

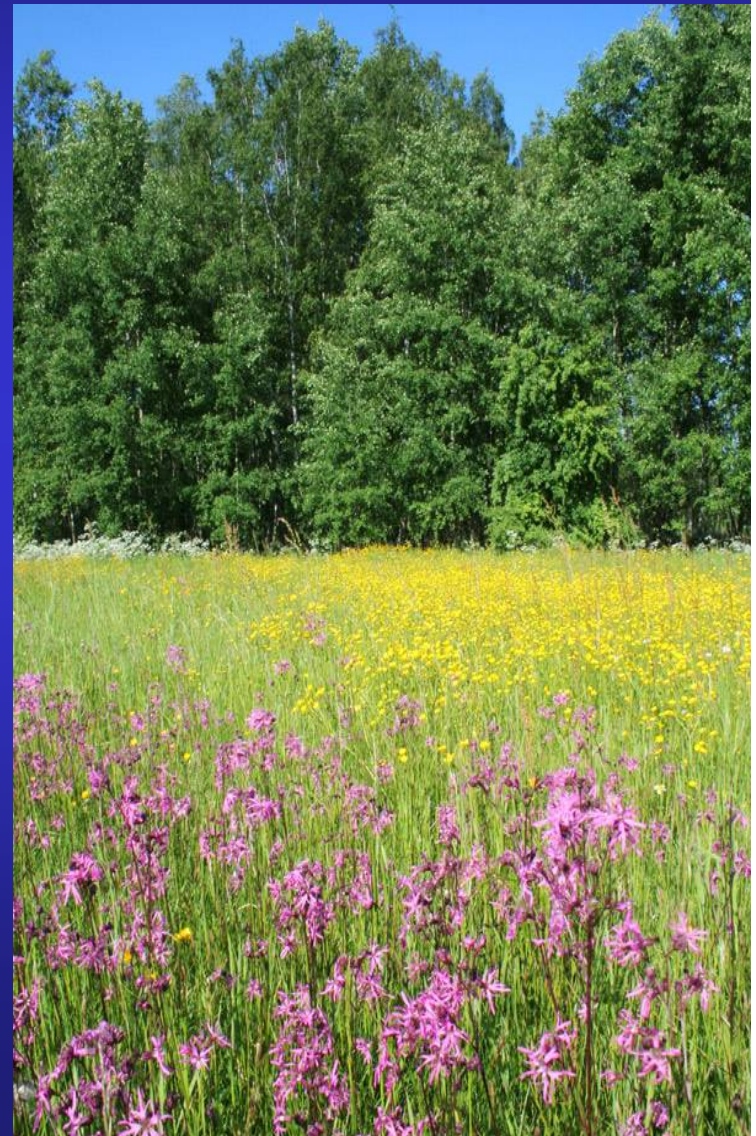
4) Reprodukce rostlin

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

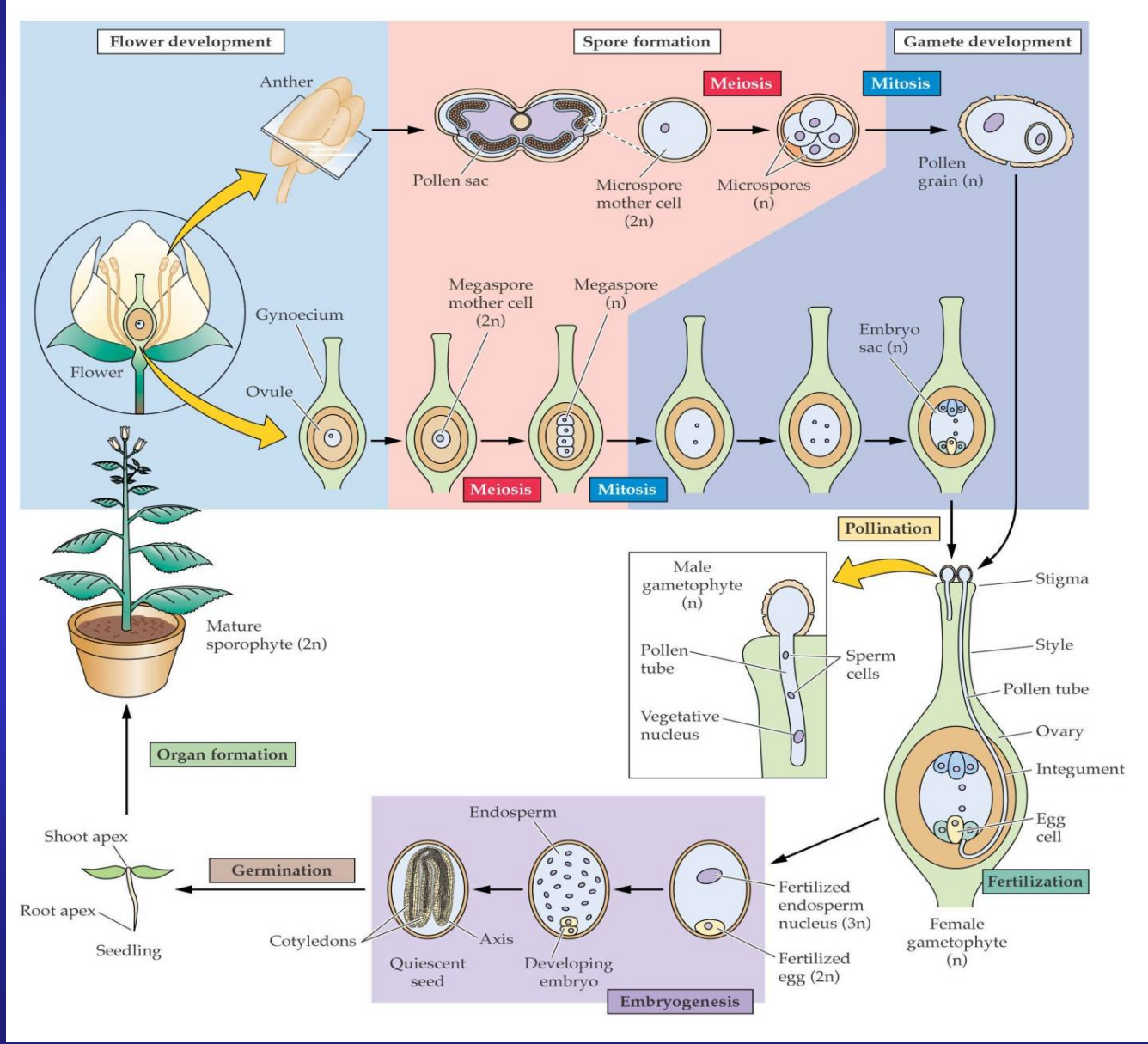
Martin Fellner

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

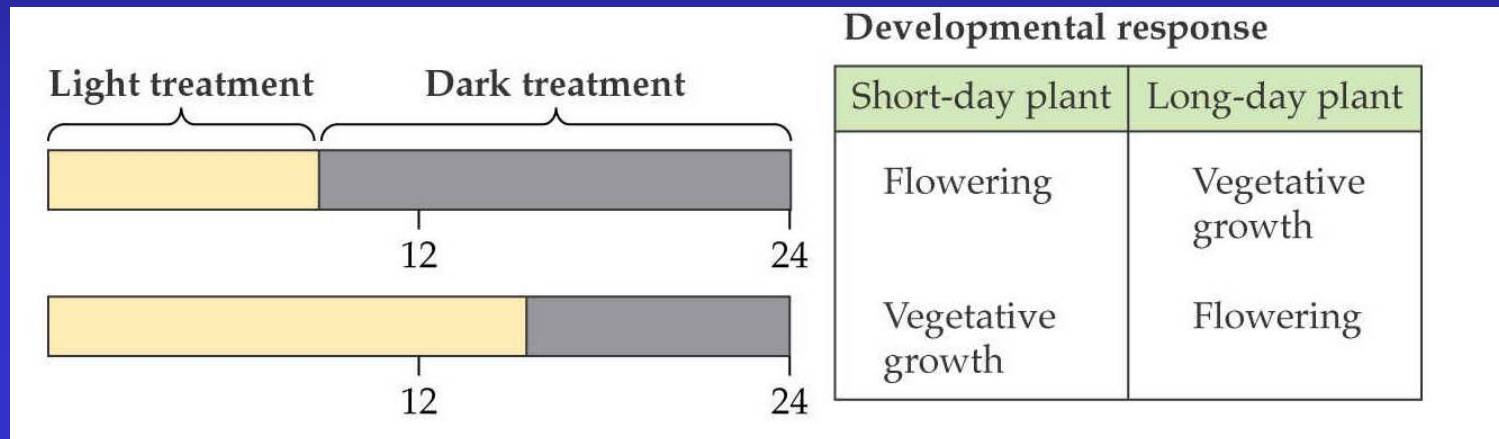


Update 2024

Maple R et al. (2024) *Plant Physiology* 195: 1901-2012

Nejnovější review o indukci kvetení.

Kvetení je indukováno fotoperiodou = poměrem mezi délkou dne a noci

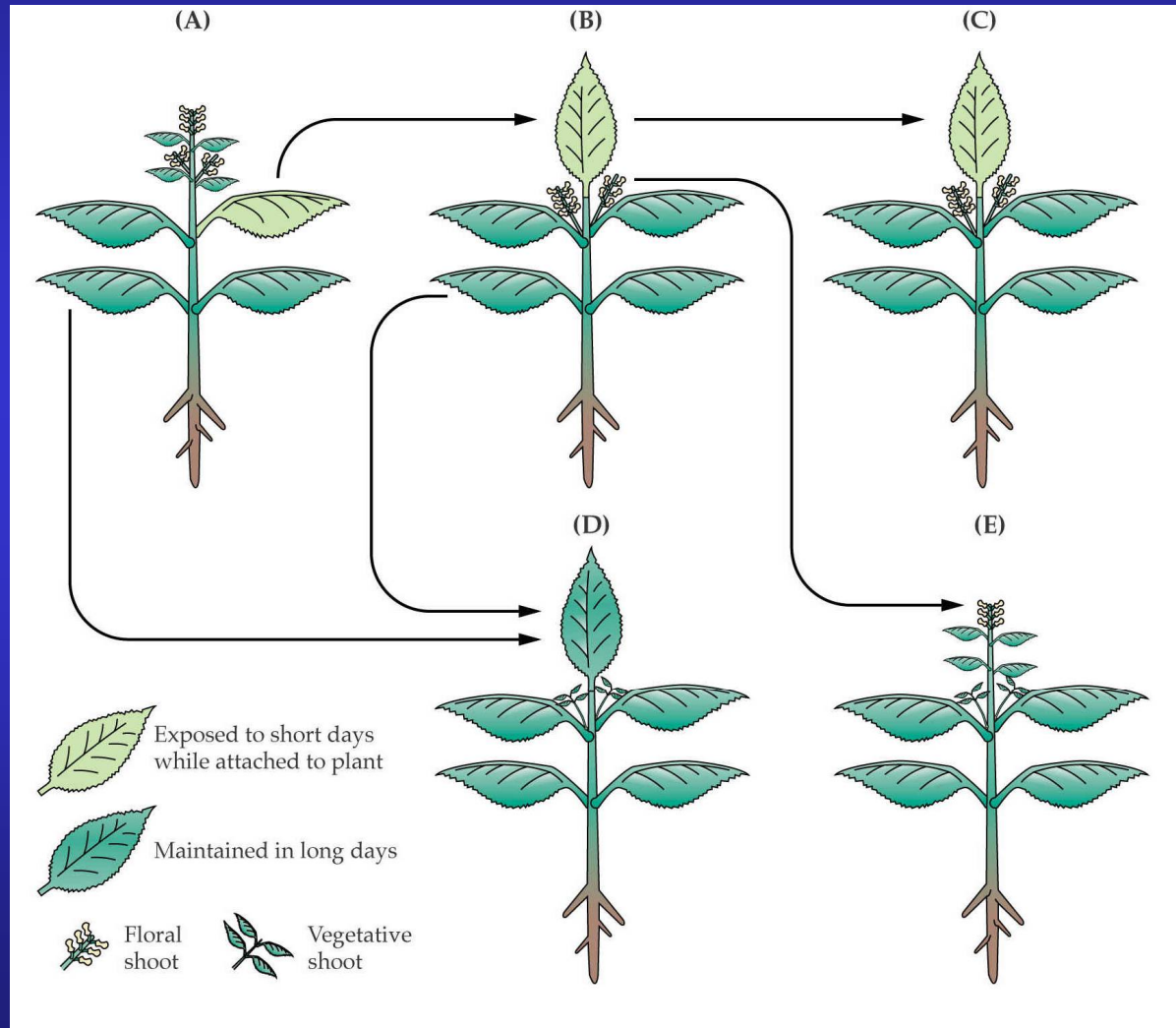


Krátkodenní rostliny – kvetení je indukováno krátkým dnem a dlouhou nocí (např. chryzantémy, odrůdy jahod, špenát)

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*

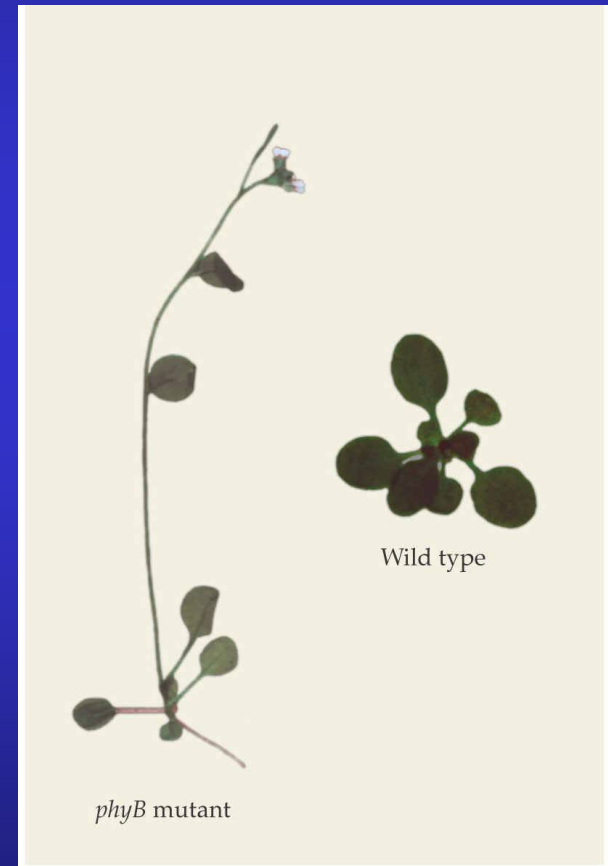


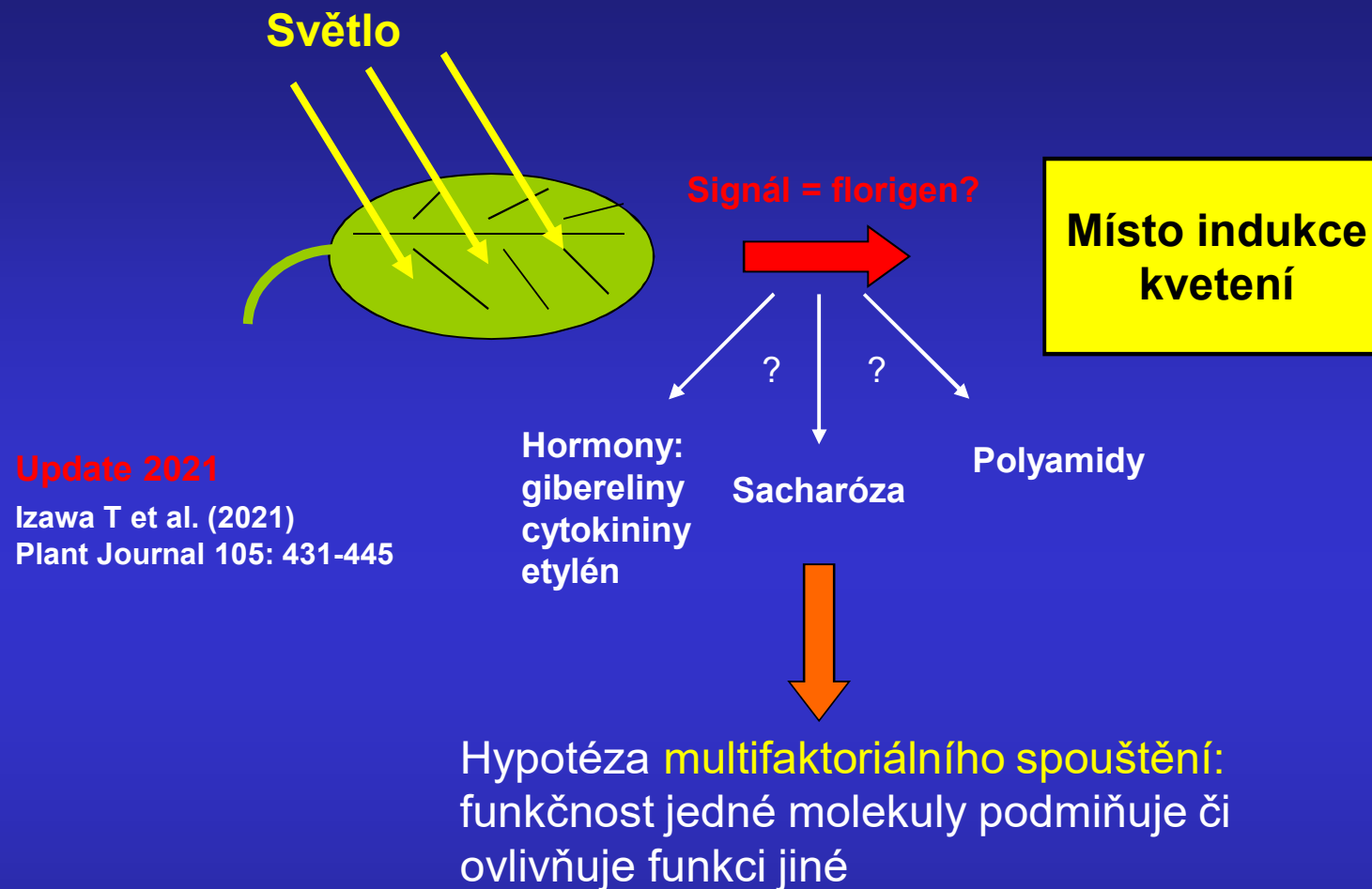
Kvetení je složitý proces



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)

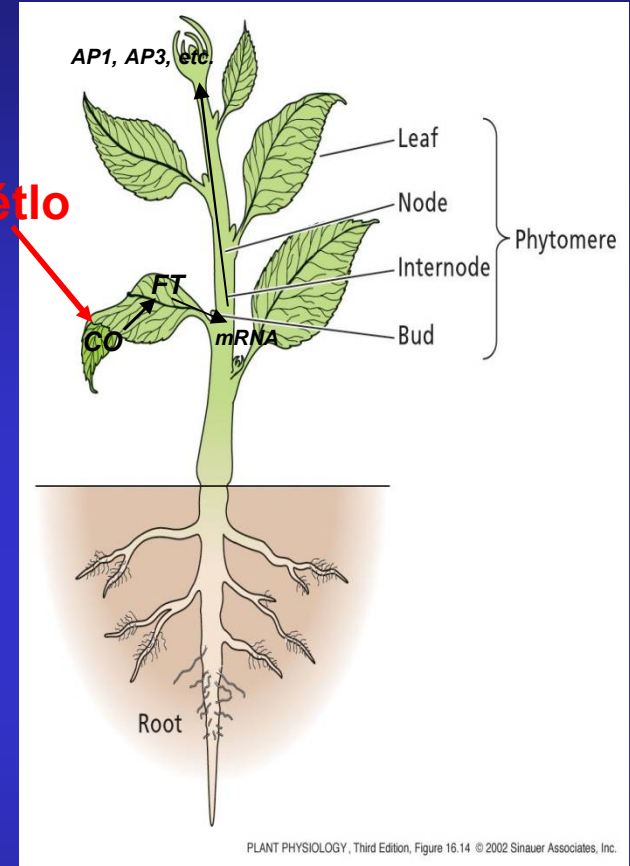
CO (CONSTANS)



mRNA of FT



Světlo



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

FT (FLOWERING LOCUS T)

Expres FT

mRNA of FT

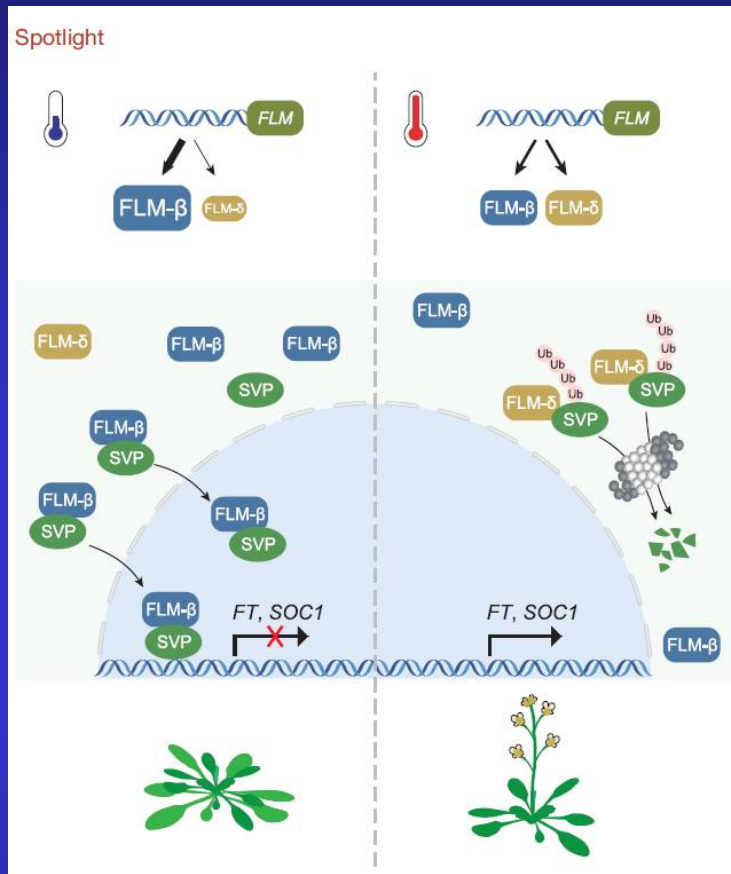
Jaeger KE, Wigge PA (2007) *Cur Biol* 17: 1-5
Mathieu J et al. (2007) *Cur Biol* 17: 1055-1060

Protein FT transportovaný z listů
postačuje k indukci kvetení.



FT protein = FLORIGEN

Vliv okolní teploty na indukci kvetení



Nízká teplota:

SVP přednostně interaguje s FLM-β a tvoří komplex SVP-FLM-β v jádře => potlačení exprese FT a SOC1 => indukce kvetení potlačena.

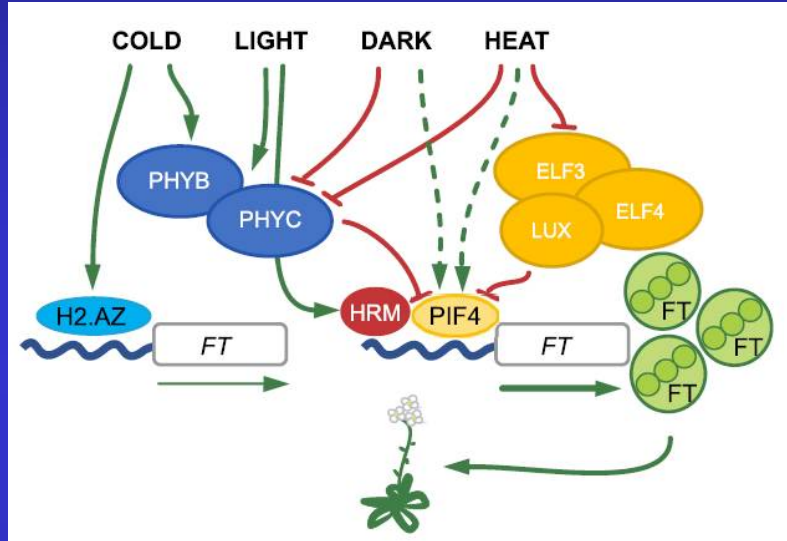
Vysoká teplota:

SVP je spojen především s FLM-δ v cytoplasmě => degradace proteinu SVP ubiquitinací => indukce kvetení.

Transkripční faktory zapojené ve vnímání teploty rostlinou:

SVP = SHORT VEGETATIVE PHASE

FLM-β = FLOWERING LOCUS M



Ke snímání teploty rostlin dochází i prostřednictvím regulace genů, které se rovněž podílejí na snímání světla a cirkadiálních hodinách (ELF3, ELF4, LUX).

HMR = HEMERA – transkripční aktivátor

PIF = PHYTOCHROME-INTERACTING FACTOR4 – transkripční faktor

H2A.Z = histony

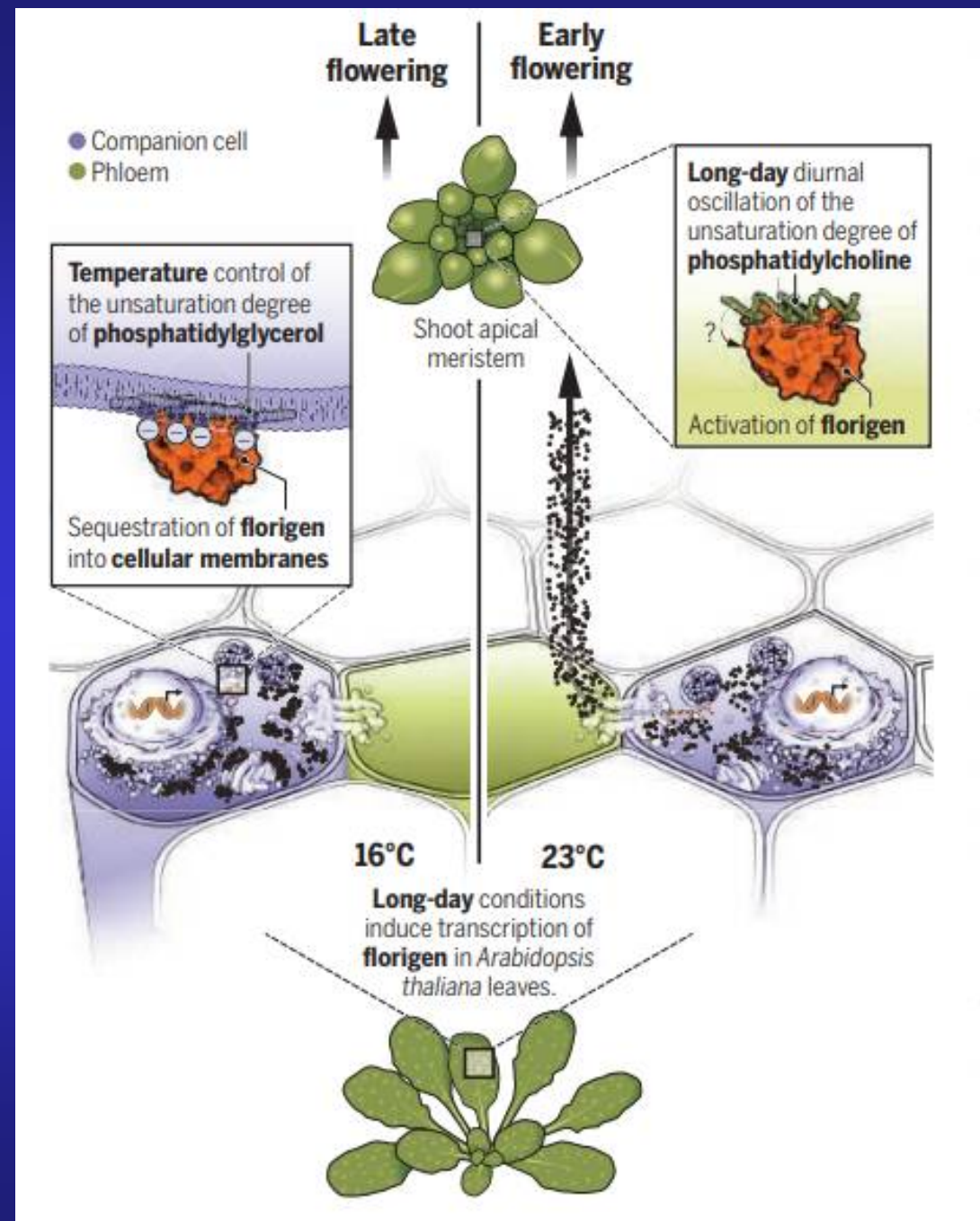
FT = FLOWERING LOKUS T – transkripční aktivátor

Update 2022

Jin S et al. (2022) Molecular Plant 15: 1696-1709
 Xuan L et al. (2022) Molecular Plant 15: 1656-1658

Update 2022

Preston JC and Fjellheim S (2022) Plant Physiology 190: 5-18



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

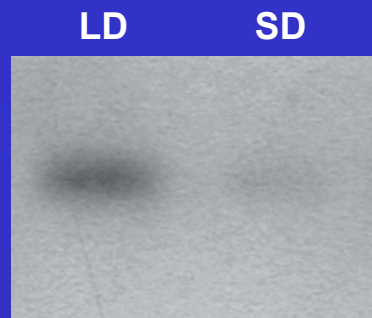


Transport FT do apikálního meristému

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

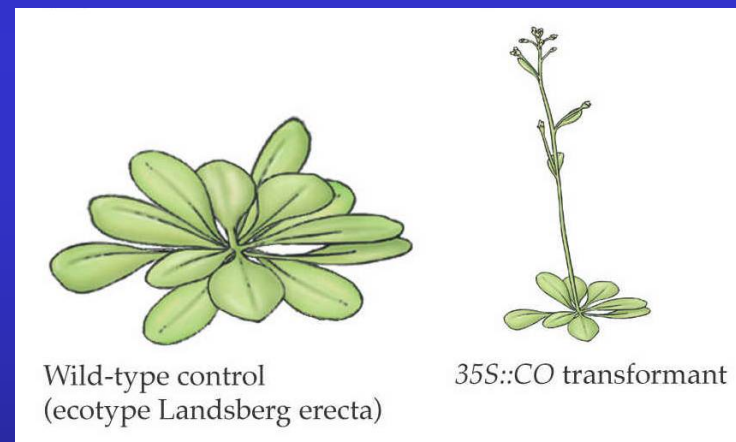


Indukce kvetení

Konstrukt: silný promotor 35S + gen CO



Kvetení indukováno i za krátkého dne

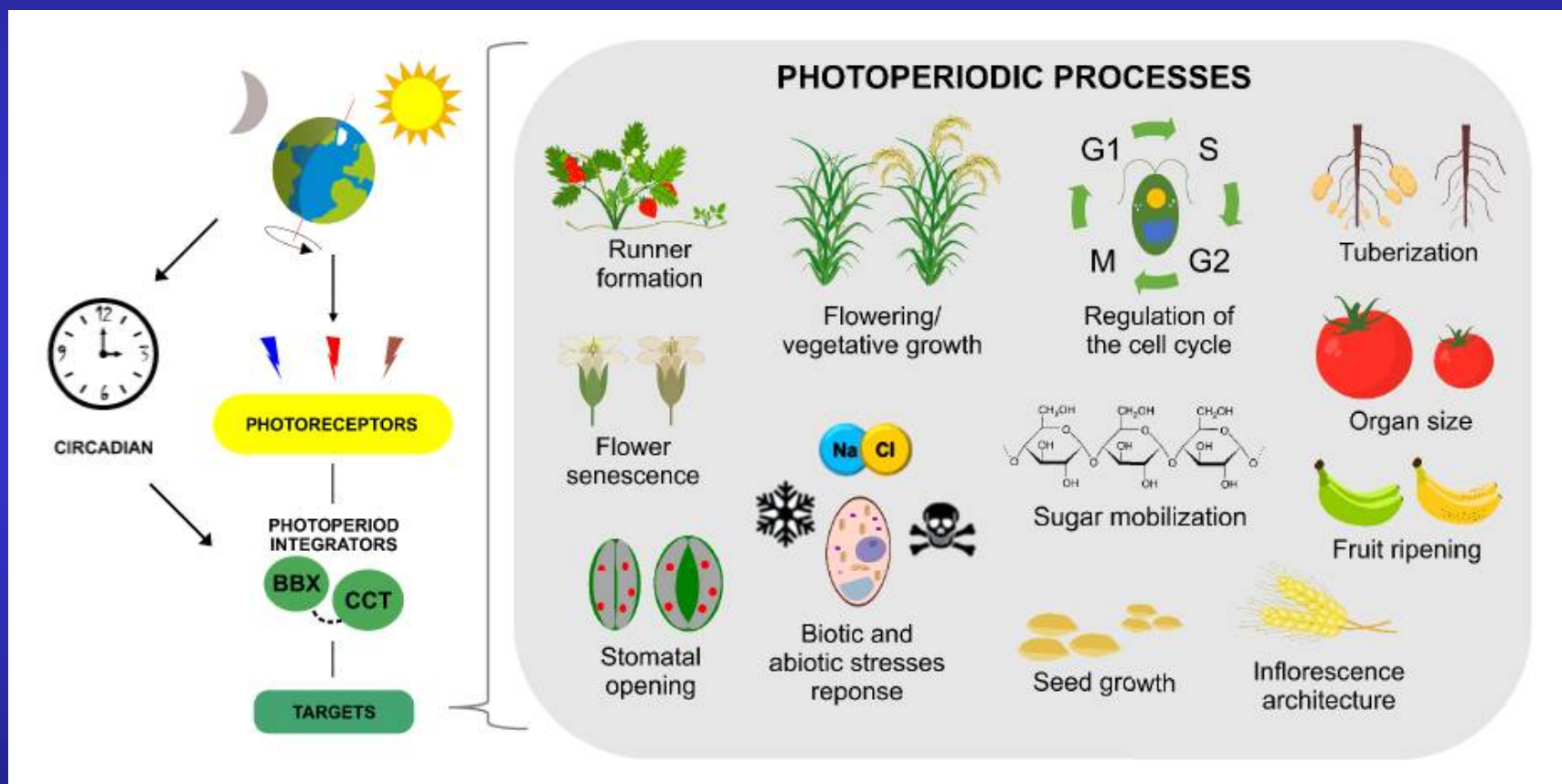


CO funguje jako transkripční faktor i jako co-aktivátor

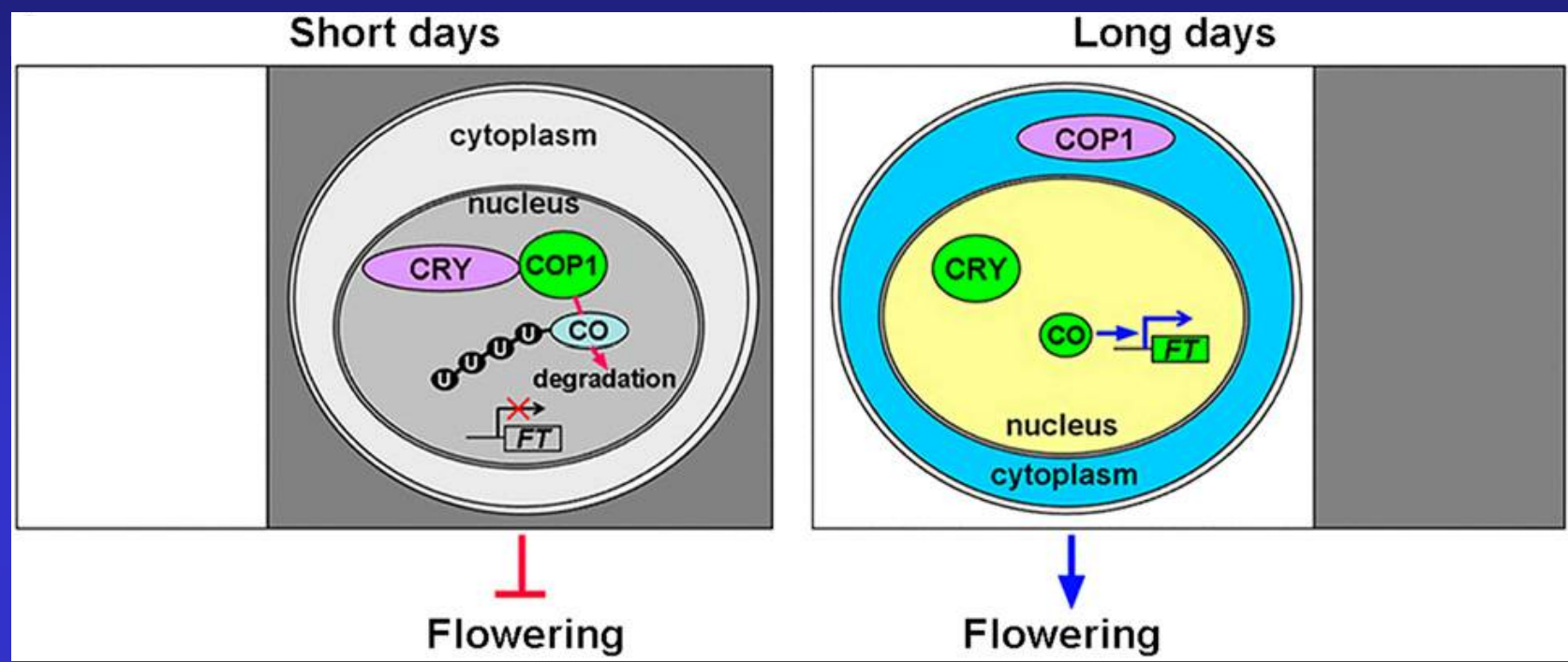
Update 2024

Romero JM et al. (2024) Plant Cell 36: 2086 – 2102

Review o klíčové úloze CONSTANS ve fotoperiodických procesech



CONSTANS patří mezi CCT elementy.



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

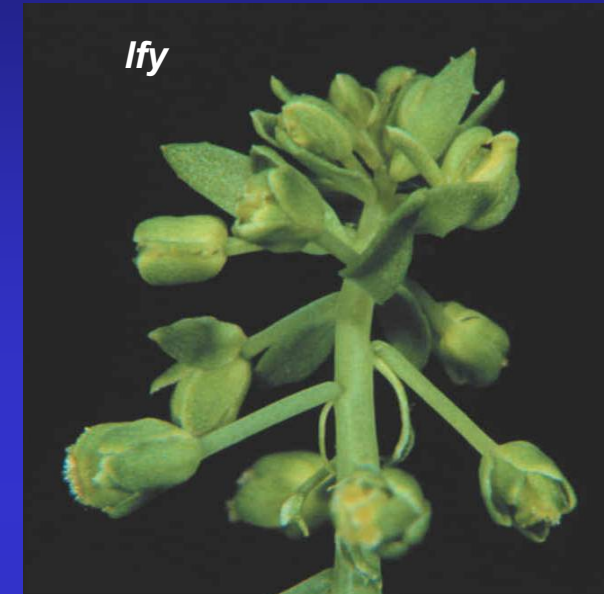
LEAFY (LFY)

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



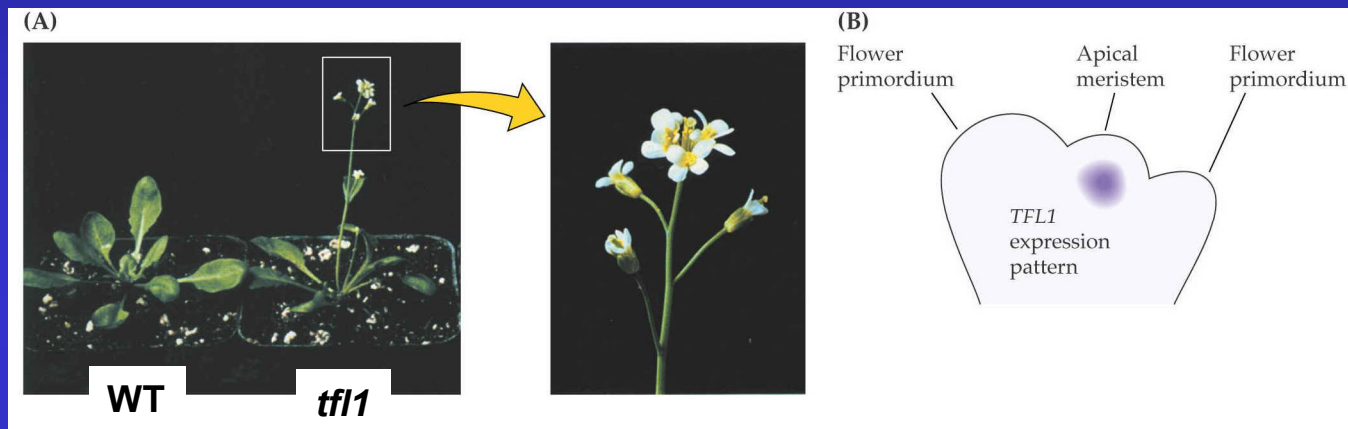
Normální funkce *LFY* = **přepíná**
nedeterminovaný růst
na **determinovaný**



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

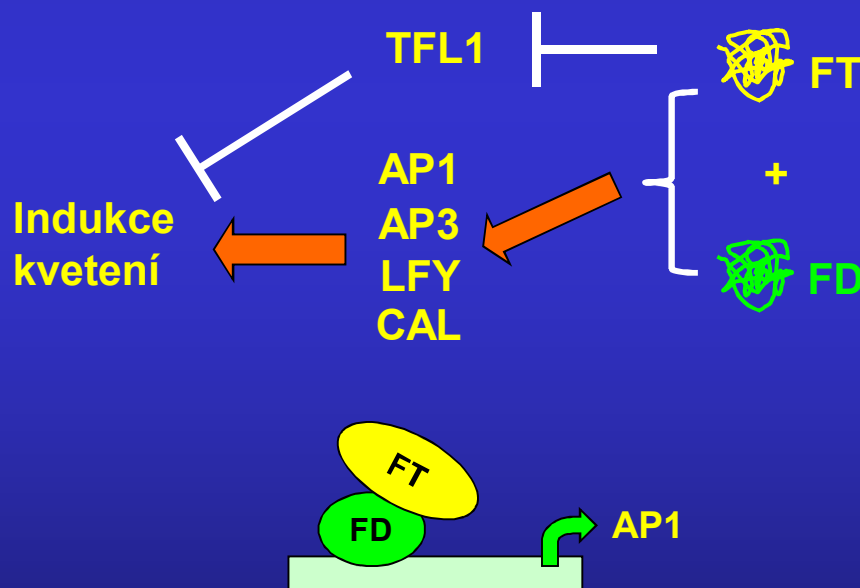


Indukce kvetení – 5 vývojových drah

1. Fotoperiodická

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

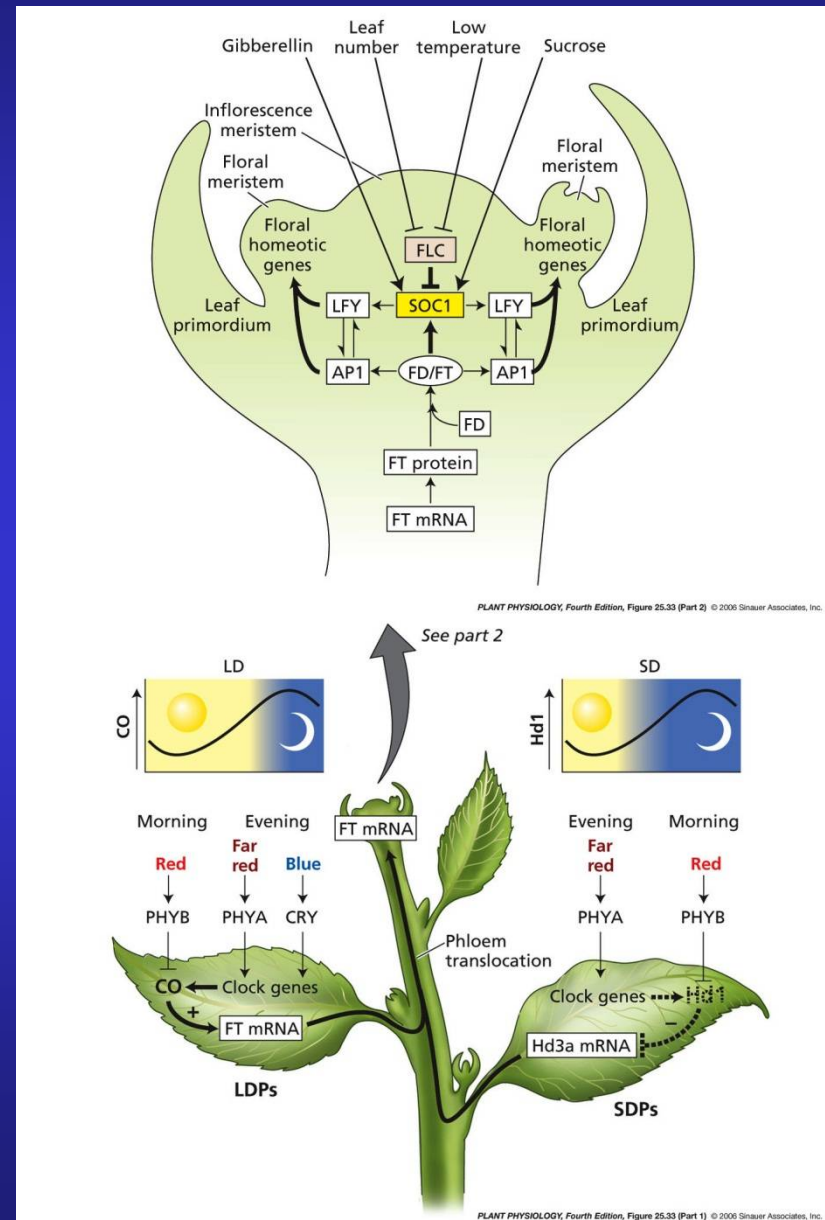
SOC1 = **S**uppressor **O**f **C**onstans1;
transkripční faktor obsahující MADS box



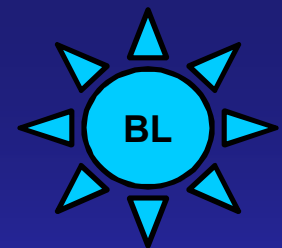
Update 2023

Takagi T et al. (2023) *Plant Communications* 4: 100552

Review o fotoperiodické indukci kvetení.



Dlouhý den



FKF1 + ZTL1 + GI



CO (CONSTANS)



FT (FLOWERING LOCUS T)



Expresse FT

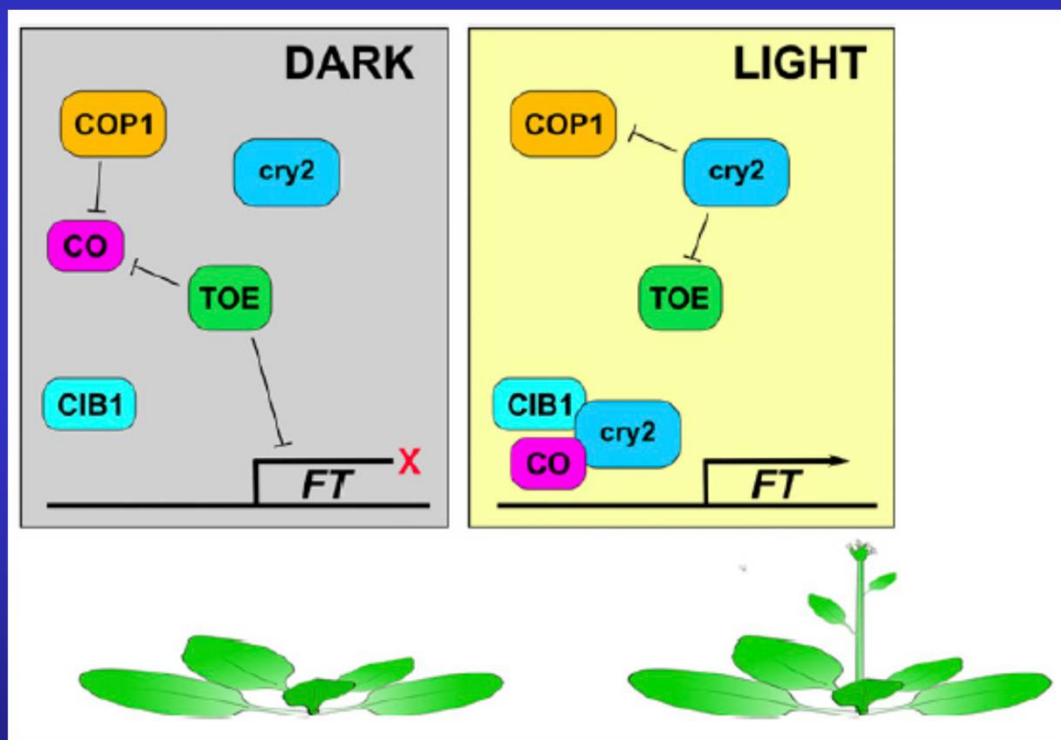


FKF1 a ZTL1 receptory interagují s proteinem GIGANTEA a komplex stabilizuje protein CONSTANS. Stabilizace je posilována modrým světlem.

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)

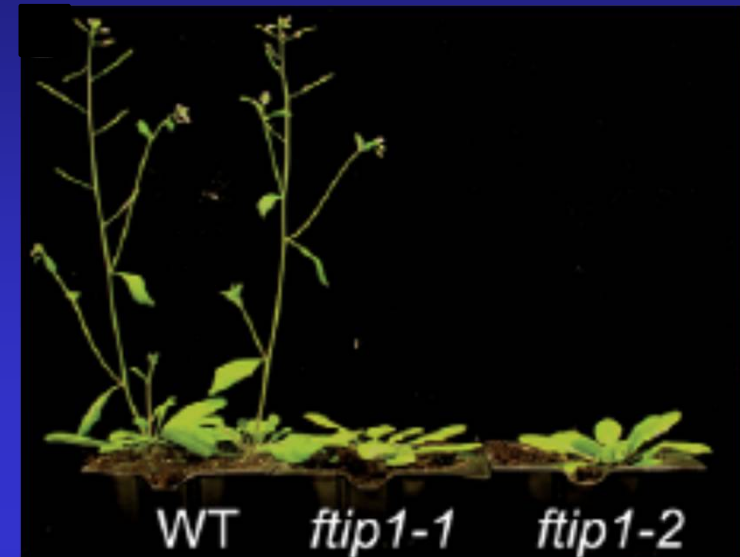
Update 2012

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

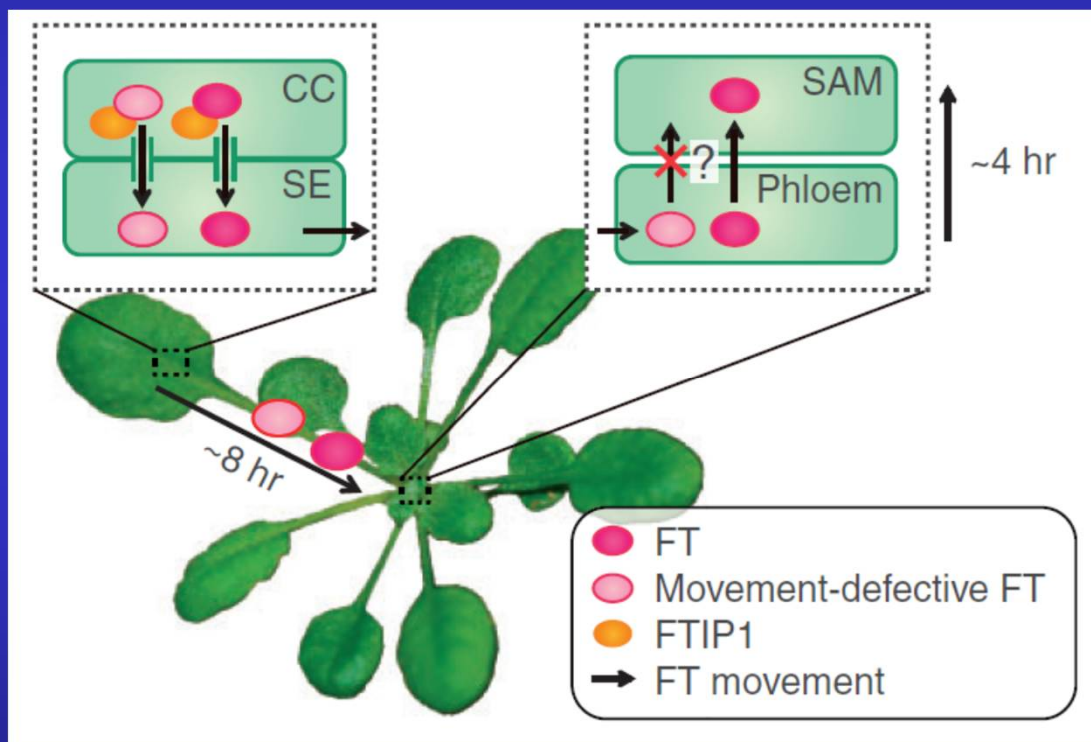
NaKR1 – protein obsahující heavy-metal-associated (HMA) doménu; typ proteinu s důležitou úlohou v transportu iontů kovů do specifických míst buňky

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

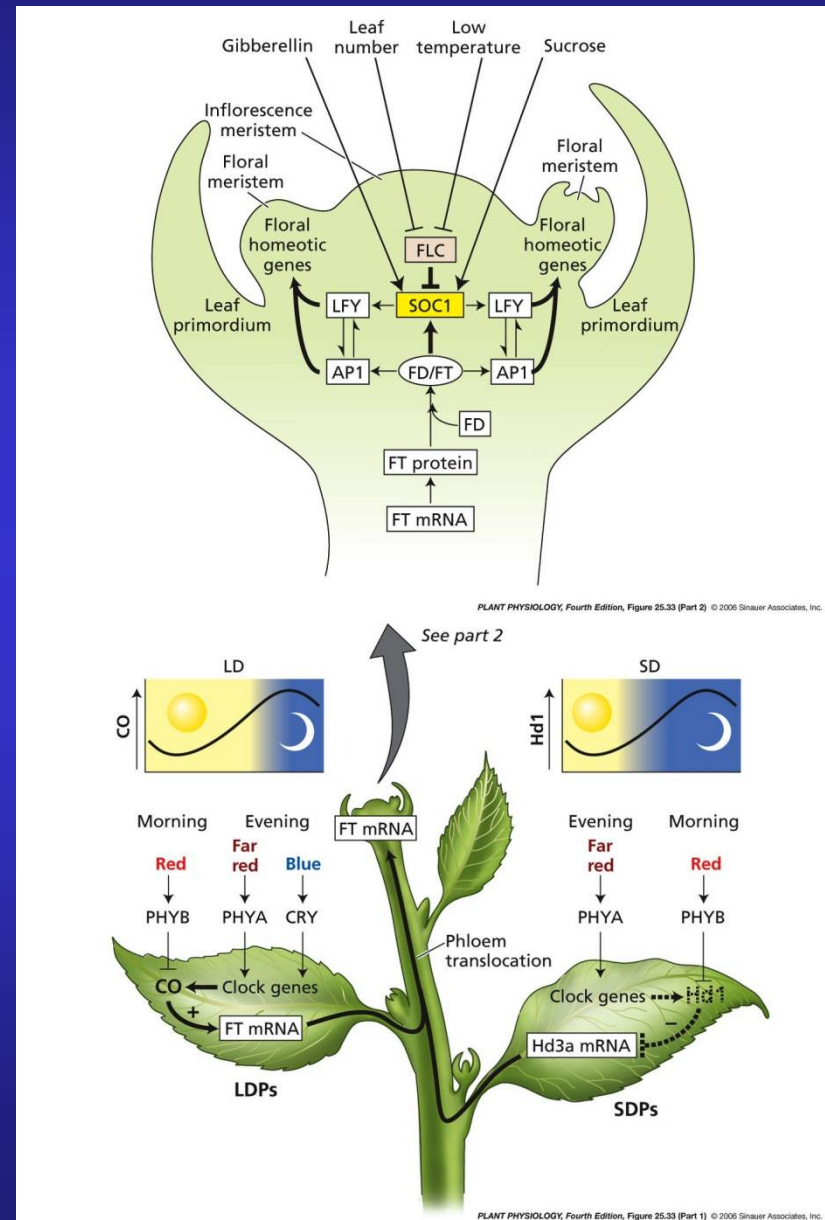
Interní signály = počet listů – redukuje expresi *FLOWERING LOCUS C (FLC)* => stimulace *SOC1*

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*.



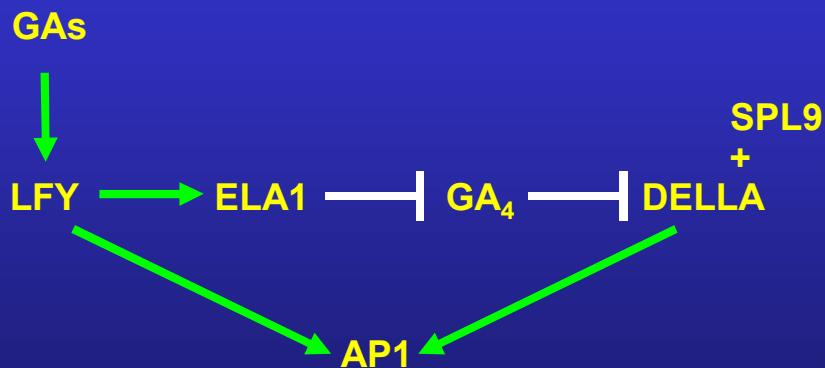
3. Karbohydrátová

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

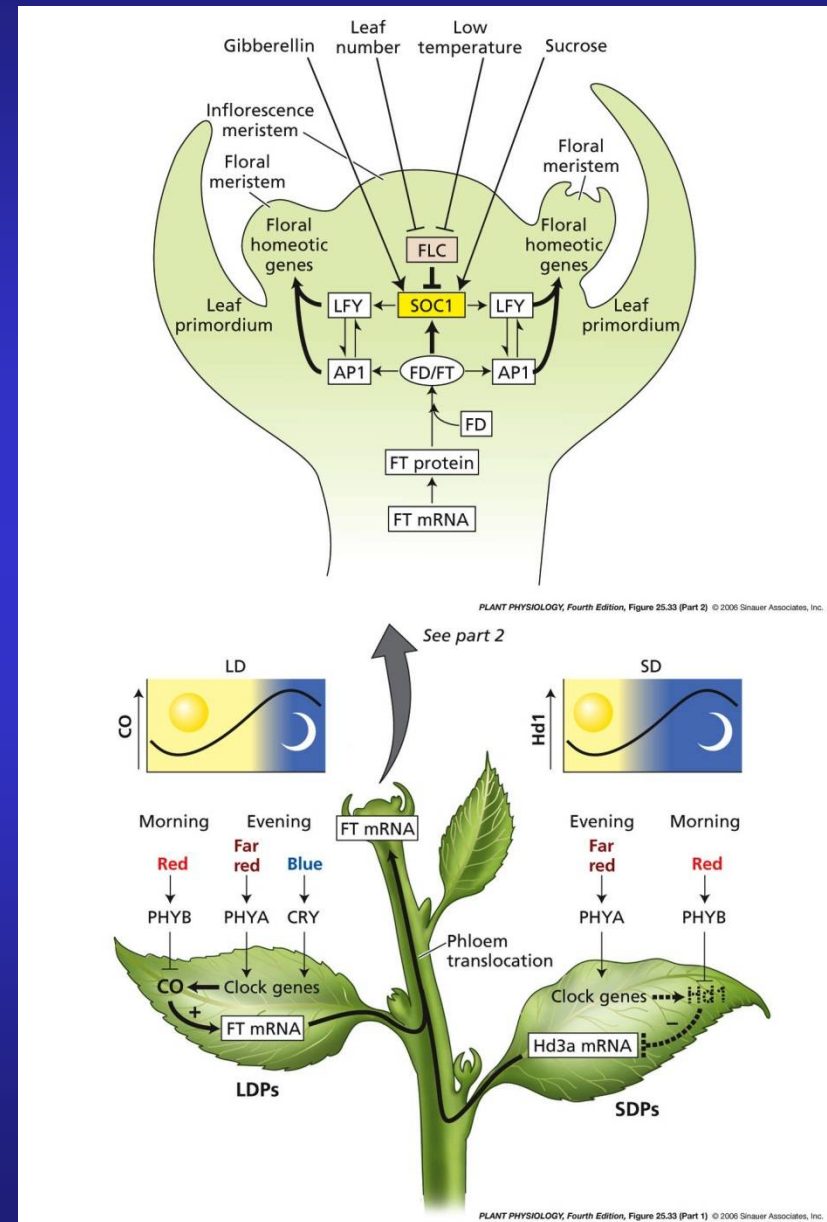
4. Giberelinová

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

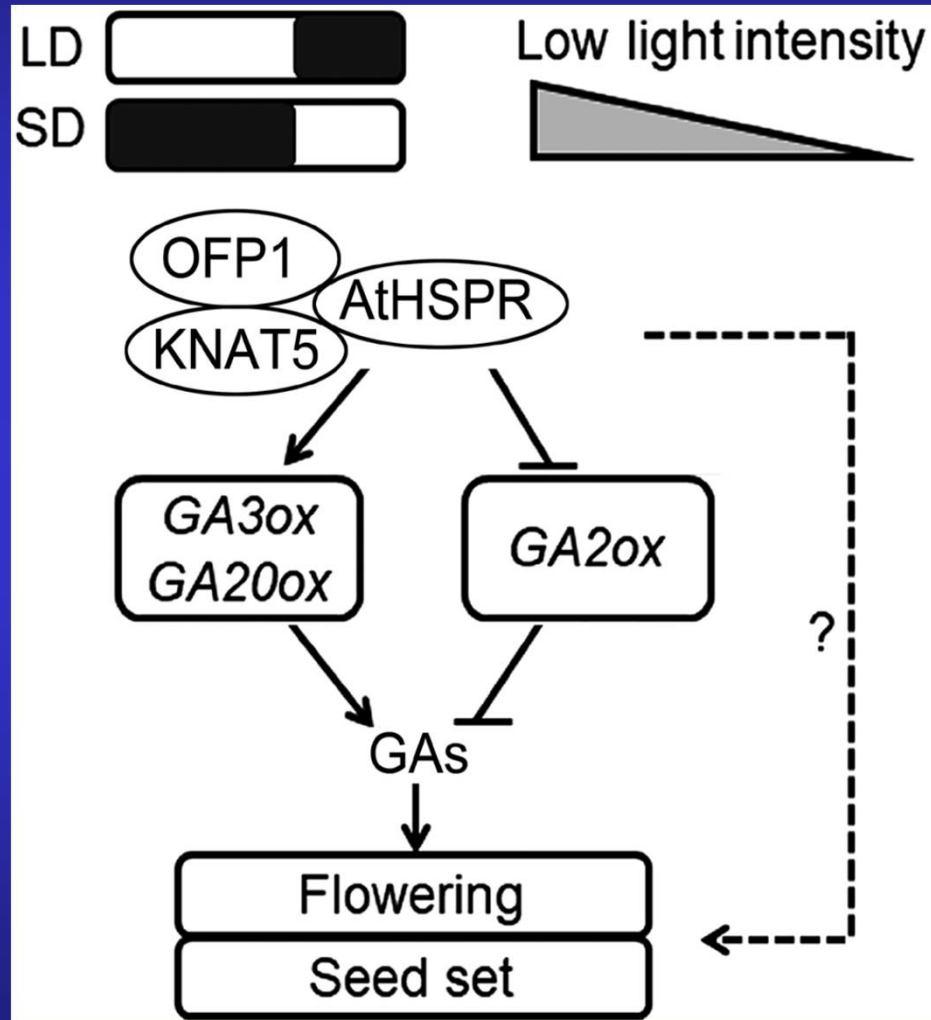


ELA1 = EUI-LIKE P450 A1 – cytochrome P450, katabolizuje GA_4



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

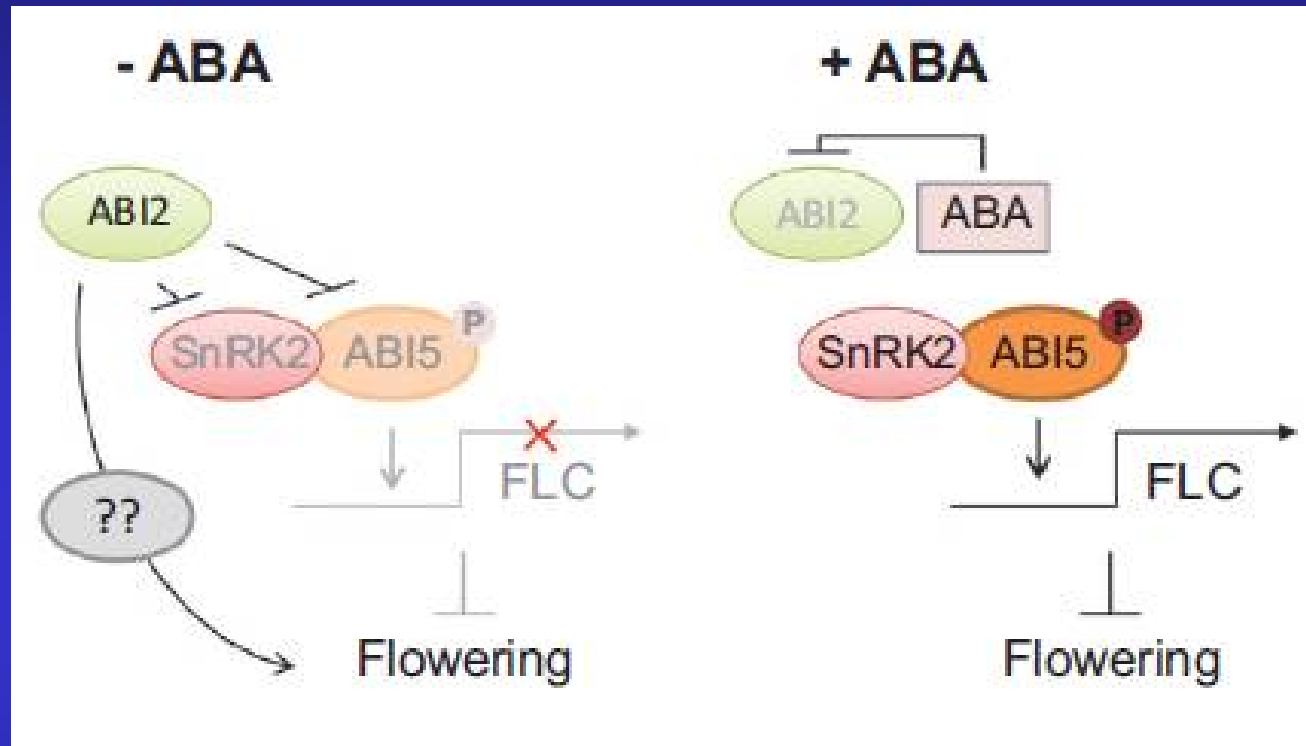
GA3ox = giberellin 3-oxidáza

GA20ox = giberellin 20-oxidáza

GA deaktivující gen

GA2ox = gibberellin 2-oxidáza

Vliv ABA (stresu) na kvetení rostlin



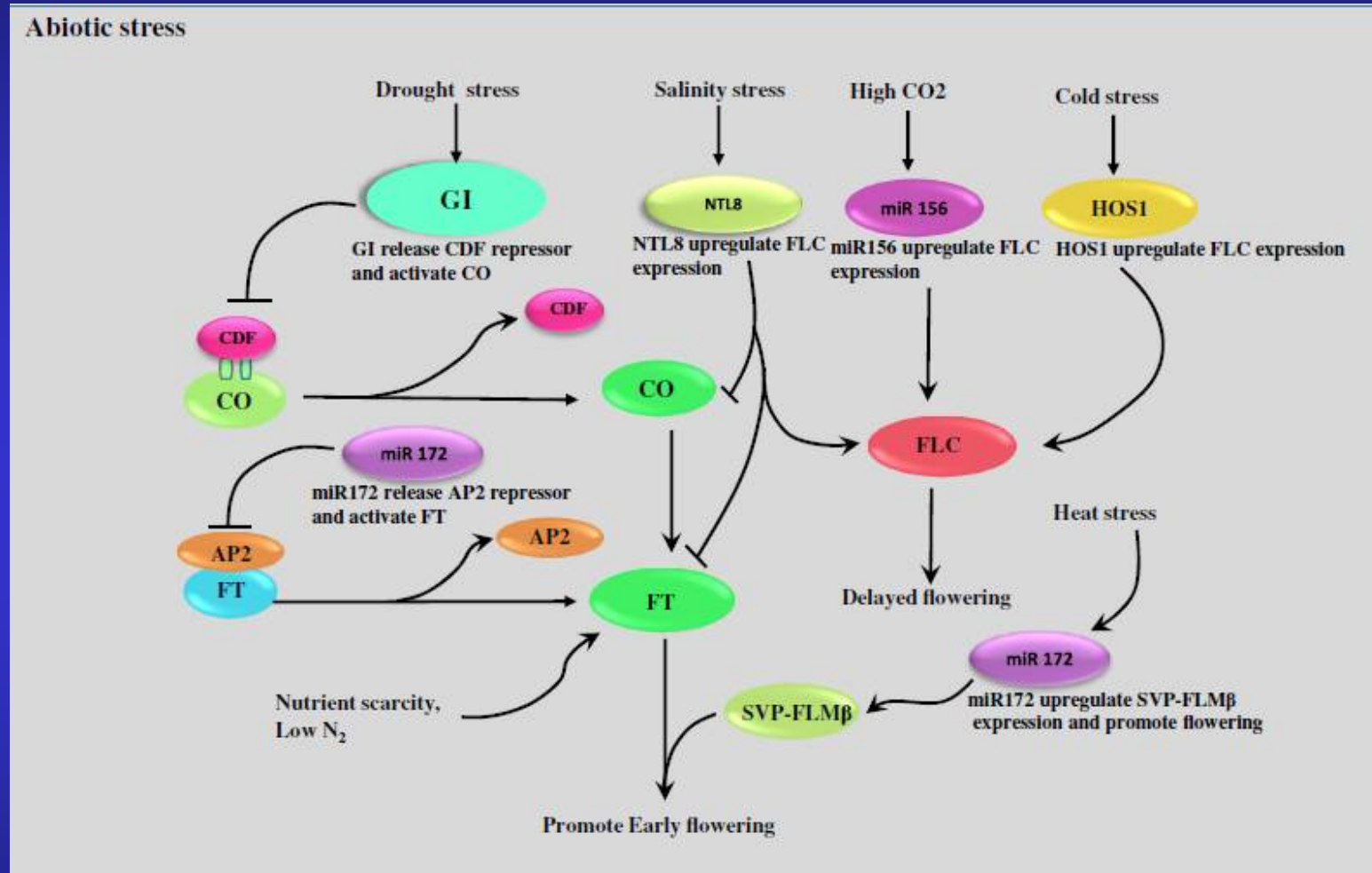
Normální podmínky (-ABA):
 ABI2 inhibuje SnRK2 a ABI5 =>
 blokáda exprese FLC =>
 podpora indukce kvetení.

Stresové podmínky (+ABA):
 ABA blokuje ABI2 => uvolnění
 SnRK2 a ABI5 => exprese FLC
 => blokáda kvetení.

Update 2024

Ali A et al. (2024) Journal of Experimental Botany 75: 2493

Abiotické stresy obecně zpomalují kvetení.



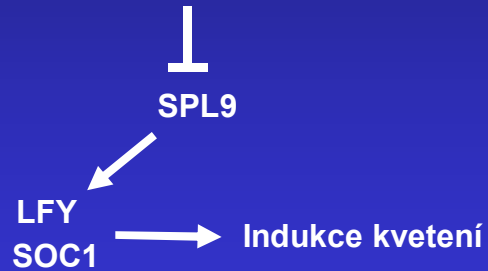
Update 2024

Patra S et al. (2024) *Physiologia Plantarum* 176e14199

5. Věková

- odráží věk rostliny

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



Dráhy 1 – 5 se soustřeďují v **SOC1**

Indukce LFY a AP1

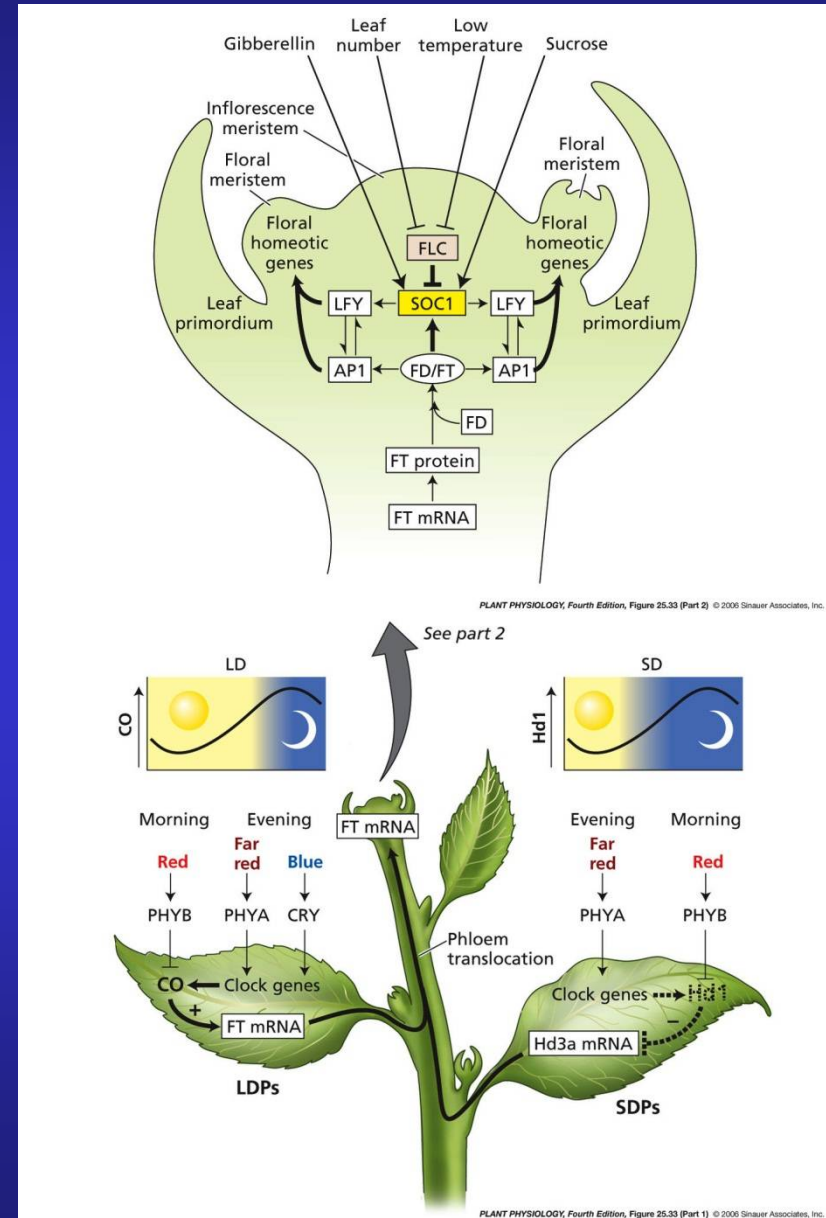
Indukce květních homeotických genů (**model ABC**)

Update 2015

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

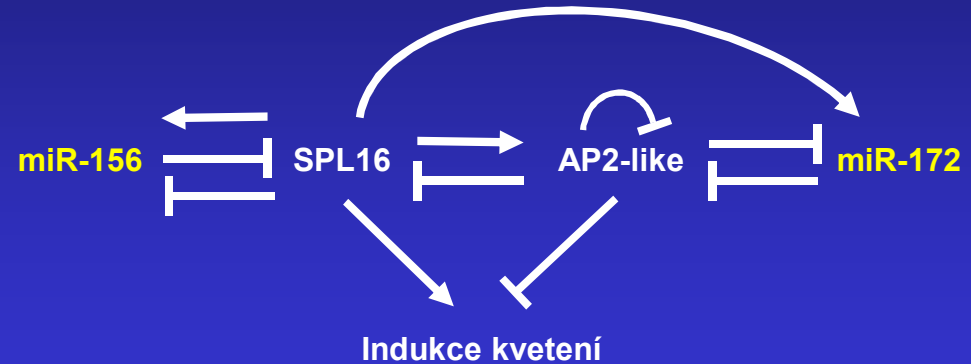
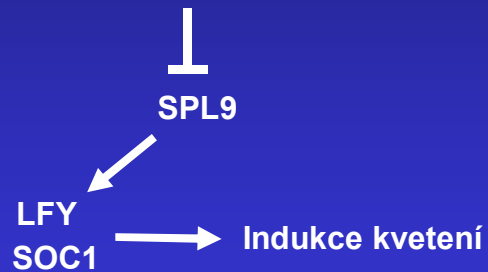
Matsoukas IG (2015) *Essays Biochem* 58: 133-149

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

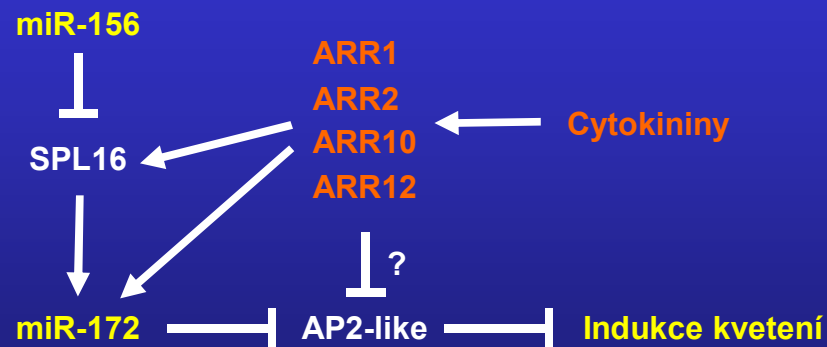


Zapojení hormonů cytokininů ve věkové dráze indukce kvetení

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

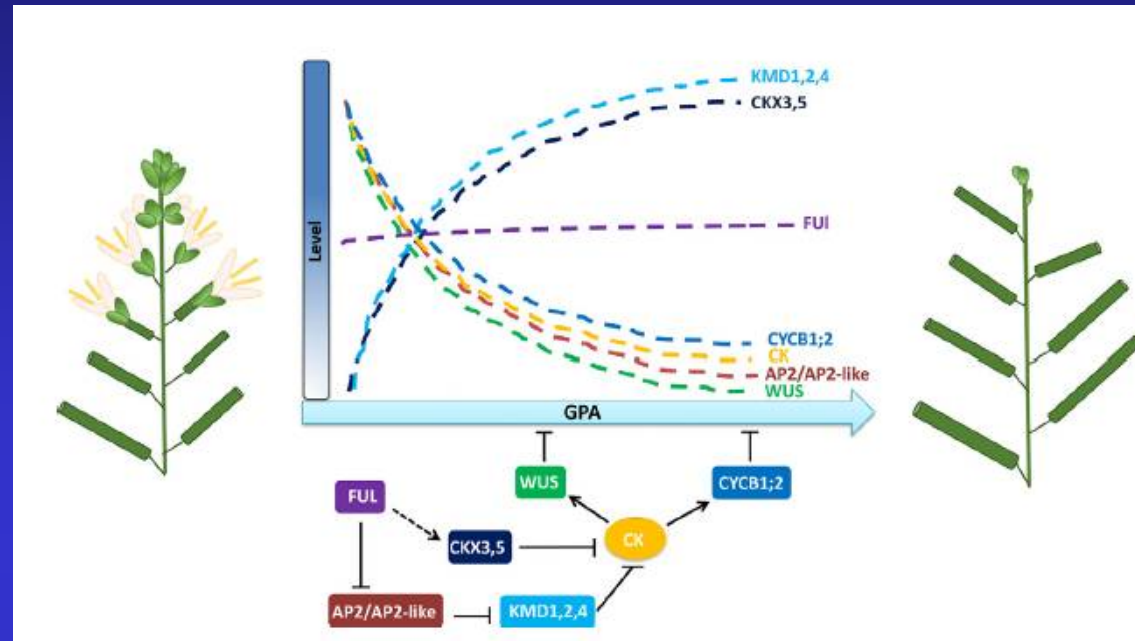
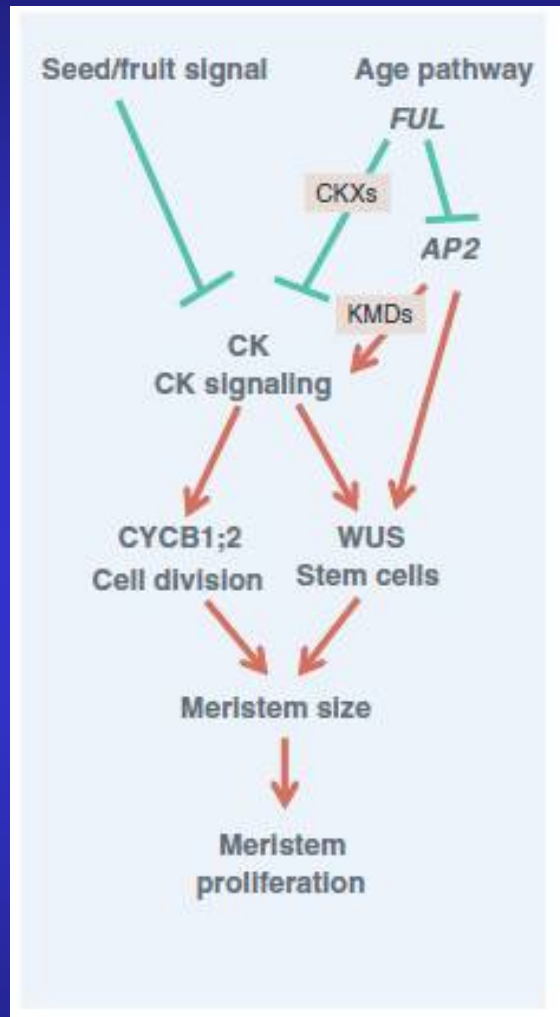


Jak jsou v tomto procesu zapojeny cytokininy?



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

Ukončení kvetení – celkové zastavení proliferace (GPA)



Cytokiny podporují buněčné dělení a proliferaci meristému => kvetení. Represe dráhy cytokininů => zmenšení velikosti meristému => GPA = celkové zastavení proliferace.

WUS = WUSCHEL - homeobox transkripční faktor – udržuje meristém organizovaný a funkční.

FUL = FRUITFULL - MADS-box transkripční faktor v květním meristému; silný induktor zástavy proliferace prostřednictvím přímé represe AP2.

KMD = KISS ME DEADLY - gen kódující Kelch-repeat F-box protein zapojený v degradaci proteinů B-type ARR (signalizace cytokininů).

CKX= cytokinin oxidáza

Update 2022

Luo X and Liu Z (2022) Current Biology 32: R158-R180

Update 2022

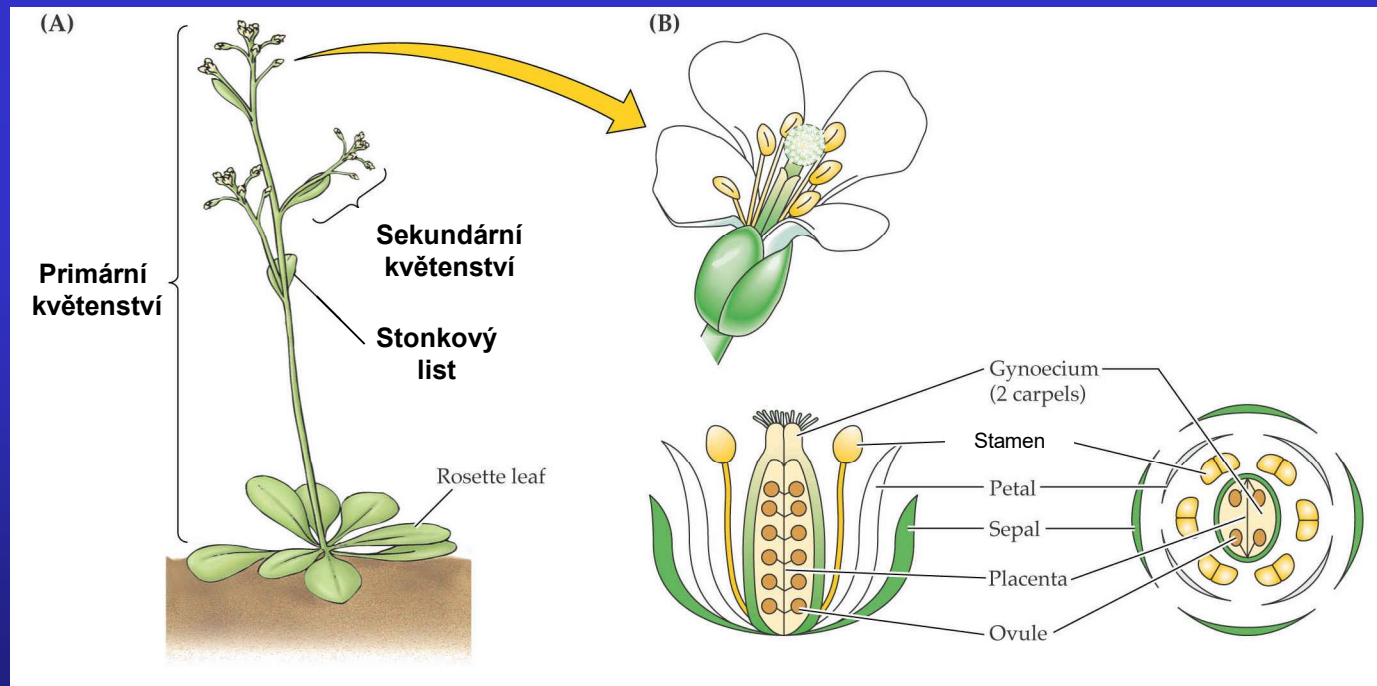
Karami O and Rahimi A (2022) TIPS 27: 840-842

b) Vývoj květu – stručná morfologie

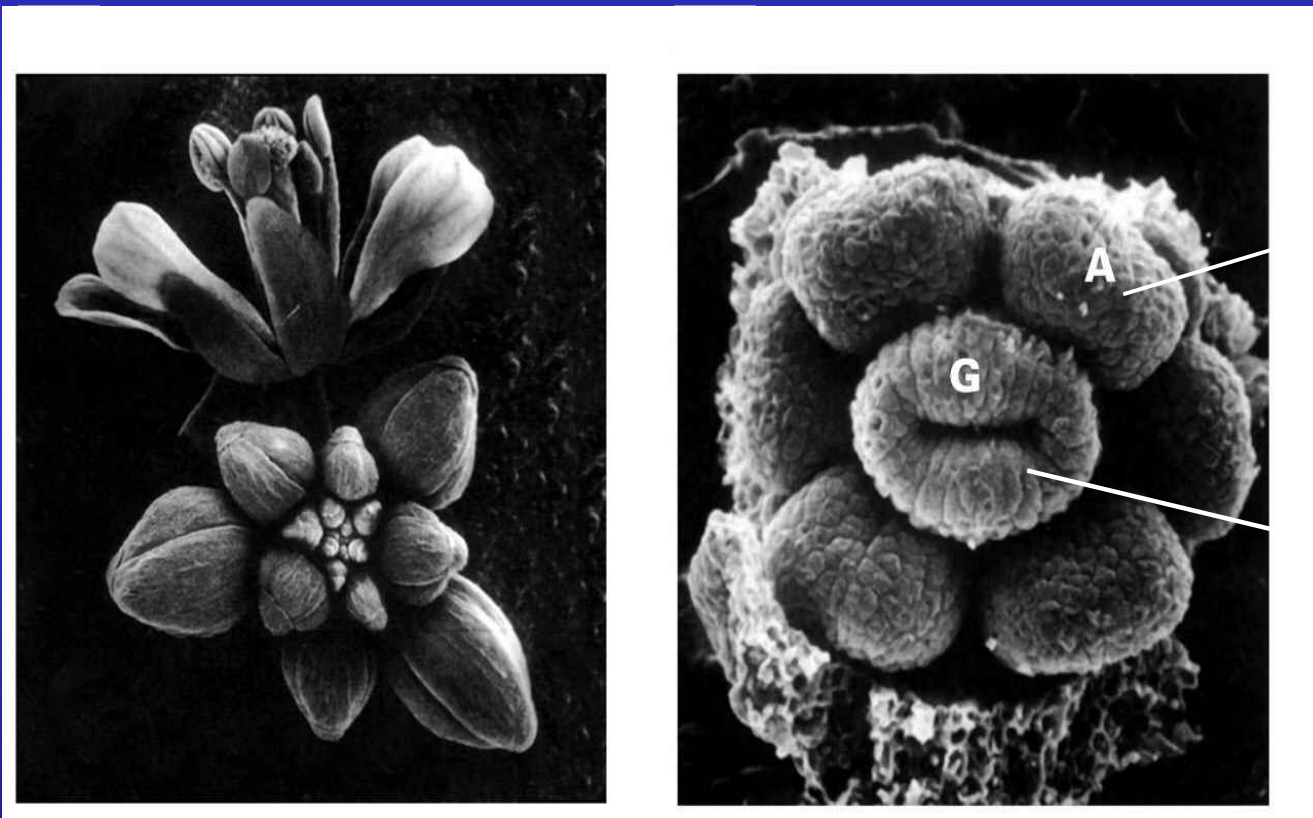
Modelová rostlina *Arabidopsis* => 1. přednáška MBR

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

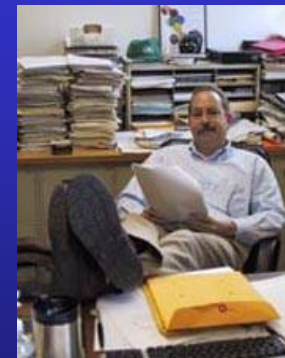
Bowman JL et al. (1991) Development 112: 1-20



Prof. M. Koornneef
(Wageningen, Holandsko)



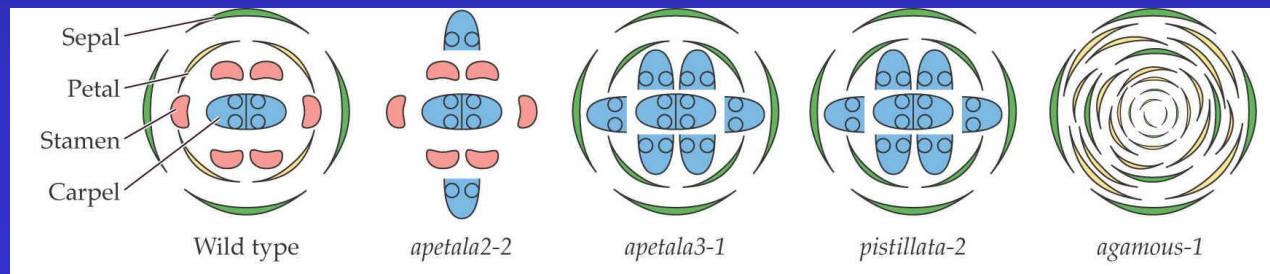
Prof. John Bowman
(Melbourne, Austrálie),



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* :

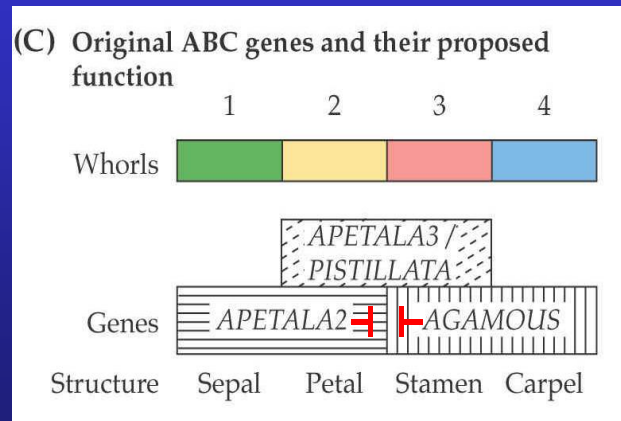
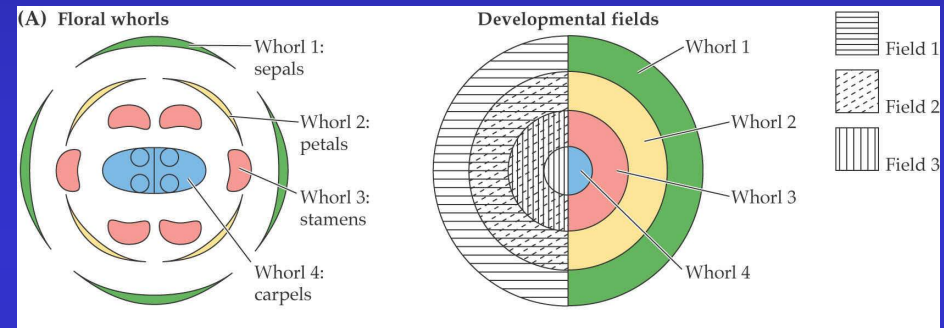
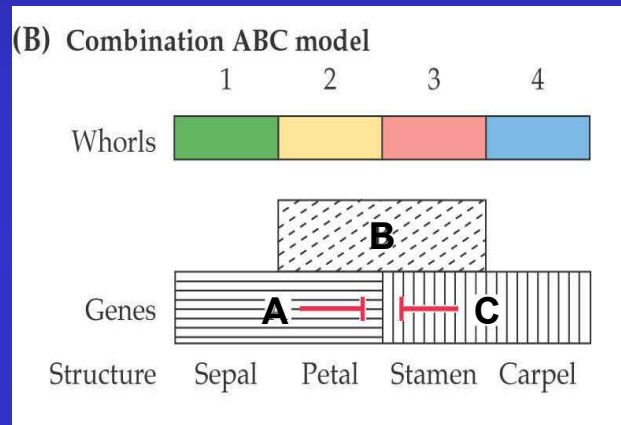
Mutant *pi* : **petals** \longrightarrow **sepals** **stamens** \longrightarrow **carpels**

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

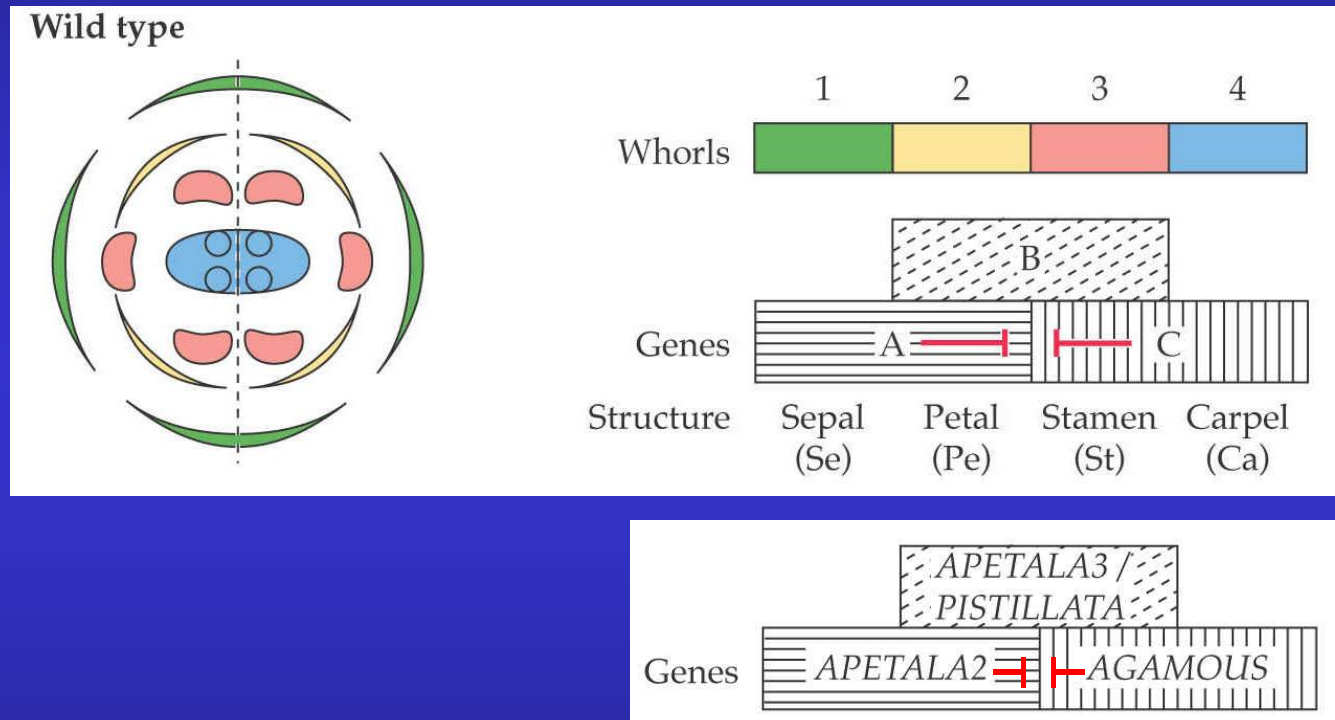


AP2 řídí pole A = **sepals** + **petals**

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

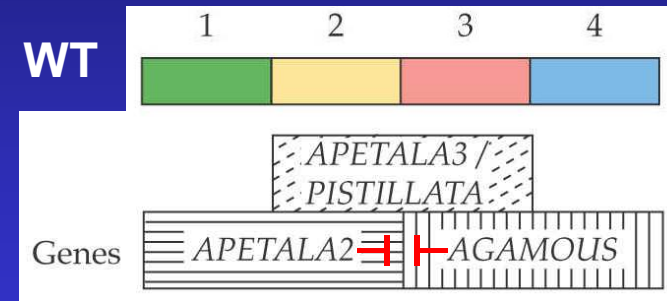
AG řídí pole C = **stamens** + **carpels**

ABC model vysvětluje vývoj jednotlivých orgánů v mutantech



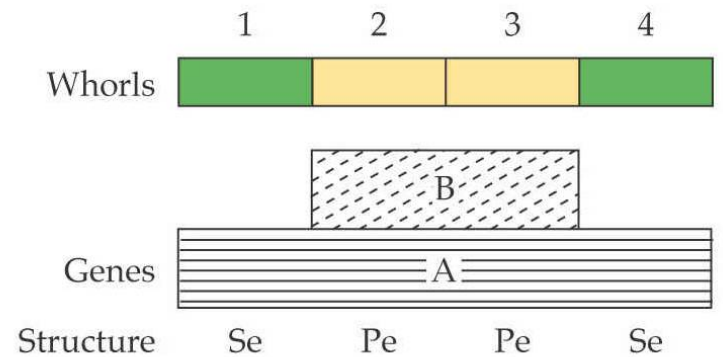
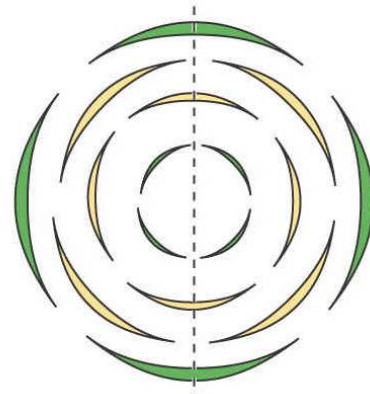
WT : všechny geny fungují normálně

ABC model vysvětluje vývoj jednotlivých orgánů v mutantech



Loss of C function

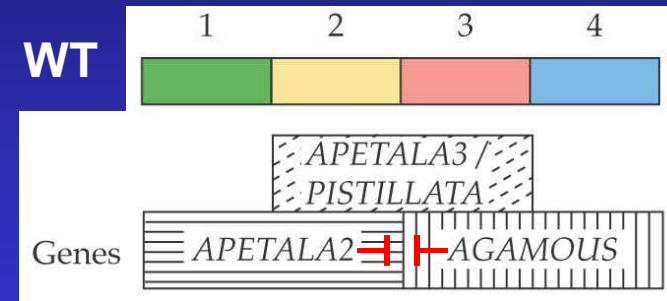
ag



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

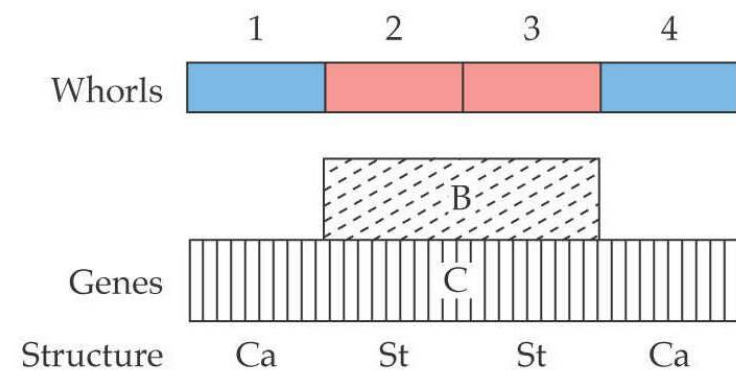
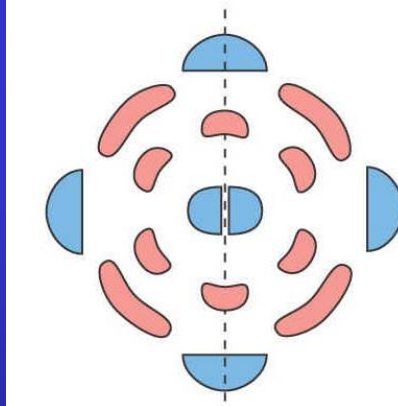
3 a 4 => **stamens** → **petals** **carpels** → **sepals**

ABC model vysvětluje vývoj jednotlivých orgánů v mutantech



Loss of A function

ap2



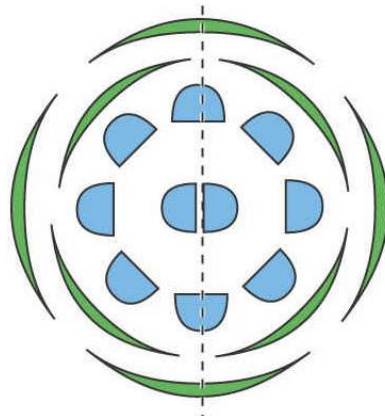
AP2 gen je off => *AP2* nepůsobí proti *AG* => *AG* expanduje do části

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

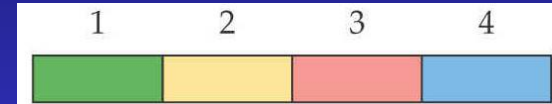
ABC model vysvětluje vývoj jednotlivých orgánů v mutantech

ap3 / pi

Loss of B function



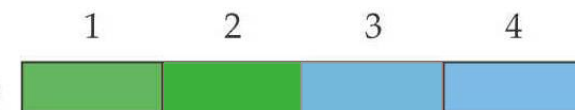
WT



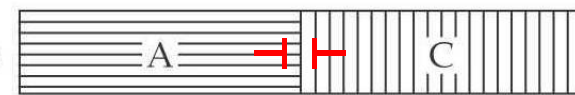
Genes



Whorls



Genes

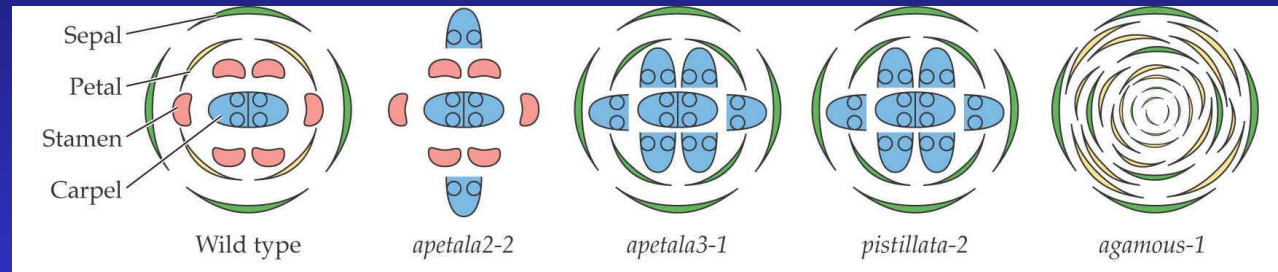


Structure

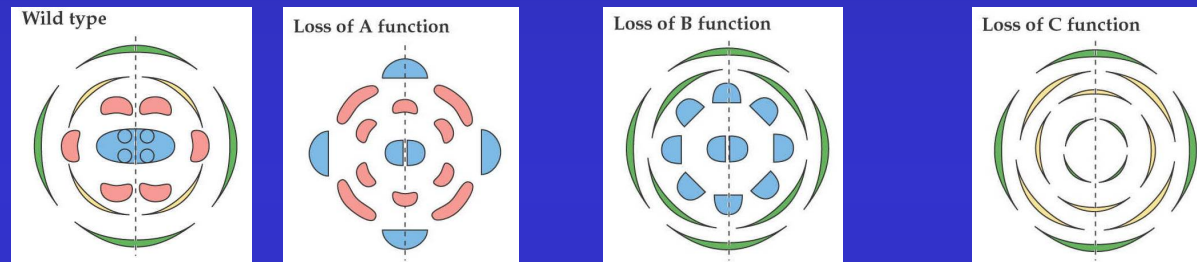
Se Se Ca Ca

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

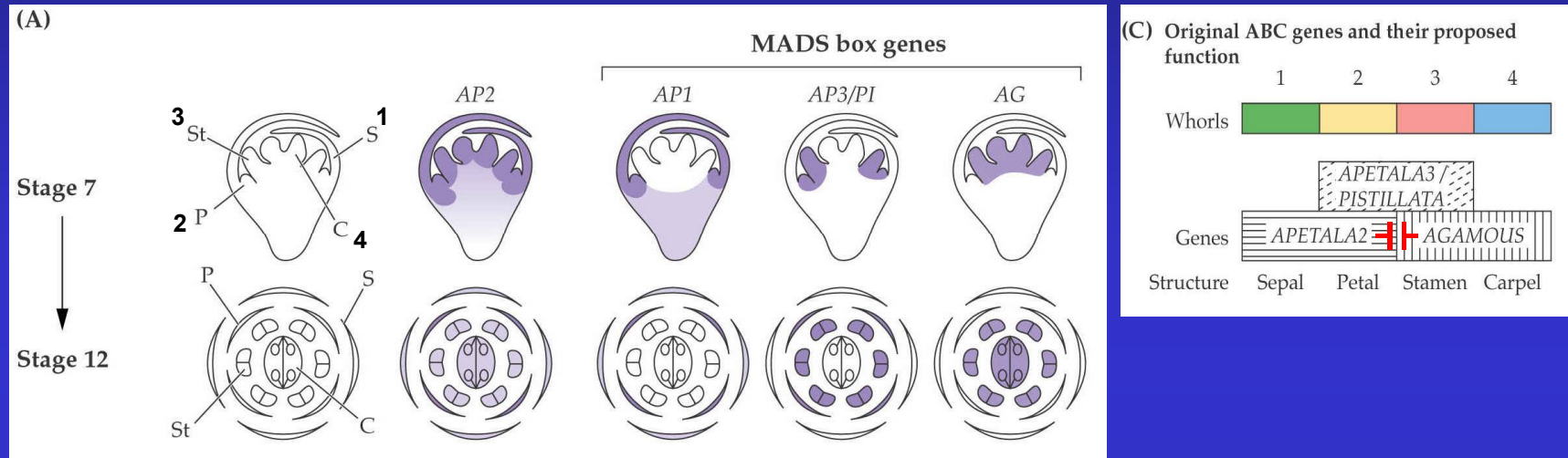
↓
Odchylka od pozorovaného fenotypu

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.

Expresa genů v orgánech WT rostlin



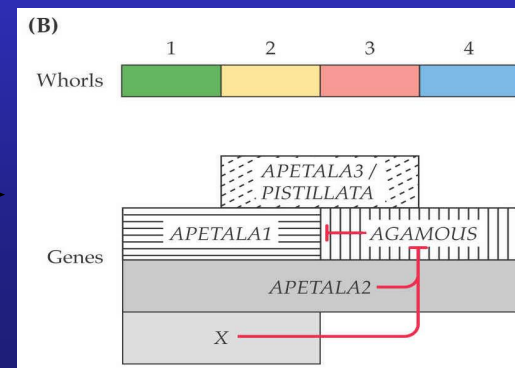
Expresa AP2 v 1 a 2 **OK. Ale**, exprese v 3 a 4 nečekaná; model předpokládá potlačení vlivem AG

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

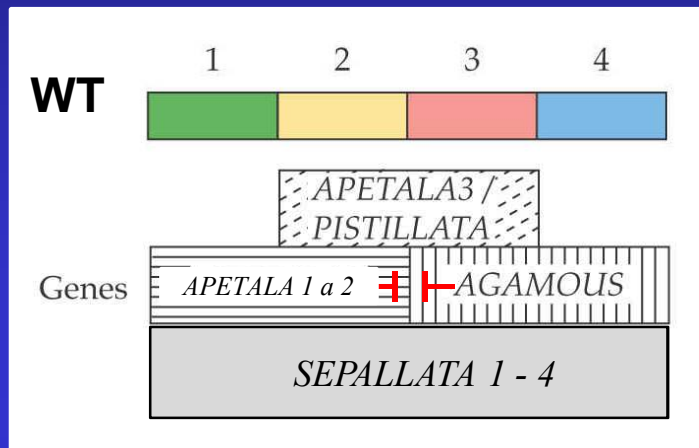
OK, AP3 / PI je exprimován ve 2 a 3

OK, AG je exprimován ve 3 a 4

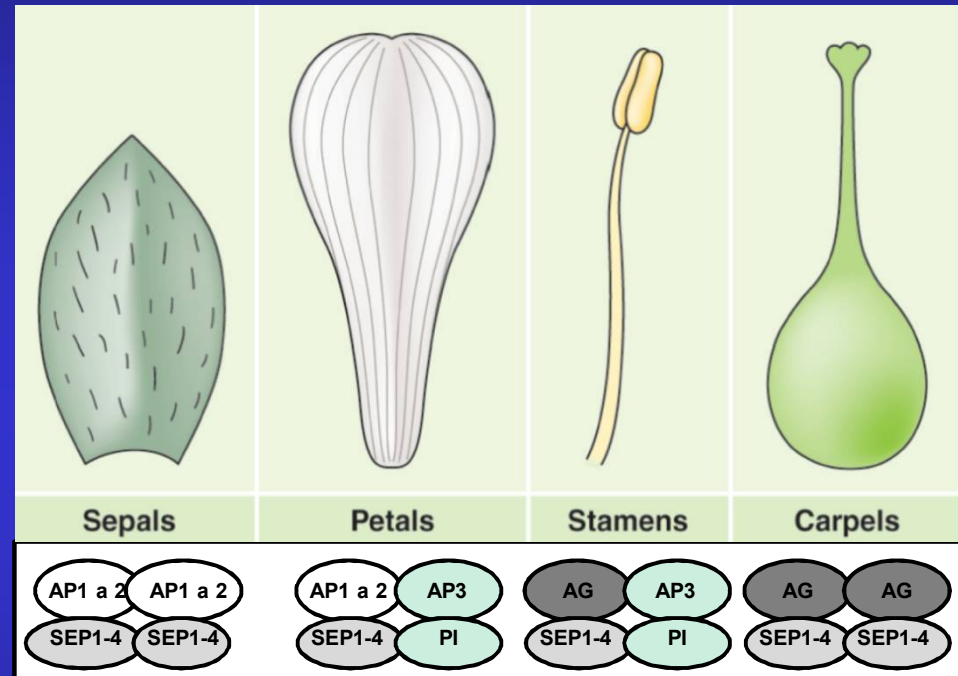
Revize modelu: neznámý gen X + gen AP1



Další revize ABC modelu – model ABCE



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

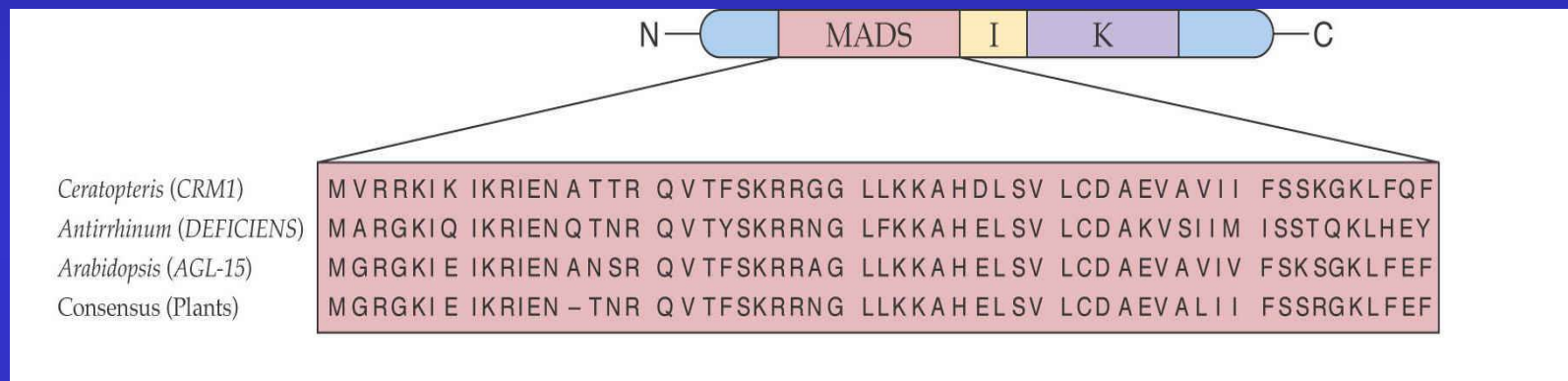


Biochemický **Quartet model** specifikace květních orgánů u *Arabidopsis* – interakce proteinů

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

Update 2024

Bowman JL and Moyroud E (2024) Plant Cell 36: 1334-1357

Poslední review o ABC modelu vývoje květů.