

Univerzita Karlova

Přírodovědecká fakulta

Katedra fyziologie rostlin

**Vliv deficitu minerální výživy na indukci
kvetení u *Arabidopsis thaliana***

The effect of mineral nutrient deficiency on flower
induction in *Arabidopsis thaliana*

diplomová práce

Jana Seňková

Praha 2008

Vedoucí diplomové práce

Mgr. Jan Kolář, Ph.D

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci zpracovala samostatně pod vedením
Mgr. Jana Koláře, Ph.D., s použitím citované literatury.

V Praze dne 5. 8. 2008

Jiřina

Práce vznikla v rámci grantového projektu KJB600380510:

název projektu: Indukce kvetení abiotickými stresy u rostlin *Arabidopsis thaliana* a *Chenopodium rubrum*

doba řešení: 2005-2007

grantová agentura: Grantová agentura Akademie věd ČR

Na tomto místě bych chtěla poděkovat vedoucímu mé diplomové práce Mgr. Janu Kolářovi, Ph.D za odborné vedení, cenné rady a vydatnou pomoc při sepsání této diplomové práce. Dále děkuji paní Janě Kališové za technickou pomoc při experimentech a PhDr. Martinu Prátovi, Ph.D za pomoc s formální úpravou textu. Mé poděkování patří také mým rodičům za podporu během studia a celé katedře fyziologie rostlin za umožnění vypracování této diplomové práce.

Seznam použitých zkratek

ABA	kyselina abscisová
ACC	kyselina 1-aminocyklopropan-1-karboxylová
AGL	AGAMOUS-LIKE
ANOVA	analýza rozptylu
ATP	adenosintrifosfát
CDF1	CYCLING DOF FACTOR
CO	CONSTANS
Col	Columbia
COP1	CONSTITUTIVELY PHOTOMORPHOGENIC
CRY2	CRYPTOCHROME 2
FKF1	FLAVIN BINDING KELCH REPEAT F-BOX 1
FLC	FLOWERING LOCUS C
FLD	FLOWERING LOCUS D
FLK	FLOWERING LATE KH MOTIF
FPF1	FLOWERING PROMOTING FACTOR 1
FRI	FRIGIDA
FT	FLOWERING LOCUS T
GA	kyselina giberelinová
GAI	GIBBERELIC ACID INSENSITIVE
GI	GIGANTEA
LD	LUMINIDEPENDENS
Ler	Landsberg erecta
LFY	LEAFY
MAF	MADS AFFECTING FLOWERING
mRNA	informační ribonukleová kyselina
NADH	redukovaná forma nikotinamidadenindinukleotidu
NADP	redukovaná forma nikotinamidadenindinukleotidfosfátu
PFT1	PHYTOCHROME AND FLOWERING TIME 1
PHYA	PHYTOCHROME A
PIE1	PHOTOPERIOD INDEPENDENT EARLY FLOWERING 1
PRR	pseudo-response regulátor
RGA	REPRESSOR OF GAI-3
RNA	ribonukleová kyselina
SA	kyselina salicylová
Sf-2	San Feliu-2
SOC1	SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS 1
SPA	SUPPRESSOR OF PHYA

UV

VIP

VRN

ZTL

ultrafialové záření

VERNALISATION INDEPENDENCE

VERNALISATION

ZEITLUPE

Obsah

1	Úvod.....	8
2	Přehled literatury.....	9
2.1	Regulace květní indukce	10
2.1.1	Fotoperiodická dráha	11
2.1.2	Vernalizační dráha.....	12
2.1.3	Autonomní dráha	15
2.1.4	Giberelinová dráha	16
2.1.5	Integrace regulačních drah.....	17
2.2	Stresové faktory, ovlivňující indukci kvetení.....	19
2.2.1	Kvalita světla	21
2.2.2	Ultrafialové záření	22
2.2.3	Zasolení	23
2.2.4	Nízké teploty.....	25
2.2.5	Deficit minerální výživy.....	26
2.3	Minerální výživa.....	28
2.3.1	Minerální živiny	28
2.3.2	Deficit	31
2.3.3	Stručný přehled významu jednotlivých živin a projevu jejich deficitu 33	
3	Materiál a metody	47
3.1	Materiál	47
3.2	Hydroponie.....	47
3.2.1	Médium.....	47
3.2.2	Kultivace v plastových krabičkách.....	49
3.2.3	Kultivace v plastových vaničkách na Grodanu	50
3.2.4	Kultivace v plastových vaničkách na agaru	53
3.3	Pěstování v půdě.....	54
3.4	Měření	55
3.5	Statistické zpracování dat.....	55
4	Výsledky	57
4.1	Optimalizace.....	57
4.1.1	Kultivace v plastových krabičkách.....	57
4.1.2	Kultivace v plastových vaničkách na Grodanu	59
4.1.3	Vliv hnojení na morfologii květů	63
4.1.4	Kultivace v plastových vaničkách na 1% agaru	70
4.1.5	Kultivace v plastových vaničkách na 1%, 1,5% a 2% agaru.....	73

4.2	Vliv nedostatku živin na indukci kvetení	78
4.2.1	Vliv časování změny minerální výživy	78
4.2.2	Vliv deficitu živin na kvetení u různých ekotypů při aplikaci 1000× zředěného média	84
4.2.3	Vliv deficitu živin na kvetení u různých ekotypů při aplikaci 100× zředěného média	91
5	Diskuze	98
6	Souhrn.....	110
7	Abstrakt.....	112
8	Seznam literatury	114

1 Úvod

Vyšší rostliny jsou přisedlé organismy, nejsou tedy schopné migrace a úniku před nepříznivými vlivy, jako například živočichové. Proto si musely během evoluce vytvořit adaptace k přizpůsobení těmto vlivům. Jejich růst a vývoj je tak regulován nejen autonomními mechanismy, ale také odpověďmi na vnější podněty.

Úspěšná reprodukce krytosemenných rostlin závisí na tom, zda vykvetou ve vhodnou dobu a za vhodných podmínek. Kvetení je proto regulováno řadou vnějších a vnitřních signálů. Mechanismy reakce na tyto signály jsou zkoumány především u modelové rostliny *Arabidopsis thaliana*. U té byly popsány čtyři hlavní dráhy regulující kvetení (vernalizační, fotoperiodická, giberelinová a autonomní). Kromě nich je však kvetení ovlivňováno i dalšími faktory, včetně některých abiotických stresů. K nim patří například sucho, příliš vysoká či nízká teplota, zastínění nebo nedostatečná výživa.

Vliv nedostatku minerální výživy na kvetení zatím není dostatečně prostudován. Proto byl za hlavní téma této práce zvolen vliv deficitu minerální výživy (konkrétně skokového snížení dostupnosti živin) na indukci kvetení u *Arabidopsis thaliana*.

Úkoly práce byly následující:

1. Vytvořit systém kultivace *Arabidopsis thaliana* použitelný ke studiu vlivu deficitu minerální výživy.
2. Popsat vliv snížení úrovně minerální výživy během kultivace na indukci kvetení.
3. Navrhnout modelový systém pro další výzkum role nutričního stresu v regulaci kvetení.

2 Přehled literatury

Vyšší rostliny jsou přisedlé organismy, které rostou a reprodukují se na místě, kde vyklíčily. Na rozdíl od živočichů se většina rostlin vyvíjí postembryonicky a jsou velmi citlivé na vnější podmínky. Vývoj rostlin proto není předem determinován, ale vykazuje širokou plasticitu založenou na neustálých úpravách vývojové regulace podle vnějších podmínek. Jedním z nejdůležitějších faktorů v životním cyklu rostlin je časování přechodu k reprodukci (v případě krytosemenných rostlin ke kvetení). K úspěšné reprodukci je nutné optimální časování iniciace reprodukčního vývoje. Tento výběr vyžaduje existenci molekulárních mechanismů, které kontinuálně monitorují vnější faktory a adekvátně na ně reagují. Množství vnějších faktorů ovlivňuje čas kvetení (Bernier a Perilleux, 2005). Nejvýznamnější z nich jsou světlo a teplota. Tyto dva faktory se v rámci roku pravidelně mění (Ausín et al., 2005).

Dobu kvetení mohou modulovat v závislosti na druhu také další faktory, např. abiotické stresy jako sucho, příliš vysoká či nízká teplota, zastínění, vítr nebo nedostatečná výživa (Bernier *et al.*, 1993).

Obecně můžeme rozlišit mezi rostlinami, které dokončí svůj cyklus během roku (jednoleté rostliny) a rostlinami, které žijí více než jeden rok (dvouleté nebo víceleté). Jednoleté a dvouleté druhy kvetou jen jednou během svého životního cyklu. I mezi víceletými rostlinami jsou druhy, které kvetou jednou během životního cyklu (monokarpické), nebo druhy, které kvetou každý rok, jakmile dosáhnou dospělosti (polykarpické). U jednoletých druhů, jako *Arabidopsis thaliana*, je květní iniciace, definovaná jako morfologické změny, během kterých se mění vegetativní meristémy na generativní, okamžitě následována tvorbou květů. Tudíž květní iniciace může být považována za klíčový regulační bod, na němž závisí zajištění kvetení a tvorby plodů ve

vhodném čase (Ratclif *et al.*, 1999). V tomto přechodu ke kvetení se obvykle ještě rozlišují dvě fáze: indukce zahrnuje molekulární a fyziologické procesy vyvolané vhodnými podněty (např. délkou dne); tyto procesy následně vyvolají evokaci, tedy vlastní morfologické změny květního meristému (Evans, 1975; Glover, 2007).

U polykarpických víceletých rostlin lze běžně najít zpoždění mezi iniciací kvetení a vývojem květů a tudíž jak časování iniciace květního meristému, tak rašení pupat jsou nepochybně cíli selekčního tlaku. Navíc u polykarpických a monokarpických víceletých rostlin se musí citlivost na vnější signály měnit během vývoje rostliny, například k zabránění kvetení před dosažením dospělosti (Lacey, 1986).

Kromě vnějších faktorů jsou za vývoj rostliny zodpovědné i vnitřní faktory (u *Arabidopsis thaliana* kapitola 2.1.3, 2.1.4) a jejich kombinace s vnějšími (kapitola 2.1.5).

Tématem práce je vliv deficitu minerální výživy na indukci kvetení. Přesné nároky rostlin na minerální výživu jsou důležitou informací při provádění výzkumů zabývajících se jejím deficitem. Jejich přehled je proto uveden v kapitole 2.3.

2.1 Regulace květní indukce

Protože experimenty v této práci byly prováděny s *Arabidopsis thaliana*, budou zde shrnuty výsledky výzkumů u tohoto modelového druhu. Genetické analýzy u *Arabidopsis thaliana* umožnily identifikaci mnoha genů, které jsou zahrnuty v regulaci kvetení (Mouradov *et al.*, 2002). Na základě různých fenotypů mutantů, kteří mají poškozenou regulaci kvetení, byly popsány čtyři hlavní, částečně nezávislé dráhy. Jsou to: fotoperiodická, autonomní, vernalizační a giberelinová.

2.1.1 Fotoperiodická dráha

Fotoperiodická dráha obsahuje geny, jejichž hlavní funkcí je podpořit kvetení při vhodné fotoperiodě, tedy délce dne (Koornneef *et al.*, 1991). Zahrnuje geny, které kódují fotoreceptory, jako *PHYTOCHROME A (PHYA)*, *CRYPTOCHROME 2 (CRY2)*, složky cirkadiálního oscilátoru, geny spojené s cirkadiálním oscilátorem jako *GIGANTEA (GI)* (Fowler *et al.*, 1999) a transkripční regulátor *CONSTANS (CO)* (Puterill *et al.*, 1995).

Většina genů, které jsou zahrnuté ve fotoperiodické dráze, vykazuje cirkadiální regulaci exprese (Fowler *et al.*, 1999). Z toho lze vyvodit, že cirkadiální oscilátor má na regulaci fotoperiodické dráhy velký vliv. Jedním z výstupů cirkadiálního oscilátoru je GI. Vliv GI na kvetení je zprostředkován CO, neboť *gi* mutanti mají sníženou hladinu CO mRNA v porovnání s divokým typem (Suárez-López *et al.*, 2001). Exprese CO je také cirkadiálně regulovaná. Na dlouhém dni je vysoká hladina CO mRNA dosažena před setměním a zůstává až do svítání (Suárez-López *et al.*, 2001), takže se vysoká hladina CO mRNA překrývá se světelnou částí dne. Protein CO, který je stabilní pouze na světle, tak může aktivovat expresi *FT* a *SOC1* a tím podporovat kvetení. Naproti tomu na krátkém dnu je hladina CO mRNA vysoká pouze během noci a protein CO se tudíž nemůže hromadit (Imaizumi *et al.*, 2005).

Na regulaci stability proteinu CO se podílí mnoho faktorů. Ovlivňují ji například proteiny CONSTITUTIVELY PHOTOMORPHOGENIC (COP1), SUPPRESSOR OF PHYA (SPA) a ZEITLUPE (ZTL) (Seijo *et al.*, 2003; Bauer *et al.*, 2004).

Kvetení ovlivňuje rovněž vlnová délka světla: zatímco modré a dlouhovlnné červené světlo kvetení u *Arabidopsis* podporuje prostřednictvím PHYA, CRY1 a

CRY2, červeným světlem aktivovaný PHYB přechod ke kvetení zpomaluje (Guo *et al.*, 1998; Valverde *et al.*, 2004). V souladu s tím na modrém nebo dlouhovlnném červeném světle se CO stabilizuje, kdežto na červeném světle nebo tmě je CO degradován (Valverde *et al.*, 2004).

Hladina proteinu CO je kromě regulace stability ovlivňována také na transkripční úrovni. Transkripci CO regulují *FLAVIN BINDING KELCH REPEAT F-BOX 1 (FKF1)* a *GI* (Fowler *et al.*, 1999, Imaizumi *et al.*, 2003). FKF1 zprostředkuje degradaci CYCLING DOF FACTOR (CDF1), což je represor CO (Imaizumi *et al.*, 2005). Kromě toho komplex FKF1-GI je nutný k regulaci exprese CO (Niwa *et al.*, 2007, Sawa *et al.*, 2007).

Také pseudo-response regulátory PRR9, PRR7 a PRR5 aktivují expresi CO tím, že inaktivují represor *CDF1* (Nakamichi *et al.*, 2007). Na dlouhém dnu je hladina proteinu CDF1 na začátku dne vysoká a zabraňuje expresi CO. Na světle FKF1 destabilizuje protein CDF1. To umožní zvýšení hladiny CO mRNA před setměním.

2.1.2 Vernalizační dráha

Působení nízkých teplot trvajících několik týdnů u některých druhů rostlin umožňuje, případně urychluje kvetení. Například některé ekotypy *A. thaliana* kvetou později, pokud nebyly 4-8 týdnů vystaveny nízkým teplotám (Michaels a Amasino, 2000). Požadavek vernalizace je reprodukční strategie, která po vyklíčení na podzim zajišťuje přezimování ve vegetativní fázi a kvetení na jaře, ve vhodnějších podmínkách.

FLOWERING LOCUS C (FLC) je represor kvetení. Exprese *FLC* koreluje s požadavkem na vernalizaci (Michaels a Amasino, 1999). Akumulaci FLC podporuje hlavně FRIGIDA (FRI) a potlačuje ji vernalizační dráha (Simpson a Dean, 2002).

Nízké teploty jsou vnímány ve vzrostném vrcholu stonku, kde se uchovává informace o prodělané vernalizaci i dlouhou dobu po skončení nízkých teplot. Molekulární analýzy dvou genů, *VERNALISATION 1 (VRN1)* a *VERNALISATION 2 (VRN2)*, a jejich vliv na expresi *FLC* naznačují, že základem „pamatování si“ vernalizace jsou epigenetické změny ve struktuře chromatinu na lokusu *FLC*.

Ačkoliv mutanti *vrn1* a *vrn2* jsou schopni vnímat chlad a reagovat na něj snížením hladiny *FLC* mRNA, nedovedou si prodělanou expozici chladu „pamatovat“. Po návratu do vyšších teplot se hladina *FLC* mRNA vrací na původní úroveň (tj. na úroveň před vernalizací).

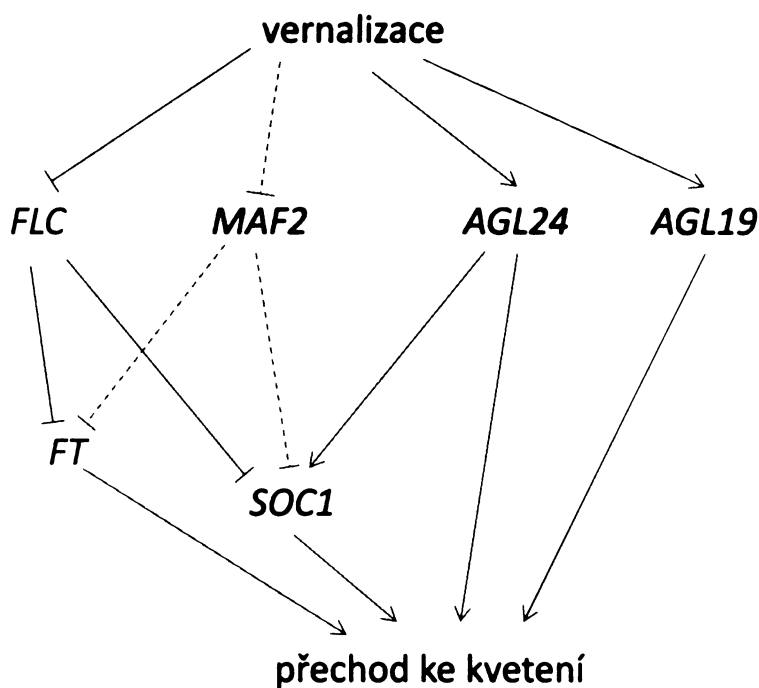
VRN2 kóduje zinc-finger protein, který je podobný PcG proteinům u *Drosophila melanogaster*. Tyto proteiny jsou složkou komplexu, který potlačuje expresi genu tím, že udržuje chromatin ve stavu, v němž nemůže dojít k transkripci. Tento stav je udržován po mitotickém, ale ne po meiotickém dělení buňky. Předpokládá se tudíž, že *VRN2* udržuje represi *FLC*, která byla indukovaná vernalizací. Udržet chromatin v neaktivním stavu dále pomáhají *VRN1* a *LHP1* (Levy *et al.*, 2002; Mylne *et al.*, 2006).

Pokud je výsledkem vernalizace to, že chromatin *FLC* je transkripčně neaktivní, měly by existovat i geny s opačnou funkcí, tedy udržovat chromatin před vernalizací v aktivním stavu. Kromě již zmíněného genu *FRI* byla identifikována řada dalších časně kvetoucích mutantů, kteří měli redukovanou expresi *FLC*. Geny, které jsou za to zodpovědné, by mohly být aktivátory *FLC*. Například *PHOTOPERIOD INDEPENDENT EARLY FLOWERING 1 (PIE1)* aktivuje expresi *FLC* tím, že udržuje aktivní chromatinovou konformaci. V aktivaci *FLC* je zahrnutá také skupina sedmi genů, *VERNALISATION INDEPENDENCE 1-7 (VIP1-VIP7)* (Zhang a Knocker, 2002).

Ačkoliv *FLC* je hlavní cíl vernalizační dráhy, pokusy s *flc*-null mutanty naznačují, že existují i další cíle (Michaels a Amasino, 2000).

Kromě *FLC* jsou vernalizací regulovány i geny *MADS AFFECTING FLOWERING (MAF)*. Vernalizace potlačuje expresi *MAF2* a *MAF3* a naopak aktivuje *MAF5* (Ratcliffe *et al.*, 2003; Sung a Amasino, 2006). Nejspíše potlačuje i expresi *MAF1*. Omezení exprese tohoto genu přispívá k urychlení kvetení při zvýšení teploty (Werner *et al.*, 2005), ale jeho funkce v reakci na vernalizaci ještě nebyla potvrzena (Sung *et al.*, 2006). *MAF2* zabraňuje kvetení po krátkém období nízkých teplot. *MAF2* pravděpodobně, stejně jako *FLC*, potlačuje expresi *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS 1 (SOC1)* a *FLOWERING LOCUS T (FT)*, které podporují přechod ke kvetení. Zatím není jisté, zda i *MAF3-5* ovlivňují kvetení (Ratcliffe *et al.*, 2003).

Vernalizací jsou aktivovány také *AGAMOUS-LIKE 24 (AGL24)* a *AGAMOUS-LIKE 19 (AGL19)*, které podporují kvetení (Michaels *et al.*, 2003; Schönrock *et al.*, 2006). *AGL19*, na rozdíl od *AGL24*, neovlivňuje hladinu *SOC1*. To naznačuje, že působí na kvetení nezávisle na *SOC1* (Schönrock *et al.*, 2006) (Obr 1).



Obr 1. Vernalizační dráha u *Arabidopsis thaliana*. V této dráze byly identifikovány *FLC*-, *AGL24*- a *AGL19*-větve. Podobně jako *FLC* může i *MAF2* potlačit expresi *SOC1* a *FT*, ale zatím to nebylo zcela potvrzeno. Upraveno podle Alexandre a Henning (2008).

2.1.3 Autonomní dráha

Autonomní dráha podporuje kvetení nezávisle na délce dne a vernalizaci. Geny zahrnuté v této dráze jsou *FCA*, *FY*, *FPA*, *LUMINIDEPENDENS (LD)*, *FLOWERING LOCUS D (FLD)*, *FVE* a *FLOWERING LATE KH MOTIF (FLK)* (Redei, 1962; Koornneef *et al.*, 1991; Lim *et al.*, 2004; Mockler *et al.*, 2004). Mutanti, kteří mají poškozenou tuto dráhu, vykazují pozdní kvetení. Tito mutanti mají zachovanou schopnost reagovat na délku dne i na vernalizaci.

Stejně jako vernalizační dráha, i autonomní potlačuje expresi *FLC* a tím podporuje kvetení. Zatím se příliš neví, jak na molekulární úrovni jednotlivé geny

autonomní dráhy ovlivňují *FLC*. Experimenty naznačují, že různé geny ovlivňují expresi *FLC* různými způsoby (Veley a Michaels, 2008).

FLD spolu s FVE potlačuje expresi *FLC* pomocí deacetylase histonů na *FLC* lokusu (He *et al.*, 2003; Ausin *et al.*, 2004). Molekulární struktura FCA a FY naznačuje, že mohou regulovat hladinu *FLC* mRNA na posttranskripční úrovni. Bylo zjištěno, že *in vitro* oba proteiny spolu interagují pomocí WW domény na C-konci FCA a PPLPP zbytku na C-konci FY (Simpson *et al.*, 2003). Právě tato interakce je důležitá pro regulaci *FLC* (Quesada *et al.*, 2003).

Předpokládá se, že posttranskripčně mohou *FLC* regulovat i proteiny *FPA* (kóduje RNA-binding protein) a *FLK*, ale zatím nebyly publikovány žádné přímé důkazy, které by to spolehlivě potvrdily (Schomburg *et al.*, 2001; Veley a Michaels, 2008).

Výzkumy ukázaly, že autonomní dráha může být ovlivněna i vnějšími signály, např. teplotou (Blázquez *et al.*, 2003).

Řada pokusů s mutanty v autonomní dráze ukázala, že geny autonomní dráhy neovlivňují pouze indukci kvetení, ale i jiné aspekty růstu a vývoje, například embryonální letalitu (Marquard *et al.*, 2006; Veley a Michaels, 2008).

2.1.4 Giberelinová dráha

Rostlinné hormony ze skupiny giberelinů podporují kvetení *Arabidopsis thaliana* (Wilson *et al.*, 1992). Giberelinová cesta zahrnuje kromě giberelové kyseliny (GA) geny *GIBBERELIC ACID INSENSITIVE (GAI)*, *REPRESSOR OF GAI-3 (RGA)*

a *FLOWERING PROMOTING FACTOR 1 (FPF1)*, které mají důležitou roli v syntéze giberelinu nebo signalizaci pomocí GA (Bagnall, 1995).

Několik studií se zabývalo interakcí giberelinové dráhy s ostatními drahami, které regulují kvetení. Genetické analýzy naznačují, že GA dráha působí souběžně s fotoperiodickou dráhou. GA deficitní mutanti kvetou později než divoký typ, zvláště na krátkém dni (Wilson *et al.*, 1992). Mutanti, kteří mají poškozenou giberelinovou i fotoperiodickou dráhu na dlouhém dni nekvetou (Reeves a Coupland, 2001). To naznačuje, že na krátkém dni, kde není fotoperiodická dráha aktivní, má giberelinová dráha velký vliv na indukci kvetení a ztráta funkce této dráhy může zabránit kvetení. Na dlouhém dni je vliv porušení giberelinové dráhy mnohem menší v důsledku aktivity fotoperiodické dráhy.

Aktivitu GA dráhy ovlivňují vnitřní a pravděpodobně i vnější signály, ale jejich přesná povaha zatím není známa. GA dráha ovlivňuje kvetení tím, že zvyšuje expresi *SOC1* a *LEAFY (LFY)* (Blázquez a Weigel, 2000; Moon *et al.*, 2003).

2.1.5 Integrace regulačních drah

Regulační signály z jednotlivých drah jsou integrovány na úrovni proteinů FT a SOC1.

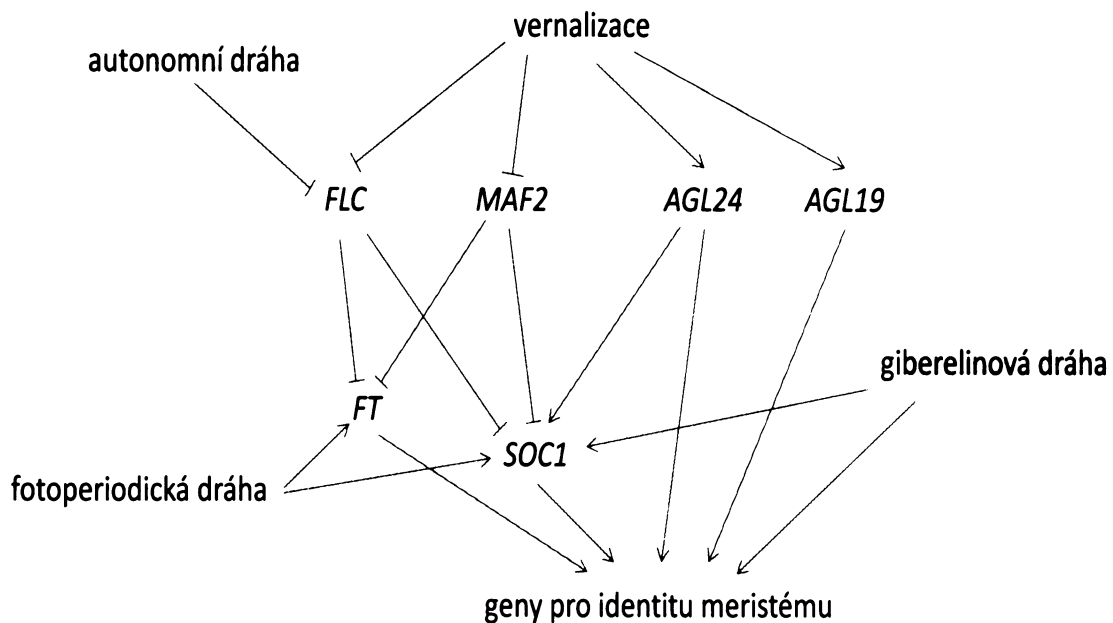
FLC je represor kvetení, jehož množství je zvyšováno proteinem FRI a naopak snižováno autonomní a vernalizační dráhou (Levy a Dean, 1998) (kapitoly 2.1.2 a 2.1.3). FLC negativně ovlivňuje expresi genů podporujících kvetení, *FT* a *SOC1* (Lee *et al.*, 2000).

Expresi *FT* je na dlouhém dni aktivována působením CO, který je součástí fotoperiodické dráhy (Hayama a Coupland, 2003). Expresi *FT* naopak inhibuje FLC a

pravděpodobně také MAF2, jehož exprese je potlačována vernalizací (Ratcliffe *et al.*, 2003). Protein FT, který je syntetizován v listech, je transportován floémem do apikálního meristému stonku. Protein FT je tedy s největší pravděpodobností totožný s předpokládaným florigenem - hormonem, který je produkován v listech a šíří se do apikálního meristému, kde indukuje kvetení (An *et al.*, 2004). V meristému interaguje s produktem genu *FD*, který je zde exprimován (Daimon *et al.*, 2004). FT a FD společně aktivují geny pro identitu meristému (Wigge *et al.*, 2005).

Expresi *SOC1* zvyšuje CO, giberelinová dráha a *AGL24* (součást vernalizační dráhy) a potlačuje ji *FLC* a *MAF2*, další člen vernalizační dráhy (Lee *et al.*, 2000; Blázquez a Weigel, 2000; Hayama a Coupland, 2003; Michaels *et al.*, 2003; Ratcliffe *et al.*, 2003).

SOC1, podobně jako FT, aktivuje geny pro identitu meristému. Tyto geny jsou také ovlivněny *AGL24* a *AGL19* (Ratcliffe *et al.*, 1999) (Obr 2). Těmito geny jsou *API* a *LFY*.



Obr 2. Schéma ukazující vztahy mezi drahami, které ovlivňují kvetení u *Arabidopsis*. Upraveno podle Alexandre a Henning (2008).

2.2 Stresové faktory, ovlivňující indukci kvetení

Kromě již zmíněných drah ovlivňují kvetení i různé další faktory, včetně některých stresů. Rostliny vystavené stresovým podmínkám mohou někdy iniciovat kvetení opožděně nebo naopak předčasně.

Určité abiotické stresy mohou významně podporovat kvetení rostlin v jejich přirozeném prostředí. Některé trvalky žijí v prostředí, kde stresové podmínky nastávají pravidelně, v předvídatelném čase v roce a mohou sloužit jako indikátory roční doby. Například diferenciaci květních pupat u některých subtropických stromů začíná

v suchém, chladném období. Podpůrný efekt sucha na kvetení byl dobře dokumentovaný u rodu *Citrus* (Monselise, 1985). Kvetení některých jednoletých rostlin je také přímo podporováno abiotickým stresem. Salinita a sucho urychlují např. přechod ke kvetení u pouštní rostliny *Mesembryanthemum crystallinum* (Adams *et al.*, 1998).

Urychlení kvetení působením stresu může v jiných případech představovat strategii vyhnutí se nepříznivým podmínkám: Rostliny předčasně vytvoří semena, která jsou schopna nejlépe přežít období nepříznivé pro růst. Tato květní odpověď na některé stesy byla popsána u řady rostlin.

Většina dostupných dat se váže k fotoperiodicky citlivým druhům, které kvetou po vystavení stresu i při neinduktivní nebo suboptimální fotoperiodě. Například krátkodenní rostlina *Perilla crispa* kvete i na stálém světle, když je pěstovaná ve zředěném nebo na dusík deficitním médiu (Wada a Totsuka, 1982). Kvetení jiné krátkodenní rostliny, *Pharbitis nil*, bylo indukováno na stálém světle za podmínek nutričního stresu, který byl vyvolán kultivací v běžné pitné vodě místo živného roztoku nebo v malých nádobkách, které limitovaly růst kořenů (Shinozaki, 1985).

V dalších pracích bylo objeveno, že kvetení tří druhů *Chenopodium* je ovlivněno stesy: Kvetení *C. foetidum* nebylo ovlivněno fotoperiodou, ale bylo silně urychleno omezenou dostupností živin (Cumming, 1967). Teplo nebo chlad aplikované na kořeny u krátkodenního *C. polyspermum* podpořily kvetení na dlouhém dni po částečné indukci krátkým dnem (Chamont *et al.*, 1982). Kvetení *C. rubrum* je výrazně stimulováno zasolením a nízkou teplotou v interakci s částečnou fotoperiodickou indukcí. Aplikace 200mM NaCl do živného roztoku krátce před slabou fotoperiodickou indukcí (6h tmy) zvýšila kvetení pětidenních rostlin z 0 - 20% na 55 - 65% jedinců. Sucho a nízká teplota rovněž stimuluje kvetení *C. rubrum*, zatímco vysoká teplota a deficit minerální výživy jej potlačují (Kolář, osobní sdělení).

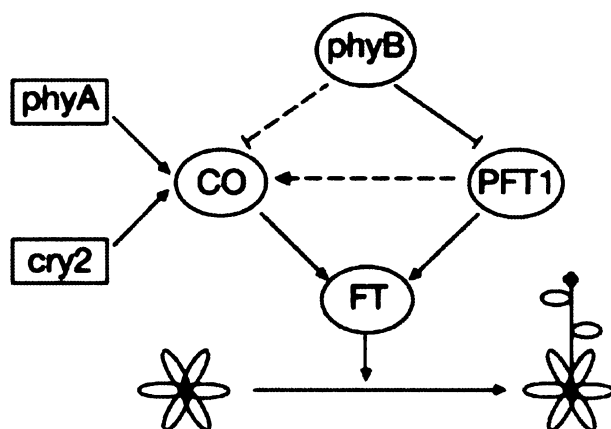
Následující kapitoly jsou věnovány stresovým faktorům, které ovlivňují indukci kvetení u *Arabidopsis thaliana*.

2.2.1 Kvalita světla

Rostliny rostoucí pod hustým zápojem jsou ovlivněny změnou kvality světla. Světlo odražené od zelené vegetace obsahuje méně modrého a červeného záření, ale je relativně bohaté na zelené a dlouhovlnné červené záření. Tím se snižuje poměr červeného k dlouhovlnnému červenému (R:FR) záření. Tyto změny v kvalitě světla mohou spustit sérii odpovědí, které jsou souhrnně označovány jako shade-avoidance syndrom. Při něm dochází k prodlužování stonku a řapíků. Velmi důležitou součástí shade-avoidance syndromu je také urychlení nástupu kvetení (Halliday *et al.*, 1994). U *Arabidopsis thaliana* důležitou roli v shade-avoidance syndromu hrají fytochromy phyB, phyD a phyE (Whitelam *et al.*, 1998).

Cerdán a Chory (2003) identifikovali PHYTOCHROME AND FLOWERING TIME 1 (PFT1), protein, pomocí kterého by mohl phyB působit na kvetení. Tím doplnili tzv. light-quality dráhu, pomocí které Simpson a Dean (2002) vysvětlovali vliv phyB a dalších fytochromů na kvetení u *Arabidopsis*. PFT1 reguluje expresi *FT* a tím indukuje kvetení jako odpověď na suboptimální světelné podmínky.

CO je klíčová složka fotoperiodické dráhy, která integruje informace z cirkadiálního oscilátoru i phyA a phyB (Suarez *et al.*, 2001). PFT1 neovlivňuje expresi *CO*, proto může regulovat hladinu *FT* mRNA mechanismem, ve kterém není *CO* zahrnut (Cerdán a Chory, 2003). Tudíž phyB ovlivňuje kvetení pomocí PFT1, který působí na expresi *FT*, a to cestou nezávislou na *CO* (**Obr 3**).



Obr 3. Model navrhuje umístění PFT1 v light-quality dráze, která reguluje kvetení. Kromě přímé regulace FT pomocí CO, ostatní šipky nerepresentují přímou regulaci nebo vliv. Podle Cerdán a Chory (2003).

2.2.2 Ultrafialové záření

Ultrafialové záření můžeme rozdělit na 3 typy: UV-C s vlnovými délkami 200-280 nm, UV-B s vlnovými délkami 280-320 nm a UV-A, které má vlnové délky 320-380 nm. Obecně je působení UV záření vždy škodlivé, čím jsou vlnové délky kratší, tím je záření škodlivější.

Po ozáření rostlin UV-C zářením vzrůstá hladina salicylové kyseliny (SA) (Yalpani *et al.*, 1994). Vlivem UV-C záření na přechod z vegetativní do generativní fáze u *Arabidopsis* se zabývali Martínez *et al.* (2004). Porovnávali čas potřebný k vykvetení u ozářených a neozářených rostlin, a to jak u divokého typu, tak u nahG rostlin, které nejsou schopné akumulovat SA. Zjistili, že UV-C záření urychluje přechod ke kvetení u

divokého typu, ale ne u nahG rostlin. To naznačuje, že k přechodu k reprodukční fázi, který je urychlen UV-C zářením, je nutná schopnost syntetizovat a akumulovat SA.

2.2.3 Zasolení

Zasolené půdy se vyskytují nejen v blízkosti moře, ale i ve vnitrozemských oblastech, kde potenciální výpar převažuje nad srážkami. K zasolení může dojít také v okolí komunikací posypávaných solí v zimním období.

Problémy, kterým rostliny musí čelit při růstu na zasolených půdách jsou komplexní povahy. Kromě vlastního toxického vlivu vysoké koncentrace některých iontů to bývá nízký vodní potenciál a zhoršené fyzikální vlastnosti půdy. Vysoká salinita omezuje příjem vody kořeny, poškozuje fyziologii buněk a zpomaluje růst (Zhu, 2002).

U rostlin *A. thaliana* ekotypu Col vystavených zasolení došlo ke zpomalení kvetení. Rostliny, které byly pravidelně zalévány 200mM NaCl, měly dobu od výsevu do objevení pupat téměř o 25% delší, než kontrolní rostliny zalévané pouze vodou (Achard *et al.*, 2006).

Vliv zasolení na indukci kvetení je u *A. thaliana* patrně zprostředkován pomocí DELLA proteinů. Tyto proteiny omezují růst rostlin v nepříznivých podmínkách. Gibberelin stimuluje růst tím, že podporuje destrukci DELLA proteinů, podobně působí i auxin (Peng *et al.*, 1999).

Achard *et al.* (2006) připravili čtyřnásobný *DELLA* mutant, jehož růst je méně inhibovaný zasolením, než růst divokého typu. Zjistili, že u divokého typu se v důsledku zasolení snižuje hladina bioaktivních gibberelinů (GA₁ a GA₄). Zasolení tedy zpomaluje růst mechanismem, který je závislý na DELLA, a který je spojený se

snížením akumulace giberelinů: snížená akumulace GA způsobí zvýšené hromadění DELLA proteinů a ty inhibují růst.

DELLA proteiny zpožďují kvetení, zejména na dlouhém dni (Achard *et al.*, 2004). Divoký typ rostlin vystavený vysoké salinitě kvete později, zatímco *DELLA* mutanti dříve než rostliny, které vyšší salinitě vystaveny nebyly. Tudíž zasolení prodlužuje vegetativní fázi působením mechanismu závislým na *DELLA*.

Achard *et al.* (2006) zjistili, že při vysoké salinitě je hladina CO mírně snížená, FLC zvýšená, zatímco na SOC1 a FT nemá zasolení žádný vliv. Hladina LFY byla výrazně snížena. Na základě tohoto zjištění i dalších pokusů vyvodili, že zasolení zpožďuje kvetení dvěma různými mechanismy: 1) Zasolení pomocí DELLA proteinů prodlužuje vegetativní fázi a tím zpomaluje přechod ke kvetení. 2) Zasolení pomocí DELLA proteinů udržuje relativně nízkou hladinu LFY, čímž inhibuje kvetení.

Stresovou odpověď na zvýšenou salinitu spouští zvýšená hladina kyseliny abscisové (ABA) a z toho vyplývající aktivace signální dráhy ABA (Zhu, 2002). ABA zpožďuje kvetení alespoň z části způsobem, který je závislý na DELLA (Achard *et al.*, 2006).

Dalším fytohormonem, který signalizuje nepříznivé podmínky, je etylen. Achard *et al.* (2006) zjistili, že zasolení způsobuje zvýšenou expresi genu pro ACC syntázu (ACC = 1-aminocyklopropan-1-karboxylová kyselina). ACC syntáza je důležitá pro syntézu etylenu. Tudíž se při zvýšené salinitě zvyšuje hladina etylenu, který inhibuje růst.

Z toho vyplývá, že zasolení prodlužuje trvání vegetativní fáze aktivací dvou nezávislých cest, ABA a etylenové. Obě tyto dráhy snižují mimo jiné hladinu bioaktivních giberelinů, čímž dochází k akumulaci DELLA proteinů (Achard *et al.*, 2006).

2.2.4 Nízké teploty

Arabidopsis thaliana je rostlina, která je poměrně tolerantní vůči nízkým teplotám, může růst a dospět i při teplotách 4-5⁰C (Schneider *et al.*, 1995). Její kvetení může být urychleno dlouhým pobytem v nízkých teplotách (tj. vernalizací). Krátké vystavení nízkým teplotám může působit i jako stresový faktor.

Vlivem nízkých teplot na kvetení různých ekotypů *Arabidopsis* se zabývali Hasdai *et al.* (2006). Rostliny začaly kvést po 25-34 dnech při 22⁰C, 37-50 dnech při 14⁰C a 93-119 dnech při 6⁰C. Z toho je vidět, že existuje korelace mezi teplotou a dobou, po které rostliny začnou kvést.

Nejlépe prostudovaný systém, který hraje roli v aklimaci na nízké teploty, je dráha nazývaná CBF cold response. Geny *CBF* jsou indukovány nízkou teplotou a jsou zahrnuty v regulaci genů reagujících na chlad ze třídy DRE/CRT. Kromě této dráhy existují i jiné dráhy regulující reakci na chlad (Jaglo-Ottosen *et al.*, 1998).

Protein *GI* reguluje kvetení (kapitola 2.1.1), ale také ovlivňuje toleranci k nízkým teplotám. Expres *GI* je indukována chladem. Mutanti *gi* mají navíc sníženou toleranci vůči chladu a horší schopnosti aklimace. *GI* způsobuje toleranci vůči chladu cestou, která nezahrnuje *CBF* (Shuqing *et al.*, 2005).

Zajímavé je, že *GI* podporuje kvetení (Park *et al.*, 1999) a zároveň expres *GI* je indukována chladem (Shuqing *et al.*, 2005), avšak Hasdai *et al.* (2006) objevili, že chlad zpomaluje přechod ke kvetení. Je patrné, že vliv chladu na kvetení je zprostředkován jinými proteiny.

Kim *et al.* (2004) objevili, že tímto spojením je protein autonomní dráhy *FVE*. Rostliny vnímají nízké teploty cestou, která vyžaduje *FVE* a *FLC*. Působení nízkých

teplot (4⁰C) 2 až 5 hodin každý den během celé růstové periody zvyšuje hladinu FLC a následně snižuje expresi *SOC1*, a tím podstatně oddaluje kvetení. Rostliny Col, které byly v těchto podmínkách pěstovány, měly při objevení pupat o 5 primárních listů v růžici více, než rostliny, které nízkým teplotám vystaveny nebyly (Kim *et al.*, 2004).

2.2.5 Deficit minerální výživy

Několik autorů zkoumalo u *Arabidopsis thaliana* vliv deficitu minerálních živin na různé ukazatele související s indukcí kvetení. Pigliucci a Schlichting (1998) pěstovali pozdně i časně kvetoucí genotypy v půdě chudé na živiny, a dále v substrátech, které obsahovaly živin dostatek. Množství dostupných živin se postupně během experimentu snižovalo. Snižování množství dostupných živin během experimentu napodobovalo spotřebovávání živin pocházejících z mateřské rostliny. Doba, po které nastalo kvetení, nebyla ovlivněna stresem z nedostatku živin. Avšak byla zřejmá korelace mezi počtem listů v růžici přítomných při rozkvětu a množstvím živin. Rostliny, které měly k dispozici méně živin, měly při rozkvětu méně listů.

Tato necitlivost absolutního času potřebného k přechodu z vegetativní do reprodukční fáze může být způsobena tím, že vývojové urychlení (posuzované dle počtu listů do rozkvětu) je spojeno se zpomalením celkové růstové rychlosti. Tudiž se zvýšil čas potřebný k produkci daného počtu listů (Pigliucci a Schlichting, 1998).

Práce zkoumající vliv chudé minerální výživy na čas do objevení pupat od výsevu u ekotypů Landsberg *erecta* (Ler) a Cape Verde Islands (Cvi) nezjistila rozdíly mezi rostlinami s deficitní výživou oproti kontrolním (Luquez *et al.*, 2006). Naopak v jiném výzkumu rostliny Ler (a některé jejich pozdě kvetoucí mutanty) kvetly o několik dnů později, když byly zalévány více zředěným Hoaglandovým roztokem (Van

Tienderen *et al.*, 1996). K podobným výsledkům dospěly i další výzkumy ekotypů *Arabidopsis thaliana*. Zhang a Lechowicz (1994) zjistili u většiny z jimi sledovaných 13 ekotypů *Arabidopsis* kvetení o několik dnů později, když byly zalévány 10% Hoaglandovým roztokem, oproti použití 100% roztoku. Při testování deficitu výživy u čtyř ekotypů zpožďovala nízká hladina živin kvetení u třech z nich, zatímco u jednoho (Ler) došlo k mírnému urychlení (Pigliucci *et al.*, 1995). Ke značným ekotypovým rozdílům v reakci na deficit výživy dospěla i studie zkoumající 26 ekotypů *Arabidopsis thaliana*. Zatímco kvetení většiny bylo zpomalené, u jiných nebyl prokázán žádný vliv redukce výživy a u některých naopak urychlení kvetení (Pigliucci a Schlichting, 1995).

O mechanismech působení nedostatku minerální výživy na indukci kvetení toho zatím není příliš známo. Tato diplomová práce by mohla přispět k vytvoření modelového systému, který by mohl pomoci objasnit molekulární mechanismy regulace kvetení v závislosti na deficitu minerálních živin. V následující kapitole budou shrnuty základní znalosti o minerální výživě rostlin.

2.3 Minerální výživa

2.3.1 Minerální živiny

Prvky, které tvoří živé organizmy, se nazývají biogenní. Vedle prvků, které tvoří základ organických látek, uhlík (C), vodík (H) a kyslík (O), obsahují rostliny řadu dalších prvků, které se v přírodě vyskytují především ve sloučeninách anorganických a označují se jako minerální prvky. Většina z těchto prvků plní v rostlině specifické úlohy, účastní se metabolických procesů nebo slouží k vytváření funkčních struktur (Pavlová, 2005).

To, že jisté prvky jsou přítomny v rostlinách, ještě neznamená, že tyto prvky hrají podstatnou roli v životě rostlin a tudíž že jsou esenciální. Definice esenciálního prvku byla publikována Arnonem a Stoutem (1939):

Prvek je esenciální, pokud:

- a) Jeho nedostatek znemožňuje rostlině dokončit životní cyklus.
- b) Daný prvek nemůže být nahrazen jiným prvkem a symptomy deficitu daného prvku mohou odstraněny pouze aplikací tohoto prvku.
- c) Daný prvek má v metabolismu rostlin svou funkci.

K testování toho, zda je prvek esenciální, jsou rostliny pěstovány v médiu, ve kterém je záměrně tento prvek přítomný v nedostatečném množství, nebo se v něm nevyskytuje vůbec. K tomuto účelu se používá především metoda hydroponie (Hoagland, 1948).

Časem se objevily jisté potíže s určováním esenciality prvku pouze podle definice od Arnona a Stouta (1939). První kritérium Arnona a Stouta je, že prvek je esenciální, pokud jeho nedostatek znemožňuje rostlinám dokončit životní cyklus. Avšak rostliny mohou mít poměrně velký nedostatek „esenciálního“ prvku a přesto mohou být

schopny dokončit svůj životní cyklus. Proto Epstein a Bloom (2005) upravili definici takto:

Prvek je esenciální, když splní alespoň jedno z těchto kritérií:

- 1) Prvek je součástí molekuly, která je podstatnou složkou struktury nebo metabolismu rostliny.
- 2) Absence tohoto prvku způsobuje abnormality v růstu, vývoji nebo reprodukci.

Esenciální prvky jsou obvykle děleny na makrobiogenní a mikrobiogenní, podle jejich funkčně nezbytné relativní koncentrace v rostlinných pletivech. Nicméně mnoho prvků se často vyskytuje v koncentraci vyšší, než je minimum vyžadované rostlinou (Taiz a Zeiger, 2006). U různých rostlinných druhů a v různých podmínkách se koncentrace a poměr prvků liší. Na základě analýz velkého množství rostlinného materiálu byla stanovena přibližná hodnota pro každý prvek (tab. 1). Prvek je považován za makrobiogenní, pokud jeho množství v sušině je větší než 1000 mg/kg, a za mikrobiogenní, pokud je jeho množství menší než 100 mg/kg.

Název prvku	Chemická značka	Obsah prvku v sušině (mg . kg ⁻¹)	Relativní počet atomů ve srovnání s molybdenem
makrobiogenní prvky			
vodík	H	60 000	60 000 000
uhlík	C	450 000	35 000 000
kyslík	O	450 000	30 000 000
dusík	N	15 000	1 000 000
draslík	K	10 000	250 000
vápník	Ca	5 000	125 000
hořčík	Mg	2 000	80 000
fosfor	P	2 000	60 000
síra	S	1 000	30 000
křemík	Si	1 000	30 000
mikrobiogenní prvky			
chlór	Cl	100	3 000
železo	Fe	100	2 000
bór	B	20	2 000
mangan	Mn	50	1 000
sodík	Na	10	400
zinek	Zn	20	300
měď	Cu	6	100
nikl	Ni	0,1	2
molybden	Mo	0,1	1

Tab. 1. Typické obsahy jednotlivých prvků v sušině (Epstein a Bloom, 2005)

Jiné třídění navrhli Mengel a Kirkby (1987). Podle nich by se prvky měly dělit podle jejich funkce v rostlinách do čtyř skupin:

1. Dusík a síra jsou členy první skupiny esenciálních prvků. Tyto živiny jsou v rostlinách součástí uhlikatých sloučenin.
2. V druhé skupině jsou prvky, které jsou důležité v uchování energie nebo mají důležitou roli v udržování struktur. Patří sem fosfor, bór a křemík.
3. Prvky třetí skupiny jsou přítomny v rostlinných pletivech buď jako volné ionty rozpuštěné ve vodě nebo ionty elektrostaticky vázané na substanci jako kyselina galakturonová, která je přítomná v buněčné stěně rostlin.

Jsou důležité jako kofaktory enzymů a v regulaci osmotického potenciálu.

Do této skupiny patří draslík, vápník, hořčík, chlór, mangan a sodík.

4. Čtvrtá skupina, obsahující kovy jako železo, zinek, měď, nikl a molybden, má důležitou roli při přenosu elektronů.

2.3.2 Deficit

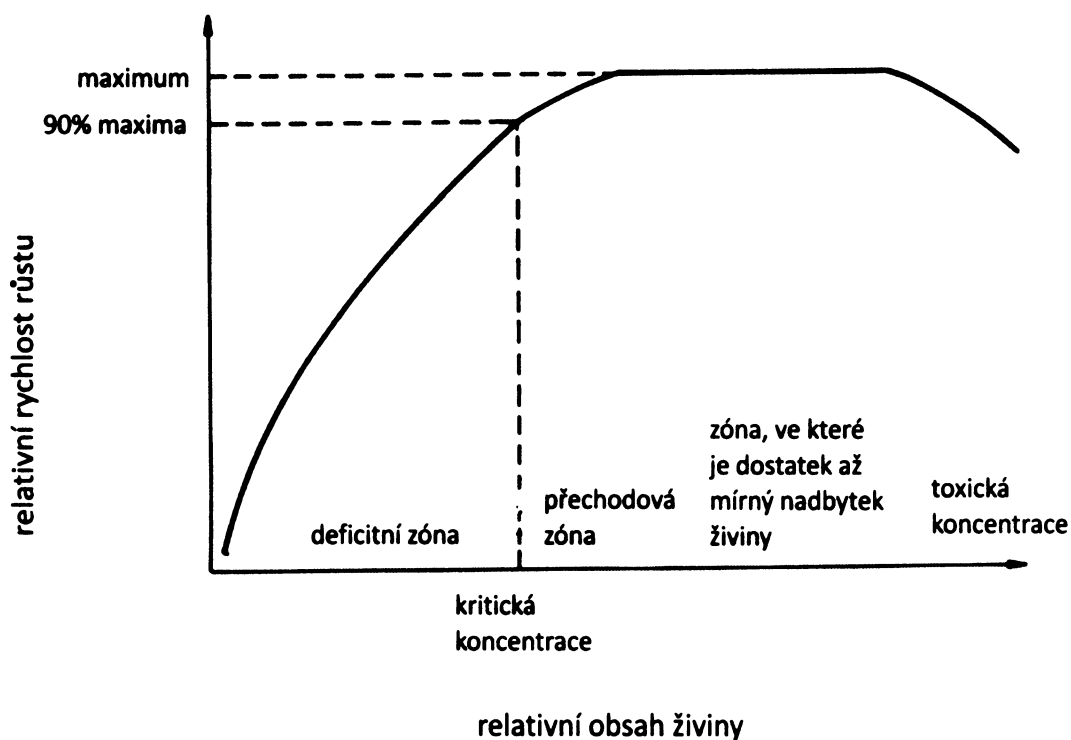
Když koncentrace esenciálního prvku v rostlinném pletivu klesne pod hladinu nutnou pro optimální růst, označuje se tento stav jako deficit daného prvku. Deficience se může vyvinout, když koncentrace prvku v půdě nebo jiném substrátu je nízká, nebo když prvek je přítomný v chemické formě, ve které ho rostliny nemohou přijmout. Někdy nastane deficit proto, že nadměrná koncentrace jiného prvku může snížit absorpci dané živiny. Takový deficit, vyplývající z „antagonistické“ činnosti jiného prvku, se může vyvinout dokonce i tehdy, když je živina přítomná v substrátu v koncentraci, která by byla adekvátní, kdyby nebyl přítomný antagonistický prvek ve vysoké koncentraci (Jarrell a Beverly, 1981).

Když je v pletivu nedostatek esenciálního prvku, dochází k rozsáhlým změnám v metabolismu a růstu rostliny. Nejprve jsou zpomaleny metabolické procesy, kterých se prvek přímo účastní. Protože každá metabolická reakce je součástí celkové velmi složité, propojené sítě, jsou postupně ovlivněny i jiné procesy, než ty, kterých se daný prvek bezprostředně účastní. Při výrazném nebo dlouhotrvajícím deficitu nakonec dojde k narušení celého metabolismu rostliny. U rostlin, které mají výrazný nebo déle trvající nedostatek nějakého esenciálního prvku, se objevuje řada více nebo méně zřetelných symptomů. Protože při deficitu dochází k narušení metabolismu, většinou se zpomalí růst rostliny a u kulturních plodin se sníží výnosy. Redukce růstu se může vyskytovat i

bez rozvoje nějakých jiných jasných symptomů deficitu, případně s velkým předstihem před nimi. Dále se nedostatek esenciálních minerálních látek může projevit specifickými změnami tvaru nebo barvy orgánů, zasycháním pletiv a poruchami vývoje. Projevy deficiencie jsou pro jednotlivé prvky značně charakteristické (Epstein a Bloom, 2005).

Při projevech deficitu jednotlivých prvků je důležité, zda prvek může být transportován ze starších listů do mladších. Některé prvky, jako dusík, fosfor a draslík, mohou být pohotově distribuovány z listu do listu. Jiné prvky, jako bór, železo a vápník, jsou u většiny rostlinných druhů relativně nepohyblivé. Když je esenciální prvek mobilní, symptomy nedostatku tohoto prvku se projevují nejprve u starších listů (Taiz a Zeiger, 2006).

Základní, velmi rozšířený koncept pro hodnocení úrovně minerální výživy je znázorněn na Obr 4. V tomto grafu závislosti růstu na koncentraci živiny v pletivech lze rozlišit čtyři zóny (Ohki, 1984). Při koncentraci prvku pod kritickou koncentrací, při které rostliny dosahují 90% maximální rychlosti růstu, se nachází deficitní zóna. V ní se s dodáváním živiny do půdy nebo jiného kultivačního média prudce zvyšuje výnos. Nad kritickou koncentrací následuje přechodová zóna. V ní se při každém dalším zvýšení absorpce živiny rostlinou adekvátně zvyšuje růst, a tak množství živiny na jednotku hmoty pletiva (koncentrace) zůstává téměř konstantní. Za přechodovou zónou již koncentrace živiny není faktor, který limituje růst a ten zůstává konstantní (zóna, ve které je dostatek až mírný nadbytek živiny). Při zvyšujícím se množství živiny v půdě rostlina dále tuto živinu přijímá a její koncentrace v pletivu stoupá. Může dosáhnout až koncentrace, která je pro rostlinu toxická (Marschner, 1995; Procházka *et al.*, 1998; Epstein a Bloom, 2005).



Obr 4. Závislost rychlosti růstu na obsahu živiny v rostlině. Upraveno podle Procházka *et al.* (1998).

2.3.3 Stručný přehled významu jednotlivých živin a projevu jejich deficitu

2.3.3.1 Makrobiogenní minerální prvky

2.3.3.1.1 Dusík (N)

Dusík je minerální prvek, který rostliny potřebují v největším množství. V rostlinách je dusík obsažen ve velkém množství různých sloučenin, v aminokyselinách, proteinech, bazích nukleových kyselin, ve sloučeninách obsahujících pyrolová jádra (např. chlorofyl), v kofaktorech NAD(P)H a ve fytohormonech. Dále se vyskytuje v sekundárních metabolitech, např. v alkaloidech. Proteinové aminokyseliny tvoří

proteiny. Neproteinové aminokyseliny jsou výchozími metabolity pro syntézu dalších látek (Pavlová, 2005).

Nedostatek dusíku v rostlině ovlivňuje řadu důležitých fyziologických pochodů. Dochází k inhibici růstu, a pokud nedostatek trvá déle, u většiny druhů se objevují chlorózy (nedostatek chlorofylu, tvorba světlých skvrn), především u starších listů blízkých bázi rostlin. Při velkém nedostatku dusíku tyto listy celé zežloutnou a odpadnou. Symptomy se objevují nejprve u starších listů, neboť dusík může být snadno distribuován ze starších do mladších, aktivně rostoucích orgánů (Epstein a Bloom, 2005).

Když nedostatek dusíku nastává postupně, rostliny mohou mít štíhlý a často dřevnatý stonek. Toto dřevnatění může být způsobeno nadbytkem uhlíkatých sloučenin, které nemohou být využity v syntéze aminokyselin nebo jiných dusíkatých sloučenin. Uhlíkaté sloučeniny nevyužité v metabolismu dusíku mohou být také využity v syntéze antokyanů a dochází k akumulaci tohoto pigmentu. To se projevuje purpurovým zbarvením listů (Taiz a Zeiger, 2006).

2.3.3.1.2 Draslík (K)

Draslík je nejčtenější kation v rostlinách. Je přijímán z půdy ve formě K^+ a v rostlině se neváže do stabilních sloučenin ani struktur, tvoří jen slabé komplexy s organickými kyselinami, z nichž se snadno uvolňuje. K^+ se významně podílí na udržování elektroneutrálnosti buněk a spolu s doprovodnými anionty (např. Cl^-) hraje důležitou úlohu v regulaci osmotických poměrů buňky a slouží k udržování turgoru (Tester, 1990). Změny obsahu K^+ vedou k reverzibilním změnám objemu buněk při pohybech orgánů (např. listů) (Satter *et al.*, 1988) a otevírání a zavírání průduchů

(Hodson a Sangster, 1988) i k trvalým změnám objemu buňky při jejím růstu (Mengel a Arneke, 1982). Obsah K^+ v kořenu je významný pro příjem vody a vznik kořenového vztlaku. Draslík ovlivňuje hydrataci a tím i konformaci proteinů, čímž mění aktivitu enzymů. Byl prokázán významný vliv K^+ na aktivitu velké řady enzymů (Reggiani *et al.*, 1993).

Prvním pozorovatelným symptomem nedostatku draslíku jsou světlé skvrny, které se objevují nejprve na okrajích nebo špičkách listů nebo mezi žilnatinou. Tyto skvrny se později mění v nekrózy. Symptomy se projevují nejprve na starších listech směrem k bázi rostliny. Listy se také mohou zkadeřit a zkroutit se (Marschner a Cakmak, 1989). Stonky rostlin s nedostatkem draslíku jsou tenké a slabé a internodia jsou zkrácena. Rostliny, zejména obilniny, jsou náchylné k poléhání (Pavlová, 2005). Při výrazném deficitu dochází k odumírání terminálních i laterálních pupenů (Epstein a Bloom, 2005).

2.3.3.1.3 Vápník (Ca)

V rostlině se vápník vyskytuje vázaný nebo volný. Velká část vápníku je lokalizována v buněčných stěnách. Ve střední lamele se reverzibilně váže na pektiny, konkrétně na jejich karboxylovou skupinu a tvoří mezi nimi tzv. vápníkové můstky. Na pektiny se váže až 50% celkového množství vápníku přítomného v pletivu (Armstrong a Kirkby, 1979), ale u některých plodů to může být až 90% (Faust a Klein, 1974). Vápníkové můstky významně zvyšují pevnost buněčné stěny (Bussler, 1963). Velký obsah vápníku v buněčné stěně také zvyšuje odolnost k houbovým a bakteriálním infekcím (Armstrong a Kirkby, 1979). Jako důležitý strukturální komponent buněčné

stěny je Ca^{2+} nezbytný pro zvětšování plochy buněčné stěny, např. při růstu buňky, klíčení pylu a vzniku pylové láčky.

Ca^{2+} má důležitou roli v membránách, kde zajišťuje soudržnost fosfolipidů a jejich schopnost vázat proteiny. Velké množství Ca^{2+} se vyskytuje také ve vakuolách, kde přispívá k udržení rovnováhy mezi kationty a anionty (Kinzel, 1989).

V apoplastu se vyskytují volné ionty Ca^{2+} , které se vyměňují mezi vnějším povrchem plazmatické membrány a buněčnou stěnou. V apoplastu, zejména v mezibuněčných prostorech, lze najít také vápník vázaný v krystalech šťavelanu, fosfátu, uhličitanu, nebo sulfátu (Kinzel, 1989).

Změna koncentrace Ca^{2+} v cytosolu vyvolává metabolické změny, které jsou součástí přenosu různých signálů. V těchto procesech vápník funguje jako tzv. druhý posel. V cytosolu je udržována velmi nízká koncentrace (0,1 - 0,2 μM) Ca^{2+} (Trewavas a Gilroy, 1991). Vnější signál může aktivovat kanály pro Ca^{2+} a jeho koncentrace v cytosolu rychle stoupne. Tímto signálem může být například ABA (Tester, 1990), IAA (Felle, 1988), infekce nebo mechanické poranění (Rincon a Hanson, 1986). V cytosolu vápník stimuluje aktivitu kináz, které fosforylují další enzymy, např. H^+ ATPázy (Roberts a Harmon, 1992).

Vápník se dále může v cytosolu reverzibilně vázat na kalmodulin a vytváří tak komplex, který ovlivňuje aktivitu celé řady enzymů. Komplex vápníku s kalmodulinem se váže také na některé transkripční faktory a proteiny cytoskeletu nebo na proteiny tvořící kanály pro K^+ ve svěracích buňkách průduchů (Sanders *et al.*, 1999).

Symptomy deficitu vápníku se objevují nejprve a nejvýrazněji v meristematických oblastech, jako jsou špičky mladých kořenů nebo mladých listů, kde je buněčné dělení a tvorba buněčných stěn nejrychlejší. Taková pletiva mají vysoké nároky na množství vápníku a Ca^{2+} není distribuován z dospělých do mladších, aktivně

rostoucích pletiv. Mladé listy mohou být deformované a dochází k opadávání tvořících se plodů. Nedostatkem vápníku může být ovlivněn také kořenový systém rostlin. Kořeny zhnědnou, jsou krátké a hodně větvené. Navíc jsou tyto kořeny náchylné k bakteriální nebo houbové infekci (Kirkby a Pilbeam, 1984).

2.3.3.1.4 Hořčík (Mg)

Mg^{2+} tvoří hlavně iontové, ale i kovalentní vazby s dalšími molekulami. Tyto vazby, tzv. hořčíkové můstky, zajišťují správné prostorové uspořádání komponent enzymů, u kterých je potřeba přesná geometrie mezi enzymem a substrátem. Příkladem takového enzymu je RuBP karboxyláza (Pierce, 1986).

V zelených listech je velká část Mg^{2+} vázána jako centrální atom v molekule chlorofylu. Zde hraje důležitou úlohu při interakci pigmentu se strukturními proteiny anténních komplexů (Dorenstouter *et al.*, 1985).

Další funkcí hořčíku je zajišťování soudržnosti ribozomálních podjednotek, což je nezbytné pro syntézu proteinů (Cammarano *et al.*, 1972). Hořčík je také nezbytný pro aktivitu RNA polymeráz a tudíž pro tvorbu RNA v jádru (Wunderlich, 1978).

Ve světelné fázi fotosyntézy, kdy jsou protony přenášeny ze stromatu do tylakoidu, je Mg^{2+} z tylakoidu uvolňován do stromatu, kde kompenzuje úbytek kladných nábojů a současně aktivuje některé enzymy Calvinova cyklu, např. fruktóza-1,6-bisfosfátfosfatázu nebo Rubisco (Gerhardt *et al.*, 1987).

Mg^{2+} pozitivně ovlivňuje aktivitu mnoha dalších enzymů, například glutathionsyntázy nebo PEPkarboxylázy (Wedding a Black, 1988). Dynamicky interaguje s fosfátovými skupinami ATP a umožňuje průběh některých enzymatických reakcí, např. syntézu glutaminu při asimilaci NH_4^+ (O'Neal a Joy, 1974).

Velká část hořčíku v rostlinách se podílí na regulaci pH buňky.

Na rozdíl od vápníku je hořčík snadno distribuován z dospělých do mladých orgánů. Proto se první symptomy objevují u dospělých listů (Scott a Robson, 1990). Typické jsou chlorotické skvrny mezi žilnatinou. Při velkém nedostatku hořčíku mají listy světle žlutou až bílou barvu. Dalším symptomem nedostatku hořčíku může být předčasné odpadnutí listů. Dále dochází k inhibici růstu a vývoje v důsledku snížené schopnosti syntetizovat proteiny a RNA (Wunderlich, 1978).

2.3.3.1.5 Fosfor (P)

Fosfor je rostlinou přijímán ve formě anorganického fosfátu. Fosfor může v rostlině existovat jako anorganický fosfát nebo je přes hydroxylovou skupinu navázán na uhlíkatý řetězec a tvoří estery, případně je připojen na jiný fosfát pomocí pyrofosfátové vazby, např. v ATP. Do organických sloučenin se zabudovává v kořeni nebo až v nadzemní části rostliny, kam je transportován v anorganické formě xylémem. Anorganický fosfát může být ve značném množství (85-95%) skladován ve vakuolách (Marschner, 1995).

V rostlině je fosfor součástí látek s vysokým obsahem energie, jako jsou ATP a další nukleosidtrifosfáty (Duff *et al.*, 1989). Fosfát je také součástí nukleových kyselin (Marschner, 1995). Nukleovým kyselinám dává fosfát kyselý charakter, který je důležitý pro interakce s dalšími makromolekulami. Strukturně je fosfát vázán také ve fosfolipidech membrán.

Mezi charakteristické symptomy deficitu patří zakrslost mladých rostlin, a tmavě zelené zbarvení listů. Listy mohou být znetvořené, objevují se na nich nekrotické

skvrny a brzy opadávají. Kvetení je opožděno, snižuje se počet květů a je omezena tvorba semen (Barry a Miller, 1989).

2.3.3.1.6 Síra (S)

Síra je rostlinou přijímána ve formě sulfátu (SO_4^{2-}). V životním prostředí rostlin se sulfát obvykle vyskytuje v takovém množství, že nedostatek síry jako limitující faktor existence rostliny prakticky nepůsobí. Zvýšené nároky na množství sulfátu v půdě mají rostliny čeledi *Brassicaceae*. V rostlinách je síra součástí dvou aminokyselin, cysteinu a metioninu, a tudíž je také složkou proteinů. Dále je důležitá pro stavbu řady koenzymů a vitamínů, jako acetylkoenzym A, S-adenosylmethionin, biotin (vitamin H) a thiamin pyrofosfát (vitamin B₁) a také antioxidantu glutationu (De Kok a Stulen, 1993).

Sulfát může být přímo vestavěn do organických sloučenin za vzniku sulfurylové skupiny. V této formě se síra vyskytuje nejčastěji v sulfolipidech v membránách tylakoidů, v sekundárních metabolitech a v některých látkách signální povahy, např. v Nod-faktorech.

Redukovaná síra tvoří thiolovou skupinu $-\text{SH}$. V této podobě se vyskytuje především v cysteinu a metabolitech z něj odvozených. Mezi cysteinovými zbytky se reverzibilně tvoří disulfidové můstky. Vznik a rušení disulfidových můstků mění aktivitu enzymů, např. enzymů Calvinova cyklu, jako jsou fosfatázy nebo ribulóza-5-fosfát-kináza (Bergmann a Rennenberg, 1993).

Thiolové skupiny cysteinových zbytků také umožňují vytvořit struktury Fe-S, které slouží přenosu elektronu. Vyskytují se např. ve ferredoxinech nebo thioredoxinech. (Epstein a Bloom, 2005).

Síra je také složkou sekundárních metabolitů, jako jsou glukosinoláty. Glukosinoláty se vyskytují nejméně u patnácti rostlinných taxonů, mezi ně patří např. *Brassicaceae* (Schnug, 1993).

Symptomy deficitu síry jsou podobné těm při deficitu dusíku. Objevují se chlorózy, dochází k inhibici růstu a akumulaci antokyanů. Tato podobnost je daná tím, že jak síra, tak dusík jsou stavební prvky proteinů. Ale chlorózy způsobené nedostatkem síry se často objevují nejprve na mladých listech, zatímco při deficitu dusíku na starších (Marschner, 1995).

2.3.3.2 Mikrobiogenní minerální prvky

2.3.3.2.1 Chlór (Cl)

Chlór se v rostlinách vyskytuje jako chloridový ion (Cl^-). Obsah chlóru v sušině různých rostlinných druhů se velmi liší, u některých druhů může dosahovat hladiny obsahu makroelementů, funkční obsah je však nejčastěji v oblasti mikroelementů.

Chlór má důležitou roli v komplexu rozkládajícím vodu, který je asociován s fotosystémem II v chloroplastu. Zde má spolu s Ca^{2+} strukturální funkci, chrání polypeptidy před disociací (Homann, 1988).

Dále chlór stimuluje funkci H^+ -ATPáz v tonoplastu. Cl^- spolu s K^+ hraje důležitou roli v osmotických poměrech buňky. Experimentálně navozený nedostatek chlóru se u dospělých rostlin projevoval vadnutím, u vyvíjejících se rostlin způsobil inhibici objemového růstu buněk (Pavlová, 2005).

Chlór má důležitou roli při otevírání a zavírání průduchů, především u rostlin, které nemají ve svěracích buňkách chloroplasty. Při nedostatku chlóru dochází u těchto rostlin k inhibici otevírání průduchů (Epstein a Bloom, 2005).

Rostliny s nedostatkem chlóru mají menší listy, na kterých se objevuje charakteristické bronzové zabarvení. Později se objevují chlorózy a nekrózy (Whitehead, 1985).

2.3.3.2.2 Železo (Fe)

Železo slouží v rostlině především k přenosu elektronu v oxidačně redukčních reakcích. Železo strukturně vázané v hemu cytochromů přenáší elektron v cytochromovém komplexu fotosyntetického aparátu v membráně thylakoidu i v cytochromovém a cytochromoxidázovém komplexu elektrontransportního řetězce ve vnitřní membráně mitochondrie (Appleby *et al.*, 1988).

Dalšími proteiny, které obsahují hemovou skupinu, jsou kataláza a peroxidázy, které slouží k detoxikaci peroxidu vodíku nebo např. k polymerizaci fenolických látek na lignin (Hendricks a van Loon, 1990).

Další struktury důležité pro přenos elektronů jsou centra Fe-S. Proteiny s těmito strukturami se vyskytují např. ve fotosystému I a v Rieskeho proteinu cytochromového komplexu fotosyntetického aparátu, ve ferredoxinech a mnoha enzýmech, např. superoxidodismutázách, které detoxikují superoxidové radikály (Fridovich, 1983).

V rostlině se okolo 80% železa vyskytuje v chloroplastech. V chloroplastech je železo skladováno ve formě fytoferritinu. Fytoferritin lze najít také v xylému a floému (Epstein a Bloom, 2005).

Charakteristickým symptomem nedostatku železa jsou chlorózy mezi žilnatinou, které se objevují nejprve na mladších listech (Taiz a Zeiger, 2006).

2.3.3.2.3 Bór (B)

Přesná funkce bóru v rostlinném metabolismu není zcela jasná. Bór není strukturální složkou enzymů a nejsou zatím žádné důkazy, že by přímo ovlivňoval aktivitu enzymů. Množství bóru v rostlině ovlivňuje řadu dějů, například syntézu buněčné stěny, transport cukrů, lignifikaci, metabolismus RNA, metabolismus uhlovodíků, respiraci, metabolismus IAA a vlastnosti membrán. Předpokládá se, že úloha bóru v rostlině spočívá primárně v jeho strukturální funkci v buněčné stěně a udržování integrity plazmatické membrány, a že ostatní procesy jsou jím ovlivněny pouze sekundárně (Shelp, 1993).

U rostlin s nedostatkem bóru obsahuje buněčná stěna charakteristické vezikulární struktury, je v ní větší množství pektinů, je silnější a tvoří se v ní méně ligninu (Dugger a Palmer, 1985).

Nedostatek bóru má vliv také na vlastnosti plazmatické membrány. Projevuje se např. sníženou aktivitou ATPáz, sníženým příjmem fosfátu a zvýšeným únikem K^+ . I v tomto případě se předpokládá, že funkce bóru je strukturální a souvisí s interakcí plazmatické membrány s buněčnou stěnou, neboť jiné membrány v buňce nedostatkem bóru ovlivněny nejsou (Pavlová, 2005).

Bór má též důležitou roli v prodlužování buněk. Tato jeho role má velký význam pro klíčení pylu a růst pylové láčky (Epstein a Bloom, 2005).

Rostliny s deficitem bóru mohou vykazovat široké spektrum symptomů, v závislosti na druhu a věku rostliny. Charakteristické jsou černé nekrózy na mladých listech a terminálních pupenech. Listy jsou zdeformované a stonek může být neobvykle

tuhý a křehký. Může dojít ke ztrátě apikální dominance, což způsobí, že se rostlina začne výrazně větvit. Avšak terminální pupeny větví brzy odumřou, což je způsobeno inhibicí buněčného dělení. Struktury jako plody, dužnaté kořeny a hlízy mohou vykazovat nekrózy nebo abnormality související se selháním vnitřních pletiv (Epstein a Bloom, 2005).

2.3.3.2.4 Mangan (Mn)

Mangan se v rostlinách nejčastěji vyskytuje ve formě Mn^{2+} , ale může být snadno oxidován na Mn^{3+} a Mn^{4+} . Mangan proto hraje důležitou roli při redoxních reakcích. Mangan je funkční složkou proteinového komplexu rozkládajícího vodu (OEC), který je asociován s fotosystémem II (Hughes a Williams, 1988).

Dále se vyskytuje v superoxiddismutázách, které chrání pletiva před poškozením superoxidovými radikály (Bowler *et al.*, 1991).

Mangan funguje jako kofaktor, který aktivuje asi 35 různých enzymů (Burnell, 1988). Většina těchto enzymů katalyzuje oxidačně-redukční, dekarboxylační a hydrolytické reakce. Mezi tyto enzymy patří dekarboxylázy a dehydrogenázy Krebsova cyklu, chloroplastové RNAPolymerázy a fenylalaninamoniumlyázy (Palma *et al.*, 1986).

Symptomy deficitu manganu se velmi liší druh od druhu. Často se na listech objevují chlorózy mezi žilnatinou, později vznikají nekrózy. Nedostatek manganu zasahuje především chloroplasty, v nichž se dezintegrují tylakoidy. Listy některých druhů jsou malformované. V některých případech jsou rostliny zakrslé (Campbell a Nable, 1988).

2.3.3.2.5 Zinek (Zn)

Zinek je přijímán ve formě Zn^{2+} . V rostlině se vyskytuje pouze jako Zn^{2+} a proto se neúčastní oxidace a redukce. Váže se na molekuly organických látek přes atomy S, N a O (Vallee a Auld, 1990).

Zinek je součástí řady enzymů. V enzimech může mít dvě funkce, katalytickou (např. karboxypeptidáza), kdy se přímo podílí na vytváření struktury vazebného místa pro substrát, nebo strukturní. Strukturní funkci má atom zinku v CuZn-superoxiddismutázách a v aldoláze (Vallee a Falchuk, 1993).

Zinek je součástí ribozomů, kde je důležitý pro jejich stabilitu. Dále se podílí na zajištění integrity membrán, neboť chrání membránové lipidy a proteiny před poškozením působeným volnými kyslíkovými radikály (Epstein a Bloom, 2005).

Při nedostatku zinku dochází k výrazné redukci růstu internodií. Listy jsou malé a mohou být zdeformované. U některých druhů (např. obilniny, čirok, fazole) se mohou na starších listech objevovat mezi žilnatinou chlorózy a později vznikají bílé nekrotické skvrny. U jiných druhů mohou být listy tmavě zelené nebo modrozelené. Dále je redukováno kvetení a tvorba plodů (Epstein a Bloom, 2005).

2.3.3.2.6 Měď (Cu)

Měď je spojená s enzymy účastnícími se redoxních reakcí, při kterých dochází k reverzibilní oxidaci Cu^+ na Cu^{2+} . Příkladem takového enzymu je plastocyanin, ve kterém je vázáno více než 50% mědi obsažené v chloroplastech. Plastocyanin je složka elektrontransportního řetězce ve fotosystému I (Sandmann a Börger, 1983).

Mezi další enzymy, které obsahují měď, patří superoxiddismutázy, které působí především proti oxidaci nenasycených mastných kyselin. Měď v tomto enzymu je

zahrnutá v mechanismu detoxifikace volného kyslíkového radikálu, který vzniká při fotosyntéze (Epstein a Bloom, 2005).

Dále je měď součástí cytochromoxidázy, askorbátoxidázy, diaminoxidázy a fenoloxidáz. Polyfenoloxidázy se vyskytují především v buněčné stěně, kde se podílejí na tvorbě ligninu, a v membráně thylakoidů, kde se podílejí na syntéze chinonu (Judel, 1972).

Prvním symptomem nedostatku mědi je tvorba tmavě zelených listů, na kterých se mohou vyskytovat nekrózy. Nekrotické skvrny se objevují nejprve na špičkách mladých listů a potom se rozšiřují směrem k bázi podél okrajů. Listy mohou být také zkroucené nebo znetvořené. Při extrémním nedostatku mědi mohou listy předčasně opadávat. Je omezeno kvetení a tvorba plodů (Taiz a Zeiger, 2006).

2.3.3.2.7 Nikl (Ni)

Nikl se svými chemickými vlastnostmi podobá železu. Většinou se v rostlině vyskytuje ve formě Ni^{2+} , ale může být přítomný také jako Ni^+ a Ni^{3+} . Nikl tvoří stabilní komplexy s cysteinem a s kyselinou citronovou. Přes atomy S, N nebo O se může vázat na proteiny a ovlivňovat aktivitu enzymů, především hydrolytických (Cammack *et al.*, 1988).

U vyšších rostlin je zatím známý jediný enzym, který obsahuje nikl, a to ureáza. Ureáza štěpí močovinu na NH_4^+ a CO_2 . Je to důležitý enzym v metabolismu dusíku (Pavlová, 2005).

Rostliny s nedostatkem niklu akumulují močovinu v listech, a následně se objevují nekrózy na špičkách listů (Epstein a Bloom, 2005).

2.3.3.2.8 Molybden (Mo)

U vyšších rostlin je molybden složkou jen několika enzymů. V nich může mít Mo strukturní i katalytickou funkci a je přímo zahrnutý v redoxních reakcích. Mezi tyto enzymy patří nitrátreduktáza, sulfitreduktáza a xanthinoxidáza/dehydrogenáza. Molybden je tedy velmi důležitý prvek v metabolismu dusíku a síry.

Molybden je také složkou nitrogenázy. To je enzym, pomocí kterého prokaryotické organizmy žijící v symbióze s vyššími rostlinami fixují vzdušný N₂ (Dilworth *et al.*, 1988).

První známkou nedostatku molybdenu je chloróza mezi žilnatinou a nekrózy starších listů. U některých rostlin z čeledi *Brassicaceae* listy nejsou nekrotické, ale místo toho mohou být zkroucené a následně odumřou. Při nedostatku molybdenu může docházet k inhibici tvorby květů, nebo mohou květy předčasně odumírat (Chatterjee *et al.*, 1985).

2.3.3.3 Benefiční prvky

Některé prvky mohou být esenciální jen pro některé rostliny, jsou nezbytné jen za určitých podmínek, nebo pouze podporují růst. Takové prvky se označují jako benefiční. Patří mezi ně sodík, křemík a selen (Marschner, 1995).

3 Materiál a metody

3.1 Materiál

Při pokusech byly použity tři ekotypy *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.: Columbia-1 (Col-1), Landsberg *erecta*-0 (*Ler*-0) a San Feliu-2 (Sf-2). Semena byla získána z Nottingham Arabidopsis Stock Centre, Velká Británie.

3.2 Hydroponie

3.2.1 Médium

Při kultivaci rostlin byl použit modifikovaný Hoaglandův roztok (modifikace J. Koláře) v různých koncentracích: 100%, 50%, 25%, 12,5% ,10%, 0,1%, 0,05 a 0,025% (Tab. 2.).

	Koncentrace modifikovaného Hoaglandova roztoku				
	100%	50%	25%	12,5%	10%
$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	0,5 mM	0,25 mM	0,125 mM	0,0625 mM	0,05 mM
KNO_3	3 mM	1,5 mM	0,75 mM	0,375 mM	0,3 mM
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	2 mM	1 mM	0,5 mM	0,25 mM	0,2 mM
MgSO_4	1 mM	0,5 mM	0,25 mM	0,125 mM	0,1 mM
citrát železitý	24,5 μM	12,25 μM	6,125 μM	3,0625 μM	2,45 μM
KI	0,452 μM	0,226 μM	0,113 μM	0,0565 μM	0,0452 μM
H_3BO_3	4,852 μM	2,426 μM	1,213 μM	0,6065 μM	0,4852 μM
MnSO_4	5,92 μM	2,96 μM	1,48 μM	0,74 μM	0,592 μM
ZnSO_4	0,696 μM	0,348 μM	0,174 μM	0,087 μM	0,0696 μM
Na_2MoO_4	0,104 μM	0,052 μM	0,026 μM	0,013 μM	0,0104 μM
CuSO_4	0,01 μM	0,005 μM	0,0025 μM	0,00125 μM	0,001 μM
CoCl_2	0,0104 μM	0,0052 μM	0,0026 μM	0,0013 μM	0,00104 μM
Na_2EDTA	10 μM	5 μM	2,5 μM	1,25 μM	1 μM
FeSO_4	10 μM	5 μM	2,5 μM	1,25 μM	1 μM

	Koncentrace modifikovaného Hoaglandova roztoku		
	0,1%	0,05%	0,025%
$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	0,5 μM	0,25 μM	0,125 μM
KNO_3	3 μM	1,5 μM	0,75 μM
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$	2 μM	1 μM	0,5 μM
MgSO_4	1 μM	0,5 μM	0,25 μM
citrát železitý	24,5 nM	12,25 nM	6,125 nM
KI	0,452 nM	0,226 nM	0,113 nM
H_3BO_3	4,852 nM	2,426 nM	1,213 nM
MnSO_4	5,92 nM	2,96 nM	1,48 nM
ZnSO_4	0,696 nM	0,348 nM	0,174 nM
Na_2MoO_4	0,104 nM	0,052 nM	0,026 nM
CuSO_4	0,01 nM	0,005 nM	0,0025 nM
CoCl_2	0,0104 nM	0,0052 nM	0,0026 nM
Na_2EDTA	10 nM	5 nM	2,5 nM
FeSO_4	10 nM	5 nM	2,5 nM

Tab. 2. Obsah látek v různých koncentracích modifikovaného Hoaglandova roztoku použitých při experimentech.

3.2.2 Kultivace v plastových krabičkách

Rostliny byly pěstovány v hydroponickém systému využívajícím plastové krabičky Magenta (výrobce Sigma) používané pro in vitro kultivaci, podle Arteca a Arteca (2000).

Vyautoklávované krabičky byly naplněny 200 ml minerálního média. U 20 krabiček byl použit 100% modifikovaný Hoaglandův roztok, u dalších 20 50% modifikovaný Hoaglandův roztok. pH bylo upraveno pomocí NaOH na 6,3.

Do každé krabičky byl na hladinu média vložen vyautoklávovaný plovák LifeRaft (Osmotec) s 3,5 cm vysokým kvádrem z předem namočené minerální vlny (Grodan Expert). Semena *Arabidopsis thaliana* byla nejprve 3 dny stratifikována v deionizované vodě při teplotě 4°C. Každý kvádr z minerální vlny byl propláchnut 10 ml 100% nebo 50% modifikovaného Hoaglandova roztoku. Potom byla na povrch kvádrů vyseta semena (4-5 semen na Magentu).

Rostliny byly kultivovány v klimaboxech MLR-350HT (Sanyo) při teplotě 20°C a 75% relativní vzdušné vlhkosti. Délka dne byla nastavena na 8h, intenzita světla na 90 $\mu\text{mol}\times\text{m}^{-2}\times\text{s}^{-1}$ (zářivky Sanyo FL40SSW/37).

Ve stáří 14 dnů byly rostliny vyjednoceny na dvě průměrně velké rostliny a ve stáří 21 dnů na jednu rostlinu v každé krabičce.

Protože u ekotypu Col vzlínal roztok po minerální vlně až do středu růžic, bylo ve stáří 4 týdny odstraněno horních asi 0,5 cm minerální vlny a středy růžic byly vysušeny buničitou vatou.

Médium bylo pravidelně každý týden měněno za čerstvé, každý raft byl přesunut do vyautoklávované krabičky s 200 ml odpovídajícího média. Aby se snížil vliv rozdílů teploty, vlhkosti a osvětlení v různých místech klimaboxu, byly každý týden krabičky

z horní police přesunuty na dolní a z dolní na horní polici a celá police byla otočena o 180°.

Ve stáří čtyř týdnů byl u poloviny krabiček nahrazen plný živný roztok roztokem 1000× zředěným (tj. místo 100% modifikovaného Hoaglandova roztoku byl použit 0,1% a místo 50% byl použit 0,05%). U druhé poloviny krabiček zůstala koncentrace roztoku stejná. Před přenesením do nové krabičky s čerstvým roztokem byl každý kvádr minerální vlny promyt 10 ml nového média, aby se snížilo obohacení deficitního média živinami z původního roztoku, který zůstal nasáklý v minerální vlně. Rostliny byly pěstovány ve zředěném roztoku až do ukončení experimentu.

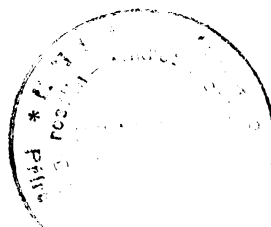
Ve všech variantách bylo 5 rostlin od každého ekotypu.

3.2.3 Kultivace v plastových vaničkách na Grodanu

Rostliny byly pěstovány v modifikovaném hydroponickém systému podle Gibeauta *et al.* (1997).

Každá plastová vanička byla naplněna 4,25 l modifikovaného Hoaglandova roztoku s pH 6,3 (upraveno pomocí NaOH). Koncentrace roztoku byla obvykle 25%, v počátečních experimentech 50% nebo 100%, jak je uvedeno ve výsledcích. Na každé vaničce byl bílý polyetylenový kryt s 10 otvory o průměru 13mm. Mezi krytem a horní hranou vaničky byla nalepena polyetylenová izolační páska (vyráběna pro utěsnění oken) kvůli zabránění průniku světla do média. V každém otvoru byl 3,5 cm vysoký válec z předem namočené minerální vlny (Grodan Expert).

Semena *Arabidopsis thaliana* byla nejprve povrchově vysterilizována. K tomu byl použit 50% roztok Savo (obsahující 3% aktivního chlóru). Semena byla umístěna do plastové zkumavky, zalita sterilizačním roztokem a za občasného protřepávání

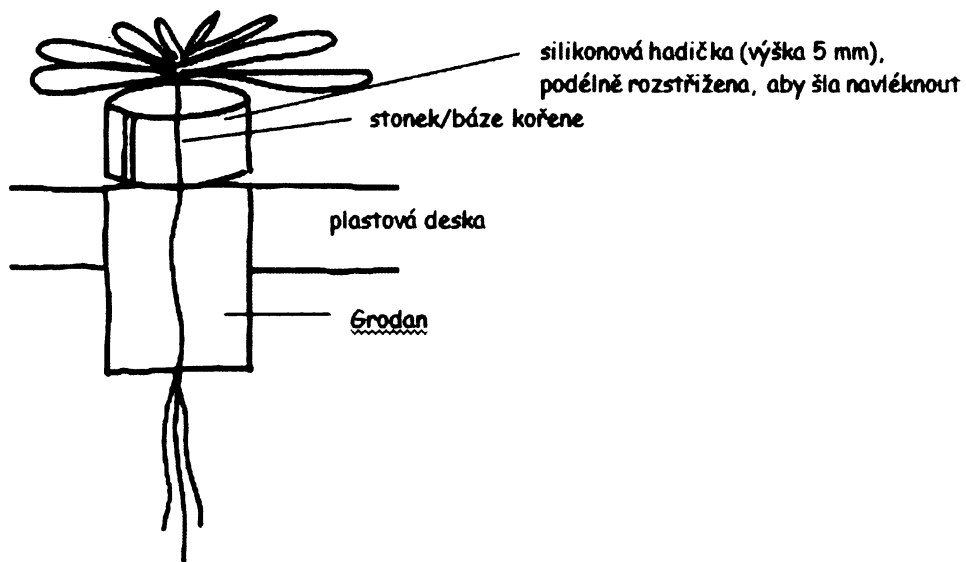


sterilizována po dobu 20 minut. Poté byl sterilizační roztok odsát pomocí pipety a semena byla 15x promyta destilovanou vodou. Potom byla semena stratifikována v deionizované vodě 3 dny při teplotě 4⁰C. Po stratifikaci byla semena vyseta na válce z minerální vlny, které byly předem propláchnuty 10 ml média, na každý válec 4-5 semen. Rostliny byly kultivovány v klimaboxech MLR-350HT (Sanyo) při teplotě 20⁰C a 75% relativní vzdušné vlhkosti. Délka dne byla nastavena na 8h, intenzita světla na 90 $\mu\text{mol}\times\text{m}^{-2}\times\text{s}^{-1}$ (zářivky Sanyo FL40SSW/37).

Médium bylo provzdušňováno 15 minut každé 3 hodiny. K tomuto účelu byl použit vzduchovací motorek Elite 801, který byl silikonovými hadičkami spojen s 2 filcovými perličkami v každé vaničce.

Rostliny byly vyjednoceny na dvě průměrně velké rostliny ve stáří 14 dnů a na jednu rostlinu na válec ve stáří 21 dnů.

Aby nedocházelo ke vzlínání roztoku po minerální vlně do středu růžic rostlin ekotypu Col, byla ve stáří 4 týdny okolo každé rostliny navlečena 5 mm vysoká silikonová hadička o vnitřním průměru 4mm a vnějším průměru 7 mm (Obr 5). Pokud byly středy růžic v té době již zavlhčeny, byly vysušeny buničitou vatou.



Obr 5. U rostlin Col docházelo ke vztlínání roztoku po minerální vlně do středu růžic. Tomu bylo zabráněno odstraněním vrchní vrstvy Grodanu a navlečením silikonových trubiček okolo stonku.

Médium bylo pravidelně každé dva týdny měněno za čerstvé odpovídající koncentrace (plné nebo zředěné), poprvé ve stáří 3 týdny. Aby se snížil vliv rozdílu teploty, vlhkosti a osvětlení v různých místech klimaboxu na růst rostlin, byly 2× týdně vaničky přesunuty mezi policemi v klimaboxu.

Ve stáří 3 týdny (v jedné sérii experimentů ve stáří 3, 4 nebo 5 týdnů) bylo médium nahrazeno 100× nebo 1000× zředěným. Aby se snížilo obohacení deficitního média živinami z původního roztoku, který zůstal nasáklý v minerální vlně, byl při výměně média za zředěné každý válec minerální vlny promyt 10 ml zředěného média. U kontrolních variant bylo ve stejný čas médium nahrazeno čerstvým a každý váleček byl propláchnut 10 ml tohoto média. Rostliny byly pěstovány ve zředěném roztoku až do ukončení experimentu.

Ve všech variantách bylo 5 nebo 10 rostlin (uvedeno ve výsledcích, kapitoly 4.1.2, 4.2.1, 4.2.2, 4.2.3) od každého ekotypu.

3.2.4 Kultivace v plastových vaničkách na agaru

Při pěstování byly použity stejné nádoby, kryty i roztok jako při kultivaci rostlin ve vaničkách s Grodanem. Místo minerální vlny byly použity 3,5 cm vysoké válečky uříznuté z 10 ml pipetových špiček (Eppendorf) nebo 1,5ml mikrozkuřavky (Eppendorf) s odříznutou spodní částí (2 mm) naplněné agarem.

Při pokusech byl použit agar různé koncentrace: 1%, 1,5% a 2%. Agarové médium obsahovalo 25% nebo 12,5% modifikovaný Hoaglandův roztok. pH bylo upraveno pomocí NaOH nebo HCl na 6,3.

Vyautoklávované válečky z pipetových špiček nebo upravené mikrozkumavky byly širší částí nalepeny na papírovou lepicí pásku a naplněny agarem. Po ztuhnutí agaru byly odlepeny a vloženy do otvorů v krytu. Protože průměr mikrozkumavek byl menší než průměr otvorů, byly okolo mikrozkumavek omotány rozříznuté silikonové hadičky.

Příprava semen, výsev a kultivace byly stejné jako při použití vaniček s minerální vlnou, pouze médium nebylo měněno za zředěné.

Použitý počet rostlin v každé variantě je uveden ve výsledcích (kapitoly 4.1.4, 4.1.5)

3.3 Pěstování v půdě

Rostliny byly pěstovány v květináčích o průměru 13 cm, naplněných směsí substrátu pro výsevy (Rašelina Soběslav) : písek : perlit v poměru 3:1:1. Před výsevem byla semena stratifikována v deionizované vodě 3 dny při teplotě 4⁰C. Rostliny byly kultivovány v klimaboxech MLR-350HT (Sanyo) při teplotě 20⁰C a 75% relativní vzdušné vlhkosti. Délka dne byla nastavena na 8h, intenzita světla na 90 $\mu\text{mol}\times\text{m}^{-2}\times\text{s}^{-1}$ (zářivky Sanyo FL40SSW/37). Rostliny byly vyjednoceny na dvě průměrně velké rostliny ve stáří 14 dnů a na jednu rostlinu v každém květináči ve stáří 21 dnů.

Od stáří 28 dnů byly rostliny až do ukončení pokusu pravidelně 1× týdně zalévány 100% nebo 10% modifikovaným Hoaglandovým roztokem (0,5 l na 6 rostlin). V obou variantách bylo 6 rostlin.

3.4 Měření

Při pokusech byly zjišťovány následující parametry:

1. Počet dnů od výsevu do objevení makroskopicky viditelných pupat
2. Počet primárních listů v růžici v určitém stáří
3. Počet primárních listů v růžici v den rozkvětu prvního květu
4. Počet listů na stonku v den rozkvětu prvního květu
5. Celkový počet primárních listů v den rozkvětu prvního květu (součet položek 3. a 4.)
6. Počet dnů od výsevu do rozkvětu prvního květu
7. Výška stonku v den rozkvětu prvního květu

V počtu listů nebyly zahrnuty děložní lístky. Den rozkvětu byl určen jako den, kdy byly poprvé viditelné korunní lístky.

Pokusy s agarem byly ukončeny ještě před objevením pupat, proto byl při nich zjišťován pouze počet primárních listů v růžici a u jednoho experimentu bylo také určováno procento rostlin, u kterých prorostly kořeny z agaru do média.

Při pokusech s vyšší koncentrací modifikovaného Hoaglandova roztoku byly některé květy podrobněji zkoumány pomocí lupy Nikon SMZ 1500.

3.5 Statistické zpracování dat

Výsledky byly statisticky zpracovány pomocí programu NCSS 2004. Hladina významnosti byla u všech testů 0,05 (pokud ve výsledcích není uvedeno jinak). Normální rozdělení dat bylo testováno pomocí testů Skewness, Kurtosis a Omnibus Normality Test (použité názvy testů odpovídají termínům v NCSS). Data, u kterých bylo normální rozdělení zamítnuto, byla logaritmičsky transformována a znovu testována

na normalitu rozdělení. U experimentů s různými ekotypy byl vliv stresu a ekotypu testován pomocí analýzy rozptylu (ANOVA). Rozdíly mezi stresovanou variantou a odpovídající kontrolní variantou stejného ekotypu byly testovány t-testem (Equal Variance T-Test); shoda rozptylů byla předem ověřena pomocí testu Modified Levene equal-variance test. V případech, kdy bylo srovnáváno více variant u jednoho ekotypu, byl vliv stresu hodnocen pomocí jednorozměrné analýzy variance (One-Way ANOVA) a rozdíly mezi jednotlivými variantami pomocí Tukey-Kramer multiple comparison testu. Tyto testy byly použity pro data s normálním rozdělením.

Pro data, jejichž rozdělení nebylo normální ani po logaritmické transformaci, byly použity testy Kruskal-Wallis One-Way ANOVA on ranks, respektive Kruskal-Wallis multiple comparison Z-value test.

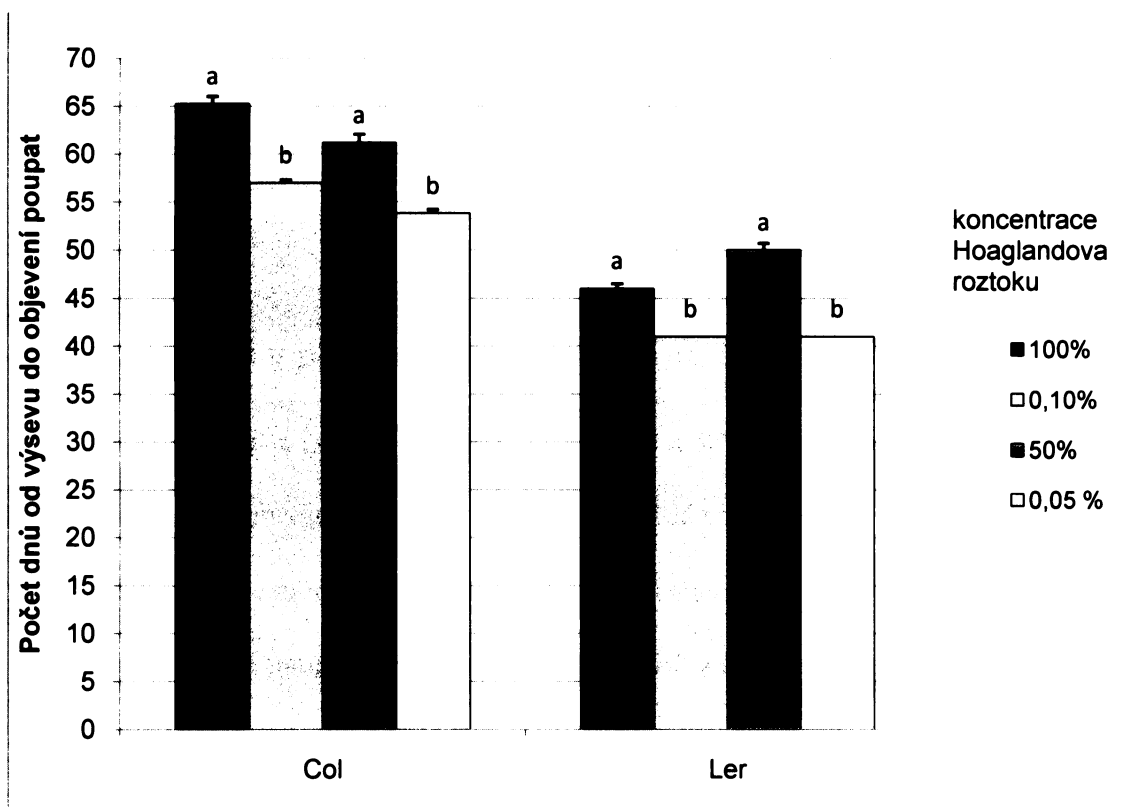
4 Výsledky

4.1 Optimalizace

4.1.1 Kultivace v plastových krabičkách

Při tomto experimentu byly použity ekotypy Ler a Col. Nejprve byly všechny rostliny pěstovány v 100% nebo 50% modifikovaném Hoaglandově roztoku v plastových krabičkách Magenta. Ve stáří 28 dnů byla u poloviny rostlin tato média nahrazena 1000× zředěnými. U kontrolních variant médium nahrazeno nebylo.

To, zda byl použit 100% nebo 50% modifikovaný Hoaglandův roztok, nemělo vliv na počet dnů od výsevu do objevení pupat. Rozdíl byl pouze mezi kontrolními a deficitními variantami. U ekotypu Col bylo objevení pupat urychleno zředěním média o 8,25 dnů při použití 100% a o 7,4 dnů při použití 50% modifikovaného Hoaglandova roztoku, u rostlin Ler to bylo o 5 a 9 dnů (Obr 6).



Obr 6. Vliv koncentrace modifikovaného Hoaglandova roztoku na počet dnů od výsevu do objevení makroskopicky viditelných pupat. Rostliny byly nejprve pěstovány v 100% nebo 50% roztoku. Ve stáří 28 dnů bylo u poloviny rostlin médium nahrazeno 1000× zředěným. Rostliny byly pěstovány v plastových krabičkách Magenta na krátkém dnu (8h světlo/16h tma). Hodnoty jsou průměry z 5 rostlin, chybové úsečky udávají střední chybu průměru. Varianty v rámci jednoho ekotypu označené stejným písmenem nejsou průkazně rozdílné na hladině významnosti 0,05 (Tukey-Kramer multiple comparison test).

Počet listů v den rozkvetu nebylo možné zjistit, protože velká část listů předčasně zasychala a listy se rozkládaly.

Při tomto způsobu pěstování byly u ekotypu Col problémy s rozkvetem. U některých rostlin pěstovaných v deficitním médiu docházelo k zasychání květů ještě

před jejich rozkvetem. Rostliny Col z kontrolních variant až do ukončení experimentu (tj. 69 dní od výsevu) nevykvetly. Dalším problémem při pěstování v krabičkách byl výskyt řas v médiu a na kořenech.

4.1.2 Kultivace v plastových vaničkách na Grodanu

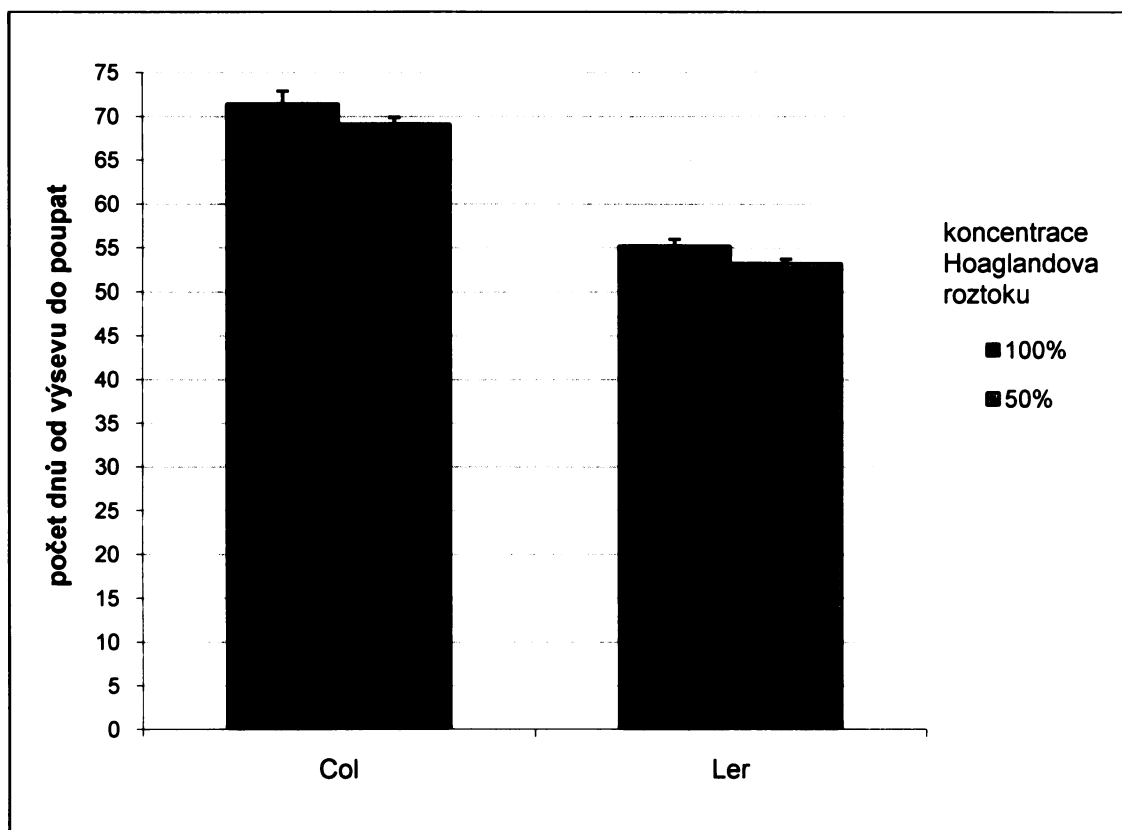
Rostliny Col a Ler byly pěstovány v 100% a 50% modifikovaném Hoaglandově roztoku v plastových vaničkách na Grodanu. V každé variantě bylo deset rostlin.

Koncentrace modifikovaného Hoaglandova roztoku neměla vliv na počet dnů od výsevu do objevení pupat (Obr 7) ani na počet listů v den rozkvetu (Obr 8). Ovlivněn byl pouze počet dnů od objevení pupat do rozkvetu u ekotypu Ler. U rostlin pěstovaných v méně koncentrovaném roztoku byla tato doba o 4,7 dnů kratší (Obr 9).

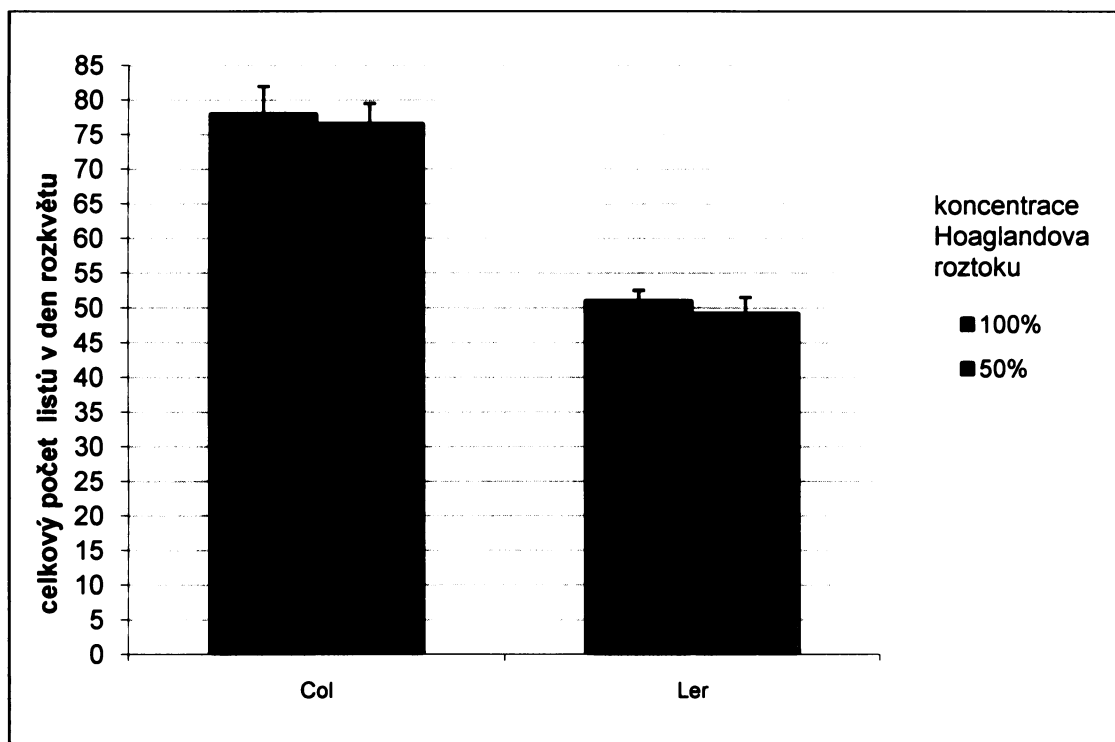
Ve stáří 100 dnů byla stanovena sušina rostlin. Mezi rostlinami pěstovanými v 100% a 50% modifikovaném Hoaglandově roztoku nebyl v tomto parametru žádný statisticky průkazný rozdíl (Obr 10).

Na rozdíl od předchozího experimentu s použitím plastových krabiček, nerostly v živném roztoku řasy. Jedinou komplikací kultivace bylo, že u rostlin Col docházelo přibližně od stáří čtyř týdnů ke vzlínání roztoku po minerální vlně do středu růžic. Tomu bylo zabráněno odstraněním vrchní vrstvy Grodanu a navlečením silikonových trubiček okolo stonku (kapitola 3.2.3). Tento zákrok nezpůsobil žádné viditelné poškození rostlin a jejich následný růst byl velmi dobrý.

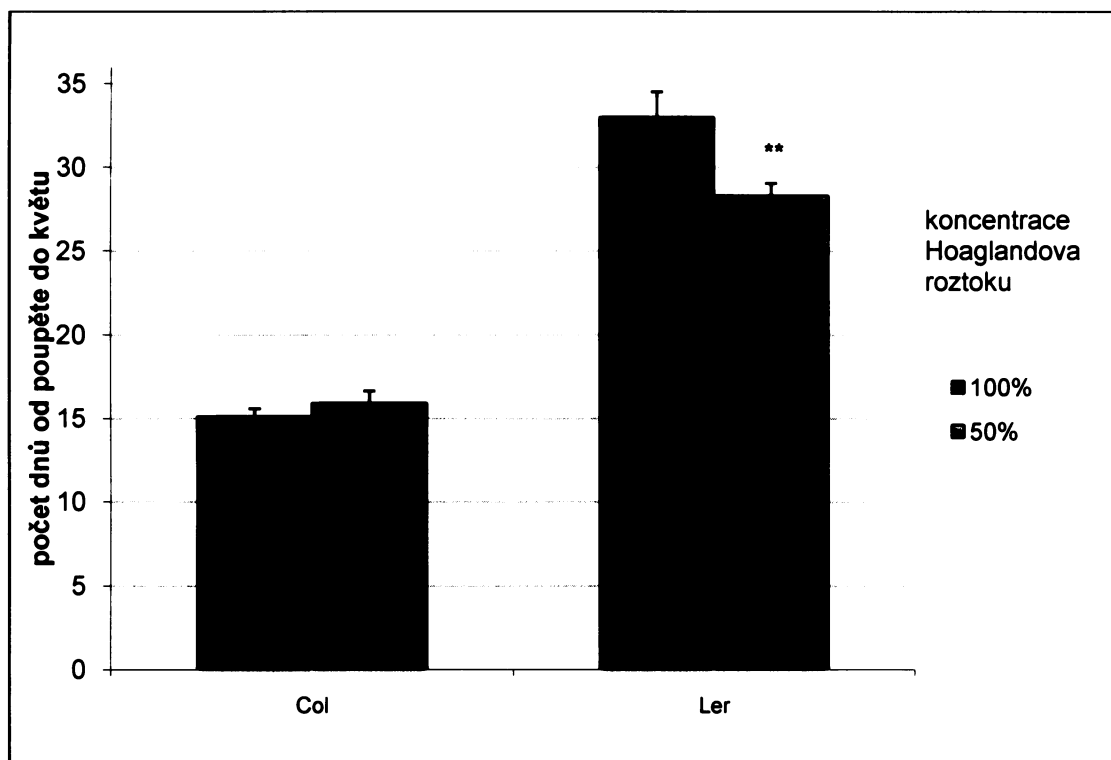
U ekotypu Ler byly při obou koncentracích modifikovaného Hoaglandova roztoku některé květy abnormální, s malformovanými orgány. Tyto deformace byly nejčastější u květů založených nejdříve, tzn. umístěných nejnižší v květenství.



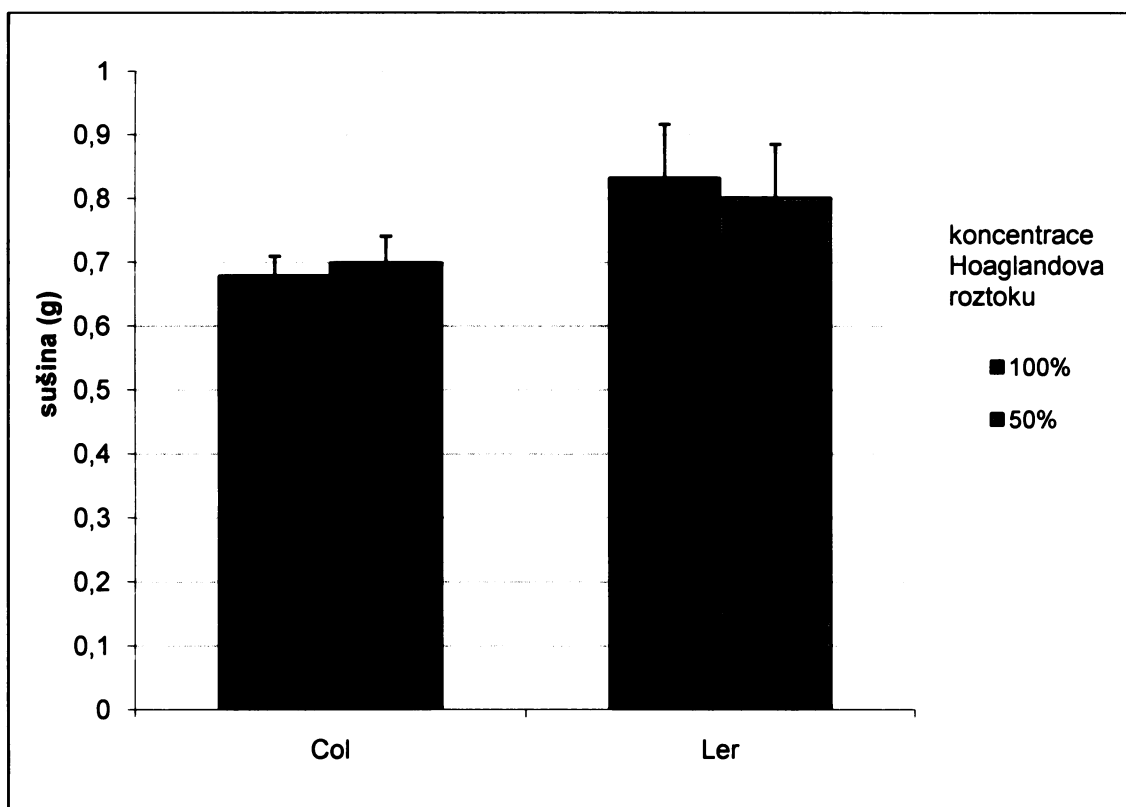
Obr 7. Vliv koncentrace modifikovaného Hoaglandova roztoku na počet dnů od výsevu do objevení makroskopicky viditelných poutat. Rostliny byly pěstovány v 100% nebo 50% roztoku v plastových vaničkách na krátkém dnu (8h světlo/16h tma). Hodnoty jsou průměry z 10 rostlin, chybové úsečky udávají střední chybu průměru. Varianty označené * jsou průkazně rozdílné oproti kontrole příslušného ekotypu na hladině významnosti 0,05, ** na hladině 0,01 (Equal-Variance T-Test).



Obr 8. Vliv koncentrace modifikovaného Hoaglandova roztoku na počet primárních listů (primární listy v růžici + listy na stonku) v den rozkvětu prvního květu. Rostliny byly pěstovány v 100% nebo 50% roztoku v plastových vaničkách na krátkém dnu (8h světlo/16h tma). Hodnoty jsou průměry z 10 rostlin, chybové úsečky udávají střední chybu průměru. Varianty označené * jsou průkazně rozdílné oproti kontrole příslušného ekotypu na hladině významnosti 0,05, ** na hladině 0,01 (Equal-Variance T-Test).



Obr 9. Vliv koncentrace modifikovaného Hoaglandova roztoku na počet dnů od objevení makroskopicky viditelných pupat do rozkvětu prvního květu. Rostliny byly pěstovány v 100% nebo 50% roztoku v plastových vaničkách na krátkém dnu (8h světlo/16h tma). Hodnoty jsou průměry z 10 rostlin, chybové úsečky udávají střední chybu průměru. Varianty označené * jsou průkazně rozdílné oproti kontrole příslušného ekotypu na hladině významnosti 0,05, ** na hladině 0,01 (Equal-Variance T-Test).



Obr 10. Vliv koncentrace modifikovaného Hoaglandova roztoku na sušinu rostlin ve stáří 100 dnů. Rostliny byly pěstovány v 100% nebo 50% roztoku v plastových vaničkách na krátkém dnu (8h světlo/16h tma). Hodnoty jsou průměry z 10 rostlin, chybové úsečky udávají střední chybu průměru. Varianty označené * jsou průkazně rozdílné oproti kontrole příslušného ekotypu na hladině významnosti 0,05, ** na hladině 0,01 (Equal-Variance T-Test).

4.1.3 Vliv hnojení na morfologii květů

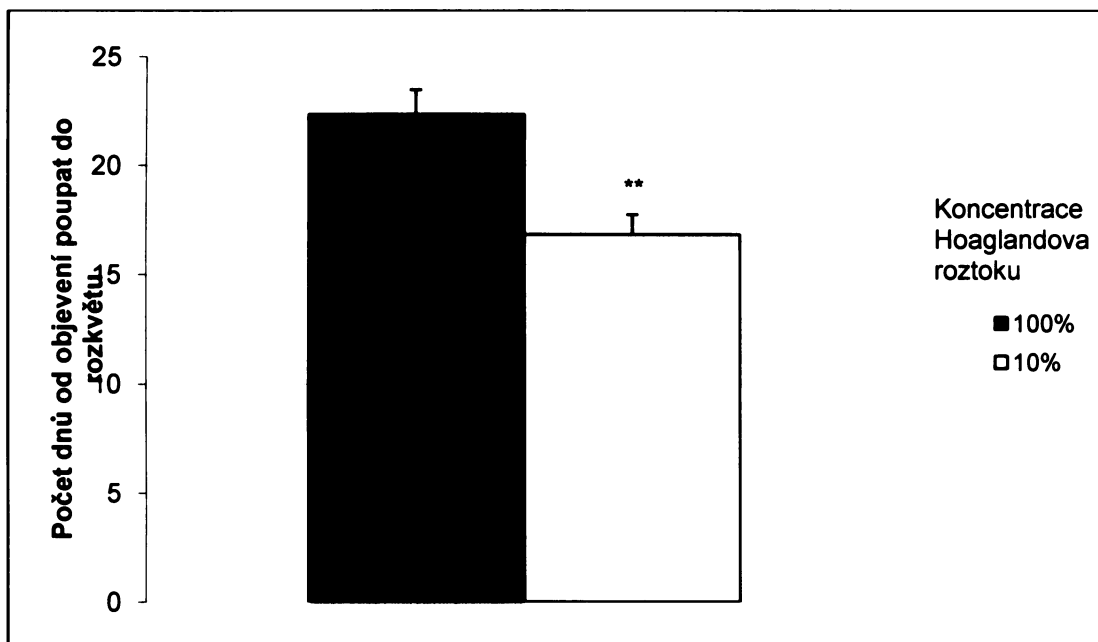
Cílem tohoto experimentu bylo zjistit, zda abnormální morfologie některých květů Ler z předešlého pokusu (kapitola 4.1.2) mohla být způsobena nadměrným zásobením živinami. Rostliny Ler byly pěstovány v půdě a od stáří 28 dnů byly až do

ukončení pokusu pravidelně 1× týdně zalévány 100% nebo 10% modifikovaným Hoaglandovým roztokem.

Rozdílná koncentrace roztoku neovlivnila počet dnů od výsevu do objevení poupat, ale měla vliv na počet dnů od objevení poupat do rozkvětu. Při záливce 10% modifikovaným Hoaglandovým roztokem byla tato doba o 5,5 dnů kratší (Obr 11).

Ve stáří 94 dnů byl zhodnocen stav květů na hlavním stonku. Nejvýraznější byly změny morfologie semeníků a kališních lístků. Podle nich bylo možné rozdělit květy do několika kategorií:

- 1) se semeníkem bez vyvíjejících se semen
- 2) se semeníkem bez vyvíjejících se semen s neopadávými kališními lístky
- 3) se semeníkem s vyvíjejícími se semeny
- 4) se semeníkem s květenstvím založeným uvnitř (Obr 12.)
- 5) se semeníkem s květenstvím založeným uvnitř a s listovým útvarem na květní stopce (Obr 13)



Obr 11. Vliv koncentrace modifikovaného Hoaglandova roztoku na počet dnů od objevení makroskopicky viditelných pupat do rozkvětu prvního květu. Rostliny Ler byly pěstovány v půdě na krátkém dnu (8h světlo/16h tma). Od stáří 28 dnů byly 1× týdně zalévány 100% nebo 10% modifikovaným Hoaglandovým roztokem. Hodnoty jsou průměry z 6 rostlin, chybové úsečky udávají střední chybu průměru. Varianty označené * jsou průkazně rozdílné oproti kontrole příslušného ekotypu na hladině významnosti 0,05, ** na hladině 0,01 (Equal-Variance T-Test).

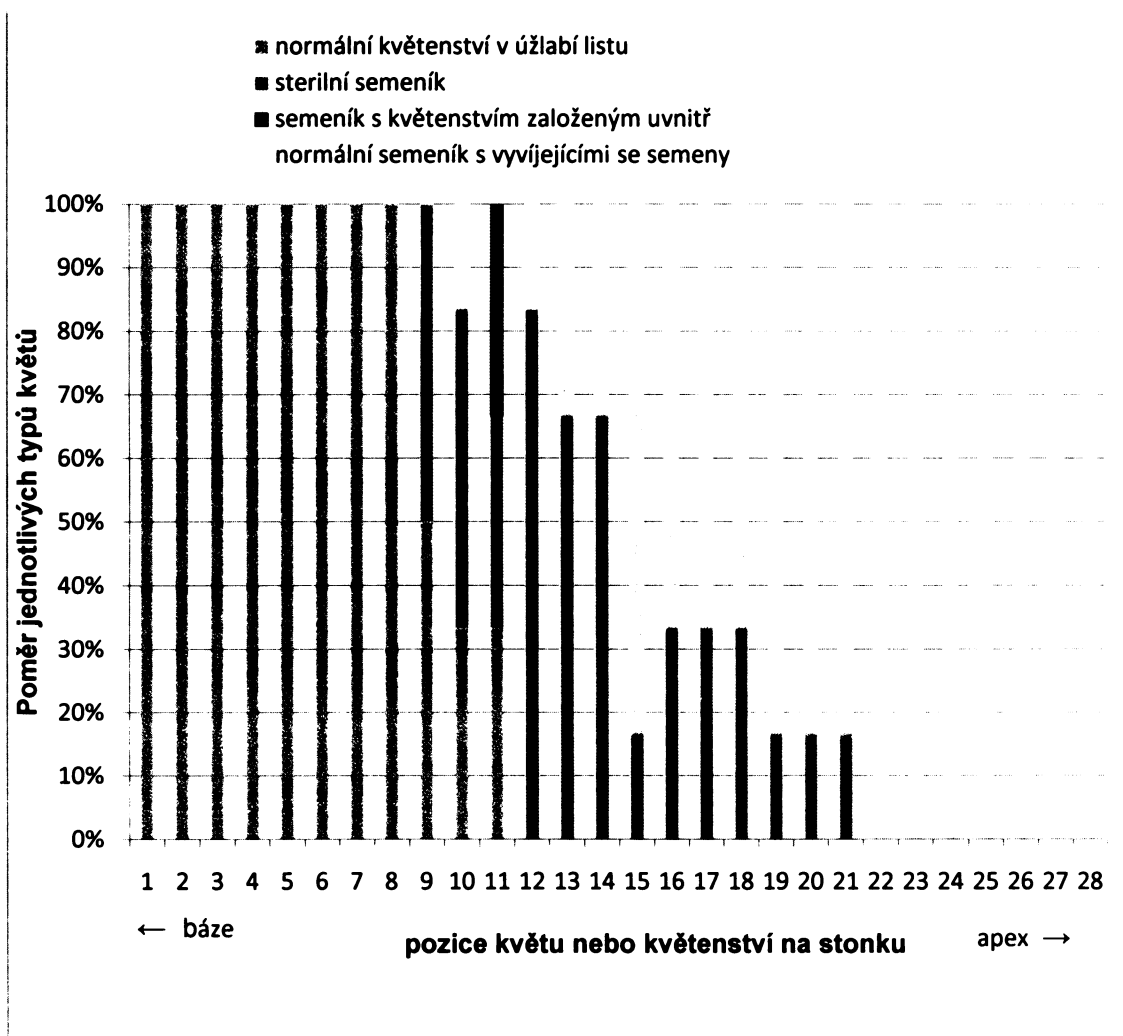


Obr 12. Semeník s květenstvím založeným uvnitř u rostliny Ler, která byly pěstována v půdě na krátkém dnu (8h světlo/16h tma) a zalévána 100% modifikovaným Hoaglandovým roztokem. (a) Vnější vzhled semeníku. (b) (c) V horní části semeníku byla vyvíjející se semena, v dolní části základ dalšího květenství.

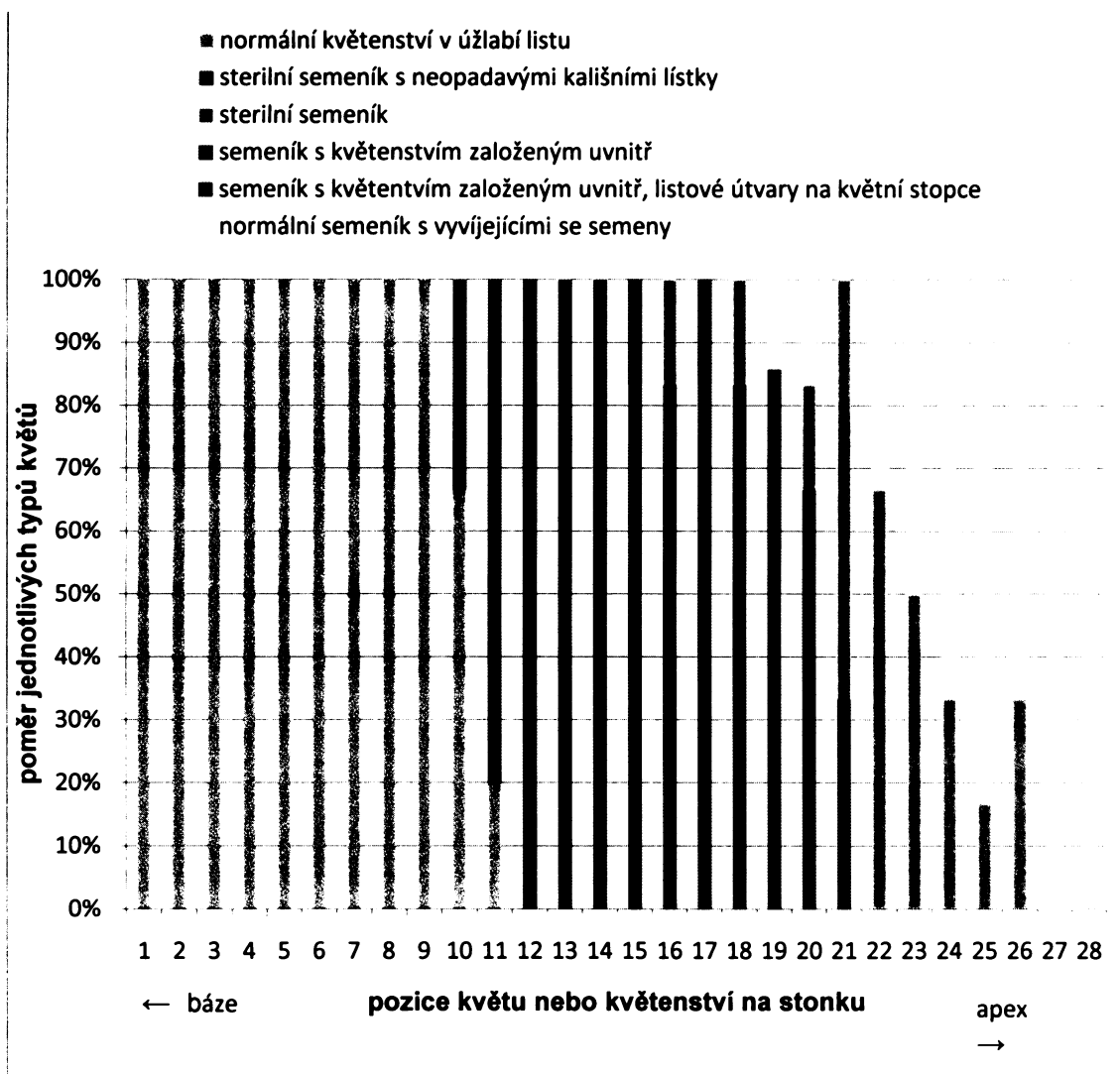


Obr 13. Semeník s květenstvím založeným uvnitř s listovým útvarem na stopce u rostliny Ler, které byla pěstována v půdě na krátkém dnu (8h světlo/16h tma) a od stáří 28 dnů zalévána 100% modifikovaným Hoaglandovým roztokem. Délka dne: 8h světlo, 16h tma.

Výsledky jsou shrnuty v Obr 14 a Obr 15. Z grafů je vidět, že malformované květní orgány se vyskytovaly především u dříve založených květů. Nejčastěji se vyskytovaly mírné abnormality, především sterilní semeníky. U rostlin, které byly zalévány 100% modifikovaným Hoaglandovým roztokem, byl vyšší výskyt semeníků s květenstvím založeným uvnitř oproti rostlinám zalévaným 10% modifikovaným Hoaglandovým roztokem. Některé z těchto květů měli na stopce listové útvary, které se u rostlin zalévaných 10% modifikovaným Hoaglandovým roztokem nevyskytovaly. Vyšší koncentrace modifikovaného Hoaglandova roztoku také způsobila vyšší výskyt sterilních semeníků a u velké část z nich byly přítomny neopadavé kališní lístky.



Obr 14. Poměrné zastoupení jednotlivých typů květů (bližší popis v textu), které se vyskytovaly u šesti rostlin Ler pěstovaných v půdě na krátkém dnu (8h světlo/16h tma) a od stáří 28 dnů 1× týdně zalévaných 10% modifikovaným Hoaglandovým roztokem. Data z 6 rostlin.



Obr 15. Poměrné zastoupení jednotlivých typů květů (bližší popis v textu), které se vyskytovaly u šesti rostlin Ler pěstovaných v půdě na krátkém dnu (8h světlo/16h tma) a od stáří 28 dnů 1× týdně zalévaných 100% modifikovaným Hoaglandovým roztokem. Data z 6 rostlin.

Vysoká dostupnost živin za podmínek krátkého dne tedy způsobuje výskyt květních abnormalit. Při dalších hydroponických pokusech byl proto používán 25% modifikovaný Hoaglandův roztok. Za těchto podmínek se malformované květy vyvíjely pouze ojedinelé.

4.1.4 Kultivace v plastových vaničkách na 1% agaru

Při úvodních pokusech s kultivací v plastových vaničkách na Grodanu byl u rostlin Col problém se vzlínáním média po minerální vlně do středu růžic, čímž docházelo k jejich zamokřování. Problém se podařilo vyřešit podložením růžic silikonovými hadičkami (str. 52) Jako alternativu jsme se však ještě rozhodli vyzkoušet kultivaci s použitím agaru místo Grodanu. V prvním pokusu byly použity zkrácené 10ml pipetové špičky naplněné 1% agarem s 25% nebo 12,5% modifikovaným Hoaglandovým roztokem a pro kontrolní variantu válečky z Grodanu. U všech tří variant byl ve vaničkách 25% modifikovaný Hoaglandův roztok. V každé variantě bylo 5 rostlin.

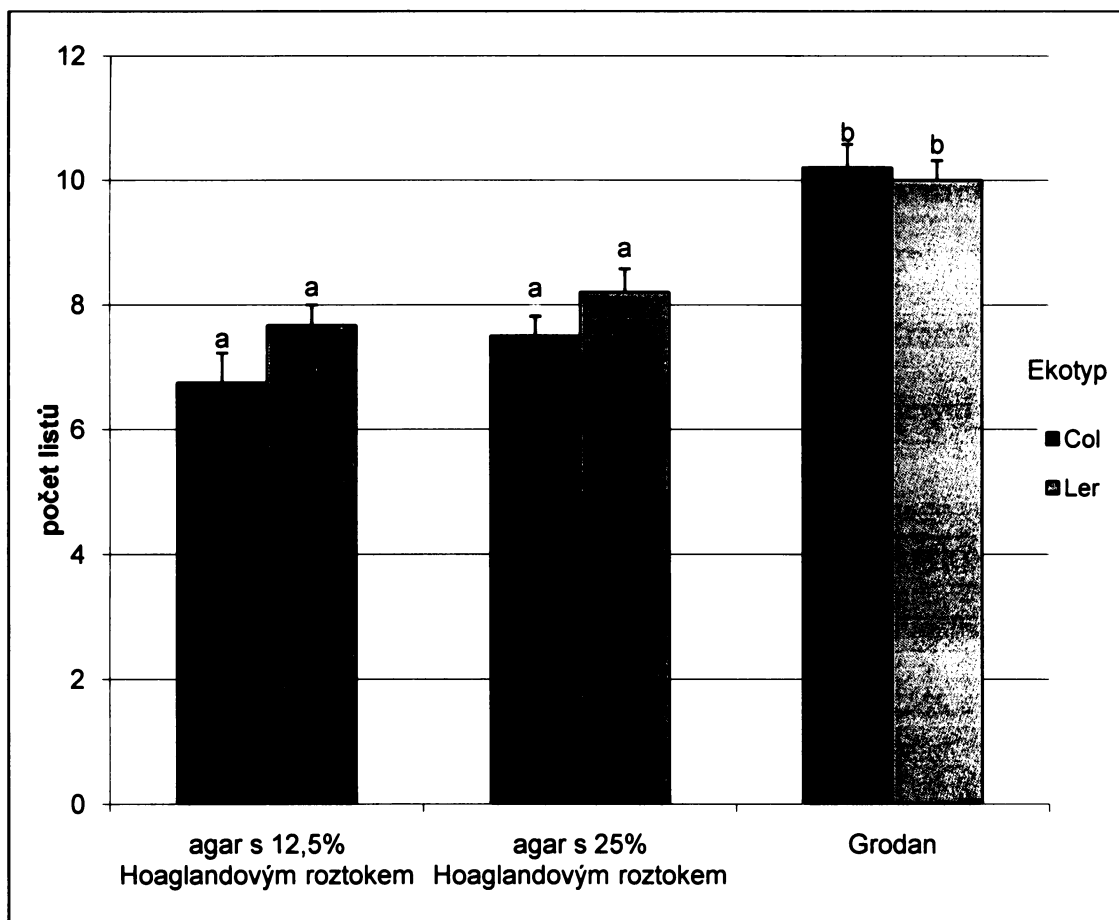
Během prvních dvou týdnů po výsevu u 80% všech špiček agar s 25% i 12,5% modifikovaným Hoaglandovým roztokem postupně propadával špičkami a klesl až o 2 cm. I přes opatrnou manipulaci s vaničkami vypadly některé agarové válečky ze špiček do média. Navíc docházelo i k vysychání agaru, při kterém agar zůstal podél stěn špiček, ale uprostřed se vytvořil důlek, v některých případech hluboký až 3 cm.

Na agaru byla o něco horší klíčivost v porovnání s Grodanem, vyklíčily jen 3/5 semen (na Grodanu vyklíčila všechna semena). Přibližně 1/5 klíčících rostlin se zanořila do agaru. Okolo těchto rostlin se objevila plíseň, která postupně pokryla celý povrch agaru.

Ve stáří rostlin 21 dnů byl stanoven počet vytvořených listů. Z výsledků vyplývá, že to, zda rostliny byly pěstované na agaru nebo na Grodanu, mělo vliv na tvorbu listů. Nebyl však žádný průkazný rozdíl mezi rostlinami pěstovanými na agaru s 12,5% a 25% modifikovaným Hoaglandovým roztokem. Rostliny Ler pěstované na

agaru s 12,5% a 25% modifikovaným Hoaglandovým roztokem měly v průměru 7,6 a 8,2 listů, na Grodanu 10 listů. Rostliny Col měly 6,75, 7,5 a 10,2 listů (Obr 16.).

U takto mladých rostlin nebyl počet listů ovlivněn ekotypem. Způsob pěstování neměl žádný průkazný vliv na délku kořenů.



Obr 16. Vliv způsobu pěstování na počet listů ve věku rostlin 21 dnů. Rostliny byly pěstovány na krátkém dnu (8h světlo/16h tma) v plastových vaničkách s 25% modifikovaným Hoaglandovým roztokem za použití Grodanu nebo 1% agaru. Agarem s 25% nebo 12,5% modifikovaným Hoaglandovým roztokem byly naplněny válečky z 10 ml pipetových špiček. Hodnoty jsou průměry z 5 rostlin, chybové úsečky udávají střední chybu průměru. Varianty v rámci jednoho ekotypu označené stejným písmenem nejsou průkazně rozdílné na hladině významnosti 0,05 (Tukey-Kramer multiple comparison test).

4.1.5 Kultivace v plastových vaničkách na 1%, 1,5% a 2% agaru

Některé problémy při pěstování na agaru, jako zanořování rostlin a propadávání agarových válečků, mohly být způsobeny příliš nízkou koncentrací agaru, proto v dalším pokusu byl použit agar nejen v koncentraci 1%, ale také 1,5% a 2%. Agarové médium obsahovalo 25% modifikovaný Hoaglandův roztok. Kromě zkrácených pipetových špiček byly agarem naplněny i 1,5 ml mikrozkušavky, kterým byla předem odstraněna špička.

Po dvou dnech od založení experimentu klesl 1% agar ve špičkách o 0,5 - 1 cm a u 1,5% agaru ve špičkách se vytvořily malé důlky (hluboké maximálně 2 mm). V ostatních variantách (špičky s 2% agarem a mikrozkušavky s 1%, 1,5% a 2% agarem) zůstal agar beze změn.

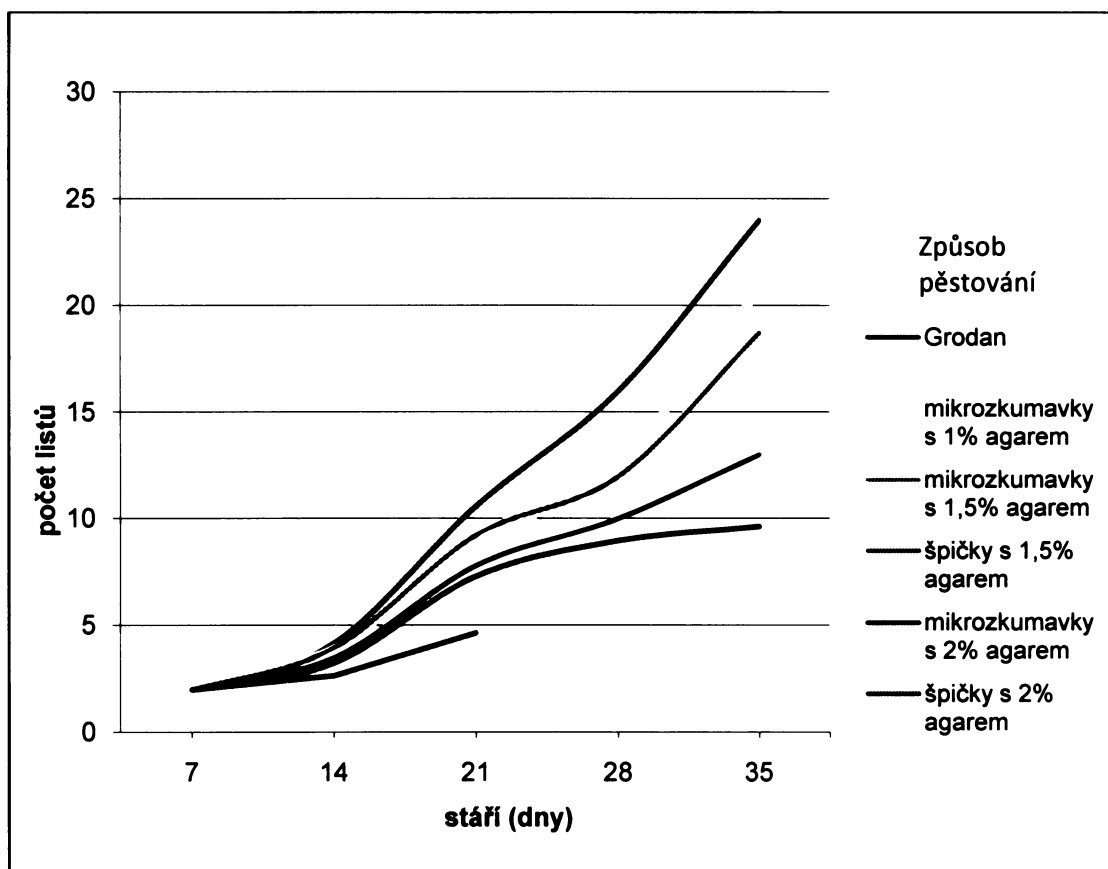
Na základě tohoto zjištění byly pro další pokus s pěstováním rostlin na agaru zvoleny následující varianty: 1% agar v mikrozkušavkách, 1,5% agar ve špičkách a v mikrozkušavkách, 2% agar ve špičkách a v mikrozkušavkách a jako kontrola válečky Grodanu. V každé variantě byly použity rostliny Ler i Col. Během růstu rostlin byly sledovány především dva znaky: počet listů a prorůstání kořenů z agaru či Grodanu do média.

Mezi rostlinami pěstovanými na Grodanu a agaru byl velký rozdíl v rychlosti růstu i v prorůstání kořenů. Již čtvrtý den po výsevu byly patrné rozdíly mezi rostlinami pěstovanými na agaru a rostlinami pěstovanými na Grodanu. Rostliny na Grodanu měly již vyvinuté dělohy, zatímco u rostlin na agaru byly dělohy ještě kryty osemením. Mezi jednotlivými variantami pěstovanými na agaru (špičky 1,5%, špičky 2%, mikrozkušavky 1%, mikrozkušavky 1,5% a mikrozkušavky 2%) nebyl v tomto věku rostlin žádný výrazný rozdíl.

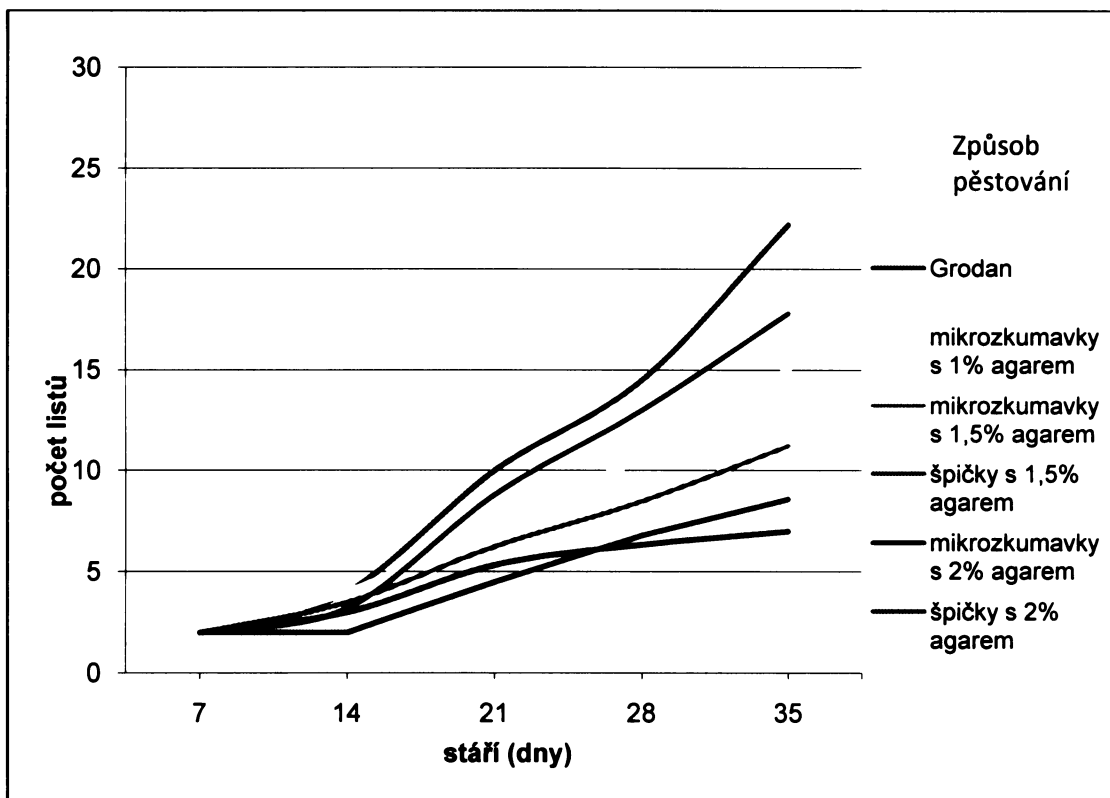
Rostliny pěstované v mikrokumavkách s 2% agaremjevily od stáří 14 dnů výrazné známky stresu (malé listy tmavě zelené až fialové barvy, malý vzrůst rostlin). To nejspíše souviselo s tím, že u těchto rostlin kořeny těžko prorůstaly do agaru a většinou zůstávaly na povrchu. Rostliny Col pěstované v mikrokumavkách s 2% agarem uhynuly ještě před ukončením pokusu, ve stáří 25 dnů.

Až do ukončení pokusu se rostliny Col i Ler pěstované na Grodanu vyvíjely lépe než rostliny pěstované na agaru, měly větší počet listů (Obr 17, Obr 18), větší listovou plochu, mohutnější kořenový systém a nejevily známky stresu. Pokus byl ukončen ve stáří rostlin 35 dnů. Počet listů u rostlin pěstovaných na Grodanu (průměrně 24,4 listů) se výrazně lišil od rostlin pěstovaných na agaru. Nejméně listů vytvořily rostliny pěstované na 2% agaru ve špičkách i v mikrokumavkách (průměrně 10,4 a 10,2 listů).

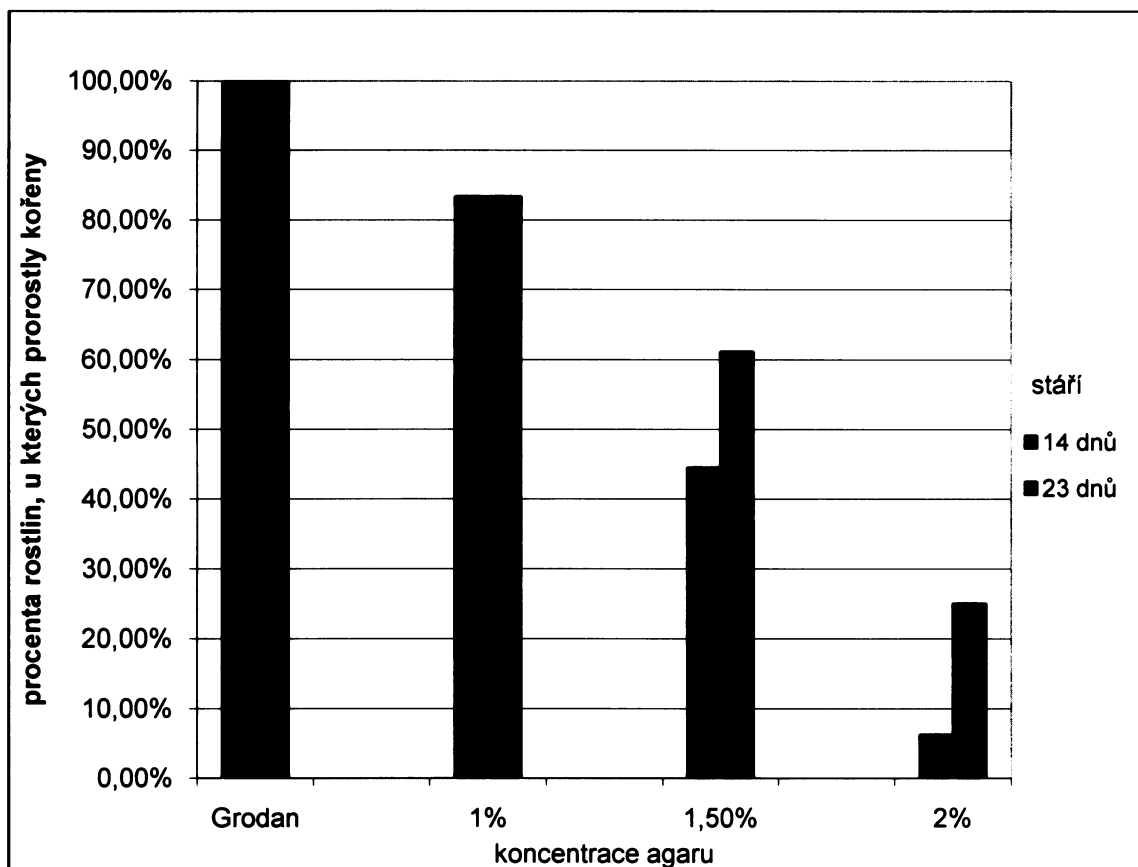
Koncentrace agaru ovlivnila rovněž prorůstání kořenů do živného roztoku. Obecně lze říci, že čím vyšší koncentrace, tím hůře kořeny prorůstaly. Z Grodanu prorostly do média kořeny všech rostlin, z 1% agaru kořeny u 83,3% rostlin, zatímco z rostlin pěstovaných na 2% agaru pouze mělo 25% ve věku 23 dnů prorostlé kořeny. Po tomto věku již žádné další kořeny neprorůstaly (Obr 19).



Obr 17. Vliv způsobu pěstování na počet listů v různém stáří rostlin Col. Listy byly počítány každých sedm dnů. Rostliny byly pěstovány na krátkém dnu (8h světlo/16h tma) v plastových vaničkách s 25% modifikovaným Hoaglandovým roztokem za použití Grodanu nebo agaru. Různě koncentrovaným agarem byly naplněny 1,5ml mikrozkumavky nebo válečky z 10 ml pipetových špiček. Rostliny pěstované ve špičkách s 2% agarem uhynuly ve stáří 25 dnů. Vynesené hodnoty jsou průměr z 5 (Grodan a špičky s 1,5% a 2% agarem), 4 (mikrozkumavky s 1,5% agarem) a 3 (mikrozkumavky s 1% a 2% agarem) rostlin.



Obr 18. Vliv způsobu pěstování na počet listů v různém stáří rostlin Ler. Listy byly počítány každých sedm dnů. Rostliny byly pěstovány na krátkém dnu (8h světlo/16h tma) v plastových vaničkách s 25% modifikovaným Hoaglandovým roztokem za použití Grodanu nebo agaru. Různě koncentrovaným agarem byly naplněny 1,5ml mikrozkumavky nebo válečky z 10 ml pipetových špiček. Vynesené hodnoty jsou průměr z 5 (Grodan a špičky s 1,5% a 2% agarem), 4 (mikrozkumavky s 1,5% agarem) a 3 (mikrozkumavky s 1% a 2% agarem) rostlin.



Obř 19. Podíl rostlin (pouřity ekotypy Col a Ler), u kterých byly v daném stáří prorostlé kořeny z agaru nebo Grodanu do média. Rostliny byly pěstovány na krátkém dnu (8h světlo/16h tma) v plastových vaničkách s 25% modifikovaným Hoaglandovým roztokem za použití Grodanu nebo agaru. Agarem byly naplněny 1,5ml mikřozkumavky nebo válečky z 10 ml pipetových špiček. Pokud kořeny neprorostly do stáří 23 dnů, neprorostly již vůbec. Hodnoty jsou podíly vypočtené vždy dohromady z rostlin obou ekotypů, v případě kultivace na agaru z obou způsobů (špičky + mikřozkumavky). Počty rostlin: 10 (Grodan), 6 (1% agar), 18 (1,5% agar) a 16 (2% agar).

Protože rostliny pěstované na Grodanu rostly výrazně lépe než rostliny na agaru, při dalších pokusech byl používán Grodan.

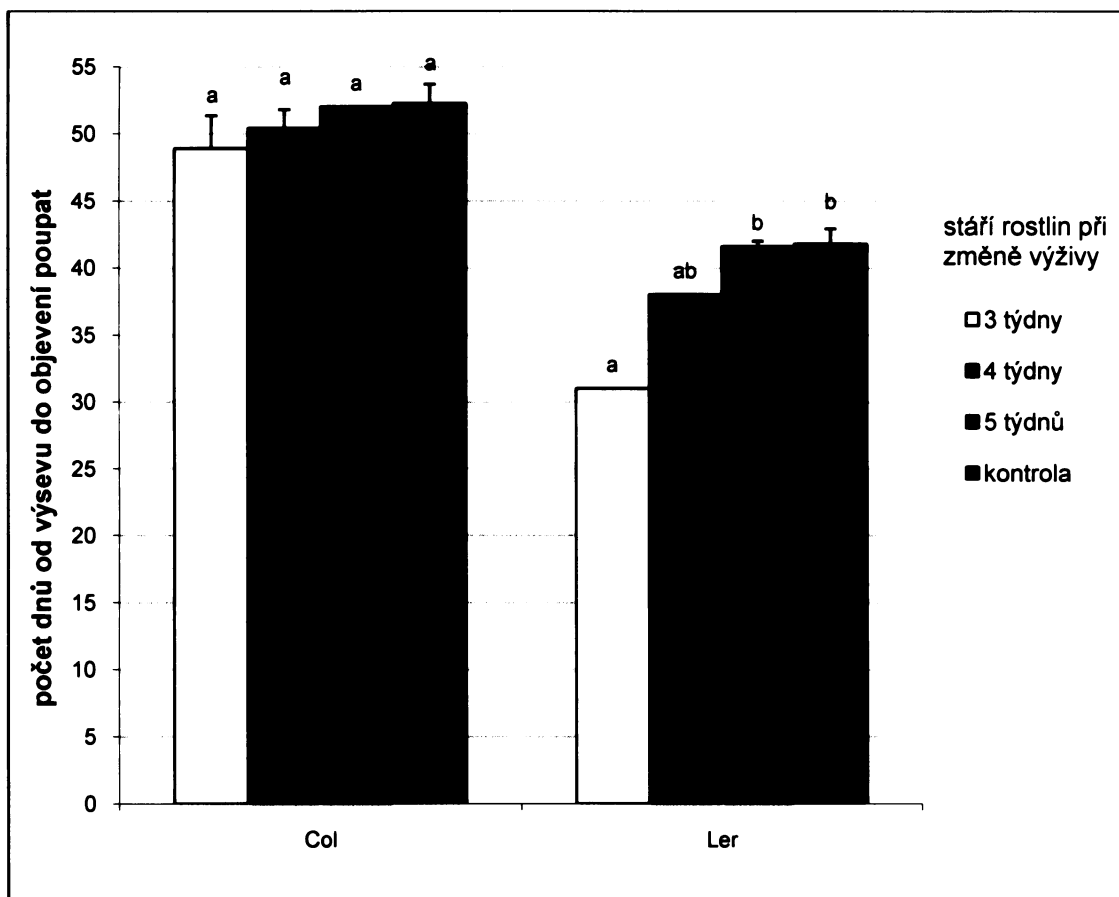
4.2 Vliv nedostatku živin na indukci kvetení

4.2.1 Vliv časování změny minerální výživy

Tento pokus byl prováděn s ekotypy Ler a Col. Rostliny byly nejprve pěstovány v 25% modifikovaném Hoaglandově roztoku. Plné médium bylo nahrazeno 1000× zředěným, a to v různém stáří rostlin: 3, 4 a 5 týdnů. U kontrolní varianty médium zředěno nebylo. V každé variantě bylo 5 rostlin.

Stáří, ve kterém byl stres aplikován, mělo u ekotypu Ler vliv na počet dnů od výsevu do objevení pupat. Objevení pupat bylo u 3-týdenní varianty urychleno v průměru o 10,8 dnů oproti kontrolní variantě. Zbylé dvě varianty (4 a 5 týdnů) se od kontrolní varianty statisticky průkazně nelišily. U ekotypu Col nemělo stáří rostliny při změně výživy na dobu objevení pupat průkazný vliv (Obr 20).

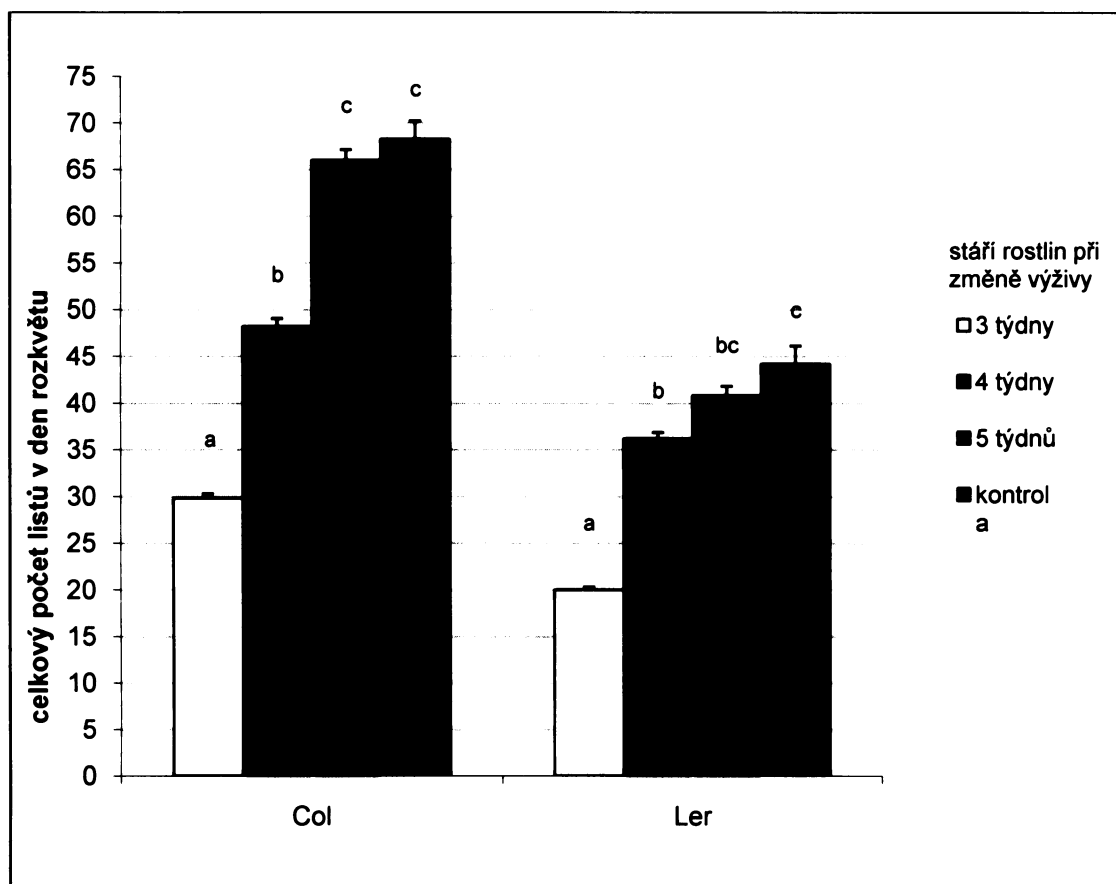
Vliv stáří, ve kterém byla změněna výživa, byl významný i u počtu primárních listů v růžici v době rozkvětu. U ekotypu Ler sice nejsou průkazné rozdíly mezi jednotlivými časově nejbližšími variantami změny výživy na hladině významnosti 0,05, lze však vysledovat trend zvětšování průměrného počtu listů v růžici (postupně od 15,2 pro variantu změny výživy ve třetím týdnu po výsevu až do 34 pro kontrolní variantu, u které se změna výživy vůbec neprováděla). Pro ekotyp Col je patrný stejný trend, projevující se výrazněji i mezi jednotlivými časově nejbližšími variantami změny výživy, od 24,4 pro variantu změny výživy ve třetím týdnu po výsevu až do 58,5 pro kontrolní variantu. Pouze mezi variantou změny výživy po pěti týdnech a kontrolou nebyl tento rozdíl průkazný.



Obr 20. Vliv stáří rostlin, ve kterém byl 25% modifikovaný Hoaglandův roztok nahrazen 0,025% modifikovaným Hoaglandovým roztokem, na počet dnů od výsevu do objevení makroskopicky viditelných pupat. Rostliny byly pěstovány na krátkém dnu (8h světlo/16h tma). Hodnoty jsou průměry z 5 rostlin, chybové úsečky udávají střední chybu průměru. Varianty v rámci jednoho ekotypu označené stejným písmenem nejsou průkazně rozdílné na hladině významnosti 0,05 (Tukey-Kramer multiple comparison test).

Podobně jako počet primárních listů v růžici byl ovlivněn i celkový počet listů v den rozkvětu. U obou ekotypů byl celkový počet listů nejnižší při změně výživy ve 3 týdnech. Rostliny Col měly v průměru o 38,5 a rostliny Ler o 24,2 listů méně než kontrolní varianty, u kterých se změna výživy vůbec neprováděla. Při aplikaci

nutričního stresu ve stáří 4 týdny se počet primárních listů lišil od kontrolní varianty (u Col o 20,1 a Ler o 8 listů méně) i od varianty se změnou výživy ve 3 týdnech. U rostlin, u kterých byl stres aplikován ve stáří 5 týdnů, se počet primárních listů statisticky průkazně nelišil od kontroly (Obr 21).

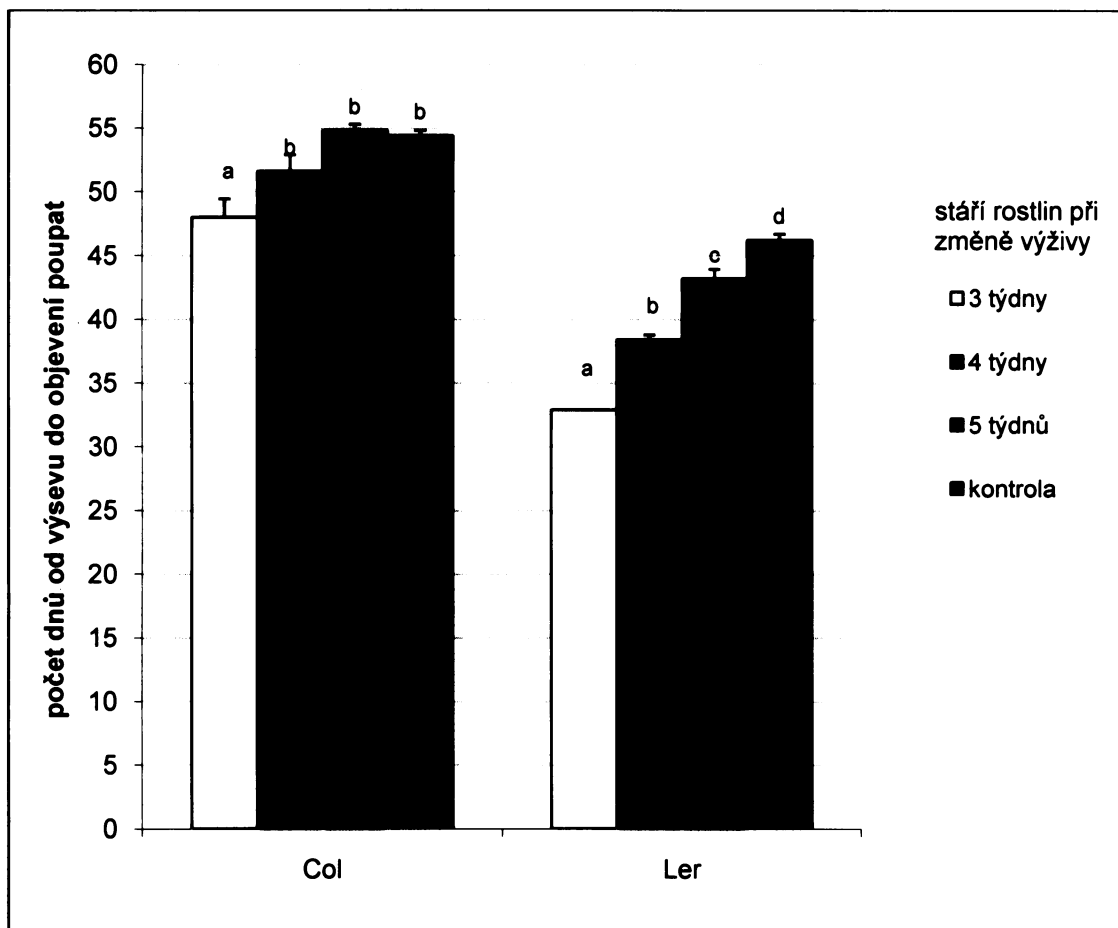


Obr 21. Vliv stáří rostlin, ve kterém byl 25% modifikovaný Hoaglandův roztok nahrazen 0,025% modifikovaným Hoaglandovým roztokem, na počet primárních listů (primární listy v růžici + listy na stonku) v den rozkvětu prvního květu. Rostliny byly pěstovány na krátkém dnu (8h světlo/16h tma). Hodnoty jsou průměry z 5 rostlin, chybové úsečky udávají střední chybu průměru. Varianty v rámci jednoho ekotypu označené stejným písmenem nejsou průkazně rozdílné na hladině významnosti 0,05 (Tukey-Kramer multiple comparison test).

Počet listů na stonku se od kontroly statisticky průkazně lišil pouze u varianty, kdy bylo médium zředěno ve věku 3 týdny, a to u obou ekotypů. Rostliny Ler měly v této variantě průměrně 4,9 a Col 5,5, v kontrolní variantě u ekotypu Ler 9,1 a Col 9,7 listů na stonku.

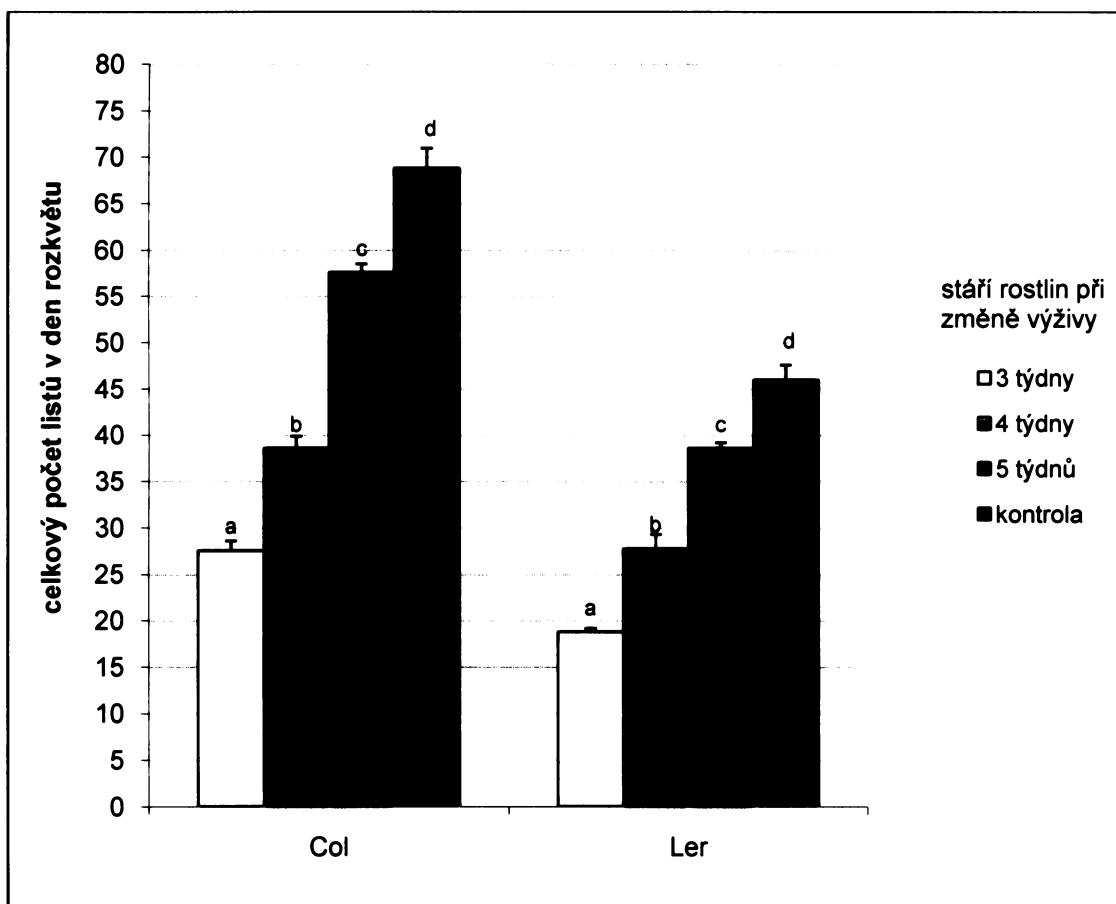
Aplikace stresu měla vliv také na počet dnů od objevení makroskopicky viditelných pupat do rozkvetu prvního květu a na výšku stonku v den rozkvetu prvního květu. Doba od objevení makroskopicky viditelných pupat do rozkvetu prvního květu byla u rostlin, u kterých bylo médium zředěno ve stáří 3 týdny, kratší o 4,8 dnů v případě ekotypu Col a 13,5 dnů v případě ekotypu Ler v porovnání s kontrolními rostlinami. Výška stonku ve variantě aplikace stresu ve 3 týdnech byla u rostlin Col v průměru 2,7 cm a Ler 1,1 cm, u kontrolních rostlin Col 10,1 a Ler 7,9 cm. Ostatní varianty (redukce výživy ve stáří 4 nebo 5 týdnů) byly v obou parametrech srovnatelné s rostlinami se změnou výživy ve 3 týdnech.

Při opakování experimentu vykazovaly výsledky u všech sledovaných parametrů podobné trendy jako v prvním pokuse: Zředění média ve třech týdnech urychlilo objevení pupat Ler o 13,3 dnů v porovnání s kontrolní variantou. Toto urychlení kvetení bylo slabší, když byl stres aplikován později, ale stále bylo statisticky významné, dokonce i při zředění ve stáří 5 týdnů. U ekotypu Col bylo objevení pupat průkazně urychleno pouze u 3-týdenní varianty, a to o 6,4 dnů oproti kontrolní variantě (Obr 22).



Obr 22. Vliv stáří rostlin, ve kterém byl 25% modifikovaný Hoaglandův roztok nahrazen 0,025% modifikovaným Hoaglandovým roztokem, na počet dnů od výsevu do objevení makroskopicky viditelných poupat. Opakovaný pokus. Rostliny byly pěstovány na krátkém dnu (8h světlo/16h tma). Hodnoty jsou průměry z 5 rostlin, chybové úsečky udávají střední chybu průměru. Varianty v rámci jednoho ekotypu označené stejným písmenem nejsou průkazně rozdílné na hladině významnosti 0,05 (Tukey-Kramer multiple comparison test).

Na rozdíl od předchozího experimentu se počet všech primárních listů, podobně jako u počtu primárních listů v růžici, od kontrolní varianty lišil nejen u variant, ve kterých byla výživa změněna ve 3 a 4 týdnech, ale i v 5 týdnech (Obr 23).



Obr 23. Vliv stáří rostlin, ve kterém byl 25% modifikovaný Hoaglandův roztok nahrazen 0,025% modifikovaným Hoaglandovým roztokem, na počet primárních listů (primární listy v růžici + listy na stonku) v den rozkvětu prvního květu. Opakovaný pokus. Rostliny byly pěstovány na krátkém dnu (8h světlo/16h tma). Hodnoty jsou průměry z 5 rostlin, chybové úsečky udávají střední chybu průměru. Varianty v rámci jednoho ekotypu označené stejným písmenem nejsou průkazně rozdílné na hladině významnosti 0,05 (Tukey-Kramer multiple comparison test).

Podobně jako u předchozího experimentu byl počet listů na stonku u varianty, kdy bylo médium zředěno ve stáří 3 týdny, statisticky průkazně nižší než u kontrolních

rostlin. U počtu dnů od objevení makroskopicky viditelných pupat do rozkvetu prvního květu a u výšky stonku v den rozkvetu prvního květu nebyl mezi jednotlivými variantami stresovaných rostlin (zředění média ve stáří 3, 4 nebo 5 týdnů) žádný statisticky průkazný rozdíl, ale všechny se lišily od kontrolní varianty.

Protože nejvýraznější urychlení objevení pupat bylo při změně výživy ve stáří rostlin 3 týdny, byl při následujících experimentech stres aplikován právě v tomto věku.

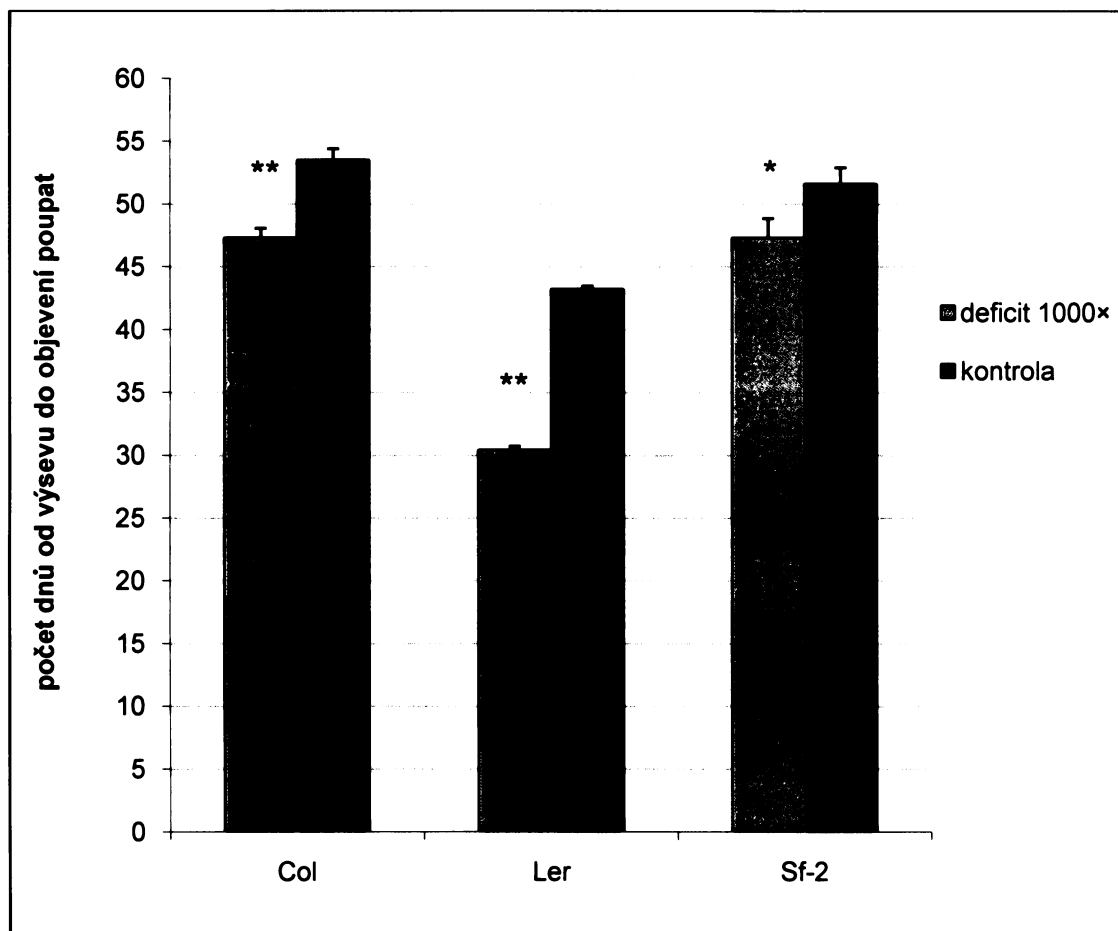
4.2.2 Vliv deficitu živin na kvetení u různých ekotypů při aplikaci 1000× zředěného média

V tomto pokusu byl porovnáván vliv deficitu živin na různé ekotypy. Použity byly ekotypy Ler, Col a Sf-2. U každého z nich byly 2 varianty. U jedné bylo plné médium nahrazeno 1000× zředěným roztokem ve věku rostlin 3 týdny. U druhé, kontrolní, varianty médium zředěno nebylo. V každé variantě bylo 10 rostlin.

První projevy deficitu živin, které se u všech ekotypů objevily pět dnů po změně výživy, byly tmavší mladé listy a menší listová plocha. Následovala tvorba antokyanů, což se projevovalo fialovým zbarvením starších listů, v nichž byl navíc postupně odbouráván chlorofyl. Dále docházelo ke zpomalení tvorby nových listů. Byly počítány listy v den změny výživy a 14 dnů po změně. Během této doby stresované rostliny Ler vytvořily v průměru o 6,1, Col o 10 a Sf-2 15,9 listů méně v porovnání s kontrolní variantou.

Čas do objevení pupat byl významně ovlivněn jak dostupností živin, tak ekotypem. Analýzou rozptylu byla prokázána i interakce mezi ekotypem a množstvím živin, což ukazuje, že existují rozdíly mezi ekotypy v reakci na deficit živin. Vliv deficitu byl nejvýraznější u ekotypu Ler, který tvořil pupata v průměru o 13 dnů dříve

než kontrolní rostliny. U stresovaných rostlin Col se první poupata objevila o 6,2 a u Sf-2 o 4,3 dnů dříve než u kontroly (Obr 24).



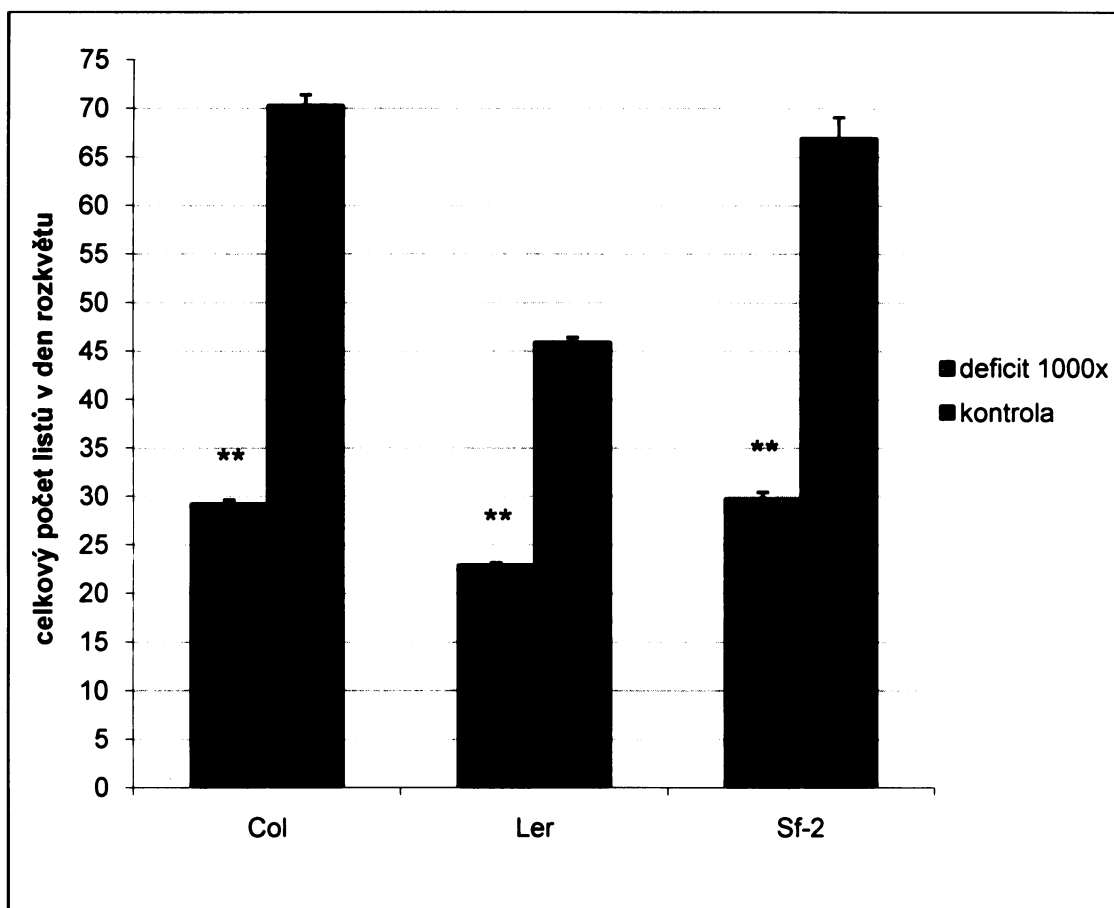
Obr 24. Vliv nahrazení plného média médiem 1000× zředěným na počet dnů od výsevu do objevení makroskopicky viditelných poupat u jednotlivých ekotypů. Varianta, u které byl ve stáří 3 týdny 25% modifikovaný Hoaglandův roztok nahrazen 0,025% modifikovaným Hoaglandovým roztokem je označena deficit 1000×. U kontrolní varianty médium zředěno nebylo. Rostliny byly pěstovány na krátkém dnu (8h světlo/16h tma). Hodnoty jsou průměry z 10 rostlin, chybové úsečky udávají střední chybu průměru. Varianty označené * jsou průkazně rozdílné oproti kontrole příslušného ekotypu na hladině významnosti 0,05, ** na hladině 0,01 (Equal-Variance T-Test).

Významný byl také vliv deficitu na počet listů v růžici, počet stonkových listů, celkový počet listů, výšku stonku v den rozkvetu prvního květu a počet dnů od objevení pupat do rozkvetu. Počet listů v růžici v den rozkvetu byl nejvíce ovlivněn u Col. Rostliny Col pěstované ve zředěném roztoku měly v průměru o 36,9 listů méně, Sf-2 o 31 a Ler o 18 listů v růžici méně než kontrolní rostliny.

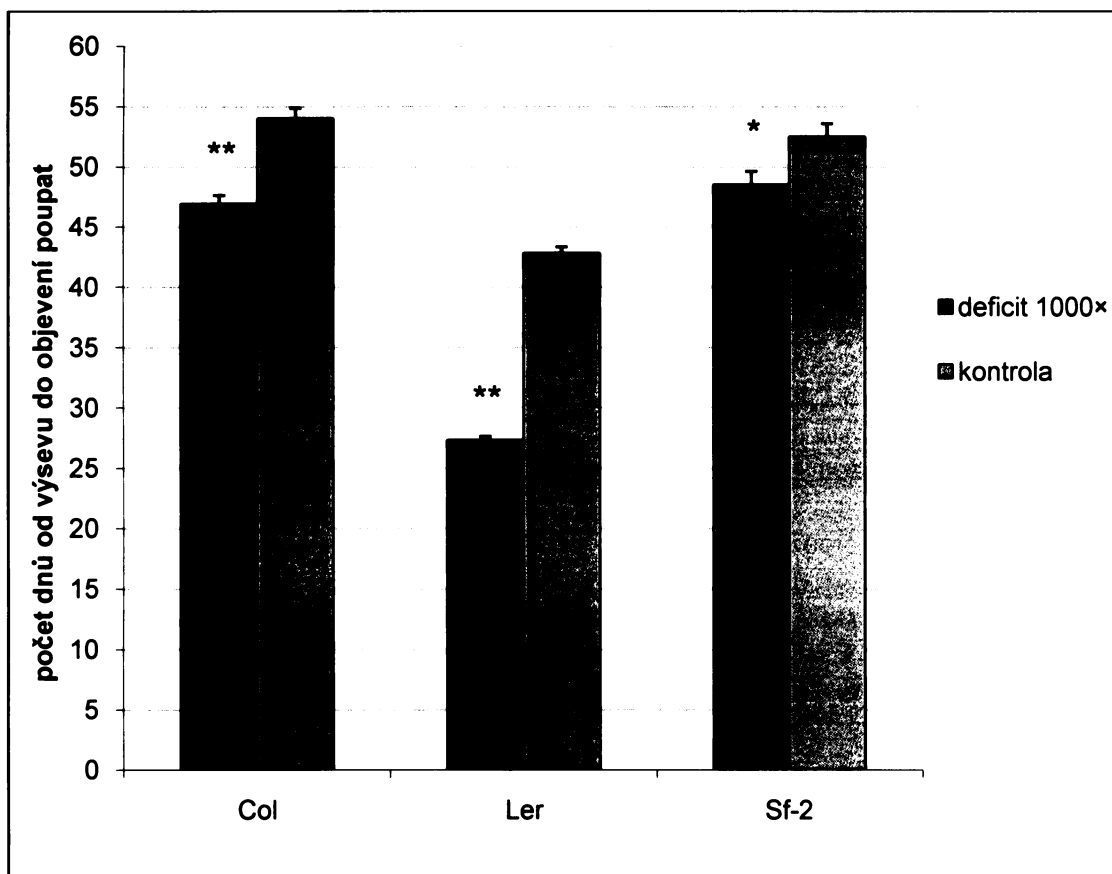
Výrazně redukován byl také počet listů na stonku a celkový počet listů v den rozkvetu. Největší rozdíl v celkovém počtu listů mezi kontrolní a deficitní variantou byl u ekotypu Col (rozdíl průměrně o 41,1 listů), dále u ekotypu Sf-2 (o 37,2 listů) a Ler (o 23 listů) (Obr 25).

U rostlin vystavených deficitu živin byl stonek v době rozkvetu kratší (Col v průměru o 12,6 cm, Sf-2 o 10,1 a Ler o 8,2 cm) oproti rostlinám pěstovaným v plném médiu. Rozdíl v počtu dnů od objevení pupat do rozkvetu byl statisticky významný pouze u rostlin Ler (urychlení o 13,8 dnů u deficitní varianty) a Col (urychlení o 4,3 dnů u deficitní varianty), zatímco mezi oběma variantami ekotypu Sf-2 nebyl rozdíl.

Při opakování experimentu byl opět vliv deficitu na počet dnů od výsevu do objevení pupat nejvýraznější u ekotypu Ler. Stresované rostliny Ler tvořily pupata v průměru o 15,5 dnů, rostliny Col o 7,1 a rostliny Sf-2 o 4 dny dříve než kontrolní rostliny daných ekotypů (Obr 26).



Obr 25. Vliv nahrazení plného média médiem 1000× zředěným na celkový počet listů (listy v růžici + listy na stonku) v den rozkvětu u jednotlivých ekotypů. Varianta, u které byl ve stáří 3 týdny 25% modifikovaný Hoaglandův roztok nahrazen 0,025% modifikovaným Hoaglandovým roztokem je označena deficit 1000×. U kontrolní varianty médium zředěno nebylo. Rostliny byly pěstovány na krátkém dnu (8h světlo/16h tma). Hodnoty jsou průměry z 10 rostlin, chybové úsečky udávají střední chybu průměru. Varianty označené * jsou průkazně rozdílné oproti kontrole příslušného ekotypu na hladině významnosti 0,05, ** na hladině 0,01 (Equal-Variance T-Test).

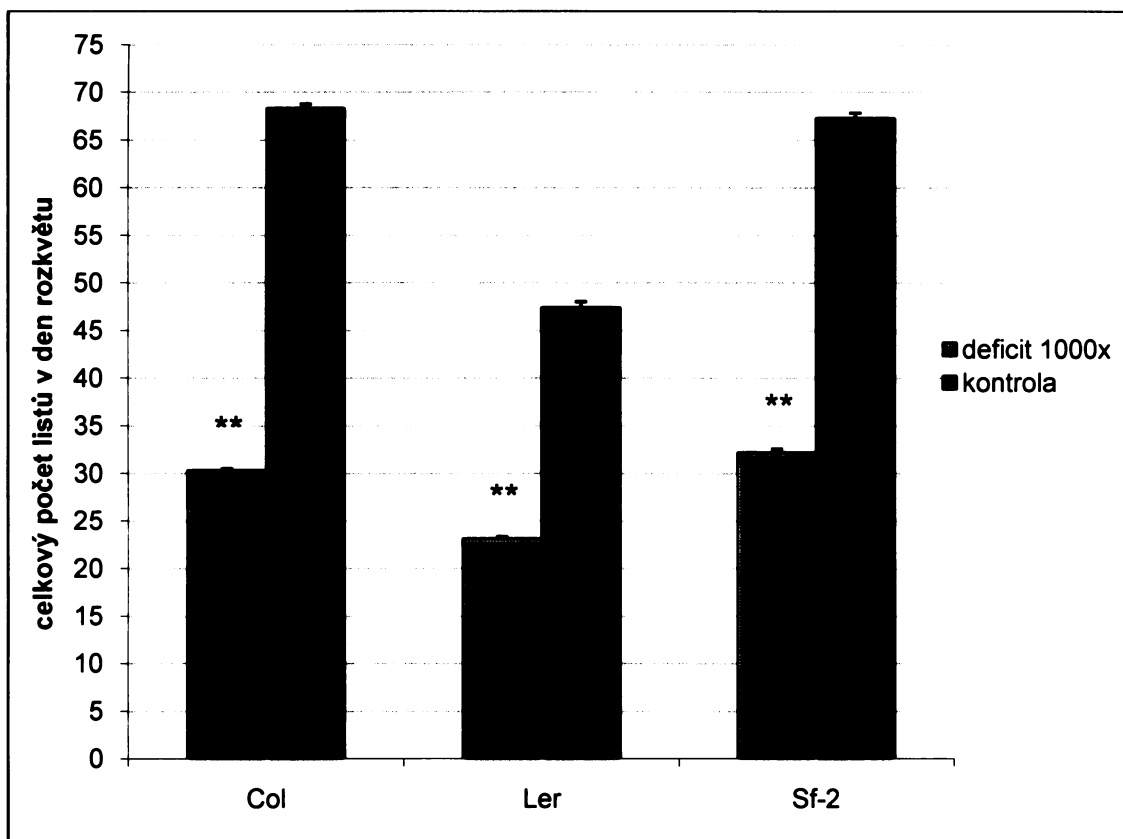


Obr 26. Vliv nahrazení plného média médiem 1000× zředěným na počet dnů od výsevu do objevení makroskopicky viditelných poupat u jednotlivých ekotypů. Opakovaný pokus. Varianta, u které byl ve stáří 3 týdny 25% modifikovaný Hoaglandův roztok nahrazen 0,025% modifikovaným Hoaglandovým roztokem je označena deficit 1000×. U kontrolní varianty médium zředěno nebylo. Rostliny byly pěstovány na krátkém dnu (8h světlo/16h tma). Hodnoty jsou průměry z 10 rostlin, chybové úsečky udávají střední chybu průměru. Varianty označené * jsou průkazně rozdílné oproti kontrole příslušného ekotypu na hladině významnosti 0,05, ** na hladině 0,01 (Equal-Variance T-Test).

Počet listů v růžici v den rozkvetu byl u rostlin Col vystavených deficitu živin menší o 34,1, u Sf-2 o 29,1 a u Ler 19,5 v porovnání s rostlinami pěstovanými v plném médiu.

Podobně jako při předchozím pokusu byl největší rozdíl v celkovém počtu listů v den rozkvetu mezi kontrolní a deficitní variantou u rostlin Col (rozdíl průměrně o 38 listů), dále pak u rostlin Sf-2 (o 35,1 listů) a u rostlin Ler (o 24,3 listů) (Obr 27).

U deficitní varianty ekotypu Col byl stonek kratší průměrně o 11,2 cm, u ekotypu Sf-2 o 8,9 a ekotypu Ler o 7,4 cm v porovnání s kontrolní variantou. Rozdíl v počtu dnů od objevení pupat do rozkvetu byl stejně jako v předchozím experimentu statisticky významný u rostlin Ler (urychlení o 11,7 dnů) a Col (urychlení o 3,6 dnů).



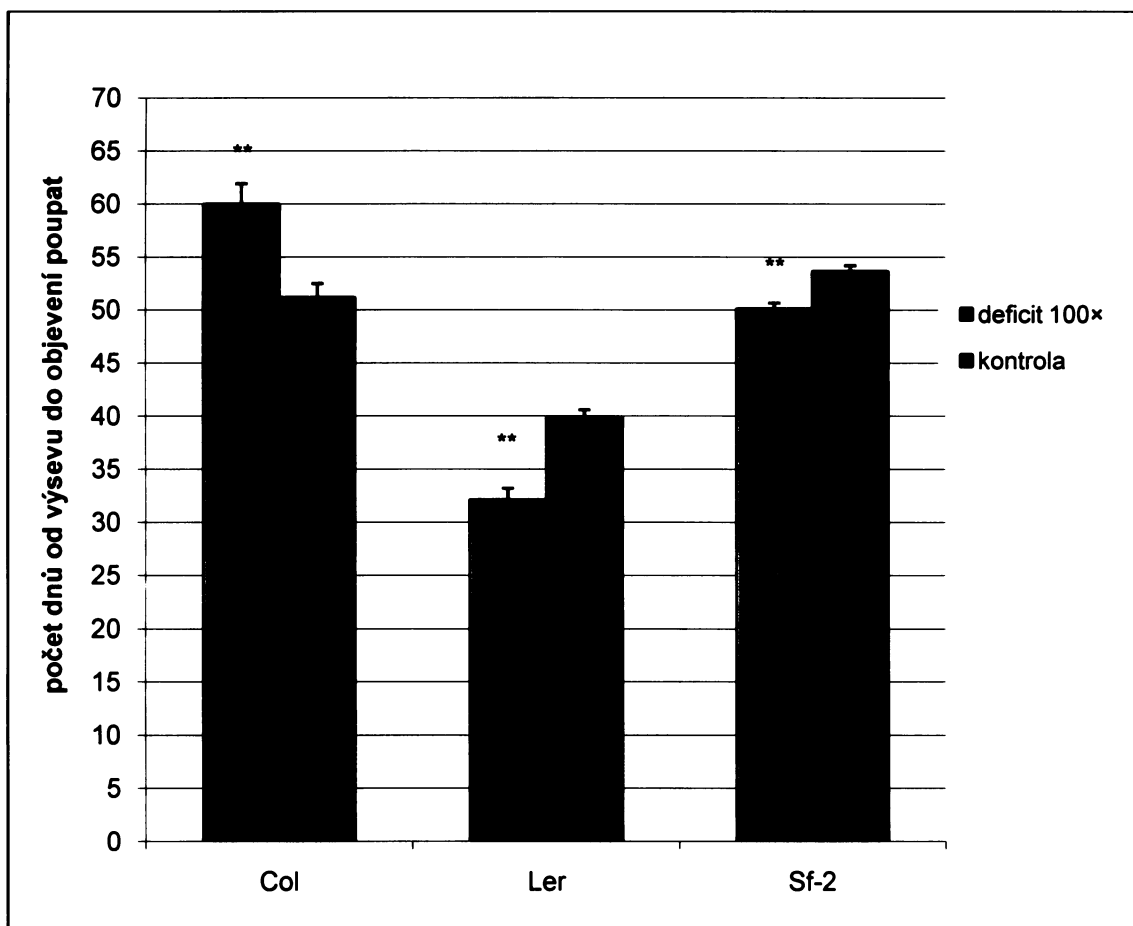
Obr 27. Vliv nahrazení plného média médiem 1000× zředěným na celkový počet listů (listy v růžici + listy na stonku) v den rozkvetu u jednotlivých ekotypů. Opakovaný pokus. Varianta, u které byl ve stáří 3 týdny 25% modifikovaný Hoaglandův roztok nahrazen 0,025% modifikovaným Hoaglandovým roztokem je označena deficit 1000×. U kontrolní varianty médium zředěno nebylo. Rostliny byly pěstovány na krátkém dnu (8h světlo/16h tma). Hodnoty jsou průměry z 10 rostlin, chybové úsečky udávají střední chybu průměru. Varianty označené * jsou průkazně rozdílné oproti kontrole příslušného ekotypu na hladině významnosti 0,05, ** na hladině 0,01 (Equal-Variance T-Test).

4.2.3 Vliv deficitu živin na kvetení u různých ekotypů při aplikaci 100× zředěného média

V následném pokusu byl u deficitní varianty 25% modifikovaný Hoaglandův roztok ve třech týdnech stáří rostlin nahrazen 0,25% modifikovaným Hoaglandovým roztokem, v kontrolní variantě rostliny dále rostly v plném médiu. Byly opět použity ekotypy Ler, Col a Sf-2. V každé variantě bylo 10 rostlin.

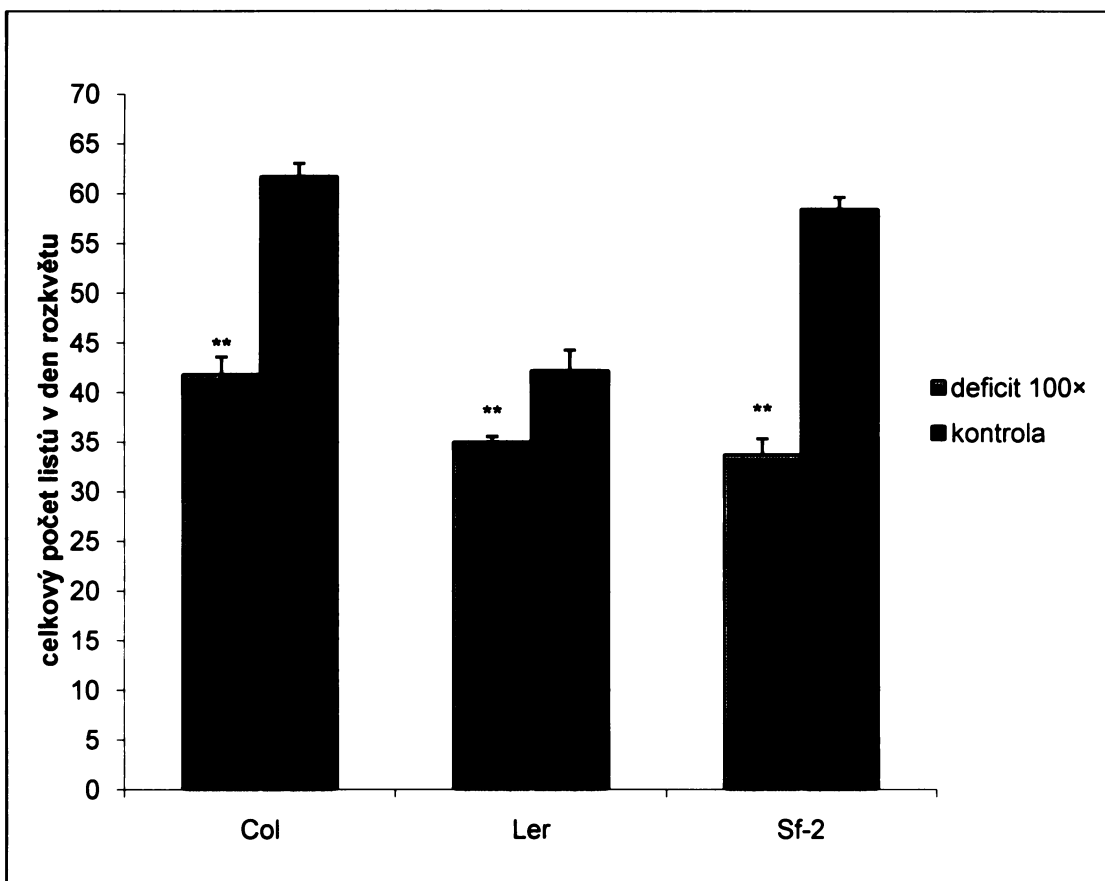
První projevy deficitu živin byly u všech tří ekotypů zřetelné po sedmi až devíti dnech od změny výživy. Těmito projevy opět byly tmavé mladé listy a menší listová plocha, ale nebyly tak výrazné jako v předchozím pokusu (tj. při použití 1000× zředěného roztoku). Podobně jako při aplikaci 1000× zředěného roztoku, i zde docházelo ke zpomalení tvorby listů vlivem nutričního deficitu. Rostliny Col vytvořily během prvních čtrnácti dnů po aplikaci stresu v průměru o 5,4 listů méně, Ler o 7,7 a Sf-2 o 14,9 listů méně než kontroly příslušného ekotypu.

U ekotypů Ler a Sf-2 nahrazení plného média roztokem 100× zředěným významně snížilo počet dnů od výsevu do vytvoření makroskopicky viditelných pupat a to průměrně o 7,8 dnů u rostlin Ler a o 3,5 dnů u rostlin Sf-2 v porovnání s kontrolními rostlinami. Na rostliny Col měla aplikace deficitu opačný efekt, počet dnů do vytvoření pupat se zvýšil o 8,8 (Obr 28).



Obr 28. Vliv nahrazení plného média médiem 100× zředěným na počet dnů od výsevu do objevení makroskopicky viditelných pupat u jednotlivých ekotypů. Varianta, u které byl ve stáří 3 týdny 25% modifikovaný Hoaglandův roztok nahrazen 0,25% modifikovaným Hoaglandovým roztokem, je označena deficit 100×. U kontrolní varianty médium zředěno nebylo. Rostliny byly pěstovány na krátkém dnu (8h světlo/16h tma). Hodnoty jsou průměry z 10 rostlin, chybové úsečky udávají střední chybu průměru. Varianty označené * jsou průkazně rozdílné oproti kontrole příslušného ekotypu na hladině významnosti 0,05, ** na hladině 0,01 (Equal-Variance T-Test).

Podobně jako při použití 1000× zředěného roztoku, i zde byl významně snížený počet listů v růžici (u rostlin Sf-2 průměrně o 21,5, Col o 13,4, Ler o 5,7), počet listů na stonku (u rostlin Col průměrně o 6,5, Sf-2 o 3,1, Ler o 1,5) a celkový počet listů v den rozkvetu u rostlin pěstovaných v 100× zředěném médiu v porovnání s kontrolní variantou. U deficitních rostlin byl celkový počet listů v den rozkvetu byl nejméně redukován u ekotypu Sf-2 (o 24,6), dále Col (o 19,9) a Ler (7,2) (Obr 29).



Obr 29. Vliv nahrazení plného média médiem 100× zředěným na celkový počet listů (listy v růžici + listy na stonku) v den rozkvetu u jednotlivých ekotypů. Varianta, u které byl ve stáří 3 týdny 25% modifikovaný Hoaglandův roztok nahrazen 0,25% modifikovaným Hoaglandovým roztokem je označena deficit 100×. U kontrolní varianty médium zředěno nebylo. Rostliny byly pěstovány na krátkém dnu (8h světlo/16h tma). Hodnoty jsou průměry z 10 rostlin, chybové úsečky udávají střední chybu průměru. Varianty označené * jsou průkazně rozdílné oproti kontrole příslušného ekotypu na hladině významnosti 0,05, ** na hladině 0,01 (Equal-Variance T-Test).

Stejně jako při pokusech s 1000× zředěným roztokem, byl u deficitních rostlin nižší stonek v den rozkvetu (u Col v průměru o 9,5 cm, Sf-2 o 7,9 cm a Ler o 3 cm) oproti rostlinám pěstovaným v plném médiu.

Nedostatek živin neměl u Sf-2 statisticky průkazný vliv na počet dnů od objevení pupat do rozkvetu. U Ler byl tento počet dnů menší (o 13,8 dnů), zatímco u Col větší o 3,43 dnů.

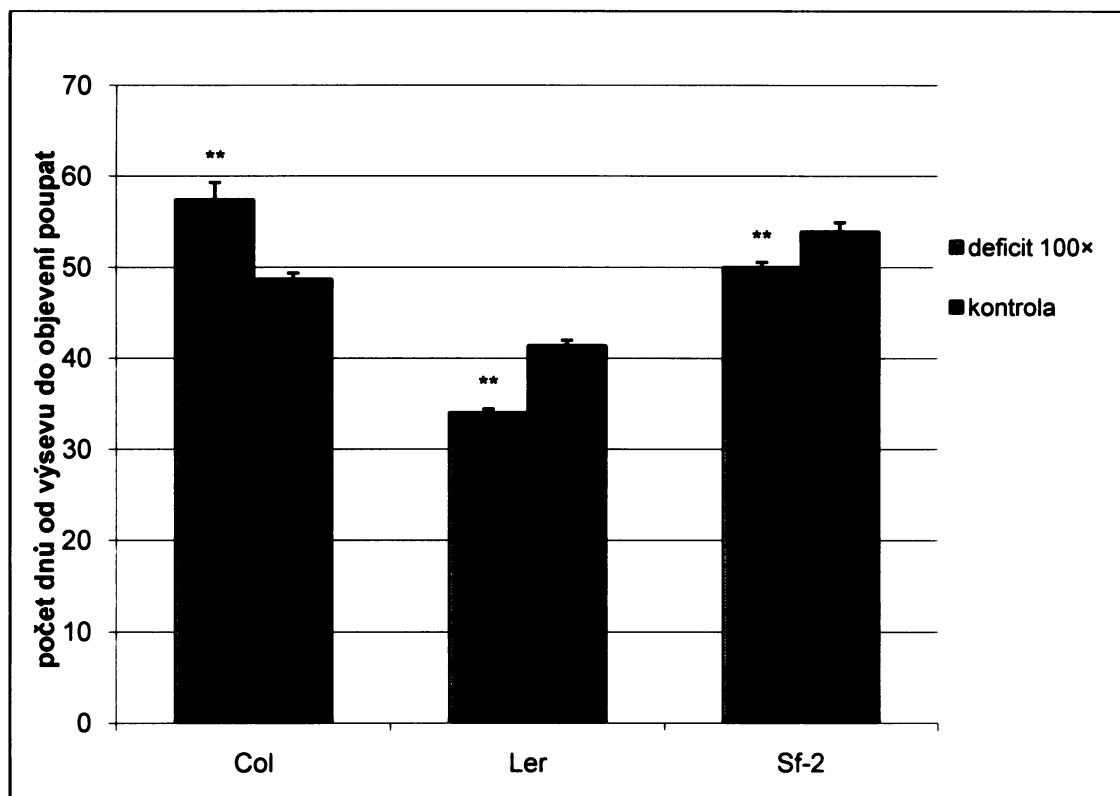
Při opakování experimentu byl počet dnů od výsevu do vytvoření makroskopicky viditelných pupat u deficitních rostlin u ekotypů Ler o 7,4 a Sf-2 o 3,9 dnů nižší, u ekotypu Col o 8,7 vyšší oproti kontrole (Obr 30).

Protože během pokusu došlo omylem ve stáří rostlin 63 dnů u ekotypu Col k nahrazení 0,25% modifikovaného Hoaglandova roztoku plným médiem, nejsou u tohoto ekotypu k dispozici počty listů, délka stonku v den rozkvetu a počet dnů od objevení pupat do rozkvetu.

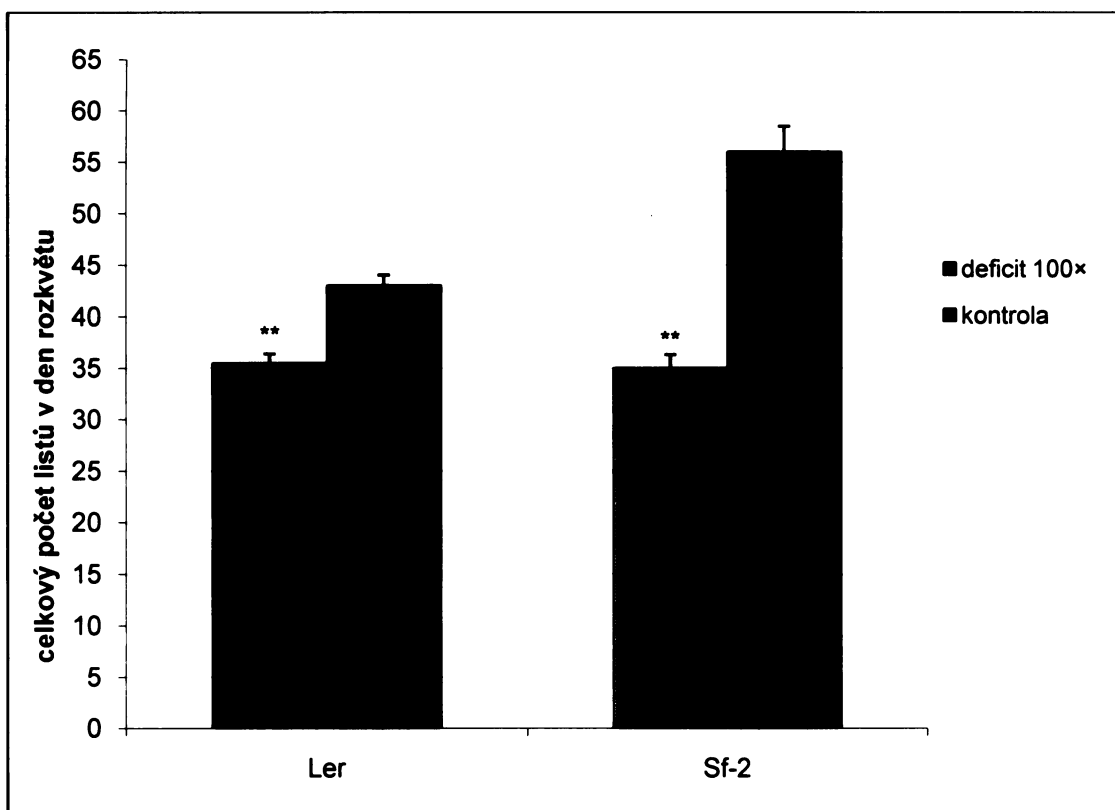
Počet listů v růžici v den rozkvetu byl u rostlin Sf-2 vystavených deficitu živin menší o 18,5 a u Ler o 7,1 v porovnání s rostlinami pěstovanými v plném médiu.

Rozdíl v celkovém počtu listů v den rozkvetu mezi kontrolní a deficitní variantou u rostlin Sf-2 byl 21 a u ekotypu Ler 7,5 (Obr 31).

U deficitní varianty ekotypu Sf-2 byl stonek kratší průměrně o 6,0 cm a u ekotypu Ler o 3,94 cm v porovnání s kontrolní variantou. Stejně jako při předchozím experimentu nebyl rozdíl v počtu dnů od objevení pupat do rozkvetu u ekotypu Sf-2 statisticky průkazný. U rostlin Ler byla tato doba o 9,5 dnů kratší.



Obr 30. Vliv nahrazení plného média médiem 100× zředěným na počet dnů od výsevu do objevení makroskopicky viditelných pupat u jednotlivých ekotypů. Opakovaný pokus. Varianta, u které byl ve stáří 3 týdny 25% modifikovaný Hoaglandův roztok nahrazen 0,25% modifikovaným Hoaglandovým roztokem je označena deficit 100×. U kontrolní varianty médium zředěno nebylo. Rostliny byly pěstovány na krátkém dnu (8h světlo/16h tma). Hodnoty jsou průměry z 10 rostlin, chybové úsečky udávají střední chybu průměru. Varianty označené * jsou průkazně rozdílné oproti kontrole příslušného ekotypu na hladině významnosti 0,05, ** na hladině 0,01 (Equal-Variance T-Test).



Obr 31. Vliv nahrazení plného média médiem 100× zředěným na celkový počet listů (listy v růžici + listy na stonku) v den rozkvetu u jednotlivých ekotypů. Opakovaný pokus. Varianta, u které byl ve stáří 3 týdny 25% modifikovaný Hoaglandův roztok nahrazen 0,25% modifikovaným Hoaglandovým roztokem je označena deficit 100×. U kontrolní varianty médium zředěno nebylo. Rostliny byly pěstovány na krátkém dnu (8h světlo/16h tma). Hodnoty jsou průměry z 10 rostlin, chybové úsečky udávají střední chybu průměru. Varianty označené * jsou průkazně rozdílné oproti kontrole příslušného ekotypu na hladině významnosti 0,05, ** na hladině 0,01 (Equal-Variance T-Test).

5 Diskuze

Kvetení u *Arabidopsis thaliana* může být ovlivněno mnoha různými stresovými faktory, jako jsou vysoká či nízká teplota, sucho, deficit minerální výživy nebo zasolení (kapitola 2.2). Vliv deficitu minerální výživy na regulaci kvetení *Arabidopsis thaliana* byl zkoumán zatím spíše okrajově, většinou v podmínkách ekologického experimentu (kapitola 2.2.5). Cílem této práce bylo popsat vliv stresu z odebrání minerální výživy na indukci kvetení v laboratorních podmínkách a vytvořit modelový systém pro další výzkum.

Pro uskutečnění experimentů bylo nejprve nutné vybrat a vyzkoušet metodu pěstování *Arabidopsis thaliana*, která by byla vhodná ke studiu vlivu deficitu minerální výživy. Předchozí experimenty (Kolář, osobní sdělení) ukázaly, že při kultivaci v pevném inertním substrátu (písek, perlit) zalévaném živným roztokem je obtížné zaručit stabilní hladinu živin v roztoku nebo jej v celém objemu substrátu spolehlivě nahradit novým o jiné koncentraci. Proto byla pro tuto diplomovou práci zvolena hydroponie. V prvních experimentech jsme porovnávali dva způsoby hydroponické kultivace popsané v literatuře: Arteca a Arteca (2000) a Gibeaut *et al.* (1997), které byly částečně modifikovány. Cílem těchto experimentů bylo zjistit, který z těchto dvou způsobů bude lépe vyhovovat našim potřebám. Při použití plastových krabiček Magenta (kapitola 4.1.1, modifikace metody dle Arteca a Arteca, 2000) nastal problém s tím, že rostliny Col zasychaly ještě před rozkvetem a navíc se v roztoku a na Grodanu vyskytovaly řasy. K tomu u plastových vaniček (kapitola 4.1.2., modifikace metody dle Gibeaut *et al.*, 1997) nedocházelo. Z toho důvodu jsme při dalších experimentech používali vaničky. V nich byl vývoj rostlin srovnatelný s pěstováním v půdě, pouze mírně urychlený. V hydroponických experimentech s 25% živným roztokem při 8h

fotoperiodě bylo zaznamenáno u Ler přibližně 43-48 listů vytvořených do rozkvetu a 40-46 dní od výsevu do objevení puppat (kapitola 4.1.2). Při pěstování v půdě ve stejných podmínkách (teplota, délka dne) byly tyto hodnoty u Ler přibližně 37-42 listů a 54-55 dní od výsevu (Kolář, osobní sdělení). Rostliny v hydroponii rostly dobře a byly schopny vykvést a vytvořit plody, což ukazuje, že tato metoda je vhodná pro dlouhodobou kultivaci *Arabidopsis thaliana*.

Při pěstování na Grodanu docházelo u rostlin Col k zamokřování růžic. To bylo způsobeno vzlínáním roztoku po Grodanu až do středu růžic, neboť růžice se během růstu dostávaly do těsného kontaktu s povrchem minerální vlny. Aby k tomu nedocházelo, byla ve stáří 4 týdny okolo stonku každé rostliny pod růžici navlečen kroužek vyrobený ze silikonové hadičky. Tato manipulace neovlivnila negativně další růst a vývoj rostliny (kapitola 3.2.3).

Další možností, jak zabránit vzlínání roztoku po minerální vlně, by bylo použití agaru místo Grodanu. Proto jsme vyzkoušeli pěstování na agaru, modifikované podle Norén *et al.* (2004). Jimi popsaný systém jsme upravili tak, abychom mohli použít plastové kryty i vaničky z předchozích pokusů. Agarem byly naplněny zkrácené 10 ml pipetové špičky a 1,5 ml mikrozkuřavky s odstraněnou špičkou. Ukázalo se, že tento způsob kultivace není příliš vhodný, protože docházelo k propadávání agarových válečků z pipetových špiček a u mikrozkuřavek k vysychání agaru a zanořování rostlin do agaru. Na povrchu agaru se také ve velkém množství vyskytovaly plísňe. Navíc zakládání listů a prorůstání kořenů do živného roztoku bylo zpomaleno ve srovnání s kultivací na Grodanu (obr. 17, 18, 19).

V prvních pokusech byly rostliny pěstované v 50% a 100% modifikovaném Hoaglandově roztoku. U rostlin se ovšem při těchto experimentech vyskytly abnormální květy (kapitola 4.1.2). Abychom zjistili, zda to může být způsobeno příliš dobrým

zásobením živinami, byl proveden pokus, při kterém byly rostliny pěstovány v půdě a zalévány 10% nebo 100% modifikovaným Hoaglandovým roztokem. Pro srovnání bylo použito ještě 6 rostlin z nezávislého experimentu (Kolář, osobní sdělení). Tyto rostliny byly pěstovány ve stejném substrátu v sadbovačích (v jamkách o rozměrech 4×3,5 cm a výšce 5 cm) a byly zalévány pouze destilovanou vodou. Ostatní podmínky kultivace byly shodné jako u rostlin zalévaných Hoaglandovým roztokem. Zatímco morfologie květů rostlin zalévaných 10% roztokem byla srovnatelná s rostlinami pěstovanými v sadbovačích, u rostlin se 100% roztokem byl zjištěn výrazně zvýšený výskyt abnormálních květů. Tyto abnormality se vyskytovaly především u květů, které se zakládaly dříve. Na hlavním stonku se ve spodní části objevovaly květy s malformovanými semeníky, například s květenstvím založeným uvnitř, též květy s listovým útvarem na stopce, u později zakládaných květů se malformace neprojevovaly (obr. 14, 15). Z toho lze usuzovat, že zvýšená koncentrace živin snížila expresi genů určujících identitu květního meristému, zvláště při absenci fotoperiodické indukce, neboť experimenty byly prováděny za krátkého dne. Tato oblast by si jistě zasloužila další výzkum, v rámci této práce ovšem bylo důležité, že zvýšený výskyt abnormálních květů souvisí s vysokou koncentrací živin. Proto jsme pro další experimenty používali nižší koncentraci živného roztoku. Na základě doplňujících experimentů (Kolář, osobní sdělení) jsme zvolili koncentraci 25%. Při jejím použití byl výskyt abnormálních květů minimální.

Všechny pokusy byly prováděny na krátkém dni, aby byla eliminována fotoperiodická indukce, která by mohla interferovat s předpokládaným vlivem stresu. Protože experimenty byly zaměřeny na studium indukce kvetení, soustředili jsme se především na kvantifikaci času kvetení u *Arabidopsis thaliana* pomocí doby od výsevu do objevení pupat a dále pomocí počtu listů v den rozkvětu, což jsou parametry široce

využívané v jiných pracích. Obvykle lze vysledovat dobrou korelaci mezi těmito parametry (Koornneef *et al.*, 1991; Karlsson *et al.*, 1993). V našich experimentech se však tato korelace neprokázala. Nutriční deficit zjevně podstatně redukoval počet listů do kvetení i v případě, kdy nedošlo k žádnému nebo jen minimálnímu urychlení objevení pupat, například u ekotypu Sf-2 (kapitola 4.2.2). Hlavní příčina této skutečnosti pravděpodobně spočívala v prodloužení plastochronu nutričním stresem, neboť stresované rostliny vytvořily během 2 týdnů po zředění média výrazně méně makroskopicky viditelných listů než kontrolní rostliny (kapitoly 4.2.2, 4.2.3; Kolář a Seňková, 2008).

Některé další studie naznačují, že redukovaný počet listů při kvetení lze považovat za běžnou odpověď na chudou výživu u *Arabidopsis thaliana*. Dle van Tienderen *et al.* (1996) nízká hladina živin redukovala počet listů u Ler a pěti pozdě-kvetoucích mutantů *Arabidopsis thaliana*, přestože zároveň oddalovala kvetení. Další autoři (Pigliucci a Schlichting, 1996) porovnávali reakci na dostupnost živin u 37 rodin (odvozených ze 4 ekotypů). Většina rodin kvetla při nižší výživě později, ale přitom s méně listy. Pigliucci a Schlichting (1998) uzavřeli, že vztah mezi počtem listů a počtem dnů do kvetení u *Arabidopsis thaliana* je ovlivněn prostředím. Počet listů se tudíž zdá být nepříliš vhodným parametrem pro posuzování kvetení v podmínkách, kde experimentální faktory ovlivňují iniciaci listů nezávisle na jejich vlivu na květní indukci (například v případě námi sledovaného nutričního stresu).

Veškeré výsledky byly tedy dále zpracovávány především s ohledem na počet dnů od výsevu do objevení pupat.

Kromě toho jsme sledovali ještě několik dalších parametrů souvisejících s kvetením. Rostliny vystavené stresu měly kratší stonek v den rozkvětu, a obvykle i zkrácenou dobu od objevení makroskopicky viditelných pupat do rozkvětu prvního

květu (kapitoly 4.2.1, 4.2.2, 4.2.3). Tyto výsledky ukázaly, že nutriční stres nepůsobil pouze na indukci kvetení, ale i na následné fáze generativního vývoje. Podrobnější výzkum těchto efektů může být tématem dalších prací.

Nejdříve bylo třeba určit optimální věk rostlin pro začátek nutričního stresu. Protože kontrolní (nestresované) rostliny Ler v předchozích experimentech na krátkém dni tvořily poupata ve stáří 6-8 týdnů a Col přibližně 8-10 týdnů po výsevu (obr. 6, 7), aplikovali jsme stres ve stáří 3, 4 nebo 5 týdnů. Mladší rostliny nebyly testovány, protože jejich kořeny většinou ještě neprorostly z válečku minerální vlny do roztoku. U 3-týdenních rostlin prorostla špička hlavního kořene pod úroveň Grodanu, což zajistilo přímý kontakt s minerálním roztokem. Zde se ukázalo, že dřívější aplikace stresu způsobuje větší urychlení kvetení (kapitola 4.2.1). Menší až nevýznamný vliv se projevil u starších rostlin (4-5 týdnů). To lze nejpravděpodobněji vysvětlit působením již aktivovaného mechanismu autonomní indukce současně se stresovou podporou kvetení. Redukce výživy u tři týdny starých rostlin měla výrazně nejsilnější vliv na kvetení u obou testovaných ekotypů (Col i Ler), proto byl v dalších experimentech stres aplikován právě v tomto stáří.

Dále jsme zkoumali, jak různá úroveň deficitu ovlivní počet dnů od výsevu do objevení pupat a jaké jsou ekotypové rozdíly v reakci na stres. Byly použity tři ekotypy *Arabidopsis thaliana*: Columbia-1 (Col-1), Landsberg *erecta*-0 (Ler-0) a San Feliu-2 (Sf-2). Col-1 a Ler-0 jsou široce využívané brzy kvetoucí linie, přičemž Ler je ranější než Col. Sf-2 byl vybrán jako reprezentant pozdě kvetoucího ekotypu a také proto, že vykazuje výraznou odpověď na jiný stresový faktor, zastínění porostem (Lee a Amasino, 1995). Jeho kvetení je výrazně urychleno působením světla obohaceného o dlouhovlnné červené záření, které hustým porostem proniká nejlépe. Účelem bylo otestovat, zda Sf-2 reaguje podobně silně také na nutriční stres.

V experimentech se ukázalo, že náhlá a výrazná redukce dostupnosti živin (1000× zředění u 3 týdny starých rostlin) urychluje objevení pupat u všech tří použitých ekotypů (kapitola 4.2.2). K nejlépe pozorovatelným symptomům reakce na nutriční stres patřila především redukovaná velikost růžicové listové plochy (symptom viditelný již 5-7 dnů po 1000× zředění média). Dále rychle následoval rozklad chlorofylu ve starších listech a tvorba antokyanu v celé růžici. Tyto symptomy jsou u *Arabidopsis thaliana* pro nutriční stres (především deficit dusíku) charakteristické (Diaz *et al.*, 2006). Mezi květní reakcí Ler, Col a Sf-2 jsme ovšem pozorovali rozdíly. U ředění 1000× vykazovaly ekotypy Col a zvláště Ler větší urychlení objevení pupat oproti ekotypu Sf-2 (ve dvou opakováních Ler 13,8 dnů a 15,5; Col 6,2 a 7,1; Sf-2 4,3 a 4) (obr. 24, 26).

Objevení pupat u Col bylo urychleno poněkud průkazněji, než v pokusech s časováním změny minerální výživy, konkrétně ve variantě změny ve 3 týdnech (kapitola 4.2.1). V porovnání s kontrolou byl u Col při pokusech s časováním změny rozdíl v počtu dnů od výsevu do objevení pupat v prvním experimentu statisticky neprůkazný, ve druhém činil 6,4 dnů (obr. 20, 22). Naproti tomu při pokusech s různými ekotypy došlo k urychlení v průměru o 6,2 dnů, respektive 7,1 dnů při opakování pokusu (obr. 24, 26). Přitom v obou typech pokusů byly vstupní podmínky zcela shodné, roztok byl nahrazen 1000× zředěným ve věku 3 týdny. Rozdíl ve výsledcích je pravděpodobně způsobený tím, že při časování změny bylo hodnoceno pouze 5 rostlin, u pokusů s ekotypy 10 rostlin, takže odhad průměru byl pro více vzorků zatížen menší chybou. Trend však byl potvrzen, v obou případech náhle aplikovaný stres kvetení Col urychloval.

Následné pokusy se 100× zředěným roztokem (kapitola 4.2.3) ukázaly, že u ekotypů Ler a Sf-2 koreluje intenzita stresu s dobou do objevení pupat. U rostlin

pěstovaných v 1000× zředěném roztoku se poupata objevovala významně dříve než v 100× zředěném. Další experimenty (Kolář a Seňková, 2008), prováděné na ekotypu Ler, ukázaly, že 10× zředěný roztok urychluje objevení pupat ještě méně.

Zajímavé bylo, že zatímco použití 100× zředěného roztoku u ekotypů Ler a Sf-2 urychlilo objevení pupat, i když méně než 1000× zředěný roztok, u ekotypu Col tomu bylo naopak, poupata se objevovala později, a to i při opakování pokusu. Doba od výsevu do objevení pupat se u ekotypu Col při změně koncentrace výživy 100× mírně prodloužila (obr. 28, 30). Z toho je vidět, že míra intenzity nutričního stresu ovlivňuje různé ekotypy různě. Proto by byly vhodné další experimenty s širší škálou koncentrací a s větším množstvím ekotypů, což ovšem přesahuje rozsah a možnosti této práce.

Výrazné ekotypové rozdíly se ukázaly při pozorování počtu listů v čase 2 týdny po aplikaci stresu. Při 1000× zředění ve 3 týdnech od výsevu všechny ekotypy vykazovaly po dalších 2 týdnech značné snížení počtu vytvořených listů (nejvíce Sf-2) (kapitola 4.2.2). Při ředění 100× došlo u ekotypu Col k méně výraznému snížení počtu listů, zatímco u ekotypů Ler a Sf-2 byl vliv na rychlost tvorby listů podobný jako při použití 1000× zředěného média (kapitoly 4.2.2 a 4.2.3). Při aplikaci nutričního stresu je tedy u všech ekotypů tvorba listů zpomalena. Závislost této inhibice na intenzitě stresu se ovšem liší mezi ekotypy. To naznačuje, že ekotypové rozdíly v květní odpovědi na snížení výživy mohou být částečně způsobeny také různou citlivostí ekotypů na nutriční deficit. V dalším výzkumu by bylo užitečné podrobně stanovit vztah mezi koncentrací média a plastochronem či přírůstkou sušiny. Nicméně po zředění média 1000× byl nástup symptomů deficitu u všech tří ekotypů stejně rychlý. Z toho lze usuzovat, že při takto výrazné redukci minerální výživy již nejsou rozdíly v citlivosti ekotypů.

Výsledky lze srovnat s dalšími studiemi, zabývajícími se kvetením *Arabidopsis thaliana* v odpovědi na stres. Bylo zjištěno, že i další stresové faktory ovlivňují u *A.*

thaliana počet listů v den kvetení a dobu do objevení pupat. Kvalita světla výrazně ovlivňuje rostliny kvetoucí pod hustým zápojem (shade-avoidance syndrom, kapitola 2.2.1). Ultrafialové záření urychluje přechod k reprodukční fázi u ekotypu Col (kapitola 2.2.2). Také nízká teplota inhibuje růst a oddaluje kvetení (kapitola 2.2.4). Naproti tomu působením vysoké teploty (43-46⁰C 6h denně po dobu 5 dnů, což zpomalilo rychlost zakládání nových listů, ale nevyvolalo ještě tvorbu nekrotických lézí na listech) ve spojení se slabou fotoperiodickou indukcí bylo statisticky průkazně urychleno kvetení Ler o 2 - 4 dny, zatímco kvetení Col nebylo teplotním stresem ovlivněno. Sucho (opakované cykly přerušení zálivky a opětného zalití vždy po zvadnutí) započaté ve stáří 4 týdnů výrazně zpomalilo kvetení Col, ale neovlivnilo dobu kvetení Ler. Zasolení zpomalilo přechod ke kvetení u ekotypu Col (Achard *et al.*, 2006) a méně výrazně i u Ler (Kolář, osobní sdělení). Je tedy zřejmé, že květní odpověď (urychlení či opoždění kvetení) závisí na konkrétním typu stresu a je ovlivněna i ekotypem. To dokazují i naše výsledky u ekotypu Sf-2. Ekotyp Sf-2 vykazuje značné urychlení kvetení při zastínění. Nicméně jeho kvetení bylo urychleno deficitem výživy jen navýrazně, méně než u ekotypů Ler a Col (kapitola 4.2.1).

Při pokusech bylo ředěno hydroponické médium. Toto zředění má ovšem za následek nejen redukcí dostupnosti živin, ale také mění osmotický potenciál roztoku. To by hypoteticky mohlo ovlivnit kvetení srovnatelně významně s dostupností živin. J. Kolář provedl experiment, který sledoval vliv na kvetení ekotypu Ler při aplikaci deficitu ve stáří 3 týdnů. Byl porovnáván 1000× zředěný živný roztok s roztokem, v němž byly osmotické změny kompenzovány přidáním manitolu. Manitol je užíván u *Arabidopsis thaliana* jako nemetabolizovaný osmolyt (Sun *et al.*, 2004). Mezi oběma variantami nebyly průkazné rozdíly a lze tedy konstatovat, že kvetení je v případě ředění roztoku ovlivněno jen nutričním stresem (Kolář a Seňková, 2008).

Zajímavé je srovnání získaných výsledků s pracemi dalších autorů (kapitola 2.2.5). Například byl sledován vliv výživy na délku vegetativní fáze a rozmnožování (Pigliucci a Schlichting, 1998). Dle této práce doba, po které nastalo kvetení, nebyla ovlivněna stresem z nedostatku živin, avšak byla zřejmá korelace mezi tímto stresem a počtem listů v růžici přítomných při rozkvětu. Rostliny, které měly k dispozici méně živin, měly při rozkvětu méně listů. Dle dalších prací (Van Tienderen *et al.*, 1996, Zhang a Lechowicz, 1994, Pigliucci a Schlichting, 1998) se doba od výsevu do kvetení u většiny ekotypů (a výrazně u některých pozdě kvetoucích mutantů *Arabidopsis thaliana*) prodlužuje až o několik dní při kontinuálním či postupně silícím deficitu výživy. I další pokusy (Kolář, osobní sdělení) ukázaly spíše zpomalení indukce kvetení při kontinuálním deficitu.

Zmíněné experimenty tedy dávají výrazně odlišné výsledky od výsledků uvedených v této práci. V našich pokusech byl však deficit minerální výživy aplikován jinak: Po počáteční kultivaci v nestresových podmínkách bylo médium skokově zředěno. Kontinuální nedostatek a náhlá redukce minerální výživy tedy zjevně ovlivňují kvetení *A. thaliana* různými mechanismy. Ty by bylo přínosné porovnat během dalšího výzkumu.

Některé výsledky ukazují, že deficit výživy interaguje s jinými faktory indukce kvetení, konkrétně s fotoperiodickou indukcí (Kolář a Seňková, 2008). Při aplikaci stresu (zředění média 1000× ve stáří 3 týdny) se na dlouhém dni (16 hodin světla) poupata u Ler vyvíjejí přibližně o 5 dní dříve, u Col o 3 dny dříve a u Sf-2 přibližně ve stejné době jako u kontrolních rostlin. Na krátkém dni (8 hodin světla) Ler vytvářely poupata přibližně o 12,8 dnů dříve, Col o 6,2 dnů dříve a Sf-2 o 4,3 dnů dříve než kontrolní rostliny, což prokazuje větší vliv deficitu výživy na krátkém dni než na

dlouhém (Kolář a Seňková, 2008). Fotoperiodická indukce tedy částečně zakrývá podporu kvetení nutričním stresem, pokud je obojí aplikováno současně.

Výsledky této diplomové práce rozšiřují dřívější poznatky, získané pozorováním a experimenty s jinými druhy rostlin. Dle těchto prací lze demonstrovat, že kvetení některých jednoletých druhů je indukováno nebo alespoň urychleno abiotickými stresy. (kapitola 2.2). Podobně jako ve všech výše uvedených pracích i při experimentech prováděných v rámci této diplomové práce se abiotický stres (zde nutriční) ukázal jako výrazně ovlivňující kvetení.

Výsledky diplomové práce se dají použít jako základ pro další výzkum. Důležitou součástí bylo vytvoření experimentálního systému, plně funkčního pro studium vlivu skokového snížení minerální výživy na kvetení. Systém zahrnuje kultivaci v hydroponii s využitím upravených plastových vaniček s Grodanem (kapitola 3.2.3), provádění všech pokusů na krátkém dni (eliminace fotoperiodické indukce), ředění roztoku 1000× ve 3 týdnech (optimální časování) a provádění pokusů u ekotypu Ler (nejvýraznější odezva z testovaných ekotypů). Tento systém nyní může být využit k objasnění mechanismů květní reakce na nutriční stres. Předmětem této diplomové práce bylo zjištění vlivu celkového deficitu živin na indukci kvetení, následné práce mohou dále zjišťovat, zda tento vliv je způsoben všemi složkami roztoku nebo jednou či několika specifickými (např. dusík, fosfor apod.). Vzhledem k tomu, že různé podněty ovlivňují kvetení *Arabidopsis thaliana* různými drahami, bude důležité určit, které molekulární či fyziologické mechanismy jsou zodpovědné za indukci kvetení nutričním stresem. Experimentální postup, který byl v rámci řešení této diplomové práce vyvinut, může být použitý např. k testování odpovědi u známých mutantů nebo k měření exprese klíčových genů.

O příslušných mechanismech lze v současnosti pouze spekulovat. Je například známo, že cytokininy podporují kvetení některých druhů (Bernier *et al.*, 1993) a jejich hladina v nadzemních částech závisí na zásobení kořenů dusíkem (Takei *et al.*, 2001). Deficit dusíku ovšem vyvolává snížení hladiny cytokininů, které přitom kvetení urychlují. Indukci kvetení nutričním stresem tedy nelze vysvětlit jejich působením. Pravděpodobnějším mechanismem by mohla být mobilizace cukrů při stárnutí listů (Wingler a Roitsch, 2008). Při experimentech prováděných v rámci této diplomové práce i jiných prací byla pozorována senescence listů po aplikaci nutričního stresu (kapitola 4.2.2). Je dokázáno, že rostliny akumulují cukry v listech při stárnutí listů, podobně jako při působení abiotického stresu (Cook *et al.*, 2004, Kaplan *et al.*, 2007). Zvýšená hladina cukrů stimuluje kvetení (Corbesier *et al.* 2002). Přesná povaha vztahu mezi hladinou cukrů, kvetením, senescencí a reakcí na stres zatím není objasněna (Wingler a Roitsch, 2008). Avšak je to jeden z možných mechanismů, který by bylo vhodné ověřit dalším výzkumem.

Zde popsaný experimentální systém byl již použit pro první pokusy s mutanty. Vyplyvá z nich, že na indukci kvetení vlivem náhlého deficitu výživy se podílejí především gen *FLC* a geny autonomní dráhy - *FVE* a nejvýrazněji *FCA* (Kolář, osobní sdělení).

Nelze vyloučit ani další mechanismy indukce kvetení odebráním minerální výživy. Hypoteticky může být kvetení stimulováno nejen oddělenou indukční dráhou, ale například změnou citlivosti k délce dne nebo procesy spojenými se změnami v růstu listů a ve vývoji během nutričního stresu.

Důležitou otázkou je, zda a jak redukce hladiny živin (např. vyčerpání půdních zásob rostlinami během růstové sezóny) ovlivňuje čas kvetení u přirozených populací

Arabidopsis thaliana. Zde bude potřebné provedení dalších výzkumů, především ekologických studií.

Naše práce odhalila rozdíly mezi třemi ekotypy *Arabidopsis thaliana*. Podobné experimenty mohou být provedeny s větším množstvím ekotypů, aby se ukázalo, zda reakce na nutriční stres koreluje s životní strategií ekotypu. Například u přezimujících rostlin, které klíčí na podzim a kvetou na jaře, nemůže být urychlení kvetení stresem adaptivní, protože by mohlo vést k vykvetení v nevhodných podmínkách (Pigliucci a Schlichting, 1998). Nutriční stres by mohl urychlovat kvetení především u raných ekotypů, které klíčí i kvetou během stejné vegetační sezóny.

6 Souhrn

Úkolem práce bylo:

- 1) **Vytvořit hydroponický systém kultivace *Arabidopsis thaliana* použitelný ke studiu vlivu deficitu minerální výživy.**

Byl optimalizován hydroponický systém kultivace *Arabidopsis thaliana*. Rostliny byly kultivovány v plastových vaničkách v modifikovaném Hoaglandově roztoku. Pro klíčení semenáčků sloužily jako opora válečky z minerální vlny Grodan. Pro účely zjišťování vlivu náhlého odebrání výživy se tento systém ukázal být velmi vhodný.

- 2) **Popsat vliv snížení úrovně minerální výživy během kultivace na indukci kvetení.**

Náhlá redukce výživy (zředění živného roztoku 1000×) urychlila v úvodních experimentech kvetení u ekotypů Ler a Col, přičemž nejúčinnější byla aplikace stresu ve stáří 3 týdny od výsevu.

Zředění média 1000× ve stáří 3 týdny zkrátilo dobu od výsevu do objevení pupat u všech tří sledovaných ekotypů (Ler o 13-16 dní, Col o 6-7 dní, Sf-2 o 4-5 dní). Na zředění 100× reagovaly ekotypy Ler a Sf-2 zkrácením doby do objevení pupat o 7-8, respektive 3-4 dny, ekotyp Col reagoval naopak prodloužením o 9 dnů.

Skokové snížení dostupnosti živin tedy ve většině případů urychlilo květní indukci *Arabidopsis thaliana*. Reakce rostlin závisela na časování stresu, na jeho intenzitě a na ekotypu.

3) Navrhnout modelový systém pro další výzkum role nutričního stresu v regulaci kvetení.

Z použité metodiky a výsledků byl navržen modelový systém pro další výzkum role nutričního stresu v regulaci kvetení *Arabidopsis thaliana*. Zahrnuje zde popsany způsob hydroponické kultivace, provádění pokusů na krátkém dni z důvodu eliminace fotoperiodické indukce, ředění roztoku 1000× ve stáří rostlin 3 týdny a provádění pokusů u ekotypu Ler. Ten vykazuje při použitém ředění a časování nejvýraznější urychlení kvetení. Tento experimentální systém může být použit k identifikaci molekulárních či fyziologických mechanismů, které jsou za indukci kvetení nutričním stresem zodpovědné.

7 Abstrakt

Angiosperm plants must flower at an appropriate time during the year and under favourable conditions to assure successful reproduction. Flowering is therefore controlled by many external and internal stimuli. Various authors demonstrated that the induction of flowering can be affected by abiotic stresses in some species. In the model plant *Arabidopsis thaliana*, mineral nutrient deficiency was found to influence flowering. However, there are very little data from laboratory experiments. The aim of this work was therefore to investigate the effects of mineral nutrient deficiency on *A. thaliana* flowering in precisely controlled conditions.

The research reported here had three goals: 1) To develop a system for hydroponic cultivation of *A. thaliana* which could be used to study the effects of nutrient stress. 2) To describe the changes in the timing of *A. thaliana* flowering after a sudden reduction of mineral nutrient supply during plant cultivation. 3) To design a model system for future investigations concerning the effects of nutrient stress on flowering.

We modified a hydroponic system described by Gibeaut et al. (1997). Our improved system was very suitable for plant growth and enabled us to accurately control nutrient levels. All experiments were performed in short days to eliminate photoperiodic induction.

We stressed the plants by diluting the nutrient medium 100-fold or 1000-fold. The flowering response, especially the number of days from sowing to bud appearance, was studied in three ecotypes (Ler, Col, Sf-2). Preliminary experiments with Ler and Col showed that 1000-fold media dilution accelerated flowering, most strongly when performed at the age of 3 weeks, as compared to the age of 4 or 5 weeks. Therefore

the nutrient stress was always applied at the age of 3 weeks in later experiments. 1000-fold dilution shortened the time to bud appearance in all three ecotypes (by 13 - 16 days in Ler, 6 - 7 days in Col, and 4 - 5 days in Sf- 2). 100-fold dilution caused an acceleration of bud appearance in Ler and Sf-2 (by 7 - 8 and 4 - 5 days, respectively) but a delay in Col (by 9 days).

We demonstrated that an abrupt decrease of mineral nutrient availability during cultivation markedly reduced the time to flowering in some *A. thaliana* ecotypes. In contrast, previous studies reported that continuous or gradually progressing nutrient deficiency rather leads to delays in flowering.

We found the most pronounced flowering response to stress in ecotype Ler after a 1000-fold dilution of the nutrient medium at the age of 3 weeks. These conditions can be employed as a model system for future research concerning the role of nutrient stress in flowering.

8 Seznam literatury

- Adams P., Nelson D.E., Yamada S., Chmara W., Jensen R.G., Bohnert H.J. & Griffiths H.: Growth and development of *Mesembryanthemum crystallinum* (Aizoaceae) *New Phytologist* 138: 171–190 , 1998
- Achard P., Herr A., Baulcombe D. C., Harberd N. P.: Modulation of floral development by a gibberellin-regulated microRNA *Development* 131: 33-57 , 2004
- Achard P., Cheng H., De Grauwe L., Decat J., Schoutteten H., Moritz T., Van der Straeten D., Peng J., Harberd N. P.: Integration of Plant Responses to Environmentally Activated Phytohormonal Signals *Science* 311: 91-93 , 2006
- Alexandre C.M., Hennig L.: FLC or not FLC: the other side of vernalization *Journal of Experimental Botany* 59: 1127–1135 , 2008
- An H., Roussot C., Suárez-López P., Corbesier L., Vincent C., Piñeiro M., Hepworth S., Mouradov A., Justin S., Turnbull C., Coupland G.: CONSTANS acts in the phloem to regulate a systemic signal that induces photoperiodic flowering of *Arabidopsis* *Development* 131: 3615–3626 , 2004
- Appleby C. A., Bogusz V., Dennis E. S., Peacock W. J.: A role for hemoglobin in all plant roots? *Plant Cell Environ* 11: 359-367 , 1988
- Armstrong, M. J., Kirkby, E. A.: The influence of humidity on the mineral composition of tomato plants with special reference to calcium distribution *Plant Soil* 52: 427-435 , 1979
- Arnon, D. I., Stout P. R.: The essentiality of certain elements in minute quantity for plants with special reference to copper *Plant Physiol.* 14: 371-375 , 1939
- Arteca R. N, Arteca J. M.: A novel method for growing *Arabidopsis thaliana* plants hydroponically *Physiol. Plant* 108: 188-193 , 2000
- Ausín I., Alonso-Blanco C., Jarillo J. A., Ruiz-Garcia L., Martínez-Zapater J. M.: Regulation of flowering time by FVE, a retinoblastoma-associated protein *Nature Genetics* 36: 162–166 , 2004
- Ausín I., Alonso-Blanco C., Martínez-Zapater J. M.: Environmental regulation of flowering *Int J. Dev. Biol* 49: 689-705 , 2005
- Bagnall D. J., King R. W., Whitelam G. C., Boylan M. T., Wagenr D., Quail P. H.: Flowering responses to altered expression of phytochrome in mutants and transgenic lines of *Arabidopsis thaliana* (L.) *Plant Physiology* 108: 1495-1503 , 1995
- Barry D.A.J., Miller M.H.: Phosphorus nutritional requirement of maize seedlings for maximum yield *Agron. J.* 81: 95–99 , 1989
- Bauer D., Viczian A., Kirchner S., Nobis T., Nitschke R., Kunkel T., Panigrahi K. C., Adam E., Fejes E., Schafer E., Nagy F.: Constitutive photomorphogenesis 1 and multiple photoreceptors control degradation of phytochrome interacting factor 3, a transcription factor required for light signaling in *Arabidopsis* *Plant Cell* 16: 1433-1445 , 2004
- Bergmann L., Rennenberg H.: Glutathione metabolism in plants V: De Kok L.J., ed, Sulfur109-123 Nutrition and Assimilation in Higher Plants. SPB Academic Publishing, The Hague, The Netherlands, 1993
- Bernier G., Périlleux C.: A physiological overview of the genetics of flowering time control *Plant Biotechnology Journal* 3: 3-16 , 2005
- Bernier, G., Havelange, A., Houssa, C., Petitjean, A. and Lejeune, P.: Physiological signals that induce flowering *Plant Cell* 5: 1147–1155 , 1993
- Blázquez M. A., Ahn J. H., Weigel D.: A thermosensory pathway controlling flowering time in *Arabidopsis thaliana* *Nature Genetics* 33: 168-171 , 2003
- Blázquez M. A., Weigel D.: Integration of floral inductive signals in *Arabidopsis* *Nature* 404: 889-892 , 2000
- Bowler C., Slooten L., Vandenbranden S., De Rycke R., Botterman J., Sybesma C., van Montagu M., Inze D.: Manganese superoxide dismutase can reduce cellular damage mediated by oxygen radicals in transgenic plants *EMBO J.* 10: 1723-1732 , 1991
- Burnell J. N.: The biochemistry of manganese in plants. V: Graham R.D. , Hannam R.J. , Uren N.C. (eds): *Manganese in Soils and Plants*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands 125–137, 1988
- Bussler, W.: Die Entwicklung von Calcium-Mangelsymptomen *Z. Pflanzenernaehr., Dueng. Bodenkd* 100: 53-58 , 1963

- Cammack R., Fernandez V. M., Schneider K.: Nickel in hydrogenase from sulfate-reducing, photosynthetic, and hydrogen-oxidizing bacteria V: J. R. Lancaster J.R (ed.): The Bioorganic Chemistry of Nickel, Verlag Chemie, Weinheim, 167-190, 1988
- Cammarano, P., Felsani, A., Gentile, M., Gualerzi, C., Romeo, C. Wolf, G.: Formation of active hybrid 80-S particles from subunits of pea seedlings and mammalian liver ribosomes Biochem. Biophys. Acta 281: 625-642 , 1972
- Campbell L. C., Nable R. S.: Physiological function of manganese in plants V: Graham R.D., Hannam J., Uren N.C. (eds): Manganese in Soils and Plants. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands 87-95, 139-154 1988
- Cerdán P. D., Chory J.: Regulation of flowering time by light quality Nature 423: 881-885 , 2003
- Clarkson, D. T., Hansos, J. B.: The mineral nutrition of higher plants Annu. Rev. Plant Physiol 31: 239-298 , 1980
- Cook D., Fowler S., Fiehn O., Thomashow M.F.: A prominent role for the CBF cold response pathway in configuring the low-temperature metabolome of *Arabidopsis* Proceedings of the National Academy of Sciences USA 101: 15243–15248 , 2004
- Corbesier L., Bernier G., Pe'rilleux C.: C:N ratio increases in the phloem sap during floral transition of the long-day plants *Sinapis alba* and *Arabidopsis thaliana* Plant & Cell Physiology 43: 684–688 , 2002
- Cumming B. G., Hendricks S. B., Borthwick H. A.: Rhythmic flowering responses and phytochrome changes in a selection of *Chenopodium rubrum* Can J Botany 43: 825–853 , 1965
- De Kok L. J., Stulen I.: Role of glutathione in plants under oxidative stress V: De Kok L.J., ed, Sulfur109-123 Nutrition and Assimilation in Higher Plants. SPB Academic Publishing, The Hague, The Netherlands 125-138, 1993
- Daimon Y., Yamamoto S., Abe M., Yamaguchi A., Ikeda Y., Ichinoki H., Notaguchi M., Goto K., Araki T.: *FLOWERING LOCUS T* as a link between photoperiodic induction in leaves and evocation at shoot apex 15th International Conference on Arabidopsis Research, Berlin, Germany T01–033 , 2004
- Diaz C., Saliba-Colombani V., Loudet O., Belluomo P., Moreau L., Daniel-Vedele F., Morot-Gaudry J., Masclax-Daubresse C.: Leaf yellowing and anthocyanin accumulation are two genetically independent strategies in response to nitrogen limitation in *Arabidopsis thaliana* Plant Cell Physiol 47: 75-83 , 2006
- Dilworth M. J., Eady R. R. and Eldridge M. E.: The vanadium nitrogenase of *Azotobacter chroococcum*: reduction of acetylene and ethylene to ethane J. Biochem 249: 745-751 , 1988
- Dorenstouter, H., Pieters, G. A., Findenegg, G. R.: Distribution of magnesium between chlorophyll and other photosynthetic functions in magnesium deficient 'sun' and 'shade' leaves of poplar J. Plant Nutr 8: 1088-1101 , 1985
- Duff S. M., Moorhead G. B., Lefebvre D. D., Plaxton W. C.: Phosphate starvation inducible "bypasses" of adenylate and phosphate-dependent glycolytic enzymes in *Brassica nigra* suspension cells Plant Physiol 90: 1275-1278 , 1989
- Dugger W. M., Palmer R. L.: Effect of boron on the incorporation of glucose by citron fibers grown *in vitro* J. Plant Nutr. 8: 311-325 , 1985
- Epstein E., Bloom A. J.: Mineral Nutrition of Plants: Principles and Perspectives 2nd Ed. Sinauer, Sunderland, MA, 2005
- Evans L. T.: Daylength and the Flowering of Plants, W. A. Benjamin, Inc. 1975
- Faust M., Klein J. D.: Levels and sites of metabolically active calcium in apple fruit J. Am. Soc. Hortic. Sci 99: 93-94 , 1974
- Felle H.: Cytoplasmatic free calcium in *Riccia fluitans* L. and *Zea mays* L.: Interaction of Ca²⁺ and pH? Planta 176: 248-255 , 1988
- Fowler S., Lee K., Onouchi H., Samach A., Richardson K., Morris B., Coupland G., Putterill J : GIGANTEA: a circadian clock-controlled gene that regulates flowering in *Arabidopsis* and encodes a protein with several possible membrane-spanning domains. EMBO J 18: 4679-4688 , 1999
- Fridovich I.: Superoxide radical: an endogenous toxicant Annu Rev Pharmacol Toxicol 23: 239–257 , 1983
- Gerhardt, R., Stitt, M., Heldt, H. W.: Subcellular metabolite levels in spinach leaves. Regulation of sucrose synthesis during diurnal alterations in photosynthetic partitioning Plant Physiol 83: 399-407 , 1987
- Gibeaut D. M., Hulett J., Cramer G. R., Seemann J. R.: Maximal biomass of *Arabidopsis thaliana* using a simple, low-maintenance hydroponic method and favorable environmental conditions Plant Physiol 115: 317-319 , 1997

- Glover B. J.: Understanding Flowers and Flowering, Oxford University Press, New York 2007
- Guo H. W., Yang W. Y., Mockler T. C., Lin C. T.: Regulations of flowering time by Arabidopsis photoreceptors *Science* 279: 1360-1363, 1998
- Halliday K. J., Koornneef M., Whitelam G. C.: Phytochrome B, and at least one other phytochrome, mediate the accelerated flowering response of *Arabidopsis thaliana* L. To low red:far-red ratio *Plant Physiology* 104: 1311-1315, 1994
- Hasdai M., Weiss B., Levi A., Samach A., Porat R.: Differential responses of Arabidopsis ecotypes to cold, chilling and freezing temperatures *Annals of Applied Biology* 148: 113-120, 2006
- Hayama R., Coupland G.: The molecular basis of diversity in the photoperiodic flowering responses of Arabidopsis and rice *Plant Physiol* 135: 677-684, 2003
- He Y., Michaels S.D., Amasino R.M.: Regulation of flowering time by histone acetylation in Arabidopsis *Science* 302: 1751-1754, 2003
- Hendricks T., van Loon L. C.: Petunia peroxidase a is localised in the epidermis of aerial plant organs *J. Plant Physiol.* 136: 519-525, 1990
- Hoagland D. R.: Lectures on the Inorganic Nutrition of Plants *Chronica Botanica*, Waltham, MA, 48-71, 1948
- Hodson, M. J., Sangster, A G.: Observations on the distribution of mineral elements in the leaf of wheat (*Triticum aestivum*L.), with particular reference to silicon *Ann. Bot* 62: 463-471, 1988
- Homann P. H.: Structural Effects of Cl and Other Anions on the Water Oxidizing Complex of Chloroplast Photosystem II *Plant Physiol.* 88: 194-199, 1988
- Hsiao, T. C, Läuchli, A.: Role of potassium in plant-water relations. V: *Advances in Plant Nutrition* (Tinker B., Läuchli A.) Vol. 2: 281-312, 1986
- Hughe, N.P., Williams R. J.: Manganese in Soil and Plants Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands 7-19, 1988
- Chamont S., Sotta B., Miginiac E.: Influence of root thermal treatments on growth, flowering and water status of *Chenopodium polyspermum* L. *Physiol Veg* 20: 1-10, 1982
- Chatterjee C., Nautiyal N., Agarwala, S. C.: Metabolic changes in mustard plant associated with molybdenum deficiency *New Phytol.* 100: 511-518, 1985
- Imaizumi T., Schultz T. F., Harmon F. G., Ho L. A., Kay S. A.: FKF1 F-box protein mediates cyclic degradation of a repressor of *CONSTANS* in *Arabidopsis* *Science* 309: 293-297, 2005
- Imazumi T., Tran H. G., Swartz T. E., Briggs W. R., Kay S. A.: *FKF1* is essential for photoperiodic-specific light signalling in *Arabidopsis* *Nature* 426: 302-306, 2003
- Jaglo-Ottosen K. R., Gilmour S. J., Zarka D. G., Schabenberger O., Thomashow M. F.: *Arabidopsis CBF1* overexpression induces *COR* genes and enhances freezing tolerance *Science* 280: 104-106, 1998
- Jarrell W. M., Beverly R. B.: The dilution effect in plant nutrition studies *Adv. Agron.* 34: 197-224, 1981
- Judel, G. K.: Änderungen in der Aktivität der Peroxidase und der Katalase und im Gehalt an Gesamtphenolen in den Blättern der Sonnenblume unter dem Einfluss von Kupfer- und Stickstoffmangel *Z. Pflanzenernaehr. Bodenk.* 133: 81-92, 1972
- Kaplan F., Kopka J., Sung D.Y., Zhao W., Popp M., Porat R., Guy C.L.: Transcript and metabolite profiling during cold acclimation of Arabidopsis reveals an intricate relationship of cold-regulated gene expression with modifications in metabolite content *Plant Journal* 50: 967-981, 2007
- Karlsson B. H., Sills G. R., Nienhuis J.: Effects of photoperiod and vernalization on the number of leaves at flowering in 32 *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae) ecotypes *Am J Bot* 80: 646-8, 1993
- Karlsson B.H., Sills G. R., Nienhuis J.: Effects of photoperiod and vernalization on the number of leaves at flowering in 32 *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae) ecotypes 80: 646-648, 1993
- Kim H.J., Hyun Y., Park J.Y., Park M.J., Park M.Y., Kim M.D., Kim H.J., Lee M.H., Moon J., Lee I., Kim J.: A genetic link between cold responses and flowering time through FVE in *Arabidopsis thaliana* *Nature Genetics* 36: 167-171, 2004
- Kinzel, H.: Calcium in the vacuoles and cell walls of plant tissue. Forms of deposition and their physiological and ecological significance *Flora* 182: 99-125, 1989
- Kirkby, E. A., Pilbeam, D. J.: Calcium as a plant nutrient *Plant Cell Environ* 7: 397-405, 1984
- Kolář J., Seňková J.: Reduction of mineral nutrient availability accelerates flowering of *Arabidopsis thaliana* *J. Plant Physiol* doi:10.1016/j.jplph.2007.11.010, 2008
- Koornneef M., Hanhart C. J., van der Veen J. H.: A genetic and physiological analysis of late flowering mutants in *Arabidopsis thaliana* *Mol Gen Genet* 229: 57-66, 1991
- Koornneef M., Hanhart C. J., van der Veen J. H.: A genetic and physiological analysis of late flowering mutants in *Arabidopsis thaliana* *Mol Gen Genet* 229: 57-66, 1991
- Lacey, E.P : Onset of reproduction in plants: size- versus agedependency *Trends Ecol. Evol* 1: 72-75, 1986

- Lee H., Suh S.-S., Park E., Cho E., Ahn J.H., Kim S.-G., Lee J.S., Kwon Y.M., Lee I.: The AGAMOUS-LIKE 20 MADS domain protein integrates floral inductive pathways in *Arabidopsis* *Genes Dev.* 14: 2366-2376 , 2000
- Lee I., Amasino R.M.: Effect of vernalization, photoperiod, and light quality on the flowering phenotype of arabidopsis plants containing the FRIGIDA gene *Plant Physiol* 108: 157-162 , 1995
- Levy Y.Y., Dean C.: The transition to flowering *Plant Cell* 10: 1973-1989 , 1998
- Levy Y.Y., Mesnage S., Mylne J.S., Gendall A.R., Dean C.: Multiple roles of Arabidopsis VRN1 in vernalization and lowering time control *Science* 297: 243-246 , 2002
- Lim M.H., Kim J., Kim Y.S., Chung K.S., Seo Y.H., Lee I., Kim J., Hong C.B., Kim H.J., Park C.M.: A new Arabidopsis gene, FLK, encodes an RNA binding protein with K homology motifs and regulates flowering via FLOWERING LOCUS C. *Plant Cell* 16: 731-740 , 2004
- Luquez V. M. C., Sasal Y., Medrano M., Martí'n M. I., Mujica M., Guiame't J. J.: Quantitative trait loci analysis of leaf and plant longevity in *Arabidopsis thaliana* *J Exp Bot* 57: 1363-1372 , 2006
- Marquardt S., Boss P.K., Hadfield J., Dean C.: Additional targets of the Arabidopsis autonomous pathway members, FCA and FY *Journal of Experimental Botany* 57: 3379-3386 , 2006
- Marschner, H., Cakmak, I.: High light intensity enhances chlorosis and necrosis in leaves of zinc, potassium, and magnesium deficient bean (*Phaseolus vulgaris*) plants *J. Plant Physiol* 134: 308-315 , 1989
- Marschner, H.: Mineral Nutrition of Higher Plants Academic Press, London, 1995
- Martínez C., Pons E., Prats G., León J.: Salicylic acid regulates flowering time and links defence responses and reproductive development *The Plant Journal* 37: 209-217 , 2004
- Mengel, K., Arneke, W. W.: Effect of potassium on the water potential, the osmotic potential, and cell elongation in leaves of *Phaseolus vulgaris* *Phytol. Plant* 54: 402-408 , 1982
- Mengel, K., Kirkby E. A.: Principles of plant nutrition. 4th ed., Int. Potash Inst., Basel, Switzerland, 1987
- Michaels S. D., Amasino R. M.: Memories of winter: Vernalization and the competence to flower *Plant Cell Environ* 23: 1145-1153 , 2000
- Michaels S. D., Amasino R. M.: FLOWERING LOCUS C encodes a novel MADS domain protein that acts as a repressor a flowering *Plant Cell* 11: 949-956 , 1999
- Michaels S.D., Ditta G., Gustafson-Brown C., Pelaz S., Yanofsky M., Amasino R.M.: AGL24 acts as a promoter of flowering in Arabidopsis and is positively regulated by vernalization *Plant Journal* 33: 867-874 , 2003
- Mockler T.C., Yu X.H., Shalitin D., Parikh D., Michael T.P., Liou J., Huang J., Smith Z., Alonso J.M., Ecker J.R., Chory J., Lin C.T.: Regulation of flowering time in Arabidopsis by K homology domain proteins *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101: 12759-12764 , 2004
- Monselise S. P.: Citrus and related genera V: Halevy AH,editor. CRC handbook of flowering, vol. II. Boca Raton, FL: CRC Press 275-294, 1985
- Moon J., Suh S. S., Lee H., Choi K. R., Hong C. B., Paek N. C., Kim S. G., Lee I.: The SOC1MADS-box gene integrates vernalization and gibberellin signals for flowering in Arabidopsis *Plant Journal* 35: 613-623 , 2003
- Mouradov A., Cremer F., Coupland G.: Control of flowering time: interacting pathways as a basis for diversity *Plant Cell* 14: S111-130 , 2002
- Mylne J.S., Barrett L., Tessadori F., Mesnage S., Johnson L., Bernatavichute Y.V., Jacobsen S.E., Fransz P., Dean C.: LHP1, the Arabidopsis homologue of HETEROCHROMATIN PROTEIN1, is required for epigenetic silencing of FLC. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 103: 5012-5017 , 2006
- Nakamichi N., Kita M., Niimura K., Ito S., Yamashino T., Mizoguchi T., Mizuno T.: *Arabidopsis* clock-associated pseudo-response regulators PRR9, PRR7 a PRR 5 coordinately and positively regulate flowering time through the canonical CONSTANS-dependent photoperiodic pathways *Plant Cell Physiol* 48: 822-832 , 2007
- Niwa Y., Ito S., Nakamichi N., Mizoguchi T : Genetic linkage of the circadian clock-associated genes, *TOC1*, *CCA1* and *LHY*, in the photoperiodic control of flowering time in *Arabidopsis* *Plant Cell Physiol* 48: 925-937 , 2007
- Norén H., Svensson P., Andersson B.: A convenient and versatile hydroponic cultivation system for *Arabidopsis thaliana* *Physiol. Plant* 121: 343-348 , 2004
- Ohki, K.: Zinc nutrition related to critical deficiency and toxicity levels for sorghum *Agron. J.* 76: 253-256 , 1984
- O'Neal, D., Joy, K. W.: Glutamine synthetase of pea leaves. Divalent cation effects, substrate specificity, and other properties *Plant Physiol* 54: 775-779 , 1974

- Palma J. M., Sandalio L. M., Del Río L. A.: Manganese superoxide dismutase and higher plant chloroplasts: a reappraisal of a controverted cellular localization J Plant Physiol 125: 427-439 , 1986
- Park D. H., Somers D. E., Kim Y. S., Chory Y. H., Lim H. K., Soh M. S., Kim H. J., Kay S. A., Nam H. G.: Control of circadian rhythms and photoperiodic flowering by the *Arabidopsis GIGANTEA* gene Science 285: 1579-1582 , 1999
- Pavlová L.: Fyziologie rostlin, Karolinum, Praha, 2005
- Pierce J.: Determinants of Substrate Specificity and the Role of Metal in the Reactions of Ribulosebiphosphate Carboxylase/Oxygenase Plant Physiol. 81: 943-945 , 1986
- Pigliucci M., Schlichting C. D.: Reaction norms of Arabidopsis. V. Flowering time controls phenotypic architecture in response to nutrient stress J. Evol. Biol. 11: 285-301 , 1998
- Pigliucci M., Schlichting C. D.: Reaction norms of Arabidopsis (Brassicaceae). III. Response to nutrients in 26 populations from a worldwide collection Am J Bot 82: 1117-1125 , 1995
- Pigliucci M., Schlichting C.D.: Reaction norms of Arabidopsis.IV. Relationships between plasticity and fitness. Heredity 76: 427-436 , 1996
- Pigliucci M., Whitton J., Schlichting C. D.: Reaction norms of Arabidopsis. I. Plasticity of characters and correlations across water, nutrient and light gradients J Evol Biol 8: 421-438 , 1995
- Procházka S., Macháčková I., Krekule J., Šebánek J., a kol.: Fyziologie rostlin Academia, Praha, 412-431, 1998
- Putterill J., Robson F., Lee K., Simon R., Coupland G : he CONSTANS gene of Arabidopsis promotes flowering and encodes a protein showeing similarites to zinc finger transcription factors Cell 80: 847-857 , 1995
- Quesada V., Macknight R., Dean C., Simpson G.G.: Autoregulation of FCA pre-mRNA processing controls Arabidopsis flowering time EMBO Journal 22: 3142-3152 , 2003
- Ratcliffe O. J., Bradley D. J., Coen E. S.: Separation of shoot and floral identity in *Arabidopsis* Development 126: 1109-1120 , 1999
- Ratcliffe O.J., Kumimoto R.W., Wong B.J., Riechmann J.L.: Analysis of the Arabidopsis MADS AFFECTING FLOWERINGgene family: MAF2 prevents vernalization by short periods of cold. Plant Cell 15: 1159-1169 , 2003
- Redei G.P.: Supervital mutants in Arabidopsis Genetics 47: 443-460 , 1962
- Reeves P. H., Coupland G.: Analysis of flowering time control in Arabidopsis by comparison of double and triple mutants Plant Physiology 126: 1085-1091 , 2001
- Reggiani R., Aurisano N., Mattana M., Bertani A.: Influence of K⁺ ions on polyamine level in wheat seedlings J. Plant Physiol 141: 136-140 , 1993
- Rincon M., Hanson J. B.: Controls on calcium ion fluxes in injured or shocked corn root cells: importance of proton pumping and cell membrane potential Physiol. Plant 67: 576-583 , 1986
- Roberts D. M., Harmon A. C.: Calcium-modulated proteins: targets of intracellular calcium signals in higher plants Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol 43: 375-414 , 1992
- Sanders D., Brownlee C., Harper J. F.: MEMBRANE STRUCTURE AND FUNCTION-Communicating with Kalcium Plant Cell 11: 691-706 , 1999
- Sandmann G., Boerger P.: The enzymatological function. of heavy metals and their role in electron transfer process of plants In 'Encyklopedia of Plant Physiology, New Series' (A. Laeuchli and R. L. Bielecki, eds.), Springer-Verlag, Berlin 15A 563-596 , 1983
- Satter, R., Morse, M. J., Lee, Y., Crain, R. C., Coté, G. G., Morgan, N.: Light and clock-controlled leaflet movements in *Samanea saman*: a physiological, biophysical and biochemical analysis Bot. Acta 101: 205-213 , 1988
- Sawa M., Nusinow D. A., Kay S. A., Imaizumi T.: FKF1 a GIGANTEA complex formation is required for day-length measurement in Arabidopsis Science 5848: 261-265 , 2007
- Scott B.J., Robson A.D.: Distribution of magnesium in subterranean clover (*Trifolium subterraneum* L.) in relation to supply Aust. J. Agric. 41: 499-510 , 1990
- Seijo Y., Sullivan J. A., Wang H., Yang J., Shen Y., Runio V., Hoecker U., Deng X. W.: The COP1-SPA1 interaction defines a critical step in phytochrome A-mediated regulation of HY5 activity Genes Dev 17: 2642-2647 , 2003
- Shelp B. J.: Physiology and biochemistry of boron in plants V: Boron andits Role in Crop Production (U. C. Gupta, ed.). CRC Press, Boca Raton, FL. 53-85, 1993
- Shuqing C., Ming Y., Jiang S.: Involvement of Gigantea gene in the regulation of the cold stress response in Arabidopsis Plant Cell Rep 24: 683-690 , 2005
- Schneider J. C., Nielsen E., Somerville C. R.: A chilling-sensitive mutant of Arabidopsis in deficient chloroplast protein accumulation at low temperature Plant Cell end Enviroment 18: 23-32 , 1995

- Schnug E.: Physiological functions and environmental relevance of sulphur-containing secondary metabolites V: De Kok LJ, Stulen I, Rennenberg H, Brunold C, Rauser WE, eds. Sulphur nutrition and assimilation in higher plants—regulatory, agricultural and environmental aspects. The Hague, The Netherlands: SPB, Academic Publishing, 179–190, 1993
- Schomburg F.M., Patton D.A., Meinke D.W., Amasino R.M.: FPA, a gene involved in floral induction in *Arabidopsis*, encodes a protein containing RNA-recognition motifs *The Plant Cell* 13: 1427–1436, 2001
- Schönrock N., Bouveret R., Leroy O., Borghi L., Köhler C., Grisse W., Hennig L.: Polycomb-group proteins repress the floral activator AGL19 in the FLC-independent vernalization pathway *Genes & Development* 20: 1667–1678, 2006
- Simpson G. G., Dean C.: *Arabidopsis*, the Rosetta stone of flowering time? *Science* 296: 285–289, 2002
- Simpson G. G., Dean C.: *Arabidopsis*, the Rosetta stone of flowering time? *Science* 296: 285–289, 2002
- Simpson G.G., Dijkwel P.P., Quesada V., Henderson I., Dean C.: FY is an RNA 3' end-processing factor that interacts with FCA to control the *Arabidopsis* floral transition *Cell* 113: 777–787, 2003
- Suárez-López P., Wheatley K., Robson F., Onouchi H., Valverde F., Coupland G.: CONSTANS mediates between the circadian clock and the control of flowering in *Arabidopsis* *Nature* 410: 1116–1120, 2001
- Suarez-Lopez P., Wheatley K., Robson F., Onouchi H., Valverde F., Coupland G.: CONSTANS mediates between the circadian clock and the control of flowering in *Arabidopsis* *Nature* 410: 1116–1120, 2001
- Sun K., Hunt K., Hauser B.A.: Ovule abortion in *Arabidopsis* triggered by stress *Plant Physiol* 135: 2358–67, 2004
- Sung S., Amasino R.M.: Molecular genetic studies of the memory of winter *Journal of Experimental Botany* 57: 3369–3377, 2006
- Taiz L., Zeiger E.: *Plant Physiology*, Fourth Edition, Sinauer Associates, Sunderland, MA., 2006
- Takei K., Sakakibara H., Taniguchi M. and Sugiyama T.: Nitrogen-dependent accumulation of cytokinins in root and the translocation to leaf: implication of cytokinin species that induces gene expression of maize response regulator *Plant Cell Physiol* 42: 85–93, 2001
- Tester M.: Plant ion channels: whole-cell and single-channel studies *New Phytol* 114: 305–340, 1990
- Trewavas A.J., Gilroy S.: Signal transduction in plant cells *Trends Genet.* 7: 356–361, 1991
- Vallee B. L., Auld D. S.: Zinc coordination, function, and structure of zinc enzymes and other proteins *Biochemistry* 29: 5647–5659, 1990
- Vallee B. L., Falchuk K. H.: The biochemical basis of zinc physiology *Physiol. Rev.* 73: 79–118, 1993
- Valverde F., Mouradov A., Soppe W., Ravenscroft D., Samach A., Coupland G.: Photoreceptor regulation of CONSTANS protein in photoperiodic flowering *Science* 303: 1003–1006, 2004
- van Tienderen P. H., Hammad I., Zwaal F. C.: Pleiotropic effects of flowering time genes in the annual crucifer *Arabidopsis thaliana* *American Journal of Botany* 83: 169–174, 1996
- Veley K.M., Michaels S.D.: Functional Redundancy and New Roles for Genes of the Autonomous Floral-Promotion Pathway *Plant Physiology* 147: 682–695, 2008
- Wada K., Totsuka T.: Long-day flowering of *Perilla* plants cultured in nitrogen-poor media *Plant Cell Physiol* 23: 977–985, 1982
- Wedding, R. T., Black, M. K.: Role of magnesium in the binding of substrate and effectors to phosphoenolpyruvate carboxylase from a CAM plant *Plant Physiol* 87: 443–446, 1988
- Werner J.D., Borevitz J.O., Warthmann N., Trainer G.T., Ecker J.R., Chory J., Weigel D.: Quantitative trait locus mapping and DNA array hybridization identify an FLM deletion as a cause for natural flowering-time variation *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 102: 2460–2465, 2005
- Whitehead D. C.: Chlorine deficiency in red clover grown in solution culture *J. Plant Nutr.* 8: 193–198, 1985
- Wigge P.A., Kim M.C., Jaeger K.E., Busch W., Schmid M., Lohmann J.U., Weigel D.: Integration of spatial and temporal information during floral induction in *Arabidopsis* *Science* 309: 1056–1059, 2005
- Wilson R. N., Heckman J. W., Somerville C. R.: Gibberellin Is Required for Flowering in *Arabidopsis thaliana* under Short Days *Plant Physiology* 100: 403–408, 1992
- Wingler A., Roitsch T.: Metabolic regulation of leaf senescence: interactions of sugar signalling with biotic and abiotic stress responses *Plant Biology* 10: 50–62, 2008
- Wunderlich F.: Die Kernmatrix: Dynamisches Protein-Gerüst in Zellkernen *Naturwiss. Rundsch* 31: 282–288, 1978

- Zhang H., van Kocker S.: The VERNALIZATION INDEPENDENCE 4 gene encodes a novel regulator of FLOWERING LOCUS C. *Plant J.* 31: 663–673, 2002
- Zhang J., Lechowicz M. J.: Correlation between time of flowering and phenotypic plasticity in *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae) *Am J Bot* 81: 1336–42, 1994
- Zhu J. K.: Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annual Review of Plant Biology* 53: 247–273, 2002