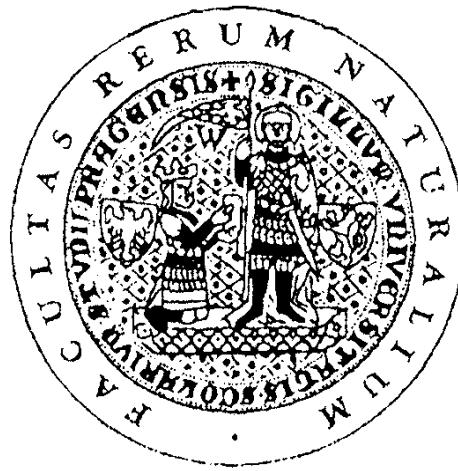


**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**

**PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA**

Katedra fyziologie rostlin



Diplomová práce

**Kvetení u fotoperiodicky neutrálního tabáku *Nicotiana tabacum* L.: vliv transformace genem *cdc25* ze *Schizosaccharomyces pombe***

Praha 2005

Petra Vojvodová  
studijní obor:  
odborná biologie

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Helena Lipavská PhD

Konzultanti: Mgr. Petra Mašková

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci na téma

**Kvetení u fotoperiodicky neutrálního tabáku *Nicotiana tabacum* L.:  
vliv transformace genem *cdc25* ze *Schizosaccharomyces pombe***

vypracovala samostatně pod vedením RNDr. Heleny Lipavské, PhD. a Mgr. Petry Maškové, s využitím citované literatury, a to na Katedře fyziologie rostlin Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze v letech 2003 až 2005. Zároveň potvrzují, že tato diplomová práce nebyla předložena na jiné vysoké škole jako práce diplomová.

Souhlasím s případným zapůjčením práce pro studijní a vědecké účely.

V Praze dne 31.8.2005

Petra Vojvodová

Práce byla podpořena granty Grantové agentury Univerzity Karlovy 133/2000, 207/2005

## Poděkování

Na tomto místě chci poděkovat všem lidem, kteří přispěli k napsání této práce svojí pomocí, radou a podporou:

Paní doktorce Heleně Lipavské a Mgr. Petře Maškové za velkou pomoc, cenné rady, trpělivost, vstřícnost. Zejména si cením jejich důvěry a pochopení po dobu trvání celé této práce.

Mgr. Markétě Pařezové za předání cenných zkušeností a pomoc při zpracovávání anatomických preparátů.

Paní Olze Činglové za pomoc, vstřícnost a výbornou spolupráci při kultivaci rostlin *in vitro*.

Panu RNDr. Lubomíru Daňkovi za kultivaci rostlin ve skleníku, pořízení fotografické dokumentace a skvělou spolupráci při kultivaci rostlin *in vivo*

Všem členům laboratoře a ostatním kolegům za přátelské prostředí a pracovní podmínky

Svojí rodině

- Manželovi za velkou pomoc, trpělivost a podporu

- Synovi za to, že je takový jaký je

- Rodičům svým, manželovým, ostatním členům rodiny, také přátelům, a všem ostatním za podporu a pochopení po celou dobu trvání této práce

# Obsah

Obsah .....	4
Úvod.....	7
Cíle práce .....	9
Seznam použitých zkratk.....	10
1 Literární přehled.....	11
1.1 Vývojové fáze životního cyklu rostlin .....	11
1.1.1 Vliv nízkých teplot (jarovizace = vernalizace) .....	12
1.1.2 Fotoperiodická indukce kvetení .....	13
1.2 Terminologie a vymezení jednotlivých fází přechodu z vegetativní do reproduktivní fáze .....	14
1.3 Současné hypotézy o povaze chemických signálů indukce kvetení .....	16
1.3.1 Fytohormony jako signál přechodu ke kvetení .....	17
1.3.1.1 Úloha giberelinů.....	18
1.3.1.2 Úloha cytokininů.....	19
1.3.2 Sacharidy jako signál přechodu ke kvetení.....	20
1.4 Květní iniciace .....	21
1.4.1 Apikální meristém prýtu (SAM) a změny spojené s kvetením.....	22
1.4.1.1 Stavba SAM .....	22
1.4.1.2 Kompetence SAM a determinace ke kvetení.....	23
1.4.1.3 Buněčná komunikace v SAM.....	25
1.4.2 Vliv prýtu a kořenů na květní iniciaci.....	26
1.4.2.1 Vliv listů a nodů .....	26
1.4.2.2 Vliv kořenů .....	27
1.4.2.3 Vliv květního gradientu.....	28
1.5 Molekulární mechanismy nástupu kvetení .....	30
1.5.1 Model regulace nástupu kvetení u <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	30
1.6 Buněčný cyklus u rostlin:.....	32
1.6.1 Fáze buněčného cyklu eukaryot.....	32
1.6.1.1 Regulace buněčného cyklu u rostlin .....	33
1.6.2 Cytokininy, buněčné dělení a diferenciacce .....	35
2 Materiál a metody .....	37

2.1	Biologický materiál.....	37
2.2	Experimenty v podmínkách <i>in vivo</i> .....	37
2.2.1	Kultivace .....	37
2.2.2	Hodnocení rostlinného materiálu .....	37
2.2.2.1	Stanovení počtu listů .....	37
2.2.2.2	Stanovení počtu dnů do kvetení .....	38
2.2.2.3	Stanovení hmotnosti sušiny kořenového systému .....	38
2.2.3	Roubování .....	38
2.2.4	Hodnocení stavby apikálního meristému prýtu.....	40
2.2.4.1	Zhotovení trvalých preparátů: .....	41
2.2.4.2	Anatomická analýza: .....	42
2.2.5	Analýza obsahu rozpustných nestrukturních sacharidů metodou HPLC .....	43
2.2.5.1	Příprava vzorků pro analýzu sacharidů .....	43
2.2.5.1.1	Exudát z dekapitovaných rostlin: .....	43
2.2.5.1.2	Exudát z listů .....	45
2.2.5.1.3	Obsah sacharidů v listech .....	47
2.2.5.1.4	Obsah sacharidů v kořenovém systému .....	48
2.2.5.2	Stanovení obsahu a spektra rozpustných nestrukturních sacharidů: ..	48
2.3	Experimenty v podmínkách <i>in vitro</i> .....	49
2.3.1	Kultivační podmínky.....	49
2.3.1.1	Složení kultivačního média .....	49
2.3.1.2	Příprava kultivačního média .....	50
2.3.2	Sterilizace nástrojů a materiálu .....	50
2.3.2.1	Sterilizace 1 l Erlenmayerových baněk.....	50
2.3.2.2	Sterilizace semen.....	50
2.3.2.3	Sterilizace nástrojů .....	51
2.3.3	Výsev a kultivace rostlin.....	51
2.3.4	Hodnocení rostlinného materiálu .....	51
2.3.4.1	Stanovení počtu listů .....	51
2.4	Zpracování dat.....	52
3	Experimentální část.....	53
3.1	Experimenty v podmínkách <i>in vivo</i> .....	53
3.1.1	Roubovací experimenty .....	53
3.1.2	Stanovení sušiny kořenového systému .....	64

3.1.3	Hodnocení stavby apikálního meristému prýtu ve vegetativní fázi vývoje	65
3.1.4	Stanovení hladiny rozpustných nestrurních sacharidů.....	70
3.2	Experimenty v podmínkách <i>in vitro</i> .....	81
4	Diskuse.....	83
	Závěry .....	90
	Abstract .....	91
	Seznam citované literatury:.....	93

## Úvod

Rostliny jsou organismy vázané po celý život na jedno stanoviště, kterému se přizpůsobují. Úspěšnost jejich reprodukce vyžaduje stálé a přesné monitorování podmínek okolního prostředí, aby kvetení a tvorba semen nastaly ve vhodném čase. Na přechodu vegetativního apikálního meristému prýtu v květní se podílejí dvě skupiny regulačních mechanismů. Jedna skupina zahrnuje regulaci pomocí faktorů okolního prostředí, tzv. regulace ekologická. Naproti tomu rostliny druhé skupiny tyto faktory pro regulaci kvetení nepožadují, jsou tzv. neutrální. Regulace u nich probíhá na základě vnitřních mechanismů neboli autonomně, kdy o přechodu ke kvetení rozhoduje ukončení juvenilní fáze a přechod do dospělosti charakterizovaný za daných podmínek dosažením minimálního počtu nodů. Na přechodu ke kvetení se také podílí aktivita vzrostného vrcholu prýtu a jeho vzdálenost od inhibičního vlivu kořenů. Studium kvetení a jeho regulace se doposud ve velké míře zabývalo ekologickou regulací, převážně fotoperiodickou, ucelená představa o autonomní regulaci kvetení dosud chybí. V posledních letech došlo k nárůstu vědomostí o regulaci kvetení i na molekulární úrovni, a to především díky studiu rostliny *Arabidopsis thaliana*, která dokáže růst a rozmnožovat se v různých podmínkách okolního prostředí, a má tedy několik signálních drah vedoucích v konečném důsledku k vykvetení; jednou z nich je také dráha autonomní.

Tým Dr. H. Lipavské se ve spolupráci s týmem Dr. D. Francise (Cardiff University, Great Britain) věnuje studiu morfologických a fyziologických charakteristik neutrálního tabáku *Nicotiana tabacum* L. cv. Samsun divokého genotypu a linií transformovaných mitotickým aktivátorem *cdc25* ze *Schizosaccharomyces pombe*. Transgenní rostliny vykazují u materiálu s různým stupněm organizovanosti (celistvé rostliny, orgánové a buněčné kultury) výrazné morfologické a fyziologické odchylky, které jsou pravděpodobně spojeny se změnou v regulaci buněčného dělení. Studium těchto odchylek může přispět k porozumění role genů buněčného cyklu v morfogenních procesech vývoje, tedy i v procesech kvetení.

Za tímto účelem bylo v rámci diplomové práce využito různých metod studia, a to jak u rostlin pěstovaných v *in vivo*, tak v *in vitro* podmínkách. Kombinace částí prýtu kontrolních a transformovaných rostlin pomocí roubování a sledování nástupu kvetení v podmínkách *in vivo* mělo přispět k objasnění vlivu transformace na proces květní

iniciace. Účelem odběru a přípravy preparátů vzrostných vrcholů rostlin kontrolních a transformovaných bylo zjistit vliv transformace na jeho strukturu. Využití možnosti jímání exudátů z prýtu dekapitovaných rostlin a listů mělo za účel zjistit, zda vlivem transformace došlo k ovlivnění exportu sacharidů z listů a ke změně v jejich toku / rozdělení směrem k apikálnímu meristému prýtu. Účelem kultivace rostlin v *in vitro* podmínkách bylo ověřit pozitivní vliv sacharidů na nástup kvetení, odlišnou reakci další nezávislé transgenní linie oproti divokému genotypu a dále zda je změna gradientu květního stimulu přítomna a tedy způsobena transformací.



## Cíle práce

**Využít rostliny fotoperiodicky neutrálního tabáku transformovaného mitotickým aktivátorem (kódovaným genem *cdc25*) ze *Schizosaccharomyces pombe* pro porozumění v regulaci nástupu kvetení u autonomních druhů**

### Dílčí cíle

- ◆ na základě roubovacích experimentů rozhodnout, které části regulačního systému nástupu kvetení u fotoperiodicky neutrálního tabáku byly zasaženy transformací cizorodým genem *cdc25*
- charakterizovat vliv roubu (vzrostného vrcholu prýtu) a podnože (kořenového systému, příp. celé rostliny bez vzrostného vrcholu) na rychlost nástupu kvetení u kontrolního genotypu a dvou nezávisle transformovaných linií A a C.
- ◆ porovnat stavbu apikálního meristému transformovaných a kontrolních rostlin.
- ◆ charakterizovat případné změny v distribuci sacharidů - jedné ze složek signálního systému regulujícího přechod ke kvetení, které mohou být vyvolané transformací příp. zda je za změnu zodpovědná.
- ◆ v *in vitro* podmínkách ověřit u další nezávisle transformované linie A narušení gradientu květního signálu ve stonku rostlin a pozitivní vliv zvýšeného zásobení sacharidem na nástup kvetení popsané u transformantu C.



## Seznam použitých zkratek

<b>CDK</b>	cyklin-dependentní kináza
<b>CKI</b>	inhibitor cyklin-dependentní kinázy
<b>EDTA</b>	kyselina etylendiamintetraoctová
<b>GA</b>	giberelin
<b>HPLC</b>	vysokoučinná kapalinová chromatografie
<b>LD</b>	<i>long day</i> , dlouhý den
<b>LFY</b>	LEAFY, gen identity květního meristému
<b>SAM</b>	apikální meristém prýtu
<b>SD</b>	<i>short day</i> , krátký den

# 1 Literární přehled

## 1.1 Vývojové fáze životního cyklu rostlin

Rostliny jsou fotoautotrofní organismy po celý život vázané na jedno stanoviště, jako zdroj energie využívají sluneční záření, zdrojem uhlíku je pak CO<sub>2</sub>, zdrojem minerálních živin a vody je půda. Vzhledem k přisedlému způsobu života rostliny stále monitorují změny okolního prostředí a přizpůsobují se jim. Toto je zvláště důležité pro monokarpické druhy, které mají jedinou šanci k sexuální reprodukci. Adaptací k vazbě na jedno stanoviště jsou např. existence meristémů umožňující lokalizovaný a neukončený růst a dále totipotence rostlinných buněk (např. Bernier et al. 1993, Taylor 1997, Bernier a Périlleux 2005).

Všechny organismy procházejí životním cyklem, který zahrnuje několik na sebe navazujících fází. U vyšších živočichů každá fáze představuje odlišnou událost života celého organismu. Naproti tomu u vyšších rostlin jsou vývojové fáze událostmi života části organismu, a to vzrostného vrcholu prýtu. Pro úspěšnost průběhu jednotlivých fází je nutné jejich správné načasování vzhledem k měnícím se podmínkám prostředí (Poethig 1990). Vzrostný vrchol vyšších rostlin prochází během postembryonálního vývoje třemi více či méně zřetelnými fázemi. Jsou to raná vegetativní fáze (juvenile vegetative phase, juvenilní fáze), pozdní vegetativní fáze (adult vegetative phase, fáze dospělosti) a reprodukční fáze (Poethig 1990). Pro každou fázi jsou charakteristické jedinečné morfologické a fyziologické znaky. Předpokládá se, že přechod mezi fázemi je ovlivněn působením okolních faktorů na apikální meristém prýtu (*shoot apical meristem* - dále v textu SAM), toto působení může být přímé a nebo zprostředkované vnitřními signály generovanými prýtem či kořenem.

Vegetativní fáze zahrnuje fázi juvenilní a fázi dospělosti. Juvenilní fáze vývoje prýtu začíná, jakmile SAM začne produkovat stonek, pravé listy a úžlabní pupeny. Tato fáze může trvat několik dní nebo mnoho let v závislosti na druhu (Poethig 1990). Fáze dospělosti je charakterizována podle druhu různými morfologickými znaky a je obvykle definována schopností rostlin podstoupit sexuální reprodukci. U různých druhů může

být juvenilní fáze a fáze dospělosti vývoje prýtu rozlišena na základě jejich fylogeneze, růstu postranních větví, otrnění, produkce postranních kořenů, fotosyntetické účinnosti, resistance vůči hmyzu atd. U některých dřevin i bylin je jedním z nejnápadnějších znaků tvar listů. Listy v juvenilní fázi vývoje jsou menší a jednodušší ve struktuře než listy v dospělosti (Poethig 1990, Bernier et al. 1993).

Přechod z vegetativní do generativní fáze vývoje je náhlý a zahrnuje dramatické změny v morfogenezi prýtu, zvláště u kvetoucích rostlin, ve srovnání s přechodem z juvenilní fáze do fáze dospělosti, který obvykle probíhá postupně a může zahrnovat spíše jemné změny v morfologii a fyziologii prýtu. Tvorba květních struktur zahrnuje jejich iniciaci v SAM a následnou morfogenezi. Transformace SAM v reprodukční struktury (květ, květenství) může znamenat ukončení růstu. U monokarpických druhů rostlin je reprodukce poslední fází vývoje, následuje pak u nich senescence a smrt rostliny (Poethig 1990, McDaniel et al. 1992). Časování přechodu z vegetativní fáze do generativní fáze vývoje má pro člověka prvořadou důležitost v zemědělství, zahradnictví a množení rostlin, protože kvetení je prvním krokem sexuální reprodukce (Bernier et al. 1993).

U rostlin z oblastí sezónního klimatu je nutné načasování generativní fáze do příznivého období. Hlavními regulačními faktory v těchto oblastech jsou tedy podmínky okolního prostředí jako je např. fotoperioda, teplota, dostupnost vody a minerálních živin. Rostliny které pro vykvetení nepožadují určitou fotoperiodu se souhrnně označují jako „autonomně regulované rostliny“ a o přechodu do generativní fáze u nich rozhoduje velikost rostliny vztážená na počet vytvořených nodů (souhrnně Bernier et al. 1993, Aukerman a Amasino 1998, Levy a Dean 1998a).

### 1.1.1 Vliv nízkých teplot (jarovizace = vernalizace)

Teplota je vnímána všemi částmi rostliny, ačkoli nízká teplota je často vnímána především apikálním meristémem prýtu. Jako vernalizace se označuje situace, kdy je rostlina (klíčící semeno, mladá rostlina) nebo její část (SAM) vystavena působení určité sumy nízkých teplot. Tento mechanismus u rostlin zabraňuje tomu, aby náhodné teplé dny v zimě nezpůsobily předčasný vývoj (klíčení, růst, kvetení) a zabezpečuje správné časování klíčení anebo kvetení na jaře nebo v létě (Leyser a Day 2003).

Rostliny, u kterých má nízká teplota vliv na vykvetení, se dělí do dvou skupin (Michaels a Amasino 2000):

1) Rostliny obligátní: rostliny tohoto typu mají striktní požadavek vernalizace, působení nízké teploty je podmínkou pro vykvetení, např. u dvouletých rostlin.

2) Rostliny fakultativní: působení chladu není pro tyto rostliny podmínkou pro vykvetení, nízká teplota kvetení pouze urychluje, např. ozimé rostliny.

### 1.1.2 Fotoperiodická indukce kvetení

Fotoperioda je délka světelné fáze během 24h cyklu. Fotoperiodismus je schopnost rostlin rozeznat délku světelné a temnotní fáze; rostliny tak mohou reagovat na měnící se roční období. Fotoperiodická indukce kvetení pak znamená zahájení (iniciaci) tvorby květních struktur po působení indukčního faktoru (změna délky dne), které je časově odděleno od změn na morfologické úrovni (Procházka et al. 1998).

Důležitým termínem je tzv. kritická fotoperioda: je to taková fotoperioda, která navodí fotoperiodickou reakci. Udává maximální délku fotoperiody / minimální délku temné periody ve 24hodinovém cyklu, která ještě kvetení indukuje (Pavlová 1996, Procházka et al. 1998).

Typy rostlin podle požadavku na fotoperiodickou indukci kvetení (Procházka et al. 1998, Pavlová 1996):

- a) krátkodenní (SDP, short – day plants): kvetou při fotoperiodě kritické nebo kratší. Do této skupiny rostlin patří např. *Nicotiana tabacum* cv. Maryland Mammoth, *Chenopodium rubrum*, *Xanthium strumarium*, *Glycine max*, *Pharbitis nil*, *Kalanchoe blossfeldiana*, *Euphorbia pulcherrima*, aj.
- b) dlouhodenní (LDP, long – day plants): kvetou při fotoperiodě kritické nebo delší. Do této skupiny rostlin patří např. *Nicotiana sylvestris*, *Chenopodium murale*, *Sinapis alba*, *Lolium temulentum*, *Rudbeckia bicolor*, *Spinacia oleracea* aj.
- c) neutrální (tzn. bez požadavku na fotoperiodu): *Nicotiana tabacum* cv. Hicks, cv. Samsun, cv. Trapezoid, cv. Wisconsin 38, *Nicotiana rustica*, *Helianthus annuus*, *Impatiens balsamina*, *Phaseolus vulgaris*, *Senecio vulgaris*, *Poa annua*, *Lycopersicon esculentum* aj.

Existují ještě další skupiny rostlin odvozené od těchto hlavních typů, rostliny dlouho-krátkodenní kvetoucí za krátkého dne po období určité sumy dlouhých

dní, dále rostliny krátko-dlouhodobě kvetoucí za dlouhého dne po určité sumě krátkých dní.

Fotoperioda a ozářenost jsou vnímány hlavně dospělými listy na intaktní rostlině, a to fytochromovým systémem. Je známo, že listy jsou orgány, které „měří“ fotoperiodu neboli přijímají informace o délce fotoperiody. Po vystavení listů indukční fotoperiodě se v listech začne produkovat jeden nebo více květních signálů, které jsou floémem transportovány do SAM, kde následně dochází k ukončení tvorby listů a začátku tvorby květních struktur (McDaniel et al. 1992 a 1996, Bernier et al. 1993). Důkazem toho, že indukční fotoperioda vede k produkci přenosného květního signálu, jsou výsledky roubovacích experimentů. Ty ukazují, že listy fotoperiodicky citlivých rostlin produkují stimulatory a inhibitory kvetení podle toho, zda jsou vystaveny indukčnímu nebo neindukčnímu režimu délky dne (přehled v Bernier et al. 1993).

## 1.2 Terminologie a vymezení jednotlivých fází přechodu z vegetativní do reprodukční fáze

Během generativní fáze získává SAM nový vývojový směr. Nejedná se však o jednokrokový proces (McDaniel et al. 1992). Regulace přechodu do generativní fáze není stále přesně známa, otázky se týkají např. toho, jak jsou zahájeny změny ve vývoji prýtu, jak je tento stav udržovaný, kdy je osud prýtu determinován k přechodu ke kvetení a jaké genetické a biochemické procesy se účastní tohoto procesu. Z tohoto důvodu existuje mezi autory nejednotnost v terminologii jednotlivých kroků tohoto procesu. Ve své diplomové práci se budu držet terminologie McDaniela et al. (1992).

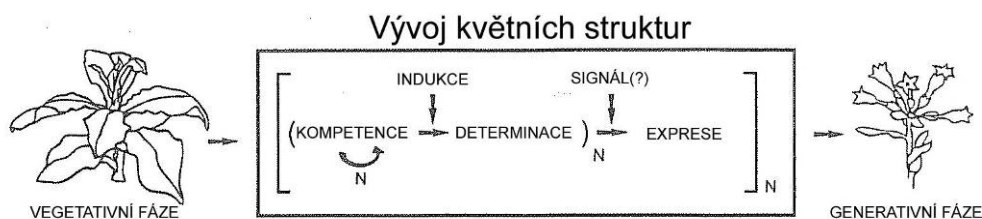
Podle McDaniela et al. (1992) existují dvě základní kategorie vývojového stavu, a to kompetence a determinace.

Kompetence je stav, kdy buňka nebo skupina buněk po vystavení určitému vývojovému signálu odpovídají specifickým způsobem. Dále je kompetence funkcí nejméně dvou parametrů. Jsou to sensitivita responsivních buněk k vývojovému signálu a koncentrace tohoto signálu.

Determinace je vykazována, jestliže buňka nebo skupina buněk vyjadřují stejný vývojový osud jak v jejich přirozeném prostředí, tak po přemístění do prostředí nového (roubovací experimenty).

Proces kterým vývojové signály způsobují změny vývojového osudu u kompetentních buněk je McDanielem et al. (1992) označen jako indukce.

Obsah termínu evokace je z literatury poněkud nejasný. Evans (1969) termínem evokace označuje počáteční změny v SAM, které jsou odpovědí na přísun květního stimulu vytvořeného působením indukční fotoperiody v listech, tyto změny vedou k tvorbě květních struktur. Podle McDaniela et al. (1992) je evokace doba mezi přísunem květního stimulu do vzrostného vrcholu prýtu a květní determinací vzrostného vrcholu prýtu. Buňky SAM musí být nejprve kompetentní odpovídat na vývojový signál, který je evokuje do determinovaného stavu, také viz **Obr. 1-1**.



**Obr. 1-1: Schematické znázornění možného procesu a podmínek spojených s květní morfogenezí (převzato z McDaniel et al. 1992)**

Šipky ukazují normální průběh událostí, ale nenaznačují jejich (ne)zvratnost. Kompetentní buňky/pletiva jsou ty, které mají schopnost odpovídat na vývojový signál specifickým způsobem. Buňky a pletiva mohou dosáhnout rozdílné kompetence působením endogenních a exogenních faktorů. Indukce probíhá tehdy, když vývojový signál působí na kompetentní buňky/pletiva a determinuje je pro specifický vývojový směr, následně dochází k determinaci. Písmeno „N“ naznačuje možnost opakování vztahu uvedeného v závorkách. Proces může probíhat v celé rostlině (v kořenech, listech, SAM), děj v jedné části rostliny může ovlivnit proces a podmínky v dalších částech rostliny.

### 1.3 Současné hypotézy o povaze chemických signálů indukce kvetení

Existuje několik hypotéz o regulaci přechodu ke kvetení, které navrhují existenci látky (látek) chemické povahy a způsob jejího transportu do pletiv, kde následně proběhnou změny na morfologické úrovni, jejichž výsledkem je tvorba květních struktur (Procházka et al. 1997).

Hypotéza florigenu navrhuje existenci univerzálního květního stimulu. Tato teorie byla poprvé formulována Čajlachjanem (angl. Chailakhyan) v roce 1936 a vychází z nepřímých důkazů existence květního hormonu – florigenu (např. Procházka et al. 1997 a 1998). Např. byl pozorován jev, kdy po vystavení jediného listu indukční fotoperiodě dojde k vykvetení i na části rostliny umístěné v neindukčních podmínkách (např. chryzantémy). Florigen je vytvářen v listech a následně transportován do SAM. Na univerzálnost florigenu ukazuje možnost přenosu mezi rostlinami z rozdílných fotoperiodických skupin (krátkodenní, dlouhodenní, neutrální), a to i mezi rozdílnými druhy (např. tabák a blín). Přenos florigenu roubováním byl úspěšný především u čeledi *Solanaceae* a *Crassulaceae* (Zeevaart 1958). Koncem padesátých let (1958) upravil Čajlachjan svoji hypotézu do podoby dvousložkové. Podle této upravené hypotézy se florigen skládá ze dvou složek, a to z giberelinové a antezinové. Giberelinová složka se vytváří za dlouhého dne a limituje kvetení dlouhodenních rostlin za krátkého dne. Je známo, že aplikace giberelinů ( $GA_3$ ) nahrazuje požadavek dlouhého dne u rostlin vytvářejících vegetativní růžici. Antezinová složka pak stimuluje kvetení za dne krátkého a její nedostatek zabraňuje kvetení krátkodenních rostlin během dlouhého dne (Čajlachjan (Chailakhyan 1968)). Doplněním k hypotéze florigenu jsou Langovy experimenty (Lang et al. 1984), kde bylo zjištěno, že u tabáku může být roubováním přenesen chemický signál inhibující kvetení – tzv. antiflorigen. Předpokládá se, že i antiflorigen je univerzální látka hormonální povahy. Na počátku čtyřicátých let se výzkum zabýval pokusy extrahovat, izolovat a identifikovat florigenní a antiflorigenní látky, avšak florigen a antiflorigen nebyly dosud nalezeny. Bylo zjištěno, že hrubé nebo částečně purifikované extrakty z listů rostlin vystavených indukční fotoperiodě mohou částečně nahradit vliv fotoperiody. Hodson a Hamner (1969) zjistili, že extrakt z listů kvetoucí rostliny *Xanthium strumarium* navodil kvetení u rostlin z rodu *Lemna*. Dále



např. u merlíku červeného (*Chenopodium rubrum*) extrakt z listů krátkodenního tabáku indukovaného ke kvetení plně nahradil vliv krátkého dne a navíc vyvolal i další růstové změny (např. prodlužování internodií) podobné změnám při fotoperiodické indukci kvetení. Extrakt připravený z listů rostlin tabáku ve vegetativní fázi kvetení nevyvolal (Čajlachjan (Chailakhyan1989)).

Hypotéza změněné alokace živin podle Sachse a Hacketta z roku 1983 navrhuje, že přechod ke kvetení je spojen s redistribucí zdrojů a sinků. Dostatečné zásobení SAM asimiláty za indukčních podmínek může být nezbytnou podmínkou pro vykvetení.

Další možné hypotézy se zabývají vlivem elektrických signálů na přechod ke kvetení (např. Montavon 1984, Wagner et al. 1998, Macháčková a Křekule 2002) a např. změnami vlastností membrán navozených po vystavení indukční fotoperiodě, které se šíří mezibuněčnou komunikací (Greppin et al. 1978).

Multikomponentní systém kontroly kvetení byl vypracován Bernierem a jeho spolupracovníky (Bernier 1988) jako reakce na fakt, že se nepodařilo identifikovat specifický florigenní stimulus. Podle této hypotézy se na přechodu ke kvetení podílí soubor látek, jako jsou např. fytohormony, sacharidy atd., podrobněji se jimi zabývají kapitoly č. 1.3.1. a č. 1.3.2. Tyto látky jsou pro kvetení nezbytné a každá z nich se za určitých podmínek (např. genotyp, okolní prostředí) může stát pro kvetení limitující. Vykvetení pak nastane pouze tehdy, pokud jsou limitující faktory přítomné v SAM ve vhodné koncentraci a čase. Tato hypotéza je dnes nejvíce přijímána (Bernier et al. 1993, Levy a Dean 1998a).

### 1.3.1 Fytohormony jako signál přechodu ke kvetení

Fytohormony hrají klíčovou roli v propojení mezi signály okolního prostředí a rostlinou, což umožňuje rostlině reagovat vhodným časováním vnitřních procesů a fenotypovou plasticitou (Voesenek a Blom 1996). Jsou zahrnuty v souboru látek chemické povahy s možným vlivem na přechod do generativní fáze vývoje rostlin (tzv. multikomponentní teorie kvetení, viz kap. 1.3.).

Nejvíce znalostí o vztahu fytohormonů k přechodu do generativní fáze je o giberelinech a cytokininech. Také další fytohormony a látky s fytohormonálním účinkem jsou zahrnuty v nástupu kvetení, např. auxiny, etylen, kyselina abscisová, polyaminy, ale znalostí je relativně málo. Jejich vliv na kvetení může být podpůrný

nebo inhibiční (přehledy v Bernier et al. 1993, Eimert a Chen 1997, Levy a Dean 1998a).

### 1.3.1.1 Úloha giberelinů

Od počátku šedesátých let se nahromadily důkazy o možnosti nahrazení dlouhodobého fotoperiodického signálu kyselinou giberelovou ( $GA_3$ ). Tento jev se převážně vyskytuje u rostlin vytvářejících ve vegetativním stavu přizemní listovou růžici a které jsou charakteristické tzv. vybíháním neboli prodlužováním internodií při přechodu do reproduktivní fáze (přehled v Bernier et al. 1993, Procházka et al. 1997, Levy a Dean 1998a, Michaels a Amasino 2000, Yong et al. 2000). U rostliny *Arabidopsis thaliana*, u které je přítomno několik regulačních drah vedoucích ke kvetení (fotoperiodická, vernalizační, autonomní), měla aplikace giberelinů v době neindukčních podmínek krátkého dne za výsledek urychlení kvetení (Langridge 1957).

King a Evans (2003) uvádějí, že u rostliny *Lolium temulentum* po vystavení indukčním podmínkám dlouhého dne došlo v listech ke zvýšení hladiny některých typů giberelinů, které byly transportovány do SAM. V počáteční fázi nástupu kvetení se zvýšila hladina  $GA_5$ , v pozdější fázi také  $GA_1/GA_4$ . Jelikož v extraktech rostlin *Arabidopsis* (Xu et al. 1997) a *Sinapis alba* (Corbesier et al. 2004) indukovaných ke kvetení nebyly gibereliny nalezeny, nemohou být považovány za univerzální „florigen“ (Bernier a Périlleux 2005).

Dále je známo, že gibereliny mohou nahradit požadavek vernalizace (Yong et al. 2000). Syntéza giberelinů je u *Arabidopsis* regulována teplotou (Yong et al. 2000). Existuje názor, že vernalizace může zvyšovat sensitivitu rostlin k účinku giberelinů, ale že gibereliny nehrají přímou roli v procesu vernalizace (Chouard 1960). U rostliny *Thlaspi arvense*, která je blízce příbuzná *A. thaliana*, došlo po působení vernalizace ke zvýšení aktivity hydrolázy kyseliny kaurenové, což je enzym zahrnutý v jednom z prvních kroků biosyntézy giberelinů (Hazebroek et al. 1993). Při vernalizaci dochází k demethylaci DNA, což může mít za výsledek expresi genu tohoto enzymu (Levy a Dean 1998b). Nicméně není dosud jasné, jestli gibereliny a vernalizace mají stejnou signální cestu v indukci kvetení (Sheldon et al. 2000, Yong et al. 2000).

### 1.3.1.2 Úloha cytokininů

Cytokininům a jejich vlivu na kvetení byla v poslední době věnována velká pozornost. Aplikace cytokininů v malé koncentraci podporuje květní iniciaci u mnoha rostlinných druhů s požadavkem fotoperiody a vernalizace, pokud rostou v suboptimálních podmínkách (Havelange et al. 1986). Cytokininy jakožto signál v nástupu generativní fáze jsou transportovány na dlouhou vzdálenost, a to xylémem a floémem. Uvažuje se o možné účasti cytokininů v regulaci mitotické aktivity SAM spojené s navozením morfogeneze květních struktur v rané fázi přechodu ke kvetení (Havelange et al. 1986, Lejeune et al. 1994). Po aplikaci cytokininu za neindukčních podmínek (SD) na SAM rostlin *Sinapis alba* ve vegetativní fázi vývoje došlo v SAM k části procesů spojených s evokací (Havelange et al. 1986). V dalších studiích vztahu cytokininů a fotoperiodické indukce kvetení u rostliny *Sinapis alba* byla po působení indukční fotoperiody (LD) zjištěna zvýšená hladina cytokininů v kořenových a listových exudátech a ve floémovém exudátu z dekapitovaných rostlin (Lejeune et al. 1994) a v SAM (Bernier et al. 2002, Jacquard et al. 2002). Macháčková et al. (1993) zjistili, že došlo k přechodnému vzestupu hladiny cytokininů v SAM za indukčních podmínek, a to jak u *Chenopodium murale* (LD typ), tak i u *Chenopodium rubrum* (SD typ). Kolísání hladiny v ostatních orgánech (listy, stonek, kořeny) bylo pak dané střídáním světla a tmy bez ohledu na indukci ke kvetení, během temnostní fáze došlo k poklesu hladiny cytokininů o 50% a během světelné fáze k opětovnému vzestupu. Podobné výsledky byly získány analýzou xylémového a floémového exudátu během indukčního ošetření *Chenopodium murale* (Machackova et al. 1996). Také u *Arabidopsis thaliana* byl zjištěn zvýšený obsah cytokininů v listech, listovém exudátu a SAM po působení indukční fotoperiody (LD) (Corbesier et al. 2003). Vystavení rostlin *Bougainvillea* SD podmínkám (indukční pro kvetení) vedlo k poklesu hladiny cytokininů v celé rostlině, tento pokles byl nejvýraznější v dospělých listech. U rostliny za LD podmínek (neindukční podmínky pro kvetení) byla nejvyšší hladina cytokininů zjištěna v dospělých listech a ve vzrostném vrcholu prýtu. Aplikace GA<sub>3</sub> na rostliny za SD podmínek měla za výsledek zvýšení hladiny cytokininů ve všech pletivech (Van Staden a Dimalla 1980).

Informace o vlivu cytokininů na přechod do generativní fáze u neutrálních druhů vychází z práce na tabáku. Dewitte et al. (1999) studovali pomocí imunocytochemické metody endogenní hladinu a buněčnou lokalizaci specifických

cytokininů v SAM ve vztahu k nástupu kvetení. Při přechodu do generativní fáze pozorovali pokles v hladině cytokininů na neměřitelné hodnoty, od začátku zakládání květních orgánů (mikroskopicky pozorovatelné) byly v SAM cytokininy opět detekovány. Na základě těchto zjištěných výsledků autoři navrhují, že je změna v hladině endogenních cytokininů v SAM zahrnuta v přechodu do generativní fáze. Naproti tomu Chang et al. (1999) zjistili u rostliny *Polianthes tuberosa* (fotoperiodicky neutrální druh), že hladina endogenních cytokininů stoupla během nástupu kvetení a tvorby květních struktur ve srovnání s vegetativní fází vývoje. Exogenní cytokinin aplikovaný během vegetativní fáze vývoje *Polianthes tuberosa* způsobil indukci kvetení. Zvýšení hladiny cytokininů při přechodu ke kvetení u této rostliny naznačuje roli cytokininů v evokaci SAM a následné determinaci ke kvetení (Chang et al. 1999).

### 1.3.2 Sacharidy jako signál přechodu ke kvetení

Regulační efekt sacharidů na fotosyntetickou aktivitu, rostlinný metabolismus, reakci na stres a s tím spojenou genovou expresi je již dlouho známý, koncept sacharidů jako centrálních signálních molekul je relativně nový. Optimalizace syntézy a využití sacharidů jako zdroje uhlíku a energie umožňuje přizpůsobit uhlíkatý metabolismus měnícím se podmínkám a dostupnosti dalších živin, např. uhlíkatý metabolismus reguluje geny zahrnuté v příjmu a metabolismu N (Yu 1999, Coruzzi a Bush 2001, Rolland et al. 2002).

Znalosti o vztahu sacharidů ke kvetení vycházejí ze studia fotoperiodických druhů rostlin, u kterých je zřetelně definovatelný indukční signál pro přechod do generativní fáze. Jednou z cest, jak zjistit změny v rostlině, ke kterým dochází po vystavení indukčním podmínkám, je analýza složení floémového a xylémového exudátu (Bernier et al. 1993). Corbesier et al. (1998) pozorovali u rostliny *Arabidopsis thaliana*, že po vystavení indukční fotoperiodě dochází k přechodnému zvýšení obsahu sacharidů v listech a floémovém exudátu.

Je známo, že mezi kořeny a SAM probíhá komunikace zprostředkovaná látkami (např. živiny, fytohormony), které jsou mezi nimi transportovány floémem a xylémem. Pokud je zaškrcením prýtu (přerušením floémového toku) zabráněno bazipetálnímu transportu látek, dojde k ovlivnění přechodu do generativní fáze (Bernier et al. 1993, Kinet et al. 1993). U *Sinapis alba* bylo zjištěno, že po působení indukční

fotoperiody (LD) dochází během několika hodin k transportu sacharózy do SAM a ke zvýšení obsahu sacharózy ve floémovém exudátu a následně v kořenech. Po zaškrcení prýtu nedošlo ke zvýšení obsahu sacharózy v kořenech a kvetení bylo inhibováno (Havelange et al. 2000). Po exogenní aplikaci sacharózy na kořeny došlo ke zvýšení transportu cytokininů z kořenů do prýtu (xylémem) a stimulaci kvetení (Havelange et al. 2000), což je ve shodě s pozorováními Lejeuna et al. (1994) a Jacquardové et al. (2002), kdy bylo po indukci ke kvetení (LD) zjištěno zvýšení obsahu cytokininů v xylémovém exudátu z kořenů a v SAM. Pokud byly rostliny umístěny do prostředí s vysokou relativní vlhkostí vzduchu, došlo k zamezení pohybu látek xylémem, tedy i cytokininů, což mělo za výsledek inhibici kvetení (Havelange et al. 2000). Z provedených experimentů vyplývá, že sacharóza zde nehraje roli živiny, ale signálu (Havelange et al. 2000, Bernier et al. 2002).

Bylo pozorováno, že sacharidy (nejčastěji sacharóza) v závislosti na jejich koncentraci v médiu během kultivace *in vitro* mohou u mnoha druhů také pozitivně ovlivnit indukci kvetení (přehled v Scorza 1982), např. sacharóza u *Spinacia oleracea* (Ćulafić 1973), glukóza u *Chenopodium murale* (Mitrović et al. 2000).

#### 1.4 Květní iniciace

Ve srovnání se znalostmi o přechodu ke kvetení u fotoperiodicky citlivých rostlin je poměrně málo informací o regulaci nástupu kvetení u rostlin neutrálních. Je to z toho důvodu, že u fotoperiodicky citlivých rostlin je přesně známý indukční signál, který navodí změnu ve vývoji směrem ke kvetení a umožňuje snazší experimentální přístup, u neutrálních rostlin je moment přechodu ke kvetení stále předmětem výzkumu. Ke kvetení neutrálních rostlin dochází v široké škále podmínek prostředí umožňujících růst. K iniciaci tvorby květních struktur pak dochází po ukončení vegetativní fáze, tedy po vytvoření určitého počtu listů / nodů (Poething 1990). Květní iniciace zahrnuje podle McDaniela et al. (1992) tři na sebe navazující fáze: indukční aktivitu listů, kompetenci SAM k evokaci, získání determinovaného stavu SAM ke kvetení.

## 1.4.1 Apikální meristém prýtu (SAM) a změny spojené s kvetením

### 1.4.1.1 Stavba SAM

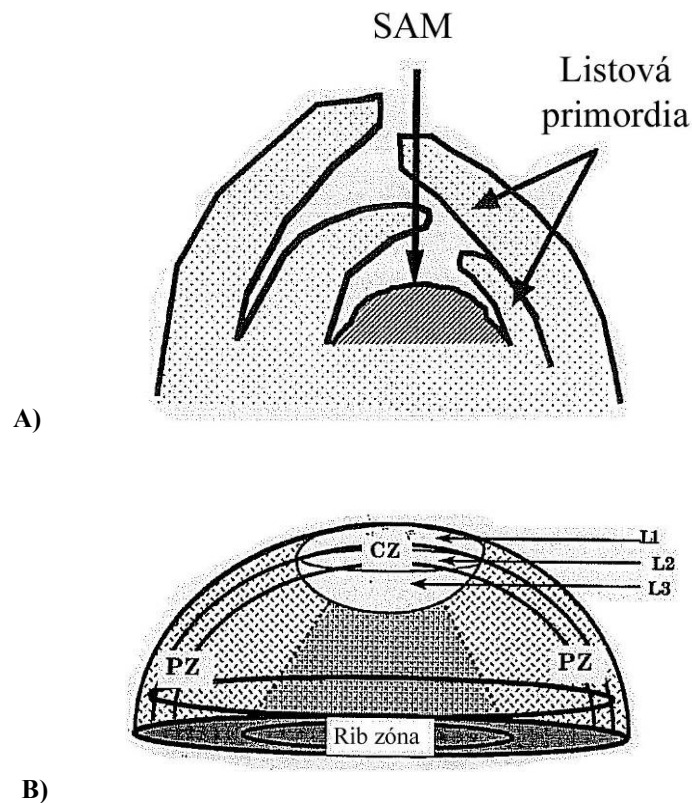
Apikální meristém prýtu (SAM) vyšších rostlin se vytváří během embryogeneze a slouží k tvorbě nadzemní části rostlin. Během vegetativní fáze produkuje opakující se jednotky prýtu, tzv. fytoмеры, které obsahují list s úžlabním pupenem (nodus) a internodium. V následné generativní fázi SAM produkuje květenství nebo květy, případně může vzniknout úžlabní apikální meristém prýtu tvořící květenství (McDaniel et al. 1992, Kerstetter a Hake 1997).

Struktura SAM je dynamická a je variabilní napříč rostlinnou říší, všechny mnohobuněčné rostliny regulují rovnováhu mezi nediferencovaností a diferencovaností buněk v SAM. Dynamičnost spočívá v tom, že buňky v SAM stále mění svoji pozici a vývojový osud s ohledem na buňky sousední, čímž je zajištěno vlastní utváření a udržení struktury a funkce SAM. Jako modelová rostlina pro studium stavby SAM je využívána *Arabidopsis thaliana* (Clark 1997).

Schopnost tvorby rostlinných orgánů je zajištěna následujícími mechanismy (Clark 1997, Kerstetter a Hake 1997, Groß-Hardt a Laux 2001):

- a) udržení poolu nediferencovaných buněk v tzv. centrální zóně SAM
- b) vznik laterálních orgánů (listy, úžlabní pupeny) v tzv. periferní zóně SAM
- c) vznik centrální části prýtu v tzv. zóně žebrového meristému SAM

SAM většiny rostlin je také členěn na horizontální vrstvy, tuniku a korpus, podle toho, jakým směrem se buňky dělí. V tunice probíhá dělení antiklinálně, v korpu s různou orientací. U *Arabidopsis thaliana* se tunika skládá z  $L_1$  epidermální buněčné vrstvy a  $L_2$  ležící pod ní, korpus tvoří vrstva  $L_3$ . Buňky z  $L_1$  vrstvy dávají vznik epidermis, buňky z  $L_2$  a  $L_3$  vrstvy vnitřním pletivům (Medford 1992, Clark 1997, ), viz **Obr. 1-2**.



**Obr. 1-2: Schema apikálního meristému prýtu (SAM) (převzato z Medford 1992)**

- A) srovnání vzrostného vrcholu a SAM: SAM představuje šedou oblast, světlá část včetně šedé představují vzrostný vrchol
- B) zóny a vrstvy v rámci SAM: Centrální zóna (CZ) je malá skupina buněk v distální oblasti SAM, které slouží jako zdroj buněk pro ostatní části meristému. Periferní zóna (PZ) je lokalizovaná po stranách a pod CZ. V této zóně dochází k iniciaci orgánových primordií. Rib zóna vytváří spojení mezi meristémem a ostatními částmi rostliny, je zdrojem buněk vnitřních pletiv prýtu. Zóny jsou ve skutečnosti oproti schématu méně zřetelné. L<sub>1</sub>, L<sub>2</sub>, L<sub>3</sub> odpovídají geneticky definovaným třem vrstvám směrem od povrchu meristému dovnitř.

#### 1.4.1.2 Kompetence SAM a determinace ke kvetení

Kompetence SAM ke květnímu stimulu následovaná determinací ke kvetení je nutnou podmínkou pro zahájení přechodu do generativní fáze, a to jak fotoperiodicky citlivých, tak neutrálních druhů rostlin (Singer et al. 1992). Regulace kompetence SAM při přechodu ke kvetení není zcela zřejmá. Např. podle Gebhardta a McDaniela (1991) může být květní stimulus u neutrálních druhů rostlin přítomen v mladých vegetativních rostlinách, ale SAM na něj nereaguje, nebo alternativně je SAM kompetentní ke květnímu stimulu, který však dosáhne kritické hladiny pro přechod ke kvetení v době ukončení vegetativní fáze.

Singer et al. (1992) se zabývali roubováním terminálních pupenů rostlin různého stáří na podnože z kvetoucích rostlin nebo nekvetoucích rostlin. Byly použity rostliny tabáku dvou genotypů, a to dlouhodobní *Nicotiana sylvestris* L. a neutrální *Nicotiana tabacum* L. cv. Wisconsin 38. Pokud byly roubovány pupeny mladých rostlin (oba genotypy) na podnož kvetoucího dlouhodobního tabáku, produkovaly tyto rouby o polovinu méně nodů než za situace, kdy podnoží byl kvetoucí neutrální tabák, což naznačuje, že genotyp podnože ovlivnil nástup kvetení. Dále bylo pozorováno urychlení kvetení u neutrálního tabáku za situace, pokud roub byl odebrán z mladé rostliny neutrálního tabáku a podnoží byl dlouhodobní tabák různého stáří. Čím starší byla podnož, tím méně nodů vytvořil roub do kvetení. Za opačné situace k urychlení kvetení nedošlo. Pokud byly roubovány terminální pupeny neutrálního tabáku různého stáří na podnože z již kvetoucího neutrálního tabáku, starší pupeny vytvořily méně nodů do kvetení než mladší pupeny. Rozdíl mezi oběma typy tabáku pravděpodobně spočívá v silnějším induktivním efektu listů ve vzrostném vrcholu fotoperiodického tabáku, který je schopen vyvolat kvetení v terminálních pupenech, které nejsou kompetentní k odpovědi na hladiny signálu přítomného v kvetoucích neutrálních rostlinách. Z těchto roubovacích experimentů tedy vyplývá, že kompetence terminálních pupenů odpovídat na květní stimulus je důležitým faktorem v regulaci kvetení u obou genotypů tabáku. Výsledky podporují hypotézu, že u fotoperiodicky neutrálního tabáku je rozhodující událostí při přechodu ke kvetení získání kompetence k přijetí nebo reakci na existující signál. Naproti tomu pro dlouhodobní tabák se jako kritický faktor jeví síla indukčního signálu. Je ovšem zřejmé, že vhodná hladina květního stimulu sama o sobě k vyvolání kvetení nestačí (Singer et al. 1992). Z roubovacích experimentů a z kultivace izolovaných SAM neutrální rostliny slunečnice *Helianthus annuus* vyplývá, že apikální meristémy jsou kompetentní již krátce po vyklíčení (Paterson 1984).

Determinace není stavem „všechno nebo nic“, jak uvádí McDaniel et al. (1989). Autoři rozlišují tzv. ranou a pozdní fázi determinace. Podle autorů je raná fáze determinace stavem, kdy SAM produkuje limitované množství nodů a pak květní struktury, odkazují se např. na experimenty Tran Thanh Vanové (1973a,b) na explantátech z povrchových pletiv u *Nicotiana tabacum*. V pozdní fázi determinace pak SAM vytváří květní struktury přímo, tj. bez tvorby nodů a listů (Van den Ende et al. 1984). Bylo prokázáno, že jakmile se SAM u neutrálního tabáku (*Nicotiana tabacum*



cv. Wisconsin 38) stane determinovaným ke kvetení, produkuje ještě další cca 3 - 4 nody, než se začnou utvářet květní struktury (Singer a McDaniel 1986, McDaniel et al. 1989).

Kompetence a následná determinace ke kvetení se vyskytuje nejen u SAM, ale také v jiných částech rostlinného těla. Např. Tran Thanh Van et al. (1974) pozorovali přímou regeneraci květních orgánů na tenkých vrstvách. Přesněji byly tyto explantáty složeny z 3 – 6 vrstev epidermálních a subepidermálních a pocházely z pletiv květenství neutrálního tabáku. Podobně došlo k regeneraci květních pupenů z tenkých vrstev krátkodenního (cv. Maryland Mammoth) a neutrálního tabáku (cv. Samsun) (Rajeevan a Lang 1987). U krátkodenního typu došlo k regeneraci pouze z květní stopky, u neutrálního se počet květních pupenů snižoval s pozicí odebíraného materiálu směrem k bazální částí, což naznačuje existenci akropetálního květního gradientu podél osy stonku.

#### 1.4.1.3 Buněčná komunikace v SAM

Pro udržení funkčnosti domén v rámci SAM je důležitá komunikace mezi buňkami v SAM a dále mezi buňkami SAM a vznikajícími laterálními orgány (Bowman a Eshed 2000). Buňky SAM mezi sebou komunikují pomocí mezibuněčných spojů, a to v rámci vrstev i mezi jednotlivými vrstvami. Charakter a úroveň komunikace se mění v závislosti na ontogenetickém vývoji. Rozsáhlá komunikační síť zahrnuje množství receptorů a jejich odpovídající ligandy. Důležité jsou také morfogeny, které hrají roli ve vedení buněčné komunikace se sousedními a vzdálenými buňkami. Toto vše je ale otázkou dalšího výzkumu (Bowman a Eshed 2000).

Ve vegetativní fázi jsou u *Iris xiphium* všechny buňky SAM propojeny plasmodesmy (Bergmans et al. 1997). Během přechodu v generativní meristém se snižuje počet plasmodesmat v  $L_2$  vrstvě tuniky, dále mezi buňkami  $L_2$  a sousedními buňkami. Ve vrstvě  $L_1$  a v korpu zůstal počet plasmodesmat stejný. Pokles se zdá být způsoben snížením tvorby primárních a sekundárních plasmodesmat ve vrstvě  $L_2$  a také směrem k buňkám v  $L_1$  a ke korpu. Tato situace má za následek redukci symplastické sítě v SAM, což může odrážet novou funkci  $L_1$  a vrstev v květním meristému.

U *Sinapis alba* bylo pozorováno zvýšení množství sekundárních plasmodesmat v celém SAM po vystavení indukční fotoperiodě (LD). Zvýšené množství bylo

pozorováno ve/mezi vrstvami L<sub>1</sub>, L<sub>2</sub> a L<sub>3</sub> SAM, v periferní i centrální zóně SAM. Tyto plasmodesmy byly vytvořeny pouze přechodně (Ormenese et al. 2000 a 2002).

## 1.4.2 Vliv prýtu a kořenů na květní iniciaci

Přechod rostlin do generativní fáze vývoje je výsledkem interakce mezi prýtem a kořeny (Čajlachjan (Chailakhyan 1961)). Přechod do generativní fáze je za daných podmínek u neutrálního tabáku výsledkem souhry endogenních signálů z listů a kořenů a kompetencí s následnou determinací SAM ke kvetení (Gebhardt a McDaniel 1991, McDaniel 1996, McDaniel et al. 1996).

### 1.4.2.1 Vliv listů a nodů

Pro neutrální tabák platí, že celkový počet nodů vytvořených SAM je funkcí momentálního prostředí, je jednotný v daném prostředí (McDaniel 1980) a je přesně regulovaný (např. McDaniel a Hsu 1976). Stejně tak SAM u jiných neutrálních druhů např. slunečnice vytváří do vykvetení jednotný počet nodů (Haberman a Sekulow 1972). Z experimentů McDaniela (1980) vyplývá, že na počet vytvořených nodů nemá vliv přítomnost listů na hlavní ose prýtu a že pozice úžlabního pupene na hlavní ose prýtu se zdá být důležitější ve vztahu k nástupu kvetení než počet listů na hlavní ose prýtu. Odstraňování všech listů nad nebo pod ponechávaným úžlabním pupenem neovlivnilo jeho růst v závislosti na pozici na hlavní ose prýtu. Úžlabní pupen v bazálnější pozici na ose vytvořil do vykvetení větší počet nodů než apikálněji umístěný pupen (McDaniel 1980). Při roubování a odstraňování listů na rostlinách slunečnice (*Helianthus annuus*) bylo také zjištěno, že stejně jako u neutrálního tabáku mají listy minimální vliv na počet nodů vytvořených SAM (Haberman a Sekulow 1972, McDaniel 1980). Z experimentů na neutrálním tabáku a slunečnici sice vyplývá, že dospělé listy nemají vliv na počet vytvořených nodů, ale na druhou stranu jsou zdrojem důležitých látek pro kvetení jako jsou fotosyntáty a fytohormony (přehledy v Lang 1965, Zeevaart 1976). U některých neutrálních druhů (např. *Nicotiana tabacum*) bylo zjištěno, že na indukční schopnost listů má největší vliv ontogenetické stáří neboli pozice listů na hlavní ose prýtu (Gebhardt a McDaniel 1991, McDaniel et al. 1992).

Proces, kterým je určen počet nodů do vykvetení, není známý. Pokud je na prýtu přítomno jen několik dospělých listů a ostatní jsou odstraněny, nedochází ke

změně v počtu nodů vytvořených do kvetení. Z toho se dá vyvodit, že při „počítání nodů“ nedochází ke „sčítání“ hladiny signálu z listů (McDaniel 1980, Gebhardt a McDaniel 1991, McDaniel 1996). Dále SAM „neměří“ čas do vykvetení, jak plyne z některých experimentů např. McDaniel (1980), kdy nepřetržitá indukce tvorby kořenů v blízkosti SAM měla za výsledek zvýšení počtu nodů do kvetení.

Kultivary neutrálního tabáku *Nicotiana tabacum* zahrnují širokou škálu genotypů, které se navzájem liší velikostí a průměrným počtem nodů vytvořených do vykvetení, výška rostlin se pohybuje od 1 m (cca 14 nodů) až ke 4 m (cca 60 nodů) (McDaniel et al. 1996). Vzájemné roubování mezi nimi prokázalo, že hladina signálu pocházejícího z kořenů je u všech genotypů stejná, nepodílí se tedy na rozdílných velikostech studovaných genotypů tabáku a na udržování vegetativní fáze vývoje (McDaniel et al. 1996). Bylo zjištěno, že se mezi genotypy liší síla signálu pocházejícího z listů (Gebhardt a McDaniel 1991) a že tato odlišnost je spolu s kompetencí SAM odpovídat na květní stimulus zodpovědná za rozdílnost velikostí u studovaných genotypů (McDaniel et al. 1996). Kompetence SAM se zvyšuje s jeho stářím (Singer et al. 1992).

#### 1.4.2.2 Vliv kořenů

U rostliny *Nicotiana tabacum* cv. Wisconsin 38 bylo zjištěno, že stálá indukce tvorby kořenů v blízkosti SAM nebo stálé zakořeňování vrcholových řízků znemožňuje přechod SAM ke kvetení, rostliny setrvaly ve vegetativní fázi vývoje. Pouze při přerušení indukce tvorby kořenů došlo v SAM k vytváření květních struktur (McDaniel 1980). Tyto výsledky ukazují na to, že přechod SAM ke kvetení je u neutrálního tabáku závislý na minimálním počtu nodů oddělujícím SAM a kořenový systém (McDaniel 1980). Podobný jev byl pozorován u rostliny *Ribes nigrum* (Schwabe a Al-Doori 1973). Pokud byla mezi úžlabním pupenem a kořeny vzdálenost pouze 20 nodů, nedošlo k vykvetení rostlin rybízu po vystavení indukčním podmínkám (SD).

Není zcela vyjasněno, jakým způsobem kořeny kvetení ovlivňují. Kořeny mohou produkovat inhibitor, který reguluje determinaci SAM k nástupu kvetení (McDaniel 1980) nebo látku udržující vegetativní růst (McDaniel 1996). Není jasné, jestli má tento inhibitor v SAM antagonistický účinek ke květnímu stimulu nebo jestli v SAM mění akumulaci květního stimulu (McDaniel a Hartnett 1993). Je také možné, že

kořeny mohou být sinkem pro látku, která je požadována pro iniciaci kvetení (McDaniel 1996). Bylo zjištěno, že inhibiční vliv kořenů může být zvrácen vysokou induktivitou listů (Gebhardt a McDaniel 1991). Pokud listy vykazovaly vysokou induktivitu (krátkodenní tabák v podmínkách krátkého dne), inhibiční vliv kořenů se na počtu listů vytvořených do kvetení neprojevil. Naproti tomu při malé induktivě listů za neindukčních podmínek (např. krátkodenní tabák za LD) došlo při kontinuální tvorbě kořenů k trvání vegetativní fáze po dobu těchto podmínek.

U některých druhů rostlin může odstranění kořenů vést k vykvetení (přehled v Kinet et al. 1993). U rostliny *Chenopodium rubrum* bylo zjištěno, že vliv odstranění kořenů na kvetení závisí na jeho načasování s ohledem na fotoperiodu (Vondráková et al. 1998).

#### 1.4.2.3 Vliv květního gradientu

Poprvé bylo Skoogem (1955) pozorováno, že se na explantátech ze segmentů prýtu u neutrálního tabáku *Nicotiana tabacum* vytvářely květní struktury. V rámci studia regenerace z tenkých vrstev u kvetoucího neutrálního tabáku *Nicotiana tabacum* (epidermální a subepidermální vrstvy prýtu) byla pozorována přímá regenerace květních pupenů, tedy bez tvorby kalusu, a to v závislosti na složení kultivačního média (Tran Thanh Van 1973a,b). Dále bylo zjištěno, že existuje vztah mezi místem původu explantátu a schopností tvořit z něho květní pupeny. Explantáty odebrané z bazální části prýtu vytvářely vegetativní pupeny, explantáty pocházející z pletiv květenství vytvářely květní pupeny. Pokud byl explantát odebírán ze střední části prýtu, docházelo k regeneraci vegetativních pupenů, které se rychle přeměnily v pupeny květní (Tran Thanh Van et al. 1974, Rajeevan a Lang 1987). Také McDaniel et al. (1989) pozorovali u kvetoucího neutrálního tabáku, že se s největší frekvencí vytvářely květní výhony tehdy, pokud explantáty pocházely z pletiv květenství. Pokud stonkové explantáty pocházely z bazální části prýtu, vytvářely květní výhony s frekvencí 1%. Překvapivě i stonkové explantáty pocházející z mladých rostlin neutrálního tabáku ve vegetativní fázi vytvářely květní výhony, a to s malou frekvencí (0,1 – 0,3%) (McDaniel et al. 1989). Nízká frekvence tvorby květních výhonů se nezvýšila žádným testovaným ošetřením, ani např. společnou kultivací s explantáty pocházejícími z pletiv květenství (McDaniel 1996). Tyto výsledky prokazují, že schopnost tvorby květních struktur je u neutrálního

tabáku daná vývojovým stavem, který je kvantitativně kontrolován v čase a prostoru (Rajeevan a Lang 1987, McDaniel et al. 1989).

Rajeevan a Lang (1987, 1993) dále zjistili, že také u krátkodenního tabáku *Nicotiana tabacum* cv. Maryland Mammoth dochází k regeneraci květních pupenů z tenkých vrstev. Pupy se tvořily pouze z květních stopek a nezávisle na fotoperiodě. Naproti tomu u neutrálního tabáku (cv. Samsun) se tvořily květní pupeny z explantátů z horní části stonku, a to podle květního gradientu s maximem v jeho apikální části. U krátkodenního tabáku se kromě květních pupenů tvořily na explantátech z květních stopek také pupeny vegetativní. U homologních explantátů neutrálního tabáku se tvořily pouze květní pupeny. Ze srovnávací studie tedy vyplývá, že schopnost tvořit květní pupeny *de novo* je více lokalizovaná a slaběji determinovaná u krátkodenního než u neutrálního tabáku (Rajeevan a Lang 1987). Příčina rozdílu mezi fotoperiodickým a neutrálním tabákem není objasněna, podle autorů je spíše kvantitativní než kvalitativní povahy (Rajeevan a Lang 1987).

Bylo zjištěno, že jen několik apikálních úžlabních pupenů u neutrálního tabáku může být determinováno ke kvetení (McDaniel 1978). Pokud jsou ale nedeterminované úžlabní pupeny spojeny se vzrostnými vrcholy, kvetou rychleji než izolované pupeny a vytvářejí stejný počet nodů do kvetení jako determinované pupeny (Čajlachjan a Chažakjan (Chailakhyan a Khazakhyan 1974, 1975)). V pozdější detailnější studii (McDaniel a Hartnett 1993) bylo prokázáno, že u neutrálního tabáku existuje gradient květního signálu ve stonku s největší aktivitou v jeho apikální části, což je ve shodě s výsledky experimentů kultivace explantátů z tenkých vrstev a izolovaných segmentů. McDaniel a Hartnett (1993) dále uvádějí, že největší potenciál ke kvetení má u neutrálního tabáku prvních šest nodů pod květenstvím, zde je květní signál nejsilnější. Není dosud jasné, jestli stonek slouží jako zásobárna pro květní signál transportovaný z listů, nebo jestli má schopnost tento signál vytvářet (McDaniel 1996).

Schopnost regenerovat květní výhony je u neutrálního tabáku nejen gradientem květního signálu, ale také gradientem kompetence SAM, se stářím rostlin neutrálního tabáku také stoupá kompetence SAM odpovídat na květní stimulus (McDaniel a Hartnett 1992, Singer et al. 1992). Dále bylo zjištěno, že podél stonku neutrálního tabáku (*Nicotiana tabacum* cv. Trapezond) existuje gradient hladiny giberelinů a cytokininů s maximem v apikální části prýtu, a také kyseliny abscisové s maximem

v bazální části prýtu (Negretsky et al. 1984). Zaškrcení stonku vedlo k obrácení tohoto gradientu u všech těchto fytohormonů (Čajlachjan a Chažakjan (Chailakhyan a Khazakhyan 1975)). Dále po zaškrcení stonku došlo k tvorbě květních výhonů na segmentech z bazální části, zatímco výhony na segmentech z apikální části zůstaly vegetativní (obrácení gradientu květního stimulu) a byl také obrácen gradient hladiny volné kyseliny indol-3-octové (IAA) (Lozhnikova et al. 1989).

## 1.5 Molekulární mechanismy nástupu kvetení

V posledních letech nabývá na významu studium genů / mutací spojených s procesem iniciace a tvorby květních struktur a nabízí další možnosti k rozšíření znalostí o regulaci kvetení. Nejvíce studovanou rostlinou v molekulární biologii je *Arabidopsis thaliana*, u které je již známá sekvence celého genomu.

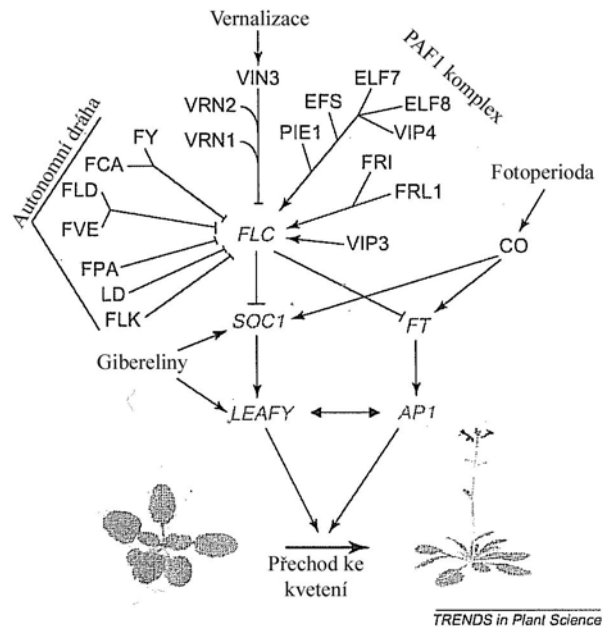
Přechod do reprodukční fáze vývoje rostlin je spojen se změnou aktivity některých genů. Vývoj květních struktur je podle Levy a Dean (1998b) regulován dvěma skupinami genů. Jsou to geny identity květního meristému, které řídí přechod SAM v květní a geny identity květních orgánů, které řídí tvorbu květních struktur.

Mezi geny identity meristému u *Arabidopsis thaliana* patří CAULIFLOWER (CAL), APETALA1 (AP1), LEAFY (LFY), které hrají primární roli v iniciaci květního programu. Nejprve je aktivován gen LFY v oblasti budoucího květního meristému, následně ve vyvíjejícím se květním meristému stoupá aktivita genů AP1 a CAL. Exprese genu LFY je ovlivněna vnějšími a vnitřními faktory (např. délka dne, teplota, gibbereliny, sacharidy). Geny identity květního meristému svojí aktivitou pozitivně regulují geny identity květních orgánů (např. APETALA2 – AP2, APETALA3 – AP3, AGAMOUS – AG) (např. Blázquez a Weigel 2000, Yong et al. 2000, Araki 2001, Leyser a Day 2003).

### 1.5.1 Model regulace nástupu kvetení u *Arabidopsis thaliana*

U *Arabidopsis thaliana* existuje několik signálních drah, které koordinují kvetení s podmínkami okolního prostředí a s vývojovým stářím rostliny a vedou k aktivaci exprese genu LFY: jsou to fotoperiodická, vernalizační a autonomní dráha. Také gibbereliny a sacharóza mají pozitivní vliv na expresi genu LFY, provázanost

sacharózy s autonomní dráhou není zcela vyjasněna (Levy a Dean 1998a, 1998b, Michaels a Amasino 2000, Reeves a Coupland 2000, Sheldon et al. 2000, Yong et al. 2000, Ohto et al. 2001, Simpson 2004). Vzájemná provázanost těchto signálních drah je naznačena na **Obr. 1-3**.



**Obr. 1–3: Regulační dráhy v procesu kvetení u *Arabidopsis thaliana* (převzato z He a Amasino 2005, upraveno)**

#### Autonomní dráha

Podle Simpsona (2004) je autonomní dráha kombinací interakcí specifických proteinů, které různými mechanismy snižují aktivitu FLC proteinu, což má za následek následnou aktivaci genu LFY. Názvy a vztahy těchto proteinů jsou ukázány na **Obr. 1–3**, navzájem se ale neovlivňují na transkripční úrovni. Některé z nich jsou zahrnuty v interakcích při metabolismu RNA (FCA-FY, FLK, FPA). Další (FLD, FVE) jsou příbuzné lidským proteinům nalezených v histon-deacetylázových korepresorových komplexech, regulují tedy FLC epigeneticky, způsobují deacetylaci histonů v FLC lokusu. Avšak dále podle Simpsona (2004) otázkou zůstává, nakolik je regulace aktivity genu FLC těmito mechanismy (epigenetická regulace genové exprese, RNA-processing) charakteristická pouze pro *Arabidopsis*.

## 1.6 Buněčný cyklus u rostlin:

Buňka je základní strukturní a funkční jednotka živých organismů. Buněčné dělení a jeho regulace hrají klíčovou roli během vývoje rostlin, protože rigidní buněčná stěna obklopující rostlinné buňky sice zajišťuje strukturální oporu, ale limituje buněčný pohyb. Mateřské a dceřiné buňky jsou tak fixovány v pozici, kde vznikly (Francis a Halford 1995, Stals et al. 2000). Ve srovnání se živočichy nemohou rostliny uniknout před nepříznivými podmínkami, a tak se u nich vyvinuly adaptace jako je kontinuální organogeneze, plastický růst a totipotence. Tyto schopnosti umožňují rostlině reagovat na okolní prostředí a měnit svůj tělní plán (např. Francis a Halford 1995). Tělní plán rostlin je přesně kontrolován v čase a prostoru. Změny v růstu a vývoji vyšších rostlin jsou zprostředkovány změnou v regulaci rychlosti a orientace buněčného dělení, v tomto kontextu je důležitá tzv. poziční informace (Francis a Halford 1995, Clark 1997, Leyser a Day 2003).

### 1.6.1 Fáze buněčného cyklu eukaryot

Každá buňka prochází buněčným cyklem, což je soubor opakujících se a na sebe navazujících fází; G1 – post-mitotická fáze, S – DNA syntetická fáze, G2 – post-syntetická fáze a M fáze – mitóza. Nedělící se buňky zůstávají v G0 fázi, tzv. klidové nebo modifikované G1 fázi. Po M fázi následuje většinou cytokineze.

G1 fáze je období mezi proběhlou mitózou a následující replikací. Buňka je metabolicky aktivní, syntetizují se proteiny, RNA, nukleotidy. Buňka roste a připravuje se na replikaci DNA. V následné S fázi dochází k replikaci DNA. Pak následuje G2 fáze, kdy se buňka připravuje na mitózu, roste, syntetizují se proteiny nutné pro mitózu. V M fázi dochází k rozdělení chromozomů do nově vznikajících jader. Je to proces, který se skládá z několika na sebe navazujících kroků: profáze, metafáze, anafáze a telofáze. Tyto kroky zajišťují rovnoměrnou segregaci chromozomů do nově vznikajících jader. Po jaderném rozdělení v M fázi následuje cytokineze, kdy dochází k rozdělení buňky na buňky dceřiné. Může probíhat rovnoměrně nebo nerovnoměrně (Nasmyth et al. 1991, Nurse 2002).

Průchod buňky buněčným cyklem je regulován v tzv. kontrolních bodech (tzv. „checkpoints“), ve kterých se buňka rozhoduje o postupu do následné fáze (Nasmyth et



al. 1991). Jsou to přechod mezi G1 a S fází a přechod mezi G2 a M fází, dále v mitóze, kdy dochází ke kontrole navázání chromozómů na mitotické vřeténko. V těchto bodech buňka kontroluje např. správnou velikost a dostatek živin, správnou replikaci DNA, správné rozdělení chromozómů atd.

Modelovými organizmy pro studium buněčného cyklu a především kontrolních bodů mezi G1 – S a G2 – M jsou kvasinky, pučící kvasinka *Saccharomyces cerevisiae* (G1 – S) a poltivá kvasinka *Schizosaccharomyces pombe* (G2 – M) (Nasmyth et al. 1991). U kvasinek existuje rozhodující kontrolní bod v jedné fázi buněčného cyklu, ostatní jsou však také přítomny. Kontrolní bod na konci G1 fáze byl poprvé popsán u kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*, kde je znám pod názvem START. Pokud buňka projde STARTem, je většinou determinována k ukončení buněčného cyklu. Naproti tomu u jiného druhu kvasinky (*Schizosaccharomyces pombe*) je jediný kontrolní bod na přechodu mezi G2 a M fází, což zamezuje zahájení mitózy před ukončením replikace DNA. U vyšších eukaryot probíhá rozhodování o postupu buněčným cyklem v obou kontrolních bodech (Nasmyth et al. 1991, Nurse 2002).

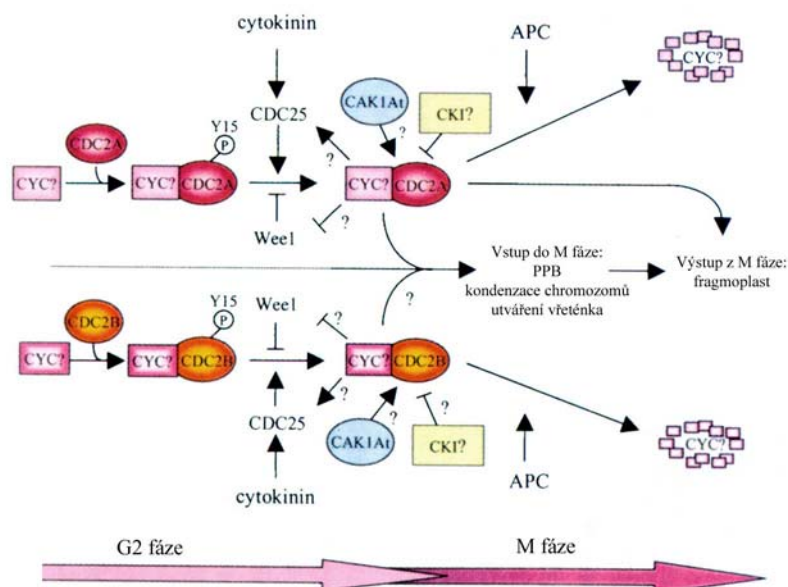
#### 1.6.1.1 Regulace buněčného cyklu u rostlin

Regulace buněčného cyklu u rostlin je podobná regulaci u ostatních eukaryot. Klíčovou roli v kontrole regulace buněčného cyklu eukaryot hraje aktivace enzymatického komplexu, který obsahuje dvě části. První je katalytická podjednotka tzv. serin/threonin cyklin–dependentní kináza (CDK), druhá část je regulační podjednotka – cyklin. U rostlin existuje několik typů CDK kódovaných *cdc2* genovou rodinou. CDK jsou požadovány pro průchod celým buněčným cyklem. Také existuje několik skupin cyklinů, jejichž hladina v průběhu buněčného cyklu osciluje a jejichž úloha spočívá v kontrole aktivity CDK. Kolísání hladiny cyklinů je zajištěno regulací jejich syntézy a degradace. Jejich degradace zajišťuje tzv. destrukční box, pomocí kterého dochází k jejich ubiquitinaci a k následné proteolýze. Během M – fáze dochází k celkové degradaci a deaktivaci kinázového komplexu CDK/cyklin (Shaul et al. 1996, Burssens et al. 1998, Hemerly et al. 1999, Mironov et al. 1999, Stals et al. 2000, Francis a Sorrell 2001).

Aktivita CDK je dále ovlivněna aktivační a inhibiční (de)fosforylací (specifické kinázy a fosfatázy), nebo připojením inhibitoru (CKI). U kvasinky *Schizosaccharomyces pombe* je CDK přechod z G2 do M fáze regulován aktivační

(de)fosforylaci na tyrosinovém zbytku CDK. Fosforylace na tyrosinu 15 inhibuje aktivitu komplexu CDK/cyklin a je způsobena specifickými kinázami Wee1. Antagonistou Wee1 je u eukaryot Cdc25 fosfatáza (Mironov et al. 1999, Nurse 2002). U rostlinné CDK byly detekovány všechny (in)aktivační domény popsané u kvasinkové CDK, včetně AMK rezidua (Tyr-15), kde dochází k aktivační defosforylaci před vstupem do mitózy (Zhang et al. 1996). Nedávno se v genomu *Arabidopsis* podařilo identifikovat *cdc25*-příbuzný gen/protein, jež obsahuje odpovídající katalytickou doménu (Landrieu et al. 2004). Tento protein vykazuje fosfatázovou aktivitu, nicméně ověření jeho biologické funkce dosud provedeno nebylo.

Transgenní rostliny tabáku (*Nicotiana tabacum* L. cv. Samsun) konstitutivně exprimující gen pro kvasinkovou fosfatázu *cdc25* pod 35S CaMV promotorem vykazují redukcii velikosti buněk kořenového meristému v mitóze, předčasné kvetení, změnu v morfogenezi a počtu květních orgánů a změnu v morfogenezi listů (Bell et al. 1993). McKibbin et al. (1998) pozorovali u tohoto neutrálního tabáku transformovaného stejným genem pod kontrolou tetracyklin-inducibilního promotoru, zvýšené zakládání primordií postranních kořenů. Dále bylo zjištěno, že transformace neutrálního tabáku kvasinkovou fosfatázou *cdc25* ovlivňuje *de novo* organogenezi, což je proces striktně závislý na frekvenci a orientaci buněčného dělení. U transformovaných rostlin byl pozorován výrazný posun v organogenezi ve prospěch tvorby pupenů, který lze vyvolat aplikací cytokininů (tzv. „cytokinin-like“ efekt) (Suchomelová et al. 2004). Výsledky naznačují, že exprese kvasinkové fosfatázy *cdc25* může u neutrálního tabáku nahradit ošetření cytokininy, což podporuje představu, že během vývoje rostlin dochází k interakci mezi regulátory buněčného cyklu a fytohormony.



**Obr. 1-4: Schematické znázornění CDK/cyklinových komplexů zapojených do regulace buněčného cyklu u *Arabidopsis thaliana* (převzato ze Stals et al. 2000, upraveno)**

### 1.6.2 Cytokininy, buněčné dělení a diferenciace

U rostlin je stále předmětem studia, jak endogenní (hormony, buněčná velikost) a exogenní faktory (teplota, stav zásobenosti vodou a živinami) ovlivňují aktivitu CDK. Exogenní přísun cytokininů na kultury *in vitro* podmínkách stimuluje buněčné dělení. Cytokininy regulují u *Arabidopsis thaliana* přechod mezi G1 a S fázemi buněčného cyklu indukcí transkripce cyklinu CycD3. Podobné účinky má i sacharóza (D'Agostino a Kieber 1999). Konstitutivní exprese CycD3 v transgenních rostlinách *Arabidopsis thaliana* způsobila indukci a udržení buněčného dělení za absence exogenních cytokininů (Riou-Khamlichi et al. 1999). Dále cytokininy mají vliv na expresi genů Kn1 rodiny, což jsou klíčové regulátory funkce meristému, ale mechanismus není znám (D'Agostino a Kieber 1999). Cytokininy mají pravděpodobně vliv na regulaci exprese reparačních enzymů. Mohou interagovat s proteiny, které mají podíl na aktivaci latentních DNA replikačních počátků, což má za výsledek zkrácení doby S fáze (Francis a Sorrell 2001).

Rostliny *Nicotiana tabacum* L. cv Samsun byly transformovány cytokininoxidázou tak, že regenerované transformanty měly snížený obsah endogenních cytokininů (Werner et al. 2001). U transformantů se mimo jiné pomalu vytvářely malé

buňky v SAM a v listových primordiích, dále byla redukována velikost SAM. Cytokininy jsou tedy zřejmě zahrnuty nejen v regulaci buněčného cyklu, ale také v diferenciaci buněk prýtu. Tito autoři dále diskutují možné cesty působení cytokininů v SAM, jako např. existenci různé lokální koncentrace cytokininů v SAM, rozdílnou distribuci různých cytokininových metabolitů a možnost nekompletní apikální dominance (Werner et al. 2001).

Cytokininy také ovlivňují přechod z G2 do M fáze. Zhang et al (1996) zjistili na kulturách tabáku *Nicotiana plumbaginifolia*, že buňky za nepřítomnosti cytokininů zůstávaly v G2 fázi. Aplikace cytokininu umožnila (defosforylací CDK) přechod do M fáze defosforylací CDK. Předpokládá se interakce cytokininů s *cdc25* (případně homologem u rostlin), která má za výsledek aktivační defosforylaci tyrozinového zbytku a vstup buněk do mitózy, **Obr. 1-4** naznačuje tento vztah.

## 2 Materiál a metody

### 2.1 Biologický materiál

Pro všechny experimenty byly jako rostlinný materiál použity rostliny tabáku *Nicotiana tabacum* L., cv. Samsun divoký genotyp (kontrolní varianta) a linie A a C nezávisle transformované *cdc25* cDNA ze *Schizosaccharomyces pombe* pod kontrolou 35S CaMV promotoru (Bell et al. 1993).

### 2.2 Experimenty v podmínkách *in vivo*

#### 2.2.1 Kultivace

Experimenty byly provedeny v prostorách určených pro práci s GMO: experimentální skleník Katedry fyziologie rostlin, PřF UK, Viničná 5 (2004 – 2005)

##### Výsev:

Výsev transformantů A a C byl vždy proveden o týden později než výsev rostlin kontrolních. Důvod byl ten, aby na začátku daného experimentu měly transformanty přibližně stejný počet listů jako rostliny kontrolní, protože transformanty vykazují od 4 - 5 plně vyvinutých listů (nad 10 cm) známky urychlení růstu. Přibližně po třech týdnech byly všechny rostliny po jedné přesazeny do květináčů o průměru 15 nebo 24 cm. Počet rostlin a typ květináče byl zvolen v závislosti na typu experimentu.

#### 2.2.2 Hodnocení rostlinného materiálu

##### 2.2.2.1 Stanovení počtu listů

Počítání listů bylo provedeno způsobem popsáním v diplomové práci Martiny Smoloňové (2003). Do celkového počtu nebyly započítány listy přízemní listové růžice (2 – 4), které během růstu rostlin odumřely. Do celkového počtu listů byly započítány listy s délkou nad 10 cm.

### 2.2.2.2 Stanovení počtu dnů do kvetení

Počet dnů do kvetení je označení pro dobu od výsevu do vytvoření nerozvitých, ale makroskopicky pozorovatelných pupat.

### 2.2.2.3 Stanovení hmotnosti sušiny kořenového systému

Byly použity kontrolní a transformované (linie A a C), a to ve vegetativní fázi vývoje (kultivace v 15 cm květináčích). Nejprve byla odříznuta nadzemní část rostlin, poté byl kořenový systém i se substrátem vyklepán. Substrát byl vymyt v tácech, každý kořenový systém 3krát. Po vymytí substrátu byly kořeny jednotlivých rostlin zabaleny do alobalu, zmrazeny v tekutém dusíku a skladovány v mrazicím boxu – 80°C. Poté byly v alobalu vysušeny v lyofilizátoru (Lyovac GT 2) cca 1,5 dne a přendány do předem zvážených centrifugačních zkumavek (15 ml). Následovalo další vysoušení v centrifugačních zkumavkách, a to cca 10 h. Poté byly vzorky zváženy na analytických vahách (Sartorius).

### 2.2.3 Roubování

Byly použity rostliny kontrolní a transformované (A,C), a to ve vegetativní fázi vývoje (kultivace ve 24 cm květináčích).

Technika roubování byla převzata z diplomové práce Martiny Smoloňové (2003). Z rostlin určených jako podnož byla šikmým řezem odstraněna horní část prýtu. Velikost podnože se lišila podle typu roubovacího experimentu. Šikmý řez (cca 2 cm) byl veden na úrovni prvního nodu nad ponechaným listem, viz **Obr. 2–1.** a **2–2.** Na šikmý řez podnože byl parafilmem připevněn roub. Roub vždy představoval apikální segment prýtu (délka 3 – 5 cm), na kterém byly odstraněny všechny listy nad 0,5 cm. Průběžně byly na podnoži odstraňovány laterální výhony, a to s frekvencí cca 3 dny.

Roubování probíhalo v následujícím uspořádání:

1. kombinace: vegetativní kontrola a transformant C, resp. A

Podnož představovala bazální část rostliny s kořenovým systémem a s 1 - 2 dospělými listy v bazální části prýtu, schematický **Obr. 2–1** znázorňuje rovinu řezu.

Byly roubovány tyto varianty:

a) K/C, K/A

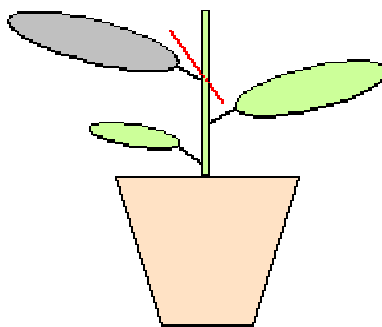
roub: kontrola

podnož: transformant C resp. A

b) C/K, A/K

roub: transformant C resp. A

podnož: kontrola



**Obr. 2–1: Schema (převzato ze Smoloňová 2003) znázorňuje rovinu a místo řezu 1. varianty roubování**

2. kombinace vegetativní kontrola a transformant C

Podnož představovala prýt bez vrcholové části, na podnoži byly ponechány listy o délce nad 10 cm, schematický **Obr. 2–2** znázorňuje rovinu řezu.

Byly roubovány tyto varianty:

a) K/C

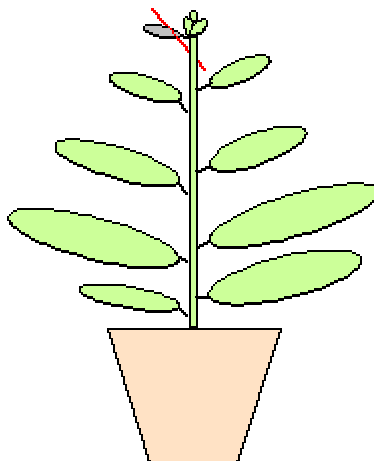
roub: kontrola

podnož: transformant C

b) C/K

roub: transformant C

podnož: kontrola



**Obr. 2–2: Schema (převzato ze Smoloňová 2003) znázorňuje rovinu a místo řezu 2. varianty roubování**

Bylo také prováděno kontrolní roubování, kdy byly roub i podnož z kontrolního (K/K), resp. transformovaného materiálu (C/C, resp. A/A).

#### 2.2.4 Hodnocení stavby apikálního meristému prýtu

Byly použity kontrolní a transformované (linie A a C) rostliny, a to ve vegetativní fázi vývoje (kultivace v 15 cm květináčích). Odebrané vzrostné vrcholy prýtu byly fixovány v 50% FAA, následně z nich byly zhotoveny trvalé preparáty.

Jako vrcholová část prýtu bylo označeno: apikální meristém prýtu (SAM), listy sevřené kolem apikálního meristému prýtu včetně odklánějícího se listu (max. délka 6 cm ).

50% FAA byla připravena následujícím způsobem: formaldehyd/kyselina octová/etanol/voda – 1:1:9:9 – v:v:v:v.

Hodnocení kvality odebraného materiálu – použitelné vzorky byly ty, které klesly během několika dnů na dno skleničky (tmavé sklo, uložení ve tmě).



### 2.2.4.1 Zhotovení trvalých preparátů:

Trvalé preparáty pro anatomická pozorování byly připraveny parafínovou metodou (Pazourková 1986).

#### Zalítí vzorků do parafínu:

Odebrané vzorky byly odvodněny pomocí vzestupné butanol - etanolové řady, viz **Tab. 2-1**.

**Tab. 2-1 Butanol - etanolová odvodňovací řada (Němec et al. 1962)**

1.	butanol : etanol : voda	25:30:45
2.	butanol : etanol : voda	40:30:30
3.	butanol : etanol : voda	55:25:20
4.	butanol : etanol : voda	70:20:10
5.	butanol : etanol : voda	85:15:0
6.	100% butanol	100:0:0
7.	100% butanol	100:0:0

V každém kroku řady byly vzorky ponechány minimálně 4 h. K odvodněným vzorkům ve 100% butanolu byl přidán parafín. Nádobky byly uzavřeny víčkem. Vzorky byly inkubovány v termostatu při teplotě 45°C po dobu 10 h. Po uplynutí této doby byly nádobky zhruba na 2 dny odkryty a inkubovány při stejné teplotě za účelem odpařování butanolu. Poté byl parafín vyměněn za čistý, v němž byly vzorky ponechány dalších 12 h. Parafín byl vyměněn ještě třikrát, a to vždy po 12 h. Do posledního čistého parafínu byly vzorky zality.

#### Řezání objektů:

Z parafínových bloků se vzorky byly vyříznuty bločky obsahující vždy jeden vzorek. Tyto bločky byly přitaveny na dřevěné špalíčky. Takto připravené vzorky vzrostných vrcholů byly řezány konzolovým mikrotomem Leitz na 12 µm silné podélné řezy. Na podložní sklíčko byla nejprve nanесena tenká vrstva adheziva (glycerol: vaječný bílek - 1:1 – v:v), následně destilovaná voda přes celé sklíčko (Pazourková 1986). Na takto připravená sklíčka byly štětečkem umístěny řezy, které byly následně

vyrovnávány žehlením na temperované desce (MEDAX) při 55°C. Preparáty zasychaly při pokojové teplotě.

#### Barvení preparátů:

Preparáty byly barveny alciánovou modří (Sigma Aldrich) a pravou jádrovou červení (Kernechtrot) (Sigma Aldrich) (Poláčková a Beneš 1975). Alciánová modř barví bazické struktury (např. buněčné stěny, cytoplasmu). Pravá jádrová červeň barví kyselé struktury, především mitoticky aktivní jádra. Postup barvení je popsán v **Tab.2-2**.

**Tab.2-2 Postup barvení alciánovou modří a pravou jádrovou červení**

1. odparafinování preparátů : toluen I, II, III - á 3 min
2. zavodnění: sestupná etanolová řada (2x 100%, 96%, 70%, 50%, 30% (v/v), destilovaná voda) – á 3 min
3. 3% kyselina octová (v/v) - 1 min
4. 0,1% alciánová modř (příprava viz dále) - 20 min
5. oddiferencování přebytečného barviva v destilované vodě - 5 až 10 min
6. 1% pravá jádrová červeň (příprava viz dále) - 1 až 2 min
7. oddiferencování přebytečného barviva v destilované vodě - 5 až 10 min
8. odvodnění: vzestupná etanolová řada (30%, 50%, 70%, 96%, 2x 100% (v/v) - á 3 min
9. promytí toluenem: toluen I, II, III - á 3 min
10. uzavření preparátů do syntetické pryskyřice (solakryl BMX, Synthesia Kolín)

#### Příprava barviv:

- ◆ alciánová modř: 0,1% (w/v), barvivo bylo rozpuštěno v 80°C teplé 3% kyselině octové (v/v) a přefiltrováno
- ◆ pravá jádrová červeň: 1% (w/v), barvivo bylo rozpuštěno v 80°C teplém 5% vodném roztoku  $Al_2(SO_4)_3$  (w/v) a přefiltrováno.

#### 2.2.4.2 Anatomická analýza:

Anatomické preparáty byly hodnoceny pomocí světelného mikroskopu Olympus BX50. Mikroskopické obrazy byly snímány digitálním fotoaparátem (Olympus C3040 – ADU) a fotografie byly převedeny do počítače. Obrazy byly pro dokumentaci připraveny v programu Adobe Photoshop (verze 6.0 CE).

## 2.2.5 Analýza obsahu rozpustných nestrukturních sacharidů metodou HPLC

Vzorky byly odebírány z rostlin kontrolních a transformovaných A a C, a to ve vegetativní fázi vývoje (kultivace v 15 cm květináčích).

### 2.2.5.1 Příprava vzorků pro analýzu sacharidů

#### 2.2.5.1.1 Exudát z dekapitovaných rostlin:

##### Příprava mikrokumavek:

Byly použity 0,5 ml mikrokumavky obsahující médium tohoto složení (podle Lejeune et al. 1994): roztok 20mM EDTA (Lachema) o pH 7,5 zpevněný 1% nebo 0,8% agarózou (Serva, Sigma).

Navážka EDTA (váženo na analytických vahách AND GR-200-EC) byla přesypána do malé kádinky s destilovanou vodou (cca 80% konečného objemu). Po rozpuštění bylo upraveno pH na 7,5 několika kapkami 1M NaOH, resp. 1M CH<sub>3</sub>COOH. Dále byla do roztoku přisypána agaróza (1% nebo 0,8%), která v něm byla rozpuštěna přivedením roztoku k varu v mikrovlnné troubě. Poté byl destilovanou vodou doplněn objem v odměrném válci. Následně bylo médium pipetováno do 0,5 ml mikrokumavek, a to až po okraj či mírně přes něj (při tuhnutí médium trochu poklesne). Po utuhnutí média bylo možné mikrokumavky ihned použít k experimentu. Nejlépe se osvědčilo připravit médium do mikrokumavek těsně před experimentem. Pokud bylo médium připraveno do mikrokumavek den předem, bylo nutné přebalit stojánek s mikrokumavkami mikroténovou fólií případně alobalem a uložit do lednice, protože médium rychle vysychá.

##### Jímání exudátu z prýtu:

Po odříznutí vrcholové části prýtu byla ihned na vzniklý řez nasazena 0,5 ml mikrokumavka s médiem, viz **Obr. 2-3**. Bylo zjištěno, že médium z mikrokumavek lépe přilne k řezu, pokud je límeček mikrokumavek odstraněn a pokud jsou mikrokumavky připevněny k rostlině parafilmem. Aby nedocházelo k odpařování vody z média, byly mikrokumavky překryty potravinovou fólií a rostliny umístěny na stinné místo skleníku. Po 24 hodinách byly mikrokumavky sbírány a ihned po sběru byl

jejich obsah přendán do 2 ml mikrozkuavek. Po tomto kroku bylo možné buď vzorky skladovat v mrazícím boxu při  $-18^{\circ}\text{C}$  nebo rovnou extrahovat sacharidy.



**Obr. 2-3: Umístění mikrozkuavky při jímání exudátu z dekapitované rostliny (transformant C)**

Extrakce sacharidů:

Extrakce sacharidů z exudátů jímáných do agarózového média byla provedena pomocí vymývání methanolem. Ke každému vzorku ve 2 ml mikrozkuavce bylo připipetováno 0,5 ml 80% methanolu (v/v). Poté byly vzorky 10 min inkubovány při  $75^{\circ}\text{C}$  v termobločku (Grant QBT1), obsah byl promíchán (Microshaker ML – 1) a následně byly vzorky 10 min centrifugovány (Eppendorf Centrifuge 5415 D) při 14 000 ref. Vzniklý supernatant byl přelit do nových 2 ml mikrozkuavek, které sloužily jako sběrné. Do mikrozkuavek se sedimentem bylo opět připipetováno 0,5 ml 80% methanolu a celý postup byl opakován. Celkem byla extrakce provedena 3x. Získané vzorky byly skladovány v mrazícím boxu při  $-18^{\circ}\text{C}$ .

Příprava k měření:

Vzorky byly rozmrazeny (při pokojové teplotě) a uloženy do Speedvacu k odpaření do sucha (cca 3,5 hodiny). V tomto bodě lze postup přerušit a vzorky opět skladovat v mrazícím boxu při  $-18^{\circ}\text{C}$  nebo pokračovat v přípravě k měření. Ke každému vzorku bylo pipetováno 0,3 ml demineralizované vody, poté byly vzorky uloženy na 15 min do ultrazvukové lázně (Julabo USR 05). Následně byly vzorky promíchány (Microshaker ML – 1) a 10 min centrifugovány (Eppendorf Centrifuge

5415 D) při 14 000 rcf. Vzniklý supernatant byl přefiltrován přes membránové filtry Millex Millipore (porozita 0,45  $\mu\text{m}$ ) do čistých mikrozkušavek. Před měřením byly vzorky skladovány v mrazícím boxu při  $-18^\circ\text{C}$ .

#### 2.2.5.1.2 Exudát z listů

##### Příprava kádinek:

Byly použity:

- ◆ - kádinky větší (rozmezí 500 – 1000 ml): byla do nich nalita voda na dno, následně byly uzavřeny alobalovou fólií, aby se uvnitř větší kádinky vytvořila vysoká relativní vlhkost vzduchu a nedocházelo k vysoušení listů během jímání exudátů. Větší kádinky byly připravovány 6 – 12 hodin před experimentem.
- ◆ - 50 ml úzké kádinky: bylo do nich pipetováno 5 ml roztoku pro jímání exudátu

##### Příprava roztoku pro jímání exudátu:

Byly použity 50 ml úzké kádinky obsahující 5 ml roztoku 20mM EDTA (Lachema), pH 7,5. (podle Lejeune et al. 1994):

Navážka EDTA (váženo na analytických vahách AND GR-200-EC) byla přesypána do malé kádinky s destilovanou vodou (cca 80% konečného objemu). Po rozpuštění bylo upraveno pH na 7,5 několika kapkami 1M NaOH. Roztok byl připravován buď v den experimentu nebo den před experimentem, a pak byl uchován v zábrusové lahvi při  $4^\circ\text{C}$ .

##### Jímání exudátu z listů:

Byly odříznuty nejvyvinutější listy, délka nad 10 cm. V závislosti na vzrůstu rostliny se počet odříznutých listů pohyboval od 1 do 3 listů na rostlinu. Odříznuté listy z jedné rostliny byly ihned ponořeny do Petriho misky s destilovanou vodou a řezná plocha ještě jednou seříznuta žiletkou. Důvod byl ten, aby řezná plocha nezaschla a aby se zamezilo vzniku kalózové zátky, která by znemožnila vytékání exudátu. Poté byly listy řeznou plochou ponořeny do roztoku v 50 ml úzké kádince (listy z jedné rostliny v jedné kádince). 50 ml kádinky s listy byly umístěny do větších kádinek s vodou a uzavřeny alobalovou fólií, viz **Obr. 2-4**. Kádinky byly umístěny na tácech ve stinné části skleníku, aby uvnitř nádobek nedocházelo k přehřívání, a tím k poškození listů. Po

24 hodinách byl jímaný roztok přelit do sběrných nádobek a ty byly skladovány v mrazícím boxu při  $-18^{\circ}\text{C}$ . Ihned po sběru roztoků byly všechny listy nasmímány pomocí scanneru (HP Scanner 4c), kde byly položeny na tenkou vrstvu destilované vody (lépe se tak listová plocha rozložila na desku scanneru). Takto získané obrazy listů byly upraveny v programu Lucia G (verze 4.8), ve kterém byla následně měřena listová plocha nebo byly upraveny v programu Adobe Photoshop (verze 6.0 CE) a listová plocha byla měřena v programu Eclipse (verze 2.05). Hodnoty ploch listů z jedné rostliny byly sečteny a použity pro stanovení množství rozpustných nestrukturních sacharidů na jednotku listové plochy.

Příprava k měření:

V závislosti na přítomnosti drobných nečistot v roztoku (např. drobné kamínky ze skleníku) bylo možné stanovit obsah sacharidů buď přímo z roztoku nebo jej bylo třeba nečistot zbavit. Proto byly jímané exudáty přelity (ihned po sběru nebo po jeho rozmražení) do označených centrifugačních zkumavek (15 ml) a centrifugovány (Hettich) 7 min při 18 030 rcf. Ze supernatantu byl odpipetován 1 ml roztoku do čistých mikrozkušavek. Tyto vzorky byly určeny k měření a byly skladovány v mrazícím boxu při  $-18^{\circ}\text{C}$ .



**Obr. 2-4: Systém kádinek pro jímání exudátu z listů**

Menší kádinka obsahuje roztok EDTA, do kterého jsou ponořené řapíky listů a která je umístěna na dno větší kádinky. Na dně větší kádinky je nízká hladina vody, která po uzavření systému alobalovým víčkem zajišťuje vysokou relativní vlhkost vzduchu v celém systému jako ochrana proti uvadnutí listů během experimentu.

#### 2.2.5.1.3 Obsah sacharidů v listech

##### Odběr listů

U rostlin byly odebírány plně vyvinuté listy. Listy z jedné rostliny byly zabaleny do alobalu, zmrazeny v tekutém dusíku a skladovány v mrazícím boxu při  $-80^{\circ}\text{C}$ .

##### Příprava vzorků:

Listy byly v alobalu vysušeny v přístroji Lyovac GT 2 (Finn–Aqua). Z každého vysušeného listu byly odebrány 3 cca 20 mg vzorky (bez středních žilek) do předem zvážených mikrozkušavek, váženo na analytických vahách (Sartorius). Tyto vzorky byly ihned zmrazeny v tekutém dusíku a skladovány v mrazícím boxu  $-80^{\circ}\text{C}$ . Poté proběhlo dosoušení, cca 6 – 10 hodin. Po vysušení byla stanovena hmotnost sušiny na analytických vahách. Po zvážení byly vzorky skladovány v exikátoru.

#### Extrakce sacharidů a příprava k měření:

Ke každému vzorku byl pipetován 1 ml 80% methanolu (v/v), uloženy do Speedvacu (Speedvac Plu SC110 A, Savant) k odpaření do sucha (cca 2,5 hodiny) a skladovány v mrazícím boxu při  $-18^{\circ}\text{C}$ . Po rozmražení (při pokojové teplotě) bylo ke každému vzorku pipetováno 0,5 ml demineralizované vody a poté byly vzorky uloženy na 15 min do ultrazvukové lázně (Julabo USR 05). Následně byly vzorky promíchány (Microshaker ML – 1) a 10 min centrifugovány (Eppendorf Centrifuge 5415 D) při 14 000 ref. Vzniklý supernatant byl přefiltrován přes membránové filtry Millex Millipore (porozita  $0,45\ \mu\text{m}$ ) do čistých mikrozkušavek. Před měřením byly vzorky skladovány v mrazícím boxu při  $-18^{\circ}\text{C}$ .

#### 2.2.5.1.4 Obsah sacharidů v kořenovém systému

##### Odběr kořenového systému:

Byl odebírán celý kořenový systém. Nejprve byly kořenové systémy vyjmuty z květináče a opatrně zbaveny substrátu. Poté byly několikrát promyty vodou. Kořenové systémy byly zabaleny do alobalu, zmrazeny v tekutém dusíku a skladovány v mrazícím boxu  $-80^{\circ}\text{C}$ .

##### Extrakce sacharidů a příprava vzorků k měření

Další příprava k analýze se shoduje s postupem popsáním v části 2.2.5.1.3. „Obsah sacharidů v listech“.

#### 2.2.5.2 Stanovení obsahu a spektra rozpustných nestrukturních sacharidů:

Obsah sacharidů byl stanoven pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC). Parametry měřicího systému: refraktometrická detekce (Shodex RI-71); isokratická pumpa Spectra Physics; počítačový program CSW 1.7; teplota:  $80^{\circ}\text{C}$ ; předkolonka: Hema-Bio 1000 SB+Q (Watrex); kolona: Polymer IEX Pb<sup>2+</sup> (Watrex); eluent: demineralizovaná voda (Milli Q), rychlost průtoku:  $0,5\ \text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$ , objem injikovaného vzorku: 10  $\mu\text{l}$ , standardy sacharidů: Sigma.



## 2.3 Experimenty v podmínkách *in vitro*

### 2.3.1 Kultivační podmínky

#### 2.3.1.1 Složení kultivačního média

Pokusný materiál byl ve všech experimentech kultivován na pevném MS médiu (Murashige a Skoog 1962).

V závislosti na typu experimentu byla použita média s různým obsahem sacharózy:

3% (w/v) pro výsev, 5% (w/v) a 7% (w/v) pro přesazení a následnou další kultivaci rostlin.

Dále byl upraven obsah agaru v médiu určeném pro výsev, a to z 8 g/l média na 7,5 g/l (médiu nebylo tak tuhé, mladé rostliny se z něho lépe vyndávaly, a snížilo se tak riziko poškození jejich kořenového systému).

Ostatní složky média: Myo–inozitol 0,1 g/l; kasein 1 g/l; v **Tab. 2-3** je uvedeno složení a objem zásobních roztoků pipetovaných pro přípravu 1 litru média.

**Tab. 2-3: Složení zásobních roztoků kultivačního média MS**

zásobní roztok	složka	zásobní roztok (500 ml) [g]	1 l média [ml]
A	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	16,50	50
	KNO <sub>3</sub>	19,00	
	CaCl <sub>2</sub>	3,31	
	MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	3,70	
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,70	
B	KI	0,08	5
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,62	
	MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O (H <sub>2</sub> O)	2,23 (1,69)	
	ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,86	
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,03	
	CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0,00	
	CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O (bezv.)	0,0025 (0,0013)	
C	FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	2,78	5
	Na <sub>2</sub> EDTA·2H <sub>2</sub> O	3,73	
D	inozitol	10,00	5
	kys. nikotínová	0,05	
	pyridoxin - HCl	0,05	
	thiamin - HCl	0,05	
	glycin	0,20	

Vzhledem k častým kontaminacím zásobních roztoků makroprvků, mikroprvků, vitamínů a chelátů železa byly roztoky rozpipetovány po malých množstvích do sběrných nádobek a skladovány v mrazícím boxu při  $-18^{\circ}\text{C}$ .

### 2.3.1.2 Příprava kultivačního média

Zásobní roztoky makroprvků (Lachema), mikroprvků (Lachema), chelátů železa (Lachema) a vitamínů (Sigma, kys. nikotinová – Serva) byly připraveny a pipetovány podle rozpisu v **Tab. 2-3**. Ostatní složky média: sacharóza (Lach-Ner), kasein (Sigma) a agar (Sigma) byly naváženy na laboratorních předvážkách (AD – EK – 200G), myo-inozitol (Sigma) a složky zásobních roztoků na analytických vahách (AND GR-200-EC).

Pro přípravu 1 l média byly všechny složky smíchány s destilovanou vodou do objemu cca 900 ml a za stálého míchání bylo upraveno pH na 5,7 několika kapkami 1M NaOH, resp. 1M  $\text{CH}_3\text{COOH}$ . K tomuto roztoku byl přisypán agar, který v něm byl rozpuštěn přivedením roztoku k varu v mikrovlnné troubě. Následně bylo médium doplněno destilovanou vodou v odměrném válci na 1l a rozlito po 150 ml do 250 ml Erlenmayerových baněk, baňky byly uzavřeny jednou vrstvou hliníkové fólie a následně sterilizovány v autoklávu (Chirana). Po sterilizaci bylo médium přelito v laminárním flow-boxu (Heraeus nebo Labox) po 150 ml do 1 l sterilních Erlenmayerových baněk. Postup jejich sterilizace je uveden v části „Sterilizace“.

## 2.3.2 Sterilizace nástrojů a materiálu

### 2.3.2.1 Sterilizace 1 l Erlenmayerových baněk

Sterilizace 1l Erlenmayerových baněk probíhala v horkovzdušném sterilizátoru (Binder), a to buď 3 h při teplotě  $150^{\circ}\text{C}$  nebo 2 h při teplotě  $160^{\circ}\text{C}$ . Baňky byly před vložením do horkovzdušného sterilizátoru uzavřeny dvojitým alobalem.

### 2.3.2.2 Sterilizace semen

Semena byla přesypána do mikrozkuhavek a zalita cca 1 ml 70% ethanolu na 30 sekund. Po slití ethanolu byl do mikrozkuhavek přidán cca 1 ml 15% SAVA (Biochemie s.r.o., Bohumín) a kapka detergentu (Pur). Po 15 minutách třepání ve

sterilizačním roztoku (třepačka IKA® KS 130) byla semena v laminárním flow-boxu propláchnuta v mikrozkuhavce sterilní vodou (3 – 5x do vymytí detergentu). Poté byla semena ihned vyseta, dále viz část „Kultivace rostlin“.

### 2.3.2.3 Sterilizace nástrojů

Sterilizace nástrojů probíhala dvojím způsobem, buď v horkovzdušném sterilizátoru při teplotě 150°C po dobu 3 h nebo v autoklávu. Během aseptické práce v laminárním flow-boxu byly nástroje sterilizovány ponořením do 96% ethanolu a následným opálením v plameni.

### 2.3.3 Výsev a kultivace rostlin

Sterilní semena byla vyseta v laminárním flow-boxu do 100 ml Erlenmayerových baněk na pevné MS médium (25 ml) s 3 % sacharózy. Do každé baňky bylo přeneseno přibližně 30 semen. Po vytvoření přízemní růžice (dělchy a 1 – 2 pravé listy) byly rostliny přesazeny vždy po jedné do sterilních 1l Erlenmayerových baněk na médium s požadovaným obsahem sacharózy.

Rostliny byly kultivovány v kultivační místnosti se stálou teplotou  $25\pm 1^\circ\text{C}$ , při fotoperiodě 16 hodin a ozáření  $120\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ .

První přesazování rostlin probíhalo stejně, jak je uvedeno v diplomové práci Martiny Smoloňové (2003), tedy v době, kdy byl prostor v baňce pro další růst limitující. Byl zjištěn počet vytvořených listů a ten byl určujícím faktorem pro další přesazování. Následující subkultivace byly vždy jen z bazálních nebo apikálních segmentů rostlin. Bazální segment představoval 2. – 4. nodální segment od báze (v závislosti na vzdálenosti mezi nody). Apikální segment představovala apikální část prýtu s prvním listem o délce nad 1 cm. Doba kultivace byla určena nástupem kvetení nebo záměrným ukončením experimentu.

### 2.3.4 Hodnocení rostlinného materiálu

#### 2.3.4.1 Stanovení počtu listů

V průběhu experimentů byly vždy v době přesazení počítány všechny listy nad 1 cm.

## 2.4 Zpracování dat

Základní výpočty (průměr, směrodatná odchylka apod.) a grafy byly provedeny v tabulkovém procesoru Microsoft Excel (směrodatná odchylka je počítaná podle vzorce uvedeného níže).

### Směrodatná odchylka

$$S. D. = \sqrt{\frac{\sum_{s=1}^m \sum_{i=1}^n (y_{is} - M)^2}{(n_y - 1)}}$$

$$M = \frac{\sum_{s=1}^m \sum_{i=1}^n y_{is}}{n_y}$$

Ke statistickému zhodnocení dat byl použit program NCSS 6.0. Data byla podrobena analýze rozptylu (ANOVA). Byly použity tyto srovnávací testy: Tukey–Kramerův test při normálním rozdělení dat, resp. Kruskal–Wallisův Z–test, pokud nebyla data rozložena normálně. Výsledky analýzy počtu listů resp. dnů do vykvetení, jsou uvedeny ve formě sloupcových grafů, stejně tak výsledky analýzy obsahu rozpustných nestrukturních sacharidů a hmotnosti sušiny kořenového systému. Jednotlivé sloupce představují průměrnou hodnotu sledovaného parametru. Úsečky nad sloupci odpovídají směrodatným odchylkám, odlišná písmena pak značí statisticky průkazný rozdíl uvedených hodnot.

### 3 Experimentální část

V této části jsou uvedeny výsledky hodnocení vybraných morfologických a fyziologických charakteristik tabáku *Nicotiana tabacum* L., cv. Samsun divokého genotypu a transformovaných linií A a C (transformace *cdc25* cDNA ze *Schizosaccharomyces pombe*) kultivovaných v podmínkách *in vivo* a *in vitro*. Experimentální část je rozdělena do dvou základních oddílů podle kultivačních podmínek.

#### 3.1 Experimenty v podmínkách *in vivo*

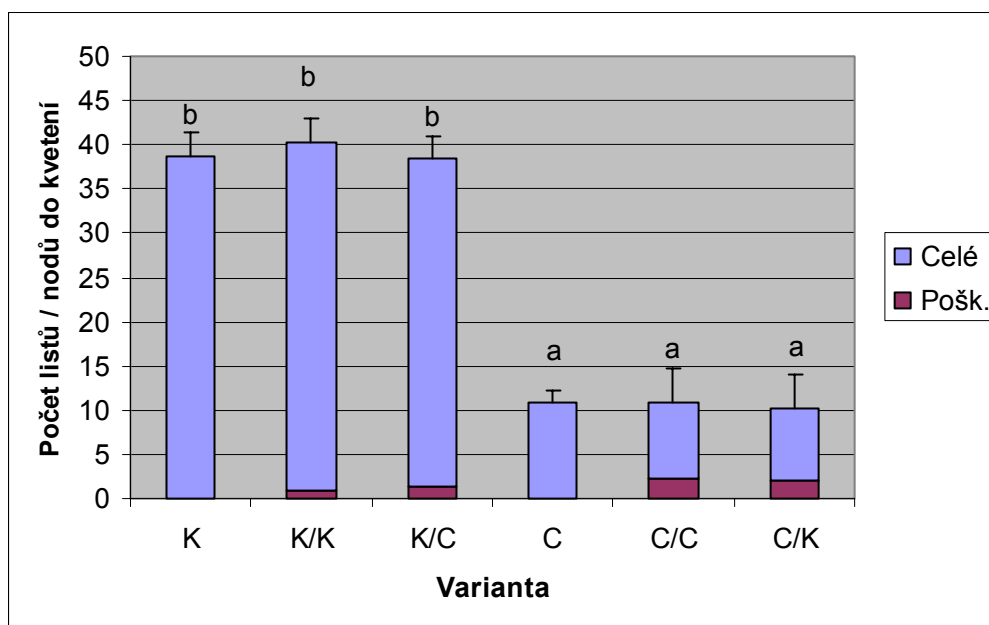
Jako vegetativní byly označeny ty rostliny, u kterých byla předpokládána vegetativní fáze vývoje na základě počtu vytvořených listů nad 10 cm (podle Gebhardt a McDaniel 1991).

##### 3.1.1 Roubovací experimenty

Roubovací experimenty navazují na práci M. Smoloňové (2003), která metodu roubování neutrálního tabáku v daných podmínkách zavedla. Provedené experimenty uvedené níže zahrnovaly nejen ověření některých orientačních výsledků získaných v její diplomové práci, ale také experimenty s další nezávisle transformovanou linií A a experimenty jiného uspořádání, které měly vést k detailnější charakterizaci vlivu jednotlivých částí rostlinného těla na přechod do generativní fáze. V této práci bylo zavedeno roubování rostlin divokého genotypu (dále kontrolní) a rostlin transformovaných linií A a C ve vegetativní fázi vývoje. Roubovací experimenty probíhaly ve dvou sezónách. Během první sezóny byly provedeny dva roubovací experimenty, a to na jejím začátku a na konci, viz **Graf 3-1, Graf 3-2, Graf 3-5 a Graf 3-6**. V obou těchto experimentech byly použity rostliny transformované linie C a rostliny kontrolní. Roubování v této sezóně probíhalo v následujícím uspořádání, roubov vždy představoval apikální segment prýtu, podnož vždy představovala bazální část rostliny s kořenovým systémem a s 1 – 2 dospělými listy v bazální části prýtu. Během druhé sezóny byly provedeny dva roubovací experimenty, a to na jejím začátku. Jeden probíhal ve stejném uspořádání jako v první sezóně, ale místo transformantu C byly roubovány rostliny transformantu A, viz **Graf 3-3 a Graf 3-7**, viz **Obr. 3-1**. V době

ukončení tohoto experimentu vykvetla pouze jedna rostlina u varianty, kdy roub i podnož pocházely z rostlin kontrolních, viz **Graf 3-3**, ostatní rostliny této varianty při ukončení experimentu ještě nedorostly do generativní fáze. Pro druhý roubovací experiment byly použity rostliny transformantu C a rostliny kontrolní, podnož zde představovala prýt bez vrcholové části, na podnoži byly ponechány listy o délce nad 10 cm, viz **Graf 3-4** a **Graf 3-8**.

U všech rostlin byl sledován počet listů (s délkou nad 10cm) do vytvoření květních pupenů a doba od výsevu do vytvoření květních pupenů. Neroubované kontrolní rostliny vytvářely v průměru 39,3 listů, neroubované rostliny transformantu A 11,8 listů a neroubované rostliny transformantu C 12,9 listů. Roubování probíhalo v různých kombinacích: a) kombinace, kdy roub i podnož byly odebrány z odlišného typu rostlin, nebo b) kombinace, kdy roub i podnož pocházely ze stejného typu rostlin. Ve všech roubovacích experimentech bylo pozorováno, že všechny roubované rostliny vytvořily stejný nebo nižší počet listů do vytvoření květních pupenů jako neroubovaná rostlina stejné varianty jako byl roub. Zjištěné rozdíly byly statisticky průkazné. Při roubování docházelo k poškození některých listů roubu, listy byly buď deformované nebo se nevytvořily vůbec, vytvářely se pouze jejich úžlabní pupeny. Tyto listy byly také zahrnuty do celkového počtu listů, v grafech je počet těchto listů barevně odlišen, viz **Graf 3-1** až **Graf 3-4**. Dále také v druhé sezóně došlo u jednoho z roubovacích experimentů k výraznějšímu výskytu poškozených listů, a to jak u transformantu C, tak u rostlin kontrolních, viz **Graf 3-4**. Doba od výsevu do vytvoření květních pupenů byla u všech roubovaných rostlin podobná nebo delší než u rostlin neroubovaných stejné varianty jako byl roub, viz **Graf 3-5** až **Graf 3-8**.



**Graf 3-1: Průměrný počet listů / nodů do vytvoření květních pupenů – začátek 1. sezóny (n = 4 - 12 )**

K: kontrola, C: transformant C

roub/podnož: K/K, K/C, C/C, C/K

Počet dospělých listů v době před zahájením roubování:

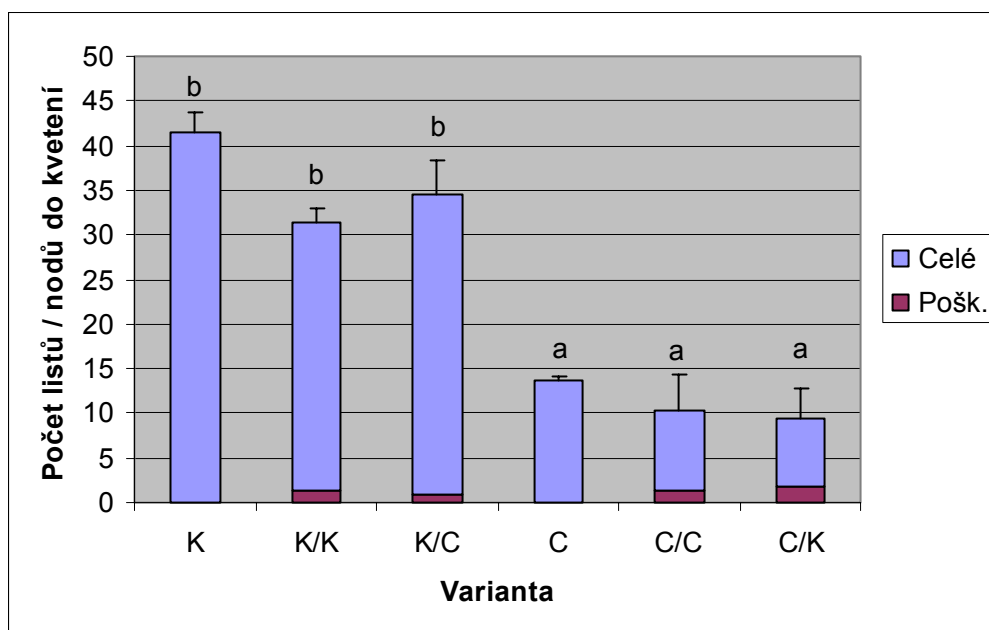
Kontrolní rostliny: 5 – 6 listů

Transformant C: 2 – 3 listy

Podnož: bazální část rostliny s kořenovým systémem a s 1 – 2 dospělými listy v bazální části prýtu

Směrodatná odchylka: celkový počet vytvořených listů včetně poškozených

Odlišná písmena nad sloupci: statisticky průkazný rozdíl mezi variantami v celkovém počtu vytvořených listů včetně poškozených



**Graf 3-2: Průměrný počet listů / nodů do vytvoření květních pupenů – konec 1. sezóny (n = 3 - 10)**

K: kontrola, C: transformant C

roub/podnož: K/K, K/C, C/C, C/K

Počet dospělých listů v době před zahájením roubování:

Kontrolní rostliny: 4 – 5 listů

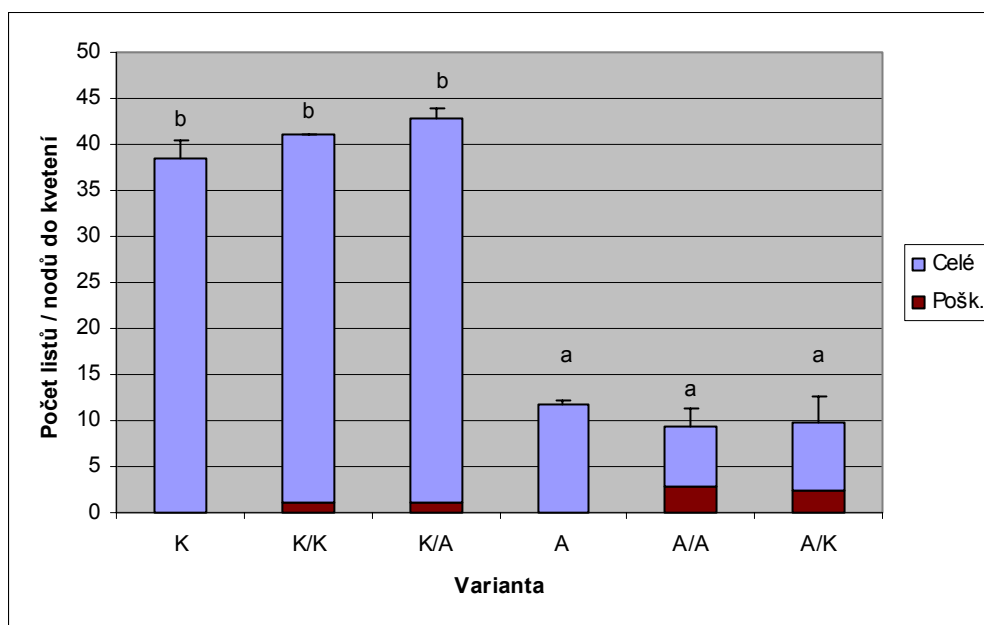
Transformant C: 3 – 4 listy

Podnož: bazální část rostliny s kořenovým systémem a s 1 – 2 dospělými listy v bazální části prýtu

Směrodatná odchylka: celkový počet vytvořených listů včetně poškozených

Odlišná písmena nad sloupci: statisticky průkazný rozdíl mezi variantami v celkovém počtu vytvořených listů včetně poškozených





**Graf 3-3: Průměrný počet listů / nodů do vytvoření květních pupenů – začátek 2. sezóny (n = 4 – 8, K/K pouze jedna rostlina)**

K: kontrola, A: transformant A

roub/podnož: K/K, K/A, A/A, A/K

Počet dospělých listů v době před zahájením roubování:

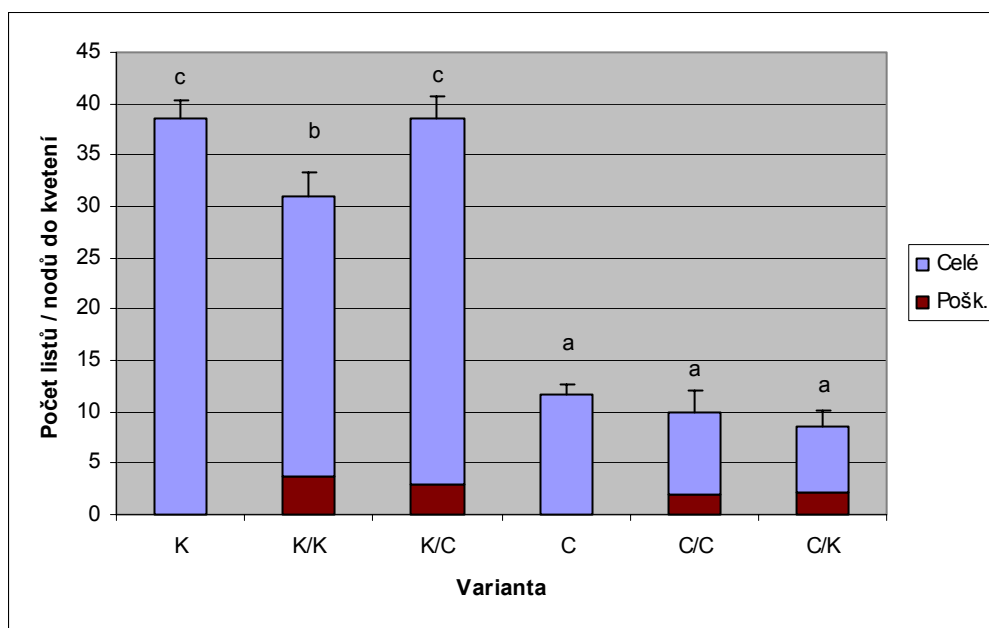
Kontrolní rostliny: 5 – 7 listů

Transformant A: 3 – 5 listů

Podnož: bazální část rostliny s kořenovým systémem a s 1 – 2 dospělými listy v bazální části prýtu

Směrodatná odchylka: celkový počet vytvořených listů včetně poškozených

Odlišná písmena nad sloupci: statisticky průkazný rozdíl mezi variantami v celkovém počtu vytvořených listů včetně poškozených



**Graf 3-4: Průměrný počet listů / nodů do vytvoření květních pupenů – začátek 2. sezóny (n = 2 - 7)**

K: kontrola, C: transformant C

roub/podnož: K/K, K/C, C/C, C/K

Počet dospělých listů v době před zahájením roubování:

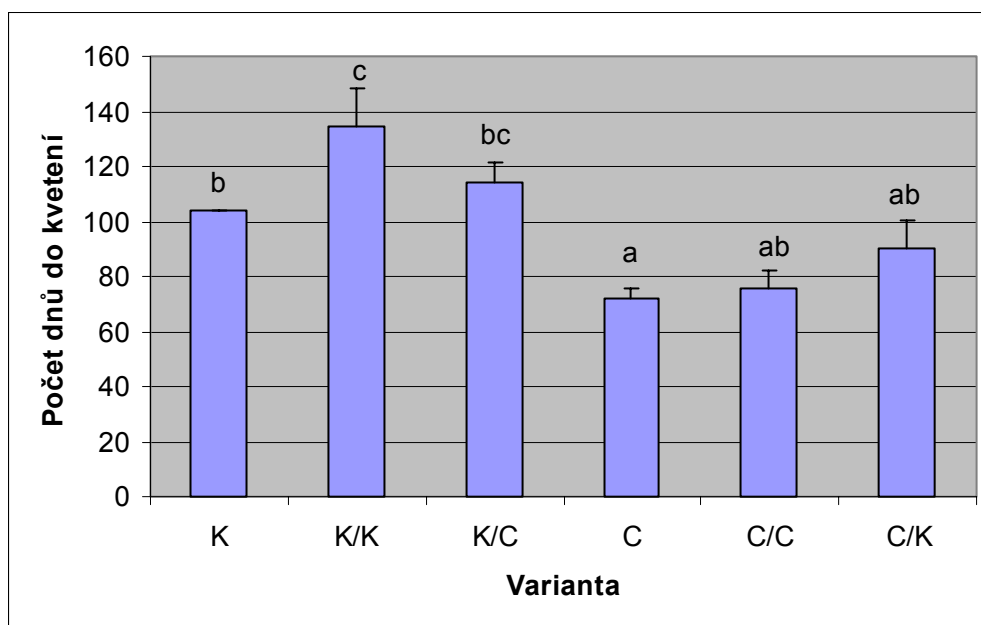
Kontrolní rostliny: 5 – 7 listů

Transformant C: 3 – 5 listů

Podnož: prýt bez vrcholové části, na podnoži byly ponechány listy o délce nad 10 cm

Směrodatná odchylka: celkový počet vytvořených listů včetně poškozených

Odlišná písmena nad sloupci: statisticky průkazný rozdíl mezi variantami v celkovém počtu vytvořených listů včetně poškozených



**Graf 3-5: Průměrný počet dnů do vytvoření květních pupenů – začátek 1. sezóny (n = 4 - 12)**

K: kontrola, C: transformant C

roub/podnož: K/K, K/C, C/C, C/K

Počet dospělých listů v době před zahájením roubování:

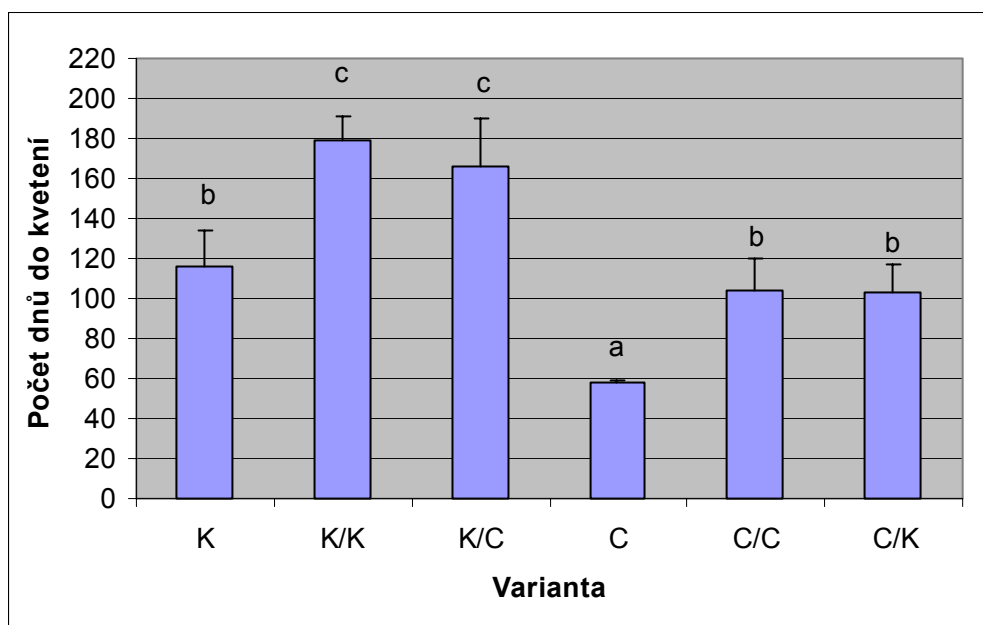
Kontrolní rostliny: 5 – 6 listů

Transformant C: 2 – 3 listy

Podnož: bazální část rostliny s kořenovým systémem a s 1 – 2 dospělými listy v bazální části prýtu

Směrodatná odchylka: celkový počet dnů do vytvoření květních pupenů

Odlišná písmena nad sloupci: statisticky průkazný rozdíl mezi variantami



**Graf 3-6: Průměrný počet dnů do vytvoření květních pupenů – konec 1. sezóny (n = 3 - 10)**

K: kontrola, C: transformant C

roub/podnož: K/K, K/C, C/C, C/K

Počet dospělých listů v době před zahájením roubování:

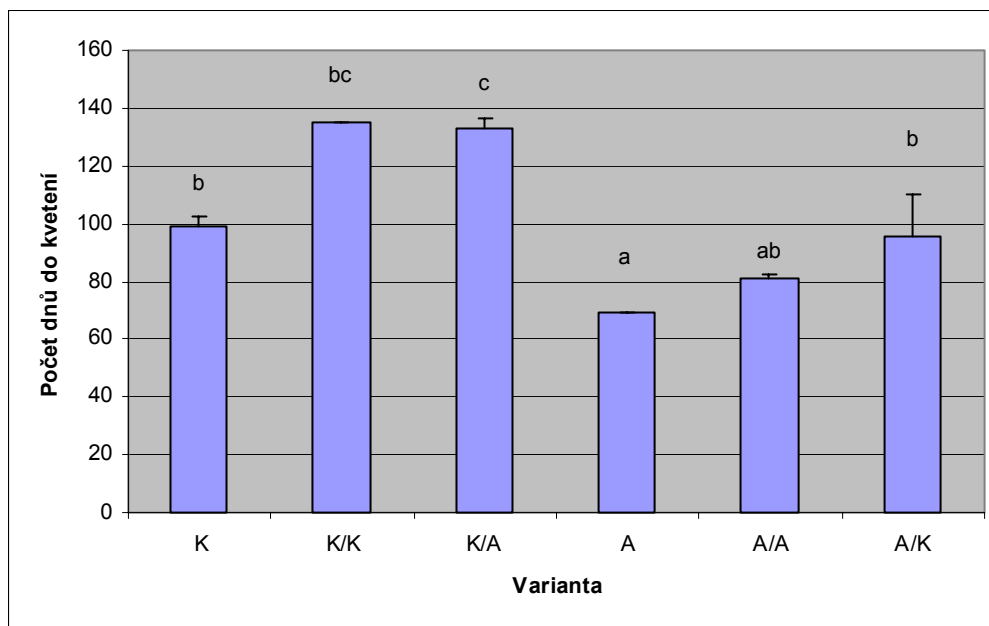
Kontrolní rostliny: 4 – 5 listů

Transformant C: 3 – 4 listy

Podnož: bazální část rostliny s kořenovým systémem a s 1 – 2 dospělými listy v bazální části prýtu

Směrodatná odchylka: celkový počet dnů do vytvoření květních pupenů

Odlíšná písmena nad sloupci: statisticky průkazný rozdíl mezi variantami



**Graf 3-7: Průměrný počet dnů do vytvoření květních pupenů – začátek 2. sezóny (n = 4 – 8, K/K pouze jedna rostlina)**

K: kontrola, A: transformant A

roub/podnož: K/K, K/A, A/A, A/K

Počet dospělých listů v době před zahájením roubování:

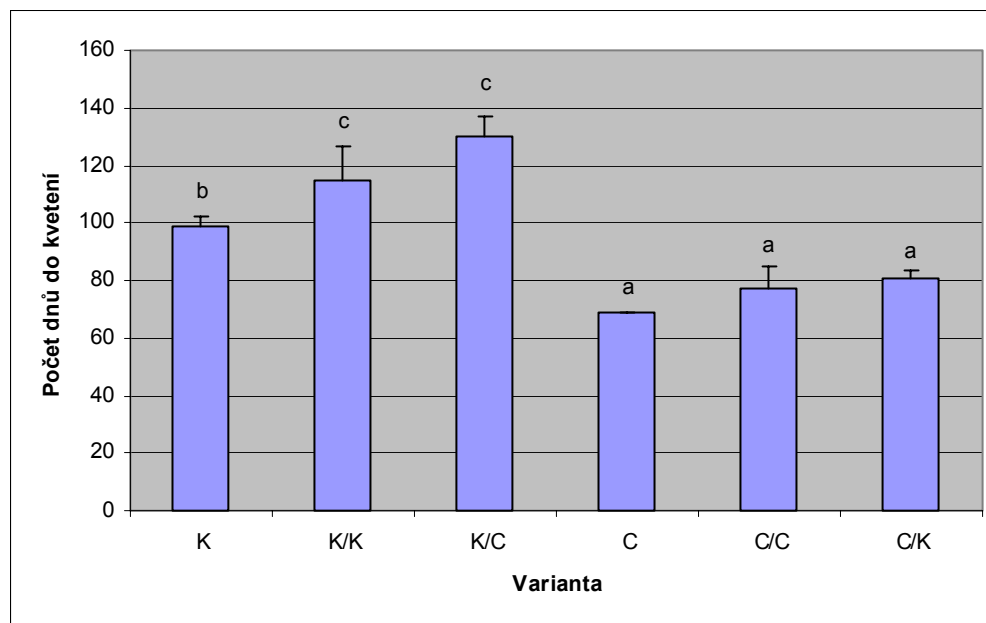
Kontrolní rostliny: 5 – 7 listů

Transformant A: 3 - 5 listů

Podnož: bazální část rostliny s kořenovým systémem a s 1 – 2 dospělými listy v bazální části prýtu

Směrodatná odchylka: celkový počet dnů do vytvoření květních pupenů

Odlišná písmena nad sloupci: statisticky průkazný rozdíl mezi variantami



**Graf 3-8: Průměrný počet dnů do vytvoření květních pupenů – začátek 2. sezóny (n = 2 - 7)**

K: kontrola, C: transformant C

roub/podnož: K/K, K/C, C/C, C/K

Počet dospělých listů v době před zahájením roubování:

Kontrolní rostliny: 5 – 7 listů

Transformant A: 3 - 5 listů

Podnož: prýt bez vrcholové části, na podnoži byly ponechány listy o délce nad 10 cm

Směrodatná odchylka: celkový počet dnů do vytvoření květních pupenů

Odlíšná písmena nad sloupci: statisticky průkazný rozdíl mezi variantami



**Obr. 3-1: Vzhled roubovaných rostlin při nástupu kvetení**

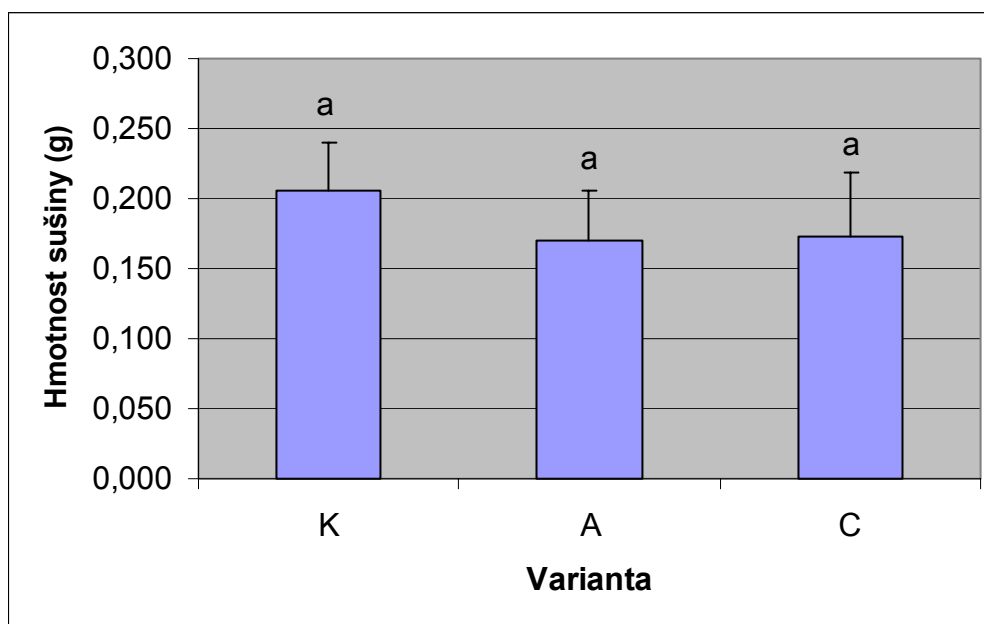
Podnož: bazální část rostliny s kořenovým systémem a s 1 – 2 dospělými listy

**A)** podnoží byl transformant A a roubem rostlina kontrolní (K/A)

**B)** podnoží byla rostlina kontrolní a roubem transformant A (A/K)

### 3.1.2 Stanovení sušiny kořenového systému

Odběr kořenového systému byl proveden jednou, a to v plné sezóně. Byl odebrán kořenový systém u rostlin kontrolních a transformovaných linií A a C ve vegetativní fázi vývoje, kdy měly všechny rostliny přibližně stejný počet vytvořených listů. Hmotnost sušiny kořenového systému obou transformantů se průkazně nelišila ve srovnání s hmotností sušiny kořenového systému rostlin kontrolních. **Graf 3-9** však ukazuje trend snížení hmotnosti sušiny kořenového systému rostlin transformovaných linií A a C oproti hmotnosti sušiny kořenového systému rostlin kontrolních.



**Graf 3-9: Hmotnost sušiny kořenového systému (n = 10)**

Počet dospělých listů u všech variant v době odběru kořenového systému:

K (kontrolní rostliny), A (transformant A), C (transformant C) : 3 – 5 listů

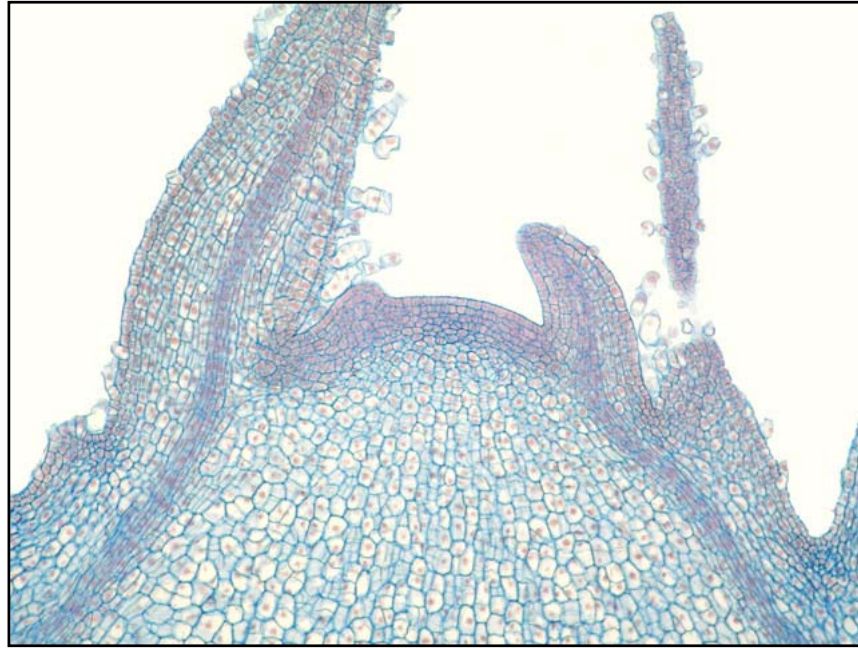
Písmena nad sloupci: statisticky průkazný rozdíl mezi variantami



### 3.1.3 Hodnocení stavby apikálního meristému prýtu ve vegetativní fázi vývoje

Pro následující experiment byly použity rostliny v rané fázi vývoje, a to v době, kdy na základě znalostí z literatury byly rostliny považovány za vegetativní (viz výše kap. 3.1., Gebhardt a McDaniel 1991).

Hodnoceny byly apikální meristémy prýtu (SAM) u rostlin kontrolních a transformovaných linií A a C ve vegetativní fázi vývoje, od každé varianty tři vzorky. Variabilita rostlinného materiálu byla v tomto experimentu nízká, všechny rostliny se lišily v počtu vytvořených dospělých listů jen mírně ( $\pm 1$ ), viz **Obr 3-8**. Z každého vzorku bylo připraveno a nařezáno cca 14 podélných řezů, ze kterých byly vybrány řezy v mediánní rovině vzrostného vrcholu. U všech transformantů byla pozorována změna ve struktuře SAM ve srovnání s SAM kontrolních rostlin. U transgenních linií A i C je ve struktuře SAM obsaženo více meristematických buněk než u rostlin kontrolních, více buněk je také v okolních pletivech. SAM transformantů nebyl vyklenut jako SAM kontrolních rostlin, celý vzrostný vrchol u obou transgenních linií byl celkově protáhlejší než vzrostný vrchol rostlin kontrolních. **Obr. 3-2** až **Obr. 3-7** prezentují charakteristické změny SAM transformantů A a C ve srovnání s SAM kontrolních rostlin, vždy dvě mikrofotografie od každé varianty.



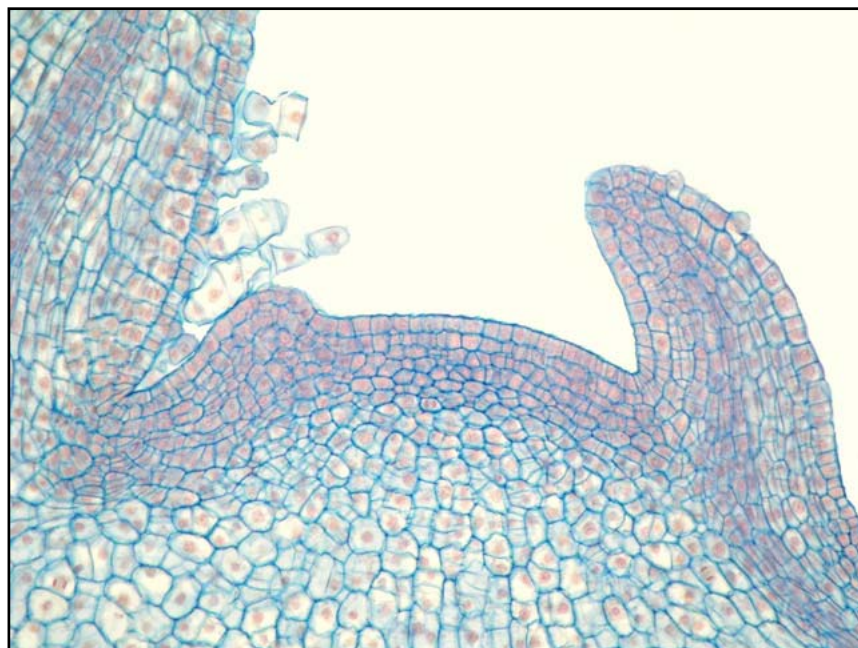
**Obr.3-2: Mikrofotografie podélného řezu vzrostným vrcholem kontrolní rostliny**

(celkový pohled, zvětšeno 100x)

Počet dospělých listů v době odběru vzrostného vrcholu: 2 - 3 listy

Tloušťka řezu: 12  $\mu\text{m}$

Barvení: alciánová modř + pravá jádrová červeň



**Obr. 3-3: Mikrofotografie podélného řezu vzrostným vrcholem kontrolní rostliny**

(detail, zvětšeno 200x)

Počet dospělých listů v době odběru vzrostného vrcholu: 2 - 3 listy

Tloušťka řezu: 12  $\mu\text{m}$

Barvení: alciánová modř + pravá jádrová červeň



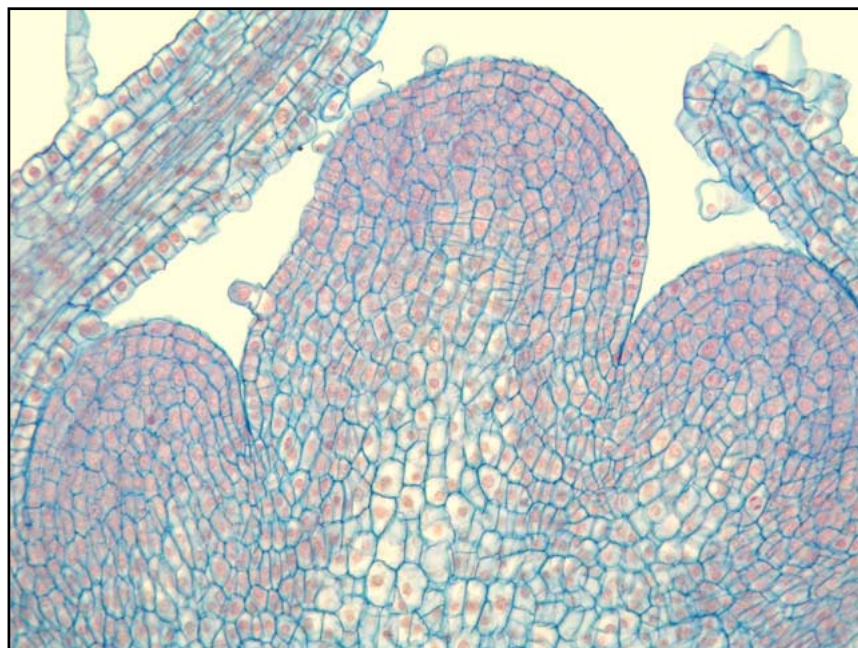
**Obr. 3-4: Mikrofotografie podélného řezu vzrostným vrcholem u transformantu A**

(celkový pohled, zvětšeno 100x)

Počet dospělých listů v době odběru vzrostného vrcholu: 2 - 3 listy

Tloušťka řezu: 12  $\mu\text{m}$

Barvení: alciánová modř + pravá jádrová červeně



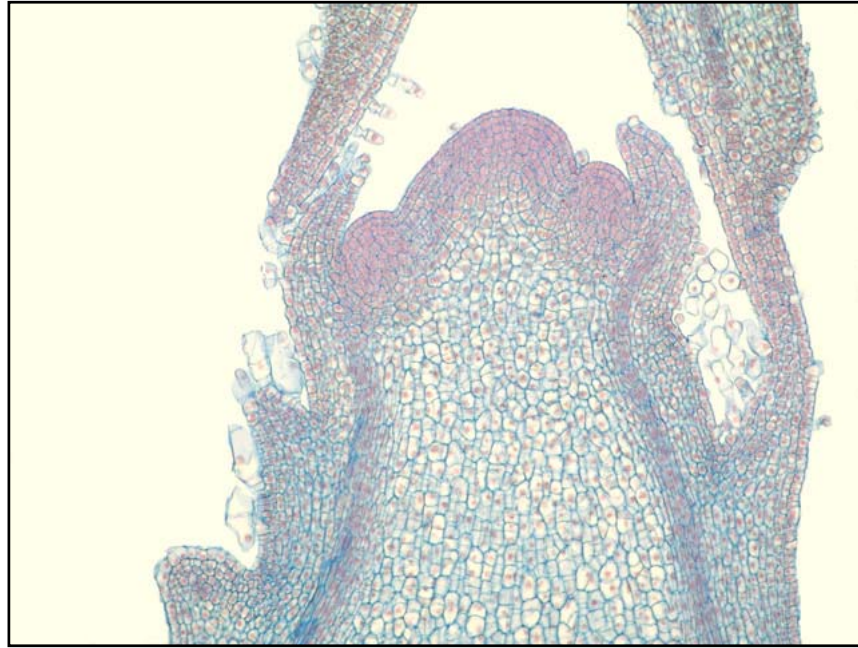
**Obr. 3-5: Mikrofotografie podélného řezu vzrostným vrcholem u transformantu A**

(detail, zvětšeno 200x)

Počet dospělých listů v době odběru vzrostného vrcholu: 2 - 3 listy

Tloušťka řezu: 12  $\mu\text{m}$

Barvení: alciánová modř + pravá jádrová červeně



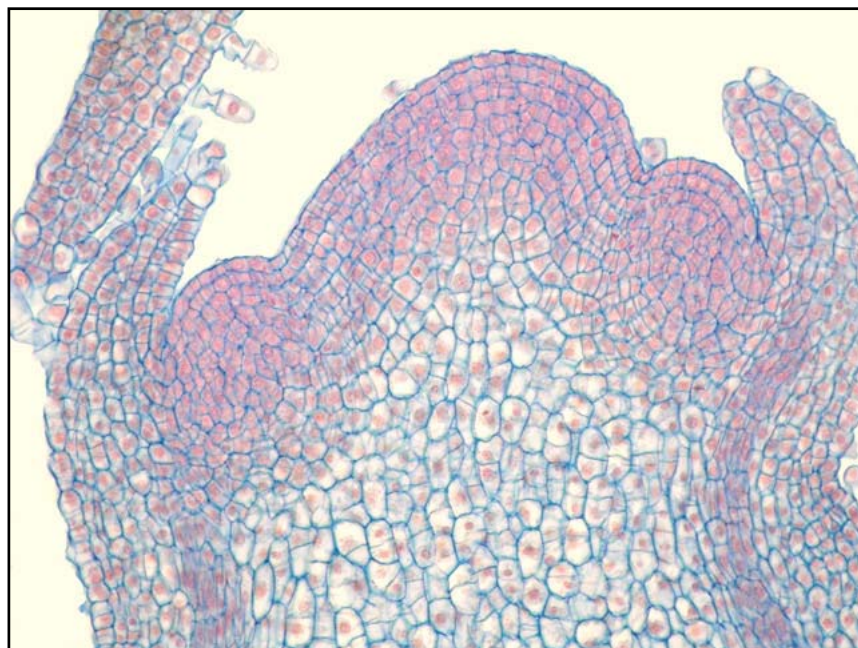
**Obr. 3-6: Mikrofotografie podélného řezu vzrostným vrcholem u transformantu C**

(celkový pohled, zvětšeno 100x)

Počet dospělých listů v době odběru vzrostného vrcholu: 2 - 3 listy

Tloušťka řezu: 12  $\mu\text{m}$

Barvení: alciánová modř + pravá jádrová červeň



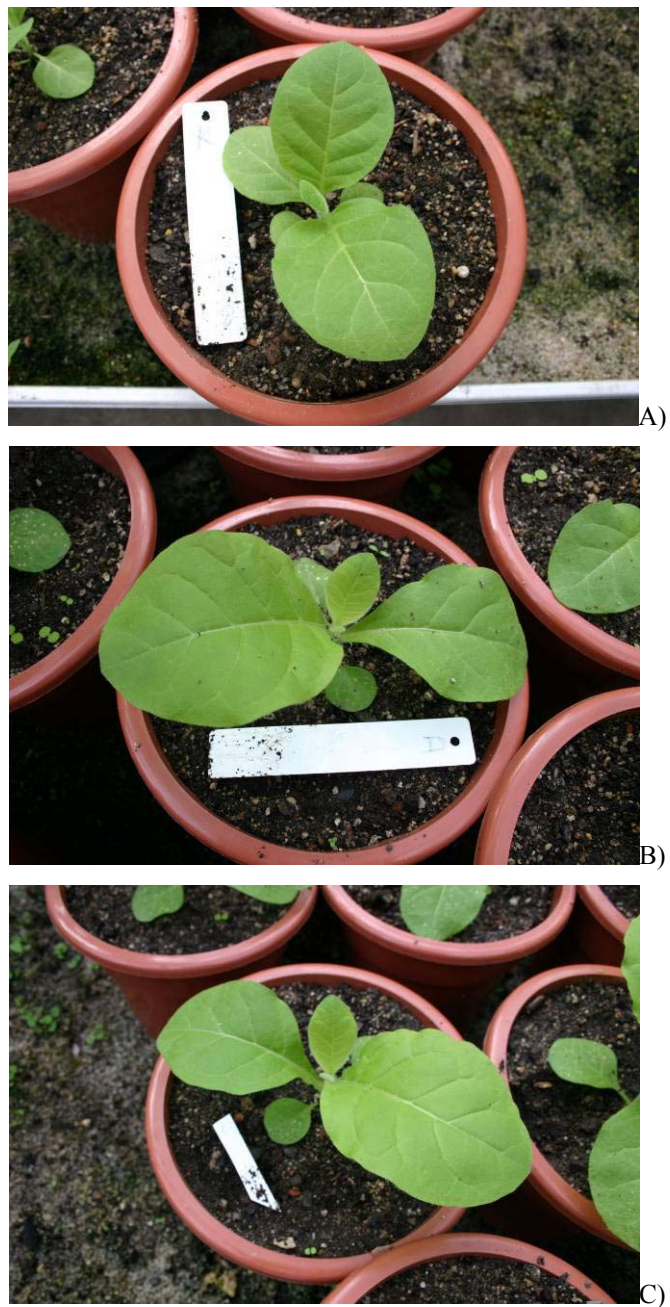
**Obr. 3-7: Mikrofotografie podélného řezu vzrostným vrcholem u transformantu C**

(detail, zvětšeno 200x)

Počet dospělých listů v době odběru vzrostného vrcholu: 2 - 3 listy

Tloušťka řezu: 12  $\mu\text{m}$

Barvení: alciánová modř + pravá jádrová červeň



**Obr. 3-8: Vzhled kontrolních rostlin při odběru vzrostných vrcholů pro přípravu anatomických preparátů**

A) kontrolní rostliny K, B) transformant A, C) transformant C

### 3.1.4 Stanovení hladiny rozpustných nestrukturních sacharidů

Byla stanovena hladina rozpustných nestrukturních sacharidů u rostlin kontrolních a transformovaných linií A a C ve vegetativní fázi vývoje, a to v listech, kořenech, v exudátech z dekapitovaných rostlin a z listů.

#### Obsah sacharidů v listech

Odběr plně vyvinutých listů byl proveden jednou, a to v plné sezóně. Rostliny všech variant se v počtu vytvořených dospělých listů lišily jen mírně ( $\pm 1$  list). Celkový obsah sacharidů v sušině listů se mezi variantami průkazně nelišil. U všech rostlin byla nejvíce zastoupena sacharóza. U obou transformantů byla pozorována nižší hladina inozitolu a mírně vyšší obsah glukózy a fruktózy než u rostlin kontrolních, více glukózy a méně fruktózy u transformantu A, u transformantu C méně glukózy a více fruktózy, viz **Graf 3-10**.

#### Obsah sacharidů v kořenech

Odběr kořenového systému byl proveden jednou, a to v době odběru listů na analýzu sacharidů. Rostliny všech variant se v počtu vytvořených dospělých listů lišily jen mírně ( $\pm 1$  list). Celkový obsah sacharidů v sušině kořenů byl stejný (transformant A) nebo průkazně nižší (transformant C) ve srovnání s kontrolními rostlinami. U všech rostlin byla nejvíce zastoupena sacharóza, její hladina byla u transformantu C mírně nižší, nižší byly také hladiny glukózy a fruktózy než u transformantu A a rostlin kontrolních. U transformantu A byla hladina fruktózy mírně vyšší než u rostlin kontrolních. Hladina inozitolu byla u všech rostlin na hranici detekovatelnosti, viz **Graf 3-11**.

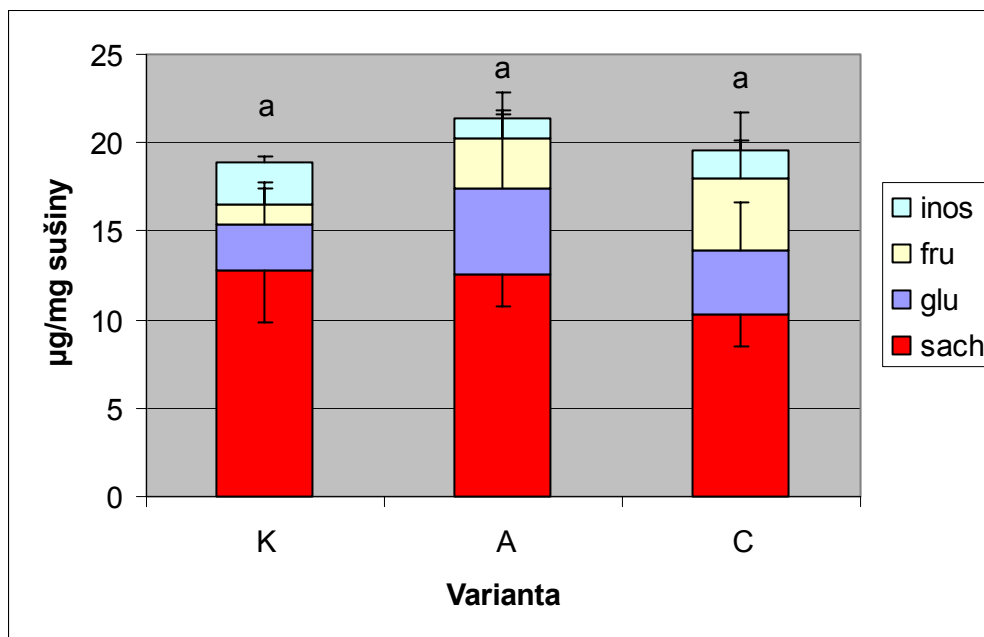
#### Obsah sacharidů v exudátu z dekapitovaných rostlin

Odběr exudátu z dekapitovaných rostlin byl proveden ve čtyřech nezávislých experimentech průběžně během dvou sezón, vždy dva v každé sezóně, viz **Graf 3-12**, **Graf 3-13**, **Graf 3-14**, **Graf 3-15**. Rostliny všech variant se ve všech experimentech lišily v počtu vytvořených dospělých listů jen mírně ( $\pm 1$  list). Celkový obsah sacharidů transportovaných do vzrostného vrcholu byl u rostlin transformovaných linií ve všech experimentech stejný nebo nižší ve srovnání s rostlinami kontrolními. V obou letech byl rozdíl mezi celkovým obsahem sacharidů v exudátu u transformantů A i C oproti kontrolním rostlinám výraznější v plné sezóně, viz **Graf 3-13** a **Graf 3-15**, statisticky průkazný rozdíl mezi kontrolou a transformantami A a C je patrný v experimentu

provedeném v plné (1.) sezóně (**Graf 3-13**). Dále byl celkový obsah sacharidů v první sezóně v obou experimentech vyšší než celkový obsah sacharidů obou experimentů 2. sezóny. U všech rostlin byla v exudátech nejvíce zastoupena sacharóza, její hladina byla u obou transformantů stejná nebo nižší než hladina u rostlin kontrolních. Hladina glukózy a fruktózy se mezi variantami výrazně nelišila. Byla pozorována velká variabilita v hladině jednotlivých sacharidů, především sacharózy, v rámci každé varianty.

#### Obsah sacharidů v exudátu z listů

Odběr exudátu z listů byl proveden ve čtyřech nezávislých experimentech průběžně během dvou sezón (jeden z odběrů je v současnosti zpracováván), vždy dva v každé sezóně, viz **Graf 3-16**, **Graf 3-17**, **Graf 3-18**. Rostliny se mezi experimenty lišily v počtu vytvořených dospělých listů jen mírně ( $\pm 1$  list). Celkový obsah sacharidů exportovaných z listů byl u rostlin transformovaných linií ve všech experimentech nižší nebo stejný ve srovnání s rostlinami kontrolními. Statisticky průkazně nižší celkový obsah sacharidů v exudátu byl u transformovaných linií ve srovnání s kontrolními rostlinami na začátku 1. sezóny, viz **Graf 3-16**. Dále byl celkový obsah sacharidů během celé 1. sezóny nižší (oba experimenty) než na začátku 2. sezóny. V exudátech všech rostlin byla nejvíce zastoupena sacharóza, její hladina byla u obou transformantů stejná nebo nižší než hladina u rostlin kontrolních. Hladina glukózy a fruktózy se mezi variantami výrazně nelišila. Byla pozorována velká variabilita v hladině jednotlivých sacharidů v rámci každé varianty.



**Graf 3-10: Hladina rozpustných nestruturních sacharidů v listech – plná sezóna (n = 5)**

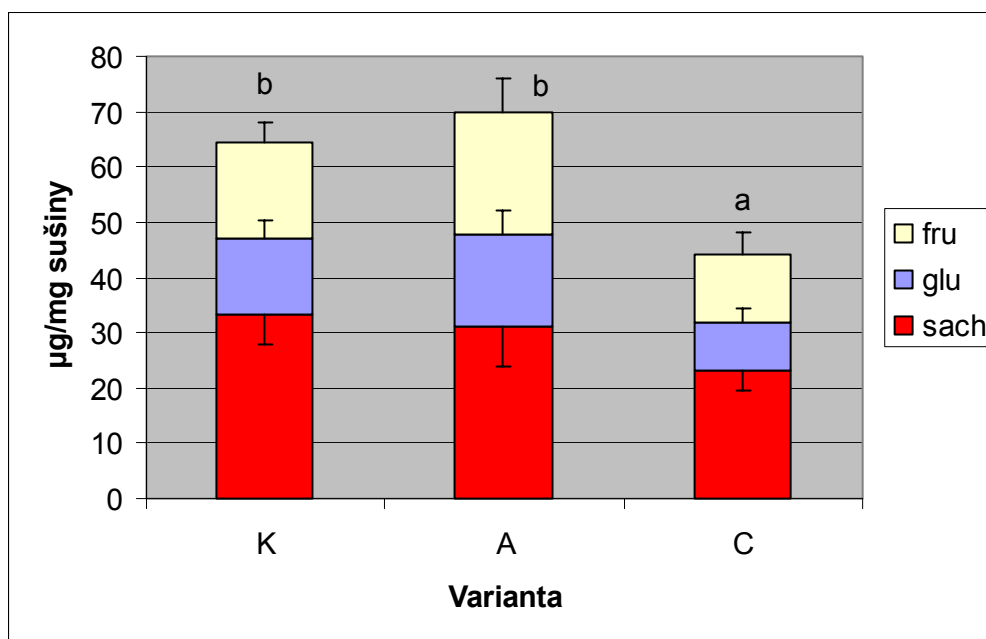
Počet dospělých listů na začátku experimentu:

K (kontrolní rostliny), A (transformant A), C (transformant C) : 3 – 4 listy

Směrodatná odchylka: stanovena pro každý typ sacharidu zvlášť

Písmena nad sloupci: statisticky průkazný rozdíl celkového obsahu sacharidů mezi variantami





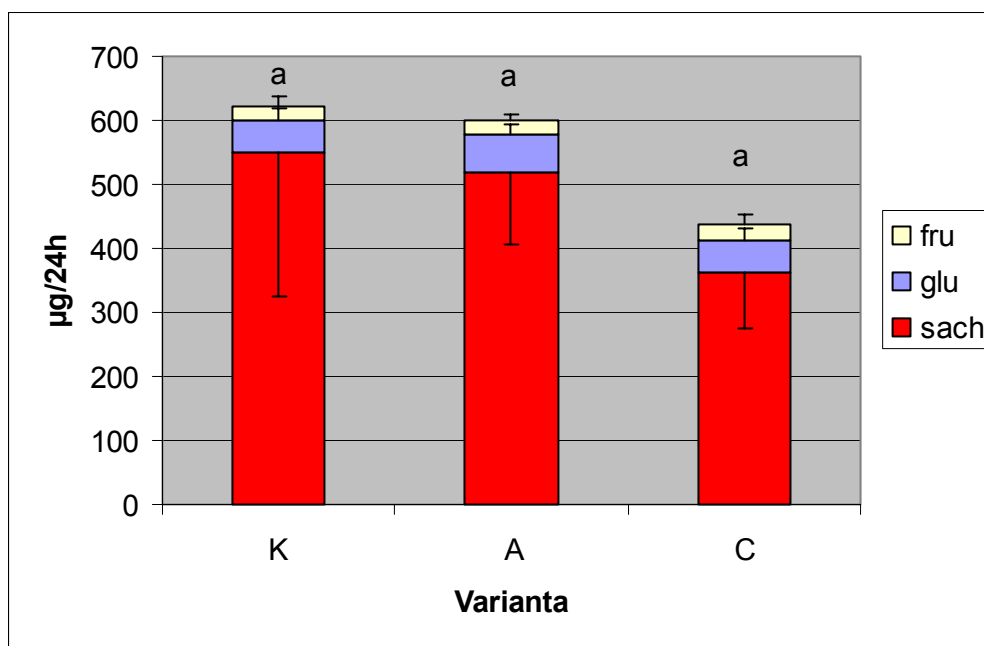
**Graf 3-11: Hladina rozpustných nestrukturních sacharidů v kořenech – plná sezóna (n = 5)**

Počet dospělých listů na začátku experimentu:

K (kontrolní rostliny), A (transformant A), C (transformant C) : 3 – 4 listy

Směrodatná odchylka: stanovena pro každý typ sacharidu zvlášť

Písmena nad sloupci: statisticky průkazný rozdíl celkového obsahu sacharidů mezi variantami



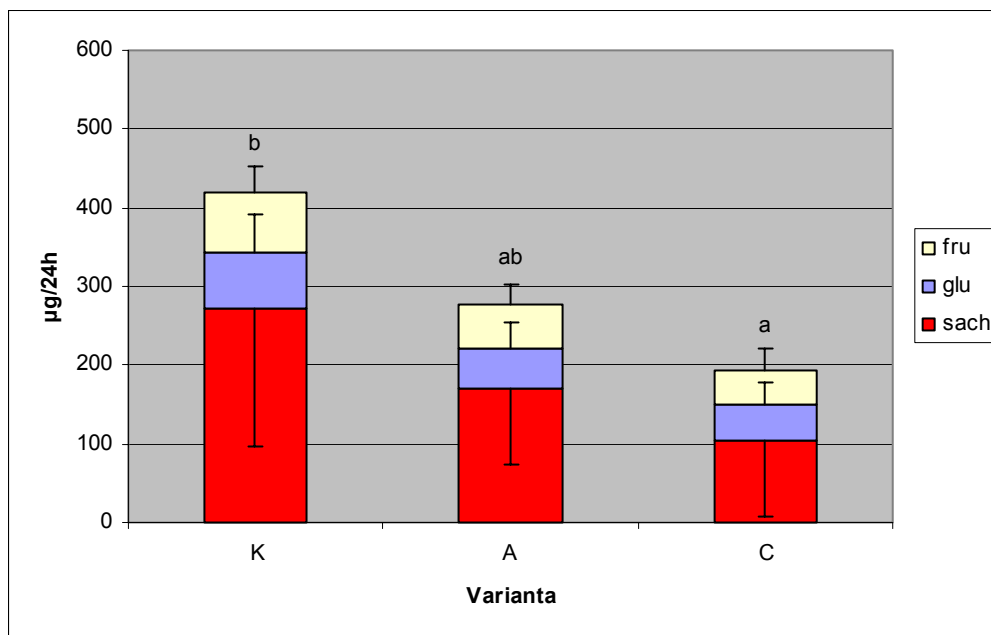
**Graf 3-12: Hladina rozpustných nestrukturních sacharidů v exudátu z dekapitovaných rostlin –začátek 1. sezóny (n = 8)**

Počet dospělých listů na začátku experimentu:

K (kontrolní rostliny), A (transformant A), C (transformant C) : 2 – 3 listy

Směrodatná odchylka: stanovena pro každý typ sacharidu zvlášť

Písmena nad sloupci: statisticky průkazný rozdíl celkového obsahu sacharidů mezi variantami



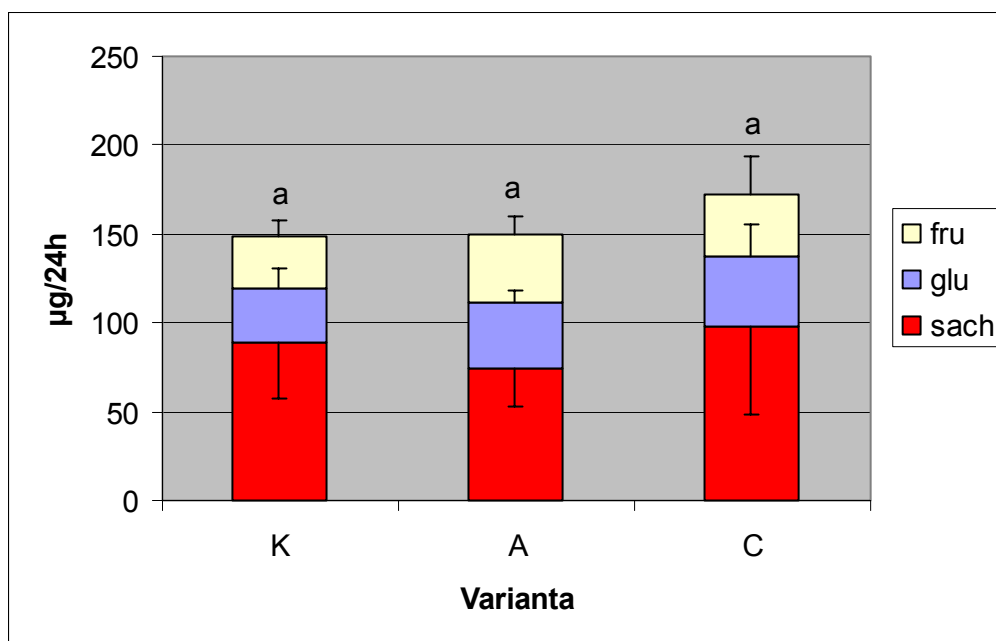
**Graf 3-13: Hladina rozpustných nestrukturních sacharidů v exudátu z dekapitovaných rostlin – plná 1. sezóna (n = 4 – 8)**

Počet dospělých listů na začátku experimentu:

K (kontrolní rostliny), A (transformant A), C (transformant C) : 2 – 3 listy

Směrodatná odchylka: stanovena pro každý typ sacharidu zvlášť

Písmena nad sloupci: statisticky průkazný rozdíl celkového obsahu sacharidů mezi variantami



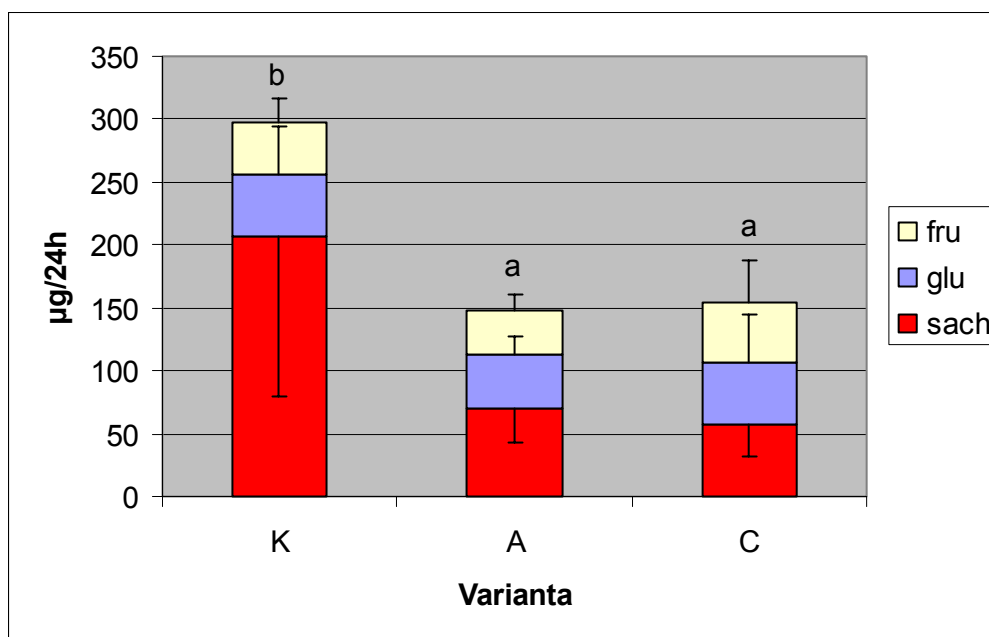
**Graf 3-14: Hladina rozpustných nestrukturních sacharidů v exudátu z dekapitovaných rostlin – začátek 2. sezóny (n = 8)**

Počet dospělých listů na začátku experimentu:

K (kontrolní rostliny), A (transformant A), C (transformant C) : 2 – 3 listy

Směrodatná odchylka: stanovena pro každý typ sacharidu zvlášť

Písmena nad sloupci: statisticky průkazný rozdíl celkového obsahu sacharidů mezi variantami



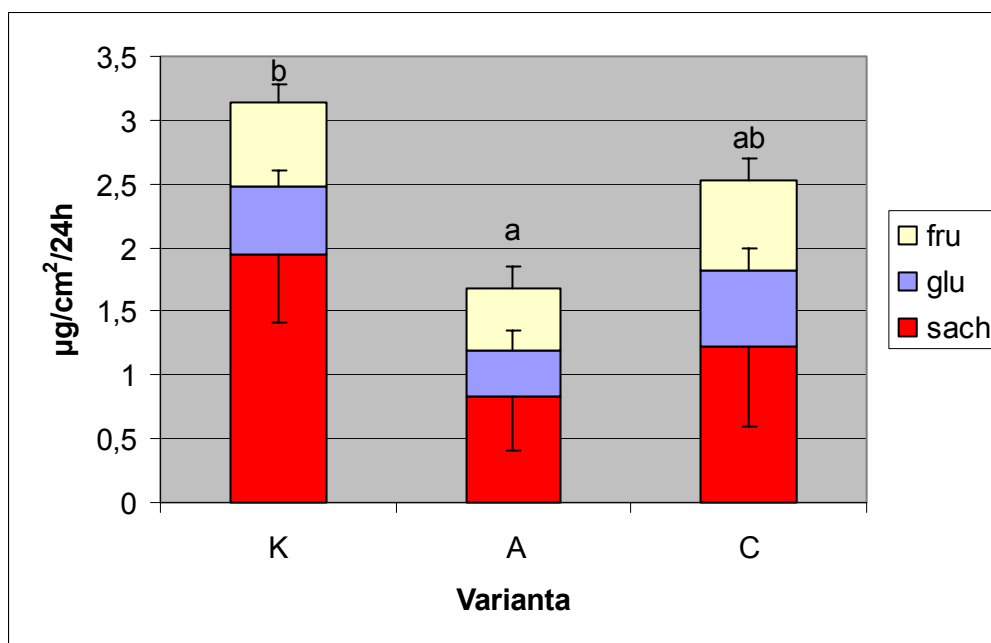
**Graf 3-15: Hladina rozpustných nestrukturních sacharidů v exudátu z dekapitovaných rostlin – plná 2. sezóna ( n = 7 – 8)**

Počet dospělých listů na začátku experimentu:

K (kontrolní rostliny), A (transformant A), C (transformant C) : 2 – 3 listy

Směrodatná odchylka: stanovena pro každý typ sacharidu zvlášť

Písmena nad sloupci: statisticky průkazný rozdíl celkového obsahu sacharidů mezi variantami



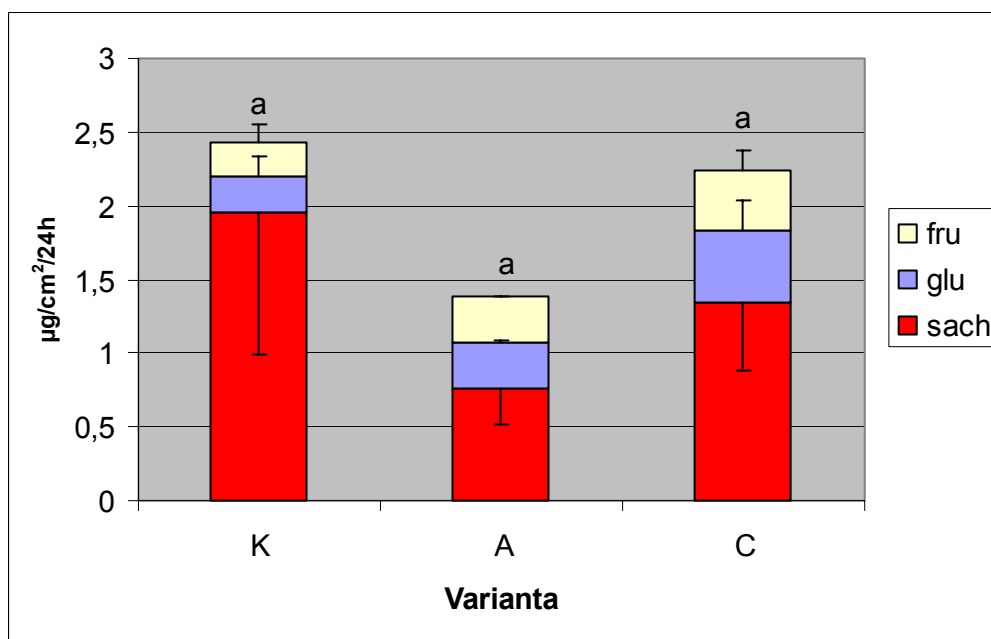
**Graf 3-16: Hladina rozpustných nestruturních sacharidů v exudátu z listů – plná 1. sezóna (n = 6 – 8)**

Počet dospělých listů na začátku experimentu:

K (kontrolní rostliny), A (transformant A), C (transformant C) : 2 – 3 listy

Směrodatná odchylka: stanovena pro každý typ sacharidu zvlášť

Písmena nad sloupci: statisticky průkazný rozdíl celkového obsahu sacharidů mezi variantami



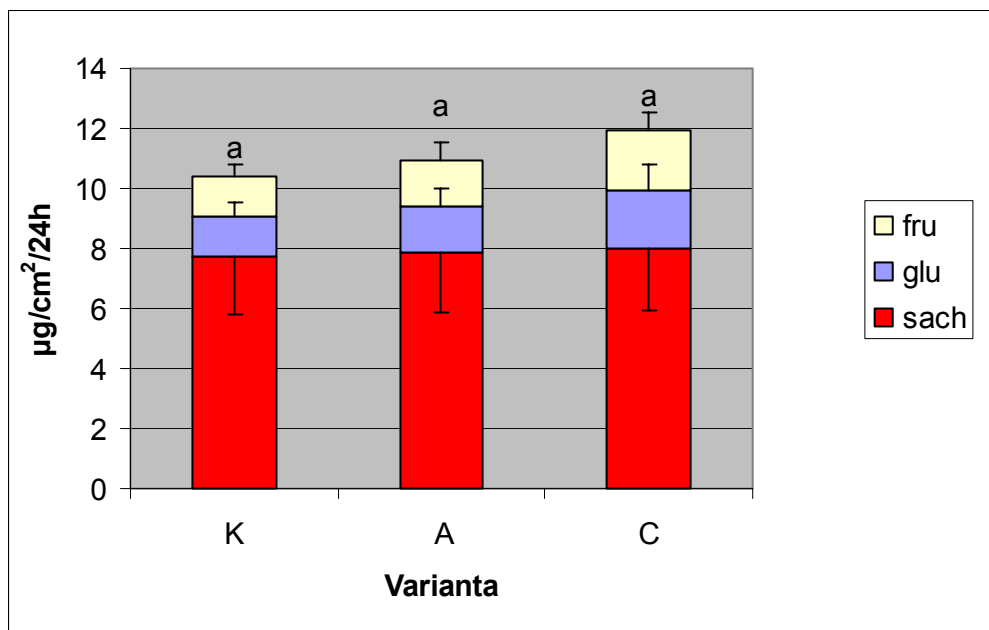
**Graf 3-17: Hladina rozpustných nestrukturních sacharidů v exudátu z listů – konec 1. sezóny (n = 3 – 8)**

Počet dospělých listů na začátku experimentu:

K (kontrolní rostliny), A (transformant A), C (transformant C) : 2 – 3 listy

Směrodatná odchylka: stanovena pro každý typ sacharidu zvlášť

Písmena nad sloupci: statisticky průkazný rozdíl celkového obsahu sacharidů mezi variantami



**Graf 3-18: Hladina rozpustných nestruturních sacharidů v exudátu z listů – začátek 2. sezóny (n = 9 – 10)**

Počet dospělých listů na začátku experimentu:

K (kontrolní rostliny), A (transformant A), C (transformant C) : 2 – 3 listy

Směrodatná odchylka: stanovena pro každý typ sacharidu zvlášť

Písmena nad sloupci: statisticky průkazný rozdíl celkového obsahu sacharidů mezi variantami



### 3.2 Experimenty v podmínkách *in vitro*

Experimenty v podmínkách *in vitro* navazují na práci M. Smoloňové (2003), která hodnotila vliv různého obsahu sacharózy dodávané v médiu na rychlost nástupu kvetení kontroly a transformantu C a dále sledovala vliv transformace na květní gradient podél osy stonku. Experimenty uvedené níže byly soustředěny na potvrzení některých pozorovaných trendů a dále na ověření pozorovaného jevu s využitím další nezávisle transformované linie A. Byla využita technika opakované kultivace oddělených bazálních a apikálních segmentů. Kultivovány byly rostliny kontrolní a rostliny transformovaných linií A a C na médiu s obsahem sacharózy 5 nebo 7 % .

U transformantů A bylo vždy pozorováno, že se květní pupeny vytvořily dříve u rostlin regenerovaných z bazálního segmentu než z apikálního (oba segmenty pocházely vždy z téže rostliny), a to na médiu jak s 5%, tak se 7% sacharózy. Na médiu se 7% sacharózy se květní struktury vytvářely v kratší době než na médiu s 5% sacharózy. Na médiu s 5% sacharózy se vytvořilo v průměru 28,5 listů za 134 dnů. Na médiu se 7% sacharózy se vytvořilo v průměru 26,3 listů za 123 dnů. Při kvetení se vytvářel buď jeden terminální květ nebo se květní pupeny nedovyvinuly a předčasně odpadly, a to nezávisle na typu kultivačního média, viz **Obr 3-9**. V době kvetení rostlin transformantu A pocházejících z bazálních segmentů nekvetly rostliny z apikálních segmentů téže varianty a ani žádná z variant rostlin kontrolních. V jednom případě bylo také pozorováno dřívejší kvetení u transformantu C z bazálního než z apikálního segmentu, viz **Tab. 3-1**.

**Tab. 3-1: Průměrný počet listů a dnů do kvetení u rostlin transformantu A regenerovaných z bazálních segmentů při kultivaci *in vitro***

Transform. A	Prům. poč. listů	Prům. poč. dnů
5%	28,5 +-10,41	134,25+-25
7%	26+-4,95	123

5% a 7%: koncentrace sacharózy v kultivačním médiu

Kontrolní rostliny vytvářely adventivní kořeny v bazální části prýtu regenerovaného z obou typů segmentů, i když se jich vyskytovalo více u segmentu z bazální části prýtu, u transformantů se taková tvorba kořenů v bazální části prýtu

v takové míře nikdy nevyskytovala. Kořenový systém vytvářený na bazálních řezných plochách segmentů obou transformantů regenerovaných jak z apikálního, tak z bazálního segmentu byl oproti rostlinám kontrolním redukován. Za podmínek stejné ozářenosti vykazovaly rostliny obou transformantů etiolaci během celé doby kultivace, nejvíce etiolované byly listy z bazální části prýtu. Dále byla opakovaně pozorována zhoršená regenerace u všech rostlin v období zimních měsíců.



**Obr. 3-9: Fotografie transformantu A regenerovaného z bazálního segmentu na médiu s 5% sacharózy**

A) celkový pohled, B) detail, C) vzhled kořenového systému

## 4 Diskuse

V rámci diplomové práce byly jako rostlinný materiál použity rostliny neutrálního tabáku *Nicotiana tabacum* L. cv. Samsun divokého typu a linie A a C nezávisle transformované genem *cdc25* ze *S. pombe* odvozené Bellem et al. (1993). Autoři pozorovali, že transformací bylo mimo jiné také ovlivněno kvetení, nezávisle transformované rostliny osmi linií kvetly po dosažení menšího počtu listů (v průměru 10,4) a za kratší dobu než divoký typ. Byla pozorována zvýšená tvorba fertálních květů u transgenních linií oproti kontrole (semena normálně klíčila), ale i výskyt květů abnormálních. Tato práce se blíže nezabývá podrobnějším studiem vlivu transformace na kvetení, jedná se v ní o zevrubný popis morfologických změn a změn ve vývoji, které byly způsobeny transformací rostlin tohoto neutrálního tabáku.

Rozhodnutí o přechodu do generativní fáze je u neutrálního tabáku dané souhrou mezi signály z kořenů (inhibiční), listů (převážně považovány za indukční), vzdáleností mezi apexem a kořeny generujícími inhibiční signál, a dále kompetencí apikálního meristému prýtu (dále SAM) k přijetí květního stimulu (McDaniel 1980, Gebhardt a McDaniel 1991, Singer et al. 1992). Série roubovacích experimentů, které byly použity v diplomové práci Martiny Smoloňové (2003) vycházela z předpokladu, že roubování dovolující vzájemnou kombinaci částí rostlin transformovaných a kontrolních umožní odhadnout, která ze složek multikomponentního systému regulujícího kvetení je transformací nejvýrazněji zasažena. Výsledky těchto experimentů naznačovaly, že transformací byl nejvíce zasažen apex, ale absence spolehlivých výsledků především kontrolního roubování (roub i podnož ze stejného typu rostliny) nedovolovala formulovat jednoznačný závěr. Dále také nebylo provedeno ověření výsledků u některé z dalších transformovaných linií. V experimentech prezentovaných v předkládané diplomové práci se podařilo optimalizovat metodu roubování pro kontrolní varianty a zároveň vedle transgenní linie C (použita i v předchozí diplomové práci) provést experimenty i s transgenní linií A (nezávisle transformovaná týmž konstruktem). Výsledky jednoznačně ukázaly, že počet listů / nodů vytvořených do kvetení byl závislý na typu roubu (transformanty A i C nebo kontrola), tzn. pokud byla podnoží rostlina kontrolní a roubem transgenní rostlina A nebo C, roub vytvořil srovnatelný počet nodů do kvetení jako neroubovaná transgenní rostlina stejné varianty jako byl roub. A stejně tak, pokud byla podnoží transgenní

rostlina A nebo C a roubem kontrolní rostlina, roub vytvořil srovnatelný počet nodů do kvetení jako neroubovaná rostlina kontrolní, viz **Graf 3-1** až **Graf 3-4**. Počet plně vyvinutých listů byl redukován (poškozeny při roubování). Podle McDaniela (1980) je počet vytvořených nodů do kvetení u neutrálního tabáku za daných podmínek stabilní parametr, odstraňování dospělých listů tento počet neovlivní. V roubovacích experimentech tedy byly počítány všechny nody, tedy včetně nodů s deformovanými případně nedovyvinutými listy. Sachs (1999) také zahrnuje do celkového počtu vytvořených nodů i nody s poškozenými listy. U roubovaných transformantů A i C byla také pozorována větší citlivost na zásah roubováním oproti roubovaným kontrolním rostlinám. U obou transformantů nezávisle na tom, zda se jednalo o roubované nebo intaktní rostliny, docházelo k výraznému větvení prýtu, a to v daleko větší míře než u rostlin kontrolních. Vytvořené postranní větve někdy přesahovaly větev hlavní. U transformovaných rostlin docházelo k prodlužování hlavní osy prýtu i po vytvoření květních pupenů, což se shoduje s pozorováním M. Smoloňové (2003).

Pro posouzení vlivu transformace byl počet vytvořených nodů zřejmě důležitějším kritériem než počet dnů do vytvoření květních pupenů. Ke konci sezóny roubované rostliny déle regenerovaly a pomaleji se vyvíjely ve srovnání s rostlinami rostoucími uprostřed sezóny, viz **Graf 3-5** až **Graf 3-8**. Dá se shrnout, že celkový počet vytvořených nodů do vykvetení po roubování byl přibližně stejný jako u neroubovaných rostlin stejné varianty jako byl roub, počet plně vyvinutých listů byl ale mírně snížen, zatímco počet dnů do vykvetení byl ovlivněn jak u roubovaných kontrolních rostlin tak u transformantů, roubované rostliny potřebovaly delší dobu pro regeneraci.

Bylo opakovaně pozorováno, že transformací byl ovlivněn kořenový systém. Během experimentů prováděných jak *in vivo*, tak *in vitro* podmínkách byla u transformantů pozorována redukce kořenového systému (také Smoloňová 2003). Při kultivaci stonkových segmentů transformovaných rostlin čtyř nezávislých linií (A, B, C a F) v podmínkách *in vitro* na médiu indukujícím tvorbu kořenů bylo pozorováno, že tyto segmenty mají sníženou schopnost tvorby kořenů (Suchomelová 1999, Velgová 2003, Suchomelová et al. 2004). Z literatury je známo, že přítomnost kořenového systému v blízkosti SAM má inhibiční vliv na přechod ke kvetení, pro přechod ke kvetení je pak důležitá vzdálenost SAM od kořenového systému daná minimálním počtem vytvořených nodů (McDaniel 1980, Sachs 1999). Jak vyplývá z roubovacích experimentů (viz **Graf 3-1** až **Graf 3-4**), inhibiční signál pocházející z kořenů nebyl

transformací ovlivněn. Pokud byla roubem rostlina kontrolní a podnoží transformant (A nebo C), nedošlo ke změně (snížení) počtu vytvořených nodů do kvetení, rouby z kontrolních rostlin vytvořily srovnatelný počet nodů do kvetení jako neroubované kontrolní rostliny.

Analýzou kvetení rostlin dopěstovaných z bazálních a apikálních segmentů v podmínkách *in vitro* u nezávisle transformované line A byly potvrzeny výsledky Smoloňové (2003) získané s transformovanou linií C, které ukazují narušení akropetálního gradientu květního stimulu. Podstata tohoto jevu zůstává stále nevyjasněným problémem, viz **Tab 3-1**.

Kromě inhibičního vlivu kořenů je další potenciální složkou regulace přechodu ke kvetení transport květního stimulu z listů a jeho tok směrem k apexu (např. Bernier et al. 1993). U fotoperiodicky citlivých rostlin bylo zjištěno, že sacharidy (sacharóza) jsou také součástí signální sítě regulace přechodu ke kvetení. Např. u dlouhodobě rostliny *Sinapis alba* bylo pozorováno, že po působení indukční fotoperiody dochází k brzkému zvýšení hladiny sacharózy v listovém exudátu (Lejeune et al. 1991). Také u rostliny *Arabidopsis thaliana* dochází po působení indukční fotoperiody k přechodnému zvýšení exportu sacharidů z listů (Corbesier et al. 1998). Dále u *S. alba* také dochází k přechodnému vzestupu toku sacharidů směrem k apexu. Zvýšení toku sacharidů do apexu probíhá téměř ihned po působení indukční fotoperiody a je přechodné (Lejeune et al. 1993), což naznačuje, že jednou z raných událostí přechodu ke kvetení u *S. alba* je akumulace sacharózy v SAM (Lejeune et al. 1993). Sacharidy jsou pravděpodobně také složkou regulačního systému nástupu kvetení u neutrálních druhů (rajče – Dielen et al. 2003), avšak spolehlivé důkazy pro jejich podíl na regulaci nástupu kvetení u neutrálního tabáku dosud v literatuře chybějí. U našeho rostlinného materiálu bylo zjištěno, že při kultivaci rostlin v podmínkách *in vitro* došlo po zvýšení koncentrace sacharózy v médiu (z 5% na 7%) k urychlení kvetení. Jak transformované rostliny (linie C), tak kontrolní rostliny kvetly dříve a po dosažení menšího počtu listů do kvetení, rostliny transformantů (C) kvetly také na médiu se 3% sacharózy, kdy u kontrolních rostlin ke kvetení nedocházelo (Smoloňová 2003). Analýza celkového obsahu sacharidů v listech transgenních rostlin A a C ve srovnání s kontrolními rostlinami neprokázala rozdíl, nicméně je patrný trend ke zvyšování celkového obsahu sacharidů u obou transformantů, viz **Graf 3-10**. Celkový obsah sacharidů v kořenovém systému byl u transformantů stejný nebo nižší než u rostlin kontrolních, viz **Graf 3-11**. Tato

pozorování se shodují s výsledky analýz sacharidů z listů v materiálu napěstovaném v *in vivo* a v *in vitro* podmínkách (Smoloňová 2003, Suchomelová osobní sdělení), nicméně vzhledem k variabilitě rostlinného materiálu je nutné ověření těchto výsledků.

Další možností tedy je, že transformací mohl být ovlivněn export sacharidů z listů nebo jejich transport a distribuce směrem k apexu. Analýza exudátů z dekapitovaných rostlin (**Graf 3-12 až Graf 3-15**) a z listů (**Graf 3-16 až Graf 3-18**) neprokázala u transformantů statisticky průkazný rozdíl v množství sacharidů exportovaných z listů a v jejich transportu a distribuci směrem do apexu mezi transformovanými a kontrolními rostlinami. Mezi vzorky byla pozorována vysoká variabilita, další optimalizace metody jímání exudátů by mohla pomoci tuto variabilitu snížit. Zajímavé výsledky by mohlo přinést také měření hladin sacharidů v samotném vzrostném vrcholu, vzorky jsou již odebrány a připraveny ke zpracování. Vedle toho bylo orientačně zjištěno, že transformace ovlivňuje zastoupení vodivých pletiv stonku vegetativních rostlin (Suchomelová osobní sdělení), ověření tohoto výsledku bude předmětem dalšího zkoumání, za tímto účelem byly odebrány stonkové segmenty transformantů A a C a rostlin kontrolních ve stadiu raného vývoje.

Dalšími látkami účastnicími se přechodu do generativní fáze u některých fotoperiodických druhů jsou cytokininy, jejichž transport směrem k apexu přechodně vzrůstá po působení indukční fotoperiody, *Sinapis alba* (Lejeune et al. 1994), *Chenopodium rubrum* a *Chenopodium murale* (Macháčková et al. 1996), *Arabidopsis thaliana* (Jacqmard et al. 2002, Corbesier et al. 2003). Při studiu organogeneze *de novo* (na stonkových segmentech kultivovaných na médiích indukujících tvorbu vegetativních pupenů) bylo opakovaně zjištěno, že rostliny transformované genem *cdc25* vytvářejí větší množství prýtů než rostliny kontrolní a jejich tvorba je časnější (Suchomelová 1999, Velgová 2003). Transformace tedy buďto ovlivňuje endogenní hladinu cytokininů a nebo simuluje ošetření segmentů cytokininem. Stanovit hladinu cytokininů u tohoto rostlinného materiálu bylo obtížné vzhledem k tomu, že se u tabáku jako takového hladina cytokininů stanovuje hůře pro přítomnost nečistot. Nicméně při opakovaném měření nebyly dramatické změny v hladině cytokininů zjištěny (Suchomelová, nepublikované výsledky). Další plánované experimenty počítají s využitím možnosti jímání exudátu, které by pravděpodobně poskytovalo čistší vzorky, ve kterých by bylo možné snáze stanovovat hladinu cytokininů. Dále by pak bylo možné sledovat přímo transport cytokininů do vzrostného vrcholu, a specifikovat tak

podíl těchto signálních látek na přepnutí vývojového programu. Je však možné, že transformace nevyvolává změny v hladinách cytokininů, ale přesto se jedná o zásah do cytokininové signalizace zodpovědné za změnu mitotické aktivity apikálního meristemu při přechodu ke kvetení.

Další možností, jak transformace mohla ovlivnit nástup kvetení je, že ke změně dochází přímo v apexu. Obecně se předpokládá, že kompetence SAM ke květnímu stimulu je nezbytnou podmínkou pro přechod do generativní fáze a stoupá se stářím rostliny (Singer et al. 1992). Vegetativní fáze vývoje je u neutrálních rostlin daná počtem vytvořených nodů do kvetení, který je dán kompetencí SAM ke květnímu stimulu a silou indukčního vlivu z listů, roli hraje také vzdálenost SAM od kořenů, které mají inhibiční vliv na přechod do generativní fáze (McDaniel 1980, Gebhardt a McDaniel 1991, Singer et al. 1992, McDaniel et al. 1996). Anatomická analýza SAM ukázala, že u transformantů dochází velmi časně ke změně struktury vzrostného vrcholu. Pro anatomickou analýzu byly vybrány rostliny, které by měly být ve vegetativní fázi vývoje. Singer a McDaniel (1986) uvádějí, že determinace ke kvetení nepředchází bezprostředně vytváření květních struktur. Rostliny tabáku po determinaci vytvoří ještě 3-4 nody než dojde k pozorovatelným změnám vzrostného vrcholu spojeným s nástupem kvetení (Singer a McDaniel 1986, McDaniel et al. 1989). Vzhledem k tomu, že u transformovaných rostlin může být situace odlišná, byly pro analýzu stavby SAM vybrány rostliny s 2 - 3 plně vyvinutými listy, tedy výrazně mladší než ty, u kterých by bylo možno předpokládat determinaci. Analyzované kontrolní rostliny měly vytvořen stejný počet plně vyvinutých listů. SAM kontrolních rostlin vykazoval typický tvar vegetativního apikálního meristému tabáku s velmi málo vyklenutým dómem. U obou transformantů bylo pozorováno prodlužování SAM, zvýšení počtu a vrstev meristematických buněk, není však jasné, zda se jedná o počátek tvorby květních struktur, viz **Obr. 3-2** až **Obr. 3-7**. Dewitte et al. (1999) u neutrálního tabáku (*Nicotiana tabacum* L.) pozorovali, že během přechodu mezi vegetativní a generativní fází vývoje byla v apikálním meristému prýtu zastavena tvorba listových primordií, následovala ztráta apikální dominance v laterální a centrální zóně a ztráta charakteristického tvaru vegetativního apikálního meristému. Pozorované změny v SAM transformovaných rostlin jsou tedy přinejmenším do určité míry shodné se změnami, ke kterým dochází při nástupu kvetení (Lozhnikova et al. 1982, Krekule osobní sdělení). Otázkou zůstává, zda stavba SAM transgenních linií není pozměněná

již ve velmi raných fázích vývoje, proto byly odebrány na anatomickou analýzu další vzrostné vrcholy prýtu u velmi mladých rostlin kontrolních a transformantů A a C (1 – 2 plně vyvinuté listy). Nicméně je nutné uvažovat i možnost, že SAM transgenních rostlin neprochází vegetativní fází vývoje vůbec, tj. přechází v květní meristém ihned po ukončení embryonálního vývoje. Ze znalosti počtu nodů do vykvetení u neroubovaných kontrolních rostlin a u neroubovaných transformantů bylo odvozeno, kdy by rostliny měly být ve vegetativní fázi a tohoto kritéria bylo dodržováno během celé diplomové práce. Možná je však také závislost nejen na počtu vytvořených nodů a listů nad 10 cm, ale taky na ploše listů. Např. u australských kultivarů neutrálního a krátkodenního tabáku se velikost listové plochy požadované k indukcí pohybuje v rozmezí 25 cm<sup>2</sup> – 200 cm<sup>2</sup>, což je hlavním kritériem pro přechod do generativní fáze (Hopkinson 1969, Hopkinson a Ison 1982).

Kontinuální růst a plasticita rostlin je umožněna existencí meristému, který svojí aktivitou reaguje na vnitřní signály a na signály okolního prostředí. Na funkčnosti meristému se mimo jiné podílejí transkripční faktory a signalizační molekuly. V poslední době je stále zřetelnější, že změna uspořádání chromatinu ve vztahu ke genové expresi a k přechodu mezi vývojovými fázemi hraje klíčovou roli (Guyomarch et al. 2005, He a Amasino 2005). Bylo zjištěno, že se při přechodu do generativní fáze mění úroveň metylace DNA, např. u rostliny *Linum usitatissimum* byla zjištěna hypometylace cytosinu (Fieldes et al. 2005). V současné době probíhá odběr vzorků pro stanovení úrovně metylace DNA ve vzrostných vrcholech rostlin transformovaných (linie A a C) a kontrolních ve vegetativní fázi vývoje a při nástupu kvetení a předpokládáme, že výsledky by mohly napomoci určit vývojový stav SAM transformantů v časných fázích vývoje.

Předčasné kvetení a vývoj abnormálních květů může být výsledkem změn regulace buněčného cyklu (Bell et al. 1993). Aplikace cytokininů na vzrostný vrchol rostlin *Sinapis alba* ve vegetativní fázi vývoje měla mimo jiné za výsledek zvýšení mitotického indexu buněk v SAM, tyto události jsou součástí událostí procesu evokace SAM při přechodu do generativní fáze. U rostlin *Arabidopsis thaliana* byla také pozorována změna v mitotické aktivitě buněk SAM po působení indukčního signálu (LD) (Jacquard et al. 2003). Také u neutrálního tabáku bylo pozorováno během přechodu SAM v květní, že dochází ke zvýšení mitotické aktivity. Změna v SAM transformantů může být způsobena tím, že u transformantů konstitutivní exprese



vneseného kvasinkového genu *cdc25* urychluje přechod z G<sub>2</sub> fáze do mitózy, čímž mohly být v SAM navozeny procesy spojené s přechodem meristému v květní. Tvorba orgánových primordií je spojena se změnou růstové rychlosti a se změnou v orientaci buněčného dělení, nastává tedy i změna v regulaci buněčného cyklu (Lyndon 1994). Bylo pozorováno, že konstitutivní exprese *cdc25* ze *Schizosaccharomyces pombe* u neutrálního tabáku vede ke změně ve vývoji rostlin (Bell et al. 1993) a ke zmenšení velikosti meristemických buněk kořene (Bell et al. 1993, McKibbin et al. 1998). Byl pozorován posun v organogenezi *de novo* u transformantů (A, B, C a F) ve prospěch tvorby vegetativních pupenů, který lze vyvolat aplikací cytokininů (tzv. „cytokinin-like“ efekt) (Velgová 2003, Suchomelová et al. 2004). Při indukované organogenezi pupenů při kultivaci rostlin v *in vitro* podmínkách se na segmentech transformantů (A, B, C a F) tvořilo výrazně více pupenů, a to převážně v bazální části segmentu – dle původní orientace na mateřské rostlině (Suchomelová 1999, Velgová 2003, Suchomelová et al. 2004). Dokonce se pupeny při kultivaci *in vitro* tvořily i na segmentech transformantů (A, B, C a F), a to i bez přídavku růstových regulátorů (Suchomelová et al. 2004). U transformovaných variant byl také v *in vitro* podmínkách pozorován posun v nástupu kvetení, dříve než u rostlin kontrolních, (Suchomelová 1999, Velgová 2003). Není jasné, jestli skutečně došlo vlivem transformace k posunu hladiny cytokininů, nebo jestli konstitutivně exprimovaný gen pro fosfatázu vliv cytokininů simuluje nebo jestli ovlivnil endogenní hladinu cytokininů (podle orientačních výsledků málo pravděpodobné).

Z roubovacích experimentů je zřejmé, že transformací je nejvíce zasažen apikální meristém. Předpokládá se, že jednou z prvních událostí v apikálním meristému při přechodu do generativní fáze je zvýšení mitotické aktivity (Havelange et al. 1986, Dewitte et al. 1999, Jacquard et al. 2003). Otázkou zůstává, zda změny v buněčném dělení ovlivňují kompetenci vzrostného vrcholu k přijetí květního stimulu. Dosažené výsledky, zdá se, tuto představu podporují, i když si její potvrzení vyžádá řadu dalších experimentů.

## Závěry

Transformace genem *cdc25* ze *Schizosaccharomyces pombe* vedla u rostlin neutrálního tabáku *Nicotiana tabacum* L., cv. Samsun k následujícím změnám:

### *In vivo* podmínky

- ◆ rostliny transformovaných linií A a C kvetly po dosažení menšího počtu nodů a nástup kvetení byl oproti divokému genotypu urychlen
- ◆ za snížení počtu vytvořených nodů do kvetení u transformovaných rostlin je zodpovědná změna aktivity vzrostného vrcholu
- ◆ byla pozorována změna ve struktuře vzrostného vrcholu prýtu transformantů A a C
- ◆ nebyl pozorován průkazný rozdíl v hladině sacharidů ve vegetativní fázi vývoje v exudátu z listů a v exudátu z dekapitovaných rostlin mezi rostlinami kontrolními a transformanty A a C
- ◆ nebyl pozorován průkazný rozdíl v hmotnosti sušiny kořenového systému mezi kontrolními rostlinami a transformantami A a C ve vegetativní fázi vývoje

### *In vitro* podmínky

- ◆ transformací byl narušen akropetální gradient květního stimulu podél stonku u transformantů A a C oproti kontrolní variantě
- ◆ zvýšení obsahu sacharózy v médiu urychlilo nástup kvetení u transformantu A
- ◆ kořenový systém byl u transformantů A, C oproti kontrolní variantě redukován

## Abstract

Plants are sessile organisms and so they cannot escape changes in environmental conditions. In order to optimize seed production and to ensure that flowering occurs during the appropriate season, plants have evolved a complex of regulatory pathways to control when the floral transition takes place. One group of regulatory pathways involves environmental factors like certain photoperiod or vernalization. The second group of regulatory pathways involves the state of development and is not sensitive to environmental cues, this pathway is called autonomous pathway and plants in this group do not require a particular photoperiod or vernalization, they are called day-neutral plants. The transition of these plants from vegetative to reproductive phase depends on combination of reaching certain minimal number of nodes, inhibition effect of roots, floral signals generated by leaves and activity of the shoot apical meristem (SAM). Among early events of the transition of SAM to reproductive phase belongs an increase in the mitotic activities of the cells in SAM. Precise mechanisms of the action of the signals connected with transition of SAM to flowering have not been elucidated yet.

The plants of day-neutral tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) cv. Samsun were transformed with fission yeast mitotic activator coded by *cdc25* (*Spcdc25*) and besides others precocious flowering was observed (Bell et al. 1993). The aim of the presented study was to determine the component of the multifactorial system controlling flowering onset which was most affected by the *Spcdc25* transformation and based on the results to contribute to elucidation of flowering regulation in day-neutral plants.

The transformation led to dramatic change in flowering of tobacco plants cultivated under *in vivo* conditions. Transformed plants of two lines flowered earlier after reaching lower number of leaves / nodes compared to the control plants. The grafting experiments enabling combination of parts of transformed and control plants indicated, that the speeding up of flowering was caused by the effect of the transformation on the SAM. This finding was supported by anatomical analysis of SAM which revealed substantial differences between the SAM structure of transformed and control plants already at early stages of the plant development.

Sugars, especially sucrose, are proposed to be a part of the control system of flowering. *In vitro* experiments confirmed the previously found effect of enhanced

sucrose supply on earlier onset of flowering and beside this also the disturbed acropetal gradient of floral capacity in transformants. The study of sugar content and transport within plant body (performed with the help of leaf and decapitated plants exudates analysis) revealed no significant and systematic changes in these characteristics between transformed and control plant material.

Based on the presented results we propose that the main change caused by the transformation of the day-neutral tobacco with *Spcdc25* gene is connected with altered characteristics of SAM, presumably as a consequence of changed mitotic activity of the SAM cells, which results in higher capacity to flower in transformed material.

## Seznam citované literatury:

- Araki T (2001) Transition from vegetative to reproductive phase. *Current Opinion in Plant Biology* 4: 63 – 68
- Aukerman MJ, Amasino RM (1998) Floral induction and florigen. *Cell* 93: 491 – 494
- Bell MH, Halford NG, Ormrod JC, Francis D (1993) Tobacco plants transformed with *cdc25*, a mitotic inducer gene from fission yeast. *Plant Molecular Biology* 23: 445 – 451
- Bergmans ACJ, de Boer AD, Derksen JWM, van der Schoot Ch. (1997) The symplasmic coupling of L2 – cells diminishes in early floral development of *Iris*. *Planta* 203: 245 – 252
- Bernier G (1988) The control of floral evocation and morphogenesis. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 39:175 - 219
- Bernier G, Corbesier L, Périlleux C (2002) The flowering process: on the track of controlling factors in *Sinapis alba*. *Russian Journal of Plant Physiology* 49: 445 - 450
- Bernier G, Havelange A, Houssa C, Petitjean A, Lejeune P (1993) Physiological signals that induce flowering. *The Plant Cell* 5: 1147 – 1155
- Bernier GA Périlleux C (2005) A physiological overview of the genetics of flowering time control. *Plant Biotechnology Journal* 3: 3 – 16
- Blázquez MA, Weigel D (2000) Interaction of floral inductive signals in *Arabidopsis*. *Nature* 404: 889 - 892
- Bowman JL, Eshed Y (2000) Formation and maintenance of the shoot apical meristem. *Trends in Plant Science* 5 (3): 110 - 115
- Burssens S, Van Montagu M, Inzé D (1998) The cell cycle in *Arabidopsis*. *Plant Physiol Biochem* 36 (1-2): 9 - 19
- Clark SE (1997) Organ formation at the vegetative shoot meristem. *The Plant Cell* 9: 1067 – 1076
- Corbesier L, Kustermans G, Périlleux C, Melzer S, Moritz T, Havelange A, Bernier G (2004) Gibberellins and the floral transition in *Sinapis alba*. *Physiol Plant* 122: 152 - 158

- Corbesier L, Lejeune P, Bernier G (1998) The role of carbohydrates in the induction of flowering in *Arabidopsis thaliana*: comparison between the wild type and a starchless mutant. *Planta* 206: 131 – 137
- Corbesier L, Prinsen E, Jacquard A, Lejeune P, Onckelen HV, Périlleux C, Bernier G (2003) Cytokinin levels in leaves, leaf exudate and shoot apical meristem of *Arabidopsis thaliana* during floral transition. *Journal of Experimental Botany* 54 (392): 2511 – 2517
- Corruzi G, Bush DR (2001) Nitrogen and carbon nutrient and metabolite signaling in plants. *Plant Physiol* 125: 61 - 64
- Čulafić L (1973) Induction of flowering of isolated *Spinacia oleracea* L. buds in sterile culture. *Bull Inst Jardin Bot Univ Beograd* 8: 1 – 4. Citováno v Mitrović et al (2000)
- D'Agostino IB, Kieber JJ (1999) Molecular mechanisms of cytokinin action. *Current Opinion in Plant Biology* 2: 359 – 364
- Dewitte W, Chiappetta A, Azmi A, Witters E, Strnad M, Rembur J, Noin M, Chriqui D, Van Onckelen H (1999) Dynamics of cytokinins in apical shoot meristems of a day-neutral tobacco during floral transition and flower formation. *Plant Physiology* 119: 111 - 121
- Dielen V, Quinet M, Chao J, Batoko H, Havelange A, Kinet J-M (2003) UNIFLORA, a pivotal gene that regulates floral transition and meristem identity in tomato (*Lycopersicon esculentum*). *New Phytologist* 161: 393 - 400
- Eimert K, Chen J (1997) Mutual influence and coregulation of floral initiation and carbohydrate metabolism. V Pessaraki M (eds) *Handbook of photosynthesis*. Dekker M New
- Evans LT (1969) The induction of flowering. Evans LT (eds) *McMillian Melbourne*. Citováno v McDaniel CN, King RW, Evans LT (1991) Floral determination and in-vitro floral differentiation in isolated shoot apices of *Lolium temulentum* L. *Planta* 185: 9 – 16
- Fieldes MA, Schaeffer SM, Krech MJ, Brown JCL (2005) DNA hypomethylation in 5-azacytidine-induced early-flowering lines of flax. *Theoretical and Applied genetic* 111 (1): 136 - 149
- Francis D, Halford NG (1995) The plant cell cycle. *Physiologia Plantarum* 93: 365 - 374

- Francis D, Sorrell DA (2001) The interface between the cell cycle and plant growth regulators: a mini review. *Plant Growth Regulation* 33: 1 – 12
- Gebhardt JS, McDaniel CN (1991) Flowering response of day-neutral and short-day cultivars of *Nicotiana tabacum* L. Interactions among root, genotype, leaf ontogenic position and growth conditions. *Planta* 185: 513 – 517
- Greppin H, Auderset G, Bonson M, Penel C (1978) Changement d'état membranaire et mécanisme de la floraison. *Saussurea* 9: 83 – 101. Citováno v Krekule J. (1996)
- Groß-Hardt R, Laux T (2001) Shoots and buds. *Encyclopedia of Life Sciences*, Macmillian Publishers Ltd, Nature Publishing Group
- Guyomarch S, Bertrand C, Delarue M, Zhou DX (2005) Regulation of meristem activity by chromatin remodelling. *Trends in Plant Science* 10 (7): 332 - 338
- Habermann HM, Sekulow DB (1972) Development and aging in *Helianthus annuus* L., effects of the biological milieu of the apical meristem on patterns of development. *Growth* 36: 339 – 349. Citováno v McDaniel (1980)
- Havelange A, Bodson M, Bernier G (1986) Partial floral evocation by exogenous cytokinin in the long-day plant *Sinapis alba*. *Physiologia Plantarum* 67: 695 – 701
- Havelange A, Lejeune P, Bernier G (2000) Sucrose / cytokinin interaction in *Sinapis alba* at floral induction: a shoot-to-root-to-shoot physiological loop. *Physiologia Plantarum* 109: 343 - 350
- Hazebroek JP, Metzger JD, Mansager ER (1993) Thermoinductive regulation in gibberellin metabolism in *Thlaspi arvense* L. II. Cold induction of enzymes in gibberellin biosynthesis. *Plant Physiol* 102: 547 – 552. Citováno v Sheldon et al. (2000)
- He Y, Amasino RM (2005) Role of chromatin modification in flowering-time control. *Plant Science* 10 (1): 30 - 35
- Hemerly AS, Ferreira CG, Van Montagu M, Inzé D (1999) Cell cycle control and plant morphogenesis: is there an essential link? *BioEssays* 21: 29 – 37
- Hodson HK, Hamner KC (1969) Floral inducing extract from *Xanthium*. *Science* 167, 384 – 385
- Hopkinson JM (1969) Causes of early flowering in tobacco. *Aust J Agric Res* 20:1061 – 71. Citováno v Gebhardt a McDaniel (1991)

- Hopkinson JM, Ison RL (1982) Investigations of ripeness to flower in tobacco. *Field Crop Res* 5: 335 – 348. Citováno v Gebhardt a McDaniel (1991)
- Chailakhyan MKh (1961) Principles of ontogenesis and physiology of flowering in higher plants. *Can. J. Botany* 39, 1817 - 1841
- Chailakhyan MKh (1968) Internal factors of plant flowering. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 19: 1 – 37
- Chailakhyan MKh, Khazakhyan KhK (1974) Interaction between leaves and shoots during efflorescence of plants of photoperiodically neutral species. *Dokl Akad Nauk SSSR* 217: 1214 – 1217. Citováno v McDaniel a Hartnett (1993)
- Chailakhyan MKh, Khazakhyan KhK (1975) Role of stem zones of different tiers in the flowering of plants of photoperiodically neutral species. *Dokl Akad Nauk SSSR* 224: 1445 – 1448. Citováno v McDaniel a Hartnett (1993)
- Chailakhyan MKh, Lozhniková V, Seidlová F, Krekule J, Dudko N, Negretzky V (1989) Floral and growth responses in *Chenopodium rubrum* L. to an extract from flowering *Nicotiana tabacum* L. *Planta* 178: 143 - 146
- Chang S–T, Chen W – S, Hsu Ch–Y, Yu H–Ch, Du B–S, Huang K–L (1999) Changes in cytokinin activities before, during and after floral initiation in *Polianthes tuberosa*. *Plant Physiol Biochem* 37 (9): 679 – 684
- Chouard (1960) Vernalization and its relation to dormancy. *Annu Rev Plant Physiol* 11: 191 – 238. Citováno v Levy a Dean (1998a)
- Jacqumard A, Detry N, Dewitte W, Van Onckelen H, Bernier G (2002) In situ localization of cytokinins in the shoot apical meristem of *Sinapis alba* at floral transition. *Planta* 214: 970 – 973
- Jacqumard A, Gadisseur I, Bernier G (2003) Cell division and morphological changes in the shoot apex of *Arabidopsis thaliana* during floral transition. *Annals of Botany* 91: 571 - 576
- Kerstetter RA, Hake S (1997) Shoot meristem formation in vegetative development. *The Plant Cell* 9: 1001 – 1010
- Kinet JM, Lejeune P, Bernier G (1993) Shoot-root interactions during floral transition: a possible role for cytokinins. *Environmental and Experimental Botany* 33: 459 - 469



- King RW, Evans LT (2003) Gibberellins and flowering of grasses and cereals: prizing open the lid of the „florigen“ black box. *Annu Rev Plant Biol* 54: 307 - 328
- Krekule J. (1997) Photoperiodic control of flowering: various signals and their roles. *Russia Journal of plant Physiology* 44 (I): 129 – 137
- Landridge J (1957) Effect of day-length and gibberellic acid on the flowering of *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 180:36 – 37. Citováno v Levy a Dean 1998a
- Landrieu I, da Costa M, De Veylder L, Dewitte, Vandepoele K, Hassan S, Wieruszkeski JM, Faure JD, Van Montagu M, Inzé D, Lippens G (2004) A small CDC25 dual-specificity tyrosine.phosphatase isoform in *Arabidopsis thaliana*. *PNAS* 101: 13380 - 13385
- Lang (1965). Citováno v McDaniel (1980), v článku chyběla citace
- Lang A (1984) Die photoperiodische regulation von Förderung und Hemmung der Blütenbildung. *Ber. Dtch. Bot. Ges.* 97: 293 – 314, citováno v Gebhardt a McDaniel (1991)
- Lejeune P, Bernier G, Kinet J-M (1991) Sucrose levels in leaf exudate as a function of floral induction in the long-day plant *Sinapis alba*. *Plant Physiol Biochem* 29 (2): 153 – 157
- Lejeune P, Bernier G, Requier M-Ch, Kinet J-M (1994) Cytokinins in phloem and xylem saps of *Sinapis alba* during floral induction. *Physiologia Plantarum* 90: 522 – 528
- Lejeune P, Bernier G, Requier M-Ch, Kinet J-M (1993) Sucrose increase during floral induction in the phloem sap collected at the apical part of the shoot of the long-day plant *Sinapis alba*. *Planta* 190: 71 - 74
- Levy YY, Dean C (1998a) The transition to flowering. *The Plant Cell* 10: 1973 – 1979
- Levy YY, Dean C (1998b) Control of flowering time. *Current Opinion in Plant Biology* 1: 49 - 54
- Leyser O, Day S (2003) Mechanisms in plant development. Vydání 1, Blackwell Publishing Oxford
- Lozhnikova VN, Krekule J, Bavrina TV, Seidlova F, Chailakhyan MKh (1982) Balance between gibberellins and abscisins in tobacco in the course of photoperiodic induction of flowering. *Fiziol. Rast. (in russ)* 29 : 247-252

- Lozhnikova VN, Macháčková I, Eder J, Dudko N, Krekule J, Chailakhyan MKh (1989) Gradient of free indole-3-acetic acid level in the day-neutral tobacco var. Trapezoid with normal and reversed gradient of flowering
- Lyndon RF (1994) Control of organogenesis at the shoot apex. *New Phytol* 128: 1 - 18
- Machackova I, Eder J, Motyka V, Hanus J, Krekule J (1996) Photoperiodic control of cytokinin transport and metabolism in *Chenopodium rubrum*. *Physiologia Plantarum* 98 (3): 564-570
- Macháčková I, Krekule J (2002) Sixty-five years of searching for the signals that trigger flowering. *Russ. J. Plant Physiol.* 49: 451 - 459
- Macháčková I, Krekule J, Eder J, Seidlová F, Strnad M. (1993) Cytokinins in photoperiodic induction of flowering in *Chenopodium rubrum*. *Physiol Plant* 87: 160 - 7
- McDaniel CN (1978) Determination for growth pattern in axillary buds of *Nicotiana tabacum* L. *Dev Biol* 66: 250 – 255. Citováno v McDaniel a Hartnett (1983)
- McDaniel CN (1980) Influence of leaves and roots on meristem development in *Nicotiana tabacum* L. cv. Wisconsin 38. *Planta* 148: 462 - 467
- McDaniel CN (1996) Developmental physiology of floral initiation in *Nicotiana tabacum* L. *Journal of Experimental Botany* 47 (297): 465 – 475
- McDaniel CN, Hartnett LK (1993) Floral-stimulus activity in tobacco stem pieces. *Planta* 189: 577 – 583
- McDaniel CN, Hartnett LK, Sangrey KA (1996) Regulation of node number in day-neutral *Nicotiana tabacum*: a factor in plant size. *The Plant Journal* 9 (1): 55 – 61
- McDaniel CN, Hsu FC (1976) Position-dependent development of tobacco meristem. *Nature* 259: 564 – 565. Citováno v McDaniel (1980)
- McDaniel CN, Sangrey KA, Jegla DE (1989) Cryptic floral determination: stem explants from vegetative tobacco plants have the capacity to regenerate floral shoots. *Developmental Biology* 134: 473 – 478
- McDaniel CN, Singer SR, Smith SME (1992) Developmental states associated with the floral transition. *Developmental Biology* 153: 59 - 69

- McKibbin RS, Halford NG, Francis D (1998) Expression of fission yeast *cdc25* alters the frequency of lateral root formation in transgenic tobacco. *Plant Molecular Biology* 36: 601 – 612
- Medford JI (1992) Vegetative apical meristem. *The Plant Cell* 4: 1029 - 1039
- Michaels SD, Amasino RM (2000) Memories of winter: vernalization and the competence to flower. *Plant, Cell and Environment* 23: 1145 – 1153
- Mironov V, De Veylder L, Van Montagu M, Inzé D (1999) Cyclin-dependent kinases and cell division in plants – the nexus. *The Plant Cell* 11: 509 – 521
- Mitrović A, Živanović B, Čulafić (2000) The effects of photoperiod, glucose and gibberellic acid on growth *in vitro* and flowering of *Chenopodium murale*. *Biologia Plantarum* 43 (2): 173 - 177
- Montavon M. (1984) PhD Thesis No. 2099. Univ. Genève, citováno v Procházka et al. (1997)
- Murashige, T., Skoog, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473 – 497
- Nasmyth K, Dirick L, Surana U, Amon A, Cvrčková F (1991) Some facts and thoughts on cell cycle control in yeast. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* LVI: 9 - 20
- Negretsky VA, Lozhnikova VN, Chailakhyan MKh (1984) Changes in activity of phytohormones in reversing the floral gradient in day-neutral tobacco var. Trapezoid (*in Russian*). *Fiziol Rast* 31: 1143 – 1148. Citováno v Lozhnikova et al. (1989)
- Němec B a kol (1962) Botanická mikrotechnika. Nakladatelství ČSAV Praha
- Nurse PM (2002) Cyclin dependent kinases and cell cycle control. *Bioscience Reports* 22: 487 - 499
- Ohto M, Onai K, Furukawa Y, Aoki E, Araki T, Nakamura K (2001) Effect of sugar on vegetative development and floral transition in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 127: 252 – 261
- Ormenese S, Havelange A, Deltour R, Bernier G. (2000) The frequency of plasmodesmata increases early in the whole shoot apical meristem of *Sinapis alba* L. during floral transition. *Planta* 211: 370 - 375

- Ormenese S, Havelange A, Bernier G, van der Schoot (2002) The shoot apical meristem of *Sinapis alba* L. expands its central symplasmic field during the floral transition. *Planta* 215: 67 - 78
- Paterson KE (1984) Shoot tip culture of *Helianthus annuus* – flowering and development of adventitious and multiple shoots. *Amer J Bot* 71( 7): 925 - 931
- Pavlová L (1996) Fotomorfogeneze, Katedra fyziologie rostlin PřF UK Praha
- Pazourková, J. (1986) Botanická mikrotechnika. Skriptum PřF UK, Praha
- Poethig RS (1990) Phase change and the regulation of shoot morphogenesis in plants. *Science* 250: 923 - 930
- Poláčková, Beneš (1975) The staining of chromosomal nuclei in squashes of root tips with aluminium lake of nuclear fast red. *Biologia Plantarum* 17:374 – 375
- Procházka S, Macháčková I, Krekule J, Šebánek J a kol (1998) Fyziologie rostlin. Vydání 1. Academia Praha
- Procházka S, Šebánek J a kol (1997) Regulátory rostlinného růstu. Vydání 1. Academia Praha, pp. 240 – 274
- Rajeevan MS, Lang A (1993) Flower-bud formation in explants of photoperiodic and day-neutral *Nicotiana* biotypes and its bearing on the regulation of flower formation. *Plant Biology* 90: 4636 – 4640
- Rajeevan MS, Lang A (1987) Comparision of de-novo flower-bud formation in a photoperiodic and a day-neutral tobacco. *Planta* (1987) 171: 560 – 564
- Reeves PH, Coupland G (2000) Response of plant development to enviroment: control of flowering by daylenght and temperature. *Current Opinion in Plant Biology* 3: 37 - 42
- Riou–Khamlichi C, Huntley R, Jacqmard A, Murray JAH (1999) Cytokinin activation of *Arabidopsis* cell division through a D–type cyclin. *Science* 283: 1541 - 1543
- Rolland F, Moore B, Sheen J (2002) Sugar sensing and signalling in plants. *The Plant Cell* 14: S185 – S205 Suppl
- Sachs RM, Hackett WP (1983) Source–relationship and flowering strategies of plant reproduction. Meudt WJ (eds) *Strategies of plant Reproduction*. BARC Symp. No. 6, Allanheld, Osmun, Totowa, NJ, 263 – 272 citováno v Bernier et al. 1993

- Sachs T (1999) „Node counting“: an internal control of balanced vegetative and reproductive development. *Plant, Cell and Environment* 22: 757 – 766
- Scorza R (1982) *In vitro* flowering. *Hort. Rev.* 4: 106 – 127. Citováno v Mitrović et al. (2000)
- Shaul O, Van Montagu M, Inzé D (1996) Cell control in *Arabidopsis*. *Annals of Botany* 78: 283 – 288
- Sheldon CC, Finnegan EJ, Rouse DT, Tadege M, Bagnall DJ, Helliwell ChA, Peacock WJ, Dennis ES (2000) The control of flowering time by vernalization. *Current Opinion in Plant Biology* 3: 418 – 422
- Schwabe WW, Al-Doori AH (1973) Analysis of a juvenile-like condition affecting flowering in black currant (*Ribes nigrum*). *J Exp Bot* 24: 969 – 981. Citováno v Gebhardt a McDaniel (1991)
- Simpson GG (2004) The autonomous pathway: epigenetic and post-transcriptional gene regulation in the control of *Arabidopsis* flowering time. *Current Opinion in Plant Biology* 7: 570 – 574
- Singer SR, Hannon CH, Huber SC (1992) Acquisition of competence for floral development in *Nicotiana* buds. *Planta* 188: 546 – 550
- Singer SR, McDaniel CN (1986) Floral determination in the terminal and axillary buds of *Nicotiana tabacum* L. *Dev Biol* 118: 587 - 592
- Skoog F (1955) Growth factors, polarity and morphogenesis. *Annee Biologica* 31: 1-11. Citováno v McDaniel (1996)
- Smoloňová M (2003) Vliv transformace genem *cdc25* ze *Schizosaccharomyces pombe* na kvetení neutrálního tabáku *Nicotiana tabacum* L., cv. Samsun. Diplomová práce, Katedra fyziologie rostlin PřF UK Praha
- Stals H, Casteels P, Van Montagu M, Inzé D (2000) Regulation of cyclin-dependent kinases in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology* 43: 583 – 593
- Suchomelová P (1999) Fyziologická charakteristika chování transgenních rostlin tabáku v podmínkách *in vitro*. Diplomová práce, Katedra fyziologie rostlin PřF UK Praha
- Suchomelová P, Velgová D, Mašek T, Francis D, Rogers HJ, Marchbank AM, Lipavská H (2004) Expression of the fission yeast cell cycle regulator *cdc25*

induces *de novo* shoot formation in tobacco: evidence of a cytokinin-like effect by this mitotic activator. *Plant Physiology and Biochemistry* 42: 49 - 55

- Taylor CB (1997) Plant vegetative development: from seed and embryo to shoot and root. *The Plant Cell* 9: 981 – 988
- Tran Thanh Van M (1973a) *In vitro* control of *de novo* flower, bud, root, and callus differentiation from excised epidermal tissues. *Nature* 246: 44 – 45
- Tran Thanh Van M (1973b) Direct flower neof ormation from superficial tissue of small explants of *Nicotiana tabacum* L. *Planta (Berl)* 115: 87 - 92
- Tran Thanh Van M, Dien NT, Chlyah A (1974) Regulation of organogenesis in small explants of superficial tissue of *Nicotiana tabacum* L. *Planta (Berl)* 119: 149 - 159
- Van den Ende et al. (1984) citováno v McDaniel et al. (1989), v článku chyběla citace
- Van Staden J, Dimalla GG (1980) Endogenous cytokinins in *Bougainvillea* „San Diego Red“. III. Effect of photoperiod and gibberellic acid on flowering and cytokinin levels. *Bot Gaz* 141 (3): 248 – 251
- Velgová D (2003) Vliv transformace genem *cdc25* ze *Schizosaccharomyces pombe* na *de novo* organogenezi tabáku *Nicotiana tabacum* L., cv. Samsun. Diplomová práce, Katedra fyziologie rostlin PřF UK Praha
- Voesenek LACJ, Blom CWPM (1996) Plants and hormones: an ecophysiological view on timing and plasticity. *Journal of Ecology* 84: 111 – 119
- Vondráková Z, Krekule J, Macháčková I (1998) Is the effect on flowering of *Chenopodium rubrum* mediated by cytokinins? *J Plant Growth Regul* 17: 115 - 119
- Wagner E, Normann J, Albrechtova JTP, Walzysko P, Bonzon M, Greppin H (1998) Electrochemical-hydraulic signalling on photoperiodic control of flowering: is „florigen“ a frequency-coded electric signal?. *Endocytosis Cell Research* 12:204 - 216
- Werner T, Motyka V, Strnad M, Schmulling T (2001) Regulation of plant growth by cytokinin. *PNAS* 98 (18): 10487 – 10492

- Xu Y-L, Gage DA, Zeevaart JAD (1997) Gibberellins and stem growth in *Arabidopsis thaliana* - effects of photoperiod on expression of the GA4 and GA5 loci. *Plant Physiol* 114 (4): 1471 - 1476
- Yong W, Chong K, Xu Z, Tan K, Zhu Z. (2000) Gene control of flowering time in higher plants. *Chinese Science Bulletin* 45:1633 - 1642
- Yu S-M (1999) Cellular and genetic responses of plants to sugar starvation. *Plant Physiol* 121: 687 - 693
- Zeevaart (1976). Citováno v McDaniel (1980), v článku chyběla citace
- Zeevaart J (1958) *Mededelingen Landbouwhogeschool Wageningen* 58: 1 – 88 citováno v Procházka et al. 1997
- Zhang K, Letham DS, John PCL (1996) Cytokinin controls the cell cycle at mitosis by stimulating the tyrosine dephosphorylation and activation of p34<sup>cdc2</sup>-like H1 histone kinase. *Planta* 200: 2 - 12