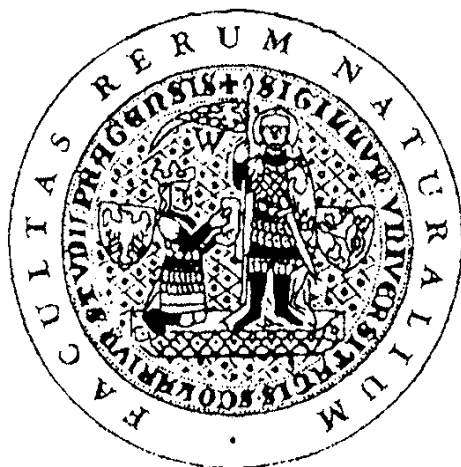


Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta
Katedra experimentální biologie rostlin

Studijní program: Biologie (N1501)
Studijní obor: Učitelství biologie a chemie pro střední školy



RNDr. Klára Čiháková

Charakterizace změn vyvolaných expresí *cdc25* ze *Schizosaccharomyces pombe* souvisejících s urychlením kvetení.

Characterization of changes induced by *Schizosaccharomyces pombe cdc25* gene related to earlier flowering onset

Diplomová práce

Vedoucí závěrečné práce/Školitel:
Doc. RNDr. Helena Lipavská, Ph.D.

Praha, 2012

Prohlášení:

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

V Praze, 27.8.2012

Podpis

Poděkování:

Na tomto místě bych ráda poděkovala

Doc. RNDr. H. Lipavské, Ph.D. za vedení, cenné připomínky a trpělivost

speciální dík patří mému konzultantovi RNDr. Petře Vojvodové za neocenitelné rady a pomoc při práci spolu s jejím přátelským vedením,

RNDr. Janu Ponertovi za všestrannou pomoc a psychickou podporu,

RNDr. Lukáši Fischerovi, Ph.D. za cenné rady týkající se molekulárně zaměřené části práce,

Halce Hrabákové a Tomáši Šebo za pomoc při kultivacích rostlin ve skleníku,

Mgr. Haně Ševčíkové a RNDr. Lence Dvořákové, Ph.D. za uvedení do metody RT-PCR, stejně tak i kolektivu laboratoře 210 za ochotu a cenné rady,

Mgr. Lence Hruškové a Tomáši Figurovi za péči o experimenty v době mé nepřítomnosti a vytvoření přátelské atmosféry v laboratoři,

Mr. Kateřině Velínské za pomoc při jímání exudátů,

mojí mamince a Pavlovi Kasíkovi za připomínky k formální úpravě textu,

a v neposlední řadě také sobě, jakožto laborantce udržující laboratoř v chodu.

Samozřejmě nesmím opomenout ani Stanislava Vosolsobě.

Obsah

Abstrakt.....	6
Abstract.....	7
Úvod.....	8
Cíle práce	9
Seznam zkratk	10
1. Literární úvod	12
1.1. Kvetení.....	12
1.1.1. Regulace kvetení látkami signální povahy	12
1.1.1.1. Nejznámější hypotézy o chemické povaze signálu ke kvetení.....	12
1.1.1.2. Vliv sacharidů na iniciaci kvetení.....	14
1.1.1.2.1. Signální role sacharidů.....	14
1.1.1.2.2. Indukce kvetení dlouhodobých rostlin v souvislosti s působením sacharidů	15
1.1.1.2.3. Indukce kvetení krátkodobých a neutrálních rostlin v souvislosti s působením sacharidů.....	18
1.1.1.2.4. Role fotosyntézy a škrobových zásob v indukcii kvetení.....	19
1.1.1.2.5. Vliv sacharidů na kvetení v podmínkách <i>in vitro</i>	19
1.1.1.3. Souvislost mezi distribucí sacharidů a giberelinovou signalizací	20
1.1.1.4. Role cytokininů v indukcii kvetení.....	21
1.1.2. Molekulárně genetické aspekty kvetení.....	24
1.1.2.1. Regulace kvetení u modelové rostliny <i>Arabidopsis</i>	24
1.1.2.1.1. Fotoperiodická dráha	25
1.1.2.1.1.1. Význam genů <i>CO</i> a <i>FT</i> v přenosu fotoperiodického signálu.....	25
1.1.2.1.1.2. TSF a TFL1, nevýznamnější geny <i>FT</i> rodiny.....	26
1.1.2.1.2. Integrační geny zahrnuté v iniciaci kvetení.....	27
1.1.2.1.3. Dráha autonomní a dráha závislá na věku rostliny	28
1.1.2.2. Regulace kvetení u neutrálních rostlin.....	29
1.1.2.2.1. Lokalizace základních komponent odpovídajících za indukcii kvetení ..	29
1.1.2.2.2. Regulace kvetení neutrálních rostlin na molekulární úrovni	30
1.1.2.2.3. Ovlivnění molekulárních mechanismů kvetení látkami signální povahy	32
1.2. Buněčný cyklus.....	34
1.2.1. Regulace přechodu G2/M u rostlin.....	35
1.2.2. Charakteristika tabáku (<i>Nicotiana tabacum</i>) s vneseným genem <i>cdc25</i> ze <i>S. pombe</i>	37
2. Materiál a metody	38
2.1. Rostlinný materiál.....	38
2.2. Kultivace rostlin <i>in vivo</i>	38
2.2.1. Kultivace tabáku	38
2.2.2. Kultivace <i>Arabidopsis</i>	38
2.3. Zpracování a hodnocení materiálu z kultur <i>in vivo</i>	39
2.3.1. Odběr rostlinného materiálu (tabák).....	39
2.3.1.1. Jímání floémového exudátu	39
2.3.2. Analýza obsahu rozpustných nestrukturních sacharidů.....	41
2.3.2.1. Extrakce sacharidů ze sušiny vzrostných vrcholů	41
2.3.2.2. Extrakce sacharidů z média s floémovou šťávou	41

2.3.2.3. Stanovení obsahu a spektra sacharidů	42
2.3.3. Stanovení exprese vybraných genů.....	43
2.3.3.1. Izolace RNA	43
2.3.3.2. Přečištění RNA od případné DNA kontaminace	44
2.3.3.3. Reverzní transkripce	44
2.3.3.4. Polymerázová řetězová reakce (PCR)	44
2.3.3.5. Elektroforéza a vizualizace DNA	46
2.3.4. Stanovení doby potřebné k nástupu kvetení (<i>Arabidopsis</i>)	47
2.3.5. Detekce invertázy na řezech tabáku.....	47
2.4. Kultivace rostlin <i>in vitro</i>	48
2.4.1. Kultivační média.....	48
2.4.1.1. MS médium (Murashige a Skoog, 1962).....	48
2.4.1.2. Gamborgovo médium B5 (Gamborg et al., 1968).....	49
2.4.1.3. Příprava médií.....	50
2.4.2. Kultivace.....	50
2.4.2.1. Dezinfekce semen.....	50
2.4.2.2. Kultivace rostlin na Petriho miskách.....	50
2.5. Hodnocení materiálu z kultur <i>in vitro</i>	51
2.6. Zpracování dat	51
3. Experimentální část.....	53
3.1. Hladiny rozpustných nestrukturních sacharidů u tabáku.....	53
3.1.1. Obsah sacharidů v exudátu z dekapitovaných rostlin tabáku	53
3.1.2. Obsah sacharidů ve vzrostných vrcholech tabáku	55
3.2. Detekce enzymové aktivity u tabáku	58
3.3. Stanovení míry exprese vybraných genů u tabáku	60
3.4. Kvetení <i>Arabidopsis</i> za indukční a neindukční fotoperiody.....	63
3.4.1. Kvetení <i>Arabidopsis</i> za indukční fotoperiody	63
3.4.2. Kvetení <i>Arabidopsis</i> za neindukční fotoperiody	65
3.5. Další charakteristiky <i>Spcdc25 Arabidopsis</i>	70
3.5.1. Kořenový systém <i>Arabidopsis</i>	70
3.5.2. Organogeneze <i>Arabidopsis de novo</i>	72
4. Diskuze	78
4.1. Hladiny a spektrum endogenních sacharidů u tabáku transformovaného genem <i>Spcdc25</i>	78
4.1.1. Hladiny rozpustných sacharidů ve floémové šťávě.....	79
4.1.2. Hladiny endogenních sacharidů ve vzrostném vrcholu tabáku	81
4.1.3. Možná role invertázy ve změnách hladin rozpustných sacharidů tabáku.....	82
4.2. Molekulární úroveň regulace kvetení u tabáku transformovaného genem <i>Spcdc25</i> ...	84
4.3. Cytokinin-like efekt v kontextu získaných poznatků	87
4.4. Charakteristika <i>Spcdc25</i> transformanta <i>Arabidopsis</i> a jeho porovnání s <i>Spcdc25</i> tabákem.....	89
Závěry	92
Seznam literatury	93

Abstrakt

Práce se zabývá mechanismy souvisejícími s dřívějším kvetením rostlin exprimujících genem *cdc25* ze *Schizosaccharomyces pombe* (*Spcdc25*). Tento gen kóduje fosfatázu odpovědnou za nezbytnou aktivační defosforylaci CDK při vstupu do mitózy. U vyšších rostlin, na rozdíl od ostatních eukaryot, však plně funkční homolog této fosfatázy nalezen nebyl. Dokonce bývá zpochybňován význam aktivační defosforylace jako takové, i když k této defosforylaci patrně dochází i u rostlin.

Předchozí výsledky našeho týmu odhalily u rostlin tabáku transformovaných genem *Spcdc25* řadu změn. Většinu z nich lze u kontrolních rostlin navodit aplikací cytokininů a byla vytvořena hypotéza cytokin-like efektu. Jednou z nejnápadnějších změn je časnější kvetení transformantů. Cílem této práce bylo poodhalit mechanismy, kterými může exprese genu *cdc25* ze *Schizosaccharomyces pombe* působit na přechod ke kvetení. Výsledky ukázaly neprůkazný trend ke snížení hladiny sacharidů transportovaných floémem do apexu u transformantů. Naopak množství sacharidů v apexu bylo stejné či zvýšené a obsah glukózy byl u transformantů výrazně navýšen vždy. Možnost účasti sacharidů v regulaci kvetení proto nelze vyloučit. Dále u transformantů dochází ke zvýšení míry exprese tabákového homologu *SOCl*, zatímco exprese ostatních genů figurujících v regulaci kvetení nebyla ovlivněna.

Předchozí výsledky týmu získané na tabáku byly ověřovány na *Arabidopsis*. Cytokinin-like efekt tu nebyl pozorován. *In vivo* nebylo rovněž pozorováno dřívější kvetení transformantů, a to jak za indukční, tak za neindukční fotoperiody, kdy kvetení spouští odlišné signální dráhy. Překvapivě u rostlin pěstovaných *in vitro* a převedených do *ex vitro* podmínek bylo kvetení transformantů urychleno. Tento výsledek může souviset se zásobením mladých semenáčků v kultuře *in vitro* exogenními sacharidy.

Z důvodu odlišného dopadu exprese *Spcdc25* na časování kvetení u tabáku a *Arabidopsis*, byly transgenní rostliny *Arabidopsis* dále stručně charakterizovány. Rozvoj kořenového systému vykazuje změny, avšak opačného charakteru, než u tabáku. Organogeneze *de novo* není na rozdíl od tabáku transformací výrazně ovlivněna. Získané výsledky poukazují na druhově specifické chování transformantů *cdc25*, kdy cytokinin-like efekt byl pozorován pouze u tabáku.

Abstract

The study is focused mainly on mechanisms related to flowering acceleration in plants expressing *cdc25* from *Schizosaccharomyces pombe* (Spdc25 plants). In yeast, the gene in question codes a phosphatase responsible for activatory dephosphorylation at mitosis entry. In higher plants, however, the ortholog has not been identified yet. Some doubts even exist on the importance of this activatory dephosphorylation, though dephosphorylation itself has been documented in plants.

Previous studies of our team revealed many differences in Spdc25 tobacco plants; majority of them can be induced in WT by cytokinin application and thus, the hypothesis of cytokinin-like effect of *Spdc25* expression have been proposed. As the earlier flowering was one of the most pronounced effects, the aim of this study has been to characterize mechanisms, responsible for this phenomenon. The analyses of phloem exudates revealed weak tendency to lower saccharide transport to the apex in transformants. The sacharide content in the apex, however, was similar or slightly higher with significantly higher glucose proportion in transformants. Thus, a role of saccharides in flowering regulation should not be excluded. The analysis of the flowering-inducing genes expression has shown the only change: the expression of the tobacco homologue of *SOC1* was elevated in the transformants.

Previous results of our team achieved with Spdc25 tobacco have been verified with *Arabidopsis* expressing the same gene. The cytokinin-like effect has not been observed in this species. Earlier flowering of transformants have not been observed *in vivo* either under the inductive nor the non-inductive conditions, when the flowering is activated by different signaling pathways. Importantly, in the Spdc25 plants which were transplanted *ex vitro* flowering was accelerated. The sucrose content in medium could be responsible for this behavior.

As *Spdc25* expression impact differs between the tobacco and the *Arabidopsis*, transgenic *Arabidopsis* plants were further briefly characterized. Root system architecture is affected by *Spdc25* expression, however in the opposite manner to the tobacco. Moreover, in contrast to tobacco, *de novo* organogenesis is not strongly affected. The results point to species-specific effect of *Spdc25* expression, when the cytokinin like effect has been observed only in tobacco.

Úvod

Dělení buněk je jedním ze základních procesů provázejících život všech organismů. Dává vzniknout novým jedincům, orgánům, ale také významnou měrou utváří tvar takto vznikajících struktur. Právě u rostlin, jejichž buňky nejsou schopny migrace v pletivech, je regulace buněčného dělení naprosto zásadní.

Sled dějů vedoucích od jednoho buněčného dělení ke druhému se nazývá buněčný cyklus. Jeho regulace je komplexní proces ovlivňovaný řadou dalších procesů či signalizačních drah. Zasahují do něj signální dráhy fytohormonů i řady dalších faktorů. Zároveň však samotná regulační mašinerie buněčného cyklu zřejmě zpětně působí na mnohé jiné signální dráhy. Vytváří se tak signalizační síť zasahující skrze buněčný cyklus do mnoha aspektů chování rostlinného těla. Jednoduchý zásah do regulace buněčného cyklu tak může mít znatelný dopad na řadu procesů, které s ním na první pohled nesouvisejí.

Tým laboratoře regulačních faktorů morfogeneze se již řadu let zabývá změnami, které v rostlinách tabáku *Nicotiana tabacum* vyvolala exprese genu *cdc25* z poltivé kvasinky *Schizosaccharomyces pombe*. Tento gen u eukaryot kóduje fosfatázu odpovědnou za nezbytnou aktivační defosforylaci CDK při vstupu do mitózy. Pokud k této defosforylaci nedojde, buňka nevstoupí do mitózy a průchod buněčným cyklem se zastaví. U vyšších rostlin, na rozdíl od ostatních eukaryot, však plně funkční homolog této fosfatázy nebyl nalezen. K samotné defosforylaci u nich patrně dochází, ale není známo, který protein je za ní odpovědný a její význam pro regulaci buněčného cyklu bývá dokonce zpochybňován.

Transformované rostliny tabáku vykazují řadu změn. Většinu z těchto změn lze u kontrolních rostlin navodit aplikací jedné skupiny fytohormonů – cytokininů. Na základě těchto výsledků byla navržena hypotéza cytokinin-like efektu exprese kvasinkového genu *cdc25*. Tato práce se pokouší poodhalit mechanismy, kterými může transformace kvasinkovým genem *cdc25* působit na přechod ke kvetení, který je u transformovaných rostlin tabáku výrazně urychlen. Dále se pokouší odpovědět na otázku, zda k tomuto efektu dojde po transformaci stejným genem i u jiného druhu rostliny, konkrétně *Arabidopsis thaliana*.

Cíle práce

S využitím tabáku *Nicotiana tabacum* L., cv. Samsun a huseníčku *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. cv. Columbia transformovaných genem *cdc25* ze *Schizosaccharomyces pombe* studovat vliv exprese tohoto genu na mechanismy spojené s přechodem ke kvetení.

Dílčí cíle

- U transgenního a kontrolního tabáku:
 - porovnat hladiny rozpustných sacharidů transportovaných do apexu
 - porovnat míru exprese vybraných genů s potenciální úlohou v regulaci iniciace kvetení
- U transgenní a kontrolní *Arabidopsis*:
 - porovnat dobu potřebnou k přechodu ke kvetení za indukční a neindukční fotoperiody
 - na základě získaných výsledků porovnat i další charakteristiky, které byly expresí *Spcdc25* u tabáku ovlivněny

Seznam zkratek

2,4-D	2,4-dichlorfenofyocetová kyselina
35S CaMV	promotor viru tabákové mozaiky (Cauliflower mosaic virus promoter)
AGL24	AGAMOUS-LIKE24
AP1	APETALA 1
ATP	adenosintrifosfát
Cdc25	fosfatáza aktivující CDK defosforylací
Cdc25 like	fosfatáza blízka Cdc25
CDK	cyklin-dependentní kináza (cyclin-dependent kinase)
cDNA	DNA vzniklá reverzní transkripcí RNA (complementary DNA)
CET	rodina genů zahrnující FT a TFL1
CET2	tabákový homolog TFL1
CIM	médium indukující tvorbu kalusu
CO	CONSTANS
cyc	cykliny
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DSD	posunutý krátký den (displaced short day)
DTT	dithiothreitol
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
ef1 α	elongační faktor ef1 α
FD	FLOWERING LOCUS D
FLC	FLOWERING LOCUS C
FT	FLOWERING LOCUS T
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
IAA	indolyl octová kyselina
IBA	kyselina indolyl másečná
iP	N ⁶ -(2-isopentenyl)adenin
LD	dlouhý den (long day)
LFY	LEAFY
MADS box	konzervovaný sekvenční motiv rodiny genů MADS box
MES	kyselina 2-morfolinethansulfonová
miR156	mikroRNA156
mRNA	mediátorová RNA
NBT	nitro-blue tetrazolium
NFL	tabákový homolog LFY (Nicotiana FLO/LFY)
NtFD	tabákový homolog FD
NtSOC1	tabákový homolog SOC1
NtSOC1	tabákový homolog SOC1
NtWUS	tabákový homolog WUS

PCR	polymerázová řetězová reakce
PMS	phenazine methosulphate
PVP-40	polyvinylpyrrolidon - 40
RIM	médium indukující tvorbu kořenů
RNA	ribonukleová kyselina
SAM	apikální meristém prýtu
SFT	homolog FT u rajčete
SFT	SINGLE FLOWER TRUSS
SIM	médium indukující tvorbu prýtů
SOC1	SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CO1
SP	SELF-PRUNING (homolog TFL1 u rajčete)
SPGB	SELF-PRUNING G-BOX PROTEIN (homolog FD u rajčete)
SPL	SQUAMOSA PROMOTER BINDING LIKE
SVP	SHORT VEGETATIVE PHASE
TAE	trisacetátový pufr s EDTA (pH 8,0)
TFL1	TERMINAL FLOWER 1
Thr14	threoninový zbytek CDK na pozici 14
TSF	TWIN SISTER OF FT (z rodiny FT)
TSF	TWIN SISTER OF FT
Tyr15	tyrosinový zbytek CDK na pozici 15
WEE1	zodpovědná za inaktivační fosphorylaci komplexu CDK/Cyc
WUS	WUCHSEL
Z	zeatin

1. Literární úvod

1.1. Kvetení

Kvetení je v životě rostlin velmi důležitá událost, načasování tohoto procesu je proto pečlivě regulováno a působí na něj vnitřní i vnější indukční vlivy. Výsledkem této interakce je signál, který v apikálním meristému vyvolá stav determinace, tedy takové vývojové změny, která vyústí v tvorbu rozmnožovacích orgánů. Meristém musí být ale nejdříve uveden do stavu, kdy je schopen na indukční signál reagovat. Tento stav označujeme kompetencí meristému. Mechanismus regulace navození kompetence však není znám.

1.1.1. Regulace kvetení látkami signální povahy

Již klasické experimenty s ozařováním části rostliny či s roubováním ukázaly, že vlastní místo realizace květního signálu (apikální meristém) nebývá totožné s místem jeho vzniku (Sachs, 1865; Chailakhyan, 1936). Došlo tak k odhalení regulace kvetení tzv. na dlouhou vzdálenost, ve které hraje hlavní roli transport signální látky (látek) floémem (Kondoch, 1999; Turnbull, 2011). Ještě před poznáním fotoperiodismu, Sachs (1865), na základě svých experimentů s ozářením jednotlivých listů zkoumaných rostlin, usoudil na existenci neznámé květní substance vznikající právě v listech. To podnítilo postupný vznik několika hypotéz o regulaci přechodu ke kvetení.

1.1.1.1. Nejznámější hypotézy o chemické povaze signálu ke kvetení

První hypotéza (Chailakhyan, 1936) měla své základy právě v experimentech Sachse (1865). V případě signálu vyvolaného u fotoperiodicky citlivých rostlin vhodnou fotoperiodou se ukázalo, že tento signál má univerzální povahu a může být proto přenášen nejen mezi odlišnými druhy, ale i mezi rostlinami s odlišnou fotoperiodickou odpovědí. Dokonce, pokud byl signál přenesen na rostliny fotoperiodicky necitlivé, došlo i u nich k vykvetení (Chailakhyan, 1936; Zeevaart, 1958; Lang et al., 1977). V první polovině dvacátého století formuloval Čajlachjan na základě roubovacích experimentů hypotézu florigenu. Jako florigen označil květní stimulus, který vzniká v listech a je následně transportován do apexu, kde vede ke spuštění květního programu (Chailakhyan, 1936). Doplněním florigenové teorie bylo zjištění existence tzv. antiflorigenu. U tabáku byl takto nazván signál, který po přenesení roubováním inhiboval kvetení (Lang et al., 1984).

Existenci inhibitoru kvetení podporují i další práce na neutrálním tabáku (Gebhardt a McDaniel, 1991; McDaniel et al., 1992; McDaniel, 1996). Autoři zde předpokládají, že inhibiční signál je produkován kořeny a teprve až po určité době růstu (vedoucí k oddálení vzrostného vrcholu z inhibičního dosahu kořenů) je rostlina schopná vykvést. Takzvaná florigenová hypotéza byla přijata, nicméně hledání chemické podstaty florigenu bylo dlouhá desetiletí neúspěšné. Florigen se tak stal spíše fyziologickým konceptem nežli konkrétní chemickou entitou (Zeevaart, 2006).

Postupně přibýly k hypotéze florigenu další dvě významné hypotézy o možném stimulu vedoucímu k nastartování květního programu. První byla „hypotéza změněné alokace živin“ Sachse a Hacketta (1983). Podle nich je za nástup kvetení zodpovědná změna v redistribuci živin (čímž autoři myslí sacharidy) související se změnou síly zdrojů a sinků. Autoři zpochybňují existenci florigenu a antiflorigenu jakožto specifických signálních molekul. Například za účinkem hypotetického antiflorigenu se podle nich může skrývat jakýkoliv proces, který zabrání cestě asimilátů z listů do apikálního meristému. Takovým inhibujícím elementem může být například kořenový systém působící jako silný sink, popřípadě mladé vyvíjející se listy (Sachs a Hackett, 1983). Po odebrání těchto silných sinků skutečně dojde k urychlení kvetení (Bernier, 1988; Roldán et al., 1999).

Druhou hypotézu nazvanou „multifaktoriální kontrola kvetení“ vypracoval Bernier (1988). Poukázal na fakt, že kvetení je ovlivňováno mnoha látkami, ať již jsou to sacharidy nebo fytohormony jako gibereliny a cytokininy, ale i auxiny, ethylen a kyselina abscisová. Později byl do úvahy vzat i vliv polyaminů a nitrátů (Bernier a Périlleux, 2005). Bernier ve své hypotéze předpokládá, že kvetení se může uskutečnit pouze v případě správné souhry všech těchto látek. Pro kvetení je nutné zvýšení koncentrace některých z nich a naproti tomu snížení koncentrace jiných (např. kyseliny abscisové). Zároveň však dodává, že se rostliny ve svých požadavcích na dané látky liší, což může být zapříčiněno geneticky i rozdílnými okolními podmínkami (Bernier, 1988). Hypotéza multifaktoriální kontroly kvetení se podle současných znalostí jeví jako skutečnosti nejbližší. Ovšem je třeba dodat, že právě u ní najdeme překryv s oběma předchozími teoriemi (Turnbull, 2011; King, 2012). Vzhledem k zaměření mé diplomové práce bude ze zmíněných látek zahrnutých v hypotéze multifaktoriální kontroly kvetení podrobněji pojednáno především o vlivu sacharidů a cytokininů.

1.1.1.2. Vliv sacharidů na iniciaci kvetení

Již poměrně dlouho je známo, že dostupnost sacharidů nástup kvetení ovlivňuje (Bernier, 1988), jejich přesná úloha v tomto procesu však není uspokojivě vyjasněna. Dodnes není jednoznačně zodpovězena ani otázka, zda sacharidy slouží v regulaci procesu kvetení především jako zdroj uhlíku a energie (podle již zmíněného modelu indukce kvetení dostupností živin), či zda je jejich působení alespoň z části signální povahy (Roldán et al., 1999; Havelange et al., 2000; Bernier et al., 2002; King, 2012).

1.1.1.2.1. Signální role sacharidů

Na rozdíl od etablovaných signálních molekul, fytohormonů, byla sacharidům role signálních látek přiznána až relativně nedávno. Teprve experimenty s nemetabolizovatelnými či z části metabolizovatelnými cukry dokázaly oddělit výživový efekt sacharidů od jejich signální funkce (Jang a Sheen, 1994). Odhalily tak, že některé proteiny známé v souvislosti s příjmem a zpracováním sacharidů při vazbě se svým substrátem generují signál. Při bližším zkoumání sacharidové regulace genové exprese vyšlo najevo, že sacharidy zasahují do mnoha procesů a ne všechny s cukerným metabolismem souvisí (Rolland et al., 2002). Například u *Arabidopsis* bylo zjištěno, že sacharóza reguluje expresi přibližně 700 genů (Gonzali et al., 2006) a již o rok později byla publikována práce identifikující přes 1700 genů, u kterých dochází ke změně exprese v návaznosti na změnu hladiny sacharózy (Osuna et al., 2007). O tom, zda je toto číslo konečné, lze přinejmenším spekulovat.

Sacharóza je hlavním transportním sacharidem většiny rostlin (Geiger, 2011). V metabolických procesech však není využívána jako taková, nýbrž až její štěpné produkty, jimiž jsou hexózy. Sacharóza může být štěpena dvěma enzymy - sacharózasyntázou nebo invertázou. Invertáza katalyzuje nevratnou reakci, při které vzniká glukóza a fruktóza. Oproti tomu reakce katalyzovaná sacharózasyntázou je v principu vratná. Produkty štěpení jsou zde fruktóza a UDP-glukóza (Koch, 2004; Ruan et al., 2010). Glukóza i fruktóza jsou v buňce fosforylovány hexokinázami. Právě hexokinázy patří mezi proteiny, které jsou schopné generovat signál (Smeekens, 2000; Rolland a Sheen, 2005). Vzhledem k tomu, že geny indukovatelné sacharózou nejsou zároveň indukovatelné jejími štěpnými produkty, je pravděpodobné, že sacharóza funguje coby signální molekula pro jinou regulační dráhu než hexózy. Signálním proteinem asociovaným s touto dráhou se ukázala stěnová invertáza (Ruan et al., 2010). Vedle již zmíněné sacharózové signalizace a signalizace na

hexokinázách závislé byla objevena i hexózová signalizace na hexokinázách nezávislá (Smeekens, 2000).

Zda bude sacharóza štěpena přednostně invertázou či sacharózasyntázou souvisí s vývojem daného sinku. Invertáza byla detekována v nově vznikajících, rostoucích a metabolicky aktivních sincích. U zásobních typů sinků, s postupným přechodem od růstu k ukládání zásobních látek, se mění i dominantní enzym degradující sacharózu. Invertáza je vystřídána sacharózasyntázou (Koch, 2004). V rostlině nalezneme několik typů invertáz lišících se buněčnou lokalizací, optimálním pH a rozpustností. Rozpustné formy jsou lokalizovány ve vakuole (kyselá invertáza) a v cytoplasmě (neutrální invertáza, většinou málo aktivní). V buněčné stěně je zakotvena kyselá nerozpustná invertáza (Roitsch, 1999). Autoři věnující se možné regulaci nástupu kvetení sacharidy, pokládají právě kyselou invertázu za zásadní enzym měnící dostupnost cukrů apikálnímu meristému (Havelange et al., 1986; Bernier et al., 2002; Heyer et al., 2004; Ranwala a Miller, 2008; Iqbal et al., 2011).

Pro úplnost je nutné zmínit rovněž signalizaci sacharidů prostřednictvím disacharidu trehalózy, která se v podobě trehalóza-6-fosfátu ukázala jako univerzální signální molekula u rostlin. Dále je předpokládána existence dalších, zde nezmíněných, signálních drah. (Eveland a Jackson, 2012)

1.1.1.2.2. Indukce kvetení dlouhodobých rostlin v souvislosti s působením sacharidů

Není překvapivé, že nejvíce prací zabývajících se detailním studiem vlivu jednotlivých látek na přechod z vegetativní do generativní fáze bylo provedeno na rostlinách, u nichž je kvetení indukováno změnou vnějších podmínek. U takovýchto modelů lze sledovat změny v distribuci látek či v expresi genů v jasně definovatelném čase vzhledem k působení indukčního signálu (Bernier et al., 1993). Nejčastěji byly ve spojitosti s výzkumem úlohy sacharidů používány fakultativně dlouhodobní rostliny, a to *Arabidopsis thaliana*, huseníčku blízce příbuzná *Sinapis alba* a *Lolium temulentum* (např. Bodson a Outlaw, 1985; King a Evans, 1991; Lejeune et al., 1991; Lejeune et al., 1993; Blázquez et al., 1998; Corbesier et al., 1998; King et al., 2008).

Indukce kvetení u dlouhodobých rostlin probíhá jejich vystavením delší světelné periodě, než je fotoperioda kritická. Toto běžně užívané ošetření ovšem nezajistí oddělení fotoperiodického signálu od účinku způsobeného prodloužením fáze fotosyntézy. Při kritickém hodnocení takto získaných výsledků je tedy zapotřebí mít zmíněnou skutečnost stále na paměti. Z důvodu odlišení fotosyntetické příčiny pozorovaných změn od změn

působených fotoperiodickým signálem, bylo zavedeno několik alternativních ošetření. V některých pracích je pro indukci kvetení vedle ošetření dlouhým dnem (long day, LD) používáno ošetření tzv. „posunutým krátkým dnem“ (displaced short day, DSD). Bylo totiž zjištěno, že při zachování krátké délky světelné fáze její jednorázové oddálení o 8 hodin rovněž způsobí indukci kvetení (Bodson a Outlaw, 1985; Corbesier et al., 1998). Fotosyntetický aspekt může být odstíněn i použitím nízké intenzity záření, která není dostatečná pro fotosyntézu, nebo použitím dlouhovlnného červeného záření v průběhu prodloužené světelné fáze (Périlleux a Bernier, 1997; King et al., 2008).

Určitá pozitivní role v nástupu kvetení byla sacharidům přisouzena po detekci zvýšeného množství sacharózy jak v centrální, tak v periferní zóně apikálního meristému *Sinapis alba* vystavené dlouhému dni či DSD (Bodson a Outlaw, 1985). Otázkou místa vzniku tohoto navýšení hladiny sacharózy se zabývaly studie zaměřené na postižení exportu sacharidů z listů metodou jímání exudátů. U *Sinapis* i *Arabidopsis* po působení indukčních podmínek skutečně dochází k přechodnému zvýšenému exportu sacharózy z listů (Lejeune et al., 1991; Corbesier et al., 1998). V souladu s předchozími dvěma pracemi Lejeune se spolupracovníky (1993) detekoval po působení LD či DSD přechodné zvýšení vtoku sacharózy do oblasti vzrostného vrcholu. Floémový tok z listů do apexu však patrně nebude jedinou cestou transportu „navýšené“ sacharózy, jak ukazují následující práce na *Sinapis* (Bernier et al., 1993; Havelange et al., 2000). Při úvahách o distribuci sacharózy po rostlině autoři vzali v potaz také kořeny. Po působení indukční fotoperiody pozorovali přechodné zvýšení hladiny i zde. Pro objasnění možného vztahu zvýšené hladiny sacharózy v kořenech a nástupu kvetení byly provedeny experimenty se zaškrcováním prýtu. Zaškrcení vedlo k inhibici floémového toku z nadzemní části do kořenů. Vzestup hladiny sacharózy v kořenech byl tímto inhibován a zastavení floémového vtoku mělo za následek výraznou redukci počtu vykvetlých rostlin (Bernier et al., 1993; Havelange et al., 2000). Kultivace zaškracených rostlin v roztoku se sacharózou nebo glukózou dokázala zcela zvrátit inhibiční vliv přerušenoého floémového toku. Bylo tak potvrzeno, že z floémové tekutiny jsou to skutečně sacharidy, které za pozorované jevy odpovídají (Havelange et al., 2000).

Při analýzách xylémových exudátů bylo zjištěno, že po vystavení indukčním podmínkám dochází k zvýšení transportu cytokininů z kořenů (Lejeune et al., 1988; Lejeune et al., 1994). Tým Berniera (Bernier et al., 1993; Havelange et al., 2000) pozoroval po zaškrcení floému snížení exportu cytokininů z kořenů oproti rostlinám nezaškrceným a oproti rostlinám zaškrceným pěstovaným v roztoku se sacharózou. To vedlo autory k vyslovení závěru, že funkce sacharózy v kořenech je signální a vede ke zvýšení exportu

cytokininů z kořenů do nadzemní části rostliny, potažmo apexu. O roli cytokininů v procesu kvetení je pojednáno v kapitole 2.1.1.4.

Zvýšené množství sacharózy ve floémovém exudátu bylo v souvislosti s indukcí kvetení zjištěno u další dlouhodobní rostliny, *Lolium temulentum*. Zde byla vyšší hladina detekována v listových exudátech při LD i DSD ošetření (Périlleux a Bernier, 1997). King a Evans (1991) však překvapivě u stejného druhu nezaregistrovali zvýšení hladiny sacharózy v apexu. Možné vysvětlení podali Lejeune a spolupracovníci (1993), kteří předpokládají, že *Lolium* pro iniciaci kvetení zvýšený tok sacharidů nepotřebuje, neboť jejich hladina je i ve vegetativním apexu optimální. Na základě výše uvedených poznatků získaných na *Sinapis*, kde bylo zmapováno, že po navýšení sacharózy v listech dochází k jejímu transportu floémem jak do apexu, tak do kořenů (Bernier et al., 1993; Havelange et al., 2000), bychom mohli předpokládat, že zvýšený export sacharózy z listů pozorovaný u *Lolium* (Périlleux a Bernier, 1997) může být spojen výhradně s následnou sacharózovou signalizací v kořenech, kde by spouštěl obdobnou dráhu zahrnující cytokininy, jak bylo pozorováno u *Sinapis*. Zjištěný nárůst množství sacharózy ve floémovém exudátu z listů (Périlleux a Bernier, 1997) by poté nebyl v rozporu s výsledky Kinga a Evanse (1991), kteří nepozorovali zvýšení obsahu sacharózy v apexu. U dlouhodobní *Rudbeckie* oproti tomu zvýšení sacharózy v apexu pozorováno bylo (Komarova a Milyaeva, 1991), rovněž tak u rostliny *Fuchsia hybrida* (King a Ben-Tal., 2001). Konkrétní mechanismy přenosu signálu tedy patrně budou druhově závislé.

Ačkoliv, jak bylo zmíněno, laboratorní podmínky dovolují při hledání univerzálnějších zákonitostí indukce kvetení rozpojit vliv fotoperiodický a fotosyntetický, je zřejmé, že v přírodě tyto cesty působí u dlouhodobních rostlin neoddělitelně. Kromě vlivu fotoperiody je tedy třeba brát v potaz také otázku vlivu zvýšené fotosyntézy. Fotosyntéza je závislá na ozáření rostliny. Silnější záření za neindukčních podmínek (krátký den) proto vede ke zvýšení fotosyntézy a tím pádem ke zvýšené tvorbě sacharidů. Jak bylo demonstrováno na *Sinapis*, i za těchto podmínek dochází k akumulaci sacharózy ve vzrostném vrcholu (Havelange a Bernier, 1983). Detailní analýza apikálního meristému ozářené rostliny ukázala, že vykazuje některé změny (navíc nastávající ve stejném pořadí), které jsou typické pro meristém dlouhodobní rostliny vystavený indukční fotoperiodě (Havelange a Bernier, 1983; Bernier et al., 1993; Bernier et al., 2002). Vedle zvýšení hladiny škrobu a kyselé invertázy byl zjištěn např. zvýšený počet mitochondrií a změna struktury jadérek. Následné zvýšení mitotické aktivity však nebylo zaznamenáno a toto ošetření nevedlo ke kvetení. Autoři (Havelange a Bernier, 1983) na základě svého pozorování

charakterizují roli sacharózy jakožto nezbytného nikoliv však dostačujícího činitele k naplnění květního programu. Tuto myšlenku potvrzují i následující pozorování. Vzrostlé vrcholy uříznuté z rostlin *Lolium*, z nichž část byla předtím vystavená indukčním podmínkám, byly následně přesazené na médium se sacharózou. Ke kvetení došlo pouze u těch vrcholů, které dříve obdržely indukční signál (King a Evans, 1991; McDaniel et al., 1991). Sacharóza samotná tedy na indukcii kvetení nestačila, ale meristémy z indukovaných rostlin na ni pozitivně reagovaly, jak ukázalo srovnání fyziologické odpovědi na médiu s a bez sacharózy (King a Evans, 1991). Sacharóza (pokud se nejedná o jiný signál) vznikající v důsledku vyššího ozáření je oproti tomu dostačující pro iniciaci kvetení u dlouhodobě fuchsie. Zvýšenou ozářeností je však třeba působit více dnů za sebou (King a Ben-Tal, 2001).

1.1.1.2.3. Indukce kvetení krátkodenních a neutrálních rostlin v souvislosti s působením sacharidů

Změna distribuce sacharidů je zřejmě důležitá součást v procesu nástupu kvetení nejen pro výše pojednané dlouhodobé rostliny, ale i pro rostliny s odlišnými fotoperiodickými požadavky. Zvýšený export sacharózy z listů byl pozorován po vystavení indukčním podmínkám u krátkodenní rostliny *Xanthium strumarium*. Indukce kvetení zde probíhala prodlouženou tmou, čili za pro fotosyntézu méně příznivých okolností než u rostlin kontrolních (Houssa et al., 1991). U krátkodenního ananasu bylo pro změnu pozorováno zvýšení hladiny sacharidů ve vzrostném vrcholu (Madhusudanan a Nandakumar, 1983). Rovněž analýza hladiny sacharidů v apexu jahody po indukcii krátkým dnem potvrdila signifikantní zvýšení sacharózy a především fruktózy (Eshghi et al., 2007). Ještě je třeba zmínit, že u jahody nebylo pozorováno signifikantní zvýšení sacharózy v kořenech, jak by se dalo očekávat v souvislosti s výše uvedenými výsledky na *Sinapis*, kde autoři zvýšení sacharózy v kořenech dali do vztahu s cytokininovou signalizací (Bernier et al., 1993; Havelange et al., 2000). Vzhledem k nedostatku dalších literárních údajů nelze tedy usoudit, zda daný efekt sacharózy popsáný u *Sinapis* (Bernier et al., 1993; Havelange et al., 2000) je univerzálnější povahy či je spíše specifický pouze pro určitou skupinu rostlin.

U neutrálních rostlin je bohužel podchycení změn souvisejících s přechodem do generativní fáze výrazně obtížnější, což dokládá absence obdobně zaměřených prací na tomto modelu. Lze uvést alespoň práci staršího data na rajčeti, kde vyšší ozáření způsobilo dřívější kvetení (Calvert, 1959). Není však jisté, zda za tento jev mohou vytvořené sacharidy, jak je uváděno ve spojitosti s obdobnými experimenty na LD rostlinách

(Havelange a Bernier, 1983; King a Ben-Tal, 2001), či za to v obou případech může jiný regulační mechanismus. Určitým přiblížením k chování neutrálních rostlin mohou být sporadické práce věnující se kvetení fakultativně dlouhodobých rostlin pěstovaných za neindukčních podmínek. U *Arabidopsis* bylo i za krátkého dne pozorováno zvýšení hladiny sacharózy před zahájením tvorby květních struktur (Ericsson et al., 2006). Uvedené nasvědčuje tomu, že navýšení sacharózy v apikálním meristému je nejspíše jevem vyskytujícím se napříč rostlinami s různými požadavky pro indukci kvetení.

1.1.1.2.4. Role fotosyntézy a škrobových zásob v indukci kvetení

U rostlin dlouhodobých i u rostlin krátkodenních tedy byla pozorována akumulace sacharózy v apexu po vystavení rostlin indukčním podmínkám. Navýšená sacharóza může v principu pocházet ze dvou zdrojů: buď vzniká zvýšenou mobilizací škrobu či v důsledku zvýšení fotosyntézy. Na otázku, zda se květního signálu účastní mobilizace škrobu, se snažili odpovědět Corbesier a spolupracovníci (1998). Na základě analýz kvetení mutanta *Arabidopsis* postiženého v tvorbě škrobu zjistili, že sacharóza po indukci dlouhým dnem pochází přímo z fotosyntézy, kdežto pro indukci DSD je nepostradatelný škrob. Na základě zvýšení množství fotosyntetických pigmentů při přechodu do kvetení u dlouhodobých rostlin čeledi *Apiaceae* byl rovněž vysloven závěr, že zvýšená sacharóza pochází z fotosyntézy a nikoliv ze škrobových zásob (Samuoliene et al., 2009). Nezastupitelnou úlohu sacharidů podtrhuje i skutečnost, že pokud dlouhodobní rostlinu vystavíme v kritickém období vzduchu bez CO₂, nedojde k iniciaci kvetení ani po působení indukčních podmínek (Friend et al., 1984, King et al., 2008).

U krátkodenních rostlin není překvapivé, že zvýšení sacharidů v apexu je doprovázeno mobilizací škrobu, a to jak listového, tak obsaženého v jiných částech rostliny včetně apexu (Eshghi et al., 2007). Autoři však rovněž pozorovali zvýšení fotosyntézy. Zjevný rozpor mezi ukládáním škrobu v apexu u dlouhodobých (Havelange a Bernier, 1983) a mobilizací škrobu u krátkodenních rostlin lze vysvětlit rozdílnými světelnými podmínkami souvisejícími s indukcí kvetení.

1.1.1.2.5. Vliv sacharidů na kvetení v podmínkách *in vitro*

Chceme-li zkoumat vliv navýšení sacharidů na kvetení, většinou je výhodné uchýlit se k metodě kultivace rostlin *in vitro*. Role sacharidů (především sacharózy) jakožto látek urychlující nástup kvetení byla pozorována v mnoha pracích, ať již se jednalo o experimenty zaměřené na podhalení regulace kvetení či práce metodické, zabývající se testováním

vhodných kultivačních podmínek cílových druhů. Zde je třeba zmínit, že rostliny pěstované technikou *in vitro* se nacházejí ve specifických podmínkách, ne právě příhodných pro fotosyntézu (zhoršená možnost výměny plynů mezi kultivační nádobou a okolím, nižší ozáření). Z toho důvodu bývá přítomnost sacharózy, popř. glukózy či fruktózy, v médiu zcela klíčová pro přechod testovaných rostlin z vegetativní fáze do generativní (Friend et al., 1984; Roldán et al., 1999; Dielen et al., 2001; Vu et al., 2006; Taylor et al., 2007). Není vyloučeno, že v souladu s hypotézou o multifaktoriální kontrole kvetení mohou být ve specifických podmínkách *in vitro* limitujícím faktorem, který chybí do správné konstelace nezbytné ke kvetení, právě endogenní sacharidy. Jejich význam je poté v daném uspořádání více patrný. U dlouhodobě rostliny *Brassica campestris* dokonce přítomnost sacharózy v médiu vedla k nahrazení fotoperiodického požadavku. Na krátkém dni zde sacharóza kvetení urychlovala, na dlouhém dni nástup kvetení neovlivnila (Friend et al., 1984). Při experimentech s exogenně dodávaným cukrem bylo pozorováno, že zvyšování koncentrace sacharidu nad určitou hladinu vede u různých druhů naopak k inhibici kvetení (Dielen et al., 2001; Vu et al., 2006; Teichmanova et al., 2007). Pozorovaný jev bývá přičítán působení osmotického stresu.

Sporé práce zaměřené na vztah mezi sacharidy a indukcí kvetení u neutrálních rostlin využívají právě kultivaci *in vitro*. Zvýšení koncentrace sacharózy v médiu tabáku (Teichmanová et al., 2007) i rajčete (Dielen et al., 2001) vedlo k výraznému urychlení kvetení. Je tedy možné, že pro neutrální rostliny by, na rozdíl od fotoperiodicky citlivých, mohlo být samotné navýšení sacharózy v apexu dostatečným stimulem, aby zahájily květní program.

Z předchozího textu vysvítá, že sacharidy nesporně mají svoji nezastupitelnou funkci při iniciaci květního programu. Na druhou stranu samy o sobě však patrně nejsou, alespoň u fotoperiodicky citlivých rostlin, dostačujícím činitelem. V otázce, zda velmi rychlé a přechodné navýšení sacharózy v apexu má funkci spíše signální či je důležité jen jako zdroj energie, nejsou autoři jednotní. O signální úloze místo výživové by svědčila skutečnost, že bezprostředně po navýšení sacharózy nenásleduje zvýšení mitotické aktivity (Bernier et al., 2002), které je s nástupem kvetení spjato (Kwiatkowska, 2008). Jaká je role sacharidů v regulaci kvetení u neutrálních rostlin, zůstává stále nevyjasněno.

1.1.1.3. Souvislost mezi distribucí sacharidů a giberelinovou signalizací

Je poměrně známou skutečností, že gibereliny jsou v regulaci nástupu kvetení zahrnuty. Bylo o nich dokonce uvažováno i jako o možném kandidátu na pozici florigenu

(Mutasa-Gottgens a Hedden, 2009; Turnbull, 2011). Jejich působení bývá většinou pozitivní, ale nezdá se, aby byly popsány i případy, kdy gibereliny kvetení inhibovaly či neměly na studovanou rostlinu žádný znatelný vliv (King a Ben-Tal, 2001; Bernier a Périlleux, 2005; Srikanth a Schmid, 2011). Hladina giberelinů se zvyšuje jak při indukci dlouhým dnem, tak při kvetení rostlin za neindukčních podmínek (King et al., 2001; Eriksson et al., 2006; King, 2012). Bylo však zjištěno, že u fakultativně dlouhodobých rostlin jsou gibereliny důležité především pro iniciaci kvetení za krátkého dne. Mutanty *Arabidopsis* v syntéze giberelinů či ke giberelinům necitlivé vykazovaly jen lehké zpoždění v kvetení na dlouhém dni, kdežto kvetení na krátkém dni bylo naprosto inhibováno (Wilson et al., 1992). Gibereliny se jeví jako důležité i pro indukci kvetení při neoptimálních podmínkách (Corbesier et al., 2004; Iqbal et al., 2011).

Při vstupu rostlin do generativní fáze byla prokázána spolupráce sacharidů s gibereliny, jak ukazuje i následující příklad. Kvetení *Phalaenopsis* je inhibováno vysokou teplotou, což dokázaly zvrátit exogenně dodané gibereliny. Aplikace sacharózy na listy rostlin inhibovaných vysokou teplotou způsobila pouze lokální zvýšení hladiny sacharózy v listech, nikoliv však v apexu. Oproti tomu při současném působení giberelinů bylo zvýšení sacharózy detekováno i v apexu (Chen et al., 1994). Předpoklad, že gibereliny usnadňují transport sacharózy do apexu, se ukázal jako správný. Gibereliny stimulují nakládání do floému a zároveň jsou regulátory vykládání z floému, neboť zvyšují množství extracelulární invertázy. (Iqbal et al., 2011). Invertázy se specificky podílejí na modulaci transportu na dlouhou vzdálenost, protože jejich činnost reguluje sacharózový gradient mezi floémem a okolními pletivy (Godt a Roitsch, 1997; Roitsch, 1999). Gibereliny tak prostřednictvím invertáz zvyšují sílu sinku apikálního meristému. Působení giberelinů na sacharidy bylo zaznamenáno i v případě negativního vlivu giberelinů na kvetení. Zde aplikace giberelinů vedla k snížení hladiny sacharidů v apexu prostřednictvím tlumení jejich importu z listů (King a Ben-Tal, 2001).

1.1.1.4. Role cytokininů v indukci kvetení

Cytokiny v rostlinách regulují řadu procesů. Znám je jejich vliv na potlačení apikální dominance, na aktivaci dormantních laterálních pupenů, na stimulaci buněčného dělení a na zvýšení síly sinku. Dále hrají úlohu např. při oddálení senescence, vývoji chloroplastů, deetiolozaci či zrání semen. (Mok a Mok, 1994). Nejhojnější cytokiny v rostlinách jsou zeatin (Z), izopentenyladenin (iP) a dihydrozeatin - tzv. volné báze.

V rostlinách však ve větší míře nalezneme i deriváty s navázanou ribózou v poloze N9 – ribozidy (Davies, 2004).

Cytokininy jsou mimo již zmíněných funkcí rovněž pokládány i za důležitý faktor v regulaci nástupu kvetení. V podmínkách *in vitro* bývají pro kvetení mnoha druhů rostlin nepostradatelnou složkou média (Bernier, 1988; Vu et al., 2006; Taylor et al., 2007). Nicméně pozitivní vliv cytokininů byl pozorován i v podmínkách *in vivo* (Bernier, 1988). Stejně jako bylo doloženo u sacharidů, hladina cytokininů se ve vzrostném vrcholu po vystavení rostlin indukčním podmínkám zvyšuje. Nárůst hladiny cytokininů byl zaznamenán u dlouhodobního i krátkodobního druhu merlíku (Macháčková et al., 1993), *Sinapis* (Jacqumard et al., 2002), *Arabidopsis* (Corbesier et al., 2003), *Tillandsia* (Mercier a Endres, 1999) a u *Boronia megastima*, jejíž kvetení indukuje nízká teplota (Day et al., 1995). Zvýšení importu cytokininů do apexu nastává až s časovým odstupem po zvýšení hladiny sacharózy v apexu (Lejeune et al., 1994; Bernier et al., 2002). Samotná aplikace cytokininu na vzrostný vrchol *Sinapis* rostoucí v neindukčních podmínkách sice ke kvetení nevedla, způsobila však některé změny, které jsou spojeny s působením indukční fotoperiody: vedle zvýšení počtu i velikosti škrobových zrn došlo k rozpadu vakuol a k zvýšení mitotické aktivity (Havelange et al., 1986). Rovněž aplikace cytokininů nebo giberelinů (nikoliv však sacharózy) přímo na apex vedla k navození exprese genu (*SaMADS A*), která je za normálních podmínek spjata s přechodem do generativní fáze (Bonhomme et al., 2000). Aplikace cytokininů napodobovala působení dlouhého dne také v souvislosti se symplastickým propojením buněk apikálního meristému. V důsledku ošetření dlouhým dnem nebo cytokininy se tvorba plasmodesmů zvýšila (Ormenese et al., 2000; 2006).

Po vystavení indukčním podmínkám dochází k zvýšení exportu cytokininů (zeatinového typu) z kořenů, jak bylo zjištěno na základě analýzy xylémových exudátů (Lejeune et al., 1988). Cytokininy Z typu jsou obecně považovány za nejhojnější typ cytokininů v xylému, kdežto ve floému dominují cytokininy iP typu (Hirose et al., 2008). Jak již bylo zmíněno v kapitole 2.1.1.2.2. Havelange se spolupracovníky (2000) odhalil stimulaci exportu cytokininů (Z typu) z kořenů zvýšením importu sacharózy do kořene, který je vyvolán působením indukční fotoperiody. Transport cytokininů (či jiných látek) xylémem se následně ukázal jako klíčový pro iniciaci květního programu. Zastavení xylémového toku zamezením transpirace v nasycené atmosféře totiž vedlo k inhibici kvetení (Bernier et al., 1993; Havelange et al., 2000). Na základě předchozích informací by se tedy dalo očekávat, že cytokininy Z typu transportované xylémem jsou totožné s cytokininy, jejichž zvýšený

vtok do apexu byl pozorován Lejeunem a spolupracovníky (1994). Metodou jímání exudátů, která byla použita (Lejeune et al., 1994), lze však získat pouze floémovou tekutinu, nikoliv xylémovou. Autoři skutečně zjistili vtok do apexu výhradně cytokininů iP typu, jehož zvýšená hladina byla pozorována i v listových exudátech *Sinapis*, *Arabidopsis* i krátkodenní rostliny *Xanthium* (Kinet et al., 1994; Lejeune et al., 1994; Corbesier et al., 2003). Po vystavení rostlin indukční fotoperiodě, dochází tedy k zvýšenému exportu cytokininů jak z kořenů, tak z listů. Cytokiny tekoucí floémem (= z listů), jsou transportovány do apexu. Zda jsou do apexu transportovány také cytokiny přicházející pravděpodobně xylémem (Z typu) není jasné. Podle Lejeune a spolupracovníků (1994) by cytokiny z kořenů mohly být transportovány přednostně do listů a zde by mohly stimulovat syntézu cytokininů iP typu. Touto hypotézou se zabývaly rovněž dvě studie využívající metodu imunolokalizace (Jacqard et al., 2002; Corbesier et al., 2003). V první studii bylo u *Sinapis* skutečně zjištěno, že po vystavení rostlin dlouhému dni dochází v apexu k výraznému zvýšení hladiny pouze cytokininů iP typu (Jacqard et al., 2002). Tento závěr je v souladu s úvahami Lejeune a spolupracovníků (1994), kteří xylémovému cytokininu nepřičítají roli morfogenního regulátoru přímo v apexu. V souladu s předchozím urychlil izopentenyladenin jako jediný z testovaných cytokininů kvetení *Arabidopsis* kultivované na dlouhém dni (He a Loh, 2002). Imunolokalizace cytokininů v apexu *Arabidopsis* ukázala však na zvýšení obou typů cytokininů (iP i Z), přičemž slabší odezva byla zaznamenána u Z typu (Corbesier et al., 2003). Macháčková a spolupracovníci (1993) pozorovali v apexu po indukčním signálu zvýšení hladiny především iP typu u dlouhodobního merlíku, kdežto zvýšení obou typů u merlíku krátkodenního. Jednoduchý závěr o převládající funkci toho kterého typu cytokininu, potažmo zdroje tohoto cytokininu v regulaci kvetení zřejmě není možný. To dokládá i skutečnost, že ačkoliv se u *Sinapis* nezvýšila hladina Z typu cytokininů, došlo ke změně v jeho distribuci po apexu, takže jeho úlohu v apexu v souvislosti s iniciací kvetení nelze vyloučit (Jacqard et al., 2002).

Na rozdíl od sacharidů byl vliv cytokininů studován i na neutrálních rostlinách. Dewitte a spolupracovníci (1999), oproti výše popsaným pracím na dlouhodobních rostlinách, pozorovali u neutrálního tabáku na konci vegetativní fáze přechodný pokles cytokininů obou typů. Nicméně pokud u neutrálního tabáku overexpresí genu pro degradaci cytokininů snížíme jejich endogenní hladinu, dojde k výraznému oddálení kvetení (Werner et al., 2001). Přítomnost exogenních cytokininů urychlila kvetení další neutrální rostliny - rajčete, pěstované v podmínkách *in vitro* (Dielen et al., 2001). *Arabidopsis* rostoucí za neindukčních podmínek (čili bez naplnění fotoperiodického požadavku) reagovala rozdílně

na aplikaci cytokininu v závislosti na stáří rostliny. Aplikace cytokininů či giberelinů vedla k výraznému urychlení kvetení pouze u starších rostlin, u mladých neměla žádný vliv (Besnard-Wibaut, 1981). Urychlení kvetení *Arabidopsis* kultivované za neindukčních podmínek po přidání cytokininů bylo zaznamenáno rovněž D`Aloia a spolupracovníky (2011).

Závěrem této kapitoly lze říci, že cytokininy se jeví jako důležitá signální molekula zahrnutá v regulaci kvetení tzv. na dlouhou vzdálenost. Nárůst cytokininů v apexu je patrně příčinou zvýšené mitotické aktivity buněk, která bezprostředně souvisí s přeměnou apikálního meristému z vegetativního na florální (Bernier et al., 2002). Jak bylo ukázáno, samotná aplikace cytokininu často ke kvetení nestačí. Nicméně experimenty s aplikací různých cytokininů ukázaly, že ne všechny cytokininy vyvolávají stejnou fyziologickou odpověď (viz zmíněná práce He a Loh, 2002). Z toho důvodu je třeba opatrnosti při formulování obecných závěrů pro cytokininy jako takové.

U *Sinapis* bylo zjištěno, že export cytokininů z kořenů je stimulován sacharózou (Havelange et al., 2000). U *Xanthium* však po působení indukční fotoperiody došlo naopak k snížení exportu cytokininů z kořenů (Kinet et al., 1994). Do jaké míry je cytokininová signalizace spojena se změnami hladin sacharózy, bude tedy ještě nutné vysledovat. Vzhledem k tomu, že se cytokininy (vedle giberelinů) patrně rovněž účastní regulace floémového nakládání a vykládání (Thomas a Blakesley, 1987), půjde zřejmě o vícenásobné propojení drah těchto dvou typů látek.

1.1.2. Molekulárně genetické aspekty kvetení

V předchozí kapitole bylo podrobněji pojednáno o některých látkách zahrnutých v regulaci kvetení tzv. na dlouhou vzdálenost. Jak již bylo řečeno, více do středu zájmu odborníků je posunula až dlouhá desetiletí neúspěšného hledání 'svatého grálu rostlinné biologie' - florigenu (Zeevaart, 2008). Existuje tedy nakonec něco jako univerzální signál přenosný mezi rostlinami s různými požadavky pro indukci kvetení? Dnes víme, že ano. Bylo však zapotřebí, aby v době, kdy už současné klasické způsoby hledání florigenu byly vyčerpány, nastoupila cesta molekulárně genetická.

1.1.2.1. Regulace kvetení u modelové rostliny *Arabidopsis*

Na modelové rostlině, fakultativně dlouhodenní *Arabidopsis thaliana*, bylo připraveno a zkoumáno množství mutantů nějakým způsobem postižených v nástupu kvetení. To vedlo k postupnému odhalení čtyř drah, které u *Arabidopsis* kontrolují kvetení:

fotoperiodické, vernalizační, autonomní a giberelinové (Bernier a Périlleux, 2005 Bäumle a Dean, 2006). K těmto klasickým drahám byly postupně přidány ještě další dvě: dráha řízená okolní teplotou a dráha řízená věkem rostliny (Fornara et al., 2010; Srikanth a Schmid, 2011; Posé et al., 2012). Ještě je třeba dodat, že většina ekotypů *Arabidopsis* používaných v laboratoři vernalizační požadavek nemá, existují ale i ekotypy dvouleté, kterým teprve vernalizace umožní na fotoperiodický signál reagovat (Srikanth a Schmid, 2011).

Jak již mnohokrát vyplynulo z prací citovaných v předešlém textu, je pro *Arabidopsis* zásadní dráha fotoperiodická. Termín florigen byl ostatně spojován právě s ní. Teprve pokud je *Arabidopsis* ponechána v neindukčních podmínkách, dochází k uplatnění drah nezávislých na fotoperiodickém stimulu. Vzhledem k zaměření mé práce, které souvisí s přesahy fotoperiodické dráhy i do regulace kvetení neutrálních rostlin, budu se v dalším textu věnovat především dráze fotoperiodické. V menší míře pak také dráze autonomní a dráze závislé na věku rostliny.

1.1.2.1.1. Fotoperiodická dráha

1.1.2.1.1.1. Význam genů *CO* a *FT* v přenosu fotoperiodického signálu

Na základě analýz mutantů postižených ve fotoperiodické odpovědi se do popředí dostaly dva geny *CONSTANS (CO)* a *FLOWERING LOCUS T (FT)*. (An et al., 2004; Ayre a Turgeon, 2004). K zvýšení hladiny *CO* dochází pouze při dlouhém dni. Vlivem dlouhé fotoperiody je totiž vznikající protein stabilizován. V regulaci hladiny *CO* se stýkají signalizační dráhy modrého, červeného a dlouhovlnného červeného světla (Valverde et al., 2004; King, 2012). Funkcí *CO*, který je exprimován v listech, je iniciace exprese mobilního *FT* (An et al., 2004; Huang et al., 2005).

FT je dnes všeobecně pokládán za onen dlouho hledaný florigen (Huang et al., 2005; Zeevaart, 2006; Corbesier et al., 2007). Dodnes nepanuje naprostá shoda v důležitosti jednotlivých transportních forem *FT*. Prvotní tvrzení, že se *FT* transportuje z listů ve formě mRNA, bylo po vizualizaci proteinu *FT* nejprve zamítnuto, aby bylo následně opět vzato na milost (Huang et al., 2005; Corbesier et al., 2007; Zeevaart, 2008; Turnbull, 2011). Odborníci se přiklánějí k názoru, že pro přenos květního stimulu je zásadní proteinová transportní forma (Srikanth a Schmid, 2011; Turnbull, 2011). Nicméně Li a spolupracovníci (2011) v nedávné době prokázali, že transportovaný transkript je rovněž schopný navodit kvetení, nezávisle na přítomnosti proteinu ve floému. Ať již probíhá transkripce *FT* v průvodních buňkách floému či až v apexu, nesporným faktem zůstává, že v apexu je pro

další přenos signálu potřebný FT ve formě proteinu. Tvoří zde totiž proteinový komplex s transkripčním faktorem FLOWERING LOCUS D (FD), jehož hladina se ve vegetativním meristému zvyšuje před přechodem ke kvetení (Abe et al., 2005; Wigge et al., 2005).

Homology FT

Univerzálnost FT coby mobilní molekuly nesoucí signál ke kvetení byla potvrzena studiem dalších druhů. Homology FT jsou známy např. u rýže, okurky, brambory, hrachu, řepy, topolu, vinné révy rajčete či merlíku, zvýšení jejich exprese vede k dřívějšímu kvetení daných druhů (Turk et al., 2008; Xu et al., 2011). FT se nachází tedy nejen u rostlin dlouhodobých, ale rovněž i u krátkodobých druhů (např. rýže, topol) a u rostlin fotoperiodicky necitlivých (např. rajče). U krátkodobých rostlin dochází oproti dlouhodobým k hromadění FT naopak za krátkého dne (Kojima et al., 2002). U neutrálního rajčete není exprese homologu FT fotoperiodicky regulována (Lifschitz et al., 2006). Experimenty s roubováním či univerzálněji použitelným vnášením cizorodých genů, prokázaly, že FT signál je přenosný mezi rozdílnými druhy (Zeevaart, 2008). Exprese FT z *Arabidopsis* a jeho homologu z rajčete (SFT) indukovala kvetení u neutrálního rajčete i tabáku (Lifschitz et al., 2006). U některých rostlin bylo nalezeno více homologů FT, které vykazují stejné rysy jako *Arabidopsis* FT. To znamená, že se pohybují floémem a dokáží vyvolat kvetení (Lin et al., 2007; Hecht et al., 2011).

1.1.2.1.1.2. TSF a TFL1, nevýznamnější geny FT rodiny

FT protein patří do malé rodiny genů, která se nazývá CET (Pnueli et al., 2001). Nejblíže příbuzný genu *FT* je u *Arabidopsis* z této rodiny *TWIN SISTER OF FT (TSF)*. TSF, stejně jako FT, vzniká působením CO ve floému listů, v apexu poté tvoří komplex s FD. Jeho funkce je s *FT* částečně redundantní (Yamaguchi et al., 2005; Jang et al., 2009).

Naproti tomu další z členů rodiny CET, blízkce strukturně podobný proteinu FT, působí jako antagonist *FT*. Jedná se o *TERMINAL FLOWER 1 (TFL1)*. Místem jeho exprese je i u ostatních rostlin apikální meristém. Jeho nadexprese vede k oddálení kvetení (Pnueli et al., 1998; Kobayashi et al., 1999; Benlloch et al., 2007). TFL1 rovněž vytváří dimer s FD (Abe et al., 2005; Wigge et al., 2005). Je možné, že tímto způsobem TFL1 udržuje transkripční faktor FD nepřístupný pro FT (Turnbull, 2011). Conti a Bradley (2007) dokázali, že i působení TFL1 je svázáno s jeho transportem, ačkoliv ten se na rozdíl od FT odehrává jen v rámci apexu: z centrální části meristému je transportován po celém meristému, není však přítomen v oblasti primordií. *tfl1* mutant *Arabidopsis* vytváří místo

květenství pouze jeden terminální květ (Alvarez et al., 1992). TFL1 je tedy nezbytný pro udržení meristému v takovém stavu, kdy je schopen produkovat další a další květní primordia a tím tvořit květenství.

1.1.2.1.2. Integrační geny zahrnuté v iniciaci kvetení

Než budou pojednány další indukční dráhy, budou v této kapitole stručně charakterizovány geny, které v sobě integrují signály z více indukčních drah a tvoří tak jakési jádro regulace nástupu kvetení. Prvním z nich je *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CO1* (*SOC1*) na regulaci jehož exprese se mimo jiné podílí i popisovaná dráha závislá na FT (Jang et al., 2009). Produktem tohoto genu je MADS box transkripční faktor, který je klíčovým bodem pro integraci jak endogenních signálů, tak signálů z okolního prostředí. V regulaci exprese *SOC1* se stýká dráha fotoperiodická, vernalizační, gibberelinová, autonomní a dráha řízená věkem rostliny (Moon et al., 2003; Lee a Lee, 2010; Srikanth a Schmid, 2011). Homologem *SOC1* je u *Sinapis* gen *SaMADS* zmíněný již v souvislosti s cytokininovou a gibberelinovou signalizací (Bonhomme et al., 2000; Borner et al., 2000).

Dráha vernalizační a autonomní působí na expresi *SOC1* přes regulaci dalšího důležitého integrátoru, tentokrát represoru kvetení, *FLOWERING LOCUS C* (*FLC*) (Michaels a Amasino, 2001; Searle et al., 2006). Proto také fenotyp mutantů v autonomní dráze může být potlačen vernalizací. Represe *FLC* patrně hraje úlohu v získání kompetence apikálního meristému ke kvetení (Searle et al., 2006). Produkt genu *FLC* totiž reprimuje expresi *SOC1* vazbou do jeho promotoru (Hepworth et al., 2002). U rostlin s vernalizačním požadavkem vede ošetření chladem k represí *FLC* a teprve poté může dojít k navýšení *SOC1* působením dalších signálních drah. Vedle toho *FLC* inhibuje zvýšení hladiny *FT* a v listech expresi i samotného *FT* (Hepworth et al., 2002; Helliwell et al., 2006; Searle et al., 2006). Proto teprve po vernalizaci jsou ekotypy *Arabidopsis*, které jí vyžadují, schopny reagovat na působení indukční fotoperiody. *FLC* funguje jako heterodimer v komplexu s MADS box transkripčním faktorem *SHORT VEGETATIVE PHASE* (*SVP*). V regulaci *SVP* se stýká regulační dráha gibberelinová, autonomní a dráha spojená s vnímáním okolní teploty (Li et al., 2008).

Vedle dráhy závislé na *FT* a drah působících prostřednictvím *FLC* je hladina *SOC1* regulována i stářím rostliny. S věkem rostliny se jeho hladina zvyšuje (Lee a Lee, 2010).

Funkce *SOC1* (ve vazbě s *AGAMOUS-LIKE24*; *AGL24*) spočívá ve stimulaci exprese *LEAFY* (*LFY*), tedy genu, který určuje identitu florálního meristému (Lee et al.,

2008). Druhým cílovým genem je *APETALA 1 (API)*, jehož exprese je aktivována i přímým působením heterodimeru FT-FD (Wigge et al., 2005). Oba zmíněné geny jsou nutné pro realizaci květního programu. Bylo pozorováno vzájemné pozitivní ovlivnění exprese mezi LFY a API (Liljegren et al., 1999). Zvýšení hladiny LFY se pokládá za znak determinace ke kvetení. Je známo, že TFL1 (již zmíněný člen rodiny FT) negativně ovlivňuje jak expresi LFY tak API (Liljegren et al., 1999, Posé et al., 2012). LFY se exprimuje převážně v budoucích květních primordiích, oblast výskytu dimeru SOC1-AGL24, který stimuluje expresi LFY je však rozsáhlejší. Exprese LFY v samotném meristému je nejspíše inhibována TFL1, protože však TFL1 nevstupuje do primordií, exprese LFY zde inhibována není (Conti a Bradley, 2007).

1.1.2.1.3. Dráha autonomní a dráha závislá na věku rostliny

Dalšími drahami, které mají význam pro časování kvetení, jsou dráha autonomní a dráha závislá na věku rostliny. Ačkoliv by se mohlo zdát, že rozdílné názvy vystihují tutéž skutečnost, v současné literatuře jsou tyto dráhy vzájemně odlišovány. Každá navíc zasahuje do jiné části regulačního mechanismu řídicího časování kvetení (Fornara et al., 2010; Srikanth a Schmid, 2011; Posé et al., 2012). Ve srovnání s fotoperiodickou dráhou jsou obě jmenované prozkoumány o poznání méně

První známé geny účinkující v autonomní dráze byly u *Arabidopsis* odhaleny na základě analýz mutantů s odchylkou v časování kvetení (Rédei, 1962; Koornneef et al., 1991). Geny pro autonomní dráhu byly charakterizovány jako ty, jejichž ztráta funkce se projeví v oddálení kvetení nezávisle na délce působící fotoperiody. Postupně byly v souvislosti s autonomní dráhou nalezeny následující geny LD, FCA, FPA, FY, FLD, FVE, FLK (Simpson, 2004; Marquardt et al., 2006). Všechny produkty zmíněných genů stimulují kvetení nepřímo - přes inhibici exprese FLC, centrálního represoru kvetení. Některé z nich také reprimují gen *SHORT VEGETATIVE PHASE (SVP)*, jehož produkt je rovněž významným represorem nástupu kvetení (Li et al., 2008). Byla prokázána přímá interakce SVP a FLC, vzniklý heterodimer FLC-SVP je významný pro správné časování nástupu kvetení (Lee et al., 2007; Li et al., 2008).

Ve dráze závislé na stáří rostliny jsou v současné době známé pouze dva její články: produkty genů *SQUAMOSA PROMOTER BINDING LIKE (SPL)* a mikroRNA156 (Wang et al., 2009; Fornara et al., 2010; Chen et al., 2010; Srikanth a Schmid, 2011) Např. hladina transkripčního faktoru SPL3 vzrůstá s věkem rostliny. Bylo zjištěno, že SPL3 přímo stimuluje expresi genů *LFY* a *API* (Yamaguchi et al., 2009), a rovněž zvyšuje expresi *SOC1*

(Wang et al., 2009). Hladina SPL3 je negativně ovlivňována mikroRNA156. Množství dané mikroRNA v pletivech klesá se stářím rostliny. Exprese genu pro *miR156* je vysoká v juvenilní fázi a poté prudce klesá. Pokles exprese se překrývá s obdobím, kdy rostliny zřejmě získávají kompetenci ke kvetení (Bäurle a Dean, 2006; Schwarz et al., 2008; Wang et al., 2009). Bylo zjištěno, že nejen hladina SOC1, ale i FD pozitivně koreluje s věkem rostliny (Abe et al., 2005). Jakým mechanismem je ve spojitosti s věkem regulována hladina FD, není ale známo. SPL3 a mikroRNA156 hrají kromě dráhy závislé na věku úlohu i v jiných drahách souvisejících s regulací kvetení. Bylo například zjištěno, že v závislosti na okolní teplotě SPL3 (posttranskripčně regulován miR156) specificky reguluje expresi FT v listech (Kim et al., 2012). Hladina miR156 a SPL3 není ovlivněna vernalizací ani působením cytokininů či giberelinů (Wang et al., 2009).

1.1.2.2. Regulace kvetení u neutrálních rostlin

V případě fotoperiodicky necitlivých rostlin je poznatků o regulaci kvetení poskrovnu. Jako modelové fotoperiodicky neutrálními rostliny jsou využívány rajče a tabák. Tabák sloužil jako model především v experimentech staršího data využívajících techniku roubování či manipulaci s počtem vegetativních orgánů (Gebhardt a McDaniel 1991; Singer et al., 1992; McDaniel 1996). Tyto práce se snažily postihnout faktory rozhodující o časování kvetení, popř., zákonitosti přenosu signálů ke kvetení mezi rostlinami neutrálními a fotoperiodicky citlivými. Autoři si ale nekladli za cíl nahlédnout do molekulární úrovně regulace kvetení. Práci věnujících se této stránce je naopak u tabáku poskrovnu. Jako model pro charakteristiku kvetení na molekulární úrovni u neutrálních rostlin je více využíváno rajče. I zde však výsledky zdaleka nedosahují komplexnosti výzkumu na *Arabidopsis* (Thouet et al., 2012).

Převážně s použitím tabáku jako modelové rostliny budou v kapitole 2.1.2.2.1. shrnuty poznatky o regulaci kvetení neutrálních rostlin bez kontextu genové regulace. Kapitola 2.1.2.2.1. bude pojednávat o poznacích získaných u neutrálních rostlin na molekulární úrovni.

1.1.2.2.1. Lokalizace základních komponent odpovídajících za indukci kvetení

Časování kvetení je u neutrálních rostlin závislé především na stáří rostliny. Neutrální rostliny tabáku (ale i například slunečnice) vytvářejí za daných podmínek stabilní počet nodů do kvetení (Haberman a Sekulow, 1972; McDaniel, 1980). Počet nodů je dán genotypem rostliny, může být ale do jisté míry ovlivněn prostředím, (McDaniel a Hartnett,

1993; McDaniel, 1996). Iniciace kvetení je i u neutrálních rostlin patrně zahájena signálem vznikajícím v listech (Chailakhyan a Khazhakyan 1974; McDaniel 1980; Hopkinson a Ison 1982; Gebhardt a McDaniel 1991). Kořeny naopak podle autorů hrají v časování kvetení roli inhibiční (McDaniel 1980; Gebhardt a McDaniel 1991). V současné době se však od této představy o roli kořenů upouští (Turnbull 2011). Ačkoliv jsou dospělé listy pokládány za zdroj signálu ke kvetení, celkový počet nodů vytvořených do kvetení nelze ovlivnit odstraňováním části dospělých listů (Gebhardt a McDaniel 1991; McDaniel 1996). Rostliny tabáku s pouze čtyřmi ponechanými bazálními listy kvetly při stejném počtu nodů, jako kontrola s plným počtem listů (Gebhardt a McDaniel 1991). Rostliny se dvěma ponechanými listy však již vytvářely větší počet nodů do kvetení, než kontrola. Signál z listů tedy není přímo úměrný počtu listů, nicméně existuje určitý minimální počet dospělých listů potřebný pro jeho dostatečně silné působení, které nastartuje vývojové změny (Gebhardt a McDaniel 1991; McDaniel 1996). Na základě roubovacích experimentů se ukázalo, že v případě rostlin tabáku vznik indukčního signálu v listech předchází vzniku kompetence apikálního meristému k přijetí tohoto signálu. Singer se spolupracovníky (1992) roubovala vzrostné vrcholy tabáku různého stáří na kvetoucí podnože, mladší rouby vytvořily do kvetení více listů nežli starší. Čím je tedy meristém starší, tím je citlivější ke stimulačnímu signálu (Singer et al., 1992; McDaniel 1996). Zajímavé bylo také zjištění, že pro kvetení roubovaných vzrostných vrcholů neutrálního tabáku byl signál produkovaný podnoží z kvetoucího neutrálního tabáku výrazně slabší než signál z podnože kvetoucího dlouhodobního *N. sylvestris* (Singer et al., 1992). Na rozdíl od tabáku u fotoperiodicky neutrálních rostlin slunečnice kompetence ke kvetení nastává už krátce po vyklíčení (Paterson, 1984).

1.1.2.2. Regulace kvetení neutrálních rostlin na molekulární úrovni

I u neutrálních rostlin byl nalezen homolog genu *FT*, který je u fotoperiodicky citlivých rostlin spjat s dráhou fotoperiodickou. Zmíněna byla existence homologu genu *FT* u rajčete (*SINGLE FLOWER TRUSS*; *SFT*) (Lifschitz et al., 2006). U neutrálních rostlin jeho byla role zkoumána pomocí manipulace s mírou exprese či vnášení genu pro homolog *FT* do jiných rostlin (Molinero-Rosales et al., 2004; Lifschitz et al., 2006). Zvýšení exprese *SFT* u rajčete i tabáku urychlilo kvetení, zatímco snížení exprese *SFT* vedlo k jeho oddálení (Molinero-Rosales et al., 2004; Lifschitz et al., 2006). Je tedy zřejmé, že i u neutrálních rostlin je správná funkce homologu *FT* vyžadována pro regulaci nástupu kvetení. Konstitutivní exprese *CO* z rajčete ani *Arabidopsis* však u rajčete ani tabáku kvetení

neurychlila, z čehož vyplývá, že u neutrálních rostlin je hladina homologu *FT* regulována jiným způsobem než u rostlin fotoperiodicky citlivých (Ben-Naim et al., 2006). U rajčete byl rovněž nalezen homolog *FD* (SELF-PRUNING G-BOX PROTEIN - *SPGB*), který se váže analogicky jako u *Arabidopsis* s homologem *FT* (*SFT*) i homologem *TFL1* (*SP*) (Pnueli et al., 1998; 2001). Exprese *SPGB* však byla na rozdíl od *FD* detekována kromě apexu i v listech (Lifschitz et al., 2006). Ortholog genu *LFY* byl u rajčete rovněž identifikován, exprimuje se však v rozsáhlejší oblasti vzrostného vrcholu nežli bylo pozorováno u *Arabidopsis* (Molinero-Rosales et al., 1999). U rajčete zatím nebyl popsán ortholog genu *SOC1* ani jiné složky účastníci se přenosu signálu z *SFT* (Thouet et al., 2012). Ostatní indukční dráhy nezávislé na *SFT* se u rajčete dosud rovněž nepodařilo odhalit. Jelikož ale mutant s nefunkčním *SFT* později vykvete, lze existenci dalších drah nezávislých na *FT* předpokládat. Zůstává potom otevřenou otázkou, jak významné mohou být tyto dráhy pro přirozený nástup kvetení v porovnání s dráhou zahrnující *FT*. Ještě je třeba dodat, že existence mobilního signálu u fotoperiodicky neutrálních rostlin byla již před mnoha lety potvrzena roubovacími experimenty (Gebhardt et McDaniel, 1991; Singer et al., 1992). Tímto signálem, který o nástupu kvetení rozhoduje, by i u neutrálních rostlin měl být homolog *FT* (McGarry et Ayre, 2012), ačkoliv explicitní důkazy spojující výsledky roubovacích experimentů a molekulární poznatky v tomto případě chybí. U rajčete byl navržen model, kdy je *FT* produkované rovnoměrně všemi listy a jeho množství v apexu stoupá během růstu rostliny s přibývajícím množstvím listů. U starších rostlin s větším počtem listů vzroste podle tohoto modelu poměr *FT/TFL1* na určitou hranici, která spustí přechod ke kvetení (McGarry et Ayre, 2012). U tabáku však bylo zjištěno, že se indukční signál z listů nesčítá (Gebhardt a McDaniel 1991; McDaniel 1996).

U fotoperiodicky neutrálních rostlin tabáku byl identifikován homolog *SOC1* (*NtSOC1*). Zvýšená hladina exprese daného genu vedla k jejich dřívějšímu kvetení. Tabákové homology *LFY* jsou známy pod názvem *Nicotiana FLO/LFY* (*NFL1* a *NFL2*) (Kelly et al., 1995). Kelly se spolupracovníky sice překvapivě nepozoroval zvýšení exprese genů *NFL* s přechodem rostlin tabáku do generativní fáze, ostatní autoři však zvýšení exprese (souhlasně s chováním ostatních známých homologů *LFY*) zaznamenali (Amaya et al., 1999; Smykal et al., 2007). U tabáku byly nalezeny rovněž homology *TFL1* označované jako *CET*-geny (*CET2* a *CET4*), jejichž název vyjadřuje skutečnost, že z důvodu příbuznosti rostlin je pro tabák bližším orthologem gen *CENTRORADIALIS* (*CEN*) - homolog *TFL1* z rostliny *Anthirrhinum majus* (Amaya et al., 1999; Mimida et al., 2001). Homology genů *FT*, *FD* či *FLC* nejsou u rostlin tabáku známy.

Vzhledem k tomu, že vnesení *FT* či *FLC* z jiných rostlin navodilo u tabáku očekávatelnou změny v časování kvetení, lze očekávat, že i u této rostliny jsou dané komponenty přítomny a plní obdobnou úlohu jako u lépe prozkoumaných druhů (Salehi et al., 2005; Lifschitz et al., 2006).

1.1.2.2.3. Ovlivnění molekulárních mechanismů kvetení látkami signální povahy

Ačkoliv, jak vysvítá z kapitol 2.1.1.2. a 2.1.1.4., existuje velký počet prací zabývajících se ovlivněním kvetení cytokininy či sacharidy, působení těchto látek na úrovni regulace exprese genů souvisejících s časováním kvetení je prakticky neznámé. Vzhledem k tomu, že u *Arabidopsis* začalo odhalování zmíněných genů teprve v nedávné minulosti, je to zcela pochopitelné. Oněch pár prací zabývajících se působením signálních látek na složitou síť interagujících proteinů však dává tušit, že tato oblast výzkumu dostane v brzké době podstatně více prostoru. Výjimku z výše uvedeného tvoří gibereliny, jejichž působení je oproti zbylým látkám podstatně více prostudováno (především u *Arabidopsis*). Jedna z indukčních drah charakterizovaných u *Arabidopsis* je právě dráha giberelinová (Périlleux a Bernier, 2005).

Sacharidy, jak bylo ukázáno v kapitole 2.1.1.2., nepopíratelně při nástupu kvetení hrají roli, ovšem jak moc důležitou zůstává otázkou. U *Arabidopsis* bylo zjištěno, že přítomnost sacharózy v médiu dokáže zvrátit projev mutace zasahující autonomní dráhu (mutace měla za následek oddálení kvetení). U mutantů defektního ve funkci *FT* však sacharóza účinek neměla (Roldán et al., 1999). Zvýšení sacharózy z jednoho procenta na 5 % mělo přesně opačný účinek – ještě více oddálilo kvetení mutantů defektních v genech autonomní dráhy popř. *CO* (Ohto et al., 2001). Autoři navíc s pomocí nemetabolizovatelných sacharidů prokázali, že pozorovaný negativní účinek sacharózy nemá příčinu osmotickou, ale metabolickou.

Do souvislosti s fotoperiodickou dráhou dává sacharidy King se spolupracovníky (2008; 2012). Ukázali, že při působení dlouhého dne jsou sacharidy nezbytné pro expresi *FT*. V případě, že byla *Arabidopsis* v atmosféře bez CO_2 či bylo použito světla nedostatečného pro fotosyntézu, exprese *FT* se následkem působení dlouhé fotoperiody nezvýšila a rostliny nekvetly (King et al., 2008). Oproti tomu při kultivaci na krátkém dnu sacharóza podle autorů stimuluje kvetení nezávisle na *FT*. Autoři k tomuto poznatku dospěli na základě experimentu postaveném na stimulaci kvetení několikadenním působením zvýšené ozáření na kontrolní rostliny a rostliny s defektem v genu *FT*. Protože zvýšení ozáření vede k zvýšení hladiny sacharózy, za příčinu pozorovaného urychlení kvetení u

obou variant považují právě sacharózu (King et al., 2008). Tento závěr ale není konzistentní s výše popsaným pozorováním Roldána a spolupracovníků (1999), kteří při kultivaci *Arabidopsis* za konstantní tmy ukázali, že sacharóza neurychlí kvetení u *ft* mutanta. Mezi fotoperiodickou dráhou a sacharidy našli spojitost i Seo a spolupracovníci (2011). Zjistili, že transkripční faktor *Arabidopsis* AtIDD8, který se váže do promotoru genů pro sacharózasyntázu a reguluje tak jejich expresi, zároveň hraje roli ve vnímání indukční fotoperiody.

Srikanth a Schmid (2011) navrhují mechanismus působení sacharidů rovněž přes dráhu závislou na věku, svojí hypotézu však konkrétními pracemi nepodkládají.

Cytokininy jsou pokládány za nezbytné pro zvýšení mitotické aktivity apikálního meristému (Bernier et al., 2002), které nastává při nástupu kvetení (Kwiatkowska, 2008). Úloze cytokininů v regulaci buněčného cyklu byl věnován velký zájem (shrnuto v Čiháková, 2006), rovněž je známo, že mají významný vliv na tvorbu, stavbu a správnou funkci apikálního meristému (Leibfried et al., 2005; Xie et al., 2009; Chandler, 2011), interakce cytokininů s dráhami regulujícími časování kvetení však oproti tomu prozkoumány nejsou. Výjimkou v tomto směru je práce D'Aloia a spolupracovníků (2011) na *Arabidopsis*. Aplikace cytokininu do kultivačního roztoku vedla k dřívějšímu kvetení rostlin pěstovaných za neindukční fotoperiody. Autoři zjistili, že aplikace cytokininů má za následek zvýšení hladiny *SOCI*. Expres *FT* nebyla zvýšena, oproti tomu došlo ke zvýšení exprese jak *FD*, tak *FT* paralogu *TSF*. *TSF*, jak již bylo řečeno, rovněž vytváří dimer s *FD* a působí částečně redundantně s *FT* (Yamaguchi et al., 2005; Jang et al., 2009). V kapitole 2.1.1.4. bylo zmíněno, že cytokininy mají vliv na přetváření cytoplasmatického propojení buněk apikálního meristému (Ormenese et al., 2006). Vzhledem k tomu, že působení některých klíčových proteinů (*FT*, *TSF*, *TFL1*) je závislé na mezibuněčném transportu (ať již ve formě proteinu či mRNA), lze si představit, že i změnou cytoplasmatického propojení cytokininy do regulace nástupu kvetení zasahují (Turnbull, 2011).

Mutanty *Arabidopsis* v syntéze giberelinů či ke giberelinům necitlivé vykazují odlišné chování za indukčních a neindukčních podmínek. Na dlouhém dni vykazují jen lehké zpoždění, kdežto kvetení na krátkém dni je naprosto inhibováno (Wilson et al., 1992). Gibereliny u *Arabidopsis* za neindukčních podmínek stejně jako cytokininy regulují expresi genu *SOCI* (Moon et al., 2003). Při působení indukční fotoperiody mají však jinou funkci - přímo nestimulují expresi *SOCI*, ale regulují expresi *FT* a *TSF* (cestou nezávislou na CO) (Porri et al., 2012).

S výjimkou giberelinů je výzkum vlivu dalších signálních látek na kvetení v počátcích. Nelze tedy vyloučit, že časem k stávajícím indukčním drahám přibudou na základě nových poznatků další větve nebo dokonce celé nové dráhy zahrnující například i probírané látky: sacharidy a cytokininy.

1.2. Buněčný cyklus

Vzhledem k tomu, že se tato práce zabývá efektem exprese mitotického aktivátoru, pojednám v následujícím textu základní informace o buněčném cyklu a roli daného genu v něm.

Vznik nových buněk probíhá mechanismem buněčného dělení. Proces zahrnující sled událostí mezi dvěma děleními buňky se nazývá buněčný cyklus. Ten lze rozdělit do čtyř fází: replikace genomu (S fáze) a segregace chromozomů (M fáze) jsou odděleny dvěma fázemi G1 a G2 (pojmenované podle anglického slova gap – mezer). Fáze G1, S, a G2 se dohromady označují termínem interfáze. Buňka může z buněčného cyklu vystoupit do tzv. G0 fáze, a to buď v G1 či v G2 fázi. V tomto stavu se buňka nedělí, ovšem do buněčného cyklu se může opět vrátit (Alberts et al., 1998; Buchanan et al., 2000).

U rostlin, stejně jako u ostatních eukaryotních organismů, je průchod buněk buněčným cyklem řízen periodickou aktivací klíčových proteinů, tzv. cyklin-dependentních kináz (CDK). Rostliny a živočichové mají více CDK, oproti tomu u kvasinek nalezneme pouze jednu. Důležitost CDK je zřejmá i z množství mechanismů, které regulují jejich aktivitu, ať již na transkripční či na posttranslační úrovni. Jak již z názvu těchto enzymů vyplývá, aktivita CDK je spojena s vazbou regulačních proteinů – cyklinů (Cyc), pojmenovaných podle výrazného kolísání jejich hladiny v průběhu buněčného cyklu. Aktivita CDK je významně regulována i fosforylací/defosforylací, vazbou inhibitorů, na ubiquitinu závislou proteolýzou a změnami buněčné lokalizace (Inzé a De Veylder, 2006; Boruc et al., 2010). Pro správný průběh buněčného cyklu je nezbytná existence tzv. kontrolních bodů. Zde je buňka zadržena, pokud všechny procesy neproběhly, jak měly. U rostlin i živočichů jsou nejvýznamnější dva kontrolní body: před zahájením replikace genomu (přelom G1/S) a před vstupem buňky do mitózy (přelom G2/M) (Alberts et al., 1998; Lodish et al., 2000). Přechod oběma kontrolními body je pečlivě regulován. V dalším textu se však budu, s ohledem na použitý experimentální materiál, věnovat pouze regulaci přechodu G2/M.

1.2.1. Regulace přechodu G2/M u rostlin

Cylin-dependentní kinázy u rostlin jsou podle sekvenčního motivu v místě pro vazbu cyklinu děleny na skupiny CDKA až CDKG a CKL (Tank a Thaker, 2011), přičemž centrální úlohu při řízení průchodu oběma výše zmíněnými kontrolními body má skupina kináz CDKA. Kinázy se sekvenčním motivem CDKA můžeme nalézt u všech eukaryot. Oproti tomu CDKB, které hrají úlohu při průchodu kontrolním bodem G2/M, jsou specifické výhradně pro rostliny (Joubes et al., 2000). CDKB na rozdíl od CDKA nejsou schopné komplementovat kvasinkovou mutaci v genu pro cyklin-dependentní kinázu (Heberle-Bors, 2001). Hladina CDKA se u rostlin v průběhu celého buněčného cyklu příliš nemění, oproti tomu exprese CDKB je omezena na interval S, G2 a M fáze s maximem v G2 fázi (Hemerly et al., 1993; Porceddu et al., 2001). Ačkoliv je u rostlin známo 10 tříd cyklinů, role v buněčném cyklu je přisouzena pouze několika z nich (Vandepoele et al., 2002; Wang et al., 2004). Cykliny třídy A a B se nazývají též mitotické cykliny, protože se oba účastní vstupu buňky do mitózy. Cykliny A jsou navíc důležité i pro průchod S fází. Bylo zjištěno, že mitotické cykliny se mohou vázat na CDKA i CDKB (Francis, 2007; De Veylder et al., 2007; Van Leene et al., 2011). Vedle těchto cyklinů hrají v G2/M přechodu úlohu patrně ještě D cykliny (Kono et al., 2003; Kawamura et al., 2006; Nakai et al., 2006). Ty byly dříve dávány do souvislosti pouze s přechodem G1/S a jsou proto známé též pod názvem G1-cykliny (Inzé a De Veylder, 2006). Bylo však zjištěno, že se cykliny třídy D váží na CDKB, kterým je připisována funkce v přechodu G2/M. Alternativní vysvětlení může být působení tohoto komplexu (pro CDKB netypicky) v průběhu S fáze (Kono et al., 2003; Kawamura et al., 2006; Nakai et al., 2006; Van Leene et al., 2011).

Pro to, aby byla CDK aktivní a mohla řídit vstup buněk do mitózy, musí splňovat několik podmínek. Vedle navázaného cyklinu je třeba, aby nesla fosfátovou skupinu na threoninovém zbytku (Thr160 nebo na jiném blízkém threoninu) a naopak, aby byla defosforylovaná na tyrosinovém zbytku (Tyr15) a na threoninu 14 (Lew a Kornbluth, 1996; Dewitte a Murray, 2003). Aktivační fosforylace (Thr160) je nezbytná již pro průchod kontrolním bodem G1/S. Zajišťuje ji CDK aktivační kináza, což je CDK typu D s navázaným příslušným cyklinem (Joubes et al., 2000). Pro inhibiční fosforylaci/aktivační defosforylaci Tyr15 a Thr14 je u ostatních eukaryot (u kvasinek se jedná pouze o polohu Tyr15) zapotřebí kináza WEE1 a fosfatáza Cdc25. WEE1 fosforylací inaktivuje komplex CDK/Cyc během S a G2 fáze. Cdc25 tento komplex defosforylací aktivuje na konci G2 fáze (Lew a Kornbluth, 1996). U rostlin je situace o něco složitější. Rostlinný homolog kinázy

WEE1 u rostlin objeven byl (Sun et al., 1999; Sorrell et al., 2002; Gonzalez et al., 2004). Snížení exprese WEE1 vede ke zmenšení buněk, (Gonzalez et al., 2007), avšak její přítomnost se nejeví pro život rostlin pěstovaných v optimálních podmínkách jako nezbytná. Význam WEE1 stoupá však při stresu - v případě poškození DNA je tato kináza zodpovědná za zastavení buněčného cyklu (De Schutter et al., 2007; Cools et al., 2011). Kupodivu substrátem kinázy za daných podmínek není CDKA, a patrně ani CDKB (Dissmeyer et al., 2009). Zda tedy WEE1 hraje nějakou úlohu v „normálním“ buněčném cyklu, zůstává otázkou (Francis, 2011).

Co se týče aktivační fosfatázy u rostlin, situace je ještě složitější. Plně funkční rostlinný homolog fosfatázy Cdc25 byl nalezen u zelené řasy *Ostreococcus tauri* (Khadaroo et al., 2004). U vyšších rostlin však byl objeven pouze protein odpovídající katalytické podjednotce enzymu Cdc25 (Landrieu et al., 2004; Bleeker et al., 2006; Dhankher et al., 2006; Ellis et al., 2006). Tyto nalezené proteiny s chybějící N-koncovou regulační doménou jsou homologické arsenátoreduktázám (označovaným též jako Cdc25-like). V rámci eukaryot se totiž rodina Cdc25 rozpadá na dvě skupiny, a to na vlastní fosfatázy a právě Cdc25-like arsenátoreduktázy, přičemž hlavní rozdíl mezi těmito skupinami je přítomnost N-koncové regulační domény. Ne vždy se však funkční rozdělení plně překrývá s predikcí na základě sekvence. Některé arsenátoreduktázy jsou totiž schopné i fosfatázové aktivity (Snaith et al., 2003; Bleeker et al., 2006; Ellis et al., 2006; Andreeva a Kutuzov, 2008). Cdc25-like protein z *Arabidopsis* vykazuje *in vitro* arsenátoreduktázovou i fosfatázovou aktivitu (defosforyluje rostlinou CDK na Tyr15 a Thr14), není ale schopen komplementovat *cdc25* mutaci u kvasinek (Landrieu et al., 2004; Sorrell et al., 2005; Ellis et al., 2006). Naopak komplementovat defekt v arsenátoreduktázové aktivitě u *Escherichia coli* dokáže (Dhankher et al., 2006). Nicméně bylo zjištěno, že i „pravá“ živočišná Cdc25 fosfatáza, má-li vhodný substrát, může vykazovat arsenátoreduktázovou aktivitu (Bhattacharjee et al., 2010). U rostlin s nefunkčním genem *cdc25-like* ovšem nebyly pozorovány žádné defekty (Dissmeyer et al., 2009; Spadafora et al., 2011). To nahrává představě, že v regulaci buněčného cyklu za normálních podmínek (stejně jako kináza WEE1) důležitou roli nehraje. Alternativním vysvětlením by mohla být velká redundance rostlinných kináz a fosfatáz (Francis, 2011).

Marná snaha nalézt „pravou“ Cdc25 v genomu vyšších rostlin, a zároveň srovnání genové výbavy zástupců skupiny Archaeplastida v kontextu evoluce, vedla ke vzniku hypotézy o postupném přebudování tohoto regulačního kroku u rostlin (Boudolf et al., 2006). Roli v aktivaci CDK komplexu, která je u ostatních eukaryot vymezená pro Cdc25, podle ní nahradila kináza ze skupiny CDKB (konkrétně CDKB1;1). CDKB1;1 aktivuje

komplex CDK/Cyc nikoliv jeho přímou fosforylací, ale fosforylací (vedoucí k odstranění) navázaného CDK inhibitoru. Autoři tak zpochybňují důležitost defosforylace CDK pro vstup do mitózy. Na druhou stranu existenci defosforylačního kroku (Tyr15) před vstupem do mitózy pozorovali u rostlinných buněk Zhang a spolupracovníci (1996; 2005), ti rovněž ukázali, že tento krok může být vyvolán expresí *cdc25* ze *Schizosaccharomyces cerevisiae*. Otázku, který rostlinný enzym je za pozorovanou defosforylací zodpovědný, ovšem nechali bez odpovědi.

Stejného efektu, jaký vyvolá exprese kvasinkového *cdc25*, lze u rostlinných buněk dosáhnout aplikací cytokininů (Zhang et al., 1996; Orchard et al., 2005; Zhang et al., 2005). Podle výsledků autorů jsou cytokininy zodpovědné za aktivační defosforylací ovlivněním neznámé fosfatázy. Nedá se ovšem zavrhnout ani přímá interakce cytokininů s CDK, vzhledem k tomu, že byla zjištěna vazba cytokininových analogů na daný enzym (Schultze-Galmen et al., 1995; Planchais et al., 1997). Z předchozího textu je patrné, že role fosforylace/defosforylace v regulaci rostlinného buněčného cyklu je nejasná. Pro podhalení působení neznámé fosfatázy, zodpovědné za aktivační defosforylací, vnesl Bell se spolupracovníky (1993) gen *cdc25* ze *Schizosaccharomyces pombe* do rostlin *Nicotiana tabacum*. Stručnému popisu transformanta, který zároveň tvoří experimentální materiál použitý v mé práci, je věnována následující kapitola.

1.2.2. Charakteristika tabáku (*Nicotiana tabacum*) s vneseným genem *cdc25* ze *S. pombe*

Bell a spolupracovníci (1993) zjistili, že exprese genu pro fosfatázu *cdc25* u sedmi nezávisle transformovaných linií vyvolala komplexní vývojové změny, přičemž změnou nejvýraznější bylo urychlení nástupu kvetení. Z následného studia organogeneze *de novo* (Suchomelová et al., 2004) vyplynulo že transformovaný rostlinný materiál se chová jako po ošetření cytokininy. K zvýšení hladiny cytokininů však u transformantů nedošlo (Suchomelová-Mašková et al., 2008). Tento jev byl proto nazván cytokinin-like efekt. Výsledky na suspenzních buněčných kulturách potvrdily stejný trend. Buňky exprimující gen *cdc25* měly podobný tvar a srovnatelné množství zásobního sacharidu škrobu jako kontrola ošetřená cytokininem (Suchomelová-Mašková et al., 2008). Rovněž i již zmíněné ovlivnění kvetení (Bell et al., 1993; Smoloňová, 2003; Vojvodová, 2005; Teichmannová et al., 2007), lze dát do souvislosti s cytokininy. V souladu s cytokinin-like efektem je i pozorovaná redukce kořenového systému u transformantů a jejich změněné chování oproti kontrolním rostlinám při kultivaci ve tmě (Smoloňová, 2003; Čiháková, 2009).

2. Materiál a metody

2.1. Rostlinný materiál

Jako experimentální materiál jsem používala rostliny *Nicotiana tabacum* L., cv. Samsun - kontrolní variantu K a linie A a C nezávisle transformované *cdc25* (cDNA) ze *Schizosaccharomyces pombe* pod kontrolou 35S CaMV promotoru (Bell et al. 1993). Dále jsem používala rostliny *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. cv. Columbia - kontrolní variantu a linii transformovanou rovněž *cdc25* (cDNA) ze *Schizosaccharomyces pombe* pod kontrolou upraveného 35S CaMV promotoru *BTX* (Spadafora et al., 2012). Původní semena kontrolní i transformovaných variant byly v obou případech poskytnuty Dr. Dennisem Francisem, Cardiff University, Velká Británie.

2.2. Kultivace rostlin *in vivo*

2.2.1. Kultivace tabáku

Rostliny tabáku jsem pěstovala v experimentálním skleníku Katedry experimentální biologie rostlin, PřF UK, Viničná 5. Rostliny jsem vysévala do květináčků o průměru 9 cm obsahujících propařenou zeminu (Papinův hrnec, 1 hod) a drenáž tvořenou perlitem (EP AGRO). Po třech týdnech byly rostliny přesazeny do truhlíků o rozměru 16 x 48 cm a následně po dvou týdnech rozsazeny po jedné do květináčů o průměru 16 cm.

2.2.2. Kultivace *Arabidopsis*

Z důvodu snížení pravděpodobnosti kontaminace v průběhu dlouhodobých experimentů jsem semena rostlin sterilizovala stejným postupem jako semena určená k výsevu *in vitro* (viz kap. 2.4.2.1). Po výsevu proběhla třídní stratifikace semen ve 4 °C. Semena jsem následně pomocí pipety vysela do hydratovaných rašelinových tablet (Jiffy 7). Rostliny jsem pěstovala v závislosti na typu experimentu v kultivační místnosti s fotoperiodou 16 hodin, teplotou 21-22 °C a osvětlením 4200 luxů nebo v kultivačním boxu s fotoperiodou 8 hodin, teplotou 21 °C a osvětlením 4000 luxů. Rostliny jsem zalévala směsí destilované a odstáté vodovodní vody (1:1) a vzhledem k nízkému obsahu živin v rašelinových tabletách jednou za tři týdny i živným roztokem (**tab. 2.1**).

zásobní roztok MS	ml/l výsledného roztoku
A	12,50
B	1,25
C	0,50

Tab. 2.1: Složení živného roztoku pro dlouhodobé pěstování rostlin v rašelinových tabletách [složení zásobních roztoků MS média (Murashige a Skoog, 1962) viz kap. 2.4.1.1]

2.3. Zpracování a hodnocení materiálu z kultur *in vivo*

2.3.1. Odběr rostlinného materiálu (tabák)

Vzorky z rostlin tabáku jsem vždy odebírala ve fázi vývoje, která byla při předchozí práci s daným materiálem Martinou Smoloňovou a Petrou Vojvodovou stanovena jako vegetativní. Hodnocení probíhalo na základě počtu vytvořených listů delších než 10 cm (podle Gebhardt a McDaniel, 1991).

Pro extrakci sacharidů ze vzrostných vrcholů a rovněž pro stanovení exprese vybraných genů jsem z rostlin odebírala vzrostné vrcholy o váze 0,02 g (**obr. 2.1**; neporušený apikální meristém, základy listů a pletiva stonku). Vzorky byly ihned zmrazeny a skladovány při -80°C. O odebírání vzorků floémové tekutiny je blíže pojednáno v následujícím textu.



Obrázek 2.1:
Vzrostný vrchol
tabáku
(měřítko v mm)

2.3.1.1. Jímání floémového exudátu

Metodiku jímání exudátu dekapitovaných rostlin jsem převzala od Petry Vojvodové, která vycházela z postupu Lejeune a spolupracovníků (1991) a v průběhu svého studia na PřF UK ji optimalizovala konkrétně pro tabák. Vzhledem k časové náročnosti související s problematikou uchycení nádob na jímání exudátu u mladých rostlin tabáku (jejichž internodia jsou velmi krátká), vyžadoval samotný sběr materiálu spolupráci dvou lidí.

Pro jímání exudátu jsem připravila roztok 20mM EDTA o pH 7,5, který byl zpevněn 0,2% agarózou. Po přidání agarózy bylo médium rozvařeno v mikrovlnné troubě. Médium jsem po dobu práce udržovala v takových podmínkách, aby bylo vychladlé ale nezačalo tuhnout. Vzhledem k časové náročnosti experimentu bylo v jeho průběhu několikrát nutno médium znovu rozvařit, počkat až vychladne a pokračovat v práci.

U rostlin byla odříznuta vrcholová část prýtu zahrnující vzrostný vrchol i s určitým počtem mladých listů. Řez byl veden tak, aby byla vždy odstraněna část prýtu se stejným počtem listů. Po odříznutí vrcholové části prýtu jsem okamžitě na řez nanasla kapku výše

popsaného média. Poté jsem na obvod stonku pod řezem nanasla bezvodého lanolinu a nasadila mikrozkuhavku s uřízlou spodní částí a rovněž s uřízlým víčkem. Na okraj vzniklý uříznutím spodní části mikrozkuhavky byl předtím rovněž nanesen bezvodý lanolin. Mikrozkuhavku jsem na prýtu zafixovala pruhy parafilmu tak, aby nehrozilo následné podtečení média. Po připipetování 0,5 ml média do mikrozkuhavky, jsem na ní označila výši hladiny, aby bylo možno na konci experimentu eliminovat rostliny, u nichž došlo k podtečení média. Aby nedocházelo k odpařování vody z média, byla otevřená horní část mikrozkuhavky zakryta dvěma vrstvami parafilmu. Popsané uspořádání je na **obrázku 2.2**.



Obrázek 2.2: Experimentální uspořádání při jímání floémového exudátu

Při nasazování mikrozkuhovek jsem vždy střídavě brala rostliny od všech tří variant, aby výsledky nebyly zkresleny, neboť v průběhu dne dochází ke kolísání hladiny sacharidů ve floému (samotné nasazování trvalo v závislosti na množství rostlin okolo šesti hodin). Rovněž z toho důvodu jsem od Petry Vojvodové převzala 24h dobu jímání exudátů (počítáno pro každý vzorek samostatně). Po tomto čase jsem médium s najímanou floémovou šťávou opatrně přenesla do nové mikrozkuhavky s propíchnutým víčkem a nechala zmrazit v tekutém dusíku. Vzorky byly skladovány při -80°C .

Vzhledem k velkému rozptylu hodnot sacharidů v jednotlivých vzorcích (kap. 3.1.1) a vzhledem k velkým ztrátám vlivem podtečení jsem zkusila porovnat 24h a 4h dobu jímání.

Čtyři hodiny byly dostatečné pro hořčici (Lejeune et al., 1993). Ukázalo se však, že v případě tabáku je po čtyřech hodinách hladina sacharidů ve vzorcích pod hladinou detekce námi používaného systému HPLC.

2.3.2. Analýza obsahu rozpustných nestrukturních sacharidů

2.3.2.1. Extrakce sacharidů ze sušiny vzrostných vrcholů

Sacharidy jsem ze vzorků extrahovala následujícím postupem:

- 1) lyofilizace zmražených vzorků v přístroji Lyovac GT 2 (Finn-Aqua); 24 hodin
- 2) sloučení sušiny vzrostných vrcholů vždy po čtyřech (aby se výsledná hmotnost pohybovala okolo 8 mg) do předem zvážených mikrozkušavek a následné zvážení sušiny na analytických vahách
- 3) inkubace vzorků s 0,5 ml 80% metanolu (v/v) při 75°C; 10 minut
- 4) odpaření methanolu ve vakuu (Speedvac Plus SC110A, Savant); 2,5 hodiny
- 5) přidání 150 µl demineralizované vody (MilliQ) ke každému vzorku
- 6) ultrazvuková lázeň (Julabo USR 05); 15 minut
- 7) centrifugace (Eppendorf Centrifuge 5415 D) při 14 000 rcf; 10 minut
- 8) odběr supernatantu injekční jehlou do čistých mikrozkušavek
- 9) zmrazení vzorků při teplotě -18°C.

2.3.2.2. Extrakce sacharidů z média s floémovou šťávou

Při dělení sacharidů z floémového exudátu na použitém systému HPLC docházelo k interferenci s EDTA. Použila jsem bazický ionex (Dowex) pro její odstranění ze vzorků (podle Lejeune et al., 1991). Zmíněné ošetření však nepřineslo plně uspokojivé výsledky, navíc použití iontoměniče vyžadovalo (kvůli minimálnímu použitelnému objemu) sloučit vždy 8 najímaných vzorků do jednoho. Problematiku jsem konzultovala s Doc. RNDr. Ivanem Jelínkem, CSc (katedra analytické chemie, PřF UK). Nejvhodnějším řešením se nakonec ukázalo použití určité kombinace kolony a předkolony. U kolony rozhodoval nejen typ (náplň s Pb^{2+} , nikoliv Ca^{2+} ionty), ale i nespécifikované parametry konkrétní kolony a její stáří. U předkolony se výsledky rovněž výrazně lišily podle použitého kusu. Vhodně zvolenou kombinací jsem docílila menší odezvy EDTA a zároveň posunutí jejího retenčního času mimo retenční časy sledovaných sacharidů.

Sacharidy jsem ze vzorků extrahovala pozměněným výše popsaným postupem (2.3.2.1). Pro přehlednost raději uvádím celý postup, nikoliv pouze odlišné body. Každý vzorek byl zpracováván ve třech mikrozkuvkách (dále značeny A, B, C):

- 1) inkubace vzorků s 0,5 ml 100% methanolu (v/v) při 75°C; 10 minut
- 2) centrifugace (Eppendorf Centrifuge 5415 D) při 14 000 rcf; 10 minut
- 3) přepipetování supernatantu do nových mikrozkuvek (B), jejich uložení do lednice (z důvodu ztuhnutí případné agarózy).
- 4) přidání 0,5 ml 80% methanolu (v/v) ke zbytku média v původních mikrozkuvkách (A), inkubace vzorků při 75°C; 10 minut
- 5) centrifugace (Eppendorf Centrifuge 5415 D) při 14 000 rcf; 10 minut
- 6) přidání supernatantu do mikrozkuvek (B) s vychlazeným předchozím supernatantem, jejich vrácení opět do lednice
- 7) centrifugace roztoku v mikrozkuvkách B (Eppendorf Centrifuge 5415 D) při 14 000 rcf; 10 minut
- 8) přepipetování supernatantu do nových mikrozkuvek (C)
- 9) odpaření metanolu z mikrozkuvek (C) ve vakuu (Speedvac Plus SC110A, Savant); 5-6 hodin
- 10) přidání 200 µl demineralizované vody (MilliQ) ke každému vzorku
- 11) ultrazvuková lázeň (Julabo USR 05); 15 minut
- 12) centrifugace (Eppendorf Centrifuge 5415 D) při 14 000 rcf; 10 minut
- 13) odběr supernatantu injekční jehlou do čistých mikrozkuvek
- 14) zmrazení vzorků při teplotě -18°C.

2.3.2.3. Stanovení obsahu a spektra sacharidů

Sacharidy ve vzorcích jsem stanovovala pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC). Parametry měřicího systému byly následující: refraktometrická detekce (Shodex RI-71); isokratická pumpa Spektra Physics; integrace: počítačový program CSW 1.7; teplota 80°C; předkolonky Hema-Bio 1000 SB+Q (Watrex); kolona polymer IEX 8 µm Pb²⁺ (Watrex); eluent: demineralizovaná voda (MilliQ), rychlost průtoku 0,5 ml. min⁻¹; objem injikovaného vzorku: 10 µl; standardy: Sigma.

Ve vzorcích obsahujících floémový exudát se vedle sacharózy vyskytovala i glukóza a fruktóza, přičemž jejich zastoupení bylo velmi variabilní. Vzhledem k tomu, že tabák je rostlina transportující sacharidy výhradně ve formě sacharózy (Hocking, 1980), jsou nalezené hexózy s největší pravděpodobností jejími štěpnými produkty. Zvýšené množství

hexos ve floémovém exudátu *Arabidopsis* pozorovali také Corbesier se spolupracovníky (1998) při jímání stejnou metodou. Pomocí radioaktivně značené sacharózy dospěli k závěru, že detekované hexózy skutečně pocházejí ze štěpení sacharózy v průběhu sběru vzorků. Z toho důvodu jsem, stejně jako zmínění autoři, stanovovala jen celkovou hmotnost sacharidů (štěpením sacharózy nepozměněno) nikoliv jejich spektrum.

2.3.3. Stanovení exprese vybraných genů

Sledovala jsem expresi čtyř genů, které se exprimují v oblasti apikálního meristému a hrají úlohu v regulaci kvetení (*CET2/TFL1*, *FD*, *SOC1* a *NFL1/LFY*). Vedle těchto genů byla rovněž stanovena exprese genu *WUS*, charakteristického pro centrální oblast meristému (Xie et al., 2009), a genu *ef1a*, který se exprimuje ve všech pletivech (Dvořáková, 2009).

Vzhledem k tomu, že odebírané vzorky kromě samotného meristému obsahovaly také další pletiva (viz kapitola 2.3.1), lze očekávat variabilitu výsledných hodnot. Z toho důvodu jsem provedla pět (*SOC1*, *NFL1/LFY*) až šest (*CET2/TFL1*, *FD*, *WUS*, *ef1a*) nezávislých stanovení exprese testovaných genů (samostatně izolovaná RNA). Materiál jsem odebírala z rostlin vypěstovaných ze třech nezávislých souborů tak, že byla provedena vždy dvě stanovení z různých rostlin jednoho souboru (souborem jsou tu míněny rostliny vypěstované za stejných podmínek ze stejného výsevu semen, jak bylo popsáno v kapitole 2.2.1).

2.3.3.1. Izolace RNA

Při izolaci RNA ze vzrostných vrcholů tabáku jsem používala komerční kit RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN). Zmražené vzrostné vrcholy jsem vždy po třech od téže varianty (výsledná hmotnost přibližně 0,06 g) pečlivě zhomogenizovala ve vychlazené třecí misce naplněné tekutým dusíkem. Dále jsem postupovala přesně podle návodu dodaného s kitem. Získanou RNA jsem nakonec rozpustila ve 30 μ l sterilní destilované vody. Koncentrace rozpuštěné RNA jsem stanovovala pomocí spektrofotometru Thermo Spectronics (BioMate 5) v 1 cm kyvetě křemenného skla skenováním v rozmezí vlnových délek 200-300nm (při 260 nm koncentrace RNA, při 280 nm míra znečištění vzorku proteiny). Koncentrace RNA byla spočtena podle vztahu: $c = (40 \times A_{260} \times \text{ředění vzorku})/1000$ [μ g/ μ l].

2.3.3.2. Přečištění RNA od případné DNA kontaminace

Roztok RNA jsem rozmrazovala jen na nezbytně dlouhou dobu a pracovala s ním vždy na ledu. Reakce probíhala ve sterilních mikrozkuvkách. K 1 μg RNA jsem přidala destilovanou sterilní vodu do získání celkového objemu 7,5 μl . Dále reakční směs obsahovala 1 μl reakčního pufru s MgCl_2 , 0,5 μl inhibitoru RNáz (RiboLock Ribonuclease inhibitor) a 1 μl DNázy I (vše firma Fermentas). Štěpení DNA probíhalo 30 minut při 37 °C. Následně jsem kvůli inhibici DNázy k reakční směsi přidala 1 μl 25mM EDTA a nechala směs inkubovat 10 minut při 65 °C. Získaný roztok RNA jsem použila pro následující krok.

2.3.3.3. Reverzní transkripce

V mikrozkuvce jsem připravila směs 6,5 μl sterilní destilované vody, 5 μl roztoku RNA očištěné od DNA kontaminace a 1 μl oligo-T primeru (10 μM , 23 nukleotidů). Směs byla inkubována 5 minut při 70 °C. Následně k ní byly přidány 4 μl M-MuLV RT pufru, 2 μl dNTPs (10mM) a 0,5 μl inhibitoru RNáz. Reakci jsem nechala inkubovat 5 minut při 41 °C. Poté jsem k reakční směsi přidala 1 μl reverzní transkriptázy (M-MuLV RT, Fermentas) a směs nechala inkubovat 60 minut při 42 °C a následně 10 minut při 70 °C.

2.3.3.4. Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Použila jsem semikvantitativní PCR, která umožňuje porovnání míry exprese mezi sledovanými vzorky. PCR má za cíl namnožení vybraného úseku DNA pomocí termostabilní DNA polymerázy a zahrnuje v sobě kromě počáteční denaturace tři cyklicky se opakující procesy: denaturace, nasedání primerů a polymerace. Počet cyklů jsem pro každý gen volila individuálně. Schéma PCR s časováním kroků a teplotami je v tabulce 2.2. Pro PCR jsem připravovala reakční směs, jejíž obecné složení je v tabulce 2.3. Reakce probíhala v termocykleru PTC-200 (MJ Research) nebo v T100™ Thermal Cycler.

Tab. 2.2: Program amplifikace DNA pomocí PCR

Program	Teplota	Čas
1. Počáteční denaturace	94 °C	3 min
2. denaturace	94 °C	30 s
3. Nasedání primeru	55-60 °C*	30-45 s
4. Polymerace	72 °C	20 s**
5. Chlazení	4 °C	∞

*teplota závisí na délce primeru a na obsahu CG bazí

**rychlost polymerace 1000 bp / min

Tab 2.3: Složení obecné reakční směsi pro PCR

složka	objem [μl]
destilovaná voda	20,2
Taq pufr s (NH ₄) ₂ SO ₄	3
MgCl ₂	1,8
dNTPs	0,6
primer přímý (F)	1
primer zpětný (R)	1
cDNA	2
Taq polymeráza	0,5

V mé práci byly použity primery pro tabákové homology následujících genů *WUS*, *TFL1*, *LFY*, *SOCI* a *FD*. U zavedených názvů pro tabákové homology používám pro větší přehlednost v následujícím textu lomený zápis názvu (název homologu / název genu u *Arabidopsis*). Primery pro *NFL1/LFY*, *CET2/TFL1* a *NtWUS* byly navrženy Petrou Vojvodou a Lukášem Fischerem. Primery pro *NtSOCI* a *NtFD* byly navrženy Lukášem Fischerem ve spolupráci se mnou. Pro navržení primerů *NFL1/LFY* a *CET2/TFL1* byly využity známé sekvence z tabáku - U15798 pro *NFL1/LFY* (Kelly et al., 1995) a AF145260 pro *CET2/TFL1* (Amaya et al., 1999). Primery pro *NtWUS* byly navrženy na základě sekvence *WUS* u rajčete (NM_001247086; Reinhardt et al., 2003).

Homolog *SOCI* v *Nicotiana tabacum* byl vyhledán podle sekvence *ArathSOCI* (NM_13012) v programu tBlastx (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) v knihovně NCBI v databázi „Nucleotide collection“ organismu *Nicotiana tabacum* beze změny přednastavených parametrů. Dříve publikovaná studie zabývající se *SOCI* v *Nicotiana tabacum* sice našla příslušný homolog, ale uvedené primery na námi zjištěný gen neseď (Sequence Extractor; <https://www.bioinformatics.org/seqext/>). Příslušnou sekvenci *NtSOCI* navíc nelze najít pod tímto označením v databázi Pubmed.

Homolog *FD* v *Nicotiana tabacum* byl vyhledán podle sekvence *Solanum lycopersicum self-pruning G-box protein (SPGB)* (EF136919 a SGN-U564495), který byl již dříve identifikován jako homolog *FD* v *Solanum lycopersicum* (Pnueli et al., 2001; Abe et al., 2005). K vyhledání byl nejprve použit program tBlastx (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) a databáze Expressed Sequence Tags (EST) organismu *Nicotiana tabacum* beze změny ostatních přednastavených parametrů. Podobnost nalezeného záznamu FS400536 s SPGB (EF136919) a *FD* z *Arabidopsis thaliana*

(NM_119756) byla kontrolována v programu ClustalW (<http://www.genome.jp/tools/clustalw/>).

Ke kontrole množství získané cDNA byl použit gen kódující elongační faktor e1 α , jehož primery jsem obdržela od Lenky Dvořákové (Dvořáková, 2009). Sekvence všech primerů, se kterými jsem pracovala, je v tabulce 2.4.

Tab. 2.4: Sekvence použitých primerů

jméno primeru	sekvence ve směru 5' - 3'
WUS F	AGT TAG GTC TCC AAC TGC TG
WUS R	AGT TCC ATA ACC ATA GTT TCC A
CET2/TFL1 F	GAT CCA TAT CTC AGG GAA CAC
CET2/TFL1 R	GGA GAG AGG TGC AGT CAA TAC
FD F	TCC TGC TGT TAC TGT GCT GAC
FD R	CTT GAT CGA GCA GCA GAC TCA
SOC1 F	TCT CCA AGA GGA AAG CTC TAT G
SOC1 R	TTT CGT GCT CGG ATG GTA CTG
NFL/LFY F	GAA CGA CAT GGG AAG TGG TG
NFL/LFY R	AAG GAT GCT CCC TTT GCC TC
EF1F	TAC TGC ACT GTG ATT GAT GCC
EF1R	AGC AAA TCA TTT GCT TGA CAC C

2.3.3.5. Elektroforéza a vizualizace DNA

Používala jsem 1,2% agarózový gel v 0,5x TAE puftru. 0,5x TAE pufr jsem připravovala ze zásobního roztoku 50x TAE (složení na 1 litr: 242 g Tris, 57,1 ml kyseliny octové, 100 ml 0,5M EDTA; pH 8,0). Pro vizualizaci DNA jsem přidávala GelRed (Biotium) o koncentraci 1 μ l / 10 ml gelu. Gel jsem za horka rozlila do forem k tomu určených a opatřila hřebeny pro tvorbu jamek na nanášení vzorků. Vzorky DNA jsem do jamek nanášela smíchané 10:3 s roztokem BPB (0,03% bromfenolová modř, 60mM EDTA, 10mM Tris-HCl (pH 7,6), 60% glycerol). Tento roztok byl přidáván pro vizualizaci pohybu vzorků a rovněž pro zvýšení hustoty. Elektroforéza probíhala ve vaničce s pufrem 0,5x TAE při stejnosměrném proudu a napětí 50 V. Pro odečet délek jsem používala marker 100-3000 bp (GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder; Fermentas). Gel jsem dokumentovala pomocí UV transiluminátoru (G:BOX, Syngene), program GeneSnap (Syngene).

2.3.4. Stanovení doby potřebné k nástupu kvetení (*Arabidopsis*)

Z důvodu možné rozdílné rychlosti růstu stonku kontroly a transformanta, jsem hodnotila rostliny pod binolupou (Krüss, MSZ 5400 Stereo Zoom Microscop; zvětšení 10 x). Všechny rostliny jsem prohlédla 1x týdně a zaznamenala počet těch s právě vytvořenými poupaty (obr. 2.3).



Obrázek 2.3: Postupná tvorba květních pupat *Arabidopsis thaliana* (A -rostlina vyhodnocena jako nekvetoucí; B – poupata rozeznatelná pod binolupou; C- makroskopicky rozeznatelná poupata; měřítko 1 mm (fotografie pořízeny fotoaparátém Canon EOS 60D s binolupou Olympus SZ X7)

2.3.5. Detekce invertázy na řezech tabáku

Kyselá invertáza je vizualizovaná díky přítomnosti modře zbarveného formazanu, který vzniká sledem následujících reakcí (Wittich et Vreugdenhil, 1998; Sergeeva et Vreugdenhil, 2002):

- 1) sacharóza → glukóza + fruktóza (enzym: invertáza)
- 2) glukóza + O₂ + H₂O → kyselina gluonová + H₂O₂ (enzym: glukózaoxidáza)
- 3) H₂O₂ + PMS → O₂ + H₂O + PMSH
- 4) PMSH + NBT → formazan

Pro detekci invertázy v pletivech tabáku ve vegetativní fázi jsem žiletkou nařezala podélné řezy meristémem a příčné řezy řapíku (nejmladšího listu s jasně oddělenou čepelí a řapíkem). Vzorky jsem nechala fixovat hodinu při 4 °C v roztoku 2% formaldehydu, 2% PVP-40 a 0,005M DTT (pH 7,0). Fixované vzorky jsem následně v průběhu 20 hodin propláchla 10x demineralizovanou vodou (při 4 °C). Poté jsem je nechala inkubovat v reakční směsi sestávající z NBT (0,24 mg/ml), PMS (0,14 mg/ml), glukózaoxidázy (25 U/ml) a sacharózy 10 mg/ml) při 36 °C. Všechny složky byly předem rozpuštěny ve fosfátovém pufru (pH 6,0). V kontrolní variantě byla sacharóza nahrazena pufrém. Inkubace trvala do vzniku viditelného modrého zbarvení (Wittich et Vreugdenhil, 1998; Sergeeva et Vreugdenhil, 2002).

2.4. Kultivace rostlin *in vitro*

2.4.1. Kultivační média

2.4.1.1. MS médium (Murashige a Skoog, 1962)

Složky média jsem připravovala formou zásobních roztoků (**tab. 2.5**). Dále jsem do média přidala 1% sacharózu a agar (0,8% nebo 1,3%, bude specifikováno u konkrétních experimentů).

Tab. 2.5: Složení zásobních roztoků kultivačního média MS

zásobní roztok	komponenty zásobního roztoku	navážka na objem 500 ml zásobního roztoku [g]	zásobní roztok na litr média [ml]	koncentrace v médiu [mg.l^{-1}]
A	KNO_3	19	50	1 900
	NH_4NO_3	16,5		1 650
	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	4,4		440
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	3,7		370
	KH_2PO_4	1,7		170
B	$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	2,23	5	22,3
	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,86		8,6
	H_3BO_3	0,62		6,2
	KI	0,083		0,83
	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,025		0,25
	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,0025		0,025
	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,0025		0,025
C	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2,78	5	27,8
	$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	3,73		37,25
D	myo-inozitol	10	5	100
	kys. nikotinová	0,05		0,5
	pyridoxin - HCl	0,05		0,5
	thiamin - HCl	0,05		0,5
	Glycin	0,2		2

Zásobní roztoky A, B a C byly skladovány v lednici při 6 °C. Roztok D jsem uchovávala v mrazicím boxu při -18 °C. Zásobní roztok C byl připravován následovně: každá z obou složek byla rozpuštěna zvlášť v destilované vodě a zahřála na cca 80 °C, poté jsem oba roztoky za stálého míchání spojila a nechala vychladnout. Zchladlý roztok jsem doplnila na finální objem. Tento postup je nutný pro dosažení stability vznikající komplexní sloučeniny.

2.4.1.2. Gamborgovo médium B5 (Gamborg et al., 1968)

Složky média jsem připravovala formou zásobních roztoků (**tab. 2.6**). Dále médium vždy obsahovalo 2% glukózu, MES 0,5g/l a 0,8% agar.

Tab. 2.6: Složení zásobních roztoků kultivačního média Gamborg B5

zásobní roztok	komponenty zásobního roztoku	navážka na objem 500 ml zásobního roztoku [g]	objem zásobního roztoku na 1 l média [ml]	finální koncentrace v médiu (mg.l^{-1})
A	KNO_3	25	50	2500
	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,5		150
	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2,5		250
	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	1,5		150
	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1,34		134
B	$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1,32	5	13,2
	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,2		2
	H_3BO_3	0,3		3
	KI	0,075		0,75
	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,0025		0,025
	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,025		0,25
	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,0025		0,025
C	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2,78	2,5	27,8
	$\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	3,73		37,25
D	myo-inozitol	10	5	100
	kys. nikotinová	0,1		1
	pyridoxin - HCl	0,1		1
	thiamin - HCl	1		10

Zásobní roztoky A, B a C byly skladovány v lednici při 6 °C. Roztok D jsem uchovávala v mrazicím boxu při -18 °C. Zásobní roztok C byl připravován stejným postupem jako v případě MS média.

Médium Gamborg B5 s přísádky fytohormonů jsem používala pro organogenní experimenty s *Arabidopsis thaliana* (Valvekens et al., 1988; Che et al., 2006; Sugiyama a Imamura, 2006). Zastoupení fytohormonů se lišilo v závislosti na typu média (indukující tvorbu kalusu - „CIM“ / indukující tvorbu prýtlů - „SIM“ / indukující tvorbu kořenů - „RIM“), složení pro konkrétní typy je uvedeno v **tabulce 2.7**. Testovala jsem odezvu rostlinného materiálu na různý poměr auxinů a cytokininů, proto jsem volila různé koncentrace iP, v případě zbylých fytohormonů jsem se držela citované literatury. V textu

používám značení jednotlivých typů SIM podle použité koncentrace iP (čili „1“, „0,5“, „0,25“, „0,1“, viz **tabulka 2.7**).

Původ chemikálií: IBA, IAA, kinetin - Lachema Neratovice čistota p.a.; iP a 2,4-D - Sigma Aldrich.

Tab. 2.7: Fytohormony konkrétních typů média pro organogenezi *de novo*

fytohormony	CIM [mg.l ⁻¹]	SIM [mg.l ⁻¹]	RIM [mg.l ⁻¹]
IAA		0,15	
2,4-D	0,5		
iP		1 / 0,5 / 0,25 / 0,1	
Kinetin	0,1		
IBA			0,5

2.4.1.3. Příprava médií

Všechny složky kromě agaru/fytagelu jsem přidala do destilované vody a po rozpuštění jsem objem doplnila na požadovanou hodnotu. Po doplnění na požadovaný objem jsem upravila pH na hodnotu $5,7 \pm 0,01$ přidávkem 1M NaOH, respektive 1M HCl. Po přidání agaru bylo médium sterilizováno v autoklávu (Tuttnauer 2540EK-N) po dobu 20 minut při teplotě 121°C a tlaku 0,144 MPa. Následně jsem médium rozlila do plastových Petriho misek (průměr 9 cm).

2.4.2. Kultivace

2.4.2.1. Dezinfekce semen

Semena *Arabidopsis* jsem odsypala do mikrozkmavek, přidala 10% SAVO a nechala třepat na třepačce 5 minut. Po odpipetování roztoku jsem přidala roztok ethanolu a SAVA (ethanol, voda a SAVO v poměru 7:2:1). Po 5 minutách třepání jsem semena v mikrozkmavce v laminárním flow-boxu 3x propláchla sterilní vodou a poté dala stratifikovat do 4 °C.

2.4.2.2. Kultivace rostlin na Petriho miskách

Semena *Arabidopsis* jsem pomocí pipety sterilně vysela na médium v takových rozestupech, aby si rostliny při budoucím růstu nepřekážely. Petriho misky jsem uzavřela parafilmem a umístila do kultivační místnosti (24 °C, fotoperioda 16 hodin, osvětlení 2800 luxů) tak, aby byly pod úhlem přibližně 70 až 80 stupňů a tudíž mohly kořeny růst po

povrchu média. Takto byly kultivované rostliny pro charakterizaci kořenového systému a rostliny pro následné organogenní experimenty.

V případě jednoho opakování experimentu zaměřeného na určení doby potřebné k vykvetení (kapitola 2.3.4.) byly rostliny kultivovány na horizontálně uložených miskách. Po deseti dnech jsem rostliny převedla do podmínek *ex vitro* a dále s nimi nakládala, jak je uvedeno v kapitole 2.2.2.

Pro organogenní experimenty jsem ze sedmidenních rostlin pěstovaných na MS médiu vyřezala 0,5 cm dlouhé segmenty hypokotylů a hlavních kořenů (měřeno 2 mm od kořenové špičky z důvodu minimalizace přítomnosti postranních kořenů a jejich primordií). Kořenové explantáty jsem zkontrolovala pod binolupou a vyřadila případné segmenty s postranním kořenem či detekovatelným primordiem (četnost do 4 %). Segmenty byly kultivovány 4 dny na CIM a následně jsem je přenesla na RIM / Gamborgovo médium neobsahující fytohormony / některou z variant SIM. Jedinou netestovanou kombinací byly kořenové segmenty na RIM. Na každé kombinaci byl testován soubor minimálně 30 segmentů od kontroly i od transformanta.

Pro lepší možnost porovnání organogenní odpovědi bylo vždy na jedné Petriho misce kultivováno 10 segmentů z transformovaných rostlin a 10 segmentů z kontroly.

2.5. Hodnocení materiálu z kultur *in vitro*

Počet postranních a adventivních kořenů jsem počítala na 8 (nebo 11) dní starých rostlinách v Petriho miskách pomocí binolupy (zvětšení 45 x). Délku kořenů *Arabidopsis* jsem hodnotila pomocí softwaru LUCIA (Laboratory Imaging, Praha) na naskenovaných Petriho miskách (Epson Expression 1680 Pro)

Explantáty z organogenních experimentů jsem fotograficky dokumentovala po 13 a 21 dnech kultivace (fotoaparát Canon EOS 60D s objektivem Canon Macro EF 100mm 1:2,8 L IS USM).

2.6. Zpracování dat

Základní početní operace při zpracování dat (průměr, směrodatná odchylka, apod.) byly provedeny v programech Microsoft Excel for Windows 2000 a Microsoft Office Excel 2007. Ke statistickému zhodnocení dat byl použit program NCSS 2001 a R 2.9.1. (R Development Core Team 2009).

V případě souboru dat se dvěma nezávislými výběry byly rozdíly v datech s normálním rozdělením hodnoceny na základě výsledku dvouvýběrového t-testu. V případě

dat, která neměla normální rozložení, byly rozdíly hodnoceny na základě výsledku Wilcoxonova testu (Wilcoxon 1945). V případě souboru dat s více nezávislými výběry byla pro data s normálním rozdělením použita ANOVA následovaná Tukey-Kramerovým testem (Kramer 1956). Pro data, jejichž rozdělení nesplňovalo kritéria normality, byl použit Kruskal-Wallisův test (Kruskal et Wallis 1952) následovaný párovým porovnáním pomocí Mann-Whitney-Wilcoxonova testu s Bonferroniho korekcí (Mann et Whitney, 1947). Výsledky jsou uvedeny ve formě sloupcových výsečových nebo spojnicových grafů. V případě sloupcových grafů představují jednotlivé sloupce průměrnou hodnotu sledovaného parametru. Úsečky odpovídají směrodatným odchylkám, odlišná písmena značí statisticky průkazný rozdíl uvedených hodnot na hladině $\alpha=0,05$.

3. Experimentální část

3.1. Hladiny rozpustných nestrukturních sacharidů u tabáku

Na základě literárních údajů je zřejmé, že sacharidy figurují v regulaci nástupu kvetení. Z předchozích výsledků našeho týmu navíc vyplývá, že sacharidový metabolismus je u rostlin tabáku transformovaných genem *cdc25* ovlivněn a jednou z nejvýraznějších charakteristik transformantů je uspíšení kvetení. Na základě zmíněných výsledků byla zaměřena pozornost na obsah sacharidů v exudátu z dekapitovaných rostlin a rovněž obsah a spektrum sacharidů ve vzrostných vrcholech. Hladina rozpustných nestrukturních sacharidů byla stanovena u kontrolních rostlin *Nicotiana tabacum* a transformovaných linií A a C ve vegetativní fázi vývoje.

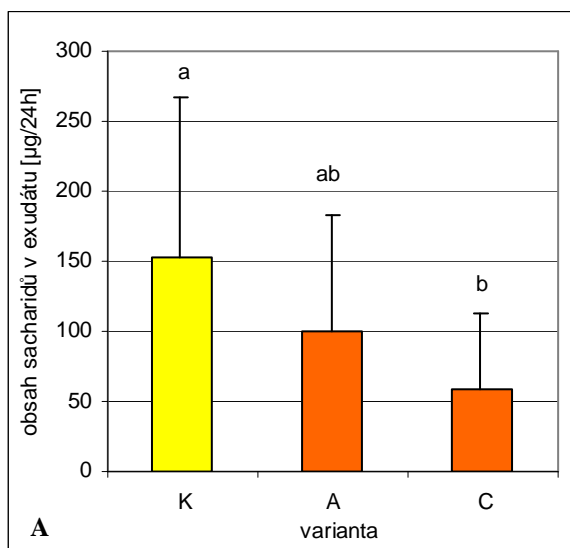
3.1.1. Obsah sacharidů v exudátu z dekapitovaných rostlin tabáku

Pro objasnění, zda pozorované změny v časování nástupu kvetení u transformantů (Smoloňová, 2003; Vojvodová, 2005) nemohou být zapříčiněny zvýšeným transportem sacharidů do apexu, byla u rostlin ve vegetativní fázi hodnocena hladina sacharidů v najímané floémové šťávě. Rostliny vhodné pro odběr byly v souladu s předchozími pracemi (Smoloňová, 2003; Vojvodová, 2005) hodnoceny na základě počtu vytvořených dospělých listů (= délka nad 10 cm). Pro jímání exudátu byly voleny rostliny se 3-4 dospělými listy. Tyto rostliny již měly dostatečně dlouhá internodia pro připevnění mikrozkumavky na jímání. Experiment byl proveden ve čtyřech opakováních, z nich byla kvůli technickým potížím měřicího systému HPLC vyhodnocena pouze tři opakování.

Výsledky jsou prezentovány ve sloupcových grafech, které vyjadřují celkový obsah sacharidů (**graf 1A-C**). Ve všech třech opakováních byla zjištěna značná variabilita v rámci každé varianty. Ve 2. a 3. opakování se celkový obsah sacharidů transportovaných do vzrostného vrcholu mezi variantami statisticky průkazně nelišil, nicméně u obou opakování byl pozorovatelný trend snížení hladiny sacharidů u transformantů (**graf 1B, 1C**). V 1. opakování (**graf 1A**) bylo zjištěno statisticky významné snížení hladiny sacharidů oproti kontrole u transformantu C, nikoliv však u transformantu A.

Z uvedených výsledků vyplývá, že u transformantů nebylo zjištěno zvýšení transportu sacharidů do apexu, ovšem kvůli velké variabilitě získaných dat nelze metodu jímání exudátů u tabáku brát jako spolehlivou. Přítomnost odlehklých vysokých hodnot (v prezentovaném typu grafu nevyznačeny) ukazuje na vysokou pravděpodobnost zasychání

floémového toku v průběhu 24h periody jímání. Zkrácení doby jímání se neukázalo jako vhodné řešení z důvodu získání velmi nízkého množství sacharidů (viz kap. 2.3.1.1).



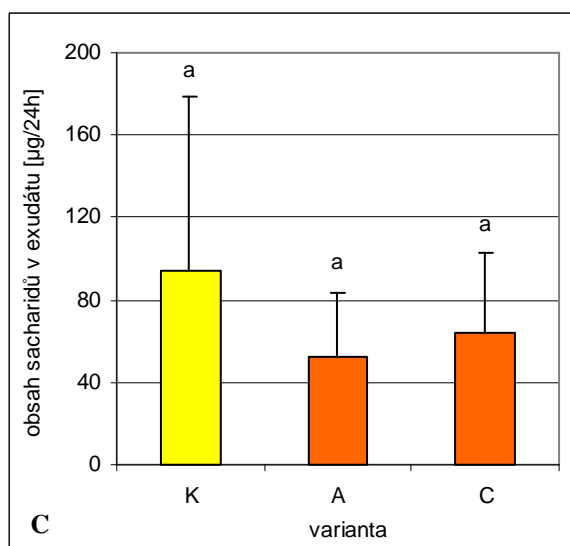
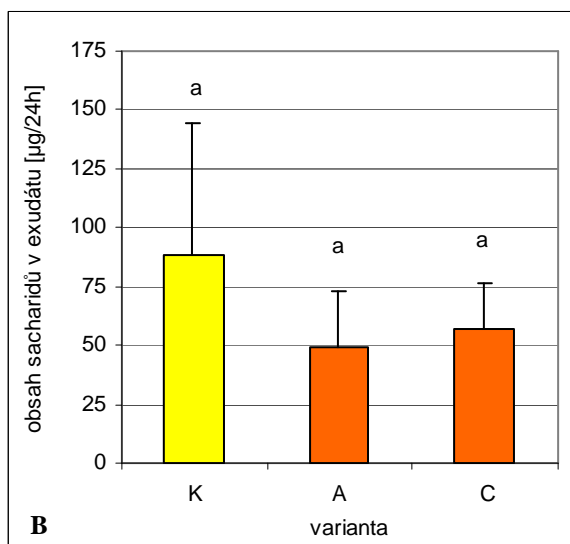
Graf 1A-C: Obsah endogenních sacharidů v exudátu z dekapitovaných rostlin;

A - 1. opakování, n=11-13;

B - 2. opakování, n=10-14;

C - 3. opakování, n=17-18;

K - kontrola, A - transformant A, C - transformant C; směrodatné odchylky jsou vyjádřeny úsečkami; odlišná písmena nad sloupci znamenají statisticky významný rozdíl, $\alpha=0,05$.



3.1.2. Obsah sacharidů ve vzrostných vrcholech tabáku

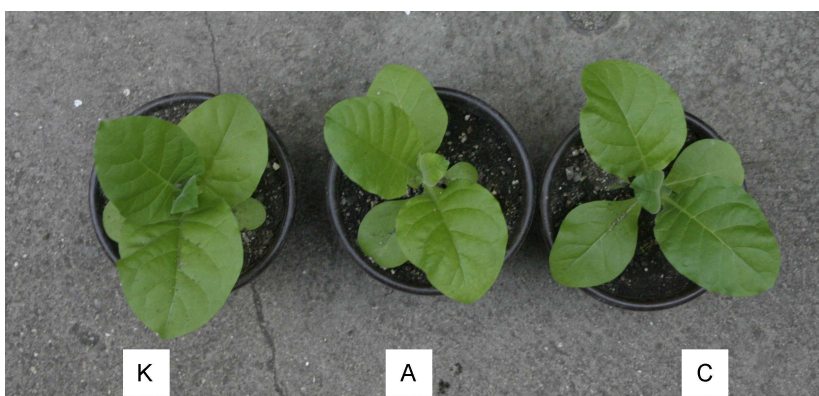
Z důvodu velké variability hodnot získaných na základě analýzy floémového exudátu byla následně stanovena hladina sacharidů i v samotném vzrostném vrcholu. Vedle celkového množství sacharidů bylo zjišťováno také jejich spektrum. Materiál byl odebrán z rostlin kontrolních a transformantů s 2-3 dospělými listy (**obr. 3.1**). Experiment byl proveden ve dvou opakováních (**graf 2A-E** pro první opakování a **3A-E** pro druhé opakování).

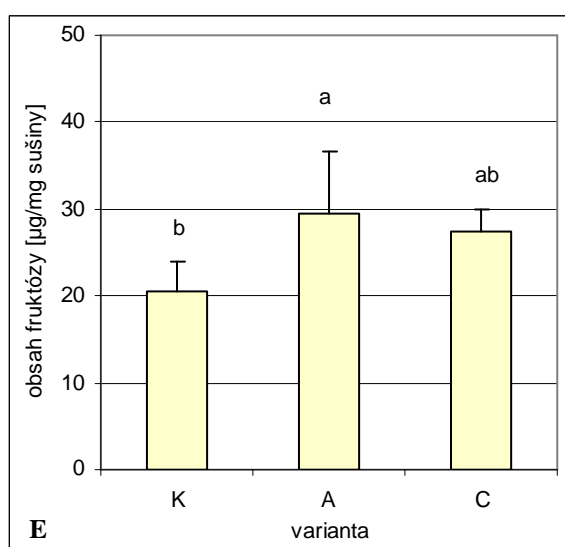
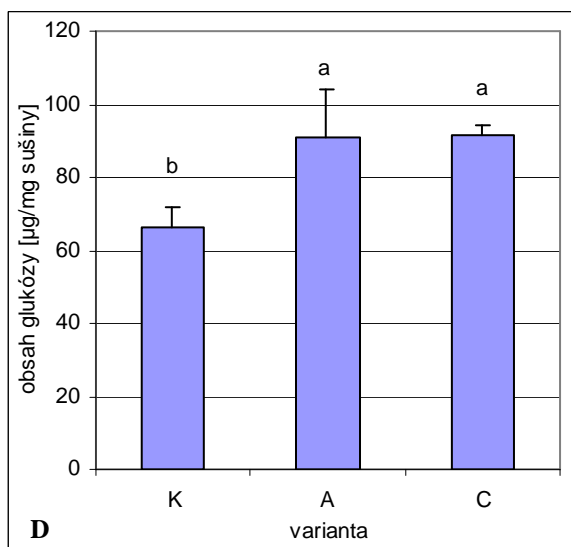
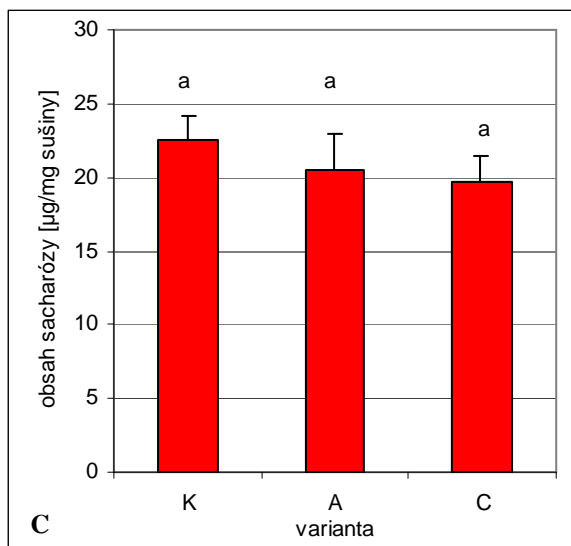
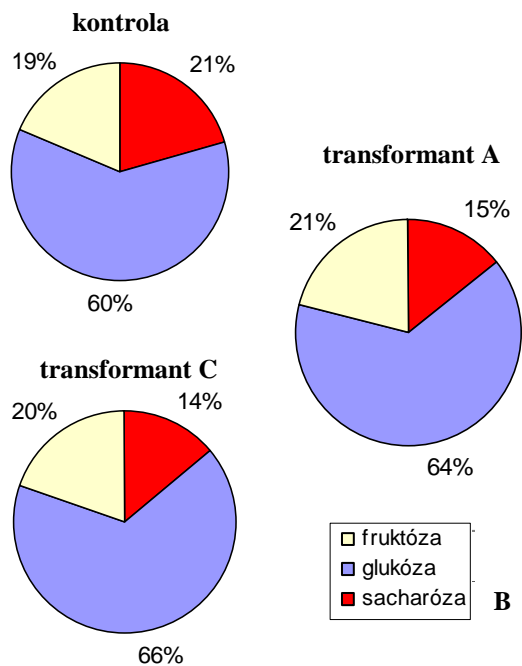
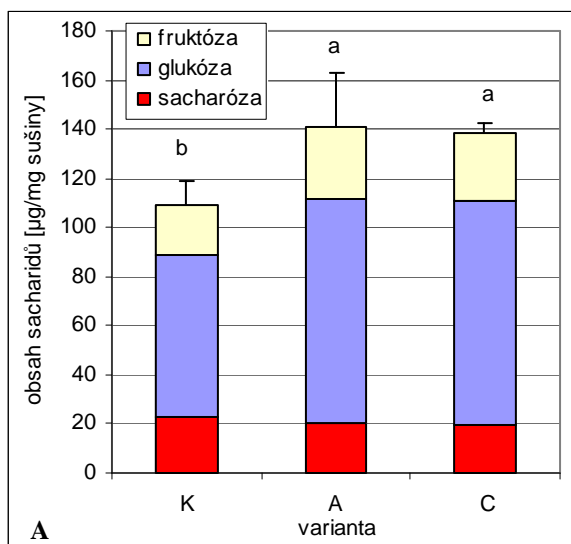
Výsledky jsou prezentovány ve dvou typech grafů: sloupcovém, vyjadřujícím obsah sacharidů, a výsečovém, vyjadřujícím procentuální zastoupení jednotlivých sacharidů. Celkový obsah sacharidů je znázorněn v **grafu 2A** a **3A**. Chybové úsečky zde znázorňují odchylky celkového obsahu sacharidů. Procentuální zastoupení jednotlivých sacharidů pro každou variantu je v **grafech 2B** a **3B**. **Grafy 2C-E** a **3C-E** znázorňují množství jednotlivých detekovaných sacharidů (sacharózy, glukózy a fruktózy).

Celková hladina sacharidů v apexu transformovaných rostlin byla statisticky vyšší v prvním opakování (**graf 2A**), ve druhém se výsledky mezi variantami nelišily (**graf 3A**). V obou opakováních však byla zjištěna změna v zastoupení jednotlivých sacharidů. U transformovaných rostlin došlo k navýšení hexós (především glukózy) na úkor sacharózy (**graf 2B, 3B**). V obou opakováních je skutečně navýšení hladiny glukózy ve vzrostných vrcholech transformovaných rostlin statisticky průkazné (**graf 2D, 3D**). Statisticky průkazné snížení hladiny sacharózy u transformantů bylo zaznamenáno pouze u 2. opakování (**graf 3C**), naopak průkazné navýšení fruktózy bylo zjištěno pouze u prvního opakování (**graf 2E**), a to navíc pouze u transformanta A.

Stanovení hladin rozpustných sacharidů ve vzrostných vrcholech ukázalo opačný trend nežli výsledky z floémové tekutiny. Celkové navýšení sacharidů u transformantů bylo pozorováno v jednom opakování, ve druhém nebyl zaznamenán rozdíl. V obou opakováních bylo u transformantů zjištěno zvýšení hladiny glukózy.

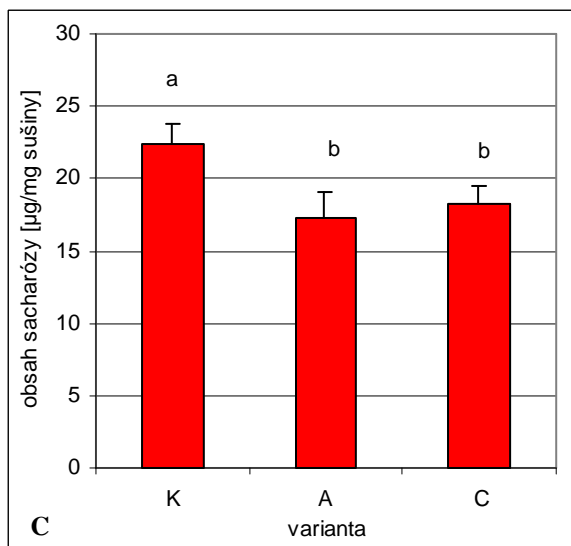
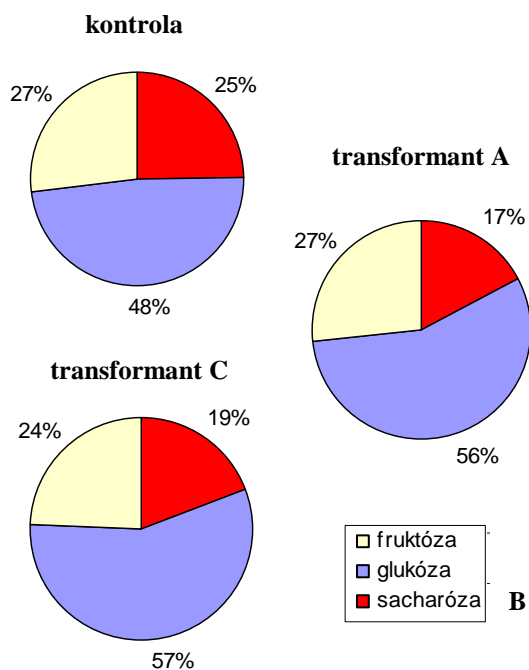
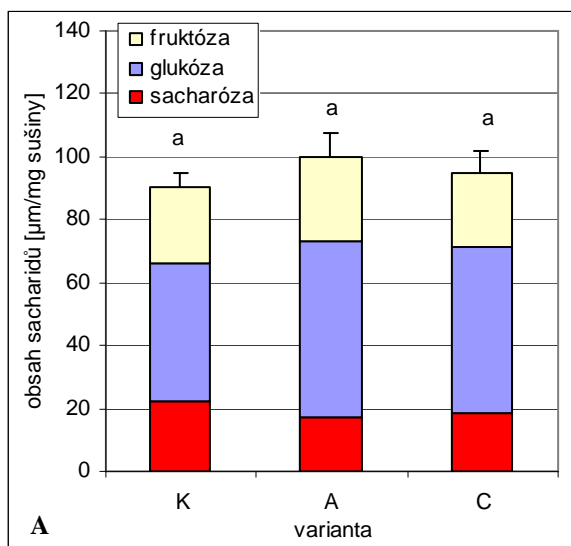
Obrázek 3.1:
Vzhled rostlin pro analýzu sacharidů ve vzrostných vrcholech;
K - kontrola,
A - transformant A,
C - transformant C.





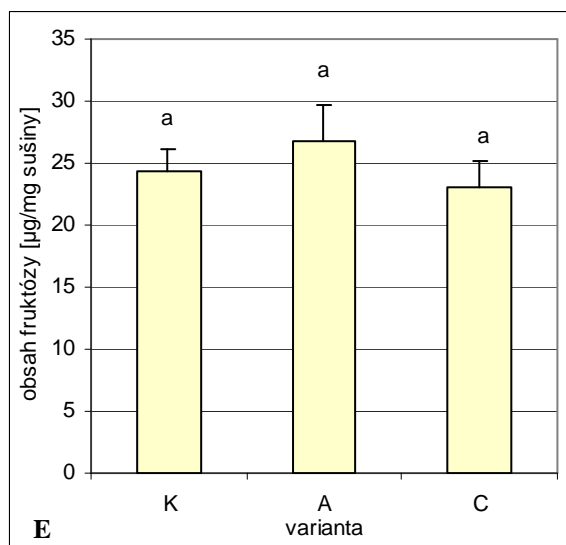
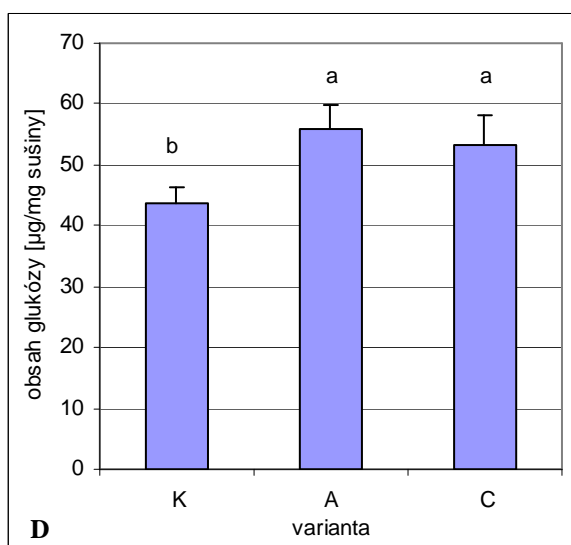
Graf 2A-E: Obsah a spektrum endogenních sacharidů ve vzrostných vrcholech

A - celkový obsah sacharidů
 B - procentuální zastoupení jednotlivých sacharidů
 C - obsah sacharózy
 D - obsah glukózy
 E - obsah fruktózy
 K - kontrola, A - transformant A, C - transformant C; n=6; směrodatné odchylky jsou vyjádřeny úsečkami; odlišná písmena nad sloupci znamenají statisticky významný rozdíl, $\alpha=0,05$.



Graf 3A-E: Obsah a spektrum endogenních sacharidů ve vzrostných vrcholech

A - celkový obsah sacharidů
 B - procentuální zastoupení jednotlivých sacharidů
 C - obsah sacharózy
 D - obsah glukózy
 E - obsah fruktózy
 K - kontrola, A - transformant A, C - transformant C; n=5; směrodatné odchylky jsou vyjádřeny úsečkami; odlišná písmena nad sloupci znamenají statisticky významný rozdíl, $\alpha=0,05$.



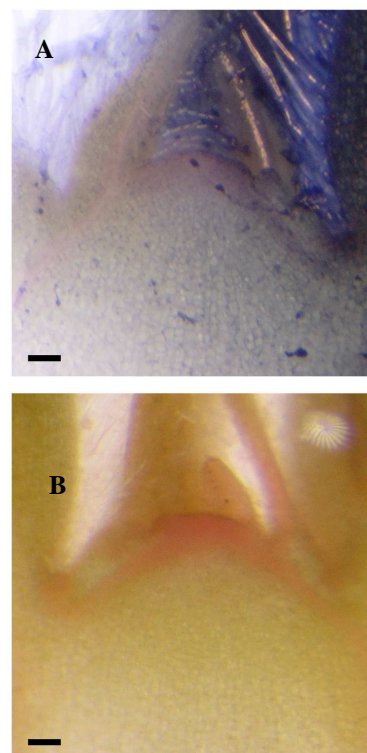
3.2. Detekce enzymové aktivity u tabáku

Vzhledem ke zjištěnému navýšení hexóz na úkor sacharózy ve vzrostných vrcholech transformantů (kap. 3.1.2.), byla na řezech tabáku detekována aktivita invertázy. Při zvoleném postupu dochází vlivem specifických enzymatických reakcí ke vzniku modrého produktu v místě aktivní invertázy.

Byly použity mediální řezy vzrostným vrcholem a příčné řezy řapíkem. Z důvodu silného barvení neterministematických oblastí vzrostného vrcholu (především trichomů, **obr. 3.2**) se řezy vzrostným vrcholem ukázaly pro stanovení aktivity invertázy jako nevhodné. Detekce aktivity invertázy na řezech řapíku neukázala rozdíl mezi transformantem a kontrolou. Expresí *Spcdc25* nebyla lokalizace invertázy ovlivněna. Nejvyšší aktivita invertázy byla u všech variant na adaxiální straně řapíku a nejnižší v povrchových pletivech (**obr. 3.3**).

Použitá metoda bývá využívána jak pro stanovení lokalizace invertázy, tak i pro orientační kvantifikování míry aktivity invertázy mezi srovnávanými vzorky. V případě řezů řapíkem tabáku byl sledován rozptyl v postupu barvení jednotlivých vzorků v rámci varianty. Proto byl následně testován vliv síly řezu na intenzitu vzniklého zbarvení. Variabilitu dat však nebylo možné vysvětlit rozdílnou silou řezu. Porovnání míry aktivity invertázy mezi vzorky by tedy bylo možné pouze v případě výrazného rozdílu mezi variantami.

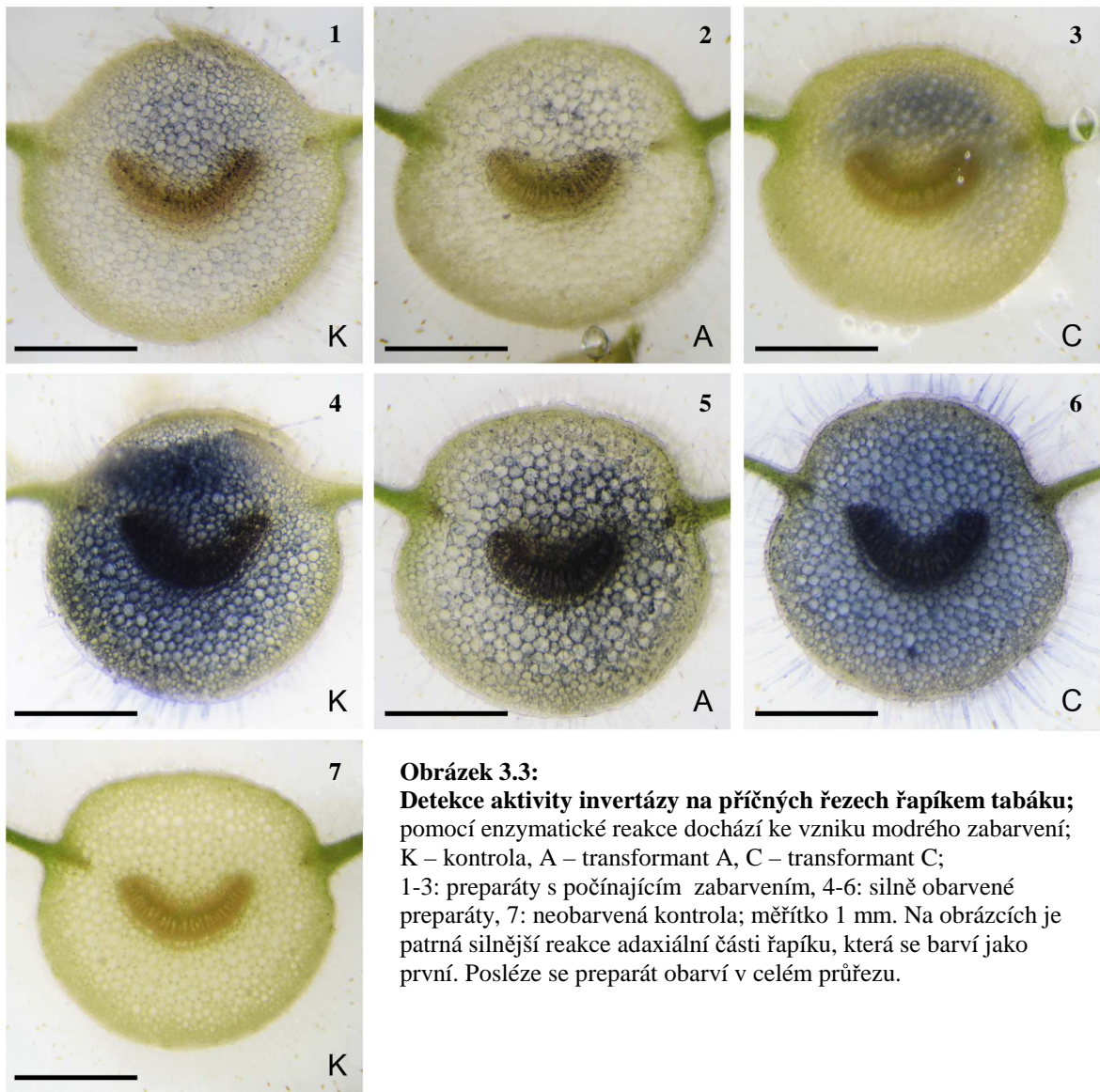
Nicméně v obou experimentech, které byly provedeny, byl vznik barevného produktu nejprve pozorovatelný u některých řezů transformanta C, poté kontroly a poslední se začaly barvit řezy transformanta A, což by mohlo na případné rozdíly v množství invertázy ukazovat. Pořadí vzniku barevného produktu však nenaznačuje zvýšení aktivity invertázy (v řapíku) u transformantů oproti kontrole.



Obrázek 3.2:

Detekce aktivity invertázy na řezech vzrostným vrcholem tabáku;

kontrolní netransformované rostliny; pomocí enzymatické reakce dochází ke vzniku modrého zbarvení; A – obarvený preparát, B – neobarvená kontrola;



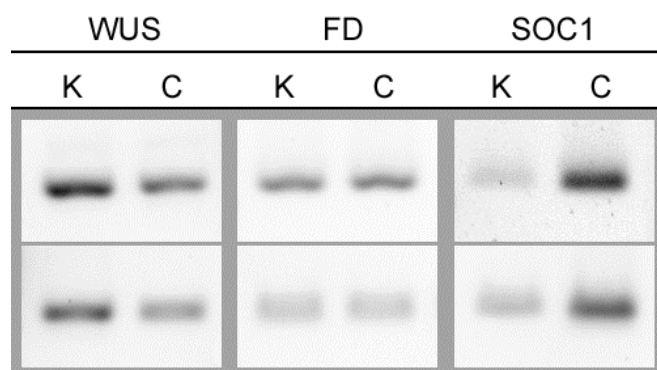
3.3. Stanovení míry exprese vybraných genů u tabáku

Předchozí studium mechanismů regulace iniciace kvetení odhalilo významnou roli některých genů (Srikanth a Schmid, 2011). Z těchto důvodů byla ve vzrostných vrcholech rostlin tabáku semikvantitativně stanovena míra exprese genů *CET2/TFL1*, *NtFD*, *NtSOC1*, *NFL1/LFY*, *NtWUS* a elongačního faktoru *ef1α*. Kvůli nedostatku prostoru v experimentálním skleníku byly pro odběr materiálu použity totožné rostliny jako v kapitole 3.1.1. Pro stanovení míry exprese daných genů byly ze souboru vybrány rostliny se třemi dospělými listy. Bylo provedeno 6 nezávislých stanovení exprese (dále označeno I až VI) ze třech souborů rostlin (viz kapitola 2.2.3).

Míra exprese tabákového homologu *FD* ani *CET2/TFL1* nebyla u transformantů oproti kontrole změněna (**obr. 3.6**). Naproti tomu byl u transformantů zaznamenán trend zvýšené exprese tabákového homologu *SOC1*, ve čtyřech z pěti opakování (opakování 1,2,4,5; **obr. 3.7**). Ačkoliv byla pozorována častá pozitivní korelace mezi mírou exprese *NtSOC1* a *NFL1/LFY*, nelze u transformantů označit míru exprese *NFL1/LFY* oproti kontrole za zvýšenou (**obr. 3.7**). Míra exprese *NtWUS* vykazovala vysokou variabilitu mezi jednotlivými variantami. Poměry míry exprese mezi transformanty a kontrolou se však mezi jednotlivými opakováními lišily a nevykazovaly žádný zjevný trend (**obr. 3.5**).

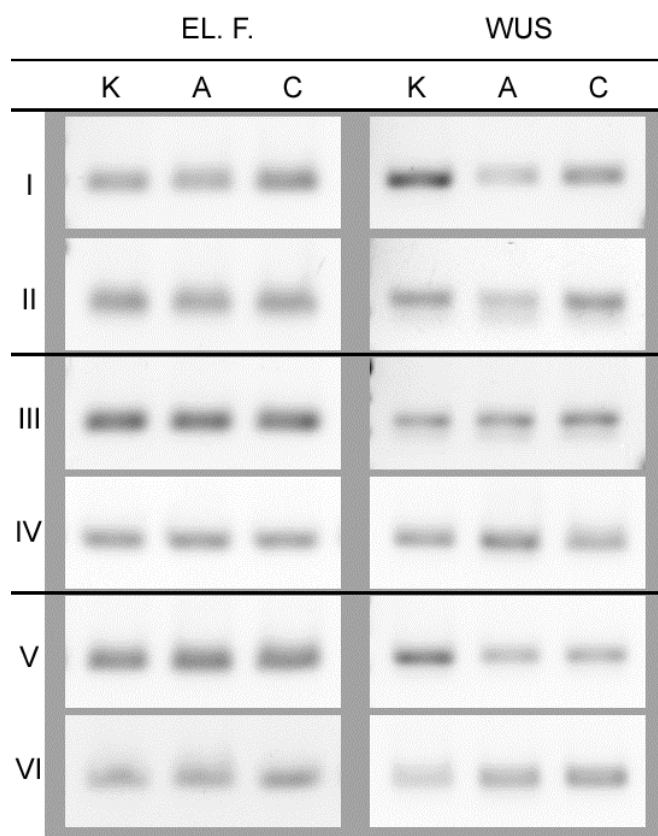
Pro kontrolu správnosti provedení RT-PCR jsou prezentovány výsledky dvou nezávislých RT-PCR ze stejného vzorku vyizolované RNA (**obr. 3.4**). Srovnávány byly pouze vzorky kontroly a transformantu C.

Na základě stanovení míry exprese bylo zjištěno, že u transformantů dochází k zvýšení exprese *NtSOC1*, jehož homolog u *Arabidopsis* integruje působení různých signálních cest. Oproti tomu nebyl zjištěn rozdíl v hladinách *NtFD* ani *CET2/TFL1*. Rovněž nebylo u transformantů zaznamenáno zvýšení exprese tabákového homologu genu *LFY*, který bývá spojován s determinací ke kvetení (Benlloch et al., 2007).

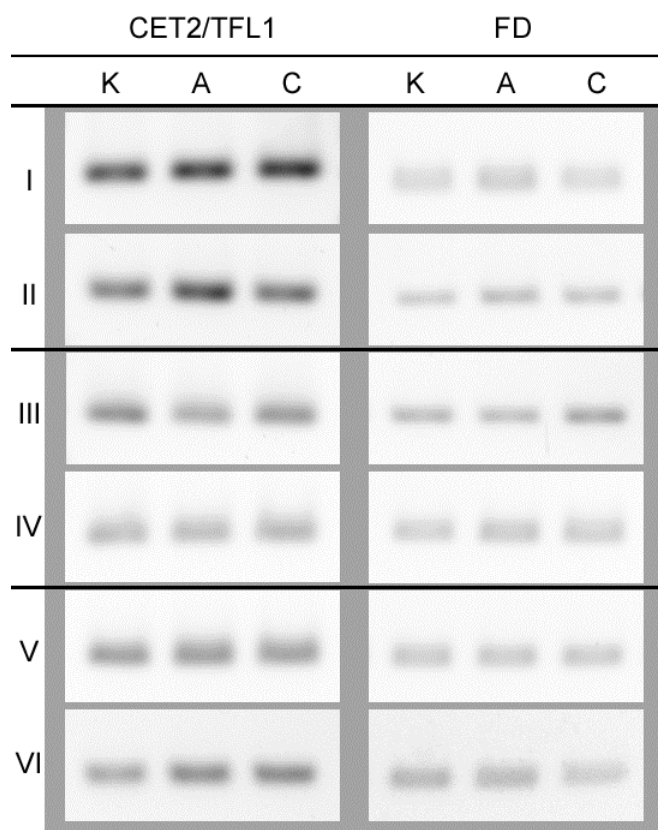


Obrázek 3.4: Srovnání dvou nezávislých RT-PCR ze stejného vzorku RNA;

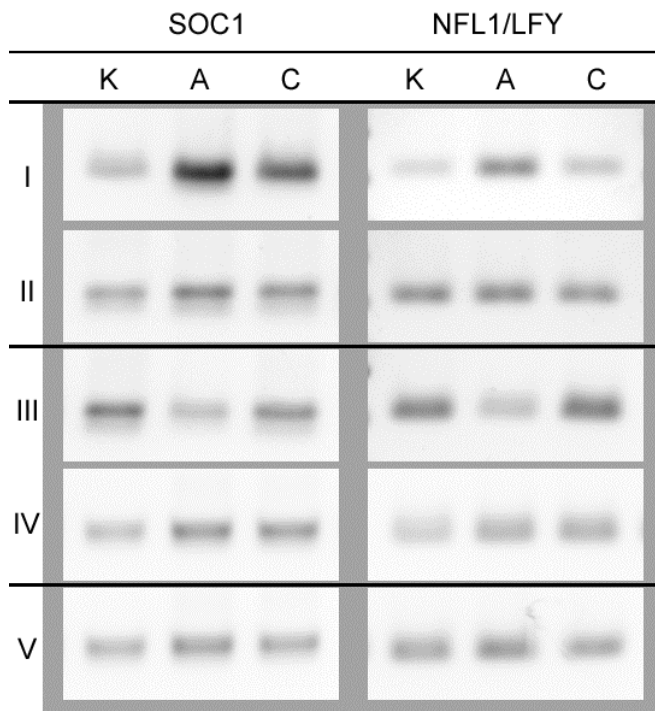
K - kontrola, A - transformant A, C - transformant C; sledované geny *NtWUS*, *NtFD*, *NtSOC1* (značeno WUS, FD, SOC1)



Obrázek 3.5: Expresse *ef1α* (značeno EL. F.) a *NtWUS* (značeno WUS);
K - kontrola, A - transformant A, C - transformant C; I-VI - jednotlivá nezávislá stanovení exprese ze třech souborů rostlin.



Obrázek 3.6: Expresse *CET2/TFL1* a *NtFD* (značeno FD);
K - kontrola, A - transformant A, C - transformant C; I-VI - jednotlivá nezávislá stanovení exprese ze třech souborů rostlin.



Obrázek 3.7: Expres *NtSOC1* (značeno SOC1) a *NFL1/LFY*;

K - kontrola, A - transformant A, C - transformant C; I-V - jednotlivá nezávislá stanovení exprese ze třech souborů rostlin.

3.4. Kvetení *Arabidopsis* za indukční a neindukční fotoperiody

Jedním z nejvýraznějších projevů transformantů *Nicotiana tabacum* exprimujících kvasinkový gen *cdc25* je urychlení nástupu kvetení oproti kontrole. Z toho důvodu bylo časování kvetení sledováno u *Arabidopsis* transformované tímtož genem.

3.4.1. Kvetení *Arabidopsis* za indukční fotoperiody

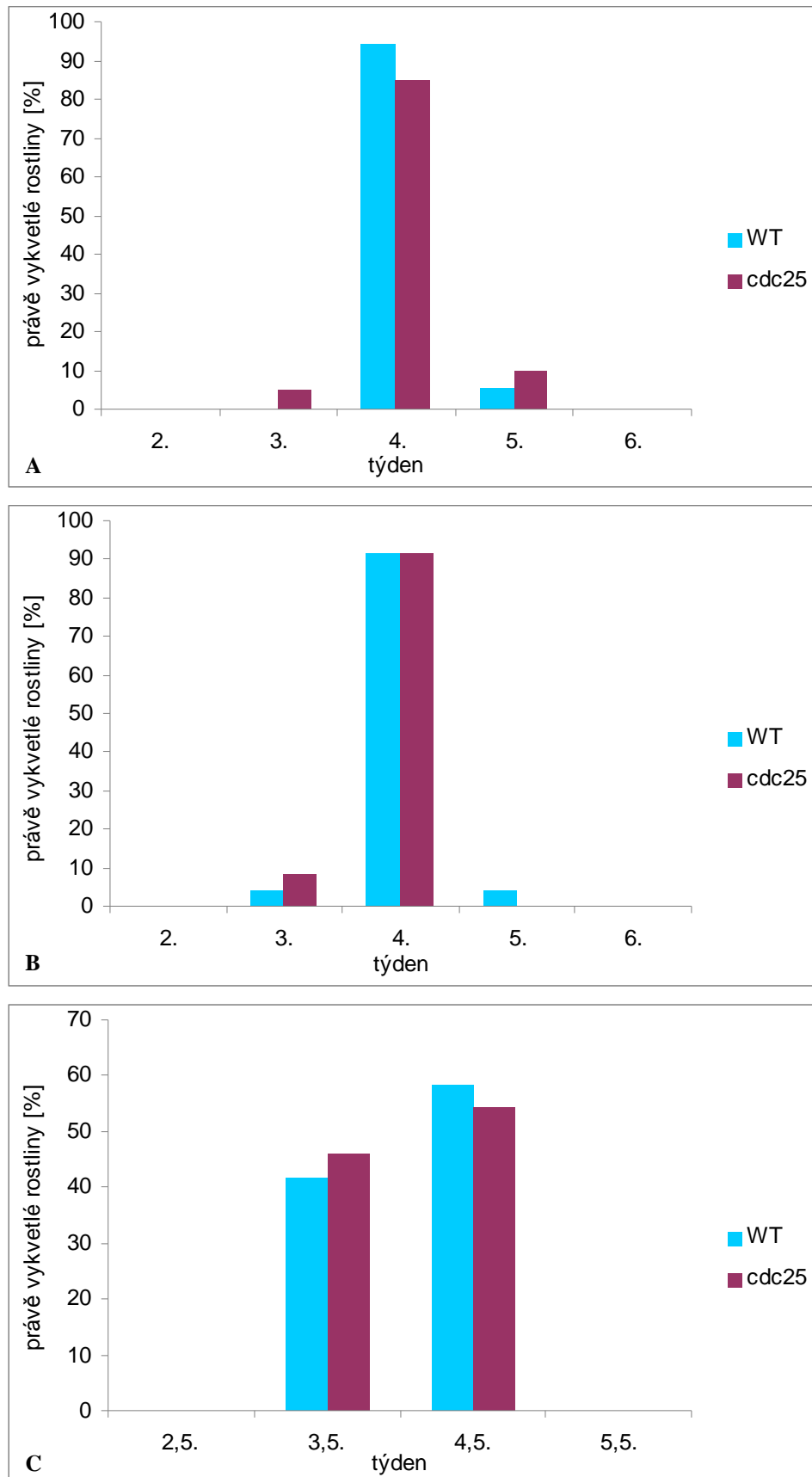
Rostliny *Arabidopsis* byly kultivovány při fotoperiodě 16 hodin. V týdenních intervalech od vyklíčení byly pomocí binolupy detekovány rostliny s nově vytvořenými poupaty. Tyto rostliny jsou v následujících grafech značeny termínem „právě vykvetlé rostliny“. Na obrázku 3.8 je zachycen vzhled kontrolních a transformovaných rostlin s detekovatelnými poupaty. Transformované rostliny po celou dobu kultivace nevykazovaly žádnou viditelnou změnu fenotypu oproti kontrolním rostlinám.

Experiment byl proveden ve třech opakováních (graf 4A-C). V prvním a druhém opakování byly rostliny sledovány v týdenním intervalu. Protože se takto neukázal rozdíl mezi transformantem a kontrolou a naprostá většina rostlin vytvořila poupata během jediného týdne (graf 4A,B), byly rostliny ve třetím opakování sledovány v týdenním intervalu posunutém o tři dny (tzn. 1,5; 2,5; 3,5... týdne od vysetí). Podařilo se tak počátek kvetení sledovaného souboru rozdělit rovnoměrně do dvou týdnů, avšak ani tak nebyl nástup kvetení transformanta oproti kontrole výrazněji urychlen (graf 4C).

Bylo zjištěno, že při kultivaci rostlin na indukční fotoperiodě není rozdíl v časování kvetení rostlin exprimujících *Spcdc25* a rostlin kontrolních.

Obrázek 3.8: Vzhled rostlin v generativní fázi při kultivaci za indukční fotoperiody; WT - kontrola, *cdc25* - transformant *Spcdc25*; stáří rostlin 25 dní





Graf 4A-C: Časování kvetení *Arabidopsis* při indukční fotoperiodě A - 1. opakování, n=18-20; B - 2. opakování, n=24; C - 3. opakování, n=24; WT - kontrola, cdc25 - transformant Spcdc25.

3.4.2. Kvetení *Arabidopsis* za neindukční fotoperiody

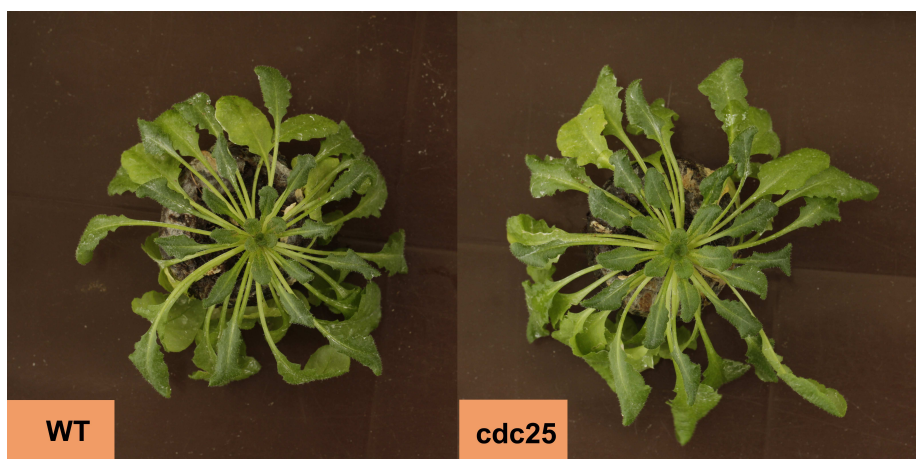
V předchozí kapitole bylo ukázáno, že časování kvetení za indukční fotoperiody nebylo u transformanta změněno. Vzhledem k možnému ovlivnění drah nekřížících se s přenosem fotoperiodického signálu bylo u transformanta sledováno také časování kvetení za neindukční fotoperiody. Rostliny byly hodnoceny stejně jako v **kap 3.3.1**. Na obrázku **3.9** je zachycen vzhled kontrolních a transformovaných rostlin s detekovatelnými pupaty.

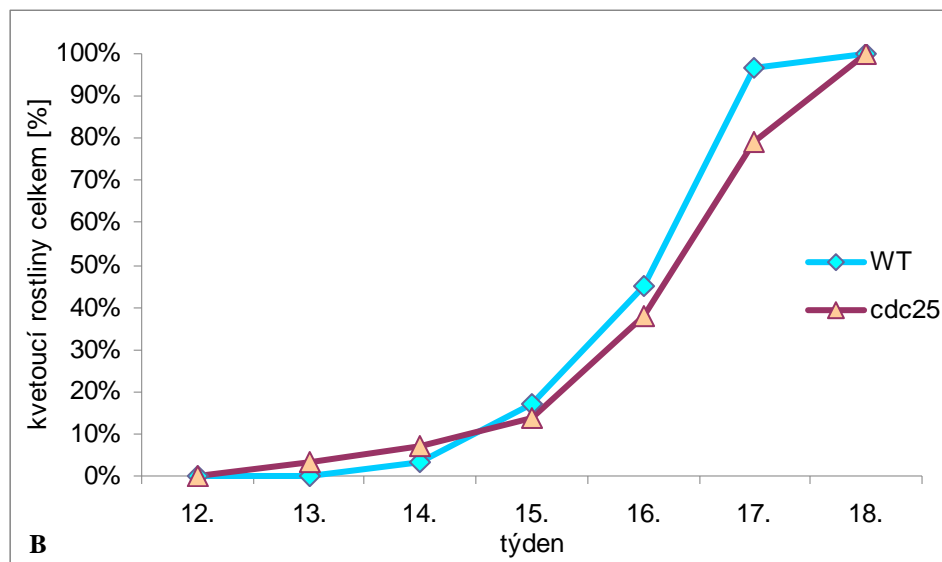
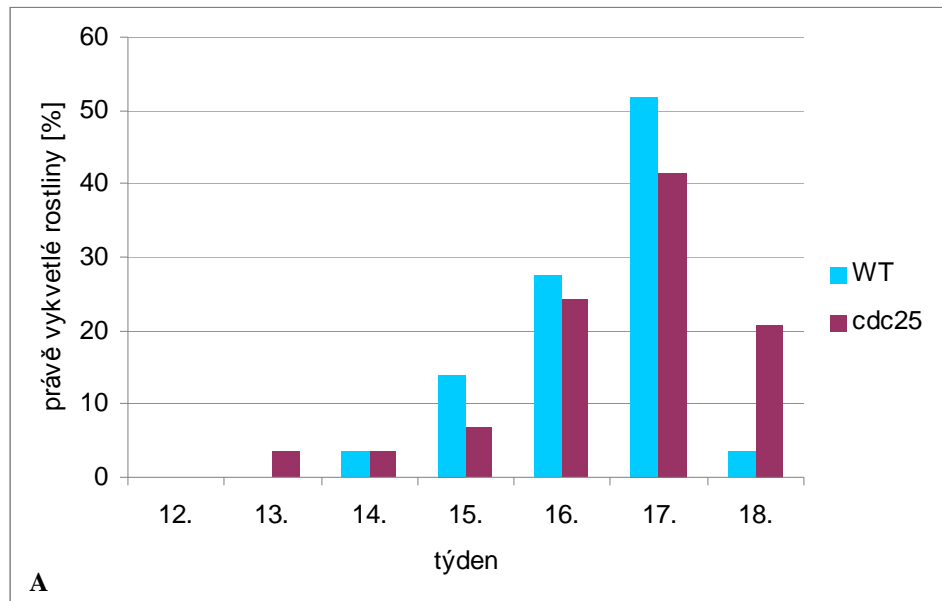
Experiment byl proveden ve třech opakováních (**graf 5A,B, 6A,B, 7A,B**). Pro přehlednost jsou výsledky prezentovány kromě sloupcových grafů, znázorňujících procento rostlin s nově vytvořenými pupeny (**grafy A**), také spojnicovými grafy, znázorňujícími celkové procento rostlin v generativní fázi (**grafy B**). Výsledky ukazují, že se doby nástupu kvetení u transformanta a u kontroly překrývají. V prvním a druhém opakování byl pozorován nepříliš výrazný trend dřívějšího vykvetení kontrolních rostlin (**graf 5A,B a 6A,B**), ve třetím opakování bylo kvetení většiny transformovaných rostlin oproti kontrolním uspíšeno - z **grafu 7A,B** lze vyčíst posun přibližně o týden. Ve třetím opakování byl ale také nejmenší soubor sledovaných rostlin. Pro úplnost je třeba uvést, že rostliny z 2. experimentu (**graf 6A,B**) byly v průběhu kultivace ošetřeny přípravkem MERPAN 80WG proti hnilobě krčků (postižené rostliny byly odstraněny), což mohlo ovlivnit vývoj hodnocených rostlin.

Výraznější rozdíl v časování kvetení mezi transformantem a kontrolou byl zjištěn u rostlin klíčících na médiu *in vitro* a po 10 dnech převedených *ex vitro*. Většina transformovaných rostlin v souboru kvetla dříve než rostliny kontrolní (**graf 8A,B**). Vzhledem k časové náročnosti však nebyl experiment zopakován.

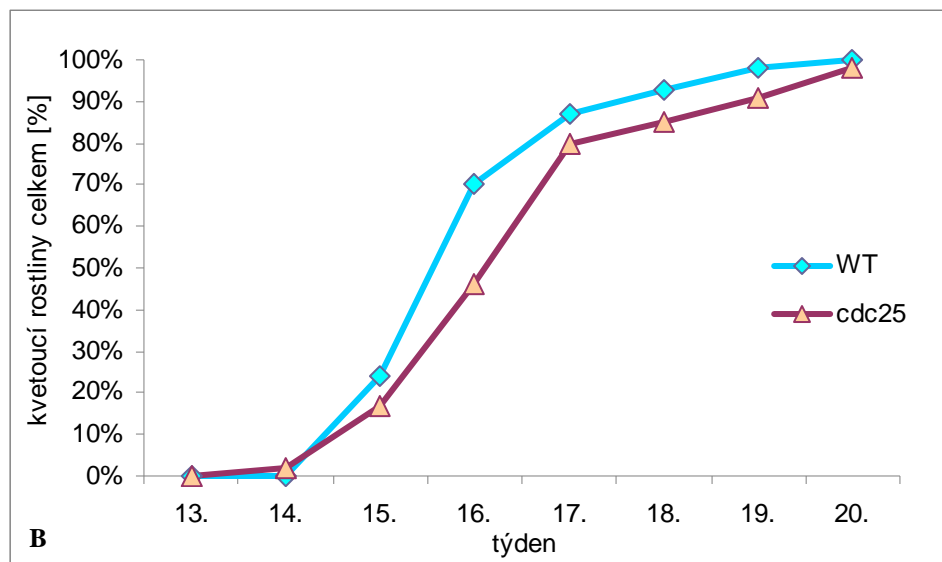
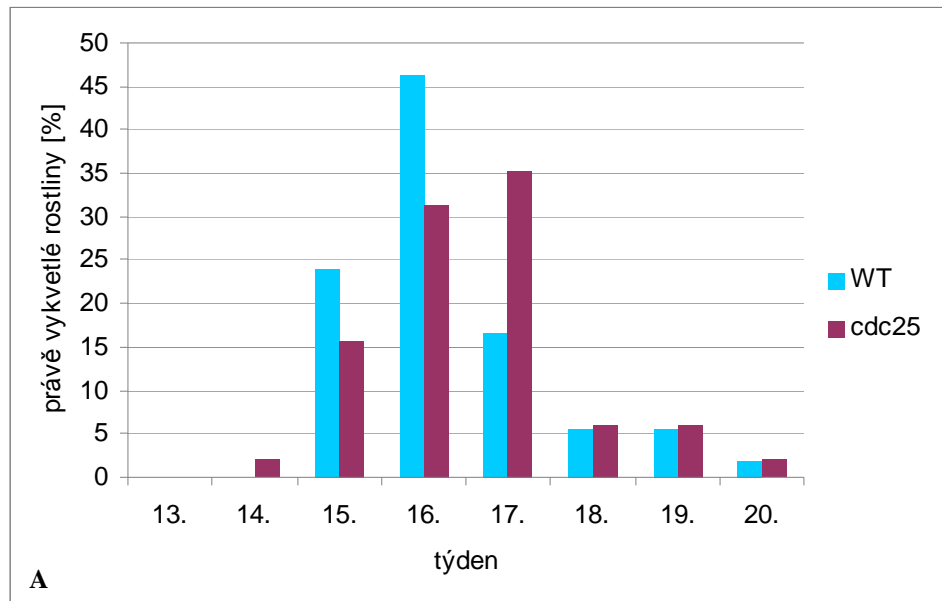
Bylo zjištěno, že ani při kultivaci rostlin za neindukčních podmínek nedochází k posunu v časování kvetení u rostlin exprimujících *Spcdc25* oproti rostlinám kontrolním. Pokud však byly rostliny předpěstovány *in vitro*, kvetly transformanty dříve než kontrola.

Obrázek 3.9:
Vzhled rostlin
v generativní fázi
při kultivaci za
neindukční
fotoperiody;
WT - kontrola, *cdc25* -
transformant *Spcdc25*;
stáří rostlin 125 dní.

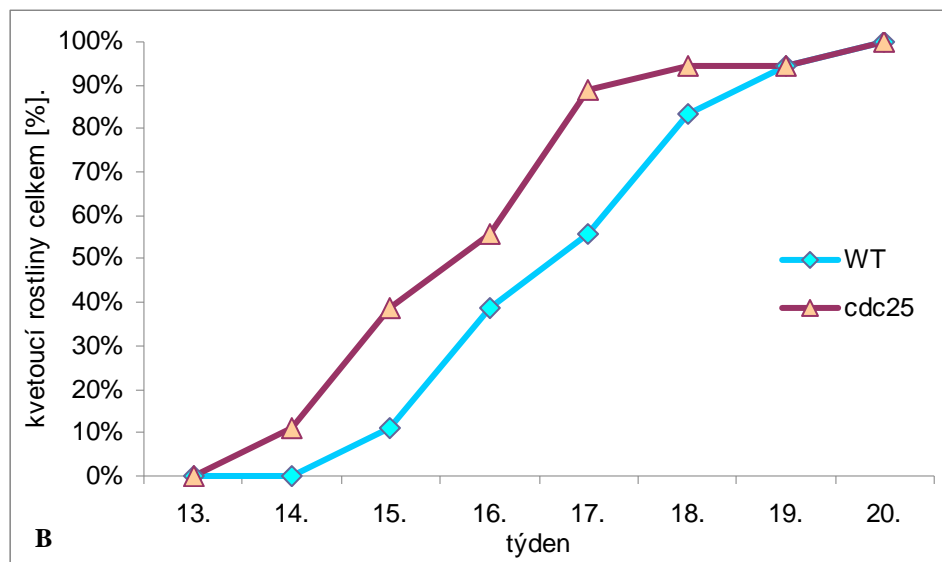
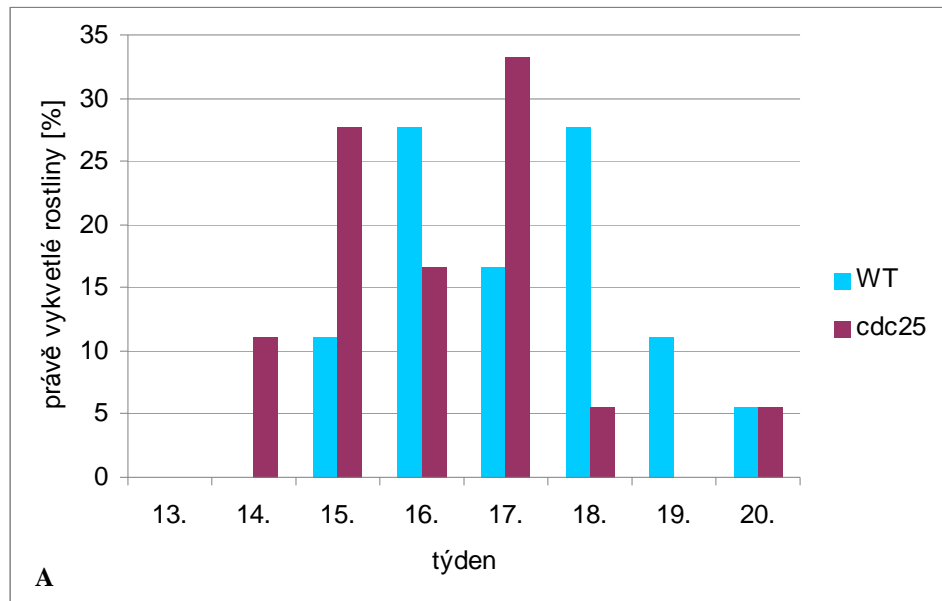




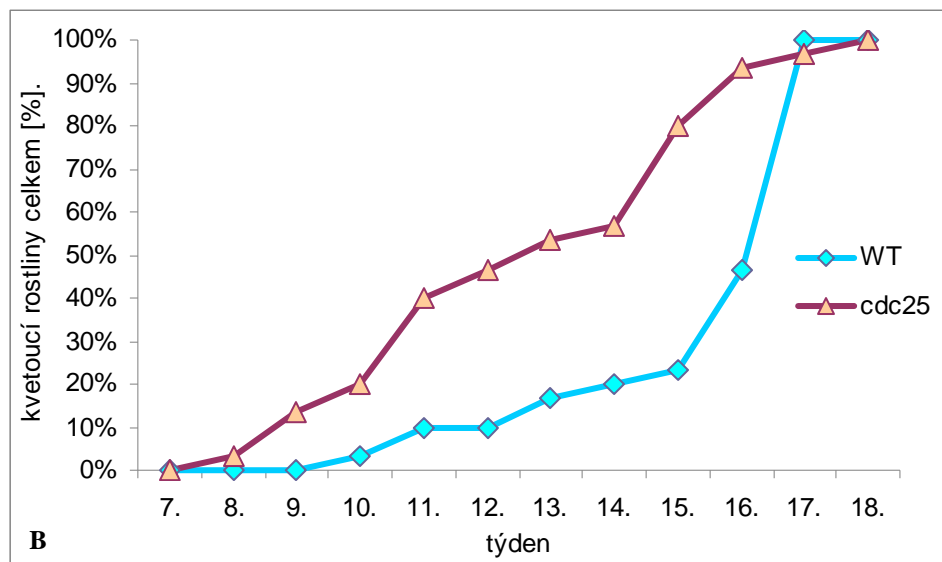
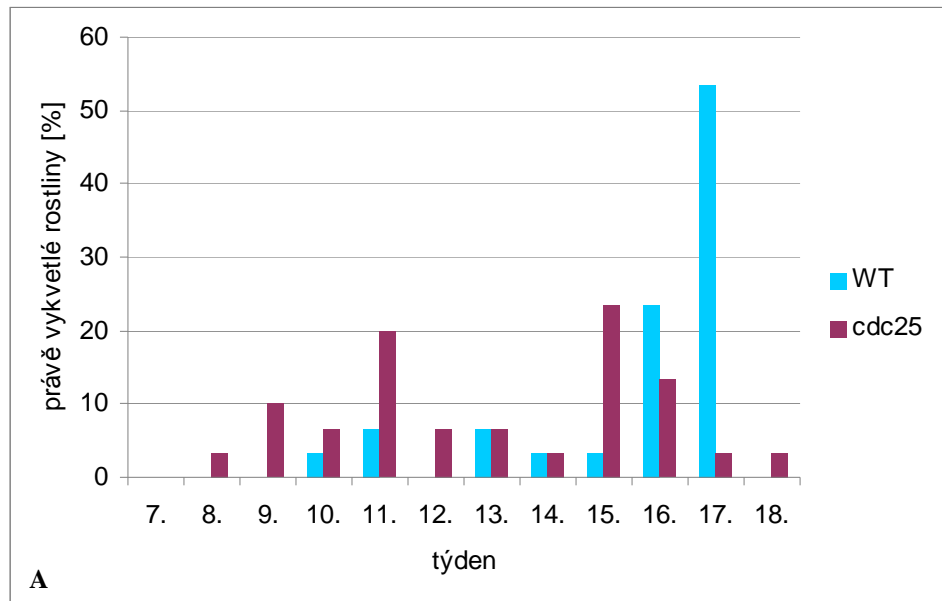
Graf 5A,B: Časování kvetení *Arabidopsis* při neindukční fotoperiodě 1. opakování;
 WT - kontrola, cdc25 - transformant Spcdc25; n=29.



Graf 6A,B: Časování kvetení *Arabidopsis* při neindukční fotoperiodě 2. opakování;
 WT - kontrola, cdc25 - transformant Spcdc25; n=51-54.



Graf 7A,B: Časování kvetení *Arabidopsis* při neindukční fotoperiodě 3. opakování;
 WT - kontrola, cdc25 - transformant Spcdc25; n=18.



Graf 8A,B: Časování kvetení *Arabidopsis* při neindukční fotoperiodě, výsev na médium v podmínkách *in vitro*, dále *ex vitro*;
 WT - kontrola, cdc25 - transformant Spcdc25; n=30.

3.5. Další charakteristiky *Spcdc25 Arabidopsis*

K dokreslení vlivu transformace *Spcdc25* na vývoj *Arabidopsis* byly okrajově sledovány také další parametry, které jsou transformací tímto genem ovlivněny u tabáku. Konkrétně byl zvolen rozvoj kořenového systému a organogeneze *de novo*.

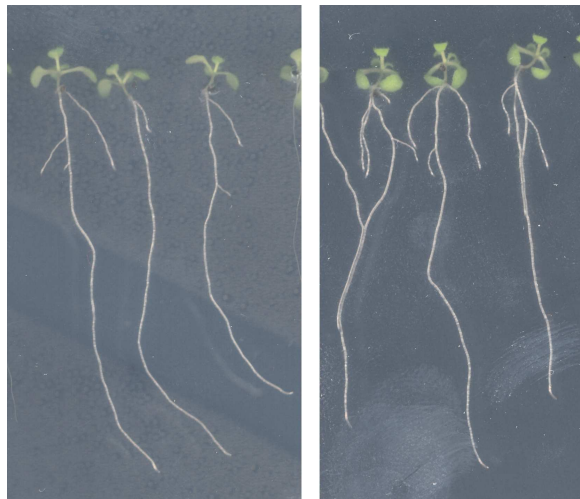
3.5.1. Kořenový systém *Arabidopsis*

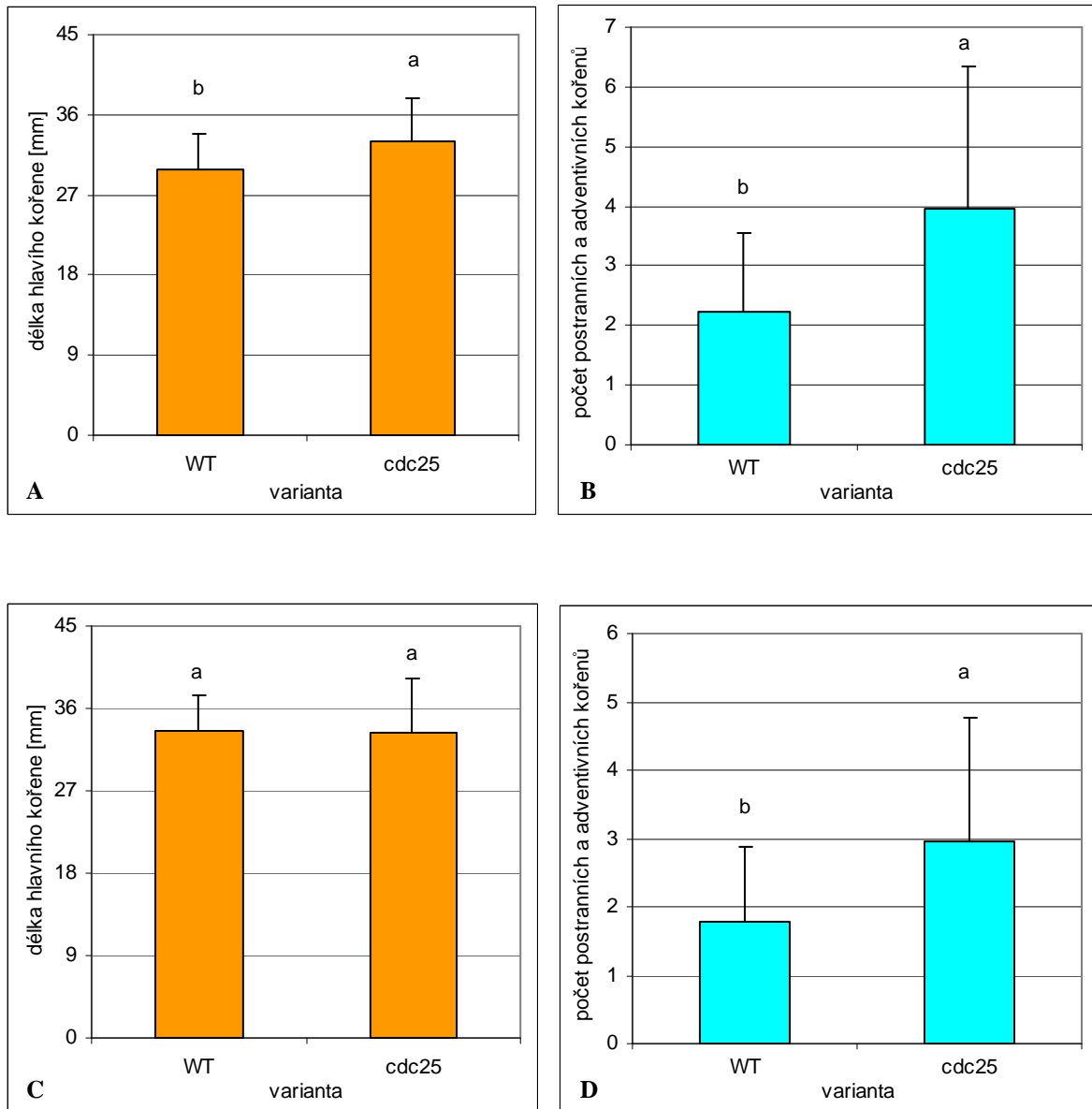
Z předchozích prací je známo, že kořenový systém rostlin tabáku transformovaných genem *Spcdc25* je oproti kontrole redukován. Zjištěna byla jak redukce délky hlavního kořene, tak redukce počtu kořenů postranních (Čiháková, 2009). Pro analýzu kořenového systému byly použity rostliny kultivované *in vitro*, u kterých byly měřeny dva následující parametry: délka hlavního kořene a celkový počet postranních a adventivních kořenů. Experiment byl proveden ve dvou opakováních. Při prvním opakování byly rostliny pěstované na médiu zpevněném 0,8% agarem. Z důvodu častého zarůstání kořenů do média byl druhý experiment proveden s médiem zpevněným 1,3% agarem. Hodnoceny byly rostliny staré 8 dní (1. opakování) a 11 dní (2. opakování, **obr. 3.10**).

Výsledky prvního opakování jsou shrnuty v **grafech 9A,B**, výsledky druhého opakování v **grafech 9C,D**. Zakládání kořenů bylo u transformanta oproti kontrole zvýšeno v obou opakováních (**graf 9B,D**). Počet postranních kořenů byl signifikantně zvýšen vždy, u adventivních bylo pozorováno zvýšení v prvním opakování (prezentovány pouze sumární hodnoty). Délka hlavního kořene byla v prvním opakování u transformanta větší (**graf 9A**), ve druhém opakování nebyl mezi variantami zjištěn rozdíl (**graf 9C**).

Z uvedených výsledků vyplývá, že rostliny *Arabidopsis* exprimující gen *Spcdc25* vykazují změnu ve stavbě kořenového systému. Pozorované změny však neodpovídají změnám, které vyvolala exprese totožného genu u rostlin tabáku.

Obrázek 3.10: Vzhled kořenového systému *Arabidopsis* (11 dnů staré rostliny);
WT - kontrola, cdc25 - transformant *Spcdc25*.





Graf 9A-D: Charakteristika kořenového systému *Arabidopsis*; 1. opakování - A,B; n=44-48; 2. opakování - C,D; n=51-52; WT - kontrola, cdc25 - transformant Spdc25.

3.5.2. Organogeneze *Arabidopsis de novo*

U rostlin tabáku transformovaných genem *Spcdc25* byl zjištěn rozdíl v organogenní odpovědi oproti rostlinám kontrolním. Transformanty vykazovaly změny, které se u kontroly daly navodit ošetřením cytokininu (cytokinin-like efekt) (Suchomelová et al., 2004). Z toho důvodu byla organogeneze *de novo* sledována i u rostlin *Arabidopsis*, transformovaných tímto genem. Následující experimenty měly pouze orientační charakter a nekladly si za cíl detailní analýzu organogenní odpovědi sledovaných rostlin. Dílčím cílem bylo nalezení vhodných kultivačních podmínek.

Organogeneze prýtlů byla sledována jak na hypokotylových, tak na kořenových segmentech. Na médiu bez fytohormonů tvořily oba typy segmentů pouze kořeny. Nebyl pozorován viditelný rozdíl mezi transformantem a kontrolou (**obr. 3.11**).

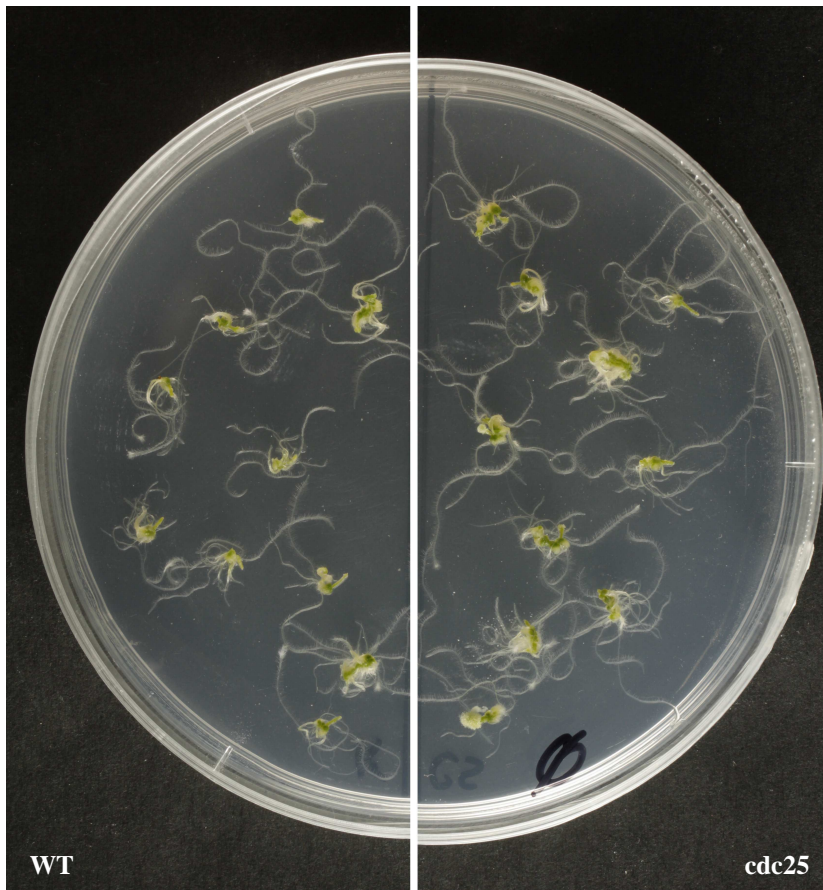
Na médiích SIM (s 0,15 mg/l IAA a různými koncentracemi iP) se hypokotylové a kořenové segmenty chovaly odlišně. Segmenty hypokotylů tvořily na médiu indukujícím tvorbu prýtlů (SIM) na celé škále testovaných koncentrací kromě prýtlů i kořeny (**obr. 3.12-3.14**). Tvorba kořenů se snižovala se vzrůstajícím poměrem cytokininu k auxinu (iP : IAA). Ve tvorbě prýtlů byl pozorovatelný slabý rozdíl: transformanty oproti kontrole vykazovaly na médiu „0,1“; „0,25“ a „0,5“ (značeno podle koncentrace iP) tendenci k vyšší tvorbě kalusu na úkor tvorby prýtlů (**obr. 3.12, 3.13**).

Na médiu indukujícím tvorbu kořenů (RIM) tvořily segmenty hypokotylů pouze kořeny. Nebyl pozorován výraznější rozdíl v jejich počtu ani délce mezi transformantem a kontrolou.

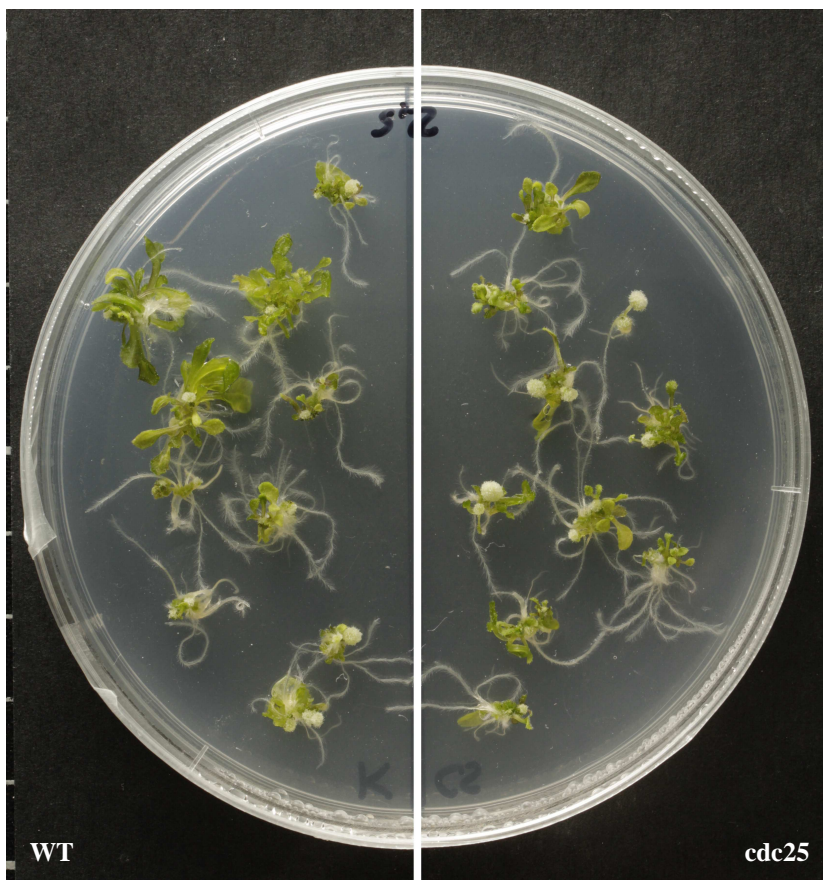
Segmenty kořenů tvořily na médiu SIM pouze prýty ale žádné kořeny. Jejich množství i velikost se zvyšovaly se vzrůstajícím poměrem iP : IAA (**obr. 3.15-3.18**). U nižších koncentrací iP byl pozorován vyšší podíl segmentů nevytvářejících prýty u transformantu i kontroly. Srovnáním podílů těchto segmentů v rámci celé škály testovaných koncentrací však nebyl zjištěn rozdílný trend mezi transformantem a kontrolou.

Z výsledků orientačních experimentů nevyplývá výraznější rozdíl v organogenezi mezi transformantem a kontrolou. Není však vyloučeno, že možné rozdílné chování by bylo odhaleno na základě detailnější analýzy. Pro případné další studium se jeví jako vhodnější materiál kořenové segmenty. Kořenové segmenty netvoří na SIM na rozdíl od hypokotylů kořeny a při nižších koncentracích iP vykazují citlivější odpověď.

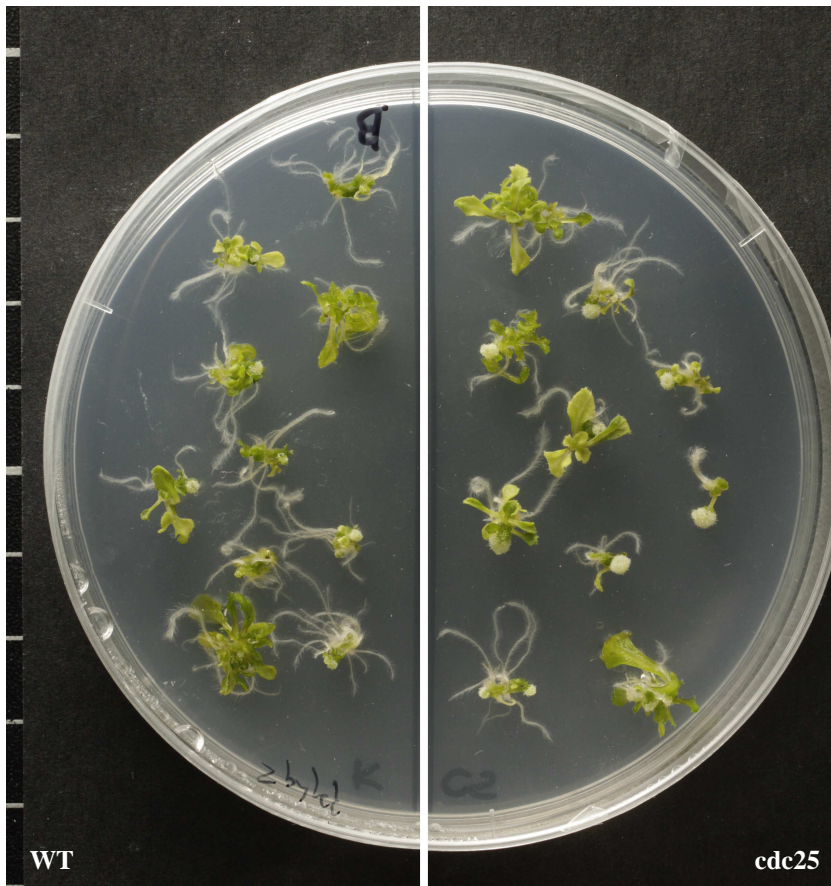
V této práci jsou demonstračně vyobrazeny pouze vybrané Petriho misky nepokrývající celou testovanou škálu médií, ale dokumentující typický vzhled explantátů. Konkrétně pro hypokotylové segmenty varianty „0“ a SIM „0,25“, „0,5“ a „1“ (značeno podle koncentrace iP) (**obr. 3.11-3.14**) a pro kořenové segmenty SIM „0,1“, „0,25“, „0,5“ a „1“ (**obr. 3.15-3.18**).



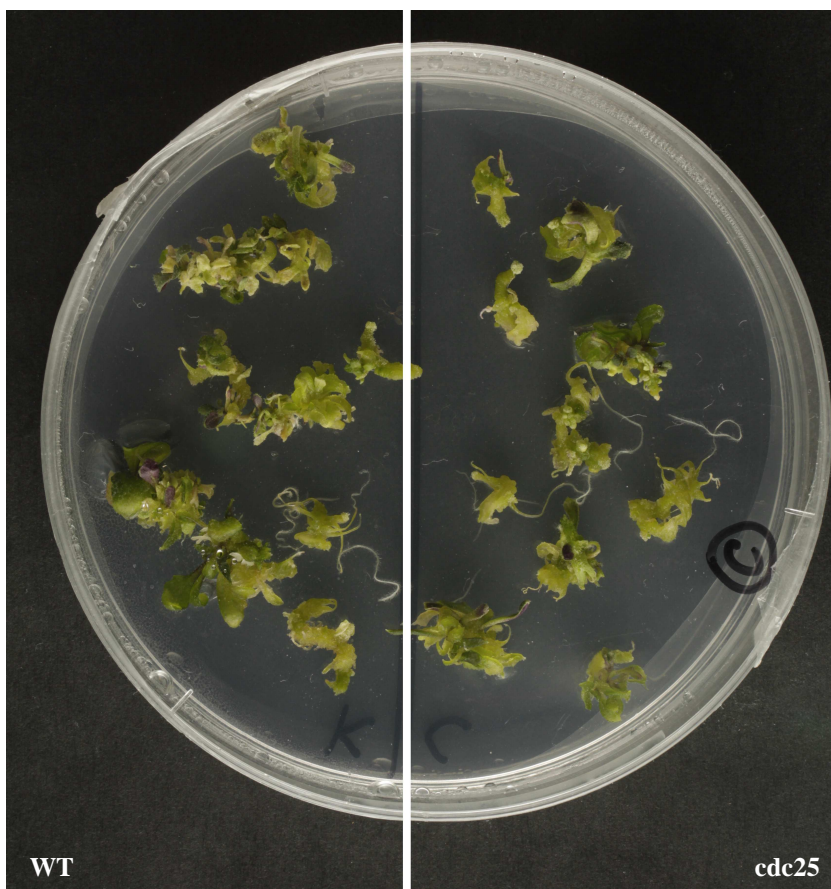
Obrázek 3.11:
Hypokotylové segmenty
na médiu bez fytohormonů,
 po 13 dnech kultivace,
 WT - kontrola, cdc25 -
 transformant Spdc25



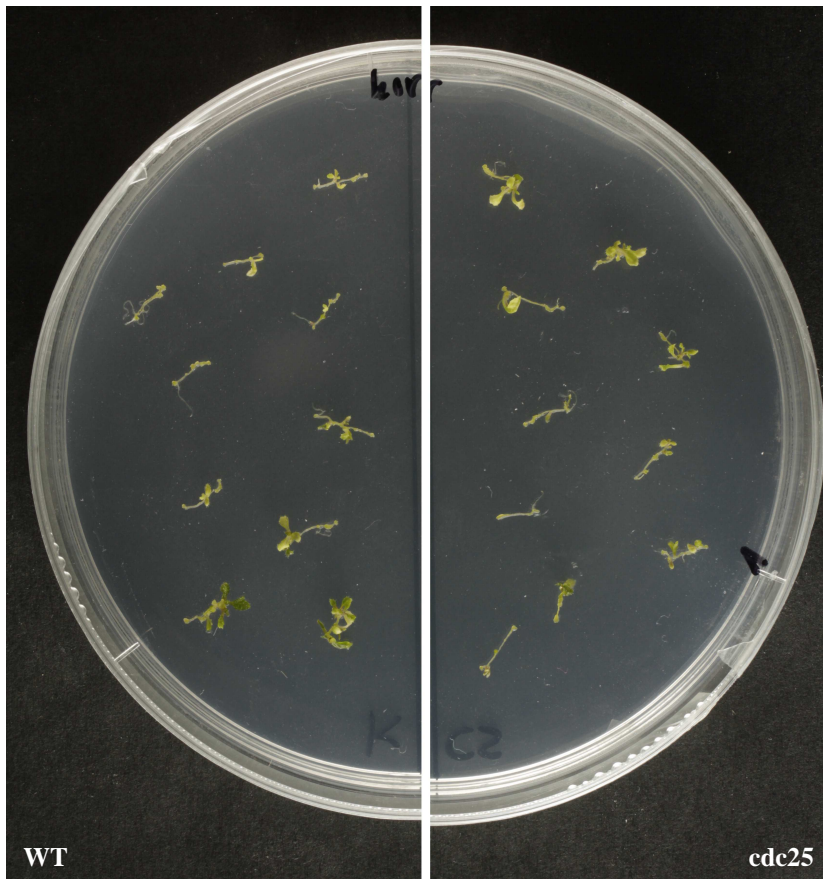
Obrázek 3.12:
Hypokotylové segmenty
na médiu SIM „0,25“
 (0,15 mg/l IAA; 0,25 mg/l
 iP), po 13 dnech kultivace,
 WT - kontrola, cdc25 -
 transformant Spdc25



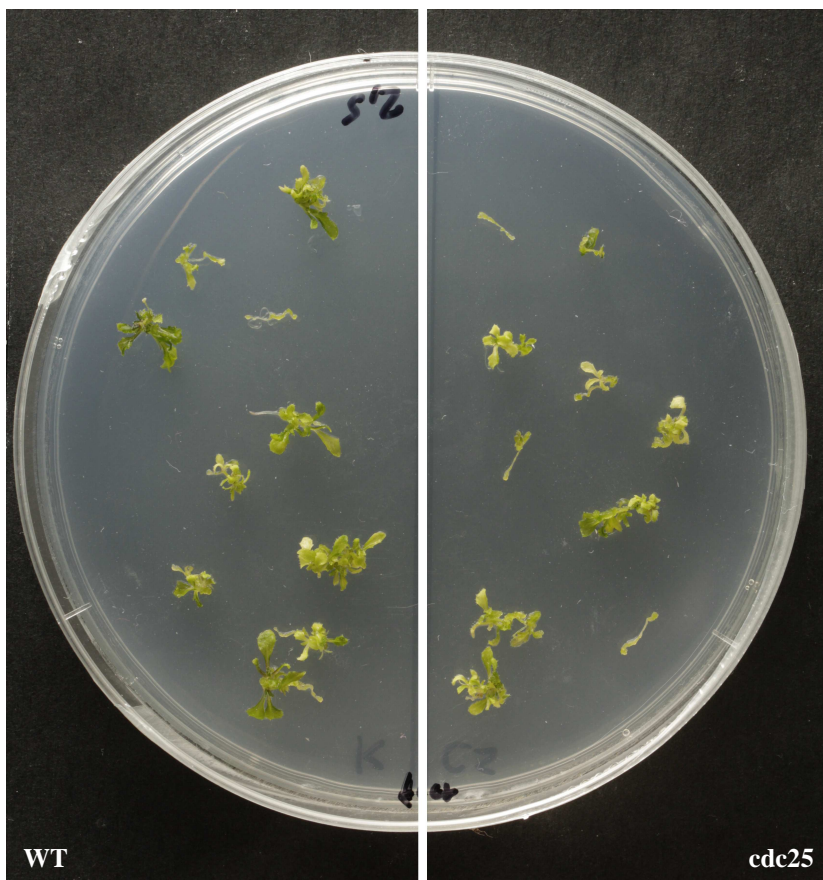
Obrázek 3.13:
Hypokotylové segmenty
na médiu SIM „0,5“
 (0,15 mg/l IAA; 0,5 mg/l iP),
 po 13 dnech kultivace,
 WT - kontrola, cdc25 -
 transformant Spcdc25



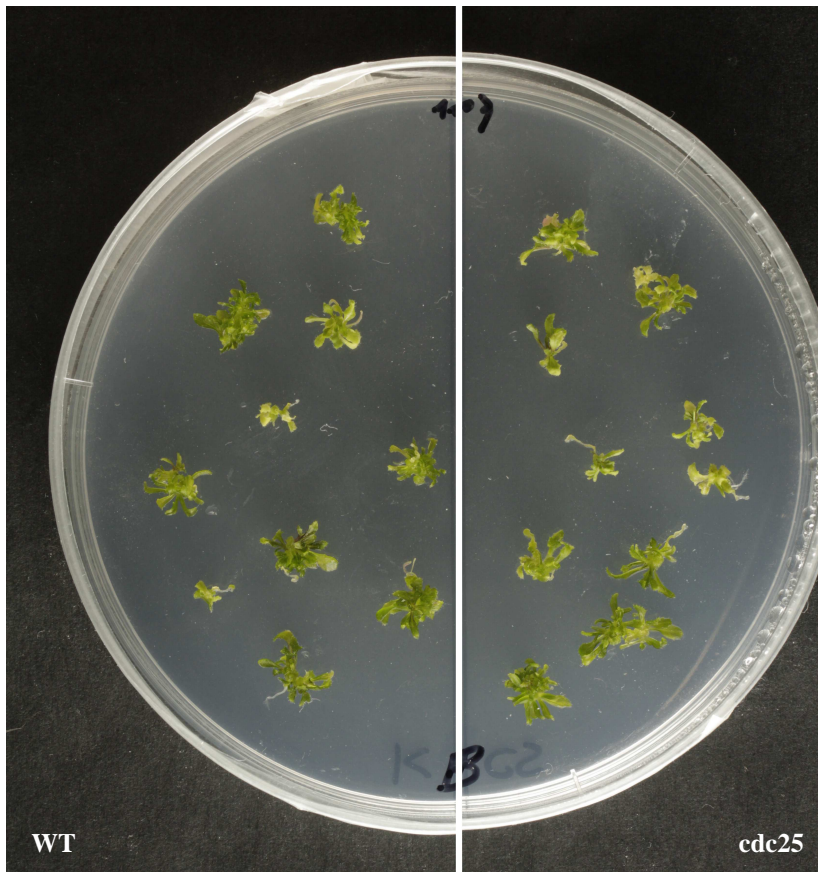
Obrázek 3.14:
Hypokotylové segmenty
na médiu SIM „1“
 (0,15 mg/l IAA; 1 mg/l iP),
 po 13 dnech kultivace,
 WT - kontrola, cdc25 -
 transformant Spcdc25



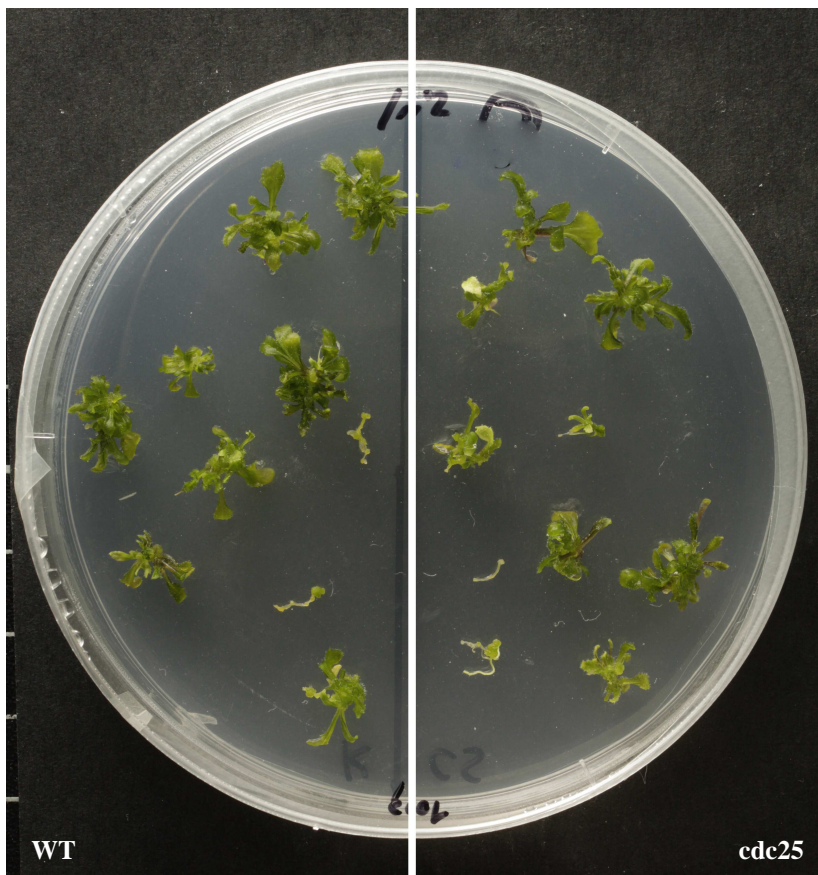
Obrázek 3.15:
Kořenové segmenty
na médiu SIM „0,1“
 (0,15 mg/l IAA; 0,1 mg/l iP),
 po 13 dnech kultivace,
 WT - kontrola, cdc25 -
 transformant Spcdc25



Obrázek 3.16:
Kořenové segmenty
na médiu SIM „0,25“
 (0,15 mg/l IAA; 0,25 mg/l
 iP), po 13 dnech kultivace,
 WT - kontrola, cdc25 -
 transformant Spcdc25



Obrázek 3.17:
Kořenové segmenty
na médiu SIM „0,5“
 (0,15 mg/l IAA; 0,25 mg/l
 iP), po 13 dnech kultivace,
 WT - kontrola, cdc25 -
 transformant Spcdc25



Obrázek 3.18:
Kořenové segmenty
na médiu SIM „1“
 (0,15 mg/l IAA; 1 mg/l iP),
 po 13 dnech kultivace,
 WT - kontrola, cdc25 -
 transformant Spcdc25

4. Diskuze

Regulace buněčného cyklu u rostlin zůstává i přes veškerou snahu vědců méně objasněná než je tomu u živočichů či hub. Problematickým momentem se jeví zvláště regulace přechodu G2/M. Konkrétně se jedná o úlohu kroku aktivační defosforylace CDK ve vstupu buňky do mitózy. Plně funkční homolog příslušné fosfatázy (*cdc25*) u vyšších rostlin nebyl nalezen, podařilo se najít pouze homolog její katalytické podjednotky (Landrieu et al., 2004). Ten náleží ke skupině proteinů aresnátreduktáz (Dhankher et al., 2006; Ellis et al., 2006). Skutečně vykazuje arzenátoreduktázovou aktivitu, avšak kromě této aktivity vykazuje také fosfatázovou aktivitu (Ellis et al., 2006). Jakou roli hraje v regulaci buněčného cyklu u rostlin, zůstává otevřenou otázkou (Francis, 2011). Nebývá jí však přisuzován příliš velký význam (Dissmeyer et al., 2009; Francis, 2011).

Snaha po uchopení role dosud neznámé fosfatázy vedla k bližšímu zkoumání mutantů s vneseným genem *cdc25*. Bell se spolupracovníky, kteří pracovali s neutrálními rostlinami tabáku exprimujícími *cdc25* z *S. pombe* zjistili, že kromě očekávatelného zmenšení velikosti buněk (sledováno v kořenovém meristému) rostliny vykazují i komplexnější změny jako například změnu tvaru listů a urychlený nástup kvetení. Daný experimentální materiál byl použit v řadě prací naší laboratoře (Smoloňová, 2003; Suchomelová et al., 2004; Vojvodová, 2005; Teichmanová et al., 2007; Suchomelová-Mašková et al., 2008; Čiháková, 2009). Na základě těchto prací bylo zjištěno, že základním pojítkem mezi sledovanými morfologickými, anatomickými i biochemickými parametry je tzv. cytokinin-like efekt. Experimentální materiál se v naprosté většině zkoumaných parametrů choval jako pod vlivem cytokininů, jejichž hladina u něj však zvýšena nebyla (Lipavská et al., 2011).

4.1. Hladiny a spektrum endogenních sacharidů u tabáku transformovaného genem *Spcdc25*

Z předchozích prací na rostlinách tabáku exprimujících gen *Spcdc25* byly zjištěny změny v sacharidovém metabolismu oproti rostlinám kontrolním. Cukerný metabolismus byl zasažen, ať již experimentálním materiálem byla celistvá rostlina či buněčné suspenze odvozené ze stonkových segmentů (Teichmanová et al., 2007; Suchomelová-Mašková et al., 2008; Čiháková, 2009)

Další charakteristikou rostlin tabáku exprimujících gen *Spcdc25* je urychlení kvetení (Bell et al., 1999; Smoloňová, 2003; Vojvodová, 2005). Vzhledem k tomu, že v regulaci

nástupu kvetení figurují i sacharidy, bylo jedním z hlavních cílů mé práce podchycení možných změn v množství sacharidů importovaných do vzrostného vrcholu rostlin. Vzhledem k ovlivnění sacharidového metabolismu u *Spcdc25* transformantů nelze vyloučit, že se navýšení hladiny sacharidů vyvolané expresí genu *Spcdc25* může promítnout do regulace kvetení.

4.1.1. Hladiny rozpustných sacharidů ve floémové šťávě

Změny v hladinách sacharidů v apexu ve vztahu k přechodu ke kvetení byly diskutovány v literárním úvodu. Předpokládanou signální roli sacharidů v této vývojové změně však dosud nikdo blíže nespecifikoval. Pro podchycení možné změny v dostupnosti sacharidů apikálnímu meristému byla sledována hladina sacharidů ve floémové šťávě dekapitovaných rostlin (graf 1). Z výsledků vyplývá, že k navýšení sacharidů importovaných do vzrostného vrcholu u transformantů nedošlo. Naopak byl patrný opačný trend, tedy snížení hladiny sacharidů u transformovaných rostlin oproti kontrole. Tento rozdíl byl statisticky průkazný mezi kontrolou a transformantem C v jednom opakování (graf 1). Obdobných výsledků dosáhla Petra Vojvodová (2005), která ve své diplomové práci však používala techniku, která dosud nebyla optimalizována. Následkem toho bylo malé množství získaných vzorků. Vojvodová (2005) rovněž pozorovala velkou variabilitu v získaných datech, což bylo připisováno jak malému souboru testovaných rostlin, tak problémům s difuzí floémové šťávy do používaného tuhého média. Nicméně data získaná v mé práci, kdy již byly tyto technické problémy odstraněny, jsou v souladu s daty Vojvodové (2005). V žádném ze čtyř experimentů Vojvodové nebylo pozorováno zvýšení hladiny sacharidů u transformantů oproti kontrole. Ve dvou experimentech naopak u jednoho či obou zkoumaných transformantů (linie A a C) došlo k statisticky průkaznému poklesu hladiny sacharidů (Vojvodová, 2005).

Vzhledem k velké variabilitě získaných dat z obsahu sacharidů ve floémové šťávě bylo přistoupeno rovněž k detekci množství sacharidů ve vzrostném vrcholu. Zde však byl oproti očekávání zjištěn opačný trend. Celkové množství sacharidů bylo u transformantů oproti kontrole zvýšeno u jednoho opakování, u druhého se hodnoty statisticky významně nelišily (graf 2 a 3). Analýza spektra rozpustných sacharidů ukázala na signifikantní zvýšení glukózy v obou opakováních (graf 2 a 3). Opačný trend pozorovaný v celkových hladinách sacharidů ve floémovém exudátu a v sušině vzrostného vrcholu může být zdůvodněn dvojím způsobem.

Prvním z nich je skutečnost, že aktuální hladina sacharidů v apexu nemusí být bezprostředním odrazem jejich importu. Vzhledem k tomu, že sacharidový metabolismus je vlivem exprese *cdc25* změněn (Teichmanová et al., 2007; Suchomelová-Mašková et al., 2008; Čiháková, 2009), lze si představit rozdílnou rychlost ve štěpení, ukládání a mobilizaci sacharidů ve vzrostném vrcholu u transformanta oproti kontrole. Zjištění hladiny množství zásobního sacharidu - škrobu - u transformanta a kontroly by jistě přispělo k lepšímu vhledu do změn v distribuci sacharidů v apexu. Množství škrobu u tohoto materiálu se však kvůli technickým problémům s měřícím systémem HPLC bohužel nepodařilo stanovit. Snížená hladina sacharidů v najímaných exudátech transformanta by mohla být dána do souvislosti s možnou odlišností stavby stonku oproti kontrole. Anatomii stavby stonku u tohoto materiálu se zabývala Čiháková (2009), která však podrobněji analyzovala pouze bazální část stonků. Byla zde mimo jiné hodnocena šířka stonků, která byla u transformantů signifikantně menší. Z obrazového materiálu ale vyplývá, že pro internodium pod vzrostným vrcholem tato skutečnost neplatí. Zde se mezi variantami nejeví výraznější rozdíl. Rovněž při jímání exudátu byla v šířce horní části stonku pozorována spíše větší variabilita uvnitř jednotlivých souborů rostlin konkrétní varianty nežli mezi variantami samotnými. Čiháková (2009) rovněž ve stonku daného experimentálního materiálu zkoumala změny v zastoupení jednotlivých typů pletiv, ovšem opět v jeho bazální části. Zde byla plocha floému u transformanta zmenšena. Pro apikální část stonku ovšem obdobná data chybějí. Na základě stavby báze stonku se však jeví pravděpodobnější, že případná změna ve velikosti floému v horní části stonku bude u transformantů *cdc25* spočívat spíše v redukci nežli zvětšení plochy floému. Možná redukce transportní cesty sacharidů do apexu by mohla mít souvislost se snížením množství floémové šťávy (a tedy i sacharidů), která floémem proteče za časovou jednotku. Stanovení celkového obsahu floémové šťávy ve vzorcích by však vyžadovalo použití odlišných technik jímání exudátu.

Druhou možností vysvětlení nesouladu trendu mezi obsahem sacharidů v najímaných vzorcích exudátu a množstvím sacharidů detekovaném ve vzrostném vrcholu u transformanta a kontroly je zpochybnění, zda najímané vzorky odrážejí skutečné poměry v rostlině. K této hypotéze mě vedla přítomnost odlehlých výsledků vysokých hodnot u všech variant (v grafech speciálně nevyznačeny). Je velice nepravděpodobné, že by v rámci stejné varianty a stejné vývojové fáze jedna rostlina transportovala ve stejném časovém úseku floémem několikanásobně vyšší množství sacharidů oproti rostlině jiné. Výsledky spíše ukazují na postupné zasychání floémového toku v průběhu periody jímání. Autoři metody jímání exudátů pomocí EDTA (King a Zeevaart, 1974) pracující s rostlinou *Perilla*

crispa považovali za optimální 2-4 hodiny jímání exudátu. Nutno ovšem dodat, že stanovovali floémový exudát z izolovaných listů a u tohoto materiálu po 4 hodinách došlo k postupnému snížení exportu sacharidů. To však vzhledem k izolovanosti zkoumaných orgánů mohlo mít jinou příčinu než zasychání floémového toku. Rovněž pro detekci sacharidů používali radioaktivně značený uhlík, tudíž metodu s odlišnou citlivostí než stanovování pomocí HPLC užitá v této práci. Pomocí HPLC oproti tomu stanovovali množství sacharidů ve floému *Sinapis* Lejeune et al (1991; 1993). Zde byla pro jímání sacharidů rovněž dostatečná doba 4 hodiny (jiný časový rozsah nebyl testován). Pro analýzu cytokininů však byla u *Arabidopsis* volena doba jímání floémového exudátu z izolovaných listů 16 hodin (Corbesier et al., 2003), tudíž používaná koncentrace EDTA by měla být dostatečná pro udržení floémového toku i pro delší časový úsek. Lze si však představit, že použitá koncentrace nemusí být dostatečná pro každý rostlinný materiál, či že o výsledku rovněž rozhodují technické odchylky ve vlastním sběru exudátů (vyplývající z odlišné architektury testovaných rostlin a z použití různých částí rostlin). Zkrácení intervalu jímání na čtyři hodiny se u tabáku neukázalo jako vhodná cesta (data neukázána), protože většina vzorků měla obsah sacharidů pod hranicí detekce námi používaného systému. Osobně se ale nedomnívám, že by další testování doby jímání vedlo k optimalizaci dat, vzhledem k přítomnosti i velmi nízkých hodnot (téměř u hranice detekce) u všech variant při jímání 24 hodin. Zajímavá je také úvaha, zda by mohl být floémový tok více náchylný k zástavě u transformantů nežli u kontroly. Data prezentovaná v této práci i v práci Vojvodové (2005) by poté nebyla odrazem rozdílu v distribuci sacharidů mezi transformanty a kontrolou, nýbrž rozdílu ve stavbě a funkci vodivých pletiv, která by se projevila až při tomto konkrétním zásahu do rostliny. Ovšem vzhledem k nedostatku dalších údajů nezbyvá nežli nechat celou tuto problematiku otevřenou.

4.1.2. Hladiny endogenních sacharidů ve vzrostném vrcholu tabáku

Na základě literárních údajů (především však týkajících se fotoperiodicky citlivých rostlin) se navýšení sacharidů v apexu jeví jako jeden z důsledků a nikoliv příčina prvotních změn vedoucích k přechodu do generativní fáze. Literární data u fotoperiodicky citlivých rostlin nasvědčují tomu, že zvýšení sacharidů a (předpokládaná) s ním spojená signalizace má v signální kaskádě (více či méně rozvětvené) místo za fotoperiodickou signalizací zprostředkovanou pomocí FT a před realizací cytokininového signálu (King a Evans, 1991; McDaniel, 1991; Bernier et al., 1993; Bernier et al., 2002; King, 2012). U neutrálních rostlin bohužel práce obdobného zaměření neexistují. Funkce homologů FT v regulaci kvetení je u

neutrálních rostlin sice prokázána (Molinero-Rosales et al., 2004; Lifschitz et al., 2006), ale význam této regulační dráhy ve vztahu k dalším drahám (jejichž existence je u neutrálních rostlin spíše jen předpokládána) není znám. Z nedostatku literárních údajů není tedy možno rozhodnout, zda umělý zásah do fotoperiodicky necitlivé rostliny vedoucí ke zvýšení hladiny sacharidů může mít za následek indukci kvetení. Nabízí se zde možnost ovlivnění dalších regulačních drah zvýšením hladiny sacharidů. Zvýšení hladiny sacharidů například stimulovalo transport cytokininů z kořenů (Havelange et al., 2000).

V této práci bylo pozorováno signifikantní zvýšení hladiny sacharidů ve vzrostném vrcholu transformantů pouze v jednom opakování ze dvou. V obou opakováních však došlo k signifikantnímu zvýšení obsahu glukózy a naskýtá se tedy otázka, zda by s pozorovaným urychlením kvetení nemohla nějakým způsobem souviset právě tato skutečnost. Bylo zjištěno, že aplikace glukózy může mít stejný stimulační účinek na kvetení jako sacharóza (Roldán et al., 1999; Havelange et al., 2000). V některých pracích byl dokonce pozorován silnější stimulační účinek na nástup kvetení u glukózy než sacharózy (Durdan et al., 2000; Taylor et al., 2007). Nelze tedy vyloučit, že i u tabáku může mít glukóza stimulační účinek na iniciaci kvetení. Při úvahách o možných příčinách urychleného kvetení u rostlin tabáku exprimujících *Spcdc25* je tedy třeba brát v potaz i zjištěné zvýšení obsahu glukózy. Zda však zvýšení glukózy v tomto případě skutečně hraje roli, nelze bez dalšího studia rozhodnout.

4.1.3. Možná role invertázy ve změnách hladin rozpustných sacharidů tabáku

Ve vzrostném vrcholu transformovaných rostlin tabáku došlo ke zvýšení hexóz na úkor sacharózy (především pak glukózy) (graf 2 - 3). Tento jev nabízí spojitost se změnou množství či aktivity enzymu štěpícího sacharózu – invertázy. Kyselá invertáza je totiž považovaná za zásadní enzym měnící dostupnost cukrů apikálnímu meristému (Pryke a Bernier, 1978; Havelange et al., 1986; Bernier et al., 2002; Heyer et al., 2004; Ranwala a Miller, 2008; Iqbal et al., 2011). Heyer a spolupracovníci (2004) pozorovali, že exprese extracelulární invertázy pod promotorem specifickým pro apikální meristém, vedla u *Arabidopsis* kultivované na indukční fotoperiodě k urychlení kvetení. Vzhledem k tomu, že tento enzym má kromě funkce štěpení sacharózy i funkci signalizační, je otázka, zda urychlený nástup kvetení byl zajištěn zvýšenou dodávkou hexóz a zesílením signalizace s nimi spojené či signalizací samotné invertázy. Pokud by došlo ke zvýšení hladiny invertázy i v transformantech *Spcdc25*, bylo by možné pohlížet na případné ovlivnění kvetení spojené se změnou sacharidového metabolismu i z tohoto úhlu. To znamená, že nemusí být

rozhodující hladina glukózy (a s ní spojená signalizace), ale rozhodujícím může být signál vyvolaný štěpením sacharózy invertázou. Ovšem na druhou stranu tento signál nemůže být stěžejní v pracích, kde autoři sledovali stejný účinek hexóz a sacharózy při ovlivnění kvetení (Roldán et al., 1999; Havelange et al., 2000). Invertáza se rovněž podílí na modulaci transportu na dlouhou vzdálenost, protože její činnost reguluje sacharózový gradient a tak zvyšuje sílu sinku (Godt a Roitsch, 1997; Roitsch, 1999). Z toho důvodu by se dalo očekávat, že vyšší exprese invertázy v apexu může vést i k zvýšení vtoku sacharidů do apexu. Takovéto zvýšení nebylo u transformantů *cdc25* na základě analýzy floémového exudátu prokázáno (graf 1). Pro podchycení možných změn v aktivitě a lokalizaci invertázy u rostlin tabáku exprimujících gen *cdc25* byla vizualizována aktivita invertázy (EC 3.2.1.26; použitá metoda neumožňuje rozlišit jednotlivé typy tohoto enzymu; Sergeeva a Breugdenhil, 2002) v apikálním meristému, stonkovém internodiu pod apexem a řapíku listu. Bylo zjištěno, že ruční podélné řezy apikálním meristémem jsou k určení aktivity invertázy nevhodné. Zvýšení aktivity invertázy ve vzrostném vrcholu lze tedy pouze předpokládat na základě nepřímého důkazu, čímž je posun poměru hexós k sacharóze a soulad s cytokinin-like efektem (o souvislosti mezi cytokininy a invertázou bude pojednáno dále). Jako vhodný materiál pro sledování aktivity invertázy ve zbylé části prýtu se ukázal příčný řez řapíkem. Zde nebyla zaznamenána změna v lokalizaci invertázy mezi transformanty a kontrolou. Nejsilnější aktivita invertázy byla detekována na adaxiální straně řapíku, nejslaběji v povrchových vrstvách buněk řapíku. Kromě v této práci prezentovaného posunu ve spektru sacharidů ve vzrostném vrcholu, byl v předchozích experimentech zjištěn slabý posun spektra sacharidů i v listech rostlin transformantů ve vegetativní fázi (Vojvodová, 2005; Čiháková, 2009). U transformantů došlo k navýšení podílu hexóz, což by mohlo ukazovat na zvýšení aktivity invertázy i ve zbytku prýtu. Oproti očekávání zvýšené aktivity, bylo v obou provedených experimentech zaznamenáno následující pořadí variant, ve kterém se první řezy začaly barvit: nejprve transformant C, poté kontrola a nakonec transformant A. Daným stanovením tedy nebyl prokázán rozdíl transformantů oproti kontrole v aktivitě a lokalizaci invertázy. Nicméně použití jiné metody určené primárně pro kvantifikaci aktivity tohoto enzymu by mohlo vést k přesnějším výsledkům. Překvapivě výrazný posun v poměru sacharózy k hexózám u transformantů, ale opačným směrem než u prýtu intaktních rostlin, byl zjištěn u buněčných suspenzí odvozených ze stonkových segmentů transformantů (Suchomelová-Mašková et al., 2008). Za tuto skutečnost patrně může velmi rozdílná regulace metabolismu izolovaných buněk a intaktních rostlin, nicméně vzhledem k jinak

obdobným výsledkům dosažených na různém materiálu odvozeném z rostlin exprimujících *cdc25* je zmíněný fakt překvapivý.

4.2. Molekulární úroveň regulace kvetení u tabáku transformovaného genem *Spcdc25*

Vzhledem k urychlení nástupu kvetení transformantů v podmínkách *in vivo* i *in vitro* (Bell et al., 1993; Smoloňová, 2003; Vojvodová et al., 2005; Teichmanová et al., 2007) byla v této práci zaměřena pozornost i na charakteristiku míry exprese vybraných genů, u kterých byla objasněna (alespoň na modelové rostlině *Arabidopsis*) úloha v regulaci kvetení. Jak již bylo řečeno, FT či jeho homolog u neutrálních rostlin prokazatelně časování nástupu kvetení ovlivňuje (Huang et al., 2005; Lifschitz et al., 2006). Stanovení jeho hladiny však nebylo cílem předkládané práce, která se zaměřovala na geny exprimující se v oblasti apikálního meristému. Apikální meristém byl vybrán kvůli výsledkům roubovacích experimentů vegetativních rostlin provedených Smoloňovou (2003) a Vojvodovou (2005). Roub zbavený listů vždy obsahoval vzrostný vrchol, podnož byla tvořena v závislosti na experimentu různým počtem listů. Ukázalo se, že pro nástup kvetení je stěžejní původ roubu, nikoliv původ podnože. To vedlo k nepřímému důkazu, že v časování kvetení transformantů nehraje roli případná změna hladiny dosud neidentifikovaného homologu FT. I přes to, že na základě popsaných experimentů exprese *cdc25* nezasáhla do regulace kvetení působením na změnu exprese FT, může být signální cesta závislá na FT změněna. Ovlivněním exprese genu pro partnera FT - FD - lze rovněž zasáhnout do časování kvetení. Mutant defektní ve funkci FD u *Arabidopsis* vykazoval zpoždění v kvetení, kdežto zvýšení jeho exprese naopak vedlo k dřívějšímu kvetení (Abe et al., 2005). Dopady manipulace exprese rajčatového homologu FD (*SPGB*) nejsou v literatuře známy. U testovaných rostlin nebyl zjištěn v míře exprese FD žádný rozdíl mezi transformanty a kontrolou (obrázek 3.4).

Bylo však zjištěno, že u transformantů došlo k navýšení hladiny *NtSOC1*, jednoho z prvních genů, u něhož nastává u fotoperiodicky citlivých rostlin zesílení exprese po obdržení fotoperiodického indukčního signálu. Stejně jako u fotoperiodicky citlivých i u neutrálních rostlin umělé navýšení exprese *NtSOC1* vede k urychlení kvetení (Smykal et al., 2007, Jang et al., 2009). Tento gen má u rostlin integrační funkci, protože v regulaci hladiny SOC1 se stýká množstvím signálních drah. Není důvod domnívat se, že u neutrálních rostlin nebude mít homolog daného genu obdobně důležitý význam. Jedna ze signálních drah vedoucích ke změně exprese *SOC1* je u *Arabidopsis* i dráha závislá na věku. U neutrálních

rostlin stoupá kompetence apikálního meristému ke kvetení rovněž se stářím rostliny (Singer et al., 1992). Na rozdíl od starších prací však současná literatura zabývající se molekulárními aspekty kvetení s termínem kompetence pracuje již vzácně (výjimka např. Searle et al., 2006). Proto nelze na základě nových poznatků definovat, s jakými událostmi na úrovni hladiny konkrétních proteinů v apikálním meristému je tento termín spjat. Jako jeden z kandidátů by se mohl jevit právě *SOC1*, nejen díky tomu, že jeho hladina stoupá s věkem rostliny (Srikanth a Schmid, 2011), ale i kvůli tomu, že ošetření chladem u rostlin s vernalizačním požadavkem vede k represi represoru *SOC1 - FLC* - a jen takto ošetřené rostliny jsou kompetentní k přijetí fotoperiodického signálu (Searle et al., 2006). Pouze u kompetentního meristému může být působením indukčních faktorů navozena determinace ke kvetení. Pozorované zvýšení míry exprese *SOC1* u transformantů *Spcdc25* může se změnou v získání kompetence meristému k přijetí indukčního signálu (signálů) souviset.

Dalším genem, u kterého byla v této práci stanovována míra exprese, je *LFY*. Zvýšení exprese *LFY* je známkou determinace meristému ke kvetení. V případě meristému vytvářejícího květenství je však situace o něco složitější a dané tvrzení je příliš zjednodušující. U otevřeného květenství, kdy apikální meristém tvoří terminální květ ale další a další květní struktury, se pojmem „determinovaný meristém“ rozumí meristém odvozený od apikálního (vznikající na jeho okraji), který dává vznik květním strukturám. Takto z apikálního meristému vznikají další a další květní meristémy a z nich květy (nebo větve s ukončeným růstem nesoucí květy). V těchto determinovaných meristémech se *LFY* silně exprimuje. Pro samotný apikální meristém kvetoucí rostliny s otevřeným typem květenství se používá pojem „nedeterminovaný meristém“, zde k expresi *LFY* nedochází. Otevřený typ květenství má *Arabidopsis*. V případě uzavřeného květenství (rajče a tabák) vzniká jako první květ terminální a ostatní květy vznikají z již založených úžlabních pupenů bazipetálně od apexu (Benlloch et al., 2007). Zde se *LFY* v apikálním meristému exprimuje (Amaya et al., 1999; Pnueli et al., 1998; Molinero-Rosales et al., 1999). U transformantů *cdc25* oproti kontrole ke zvýšení exprese homologu *LFY* (*NFL1/LFY*) nedošlo (obrázek 3.7). To je v souladu s očekáváním, protože stanovení exprese bylo provedeno u rostlin ve fázi růstu, která je na základě předchozích prací našeho týmu pokládána za vegetativní.

Dalším genem, jehož míra exprese byla ve vzrostných vrcholech stanovena, byl tabákový homolog *TFL1* (*CET2/TFL1*). Produkt tohoto genu u rostlin rovněž tvoří dimer s *FD* (Abe et al., 2005; Wigge et al., 2005) a předpokládá se, že mezi *FT* a *TFL1* existuje kompetiční vztah o vazbu s *FD* (Turnbull, 2011). *TFL1* u *Arabidopsis* je důležitý pro udržení apikálního meristému v nedeterminovaném stavu, aby byl meristém stále schopen tvořit

další a další květní struktury. Zvýšená exprese TFL1 vede k oddálení kvetení z důvodu existence negativní regulace exprese mezi TFL1 a LFY s AP1 (Benlloch et al., 2007). Pokud by tabákový homolog TFL1 zodpovídal za pozorované urychlení kvetení transformantů *Spdc25* (Bell et al., 1993), hladina TFL1 by u transformantů měla být oproti kontrole snížena. To však v předkládané práci pozorováno nebylo (obrázek 3.6). V interpretaci tohoto výsledku je třeba být opatrnější a nepřijímat fakta získaná na *Arabidopsis* jako daná i pro tabák. Jak již bylo řečeno, *Arabidopsis* má na rozdíl od rajčete a tabáku otevřené květenství. TFL1 se zde exprimuje v apikálním meristému pro jeho udržení v nedeterminovaném stavu. Kvůli jeho slabšímu vlivu v primordiích se vlivem LFY z přítomných meristémů začínají tvořit květní struktury (Blázquez et al., 1997; Conti a Bradley, 2007). V případě uzavřeného květenství dochází naopak nejdříve k tvorbě květu z apikálního meristému. U tabáku bylo zjištěno, že se (na rozdíl od *Arabidopsis*) homolog LFY ve vegetativní fázi exprimuje především v apikálním meristému, jeho hladina s přechodem ke kvetení stoupá (Amaya et al., 1999). Hlavním místem exprese homologu TFL1 jsou oproti tomu základy úžlabních pupenů vznikající na okraji apikálního meristému. Po utvoření terminálního květu i zde stoupá exprese LFY (Amaya et al., 1999). Z toho důvodu případná změna v hladině TFL1 (pokud bychom očekávali její snížení vlivem transformace) patrně nezasáhne samotný apikální meristém a možné ovlivnění nástupu kvetení je zde sporné. Na druhou stranu vzhledem k tomu, že nebyly provedeny experimenty s manipulací exprese homologu TFL1 u tabáku nelze říci, zda by skutečně k změně v časování kvetení nedošlo. Překvapivé rovněž je, že u rajčete se stejným typem květenství jako u tabáku se homolog TFL1 (SP) exprimuje stejně jako homolog LFY v celém apikálním meristému i primordiích. Ačkoliv tedy nedochází k oddělení oblastí exprese obou genů, funkce daných proteinů v regulaci kvetení je stejná jako u *Arabidopsis*, (Pnueli et al., 1998; Molinero-Rosales et al., 1999).

Vedle zmíněných genů byla stanovována rovněž míra exprese *NtWUS*, který se exprimuje v centrální oblasti meristému. Tento gen byl vybrán jako marker meristemického pletiva. Jakékoliv další úvahy o vztahu míry exprese a velikosti meristému (meristémů) ve vzrostných vrcholech rostlin ztěžuje fakt, že hladina tohoto proteinu je mimo jiné regulována cytokininy (Leibfried et al., 2005; Xie et al., 2009; Chandler, 2011) a jak již bylo zmíněno, transformanty vykazují cytokinin-like efekt.

Z uvedených výsledků je tedy zřejmé, že u transformantů dochází k zvýšení hladiny homologu *SOC1*. To by mohlo souviset s dřívějším získáním kompetence transformantů ke kvetení či by to dokonce mohlo indikovat již první změny kompetentního meristému postupně vedoucí ke kvetení. Nárůst *NtSOC1* je u neutrálních rostlin pozvolný (Smykal et

al., 2007) a nelze říci, v jaké fázi je ovlivněn právě cestou závislou na FT. To, zda je hladina *NtSOC1* u transformantů oproti kontrole stabilně zvýšena během vegetativního vývoje, či zda prezentované výsledky zachytily nárůst, nastávající až při určitém stáří transformovaných rostlin nelze na základě získaných dat rozhodnout. Vzhledem k tomu, že tvar apikálního meristému už velmi záhy po vyklíčení ukazuje změny ve tvaru jinak související s přechodem rostlin ke kvetení (Vojvodová, nepublikováno) nelze ani myšlenku velmi rané kompetence meristému k přijetí květního stimulu vyloučit. Vzhledem k tomu, že pro předchozí roubovací experimenty byly použity rostliny v obdobné fázi vývoje jako ty, u kterých byla v této práci sledována míra exprese vybraných genů (počítáno na základě počtu dospělých listů) (Vojvodová, 2005), nelze zavrhnout ani možnost, že signál z dospělých listů v tomto případě v meristému transformantů dokázal spustit určité změny ještě před vlastním roubováním. To zda přítomné dospělé listy dokáží vytvořit dostatečně silný indukční signál je otázkou. Lze si představit, že ano a zároveň, že meristém transformantů se z dosud neobjasněných důvodů stává dříve kompetentním k přijetí tohoto signálu nežli meristém kontroly. Lze si rovněž představit, že dostatečně silný indukční signál v listech v této fázi dokáže produkovat pouze transformant. Proto by bylo zajímavé rovněž stanovení exprese dosud neidentifikovaného FT v listech transformanta a kontroly. Pokud by u transformanta nebyla zjištěna změna exprese tohoto genu (genů), dráha závislá na FT by určitě na urychlení kvetení neparticipovala. Další komponenty související s touto dráhou totiž nebyly transformací poznamenány (obrázek 3.4, 3.5, 3.6, 3.7).

4.3. Cytokinin-like efekt v kontextu získaných poznatků

Jak již bylo zmíněno, transformanty *Spcdc25* vykazují v mnoha směrech chování, jež se dá u kontrol navodit aplikací cytokininů (Lipavská et al., 2011). Vzhledem k tomu, že celková hladina cytokininů stanovovaná u buněčných suspenzí je u transformantů ve skutečnosti nižší oproti kontrole (Suchomelová-Mašková et al., 2008), nedají se změny přičíst fyzické přítomnosti cytokininů, ale zásahu do cytokininové signalizace. Vedle organogenní odpovědi, kdy transformanty tvořily více prýtů na úkor kořenů, byl tento efekt pozorován například i v redukci kořenového systému intaktních rostlin, zvýšeného prorůstání úžlabních pupenů a zvýšení obsahu škrobu u buněčných suspenzí. Všechny tyto jevy jsou v literatuře dávány do souvislosti s působením cytokininů (Coenen a Lomax, 1997). Vztah mezi cytokininovou signalizací a defosforylačním krokem souvisejícím se vstupem do mitózy našli Zhang et al. (1996, 2005). Zjistili, že defosforylaci (čili krok, který u živočichů a hub zajišťuje fosfatáza Cdc25) lze v rostlinných buňkách kromě exprese

Spdc25 rovněž navodit aplikací cytokininu. Lze tedy spolu s autory předpokládat, že dosud neznámá fosfatáza skutečně bude zahrnuta v cytokininové signalizaci a bylo by možné, že exprese kvasinkové fosfatázy by mohla být vnímána u rostlin obdobným způsobem jako působení cytokininů.

Cytokininy mimo jiné hrají roli i v regulaci nástupu kvetení (Besnard-Wibaut, 1981; Bernier, 1988; Chang et al. 1999; Dielen et al., 2001; Werner et al., 2001). V přechodu rostlin ke kvetení, bylo zjištěno synergické působení cytokininů a sacharidů (Bernier et al., 1993), které by mohlo spočívat ve vzájemné stimulaci transportu těchto látek do apexu (Thomas a Blakesley, 1987; Havelange et al., 2000; Gibson et al., 2004). Z předchozích experimentů našeho týmu je známo, že aplikace roztoku sacharózy s cytokininy (BAP) nevedla k urychlení kvetení neutrálního tabáku (Vojvodová, osobní sdělení). Nicméně, jak bylo ukázáno v literárním přehledu, účinek cytokininů na kvetení je závislý na jeho typu a jako hlavní typ cytokininů figurující v iniciaci kvetení se jeví iP typ (He a Loh, 2002; Jacquard et al., 2002).

Cytokininy zasahují do cukerného metabolismu například v regulaci exprese extracelulární invertázy i hexokináz. V obou případech stimulují expresi daných enzymů (Roitsch a Ehness, 2000). U rostlin ošetřených cytokininem došlo k akumulaci hexóz ve zkoumaných pletivech, jimiž v této práci byly listy (Gonzalez-Santos et al., 2009). Literární data jsou tedy v souladu s pozorovaným posunem spektra sacharidů u transformantů, který byl méně výrazný u listů intaktních rostlin (Vojvodová, 2005; Čiháková, 2009) a více výrazný v případě pletiv vzrostného vrcholu (graf 2, 3).

Možná cesta působení cytokininů na kvetení vede skrze ovlivnění buněčného cyklu. Cytokininy pozitivně ovlivňují průchod buněk buněčným cyklem (del Pozo et al., 2005) a zvýšení mitotické aktivity meristému je spojeno s nástupem kvetení (Kwiatkowska, 2008). Při výzkumu buněčného cyklu vyšlo najevo, že s přechody mezi jednotlivými fázemi buněčného cyklu koreluje i zvýšení endogenní hladiny cytokininů (Hartig a Beck, 2005). Role těchto fytohormonů byla zjištěna při regulaci přechodu G1/S a G2/M i pro průchod S fází Houssa et al., 1994; del Pozo et al., 2005).

Role v buněčném cyklu byla přiznána rovněž sacharidům (Riou-Khamlichi et al., 2000). Cytokininy svým působením na extracelulární invertázy zajišťují buňkám zvýšený přísun hexóz. Vzhledem k tomu, že zvýšení aktivity extracelulárních invertáz vede ke zvýšení síly sinku (Roitsch a Ehness, 2000), cytokininy přes stimulaci invertáz patrně buňkám zvyšují i celkový přísun sacharidů. Pozitivní vliv sacharidů ve stimulaci buněčného cyklu proto může být rovněž dáván do spojitosti s cytokininy. U prací porovnávajících vliv

sacharózy i glukózy byla exprese sledovaných genů stimulovaná oběma typy sacharidů. Tento jev byl pozorován u exprese genů kódujících D typy cyklinů i genů pro CDKB (Riou-Khamlichi et al., 2000; Joubes et al. 2001). Nelze tedy vyloučit, že zvýšené množství glukózy ve vzrostných vrcholech transformantů *Spcdc25* pozorované v předkládané práci může rovněž hrát roli v regulaci buněčného cyklu buněk meristému.

4.4. Charakteristika *Spcdc25* transformanta *Arabidopsis* a jeho porovnání s *Spcdc25* tabákem

Vzhledem k tomu, že u rostlin tabáku vedla exprese *cdc25* k urychlení nástupu kvetení (Bell et al., 1993; Smoloňová, 2003; Vojvodová, 2005), byl tento vývojový krok sledován i u rostlin *Arabidopsis* transformovaných tímtež genem.

Urychlení nástupu kvetení vyvolané expresí *Spcdc25* bylo zaznamenáno již Bellem a spolupracovníky (1993), který rostliny tabáku kvasinkovým genem transformoval. Autor rovněž zjistil zvýšení množství květů u transformantů. To nepozorovala Smoloňová (2003), která se kvetením u transformantů v podmínkách *in vivo* i *in vitro* zabývala. Zjistila, že v obojím uspořádání dochází k urychlení kvetení. Transformanty kvetly dříve a při menším počtu listů nežli kontroly. Zatímco kontrola vykvetla při přibližně čtyřiceti dospělých listech, transformanty kvetly již při deseti (Smoloňová, 2003; Vojvodová, 2005). Počet listů se ukázal jako stabilnější parametr nežli doba do nástupu kvetení.

Arabidopsis je fakultativně dlouhodobá rostlina, v indukčních podmínkách je signál z fotoperiodické dráhy zodpovědný za přechod rostlin do generativní fáze. V neindukčních podmínkách je kvetení výrazně oddáleno a nastává působením jiných indukčních cest nezávislých na fotoperiodickém signálu (Moon et al., 2003). Při kultivaci na indukční fotoperiodě nebyl zjištěn rozdíl v době nástupu kvetení mezi transformantem a kontrolou. Ani případný rozdíl ve kvetení transformantů by však nevedl k jednoznačnému závěru, že expresí *Spcdc25* je zasaženo do dráhy nezávislé na FT. Exprese *FT* je u *Arabidopsis* regulována nejen CO, jehož hladina je závislá na fotoperiodě, ale i represorem kvetení *FLC*. V jeho regulaci se stýkají další dráhy včetně dráhy autonomní (Simpson, 2004). Lze si představit, že signalizace přes CO při indukční fotoperiodě může „přebít“ případnou změnu (vyvolanou expresí *Spcdc25*) v jiných drahách regulujících hladinu FT. Tato změna by se poté projevila až za neindukčních podmínek. Z předkládaných výsledků však vyplývá, že ani za neindukční fotoperiody nebyl nástup kvetení transformanta *Arabidopsis* urychlen (graf 5, 6 a 7). Transformant kvetl dříve pouze v tom případě, kdy byly rostliny prvních 10 dní

pěstovány *in vitro*. To lze dát do vztahu s přísunem sacharidů kořenům. Ovlivnění kvetení sacharidy bylo již v předešlém textu dostatečně prodiskutováno. Vliv sacharidů na urychlení kvetení *Spdc25* transformanta *Arabidopsis* oproti kontrole by mohl ukazovat na vyšší schopnost meristému transformanta reagovat na sacharózou vyvolaný indukční signál.

Rostliny *Arabidopsis* transformované genem *cdc25* kultivované *in vivo* na rozdíl od *Spdc25* tabáku překvapivě nevykazovaly dřívější nástup kvetení. Proto byly rostliny dále charakterizovány, aby se dalo rozhodnout, zda jinak vykazují nějaké obdobné rysy jako *Spdc25* tabák. Výraznou změnou u transformantů tabáku je redukce hmotnosti kořenového systému (Smoloňová, 2003). Kořenový systém transformantů byl podrobněji analyzován Čihákovou (2009). Ukázalo se, že redukce hmotnosti spočívá v redukci délky jak hlavního tak postranních kořenů, rovněž tak v redukci počtu postranních kořenů. Všechny tyto jevy se daly navodit u kontroly aplikací cytokininů. Zajímavé bylo zjištění, že v redukci délky hlavního kořene transformantů hraje úlohu ethylen (Čiháková, 2009). Tento poznatek rovněž nebyl v rozporu s cytokinin-like efektem. Je totiž známo, že cytokininy působí zkrácení kořene přes stimulaci syntézy ethylenu (Růžička et al., 2009). Nutno ovšem dodat, že na zvýšení ethylenu se vedle cytokininů podílí i řada dalších signálních cest. U transformanta *Arabidopsis* bylo oproti výsledkům získaných na tabáku zjištěno, že zakládání kořenů bylo zvýšeno (graf 9). V obou experimentech došlo ke zvýšení počtu postranních kořenů. Stejný trend byl pozorován i při práci s rostlinami použitými pro organogenní experimenty (data neprezentována). Počet adventivních kořenů byl vyšší v jednom opakování, ve druhém nebyl mezi transformantem a kontrolou pozorován rozdíl. V tomto roce, pro mě překvapivě, vyšla publikace studující stejný experimentální materiál, který je používán v předkládané práci, transformanta *Spdc25 Arabidopsis* (Spadafora et al., 2012). Autoři se zde zabývají detailní charakterizací změn kořenového systému transformanta a získané poznatky diskutují se zjištěnými změnami v hladinách fytohormonů. Zmíněná publikace byla důvodem, proč v mojí práci nebyl kořenový systém již dále podrobněji analyzován. Nicméně publikace Spadafora a spolupracovníků (2012) umožnila srovnání získaných výsledků. Autoři rovněž pozorovali zvýšení tvorby kořenů. Zvýšeno bylo množství jak adventivních tak postranních kořenů a primordií. V délce hlavního kořene nebyla zjištěna změna. Autoři dávají pozorované změny v zakládání kořenů do souvislosti se stimulací buněčného cyklu vnesenou aktivační fosfatázou *Spdc25*.

Organogeneze *de novo* byla u tohoto materiálu taktéž studována mnou i autory (Spadafora et al., 2012). Moje výsledky neukázaly zjevný rozdíl mezi chováním transformantů a kontroly. Nicméně bylo pozorováno, že při určitých koncentracích

fytohormonů v médiu segmenty transformanta vykazovaly mírně zvýšenou tendenci ke tvorbě kalusu na úkor prýtlů. Výsledky Spadafora a spolupracovníky (2012) ukázaly, že hypokotylové segmenty transformantů produkovaly oproti kontrole větší počet kořenů. U transformantů byla pozorována také zvýšená tvorba prýtlů a kalusu, ale pouze na určitých koncentracích použitých fytohormonů. Výraznější tvorba kořenů na explantátech získaných z transformantů je v rozporu s předchozími výsledky našeho týmu na tabáku (Suchomelová et al., 2004). Zde byla tvorba kořenů u transformantů naopak redukována.

Zajímavý pohled na tuto problematiku přináší porovnání změn v hladinách endogenních cytokininů vyvolaných expresí *Spcdc25* u tabáku a *Arabidopsis* (Suchomelová-Mašková et al., 2008; Spadafora et al., 2012). U transformantů tabáku bylo celkové množství cytokininů sníženo. Množství zeatinu se mezi transformantem a kontrolou nelišilo, množství zeatin-ribosidu bylo u transformantu sníženo, oproti tomu množství iP bylo zvýšeno. U *Arabidopsis* se rovněž nelišilo množství zeatinu mezi transformantem a kontrolou, nicméně množství zbylých dvou cytokininů se výrazně lišilo. Pozorovaný trend byl ale u obou opačný oproti tabáku. Autoři bohužel nestanovovali celkové množství cytokininů. Společným pojítkem pro tabák i *Arabidopsis* exprimující *Spcdc25* se ukázala zvýšená hladina ethylenu, kterou u transformantů tabáku předpokládala Čiháková (2009) na základě experimentů s inhibitory ethylenové signalizace. Spadafora a spolupracovníci (2012) zjistili ovlivnění exprese genů zahrnutých v ethylenové signalizaci a předpoklad zvýšení hladiny ethylenu u transformovaných rostlin *Arabidopsis* potvrdili stanovením hladiny ethylenu.

Z uvedených výsledků vyplývá, že exprese *Spcdc25* v rostlinách vykazuje druhově specifickou změnu fenotypu a ačkoliv exprese do cytokininové signalizace zasahuje, cytokinin-like efekt pozorovaný na tabáku patrně nebude obecně použitelným modelem.

Závěry

Studium vlivu exprese genu *cdc25* z kvasinky *Schizosaccharomyces pombe* v tabáku (*Nicotiana tabacum* L., cv. Samsun) a huseníčku (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. cv. Columbia) na mechanismy spojené s přechodem ke kvetení vedlo k následujícím závěrům:

U tabáku:

- Hladiny sacharidů transportovaných floémem do apexu se mezi transformanty a kontrolou neliší, nebo jsou u transformantů jen velmi mírně sniženy.
- Celkové množství sacharidů v růstovém vrcholu je u transformantů stejné, nebo zvýšené oproti kontrole. Vždy je však zvýšena hladina glukózy.
- U rostlin transformovaných *Spdc25* je zvýšena míra exprese tabákového homologu *SOCI*.
- Míra exprese dalších genů (*CET2/TFL1*, *NtFD*, *NtSOCI*, *NFL1/LFY*, *NtWUS*) figurujících v regulaci kvetení není expresí *Spdc25* ovlivněna.

U Arabidopsis

- Exprese *Spdc25* nevede k časnějšímu kvetení za indukční fotoperiody.
- Exprese *Spdc25* nevede k časnějšímu kvetení za neindukční fotoperiody v případě kultivace rostlin *in vivo*. U rostlin předpěstovaných *in vitro* je však kvetení urychleno.
- Rozvoj kořenového systému je ovlivněn expresí *Spdc25*.
- Organogeneze *de novo* není výrazně ovlivněna expresí *Spdc25*.
- Cytokinin-like efekt exprese *Spdc25* není pozorovatelný.

Změny v rozvoji kořenového systému vyvolané u *Arabidopsis* expresí *Spdc25* mají opačný charakter, než bylo v předchozích pracích ukázáno u tabáku. Organogeneze *de novo* u *Arabidopsis* není výrazně ovlivněna expresí *Spdc25*, takže nevykazuje stejný trend, jaký byl dříve pozorován u tabáku. Cytokinin-like efekt exprese *Spdc25* známý z tabáku, nelze pozorovat u *Arabidopsis*.

Seznam literatury

- Abe, M., Kobayashi, Y., Yamamoto, S., Daimon, Y., Yamaguchi, A., Ikeda, Y., Inoki, H., Notaguchi, M., Goto, K., Araki, T.:** FD, a bZIP protein mediating signals from the floral pathway integrator FT at the shoot apex. *Science* 309: 1052 – 1056, 2005.
- Alberts, B., Bray, D., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P.:** *Essential Cell Biology*. Garland Publishing, Inc., New York 1998 – české vydání 2001, *Základy buněčné biologie*. Espero Publishing, s.r.o., Ústí nad Labem.
- Alvarez, J., Guli, C.L., Yu, X.-H., Smyth, D.R.:** Terminal flower: a gene affecting inflorescence development in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 2: 103 – 116, 1992.
- Amaya, I., Ratcliffe, O.J., Bradley, D.J.:** Expression of *CENTRORADIALIS (CEN)* and *CEN*-like genes in tobacco reveals a conserved mechanism controlling phase change in diverse species. *The Plant Cell* 11: 1405 – 1417, 1999.
- 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.
- Andreeva, A.V., Kutuzov, M.A.:** Protozoan protein tyrosine phosphatases. *International Journal for Parasitology* 38: 1279 – 1295, 2008.
- Ayre, B.G., Turgeon, R.:** Graft transmission of a floral stimulant derived from *CONSTANS*. *Plant Physiology* 135: 2271 – 2278, 2004.
- Bell, M.H., Halford, N.G., Ormrod, J.C., Francis, D.:** Tobacco plants transformed with *CDC25*, a mitotic inducer gene from fission yeast. *Plant Molecular Biology* 23: 445 – 451, 1993.
- Ben-Naim, O., Eshed, R., Parnis, A., Teper-Bamnolker, P., Shalit, A., Coupland, G., Samach, A., Lifschitz, E.:** The CCAAT binding factor can mediate interactions between *CONSTANS*-like proteins and DNA. *The Plant Journal* 46: 462–476, 2006.
- Benlloch, R., Berbel, A., Serrano-Mislata, A., Madueno, F.:** Floral initiation and inflorescence architecture: a comparative view. *Annals of Botany* 100: 659 – 676, 2007.
- Bernier, G.:** The control of floral evocation and morphogenesis. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 39: 175 – 219, 1988.
- Bernier, G., Corbesier, L., Périlleux, C.:** The flowering process: on the track of controlling factors in *Sinapis alba*. *Russian Journal of Plant Physiology* 49: 445 – 450, 2002.
- Bernier, G., Havelange, A., Houssa, C., Petitjean, A., Lejeune, P.:** Physiological signals that induce flowering. *The Plant Cell* 5: 1147 – 1155, 1993.

- Bernier, G., Périlleux, C.:** A physiological overview of the genetics of flowering time control. *Plant Biotechnology Journal* 3: 3 – 16, 2005.
- Besnard-Wibaut, C. 1981.** Effectiveness of gibberellins and 6-benzyladenine on flowering of *Arabidopsis thaliana*. *Physiologia Plantarum* 53: 205 – 212, 1981.
- Bhattacharjee, H., Sheng, J., Ajees, A.A., Mukhopadhyay, R., Rosen, B.P.:** Adventitious arsenate reductase activity of the catalytic domain of the human Cdc25B and Cdc25C phosphatases. *Biochemistry* 49: 802 – 809, 2010.
- Blanchard, M.G., Runkle, E.S.:** Benzyladenine Promotes flowering in *Doritaenopsis* and *Phalaenopsis* orchids. *J Plant Growth Regul* 27: 141 – 150, 2008.
- Blázquez, M.A., Green, R., Nilsson, O., Sussman, M.R., Weigel, D.:** Gibberellins Promote Reviewed Flowering of *Arabidopsis* by Activating the LEAFY Promoter. *The Plant Cell* 10: 791 – 800, 1998.
- Bleeker, P.M., Hakvoort, H.W. J., Bliet, M., Souer, E., Schat, H.:** Enhanced arsenate reduction by a CDC25-like tyrosine phosphatase explains increased phytochelatin accumulation in arsenate-tolerant *Holcus lanatus*. *The Plant Journal* 45: 917 – 929, 2006.
- Bodson, M., Outlaw, W.H. Jr.:** Elevation in the sucrose content of the shoot apical meristem of *Sinapis alba* at floral evocation. *Plant Physiology* 79: 420 – 424, 1985.
- Bonhomme, F., Kurz, B., Melzer, S., Bernier, G., Jacquard, A.:** Cytokinin and gibberellin activate *SaMADS A*, a gene apparently involved in regulation of the floral transition in *Sinapis alba*. *The Plant Journal* 24: 103 – 111, 2000.
- Borner, R., Kampmann, G., Chandler, J., Gleißner, R., Wisman, E., Apel, K., Melzer, S.:** A MADS domain gene involved in the transition to flowering in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 24: 591 – 599, 2000.
- Boruc, J., Van den Daele, H., Hollunder, J., Rombauts, S., Mylle, E., Hilson, P., Inzé, D., De Veylder, L., Russinova, E.:** Functional modules in the *Arabidopsis* core cell cycle binary protein–protein interaction network. *The Plant Cell* 22: 1264 – 1280, 2010.
- Boudolf, V., Inzé, D., De Veylder, L.:** What if higher plants lack a CDC25 phosphatase? *Trends in Plant Science* 11: 474 – 479, 2006.
- Buchanan, B., Gruissem, W., Jones, R. (eds.):** *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. Amer. Soc. Plant Physiol., 2000.
- Brenner, W.G., Romanov, G.A., Köllmer, I., Bürkle, L., Schmülling, T.:** Immediate-early and delayed cytokinin response genes of *Arabidopsis thaliana* identified by genome-wide expression profiling reveal novel cytokinin-sensitive processes and suggest cytokinin action through transcriptional cascades. *The Plant Journal* 44: 314 – 333, 2005.
- Bäurle, I., Dean, C.:** The timing of developmental transitions in plants cell. *Cell* 125: 655 – 664, 2006.

- Calvert, A.:** Effect of the early environment on the development of flowering in tomato. II. Light and temperature interactions. *J. Hort. Sci.* 34: 154 – 162, 1959.
- Chailakhyan, M.K.:** About the mechanism of the photoperiodic response. *Doklady Akademii Nauk SSSR* 1: 85 – 89, 1936. Citováno dle Lipavská et al., 2011.
- Chailakhyan, M., Khazhakyán, K.:** Interaction between leaves and shoots during efflorescence of plants of photoperiodically neutral species. *Doklady Akademii Nauk SSSR* 217: 1214 – 1217, 1974. Citováno dle McDaniel, 1996.
- Chandler, J.W.:** The hormonal regulation of flower development. *J Plant Growth Regul* 30: 242 – 254, 2011.
- Chen, W.-S., Liu, H.-Y., Liu, Z.-H., Yang, L., Chen, W.-H.:** Gibberellin and temperature influence carbohydrate content and flowering in *Phalaenopsis*. *Physiologia Plantarum* 90: 391 – 395. 1994.
- Chen, X., Zhang, Z., Liu, D., Zhang, K., Li, A., Mao, L.:** SQUAMOSA promoter-binding protein-like transcription factors: star players for plant growth and development. *Journal of Integrative Plant Biology* 52: 946 – 951, 2010.
- Coenen, C., Lomax, T.L.:** Auxin-cytokinin interactions in higher plants: old problems and new tools. *Trends in Plant Science* 2: 351 – 356, 1997.
- Conti, L., Bradley, D.:** TERMINAL FLOWER1 is a mobile signal controlling *Arabidopsis* architecture. *The Plant Cell* 19: 767 – 778, 2007.
- Cools, T., Iantcheva, A., Weimer, A.K., Boens, S., Takahashi, N., Maes, S., Van den Daele, H., Van Isterdael, G., Schnittger, A., De Veylder, L.:** The *Arabidopsis thaliana* checkpoint kinase WEE1 protects against premature vascular differentiation during replication stress. *The Plant Cell* 23: 1435 – 1448, 2011.
- Corbesier, L., Lejeune, P., Bernier, G.:** The role of carbohydrates in the induction of flowering in *Arabidopsis thaliana*: comparison between the wild type and a starchless mutant. *Planta* 206: 131 – 137, 1998.
- Corbesier, L., Kustermans, G., Périlleux, C., Melzer, S., Moritz, T., Havelange, A., Bernier, G.:** Gibberellins and the floral transition in *Sinapis alba*. *Physiologia Plantarum* 122: 152 – 158. 2004.
- Corbesier, L., Prinsen, E., Jacquard, A., Lejeune, P., Onckelen, H.V., Périlleux, C., Bernier, G.:** Cytokinin levels in leaves, leaf exudate and shoot apical meristem of *Arabidopsis thaliana* during floral transition. *Journal of Experimental Botany* 54: 2511 – 2517, 2003.
- Corbesier, L., Vincent, C., Jang, S., Fornara, F., Fan, Q., Searle, I., Giakountis, A., Farrona, S., Gissot, L., Turnbull, C., Coupland, G.:** *FT* protein movement contributes to long-distance signaling in floral induction of *Arabidopsis*. *Science* 316: 1030 – 1033, 2007.

- Čiháková K.:** Buněčný cyklus u rostlin a role signálních molekul v jeho regulaci. Bakalářská práce. Katedra fyziologie rostlin PřF UK Praha, 2006.
- Čiháková, K.:** Vliv transformace kvasinkovým genem *Spcdc25* na stavbu kořenového systému tabáku. Diplomová práce. Katedra fyziologie rostlin PřF UK Praha, 2009.
- D'Aloia, M., Bonhomme, D., Bouché, F., Tamseddak, K., Ormenese, S., Torti, S., Coupland, G., Périlleux, C.:** Cytokinin promotes flowering of *Arabidopsis* via transcriptional activation of the *FT* paralogue *TSF*. *The Plant Journal* 65: 972–979, 2011.
- Davies, P.J.:** Cytokinin regulation of the cell division cycle. In: Davies, P.J. (ed), *Plant Hormones: Biosynthesis, Signal Transduction, Action!* Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1 – 15, 2004.
- Day, J.S., Loveys, B.R., Aspinall, D.:** Cytokinin and carbohydrate changes during flowering of boronia-megastigma. *Australian Journal of Plant Physiology* 22: 57 – 65, 1995.
- De Schutter, K., Joubès, J., Cools, T., Verkest, A., Corellou, F., Babiychuk, E., Van Der Schueren, E., Beeckman, T., Kushnir, S., Inzé, D., De Veylder, L.:** *Arabidopsis* WEE1 kinase controls cell cycle arrest in response to activation of the DNA integrity checkpoint. *The Plant Cell* 19: 211 – 225, 2007.
- De Veylder, L., Beeckman, T., Inzé, D.:** The ins and outs of the plant cell cycle. *Nature reviews* 8: 655 – 665, 2007.
- Del Pozo, J.C., Lopez-Matas, M.A., Ramirez-Parra, E., Gutierrez, C.:** Hormonal control of the plant cell cycle. *Physiologia Plantarum* 123: 173 – 183, 2005.
- Dewitte, W., Chiappetta, A., Azmi, A., Witters, E., Strnad, M., Rembur, J., Noin, M., Chriqui, D., Van Onckelen, H.:** Dynamics of cytokinins in apical shoot meristems of a day-neutral tobacco during floral transition and flower formation. *Plant Physiology* 119: 111 – 121, 1999.
- Dewitte, W., Murray, J.A.H.:** The plant cell cycle. *Annual Review of Plant Biology* 54: 235 – 264, 2003.
- Dhankher, O.P., Rosen, B.P., McKinney, E.C., Meagher, R.B.:** Hyperaccumulation of arsenic in the shoots of *Arabidopsis* silenced for arsenate reductase (*ACR2*). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103: 5413 – 5418, 2006.
- Dielen, V., Lecouvet, V., Dupont, S., Kinet, J.-M.:** *In vitro* control of floral transition in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.), the model for autonomously flowering plants, using the late flowering *uniflora* mutant. *Journal of Experimental Botany* 52: 715 – 723, 2001.
- Dissmeyer, N., Weimer, A.K., Pusch, S., De Schutter, K., Kamei, C.L.A., Nowack, M.K., Novak, B., Duan, G.L., Zhu, Y.G., De Veylder, L., Schnittger, A.:** Control of Cell Proliferation, Organ Growth, and DNA Damage Response Operate Independently of Dephosphorylation of the *Arabidopsis* Cdk1 Homolog CDKA;1. *The Plant Cell* 21: 3641 – 3654, 2009.

- Durdan, S.F., Herbert, R.J., Rogers, H.J., Francis, D.:** The determination time of the carpel whorl is differentially sensitive to carbohydrate supply in *Pharbitis nil*. *Plant Physiology* 123: 189 – 200, 2000.
- Dvořáková, L.:** Studium funkce rodiny hybridních prolinem bohatých proteinů. Disertační práce. Katedra fyziologie rostlin PŘF UK Praha, 2009.
- Ellis, D.R., Gumaelius, L., Indriolo, E., Pickering, I.J., Banks, J.A., Salt, D.E.:** A novel arsenate reductase from the arsenic hyperaccumulating fern *Pteris vittata*. *Plant Physiology* 141: 1544 – 1554, 2006.
- Eriksson, S., Böhlenius, H., Moritz, T., Nilsson, O.:** GA4 Is the active gibberellin in the regulation of *LEAFY* transcription and *Arabidopsis* floral initiation. *The Plant Cell* 18: 2172 – 2181, 2006.
- Eshghi, S., Tafazoli, E., Dokhani, S., Rahemi, M., Emam, Y.:** Changes in carbohydrate contents in shoot tips, leaves and roots of strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) during flower-bud differentiation. *Scientia Horticulturae* 113: 255 – 260, 2007.
- Eveland, A.L., Jackson, D.P.:** Sugars, signalling, and plant development. *Journal of Experimental Botany* 63: 3367 – 3377, 2012.
- Fountain, M.D., Valdes, O., Fettig, S., Beck, E.:** Expression of cell cycle control factors in non-dividing and ageing photoautotrophic plant cells. *Physiologia Plantarum* 119: 30 – 39, 2003.
- Francis, D.:** The plant cell cycle – 15 years on. *New Phytologist* 174: 261 – 278, 2007.
- Francis, D.:** A commentary on the G2/M transition of the plant cell cycle. *Annals of Botany* 107: 1065 – 1070, 2011.
- Friend, D.J.C., Bodson, M., Bernier, G.:** Promotion of Flowering in *Brassica campestris* L. cv. Ceres by Sucrose. *Plant Physiology* 75: 1085 – 1089, 1984.
- Fornara, F., de Montaigu, A., Coupland, G.:** SnapShot: Control of Flowering in *Arabidopsis*. *Cell* 141, 2010.
- Gebhardt, J.S., McDaniel, C.N.:** Flowering response of day-neutral and short-day cultivars of *Nicotiana tabacum* L. Interactions among root, genotype, leaf ontogenic position and growth conditions. *Planta* 185: 513 – 517, 1991.
- Geiger, D.:** Plant sucrose transporters from a biophysical point of view. *Molecular Plant* 4: 395 – 406, 2011.
- Gibson, S.I.:** Sugar and phytohormone response pathways: navigating a signalling network. *Journal of Experimental Botany* 55: 253 – 264, 2004.
- Godt, D.E., Roitsch, T.:** Regulation and tissue-specific distribution of mRNAs for three extracellular invertase isoenzymes of tomato Suggests an important function in establishing and maintaining sink metabolism. *Plant Physiology* 115: 273 – 282, 1997.

- Gonzalez, N., Hernould, M., Delmas, F., Gevaudant, F., Duffe, P., Causse, M., Mouras, A., Chevalier, C.:** Molecular characterization of a *WEE1* gene homologue in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *Plant Molecular Biology* 56: 849 – 861, 2004.
- Gonzalez-Santos, R., Delgado-Alvarado, A., Zavaleta-Mancera, H.A., Herrera-Cabrera, B.E.:** Cytokinin bap promotes the accumulation of hexoses and increases the activity of phosphoenolpyruvate carboxylase and phosphoenolpyruvate carboxykinase during the delay of leaf senescence in wheat. *Agrociencia* 43: 379 – 391, 2009.
- Gonzali, S., Loreti, E., Solfanelli, C., Novi, G., Alpi, A., Perata, P.:** Identification of sugar-modulated genes and evidence for *in vivo* sugar sensing in *Arabidopsis*. *J. Plant Res.* 119: 115 – 123, 2006. Gonzali et al., 2006 (šedý text str.3)
- Habermann, H.M., Sekulow, D.B.:** Development and aging in *Helianthus annuus* L., effects of the biological milieu of the apical meristem on patterns of development. *Growth* 36: 339 – 349, 1972. Citováno dle McDaniel, 1980.
- Hartig, K., Beck, E.:** Endogenous cytokinin oscillations control cell cycle progression of tobacco BY-2 cells. *Plant Biol.* 7: 33 – 40, 2005.
- Havelange, A., Bernier, G.:** Partial floral evocation by high irradiance in the long-day plant *Sinapis alba*. *Physiologia Plantarum* 59: 545 – 550, 1983.
- Havelange, A., Bodson, M., Bernier, G.:** Partial floral evocation by exogenous cytokinin in the long-day plant *Sinapis alba*. *Physiologia Plantarum* 67: 695 – 701, 1986.
- Havelange, A., Lejeune, P., Bernier, G.:** Sucrose / cytokinin interaction in *Sinapis alba* at floral induction: a shoot-to-root-to-shoot physiological loop. *Physiologia Plantarum* 109: 343 – 350, 2000.
- He, Y.-W., Loh, C.-S.:** Induction of early bolting in *Arabidopsis thaliana* by triacontanol, cerium and lanthanum is correlated with increased endogenous concentration of isopentenyl adenosine (iPA_{dos}). *Journal of Experimental Botany* 53: 505 – 512, 2002.
- Heberle-Bors, E.:** Cyclin-dependent protein kinases, mitogen-activated protein kinases and the plant cell cycle. *Current Science* 80: 225 – 232, 2001.
- Hecht, V., Laurie, R.E., Vander Schoor, J.K., Ridge, S., Knowles, C.L., Liew, L.C., Sussmilch, F.C., Murfet, I.C., Macknight, R.C., Weller, J.L.:** The pea *GIGAS* gene is a *FLOWERING LOCUS T* homolog necessary for graft-transmissible specification of flowering but not for responsiveness to photoperiod. *The Plant Cell* 23: 147 – 161, 2011.
- Helliwell, C.A., Wood, C.C., Robertson, M., Peacock, W.J., Dennis, E.S.:** The *Arabidopsis* FLC protein interacts directly *in vivo* with *SOC1* and *FT* chromatin and is part of a high-molecular-weight protein complex. *The Plant Journal* 46: 183 – 192, 2006.

- Hemerly, A.S., Ferreira, P., De Almeida Engler, J., Van Montagu, M., Engler, G., Inzé, D.:** Cdc2a expression in *Arabidopsis* is linked with competence for cell division. *The Plant Cell* 5: 1711 – 1723, 1993.
- Hepworth, S.R., Valverde, F., Ravenscroft, D., Mouradov, A., Coupland, G.:** Antagonistic regulation of flowering-time gene *SOC1* by CONSTANS and FLC via separate promoter motifs. *The EMBO Journal* 21: 4327 – 4337, 2002.
- Herbers, K., Meuwly, P., Frommer, W.B., Métraux, J.-P., Sonnewald, U.:** Systemic acquired resistance mediated by the ectopic expression of invertase: possible hexosesensing in the secretory pathway. *The Plant Cell* 8: 793 – 803, 1996.
- Heyer, A.G., Raap, M., Schroeer, B., Marty, B., Willmitzer, L.:** Cell wall invertase expression at the apical meristem alters floral, architectural, and reproductive traits in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 39: 161 – 169, 2004.
- Hirose, N., Takei, K., Kuroha, T., Kamada-Nobusada, T., Hayashi, H., Sakakibara, H.:** Regulation of cytokinin biosynthesis, compartmentalization and translocation. *Journal of Experimental Botany* 59: 75 – 83, 2008.
- Hocking, P.J.:** The composition of phloem exudate and xylem sap from tree tobacco. *Annals of Botany* 45: 633 – 643, 1980.
- Hopkinson, J.M., Ison, R.L.:** Investigations of ripeness to flower in Tobago. *Field Crops Research* 5: 335 – 348 1982.
- Houssa, P., Bernier, G., Kinet, J.M.:** Qualitative and quantitative-analysis of carbohydrates in leaf exudate of the short-day plant, *Xanthium-strumarium* L. during floral transition. *Journal of Plant Physiology* 138: 24 - 28, 1991.
- Houssa, C., Bernier, G., Pieltain, A., Kinet, J.M., Jacquard, A.:** Activation of latent DNA-replication origins: a universal effect of cytokinins. *Planta* 193: 247 – 250, 1994.
- Huang, T., Böhlenius, H., Eriksson, S., Parcy, F., Nilsson, O.:** The mRNA of the *Arabidopsis* gene FT moves from leaf to shoot apex and induces flowering. *Science* 309: 1694 – 1696, 2005.
- Inzé, D., De Veylder, L.:** Cell cycle regulation in plant development. *Annu. Rev. Genet.* 40: 77 – 105, 2006.
- Iqbal, N., Nazar, R., Iqbal, M., Khan, R., Masood, A., Khan, N.A:** Role of gibberellins in regulation of source–sink relations under optimal and limiting environmental conditions. *Current Science* 100: 998 – 1007, 2011.
- Jacquard, A., Detry, N., Dewitte, W., Van Onckelen, H., Bernier, G.:** In situ localization of cytokinins in the shoot apical meristem of *Sinapis alba* at floral transition. *Planta* 214: 970 – 973, 2002.
- Jang, J.-C., Sheen, J.:** Sugar sensing in higher plants. *The Plant Cell* 6: 1665 – 1679, 1994.

- Jang, J.-C., Torti, S., Coupland, G.:** Genetic and spatial interactions between FT, TSF and SVP during the early stages of floral induction in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 60: 614 – 625, 2009.
- Jelenska, J., Deckert, J., Kondorosi, E., Legocki, A.B.:** Mitotic B-type cyclins are differentially regulated by phytohormones and during yellow lupine nodule development. *Plant Science* 150: 29 – 39, 2000.
- Joubes, J., Chevalier, C., Dudits, D., Heberle-Bors, E., Inzé, D., Umeda, M., Renaudin, J.-P.:** CDK-related protein kinases in plants. *Plant Molecular Biology* 43: 607 – 620, 2000.
- Joubes, J., Lemaire-Chamley, M., Delmas, F., Walter, J., Hernould, M., Mouras, A., Philippe, R., Chevalier, Ch.:** A new C-type cyclin-dependent kinase from tomato expressed in dividing tissues does not interact with mitotic and G1 cyclins. *Plant Physiology* 126: 1403 – 1415, 2001.
- Kawamura, K., Murray, J.A. H., Shinmyo, A., Sekine, M.:** Cell cycle regulated D3-type cyclins from active complexes with plant-specific B-type cyclin-dependent kinase *in vitro*. *Plant Molecular Biology* 61: 311 – 327, 2006.
- Kelly, A.J., Bonnländer, M.B., Meeks-Wagner, D.R.:** *NFL*, the tobacco homolog of *FLORICAULA* and *LEAFY*, is transcriptionally expressed in both vegetative and floral meristems. *The Plant Cell* 7: 225 – 234, 1995.
- Khadaroo, B., Robbens, S., Ferraz, C., Derelle, E., Eychenié, S., Cooke, R., Peaucellier, G., Delseny, M., Demaille, J., Van de Peer, Y., Picard, A., Moreau, H.:** The first green lineage *cdc25* dual-specificity phosphatase. *Cell Cycle* 3: 104 – 110, 2004.
- Kim, J.J., Lee, J.H., Kim, W., Jung, H.S., Huijser, P., Ahn, J.H.:** The *microRNA156-SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE3* module regulates ambient temperature-responsive flowering via *FLOWERING LOCUS T* in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 159: 461 – 478, 2012.
- Kinet, J.M., Houssa, P., Requier, M.C., Bernier, G.:** Alteration of cytokinin levels in root and leaf exudates of the short-day plant *Xanthium strumarium* in response to a single long night inducing flowering. *Plant Physiology and Biochemistry* 32: 379 – 383, 1994.
- King, R.W.:** Mobile signals in day length-regulated flowering: gibberellins, Flowering Locus T, and sucrose. *Russian Journal of Plant Physiology* 59: 479 – 490, 2012.
- King, R.W., Ben-Tal, Y.:** A florigenic effect of sucrose in *Fuchsia hybrida* is blocked by gibberellin-induced assimilate competition. *Plant Physiology* 125: 488 – 496, 2001.
- King, R.W., Evans, L.T.:** Shoot apex sugars in relation to long-day induction of flowering in *Lolium-temulentum* L. *Australian Journal of Plant Physiology* 18: 121 – 135, 1991.
- King, R.W., Hisamatsu, T., Goldschmidt, E.E., Blundell, C.:** The nature of floral signals in *Arabidopsis*. I. Photosynthesis and a far-red photoresponse independently regulate

- flowering by increasing expression of *FLOWERING LOCUS T (FT)*. Journal of Experimental Botany 59: 3811 – 3820, 2008.
- King, R.W., Moritz, T., Evans, L.T., Junttila, O., Herlt, A.J.:** Long-day induction of flowering in *Lolium temulentum* involves sequential increases in specific gibberellins at the shoot apex. Plant Physiology 127: 624 – 632, 2001.
- King, R.W., Zeevaart, J.A.D.:** Enhancement of phloem exudation from cut Petioles by chelating agents. Plant Physiology 53: 96 – 103, 1974.
- Kobayashi, Y., Kaya, H., Goto, K., Iwabuchi, M., Araki, T.:** A pair of related genes with antagonistic roles in mediating flowering signals. Science 286: 1960 – 1962, 1999.
- Koch, K.:** Sucrose metabolism: regulatory mechanisms and pivotal roles in sugar sensing and plant development. Current Opinion in Plant Biology 7: 235 – 246, 2004.
- Kojima, S., Takahashi, Y., Kobayashi, Y., Monna, L., Sasaki, T., Araki, T., Yano, M.:** *Hd3a*, a rice ortholog of the *Arabidopsis* FT gene, promotes transition to flowering downstream of *Hdl* under short-day conditions. Plant Cell Physiology 43: 1096 – 1105, 2002.
- Komarova, E.N., Milyaeva, E.L.:** Changes in content and distribution of starch in stem apices of bicolored coneflower during the period of flowering evocation. Sov Plant Physiol 38: 46 – 51, 1991 (Russian Journal of Plant Physiology). Citováno dle Lejeune, 1993.
- Kondoh M, Murakami A, Shigeta Ch, Tanimoto S:** Flower-inducing and -inhibiting activities of phloem exudate from cotyledons of *Pharbitis* seedlings. J Plant Growth Regulation 28: 107 – 116, 1999.
- Kono, A., Umeda-Hara, C., Lee, J., Ito, M., Uchimiya, H., Umeda, M.:** *Arabidopsis* D-Type Cyclin CYCD4;1 is a novel cyclin partner of B2-type cyclin-dependent kinase. Plant Physiology 132: 1315 – 1321, 2003.
- Koornneef, M., Hanhart, C., van der Veen, J.:** A genetic and physiological analysis of late flowering mutants in *Arabidopsis thaliana*. Mol Gen Genet 229: 57 – 66, 1991.
- Kwiatkowska, D.:** Flowering and apical meristem growth dynamics. Journal of Experimental Botany 59: 187 – 201, 2008.
- Landrieu, I., Da Costa, M., De Veylder L., Dewitte, F., Vandepoele, K., Hassan, S., Wieruszkeski, J.M., Faure, J.D., Van Montagu, M., Inzé, D., Lippens, G.:** A small CDC25 dual-specificity tyrosine-phosphatase isoform in *Arabidopsis thaliana*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101: 13380 – 13385, 2004.
- Lang, A.:** Die photoperiodische regulation von Förderung und Hemmung der Blütenbildung. Ber. Dtsch. Bot. Ges. 97: 293 – 314, 1984. Citováno dle Gebhardt a McDaniel, 1991.
- Lang, A., Chailakhyan, M.K., Frolova, I.A.:** Promotion and inhibition of flower formation in a day-neutral plant in grafts with a short-day plant and a long-day plant. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 2412 – 2416, 1977. Citováno dle Thurnbull, 2011.

- Lee, J., Lee, I.:** Regulation and function of SOC1, a flowering pathway integrator. *Journal of Experimental Botany* 61: 2247 – 2254, 2010.
- Lee, J., Oh, M., Park, H., Lee, I.:** SOC1 translocated to the nucleus by interaction with AGL24 directly regulates *LEAFY*. *The Plant Journal* 55: 832 – 843, 2008.
- Lee, J.H., Yoo, S.J., Park, S.H., Hwang, I., Lee, J.S., Ahn, J.H.:** Role of *SVP* in the control of flowering time by ambient temperature in *Arabidopsis*. *Genes & Development* 21: 397 – 402, 2007.
- Leibfried, A., To, J.P.C., Busch, W., Stehling, S., Kehle, A., Demar, M., Kieber, J.J., Lohmann, J.U.:** WUSCHEL controls meristem function by direct regulation of cytokinin-inducible response regulators. *Nature* 438: 1172 – 1175, 2005.
- Lejeune, P., Bernier, G., Kinet, J.-M.:** Sucrose levels in leaf exudate as a function of floral induction in the long-day plant *Sinapis alba*. *Plant Physiology and Biochemistry* 29: 153 – 157, 1991.
- Lejeune, P., Bernier, G., Requier, M.-Ch., Kinet, J.-M.:** Sucrose increase during floral induction in the phloem sap collected at the apical part of the shoot of the long-day plant *Sinapis alba*. *Planta* 190: 71 – 74, 1993.
- Lejeune, P., Bernier, G., Requier, M.-Ch., Kinet, J.-M.:** Cytokinins in phloem and xylem saps of *Sinapis alba* during floral induction. *Physiologia Plantarum* 90: 522 – 528, 1994.
- Lejeune, P., Kinet, J.-M., Bernier, G.:** Cytokinin fluxes during floral induction in the long day plant *Sinapis alba* L. *Plant Physiology* 86: 1095 – 1098, 1988.
- Lew, D.J., Kornbluth, S.:** Regulatory roles of cyclin dependent kinase phosphorylation in cell cycle control. *Current Opinion in Plant Biology* 8: 795 – 804, 1996.
- Li, C., Gu, M., Shi, N., Zhang, H., Yang, X., Osman, T., Liu, Y., Wang, H., Vatish, M., Jackson, S., Hong, Y.:** Mobile *FT* mRNA contributes to the systemic florigen signalling in floral induction. *Scientific Reports* 1(73): (stránky neuvedeny, počet stránek 6), 2011.
- Li, D., Liu, C., Shen, L., Wu, Y., Chen, H., Robertson, M., Helliwell, C.A., Ito, T., Meyerowitz, E., Yu, H.:** A repressor complex governs the integration of flowering signals in *Arabidopsis*. *Developmental Cell* 15: 110 – 120, 2008.
- Lifschitz, E., Eshed, Y.:** Universal florigenic signals triggered by FT homologues regulate growth and flowering cycles in perennial day-neutral tomato. *Journal of Experimental Botany* 57: 3405 – 3414, 2006.
- Liljegren, S.J., Gustafson-Brown, C., Pinyopich, A., Ditta, G.S., Yanofsky, M.F.:** Interactions among *APETALA1*, *LEAFY*, and *TERMINAL FLOWER1* specify meristem fate. *The Plant Cell* 11: 1007 – 1018, 1999.
- Lin, M.-K., Belanger, H., Lee, Y.-J., Varkonyi-Gasic, E., Taoka, K.-I., Miura, E., Xoconostle-Cázares, B., Gendler, K., Jorgensen, R.A., Phinney, B., Lough, T.J.,**

- Lucas, W.J.:** FLOWERING LOCUS T Protein May Act as the Long-Distance Florigenic Signal in the Cucurbits. *The Plant Cell* 19: 1488 – 1506, 2007.
- Lipavská, H., Mašková, P., Vojvodová, P.:** Regulatory dephosphorylation of CDK at G2/M in plants: yeast mitotic phosphatase *cdc25* induces cytokinin-like effects in transgenic tobacco morphogenesis. *Annals of Botany* 107: 1071 – 1086, 2011.
- Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S.L., Matsudaira, P., Baltimore, D., Darnell, J.:** *Molecular Cell Biology*. W. H. Freeman and Company, New York, 2000.
- Macháčková, I., Krekule, J., Eder, J., Seidlová, F., Strnad, M.:** Cytokinins in photoperiodic induction of flowering in *Chenopodium* species. *Physiologia Plantarum* 87: 160 – 166, 1993.
- Madhusudanan, K.N., Nandakumar, S.:** Carbohydrate changes in shoot tip and subtending leaves during ontogenetic development of pineapple. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie* 110: 429 – 438, 1983. Citováno dle Lejeune, 1993.
- 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.
- McDaniel, C.N.:** Influence of leaves and roots on meristem development in *Nicotiana tabacum* L. cv. Wisconsin 38. *Planta* 148: 462 – 467, 1980.
- McDaniel, C.N.:** Developmental physiology of floral initiation in *Nicotiana tabacum* L. *Journal of Experimental Botany* 47: 465 – 475, 1996.
- McDaniel, C.N., Hartnett, L.K.:** Floral-stimulus activity in tobacco stem pieces. *Planta* 189: 577 – 583, 1993.
- McDaniel, C.N., King, R.W., Evans, L.T.:** Floral determination and invitro floral differentiation in isolated shoot apices of *LOLIUM-TEMULENTUM* L. *Planta* 185: 9 – 16, 1991.
- McDaniel, C.N., Singer, S.R., Smith, S.M.E.:** Developmental states associated with the floral transition. *Developmental Biology* 153: 59 – 69, 1992.
- McGarry, R.C., Ayre, B.G.:** Manipulating plant architecture with members of the CETS gene family. *Plant Science* 188 – 189: 71 – 81, 2012.
- Mercier, H., Endres, L.:** Alteration of hormonal levels in a rootless epiphytic bromeliad in different phenological phases. *J Plant Growth Regul* 18: 121 – 125, 1999.
- Michaels, S.D., Amasino, R.M.:** Loss of *FLOWERING LOCUS C* activity eliminates the late-flowering phenotype of *FRIGIDA* and autonomous pathway mutations but not responsiveness to vernalization. *The Plant Cell* 13: 935 – 941, 2001.
- Mimida, N., Goto, K., Kobayash, Y., Araki, T., Ahn, J.H., Weigel, D., Murata, M., Motoyoshi, F., Sakamoto, W.:** Functional divergence of the *TFL1*-like gene family in *Arabidopsis* revealed by characterization of a novel homologue. *Genes to Cell* 6: 327 – 336, 2001.

- Mok, D.W.S., Mok, M.C.:** Cytokinins: Chemistry, Activity and Function. Boca Raton, FL: CRC Press, 1994. Citováno dle D'Agostino, I. B., Deruère, J., Kieber, J. J.: Characterization of the response of the *Arabidopsis* response regulator gene family to cytokinin. *Plant Physiology* 124: 1706 – 1717, 2000.
- Molinero-Rosales, N., Jamilena, M., Zurita, S., Gómez, P., Capel, J., Lozano, R.:** FALSIFLORA, the tomato orthologue of FLORICAULA and LEAFY, controls flowering time and floral meristem identity. *The Plant Journal* 20: 685 – 693, 1999.
- Molinero-Rosales, N., Latorre, A., Jamilena, M., Lozano, R.:** *SINGLE FLOWER TRUSS* regulates the transition and maintenance of flowering in tomato. *Planta* 218: 427 – 434, 2004.
- Moon, J., Suh, S.S., Lee, H., Choi, K.R., Hong, C.B., Paek, N.C., Kim, S.G., Lee, I.:** The *SOCI* MADS-box gene integrates vernalization and gibberellin signals for flowering in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 35: 613 – 623, 2003.
- Murashige, T., Skoog, F.:** A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473 – 497, 1962.
- Mutasa-Gottgens, E., Hedden, P.:** Gibberellin as a factor in floral regulatory network. *Journal of Experimental Botany* 60: 1979 – 1989, 2009.
- Nakai, T., Kato, K., Shinmyo, A., Sekine, M.:** *Arabidopsis* KRPs have distinct inhibitory activity toward cyclin D2-associated kinases, including plant-specific B-type cyclin-dependent kinase. *FEBS Letters* 580: 336 – 340, 2006.
- Ohto, M., Onai, K., Furukawa, Y., Aoki, E., Araki, T., Nakamura, K.:** Effects of sugar on vegetative development and floral transition in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 127: 252 – 261, 2001.
- Orchard, C.B., Siciliano, I., Sorrell, D.A., Marchbank, A., Rogers, H.J., Francis, D., Herbert, R.J., Suchomelová, P., Lipavská, H., Azmi, A., Van Onckelen, H.:** Tobacco BY-2 cells expressing fission yeast *cdc25* bypass a G2/M block on the cell cycle. *The Plant Journal* 44: 290 – 299, 2005.
- Ormenese, S., Bernier, G., Périlleux, C.:** Cytokinin application to the shoot apical meristem of *Sinapis alba* enhances secondary plasmodesmata formation. *Planta* 224: 1481 – 1484, 2006.
- Ormenese, S., Havelange, A., Deltour, R., Bernier, G.:** The frequency of plasmodesmata increases early in the whole shoot apical meristem of *Sinapis alba* L. during floral transition. *Planta* 211: 370 – 375, 2000.
- Osuna, D., Usadel, B., Morcuende, R., Gibon, Y., Bläsing, O.E., Höhne, M., Günter, M., Kamlage, B., Trethewey, R., Scheible, W.-R., Stitt, M.:** Temporal responses of transcripts, enzyme activities and metabolites after adding sucrose to carbon-deprived *Arabidopsis* seedlings. *The Plant Journal* 49: 463 – 491, 2007.
- Paterson, K.E.:** Shoot tip culture of *Helianthus annuus* – flowering and development of adventitious and multiple shoots. *American Journal of Botany* 71: 925 – 931, 1984.

- Périlleux, C., Bernier, G.:** Leaf carbohydrate status in *Lolium temulentum* during the induction of flowering. *New Phytologist* 135: 59 – 66, 1997.
- Planchais, S., Glab, N., Tréhin, C., Prennes, C., Bureau, J.-M., Meijer, L., Burgounious, C.:** Roscovitine, a novel cyclin-dependent kinase inhibitor, characterizes restriction point and G2/M transition in tobacco BY-2 cell suspension. *The Plant Journal* 12: 191 – 202, 1997.
- Pnueli, L., Carmel-Goren, L., Hareven, D., Gutfinger, T., Alvarez, J., Ganal, M., Zamir, D., Lifschitz, E.:** The *SELF-PRUNING* gene of tomato regulates vegetative to reproductive switching of sympodial meristems and is the ortholog of *CEN* and *TFL1*. *Development* 125: 1979 – 1989, 1998.
- Pnueli, L., Gutfinger, T., Hareven, D., Ben-Naim, O., Ron, N., Adir, N., Lifschitz, E.:** Tomato SP-interacting proteins define a conserved signaling system that regulates shoot architecture and flowering. *The Plant Cell* 13: 2687 – 2702, 2001.
- Porceddu, A., Stals, H., Reichheld, J.P., Segers, G., De Veylder, L., de Pinho Barroco, R., Peter Casteels, P., Van Montagu, M., Inzé, D., Mironov, V.:** A Plant-specific Cyclin-dependent Kinase Is Involved in the Control of G2/M Progression in Plants. *The Journal of Biological Chemistry* 276: 36354 – 36360, 2001.
- Porri, A., Torti, S., Romera-Branchat, M., Coupland, G.:** Spatially distinct regulatory roles for gibberellins in the promotion of flowering of *Arabidopsis* under long photoperiods. *Development* 139: 2198 – 2209, 2012.
- Posé, D., Yant, L., Schmid, M.:** The end of innocence: flowering networks explode in complexity. *Current Opinion in Plant Biology* 15: 45 – 50, 2012.
- Ranwala, A.P., Miller, W.B.:** Gibberellin-mediated changes in carbohydrate metabolism during flower stalk elongation in tulips. *J Plant Growth Regul* 55: 241 – 248, 2008.
- Rédei, G.P.:** Supervital mutants of *Arabidopsis*. *Genetics* 47: 443 – 460, 1962. Citováno dle Roldán, et al., 1999.
- Riou-Khamlichi, C., Huntley, R., Jacquard, A., Murray, J.A.:** Cytokinin activation of *Arabidopsis* cell division through a D-type cyclin. *Science* 283: 1541 – 1544, 1999.
- Riou-Khamlichi, C., Menges, M., Healy, J.M.S., Murray, J.A.H.:** Sugar control of the cell cycle: Differential regulation of *Arabidopsis* D-type cyclin gene expression. *Mol. Cell. Biol.* 20: 4513 – 4521, 2000.
- Roitsch, T.:** Source-sink regulation by sugar and stress. *Current Opinion in Plant Biology* 2: 198 – 206, 1999.
- Roitsch, T., Ehness, R.:** Regulation of source/sink relations by cytokinins. *J Plant Growth regulation* 32: 359 – 367, 2000.
- Roldán, M., Gómez-Mena, C., Ruiz-García, L., Salinas, J., Martínez-Zapater, J.M.:** Sucrose availability on the aerial part of the plant promotes morphogenesis and flowering of *Arabidopsis* in the dark. *The Plant Journal* 20: 581 – 590, 1999.

- Rolland, F., Moore, B., Sheen, J.:** Sugar sensing and signaling in plants. *Plant Cell* 14: 185 – 205, 2002.
- Rolland, F., Sheen, J.:** Sugar sensing and signalling networks in plants. *Biochem. Soc. Trans.* 33: 269 – 271, 2005.
- Ruan, Y.-L., Jin, Y., Yang, Y.-J., Li, G.-J., Boyer, J.S.:** Sugar input, metabolism, and signaling mediated by invertase: roles in development, yield potential, and response to drought and heat. *Molecular Plant* 3: 942 – 955, 2010.
- Růžicka, K., Šimášková, M., Duclercq, J., Petrášek, J., Zažímalová, E., Simon, S., Friml, J., Van Montagu, M.C.E., Benková E.:** Cytokinin regulates root meristem activity via modulation of the polar auxin transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 106: 4284 – 4289, 2009.
- Sachs, J.:** Wirkung des lichten auf die blütenbildung unter vermittlung der laubblätter. *Bot. Ztg.* 23: 117 – 121, 125 – 131, 133 – 139; 1865. Citováno dle Zeevaart, 2006.
- Sachs, R.M., Hacket, W.P.:** Source–relationship and Flowering Strategies of Plant Reproduction. Meudt W.J. (ed.): *Strategies of Plant Reproduction*. BARC Symp. No. 6, Allanheld, Osmun, Totowa, NJ, 263 – 272, 1983. Citováno dle Raper, C.D. Jr., Thomas J.F., Tolley-Henry. L., Rideout. J.W.: Assessment of an apparent relationship between availability of soluble carbohydrates and reduced nitrogen during floral initiation in tobacco. *Botanical Gazette* 149: 289 – 294, 1988.
- Salehi, H., Ransom, C.B., Oraby, H.F., Seddighi, Z., Sticklen, M.B.:** Delay in flowering and increase in biomass of transgenic tobacco expressing the *Arabidopsis* floral repressor gene *FLOWERING LOCUS C*. *Journal of Plant Physiology* 162: (stránky neuvedeny), 2005.
- Samuoliene, G., Duchovskis, P., Urbonavičiute, A., Šabajeviene, G.:** Flowering initiation in plants of different *Apiaceae* species. *Zemdirbyste–Agriculture* 96: 186 – 198, 2009.
- Schultze-Galmen, U., Brandsen, J., Jones, H.D., Morgan, D.O., Meijer, L., Vesely, J., Kim, S.H.:** Multiple –modes of ligand recognition. crystal structures of cyclin-dependent protein-kinase-2 in complex with ATP and 2 inhibitors, olomoucine and isopentenyladenine. *Proteins-structure function and genetics* 22: 378 – 391, 1995. Citováno dle Francis, D., Sorrell, D. A.: The interface between the cell cycle and plant growth regulators: a mini review. *J Plant Growth Regul.* 33: 1 – 12, 2001.
- Schwarz, S., Grande, A.V., Bujdoso, N., Saedler, H., Huijser, P.:** The microRNA regulated SBP-box genes *SPL9* and *SPL15* control shoot maturation in *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology* 67: 183 – 195, 2008.
- Searle, I., He, Y., Turck, F., Vincent, C., Fornara, F., Kröber, S., Amasino, R.A., Coupland, G.:** The transcription factor *FLC* confers a flowering response to vernalization by repressing meristem competence and systemic signaling in *Arabidopsis*. *Genes & Development* 20: 898 – 912, 2006.

- Seo, P.J., Ryu, J., Kang, S.K., Park, C.-M.:** Modulation of sugar metabolism by an INDETERMINATE DOMAIN transcription factor contributes to photoperiodic flowering in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 65: 418 – 429, 2011.
- Sergeeva, L.I., Vreugdenhil, D.:** In situ staining of activities of enzymes involved in carbohydrate metabolism in plant tissues. *Journal of Experimental Botany* 53: 361 – 370, 2002.
- Simpson, G.G.:** (2004) The autonomous pathway: epigenetic and post-transcriptional gene regulation in the control of *Arabidopsis* flowering time. *Current Opinion in Plant Biology* 7: 570 – 574, 2004.
- Singer, S.R., Hannon, C.H., Huber, S.C.:** (1992) Acquisition of competence for floral development in *Nicotiana* buds. *Developmental Biology* 153: 59 – 69, 1992.
- Smeekens, S.:** Sugar-induced signal transduction in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 51: 49 – 81, 2000.
- Smoloňová, M.:** Vliv transformace genem *cdc25* ze *Schizosaccharomyces pombe* na kvetení neutrálního tabáku *Nicotiana tabacum* L., cv. Samsun. Diplomová práce. Katedra fyziologie rostlin PřF UK Praha, 2003.
- Smykal, P., Gennen, J., De Bodt, S., Ranganath, V., Melzer, S.:** Flowering of strict photoperiodic *Nicotiana* varieties in non-inductive conditions by transgenic approaches. *Plant Molecular Biology* 65: 233 – 242, 2007.
- Snaith, H.A., Marlett, J., Forsburg, S.L.:** Ibp1p, a novel Cdc25-related phosphatase, suppresses *Schizosaccharomyces pombe hsk1* (*cdc7*). *Curr. Genet.* 44: 38 – 48, 2003.
- Sorrell, D.A., Chrimes, D., Dickinson, J.R., Rogers, H.J., Francis, D.:** The *Arabidopsis* CDC25 induces a short cell length when overexpressed in fission yeast: evidence for cell cycle function. *New Phytologist* 165: 425 – 428, 2005.
- Sorrell, D.A., Marchbank, A., McMaho, K., Dockinson, J.R., Rogers, H.J., Francis, D.:** A *WEE1* homologue from *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 215: 518 – 522, 2002.
- Spadafora, N.D., Doonan, J.H., Herbert, R.J., Bitonti, M.B., Wallace, E., Rogers, H.J., Francis, D.:** *Arabidopsis* T-DNA insertional lines for CDC25 are hypersensitive to hydroxyurea but not to zeocin or salt stress. *Annals of Botany* 107: 1183 – 1192, 2011.
- Spadafora, N.D., Parfitt, D., Marchbank, A., et al.:** Perturbation of cytokinin and ethylene-signalling pathways explain the strong rooting phenotype exhibited by *Arabidopsis* expressing the *Schizosaccharomyces pombe* mitotic inducer, *cdc25*. *BMC Plant Biology* 12: Article Number 45, DOI: 10.1186/1471-2229-12-45, 2012.
- Srikanth, A., Schmid, M.:** Regulation of flowering time: all roads lead to Rome. *Cell. Mol. Life Sci.* 68: 2013 – 2037, 2011.
- Suchomelová, P.:** Fyziologická charakteristika chování transgenních rostlin tabáku v podmínkách in vitro. Diplomová práce. Katedra fyziologie rostlin PřF UK Praha, 1999.

- Suchomelová, P., Velgová, D., Mašek, T., Francis, D., Rogers, H.J., Marchbank, A.M., Lipavská, H.:** Expression of the fission yeast cell cycle regulator *cdc25* induces de novo shoot formation in tobacco: evidence of cytokinin-like effect by this mitotic activator. *Plant Physiology and Biochemistry* 42: 49 – 55, 2004.
- Suchomelová-Mašková, P., Novák, O., Lipavská, H.:** Tobacco cells transformed with the fission yeast *Spcdc25* mitotic inducer display growth and morphological characteristics as well as starch and sugar status evocable cytokinin application. *Plant Physiology and Biochemistry* 46: 673 – 684, 2008.
- Sun, Y., Dilkes, B.P., Zhang, C., Dante, R.A., Carneiro, N.P., Lowe, K.S., Jung, R., Gordon-Kamm, W.J., Larkins, B.A.:** Characterization of maize (*Zea mays* L.) Wee1 and its activity in developing endosperm. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 4180 – 4185, 1999.
- Tank, J.G., Thaker, V.S.:** Cyclin dependent kinases and their role in regulation of plant cell cycle. *Biologia Plantarum* 55: 201 – 212, 2011.
- Taylor, N.J., Light, M.E., Van Staden, J.:** Monosaccharides promote flowering in *Kniphofia leucocephala* in vitro. *J Plant Growth Regul* 52: 73 – 79, 2007.
- Teichmanová, M., Mašková, P., Vojvodová, P., Krekule, J., Francis, D., Lipavská, H.:** The fission yeast mitotic activator *cdc25* and sucrose induce early flowering synergistically in the day-neutral *Nicotiana tabacum* cv. Samsun. *New Phytologist* 176: 804 – 812, 2007.
- Thomas, T.H., Blakesley, D.:** Practical and Potential Uses of Cytokinins in Agriculture and Horticulture. In: Horgan R., Jeffcoat B. (eds): *Cytokinins: Plant Hormones in Search of a Role*. Pergamon, Oxford, UK, 69 – 83, 1987. Citováno dle Blanchard a Runkle, 2008.
- Thouet, J., Quinet, M., Lutts, S., Kinet, J.-M., Périlleux, C.:** Repression of floral meristem fate is crucial in shaping tomato inflorescence. *Plos One* 7, 2012.
- Turck, F., Fornara, F.:** Regulation and Identity of Florigen: FLOWERING LOCUS T Moves Center Stage. *Annual Review of Plant Biology* 59: 573 – 94, 2008.
- Turnbull, C.:** Long-distance regulation of flowering time. *Journal of Experimental Botany* 62: 4399 – 4413, 2011.
- 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 Leene, J., Boruc, J., De Jaeger, G., Russinova, E., De Veylder, L.:** A kaleidoscopic view of the Arabidopsis core cell cycle interactome. *Trends in Plant Science* 16: 141 – 150, 2011.
- Vandepoele, K., Raes, J., De Veylder, L., Rouzé, P., Rombauts, S., Inzé, D.:** Genome-wide analysis of core cell cycle genes in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 14: 903 – 916, 2002.

- Vojvodová, P.:** Kvetení u fotoperiodicky neutrálního tabáku *Nicotiana tabacum* L.: vliv transformace genem *cdc25* ze *Schizosaccharomyces pombe*. Diplomová práce. Katedra fyziologie rostlin Praha, 2005.
- Vu, N.H., Anh, P.H., Nhut, D.T.:** The role of sucrose and different cytokinins in the in vitro floral morphogenesis of rose (hybrid tea) cv. ‘‘First Prize’’. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 87: 315 – 320, 2006.
- Wang, W., Chen, X.:** HUA ENHANCER3 reveals a role for a cyclin-dependent protein kinase in the specification of floral organ identity in *Arabidopsis*. *Development* 131: 3147 – 3156, 2004.
- Wang, J.W., Czech, B., Weigel, D.:** miR156-regulated SPL transcription factors define an endogenous flowering pathway in *Arabidopsis thaliana*. *Cell* 138: 738 – 749, 2009.
- Werner, T., Motyka, V., Strnad, M., Schmülling, T.:** Regulation of plant growth by cytokinin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 10487 – 10492, 2001.
- Wigge, P.A., Kim, M.C., Jaeger, K.E., Busch, W., Schmid, M., Lohmann, J.U., Weigel, D.:** (2005) 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.
- Wittich, P.E., Vreugdenhil, D.:** Localization of sucrose synthase activity in developing maize kernels by in situ enzyme histochemistry. *Journal of Experimental Botany* 49: 1163 – 1171, 1998.
- Xie, M., Tataw, M., Reddy, G.V.:** Towards a functional understanding of cell growth dynamics in shoot meristem stem-cell niche. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 20: 1126 – 1133, 2009.
- Xu, F., Rong, X., Huang, X., Cheng, S.:** Recent advances of *Flowering Locus T* gene in higher plants. *Int. J. Mol. Sci.* 13: 3773 – 3781, 2012.
- Yamaguchi, A., Kobayashi, Y., Goto, K., Abe, M., Araki, T.:** *TWIN SISTER OF FT (TSF)* acts as a floral pathway integrator redundantly with *FT*. *Plant Cell Physiology* 46: 1175 – 1189, 2005.
- Zeevaart, J.A.D.:** Rower formativ as studied by grafting. *Modedeelingen van de Landbouwhoogeschool Wageningen* 58: 1 – 88, 1958. Citováno dle Turnbull, 2011.
- Zeevaart, J.A.D.:** Florigen Coming of Age after 70 Years. *The Plant Cell* 18: 1783 – 1789, 2006.
- Zeevaart, J.A.D.:** Leaf-produced floral signals. *Current Opinion in Plant Biology* 11: 541 – 547, 2008.
- Zhang, K., Diederich, L., John, P.C.L.:** The cytokinin requirement for cell division in cultured *Nicotiana plumbaginifolia* cells can be satisfied by yeast Cdc25 protein

tyrosine phosphatase. Implications for mechanisms of cytokinin response and plant development. *Plant Physiology* 137: 308 – 316, 2005.

Zhang, K., Letham, D.S., John, P.C.L.: Cytokinin controls the cell cycle at mitosis by stimulating the tyrosine dephosphorylation and activation of p34(cdc2)-like H1 histone kinase. *Planta* 200: 2 – 12, 1996.