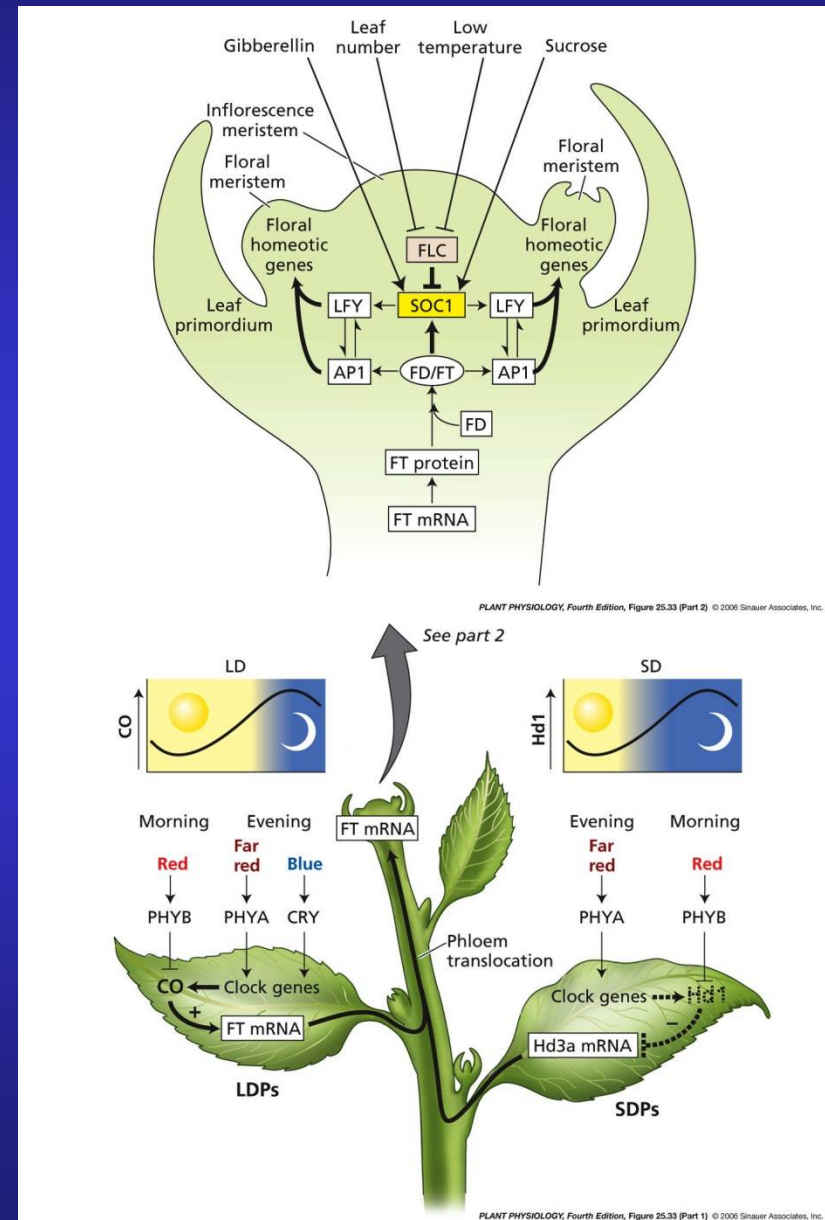
4. Giberelinová

Vyžadována pro předčasné kvetení a pro kvetení za krátkého dne

- GAs indukují transkripční faktor typu GAMYB => stimulace **LFY** => přepnutí do generativní fáze
- GAs interagují přímo se **SOC1** => aktivace **LFY**
- aktivním giberelinem je GA_4



ELA1 = EUI-LIKE P450 A1 – cytochrome P450, katabolizuje GA_4

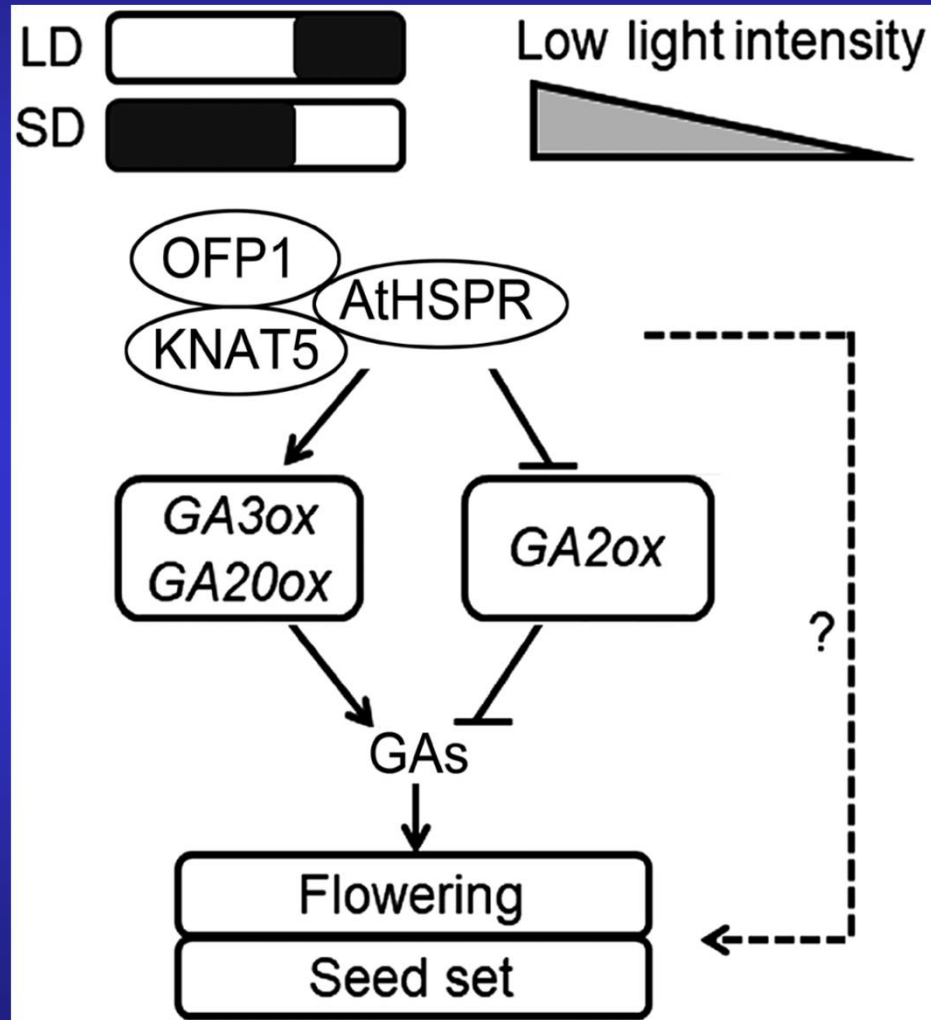


PLANT PHYSIOLOGY, Fourth Edition, Figure 25.33 (Part 2) © 2006 Sinauer Associates, Inc.

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

UPDATE 2020

Yang T et al. (2020) Journal of Experimental Botany 71: 3543-3559



AtHSPR – Heat Shock Protein-Related

- stimulován nízkou intenzitou světla

GA biosyntetické geny

GA3ox = giberellin 3-oxidáza

GA20ox = giberellin 20-oxidáza

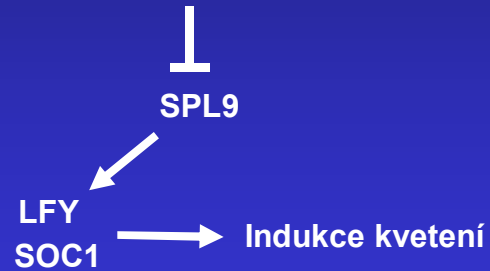
GA deaktivující gen

GA2ox = gibberellin 2-oxidáza

5. Věková

- odráží věk rostliny

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



Dráhy 1 – 5 se soustřeďují v **SOC1**

Indukce LFY a AP1

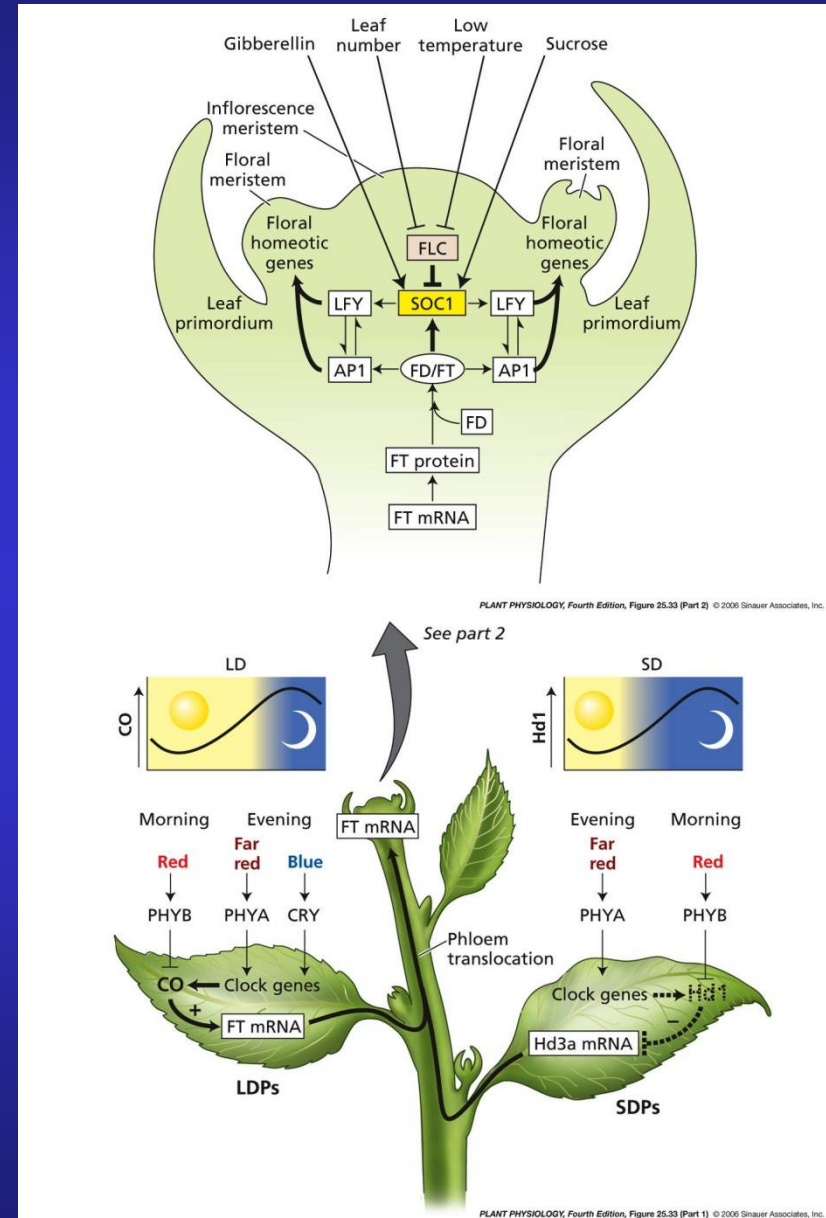
Indukce květních homeotických genů (**model ABC**)

UPDATE 2015

Song YH et al. (2015) *Annu Rev Plant Biol* 66: 441-464

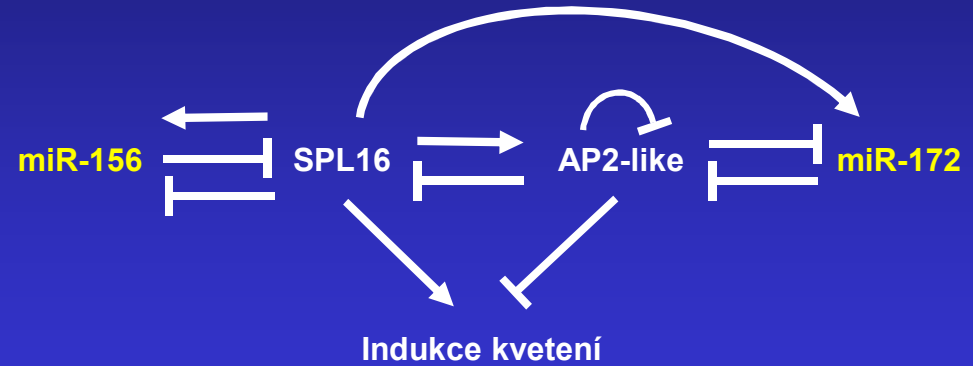
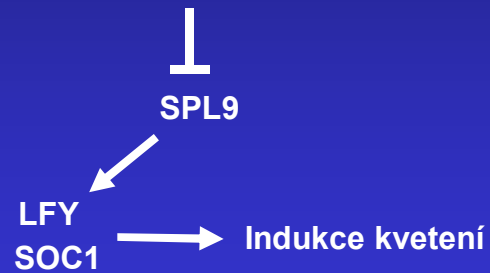
Matsoukas IG (2015) *Essays Biochem* 58: 133-149

Johansson M, Staiger D (2015) *J Exp Biol* 66: 719-730

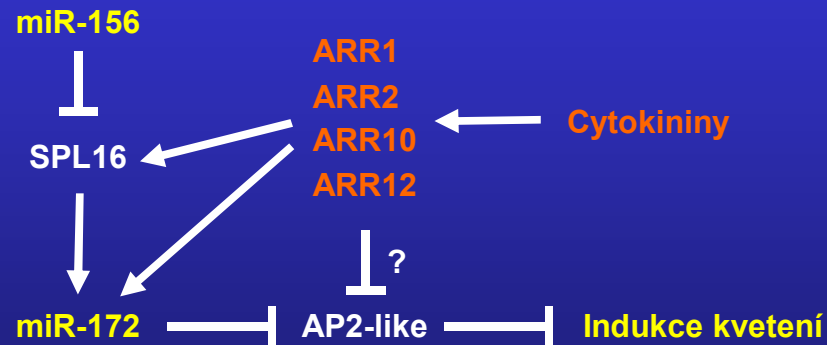


Zapojení hormonů cytokininů ve věkové dráze indukce kvetení

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



Jak jsou v tomto procesu zapojeny cytokininy?



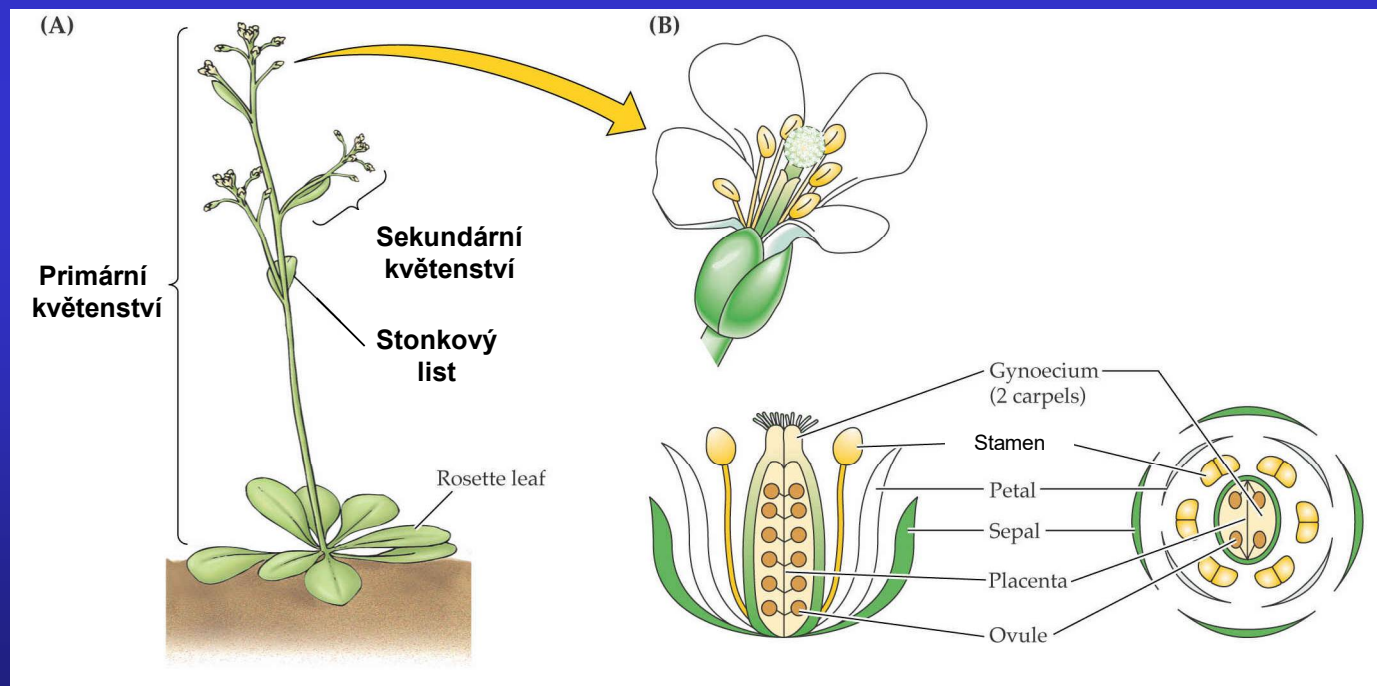
Prof. Thomas Schmülling (Berlin University)
(přednáška 12.9. 2019, PšF Holice)

b) Vývoj květu – stručná morfologie

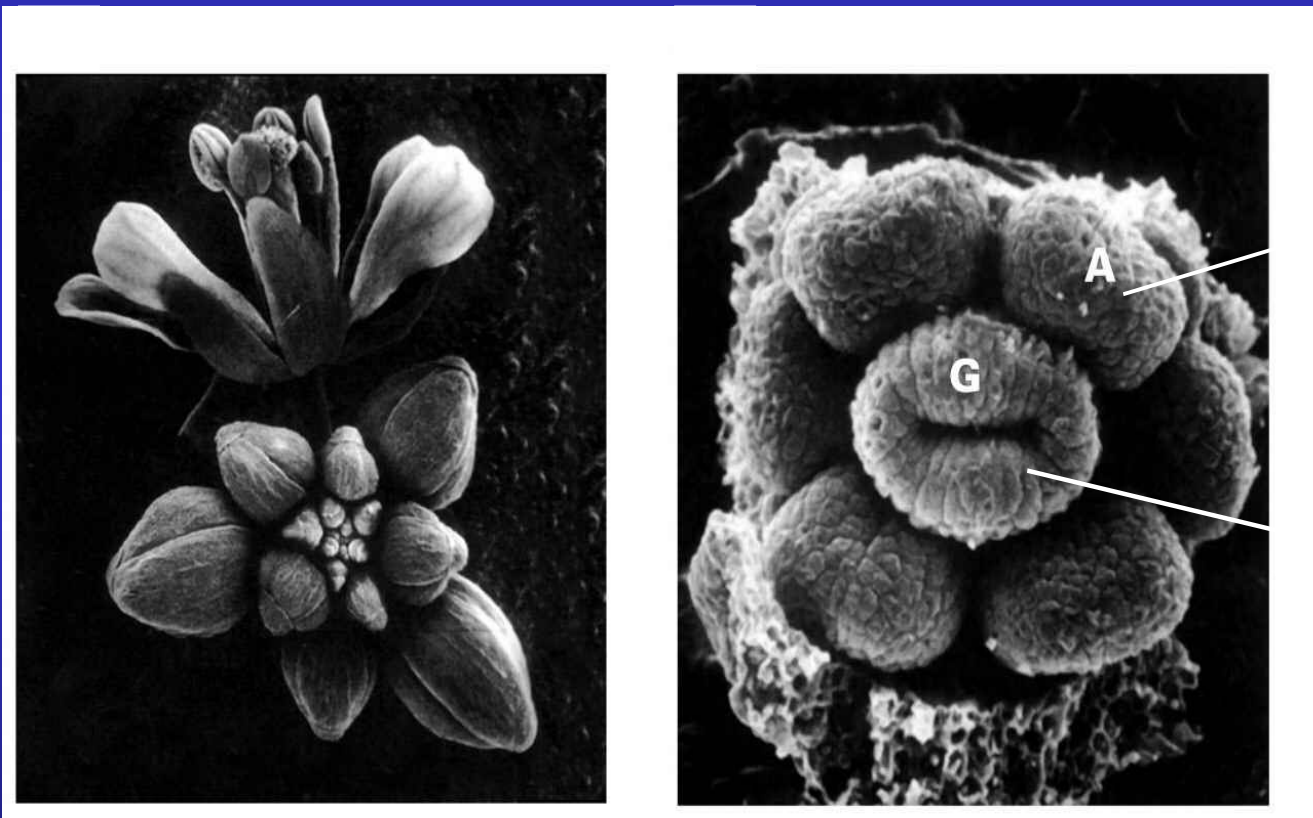
Modelová rostlina *Arabidopsis* => 1. přednáška MBR

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

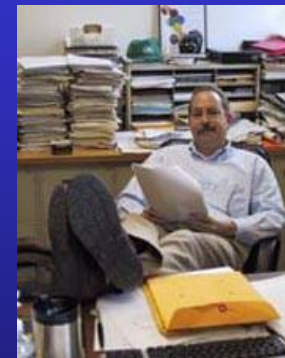
Bowman JL et al. (1991) Development 112: 1-20



Prof. M. Koornneef
(Wageningen, Holandsko)



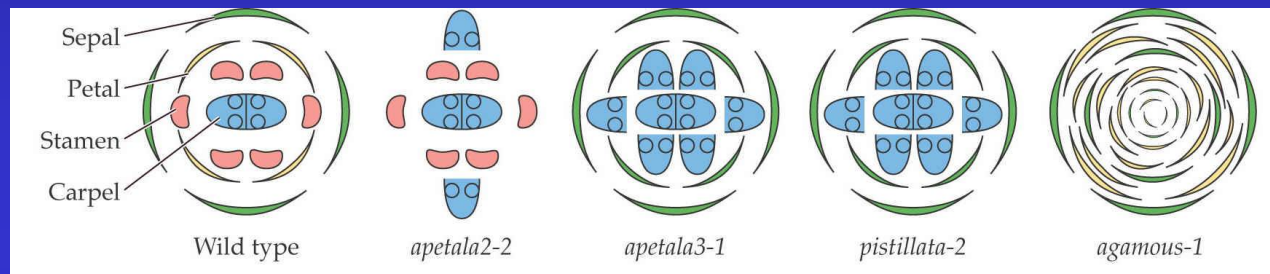
Prof. John Bowman
(Melbourne, Austrálie),



Prof. Elliot Meyerowitz
(Pasadena, CA, USA)

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* :

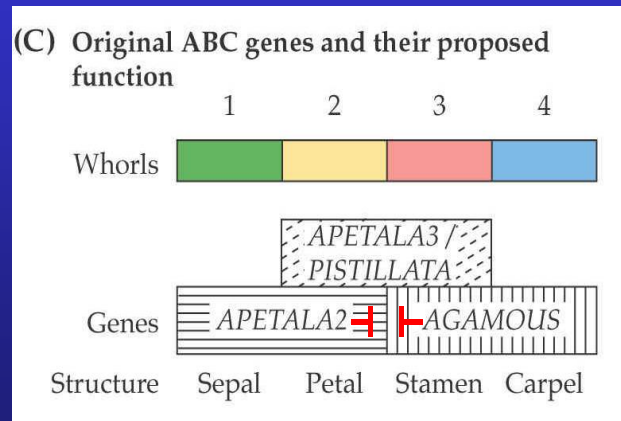
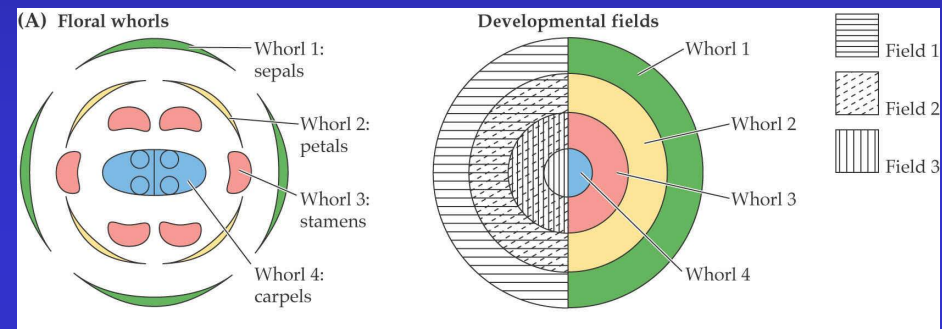
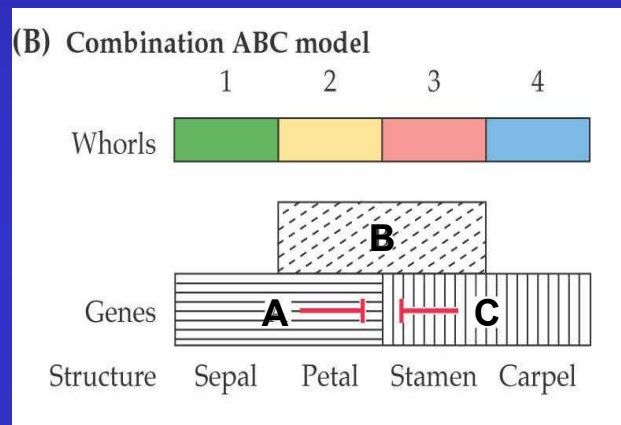
Mutant *pi* : **petals** \longrightarrow **sepals** **stamens** \longrightarrow **carpels**

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

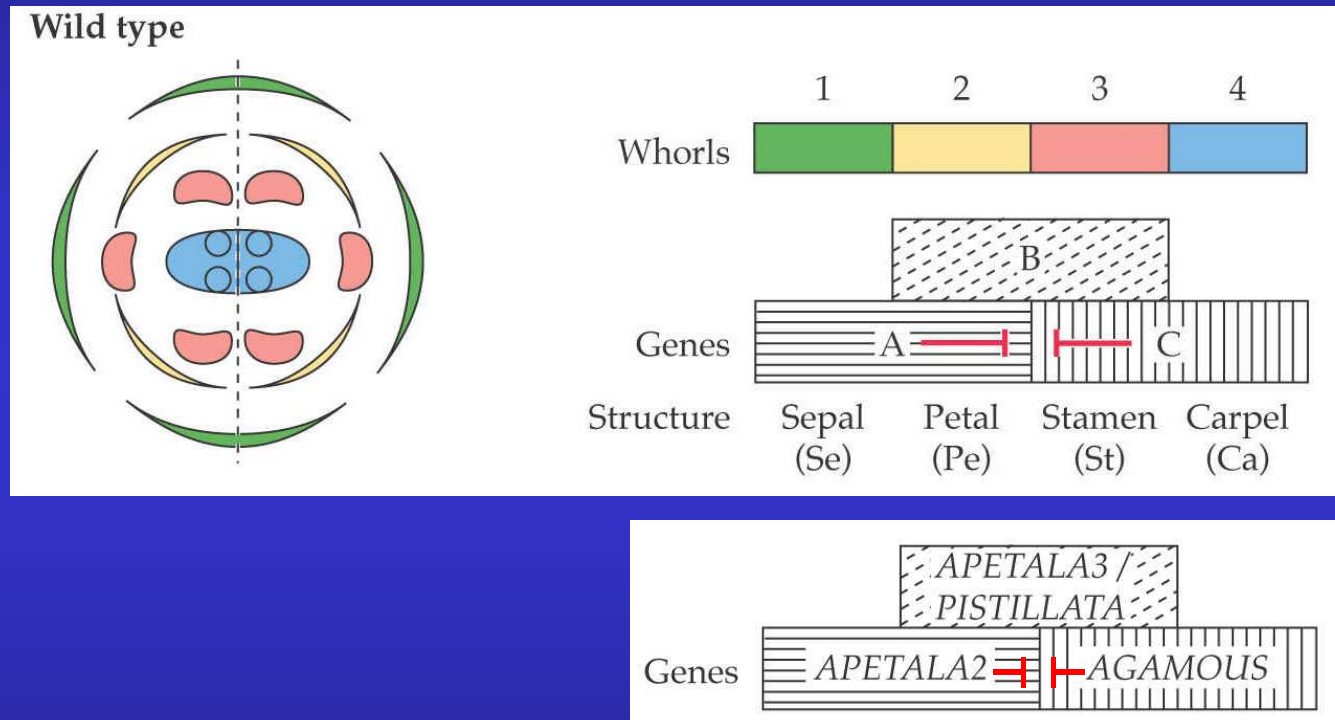


AP2 řídí pole A = **sepals** + **petals**

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

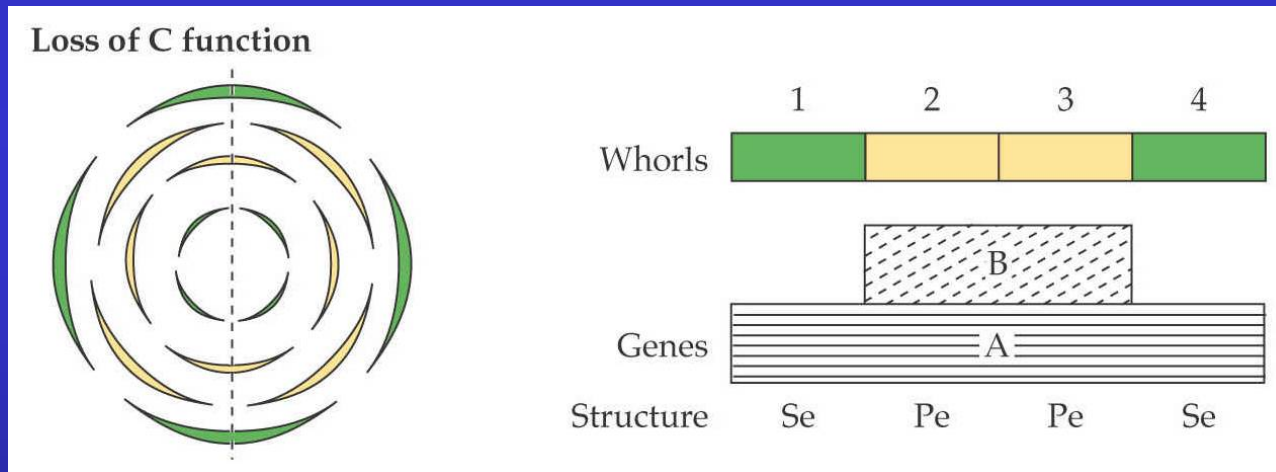
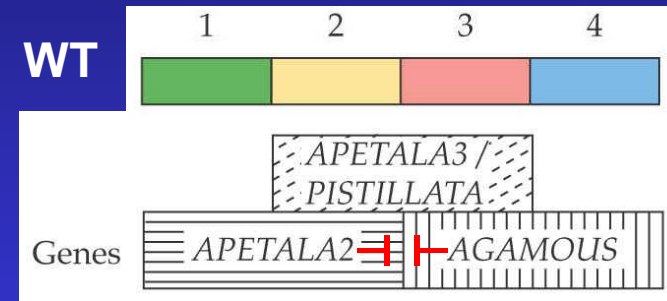
AG řídí pole C = **stamens** + **carpels**

ABC model vysvětluje vývoj jednotlivých orgánů v mutantech



WT : všechny geny fungují normálně

ABC model vysvětluje vývoj jednotlivých orgánů v mutantech

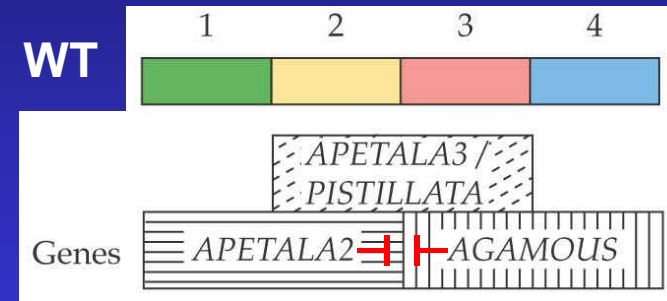


ag

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

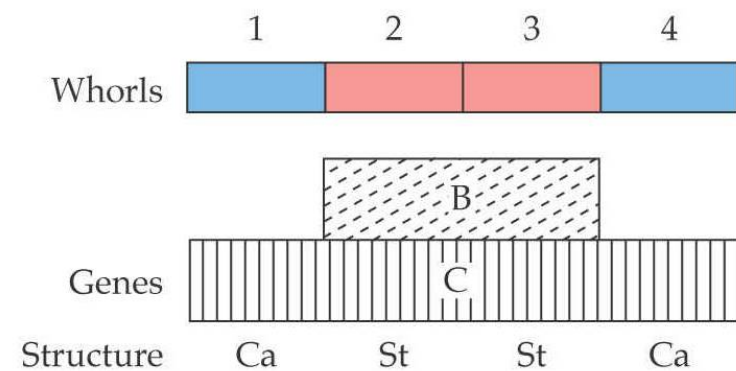
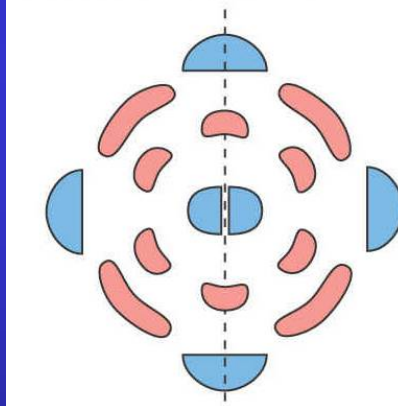
3 a 4 => **stamens** → **petals** **carpels** → **sepals**

ABC model vysvětluje vývoj jednotlivých orgánů v mutantech



Loss of A function

ap2



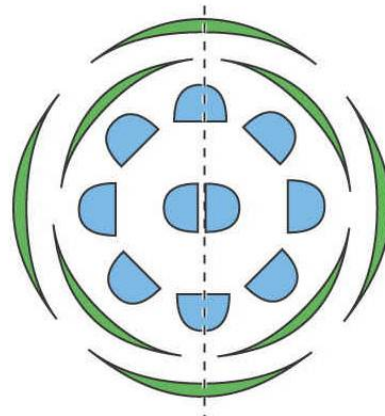
AP2 gen je off \Rightarrow *AP2* nepůsobí proti *AG* \Rightarrow *AG* expanduje do části

1 a 2 \Rightarrow **sepals** \longrightarrow **carpels** **petals** \longrightarrow **stamens**

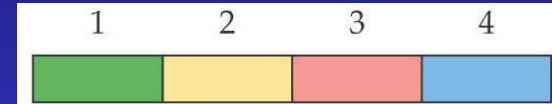
ABC model vysvětluje vývoj jednotlivých orgánů v mutantech

ap3 / pi

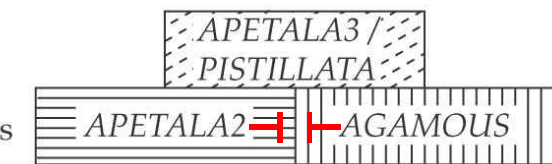
Loss of B function



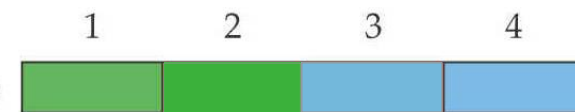
WT



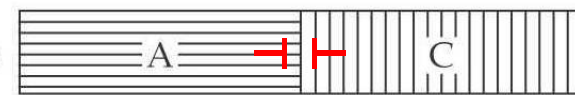
Genes



Whorls



Genes

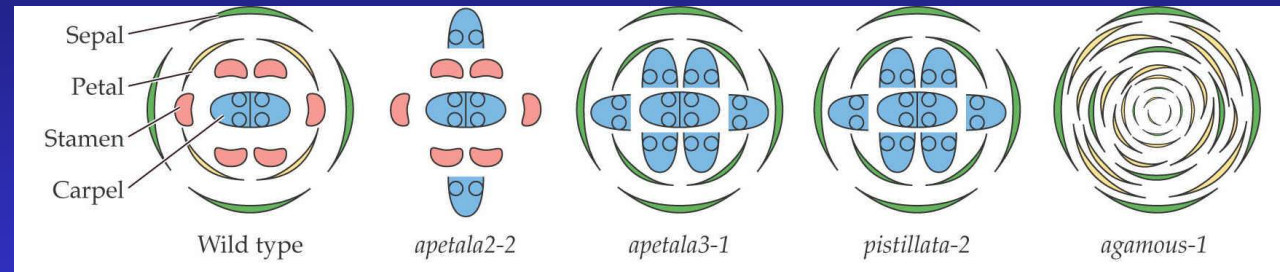


Structure

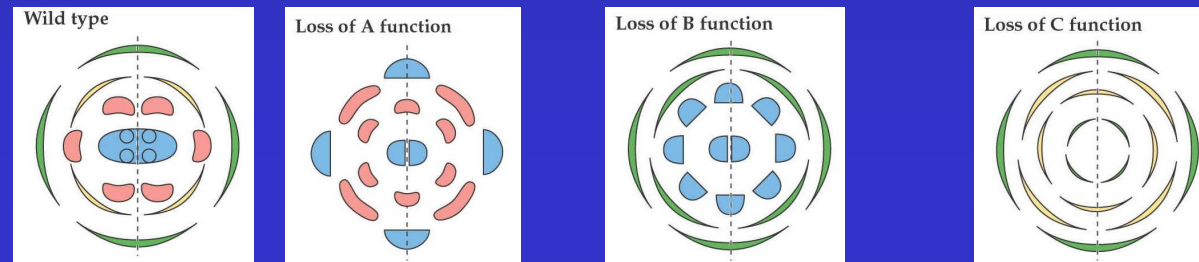
Se Se Ca Ca

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

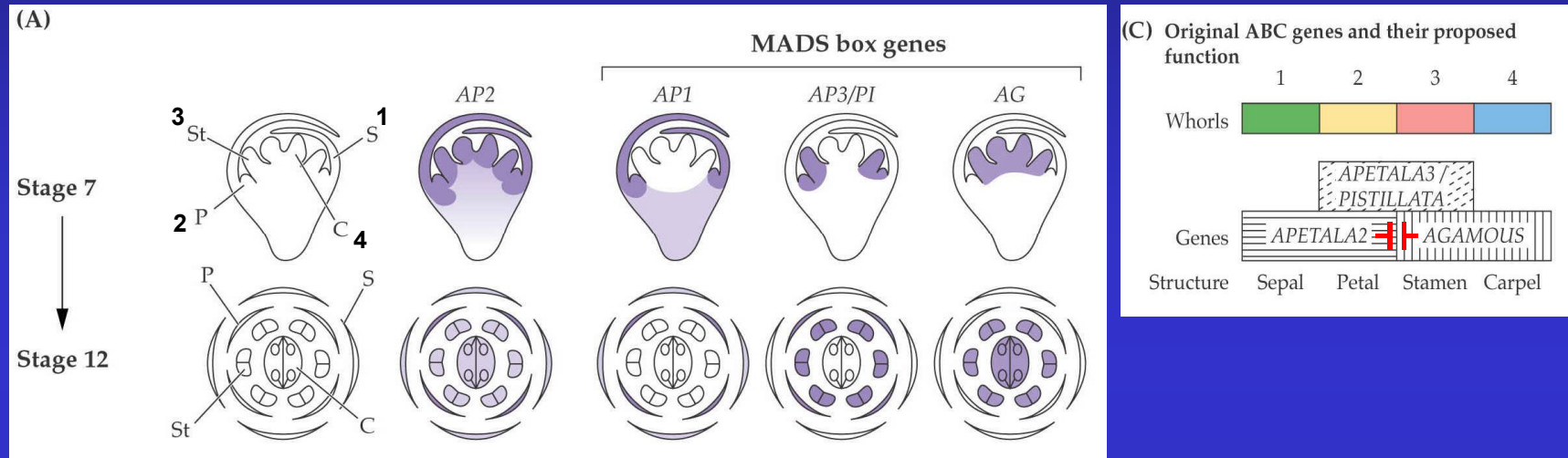
↓
Odchylka od pozorovaného fenotypu

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



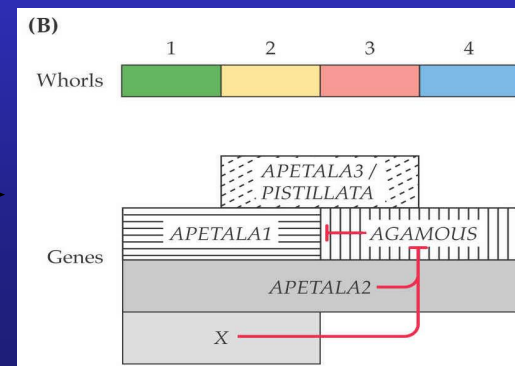
Expresí AP2 v 1 a 2 **OK. Ale**, expresí v 3 a 4 nečekaná; model předpokládá potlačení vlivem AG

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

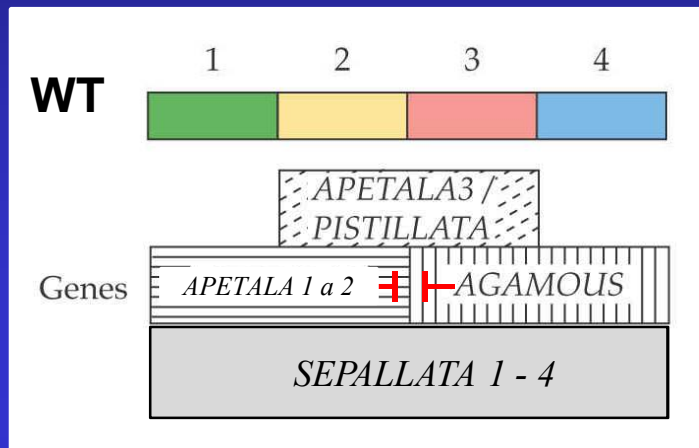
OK, AP3 / PI je exprimován ve 2 a 3

OK, AG je exprimován ve 3 a 4

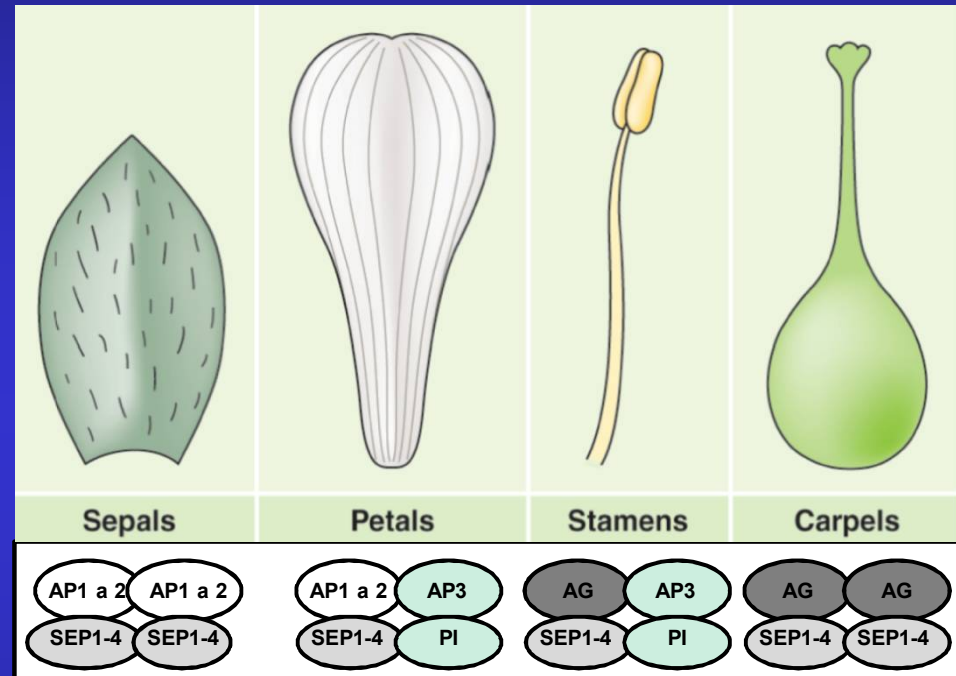
Revize modelu: neznámý gen X + gen AP1



Další revize ABC modelu – model ABCE



Quadruple mutant *ap1/ap2/ap3/pi/ag*

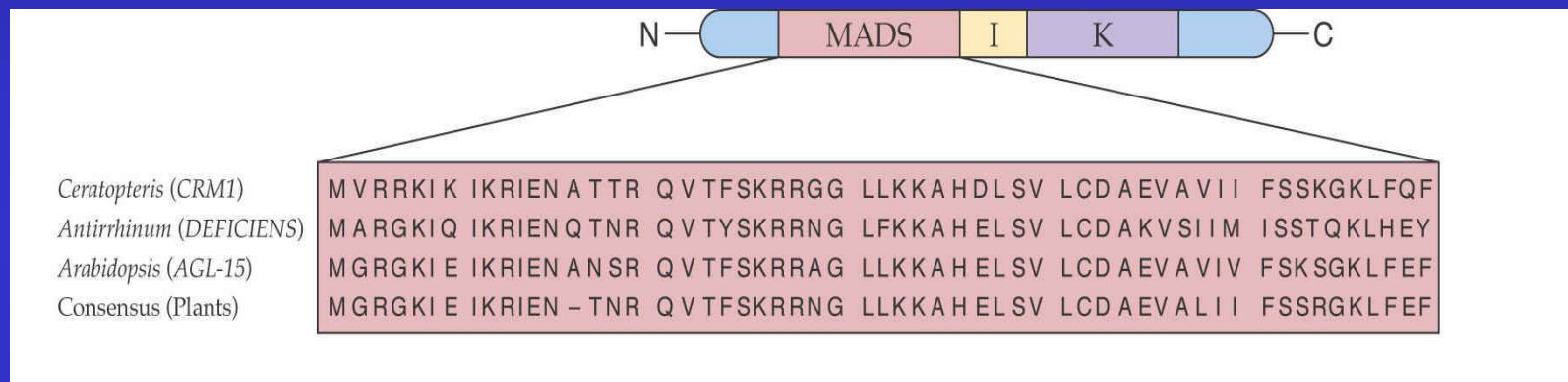


Biochemický **Quartet model** specifikace květních orgánů u *Arabidopsis* – interakce proteinů

Proteiny fungují většinou jako tetramery.

Produkty homeotických genů = proteiny

AG, PI, AP1, AP3, SEP 1-4 – skupina evolučně konzervovaných transkripčních faktorů. Každý z nich obsahuje konzervovanou DNA-binding doménu: **MADS box**.



Homeotické proteiny se váží MADS doménou k sekvenci **CC(AT)₆GG** (nazývaná **CArG-box**) = regulační oblast na terčových genech pro květní orgány.

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.

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