

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie



Andrea Zounková

Symplastický transport a jeho role v regulaci kvetení rostlin
Symplastic transport and its role in flowering regulation of plants

Bakalářská práce

Školitelka: doc. RNDr. Helena Lipavská, Ph.D.

Konzultantka : RNDr. Petra Mašková, Ph.D.

Praha, 2017

Poděkování

Chtěla bych poděkovat své školitelce doc. RNDr. Heleně Lipavské, Ph.D. a konzultantce RNDr. Petře Maškové, Ph.D. za cenné rady, ochotu a čas, který mi věnovaly při psaní bakalářské práce. Dále bych chtěla poděkovat své rodině a příteli za podporu během celého studia.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze 19.7. 2017

Podpis:

Abstrakt

Komunikace mezi buňkami je nezbytným předpokladem pro koordinaci růstu a vývoje mnohobuněčných organismů. Rostlinné buňky jsou obklopeny buněčnou stěnou zabraňující jejich migraci. Jejich osud je tedy určen převážně poziční informací, která je mj. zprostředkována symplastickým transportem molekul pomocí plasmodesmů (PD) - úzkých kanálků, jež procházejí buněčnou stěnou a umožňují tak propojení obsahu sousedních buněk. PD mohou vzniknout buď během buněčného dělení v nově vznikající buněčné stěně, či po cytokinezi v již existující buněčné stěně. Jejich průchodnost je dále regulována, jednotlivé PD mohou mít ve stejné vývojové fázi různou aperturu a může dojít i k jejich uzavření. Molekuly procházející PD difúzí jsou limitovány velikostí jeho apertury, avšak některé molekuly dokáží interagovat s různými molekulárními mechanismy, jež jim umožní selektivní průchod PD. V první části této práce se zabývám obecnými vlastnostmi PD a možnostmi regulace symplastického transportu, dále se pak podrobněji zaměřuji na roli symplastického transportu během indukce kvetení a tvorby květů. Při indukci kvetení symplastické propojení buněk umožňuje transport živin a signálních molekul, jeho regulace je tedy nezbytná pro správné načasování kvetení. Během tvorby květů symplastický transport buněčně neautonomních molekul zajišťuje správný vývoj květních orgánů.

Klíčová slova: symplastické propojení buněk, regulace symplastického transportu, plasmodesmy, indukce kvetení, tvorba květů

Abstract

Communication between cells is a prerequisite for development coordination of multicellular organisms. Plant cells are encased in cell walls, hence they cannot migrate. Their fate is therefore mainly determined by positional cues, which are among others mediated by symplastic transport of molecules through plasmodesmata (PD) - narrow channels spanning the cell wall between neighbouring cells, enabling their interconnection. PD may arise either during cell division in the emerging cell wall or after cytokinesis in already established cell wall. Passage through PD is further regulated; at the same developmental stage, individual PDs may have different states of aperture or even may be closed. Molecules passing through PD by diffusion are limited by aperture state, however some molecules are able to interact with molecular mechanisms that allow their selective transport through PD. The beginning of the thesis is focused on general features of PD and options of symplastic transport regulation, next I focus in detail on the role of symplastic transport during floral induction and formation of flowers. During the floral induction, symplastic connections of cells allow transport of nutrients and signal molecules, therefore their regulation is necessary for flowering time control. During formation of flowers, symplastic transport of non-cell autonomous molecules ensures proper floral organ development.

Key words: symplastic connection of cells, symplastic transport regulation, plasmodesmata, floral induction, formation of flowers

Seznam zkratek

| | |
|-------|--|
| AG | AGAMOUS |
| AHL4 | AT-HOOK MOTIF NUCLEAR-LOCALIZED PROTEIN 4 |
| AP1 | APETALA1 |
| AP3 | APETALA3 |
| BP | BREVIPEDICELLUS neboli KNOTTED-LIKE FROM ARABIDOPSIS THALIANA1 |
| bZIP | Basic Leucine Zipper Domain |
| CO | CONSTANS |
| CR4 | CRINKLY4 |
| DEF | DEFICIENS |
| DSE1 | DECREASED SIZE EXCLUSION LIMIT OF PLASMODESMATA 1 |
| ER | endoplazmatické retikulum |
| FD | FLOWERING LOCUS D |
| flg22 | ligand odvozený od flagelinu |
| FLS2 | FLAGELLIN SENSING 2 |
| FM | květní meristém (floral meristem) |
| FT | FLOWERING LOCUS T |
| FTIP1 | FT-INTERACTING PROTEIN1 |
| FTL2 | FLOWERING LOCUS T-LIKE 2 |
| GFP | ZELENÝ FLUORESCENČNÍ PROTEIN (GREEN FLUORESCENT PROTEIN) |
| GL1 | GLABROUS 1 |
| GLO | GLOBOSA |
| GST | GLUTATHION-S-TRANSFERÁZA |
| Hd3a | HEADING DATE 3A |
| HPTS | 8-hydroxypyren-1,3,6-trisulfonová kyselina |
| CHER1 | CHOLINE TRANSPORTER-LIKE1 |

| | |
|------------|---|
| IM | intermediální neboli přechodný meristém (inflorescence meristem) |
| ISE 1/ISE2 | INCREASED SIZE EXCLUSION LIMIT OF PLASMODESMATA 1 resp. 2 |
| KN1 | KNOTTED1 |
| KNAT | KNOTTED-LIKE FROM ARABIDOPSIS THALIANA1 neboli BREVIPEDICELLUS |
| KNOX | KNOTTED1-like homeobox |
| LeT6 | ortolog KN1 u <i>Solanum lycopersicum</i> |
| LFY | LEAFY |
| LYM2 | LYSIN MOTIF DOMAIN-CONTAINING GLYCOSYLPHOSPHATIDYLINOSITOL-ANCHORED PROTEIN 2 |
| MFT | MOTHER OF FT AND TFL1 |
| NaKR1 | SODIUM POTASSIUM ROOT DEFECTIVE 1 |
| NCAP | buněčně neautonomní protein (non-cell autonomous protein) |
| NLS | jaderný lokalizační signál (nuclear localization signal) |
| OSFD1 | ortolog FD u <i>Oryza sativa</i> |
| PAPK | proteinkináza asociovaná s PD (Plasmodesmal-associated protein kinase) |
| PD | plasmodesmus |
| PDCB1 | PD CALLOSE BINDING PROTEIN1 |
| PDGLP1 | PLASMODESMAL GERMIN-LIKE PROTEIN1 |
| PDLPs | plasmodesmal located proteins |
| PEBP | phosphatidylethanolamine-binding protein |
| PI | PISTILLATA |
| PME | pektin-methylesteráza (Pectin methylesterase) |
| PtFT1 | ortolog FT u topolu (<i>Populus spp.</i>) |
| PVX | Potato virus X |
| REM | Remorin |
| RFP | ČERVENÝ FLUORESCENČNÍ PROTEIN (RED FLUORESCENT PROTEIN) |

| | |
|-------------|--|
| RFT1 | RICE FLOWERING LOCUS T 1 |
| RLK | receptor-like kináza (Receptor-like Kinase) |
| RLP | Receptor-like Protein |
| RTNLB | rodina rostlinných retikulonů |
| SAM | apikální meristém prýtu (shoot apical meristem) |
| SEL | velikostní limit PD (size exclusion limit) |
| SEP | SEPALLATA |
| SFT | SINGLE-FLOWER TRUSS |
| SHP | SHATTERPROOF |
| SOC1 | SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CO1 |
| SPGB | ortolog FD u <i>Solanum lycopersicum</i> |
| STK | SEEDSTICK |
| STM | SHOOT MERISTEMLESS |
| StSP5G-like | homolog FT u <i>Solanum tuberosum</i> |
| StSP3D | ortolog FT u <i>Solanum tuberosum</i> |
| StSP5G | homolog FT u <i>Solanum tuberosum</i> |
| StSP6A | homolog FT u <i>Solanum tuberosum</i> |
| TF | transkripční faktor |
| TFL1 | TERMINAL FLOWER1 |
| TSF | TWIN SISTER OF FT |
| UPB1 | UPBEAT1 |
| vsr | mutant se třemi bodovými mutacemi u FT v reziduích V70A, S76A a R83A; u FTL2 v reziduích V69A, S75A a R82A |
| WUS | WUSCHEL |
| ZYMV | Zucchini yellow mosaic virus |

Obsah

| | | |
|---------|--|----|
| 1 | Úvod..... | 1 |
| 2 | Evoluční vznik symplastického propojení buněk..... | 2 |
| 3 | Plasmodesmy vyšších rostlin..... | 3 |
| 3.1 | Vznik plasmodesmu | 3 |
| 3.1.1 | Vznik primárních PD..... | 3 |
| 3.1.2 | Vznik sekundárních PD..... | 3 |
| 3.2 | Typy plasmodesmů..... | 4 |
| 3.3 | Struktura plasmodesmu | 5 |
| 3.4 | Faktory regulující transport plasmodesmy | 5 |
| 3.4.1 | Molekuly ovlivňující symplastický transport asociované s plasmodesmy | 6 |
| 3.4.1.1 | Neproproteinové složky asociované s PD..... | 6 |
| 3.4.1.2 | Proteiny asociované s PD..... | 7 |
| 3.5 | Metody studia symplastického pohybu molekul | 8 |
| 3.6 | Symplastické domény..... | 9 |
| 3.6.1 | Symplastická izolace buněk podmiňující jejich fyziologickou funkci | 9 |
| 3.6.2 | Regulace symplastického propojení buněk během vývojových procesů..... | 9 |
| 4 | Indukce kvetení | 10 |
| 4.1 | Fotoperiodická dráha..... | 11 |
| 4.2 | Evoluce a funkce FT-like genů..... | 12 |
| 4.3 | Role symplastického transportu během indukce kvetení | 14 |
| 4.3.1 | Transport florigenního signálu | 14 |
| 4.3.1.1 | Transport FT proteinu..... | 14 |
| 4.3.1.2 | Transport <i>FT</i> mRNA | 17 |
| 4.3.2 | Transport represoru kvetení – proteinu TFL1 | 18 |
| 5 | Tvorba květů/ květenství | 19 |
| 5.1 | Vznik květního meristému | 19 |
| 5.2 | Role symplastického transportu v květním meristému..... | 20 |
| 5.2.1 | Transport KNOX transkripčních faktorů..... | 20 |
| 5.2.2 | Transport WUSCHEL | 21 |
| 5.2.3 | Transport LEAFY..... | 23 |
| 5.2.4 | Transport homeotických MADS box transkripčních faktorů | 24 |
| 6 | Závěr..... | 27 |
| 7 | Seznam použité literatury | 29 |

1 Úvod

U vyšších rostlin, jakožto mnohobuněčných organismů, je nutné zajistit komunikaci a výměnu látek mezi jednotlivými buňkami. Díky přítomnosti buněčné stěny obklopující rostlinné buňky rozlišujeme dva typy transportních procesů, které toto zajišťují: symplastický a apoplastický.

Apoplastická cesta zahrnuje prostor buněčné stěny, velikost molekul vyskytujících se v tomto prostoru je tudíž limitována, dále zahrnuje prostor intercelulár a transport pomocí xylému, který zajišťuje transport na dlouhou vzdálenost a umožňuje i transport makromolekul (např. Turnbull a Lopez-Cobollo, 2013). Molekula nacházející se v apoplastickém prostoru buď může interagovat s receptorem na povrchu buňky nebo projít pomocí různých mechanismů přes cytoplazmatickou membránu do buňky.

Symplastická transportní cesta vede z buňky do buňky, což je umožněno díky úzkým kanálkům – plasmodesmům (PD, viz dále). K symplastické cestě patří též floém, který zajišťuje transport molekul na dlouhou vzdálenost (např. Ruiz-Medrano et al., 2001). Symplastický transport je pro život rostliny nezbytný. PD propojují téměř všechny buňky rostliny. Symplastickou cestou je zajištěn transport proteinů, nukleových kyselin, fytohormonů, metabolitů, iontů, dokonce i plastidů (Thyssen et al., 2012), ale také patogenů (např. Lee a Lu, 2011). Symplastický transport kromě látkové výměny významně ovlivňuje rostlinný vývoj (např. Stahl a Simon, 2013) a vyžaduje proto důslednou regulaci. Regulace symplastického propojení se dále uplatňuje např. při symplastickém oddělení buněk s odlišnou funkcí (Ehlers et al., 1999) nebo při imunitní odpovědi (Lim et al., 2016).

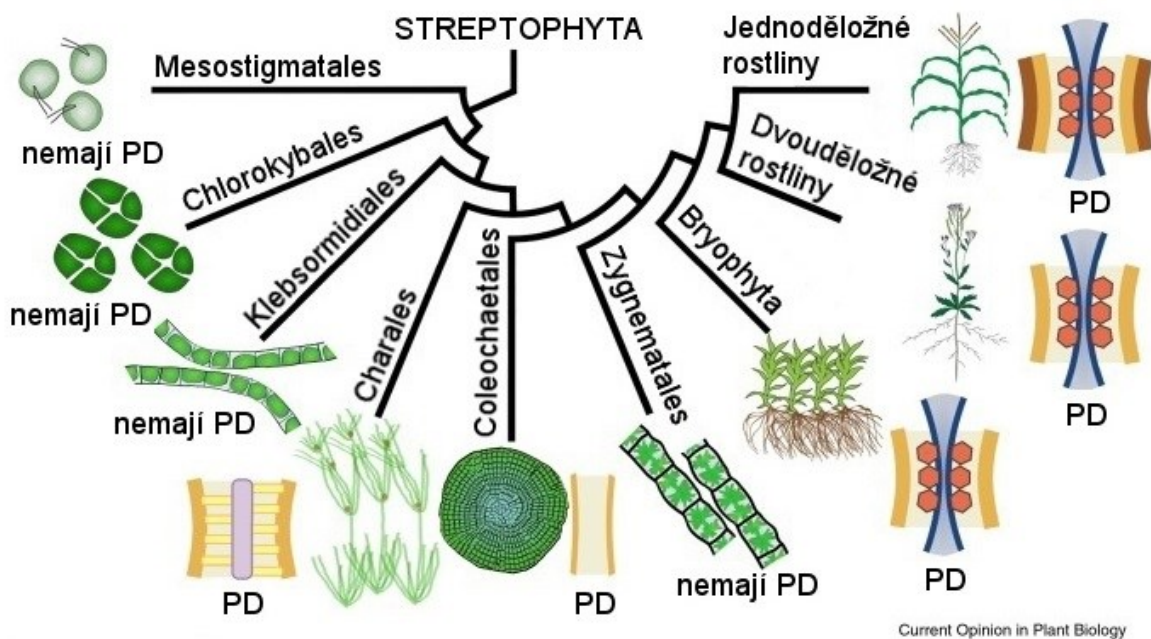
Tato práce je zaměřena na roli symplastického propojení buněk během indukce kvetení a tvorby květů. Avšak pro pochopení možností regulace symplastického transportu předchází této části obecný popis symplastického transportu.

Symplastický transport má při indukci kvetení významnou roli, jelikož je touto cestou transportován florigenní signál i represory kvetení. Navíc též zajišťuje přísun živin nutných pro vytvoření nových struktur. Symplastický transport tedy musí být během indukce kvetení regulován, aby došlo ke správnému načasování kvetení. Při tvorbě květů je symplastické propojení buněk důležité pro transport buněčně neautonomních molekul, jež ovlivňují vývoj květu.

2 Evoluční vznik symplastického propojení buněk

S rozvojem mnohobuněčnosti u streptophytní linie, kam patří i vyšší rostliny, bylo nutné zajistit komunikaci a výměnu látek mezi buňkami, které jsou však kromě cytoplasmatické membrány obklopeny navíc i buněčnou stěnou. Tento evoluční tlak vedl k vyvinutí plasmodesmů (PD), struktur, jež překlenují tuto bariéru. PD jsou úzké kanálky (o průměru kolem 50 nm) procházející buněčnou stěnou, což umožňuje propojení cytoplasmy sousedních buněk.

Struktury analogické PD vyšších rostlin se vyskytují již u mnohobuněčných řas, jež mají parenchymatické buňky dělicí se ve třech rovinách. Jedná se o některé zástupce řádu Coleochaetales a zástupce řádu Charales (Cook et al., 1997). Zástupci řádu Zygnematales, sesterské skupiny vyšších rostlin, jsou jednobuněčné a vláknité řasy a tvoří PD (Zhong et al., 2015). Je tedy pravděpodobné, že společný předek Zygnematales a vyšších rostlin také neměl PD. Předpokládá se, že došlo k paralelní evoluci PD (resp. struktur analogických PD) u Coleochaetales, Charales a u vyšších rostlin (Brunkard a Zambryski, 2017). PD, resp. struktury analogické PD se u těchto tří skupin liší svou stavbou (obr. 1) (Cook et al., 1997).



Obrázek 1: **Paralelní evoluce plasmodesmů (PD) u streptophytní linie:** PD vyšších rostlin i analogické struktury u řas jsou vystlány cytoplasmatickou membránou (okrově). "PD" u Charales mívají centrální strukturu (fialově), která však na rozdíl od membránového útvaru v PD vyšších rostlin není propojena s endoplasmatickým retikulem (ER) a jehlicovité struktury neznámého složení (žlutě). U "PD" Coleochaetales nebyly nalezeny žádné vnitřní struktury. PD vyšších rostlin prochází membránový útvar, zvaný desmotubulus (modře). Mezi plazmatickou membránou a desmotubulem se nachází tzv. cytoplasmatický rukáv (běžově). Oranžové šestiúhelníky značí proteiny nacházející se v PD. Kolem PD některých druhů trav se tvoří suberinová lamela (hnědě). (upraveno podle Brunkard a Zambryski, 2017)

3 Plasmodesmy vyšších rostlin

3.1 Vznik plasmodesmu

PD mohou být buď primární nebo sekundární, v závislosti na tom, jestli vznikly v průběhu cytokineze nebo až po cytokinezi.

3.1.1 Vznik primárních PD

Vznik primárních PD je vždy spojen s buněčným dělením, provazce endoplasmatického retikula (ER) jsou zachyceny v buněčné desce během depozice materiálu buněčné stěny řízené fragmoplastem (Ehlers a Kollmann, 2001). Buněčné dělení řízené pomocí fragmoplastu se vyskytuje již u charofytních řas, jejichž struktury analogické PD neobsahují desmotubulus odvozený od ER (Buschmann a Zachgo, 2016). Předpokládá se tedy, že zachycení ER v buněčné desce je aktivní proces, řízený mechanismy, jež vyvinuly vyšší rostliny (Brunkard a Zambryski, 2017). Byl navržen model, podle něhož se na tvorbě desmotubulu podílí retikulony (Knox et al., 2015), integrální membránové proteiny, jež indukují zakřivení membrány ER (Voeltz et al., 2006). Retikulony rodiny RTNLB (konkrétně RTNLB2, RTNLB3, RTNLB4 a RTNLB6) jsou během cytokineze rekrutovány do vznikající buněčné desky, kde se podílejí na modelování desmotubulu z kortikálního ER. RTNLB3 a RTNLB6 zůstávají v proteomu PD i po cytokinezi a udržují desmotubulus zúžený na průměr okolo 15 nm (Knox et al., 2015).

3.1.2 Vznik sekundárních PD

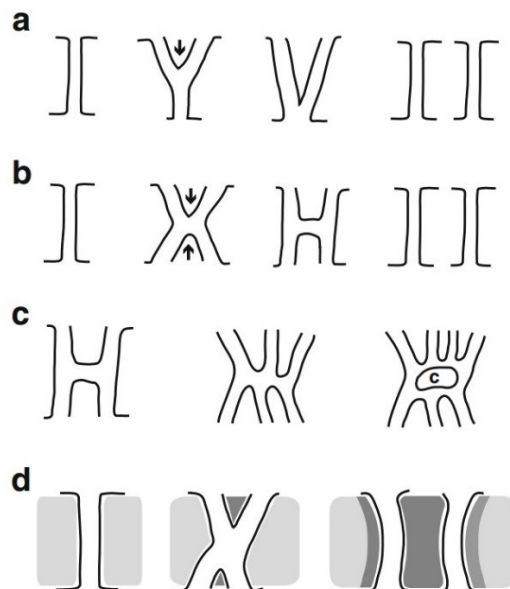
Sekundární PD mohou potenciálně vzniknout v kterékoli buněčné stěně a umožňují tedy i propojení buněk různých linií (Kaplan, 1992). Lze rozlišit dva typy sekundárních PD: sekundární PD, jež se vyvinuly z již existujících PD a PD vzniklé zcela *de novo* (Burch-Smith et al., 2011). Jak vznikají sekundární PD, není příliš objasněno, pravděpodobně se na jejich tvorbě také podílejí retikulony (Knox et al., 2015).

Dále bylo zjištěno, že tvorba sekundárních PD je regulována produkty genů *DSE1* (*DECREASED SIZE EXCLUSION LIMIT OF PLASMODESMATA 1*), *CHER1* (*CHOLINE TRANSPORTER-LIKE1*), *ISE1* a *ISE2* (*INCREASED SIZE EXCLUSION LIMIT OF PLASMODESMATA 1* resp. 2) (Xu et al., 2012; Kraner et al., 2017; Burch-Smith a Zambryski, 2010). U mutantů *dse1* bylo detekováno méně PD intermediátů ve tvaru Y a X, jež předchází vzniku sekundárních PD a méně párových PD (viz kapitola 3.2), s čímž souvisí snížení symplastického transportu u těchto mutantů (Xu et al., 2012). U *cher1* mutantů došlo k poklesu tvorby sekundárních PD, zatímco tvorba primárních PD nebyla narušena. Předpokládá se, že *CHER1* se podílí na modelaci membránových lipidů při tvorbě sekundárních PD (Kraner et al., 2017). Umlčení *ISE1* a *ISE2* vedlo

naopak ke zvýšení počtu sekundárních PD. Aktivita těchto genů je tedy důležitá pro omezení tvorby sekundárních PD a je důležitá již během embryogeneze. U embryí divokého genotypu dochází ve stádiu středního torpéda k redukci symplastického transportu, jež je nezbytná pro správný vývoj. U *ise1* a *ise2* mutantů je tato schopnost narušena a tyto mutanty jsou embryo-letální (Burch-Smith a Zambryski, 2010).

3.2 Typy plasmodesmů

Primární i sekundární PD lze dále rozlišit podle jejich morfologie na jednoduché, jež se vyskytují nejčastěji samostatně, ale mohou se vyskytnout i v párech (příčemž párové PD nejsou vzdáleny více než 100 nm od sebe) (Burch-Smith a Zambryski 2010), dále větvené PD a větvené PD s centrální dutinou. Tyto struktury nejsou neměnné, to znamená, že může přecházet jedna v druhou (obr. 2) (Burch-Smith et al. 2011).



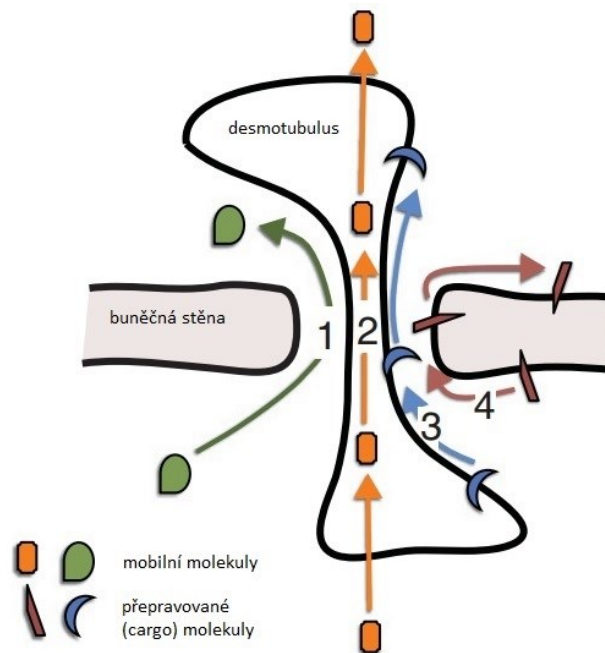
Obrázek 2: **Přechody mezi různými typy plasmodesmů:** a), b) přeměna jednoduchého PD na dvojité, a) k iniciaci zdvojení dochází v jednom místě: jednoduchý PD je nejdříve přeměněn na intermediát ve tvaru Y, poté ve tvaru V, až nakonec dojde k úplnému rozdělení PD, tedy ke vzniku dvojitého PD, b) k iniciaci zdvojení dochází zároveň ve dvou místech: jednoduchý PD je přeměněn v intermediát ve tvaru X, poté ve tvaru H, z něhož posléze vznikne dvojité PD, c) PD ve tvaru H může dát též vznik PD se složitější větvenou strukturou, která může mít i centrální dutinu (označena c), d) tvorba větveného a dvojitého PD určená depozicí nového materiálu buněčné stěny (znázorněno tmavě šedě), stávající buněčná stěna se oddaluje v laterálním směru (světle šedě) (převzato z Burch-Smith et al., 2011)

Zastoupení jednotlivých typů PD koreluje s rostlinným vývojem. V jiných než trvalých pletivech převažují jednoduché PD (Burch-Smith a Zambryski 2010). V trvalých pletivech se naopak vyskytují spíše PD s komplexnější strukturou, tedy větvené PD, které mohou mít i centrální dutinu (Ding et al. 1992). Dříve se dokonce myslelo, že embryo obsahuje pouze jednoduché PD, a že komplexní PD

jsou vlastností pouze mutantních embryí, ale bylo zjištěno, že embrya v časném až pozdním torpédovitém stádiu obsahují 5-9 % párových a rozvětvených PD (Burch-Smith a Zambryski 2010). Dále např. zdrojové listy obsahují především velmi rozvětvené PD a pouze asi 20 % jednoduchých, na rozdíl od mladých plně nefotosyntetizujících listů, kde jsou PD zhruba z 90 % jednoduché (Ding et al. 1992).

3.3 Struktura plasmodesmu

Cytoplazmatická membrána vystýlající PD a desmotubulus procházející středem PD vymezují čtyři různé transportní cesty (Wu a Gallagher, 2012): transport tzv. cytoplasmatickým rukávem - cytoplasmou nacházející se mezi plasmatickou membránou a desmotubulem, skrz lumen desmotubulu, který je kontinuem endoplasmatického retikula, laterální difúzí v membráně desmotubulu nebo laterální difúzí v cytoplasmatické membráně (obr. 3).



Obrázek 3: **Možné cesty transportu pomocí PD:** 1) cytoplasmatickým rukávem, 2) skrz lumen desmotubulu, 3) laterální difúzí v membráně desmotubulu, 4) laterální difúzí v cytoplasmatické membráně (upraveno podle Wu a Gallagher, 2012)

3.4 Faktory regulující transport plasmodesmy

Symplastický transport je ovlivněn velikostí a strukturou transportované molekuly, její subcelulární lokalizací a parametry PD. Se subcelulární lokalizací totiž souvisí to, jestli je molekula buněčně autonomní či neautonomní. Byla nalezena korelace mezi cytoplasmatickou lokalizací a schopností pohybu těchto tzv. buněčně neautonomních proteinů do okolních buněk. Buněčně autonomní proteiny si naopak musí zajistit udržení v buňce, ve které jsou exprimovány. To se děje buď pomocí

signální sekvence lokalizující protein do jádra nebo ER či tak, že tvoří proteinové komplexy, které již nejsou schopny projít PD (Crawford a Zambryski, 2000).

Mezi parametry PD patří velikost apertury PD, jež určuje velikostní limit transportovaných molekul neboli SEL (size exclusion limit). Dále typ struktury PD (např. protein viru tabákové mozaiky byl nalezen ve zdrojových listech v dutinách rozvětvených PD, zatímco v jednoduchých PD plně nefosyntetizujících listů nebyl detekován) (Ding et al., 1992). Dalším důležitým kritériem je přítomnost složek transportní mašinerie a schopnost jejich interakce s transportovanými molekulami. Na základě toho je rozlišována tzv. selektivní a neselektivní symplastická cesta (Crawford a Zambryski, 2000). Při selektivním transportu molekuly interagují s molekulárními mechanismy umožňujícími průchod PD, např. transkripční faktor SHOOT MERISTEMLESS (Kim et al., 2005b). Při neselektivním transportu se molekuly pohybují skrz PD difúzí, např. transkripční faktor LEAFY (Wu et al., 2003). Bylo zjištěno, že fúze proteinu, který je za běžných okolností buněčně autonomní s buněčně neautonomním proteinem, který prochází PD selektivní cestou, zajistí, že jsou společně transportovány selektivní cestou (Kim et al., 2005b).

3.4.1 Molekuly ovlivňující symplastický transport asociované s plasmodesmy

PD jsou asociovány s mnoha molekulami proteinové i neproteinové povahy (přehled molekul asociovaných s PD je znázorněn v obrázku 4).

3.4.1.1 Neproteinové složky asociované s PD

Z neproteinových složek, podílejících se na regulaci symplastického transportu, je nejvýznamnější kalóza (přehledně např. v Lee, 2015). Polysacharid kalóza je klíčovým regulátorem apertury, a tím pádem i permeability PD. Depozice kalózy lokalizovaná v oblasti buněčné stěny obklopující PD vyvolá tlak na plasmatickou membránu PD a způsobuje tak jeho zúžení, vedoucí ke snížení SEL nebo k dočasnému uzavření PD. Syntézu kalózy zajišťuje enzym kalózasyntáza, její štěpení enzym β -(1,3)-glukanáza (přehledně např. v Zavaliev et al., 2011). Poměr exprese těchto enzymů se mění dle aktuálních potřeb rostliny, např. biotický i abiotický stres vede ke zvýšení exprese kalózasyntázy (Cui a Lee, 2016). Poměr těchto enzymů též reguluje např. dormanci a rašení pupenů. V dormantním stavu je symplastický transport přerušen uzavřením PD všech buněk pomocí kalózy. Po vystavení dormantních pupenů chladné teplotě jsou aktivovány gibereliny, jež aktivují β -(1,3)-glukanázu, která zajistí štěpení kalózy, vedoucí k obnovení symplastické transportní cesty (Rinne et al., 2011). Dále se na regulaci množství kalózy v PD podílí protein vázající kalózu PDCB1 (PD CALLOSE BINDING PROTEIN 1) lokalizovaný specificky v oblasti krčku PD. Overexprese *PDCB1* vede ke zvýšené akumulaci kalózy v krčku PD, bránící symplastickému transportu (Simpson et al., 2009).

Buněčná stěna obklopující PD je dále obohacena o pektin, který je typický pro ztenčení buněčné stěny (Orfila a Knox, 2000). Lipidické složení cytoplasmatické membrány PD a membrány desmotubulu není příliš objasněno. Na základě detekce Remorinu (REM), rostlinně specifického proteinového markeru lipidových raftů, v cytoplasmatické membráně v okolí PD se předpokládá, že membrána vystylající PD obsahuje lipidové rafty (Raffaele et al., 2009).

3.4.1.2 Proteiny asociované s PD

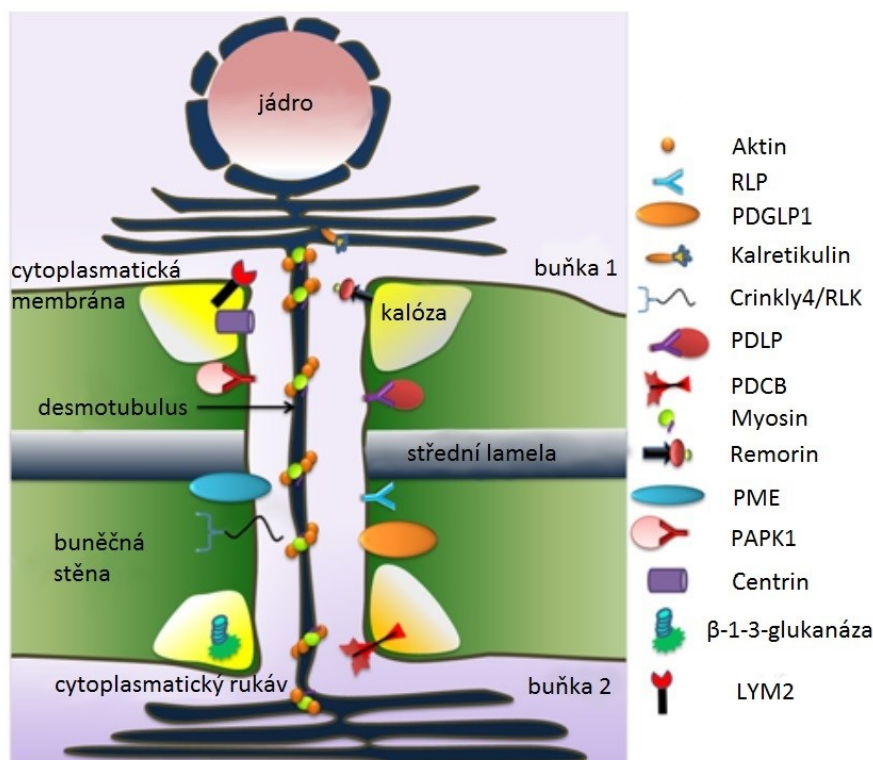
Z proteinových komponent, jež jsou asociovány s PD, jsou důležité proteiny cytoskeletu a na cytoskelet se vážící proteiny. Hlavní složkou cytoskeletu PD je aktin (White et al., 1994). Předpokládá se, že aktinový cytoskelet spolu s proteiny vážícími se na aktin, jako je např. myosin (Radford a White, 1998) a tropomyosin-like protein (Faulkner et al., 2009), se podílí na kontrole symplastického transportu (Ding et al., 1996). Aktinová mikrofilamenta jsou pravděpodobně spirálovitě obtočena kolem desmotubulu a spolu s proteiny vážícími se na tato vlákna ovlivňují průměr desmotubulu (White a Barton, 2011). Avšak přesný mechanismus není zcela objasněný. Mikrotubuly se též účastní symplastického transportu. Bylo např. zjištěno, že chemické či genetické narušení mikrotubulů vede k redukci symplastického transportu transkripčního faktoru SHORTROOT, klíčového regulátoru kořenového meristému (Wu a Gallagher, 2013).

S PD jsou dále asociovány proteiny vážící vápník - centrin a kalretikulin. Zvýšení hladiny volného Ca^{2+} vede ke snížení SEL PD. Předpokládá se tedy, že centrin a kalretikulin vazbou Ca^{2+} ovlivňují symplastické propojení buněk (Baluška et al., 1999; Blackman et al., 1999). Dalším proteinem detekovaným v PD je enzym pektin-methylesteráza (PME, Pectin methylesterase), který katalyzuje de-esterifikaci pektinů v buněčné stěně vedoucí k rozšíření PD (Chen et al., 2000). Především v PD kořene byl detekován protein PDGLP1 (PLASMODESMAL GERMIN-LIKE PROTEIN1), který hraje roli při translokaci molekul pomocí floému mezi kořenem hlavním a laterálními kořeny (Ham et al., 2012).

Dále bylo v PD detekováno 8 členů PDLPs (Plasmodesmal located proteins), což je skupina RLP (Receptor-like Proteins) s transmembránovou doménou. Ačkoli jejich funkce není zcela objasněna, bylo zjištěno, že overexprese *PDLPI* vede k omezení mezibuněčného transportu GFP (ZELENÝ FLUORESCENČNÍ PROTEIN, GREEN FLUORESCENT PROTEIN) (Amari et al., 2010). Overexprese *PDLP5* vedla též ke snížení permeability PD, v tomto případě zvýšením množství kalózy v PD (Lee et al., 2011). Dalším receptor-like proteinem, lokalizovaným v PD, je LYSIN MOTIF DOMAIN-CONTAINING GLYCOSYLPHOSPHATIDYLINOSITOL-ANCHORED PROTEIN 2 (LYM2), který v přítomnosti chitinu (jež se vyskytuje v buněčných stěnách houbových patogenů) zprostředkuje redukci symplastického toku molekul spuštěním signální dráhy vedoucí ke zvýšení depozice kalózy (Faulkner et al., 2013).

Další skupinou proteinů lokalizovanou v PD, jsou receptor-like kinázy (RLKs, Receptor-like Kinase) a s PD asociovaná proteinkináza (PAPK, Plasmodesmal-associated Protein Kinase). Mezi RLKs asociované s PD patří např. CRINKLY4 (CR4), která se podílí na zvýšení SEL PD (Tian et al., 2007). Jiná RLK asociovaná s PD, FLAGELLIN SENSING 2 (FLS2), se naopak účastní zavírání PD, jež je indukované navázáním ligandu flg22, což je peptid odvozený od flagelinu, proteinu, který tvoří bičík bakterií (Faulkner et al., 2013).

V membráně desmotubulu se nacházejí retikulony, proteiny rodiny RTNLB, indukující zakřivení membrány ER, jež se uplatňují jednak při formování desmotubulu během vzniku primárních PD (viz kapitola 3.1), ale podílejí se též na regulaci symplastického transportu tím, že ovlivňují průměr desmotubulu (Knox et al., 2015). Důležitými proteiny PD jsou též již zmíněné proteiny regulující množství kalózy (Simpson et al., 2009; Tilsner et al., 2016).



Obrázek 4: Molekuly asociované s PD (upraveno podle Kumar et al., 2015)

3.5 Metody studia symplastického pohybu molekul

Ke studiu symplastického transportu se používají symplastické tracers (značky – nejčastěji fluorescenční nebo barevné), které jsou zavedeny do buněk, a poté je sledován jejich pohyb. Tracer může být fúzován s molekulou, jejíž transport chceme sledovat či může být použit samostatně v případě, že chceme určit aperturu PD. Molekulová hmotnost traceru (příp. traceru fúzovaného se sledovanou molekulou) umožňuje blíže určit velikostní limit PD v různých částech rostliny a podle toho určit

hranice symplastických domén (viz následující kapitola) (Kim, *et al.*, 2005). Výhodným tracerem je GFP (27 kDa), protože neprochází membránou, není toxický a neváže se na žádnou buněčnou komponentu (Crawford a Zambryski, 2000). Dalším používaným tracerem je např.: HPTS (8-hydroxypyren-1,3,6-trisulfonová kyselina; 524 Da), který je též fluorescenční (Gisel *et al.*, 2002).

Další způsob, jak sledovat pohyb molekul, je použití imunolokalizačních metod, např. označení sledované molekuly pomocí polypeptidu c-Myc (1,2 kDa). Takto označené molekuly je pak možné detekovat použitím c-Myc monoklonální protilátky (Yoo *et al.*, 2013).

3.6 Symplastické domény

Symplastická doména/subdoména je skupina buněk symplasticky izolovaná od okolních buněk uzavřením PD, případně omezením transportu, v buněčné stěně ohraničující tuto doménu. Vzor symplastických domén se mění v prostoru i čase. Jednotlivé buňky mohou mít ve stejné vývojové fázi rostliny různý stav apertury PD, od zcela otevřených, přes různě zúžené, po zcela uzavřené (Crawford *et al.*, 2001). Tvorba symplastických domén je důležitá při imunitní odpovědi, kdy dochází k izolaci buněk napadených patogeny (Lim *et al.*, 2016), ale hlavní funkcí zakládání symplastických domén je symplastická izolace buněk podmiňující jejich fyziologickou funkci a regulace vývoje.

3.6.1 Symplastická izolace buněk podmiňující jejich fyziologickou funkci

Symplastická izolace buněk je nezbytná např. pro správnou funkci průduchů, jejichž otevírání/zavírání je řízeno na základě osmotických poměrů (Palevitz a Hepler, 1985). Symplastické bariéry zajišťují též izolaci nodu a internodií, kořenové čepičky a kořene či epidermis a primární kůry (Erwee a Goodwin, 1985). Dalším příkladem je izolace jednotlivých buněk dormantních pupenů (Rinne *et al.*, 2011). Dočasná symplastická izolace je též nezbytná např. během elongace buněk vláken bavlny (Pfluger a Zambryski, 2001) a při tvorbě kořenových vlásků (Duckett *et al.*, 1994).

3.6.2 Regulace symplastického propojení buněk během vývojových procesů

Vyšší rostliny, žijící přisedlým způsobem, se vyznačují velkou vývojovou plasticitou, která jim umožňuje reagovat na environmentální vlivy. Jejich vývoj je neukončený, tzn., že mohou po celý život zakládat nové orgány. Pro koordinaci vývoje je nezbytná mezibuněčná komunikace. Rostliny proto vyvinuly komplexní signalizační síť, která umožňuje regulaci jejich vývoje. K přenosu informace jsou využívány mobilní molekuly: peptidy, fytohormony, RNA, proteiny, metabolity.

Jelikož jsou rostlinné buňky obklopeny buněčnou stěnou, zabraňující jejich migraci, buněčný osud je určen především poziční informací, jež je zprostředkována právě mezibuněčnou komunikací

pomocí mobilních molekul. Transport těchto molekul probíhá apoplastickou i symplastickou cestou (Stahl a Simon, 2013). V další části práce se zaměřím zejména na regulaci symplastického transportu během indukce kvetení a tvorby květů (viz kapitola 4 a 5). Avšak změny v symplastickém propojení buněk jsou nezbytným regulačním mechanismem při všech vývojových změnách. Dynamické změny ve vzoru symplastických domén, umožňují uskutečnění specifických vývojových programů v omezených oblastech.

Již během embryogeneze je ustavení symplastických domén nezbytné pro tvorbu tělního plánu. Buňky na počátku vývoje embrya tvoří jednu symplastickou doménu, která sdílí společnou cytoplasmu, ale je oddělena od mateřských pletiv (Jensen, 1968; Mansfield a Briarty, 1991). S postupujícím vývojem embrya dochází k regulaci apertury PD, jež určí hranice symplastických subdomén: SAM (apikální meristém prýtu, shoot apical meristem), děloh, hypokotylu a kořene, jež korespondují s apikálně bazální osou rostliny (Kim et al., 2005).

V kořeni byl detekován buněčně neautonomní protein (NCAP, non-cell autonomous protein) SHORTROOT, jež je symplasticky transportován ze stéle do ostatních buněk, což je nezbytné pro jeho funkci: tvorbu radiálního vzoru a určení osudu buněk kořenové endodermis (Helariutta et al., 2000). Dalším NCAP detekovaným v kořeni je AT-HOOK MOTIF NUCLEAR-LOCALIZED PROTEIN 4 (AHL4), který se pohybuje z prokambia do xylému a jeho transport je vyžadován pro určení vzoru vodivých pletiv (Zhou et al., 2013). Dále např. UPBEAT1 (UPB1), který je transportován z buněk čepičky laterálních kořenů či vodivých pletiv do elongační zóny a podílí se na kontrole hladiny reaktivních forem kyslíku ovlivňující proliferaci (Tsukagoshi et al., 2010).

V prýtu bylo též detekováno několik symplasticky transportovaných NCAP, ovlivňujících vývoj. Např. KNOTTED1 (KN1), který reguluje tvorbu a udržování apikálního meristému prýtu (SAM) u *Zea mays* (Lucas et al., 1995) a jeho ortology u *A. thaliana* SHOOT MERISTEMLESS (STM) a KNOTTED-LIKE FROM ARABIDOPSIS THALIANA1 (KNAT1)/BREVIPEDICELLUS (BP), které jsou též buněčně neautonomní (Kim et al., 2003). Dalším z NCAP ovlivňujících vývoj prýtu je např. WUSCHEL (WUS), podílející se též na udržování kmenových buněk v SAM *A. thaliana* (např. Somssich a Je, 2016). Na roli symplastického transportu během indukce kvetení a tvorby květů se podrobněji zaměřím v následujících kapitolách.

4 Indukce kvetení

Správné načasování kvetení je naprosto zásadní. Rostliny proto vyvinuly regulační genetickou a molekulární síť, která integruje environmentální a endogenní signály (např. Srikanth a Schmid, 2011). Jednou z důležitých drah této regulační sítě je dráha fotoperiodická. Podle fotoperiodických nároků na indukci kvetení rozlišujeme: fotoperiodicky citlivé rostliny (ty mohou být krátkodenní, dlouhodenní, příp. fakultativně krátkodenní nebo fakultativně dlouhodenní) a fotoperiodicky neutrální rostliny. U

fotoperiodicky citlivých rostlin indukční fotoperioda iniciuje v listu produkci mobilního tzv. florigenního signálu (u fotoperiodicky neutrálních rostlin produkce není ovlivněna délkou dne), který je floémem transportován do SAM, kde indukuje kvetení (Corbesier et al., 2007; Mathieu et al., 2007).

4.1 Fotoperiodická dráha

Experimenty potvrzující existenci mobilního florigenního signálu (florigenu) provedl již ve 30. letech 20. stol. M. Chailakhyan. Zjistil, že pokud je naroubován neindukovaný vzrostný vrchol na podnož se světlem indukovanými listy, je rostlina schopná spustit kvetení. Prokázal tedy, že florigen je produkován v listech, odkud je floémem transportován do vzrostného vrcholu, kde spouští kvetení (Chailakhyan, 1936; cit. Aksenova et al., 2006). Bylo zjištěno, že florigen lze roubováním přenést i mezi různými druhy, a to i mezi druhy s odlišnými fotoperiodickými nároky (Lang et al., 1977). Avšak identita florigenu zůstala po několik desítek let neznámá.

Nejdříve se předpokládalo, že jako florigen fungují malé signální molekuly (např.: kyselina gibberelová, sacharóza, cytokininy) (Bernier, 1993). Ačkoli je indukce kvetení spojena s jejich navýšeným transportem do SAM (Gisel et al., 2002), tyto signály nejsou specifické jen pro indukci kvetení (Mouradov et al., 2002).

Nyní je známo několik genů z rodiny *FLOWERING LOCUS T (FT)*, jejichž produkty jsou transportovány na dlouhou vzdálenost a fungují jako florigenní signál. Nejznámější je *FLOWERING LOCUS T (FT)* (Corbesier et al., 2007; Mathieu et al., 2007), dále pak *TWIN SISTER OF FT (TSF)* (Jin et al., 2015) u *Arabidopsis thaliana* a jejich ortology u jiných druhů: např. *HEADING DATE 3A (Hd3a)* (Tamaki et al., 2007) a *RICE FLOWERING LOCUS T 1 (RFT1)* (Komiya et al., 2009) u *Oryza sativa*, *SINGLE-FLOWER TRUSS (SFT)* u *Solanum lycopersicum* (Lifschitz et al., 2006), *FLOWERING LOCUS T-LIKE 2 (FTL2)* u *Cucurbita moschata* (Yoo et al., 2013) a mnoho dalších (přehledně např. v Matsoukas et al., 2012). Jelikož správné načasování kvetení je nezbytné pro přežití a rozšíření druhu, exprese těchto genů je pod kontrolou mnoha endogenních i environmentálních faktorů (např. Turnbull, 2011).

Pokud je *A. thaliana* vystavena induktivním dlouhodobým podmínkám, je exprimován gen *CONSTANS (CO)*, jehož produktem je protein s motivem zinkového prstu, který funguje jako transkripční faktor (Putterill et al., 1995). Exprese *CO* je regulována na úrovni transkripce v odpovědi na expozici světlu, v závislosti na biologických hodinách, a na post-transkripční úrovni - stabilizací *CO* proteinu na světle (Valverde et al., 2004; Wheatley et al., 2001). *CO* je exprimován v průvodních buňkách floému listu a v SAM (Simon et al., 1996). Pro indukci kvetení je však rozhodující exprese *CO* v průvodních buňkách floému listu, kde aktivuje transkripci *FT*. Gen *FT* kóduje malý protein (20 kDa), který je transportován floémem do SAM, kde interaguje s 14-3-3 proteinem (např. Boer et al., 2013), který zajistí interakci *FT* s transkripčním faktorem *FLOWERING LOCUS D (FD)* (Abe et al., 2005).

Tento komplex aktivuje expresi *APETALA1 (AP1)* a *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CO1 (SOC1)*, který aktivuje expresi *LEAFY (LFY)*. LFY a AP1 fungují jako transkripční faktory, jež aktivují expresi homeotických genů určujících identitu květních orgánů (viz kapitola 5) (Winter et al., 2015).

TSF působí redundantně s FT. TSF protein stejně jako FT protein tvoří komplex s FD a aktivuje expresi stejných genů (Yamaguchi et al., 2005). Avšak regulace exprese *TSF* a *FT* genů podléhá mírně odlišným mechanismům. Oproti *ft* mutantům vykazuje *tsf* mutant menší zpoždění kvetení (Yamaguchi et al., 2005).

U *Oryza sativa*, jež je fakultativně krátkodenní, jsou proteiny florigenního signálu (homology FT) též exprimovány v listech, avšak *Hd3a* je exprimován za krátkodenních podmínek a *RFT1* naopak při dlouhodobých. Oba proteiny jsou transportovány do SAM. V cytoplasmě buněk SAM nezávisle na sobě interagují s 14-3-3 proteinem. Hd3a/14-3-3 a RFT1/14-3-3 komplexy jsou poté dopraveny do jádra, kde interagují s OsFD1, homologem FD. Tyto trimery pak aktivují expresi *OsMADS15*, což je homolog *AP1* (Taoka et al., 2011).

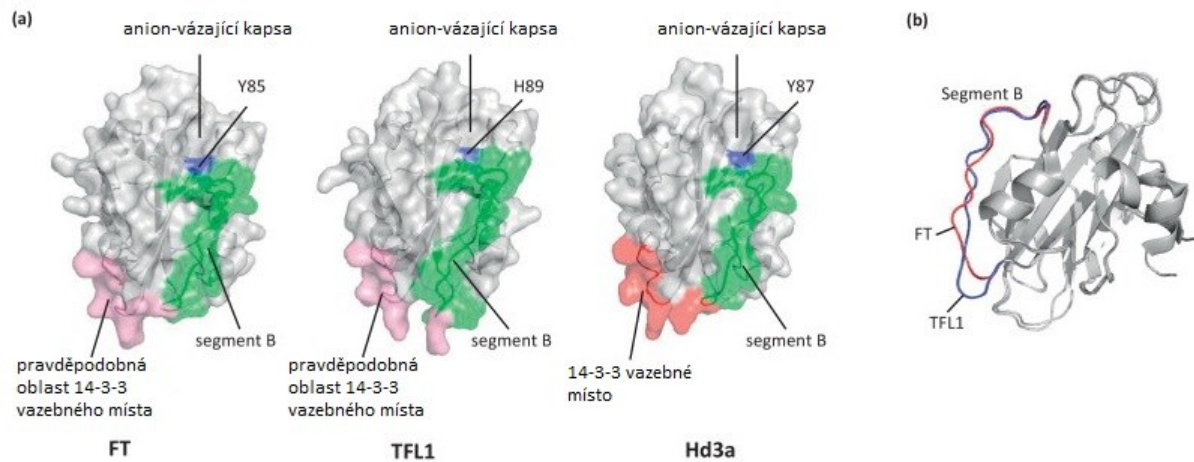
U *Solanum lycopersicum*, fotoperiodicky neutrální rostliny, je *SFT (SINGLE FLOWER TRUSS, ortolog FT)* exprimován v listech nezávisle na délce dne. SFT je také transportován do SAM, kde interaguje s několika 14-3-3 proteiny a se SPGB proteinem, jež je ortologem FD (Lifschitz et al., 2006).

4.2 Evoluce a funkce FT-like genů

Ačkoli úloha FT-like proteinů při indukci kvetení je konzervovaná u všech krytosemenných rostlin, bylo zjištěno, že během evoluce došlo mnohokrát k duplikaci FT like genů, jež pak v mnoha případech podstoupily různé změny vedoucí k částečnému nebo úplnému získání nové funkce jimi kódovaných proteinů (Wendel et al., 2009). Hrají tedy důležitou roli v diverzifikaci a adaptaci krytosemenných rostlin. Byly objeveny jak buněčně autonomní, tak neautonomní FT like proteiny, ovlivňující různé procesy.

FT-like geny patří do rodiny *PEBP* (phosphatidylethanolamine-binding protein). Předpokládá se, že se vznikem semenných rostlin došlo ke genové duplikaci vedoucí ke vzniku dvou typů *PEBP* genů: *MOTHER OF FT AND TFL1 (MFT)* a *FT/TFL1 (TERMINAL FLOWER1)*. Pouze u krytosemenných rostlin došlo k duplikaci v rámci *FT/TFL1* větve vedoucí k diverzifikaci na *FT*, jež kóduje protein podporující kvetení a *TFL1*, kódující represor kvetení (Hedman a Kallman, 2009). Struktura proteinů, jež jsou součástí florigenního signálu u různých druhů rostlin, je velmi konzervovaná (obr. 5a: porovnání struktury proteinů FT a Hd3). Narušení některých důležitých motivů vede buď k opožděnému kvetení nebo k úplné neschopnosti vykvést (Yoo et al., 2013). Bylo zjištěno, že represor kvetení TFL1 se od FT liší především v oblasti B segmentu (obr. 5). Při experimentech s chimérickým FT proteinem, jež měl substituovaný B segment z TFL1 bylo zjištěno, že změna B segmentu stačí ke změně funkce z florigenu

na represor kvetení (Ahn et al., 2006). Koordinace míry exprese a regulace transportu FT a TFL1 významně ovlivňuje dobu nástupu kvetení (Conti a Bradley, 2007).



Obrázek 5: **Struktura FT a FT-like proteinů:** a) Struktura proteinů florigenního signálu: FT *A. thaliana* a Hd3a (ortolog FT u rýže) a represoru kvetení - proteinu TFL1 u *A. thaliana*: Motivy Y85 a H89 jsou důležité pro schopnost indukce kvetení, 14-3-3 vazebné místo je důležité pro vazbu bZIP (Basic Leucine Zipper Domain) transkripčních faktorů (FD, resp. jeho ortologů). b) Porovnání B segmentu u FT a TFL1 proteinu u *A. thaliana*, (upraveno podle Taoka et al., 2013)

Byly provedeny experimenty zabývající se souvislostí mezi strukturou proteinů florigenního signálu a schopností indukovat kvetení u *Arabidopsis thaliana* a *Cucurbita moschata*, jež byly pěstovány při neinduktivní fotoperiodě a byla u nich navozena inducibilní exprese vnesených genů *FT/FTL2* (*FLOWERING LOCUS T-LIKE 2*, ortolog u *C. moscata*) s mutací, která vedla ke změně jedné aminokyseliny (Yoo et al., 2013). Několik z těchto rostlin kvetlo opožděně (mutanty s narušenou mobilitou FT), u některých vůbec indukce kvetení nenastala. U všech rostlin, které kvetly opožděně, byla mutace *FT/FTL2* lokalizována v oblasti kódující anion-vázající kapsu (obr. 5). Rostliny, které vůbec nevykvetly, měly mutaci v tomto genu lokalizovanou nejčastěji v oblasti kódující externí smyčku B segmentu. Když byly poté provedeny současně tři mutace *FT/FTL2* (konkrétně v reziduích V70A, S76A a R83A u FT a V69A, S75A a R82A u FTL2, zkráceně *vsr* mutanty), které jako jednoduché mutace způsobují opoždění kvetení, došlo ke ztrátě schopnosti indukovat kvetení. (Yoo et al., 2013)

V průběhu speciace rostlin proběhlo mnoho dalších genových duplikací, umožňujících získání proteinů s novými funkcemi. Fylogenetické studie odhalily početné duplikace *FT* v různých liniích (Sundstro et al., 2011). U některých druhů se vyskytuje mnoho kopií *FT* paralogů. Tyto paralogy mohou mít buď stejnou či odlišnou funkci, stejně tak místo a doba exprese může či nemusí být zachována.

Např. u *A. thaliana* *FT* a *TSF*, jejichž produkty působí redundantně při indukci kvetení (Yamaguchi et al., 2005), dále pak *TFL1* a *BROTHER OF FT*, kódující represory kvetení (Yoo et al., 2010). U topolu (*Populus spp.*) byly nalezeny paralogy *PtFT1* a *PtFT2*. *PtFT1* je exprimován přednostně na konci zimy a je zodpovědný za indukci kvetení, zatímco *PtFT2* je exprimován v době vegetativního

růstu a podílí se na zastavení růstu a zakládání pupenů (Hsu et al., 2011). Dále bylo zjištěno, že funkce *SFT* u *Solanum lycopersicum* závisí na množství jeho exprese. *SFT* protein nejdříve zajistí indukci kvetení a poté, když je *SFT* gen overexprimován, spustí tvorbu plodů (Krieger et al., 2010). Kromě toho, se podílí na organizaci architektury listu (Shalit et al., 2009). *ZCN8* (*Zea CENTRORADIALIS 8*) u *Zea mays* má také pleiotropní účinky, kromě indukce kvetení zprostředkuje zastavení růstu (Danilevskaya et al., 2011). U *Solanum tuberosum* byly objeveny paralogy: *StSP3D*, jehož aktivita zajišťuje indukci kvetení, *StSP6A*, který kontroluje přeměnu stolonu v hlízu, *StSP5G* a *StSP5G-like*, jejichž produkty jsou pravděpodobně represory kvetení/tuberizace (Abelenda et al., 2011).

Bylo zjištěno, že kromě těchto vývojových procesů, je míra exprese *FT*-like genů důležitá pro regulaci otevírání/zavírání průduchů. Overexprese *FT*-like genů vede ke zvýšení H^+ ATPázové aktivity a otevření průduchu (Kinoshita et al., 2011).

4.3 Role symplastického transportu během indukce kvetení

Symplastické propojení buněk hraje při indukci kvetení a tvorbě květenství/květů zásadní roli. Zprostředkovává transport proteinů (zejména transkripčních faktorů), RNA, dalších signálních molekul a živin na krátké vzdálenosti z buňky do buňky i na dlouhou vzdálenost pomocí floému (Turnbull, 2011). Symplastický transport malých molekul je zajištěn difúzí, tudíž je limitován pouze aperturou. V této práci se tedy zaměřím na transport makromolekul, jejichž transport může být limitován více mechanismy.

4.3.1 Transport florigenního signálu

Transport florigenu zahrnuje: jeho naložení do floému (tzn. transport z průvodních buněk floému do sítkovic), transport na dlouhou vzdálenost sítkovicemi (otvory sítkovic jsou modifikované PD), vyložení z floému (tzn. transport ze sítkovic do průvodních buněk) a pohyb florigenu z buňky do buňky po vyložení z floému až do cílových buněk apikálního meristému prýtu (SAM) (Mathieu et al., 2007; Jaeger a Wigge, 2007).

4.3.1.1 Transport FT proteinu

Transport mezi průvodními buňkami a sítkovicemi

Ačkoli mechanismy podílející se na transportu proteinu FT nejsou zcela objasněny, bylo zjištěno, že na regulaci jeho transportu mezi průvodními buňkami floému a sítkovicemi se podílí protein FTIP1 (FT-INTERACTING PROTEIN1), který je lokalizovaný na membráně ER/desmotubulu a pravděpodobně funguje jako chaperon. Mutantní *ftip1* rostliny *A. thaliana* kvetly opožděně při

induktivní fotoperiodě (Liu et al., 2012). Nicméně nedošlo k úplné ztrátě schopnosti indukovat kvetení u *ftip1* mutantů, proto se předpokládá, že transport florigenu je komplexní proces, regulovaný více různými mechanismy (Abe et al., 2015; Yoo et al., 2013).

Dalším proteinem, který se podílí na regulaci transportu FT proteinu je FE protein, dříve označovaný jako ALTERED PHLOEM DEVELOPMENT. FE má dvojí roli v regulaci FT. FE se jednak podílí na aktivaci transkripce FT v průvodních buňkách floému listů, ale také se podílí na kontrole transportu FT proteinu, tím že aktivuje transkripci FTIP1. (Abe et al., 2015)

Byla též navržena hypotéza, podle níž nakládání proteinu FT do floému probíhá difúzí. U *C. moschata* byla navozena inducibilní exprese mutantních genů *ft* (popsaných v kapitole 4.2) (Yoo et al., 2013). Všechny mutantní formy FT proteinu (včetně trojnásobného mutantu *vsr*), byly pomocí imunolokalizace detekovány ve floémové šťávě, což znamená, že jsou schopny projít skrz PD z průvodních buněk do sítkovic floému.

Pro zjištění, jakým způsobem je transport těchto proteinů skrz PD uskutečněn, byla použita stejná imunolokalizační metoda, avšak sledované proteiny byly sfúzovány s GFP (GREEN FLUORESCENT PROTEIN) a GST (GLUTATHION-S-TRANSFERÁZA), jež mají stejnou hmotnost (27 kDa), ale odlišný tvar, takže GFP se dokáže pohybovat skrz PD difúzí, zatímco GST je za běžných podmínek buněčně autonomní (Yoo et al., 2013; Taoka et al., 2007; Oparka et al., 1999). Pokud je sfúzován buněčně neautonomní protein pohybující se selektivní cestou s proteinem, který je za běžných podmínek buněčně autonomní, pohybují se společně selektivní cestou (viz kapitola 3.4) (Kim et al., 2005b). V extraktu z listů, ve kterých byla navozena ektopická exprese, byl detekován silný signál obou forem fúzních proteinů, avšak ve floémové šťávě, bylo detekováno malé množství proteinů, jež byly sfúzovány s GFP, a proteiny sfúzované s GST nebyly ve floémové šťávě vůbec detekovány (Yoo et al., 2013). V tomto experimentu FT protein nepomohl pohybu ani GFP ani GST skrz PD mezi průvodními buňkami a sítkovicemi, tudíž je pravděpodobné, že FT protein vstoupil do sítkovic neselektivní cestou, a že apertura PD mezi průvodními buňkami a sítkovicemi je dostatečná na to, aby byl umožněn průchod FT proteinu i bez specifické interakce (Yoo et al., 2013).

Je možné, že rozdílné názory na to, jak je florigen nakládán do floému, jsou ovlivněny tím, že při experimentu, který provedli Yoo et al. (2013) byla *C. moschata* pěstována při neinduktivní fotoperiodě a byla u ní navozena pouze exprese FT pod kontrolou HEAT SHOCK PROTEIN promotoru, nikoliv však exprese FTIP1, jehož expresi aktivuje FE protein, který je exprimován pod kontrolou fotoperiody (Abe et al., 2015). Je pravděpodobné, že za normálních okolností je nakládání florigenu do floému kontrolováno pomocí FTIP1 a částečně probíhá i difúzí (příp. pomocí dalších mechanismů, jež nejsou zatím známy), což by vysvětlovalo i to, proč nedošlo u *ftip1* mutantů k úplné ztrátě schopnosti indukovat kvetení. Další možností je vliv symplastického transportu FT mRNA na regulaci nástupu kvetení (viz následující kapitola).

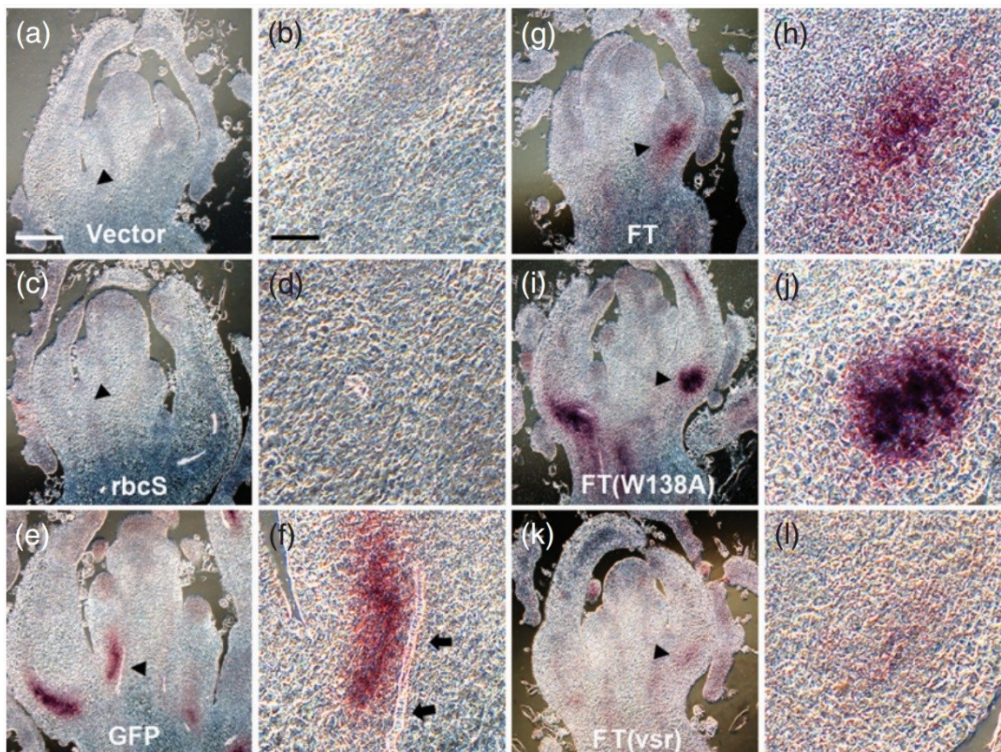
Transport sítkovicemi na dlouhou vzdálenost

Transport proteinu FT floémem na dlouhou vzdálenost je zprostředkován proteinem SODIUM POTASSIUM ROOT DEFECTIVE 1 (NaKR1) lokalizovaným ve floému. Exprese *NaKR1* je pod kontrolou CO, který aktivuje též expresi *FT*. U *nakr1-1* mutantů bylo detekováno méně FT signálu v oblasti pod SAM. Předpoklad, že NaKR1 reguluje transport proteinu FT sítkovicemi, potvrdil i fakt, že *nakr1-1* a *ftip1* mutace působí aditivně. Transport TSF (paralog FT) však pravděpodobně není regulován NaKR1. (Zhu et al., 2016)

Transport po vyložení z floému

Yoo et al. (2013) sledovali pohyb florigenu po vyložení z floému. Mutantní proteiny *vsr* byly ve vzrostném vrcholu buď ve velmi malém množství, nebo nebyly detekovány vůbec, ačkoli ve floémové šťávě detekovány byly. Pravděpodobně proto, že tyto mutace způsobily narušení motivu, který je důležitý pro interakci s mechanismy, jež umožňují průchod skrz PD buněk vzrostného vrcholu v oblasti po vyložení z floému selektivní cestou. Předpokládá se, že pro interakci s PD jsou rozhodující rezidua na povrchu FT proteinu, nikoliv B segment. U *ft* mutantů, s jednou aminokyselinovou substitucí (W138A) lokalizovanou v B segmentu tohoto proteinu, jež nebyly schopny vykvést, bylo totiž detekováno velké množství odpovídajícího proteinu (Yoo et al. 2013, obr. 6).

Ačkoli je obvykle apertura PD v méně diferencovaných pletivech vyšší, byl proveden experiment, který nasvědčuje tomu, že během indukce kvetení dochází k dočasnému snížení apertury PD ve vzrostném vrcholu. V této fázi totiž došlo k omezení transportu symplastického traceru HPTS (524 Da), transport malých molekul ≈ 350 Da (cytokininů, kyseliny giberelové a sacharózy) nebyl omezen (Gisel et al., 2002). Je tedy pravděpodobné, že větší molekuly transportované do vzrostného vrcholu při indukci kvetení musí interagovat s PD, aby navýšily SEL. Možným způsobem, jak navýšit SEL je aktivace β -(1,3)-glukanáz. Bylo zjištěno, že v dormantních pupenech topolu navýšení exprese *FT* vede k aktivaci giberelinů, jež aktivují β -(1,3)-glukanázy, a tak navyšují SEL (Rinne et al., 2011). Je možné, že na indukci kvetení se podílejí podobné mechanismy.



Obrázek 6: **Detekce FT proteinu a jeho mutantních forem fúzovaných s 4x c-Myc ve vzrostném vrcholu po vyložení z floému:** Imunolokalizační studie vzrostných vrcholů rostlin *C. moschata*, jež byly pěstovány při neinduktivní fotoperiodě a byla u nich navozena exprese různých forem FT (g, i, k, resp. h, j, l), za použití ZYMV (Zucchini yellow mosaic virus) jako vektoru. FT divokého genotypu (g, h) a FT (W138A) (i, j) s mutací lokalizovanou v B segmentu bylo detekováno velké množství, zatímco trojnásobný FT (vsr) mutantní protein (k, l) buď nebyl detekován nebo byl detekován ve velmi malém množství. ZYMV (a, b) a rbcS (ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase small subunit) (c, d) byly použity jako negativní kontrola, GFP (e, f) byl použit jako pozitivní kontrola. Měřítka: 200 μm (a, c, e, g, i, k), resp. 40 μm (b, d, f, h, j, l). (převzato z Yoo et al., 2013)

4.3.1.2 Transport *FT* mRNA

Bylo navrženo, že kromě FT proteinu může být z listu do vzrostného vrcholu floémem transportována i *FT* mRNA. Toto téma je však velmi kontroverzní, a to zejména kvůli nedokonalosti detekčních metod. Jedna z publikovaných prací, provedená na transgenní *A. thaliana*, podle níž je *FT* transkript transportován z listů do vzrostného vrcholu a podílí se na indukcii kvetení, byla kvůli neschopnosti reprodukovat tento pokus stažena (Huang et al., 2005). Následně byl proveden experiment, ve kterém byl použit *FT* gen se synonymními substitucemi ve 171 ze 175 kodonů, podle nějž nezáleží na primární sekvenci a sekundární struktuře *FT* mRNA, ale rozhodující je aminokyselinové složení proteinu podmiňující jeho strukturu (Notaguchi et al., 2008). Toto tvrzení je však v nesouladu s následnými výsledky. Na základě mutačních analýz, byl u *FT* mRNA odhalen na 5' konci cis element, čítající 102 nukleotidů, nezbytný pro pohyb tohoto transkriptu (Li et al., 2009).

Poté byly provedeny experimenty navržené tak, aby bylo možné oddělit účinky *FT* mRNA a FT proteinu při indukci kvetení (Li et al., 2011). U rostlin *N. tabacum* byla navozena exprese mutantní netranslatovatelné formy *FT* (*mFT*), jejíž start kodon byl přeměněn na stop kodon, za použití vektoru PVX (Potato virus X), jehož mobilita byla narušena, avšak PVX:*mFT* byl detekován ve vzrostném vrcholu. Netranslatovatelná forma pochopitelně neměla vliv na indukci kvetení, avšak transport nativní *FT* mRNA, za použití stejného vektoru, vyvolal urychlení kvetení. Předpokládá se, že *FT* mRNA může být ve vzrostném vrcholu translatována, čímž se navýší hladina FT proteinu, vedoucí k urychlení kvetení (Li et al., 2011). Je známo, že RNA pohybující se floémem, je před vstupem do vzrostného vrcholu tříděna, aby došlo k zabránění transportu virové RNA do SAM (Spiegelman et al., 2013). Avšak bylo zjištěno, že cis-působící element dokáže zajistit i transport virů, v tomto případě PVX, jež byl použit jako vektor (Li et al., 2009).

Dále byly provedeny roubovací experimenty, které též podporují tvrzení, že *FT* mRNA je transportována floémem do vzrostného vrcholu. V tomto experimentu, kdy byl FT protein označený červeným fluorescenčním proteinem (RFP, RED FLUORESCENT PROTEIN) zadržen v průvodních buňkách floému, byla RFP:*FT* RNA transportována na dlouhou vzdálenost do vzrostného vrcholu (Lu et al., 2012). Nicméně při pokusu, kdy byla použita miRNA namířená proti *FT* mRNA ve vzrostném vrcholu, nebyla indukce kvetení narušena, což vypovídá o tom, že pokud je zachován transport FT proteinu, *FT* mRNA není ve vzrostném vrcholu nezbytná pro schopnost indukovat kvetení (Mathieu et al., 2007). Zároveň to ale ani nevylučuje možnost, že je *FT* mRNA též transportována do vzrostného vrcholu, kde je pravděpodobně translatována, tudíž působí redundantně s transportem FT proteinu. Byla navržena hypotéza, podle níž je *FT* mRNA transportována do blízkosti PD SAM, kde slouží jako templát pro translaci FT proteinů, které pak mohou být rekrutovány do SAM pomocí PD (Notaguchi, 2014), což se děje pravděpodobně selektivně a nejspíše je zde vyžadována interakce FT proteinu s transportní mašinérií PD, jak již bylo zmíněno v předchozí kapitole.

4.3.2 Transport represoru kvetení – proteinu TFL1

TFL1, je blízce příbuzný *FT*, avšak protein, který kóduje, má antagonistickou funkci, tedy reprimuje expresi genů květní identity (Kobayashi et al., 1999). TFL1 protein určuje identitu vegetativního SAM napříč životním cyklem rostliny. Jeho exprese je omezena na buňky vnitřních vrstev SAM, avšak TFL1 protein ovlivňuje i osud buněk vnějších vrstev SAM. U *A. thaliana* bylo zjištěno, že TFL1 protein funguje jako mobilní signál, který je transportován z vnitřních vrstev meristému do vnějších, avšak ne do laterálních primordií, které tak mohou dát vznik postranním orgánům. (Conti a Bradley, 2007)

TFL1 protein se pohybuje rovnoměrně v celém meristému během všech vývojových stádií, s výjimkou indukce kvetení, kdy je u *A. thaliana* omezen vstup TFL1 proteinu do květního meristému.

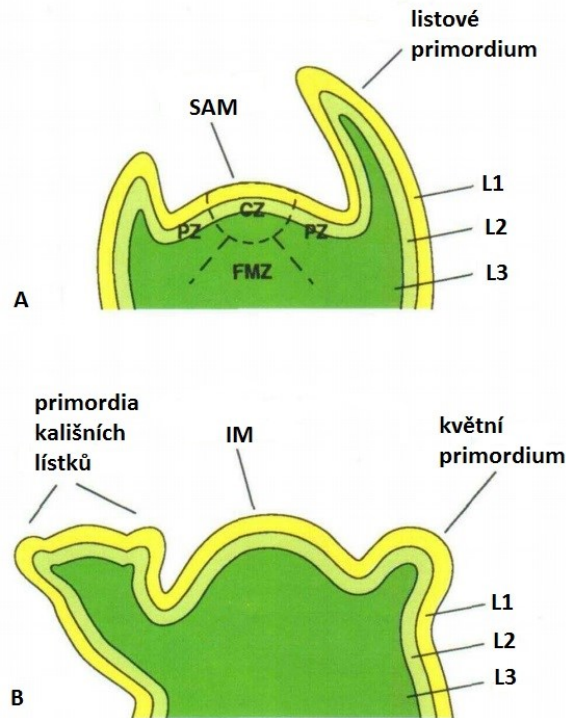
Předpokládá se, že transport TFL1 proteinu je zprostředkován PD a jedná se nejspíše o cílený transport, jelikož distribuce TFL1 proteinu nevykazuje gradient (Conti a Bradley, 2007) a odpovídalo by to i hypotéze, podle níž je SEL PD ve vzrostném vrcholu při indukci kvetení dočasně snížen, aby mohl být v této fázi lépe regulován transport velkých molekul (Gisel et al., 2002).

5 Tvorba květů/ květenství

5.1 Vznik květního meristému

Apikální meristém prýtu (SAM) je rozdělen do zón (obr. 7), jež mají různé funkce. Během vegetativního růstu dává periferní zóna SAM vznik listovým primordiím, ze kterých se vyvinou listy. V jejich úžlabí se nachází axilární meristém, jehož funkcí je vytváření postranních větví, na kterých se mohou tvořit další orgány. Při přechodu do generativní fáze dochází v buňkách SAM ke změně genové exprese, podmiňující tvorbu květenství/ květů. U *A. thaliana* je periferní zóna SAM přeměněna na přechodný neboli intermediální meristém (IM, inflorescence meristem), který dá vznik základu květenství. Květy vznikají z květního meristému (FM, floral meristem), jež vzniká z IM (obr. 8) (Ormenese et al., 2002). Analýza molekulárních markerů u *A. thaliana* odhalila, že FM je vlastně specializovaný axilární meristém (Long a Barton, 2000).

Počet a pozice kmenových buněk IM a FM jsou stejně jako v SAM kontrolovány zpětnovazebnou signalizační smyčkou WUSCHEL-CLAVATA (např. Somssich a Je, 2016) a aktivitou KNOX (KNOTTED1-like homeobox) proteinů (Lenhard et al., 2002). Vývoj květů je však na rozdíl od prýtu determinovaný, tudíž když se vyvinou květy/květenství, aktivita genů, jež určují identitu kmenových buněk, musí být v FM potlačena. Exprese *WUS* je tedy negativně regulována produkty genů rodin *MADS* a *BELL*, určujících identitu květních orgánů (viz kapitola 5.2.4) (Sun et al., 2009). Exprese těchto genů je aktivována transkripčními faktory *LEAFY* a *APETALA1*, jejichž exprese je závislá na florigenním signálu (viz kapitola 4.1) (Winter et al., 2015).



Obrázek 7: **Struktura SAM, IM a vznik květních primordií:** A: zóny SAM: L1 (epidermální) vrstva buněk a L2 (subepidemální) vrstva buněk jsou souhrnně označovány jako tunika a vyznačují se antiklinálním buněčným dělením. L3 buněčná vrstva je označována jako korpus a tyto buňky se dělí různými směry. Radiální domény: PZ: periferní zóna, FMZ: zóna dřevového meristému (file meristem zone neboli rib meristem), CZ: centrální zóna; Buňky periferní zóny dávají vznik laterálním orgánům, zatímco zóna dřevového meristému určuje velikost stonku. Centrální zóna reguluje velikost meristému a zásobuje kmenovými buňkami periferní a dřevovou zónu. B: IM a vznik květních primordií (upraveno podle Huala a Sussex, 1993)

5.2 Role symplastického transportu v květním meristému

Bylo prokázáno, že některé proteiny, podílející se na vývoji květů, jsou buněčně neautonomní a jejich transport je zprostředkován PD.

5.2.1 Transport KNOX transkripčních faktorů

Bylo zjištěno, že *KNOTTED1* (KN1) ze *Zea mays* a jeho ortolog *SHOOT MERISTEMLESS* (STM) z *A. thaliana*, transkripční faktory (TF) rodiny KNOX, jsou schopny procházet PD selektivní cestou (Lucas et al., 1995; Kim et al., 2003, 2005b). Jejich symplastický transport je nezbytný pro jejich správnou funkci - potlačení diferenciace buněk vegetativního SAM, IM a FM, umožňující jejich proliferaci pro vznik nových orgánů (Endrizzi et al., 1996). KN1 je prvním rostlinným proteinem, u něhož bylo zjištěno, že působí buněčně neautonomně. *KN1* je exprimován v L2 buněčné vrstvě, protein KN1 byl však detekován i v L1 vrstvě (Lucas et al., 1995). Lokalizace *STM* mRNA a STM proteinu se příliš neliší. *STM* mRNA byla, na rozdíl od *KN1* mRNA, detekována v L1 i L2 vrstvě (Long et al., 1996). Transgenní rostliny, u nichž bylo zabráněno transportu STM, však měly výrazně menší meristémy, což

nasvědčuje tomu, že transport STM z místa exprese do okolních buněk, je nezbytný pro dosažení správné velikosti meristému (Balkunde et al., 2017).

Na základě experimentu s obnovenou tvorbou trichomů (trichome rescue assay) bylo zjištěno, že pro selektivní symplastický transport KNOX TF, je nezbytná oblast homeodomény (Kim et al., 2005b). U *glabrous1 (gll)* mutantů, jež mají narušenou schopnost tvorby trichomů, byla navozena exprese fúzních proteinů GL1:KN1. *Gll* je za běžných podmínek exprimován v epidermis a je buněčně autonomní. Vnesené fúzní proteiny byly však exprimovány pod kontrolou promotoru malé podjednotky rubisco 2b, jež je aktivní v buňkách mezofylu (a svěřacích buňkách průduchů, což však neovlivňuje tento experiment, protože jsou symplasticky izolovány). Vnesené fúzní proteiny dokázaly částečně obnovit divoký fenotyp, což nasvědčuje tomu, že fúze s KN1 dokáže zajistit transport proteinu, který je za běžných okolností buněčně autonomní. Když pak byl tento experiment proveden s KN1 s narušenou homeodoménou, proteiny nebyly transportovány. Dále byl proveden tento pokus s konstruktem, který obsahoval z KN1 pouze homeodoménu a 3 aminokyseliny na N konci, a i přesto došlo k částečnému obnovení divokého fenotypu. Poté byly testy s obnovenou tvorbou trichomů provedeny s dalšími KNOX proteiny a bylo zjištěno, že pouze blízké příbuzné KNOX proteiny I. třídy (STM, KNAT1/ BP z *A. thaliana*, LeT6 ze *Solanum lycopersicum*) jsou schopny alespoň částečně obnovit tvorbu trichomů. (Kim et al., 2005b)

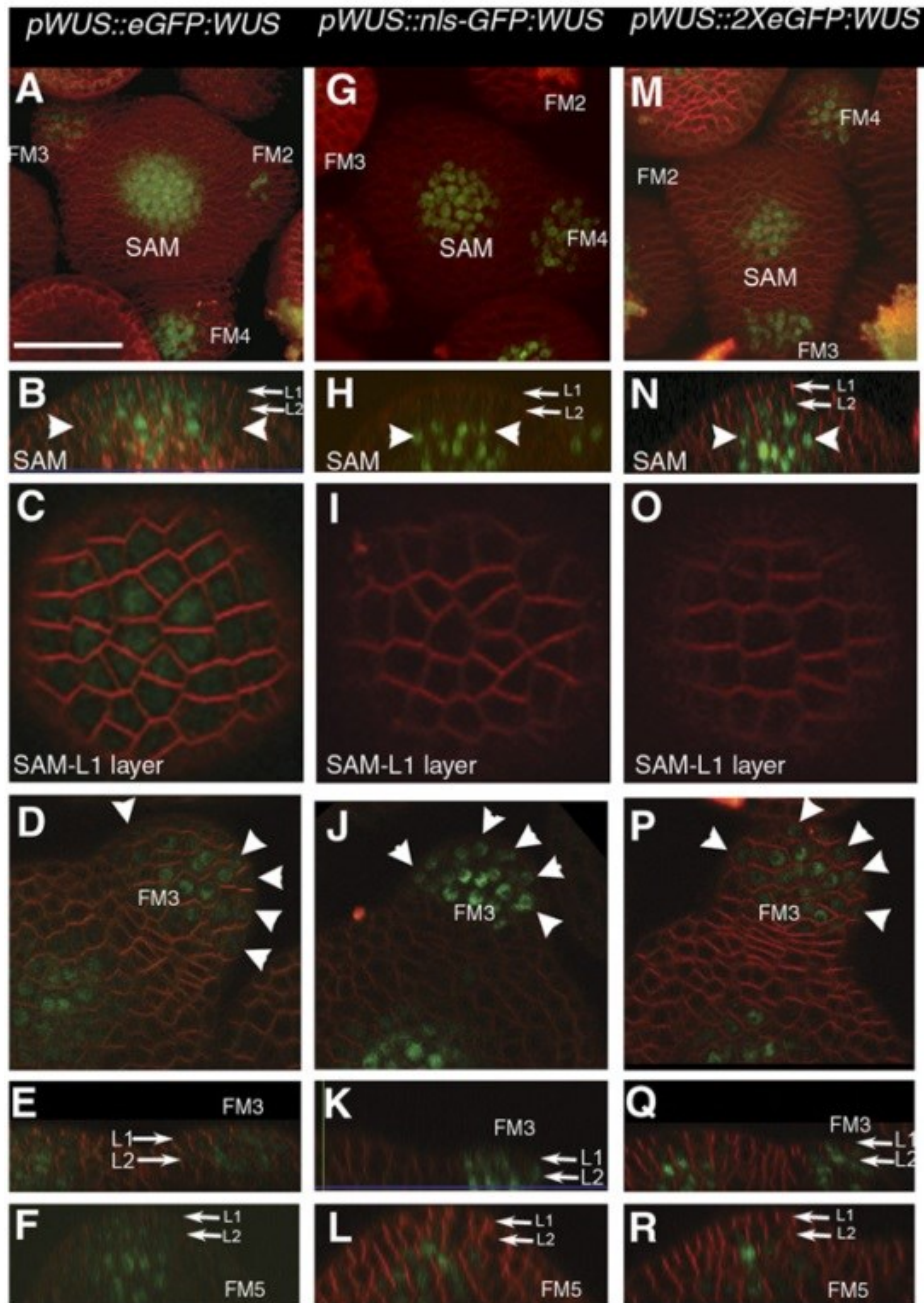
Později bylo zjištěno, že selektivní transport výše zmíněných KNOX proteinů, je umožněn díky jejich interakci s chaperoninovým komplexem (Xu et al., 2011). U linie *A. thaliana*, která byla schopna obnovit tvorbu trichomů (Kim et al., 2005b) byla navozena chemická mutagenese (Xu et al., 2011). Z těchto mutantů pak byly vybrány rostliny, které ztratily schopnost tvořit trichomy. Na základě mapování byly mutace detekovány v podjednotce CCT8 chaperoninového komplexu (Xu et al., 2011).

5.2.2 Transport WUSCHEL

Funkcí WUS je udržování identity kmenových buněk jak vegetativního SAM, tak i IM a FM. Vývoj květů je u *wus* mutantů ukončen předčasně z důvodu sníženého počtu kmenových buněk (Laux et al., 1996). Bylo zjištěno, že pro správnou funkci meristémů je nezbytný též symplastický transport WUS proteinu, pokud je jeho mobilita narušena, rostliny vykazují fenotyp částečně podobný jako *wus* mutanti (Yadav et al., 2011).

WUS transkripty označené eGFP (enhanced GFP) byly detekovány v L2 a v hlubších vrstvách FM, zatímco WUS protein (též označený eGFP; 60 kDa) byl detekován i v L1 vrstvě v časném i pozdním stádiu vývoje FM. Avšak v časném FM vykazoval WUS protein širší radiální rozšíření než v pozdním FM (obr. 8 A-F) (Yadav et al., 2011). Když byl pod kontrolou WUS promotoru exprimován fúzní *nls-GFP:WUS* (64 kDa; nls - jaderný lokalizační signál, nuclear localization signal), v rámci SAM byl protein detekován v L2 a hlubších vrstvách (doméně jeho exprese) a jenom v několika málo buňkách

L1. NLS tedy působilo inhibičně na symplastický transport WUS proteinu v SAM. Nicméně v časném FM se příliš nelišila distribuce nls-GFP:WUS a eGFP:WUS. V pozdním FM došlo opět k omezení transportu nls-GFP:WUS do L1 (obr. 8 G-L) (Yadav et al., 2011). Poté byl proveden kontrolní experiment, při němž byla pod kontrolou stejného promotoru navozena exprese 2x eGFP:WUS (87 kDa) s větší molekulovou hmotností. Opět byl narušen transport tohoto fúzního proteinu v SAM, zatímco v časném FM nebyla mobilita narušena a v pozdním FM došlo opět k omezení transportu z L2 vrstvy (obr. 8 M-R) (Yadav et al., 2011).



Obrázek 8: Vizualizace transportu eGFP:WUS (A-F), nls-GFP:WUS (G-L) a 2xeGFP:WUS (M-R) pod kontrolou nativního WUS promotoru: ve vegetativním SAM, v časném vývojovém stádiu FM (FM2, FM3) a pozdním vývojovém stádiu FM (FM4 a FM5) (Yadav et al., 2011)

Později bylo zjištěno, že transport WUS pomocí PD v SAM je selektivní. Stejně jako u KNOX transkripčních faktorů, je i zde pro selektivní symplastický transport vyžadována homeodoména. U WUS se homeodoména nachází na N-konci (Daum et al., 2014). Ve výše zmíněném experimentu s fúzními proteiny však byly nls a GFP fúzovány s N-koncem WUS (Yadav et al., 2011), je tedy pravděpodobné, že omezení transportu nls-GFP:WUS a 2x eGFP:WUS v SAM a pozdním FM je způsobeno narušením schopnosti homeodomény interagovat s molekulárními mechanismy, jež umožňují selektivní transport. Otázkou je, proč nedošlo k zabránění transportu těchto fúzních proteinů v časném FM (Yadav et al., 2011). Je možné, že ve stádiu časného vývoje FM mají PD v těchto buňkách vyšší aperturu a umožňují tak difúzi větších molekul, což by korespondovalo i s hypotézou, že LEAFY označený GFP (74 kDa) v této fázi prochází PD difúzí (viz následující kapitola).

Na základě porovnání homeodomén KNOX TF a WUS bylo zjištěno, že buněčně neautonomní proteiny nesdílí společný motiv umožňující selektivní transport PD. Jejich homeodomény sdílí jen malou sekvenční podobnost, rezidua nezbytná pro transport STM se u WUS nenachází. Navíc chaperoninový komplex, který se podílí na transportu KN1, pravděpodobně neovlivňuje transport WUS (Daum et al., 2014; Xu et al., 2011).

5.2.3 Transport LEAFY

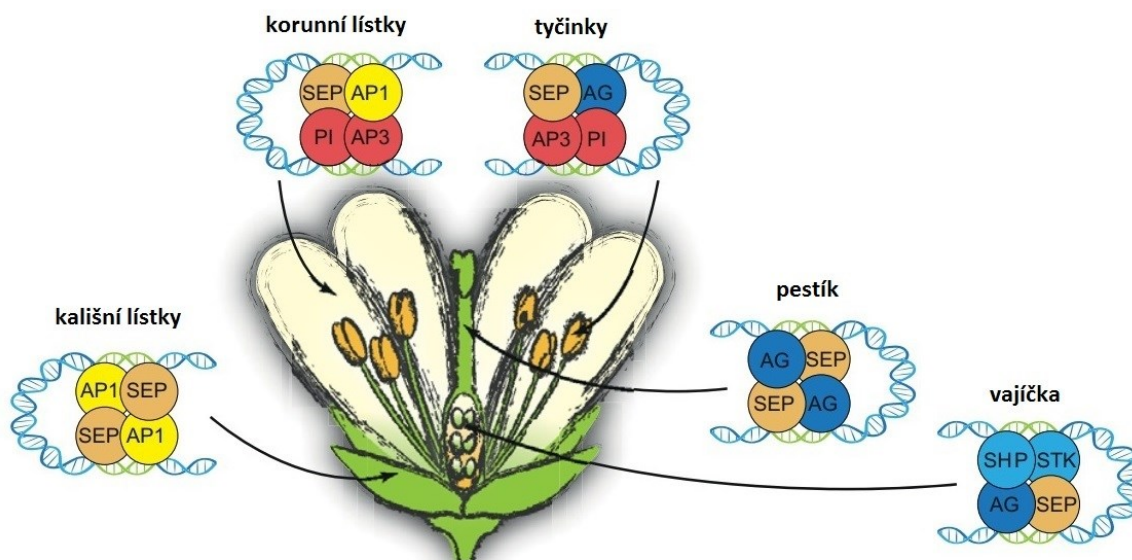
Bylo zjištěno, že transkripční faktor LEAFY (LFY) důležitý pro určení identity květního meristému (viz kapitola 4.1), se dokáže symplasticky pohybovat v rámci celého květního meristému (Sessions et al., 2000).

Avšak za běžných podmínek je v době časného vývoje květů *LFY* exprimován ve všech vrstvách FM, tudíž význam tohoto transport, není zcela jasný. Byla navržena hypotéza, podle níž symplastický transport buněčně neautonomních transkripčních faktorů v rámci jejich expresních domén zajišťuje obranu před náhodnými fluktuacemi v genové expresi jednotlivých buněk, a tím jejich synchronizaci (Becker a Ehlers, 2016).

Když byla u *lfy* mutantů *A. thaliana* navozena inducibilní exprese tohoto genu v L1 vrstvě vyvíjejícího se květu, došlo k plnému získání divokého fenotypu (Wu et al., 2003). Předpokládá se, že transport LFY pomocí PD probíhá difúzí. Distribuce LFY fúzovaného s GFP (74 kDa), jehož exprese byla navozena v L1 vrstvě, totiž vykazovala gradient s nejvyšší koncentrací v L1 vrstvě. Shodně s tím vyšel i další experiment, při kterém byl zkoumán transport tří mutantních forem proteinů LFY. U každé formy byla provedena delece zhruba třetiny kódující sekvence, jež se navzájem nepřekrývaly. Cílem bylo zjistit, jestli LFY obsahuje motiv důležitý pro interakci s PD. Všechny 3 formy mutantních *lfy* však měly schopnost symplastického transportu zachovánu, což nasvědčuje tomu, že se skutečně pohybuje difúzí (Wu et al., 2003). Ortolog LFY, u *Antirrhinum majus* - FLORICAULA je též transportován v rámci meristému (Carpenter a Coen, 1995).

5.2.4 Transport homeotických MADS box transkripčních faktorů

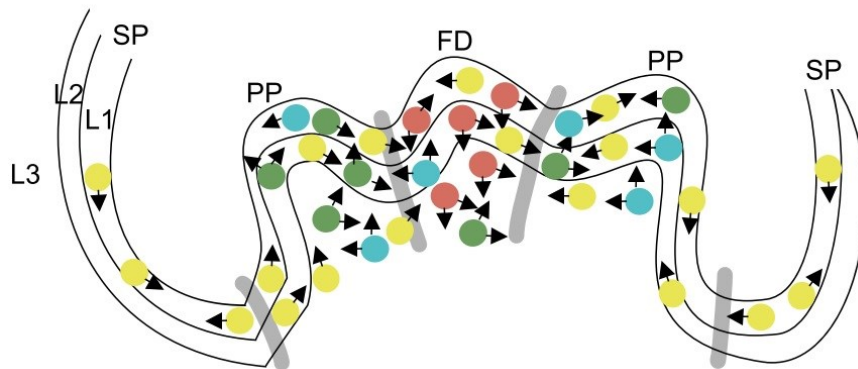
MADS box transkripční faktory se účastní květní přeměny, určení identity květních orgánů a determinace květu. Květ je tvořen čtyřmi soustřednými kruhy orgánů: kališních lístků, korunních lístků, tyčinek a pestíků. Identita jednotlivých květních orgánů je specifikována tetramery, tvořenými MADS box TF (obr. 9) (např. Theißen et al., 2016).



Obrázek 9: **MADS box TF: kvartetový model:** AP1- APETALA1, AP3-APETALA3 SEP- SEPALLATA, PI- PISTILLATA, AG- AGAMOUS, SHP- SHATTERPROOF, STK- SEEDSTICK (upraveno podle Theißen et al., 2016)

Bylo zjištěno, že jednotlivé MADS box TF mají cytoplasmatickou lokalizaci do doby, než vytvoří dimer, který je transportován do jádra, kde se dva dimery spojí v tetramer (Mcgonigle et al., 1996). Byly provedeny experimenty, s cílem zjistit, jestli jsou MADS box TF, předtím než dimerizují, schopny procházet PD. U *A. thaliana* byla navozena exprese: AG (33kDa), AP3 (28 kDa), PI (24 kDa) a SEP3 (29 kDa) fúzovaných s GFP (27 kDa) pod kontrolou MERISTEM LAYER 1 promotoru, jež je aktivní v epidermis a poté byl sledován jejich pohyb (Urbanus et al., 2010). Bylo zjištěno, že všechny sledované proteiny se dokázaly pohybovat v rámci buněk epidermis. Avšak jediný AG byl schopný procházet i do vnitřních buněčných vrstev. Sesterské buňky tuniky jsou propojeny především primárními PD, vzniklými během cytokineze, zatímco buňky různých vrstev jsou propojeny sekundárními PD (Ehlers a Kollmann, 2001). Předpokládá se, že transport sekundárními PD je více regulovaný než primárními PD, a že tedy transport AG mezi různými vrstvami meristémů proběhl selektivně a laterální transport v rámci jedné vrstvy je zprostředkován spíše difúzí primárními PD (Urbanus et al., 2010). V případě, že je laterální transport MADS box TF zprostředkován difúzí, mezi jednotlivými orgánovými primordii pravděpodobně existují difúzní bariéry (Becker a Ehlers, 2016).

Bylo však zjištěno, že ortology AP3 resp. PI u *Antirrhinum majus* - DEFICIENS (DEF) a GLOBOSA (GLO), se pohybují z L2 a L3 vrstvy do L1 vrstvy. Předpokládá se, že tento transport je unipolární, tedy že probíhá jen v akropetálním směru (Perbal et al., 1996). To, že se proteiny DEF a AP3, kódované ortologickými evolučně konzervovanými homeotickými geny, liší ve schopnosti procházet PD, nasvědčuje tomu, že některé druhy rostlin vyvinuly mechanismy umožňující transport některých ortologů sekundárními PD (Han et al., 2014). Hypotetický pohyb jednotlivých MADS box TF v květním primordiu je znázorněn v obrázku 10.



Obrázek 10: Schématické znázornění hypotetického pohybu MADS box TF v květním primordiu, založené na základě experimentů provedených u *A. thaliana* a *Antirrhinum majus*: SP- primordium kališního lístku (sepal primordium), PP-primordium korunního lístku (petal primordium), FD (floral dome); AP3/DEF (zeleně), PI/GLO (modře), SEP3 (žlutě), AG (červeně); šedé čáry značí bariéry pro transport mezi dvěma orgánovými primordii; černé šipky znázorňují směr pohybu (převzato z Becker a Ehlers, 2016)

Protein AP1, který jednak aktivuje expresi dalších homeotických genů, jejichž produkty určují identitu květních orgánů (regulace AP1 viz kapitola 4.1) a je též nezbytný pro určení identity kališních a korunních lístků, je pravděpodobně buněčně autonomní (Wu et al., 2003).

V pozdějším stádiu vývoje květů, kdy v semeníku pestíku vznikají vajíčka, je *AG* exprimován v poutku a vaječných obalech, avšak *AG* proteiny byly detekovány i v chaláze a nucellu, kde pravděpodobně spolu s *SEP3* a *BELL1* reprimují expresi *WUS*, čímž je zajištěn determinovaný vývoj květů (Urbanus et al., 2009; Kater a Colombo, 2007).

6 Závěr

Regulace symplastického propojení buněk a s ním související změny ve vzorci symplastických domén významně ovlivňují vývoj a fyziologické procesy rostlin. Škála symplasticky transportovaných molekul je velmi široká, tudíž i mechanismy umožňující jejich transport jsou velmi diverzifikovány. Molekuly procházející PD difúzí jsou limitovány jeho aperturou, která je dynamicky regulována v závislosti na endogenních a environmentálních podnětech a může se ve stejné vývojové fázi lišit u jednotlivých PD. Selektivní transport závisí na schopnosti interakce transportovaných molekul se složkami transportní mašinerie. Různé molekuly však pro svůj selektivní transport pomocí PD vyžadují různé složky transportní mašinerie, s nimiž specificky interagují. Navíc tyto složky transportní mašinerie se mohou vyskytovat specificky jen v některých částech rostliny a jejich exprese může být též pod kontrolou endogenních i environmentálních faktorů.

Důsledná regulace symplastického transportu je zvláště důležitá během vývojových změn. Jednou ze zásadních změn v rostlinném vývoji je přechod z vegetativní do generativní fáze. Velký pokrok v pochopení regulace kvetení znamenal nejen odhalení povahy mobilního florigenního signálu, ale i identifikace dalších signálních molekul a regulačních drah. Pro správné načasování je ovšem naprosto zásadní i správná distribuce těchto látek závisející mimo jiné i na jejich symplastickém transportu. Mechanismy těchto transportních procesů a jejich regulace i význam pro jednotlivé fáze kvetení nejsou však dosud uspokojivě objasněny.

7 Seznam použité literatury

- Abe, M., Kaya, H., Watanabe-Taneda, A., Shibuta, M., Yamaguchi, A., Sakamoto, T., Kurata, T., Ausín, I., Araki, T., a Alonso-Blanco, C.** (2015). FE, a phloem-specific Myb-related protein, promotes flowering through transcriptional activation of FLOWERING LOCUS T and FLOWERING LOCUS T INTERACTING PROTEIN 1. *Plant J.* **83**: 1059–1068.
- Abe, M., Kobayashi, Y., Yamamoto, S., a Daimon, Y.** (2005). FD, a bZIP Protein Mediating Signals from the Floral Pathway Integrator FT at the Shoot Apex. *Science* (80-.). **309**: 1052–1056.
- Abelenda, A., Cruz-oro, E., Cue, C.A., Tamaki, S., Silva, J., Shimamoto, K., a Navarro, C.** (2011). Control of flowering and storage organ formation in potato by FLOWERING LOCUS T. *Nature* **478**: 119–U132.
- Ahn, J.H., Miller, D., Winter, V.J., Banfield, M.J., Lee, J.H., Yoo, S.Y., Henz, S.R., Brady, R.L., a Weigel, D.** (2006). A divergent external loop confers antagonistic activity on floral regulators FT and TFL1. *EMBO J.* **25**: 605–614.
- Aksenova, N.P., Milyaeva, E.L., a Romanov, G. a.** (2006). Florigen goes molecular: Seventy years of the hormonal theory of flowering regulation. *Russ. J. Plant Physiol.* **53**: 401–406.
- Amari, K. et al.** (2010). A family of plasmodesmal proteins with receptor-like properties for plant viral movement proteins. *PLoS Pathog.* **6**: 1–10.
- Balkunde, R., Kitagawa, M., Xu, X.M., Wang, J., a Jackson, D.** (2017). SHOOT MERISTEMLESS trafficking controls axillary meristem formation , meristem size and organ boundaries in Arabidopsis. *The Plant Journal* **90**: 435–446.
- Baluška, F., Šamaj, J., Napier, R., a Volkmann, D.** (1999). Maize calreticulin localizes preferentially to plasmodesmata in root apex. *Plant J.* **19**: 481–488.
- Becker, A. a Ehlers, K.** (2016). Arabidopsis flower development—of protein complexes, targets, and transport. *Protoplasma* **253**: 219–230.
- Bernier, G.** (1993). Physiological Signals That Induce Flowering. *Plant Cell* **5**: 1147–1155.
- Blackman, L.M., Harper, J.D.I., a Overall, R.L.** (1999). Localization of a centrin-like protein to higher plant plasmodesmata. *Eur. J. Cell Biol.* **78**: 297–304.
- Boer, A.H. De, Kleeff, P.J.M. Van, a Gao, J.** (2013). Plant 14-3-3 proteins as spiders in a web of phosphorylation. *Protoplasma* **250**: 425–440.
- Brunkard, J.O. a Zambryski, P.C.** (2017). Plasmodesmata enable multicellularity: new insights into their evolution, biogenesis, and functions in development and immunity. *Curr. Opin. Plant Biol.* **35**: 76–83.
- Burch-Smith, T.M., Stonebloom, S., Xu, M., a Zambryski, P.C.** (2011). Plasmodesmata during development: Re-examination of the importance of primary, secondary, and branched plasmodesmata structure versus function. *Protoplasma* **248**: 61–74.
- Burch-Smith, T.M. a Zambryski, P.C.** (2010). Loss of increased size exclusion limit (ise)1 or ise2 increases the formation of secondary plasmodesmata. *Curr. Biol.* **20**: 989–993.
- Buschmann, H. a Zachgo, S.** (2016). The Evolution of Cell Division: From Streptophyte Algae to Land Plants. *Trends Plant Sci.* **21**: 872–883.
- Carpenter, R. a Coen, E.S.** (1995). Transposon induced chimeras show that floricaula , a meristem identity gene , acts non-autonomously between cell layers. *Development* **121**: 19–26.
- Conti, L. a Bradley, D.** (2007). TERMINAL FLOWER1 is a mobile signal controlling Arabidopsis architecture. *Plant Cell* **19**: 767–778.
- Cook, M.E., Graham, L.E., Botha, C.E.J., a Lavin, C.A.** (1997). Comparative Ultrastructure of Plasmodesmata of Chara and Selected Bryophytes: Toward an Elucidation of the Evolutionary Origin of Plant Plasmodesmata. *Am. J. Bot.* **84**: 1169–1178.
- Corbesier, L. et al.** (2007). FT Protein Movement Contributes to Long-Distance Signaling in Floral Induction of

- Arabidopsis. *Science* (80-.). **316**: 1030–1033.
- Crawford, K.M. a Zambryski, P.C.** (2000). Subcellular localization determines the availability of non-targeted proteins to plasmodesmatal transport. *Curr. Biol.* **10**: 1032–1040.
- Crawford, K.M., Zambryski, P.C., Physiology, S.P., Apr, N., Crawford, K.M., a Zambryski, P.C.** (2001). Non-Targeted and Targeted Protein Movement through Plasmodesmata in Leaves in Different Developmental and Physiological States. **125**: 1802–1812.
- Cui, W. a Lee, J.-Y.** (2016). Arabidopsis callose synthases CalS1/8 regulate plasmodesmal permeability during stress. *Nat. PLANTS* **2**: 1–9.
- Danilevskaya, O.N., Meng, X., Mcgonigle, B., a Muszynski, M.G.** (2011). Pleiotropic function of the maize flowering hormone florigen. *Plant Signal. Behav.* **6**: 1267–1270.
- Daum, G., Medzihradzky, A., Suzaki, T., a Lohmann, J.U.** (2014). A mechanistic framework for noncell autonomous stem cell induction in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**: 14619–14624.
- Ding, B., Haudenschild, J.S., Hull, R.J., Wolf, S., Beachy, R.N., a Lucas, W.J.** (1992). Secondary plasmodesmata are specific sites of localization of the tobacco mosaic virus movement protein in transgenic tobacco plants. *Plant Cell* **4**: 915–928.
- Ding, B., Kwon, M.O., a Warnberg, L.** (1996). Evidence that actin filaments are involved in controlling the permeability of plasmodesmata in tobacco mesophyll. *Plant J* **10**: 157–164.
- Duckett, C.M., Oparka, K.J., Prior, D.A.M., Dolan, L., a Roberts, K.** (1994). Dye-coupling in the root epidermis of Arabidopsis is progressively reduced during development. *Development* **120**: 3247–3255.
- Ehlers, K., Binding, H., a Kollmann, R.** (1999). The formation of symplasmic domains by plugging of plasmodesmata: a general event in plant morphogenesis? *Protoplasma* **209**: 181–192.
- Ehlers, K. a Kollmann, R.** (2001). Primary and secondary plasmodesmata: structure, origin, and functioning. *Protoplasma* **216**: 1–30.
- Endrizzi, K., Moussian, B., Haecker, A., Levvin, J.Z., a Laux, T.** (1996). The SHOOT MERISTEMLESS gene is required for maintenance of undifferentiated cells in Arabidopsis shoot and floral meristems and acts at a different regulatory level than the meristem genes WUSCHEL and ZWILLE. *Plant J.* **10**: 967–979.
- Erwee, M.G.. a Goodwin, P.B.** (1985). Symplast domains in extrastellar tissues of *Egeria-densa* Planch. *Planta* **163**: 9–19.
- Faulkner, C., Petutschnig, E., Benitez-Alfonso, Y., Beck, M., Robatzek, S., Lipka, V., a Maule, A.J.** (2013). LYM2-dependent chitin perception limits molecular flux via plasmodesmata. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **110**: 9166–9170.
- Faulkner, C.R., Blackman, L.M., Collings, D.A., Cordwell, S.J., a Overall, R.L.** (2009). Anti-tropomyosin antibodies co-localise with actin microfilaments and label plasmodesmata. *Eur. J. Cell Biol.* **88**: 357–369.
- Gisel, A., Hempel, F.D., Barella, S., a Zambryski, P.** (2002). Leaf-to-shoot apex movement of symplastic tracer is restricted coincident with flowering in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**: 1713–1717.
- Ham, B.-K., Li, G., Kang, B.-H., Zeng, F., a Lucas, W.J.** (2012). Overexpression of Arabidopsis Plasmodesmata Germin-Like Proteins Disrupts Root Growth and Development. *Plant Cell* **24**: 3630–3648.
- Han, X., Kumar, D., Chen, H., Wu, S., a Kim, J.** (2014). Transcription factor-mediated cell-to-cell signalling in plants. *J. Exp. Bot.* **65**: 1737–1749.
- Hedman, H. a Kallman, T.** (2009). Early evolution of the MFT-like gene family in plants. *Plant Mol. Biol.* **70**: 359–369.
- Helariutta, Y., Fukaki, H., Wysocka-diller, J., Nakajima, K., Jung, J., Sena, G., Hauser, M., a Benfey, P.N.** (2000). The SHORT-ROOT Gene Controls Radial Patterning of the Arabidopsis Root through Radial Signaling. *Cell* **101**: 555–567.

- Hsu, C. et al.** (2011). FLOWERING LOCUS T duplication coordinates reproductive and vegetative growth in perennial poplar. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**: 10756–10761.
- Huala, E. a Sussex, M.** (1993). Determination and Cell Interactions in Reproductive Meristems. *Plant Cell* **5**: 1157–1165.
- Huang, T., Böhlenius, H., Eriksson, S., Parcy, F., a Nilsson, O.** (2005). The mRNA of the Arabidopsis Gene FT Moves from Leaf to Shoot Apex and Induces Flowering. *Science* (80-.). **309**: 1694–1696.
- ***Chailakhyan, M.** (1936). New facts in support of the hormonal theory of plant development. *COMPTEs RENDUS L Acad. DES Sci. L URSS* **13**: 79–83.
- Chen, M.-H., Sheng, J., Hind, G., Handa, A.K., a Citovsky, V.** (2000). Interaction between the tobacco mosaic virus movement protein and host cell pectin methylesterases is required for viral cell-to-cell movement. *EMBO J.* **19**: 913–920.
- Jaeger, K.E. a Wigge, P.A.** (2007). FT Protein Acts as a Long-Range Signal in Arabidopsis. *Curr. Biol.* **17**: 1050–1054.
- Jens Tilsner, William Nicolas, Abel Rosado, and E.M.B.** (2016). Staying Tight: Plasmodesmal Membrane Contact Sites and the Control of Cell-to-Cell Connectivity in Plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* **67**: 1–28.
- Jin, S., Jung, H.S., Chung, K.S., Lee, J.H., a Ahn, J.H.** (2015). FLOWERING LOCUS T has higher protein mobility than TWIN SISTER OF FT. *J. Exp. Bot.* **66**: 6109–6117.
- Kaplan, D.R.** (1992). The Relationship of Cells to Organisms in Plants : Problem and Implications of an Organismal Perspective. *Int. J. Plant Sci.* **153**: S28–S37.
- Kater, M.M. a Colombo, L.** (2007). Genetic and Molecular Interactions between BELL1 and MADS Box Factors Support Ovule Development in Arabidopsis. *Plant Cell* **19**: 2544–2556.
- Kim, I., Kobayashi, K., Cho, E., a Zambryski, P.C.** (2005a). Subdomains for transport via plasmodesmata corresponding to the apical-basal axis are established during Arabidopsis embryogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**: 11945–50.
- Kim, J., Rim, Y., Wang, J., a Jackson, D.** (2005b). A novel cell-to-cell trafficking assay indicates that the KNOX homeodomain is necessary and sufficient for intercellular protein and mRNA trafficking. *Genes Dev.*: 788–793.
- Kim, J., Yuan, Z., a Jackson, D.** (2003). Developmental regulation and significance of KNOX protein trafficking in Arabidopsis. *Development* **130**: 4351–4362.
- Kinoshita, T., Ono, N., Hayashi, Y., Morimoto, S., Nakamura, S., Soda, M., Kato, Y., Ohnishi, M., a Nakano, T.** (2011). FLOWERING LOCUS T Regulates Stomatal Opening. *Curr. Biol.* **21**: 1232–1238.
- Knox, K., Wang, P., Kriechbaumer, V., Tilsner, J., Frigerio, L., Sparkes, I., Hawes, C., a Oparka, K.** (2015). Putting the Squeeze on Plasmodesmata: A Role for Reticulons in Primary Plasmodesmata Formation. *Plant Physiol.* **168**: 1563–1572.
- Kobayashi, Y., Kaya, H., Goto, K., Iwabuchi, M., a Araki, T.** (1999). A Pair of Related Genes with Antagonistic Roles in Mediating Flowering Signals. *Science* (80-.). **286**: 1960–1962.
- Komiya, R., Yokoi, S., a Shimamoto, K.** (2009). A gene network for long-day flowering activates RFT1 encoding a mobile flowering signal in rice. *Development* **136**: 3443–3450.
- Kraner, M.E., Link, K., Melzer, M., Ekici, A.B., Uebe, S., Tarazona, P., Feussner, I., Hofmann, J., a Sonnwald, U.** (2017). Choline transporter-like1 (CHER1) is crucial for plasmodesmata maturation in Arabidopsis thaliana. *Plant J.* **89**: 394–406.
- Krieger, U., Lippman, Z.B., a Zamir, D.** (2010). The flowering gene SINGLE FLOWER TRUSS drives heterosis for yield in tomato. *Nat. Genet.* **42**: 459–U138.
- Kumar, R., Kumar, D., Hyun, T.K., a Kim, J.Y.** (2015). Players at plasmodesmal nano-channels. *J. Plant Biol.* **58**: 75–86.
- Lang, A., Chailakhyan, M., a Frolova, I.A.** (1977). Promotion and inhibition of flower formation in a

- dayneutral plant in grafts with a short-day plant and a long-day plant. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **74**: 2412–2416.
- Laux, T., Mayer, K.F.X., Berger, J., Jürgens, G., Genetik, L., a München, L.** (1996). The WUSCHEL gene is required for shoot and floral meristem integrity in Arabidopsis. *Development* **122**: 87–96.
- Lee, J.-Y.** (2015). Plasmodesmata: a signaling hub at the cellular boundary. *Curr. Opin. Plant Biol.* **27**: 133–140.
- Lee, J.-Y., Wang, X., Cui, W., Sager, R., Modla, S., Czymmek, K., Zybaliyov, B., van Wijk, K., Zhang, C., Lu, H., a Lakshmanan, V.** (2011). A Plasmodesmata-Localized Protein Mediates Crosstalk between Cell-to-Cell Communication and Innate Immunity in Arabidopsis. *Plant Cell* **23**: 3353–3373.
- Lee, J.Y. a Lu, H.** (2011). Plasmodesmata: The battleground against intruders. *Trends Plant Sci.* **16**: 201–210.
- Lenhard, M., Jürgens, G., a Laux, T.** (2002). The WUSCHEL and SHOOTMERISTEMLESS genes fulfil complementary roles in Arabidopsis shoot meristem regulation. *Development* **129**: 3195–3206.
- Li, C., Gu, M., Shi, N., Zhang, H., Yang, X., Osman, T., a Liu, Y.** (2011). Mobile FT mRNA contributes to the systemic florigen signalling in floral. *Sci. Rep.* **1**: 1–6.
- Li, C., Zhang, K., Zeng, X., Jackson, S., Zhou, Y., a Hong, Y.** (2009). A cis Element within Flowering Locus T mRNA Determines Its Mobility and Facilitates Trafficking of Heterologous Viral RNA. *J. Virol.* **83**: 3540–3548.
- Lifschitz, E., Eviatar, T., Rozman, A., Shalit, A., Goldshmidt, A., Amsellem, Z., Alvarez, J.P., a Eshed, Y.** (2006). The tomato FT ortholog triggers systemic signals that regulate growth and flowering and substitute for diverse environmental stimuli. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 6398–6403.
- Lim, G., Shine, M.B., Lorenzo, L. De, Lee, J., Lim, G., Shine, M.B., Lorenzo, L. De, Yu, K., Cui, W., Navarre, D., a Hunt, A.G.** (2016). Plasmodesmata Localizing Proteins Regulate Transport and Signaling during Systemic Acquired Immunity in Plants. *Cell Host Microbe* **19**: 541–549.
- Liu, L., Liu, C., Hou, X., Xi, W., Shen, L., Tao, Z., Wang, Y., a Yu, H.** (2012). FTIP1 is an essential regulator required for florigen transport. *PLoS Biol.* **10**: 1–14.
- Long, J.A., Moan, E.I., Medford, J.I., a Barton, K.M.** (1996). A member of the KNOTTED class of homeodomain proteins encoded by the STM gene of Arabidopsis. *Nature* **379**: 66–69.
- Long, J. a Barton, M.K.** (2000). Initiation of Axillary and Floral Meristems in Arabidopsis. *Dev. Biol.* **218**: 341–353.
- Lu, K., Huang, N., Liu, Y., Lu, C., a Yu, T.** (2012). Long-distance movement of Arabidopsis FLOWERING LOCUS T RNA participates in systemic floral regulation. *RNA Biol.* **9**: 653–662.
- Lucas, W.J. et al.** (1995). Selective Trafficking of KNOTTED1 Homeodomain Protein and Its mRNA Through Plasmodesmata. *Science* (80-.). **270**: 1980–1983.
- Mathieu, J., Warthmann, N., Küttner, F., a Schmid, M.** (2007). Export of FT Protein from Phloem Companion Cells Is Sufficient for Floral Induction in Arabidopsis. *Curr. Biol.* **17**: 1055–1060.
- Matsoukas, I.G., Massiah, A.J., a Thomas, B.** (2012). Florigenic and Antiflorigenic Signaling in Plants. *Plant Cell Physiol.* **44**: 1827–1842.
- Mcgonigle, B., Bouhidel, K., a Irish, V.F.** (1996). Nuclear localization of the Arabidopsis APETALA3 and PISTILLATA homeotic gene products depends on their simultaneous expression. *Genes Dev.*: 1812–1821.
- Mouradov, A., Cremer, F., a Coupland, G.** (2002). Control of flowering time: interacting pathways as a basis for diversity. *Plant Cell* **14**: S111–S130.
- Notaguchi, M.** (2014). Identification of phloem-mobile mRNA. *J. Plant Res.* **128**: 27–35.
- Notaguchi, M., Abe, M., Kimura, T., Daimon, Y., Kobayashi, T., Yamaguchi, A., Tomita, Y., Dohi, K., Mori, M., a Araki, T.** (2008). Long-distance, graft-transmissible action of Arabidopsis FLOWERING LOCUS T protein to promote flowering. *Plant Cell Physiol.* **49**: 1645–1658.
- Oparka, K.J., Roberts, A.G., Boevink, P., Cruz, S.S., Roberts, I., Pradel, K.S., Imlau, A., Kotlizky, G., Sauer, N., a Epel, B.** (1999). Simple, but not branched, plasmodesmata allow the nonspecific trafficking

- of proteins in developing tobacco leaves. *Cell* **97**: 743–754.
- Orfila, C. a Knox, J.P.** (2000). Spatial Regulation of Pectic Polysaccharides in Relation to Pit Fields in Cell Walls of Tomato Fruit Pericarp. *Plant Physiol.* **122**: 775–781.
- Ormenese, S., Havelange, A., Bernier, G., a Van der Schoot, C.** (2002). The shoot apical meristem of *Sinapis alba* L. expands its central symplasmic field during the floral transition. *Planta* **215**: 67–78.
- Palevitz, B.A. a Hepler, P.K.** (1985). Changes in dye coupling of stomatal cells of *Allium* and *Commelina* demonstrated by microinjection of Lucifer yellow. *Planta* **164**: 473–479.
- Perbal, M., Haughn, G., Saedler, H., a Schwarz-sommer, Z.** (1996). Non-cell-autonomous function of the Antirrhinum floral homeotic proteins DEFICIENS and GLOBOSA is exerted by their polar cell-to-cell trafficking. *Development*: 3433–3441.
- Pflugner, J. a Zambryski, P.C.** (2001). Cell growth : The power of symplastic isolation. *Curr. Biol.* **11**: R436–R439.
- Putterill, J., Robson, F., Lee, K., Simon, R., a Coupland, G.** (1995). The CONSTANS gene of arabidopsis promotes flowering and encodes a protein showing similarities to zinc finger transcription factors. *Cell* **80**: 847–857.
- Radford, J.E. a White, R.G.** (1998). Localization of a myosin-like protein to plasmodesmata. *Plant J.* **14**: 743–750.
- Raffaele, S. et al.** (2009). Remorin, a Solanaceae Protein Resident in Membrane Rafts and Plasmodesmata, Impairs Potato virus X Movement. *Plant Cell* **21**: 1541–1555.
- Rinne, P.L.H., Welling, A., Vahala, J., Ripel, L., Ruonala, R., Rinne, P.L.H., Welling, A., Vahala, J., Ripel, L., Ruonala, R., a Kangasjärvi, J.** (2011). Chilling of Dormant Buds Hyperinduces FLOWERING LOCUS T and Recruits GA-Inducible 1, 3-β-Glucanases to Reopen Signal Conduits and Release Dormancy in *Populus*. *Plant Cell* **23**: 130–146.
- Ruiz-Medrano, R., Xoconostle-Cázares, B., a Lucas, W.J.** (2001). The phloem as a conduit for inter-organ communication. *Curr. Opin. Plant Biol.* **4**: 202–209.
- Sessions, A., Yanofsky, M.F., Weigel, D., Sessions, A., Yanofsky, M.F., a Weigelt, D.** (2000). Cell-Cell Signaling and Movement by the Floral Transcription Factors LEAFY and APETALA1. *Science* (80-.). **289**: 779–781.
- Shalit, A. et al.** (2009). The flowering hormone florigen functions as a general systemic regulator of growth and termination. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **106**: 8392–8397.
- Simon, R., Igeno, M.I., a Coupland, G.** (1996). Activation of floral meristem identity genes in *Arabidopsis*. *Nature* **384**: 59–62.
- Simpson, C., Thomas, C., Findlay, K., Bayer, E., a Maule, A.J.** (2009). An *Arabidopsis* GPI-Anchor Plasmodesmal Neck Protein with Callose Binding Activity and Potential to Regulate Cell-to-Cell Trafficking. *Plant Cell* **21**: 581–594.
- Somssich, M. a Je, B. II** (2016). CLAVATA-WUSCHEL signaling in the shoot meristem. *Development* **143**: 3238–3248.
- Spiegelman, Z., Golan, G., a Wolf, S.** (2013). Don't kill the messenger: Long-distance trafficking of mRNA molecules. *Plant Sci.* **213**: 1–8.
- Srikanth, A. a Schmid, M.** (2011). Regulation of flowering time : all roads lead to Rome. *Cell. Mol. Life Sci.* **68**: 2013–2037.
- Stahl, Y. a Simon, R.** (2013). Gated communities: Apoplastic and symplastic signals converge at plasmodesmata to control cell fates. *J. Exp. Bot.* **64**: 5237–5241.
- Sun, B., Xu, Y., Ng, K., a Ito, T.** (2009). A timing mechanism for stem cell maintenance and differentiation in the *Arabidopsis* floral meristem. *Genes Dev.* **23**: 1791–1804.
- Sundstro, J.F., Moore, D., Karlgren, A., Gyllenstrand, N., Ka, T., Lascoux, M., a Lagercrantz, U.** (2011).

- Evolution of the PEBP Gene Family in Plants : Functional Diversification in Seed Plant Evolution. *Plant Physiol.* **156**: 1967–1977.
- Tamaki, S., Matsuo, S., Wong, H.L., Yokoi, S., a Shimamoto, K.** (2007). Hd3a protein is a mobile flowering signal in rice. *Science* (80-.). **316**: 1033–1036.
- Taoka, K. et al.** (2011). 14-3-3 proteins act as intracellular receptors for rice Hd3a florigen. *Nature* **476**: 332–335.
- Taoka, K., Ham, B.K., Xoconostle-Cazares, B., Rojas, M.R., a Lucas, W.J.** (2007). Reciprocal phosphorylation and glycosylation recognition motifs control NCAPP1 interaction with pumpkin phloem proteins and their cell-to-cell movement. *Plant Cell* **19**: 1866–1884.
- Taoka, K.I., Ohki, I., Tsuji, H., Kojima, C., a Shimamoto, K.** (2013). Structure and function of florigen and the receptor complex. *Trends Plant Sci.* **18**: 287–294.
- Theißen, G., Melzer, R., a Ru, F.** (2016). MADS-domain transcription factors and the floral quartet model of flower development : linking plant development and evolution. *Development* **143**: 3259–3271.
- Thyssen, G., Svab, Z., a Maliga, P.** (2012). Cell-to-cell movement of plastids in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**: 2439–43.
- Tian, Q., Olsen, L., Sun, B., Lid, S.E., Brown, R.C., Lemmon, B.E., Fosnes, K., Gruis, D. (Fred), Opsahl-Sorteberg, H.-G., Otegui, M.S., a Olsen, O.-A.** (2007). Subcellular Localization and Functional Domain Studies of DEFECTIVE KERNEL1 in Maize and Arabidopsis Suggest a Model for Aleurone Cell Fate Specification Involving CRINKLY4 and SUPERNUMERARY ALEURONE LAYER1. *Plant Cell* **19**: 3127–3145.
- Tsukagoshi, H., Busch, W., a Benfey, P.N.** (2010). Transcriptional Regulation of ROS Controls Transition from Proliferation to Differentiation in the Root. *Cell* **143**: 606–616.
- Turnbull, C.** (2011). Long-distance regulation of flowering time. *J. Exp. Bot.* **62**: 4399–4413.
- Turnbull, C.G.N. a Lopez-Cobollo, R.M.** (2013). Heavy traffic in the fast lane: Long-distance signalling by macromolecules. *New Phytol.* **198**: 33–51.
- Urbanus, S.L., Folter, S. De, Shchennikova, A. V, Kaufmann, K., Immink, R.G.H., a Angenent, G.C.** (2009). In planta localisation patterns of MADS domain proteins during floral development in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biol.* **9**.
- Urbanus, S.L., Martinelli, A.P., Dinh, Q.D., Aizza, L.C.B., Dornelas, M.C., Angenent, G.C., a Immink, R.G.H.** (2010). Intercellular transport of epidermis-expressed MADS domain transcription factors and their effect on plant morphology and floral transition. *Plant J.* **63**: 60–72.
- Valverde, F., Mouradov, A., Soppe, W., Ravenscroft, D., Samach, A., a Coupland, G.** (2004). Photoreceptor Regulation of CONSTANS Protein in Photoperiodic Flowering. *Science* (80-.). **303**: 1003–1006.
- Voeltz, G.K., Prinz, W.A., Shibata, Y., Rist, J.M., a Rapoport, T.A.** (2006). A Class of Membrane Proteins Shaping the Tubular Endoplasmic Reticulum. *Cell* **124**: 573–586.
- Wendel, J.F., Flagel, L.E., a Wendel, J.F.** (2009). Gene duplication and evolutionary novelty in plants. *New Phytol.* **183**: 557–564.
- Wheatley, K., Robson, F., Onouchi, H., Valverde, F., a Coupland, G.** (2001). CONSTANS mediates between the circadian clock and the control of flowering in *Arabidopsis*. *Nature* **410**: 24–29.
- White, R., Badelt, K., Overall, R., a Vesik, M.** (1994). Actin Associated with Plasmodesmata. *Protoplasma* **180**: 169–184.
- White, R.G. a Barton, D.A.** (2011). The cytoskeleton in plasmodesmata: A role in intercellular transport? *J. Exp. Bot.* **62**: 5249–5266.
- Winter, C.M., Yamaguchi, N., Wu, M.F., a Wagner, D.** (2015). Transcriptional programs regulated by both LEAFY and APETALA1 at the time of flower formation. *Physiol. Plant.* **155**: 55–73.
- Wu, S. a Gallagher, K.L.** (2013). Intact microtubules are required for the intercellular movement of the

- SHORT-ROOT transcription factor. *Plant J.* **74**: 148–159.
- Wu, S. a Gallagher, K.L.** (2012). Transcription factors on the move. *Curr. Opin. Plant Biol.* **15**: 645–651.
- Wu, X., Dinneny, J.R., Crawford, K.M., Rhee, Y., Citovsky, V., a Zambryski, P.C.** (2003). Modes of intercellular transcription factor movement in the Arabidopsis apex. *Development* **130**: 3735–3745.
- Xu, M., Cho, E., Burch-Smith, T.M., a Zambryski, P.C.** (2012). Plasmodesmata formation and cell-to-cell transport are reduced in decreased size exclusion limit 1 during embryogenesis in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**: 5098–103.
- Xu, M.X., Wang, J., Xuan, Z., Goldshmidt, A., Borrill, P.G.M., Hariharan, N., Kim, J.Y., a Jackson, D.** (2011). Chaperonins Facilitate KNOTTED1 Cell-to-Cell Trafficking and Stem Cell Function. *Science* (80-). **333**: 1141–1144.
- Yadav, R.K., Perales, M., Girke, T., a Jo, H.** (2011). WUSCHEL protein movement mediates stem cell homeostasis in the Arabidopsis shoot apex. *Genes Dev.* **25**: 2025–2030.
- Yamaguchi, A., Kobayashi, Y., Goto, K., Abe, M., a Araki, T.** (2005). TWIN SISTER OF FT (TSF) Acts as a Floral Pathway Integrator Redundantly with FT. *Plant Cell Physiol.* **46**: 1175–1189.
- Yoo, S.C., Chen, C., Rojas, M., Daimon, Y., Ham, B.K., Araki, T., a Lucas, W.J.** (2013). Phloem long-distance delivery of FLOWERING LOCUS T (FT) to the apex. *Plant J.* **75**: 456–468.
- Yoo, S.J., Chung, K.S., Jung, S.H., Yoo, S.Y., Lee, J.S., a Ahn, J.H.** (2010). BROTHER OF FT AND TFL1 (BFT) has TFL1 -like activity and functions redundantly with TFL1 in inflorescence meristem development in Arabidopsis. *Plant Cell* **63**: 241–253.
- Zavaliev, R., Ueki, S., Epel, B.L., a Citovsky, V.** (2011). Biology of callose (β -1,3-glucan) turnover at plasmodesmata. *Protoplasma* **248**: 117–130.
- Zhong, B., Sun, L., a Penny, D.** (2015). The Origin of Land Plants: A Phylogenomic Perspective. *Evol. Bioinforma.* **11**: 137–41.
- Zhou, J., Wang, X., Lee, J., a Lee, J.** (2013). Cell-to-Cell Movement of Two Interacting AT-Hook Factors in Arabidopsis Root Vascular Tissue Patterning. *Plant Cell* **25**: 187–201.
- Zhu, Y., Liu, L., Shen, L., a Yu, H.** (2016). NaKR1 regulates long-distance movement of FLOWERING LOCUS T in Arabidopsis. *Nat. Plants* **2**: 1–10.

* sekundární citace