

Molekulární genetika rozluštila záhadu florigenu, faktoru navozujícího kvetení

Pochopení signálních drah využívaných rostlinami pro přechod z fáze růstu do fáze kvetení a reprodukce je jedním z přínosů biologie na prahu 21. stol. Byly nalezeny dva základní klíče – gen *CONSTANS*, který propojuje řízení květní indukce s vnitřními hodinami, a gen *FT*, jehož produkt se ukázal být dlouho hledaným florigenem. Ač jsou naše znalosti dosud kusé, lze říci, že tyto dva geny jsou základní součástí složité regulační sítě. Tu dále tvoří jemné předivo mnoha interakcí, které rostlinám umožňují vykvést v ten nejvhodnější čas.

Jak rostliny vnímají světlo

V předchozích dvou článcích o regulaci kvetení (Živa 2008, 1: 7–9, 2: 57–60) jsme sledovali, jak klikatě se vinula cesta zkoumání pochodů, které v rostlinách vyvolávají kvetení. Ukázalo se, že jedním z nejdůležitějších činitelů je délka dne, což potvrdilo i současné molekulárně biologické bádání. Tento poznatek plně souzní se selským rozumem. Počasí je proměnlivé a nespolehlivé, zvláště v nynější době globálních klimatických změn. V lednu se vyskytují teploty typické pro sklonek jara, uprostřed léta přicházejí nečekané deště. Existuje však jeden pevný záchytný bod – délka dne; 21. března je rovníkennost, i kdyby padaly kroupy, mrzlo či panovala úmorná vedra. Právě proto délka dne pomáhá mnoha rostlinám rozpoznat, kdy je třeba nasadit květy. Spolupůsobí však i další faktory – teplota, vlhkost, stáří a fyziologický stav rostliny. Rozdílný důraz na jednotlivé činitele ovlivňující kvetení je

součástí jedinečné životní strategie každého rostlinného druhu.

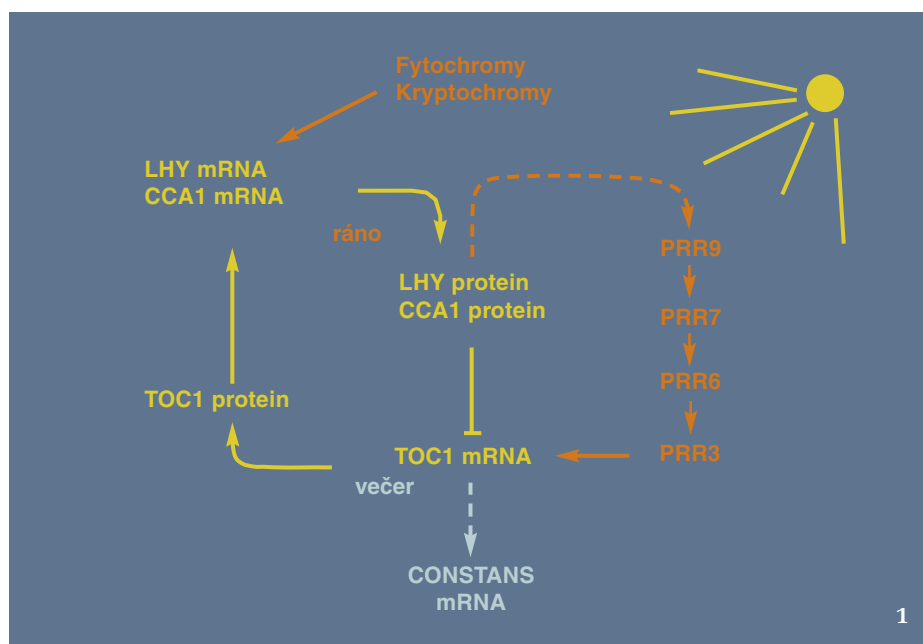
Jak ale fialka či chryzantéma rozpoznají délku dne? Musí být schopny nejen vnímat světlo, ale také změřit dobu jeho trvání. Rostliny jsou na světle závislé, přeměňují jeho energii na energii chemických vazeb v průběhu fotosyntézy. Proto jsou vlastně zelené – pohlcují červenou složku slunečního záření a zelenou odrážejí. Mohou být fotosyntéza a chlorofyl odpovědné za vnímání světla? Zřejmě nikoli. Plyne to z pokusů s huseníčkem rolním (*Arabidopsis thaliana*), významným experimentálním objektem současné rostlinné genetiky (Živa 2007, 1: 5–7). Jeho mutanty neschopné syntézy chlorofylu (a rostoucí proto na živném médiu s glukózou) reagují na světelnou fotoperiodu obdobně jako zelení jedinci. K témuž závěru může dojít i bystrý pozorovatel přírody – rovněž některé parazitické nezelené rostliny se řídí délkou dne. K vnímání světla rostli-

ny chlorofyl nepotřebují, jako fotoreceptory jim slouží bílkoviny fytochromy (pro červené světlo) a kryptochromy (pro modré světlo). Fytochromy rozlišují červené světlo o určité vlnové délce, jak bylo podrobně popsáno ve druhém dílu našeho volného seriálu o kvetení. Fytochrom A je citlivý k dlouhovlnnému červenému světlu (asi 730 nm), které převažuje brzy rána či v podvečer. Mohli bychom se domnívat, že takovéto označení začátku a konce dne by mohlo rostlině pomoci v odhadu jeho délky. V tom případě by však byla často zmatena. Dlouhovlnné červené paprsky procházející listovím a tvořící tak podstatnou složku světla dopadajícího na zastíněný podrost po celý den nejsou omezeny jen na ranní a večerní hodiny. K určení délky dne potřebuje rostlina spolehlivější prostředek, něco na způsob hodin. A organismy své vnitřní hodiny skutečně mají! O jejich působení na celkový fyziologický stav se můžeme přesvědčit sami na sobě. Zkusme bdít jednu noc. Po překonání největší únavy krátce po půlnoci se kolem čtvrté hodiny dostaví pocit určité ranní svěžesti, můžeme pokračovat v běžné činnosti. Další večer však již zpravidla usneme, třeba vestoje.

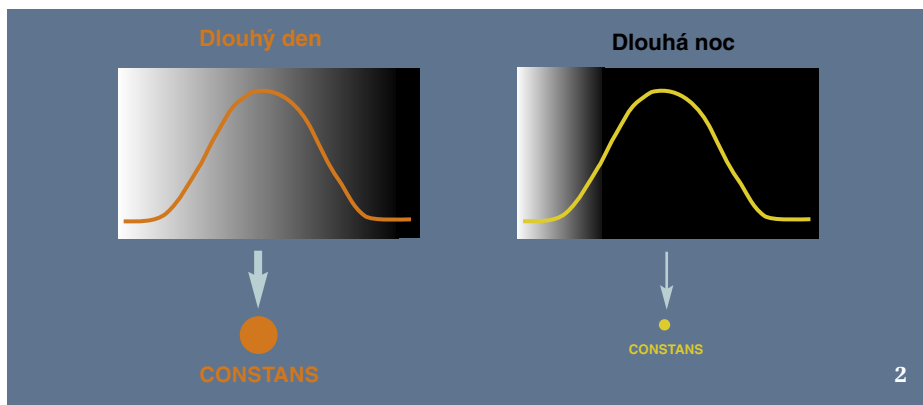
Vnitřní hodiny rostlin

Také rostliny mají své vnitřní hodiny, pojednával o nich článek v Živě (2002, 4: 150–152). Jsou uloženy v mnoha buňkách rostlinného těla. Jejich principem jsou tzv. transkripčně translační smyčky založené na zpětné vazbě. Protein A tlumí transkripční genu B, jehož produkt, protein B, naopak aktivuje transkripční genu A. Vysoké hladiny exprese proteinu B, který je ovšem aktivátorem transkripce genu A. Hladiny proteinu A budou klesat, tím se odblokuje transkripce genu B. Hladiny proteinů A a B tak rytmicky klesají a stoupají, maximum A odpovídá minimu B, a naopak. Obr. 1 ukazuje zjednodušené schéma vnitřních hodin u rostlin. „Ranní geny“ *LHY1* a *CCA1* brzdí transkripční „večerního genu“ *TOC1*. Tento gen a jeho produkt je také součástí jiné smyčky, které se účastní geny *PRR*. Jednotlivé smyčky

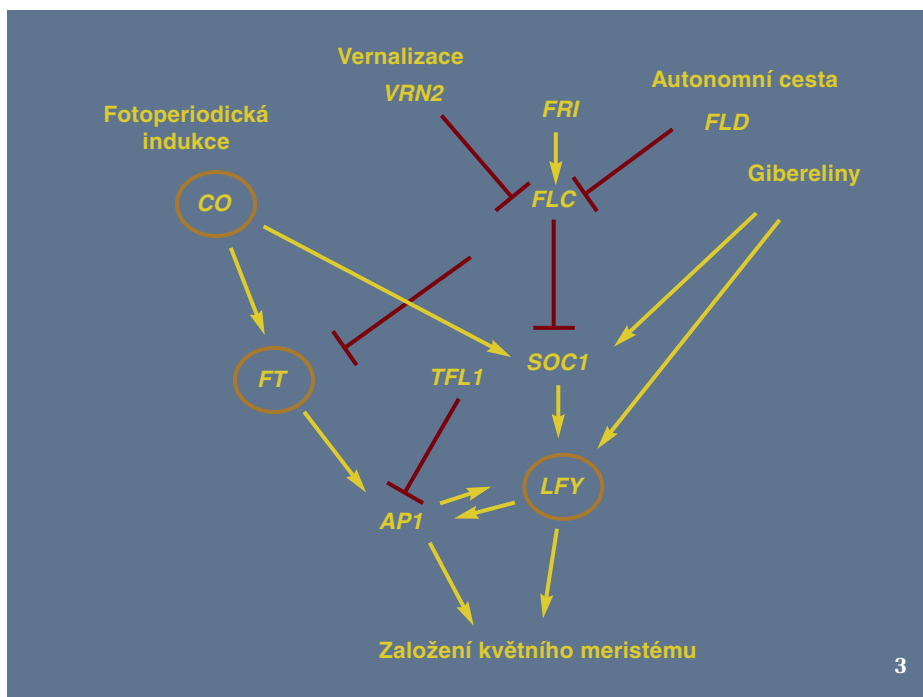
1 Vnitřní oscilátor rostlin. Ráno je aktivována dvojice genů *CCA1* (*CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1*) a *LHY* (*LATE ELONGATED HYPOCOTYL*), je syntetizována mRNA a příslušné proteiny. Ty působí jako inhibitory transkripce genu *TOC1* (*TIMING OF CAB EXPRESSION 1*). Protein *TOC1* je však nutný pro transkripční *CCA1* a *LHY*. Jeho nedostatek posléze přivodí i pokles hladin proteinů *CCA1* a *LHY* a tím i postupnou aktivaci vlastní exprese. K ní dále přispívá protein *PRR3* (*PSEUDORESPONSE REGULATOR 3*), který je součástí druhé zpětnovazebné smyčky vnitřního oscilátoru rostlin, znázorněné oranžově. Smyčky jsou vzájemně propojeny podobně jako ozubená kolečka hodinového strojku. Rytmičké změny exprese genů vnitřního oscilátoru řídí transkripční mnoha dalších genů, mezi nimi *CONSTANS* (*CO*). Plná čára – přímá aktivace; přerušovaná čára – aktivace prostřednictvím dalších genů, známých či jen předpokládaných



2 Exprese genu *CONSTANS* za dlouhého a krátkého dne u huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*). Křivka v obou částech obrázku znázorňuje rytmický průběh transkripce genu *CO* (hladin jeho mRNA). Je stejná za dlouhého i krátkého dne. Na fotoperiodě však závisí množství proteinu, který translací této mRNA vzniká. Pokud vrcholí transkripce genu *CO* na světle, dochází ke tvorbě dostatečného množství proteinu CO. Ten pak aktivuje klíčový gen *FT*, který vyvolá kvetení. Pokud však je den krátký a noc dlouhá, ocitá se maximum *CO* mRNA ve tmě. A za tmy jsou u huseníčku aktivní mechanismy cílené degradace proteinu CO. Proto ho není dostatek k aktivaci genu *FT* a rostlina nekvete. Pro úplnost je třeba dodat, že huseníček časem přece jen vykvete i za krátkého dne, indukce je však v tom případě spjata s jinými proteiny než CO



3 Zjednodušené schéma regulace indukce kvetení u huseníčku rolního. Na obrázku jsou znázorněny základní regulační prvky čtyř signálních drah, které řídí kvetení u huseníčku. O první z nich, fotoperiodické indukce, podrobně pojednává tento článek. Zprostředkovává odpověď na délku dne. Její osou jsou dva geny – *CO* a *FT*. Druhé dvě dráhy, vernalizační a endogenní, se křížují u genu *FLC* (*FLOWERING LOCUS C*), který inhibuje geny *SOC1* (*SUPPRESSOR OF OVER-EXPRESSION OF CO 1*) a *FT*. Jeho transkripce může být potlačena produktem genu *VRN2* po několikadenním působení nízkých teplot, tedy po vernalizaci. Dále může být *FLC* inhibován produktem genu *FLD*, prvkem endogenní signální dráhy. Takto se zřejmě projevuje indukční účinek stáří rostliny. Jako další hráči vystupují rostlinné hormony gibereliny, aktivující jak *SOC1*, tak přímo gen *LFY* (*LEAFY*), zřejmě však nikoli *FT*. Geny *LFY* a *AP1* (*APETALA 1*) odpovídají za přeměnu vegetativního vzrostného vrcholu na vzrostný vrchol se základy květenství. Důležitý je také gen *FRI* (*FRI-GIDA*), jehož proteinový produkt aktivuje gen *FLC*. Zesiluje tedy inhibici kvetení. Je spoluzodpovědný za rozmanité požadavky různých ekotypů huseníčku na vernalizaci. Dalším zajímavým inhibičním genem je *TFL1* (*TERMINAL FLOWER 1*). Působí negativně na expresi *AP1*, čímž ruší pozitivní účinek *FT*. Oba regulační geny (*FT* a *TFL1*) mají velmi podobnou sekvenci, jsou členy téže genové rodiny, jejich účinek na transkripci *AP1* je však přesně opačný. Řízení indukce kvetení se účastní řada dalších proteinů a malých RNA, tzv. microRNA. Jsou propojeny mnoha interakcemi, které jsou předmětem současného výzkumu. Všechny orig. H. Štorchové



3 Zjednodušené schéma regulace indukce kvetení u huseníčku rolního. Na obrázku jsou znázorněny základní regulační prvky čtyř signálních drah, které řídí kvetení u huseníčku. O první z nich, fotoperiodické indukce, podrobně pojednává tento článek. Zprostředkovává odpověď na délku dne. Její osou jsou dva geny – *CO* a *FT*. Druhé dvě dráhy, vernalizační a endogenní, se křížují u genu *FLC* (*FLOWERING LOCUS C*), který inhibuje geny *SOC1* (*SUPPRESSOR OF OVER-EXPRESSION OF CO 1*) a *FT*. Jeho transkripce může být potlačena produktem genu *VRN2* po několikadenním působení nízkých teplot, tedy po vernalizaci. Dále může být *FLC* inhibován produktem genu *FLD*, prvkem endogenní signální dráhy. Takto se zřejmě projevuje indukční účinek stáří rostliny. Jako další hráči vystupují rostlinné hormony gibereliny, aktivující jak *SOC1*, tak přímo gen *LFY* (*LEAFY*), zřejmě však nikoli *FT*. Geny *LFY* a *AP1* (*APETALA 1*) odpovídají za přeměnu vegetativního vzrostného vrcholu na vzrostný vrchol se základy květenství. Důležitý je také gen *FRI* (*FRI-GIDA*), jehož proteinový produkt aktivuje gen *FLC*. Zesiluje tedy inhibici kvetení. Je spoluzodpovědný za rozmanité požadavky různých ekotypů huseníčku na vernalizaci. Dalším zajímavým inhibičním genem je *TFL1* (*TERMINAL FLOWER 1*). Působí negativně na expresi *AP1*, čímž ruší pozitivní účinek *FT*. Oba regulační geny (*FT* a *TFL1*) mají velmi podobnou sekvenci, jsou členy téže genové rodiny, jejich účinek na transkripci *AP1* je však přesně opačný. Řízení indukce kvetení se účastní řada dalších proteinů a malých RNA, tzv. microRNA. Jsou propojeny mnoha interakcemi, které jsou předmětem současného výzkumu. Všechny orig. H. Štorchové

(jejichž přesný počet a vzájemné vazby dosud nejsou zcela známy) můžeme přirovnat k ozubeným kolečkům a celý systém, kterému se také říká vnitřní oscilátor, k soustrojí řídicímu Staroměstský orloj. Podobně vnitřní oscilátor rostlin určuje ten správný okamžik pro aktivaci stovek až tisíců genů ráno, v poledne či večer. Rostlina je tak např. připravena přivítat východ Slunce s chloroplasty plnými čer-

stvě nasyntetizovaných bílkovin. Jde např. o proteiny světlosběrných komplexů, které umožňují efektivně využívat světlo od samého úsvitu.

Jistě nepřekvapí, že celý zpětnovazebný mechanismus je nastaven tak, aby perioda (vzdálenost mezi dvěma maximy nebo minimy) rytmických dějů byla zhruba 24 hodin. Chod vnitřních hodin je obecně nezávislý na vnějších podnětech, hladiny příslušných proteinů pravidelně klesají a stoupají i za stálého světla či stálé tmy. Tento rytmus se však při úplné absenci vnějších podnětů postupně vytrácí. Ani rostliny nemají svoji časomíru zcela nezávislou na vnějším prostředí. Podobně jako musíme občas nastavit správný čas na hodinách, rostlina upřesňuje (synchronizuje) chod svého oscilátoru pomocí pravidelného chodu svého oscilátoru pomocí pravidelného střídání světla a tmy. Organismy však mohou pro synchronizaci využívat i jiné pravidelné podněty, např. střídání denních a nočních teplot. Některým živočichům (třeba hrabošům a možná i lidem) poslouží ke stejnému účelu i pravidelné podávání potravy.

Sít genů u huseníčku

Pokud tedy rostlina dokáže vnímat světlo pomocí fotoreceptorů a současně má nástroj k měření času, může celkem jednoduše stanovit délku dne. V podstatě to učiní stejným způsobem, jako roztržitý vědec, který vpodvečer vyhlédne z okna labora-

toře. Je-li tma, uvědomí si, že je krátký den, tedy zima, svítí-li ještě sluníčko, ví, že je uprostřed léta. Informace o části dne je kombinována s informací o tom, zda je v tuto určitou hodinu světlo nebo tma. Pro roli člověka vykukujícího z okna využívá rostlina jeden z mnoha genů, jejichž transkripci řídí vnitřní oscilátor. Byl objeven při výzkumu již zmíněné dlouhodobě rostliny huseníčku rolního. Jeho mutace činí kvetení rostliny nezávislým na délce dne, tedy konstantním. Proto dostal tento gen název *CONSTANS* (*CO*). Jeho aktivita pulzuje rytmicky s maximem na konci dne či již v noci (obr. 2). Pokud je krátký den, maximum transkripce genu *CO* nastává až v noci. Za tmy jsou aktivní mechanismy, které odbourávají čerstvě vzniklý CO protein. Za krátkého dne se tedy produkuje jen velmi málo CO proteinu. Naopak, je-li den dlouhý, transkripce *CO* vrcholí na světle, degradační mechanismy jsou inhibovány a CO protein je syntetizován v hojně míře. Je čas kvést! Informace o délce dne je takto převedena na informaci typu Ano/Ne. Dlouhý den = dostatek CO proteinu, krátký den = žádný CO protein. K iniciaci kvetení pak stačí jen vhodný spouštěcí faktor zapnutý právě proteinem CO.

Pozorní čtenáři předchozích dvou článků tohoto cyklu jistě tuší, co oním faktorem může být. Ano, jde o florigen, signál přenášející informaci o délce dne z listu do růstového vrcholu, kde se zakládají květy.



4 Merlík červený (*Chenopodium rubrum*) kvete jako pětidenňí semenáček, ale také později, třeba ve stáří čtyř týdnů. Kvítky jsou velmi drobné, snadno uniknou pozornosti. Přesto je tento druh vhodným modelem pro studium genetické regulace kvetení. Foto H. Štorchová

Hypotetický faktor, předpokládaný již botanikem M. Ch. Čajlachjanem a dalšími před 70 lety, hledali fyziologové pomocí analytické biochemie a aplikačních pokusů – pilně, ale marně. Teprve molekulárně genetické studium nových mutací ovlivňujících kvetení huseníčku rolního, izolovaných M. Koorneefem na počátku 90. let 20. stol., přineslo objasnění záhady. Byl nalezen gen aktivovaný jen za podmínek indukujících kvetení, tedy např. nikoli za krátkého dne. Původně byl pojmenován *FT*, což neznamenalo vůbec nic, jen odkaz na pořadí, ve kterém byla mutace izolována. Tak byly popsány geny *FA*, *FD* apod. Písmeno F pochází z anglického *flowering*, písmeno T svědčí jen o nutnosti využít i konec abecedy. Transgenní rostliny nesoucí tento gen pod kontrolou silného promotoru, a tudíž vykazující stále vysoké hladiny příslušné mRNA i proteinu, kvetly velmi brzy bez ohledu na světelné podmínky. A toto zjištění neplatilo jen pro huseníček rolní. Rovněž tabák transformovaný *FT* genem huseníčku vykvétal časně. Bylo tedy zřejmé, že produkt *FT* genu indukuje kvetení nezávisle na rostlinném druhu, ze kterého pochází. Tato vlastnost dlouho hledaného florigenu byla již dříve prokázána pomocí mezirodového roubování v mnoha pokusech klasických fyziologů. Rozhodující důkazy přinesly v r. 2007 experimenty s *FT* genem pod kontrolou promotoru indukovatelného chemickou látkou dexametazonem. Transgenní huseníček vykvétl i za krátkého dne, když byl jeden jeho list potřen právě touto látkou. Naopak kontrolní netransgenní rostlina přečkala stejné ošetření bez jakéhokoli náznaku kvetení. Protein *FT* byl proto ztotožněn (byť dosud s jistými otazníky) s dlouho hledaným florigenem.

Další podrobné pokusy pak prokázaly, že *CO* protein v komplexu s dalšími proteiny skutečně aktivuje transkripci *FT*. Tak byla objevena dvojice klíčových genů, která je osou složité signální sítě regulující kvetení u huseníčku rolního. Její zjednodušenou podobu ukazuje obr. 3.

Důležitým uzlovým prvkem této sítě je také gen *FLC*. Jeho produkt působí jako inhibitor exprese genu *FT* a dalších aktivátorů kvetení. Právě prostřednictvím *FLC* se uplatňuje vernalizace (jarovizace). Nízké teploty aktivují expresi *VRN2*, který pozastaví transkripci *FLC*. Gen *FT*, zbaven inhibičního působení ze strany *FLC*, pak může být za dlouhého dne aktivován proteinem *CO*. Jak naznačuje obr. 3, celá signální kaskáda končí aktivací genů *LEAFY* (*LFY*) a *AP1*, které mění osud buněk ve vzrostném vrcholu. V dělivém pletivu se namísto dalších listů zakládají budoucí květy s korunními lístky, pestíkem a tyčinkami. Jméno genu *LEAFY* (olistěný) odkazuje ke vzhledu mutantních rostlinek. Místo květu s rozlišenou korunou, kalichem atd. nesou chomáč pokroucených lístků. Právě objev genu *LFY* známým německým rostlinným biologem D. Weigelem a spolupracovníky odstartoval v r. 1992 dobrodružné odhalování genetických základů kvetení.

Rozmanitost světa rostlin se projevuje i v různorodosti signálních drah

Dosud probírané schéma řízení květní indukce se vztahuje k modelové rostlině huseníčku rolnímu, který je dlouhodenňí. O krátkodenních či neutrálních rostlinách máme poznatků méně. Nejlépe prozkoumanou krátkodenní rostlinou je rýže setá (*Oryza sativa*). Nacházejí se u ní geny homologní jak s *FT*, tak s *CO* a mají i podobnou funkci. Jen způsob regulace je jiný. Za dlouhého dne, který u rýže potlačuje kvetení, působí protein Hd1 (homolog *CO*) jako inhibitor transkripce genu *Hd3a* (homolog *FT*). Je tomu tedy přesně naopak než u huseníčku. Krátký den (a dlouhá noc) navozují u rýže kvetení prostřednictvím stejného proteinu Hd1, jenže ten má tentokrát na gen *Hd3a* aktivaci účinek. Proč tomu tak je, není dosud známo, existují jen hypotézy. Rovněž nebyl dosud ve zcela přečteném genomu rýže nalezen např. homolog genu *FLC*, naopak byly objeveny geny se vztahem ke kvetení bez odpovídajících protějšků u huseníčku. Tyto poznatky naznačují, že celková regulace indukce kvetení je u rýže poněkud jiná. Rýže slouží jako základní zdroj potravy pro tři miliardy lidí. Je předmětem dlouhodobé pozornosti mnoha japonských biologů a cílem štedrých dotací. Přesto nejsou signální dráhy řídicí kvetení u rýže ještě zdaleka popsány a pochopeny.

Jak a proč kvetou ostatní rostliny, je pochopitelně probádáno daleko méně než u huseníčku a rýže. Jde však o vzrušující otázky, uvědomíme-li si, jak důležité je pro rostlinu rozhodnutí kvést. A výzkum má i své praktické důsledky. Kdo by nechtěl pokojově citroníky plodící ve stáří dvou let? Jaké geny bude nutno pozměnit, abychom s postupujícím globálním oteplením mohli u nás pěstovat subtropické rostliny? Délka dne na jaře je v Čechách jiná než v Egyptě.

Proto pokračuje se vzrůstající rychlostí výzkum genů souvisejících s kvetením i u dalších rostlin. Tradičním krátkodenním modelem je povijnice nachová (*Ipomoea nil*) z čel. svačkovitých (*Convolvulaceae*), anglicky zvaná Morning glory (Sláva jitra). V Japonsku je velmi oblíbená, lidé ji chovají téměř ve stejné účtě jako sakuru. I když je dosud genom povijnice přečten jen z malé části, byla v něm rozpoznána řada genů homologních s huseníčkem. Podrobné studium exprese klíčových „květních“ genů povijnice našlo některé odchylky oproti rýži i huseníčku. Je zřejmé, že zejména u krátkodenních rostlin jsou dráhy regulující kvetení pestře a rozmanitě.

A jak přispívá k výzkumu kvetení česká věda? V Ústavu experimentální botaniky AV ČR, v. v. i., v Praze má dlouhou tradici studium merlíku červeného (*Chenopodium rubrum*, obr. 4). Je to dnes již celkem vzácný plevel rostoucí s oblibou poblíž kravínů a louží močůvky. Také jeho květy jsou velmi nenápadné, miniaturní, zelené, shloučené v klubičkách. Právý opak vznešené povijnice s velkými modrými květy. Může však vykvést ve stadiu pětidenňího semenáčku po působení jediné periody tmy. Rychle roste, dospělá rostlina poskytuje stovky semen. Je velmi ochotným experimentálním modelem. Čeští rostlinní fyziologové, zejména Jan Krekule, Frideta Seidlová, Ivana Macháčková a řada dalších na něm podrobně zkoumali indukci a průběh kvetení. Na jejich úsilí dnes navazují molekulární biologové, kteří se snaží pochopit, které geny a proteiny jsou za zajímavé chování merlíku červeného odpovědné. Již první výsledky naznačují, že leccos je u merlíku jinak než u rýže či huseníčku.

Na závěr našeho vyprávění se pokusím zamyslet nad otázkou, která jistě napadla nejednoho čtenáře. Mohlo dojít k některému ze zásadních objevů, které lemují cestu k rozluštění záhady florigenu, na českém pracovišti? Existovaly zde týmy nadšených pracovníků s mnohaletou zkušeností, zcela oddaných vědě. Chyběla však dostatečně hluboká interdisciplinární spolupráce. K iniciaci studia kvetení u huseníčku na konci 80. let byla potřebná kombinace lidí, kteří ovládali klasickou genetiku, technologii rekombinantní DNA, sekvenování (tehdy ještě pomocí vertikální elektroforézy a radioizotopů) a samozřejmě nauku o kvetení. Badatelé s podobnými znalostmi u nás existovali, avšak roztroušeni v podkritickém množství na různých pracovištích. Systém vědecké práce, který tenkrát převládá a bohužel je rozšířen i nyní, lze charakterizovat heslem „od kolébky do hrobu“, neboli od promoce do penze na jedné židli. Produktivní skupiny však nevznikají snadno, je nutno vyzkoušet několik variací, než se najde ta pravá. Proto je nutné, aby mladí lidé nešetřovali v laboratořích, kde ukončili svá magisterská nebo doktorská studia, ale vydali se jako tovaryši na vědecký vandr. Pak mohou přinášet své zkušenosti jinam a sami se dále učit.

Výzkum genetických základů kvetení u merlíku červeného podporuje grant Grantové agentury ČR 522/05/300.