

Waldemar Wojciechowski, Jan Kopcewicz

Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu

MOLEKULARNE MECHANIZMY KWITNIENIA ROŚLIN DRZEWIASTYCH

MOLECULAR MECHANISMS OF FLOWERING IN WOODY PLANTS

Słowa kluczowe: kwitnienie, indukcja kwitnienia, geny kwitnienia, rośliny drzewiaste

Key words: flowering, flower induction, flowering genes, woody plants

Abstract. Woody plants go through a long period of vegetative growth before they reach maturity and start to reproduce. In such plants three postembryonic developmental phases have been recognized: juvenile, an adult vegetative and an adult reproductive. During juvenile and adult vegetative phases a gradual maturation occurs. These phases are accompanied by changes in molecular, physiological and morphological traits. The transition of woody plants from juvenile vegetative to an adult reproductive phase is related to specific quantitative proportion of contents between miRNA (*miR156* and *miR172*) and transcriptional factors from SPL (e.g. SPL9) and AP2- like (e.g. TOE1) families. It is first necessary stage which has to be ended if the generative initiation could take place. In the second stage of woody plants generative transition several pathways that promote flowering, including photoperiod, vernalization, autonomous and gibberellins are starting. These pathways, similar as in *Arabidopsis thaliana*, include control of many evolutionary conservative genes and proteins like CO, GI, FT, FLC, SOC1, LFY and TFL1. Taken together the molecular mechanism of woody plants flowering is in some important cases similar to that which occur in herbaceous plants.

Skróty:

PHYTOCHROME (PHY), CRYPTOCHROME (CRY), ZEITLUPE (ZTL), GIGANTEA (GI), LOV KELCH PROTEIN 2 (LKP2), FLAVIN-BINDING, KELCH REPEAT, F BOX 1 (FKF1), PSEUDO-RESPONSE REGULATOR (PRR), CONSTANS (CO), DOF TRANSCRIPTION FACTOR CDF1, SUPPRESSOR OF PHYA-105 (SPA), FLOWERING LOCUS T (FT), TARGET OF EAT1 (TOE1), APETALA 2 (AP2), SCHLAFMUTZE (SMZ), MADS AFFECTING FLOWERING 1 (MAF1), CRYPTOCHROME-INTERACTING BASIC-HELIX-LOOP-HELIX

1 (CIB1), *APETALA 1 (API)*, *TWIN SISTER OF FT (TSF)*, *TERMINAL FLOWER 1 (TFL1)*, *MOTHER OF FT 1 (MFT1)*, HEME ACTIVATOR PROTEIN (HAP), VERNALIZATION 1, 2 (VRN1, 2), SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CO 1 (SOC1), FLOWERING LOCUS C (FLC), LEAFY (LFY), *SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE 9 (SPL9)*, AGAMOUS-LIKE 19 (AGL19), FRIGIDA (FRI), *VERNALIZATION INSENSITIVE 3 (VIN3)*, *EMBRYONIC FLOWER (EMF)*, *FLOWERING LOCUS D (FLD)*

WSTĘP

Roślina będąc w okresie rozwoju wegetatywnego nabywa z czasem gotowości do kwitnienia. Wiąże się to z osiągnięciem przez roślinę zaawansowanego stanu rozwoju wegetatywnego oraz z uzyskaniem zdolności do tworzenia poza wierzchołkami wzrostu określonych induktorów (sygnałów) kwitnienia. Sygnały te przemieszczają się w roślinie i docierają do wierzchołków wzrostu indukując powstawanie kwiatów. Jest to wynikiem uruchomienia aktywności specyficznych genów kwitnienia. Kwitnienie rozpoczyna zatem proces morfogenezy generatywnej który prowadzi do powstania gamet, zapylenia, zapłodnienia, zygoty, nasion i owoców (rośliny okrytonasienne).

U roślin funkcjonują różne drogi wchodzenia w fazę rozwoju generatywnego. Rośliny strefy równikowej, gdzie nie występują zmiany dobowe długości dnia ani duże zmiany temperaturowe, przechodzą w stan gotowości do kwitnienia pod wpływem czynników natury wewnętrznej. Rośliny strefy klimatu umiarkowanego są natomiast z reguły uzależnione od czynników środowiskowych, zwłaszcza sezonowych zmian długości dnia i nocy oraz temperatury. Kwitnienie jest u roślin nasiennych procesem decydującym o ciągłości i przetrwaniu gatunku, zatem zachodzić musi w najbardziej korzystnym okresie. W niesprzyjających warunkach oświetlenia czy temperatury rośliny te pozostają wegetatywne.

Najbardziej ogólnie wszystkie rośliny nasienne podzielić można na 3 grupy biorąc pod uwagę mechanizmy ich wejścia w stan kwitnienia: 1/ kwitnące pod wpływem określonego fotoperiodu (długiego bądź krótkiego), 2/ kwitnące pod wpływem obniżonej temperatury (wernalizacja), 3/ autonomiczne (neutralne).

Rośliny dzielą się także na roczne, dwuletnie i wieloletnie. Rośliny roczne, dwuletnie i niektóre wieloletnie (np. agawa, bambusy) są roślinami monokarpicznymi, tzn. zakwitają tylko jeden raz, po czym obumierają. Natomiast rośliny trwałe, wieloletnie, są roślinami polikarpicznymi, tzn. zakwitają i wytwarzają nasiona wielokrotnie.

Rośliny drzewiaste są roślinami zarówno autonomicznymi jak i polikarpicznymi. U drzew szczególnego znaczenia nabiera zagadnienie

„dojrzałości do kwitnienia”. Dwa główne czynniki środowiskowe – fotoperiod i temperatura – wywierają oczywiście ogólny wpływ na procesy rozwojowe drzew, jednakże nie są czynnikami bezpośrednio warunkującymi indukcję kwitnienia. U roślin drzewiastych dominują czynniki natury wewnętrznej warunkujące uzyskanie stanu dojrzałości do kwitnienia. Stan dojrzałości do kwitnienia u roślin drzewiastych wiąże się z osiągnięciem określonego wieku, co jest związane z pewnym, zaawansowanym stopniem rozwoju wegetatywnego. Drzewa i krzewy są poza tym roślinami, u których inicjacja generatywna (powstanie zawiązków kwiatowych) jest często oddzielona od momentu morfogenezy kwiatu okresem spoczynkowym. U roślin tych istnieje zatem rozdzielenie czasowe indukcji kwitnienia od dyferencjacji (morfogenezy) kwiatu, a następnie tworzenia nasion. Na przykład u sosny okres od indukcji żeńskiego kwiatu do wytworzenia nasienia trwa około trzech lat. W pierwszym roku inicjują się zawiązki kwiatów i rozwijają się megasporofil. W drugim roku następuje morfogeneza kwiatu, zapylenie i mejoza w komórkach macierzystych megaspor. Dopiero w trzecim roku tworzą się rodnie i dochodzi do zapłodnienia i wytworzenia nasion. Cykl rozwojowy kwiatów męskich u sosny trwa dwa lata. W pierwszym roku inicjują się zawiązki kwiatowe i rozwijają mikrosporofile, natomiast w drugim roku następuje mejoza w komórkach macierzystych pyłku, formowanie się ziaren pyłku oraz pylenie.

Zatem mechanizmy kwitnienia u roślin drzewiastych są niewątpliwie dużo bardziej skomplikowane niż u roślin zielnych. Istnieją ponadto oczywiste trudności techniczne w badaniu tych mechanizmów u wieloletnich drzew.

Z drugiej strony jednak wydaje się, że podstawowe mechanizmy kwitnienia są wspólne dla wszystkich roślin. Faza generatywna jest rezultatem procesów, które odbyły się w fazie rozwoju wegetatywnego i im bardziej rozwój wegetatywny jest zaawansowany, tym szybciej roślina jest zdolna wytworzyć kwiaty. U różnych roślin wyróżnić można, poza tym, trzy zasadnicze fazy (etapy) kwitnienia, tzn. indukcję (w liściu) oraz ewokację i morfogenezę (dyferencjację) kwiatu (w wierzchołku wzrostu pędu). U roślin autonomicznych, jakimi są drzewa, etap indukcji jest mniej wyraźny i uzależniony jest głównie od czynników natury wewnętrznej.

HISTORIA BADAŃ MECHANIZMÓW KWITNIENIA

Pierwszą koncepcję przyczyn przejścia roślin z fazy rozwoju wegetatywnego do rozwoju generatywnego zaproponował na początku ubiegłego wieku G. Klebs [Klebs 1913]. Przyczyny tej dopatrywał się w zmianach stosunku ilościowego cukrowców do związków azotowych w organizmie roślinnym. Przy dużych ilościach cukrowców, wytwarzanych w procesie fotosyntezy, a niższej zawartości związków azotowych, roślina uzyskuje zdolność do kwitnienia. Później

pogląd ten uproszczono postulując że decyduje stosunek węgla do azotu (C:N). Pogląd ten znajdował eksperymentalne potwierdzenie ponieważ wysokie dawki nawozu azotowego przedłużają rozwój wegetatywny hamując kwitnienie i owocowanie. Szybko okazało się jednak, że istnieje wiele faktów przeczących tej hipotezie. Koncepcja tzw. różnorodności pokarmowej była jednak dalej kontynuacją tej idei. Sachs i Hackett uważali, że specyficzna dystrybucja asymilatów do wierzchołków wzrostu jako wynik indukcji fotoperiodycznej jest czynnikiem indukującym kwitnienie, rozpoczynając procesy ewokacji i morfogenezy kwiatu. Teza ta nie spotkała się jednak z szerszą akceptacją, bowiem nie wiadomo, czy dotarcie asymilatów do wierzchołków wzrostu jest przyczyną, czy też konsekwencją stanu indukcji generatywnej [Sachs i Hackett 1983].

W związku z tym w latach 30-tych ubiegłego wieku pojawiła się koncepcja istnienia hormonu kwitnienia, czyli florigenu [Chailakhyan 1936]. Koncepcja ta, ze względu na jej duże znaczenie, jest omówiona poniżej.

W końcu Bernier proponując na początku lat 80-tych wieloczynnikowy model kontroli kwitnienia, wyszedł z założenia, że różne czynniki, zarówno asymilaty jak i substancje hormonalne, działając jako stymulatory i inhibitory kwitnienia, uczestniczą w inicjacji kwiatów w wierzchołkach wzrostu pędów [Bernier 1988]. Zwolennicy tych poglądów uważają, że do morfogenezy kwiatu może dojść tylko wtedy, gdy wszystkie niezbędne czynniki, będące w sumie kompleksowym induktorem kwitnienia, znajdują się w odpowiednich ilościach i czasie w wierzchołku wzrostu.

KONCEPCJA FLORIGENU

W 1936 roku Mikhail Chailakhyan doszedł do wniosku, że w wyniku indukcji fotoperiodycznej pojawia się w liściach hormon kwitnienia, który nazwał florigenem. Wniosek ten wysnuł na podstawie obserwacji, że sygnał fotoperiodyczny jest przyjmowany przez liście, zaś różnicowanie generatywne zachodzi w wierzchołkach wzrostu. Istnieje więc konieczność przekazania informacji i mobilny florigen jest właśnie jej nośnikiem. Również przekazywanie w wyniku szczepień sygnału kwitnienia z zaindukowanych donorów (rośliny kwitnące) do wegetatywnych akceptorów (rośliny wegetatywne), stanowiło dodatkowy argument do wysunięcia przez Chailakhyana koncepcji florigenu. Koncepcja ta zakładała więc, że w wyniku indukcji fotoperiodycznej powstaje w liściach specyficzny, uniwersalny hormon kwitnienia – florigen, który przemieszcza się floemem do wierzchołka wzrostu, zmieniając wzorzec jego różnicowania z wegetatywnego na generatywny. Wytworzony w zaindukowanych do kwitnienia roślinach florigen jest także przekazywany drogą szczepień, powodując kwitnienie roślin wegetatywnych [Chailakhyan 1936].

Koncepcja ta została szeroko zaakceptowana i stała się na wiele dziesiątków lat dominującym sposobem myślenia w badaniach mechanizmów kwitnienia. Okazało się jednak, że istnienia tak rozumianego hormonu nie sposób udowodnić [Wojciechowski i in. 2007]. Szeroko prowadzone badania izolacji florigenu w czołowych pracowniach na świecie skończyły się niepowodzeniem. Chailakhyan w międzyczasie kilkakrotnie modyfikował koncepcję florigenu (gibereliny + antezyny, florigen/antyflorigen), jednakże nigdy istnienia takiego hormonalnego kompleksu kwitnieniowego nie udowodniono.

Z drugiej strony jednak nie sposób zaprzeczyć, że mobilny sygnał kwitnienia rzeczywiście istnieje i powstaje w liściach, skąd przemieszcza się do wierzchołków wzrostu, a także jest przekazywany drogą szczepień.

Zagadka mitycznego florigenu została dopiero wyjaśniona wraz z wprowadzeniem do badań nad mechanizmami kwitnienia metod biologii molekularnej. Okazało się, że sygnał kwitnieniowy rzeczywiście istnieje, lecz nie jest to, jak przypuszczał Chailakhyan, hormon, tylko białko kodowane przez specyficzny gen integratorowy (*FLOWERING LOCUS T- FT*) lub inne białka należące do rodziny FT [Kardailsky i in. 1999, Wigge 2011].

BADANIA MOLEKULARNE

Prowadzone na przestrzeni ostatnich 20 lat badania nad mechanizmami indukcji kwitnienia z wykorzystaniem modelowej rośliny dnia długiego *Arabidopsis thaliana* pozwoliły zidentyfikować i scharakteryzować blisko 100 genów i białek związanych z tym procesem. Dzięki zastosowaniu mutantów wspomnianego gatunku opisano znaczenie tych czynników, co w konsekwencji doprowadziło do sformułowania szeregu hipotez przedstawiających na poziomie molekularnym kolejne etapy przemian metabolicznych wywołujących zakwitanie. Kwitnienie może zostać zainicjowane na kilka różnych sposobów. Ze względu na inklinacje historyczne a także łatwość manipulacji oraz jednoznaczność odpowiedzi początkowe prace skupiały się głównie na czynnikach zewnętrznych indukujących przejście roślin z fazy rozwoju wegetatywnego w generatywny. Najefektywniej modulujące ten proces okazały się być warunki termiczne (wernalizacja) oraz fotoperiodyczne. W toku równoległe prowadzonych badań wykazano jednak, że nie są to jedyne bodźce kontrolujące czas kwitnienia u roślin. Wykazano, że równie ważna jest gospodarka (homeostaza) hormonalna czy też endogennie zaprogramowany i realizowany w czasie ontogenezy wzorzec rozwojowy specyficzny dla każdego gatunku. Na podstawie wyników wszystkich ówczesnych prac zaproponowano model funkcjonowania 4 niezależnych szlaków indukcji kwitnienia: fotoperiodyczny, wernalizacyjny, hormonalny, autonomiczny (Ryc.1.) [Baurle i Dean 2006, Turnbull 2011].

SZLAK FOTOPERIODYCZNY

Aktywacja szlaku fotoperiodycznego indukcji kwitnienia zależna jest od funkcjonowania w komórkach roślinnych specyficznych fotoreceptorów. Najważniejszymi z nich są fitochromy, kryptochromy oraz białka ZTL, LKP czy FKF1. Aktywność tych receptorów uzależniona jest od charakterystycznych dla nich długości pochłanianych fal świetlnych. Fitochromy pochłaniają światło czerwone i daleką czerwień, kryptochromy światło UV A i B a ostatnie z wymienionych powyżej są receptorami światła niebieskiego. Wydaje się, że aktywność wszystkich skupia się na tzw. rdzeniu szlaku fotoperiodycznego, czyli niewielkiej grupie genów bezpośrednio kontrolujących kwitnienie zależne od światła. W skład rdzenia szlaku fotoperiodycznego wchodzi: geny zegara okołodobowego oraz *GI*, *CO* i *FT*. Do niedawna przypuszczano, że podstawową funkcją fotoreceptorów jest kontrola ekspresji tych genów. Twierdzenie to jest prawdziwe w przypadku genów zegara okołodobowego. Jednak ostatnie badania pokazują jeszcze inne możliwości kontroli aktywności zwłaszcza *CO* i *FT* [Turck i in. 2008, Fornara i in. 2009].

Fitochrom labilny reprezentowany u *Arabidopsis* przez PHYA oraz kryptochromy stabilizują w sprzyjających warunkach fotoperiodycznych białko *CO*, nie mając bezpośredniego wpływu na aktywność transkrypcyjną genu. Za bezpośrednią degradację tego białka odpowiedzialne są PHY B (fitochrom stabilny) oraz białko SPA1 usuwające *CO* na początku dnia. Ekspresja *CO* regulowana jest pośrednio przez zegar okołodobowy oraz receptory światła niebieskiego. Najważniejsze dla tego procesu wydaje się współdziałanie *GI* z FKF1, ZTL i LKP, mające na celu degradację czynników CDF odpowiedzialnych bezpośrednio za hamowanie transkrypcji *CO*. W podobny sposób eliminowane mogą być także inne inhibitory tego genu. Ciekawym aspektem tego współdziałania jest kontrola aktywności i stabilności *GI* realizowana przy udziale ZTL [Valverde i in. 2004, Imaizumi i in. 2005, Laubinger i in. 2006, Sawa i in. 2007, Imaizumi 2010].

Równie interesujące mechanizmy kontroli ekspresji genu oraz aktywności białka zaobserwowano w przypadku *FT*. Do stymulacji aktywności transkrypcyjnej genu kodującego ten peptyd dochodzi w sytuacji, kiedy w sprzyjających warunkach fotoperiodycznych stabilizowane jest białko *CO*. To jego obecność, determinowana funkcjonowaniem zegara okołodobowego, decyduje o prawidłowym przebiegu szlaku fotoperiodycznej indukcji kwitnienia. Na podstawie charakterystycznej domeny palców cynkowych *CO* opisano początkowo jako czynnik transkrypcyjny. Brak dowodów na bezpośrednie wiązanie się do DNA skłoniło badaczy do poszukiwań białek posiadających tę aktywność i wiążących się z *CO*. Ostatnie doniesienia wskazują, że to dzięki peptydom należącym do rodziny HAP CONSTANS może stymulować ekspresję *FT*. Wyniki badań pokazują, że na

poziomie regulacji aktywności transkrypcyjnej *FT* może być regulowany także niezależnie od CO. Droga ta przebiega z pominięciem układu fitochromowego oraz zegara okołodobowego. Najważniejszymi jej elementami są kryptochrom 2 oraz białko CIB1 należące do grupy czynników transkrypcyjnych zawierających w swej budowie domenę bHLH [Liu i in. 2008]. Kontrola aktywności białka FT nabiera dodatkowego znaczenia z racji tego, że jest ono mobilnym sygnałem przenoszonym z liści czy liścieni do wierzchołków wzrostu gdzie dzięki oddziaływaniom z FD stymuluje aktywność genu *API* odpowiedzialnego za tożsamość metystemów. Istotne dla indukcji kwitnienia są także ilość białka FT oraz jego aktywność biochemiczna. Tworzenie kompleksu FD/FT zależy właśnie od tych czynników, a kluczowym wydaje się być kontrolowany przez białka 14-3-3 poziom fosforylacji FT (Ryc.1.) [Oecking i in. 2009].

Funkcja FT nie ogranicza się jedynie do stymulacji genów homeotycznych odpowiedzialnych za inicjację rozwoju kwiatu. Innym z genów aktywowanych przez FT jest *SOC1*. Choć nie pełnią one równorzędnych funkcji w szlakach indukcji kwitnienia zakwalifikowano je (*FT*, *SOC1*) do grupy genów integratorowych. Co ciekawe kolejnym ogniwem tej kaskady inicjującej kwitnienie jest następny gen integratorowy *LFY*. Pomimo tego, że zarówno *SOC1* jak i *LFY* leżą w tym samym ciągu zdarzeń prowadzących do wytwarzania kwiatów oraz podobnie do *FT* są one genami integratorowymi, nie są klasyfikowane jako elementy szlaku fotoperiodycznego [Abe i in. 2005, Wigge i in. 2005].

WERNALIZACJA I SZLAK AUTONOMICZNY

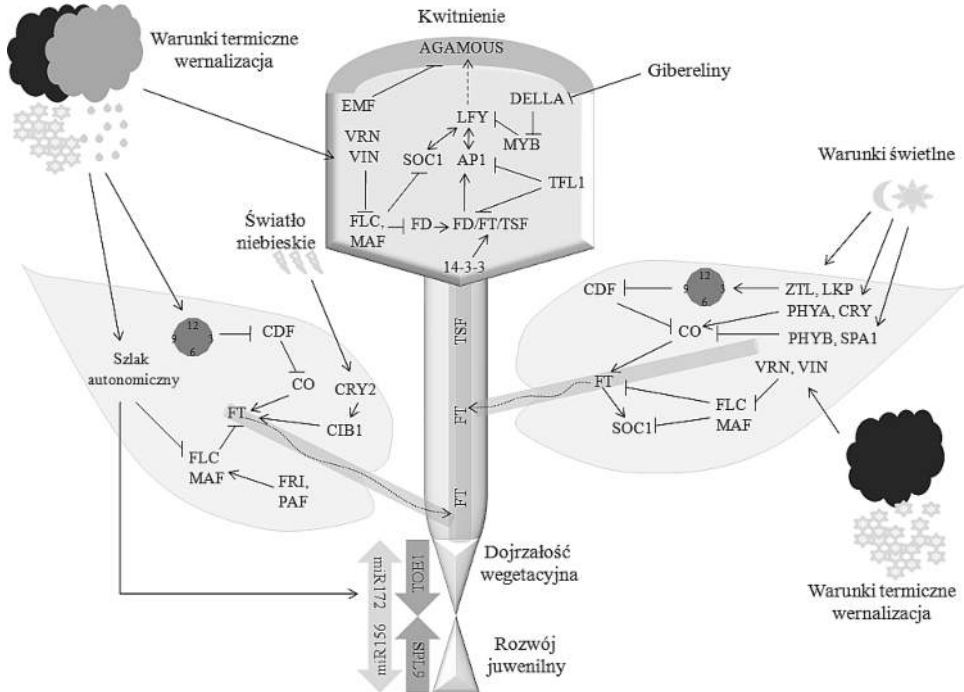
Kolejny szlak promujący rozwój generatywny zależny jest od niskiej temperatury. Warunki temperaturowe oraz czas trwania procesu wernalizacji jest gatunkowo specyficzny. Dla rzodkiewnika scharakteryzowano podstawowe mechanizmy molekularne determinujące przemiany prowadzące do wytwarzania kwiatów. Niemal od samego początku badań nad tym szlakiem bezspornym był fakt, że najważniejszym jego elementem jest gen i białko FLC. Analizy peptydu wykazały, że jest on jednym z członów rodziny białek MADS. Ma on zdolność bezpośredniego wiązania się do DNA zwykle w formie kompleksów homo- lub heteromerycznych. Jak wykazały liczne badania funkcją tego białka jest hamowanie kwitnienia. Dlatego też określa się go mianem kluczowego inhibitora (represora) kwitnienia. Wykazano u *Arabidopsis*, że FLC jest bezpośrednio zaangażowany w kontrolę ekspresji *FD*, *FT* i *SOC1*. W ten sposób blokuje każdą z dróg przebiegającą przez te trzy geny odciskając piętno na szlakach indukcji kwitnienia. O jego znaczeniu dla regulacji kwitnienia może świadczyć też mnogość czynników białkowych kontrolujących ekspresję *FLC*. Poza czynnikami pozytywnie wpływającymi na aktywność tego genu, takimi jak FRI, FRI-like czy

kompleks PAF, wyróżnić można co najmniej 3 białka VIN1, VRN1 i VRN2, które hamują jego ekspresję pod wpływem wernalizacji. Wszelkie dane wskazują, że zarówno promowanie jak i inhibicja transkrypcji polega na zmianach właściwości chromatyny w obrębie locus genu *FLC*. Do najważniejszych modyfikacji należą metylacja i acetylacja reszt lizyny w histonie H3. To właśnie te przeciwstawne funkcjonalnie zmiany dokonywane są m.in. przez wymienione powyżej białka tworzące niejednokrotnie wielopodjednostkowe kompleksy (Ryc. 1.) [Alexandre i Hennig 2008, Kim i in. 2009].

Chociaż szlak autonomiczny opisano pierwotnie jako niezależny od warunków środowiskowych oraz samodzielnie indukujący kwitnienie, to jednak cechuje go wiele podobieństw do opisanego powyżej szlaku wernalizacyjnego. Podstawową funkcję spełnia w nim co najmniej 7 białek posiadających kilka charakterystycznych właściwości. Część z nich FVE, FLD to peptydy bezpośrednio zaangażowane w remodelowanie chromatyny genu *FLC*. Determinują one identyczne modyfikacje histonów jak te opisane w szlaku wernalizacyjnym. Aktywność białek szlaku autonomicznego nie ogranicza się tylko do regulacji *FLC* na poziomie struktury chromatyny. Zmiany aktywności transkrypcyjnej tego kluczowego inhibitora kwitnienia kontrolowane są także na poziomie syntezy mRNA genu *FLC*. W procesie tym FCA i FY determinują wcześniejsze rozcinanie transkryptu, co powoduje powstanie niepełnej długości matrycy do translacji a w konsekwencji zahamowanie syntezy białka FLC. Wykazano, że niektóre z elementów szlaku autonomicznego podlegają autoregulacji, co w rezultacie zapobiega zbyt wczesnej inhibicji *FLC* i pozwala roślinie zakwitać w warunkach optymalnych (Ryc. 1.). Tak więc, zarówno szlak wernalizacyjny jak i autonomiczny pełnią podobną rolę dzięki częściowo zbieżnym mechanizmom molekularnym [Winichayakul i in. 2005, Jung i in. 2007, Baurle i Dean 2008].

SZLAK HORMONALNY

Następna droga prowadząca do kwitnienia to szlak hormonalny. Na podstawie badań przeprowadzonych na *A. thaliana* wykazano, że najważniejszymi fitohormonami w zakwitaniu są gibereliny. Doświadczenia prowadzone na mutantach wykazały wpływ GA na niewielką grupę genów. Wyróżniono w nich geny regulatorowe oraz efektorowe. Do pierwszych należą receptory giberelin oraz białka z rodziny DELLA, decydujące o trwałości czynników transkrypcyjnych determinujących aktywność genów odpowiedzi. Kluczowym wydaje się w tej regulacji białko MYB33. Docelowe sekwencje wiązane przez ten czynnik transkrypcyjny zlokalizowano w promotorze genu *LFY*. Kolejne etapy w tym szlaku są konsekwencją aktywacji tego genu integratorowego. Jego produkt białkowy wpływa pozytywnie na transkrypcję zarówno genów tożsamości



Ryc. 1. Współdziałanie i regulacja kluczowych dla indukcji kwitnienia genów i białek na podstawie badań prowadzonych na *A. thaliana*. → - Aktywacja —| - Hamowanie, ● - wernalizacja 0-15°C, ○ - temperatura otoczenia 15-25°C
 Źródło: Opracowanie własne.

merystatycznej np. *API* jak również na aktywność *SOC1* (Ryc.1.). Z badań prowadzonych także na innych gatunkach roślin wynika jednoznacznie, że nie tylko gibereliny kontrolują czas zakwitania. Uzasadnionym na podstawie licznych doświadczeń wydaje się być twierdzenie wskazujące na rolę homeostazy hormonalnej w mechanizmach indukcji kwitnienia [Turnbull 2011].

WSZYSTKIE DROGI PROWADZĄ DO KWITNIENIA

Z zaprezentowanych powyżej mechanizmów wynika, że najważniejszymi dla indukcji kwitnienia są geny integratorowe *FT*, *SOC1*, *LFY* i *FLC*. Kontrola ich aktywności transkrypcyjnej oraz stabilności i funkcjonalności białka może odbywać się zwykle, przez co najmniej dwa z zaprezentowanych szlaków. Szlak fotoperiodyczny wpływa bezpośrednio na transkrypcje *FT* a pośrednio *SOC1* i *LFY*. Szlak wernalizacyjny kontroluje aktywność *FLC* a przez kodowane przez ten gen białko także *FT* i *SOC1*. Podobny przebieg zaproponowano dla szlaku autonomicznego. Szlak giberelinowy odpowiada za aktywację *LFY* i *SOC1*. Jest to zatem dość prosty mechanizm kontroli indukcji kwitnienia. Składa się on z

czynników regulatorowych funkcjonujących niezależnie w każdym ze szlaków, genów integratorowych oraz kontrolowanych bezpośrednio przez nie genów tożsamości merystatycznej i organowej kwiatów.

Ostatnie badania wskazują jednak na zdecydowanie większy stopień złożoności procesów towarzyszących kwitnieniu. Najważniejszym osiągnięciem tych doświadczeń jest wykazanie, że poza 4 podstawowymi szlakami kwitnieniowymi jest jeszcze kilka innych dróg prowadzących do wytworzenia kwiatów. Jako pierwszą z nich wskazano szlak jakości światła. Prowadzone badania wykazały jego zależność od układu fitochromowego. Stwierdzono, że kluczowym dla przebiegu tego szlaku jest gen *PFT1*. Funkcjonuje on niezależnie od zegara okołodobowego w regulacji aktywności transkrypcyjnej *CO*. W ten sposób tłumaczy się indukcję kwitnienia niezależną od zmian dobowych i skomplikowanego mechanizmu pomiaru czasu trwania dnia i nocy. Możliwy jest jednak model, w którym *PFT1* wpływa na działanie fotoreceptorów kontrolując w ten sposób ich funkcjonowanie w przemianach towarzyszących stabilizowaniu białka *CO*. Niemniej jednak w szlaku tym nie wykazano udziału zegara okołodobowego w kontroli podstawowych przemian w nim zachodzących [Cerdan i Chory 2003].

Od dawna w licznych koncepcjach dotyczących mechanizmów indukcji kwitnienia postulowano udział podstawowych procesów metabolicznych. Fotosynteza, stosunek C:N, ilość podziałów komórkowych w stożku wzrostu, powierzchnia asymilacyjna liści, dostępność substancji mineralnych czy wiek rośliny, były rozważane jako przyczyny zainicjowania rozwoju generatywnego.

Najintensywniej badanym jest obecnie wpływ wieku, czyli osiągnięcie określonego stopnia rozwoju wegetatywnego. Docelowymi dla aktywności tego szlaku są geny *FT*, *SOCI* i *API*. Mechanizm kontroli jest niezwykle skomplikowany a jego poznanie zawdzięczamy opisaniu i charakterystyce funkcji, jaką w komórkach roślinnych spełniają niskocząsteczkowe RNA należące do grupy miRNA. To kodowane przez geny *MIR* transkrypty regulują na poziomie translacji ilości takich czynników transkrypcyjnych jak *SPL*, *TOE*, *SMZ* czy *SNZ* a one właśnie odpowiedzialne są bezpośrednio za przejście rośliny z fazy juwenilnej do fazy rozwoju wegetatywnego a w konsekwencji generatywnego. Specyficzna dla wieku akumulacja miR156 oraz przeciwnego w funkcji miR172 decyduje, kiedy roślina zdolna będzie do wytwarzania kwiatów. Swoją rolę w tym ma także szlak autonomiczny, którego elementy odpowiedzialne są za stymulowanie transkrypcji miR172. Poza pierwszymi przemianami angażującymi niskocząsteczkowe RNA oraz wymienione powyżej czynniki transkrypcyjne, wszystkie dalsze etapy kwitnienia są wspólne z innymi szlakami indukcji kwitnienia [Jung i in. 2007].

Białka szlaku autonomicznego odpowiedzialne są także za inicjację rozwoju generatywnego zależną od temperatury otoczenia. Wykazano, że zmiana temperatury z 23 na 27°C wywołuje u *A. thaliana* efekt podobny do zmiany warunków fotoperiodycznych z SD (krótki dzień) na LD (długi dzień). Jak się okazuje podobne odpowiedzi zależne są od zmiany aktywności transkrypcyjnej *FT* a także funkcji *FD*. W mechanizmach tych nie uczestniczą elementy szlaku fotoperiodycznego takie jak *CRY*, *GI* czy *CO*. Wydaje się, że podstawą przemian zachodzących w szlaku zależnym od temperatury otoczenia jest zmiana składu chromatyny w locus *FT* skutkująca modyfikacjami strukturalnymi a w konsekwencji zmianą aktywności transkrypcyjnej tego genu. Funkcjonalnie jest to mechanizm podobny do tego opisanego w regulacji *FLC* i wskazuje jednoznacznie na rolę, jaką w indukcji kwitnienia odgrywa proces remodelowania chromatyny [Balasubramanian i in. 2006, Kumar i Wigge 2010]. Temperatura może także wpływać na przebieg szlaku fotoperiodycznego poprzez kontrolowanie aktywności białek zegara okołodobowego. Zwłaszcza grupa peptydów należących do rodziny *PRR* wrażliwa jest na warunki termiczne towarzyszące zmianom fotoperiodycznym. Podkreślić należy, że są to kluczowe elementy wewnętrznego oscylatora, decydującego o poprawnym wyznaczeniu rytmu okołodobowego. Kolejne etapy przemian prowadzących do zakwitania są wspólne ze szlakiem fotoperiodycznej indukcji kwitnienia.

Na podstawie badań przeprowadzonych w ostatnich latach wykazano także, iż szlak wernalizacyjny może przebiegać bez udziału *FLC*. Podstawową rolę kontrolną przejmują wtedy białka *AGL19* i *AGL24*, które zmieniają aktywność *SOCI* i *LFY* [McClung i Davis 2010, Salomé i in. 2010].

Wśród genów zaangażowanych w indukcję kwitnienia wymienić należy także te, które są inhibitorami tego procesu. Poza wspomnianym już wcześniej *FLC* należą do tej grupy także *EMF 1* i *2* oraz *TFL1*. Ostatni z nich pełni funkcję przeciwną do roli, jaką odgrywa *FT*. Mechanizm działania *EMF1* nie jest do końca poznany wiadomo tylko, że zmienia aktywność transkrypcyjną *AGAMOUS* jednego z genów odpowiedzialnych za organogenezę kwiatów (Ryc.1.). *EMF2* należy do czynników regulujących procesy remodelowania chromatyny. Jak wspomniano wcześniej jest to powszechny sposób zmiany aktywności genów. Dlatego też postuluje się, że *EMF2* może kontrolować proces inicjacji kwitnienia na wielu etapach przemian [Kinoshita i in. 2001, Ahn i in. 2006].

KWITNIENIE U INNYCH GATUNKÓW ROŚLIN

Wszystkie opisane powyżej mechanizmy kwitnienia funkcjonują u rzodkiewnika pospolitego. Prowadzone badania wykazały jednak obecność większości z wspomnianych powyżej genów u innych gatunków roślin. Niektóre z

nich są silnie zachowywane ewolucyjnie. Dotyczy to zwłaszcza elementów szlaków fotoperiodycznego oraz autonomicznego. Wydaje się, że także mechanizmy kolejnych przemian w rozwoju ontogenetycznym prowadzące w konsekwencji do zakwitania są podobne. Prowadzone doświadczenia wskazują ich udział w indukcji kwitnienia tak u roślin o odmiennej wrażliwości np. fotoperiodycznej, czy różnych przynależności systematycznych np. rośliny jednoliścienne. W przypadku niektórych szlaków można zaobserwować pewną autonomię w doborze białek czy genów zaangażowanych w podstawowe przemiany. U roślin jednoliściennych nie stwierdzono występowania FLC, ale jego funkcja przejęta została przez inne białka pozwalające prawidłowo wyznaczać czas kwitnienia zależny od wernalizacji [Higgins i in. 2010].

Pomimo więc niewielkich różnic w doborze czynników kontrolujących przebieg danego szlaku indukcji kwitnienia u różnych roślin zasadniczy charakter przemian i mechanizmów zostaje zachowany.

KWITNIENIE ROŚLIN DRZEWIASTYCH

U roślin drzewiastych szczególnego znaczenia nabiera zależność między zdolnością do zakwitania a wiekiem, czyli określonym stadium rozwojowym. Szczególnie długi okres rozwoju wegetatywnego występuje u drzew. Wiele drzew nie kwitnie przed upływem przynajmniej dziesięciu lat, przy czym często fazę „młodociana” charakteryzuje obok niezdolności do kwitnienia, także inny pokrój rośliny oraz inny kształt liści, niż w fazie dojrzałej. Podobne jednak zjawiska, ale trwające znacznie krócej, obserwuje się często u roślin zielnych. Tak więc rozwój roślin zachodzi jako kolejno po sobie następujące fazy, z których każda wymaga specyficznego układu metabolicznego oraz określonych warunków środowiskowych. Sosna w zwarciu kwitnie około 40 roku życia, natomiast na stanowiskach otwartych wytworzyć kwiaty może już kilkuletnia roślina.

Zatem u roślin drzewiastych szczególnego znaczenia nabiera zagadnienie „dojrzałości do kwitnienia”. Dwa główne czynniki środowiska – fotoperiod i temperatura – od których bezpośrednio zależy kwitnienie większości roślin zielnych – wywierają oczywiście wpływ także na rośliny drzewiaste, podobny jest również mechanizm ich działania, u drzew dominuje jednak czynnik natury wewnętrznej, warunkujący osiągnięcie dojrzałości do kwitnienia.

U drzew proces kwitnieniowy jest także rozciągnięty w czasie i inicjacja generatywna jest oddzielona od właściwej morfogenezy kwiatu długim okresem spoczynkowym. Dlatego też warunki wewnętrzne i środowiskowe konieczne do spowodowania inicjacji kwitnienia mogą znacznie różnić się od warunków korzystnych dla rozwoju (morfogenezy) kwiatów.

Oczywistym jest także, że ogromne znaczenie miałyby tu każda metoda prowadząca do skrócenia okresu, po upływie którego drzewo osiąga zdolność do zakwitania, oraz do przyspieszenia cyklu reproduktywnego. Poznanie mechanizmów kwitnienia drzew mogłoby pozwolić także na uzasadnione hamowanie zakwitania, ponieważ niektóre drzewa (np. sosna) wytwarzają olbrzymie ilości pyłku, co radykalnie obniża produkcję drewna.

Molekularne mechanizmy kwitnienia drzew są stosunkowo mało poznane. Decydują o tym oczywiście trudności techniczne w prowadzeniu badań. Jednakże nie ma wątpliwości, iż rozwój roślin drzewiastych, podobnie jak roślin zielnych, jest kontrolowany przez dwa podstawowe układy regulacyjne: układ genetyczny i układ hormonalny.

CZNNIKI WEWNĘTRZNE I ZEWNĘTRZE INDUKUJĄCE KWITNIENIE U DRZEW

Rośliny drzewiaste podobnie do zielnych przechodzą te same fazy rozwoju: fazę juwenilną, fazę dojrzałości wegetatywnej oraz fazę generatywną. Podlegają podobnym procesom morfogenetycznym polegającym na zmianach molekularnych, metabolicznych, anatomicznych i morfologicznych. W przypadku wieloletnich drzew są one jednak bardzo rozciągnięte w czasie. Najważniejszą z punktu widzenia ontogenezy roślin jest kontrola przejścia pomiędzy kolejnymi fazami rozwojowymi. Niezwykle istotne jest to w przypadku drzew, które w czasie trwania określonych faz, w każdym sezonie wegetacyjnym, poddawane są działaniu wielu czynników biotycznych i abiotycznych mogących całkowicie zmieniać wzorce rozwojowe. Właściwy etap ontogenezy gwarantuje prawidłowy przebieg wszystkich procesów zapewniając przeżycie osobnikowi oraz sukces reprodukcyjny populacji czy gatunku.

Na podstawie badań prowadzonych na *Arabidopsis thaliana* i *Zea mays* poznano podstawy molekularne przemian regulujących przejście rośliny z fazy rozwoju młodocianego do dorosłego rozwoju wegetatywnego. Kluczową rolę odgrywają w nich dwa rodzaje miRNA, miR156 oraz miR172 wraz z kontrolowanymi przez nie czynnikami transkrypcyjnymi.

miRNA został opisany jako klasa niekodujących niskocząsteczkowych RNA, pełniących w komórkach organizmów eukariotycznych funkcje regulatorowe. Ten rodzaj małych RNA zapisany jest w genomie. Stwierdzono, że rozmieszczenie tych jednostek transkrypcyjnych może być bardzo różne. Odnajduje się je wewnątrz genów kodujących peptydy, zarówno w części kodującej (eksonach) jak również w intronach. Mogą występować także niezależnie w sekwencjach między genowych. Z lokalizacją związane są także modele regulacji transkrypcji tych genów. Mogą one podlegać transkrypcji zależnej od promotorów genów w obrębie których się

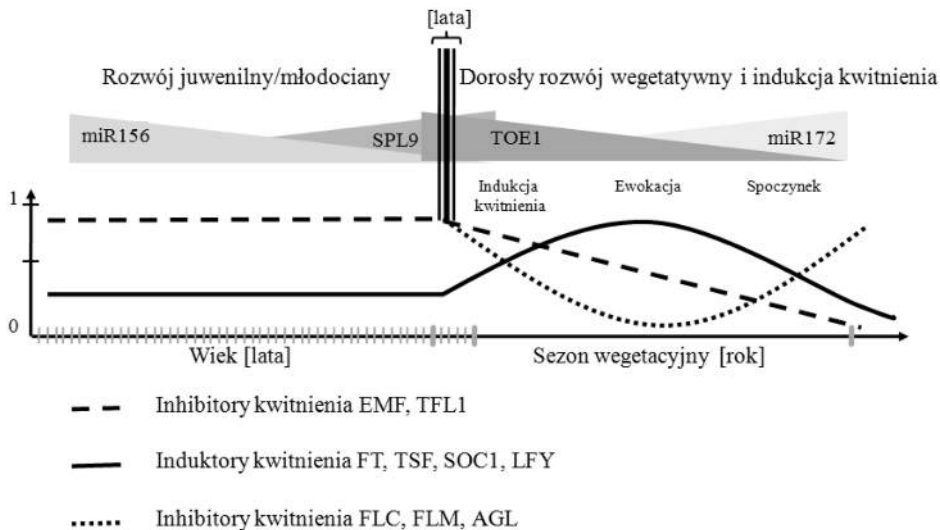
znajdują lub eksprymowane są całkowicie niezależnie pod kontrolą własnych promotorów. Powstające komplementarne do DNA sekwencje są poddawane skomplikowanej obróbce w wyniku której powstają 21-25 nukleotydowe fragmenty RNA. Te kodowane na matrycy genów miR cząsteczki RNA są formą końcową i efektorową genu. W znakomitej większości przypadków aktywne są w cytoplazmie w kompleksach rybonukleoproteinowych RISK z białkami rodziny ARGONAUT. To miRNA decyduje, na zasadzie komplementarności, o wiązanie się kompleksu RISK z docelowym mRNA. Zgodność sekwencji nukleotydowej jest niezwykle specyficznym sposobem identyfikacji transkryptów genów kodujących peptydy. W konsekwencji rozpoznanie mRNA prowadzi do jego degradacji lub do fizycznego zahamowania translacji. W każdym przypadku pomimo prawidłowego przebiegu transkrypcji i obróbki mRNA genu docelowego, nie powstaje funkcjonalny peptyd. Jest to jeden z podstawowych mechanizmów kontroli ekspresji genów.

Według modelu zaproponowanego dla *A. thaliana* pomiędzy miRNA oraz docelowymi dla nich genami istnieje specyficzna zależność. Wykazano, że miR156 i miR172 charakteryzują się przeciwstawną aktywnością. W okresie młodocianym przeważa ten pierwszy, ale jego ilość w miarę upływu czasu spada. Docelowymi dla aktywności miR156 są transkrypty genów należących do rodziny *SPL* (*SQUAMOSA PROMOTOR BINDING PROTEIN-LIKE*). Efektem zmniejszenia ilości miRNA jest stopniowy wzrost efektywności biosyntezy czynników transkrypcyjnych kodowanych przez wspomniane powyżej geny. Jednym z nich jest *SPL9*, który jest białkiem pozytywnie regulującym ekspresję genu miR172. Pod wpływem działania tego czynnika transkrypcyjnego wzrasta ilość funkcjonalnych cząsteczek miR172, które hamują translację genów podobnych do *AP2* takich jak np. *TOE1*, *SMZ* czy *SNZ*. Kodowane przez nie czynniki transkrypcyjne są inhibitorami ekspresji kluczowego dla kwitnienia genu *FT*.

Nadekspresja miR156 powoduje wyraźne opóźnienie przejścia, zarówno z fazy rozwoju młodocianego do dorosłego rozwoju wegetatywnego, jak i następnie do fazy reprodukcyjnej. Nadekspresja *TOE1* opóźnia wejście rośliny w fazę dorosłego rozwoju wegetatywnego.

Identyczny schemat kontroli przejścia z fazy juwenilnej do fazy dojrzałego rozwoju wegetatywnego zaobserwowano u drzew. Prowadzone badania potwierdziły udział w podstawowych przemianach zarówno cząsteczek miRNA homologicznych do miR156 oraz miR172, jak również odpowiednich czynników transkrypcyjnych należących do rodzin *SPL* i *AP2-like* (Ryc.2.) [Wang i in, 2011].

Współdziałanie regulatorowych cząsteczek RNA oraz czynników transkrypcyjnych podobnych do *SPL* oraz *AP2-like* (*TOE1*) może u drzew, podobnie jak u roślin zielnych, bardzo precyzyjnie wyznaczać czas gotowości do



Ryc. 2. Schemat wpływu poziomu ekspresji genów *miR56* i *miR172* oraz genów docelowych *SPL9* i *TOE1* na determinację fazy rozwoju roślin oraz zależności ilościowe między czynnikami stymulującymi i hamującymi kwitnienie we wskazanych fazach ontogenezy
 Źródło: Opracowanie własne.

kwitnienia. Byłyby to pierwszy z etapów wymaganych do zainicjowania rozwoju generatywnego. Drugim etapem byłaby zależna od wielu czynników (fotoperiod, temperatura, gospodarka hormonalna, metabolizm podstawowy) aktywacja genów specyficznych dla przebiegu podstawowych szlaków inicjacji kwitnienia. Rolą tych genów może być odpowiedź na specyficzne czynniki endo- czy egzogenne oraz kontrola poszczególnych etapów przemian.

Znaczna część genów odpowiedzialnych za kwitnienie u roślin zielnych opisana została także u drzew. Wykazano obecność takich czynników jak CO czy FT zarówno u szpilkowych (świerk, sosna) jak i liściastych (topola, jabłoń). Można przypuszczać, że zachowywane są także elementy szlaku autonomicznego. Wyniki badań prowadzonych na drzewach pokazują także jak istotna dla ich rozwoju jest homeostaza hormonalna. Wielokrotnie wskazywano na ważną rolę giberelin w przejściu do fazy generatywnej zarówno u drzew iglastych jak i liściastych [Holefors i in.2009, Mimida i in. 2009, Rinne i in. 2011].

Wykazano, że u drzew szlak fotoperiodyczny kwitnienia ma bardzo podobny przebieg jak u rzodkiewnika. Podobieństwo to wynika zarówno z ciągu kolejnych etapów jak również z zaangażowania homologicznych białek. Komplikację stanowić może jedynie ilość genów homologicznych. *A. thaliana* jest organizmem modelowym m. in. ze względu na małą wielkość genomu. U większości innych badanych gatunków geny zidentyfikowane u rzodkiewnika mają

po kilka odpowiedników. Podobnie jest u drzew. U sosny wykazano obecność kilku białek podobnych do CO. U topoli funkcjonuje blisko 10 genów zbliżonych w budowie do *FT*. Podobnie ma się z innymi charakteryzowanymi homologami. Mnogość homologów nie musi świadczyć jednak o komplikacji mechanizmów. Wydaje się, że znaczna część identyfikowanych sekwencji to pseudogeny lub geny pełniące tę samą funkcję. Sytuację u drzew można porównać do opisanej dla rodziny białek FT u rzodkiewnika. W genomie *A. thaliana* stwierdzono występowanie 5 genów podobnych do siebie strukturalnie (*FT*, *MFT*, *TSF*, *BFT* i *TFL1*). Pierwsze 4 pełnią podobne funkcje w promowaniu kwitnienia a *TSF* wydaje się nawet zastępować funkcjonalnie *FT*. *TFL1* jak już wspomniano wcześniej działa przeciwstawnie i jest inhibitorem kwitnienia (Ryc.3.).

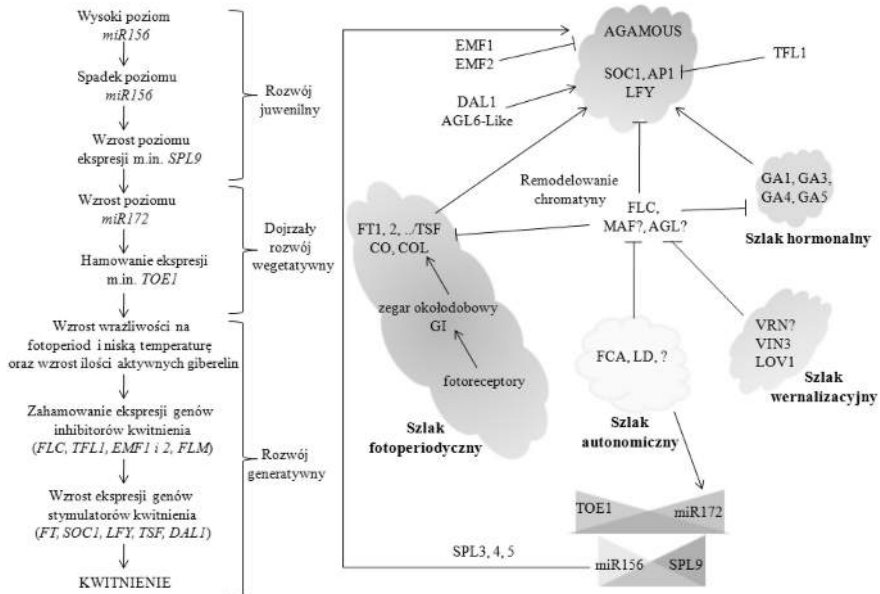
U wielu gatunków drzew wykazano wrażliwość na wernalizację. Nie prowadzono jednak dotychczas badań u drzew nad podstawami molekularnymi tego procesu. Można tylko sugerować istnienie mechanizmu lub mechanizmów podobnych do tych występujących u roślin zielnych. Jak wspomniano powyżej dróg determinujących kwitnienie zależnych od niskiej temperatury może być kilka. Nie wszystkie z nich wymagają obecności *FLC*. Rodzina białek *AGL* jest liczna i odnajdywana powszechnie w genomach wszystkich badanych roślin. Przebieg szlaku wernalizacyjnego zależy od pozycji systematycznej organizmu. Można więc pokusić się o stwierdzenie, że skoro drzewa wykazują wrażliwość na niską temperaturę to albo wygenerowały na drodze ewolucji własny mechanizm, albo mechanizm ten jest w mniejszym lub większym stopniu zbieżny z tymi poznanymi u innych roślin. Ważne dla prawidłowego przebiegu tej drogi jest obniżenie aktywności transkrypcyjnej inhibitora/-ów kwitnienia. Do spadku aktywności takich genów dochodzi pod wpływem niskiej temperatury. Jak się wydaje może być to wywołane także sezonowymi wahaniami temperatury w zakresach nie będących klasyczną wernalizacją. W tej sytuacji ważniejsze byłyby białka szlaku autonomicznego, czy regulacja zegara okołodobowego. Konsekwencją w każdym przypadku jest czasowe wyłączenie aktywności transkrypcyjnej inhibitora kwitnienia. Taki wzór sezonowej aktywności transkrypcyjnej homologa *FLC* wykazano u pomarańczy trójlistkowej [Zhang i in. 2009]. W modelu tym ograniczenie aktywności tego genu determinuje możliwość wytwarzania kwiatów w odpowiedzi na inne czynniki kwitnienia np. fotoperiod czy hormony (Ryc. 3.)

Ciekawym aspektem kontroli kwitnienia u drzew jest występowanie oraz aktywność zarówno inhibitorów jak i aktywatorów tego procesu. W badaniach na drzewach szpilkowych wykazano istnienie co najmniej kilku tego typu genów. Podobnie jak u roślin zielnych wyselekcjonowano geny *EMF*, *TFL* oraz *FLC* występujące w wielu kopiach. Ich zadaniem jest hamowanie kwitnienia na kolejnych etapach tego procesu. Działają one przeciwstawnie do białek będących

induktorami kwitnienia a ich obecność powoduje permanentny rozwój wegetatywny rośliny. Wydaje się, że równie liczne mogą być nadrzędne stymulatory kwitnienia. Opisano u drzew szpilkowych białko DAL1 należące do rodziny czynników transkrypcyjnych typu MADS, którego aktywność wiąże się z inicjacją rozwoju generatywnego. Spektakularnym dowodem na stymulującą rolę tego białka jest jego obecność w transgenicznych liniach *A. thaliana*, w których powoduje wytwarzanie kwiatów tuż po wykiełkowaniu i zakończeniu fazy rozwoju juvenilnego (Ryc.3.) [Carlsbecker i in. 2004].

Istotne znaczenie dla procesu kwitnienia ma z całą pewnością także dostępność substancji odżywczych oraz przebieg metabolizmu podstawowego, zwłaszcza procesu fotosyntezy. Wytworzenie kwiatów, a w następstwie komórek rozrodczych, wymaga całkowitego przestawienia metabolomiki komórki. Odbywa się to ogromnym kosztem energetycznym. Dlatego też nie sposób nie docenić udziału tych procesów w ogólnym przebiegu inicjacji kwitnienia.

Na podstawie badań prowadzonych u drzew można postulować zatem występowanie podobnych mechanizmów kwitnienia do tych opisanych u roślin zielnych. Niezwykle potrzebna jest identyfikacja u drzew większej ilości genów związanych z kwitnieniem. Znając te geny i mając możliwość manipulacji ich aktywnością można by było myśleć o regulacji czasu kwitnienia drzew. Wyłączenie



Ryc. 3. Model współdziałania genów i białek determinujących fazy rozwoju ontogenetycznego oraz kluczowych stymulatorów i inhibitorów kwitnienia w inicjacji tego procesu u drzew
Źródło: Opracowanie własne.

aktywności transkrypcyjnej genu *FT*, lub genów podobnych do *FT*, mogłoby wydatnie opóźnić kwitnienie. Takie możliwości daje technologia związana z wykorzystaniem regulatorowego niskocząsteczkowego RNA.

Dla wielu drzew szczególnie ważne w procesie kwitnienia są gibereliny. Podobnie jak u innych roślin, tak i u drzew, tylko nieliczne gibereliny są aktywne i efektywnie wpływają na przebieg procesów biologicznych. Wydaje się, że hormony te w kontroli kwitnienia działają głównie i bezpośrednio na geny związane z tożsamością merystematyczną np. *LFY* czy *SOCI* (Ryc.3.). W świetle najnowszych doniesień postuluje się także ich udział w kontroli ekspresji takich genów jak *FT*. Ciekawym aspektem jest współdziałanie czynników środowiskowych, takich jak fotoperiod czy temperatura, w kontroli ilości syntetyzowanych giberelin. Równie istotny jest jednak fakt odpowiedzi zwrotnej ze strony hormonów na przebieg szlaków fotoperiodycznego czy wernalizacyjnego. Niezwykle ważnym w badaniach nad funkcją giberelin w mechanizmach kontroli kwitnienia drzew jest precyzyjne określenie roli poszczególnych giberelin w kolejnych etapach przemian. Specyficzny wpływ konkretnych giberelin na zakwitanie drzew może dać narzędzie do modulowania tego procesu poprzez egzogenne stosowanie hormonu w ściśle określonych fazach rozwoju i warunkach środowiskowych [Hansen i in. 1999, Mutasa-Göttgens i Hedden 2009, Rinne i in. 2011].

PODSUMOWANIE

Podobne mechanizmy indukcji kwitnienia funkcjonują u różnych grup systematycznych roślin. Pomimo niewielkich zmian w składzie jakościowym białek w nich uczestniczących wzorce przemian prowadzących do kwitnienia są zbliżone. Równie ważne, jak cztery podstawowe szlaki indukcji kwitnienia są niedawno opisane mechanizmy związane z wpływem jakości światła, temperaturą otoczenia czy wiekiem rośliny. Wszystkie one modulują aktywność niewielkiej grupy genów integratorowych (rodzina *FT*, *SOCI*, *LFY*, *FLC*), bezpośrednio odpowiedzialnych za indukcję kwitnienia. Zainicjowanie tego procesu możliwe jest jednak dopiero w chwili, kiedy roślina zakończy rozwój wegetatywny i jest rozwojowo gotowa do wytworzenia kwiatów. Przejście z fazy rozwoju juvenilnego do dojrzałego rozwoju wegetatywnego a w następstwie rozwoju generatywnego kontrolowane jest przez geny miR oraz czynniki transkrypcyjne należące do rodziny SPL i AP2-like (TOE1). Wzajemne proporcje pomiędzy białkami promującymi i hamującymi przejście fazowe leży u podstaw tego procesu.

Podobny wzorec balansu pomiędzy czynnikami stymulującymi i hamującymi występuje w mechanizmach właściwej indukcji kwitnienia także roślin drzewiastych. Po zainicjowaniu fazy dojrzałego rozwoju wegetatywnego drzewo staje się wrażliwe na bodźce wewnętrzne oraz zewnętrzne. To one

dostosowują czas kwitnienia do warunków panujących w okresie wegetacyjnym. Ma to neuralgiczne znaczenie zwłaszcza dla roślin wieloletnich, u których kwitnienie powtarza się sezonowo. Na początku sezonu wegetacyjnego dochodzi do spadku aktywności inhibitorów kwitnienia np. *FLC*, *TFL1*. Niski ich poziom utrzymywany jest do czasu zakończenia inicjacji rozwoju kwiatów. Wytwarzanie natomiast stymulatorów kwitnienia determinowane jest warunkami fotoperiodycznymi oraz temperaturą otoczenia. Najwyższy poziom funkcjonujących w szlaku fotoperiodycznym i autonomicznym induktorów kwitnienia (FT, TSF, SOC1) stwierdzano w warunkach dnia długiego przy wysokich temperaturach otoczenia. W tym samym czasie dochodzi też do kumulacji aktywnych giberelin, które determinują odpowiednią ekspresję genów związanych z tożsamością merystematyczną oraz decydują, wspólnie z innymi hormonami, o właściwym rozwoju kwiatów. Po zakończeniu cyklu związanego z aktywnością induktorów przywracana jest ponownie aktywność inhibitorów. Efektem tego jest inicjacja spoczynku pąków, które mogą przetrwać niekorzystne warunki środowiskowe i rozpocząć rozwój w następnym sezonie wegetacyjnym. W przedstawiony powyżej sposób może odbywać się kontrola rozwoju generatywnego u roślin wieloletnich zapewniając im sukces reprodukcyjny (Ryc. 3.).

LITERATURA

- Abe M, Kobayashi Y, Yamamoto S, Daimon Y, Yamaguchi A, et al. FD, a bZIP protein mediating signals from the floral pathway integrator FT at the shoot apex. *Science*. 2005;309:1052–1056.
- Ahn JH, Miller D, Winter VJ, Banfield MJ, Lee JH, Yoo SY, Henz SR, Brady RL, Weigel D. 2006 A divergent external loop confers antagonistic activity on floral regulators FT and TFL1. *EMBO J*. Feb 8;25(3):605-14.
- Alexandre CM, Hennig L. 2008 FLC or not FLC: the other side of vernalization. *J Exp Bot.*;59(6):1127-35.
- Balasubramanian S, Sureshkumar S, Lempe J, Weigel D. 2006 Potent induction of *Arabidopsis thaliana* flowering by elevated growth temperature. *PLoS Genet.*;2(7).
- Baurle I, Dean C. 2006 The timing of developmental transitions in plants. *Cell.*;125:655–664.
- Baurle I, Dean C. 2008 Differential interactions of the autonomous pathway RRM proteins and chromatin regulators in the silencing of *Arabidopsis* targets. *PLoS One.*; 16;3(7).
- Bernier G. 1988: The control of floral evocation and morphogenesis, *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 39: 197-219.

- Blazquez M.A. 2005: Plant Science. The right time and place for making flowers, Science 309: 1024-1025.
- Carlsbecker A, Tandré K, Johanson U, Englund M, Engström P. 2004 The MADS-box gene DAL1 is a potential mediator of the juvenile-to-adult transition in Norway spruce (*Picea abies*). Plant J. Nov;40(4):546-57.
- Cerdan PD, Chory J. 2003 Regulation of flowering time by light quality. Nature.;423:881–885.
- Chailakhyan M.C. 1936: On the hormonal theory of plant development. Com. Rend (Doklady) Acad. Sci. USSR 3: 443-447.
- Fornara F, Panigrahi KC, Gissot L, Sauerbrunn N, Rühl M, Jarillo JA, Coupland G. 2009 Arabidopsis DOF transcription factors act redundantly to reduce CONSTANS expression and are essential for a photoperiodic flowering response. Dev Cell.;17:75–86.
- Hansen E, Olsen JE, Junttila O. 1999 Gibberellins and Subapical Cell Divisions in Relation to Bud Set and Bud Break in *Salix pentandra*. J Plant Growth Regul. Dec;18(4):167-170.
- Higgins JA, Bailey PC, Laurie DA, 2010, Comparative Genomics of Flowering Time Pathways Using *Brachypodium distachyon* as a Model for the Temperate Grasses, PLoS One.; 5(4)
- Holefors A, Opseth L, Ree Rosnes AK, Ripel L, Snipen L, Fossdal CG, Olsen JE. 2009 Identification of PaCOL1 and PaCOL2, two CONSTANS-like genes showing decreased transcript levels preceding short day induced growth cessation in Norway spruce. Plant Physiol Biochem.; 47(2):105-15.
- Imaizumi T, Schultz TF, Harmon FG, Ho LA, Kay SA. 2005 FKF1 F-box protein mediates cyclic degradation of a repressor of CONSTANS in Arabidopsis. Science.;309:293–297.
- Imaizumi T. 2010 Arabidopsis circadian clock and photoperiodism: time to think about location. Curr Opin Plant Biol.;13:83–89.
- Jung JH, Seo YH, Seo PJ, Reyes JL, Yun J, Chua NH, Park CM. 2007 The GIGANTEA-regulated microRNA172 mediates photoperiodic flowering independent of CONSTANS in Arabidopsis. Plant Cell. Sep;19(9):2736-48.
- Kardailsky I., Shukla K.K., Ahn J.H., Dagenais N., Christensen S.K., Nguyen J.T., Chory J., Harrison M.J., Weigel D. 1999: Activation tagging of the floral inducer FT, Science 286: 1962-1965.
- Kim DH, Doyle MR, Sung S, Amasino RM. 2009 Vernalization: winter and the timing of flowering in plants. Annu Rev Cell Dev Biol.;25:277–299.
- Kinoshita T, Harada JJ, Goldberg RB, Fischer RL. 2001 Polycomb repression of flowering during early plant development. Proc Natl Acad Sci U S A. Nov 20;98(24):14156-61.

- Klebs G. 1913: Über das Verhältnis der Aussenwelt zur Entwicklung der Pflanze, S.B.Akad. Wiss. Heidelberg B 5: 1-22.
- Kumar V, Wigge P. 2010 H2A.Z-containing nucleosomes mediate the thermosensory response in *Arabidopsis*. *Cell.*;140:136–147.
- Laubinger S, Marchal V, Le Gourrierc J, Wenkel S, Adrian J, et al. 2006 *Arabidopsis* SPA proteins regulate photoperiodic flowering and interact with the floral inducer *CONSTANS* to regulate its stability. *Development.*;133:3213–3222.
- Liu H, Yu X, Li K, Klejnot J, Yang H, et al. 2008 Photoexcited *CRY2* interacts with *CIB1* to regulate transcription and floral initiation in *Arabidopsis*. *Science.*;322:1535–1539.
- McClung CR, Davis SJ. 2010 Ambient thermometers in plants: from physiological outputs towards mechanisms of thermal sensing. *Curr Biol.* Dec 21;20(24):R1086-92.
- Mimida N, Kotoda N, Ueda T, Igarashi M, Hatsuyama Y, Iwanami H, Moriya S, Abe K. 2009 Four *TFL1/CEN*-like genes on distinct linkage groups show different expression patterns to regulate vegetative and reproductive development in apple (*Malus x domestica* Borkh.) *Plant Cell Physiol.*;50(2):394-412.
- Mutasa-Göttgens E, Hedden P. 2009 Gibberellin as a factor in floral regulatory networks. *J Exp Bot.*;60(7):1979-89.
- Oecking C, Jaspert N. 2009 Plant 14-3-3 proteins catch up with their mammalian orthologs. *Curr Opin Plant Biol.*;12:760–765.
- Rinne PL, Welling A, Vahala J, Ripel L, Ruonala R, Kangasjärvi J, van der Schoot C. 2011 Chilling of dormant buds hyperinduces *FLOWERING LOCUS T* and recruits *GA*-inducible 1,3-beta-glucanases to reopen signal conduits and release dormancy in *Populus*. *Plant Cell.*;23(1):130-46.
- Sachs R.M., Hackett W.P. 1983: Source-sink relationships and flowering. W: Meudt W.J. (red.), *Strategies of plant reproduction*. Allanheld, Osmun: 263-272.
- Salomé PA, Weigel D, McClung CR 2010 The role of the *Arabidopsis* morning loop components *CCA1*, *LHY*, *PRR7*, and *PRR9* in temperature compensation. *Plant Cell.*;22(11):3650-61.
- Sawa M, Nusinow DA, Kay SA, Imaizumi T. 2007 *FKF1* and *GIGANTEA* complex formation is required for day-length measurement in *Arabidopsis*. *Science.*;318:261–265.
- Turck F, Fornara F, Coupland G. 2008 Regulation and identity of florigen: *FLOWERING LOCUS T* moves center stage. *Annu Rev Plant Biol.*;59:573–594.
- Turnbull C. 2011 Long-distance regulation of flowering time. *J Exp Bot.* Jul 21
- Valverde F, Mouradov A, Soppe W, Ravenscroft D, Samach A, Coupland G. 2004

- Photoreceptor regulation of CONSTANS protein in photoperiodic flowering. *Science.*;303(5660):1003-6.
- Wang JW, Park MY, Wang LJ, Koo Y, Chen XY, Weigel D, Poethig RS. 2011 miRNA control of vegetative phase change in trees. *PLoS Genet.* Feb;7(2):
- Weigel D. 1995: The genetics of flower development: from floral induction to ovule morphogenesis, *Ann. Rev. Genet.*; 29: 19-39.
- Wigge PA, Kim MC, Jaeger KE, Busch W, Schmid M, et al. 2005 Integration of spatial and temporal information during floral induction in *Arabidopsis*. *Science.*;309:1056–1059
- Winichayakul S, Beswick NL, Dean C, Macknight RC. 2005 Components of the *Arabidopsis* autonomous floral promotion pathway, FCA and FY, are conserved in monocots. *Functional Plant Biology.*;32:345–355.
- Wojciechowski W., Kęsy J., Kopcewicz J. 2007: Florigen – legenda czy rzeczywistość?, *Post. Biol. Kom.* 1: 31-47.
- Zhang JZ, Li ZM, Mei L, Yao JL, Hu CG. 2009 PtFLC homolog from trifoliolate orange (*Poncirus trifoliata*) is regulated by alternative splicing and experiences seasonal fluctuation in expression level. *Planta.* Mar;229(4):847-59.

STRESZCZENIE

W pracy przedstawiono zarys historii badań nad mechanizmami indukcji kwitnienia u roślin. Współcześnie rozwój genetyki molekularnej unaoczniał bezpośredni związek pomiędzy regulacją ekspresji genu a jego funkcją w reakcji rośliny na czynniki środowiskowe i wewnętrzne. Wiele specyficznych tzw. genów kwitnieniowych jak CO, GI, FT, SOC1, LFY, FLC, zidentyfikowano u różnych roślin, także drzew. Drzewa charakteryzują się długim okresem juwenilnym (młodocianym) i wegetatywnym. Przejście tych roślin do fazy generatywnej jest związane w pierwszym etapie z powstaniem w ich tkankach wewnętrznego balansu między miRNA (miR156 i miR172) a czynnikami transkrypcyjnymi z rodzin SPL (np. SPL9) oraz AP2- podobnych (m.in. TOE1). Kiedy ten balans zostanie ustanowiony drzewo uzyskuje zdolność realizacji drugiego etapu indukcji a więc tworzenia kwiatów. Włączają się wtedy, zależnie od sytuacji i potrzeb, szlaki metaboliczne wiodące do kwitnienia (fotoperiodyczny, wernalizacyjny, autonomiczny, giberelinowy). Tak więc, mechanizm indukcji kwitnienia u roślin drzewiastych jest rozciągnięty w czasie i podlega dodatkowym etapom regulatorowym w porównaniu do roślin zielnych, jednakże na poziomie molekularnym i fizjologicznym istnieją daleko idące podobieństwa.

SUMMARY

The outline of history of investigation on mechanisms of flowering induction in plants have been presented. Recent development in plant molecular genetics has revealed a direct relationship between regulation of gene expression and its function in response to environmental stimuli and metabolic pathways. Many specific so called “flowering genes” like CO, GI, FT, SOC1, LFY, FLC, have been identified in different kinds of plants, also in woody plants. Trees are characterized by a long period of juvenile and adult vegetative phases. The transition of these plants to an adult reproductive phase is related to endogenous balance between miRNA (miR156 and miR17), and transcription factors from SPL (e.g. SPL9) and AP2-like (e.g. TOE1) families. When such balance is established woody plants are going to the second stage of flower transition and, dependent on situation, the different pathways of flower induction, related to photoperiod, vernalization, autonomous or gibberellins, are started. So, generally speaking, the mechanism of flower induction in woody plants is spread out over a long time and is subjected to additional regulatory stage in comparison to herbaceous plants, but at molecular and physiological levels very close similarities exist.