

Univerzita Palackého v Olomouci

Diplomová práce

Olomouc 2023

David Šimek

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Vliv auxinu na růst rostlin a expresi *Aux/IAA* genů u *itpk1*
mutantů jarního ječmene**

Diplomová práce

David Šimek

Studijní program: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2023

Vedoucí práce: Mgr. Tomáš Vlčko, Ph.D.

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta
Akademický rok: 2021/2022

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: Bc. David ŠIMEK
Osobní číslo: R21930
Studijní program: N0511A030046 Molekulární a buněčná biologie
Téma práce: Vliv auxinu na růst rostlin a expresi Aux/IAA genů u itpk1 mutantů jarního ječmene
Zadávací katedra: Katedra buněčné biologie a genetiky

Zásady pro vypracování

Vypracovat literární rešerši na téma diplomové práce zahrnující okruhy funkce ITPK genů u rostlin a hormonální signální v kořenech rostlin se zaměřením na auxiny. Charakterizovat fenotypovou odpověď itpk1 mutantů jarního ječmene po aplikaci indol-3-octové kyseliny (IAA). Stanovit minimální inhibiční hladinu IAA za účelem popsání účinku na izolovaná embrya kontrolní odrůdy Golden Promise. Vyhodnotit účinek IAA ve vybraných hladinách na růst rostlin z izolovaných embryí itpk1 linií kultivovaných v in vitro podmínkách. U itpk1 mutantních linií ječmene stanovit metodou qRT-PCR expresi auxin/indol-3-octová kyselina (Aux/IAA) genů v odpovědi na ošetření IAA.

Rozsah pracovní zprávy:
Rozsah grafických prací:
Forma zpracování diplomové práce: tištěná

Seznam doporučené literatury:

1. Laha, N. P., Dhir, Y. W., Giehl, R. F. H., Schäfer, E. M., Gaugler, P., Shishavan, Z. H., Gulabani, H., Mao, H., Zheng, N., von Wirén, N., Jessen, H. J., Saiardi, A., Bhattacharjee, S., Laha, D., Schaaf, G., 2020. ITPK1-dependent inositol polyphosphates regulate auxin responses in Arabidopsis thaliana. bioRxiv. doi: 10.1101/2020.04.23.058487
2. Riemer, E., Qiu, D., Laha, D., Harmel, R. K., Gaugler, P., Gaugler, V., Frei, M., Hajirezaei, M. R., Laha, N. P., Krusenbaum, L., Schneider, R., Saiardi, A., Fiedler, D., Jessen, H. J., Schaaf, G., Giehl, R. F. H., 2021. ITPK1 is an InsP6/ADP phosphotransferase that controls phosphate signaling in Arabidopsis. Mol Plant 14:1–17 . doi: 10.1016/j.molp.2021.07.011
3. Laha, D., Parvin, N., Hofer, A., Giehl, R. F. H., Fernandez-Rebollo, N., Von Wirén, N., Saiardi, A., Jessen, H. J., Schaaf, G., 2019. Arabidopsis ITPK1 and ITPK2 Have an Evolutionarily Conserved Phytic Acid Kinase Activity. ACS Chem Biol 14:2127–2133 . doi: 10.1021/acscchembio.9b00423
4. Leyser, O., 2018. Auxin signaling. Plant Physiol 176:465–479. doi: 10.1104/pp.17.00765
5. Shi, Q., Zhang, Y., To, V.T., Shi, J., Zhang, D., Cai, W., 2020. Genome-wide characterization and expression analyses of the auxin/indole-3-acetic acid (Aux/IAA) gene family in barley (Hordeum vulgare L.). Sci Rep 10:1–14 . doi: 10.1038/s41598-020-66860-7

Vedoucí diplomové práce: Mgr. Tomáš Vlčko
Laborař růstových regulátorů

Datum zadání diplomové práce: 24. října 2021
Termín odevzdání diplomové práce: 31. července 2023

L.S.

doc. RNDr. Martin Kubala, Ph.D.
děkan

prof. RNDr. Zdeněk Dvořák, DrSc.
vedoucí katedry

BIBLIOGRAFICKÁ IDENTIFIKACE A SOUHRN:

Jméno a příjmení autora:	Bc. David Šimek
Název práce:	Vliv auxinu na růst rostlin a expresi <i>Aux/IAA</i> genů u <i>itpk1</i> mutantů jarního ječmene
Typ práce:	diplomová
Pracoviště:	Laboratoř růstových regulátorů
Vedoucí práce:	Mgr. Tomáš Vlčko, Ph.D.
Rok obhajoby práce:	2023

Abstrakt:

Ječmen je globálně čtvrtou nejvýznamnější obilovinou. Ječmenné obilky obsahují velké množství živin a jsou hojně využívány jako krmivo pro hospodářská zvířata a ve sladovnictví. Fosfor je pro rostliny esenciálním makroprvkem. Obiloviny ukládají získaný fosfor do organických látek, převážně kyseliny fytové, která vzniká sekvenční fosforylací z *myo*-inositolu. ITPK kinasy jsou enzymy katalyzující některé reakce v procesu syntézy kyseliny fytové, a proto hrají u rostlin podstatnou roli v homeostáze fosforu. Rostlinná fyziologie je komplexní záležitostí, protože homeostáza fosforu úzce souvisí s fotomorfogenezí a hormonální signalizací. Fytohormon auxin má nezastupitelnou roli v regulaci mnoha fyziologických procesů rostlin a účastní se téměř každé fáze rostlinné ontogeneze. *Aux/IAA* geny patří k primárně exprimovaným genům v reakci na přítomnost auxinu a jsou negativními regulátory transdukce auxinového signálu. Tato práce si kladla za cíl popsat fenotypy mutantních linií *itpk1* a stanovit úroveň exprese *Aux/IAA* a *ITPK* genů v reakci na ošetření auxinem, což by vedlo k hlubšímu porozumění účasti *ITPK* genů v auxinové signalizaci a k vysvětlení dopadu mutace genu *ITPK1*.

Klíčová slova:	<i>Aux/IAA</i> geny, ječmen, ITPK, auxin, <i>Hordeum vulgare</i> , kyselina fytová, fotomorfogeneze, homeostáza fosforu
Počet stran:	86
Počet příloh:	1
Jazyk:	Český

BIBLIOGRAPHICAL IDENTIFICATION AND SUMMARY:

Author's first name and surname: Bc. David Šimek

Title: Effect of auxin on plant growth and *Aux/IAA* gene expression in *itpk1* mutants of spring barley

Type of thesis: master

Department: Laboratory of Growth Regulators

Supervisor: Mgr. Tomáš Vlčko, Ph.D.

The year of presentation: 2023

Abstract:

Barley is the fourth most important cereal globally. Barley grains contain a high amount of nutrients and are widely used as livestock feed and in the brewing industry. Phosphorus is an essential macronutrient for plants. Cereals store the acquired phosphorus in organic form, mainly phytic acid, which is synthesized by sequential phosphorylation from *myo*-inositol. ITPK kinases are enzymes that catalyse certain reactions in the process of phytic acid synthesis and therefore play an essential role in plant phosphorus homeostasis. Plant physiology is a complex matter, as phosphorus homeostasis is closely related to photomorphogenesis and hormone signalling. The phytohormone auxin plays an essential role in the regulation of many plant physiological processes and is involved in almost every stage of plant ontogeny. *Aux/IAA* genes are among the primary genes expressed in response to auxin and are negative regulators of auxin signal transduction. This work aimed to characterize the phenotypes of *itpk1* mutant lines and determine the expression levels of *Aux/IAA* and *ITPK* genes in response to auxin treatment, which would lead to a deeper understanding of the involvement of *ITPK* genes in auxin signaling and explain the impact of the *ITPK1* gene mutation.

Keywords: *Aux/IAA* genes, barley, ITPK, auxin, *Hordeum vulgare*, phytic acid, photomorphogenesis, phosphorus homeostasis

Number of pages: 86

Number of appendices: 1

Language: Czech

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci zhotovil samostatně pod odborným vedením Mgr. Tomáše Vlčka, Ph.D. se současným použitím citované literatury.

V Olomouci dne.....

.....

Bc. David Šimek

PODĚKOVANÍ

Tímto bych chtěl poděkovat vedoucímu mé diplomové práce Mgr. Tomášovi Vlčkovi, Ph.D. za odborné konzultace týkající se teoretické i experimentální části této práce a za vstřícný a profesionální přístup. Také bych rád poděkoval Ing. Ludmile Ohnoutkové, Ph.D. za cenné rady týkající se praktických aspektů experimentální části práce. Děkuji rovněž panu proděkanovi Mgr. Otovi Blahouškovi za pomoc se zhotovováním snímků rostlin ječmene.

OBSAH

1 ÚVOD	16
2 CÍLE PRÁCE	17
3 LITERÁRNÍ PŘEHLED	18
3.1 Charakteristika ječmene a jeho hospodářský význam	18
3.2 Vnímání světla rostlinami a fotomorfogeneze	18
3.3 Hormonální signalizace u rostlin	21
3.4 Homeostáza fosforu u rostlin	29
3.5 Pleiotropní vliv COP9 signalosomu na fyziologii rostlin	34
4 MATERIÁL A METODY	38
4.1 Biologický materiál	38
4.2 Použité chemikálie, soupravy a roztoky	38
4.2.1 Použité chemikálie	38
4.2.2 Použité soupravy	39
4.2.3 Použité roztoky	39
4.3 Seznam použitých přístrojů a zařízení	40
4.4 Použité experimentální a vyhodnocovací postupy	41
4.4.1 Fenotypová analýza	41
4.4.2 Určení relativní změny exprese u vybraných genů	42
4.4.3 Zjištění vztahu +A a -G mutantní alely genu <i>ITPK1</i>	47
4.4.4 Grafické a statistické hodnocení	48
5 VÝSLEDKY	49
5.1 Fenotypová analýza	49
5.1.1 Optimalizace koncentrací IAA	49
5.1.2 Stanovení vlivu IAA na délku kořene	50
5.2 Určení relativní změny exprese u vybraných genů	52
5.2.1 Izolace celkové RNA	52
5.2.2 Reverzní transkripce z RNA do cDNA	53
5.2.3 Detekce cDNA transkriptů	54

5.2.4 Stanovení exprese metodou qRT-PCR.....	55
5.3 Zjištění vztahu +A a –G mutantní alely genu <i>ITPK1</i>	58
5.3.1 Izolace genomové DNA paramagnetickými částicemi a PCR	58
5.3.2 Genotypování pomocí Sangerova sekvenování.....	59
6 DISKUZE.....	61
7 ZÁVĚR.....	65
8 LITERATURA	66
9 PŘÍLOHY	86

SEZNAM SYMBOLŮ A ZKRATEK

(-)DNA	<i>antisense</i> DNA
½ MS	médium Murashige a Skoog, poloviční koncentrace
2,4-D	2,4-dichlorfenoxyoctová kyselina
4-Cl-IAA	kyselina 4-chlorindol-3-octová
ABA	kyselina abscisová
ABCB	ABC-transportéry podrodiny B (angl. <i>ATP-binding cassette subfamily B</i>)
AD	aktivační doména
ADP	adenosin difosfát
AFB1–5	angl. <i>auxin signaling f-box 1–5</i>
AG	angl. <i>agamous</i>
AP2	angl. <i>apetala2</i>
ARF	auxin responzivní faktor
ASK1	angl. <i>arabidopsis skp1 homolog 1</i>
ATP	adenosin trifosfát
Aux/IAA	angl. <i>auxin/indole-3-acetic acid</i>
AUX1/LAX	angl. <i>auxin resistant 1/like aux</i>
AuxRE	auxin responzivní elementy
AXR	angl. <i>auxin resistant</i>
BIN2	angl. <i>brassinosteroid insensitive 2</i>
bp	jednotka párů bází
BR	brassinosteroidy
BRI1	angl. <i>brassinosteroid insensitive 1</i>
cDNA	komplementární DNA
CK	cytokininy
COI1	angl. <i>coronatine-insensitive 1</i>

CRL	Cullin-RING E3 ubikvitin ligasy
CRY	krytochromy
CSN	COP9 signalosom (angl. <i>COP signalosome nine</i>)
CTD	C-terminální doména
CUL1	Cullin 1
DAG	diacylglycerol
DAO	angl. <i>dioxygenase for auxin oxidation</i>
DBD	DNA-vazebná doména (angl. <i>DNA-binding domain</i>)
ddH ₂ O	deionizovaná voda
DNasa	deoxyribonukleasa
dNTP	deoxynukleosid trifosfát
dsDNA	dvouřetězcová DNA
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
EF1 α	elongační faktor 1 α
EGTA	ethylenglykol-bis(2-aminoethylether)-N, N, N', N'-tetraoctová kyselina
eIF3	eukaryotický iniciační faktor 3
EIL1	angl. <i>ethylene-insensitive3-like1</i>
ET	etylén
EtBr	ethidium bromid
EXS	<u>E</u> rd1, <u>X</u> pr1, <u>S</u> yg1
FBP	F-box protein
FKF1	protein Flavin-Binding, Kelch Repeat, F-Box 1
GA	gibereliny, resp. kyselina giberelová
gDNA	genomická DNA
GH3	Gretchen Hagen 3
Glc6P	glukosa-6-fosfát

HY2	fytochromobilin syntasa, oz. <i>hypokotyl elongated in light 2</i>
HY5	angl. <i>hypokotyl elongated in light 5</i>
IAA	kyselina indol-3-octová
IAM	indol-3-acetamidová dráha
IAOx	indol-3-acetaldoximová dráha
IBA	indol-3-máselná kyselina
IBR1	angl. <i>indole-3-butyric acid response 1</i>
Ins	<i>myo</i> -inositol
Ins(1,3,4,5,6)P ₅ /InsP ₅	<i>myo</i> -inositol-1,3,4,5,6-pentakisfosfát/syn. inositol pentakisfosfát
Ins(1,3,4,6)P ₄ / InsP ₄	<i>myo</i> -inositol-1,3,4,6-tetrakisfosfát/ syn. inositol tetrakisfosfát
Ins(1,4,5)P ₃ /InsP ₃	<i>myo</i> -inositol-1,4,5-trisfosfát/ inositol trisfosfát
Ins(3)P ₁	<i>myo</i> -inositol-3-fosfát
Ins(3,4)P ₂	<i>myo</i> -inositol-3,4-bisfosfát
Ins(3,4,6)P ₃	<i>myo</i> -inositol-3,4,6-trisfosfát
InsP ₆	<i>myo</i> -inositol-1,2,3,4,5,6-hexakisfosfát, syn. kyselina fytová
InsP ₇	5-difosfoinositol-1,2,3,4,6-pentakisfosfát
InsP ₈	1,5-bisdifosfoinositol-2,3,4,6-tetrakisfosfát
InsP _x	inositol polyfosfáty
IPK	inositol pentakisfosfát kinasa
IPK2	inositol polyfosfát kinasa 2
IPT5	ATP/ADP isopentenyltransferasa 5
IPyA	kyselina indol-3-pyrohroznová
ITPK	inositol-1,3,4-trisfosfát 5/6-kinasa
JA	jasmonáty, resp. kyselina jasmonová
JAZ	jasmonátová ZIM-doména
LFR	(angl. <i>low fluence response</i>), odpověď na nízkou intenzitu světla

LKP2	Lov Kelch Protein 2
<i>lpa</i>	angl. <i>low-phytic acid lines</i> , linie s nízkým obsahem kyseliny fytové
MFS	angl. <i>major facilitator superfamily</i>
MIPS	<i>myo</i> -inositol-3-fosfát syntasa
miRNA	mikro RNA
MPK14	mitogenem aktivovaná proteinkinasa 14
MPN	doména angl. <i>Mpr1p-Pad1p-N-terminal</i>
MR	angl. <i>middle region</i>
mRNA	mediátorová RNA
MRP	angl. <i>multidrug-resistance-associated protein ATP-binding cassette</i>
NAA	naftalen-1-octová kyselina
NTC	angl. <i>non-template control</i> , kontrola bez templátu
Oligo(dT) ₁₂₋₁₈	oligodeoxythymin (délka 12–18 párů bází)
oxIAA	2-oxindol-3-octová kyselina
oxIAA-Glc	1-O-(2-oxoindol-3-ylacetyl)-β-D-glukopyranosa
PAA	fenyloctová kyselina
PCC1	angl. <i>Pathogen and Circadian Controlled 1</i>
PCI	doména angl. <i>Proteasome, COP9 signalosome and eukaryotic initiation factor 3, eIF3</i>
PCR	polymerázová řetězová reakce
P _{fr}	konformační forma fytochromu (angl. <i>far red</i> , vzdálená červená)
PGP	P-glykoprotein
PHL1	angl. <i>phosphate starvation response1-like 1</i>
PHOT	fototropiny
PHR1	angl. <i>phosphate starvation response 1</i>
PHY	fytochromy

phyA–phyE	fytochrom A–E
P _i	fosfát, PO ₄ ⁻³
PIFs	s fytochromy interagující faktory (angl. <i>phytochrome interacting factors</i>)
PIL	angl. <i>PIN-like</i> proteiny
PIN	proteiny angl. <i>PIN-formed</i>
PKS1	angl. <i>phytochrome kinase substrate</i>
PLC	fosfolipasa C
P _r	konformační forma fytochromu (angl. <i>red</i> , červená)
PSI	angl. <i>phosphate starvation induced</i>
PSR	angl. <i>phosphate starvation response</i> , odpověď na nedostatek fosfátu
PtdIns	fosfatidylinositol
PtdInsP	fosfatidylinositol-4-fosfát
PtdInsP ₂	fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát
qRT-PCR	kvantitativní polymerázová řetězová reakce v reálném čase
RBX	E2-interagující RING-box protein
RD	represivní doména
RNasa	ribonukleasa
ROS	kyslíkové radikály (angl. <i>reactive oxygen species</i>)
rRNA	ribosomální RNA
SA	kyselina salicylová
SAUR	angl. <i>small auxin upregulated RNA</i>
SCF ^{TIR1/AFB}	E3 ubikvitin ligasový komplex SKP1, CUL1, F-box protein TIR1/AFB
SHY2	angl. <i>suppressor of HY2</i> , protein IAA3
SKP1	adaptorový protein angl. <i>S-phase kinase-associated protein 1</i>
SL	strigolaktony
SLY1	angl. <i>sleepy 1</i>

SPA	angl. <i>suppressor of phyA</i>
SPX	<u>SYG1/Pho81/XPR1</u>
SUR2	cytochrom P450 CYP83B1
T2	druhá transgenní generace
TAA1	L-tryptofan aminotransferasa
TAA1/TAR	Tryptophan Aminotransferase Of Arabidopsis1/Tryptophan Aminotransferase Related
TAE	pufr Tris-acetát-EDTA
ta-siRNA	angl. <i>transacting-small interfering RNA</i>
TIR1	angl. <i>transport inhibitor resistant 1</i>
TPL	angl. <i>topless protein</i>
TRA	tryptaminová dráha
Trp	aminokyselina tryptofan
Ub	ubikvitin
UV-A	ultrafialové záření A
UV-B	ultrafialové záření B
UVR8	angl. <i>UV resistance locus 8</i>
VIH	inositol hexakisfosfát a difosfoinositol-pentakisfosfát kinasa
<i>VIP1</i>	angl. <i>inositol hexakisphosphate and diphosphoinositol-pentakisphosphate kinase1 gene</i>
VLFR	(angl. <i>very low fluence response</i>), odpověď na velmi nízkou intenzitu světla
WT	angl. <i>wild-type</i> , označení pro nemutovanou přirozenou formu organismu
ZTL	Zeitlupe protein
λ	vlnová délka

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Chemická struktura vybraných zástupců jednotlivých skupin fytohormonů	22
Obrázek 2: Kanonický molekulární mechanismus auxinové signalizační kaskády.....	25
Obrázek 3: Alely ve sledovaném lokusu genu pro <i>ITPK1</i> v jednotlivých genotypch ječmene jarního	38
Obrázek 4: Schéma extirpace embrya z obilky ječmene jarního	41
Obrázek 5: Vzorec pro výpočet relativní změny exprese dle Pfaffla (2001).	46
Obrázek 6: Rostliny WT linie a mutantů <i>itpk1-2</i> a <i>itpk1-33</i> jarního ječmene v kontrolních podmínkách a při ovlivnění IAA.....	52
Obrázek 7: Kontrola kvality izolované celkové RNA	53
Obrázek 8: Kontrola množství cDNA pomocí PCR s oligomery pro <i>EFlα</i> a <i>Actin2</i>	53
Obrázek 9: Detekování cDNA transkriptů u zájmových genů.	54
Obrázek 10: Detekce standardů pomocí horizontální elektroforézy.	55
Obrázek 11: Klastrovaná „heat“ mapa exprese cílových genů v kořenech po ovlivnění 500nM IAA u ječmene jarního	58
Obrázek 12: Kontrola purifikovaných PCR produktů genu <i>ITPK1</i> z linie <i>itpk1-21</i> jarního ječmene.	59
Obrázek 13: Srovnání DNA sekvencí sledovaného lokusu genu <i>ITPK1</i> u jarního ječmene.....	60
Obrázek 14: Fenotypy rostlin ječmene jarního dané konstituce alel u segregujících linií generace T2	61

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Škála jednotlivých koncentrací IAA a jejich příprava	42
Tabulka 2: Složení reakčního mixu pro PCR.....	44
Tabulka 3: Teplotní profil PCR reakce.....	44
Tabulka 4: Seznam použitých sekvencí oligomerů u zájmových genů.....	45
Tabulka 5: Příprava reakčního mixu pro qRT-PCR	46
Tabulka 6: Teplotní profil qRT-PCR včetně analýzy teploty tání PCR produktu	46
Tabulka 7: Sekvence použitých oligomerů vhodných k sekvenování.....	47
Tabulka 8: Teplotní podmínky PCR reakce pro přípravu ampliconu k sekvenování	48

SEZNAM GRAFŮ

Graf 1: Optimalizace vlivu koncentrací IAA na růst ječmene	49
Graf 2: Efekt IAA na délku kořene.....	51
Graf 3: Relativní změna exprese <i>Aux/IAA</i> genů v kořenech jarního ječmene po ovlivnění 500 nM IAA	56
Graf 4: Relativní změna exprese genů <i>ITPK1-ITPK6</i> a <i>MIPS</i> v kořenech jarního ječmene po ovlivnění 500 nM IAA	57
Graf 5: Délky kořenů homozygotů +A/+A a -G/-G a bialelického mutantu +A/-G.....	60

1 ÚVOD

Ječmen (*Hordeum vulgare*) je celosvětově velmi významnou obilovinou s využitím jako součást krmných směsí pro hospodářská zvířata nebo ve sladovnictví. Ječmen stejně tak jako většina dalších obilovin ukládá získaný anorganický fosfát do podoby organické molekuly, kyseliny fytové (InsP₆). InsP₆ představuje pro klíčící obilku hlavní zdroj fosforu a figuruje v mnoha procesech. InsP₆ vzniká sekvenční fosforylací z *myo*-inositolu. Meziprodukty syntézy InsP₆ jsou *myo*-inositol fosfáty, které mají různé funkce. Například *myo*-inositol trisfosfát (InsP₃) figuruje v buněčné signalizaci a *myo*-inositol pentakisfosfát (InsP₅) má význam v obraných reakcích rostlin. Inositol 1,3,4-trisfosfát 5/6 kinasy (ITPK) hrají důležitou roli v homeostáze fosforu. Bylo zjištěno, že snížením exprese *ITPK* genů dochází k poklesu koncentrace InsP₆. Ukázalo se však, že ITPK jsou zapojeny mimo jiné v hormonální signalizaci. Auxiny, fytohormony, z nichž je v rostlinách nejhojněji zastoupena kyselina indol-3-octová (IAA), jsou klíčové regulační a signalizační molekuly související s mnoha aspekty vývoje rostlin. Na signalizaci auxinem má vliv jednak jeho biosyntéza, transport a distribuce, ale také v konečném důsledku transdukce signálu. Podstatnou součástí auxinového signalingu jsou Aux/IAA, které negativně regulují expresi auxin responsivních genů. Aux/IAA jsou ovlivněny dalšími faktory jako jsou světelné podmínky nebo homeostáza fosforu. Tato práce se zaměřuje na změnu v expresních profilech vybraných *Aux/IAA* genů u ječmene v reakci na ošetření IAA za účelem lepšího porozumění jejich funkce. Důraz se klade na zhodnocení dopadu různých typů mutací genu *ITPK1* na fenotyp *itpk1* mutantů jarního ječmene a analýzu změny exprese *ITPK* genů v rámci kořenů *itpk1* linií ječmene po ovlivnění exogenně dodaným auxinem.

2 CÍLE PRÁCE

Dílčím cílem bylo vypracování literární rešerše na téma diplomové práce zahrnující okruhy funkce *ITPK* genů u rostlin a hormonální signální v kořenech rostlin se zaměřením na auxiny. Dále si práce kladla za cíl charakterizovat fenotypovou odpověď *itpk1* mutantů jarního ječmene po aplikaci indol-3-octové kyseliny (IAA), také stanovit minimální inhibiční hladinu IAA za účelem popsání účinků na izolovaná embrya kontrolní odrůdy Golden Promise. Vyhodnotit účinek IAA ve vybraných hladinách na růst rostlin z izolovaných embryí *itpk1* linií kultivovaných v *in vitro* podmínkách. U *itpk1* mutantních linií ječmene stanovit metodou qRT-PCR expresi auxin/indol-3-octová kyselina (*Aux/IAA*) genů v odpovědi na ošetření IAA.

3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1 Charakteristika ječmene a jeho hospodářský význam

Ječmen jarní (*Hordeum vulgare* subs. *vulgare* L.) je jednoletá jednoděložná rostlina z čeledi Lipnicovité (*Poaceae*) a jedna z prvních domestikovaných obilovin (Baik *et* Ullrich, 2008). Ječmen se řadí mezi globálně hospodářsky velmi významné plodiny. Udává se, že je v současnosti čtvrtou nejdůležitější světovou kulturní plodinou po pšenici, rýži a kukuřici (Farag *et al.*, 2020). Používá se jako krmivo pro hospodářská zvířata, ve sladovnictví a v poslední době je brán zřetel i na příznivé účinky jeho konzumace na lidské zdraví (Felizardo *et* Freire, 2018). Hlavní nutriční nevýhodou obilovin je vysoký obsah zásobních fosfátů v podobě kyseliny fytové (myo-inositol-1,2,3,4,5,6-hexakisfosfát (InsP₆), která je hlavní anti-nutrient a je málo stravitelná pro všežravce. Anti-nutriční vlastnosti InsP₆ jsou dány především schopností tvořit nerozpustné komplexy s minerálními kationy jako jsou Mg⁺², Ca⁺², Fe⁺², Zn⁺² aj., které se tak nevstřebávají do organismu (Coulibaly *et al.*, 2011; Raboy, 2020). InsP₆ je přirozeně enzymaticky rozkládán fytasami během klíčení semen za účelem zvýšení dostupnosti fosfátů pro rostlinu. Pro zlepšení příjmu fosforu v krmných směsích je přidáván buď anorganický fosfát, nebo je InsP₆ v krmných směsích rozkládán přidáním purifikované mikrobiální fytasy, přičemž je toto řešení poměrně finančně nákladné. Současným trendem je vývoj linií ječmene s redukováným množstvím InsP₆, což by zvýšilo možnost vstřebávání fosfátů a minerálních látek. Současně musí být brána v úvahu také fyziologie rostliny, protože příliš nízká hladina InsP₆ by mohla snižovat výnosnost a životaschopnost rostlin (Raboy, 2020).

3.2 Vnímání světla rostlinami a fotomorfogeneze

Světlo je jeden z hlavních a nejdůležitějších faktorů regulujících rostlinou fyziologii v rámci celého životního cyklu rostliny. Nefunguje pouze jako hlavní zdroj energie rostlin pro fixaci atmosférického CO₂ v procesu fotosyntézy, ale rovněž figuruje jako regulátor ostatních klíčových procesů spjatých s ontogenezí a růstem rostlin (Paradiso *et* Proietti, 2022). V závislosti na přítomnosti nebo absenci světelného záření mohou vyšší rostliny podstoupit dva odlišné vývojové procesy. V přítomnosti světla dochází k fotomorfogenezi a při jeho absenci ke skotomorfogenezi, přičemž každý z těchto procesů je doprovázen charakteristickým fenotypem rostlin. Při skotomorfogenezi je pozorována etiolizace, delší hypokotyl a nažloutlé děložní lístky. Naopak fotomorfogenní fenotypy jsou charakterizovány krátkými hypokotyly a světle zelenými širokými děložními lístky (Pham *et al.*, 2018). Tento fenomén je způsoben schopností rostlin důmyslným systémem monitorovat světlené podmínky v prostředí prostřednictvím fotoreceptorů, které rozlišujeme na tyto základní typy: fytochromy (PHY), kryptochromy (CRY), fototropiny (PHOT), rodina Zeitlupe proteinů (ZTL/FKF1/LKP2) a fotoreceptor UVR8 (angl. *UV resistance locus 8*) (Gyula *et al.*, 2003; Escobar-Bravo *et al.*, 2017; Paradiso *et* Proietti, 2022). Každý z těchto typů fotoreceptorů slouží vyšším rostlinám pro vnímání světla konkrétních vlnových délek a rostliny tak mohou maximalizovat jeho celkovou absorpci. Rostliny jsou schopny zachytit světelné spektrum počínaje oblastí ultrafialového záření UV-B až po vzdálenou červenou ($\lambda=280-750$ nm).

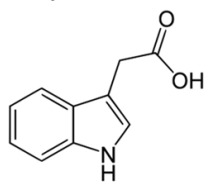
Principem světelné signalizace je vnímání konkrétních světelných signálů skrze fotoreceptory a jejich následné zpracování formou vývojové odpovědi (Zhao *et al.*, 2022). Fytochromy jsou fotoreceptory převážně vnímající viditelné červené a vzdálené červené světlo (Pham *et al.*, 2018). Naopak kryptochromy, fototropiny a fotoreceptory z rodiny Zeitlupe proteinů jsou citlivé především k modrému světlu a UV-A (Takemiya *et al.*, 2005; Chaves *et al.*, 2011; Pudasaini *et al.*, 2017). Vnímání a odpovídající vývojové reakce vůči UV-B světlu zajišťuje pouze jeden fotoreceptor UVR8 a tvoří jej homodimer proteinů s navázaným tryptofanem coby chromoforem (Rizzini *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2012). Kryptochromy, flavoproteinové fotoreceptory, byly poprvé popsány u *Arabidopsis thaliana* a následně rovněž u mnohých prokaryot i eukaryot. U rostlin podmiňují vývojové a růstové změny v závislosti na signalizaci modrého, zeleného i UV-A světla. Kryptochromy jsou z hlediska struktury blízké příbuzné s fotolyasami, jež katalyzují na světle závislou dráhu reparace DNA, fotoreaktivaci, ale nevykazují stejnou aktivitu. Mezi hlavní funkce kryptochromů patří modulace cirkadiálních rytmů, fotoperiodická regulace kvetení, de-etiolizace, inhibice prodlužování stonku a řapíku, expanze listů a biosyntéza flavonoidů. V rámci jednoděložných rostlin existují pouze dva geny pro kryptochromy: *CRY1* a *CRY2* (Chaves *et al.*, 2011; Barrero *et al.*, 2014; Paradiso *et al.*, 2022). Proteinový komplex ZTL/FKF1/LKP2 představován Zeitlupovými proteiny, které ve své struktuře obsahují amino-terminální flavin-vázající LOV (angl. *light oxygen or voltage*) doménu, je také zapojen v signalizaci modrého a UV-A světla. Bylo zjištěno, že tyto fotoreceptory se uplatňují při cirkadiálních rytmech a v procesu fotoperiodického kvetení, což bylo ukázáno experimenty s *A. thaliana* u jednotlivých proteinů ZTL, FKF1 a LKP2 (Nelson *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2007; Baudry *et al.*, 2010; Pudasaini *et al.*, 2017). Fototropiny jsou specifické fotoreceptory vyskytující se pouze u rostlin, čímž se podstatně liší od kryptochromů. Ovládají speciální fyziologické pochody fungující v odpovědi na signalizaci modrého světla jako např. otevírání stomat, růst listové čepele, fototropismus a relokaci chloroplastů, vše za účelem optimalizace fotosyntézy zvyšováním účinnosti zachycení světelného záření a za účelem předcházení poškození způsobené světlem (Takemiya *et al.*, 2005). Fytochromy jsou dimerové chromoproteiny, kde je apoprotein každého monomeru vázán na fytochromobilin, což je látka na bázi tetrapyrrolo fungující jako chromofor. Fytochromy se nacházejí ve dvou formách: inaktivní P_r (angl. *red*) a aktivní P_{fr} (angl. *far red*). Forma P_r absorbuje červené světlo ($\lambda = 650\text{--}670$ nm) a forma P_{fr} absorbuje světelné záření odpovídající vzdálené červené ($\lambda = 705\text{--}740$ nm) (Rockwell *et al.*, 2006). V momentě vystavení červenému světlu ($\lambda = 650\text{--}670$ nm) dochází k reverzibilním změnám konformace fytochromů, konkrétně k izomeraci jejich chromoforů, čímž dojde k přechodu fytochromu z jeho inaktivní P_r formy na aktivovanou formu P_{fr} a naopak je-li vystavena aktivní forma P_{fr} světlu vzdálené červené, přechází zpět na inaktivní formu P_r . Fytochromy tedy fungují jako molekulární přepínače a poměr aktivních/inaktivních forem silně závisí na poměru červeného/vzdáleného červeného světla (Klose *et al.*, 2015). Inaktivní forma P_r je syntetizována a běžně se nachází v cytosolu. Pokud dojde k její aktivaci a změně na aktivní P_{fr} formu je daný fytochrom translokován do buněčného jádra, kde spouští expresi odpovídajících cílových genů (Paik *et al.*, 2012). Exprese cílových genů je umožněna

interakcí aktivní P_{fr} formy fytochromu s PIFs (angl. *phytochrome interacting factors*) transkripčními faktory, které fungují jako hlavní negativní regulátory odpovědi na světlo a zabraňují fotomorfogenezi (Leivar *et al.*, 2014). Fytochromy v aktivních formách vytvářejí s PIFs jaderná tělíška (Van Buskirk *et al.*, 2012), která podléhají 26S proteasomem-zprostředkované degradaci prostřednictvím jejich rychlé fosforylace a ubikvitinace, čímž dochází k inhibici funkce PIFs jakožto represorů transkripce (Xu *et al.*, 2015). U vyšších rostlin jsou fytochromy kódovány malými genovými rodinami. Kupříkladu v rámci dvouděložných rostlin obsahuje genová rodina fytochromů pět členů od fytochromu A (*phyA*) až po fytochrom E (*phyE*) (Tepperman *et al.*, 2004). Avšak u většiny jednoděložných rostlin jsou součástí genové rodiny fytochromů pouze tři geny: *phyA*, *phyB* a *phyC* (Sun *et al.*, 2017). Ječmen (*Hordeum vulgare* L.) jakožto jednoděložná rostlina je výjimkou z pravidla, protože se zde nachází čtyři geny pro fytochromy, z nichž jeden je navíc duplikován (Biyashev *et al.*, 1997). Fytochromy mohou být rozděleny dle stability na červeném světle do dvou typů: fotostabilní a fotolabilní typ. Fotostabilní je pouze *phyA*. Ostatní fytochromy (*phyB*–*phyE*) jsou fotolabilními typy. Také je známo, že *phyA* reguluje signalizaci světla odpovídající vzdálené červené a funguje v tzv. VLFR odpovědi (angl. *very low fluence response*), tedy při odpovědi na velmi nízkou intenzitu světelného záření, zatímco všechny ostatní typy fytochromů (*phyB*–*phyE*) řídí signalizaci červeného světla a fungují v LFR odpovědi (angl. *low fluence response*) (Rausenberger *et al.*, 2011; Paik *et al.*, 2019). Obecně jsou fytochromy zapojeny v široké paletě procesů od klíčení, de-etiolizace, inhibice prodlužování stonku a řapíku, vývoje chloroplastů a syntézy chlorofylu, expanze a zplošťování listové čepele, až po kvetení, větvení, senescenci a účastní se také při cirkadiálních rytmech (Tripathi *et al.*, 2019; Paradiso *et al.*, 2022). Funkce jednotlivých fytochromů se mnohdy vzájemně překrývají. Světelná signalizace fytochromy může rovněž ovlivňovat auxinovou signalizační kaskádu a zde zaujímá majoritní roli *phyB*. Ztráta funkce *phyA* či *phyB* je spjata s prodlužováním hypokotylu, redukcí prodlužování kořenů a inhibicí produkce laterálních kořenů, což koresponduje s účastí těchto fytochromů alespoň částečně v modulaci signalizace auxinu (Halliday *et al.*, 2009; Jiang *et al.*, 2020). Role P_{fr} *phyB* v rámci fotomorfogeneze spočívá v represí ARF prostřednictvím koordinované aktivace supresoru *AtSUR2* a inhibice enhanceru *AtTAA1* biosyntézy IAA. Naopak exogenně dodaný auxin snižuje množství *phyB* v rostlinách. Funguje zde tedy reciproční regulace (Jiang *et al.*, 2019a). Oba fytochromy *phyA* a *phyB* mají schopnost přímé interakce s Aux/IAA proteiny a tím zvyšují jejich stabilitu předcházením interakce s TIR1 (angl. *transport inhibitor response 1*) a jejich následné degradace prostřednictvím SCF^{TIR1/AFB} E3 ubikvitin ligasy. Aux/IAA proteiny jsou represory ARF, které spouštějí expresi auxin responzivních genů. *PhyB* dokonce může přímou vazbou na ARF proteiny snižovat jejich DNA-vazebnou schopnost, čímž je eliminována jejich stimulační funkce transkripce (Liu *et al.*, 2021; Xie *et al.*, 2022). *PhyA* má schopnost autofosforylace a funguje jako kinasa fosforylující PKS1 (angl. *phytochrome kinase substrate 1*) a Aux/IAA proteiny. Tato modifikace vede u Aux/IAA genů k již zmíněné ochraně před degradací a vyšší stabilitě. PKS1 je protein figurující při fototropismu a elongaci hypokotylu při signalizaci modrého světla a je úzce spjat s fototropiny, což poukazuje na provázanost signalizace různých fotoreceptorů (Colón-Carmona *et al.*, 2000; Gyula *et al.*,

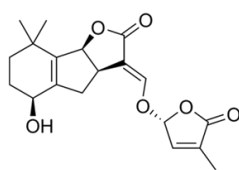
2003; Lariguet *et al.*, 2006; Xie *et al.*, 2022). Tyto informace podávají jasné důkazy o tom, že světelná signalizace je hierarchicky nadřazena auxinové hormonální signalizaci, tedy, že auxinový signál vedoucí k intenzivnímu růstu může být vlivem signalizace světelných podmínek zeslaben (Xie *et al.*, 2022). Fytochromy se rovněž účastní obranné signalizační kaskády rostlin při stresových situacích. Regulační funkce phyB v rostlinných obranných mechanismech spočívá ve funkční integraci phyB a jasmonátů pravděpodobně prostřednictvím konzervované transkripční sítě, která inhibuje růst rostlin po aktivaci jasmonátového signalingu. Skrze phyB je vyvažován kompromis růstu a obrany rostlin (Campos *et al.*, 2016).

3.3 Hormonální signalizace u rostlin

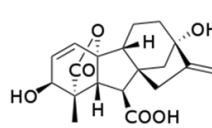
Rostlinné hormony neboli fytohormony jsou organické látky přirozeně se v rostlinách vyskytující ve velmi nízkých koncentracích, které fungují jako informační poslové ovlivňující růst, vývoj a obranné reakce celé rostliny prostřednictvím různých biochemických procesů. Fytohormony se vzájemně velmi liší v chemické struktuře a ve fyzikálně-chemických vlastnostech. Vyskytují se jak u vyšších, tak u nižších rostlin. Tyto fytohormony figurují v signalizaci sami o sobě, ale jejich konjugované formy a intermediáty rovněž hrají podstatnou roli. Fytohormony lze rozdělit dle účinku na růst do dvou základních skupin. První skupina tzv. stimulačních fytohormonů zahrnuje auxiny, cytokininy (CK), gibbereliny, resp. kyselinu gibberelovou (GA), brassinosteroidy (BR), strigolaktony (SL) a kyselinu salicylovou (SA). Ve druhé skupině tzv. inhibičních fytohormonů se nalézá kyselina abscisová (ABA), jasmonáty, resp. kyselina jasmonová (JA) a etylén (ET). Dle funkce je můžeme dále dělit na růstové regulátory (auxiny, CK, GA aj.) prvoplánově modulující růst a obranné substance (SA, JA, ABA aj.), uplatňující se při reakci na biotický a abiotický stres (Durbak *et al.*, 2012; Mishra *et al.*, 2017; Asif *et al.*, 2022; Sabagh *et al.*, 2022). Rozdíl v chemické struktuře jednotlivých fytohormonů je znázorněn na Obrázku 1. Homeostáza fytohormonů je regulována skrze jejich syntézu, metabolismus, transport do cílových pletiv a v konečném důsledku je zpětně ovlivněna transdukcí signálu. Fytohormony se účastní signalizace na krátké i na dlouhé vzdálenosti v rámci rostliny a uplatňuje se zde rozdílný transportní mechanismus. Při signalizaci na dlouhé vzdálenosti (např. z kořene do listu nebo naopak) jsou fytohormony od zdroje svého vzniku přenášeny prostřednictvím vodivých pletiv xylému a floému, kdežto při lokální signalizaci dochází k přenosu díky symplastu, apoplastu nebo transcelulárním mechanismem činností transportních proteinů (Asif *et al.*, 2022). Koncentrace jednotlivých fytohormonů v rámci životního cyklu rostliny v cílových pletivech simultánně kolísá. Fytohormony v rámci vývojových procesů vykazují znaky synergismu nebo antagonismu. Zvýšení koncentrace určité kombinace fytohormonů je spjata s konkrétním vývojovým procesem a aktivita jednotlivých fytohormonů velmi závisí na buněčném kontextu (Depuydt *et al.*, 2011; Durbak *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2014a).

a. auxiny

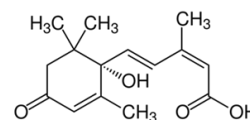
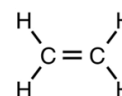
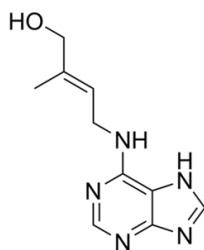
kyselina indol-3-octová

c. strigolaktony

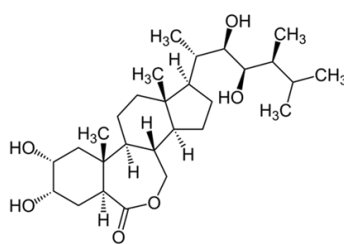
(+) -strigol

e. gibereliny

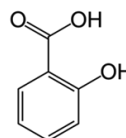
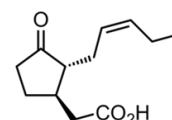
kyselina giberelová

g. kyselina abscisová**h. etylén****b. cytokininy**

zeatin

d. brassinosteroidy

brassinolid

f. kyselina salicylová**i. kyselina jasmonová****Obrázek 1:** Chemická struktura vybraných zástupců jednotlivých skupin fytohormonů.

Auxiny jsou fytohormony obecně zapojené v růstu stonku i kořene, ale přítomny jsou během téměř každé fáze ontogeneze rostlin. Auxiny jsou klíčové regulátory buněčného dělení a diferenciace, vývoje embrya, tropismů stonků i kořenů, apikální dominance a uplatňují se i při zahájení kvetení. V těchto procesech vykazují částečný synergismus s cytokininy, které jsou rovněž nepostradatelné pro buněčnou proliferaci a diferenciaci (Sachs, 2005; Balzan *et al.*, 2014; Sabagh *et al.*, 2022). Gibereliny mají zásadní stimulační vliv na klíčení semen a růst rostlin obecně (např. při inter-nodální elongaci). Rovněž jsou zapojeny při vývoji květu, načasování kvetení a vývoji plodu. Další skupina fytohormonů, brassinosteroidy, byly nalezeny téměř ve všech typech pletiv. Účastní se opět mnoha vývojových procesů převážně spojených s růstem. Indukují růst stonku a kořene. Ovlivňují vaskulární diferenciaci, kvetení a klíčení. Účastní se dokonce v odpovědích na environmentální stres (Bajguz *et al.*, 2009; Depuydt *et al.*, 2011; Bajguz *et al.*, 2020). Primárně zprostředkovávají obranné reakce vůči abiotickému nebo biotickému stresu čtyři základní fytohormony, tj. ABA, ET, JA a SA, které mají mimo to další funkce. ABA je důležitá během dozrávání a dormanci semen. Také reguluje množství vody v rostlině otevíráním/uzavíráním stomat. ET mimo svou protektivní funkci řídí klíčení semen, vývoj květu a dozrávání plodů. SA je spíše spojována s reakcemi na salinitu a osmotický stres. Kdežto JA se podílejí na vývoji embrya a reprodukčních orgánů, determinaci pohlaví rostlin, klíčení, dozrávání plodů i formování trichomů (Horváth *et al.*, 2007; Danquah *et al.*, 2013; Wasternack, 2014). Zajímavou skupinou fytohormonů jsou SL, které byly nejprve objeveny u parazitických rostlin, posléze byl zjištěn jejich výskyt u dalších rostlinných druhů. SL fungují jako determinanty architektury rostlinného těla. Ovšem jejich nejvýznamnější funkcí je podpora endomykorhizy (Mishra *et al.*, 2017). Následující text

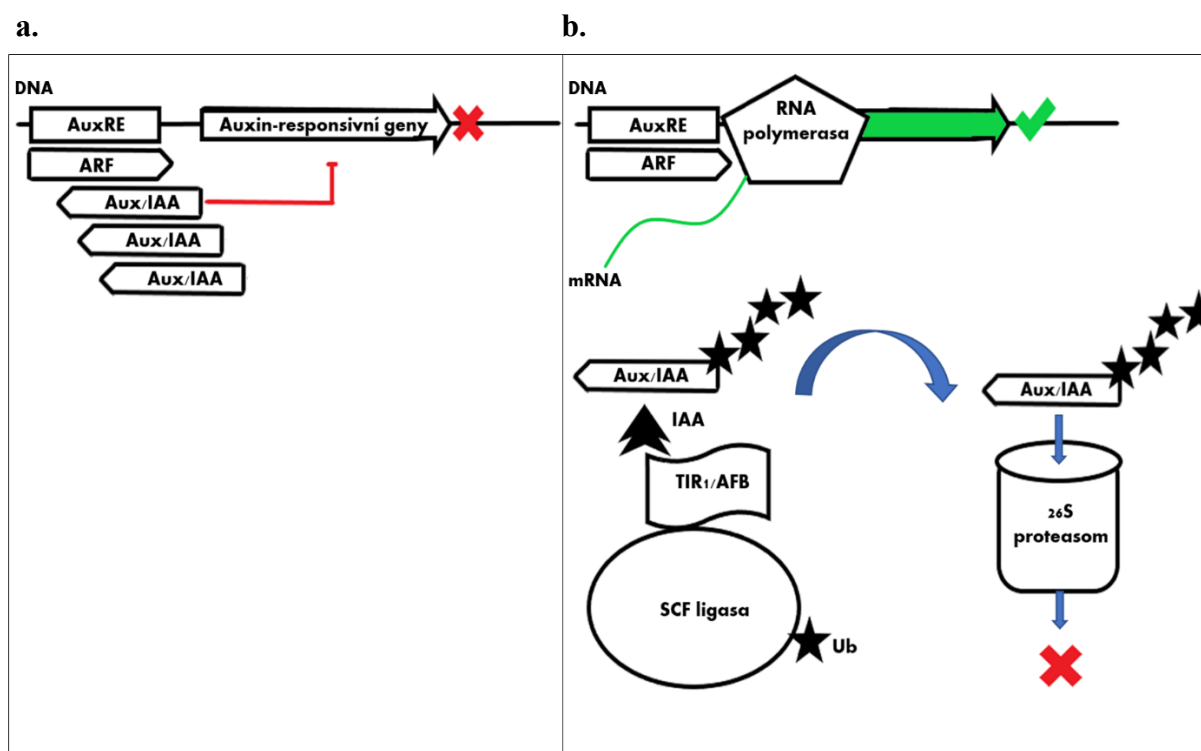
bude věnován převážně metabolismu IAA (kyselina indol-3-octová) a auxinové signalizaci, která je předmětem této práce.

Biosyntéza IAA může probíhat v děložních lístcích, listech i kořenech, přičemž nejvyšší kapacitu mají mladé vyvíjející se listy (Chen *et Xiong*, 2009). Transdukce auxinového signálu je zásadně ovlivněna jeho metabolismem, jenž představuje mechanismus regulace hladiny IAA v rostlině prostřednictvím biosyntézy či degradace tohoto fytohormonu. Syntéza IAA probíhá několika alternativními metabolickými drahami, z nichž některé jsou závislé a jiné nezávislé na aminokyselině tryptofanu (Trp) (Ljung *et al.*, 2005). Trp-dependentní dráhy syntézy IAA zahrnují enzymatickou přeměnu, kde je výchozím substrátem Trp. Jsou známy čtyři alternativy syntézy IAA z Trp (Pěňčík *et al.*, 2018). Trp-nezávislá syntéza využívá jako substrát prekurzory Trp (indol-3-glycerol fosfát), čímž kompletně potřebu Trp obchází, doposud byla však objevena pouze jedna taková dráha (Wang *et al.*, 2015). Trp-dependentní dráhy jmenovitě: indol-3-acetamidová (IAM) dráha, indol-3-acetaldoximová (IAOx) dráha, tryptaminová (TRA) dráha a dráha kyseliny indol-3-pyrohroznové (IPyA) byly pojmenovány podle hlavního intermediátu při syntéze IAA (Pěňčík *et al.*, 2018; Sabagh *et al.*, 2022). Z těchto drah je nejlépe charakterizována IPyA, kterou zprostředkovávají genové rodiny *TAAI/TAR* (aminotransferasy) a *YUCCA* (flavin mono-oxygenasy). Degradace IAA probíhá oxidací a následnou konjugací za vzniku 2-oxindol-3-octové kyseliny (oxIAA) a oxIAA-glukósy (oxIAA-Glc), což zajišťuje protein DAO. Jinou formou inaktivace IAA je konjugace s cukry či aminokyselinami. Tato inaktivace je zajištěna genovou rodinou *GH3* (angl. *Gretchen Hagen 3*). Některé konjugáty mohou být posléze hydrolyzovány a uvolňovat IAA, což naznačuje, že tyto konjugáty poskytují dočasný rezervoár inaktivního IAA (Kramer *et Ackelsberg*, 2015; Pěňčík *et al.*, 2018; Gomes *et Scortecci*, 2021).

Auxiny jsou v rostlinném těle transportovány a distribuovány na krátké i dlouhé vzdálenosti. Na dlouhé vzdálenosti se tak děje hromadným tokem (tzn. konvekcí) vodivým pletivem floémem. Avšak na krátké vzdálenosti jsou auxiny transportovány effluxem/influxem díky specifickým přenašečům z buňky do buňky. Mezi effluxní přenašeče patří PIN (angl. *PIN-formed*) proteiny a ABC transportéry (angl. *ATP-binding cassette*) podrodiny B (ABCB). Influx auxinu zajišťují AUX1/LAX (angl. *auxin resistant 1/like aux*), P-glykoprotein (PGP) a PIL proteiny (angl. *PIN-like*) (Xi *et al.*, 2016; Doyle *et al.*, 2019). Z hlediska distribuce auxinu je důležitý také proces IAA kanalizace. Hypotéza kanalizace IAA nabízí zpětnovazebný mechanismus regulace auxinu ovlivňující směr jeho intracelulárního proudu jako prostředek polarizace meristémů. Děje se tak prostřednictvím Aux/IAA-ARF-dependentní regulace cílení polarity PIN auxin-transportních komponent (Sauer *et al.*, 2006).

Kyselina indol-3-octová (IAA) patří mezi nejhojněji se v rostlině vyskytující, první objevenou a první izolovanou formu auxinu. Bylo zjištěno, že na transdukci auxinového signálu v rostlinách má hlavní podíl právě IAA. Avšak kromě IAA existují i další jiné auxiny. Přirozeně se vyskytuje např. 4-chlorindol-3-octová kyselina (4-Cl-IAA), indol-3-máselná kyselina (IBA), nebo fenylactová kyselina

(PAA). IBA slouží jako endogenní auxinový rezervoár, protože její degradaci pomocí β -oxidace zpětně vzniká IAA působením peroxizomálního enzymu IBR1 (angl. *indole-3-butyric acid response 1*). IBA má pozitivní vliv na indukci růstu adventivních kořenů. Stejný účinek jako přírodní auxiny mají také syntetické deriváty, které se přirozeně nevyskytují v rostlinách, např. 2,4-dichlorfenoxycetová kyselina (2,4-D) a naftalen-1-octová kyselina (NAA) (Ljung *et al.*, 2005; Balzan *et al.*, 2014; Ma *et al.*, 2018). Dobře prostudovaným molekulárním mechanismem auxinové signalizace je SCF^{TIR1/AFB}-auxin-Aux/IAA ko-receptorový systém, který funguje na principu degradace klíčových transkripčních represorů Aux/IAA (angl. *auxin/indole-3-acetic acid*), které jsou inhibitory ARF (Calderon Villalobos *et al.*, 2012). Při percepci auxinu jsou zde klíčové F-box proteiny TIR1 (angl. *transport inhibitor resistant 1*) a AFB1–5 (angl. *auxin signaling f-box*), které fungují jako auxinové ko-receptory a jsou lokalizovány v buněčném jádře. Experimentální studií (Havens *et al.*, 2012) bylo potvrzeno, že TIR1 a AFB2 jsou hlavními receptory auxinové signalizace a vzájemnou součinností s AFB1 a AFB3, jejichž význam je menší, umožňují degradaci Aux/IAA proteinů. Parry *et al.* (2009) předpokládali, že AFB4 a AFB5 jsou negativními regulátory auxinové signalizace. TIR1 a AFB jsou substrát-rozpoznávajícími podjednotkami proteinového komplexu E3 ubikvitin ligasy SCF^{TIR1/AFB}, které po percepci IAA zajišťují vazbu Aux/IAA transkripčních represorů k SCF^{TIR1/AFB}. IAA zde funguje jako „molekulární lepidlo“ umožňující interakci auxinových ko-receptorů s Aux/IAA proteiny. Následuje polyubikvitinace Aux/IAA zajišťovaná SCF^{TIR1/AFB} ligasou, což vede k 26S proteasomem zprostředkované degradaci těchto represorů (Yu *et al.*, 2013; Di *et al.*, 2015; Leyser, 2018; Laha *et al.*, 2020). Komplex SCF^{TIR1/AFB} je podtypem Cullin-RING E3 ubikvitin ligas (CRL) sestávajícím ze čtyř základních komponent. Obsahuje homolog adaptorového proteinu SKP1, u *A. thaliana* se jedná o ASK1 (angl. *arabidopsis skp1 homolog 1*), dále je vázán protein Cullin 1 (CUL1), E2-interagující RING-box protein (RBX) a již zmíněné auxinové receptory z rodiny F-box proteinů (Di *et al.*, 2015; Ma *et al.*, 2017; Gomes *et al.*, 2021). Polyubikvitinace je typem post-translační modifikace, při které je na substrát určený k degradaci opakovaně kovalentně vázán malý protein ubikvitin (Ub) do krátkého řetězce. To vyžaduje součinnost tří základních enzymů: E1 Ub-aktivačního, E2 Ub-konjugačního a E3 Ub-ligačního. Vazba Ub k cílovému proteinu slouží jako značka pro multi-podjednotkový ATP-dependentní proteasomový komplex zvaný 26S proteasom, jenž zajišťuje hydrolytické štěpení tohoto proteinu. (Santner *et al.*, 2010). Aux/IAA proteiny jsou při nízkých hladinách či absenci IAA navázány na ARF, které obsahují DNA-vazebnou doménu. ARF se váží do auxin responzivních elementů (AuxRE), regulačních úseků DNA v oblasti promotorů auxin responzivních genů. Při současné vazbě Aux/IAA je funkce ARF jako modulátorů exprese inhibována. Po degradaci Aux/IAA proteinů výše popsaným způsobem jsou ARF aktivovány a je spuštěna/potlačena exprese odpovídajících genů. Jedna ze základních schopností Aux/IAA proteinů je právě jejich vzájemná oligomerizace a heterodimerizace s ARF proteiny, čehož je v tomto molekulárním mechanismu negativní regulace auxinové signalizace využito (Zenser *et al.*, 2001; Lavy *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2016; Luo *et al.*, 2018; Ori, 2019). Schematicky je molekulární mechanismus auxinové signalizace znázorněn Obrázkem 2.



Obrázek 2: Kanonický molekulární mechanismus auxinové signální kaskády. **a.** Při absenci auxinu dochází k inhibici exprese auxin-responsivních genů prostřednictvím Aux/IAA. **b.** Při vyšších koncentracích auxinu jsou Aux/IAA represory ubikvitinovány a degradovány proteasomem, což vede k transkripci auxin-responsivních genů.

Aux/IAA geny náleží do skupiny primárních (včasných) auxin-responsivních genů včetně *GH3* (angl. *Gretchen Hagen 3*) a *SAUR* (angl. *small auxin upregulated RNA*). Tyto geny reagují na auxin jako první, a proto hrají významnou roli v prvotní transdukcii auxinového signálu. Genová rodina *Aux/IAA* obsahuje velké množství genů napříč širokou paletou druhů vyšších rostlin. Do dnešního dne bylo genomovými studiemi u *A. thaliana* identifikováno 29 *Aux/IAA* genů (Luo *et al.*, 2018). Avšak u rýže (*O. sativa*) se vyskytuje 31 *Aux/IAA* genů a v rámci genomu ječmene (*Hordeum vulgare* L.) se nachází až 36 těchto genů (Shi *et al.*, 2020). *Aux/IAA* proteiny jsou lokalizovány v buněčném jádře a vykazují nízkou stabilitu. Kanonické *Aux/IAA* proteiny obsahují čtyři základní fylogeneticky konzervované domény (doména I–IV), na jejichž přítomnosti závisí funkčnosti těchto proteinů. Doména I lokalizovaná v blízkosti N-terminální části má epistatický efekt na transkripční aktivaci ARF, což znamená, že zprostředkovává transkripční represi ARF proteinů. Tato doména obsahuje strukturální motiv LxLxLx (L reprezentuje leucín, x reprezentuje jakoukoli jinou proteinogenní aminokyselinu). Do tohoto motivu se váže transkripční ko-represor TPL (angl. *topless*) vytvářející lešení, které poté přivádí histon-deacetylasi k oblasti s ARF, čímž je zajišťována výše popsaná inhibice. Doména II obsahuje specifickou sekvenci 13 aminokyselin vytvářející degron, který interaguje s TIR1. Degron v doméně II je tedy část *Aux/IAA* proteinů podílející se na regulaci jejich stability. Poločas rozpadu *Aux/IAA* proteinů se pohybuje od 10 min do několika hodin v závislosti na struktuře a vlastnostech domény II.

Některé Aux/IAA nesoucí mutaci v doméně II mají několikanásobně vyšší poločas rozpadu a jsou nesenzitivní vůči auxinu. C-terminální domény III a IV sdílejí homologii s doménami ARF proteinů a umožňují vzájemnou protein-proteinovou interakci. Mají tedy zásadní vliv na oligomerizaci mezi Aux/IAA a heterodimerizaci s ARF. Ty Aux/IAA proteiny, jež ztratily funkci některé z konzervovaných domén, jsou označovány jako nekanonické a jejich role se zásadně liší od kanonických Aux/IAA (Zenser *et al.*, 2001; Luo *et al.*, 2018; Shi *et al.*, 2020). Předpokládá se, že vznik nekanonických Aux/IAA proteinů byl dávnou evoluční událostí zřejmě důležitou pro adaptaci rostlin k odlišným environmentálním podmínkám. Podporou tohoto tvrzení je fakt, že nekanonické Aux/IAA se vyskytují v genových rodinách napříč rostlinnou říší (Jain *et al.*, 2006; Kalluri *et al.*, 2007). Nekanonické Aux/IAA32, IAA33 a IAA34 fungují při vyšších fyziologických hladinách auxinu a nejsou zapojeny v klasické signalizační dráze s ligasou SCF^{TIR1/AFB}. Nekanonický IAA33 bez typických domén I a II funguje jako negativní regulátor auxinové odpovědi a ovlivňuje identitu totipotentních buněk kořene. Prostřednictvím kompetice s IAA5 narušuje IAA33 represi faktorů ARF10 a ARF16. IAA33 je stabilizován přítomností auxinu, který zvyšuje fosforylační aktivitu enzymu MPK14, jehož je IAA33 fosforylačním substrátem (Cao *et al.*, 2019; Lv *et al.*, 2020). Dalším příkladem nekanonických Aux/IAA je IAA26. U rýže (*O. sativa*) OsIAA26 nesoucí substituci aminokyselin v degronu domény II společně s kanonickým OsIAA9 funkčně integrují auxinový a etylénový signaling (Chen *et al.*, 2018). Aux/IAA proteiny participují v mnoha vývojových procesech spjatých s auxinovou signalizací od vývoje embrya, růstu a elongaci laterálních kořenů, až po růst hypokotylu, tropismy, senescenci listů či vývoj květu (Luo *et al.*, 2018). Studium IAA7/AXR2 deficientních mutantů *A. thaliana* poukázalo na roli IAA7 v regulaci indukce kvetení, regulaci elongace hypokotylu a vývoje listu. Protein IAA29 je naproti tomu antagonistou JA-indukované senescence listů. (Mai *et al.*, 2011; Luo *et al.*, 2018). Mutant *iaa1/axr5* u *A. thaliana* vykazoval defekty tropismů listu i kořene (Yang *et al.*, 2004). Podobný fenotyp se vyskytoval i u mutantů *iaa2* a *iaa6*, kdy byl navíc pozorován krátký hypokotyl a deformace listů (Kim *et al.*, 1996; Tian *et al.*, 1999). IAA3, IAA14 a IAA18 společně ovlivňují tvorbu a růst laterálních kořenů prostřednictvím represe ARF7 a ARF19 (Guseman *et al.*, 2015). Nicméně proces tvorby laterálních kořenů je také podmíněn interakcí IAA8 s TIR1. Nadměrně exprimovaný IAA8 způsobuje abnormální gravitropismus kořene a změna struktury domény II proteinu IAA8 způsobená mutací vede k narušení vývoje květu (Arase *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2013a). V prvních fázích embryogeneze se zapojuje protein IAA12 při regulaci vývoje kořenového meristému. IAA16 má zase velký vliv na plodnost a růst rostlin. Homozygotní mutant *iaa16* vykazoval kompletní ztrátu fertility, zakrslý růst a menší množství laterálních kořenů (Rinaldi *et al.*, 2012). Studie u *Arabidopsis* potvrdily, že IAA17, klíčový v procesech regulace elongace hypokotylu, gravitropismu kořene a tvorby laterálních kořenů, je rovněž zapojen v glutamin syntetasou (GLN1)-zprostředkované asimilaci amoniaku v cytosolu meristematických buněk kořene (Saito *et al.*, 2017). Velmi zajímavá jsou zjištění studií, které vnesly nový pohled na funkci Aux/IAA proteinů u obilovin. Jedná se například o zapojení v procesu formace aerenchymu u rýže (*O. sativa*) (Yamauchi *et al.*, 2019), nebo u kukuřice (*Zea mays*) při tvorbě klasů

a střapců (Galli *et al.*, 2015). Nadměrná exprese *OsIAA4* má spíše negativní důsledky, vede k nižší senzitivě k exogenně aplikovanému auxinu a zakrslému růstu. Naopak nadměrná exprese *OsIAA6* zvyšuje odolnost rostlin vůči suchu (Song *et Xu*, 2013; Jung *et al.*, 2015). *OsIAA11* inhibuje vývoj laterálních kořenů a ovlivňuje tvorbu květenství (Zhu *et al.*, 2012). Analýzou exprese *Aux/IAA* genů Shi *et al.* (2020) byla nastíněna funkce těchto genů v rámci ječmene (*Hordeum vulgare* L.). Například vysoká míra exprese *HvIAA20* v květenství naznačuje zapojení tohoto genu právě v procesu kvetení. Podobnou analogii lze použít u genu *HvIAA16*, který je výrazněji exprimován při vývoji obilek. Na základě analýz exprese a studií fylogenetických příbuzností genu *OsIAA9* s *HvIAA28* a *HvIAA30*, lze předpokládat, že *HvIAA28* a *HvIAA30* mohou ovlivňovat růst kořene (Shi *et al.*, 2020). *Aux/IAA* proteiny jsou zapojeny v mnoha dalších odpovědích na environmentální podněty. Bylo zjištěno, že protein *AtIAA3* (synonymně SHY2; angl. *suppressor of HY2*) je zapojen v procesu fotomorfogeneze. Exprese tohoto proteinu je jednak regulována světelnými podmínkami. Avšak *AtIAA3* navíc participuje v inhibici aktivity fytochromů, jelikož potlačuje aktivitu fytochromobilin syntasy HY2 (Tian *et al.*, 2002). Světelnými podmínkami je regulována rovněž exprese *AtIAA19* a *AtIAA29*, kdy PIF4 přímo interaguje s promotory těchto genů, inhibuje aktivitu ARF7 a spouští tak jejich expresi. Tímto způsobem PIF4 negativně reguluje procesy spojené se signalizací světla a auxinový signaling. Fotomorfogeneze se rovněž účastní *IAA7* (Luo *et al.*, 2018). *Aux/IAA* proteiny jsou také zapojeny ve vnímání fosforu. López-Bucio *et al.* (2002) ukázal, že *IAA28* deficiční mutanti *A. thaliana* vykazují defektivní fenotyp kořene a neschopnost formace laterálních kořenů v odpovědi na nízkou i vysokou hladinu fosforu, což byl zásadní kontrast oproti jiným auxin-deficientním mutantům. Dalším pojítkem auxinové signalizace s procesem vnímání fosforu je protein *OsIAA11*, který je u rýže (*O. sativa*) stabilizován inositol polyfosfát kinásou 2 (*OsIPK2*). Nadměrnou expresí *OsIPK2* dochází u rostlin ke ztrátám sensitivity vůči auxinu a k defektům růstu laterálních kořenů (Luo *et al.*, 2018). Mutace *IAA7/AXR2* vedla ke zvýšené náchylnosti k nekrotrofním houbám *Plectosphaerella cucumerina* a *Botrytis cinerea* (Llorente *et al.*, 2008).

Klíčem k funkci ARF je jejich schopnost vázat se na *cis*-elementy AuxRE, které představují specifický sekvenční motiv TGTCTC v promotorech auxin responzivních genů. Pro vazbu ARF je nezbytná pouze sekvence TGTC, jelikož kanonický TGTCTC není přítomen v rámci všech promotorů auxin-responzivních genů a některé ARF (konkrétně ARF1 a ARF5) preferují vazbu na nekanonický TGTCCG motiv (Paciorek *et Friml*, 2006; Hayashi, 2012; Lavy *et Estelle*, 2016). Většina ARF ve své struktuře obsahuje tři domény. Jedná se o konzervovanou N-terminální B3 DNA-vazebnou doménu (DBD) zajišťující interakci ARF s AuxRE, dále konzervovanou C-terminální PB1 doménu (CTD) zajišťující protein-proteinovou interakci s doménami III a IV *Aux/IAA* proteinů a variabilní region nacházející se mezi těmito doménami (MR; angl. *middle region*), který definuje transkripční regulační aktivitu. MR se může na základě své funkce rozlišovat na aktivační (AD) nebo represivní doménu (RD) s přímým impaktem na funkci daného ARF (Wang *et al.*, 2013b; Li *et al.*, 2016; Freire-Rios *et al.*, 2020). Bylo

zjištěno, že MR bohatý na aminokyselinu glutamin funguje převážně jako AD, přičemž při nadměrném výskytu jiných aminokyselin v MR jsou dané ARF spojeny spíše s represí exprese auxin responzivních genů. Pravděpodobným mechanismem této negativní regulace je interference těchto represivních a aktivačních ARF (Liscum *et* Reed, 2002). V rámci genomu *A. thaliana* bylo identifikováno 23 ARF genů. Bylo analyzováno 18 typů ARF deficientních mutantů *A. thaliana* se ztrátou funkce, z nichž pouze někteří mutanti vykazovali abnormální fenotyp, což naznačuje, že jsou funkce ARF obdobně jako Aux/IAA do jisté míry redundantní (Quint *et* Gray, 2006; Hayashi, 2012). Genová rodina ARF u ječmene (*Hordeum vulgare*) má na rozdíl od *A. thaliana* pouze 20 členů (Tombuloglu, 2019). Jednotlivé ARF obecně vykazují funkční specializaci. Auxinový signál je převáděn na specifické odpovědi párováním funkcí ko-exprimovaných Aux/IAA a ARF proteinů, které jsou si vzájemnými antagonisty. Příkladem je podobný abnormální fenotyp *iaa12/bdl* a *arf5/mp* mutantů, což poskytuje důkaz, že konkrétní Aux/IAA proteiny interagují s vybranými ARF harmonicky v modulaci přesně určeného vývojového procesu (Quint *et* Gray, 2006; Ori, 2019). Studiemi na mutantních rostlinách *A. thaliana* bylo zjištěno, že ARF proteiny figurují v mnoha vývojových procesech zahrnující vývoj květu (*AtARF2*, *AtARF3*), embryogenezi (*AtARF5*, *AtARF17*), vývoj kořene (*AtARF7*, *AtARF10*, *AtARF16* a *AtARF19*) a senescenci (*AtARF1* a *AtARF2*) (Quint *et* Gray, 2006). Mutant *arf3/ettin* vykazoval defekty při vývoji květu a gynecea. Studiemi Liu *et al.*, 2014b bylo zjištěno, že ARF3 integruje funkce proteinů AG (angl. *agamous*) a AP2 (angl. *apetala 2*) při determinaci květního meristému. Rovněž ARF3 interaguje s KANADI proteiny. Dohromady tvoří funkční komplex, který je esenciální pro specifikaci polaritu listu. *AtARF3* zprostředkovává transdukcii auxinového signálu během *de novo* regenerace listu (Cheng *et al.*, 2013). U rajčete (*Solanum lycopersicum* L.) *SlARF3* figuruje při tvorbě buněk epidermis a při formování trichomů (Zhang *et al.*, 2015a). Mutantní rostlina *A. thaliana arf5/mp* vykazovala abnormální vývoj embrya a tato mutace vedla k neschopnosti tvořit děložní lístky či kořen. Konkrétně je ARF5 nepostradatelný například pro tvorbu radikuly a uplatňuje se také minoritně při vývoji květu (Hardtke *et* Berleth, 1998; Hayashi, 2012). ARF8 hraje klíčovou roli během vývoje plodů a při fertilizaci. ARF6 a ARF8 působí redundantně a jsou důležité v mnoha procesech. Jmenovitě se jedná o maturaci květů a gynecea, elongaci květního stvolu, elongaci filamentů tyčinek a rozevírání prašníků. Mutanti *arf7/nph4/msg1* a *arf19* byli neschopni tvořit laterální kořeny a došlo zde k narušení fototropismu, což vedlo k závěru, že ARF7 a ARF19 současně fungují při růstu laterálních kořenů a dále bylo konstatováno, že oba kontrolují proces expanze listu. Pleotropní abnormální fenotyp byl zaznamenán u mutantu *arf2/hss*, zatímco u jednotlivých mutantů *arf10* a *arf16* nebyl pozorován aberantní fenotyp. Bylo zjištěno, že *OsARF12* a *OsARF16* jsou potřebné při redistribuci auxinu během odpovědi na nízkou hladinu železa (Tabata *et al.*, 2010; Hayashi, 2012; Li *et al.*, 2016). Shen *et al.* 2013 popisuje zapojení *OsARF16* při prodlužování kořene. ARF podobně jako Aux/IAA proteiny figurují v mnoha dalších procesech a mimo jiné poskytují funkční propojení různých typů hormonální signalizace. Experimentálně Pérez-Torres *et al.* (2008) a poté Bhosale *et al.* (2018) potvrdili zapojení ARF19 v procesu elongace a tvorby laterálních kořenů při nedostatku fosforu. Tato zjištění celkově poukazují

na zapojení ARF19 při vnímání dostupnosti fosforu rostlinami. Podobně je tomu při supresi genu *OsARF16*, kdy dochází u rýže k nevnímavosti rostlin vůči nízké hladině fosforu (Shen *et al.* 2013). Nedávné studie poskytly důkazy o funkční integraci auxinové a brassinosteroidní hormonální signalizace, kdy oba typy fytohormonů synergicky zvyšují expresi auxin responzivních genů. Bylo pozorováno, že BIN2 kinasa (angl. *brassinosteroid-insensitive 2*) prostřednictvím fosforylace zapříčinila inaktivaci transkripčních faktorů ARF2, ARF7 a ARF19, čímž došlo ke zvýšení exprese genů indukovaných auxinem během organogeneze laterálních kořenů. Zmíněná fosforylace vedla ke ztrátě DNA-vazebné aktivity těchto ARF (Choi *et al.*, 2018). U rýže (*O. sativa*) *OsARF19* kontroluje úhel sklonu listů skrze pozitivní regulaci genů *OsGH3-5* a *OsBR11* (angl. *brassinosteroid insensitive 1*), což poukazuje na další funkční provázání BR a auxinové signalizace (Zhang *et al.*, 2015b). U rajčete (*Solanum lycopersicum* L.) *SlARF7* zprostředkovává funkční integraci giberelinové a auxinové signalizace během vývoje plodu (de Jong *et al.*, 2011). Zhang *et al.*, 2020 uvádí, že u *Carica papaya* L. dochází k interakci mezi *CpARF2* a *CpEIL1* (angl. *ethylene-insensitive3-like1*) během regulace zrání plodů. Tento fenomén podal důkaz o funkčním propojení auxinové a etylénové signalizace prostřednictvím ARF2. Zmíněná zjištění jsou podpořena jinou studií s použitím transgenních linií rajčat, kde nadměrnou expresí *SlARF2* došlo k rychlejšímu zrání ovoce oproti *wild-type* liniím, což naznačuje, že ARF2 má obdobnou funkci napříč rostlinnými druhy (Breitel *et al.*, 2016). Studiemi na *A. thaliana* byla prokázána antagonistická funkční integrace cytokininové a auxinové hormonální signalizace skrze ARF3, jenž je schopen přímo se vázat na promotor genu *AtIPT5* (angl. *ATP/ADP isopentenyltransferase 5*) a negativně tak regulovat jeho expresi. Enzym IPT5 je zapojen v biosyntéze cytokininů (Cheng *et al.*, 2013). Velmi zajímavým fenoménem je vliv miRNA a ta-siRNA (angl. *transacting-small interfering RNA*) na post-transkripční regulaci množství ARF transkriptů (Li *et al.*, 2016).

K výraznému propojení procesu homeostázy fosforu s auxinovou hormonální signalizací dochází rovněž prostřednictvím auxinového receptoru TIR1. Úroveň dostupnosti P_i pro rostlinu ovlivňuje expresi *TIR1* (Pérez-Torres *et al.*, 2008). Výzkumem struktury receptoru TIR1 bylo objasněno, že produkt sekvenční fosforylace *myo*-inositolu, $InsP_6$, je kofaktorem TIR1. $InsP_6$ také interaguje s JA receptorem COI1 (angl. *coronatine-insensitive 1*), což může znamenat, že $InsP_6$ funkčně integruje auxinovou a JA signalizaci (Di *et al.*, 2015).

3.4 Homeostáza fosforu u rostlin

Fosfor je esenciálním nutrientem nezbytným pro mnoho vývojových procesů rostlin od růstu po reprodukci. Jedná se o stavební kámen buněčných membrán a nukleových kyselin. Fosfor je také nezbytný při přenosu a uchování energie v organismech. Rostliny fosfor přijímají ze substrátu ve formě anorganických fosfátů (PO_4^{3-} , zk. P_i) rozpustných ve vodě (López-Bucio *et al.*, 2002; Kuo *et al.*, 2018; Ried *et al.*, 2021). Dostupnost fosfátu má velký efekt na architekturu kořenového systému. Fosfát (P_i) má přímý vliv na růst primárního kořene a také na formování kořenů laterálních (Nacry *et al.*, 2005). Rostliny ukládají získaný fosfor převodem z anorganických fosfátů do organické podoby převážně ve

formě kyseliny fytové (*myo*-inositol-1,2,3,4,5,6-hexakisfosfát, zk. InsP₆). InsP₆ se v neutrálním prostředí nachází jako polyaniont a dokáže chelatovat minerální kationty (Mg⁺², Ca⁺², Fe⁺², Zn⁺²), a proto se majoritně nachází ve formě solí, fytátů (Raboy *et al.*, 2001; Cominelli *et al.*, 2020). Místem akumulace InsP₆ v rostlinách jsou převážně semena, nebo zásobní pletiva. Na buněčné úrovni jsou místem ukládání InsP₆ vakuoly. Transport InsP₆ do vakuol přes tonoplast zajišťuje specifický přenašeč MRP (angl. *multidrug-resistance-associated protein ATP-binding cassette*) (Sparvoli *et al.*, 2015; Sashidhar *et al.*, 2020). Biosyntéza InsP₆ je možná dvěma různými metabolickými drahami, z nichž jedna je závislá a druhá nezávislá na lipidech. V obou případech je však využívána sekvenční fosforylace prekurzorů InsP₆, jež oba vznikají z glukosy-6-fosfátu (Glc6P). Bylo ukázáno, že kriticky důležitým enzymem katalyzujícím první krok při biosyntéze InsP₆, konkrétně přeměnu Glc6P na *myo*-inositol-3-fosfát, je *myo*-inositol-3-fosfát syntasa (MIPS). Rostlinné genomy mohou obsahovat od pouze jednoho *MIPS* genu (ječmen) po velké množství genových kopií (rýže, kukuřice). U lipid-dependentní dráhy je výchozím prekurzorem fosfatidylinositol a u dráhy nezávislé na lipidech se jedná o *myo*-inositol. Obě dráhy se liší svou funkcí. Dráha nezávislá na lipidech je zapojena hlavně při ukládání fosforu během vývoje obilky, zatímco lipid-dependentní drahou jsou produkovány inositoly s funkcí v buněčné signalizaci (Raboy *et al.*, 2001; Jia *et al.*, 2019). Podstatou sekvenční fosforylace v rámci lipid-nezávislé dráhy jak ji popisuje Raboy, (2009) je postupné přidávání funkční skupiny -PO₃H₂ enzymaticky katalyzovanou reakcí s -OH skupinami inositolů a může být vyjádřena následovně: Ins → Ins(3)P₁ → Ins(3,4)P₂ → Ins(3,4,6)P₃ → Ins(1,3,4,6)P₄ → Ins(1,3,4,5,6)P₅ → Ins(1,2,3,4,5,6)P₆. Obecně jsou inositol polyfosfáty (InsP_x) důležitými eukaryotickými signálními molekulami, které jsou téměř všudypřítomné jak u rostlin, tak u živočichů a jsou zapojeny ve velkém množství buněčných procesů. Jmenovitě se jedná např. o regulaci energetické bilance, hormonální signalizaci nebo odpovědi na biotický či abiotický stres. Ins(1,4,5)P₃ je druhým poslem úzce spjatým s uvolňováním Ca⁺² a hraje tak důležitou roli v buněčné signalizaci. Později bylo zjištěno, že InsP₆ má obdobnou funkci (Dong *et al.*, 2019). Biosyntéza InsP₃ zahrnuje sekvenční fosforylaci fosfatidylinositolu (PtdIns) specifickými lipid-dependentními kinasami za vzniku fosfatidylinositol-4-fosfátu (PtdInsP) a poté fosfatidylinositol-4,5-bisfosfátu (PtdInsP₂), který je dále hydrolyzován fosfolipasou C (PLC). Hydrolyza PtdInsP₂ poskytuje dva důležité druhé posly: InsP₃ a diacylglycerol (DAG) (Ju Im *et al.*, 2010; Jia *et al.*, 2019; Laha *et al.*, 2021). InsP₃ nepřímě ovlivňuje transdukcí auxinového signálu prostřednictvím kontroly auxinových PIN transportérů. Bylo zjištěno, že koncentrace intracelulárního InsP₃ se zvyšuje při odpovědi na různé environmentální stresy (slabé kyseliny, H₂O₂ nebo světlo). Tato zjištění mohou tedy naznačovat zapojení InsP₃ v pH a ROS signalizaci (Di *et al.*, 2015). Signalizační kaskáda inositol polyfosfátů obecně reaguje na stres a nabízí úzké propojení s fytohormonální signalizací, převážně skrze ABA (Jia *et al.*, 2019). Sekvenční fosforylace InsP₃ poskytuje další inositol polyfosfáty: InsP₄, InsP₅ a InsP₆. V rámci živočišných buněk byla popsána funkce InsP₄ a InsP₅ v buněčné signalizaci (Shears *et al.*, 2012), ale u rostlin není jejich funkce plně vysvětlena. U rostlin je však známo, že InsP₅ je kofaktorem COI1, moduluje JA signaling během obranných reakcí rostlin (Mosblech *et al.*, 2011).

Narušení biosyntézy InsP_6 vede k jejímu sníženému množství, které je spojeno se zvýšenou koncentrací P_i . Tohoto faktu je využíváno při vývoji transgenních linií obilovin se sníženým obsahem InsP_6 (angl. *low-phytic acid lines*, zk. *lpa*) a v zásadě mohou být za tímto účelem použity dva základní konvenční přístupy. První zahrnuje klasickou mutagenesi zapříčiňující výpadek funkce některého z enzymů biosyntézy InsP_6 (Larson *et al.*, 1998). Druhý využívá nadměrnou expresi fytas, enzymů, které InsP_6 štěpí (Holme *et al.*, 2012; Belgaroui *et al.*, 2018). Inovativním přístupem je snižování expresních profilů vybraných *ITPK* genů, které má za následek zvyšování hladin P_i např. pomocí RNA-interference (Karmakar *et al.*, 2020; Sengupta *et al.*, 2021) nebo inaktivací *ITPK* genu systémem CRISPR/Cas9 (Vlčko *et Ohnoutková*, 2020).

InsP_6 může být dále fosforylován za vzniku vysokoenergetických inositol pyrofosfátů. Fosforylace InsP_6 je u rostlin zprostředkována inositol-1,3,4-trisfosfát 5/6-kinasami ITPK1 a ITPK2 za vzniku InsP_7 . ITPK1 vykazuje rovněž InsP_7 -fosfatasovou aktivitu. Rostliny dále syntetizují InsP_8 , což je zajištěno bifunkčními kinasami/fosfatasami VIH1 a VIH2 s víceméně redundantní funkcí skrze fosforylace InsP_7 jakožto prekursoru. Tyto inositol pyrofosfáty mají mnohé další funkce (Zhu *et al.*, 2019; Whitfield *et al.*, 2020; Riemer *et al.*, 2021). U rostlin bylo objeveno, že inositol pyrofosfáty jsou zapojeny v obranných reakcích proti nekrotrofním houbám, též proti herbivornímu hmyzu, modulují odolnost proti suchu a hrají podstatnou roli při regulaci vnímání nutrientů a metabolismu lipidů (Laha *et al.*, 2019). Studiemi *vip1* mutantních linií *A. thaliana*, jež provedl Laha *et al.* (2020), bylo zjištěno, že InsP_7 umocňuje interakci auxinového ko-receptoru AFB1 s proteiny IAA5, IAA7 a IAA8, což znamená, že InsP_7 ovlivňuje auxinovou signalizaci.

Za účelem udržování homeostázy P_i v buňkách se u rostlin vyvinul sofistikovaný systém vnímání a signalizace dostupnosti P_i . Avšak navzdory tomu, že již bylo identifikováno mnoho proteinů, které hrají roli v homeostáze P_i , přesný mechanismus signalizace P_i zůstává dosud u komplexních organismů, jakými rostliny bezesporu jsou, velkou neznámou. V rámci *A. thaliana* MYB transkripční faktory PHR1 (angl. *phosphate starvation response 1*) a blízký paralog PHL1 (angl. *PHR1-like1*) kontrolují expresi mnoha PSI (angl. *P_i starvation-induced*) genů. PSI geny regulují vývojové a metabolické procesy rostlin spjaté s deficiencí P_i (Riemer *et al.*, 2021). Tyto geny ve svých promotorech obsahují imperfektní palindromickou sekvenci, *cis*-element GNATATNC, na který se PHR proteiny vážou a spouští tak jejich expresi. Bylo nalezeno spoustu orthologů genu *PHR1* napříč říší rostlin (Bari *et al.*, 2006; Dong *et al.*, 2019). Modelovým příkladem PSI genů jsou geny pro fosfátové transportéry, které jsou po navázání PHR na jejich promotory exprimovány, což v konečném důsledku vede ke zvýšení příjmu externího P_i (Ruan *et al.*, 2019). Přibývající důkazy nasvědčují, že napříč různými druhy rostlin je aktivita transkripčních faktorů PHR1 a PHL1 post-translačně negativně regulována SPX proteiny. Ty dostaly své jméno po specifické stejnojmenné doméně, kterou obsahují. V rámci rostlin existují čtyři SPX podrodiny, jmenovitě se jedná o SPX-EXS (zkratka EXS po angl. *S. cerevisiae* Erd1, savčí Xpr1 a *S. cerevisiae* Syg1), SPX-MFS (angl. *major facilitator superfamily*), SPX-RING (angl. *really interesting new gene*) a konečně SPX, které obsahují pouze SPX doménu (Ruan *et al.*, 2019). Tyto SPX proteiny

interagují s unikátním motivem tzv. svinuté cívkou (angl. *coiled-coil*) lokalizovaným na PHR1, čímž je kontrolován stav oligomerizace a DNA-vazebná aktivita PHR1 (Ried *et al.*, 2021). U *A. thaliana* se vyskytují čtyři členové této podrodiny: *AtSPX1–AtSPX4*, ale v rámci rýže jich existuje až šest: *OsSPX1–OsSPX6* (Ruan *et al.*, 2019). Bylo zjištěno, že SPX proteiny obsahují klasické vazebné místo pro InsP_6 . Studie na *O. sativa* ukázala, že interakce *OsPHR2* a *OsSPX4* byla stabilizována přítomností InsP_7 (Wild *et al.*, 2016). Studiemi na *A. thaliana* bylo potvrzeno, že interakce SPX1 a PHR1 je stabilizována vazbou P_i , InsP_6 a inositol pyrofosfátů, přičemž jejich vazebnou afinitu ke komplexu PHR1-SPX1 lze vyjádřit následovně: $\text{P}_i < \text{InsP}_6 < \text{InsP}_7 < \text{InsP}_8$. Intracelulární hladina InsP_8 navíc pozitivně korelovala s koncentrací P_i . To souhlasí se zjištěním, že u dvojitého mutantu *A. thaliana vih1 vih2* neschopného tvořit InsP_8 byla interakce SPX1 a PHR1 snížena ve srovnání s *wild-type* linií. Tato pozorování jsou důkazem, že InsP_6 , více však inositol pyrofosfáty (InsP_7 , InsP_8) hrají důležitou roli při regulaci vnímání dostupnosti P_i a expresi PSI genů (Dong *et al.*, 2019).

Při syntéze inositol polyfosfátů je zapojeno mnoho různých kinas. Inositol 1,3,4-trisfosfát 5/6 kinasy (ITPK) náleží do velké rodiny ATP-vazebných proteinů, vazba ATP je možná díky existenci štěrbiny ve struktuře těchto enzymů vytvořené mezi β -skládaným listem centrální domény a C-terminální doménou. K vazbě ATP dochází za účelem přenosu P_i skupiny na vybraný substrát, což je podstatou kinasové aktivity (Stiles *et al.*, 2008; Tang *et al.*, 2013). ITPK jsou evolučně konzervované a vyskytují se napříč různými organismy od živočichů po rostliny. ITPK jsou klíčové enzymy zapojené při fosforylaci $\text{Ins}(1,3,4)\text{P}_3$ za vzniku $\text{Ins}(1,3,4,5)\text{P}_4$ nebo $\text{Ins}(1,3,4,6)\text{P}_4$. V některých případech katalyzují také fosforylaci $\text{Ins}(1,3,4,6)\text{P}_4$ za vzniku $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$ a rovněž vykazují zpětnou $\text{Ins}(1,3,4,5,6)\text{P}_5$ -fosfatasovou aktivitu. Enzymatická katalýza těchto reakcí v rámci dráhy nezávislé na lipidech je již delší dobu dobře známá (Suzuki *et al.*, 2007; Jiang *et al.*, 2019b; Zong *et al.*, 2022). Pozdější studie potvrdily, že ITPK u vyšších rostlin mají také InsP_6 -kinasovou aktivitu, kdy vzniká z InsP_6 inositol pyrofosfát 5- InsP_7 , což je důležité hned z několika důvodů. InsP_7 interaguje s funkčně rozmanitými proteiny skrze unikátní způsob kovalentní modifikace zvaný pyrofosforylace, navíc InsP_7 slouží jako prekurzor pro syntézu InsP_8 . Aktivita ITPK je podmíněna poměrem ADP/ATP, který úzce souvisí s energetickou bilancí. Při nedostatku ATP se uplatňuje InsP_5 -fosfatasová aktivita, zatímco při nadbytku je upřednostněna aktivita InsP_6 -kinasová (Zong *et al.*, 2022). ITPK nejsou zapojeny pouze v homeostáze fosforu, ale také v mnoha dalších procesech jako jsou reakce na abiotický stres (salinita, sucho) v úzkém provázání s ABA signalizací. Bylo zjištěno, že pomocí ABA signalizace je kontrolována exprese mnoha genů podílejících se na syntéze InsP_6 (Aggarwal *et al.*, 2015).

Klastr ITPK proteinů lze rozdělit do tří základních fylogenetických skupin α , β a γ . V rámci *A. thaliana* (Sweetman *et al.*, 2007) a sóji (*Glycine max* L.) (Stiles *et al.*, 2008) byly nalezeny čtyři různé ITPK geny. Až šest ITPK genů bylo nalezeno u rýže (*O. sativa*) (Jiang *et al.*, 2019b) a pšenice (*Triticum aestivum*) (Bhati *et al.*, 2014), doposud minimálně tři u fazolu (*Phaseolus vulgaris* L.) (Fileppi *et al.*, 2010), ale pouze jeden u kukuřice (*Zea mays*) (Shi *et al.*, 2003). Genom ječmene (*Hordeum vulgare* L.)

obsahuje podobně jako je tomu u rýže šest genů pro různé ITPK, přičemž tři z nich neobsahují introny, jmenovitě *HvITPK1*, *HvITPK4* a *HvITPK5*. Zbylé tři geny *HvITPK2*, *HvITPK3* a *HvITPK6* obsahují 10 nebo 12 intronů (Vlčko *et Ohnoutková*, 2020). U rýže vykazovaly *OsITPK4* a *OsITPK6* specifickou expresi v semenech, přičemž *OsITPK4* se hojně vyskytoval v aleuronu a *OsITPK6* více v embryu (Tang *et al.*, 2013). *OsITPK* kinasy jsou pravděpodobně zapojeny v mnoha procesech, ale zatím zůstávají detailní funkce jednotlivých *OsITPK* víceméně neznámé. Niu *et al.* (2008) uvádí, že gen *OsITL1*, kódující *OsITPK1*, negativně reguluje reakce rostlin vůči osmotickému stresu. Umlčováním *OsITPK2* pomocí RNA-interference bylo dosaženo zvýšení intracelulárního P_i a minerálních látek a u *OsITPK1* bylo stejným způsobem dosaženo snížení obsahu $InsP_6$. Bylo zjištěno, že *OsITPK2* je exprimován hojně v embryu, málo však v endospermu (Karmakar *et al.*, 2020; Sengupta *et al.*, 2021). *OsITPK2* deficientní mutanti rýže při nedostatku vody akumulují významně nižší množství osmolytů, např. rozpustných cukrů či prolinu, než *wild-type* linie. Expres *OsITPK4* je intenzivně zvýšena teplotním stresem (chladem i horkem), zatímco expres *OsITPK6* se zvyšuje pouze nadměrným zvýšením teploty (Du *et al.*, 2011). Mutace *OsITPK6* narušuje růst rostlin a syntézu $InsP_6$ (Jiang *et al.*, 2019b). Analýza genové exprese *ITPK* uskutečněná ve studii Vlčko *et Ohnoutková* (2020) poodhalila expresní profil a nastínila funkční zapojení *ITPK* orthologů ječmene (*Hordeum vulgare* L.) v obraných reakcích na salinitu. Při kontrolních podmínkách byla expres *HvITPK1* intenzivnější v listech než v kořenech u WT linie. Avšak při zvýšení salinity se expres *HvITPK1* v kořeni WT linie zvýšila a naopak v listech došlo k významnému snížení exprese. Tato skutečnost společně s faktem, že *HvITPK1* obsahuje v promotoru velké množství regulačních a vazebných elementů, může poukazovat na zapojení *HvITPK1* v reakcích na abiotický stres. Paradoxem ovšem bylo, že v rámci všech testovaných *HvITPK1* deficientních linií ječmene neměla tato mutace vliv na zvýšení obsahu P_i . V reakcích na salinitu byla rovněž zvýšená expres *HvITPK2* a *HvITPK5* v kořeni u WT i v rámci mutantů *itpk1-2* a *itpk1-33*. Na rozdíl od ostatních *ITPK* genů, *HvITPK3* nevykazoval v kořeni WT nebo mutantních linií signifikantní zvýšení exprese v reakci na salinitu. U sóji je *GmITPK1* kandidátní gen pro tvorbu transgenních linií sóji se sníženým obsahem $InsP_6$ a *GmITPK2* je pravděpodobně zapojen v reakcích na dehydrataci či salinitu. *GmITPK3* vykazovala vysokou expresi během ranného stádia vývoje semen oproti ostatním *GmITPK* a tento enzym náleží do podskupiny β . U kukuřice jediný *ITPK* gen, *ZmIPK* (podskupina α), vykazoval specifickou expresi v emryu a *ZmIPK* deficientní mutanti vykazovali *lpa* fenotyp (Sparvoli *et Cominelli*, 2015). *ZmITPK1* vykazuje $InsP_x$ -kinasovou aktivitu a je obdobně jako je tomu u jiných druhů rostlin zapojena při biosyntéze $InsP_6$ (Jiang *et al.*, 2019b). V rámci *A. thaliana* náleží *AtITPK1* do α podskupiny, *AtITPK2* a *AtITPK3* do β podskupiny a *AtITPK4* do γ podskupiny. Jednotlivé *AtITPK* geny jsou exprimovány v odlišných pletivech, ale žádný z nich není exprimován v šešulích (Sweetman *et al.*, 2007). Byli izolováni mutanti *A. thaliana itpk1* a *itpk4* vykazující *lpa* fenotyp a bylo zjištěno, že funkce těchto kinas pravděpodobně nejsou redundantní. Je známo, že *AtITPK4* postrádá $Ins(3,4,5,6)P_4$ -kinasovou aktivitu, ale naopak vykazuje $Ins(1,4,5,6)P_4$ a $Ins(1,3,4,5)P_4$ isomerasovou aktivitu, což je zásadní rozdíl oproti ostatním *ITPK*. *AtITPK1* je zapojena ve fotomorfogenezi při červeném světle

prostřednictvím interakce s COP9 signalosomem. Mutant *Atitpk1* vykazuje krátký hypokotyl během růstu při osvětlení červeným světlem obdobně jako *csn* mutanti (Qin *et al.*, 2005; Jiang *et al.*, 2019b). *AtITPK1* společně s jiným enzymem, inositol pentakisfosfát 2-kinasou 1 (*AtIPK1*), moduluje funkci integraci SA-dependentních obranných reakcí a odpovědi na nedostatek P_i , přičemž *AtITPK1*, *AtIPK1* a *AtVIH2* zde figurují jako negativní regulátory SA signalizace (Gulabani *et al.*, 2022; Riemer *et al.*, 2022). Za podmínek nadbytku P_i je *AtITPK1* nepostradatelná pro jeho ukládání. *Atitpk1* mutanti obsahují oproti WT liniím signifikantně méně $InsP_6$ a $InsP_7$, což naznačuje intenzivní zapojení v P_i signalingu (Kuo *et al.*, 2018; Jiang *et al.*, 2019b; Riemer *et al.*, 2021). *AtITPK1* má významnou roli během vývojových procesů spjatých s auxinovou signalizací. Laha *et al.* (2020) zjistil, že u *itpk1* mutantů nedošlo k narušení biosyntézy či transportu auxinu, jelikož koncentrace auxinu v listech a kořenech stejně tak polární transport se signifikantně nelišily v porovnání s WT linií. Vysvětlením je, že *itpk1* mutanti jsou neschopni transdukce auxinového signálu. Tyto defekty auxinové signalizace korelují se změnami homeostázy $InsP_x$. Laha *et al.* (2020) dále uvádí, že *AtITPK1* může interagovat s auxinovým ko-receptorem TIR1 *in vivo*. *AtITPK2* zodpovídá za normální vývoj osemení a tvorbu lipidové polyesterové bariéry a jeho exprese může být indukována ABA signalizací nebo nedostatkem P_i (Tang *et al.*, 2013). Nedávná studie potvrdila, že *AtITPK4* oproti ostatním *AtITPK* postrádá také $InsP_6$ -kinasovou aktivitu (Whitfield *et al.*, 2023). Bylo prokázáno, že *AtITPK4* deficientní mutanti vykazují obdobně jako *Atitpk1* významný pokles hladin $InsP_6$ a $InsP_7$, ale vzájemně se liší fenotypem (Jiang *et al.*, 2019b). Bylo však ukázáno, že pouze *AtITPK1* a *AtITPK2* nikoli *AtITPK3* a *AtITPK4* disponují $InsP_6$ -kinasovou aktivitou (Laha *et al.*, 2019).

3.5 Pleiotropní vliv COP9 signalosomu na fyziologii rostlin

COP9 signalosom (CSN) je evolučně konzervovaný proteinový komplex, který ovlivňuje mnoho aspektů vývoje rostlin (Singh *et Chamovitz*, 2019). Z hrubého výčtu těch nejdůležitějších procesů u rostlin se jedná o nepřímou regulaci fotomorfogeneze (Gusmaroli *et al.*, 2005), hormonální signalizaci (Schwechheimer *et al.*, 2001), maturaci a klíčení semen (Jin *et al.*, 2018), hormonální obranné reakce rostlin (Feng *et al.*, 2003), homeostázu fosforu (Walia *et al.*, 2021), ale rovněž je zapojen v epigenetické regulaci (Tuller *et al.*, 2019), regulaci buněčného cyklu v G_2 fázi (Dohmann *et al.*, 2008b) a dokonce hraje roli v DNA opravných mechanismech (Halimi *et al.*, 2011).

COP9 signalosom je tvořen osmi podjednotkami CSN1–CSN8, jejichž struktura se mírně odlišuje (Schwechheimer *et Isono*, 2010). Šest podjednotek COP9 signalosomu (jmenovitě: CSN–CSN4, CSN7 a CSN8) obsahuje tzv. PCI doménu (angl. *Proteasome, COP9 signalosome and eukaryotic initiation factor 3, eIF3*) a dvě zbývající (CSN5 a CSN6) obsahují fylogeneticky starší MPN doménu (angl. *Mpr1p-Pad1p-N-terminal*). Doména PCI, bohatá na α -helixy, se ukazuje jako nezbytná pro interakce CSN podjednotek, a proto může fungovat jako lešení při sestavování COP9 signalosomu, zatímco doména MPN, obsahující strukturální motiv MPN+ s aktivitou metaloproteasy, je důležitá pro katalýzu denedylace. Obsah konkrétní domény v dané podjednotce určuje do jisté míry její funkci. Každá z CSN

podjednotek má svůj analog u podjednotek tzv. proteasomového víčka (19S regulační část proteasomu) či u eIF3, což poukazuje na společný fylogenetický původ těchto proteinů (Wei *et al.*, 2003; Mir *et al.*, 2014; Pacurar *et al.*, 2017). Podjednotka CSN1 má nezastupitelnou funkci udržování stability proteinového komplexu COP9. Kompletní ztráta CSN1 u *A. thaliana* narušuje akumulaci CSN8, disociuje CSN5 z komplexu a vede k signifikantní redukci množství CSN4 a CSN7 (Wei *et al.*, 2003). COP9 signalosom je negativním regulátorem fotomorfogeneze. Hraje ústřední roli při zprostředkování degradace celé řady regulačních proteinů zapojených ve světelné signalizaci rostlin (Gyula *et al.*, 2003). Děje se tak interakcí COP9 signalosomu s E3 ubikvitin ligasou COP1 (Suzuki *et al.*, 2002). Interakce COP9 signalosomu s COP1 je možná díky N-terminální doméně podjednotky CSN1. Bylo potvrzeno, že CSN1 je nezbytná pro akumulaci COP1 v buněčném jádře *in vivo* (Wang *et al.*, 2009a). Z toho vyplývá, že COP9 signalosom přímo ovlivňuje funkčnost COP1. Principem funkce COP1 je jeho translokace do buněčného jádra za podmínek nedostatečného osvětlení. V jádře tvoří komplex se SPA (angl. *suppressor of phyA*) a iniciuje proteasomem-zprostředkovanou degradaci transkripčních faktorů např. proteinu HY5 (angl. *elongated hypocotyl in light 5*). HY5 je pozitivním regulátorem fotomorfogeneze vázajícím se do regulačních elementů foto-responzivních genů (Kim *et al.*, 2002; Ma *et al.*, 2002; Zheng *et al.*, 2013). Naopak při osvětlení v závislosti na typu světla dochází k protein-proteinové interakci PHY nebo CRY s COP1 vedoucí k inaktivaci komplexu COP1-SPA a spuštění fotomorfogeneze (Xu *et al.*, 2015; Ponnu *et al.*, 2021). Membránový protein PCC1 (angl. *Pathogen and Circadian Controlled 1*) účastní se světelné signalizace interaguje s CSN5 podjednotkou. Umlčováním *PCC1* u *A. thaliana* pomocí RNA interference došlo u rostlin k částečnému projevu skotomorfogeneze i za normálních světelných podmínek. Proto se předpokládá, že PCC1-CSN5 interakce představuje systém negativní regulace COP9 signalosomu bránící jeho komplekci a translokaci do buněčného jádra, což vede k podpoře fotomorfogeneze. Zajímavé je, že phyB je negativní regulátor exprese *PCC1*, takže funkce PCC1 v rámci fotomorfogeneze je nejspíše více spjata s kryptochromy (Mir *et al.*, 2014).

Obecný princip hormonální signalizace spočívá v degradaci klíčových transkripčních represorů, např. Aux/IAA u auxinové signalizace, DELLA u GA signalizace, či JAZ při JA-dependentních obranných reakcích rostlin. Tato degradace vedoucí k expresi responsivních genů je možná činností SCF (angl. *Skp1-Cullin-F-box*) ligas, které jsou podtypem Cullin-RING E3 ubikvitin ligas (CRL) (Feng *et al.*, 2003; Singh *et al.*, 2019). Rostlinné SCF ligasy představují proteinový komplex sestávající ze čtyř podjednotek, v němž se protein CUL (angl. *cullin protein*) svým C-koncem váže na E2-interagující RBX (angl. *RING box protein*), zatímco adaptorový protein SKP1 (u *A. thaliana* ASK1) zajišťuje vazbu mnohých proteinů skupiny FBP (angl. *F-box proteins*) k N-konci CUL. Prostřednictvím proteinů FBP dochází k označování cílových proteinů Ub, aby mohly tyto označené proteiny být vzápětí degradovány proteasomem (Peng *et al.*, 2001; Huang *et al.*, 2013). Pro správnou funkci CRL ligas je zapotřebí procesu neddylace, v odborné literatuře mnohdy uváděn pod synonymním názvem rubylace, který

zahrnuje kovalentní připojení proteinu RUB/NEDD8 na CUL podjednotku. Neddylací zajišťují enzymy AXR1, ECR1, a RCE1 a opačný proces, deneddylací (derubylací), zprostředkovává COP9 signalosom prostřednictvím CSN5 podjednotky, metaloproteasy se zinkem jako kofaktorem (Wei *et al.*, 2003; Dohmann *et al.*, 2008a). Deneddylací COP9 signalosom kontroluje aktivitu SCF ligasy a mění tak stabilitu transkripčních represorů. Tímto způsobem ovlivňuje mnoho vývojových procesů spjatých s hormonální signalizací u rostlin. Příkladem je ligasa SCF^{TIR1/AFB} figurující v auxinové signalizaci. Proces deneddylace vede k inaktivaci SCF^{TIR1/AFB} a zvyšuje stabilitu Aux/IAA. RNA umlčování CSN5 podjednotky vedlo k narušení a poklesu auxinové signalizace. Tento paradox je vysvětlován faktem, že deneddylační aktivita CSN5 podjednotky COP9 signalosomu v nepřítomnosti substrátů CUL ligasy chrání jejich CUL podjednotky před sebe-ubikvitinací a následnou degradací (Schwechheimer *et al.*, 2001; Singh *et al.*, 2019; Walia *et al.*, 2021). Podjednotka CSN5 je kódována dvěma homologními geny *CSN5A* a *CSN5B*, které mají nerovný vliv na regulaci vývoje rostlin a auxinový signaling. T-DNA inzerční mutanti *csn5a-1* a *csn5a-2* *A. thaliana* vykazovali rezistenci k vnímání auxinu, zatímco *csn5b-1* byli auxin-senzitivní (Dohmann *et al.*, 2005; Pacurar *et al.*, 2017). Auxinová signalizace byla narušena i v rámci CSN1, CSN2 a CSN3 deficientních mutantů *A. thaliana* (Zhang *et al.*, 2008; Stuttmann *et al.*, 2009; Huang *et al.*, 2013). Avšak vnímání auxinu bylo jen částečně negativně ovlivněno u CSN4 deficientního mutantu *A. thaliana*, kde došlo k poklesu tvorby adventivních kořenů. U mutantů *csn3-3*, *csn6a-1* a *csn6b-1* nebyla narušena deneddylační aktivita, což je zásadní rozdíl oproti mutacím ostatních podjednotek (Gusmaroli *et al.*, 2007; Huang *et al.*, 2013; Pacurar *et al.*, 2017). COP9 signalosom má schopnost stabilizovat také DELLA proteiny deneddylací ligasy SCF^{SLY1} zodpovídající za jejich degradaci. F-box protein SLY1 v tomto komplexu funguje jako GA receptor. DELLA proteiny interagují s PIFs a zamezují jejich navázání na promotory genů, což vede k inhibici skotomorfogeneze při absenci GA (Feng *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2009b). COP9 signalosom je rovněž zapojen v ET a ABA signalizaci (Christians *et al.*, 2008; Jin *et al.*, 2018). JA a SA se v rostlinách hromadí v reakci na abiotický či biotický stres a jedná se o látky protektivního charakteru, např. při obraně rostlin před herbivory. COI1 je hlavním JA receptorem a je součástí ligasy SCF^{COI1}, jejíž aktivita je rovněž kontrolována COP9 signalosomem. Jejich vzájemná součinnost je při obranných reakcích rostlin nezbytná. SCF^{COI1} při signalizaci JA zprostředkuje polyubikvitinaci a následnou degradaci represorů transkripce z rodiny JAZ (angl. *jasmonate ZIM-domain*) proteinů za pomoci proteasomu, což vede ke spuštění exprese celé řady obranných genů. COP9 signalosom je pozitivním regulátorem exprese cílových genů JA-dependentní dráhy, ale naopak negativním regulátorem exprese genů SA-dependentní obranné dráhy. Tento fakt je vysvětlován důležitostí COP9 signalosomu při syntéze JA, ne však při syntéze SA (Feng *et al.*, 2003; Hind *et al.*, 2011).

Imunoprecipitační experimenty u *A. thaliana* ukázaly, že podjednotky CSN1 a CSN2 jsou schopny interagovat s inositol 1,3,4-trisfosfát 5/6-kinasou 1 (ITPK1) (Sun *et al.*, 2002; Qin *et al.*, 2005) a podjednotky CSN1, CSN2, CSN4, CSN5 vykazují interakci s inositol pentakisfosfát 2-kinasou 1

(IPK1) (Walia *et al.*, 2021). ITPK1 a IPK1 jsou enzymy zapojené v sekvenční fosforylaci *myo*-inositolu vedoucí ke vzniku inositol polyfosfátů (InsP) s funkcí v homeostáze fosforu (Kuo *et al.*, 2018). Účinnost dennedylace CUL podjednotkou CSN5 může být regulována skrze enzymy IPK1 a ITPK1 a tato regulace se odvíjí od dostupnosti fosforu. Zmíněná skutečnost poukazuje na zapojení CSN5 v P_i-homeostáze. Detailním vysvětlením tohoto procesu je schopnost těchto kinas ovlivňovat kinetiku asociace/disociace CSN5 podjednotky COP9 signalosomu, jelikož dennedylační aktivita CSN5 je možná pouze ve chvíli, kdy je CSN5 součástí holo-komplexu (Walia *et al.*, 2021). Zapojení COP9 signalosomu v homeosáze fosforu je ještě podpořeno faktem, že CSN-deficientní mutanti *A. thaliana* vykazovali konstitutivní aktivaci PSR (angl. *phosphate-starvation responses*), tzn. odpovědi na nízkou hladinu fosforu (Gulabani *et al.*, 2022).

4 MATERIÁL A METODY

4.1 Biologický materiál

Pro účely pokusů byly používány semenáčky ječmene jarního (*Hordeum vulgare* subsp. *vulgare* L. var. GoldenPromise (GCA_902500625.1). Na základě tohoto kultivaru byly připraveny homozygotní linie *itpk1-2* s inserční (adiční) mutací +A a *itpk1-33* s deleční mutací –G v genu pro inositol-tetrakisfosfát-1-kinasu (viz Obrázek 3). V rámci této práce byly rovněž za účelem zjištění vztahu těchto dvou mutantních alel použity segregující linie generace T2 obsahující genotyp s bialelickou konstitucí +A/–G ve výše zmíněném genu, jmenovitě se jednalo o *itpk1* mutantní segregující linie T2-3B-21, T2-3B-1, T2-3B-6, T2-3B-4, T2-3B-26, T2-3B-5, T2-3B-11.

```
itpk1-33   CCGTCCCGCCCCCTCGTC--ACCAGGGGCCCTTCC
itpk1-2   CCGTCCCGCCCCCTCGTCGAAACCAGGGGCCCTTCC
WT         CCGTCCCGCCCCCTCGTCG-ACCAGGGGCCCTTCC
```

Obrázek 3: Alely ve sledovaném lokusu genu pro *ITPK1* v jednotlivých genotypech ječmene jarního.

Semenáčky jarního ječmene byly pěstovány v kultivační komoře v plastových sterilních kultivačních nádobách s ½ MS médiem obsahujícím vitamíny za permanentního osvětlení červeným světlem ($\lambda_{\max}=660$ nm) bez cyklického režimu den-noc při konstantní hodnotě celkového toku fotonů $10 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ a při stálé teplotě 23 °C vždy po dobu 10 dní. Vlhkost v komoře byla přibližně 50 ± 10 %. Semena byla skladována v suchu a temnu při pokojové teplotě.

4.2 Použité chemikálie, soupravy a roztoky

4.2.1 Použité chemikálie

- 2-merkaptoethanol (Fluka, kat. č. 63690)
- 6x DNA loading buffer (Sigma-Aldrich, kat. č. G2526)
- dNTP PCR mix, solution 10 mM (Serva, kat. č. 39712.01)
- Ethanol $\geq 99.8\%$ (VWR, kat. č. 20821.296)
- Ethidium bromid (Invitrogen, kat. č. 15585-011)
- HyperLadder™ I 1 kb (Meridian Bioscience, kat. č. BIO-33025)
- HyperLadder™ II 50 bp (Meridian Bioscience, kat. č. BIO-33039)
- Chlorid lithný, 8M, for molecular biology, $\geq 99\%$ (Sigma-Aldrich, kat. č. L7026)
- Chloroform (Sigma-Aldrich, kat. č. 32211-1L)
- Isopropanol analytical grade (Serva, kat. č. 45629.01)
- iTaq Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad, kat. č. 1725120)
- Kyselina indoly-3-octová (Sigma-Aldrich, kat. č. I-9637)

- Murashige & Skoog medium obsahující vitamíny (Duchefa Biochemie, kat. č. M0222.0050)
- NaClO (~10% RT) (Sigma-Aldrich, kat. č. 71696-2,5L)
- Paramagnetické částice Bind BBB (Beckman Coulter, kat. č. C34817)
- Paramagnetické částice SPRIselect (Beckman Coulter, kat. č. B23317)
- PCR Ultra H₂O (Top-Bio s. r. o., kat. č. P440)
- Phyto agar (Duchefa Biochemie, kat. č. P1003.1000)
- Proteinase K, recombinant PCR grade (Roche, kat. č. 11760400)
- ReadyMIX™ REDTaq® PCR Reaction MIX with MgCl₂ (Sigma-Aldrich, kat. č. R2648-20RXN)
- RNase A (ThermoFisher Scientific, kat. č. R1253)
- Sacharóza (Lach-Ner, s.r.o., kat. č. 40135-AP0)
- Tekutý dusík
- TRI REAGENT® (Sigma-Aldrich, kat. č. 93289-100mL)
- UltraPure™ Agarose (Invitrogen, kat. č. 16500-500)

4.2.2 Použité soupravy

- Maxima Reverse Transcriptase (ThermoFisher Scientific, kat. č. EP0742)
- TURBO DNA-free™ Kit (Invitrogen, kat. č. AM1907)

4.2.3 Použité roztoky

1M NaOH

1% roztok NaClO: 5ml 10% NaClO přidat do 45 ml sterilní ddH₂O. Důkladně promíchat.

Basic Lysis Buffer: Do 100 ml ddH₂O za stálého míchání přidat 20 ml 5M roztoku NaCl, dále 20 ml 1M roztoku Tris-HCl a 20 ml 0,5M roztoku EDTA. Objem doplnit ddH₂O na 200 ml. pH upravit na hodnotu 7,2.

Lyzační pufr: Do 10 ml Basic Lysis Buffer přidat 10 µl 2-merkptoethanolu, 10 µl RNasy A a 10 µl proteinasy K. Roztok připravovat vždy čerstvý.

1x TAE pufr: Do 1 l ddH₂O přidat 20 ml 50x TAE. Důkladně promíchat.

½ MS médium (pH 5,8): V ddH₂O rozpustit 2,225 g MS média s obsahem vitamínů a 15 g sacharosu, objem doplnit na 1 l. Upravit pH na 5,8 pomocí 1M NaOH. Přidat 6 g Phyto agaru. Sterilizovat autoklávováním.

50x TAE pufr (Tris-acetát-EDTA) (pH 8,5): Za stálého míchání rozpustit v ddH₂O 242 g Tris base, přidat 57,1 ml ledové kyseliny octové a 100 ml 0,5M EDTA. Doplnit ddH₂O na objem 1000 ml a upravit pH na 8,5.

20x EGTA (ethylenglykol-bis(2-aminoethylether)-N, N, N', N'-tetraoctová kyselina) o koncentraci 40 mmol.l⁻¹

4.3 Seznam použitých přístrojů a zařízení

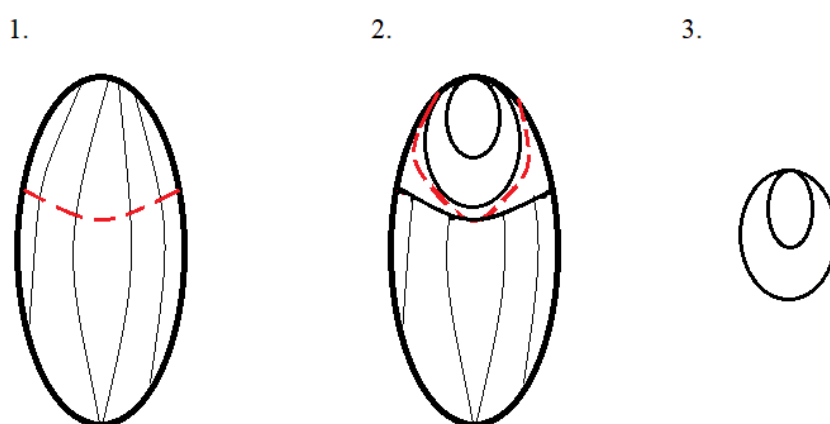
- Analytické váhy M124A (BEL Engineering)
- Binokulární stereomikroskop VisiScope® SZB250 (VWR)
- Box s laminárním prouděním HERAGUARD (ThermoFisher Scientific)
- Centrifuga FastGene® Plate (Nippon Genetics Europe)
- Centrifuga PRISM™ microcentrifuge (Labnet)
- Centrifuga s chlazením 5804R (Eppendorf)
- Digestoř M1200 (Merci)
- Dokumentační systém G:BOX (Syngene)
- Elektromagnetická míchačka Poly 15 (Variomag) s příslušenstvím
- Horizontální autokláv 3850EL (Tuttnauer)
- Horizontální elektroforetická komora Mini-Sub® CELL GT (Bio-Rad)
- Horizontální elektroforetická komora Wide Mini-Sub® CELL GT (Bio-Rad)
- Kultivační komora Microclima 1000E (Snijders Scientific) se zdrojem červeného světla: trubicemi TLD-36 W/15-Red (Phillips, USA)
- Laboratorní váhy (BOECO Germany)
- Mikrovlnná trouba (LG)
- Minicentrifuga D1008 (DLAB)
- Mrazicí box VIP ECO Ultra-Low Freezer with Natural Refrigerants (PHCBI)
- Orbitální třepačka MIXER VORTEX Wizard (Velp Scientifica)
- Orbitální třepačka Vortex V-1 plus (Biosan)
- pH metr pH7110 (VWR)
- Spektrofotometr na mikroobjem DS-11 (DeNovix)
- Sterilizátor nástrojů Stericell SC55 (BMT)
- Termální cykler CFX96 Touch™ Real-time system (Bio-Rad)
- Termální cykler T100™ Thermal-Cycler (Bio-Rad)
- Termoblok FALC analogový BIO TDB-100 (Biosan)
- UVC/T-AR DNA/RNA UV-Cleaner Box (Biosan)
- Vodní digitální lázeň SUB (Grant)
- Zdroj napětí POWERPac™ Basic (Bio-Rad)

4.4 Použité experimentální a vyhodnocovací postupy

4.4.1. Fenotypová analýza

Extirpace embryí z obilek ječmene jarního a jejich sterilizace

Před samotnou extirpací byly obilky ječmene jarního sterilizovány 1% roztokem NaClO po dobu 1,5 min v 50ml kónické zkumavce. Následovaly tři po sobě jdoucí kroky oplachování sterilní vodou po dobu 5 min. Zkumavky s obilkami ve sterilní vodě byly ponechány v temnu do dalšího dne, kdy byla embrya extirpována z obilek. Veškeré práce probíhaly ve sterilním prostředí boxu s laminárním prouděním. Použitím sterilní pinzety a skalpelu byla embrya vyňata z obilek takovým způsobem, aby nedošlo k jejich poškození a následnému snížení klíčivosti (viz Obrázek 4). Embrya byla přemístěna do 2ml mikrozukavky se sterilní vodou. Pro každý genotyp byla připravena samostatná mikrozukavka.



Obrázek 4: Schéma extirpace embrya z obilky ječmene jarního.

Embrya byla sterilizována 1% roztokem NaClO po dobu maximálně 1 min. Nakonec bylo provedeno oplachování sterilní vodou třikrát za sebou vždy v intervalu 5 min.

Optimalizace koncentrací IAA

Za účelem optimalizace vhodných koncentrací IAA pro následné experimenty byla navržena koncentrační škála. Byl připraven zásobní roztok IAA o koncentraci $1 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ (tzn. 8,76 mg IAA bylo rozpuštěno v malém množství 1M NaOH, následně doplněno sterilní vodou do 50 ml). Z výchozího zásobního roztoku IAA byla připravena sada pracovních 1000x koncentrovaných roztoků IAA (viz Tabulka 1). Do kultivačních nádob bylo připraveno tuhé kultivační $\frac{1}{2}$ MS médium bez IAA a s danou koncentrací IAA. Po ztuhnutí média bylo na povrch média umístěno sterilní pinzetou vždy 15 embryí WT jarního ječmene. Veškeré práce probíhaly výhradně v aseptických podmínkách ve sterilním boxu s laminárním prouděním. Kultivační nádoby byly umístěny do růstové komory s permanentním osvětlením červeným světlem. Po uplynutí doby kultivace 10 dní byly pravítkem změřeny délky kořenů a prýtlů jednotlivých semenáčků.

Tabulka 1: Škála jednotlivých koncentrací IAA a jejich příprava.

Číslo roztoku	Pracovní koncentrace [$\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$]	Finální koncentrace IAA v $\frac{1}{2}$ MS médiu [$\text{nmol}\cdot\text{l}^{-1}$]
1.	1000	1000
2.	750	750
3.	500	500
4.	100	100
5.	50	50
6.	10	10
7.	1	1
8.	0,75	0,75
9.	0,5	0,5
10.	0,1	0,1
11.	0,05	0,05
12.	0,01	0,01
13.	0,001	0,001

Stanovení vlivu IAA na délku kořene

Pro zjištění účinku IAA na kořeny ječmene u genotypů WT, *itpk1-2* a *itpk1-33* byly zvoleny finální koncentrace $500 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$, $1 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ a $0,001 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$. Do každé kultivační nádoby bylo umístěno 20 embryí ječmene. Experiment byl proveden ve třech opakováních. V každém opakování byla připravena varianta pokusu bez ovlivnění, s $\frac{1}{2}$ MS médiem s 500 nM IAA, s 1 nM IAA a s 0,001 nM IAA pro každý ze tří genotypů. Kultivace probíhala 10 dní v komoře s permanentním červeným světlem. Po uplynutí doby kultivace byly délky kořenů semenáčků změřeny pravítkem. Rovněž byly zhotoveny fotografie rostlin každé varianty pokusu.

4.4.2 Určení relativní změny exprese u vybraných genů

Expres byla stanovena v rámci genotypů WT, *itpk1-2* a *itpk1-33* u Aux-IAA genů: *IAA7*, *IAA11*, *IAA15*, *IAA19*, *IAA20*, *IAA27*, *IAA36*, dále u genů pro *myo*-inositol-1,3,4-trisfosfát 5/6-kinasy 1–6 (*ITPK1*–*ITPK6*) a genu pro *myo*-inositol-3-fosfát syntasu (*MIPS*).

Příprava biologického materiálu

Pro tento experiment byla embrya kultivována v $\frac{1}{2}$ MS médiu s ovlivněním 500nM IAA a bez ovlivnění. V každé kultivační nádobě bylo umístěno 15 embryí. Z kořenů semenáčků byly odstraněny zbytky kultivačního média, kořeny byly opláchnuty ve sterilní vodě a odděleny sterilním skalpelem. Byly vytvořeny směsné vzorky, u kterých kořeny 5 semenáčků daného genotypu tvořily jeden směsný vzorek. Pro každý genotyp byly připraveny dvě varianty pokusu (s ovlivněním a bez ovlivnění 500 nM IAA), které byly provedeny ve třech biologických opakováních. Směsné vzorky byly hluboce zmrazeny tekutým dusíkem a uskladněny při $-80 \text{ }^\circ\text{C}$.

Izolace celkové RNA

Byly připraveny sterilní třecí misky s tloučkem a sterilní špachtle, které byly předchlazeny tekutým dusíkem. Kořeny každého směsného vzorku byly zmrazeny tekutým dusíkem a důkladně homogenizovány. Homogenát byl špachtlí převeden do 2ml mikrozkušavky. Bezprostředně potom bylo v digestoři ke vzorku přidáno 1000 μ l reagentie TRI REAGENT. Vzorky byly inkubovány při 60 °C po dobu 30 min ve vodní lázni. Po inkubaci byly vzorky zchlazeny na ledu a promíchány. K vzorkům bylo přidáno 600 μ l chloroformu. Vzorky byly promíchány po dobu 15 s. Následně byly vzorky ponechány při pokojové teplotě po dobu 5 min. Vzorky byly centrifugovány při 10000 xg za teploty 4 °C po dobu 10 min. Po centrifugaci byla odebrána vzniklá vrchní vodná fáze s RNA do nových 1,5ml mikrozkušavek. Byl přidán isopropanol (0,6 objemu přenesené vodné fáze). Vzorky byly krátce promíchány a poté inkubovány při 4 °C po dobu 60 min. Po inkubaci byly vzorky centrifugovány při 20000 xg za teploty 4 °C po dobu 30 min. Vzniklý supernatant byl odebrán a k peletu bylo pipetováno 1000 μ l 70% ethanolu. Vzorky byly opět centrifugovány při 20000 xg za teploty 4 °C po dobu 10 min. Supernatant byl odebrán a pelet byl vysušen umístěním mikrozkušavek do horizontální polohy v boxu s laminárním prouděním po dobu 30–60 min. Bylo přidáno 60 μ l ddH₂O bez RNas. Pro účinnější rozpuštění RNA byly vzorky inkubovány při 55 °C po dobu 10 min v termobloku. Nakonec proběhla kontrola kvality izolované celkové RNA separací horizontální gelovou elektroforézou v 1% agarósovém gelu s následnou vizualizací v UV-transiluminátoru. Gel byl zhotoven smícháním 40 ml 1x TAE pufru s 0,4 g agarósy a následným převařením. Po ochladnutí gelu byly pro vizualizaci RNA přidány 2 μ l roztoku EtBr. Gel byl promíchán a vlit do elektroforetické vaničky s hřebínkem. Po ztuhnutí byl gel přenesen do elektroforetické komory a do jamek byly nanесeny po řadě marker molekulové hmotnosti HyperLadder I a vzorky RNA. Elektroforetická separace probíhala při konstantním napětí 80 V.

Ošetření vzorků RNA pomocí DNasy

K vzorkům RNA bylo pipetováno 1/10 objemu reakce 10x DNase Buffer a 1 μ l DNasy o koncentraci 2 U/ μ l. Vzorky byly promíchány pipetováním a inkubovány při teplotě 37 °C po dobu 60 min ve vodní lázni. Inaktivace DNasy byla provedena přidáním 3,3 μ l 20x EGTA o koncentraci 40 mmol·l⁻¹ (tzn. 1/20 objemu reakce) ke vzorkům a inkubaci vzorků při teplotě 65 °C po dobu 10 min ve vodní lázni. Vzorky RNA byly skladovány do dalšího dne při -80 °C.

Purifikace vzorků RNA pomocí roztoku LiCl

Ke vzorkům RNA bylo přidáno 1/2 objemu reakce roztoku chloridu lithného a reakční směs byla promíchána. Vzorky byly inkubovány při teplotě -20 °C po dobu 90 min. Vzorky byly centrifugovány při 14000 ot/min při 4 °C. Supernatant byl odebrán a k peletu bylo pipetováno 1000 μ l 70% ethanolu a následovala centrifugace při 14000 ot/min a při teplotě 4 °C po dobu 15 min. Vzniklý supernatant byl odebrán a pelet byl vysušen umístěním mikrozkušavek do horizontální polohy v boxu s laminárním prouděním po dobu 30–60 min. K peletu bylo přidáno 40 μ l ddH₂O bez RNas a objem byl lehce

promíchán pipetováním. Koncentrace a kvalita RNA jednotlivých směsných vzorků byla stanovena spektrofotometriky.

Reverzní transkripce z RNA do cDNA

Do nových sterilních 1,5ml mikrozkušavek byl pipetován 1 μ l Oligo(dT)₁₂₋₁₈ o koncentraci 500 μ g/ml. Z každého vzorku RNA bylo pro přepis připraveno 2000 ng RNA. Objem byl doplněn sterilní ddH₂O na 12 μ l. Následovala inkubace vzorků při teplotě 65 °C po dobu 5 min a následné okamžité zchlazení na ledu minimálně 1 min. V další fázi byly přidány 4 μ l 5x Reverse Transcriptase Buffer, 1 μ l dNTPs a 1 μ l reverzní transkriptasy. Reakční směs byla promíchána pipetováním. V dalším kroku proběhla inkubace vzorků při 50 °C po dobu 60 min ve vodní lázni. Reverzní transkriptasa byla inaktivována zahřátím vzorků na teplotu 70 °C po dobu 15 min. Vzorky cDNA byly v nových 1,5ml mikrozkušavkách 10x zředěny ddH₂O a proběhla kontrola kvality zpětného přepisu pomocí PCR s použitím oligomerů pro housekeepingové geny *Actin2* a *EF1a*. Kontrola PCR produktů byla provedena jejich elektroforetickou separací s následnou vizualizací v UV transiluminátoru.

Detekce cDNA transkriptů

Připravené vzorky cDNA byly použity k PCR. Kontrola PCR produktů proběhla jejich elektroforetickou separací v 1,5% agarósovém gelu barveném EtBr s následnou vizualizací v UV transiluminátoru. Pro každý studovaný gen byl nejprve vytvořen mix pro daný gen (viz Tabulka 2) v potřebném objemu dle množství vzorků. Finální objem reakce včetně templátu, kterým byly vzorky cDNA, činil 10 μ l pro jeden vzorek. Pro studium exprese každého genu byly zahrnuty vzorky 3 genotypů bez ovlivnění + 3 genotypů s ovlivněním 500 nM IAA, NTC kontrola (angl. *non-template control*) a pozitivní kontrola pro daný gen. Tato analýza byla provedena pro svou časovou náročnost a předpokládanou nižší přesnost pouze u jedné z logických sérií směsných vzorků. Teplotní profil PCR reakce je možné nalézt v Tabulce 3. Sekvence používaných oligomerů pro dané studované geny jsou uvedeny v Tabulce 4. Po PCR byla provedena horizontální gelová elektroforéza v 1,5% agarósovém gelu.

Tabulka 2: Složení reakčního mixu pro PCR.

Reagencie	1 reakce [μ l]	Pracovní koncentrace	Finální koncentrace
ddH ₂ O	3,5	-	-
ReadyMix	5	2x	1x
primer F	0,25	10 μ mol/l	0,25 μ mol/l
primer R	0,25	10 μ mol/l	0,25 μ mol/l
templát cDNA	1	-	-
Celkový objem	10		

Tabulka 3: Teplotní profil PCR reakce.

Fáze	Teplota [°C]	Časový interval	Počet cyklů
počáteční denaturace	95	3 min	1
denaturace	95	15 s	40
hybridizace oligomerů	60	20 s	
elongace	72	30 s	
finální elongace	72	5 min	1
chlazení	12	∞	

Tabulka 4: Seznam použitých sekvencí oligomerů u zájmových genů.

Název genu	ID genu HORVU.MOREX.	Sekvence oligomerů		Délka amplikonu [bp]
		Forward (5'→3')	Reverse (5'→3')	
<i>HvIAA7</i>	r2.2HG0176090.1	TGTATTCTGTCGACAGGGAGA	AGGAAAGGTAACGTGGATCATT	149
<i>HvIAA11</i>	r2.3HG0207490.1	GTGTGGGAGCAGGAGAAAC	TTCACACGGTTCCTTCCAATAG	151
<i>HvIAA15</i>	r2.3HG0260900.1	GCTCCCAACAGTTCCGAAAGA	CTCAGCAGTGAGTTCGTCATAG	144
<i>HvIAA19</i>	r2.5HG0360080.1	CCATGTTCTCTGGCTTCTC	CATGATCCTCAGCCTCTTGC	149
<i>HvIAA20</i>	r2.5HG0360110.1	AGCTGATGGATCTGCTCAAC	GGCCAATAGCTTCTGATCCTT	150
<i>HvIAA27</i>	r2.6HG0463500.1	TGTCAGAAGCTGCCTTTCC	GGCTGCCATTAGCTGTAGAA	147
<i>HvIAA36</i>	r2.7HG0589900.1	GCTGGAGCTTCTGTCCAAG	TCTTCTGTAACTGCGGATTG	143
<i>HvITPK1</i>	r2.7HG0548780.1	TCTTCGGCGACATGATTCGT	AACGTTGGAGGCTTCGGTAG	83
<i>HvITPK2</i>	r2.4HG0328320.1	GCTTCCTCCGAGACCACTTC	ACCGGTCATTAGCTCCAAGC	110
<i>HvITPK3</i>	r2.4HG0282650.1	ACCTTGCGGATTGTCATGGT	ACCGCAGCTGGTATTGACAA	82
<i>HvITPK4</i>	r2.1HG0063430.1	TCCAAAGCAGGTGAGAGCAG	GGCAAACGCTTGGAAAGGATC	116
<i>HvITPK5</i>	r2.1HG0041780.1	TGCTGGCTACGAGATTGTC	CTCTGCTCCTCCTCCTT	88
<i>HvITPK6</i>	r2.5HG0412200.1	TTGAAGACCCTCCAGTGGC	CGTTTTGCAGCCTCTCCAC	101
<i>HvMIPS</i>	r2.4HG0333190.1	CCCCAAGTCCGTCAACTACC	GAGTGTGGAGCCATTGTTGC	97
<i>HvActin2</i>	r2.4HG0281790.1	TCGTGAGAAGATGACCCAGA	CCGAGTCCAGCACAATACCT	122
<i>HvEF1α</i>	r2.5HG0427700.1	GAAGATGATTCCACCAAGC	TGACACCAACAGCCACAGTT	107

Stanovení exprese metodou qRT-PCR

Byly zhotoveny standardy za účelem zjištění účinnosti používaných oligomerů prostřednictvím kalibrační křivky. Standardy pro určení účinnosti oligomerů genů *ITPK1–ITPK6*, *Actin2* a *EF1α* nebyly zhotovovány, protože účinnosti jejich oligomerů byly stanoveny dříve v rámci jiných studií. Standardy byly zhotoveny PCR s použitím vzorků cDNA jako templátu. Teplotní profil, použité reagencie včetně jejich objemů a používané oligomery jsou již uvedeny v Tabulkách 2, 3 a 4. Vzniklý PCR produkt byl přečištěn pomocí paramagnetických částic (podrobný popis postupu je uveden v sekci 4.4.3). Standardy byly naředěny a byla vytvořena koncentrační škála počínající koncentrací zředěnou 10⁴x a končící koncentrací zředěnou 10¹¹x. Byl vytvořen reakční mix pro qRT-PCR (viz Tabulka 5). Celkový objem reakce byl 10 μl pro jeden vzorek. Každá koncentrace standardu byla aplikována v technickém duplikátu. Průběh qRT-PCR byl dvou krokový, přičemž první fáze zahrnovala samotnou amplifikaci a druhou fází bylo zjištění specifity PCR produktu metodou analýzy teploty tání. Teplotní profil reakce včetně analýzy teploty tání PCR produktu je znázorněn v Tabulce 6.

Tabulka 5: Příprava reakčního mixu pro qRT-PCR.

Reagencie	1 reakce [μl]	Pracovní koncentrace	Finální koncentrace
ddH ₂ O	3,2	-	-
iTaq Universal SYBR [®] Green Supermix	5	2x	1x
primer F	0,4	10 μmol/l	0,4 μmol/l
primer R	0,4	10 μmol/l	0,4 μmol/l
templát cDNA	1	-	-
Celkem do jamky	10		

Tabulka 6: Teplotní profil qRT-PCR včetně analýzy teploty tání PCR produktu.

Fáze	Teplota [°C]	Časový interval	Počet cyklů
počáteční denaturace	95	3 min	1
denaturace	95	10 s	40
hybridizace oligomerů/ elongace	60	30 s	
analýza teploty tání	65–95	navýšení 0,5 °C každých 5 s	

Následně byly C_t hodnoty pro každou koncentrační hladinu standardu zprůměrovány a byla vytvořena kalibrační křivka. Na základě rovnice kalibrační křivky byla stanovena účinnost oligomerů pro daný gen. Po zhotovení kalibračních křivek standardů pro vybrané geny a ověření specifity produktů proběhla samotná analýza exprese u vzorků cDNA. Analýza byla provedena u 6 vzorků cDNA (3 genotypy bez ovlivnění + 3 genotypy s ovlivněním), které byly provedeny v technickém duplikátu pro každý studovaný gen, dále NTC kontrolu a pozitivní kontrolu pro daný gen. Tato analýza byla provedena u všech 3 biologických opakováních směsných vzorků. Použité reagencie a podmínky qRT-PCR jsou uvedeny v Tabulce 5 a Tabulce 6. Byly používány oligomery uvedené v Tabulce 4. Hodnoty C_t jednotlivých vzorků v duplikátu byly zprůměrovány a byla vypočtena, podle Pfafflova vzorce se zohledněním účinnosti oligomerů (viz Obrázek 5), relativní změna exprese daného genu po ovlivnění 500 nM IAA v daném opakování směsných vzorků. Výsledek změn relativní exprese genů stanovených ze směsných vzorků ve 3 biologických opakováních byl zprůměrován a uveden se směrodatnou odchylkou.

$$\text{Ratio} = \frac{(E_{\text{target}})^{\Delta C_{T, \text{target}} (\text{calibrator} - \text{test})}}{(E_{\text{ref}})^{\Delta C_{T, \text{ref}} (\text{calibrator} - \text{test})}}$$

Obrázek 5: Vzorec pro výpočet relativní změny exprese dle Pfaffla (2001).

Ve výše uvedeném Pfafflově vzorci (viz Obrázek 5) E znamená účinnost oligomerů pro daný gen. Pod pojmem cíl (angl. *target*) byly dosazeny hodnoty cílového studovaného genu a jako reference byl zvolen housekeepingový gen. Kalibrátorem (angl. *calibrator*) byly vzorky bez ovlivnění a testovací vzorky představovaly ty vzorky, které byly ovlivněny 500nM IAA.

4.4.3 Zjištění vztahu +A a –G mutantní alely genu *ITPK1*

Příprava biologického materiálu

Za účelem objasnění vztahu mutantních alel +A a –G genu *ITPK1* byly použity segregující linie generace T2, ve kterých byly hledány bílelicí mutanti s konstitucí alel +A/–G. Z každé použité mutantní linie bylo vybráno 10–25 obilíků, ze kterých byla extirpována embrya. Ta byla pěstována v ½ MS médiu stejně jako je popsáno v sekci 4.4.1. Po uplynutí doby 10denní kultivace byly vytvořeny fotografie rostlin dané mutantní linie a z každého semenáčku byly odebrány zhruba 2–3 cm listové čepele, které byly umístěny do označených sterilních 1,5ml mikrozkušavek a neprodleně potom hluboce zmrazeny pomocí tekutého dusíku.

Izolace gDNA paramagnetickými částicemi

Vzorky listů byly zmrazeny tekutým dusíkem a neprodleně homogenizovány homogenizačními tyčinkami. K vzorkům bylo pipetováno 300 µl lyzačního pufru. Obsah byl promíchán. Vzorky byly inkubovány ve vodní lázni při teplotě 60 °C po dobu minimálně 20 min. Vzorky byly centrifugovány při 13000 ot/min po dobu 1,5 min. Do nových označených sterilních 1,5ml mikrozkušavek bylo pipetováno 10 µl roztoku paramagnetických částic, 100 µl supernatantu a 80 µl isopropanolu. Celý obsah byl promíchán pipetováním a vzorky byly ponechány k inkubaci při pokojové teplotě po dobu 5 min. Následovalo umístění vzorků do magnetického pole magnetu na dobu 5 min do vyčištění roztoku. Supernatant byl odstraněn a mimo magnet bylo pipetováno 100 µl 70% ethanolu za účelem promytí vzorků. Vzorky byly opět umístěny na magnet na dobu 5 min do vyčištění roztoku a poté byl opět odstraněn supernatant (tento promývací krok byl opakován 3x). Mikrozkušavky s pelety byly poté ponechány v horizontální poloze v boxu s laminárním prouděním. Po vysušení bylo mimo magnet k peletu přidáno 30 µl sterilní ddH₂O bez DNAs. Pelet byl promíchán s vodou. Vzorky byly umístěny na magnet na dobu 5 min do vyčištění roztoku a poté bylo odebráno 25 µl vzorku do nových označených sterilních 1,5ml mikrozkušavek. Byla stanovena koncentrace a kvalita dsDNA. Vzorky DNA byly skladovány při –20 °C.

PCR, purifikace PCR produktů a Sangerovo sekvenování

Byl připraven reakční PCR mix. Použité reagentie pro PCR mix a jejich objemy jsou uvedeny v Tabulce 2. Celkový objem reakce pro 1 vzorek činil 20 µl. Pro amplifikaci byly použity oligomery amplifikující část sekvence genu *ITPK1* obsahující mutaci. Sekvence oligomerů a velikost PCR produktu jsou uvedeny v Tabulce 7. Teplotní profil PCR reakce je uveden v Tabulce 8.

Tabulka 7: Sekvence použitých oligomerů vhodných k sekvenování.

Název genu	ID genu HORVU.MOREX.	Sekvence oligomerů		Délka ampliconu [bp]
		Forward (5'→3')	Reverse (5'→3')	
<i>HvITPK1</i>	r2.7HG0548780.1	ACGACCTCCTCACCTACA	GGAGACGACGTCGAGCATG	301

Tabulka 8: Teplotní podmínky PCR reakce pro přípravu amplikonu k sekvenování.

Fáze	Teplota [°C]	Časový interval	Počet cyklů
počáteční denaturace	94	4 min	1
denaturace	94	20 s	37
hybridizace oligomerů	60	20 s	
elongace	72	1 min	
finální elongace	72	5 min	1
chlazení	12	∞	

Po ukončení amplifikace byly PCR produkty purifikovány. PCR produkty o objemu 20 µl byly pipetovány do nových sterilních 1,5ml mikrozkuvek obsahujících 10 µl roztoku paramagnetických částic a bylo k nim přidáno 16 µl isopropanolu. Vzorky byly umístěny na magnet na dobu 5 min do vyčištění roztoku, pak byl odstraněn supernatant. Mimo magnet bylo přidáno 100 µl 70% ethanolu. Vzorky byly nechány 5 min na magnetu do vyčištění roztoku, supernatant byl odstraněn (tento promývací krok byl opakován 3x). Mikrozkuvky s pelety byly poté ponechány v horizontální poloze v boxu s laminárním prouděním. Po vysušení bylo mimo magnet k peletu přidáno 30 µl sterilní ddH₂O bez DNas. Pelet byl promíchán s vodou. Vzorky byly umístěny na magnet na dobu 5 min do vyčištění roztoku a poté bylo 25 µl vzorku odebráno do nových sterilních 1,5ml mikrozkuvek. Celý objem byl promíchán a vzorky byly inkubovány 5 min při pokojové teplotě. PCR produkty byly zkontrolovány elektroforetickou separací s následnou vizualizací v UV transiluminátoru. Purifikované PCR produkty byly zředěny na koncentraci 1–10 ng/µl a smíchány s reverse oligomerem. Pro zjištění genotypu rostlin bylo použito Sangerovo sekvenování zprostředkované firmou Eurofins Scientific. Na základě zaslaných výstupů byly vyhodnoceny genotypy rostlin.

4.4.4 Grafické a statistické hodnocení

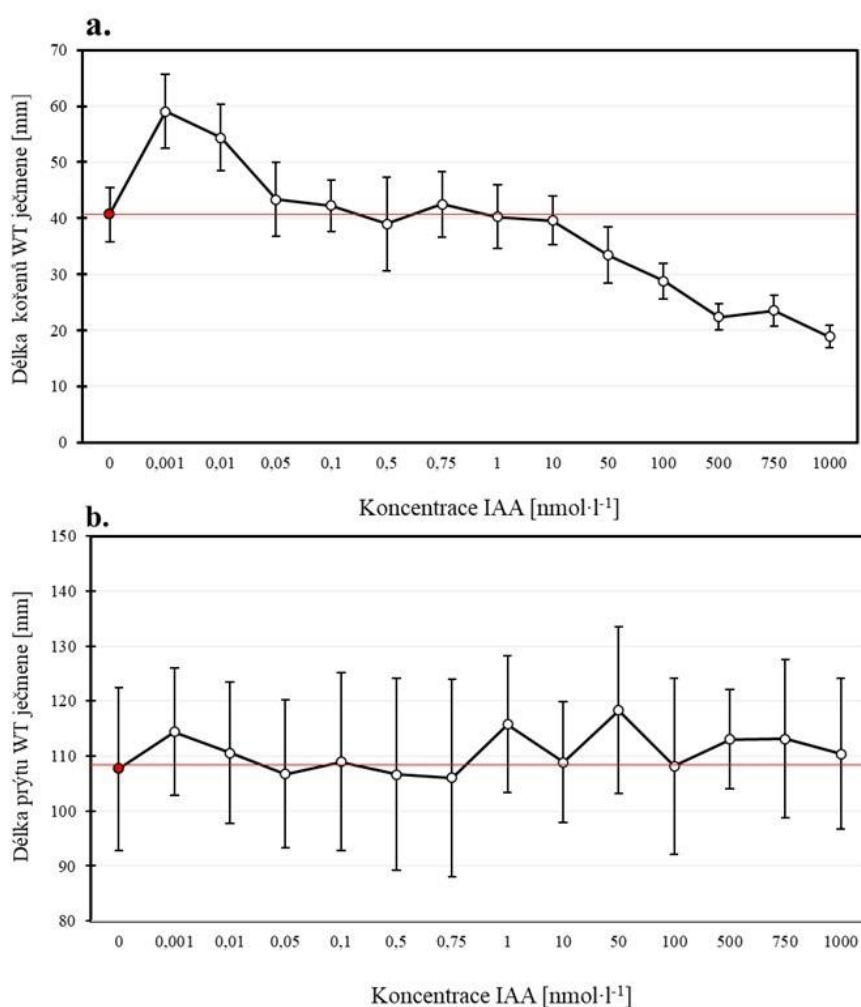
Veškeré grafy byly vytvořeny v programu Microsoft Excel. Program Microsoft Excel rovněž složil pro výpočet průměrů a směrodatných odchylek. Obrázky rostlin ječmene včetně informačních popisek byly vytvářeny a formátovány v programu Microsoft PowerPoint. Statistické hodnocení pomocí dvouvýběrového parametrického Aspin-Welchova testu bylo provedeno v programu NCSS 2023. Aspin-Welchův test je test statistických hypotéz, který se používá k porovnání průměrů dvou nezávislých skupin, které mohou mít nestejně rozptyly nebo velikosti vzorků. Výhodou tohoto testu je větší robustnost oproti jiným parametrickým testům v případech, kdy nejsou splněny předpoklady normality. V programu NCSS 2023 byl vytvořen dvojitý dendrogram, tzv. klastrovaná „heat“ mapa. Elektroforetogramy byly oříznuty a invertovány v programu ImageJ a následně opatřeny popisky v Microsoft PowerPoint. Pro vizualizaci výstupů ze Sangerova sekvenování a následné stanovení genotypů u daných vzorků byl použit program ApE.exe.

5 VÝSLEDKY

5.1 Fenotypová analýza

5.1.1 Optimalizace koncentrací IAA

Za účelem stanovení koncentrace IAA s inhibičním a stimulačním vlivem na délku kořene a prýtu WT linie ječmene byl nejprve proveden optimalizační experiment s koncentrační škálou IAA ($1 \text{ pmol}\cdot\text{l}^{-1}$ – $1 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$). Pro každé ovlivnění bylo použito 15–30 10denních semenáčků ječmene a naměřené délky kořenů a prýtů byly zprůměrovány se současným vytvořením směrodatných odchylek. Graf 1 popisuje závislost průměrné délky kořenů/prýtů WT linie ječmene vzhledem ke koncentraci IAA. V Grafu 1 označuje červená linie kontrolní průměrnou délku kořenu/prýtu, která byla pozorována u WT linie ječmene bez ovlivnění IAA.



Graf 1: Optimalizace vlivu koncentrací IAA na růst ječmene. Délka kořenů (a.), délka prýtů (b.).

Koncentrace $1 \text{ pmol}\cdot\text{l}^{-1}$ a $10 \text{ pmol}\cdot\text{l}^{-1}$ IAA měly stimulační efekt na růst kořenů WT linie ječmene, jelikož jsou délky kořenů v rámci tohoto ovlivnění nadprůměrné (55–60 mm). Při koncentracích IAA $0,1 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$, $0,5 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$, $0,75 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$, $1 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ a $10 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ byly pozorovány délky kořenů odpovídající kontrolním podmínkám (tzn. $\sim 40 \text{ mm}$) či lehce nadprůměrné délky kořenů. Při koncentraci

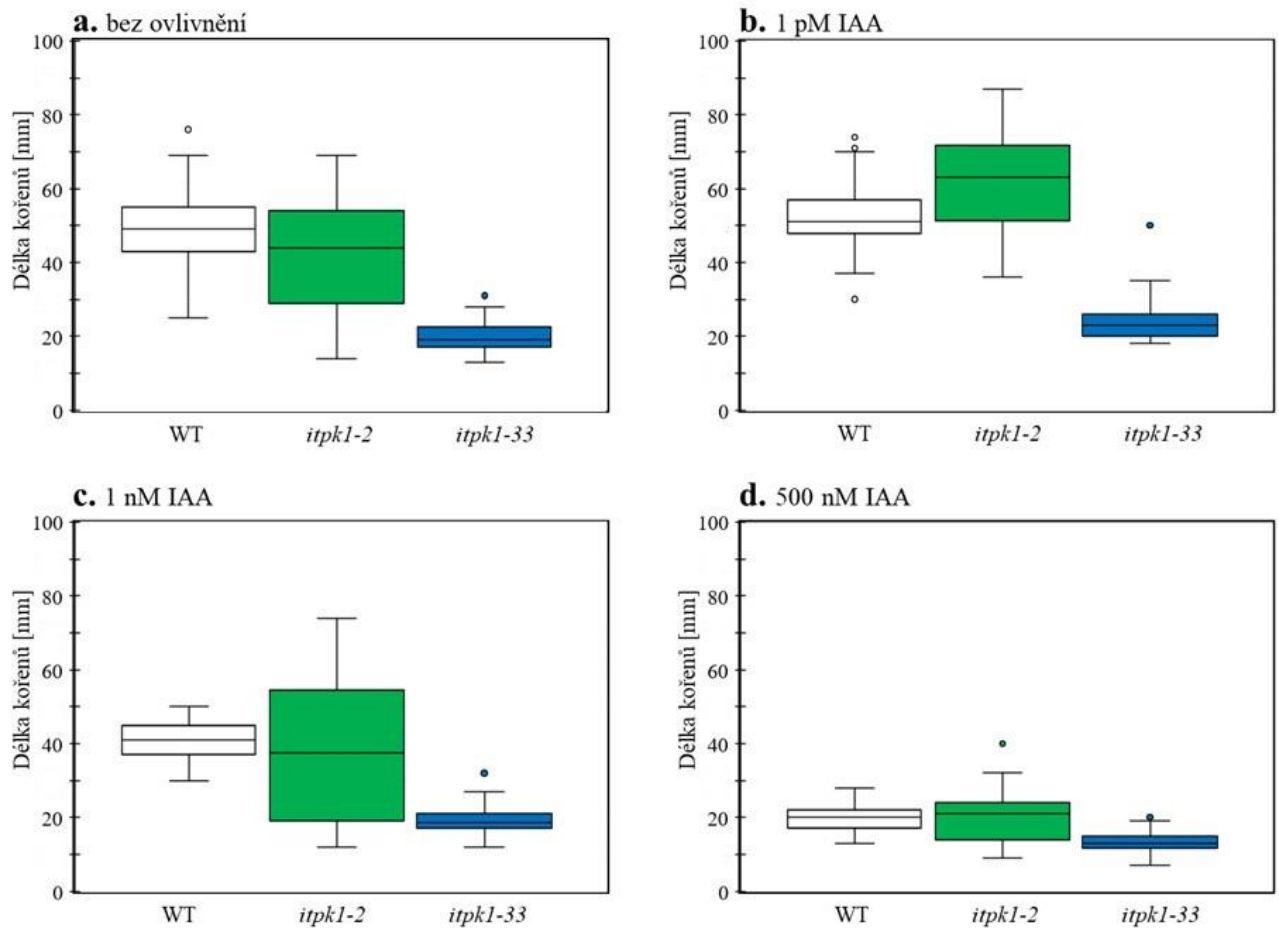
IAA ≥ 50 nmol·l⁻¹ byl zaznamenán inhibiční efekt na růst kořenů. Délky kořenů byly při ovlivnění 50 nmol·l⁻¹–1000 nmol·l⁻¹ IAA podprůměrné (nižší než 35 mm) ve srovnání s kontrolní délkou kořenů bez ovlivnění. Obecně byla při vyšších koncentracích IAA délka kořenů ječmene nižší (viz Graf 1a). Při různých koncentracích IAA dosahovaly průměrné délky prýtů 100–120 mm. Vzhledem k vysokým hodnotám směrodatných odchylek, jak je patrné z Grafu 1b, není možné vyvozovat jednoznačný trend vlivu koncentrace IAA na délku prýtů ječmene, a proto byly následující experimenty prováděny pouze v rámci kořenů.

5.1.2 Stanovení vlivu IAA na délku kořene

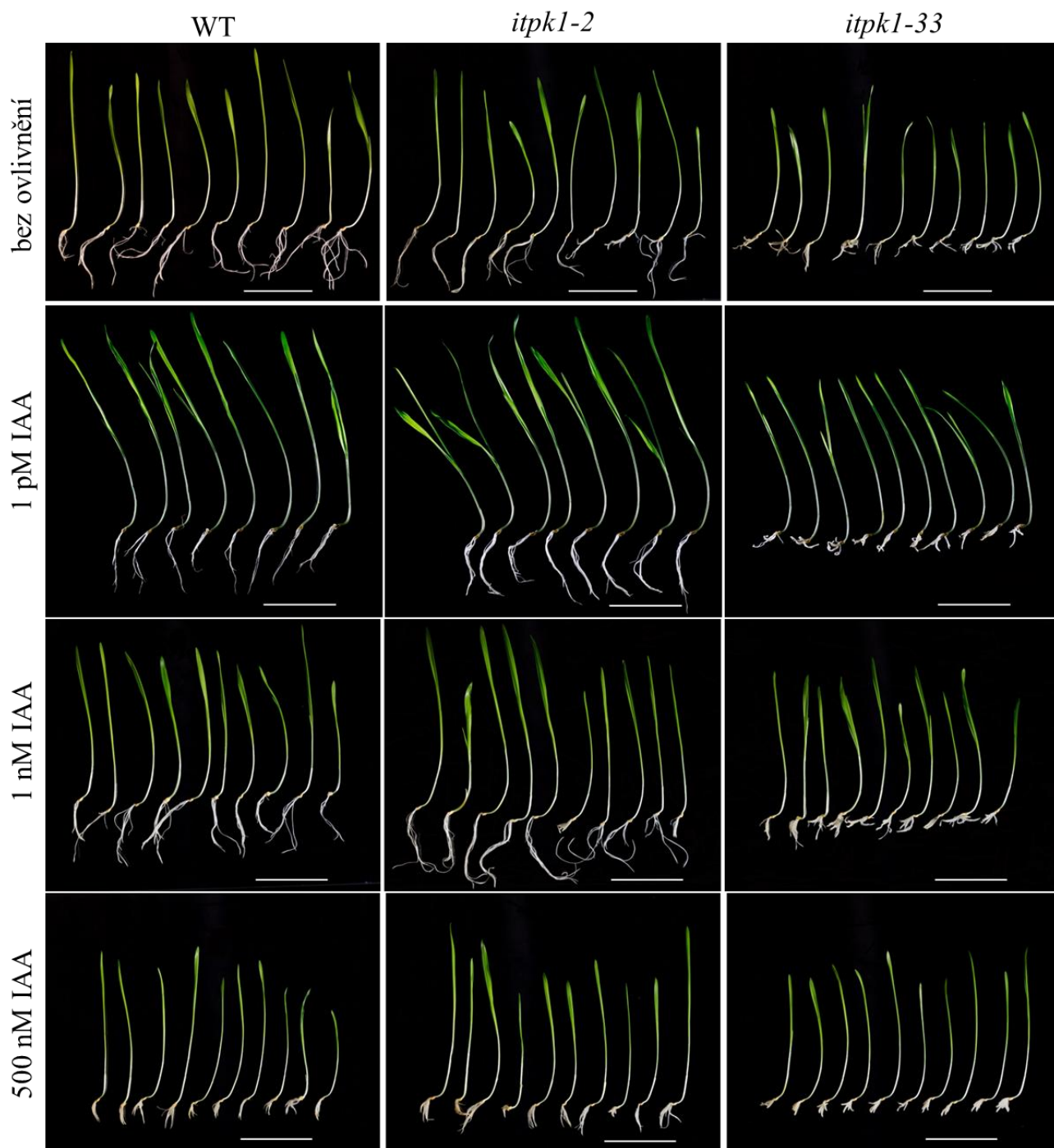
Tato fyziologická studie sloužila pro zjištění efektu vybraných hladin IAA na růst kořene u WT linie a mutantních linií *itpk1-2* a *itpk1-33* ječmene. Na základě výsledků optimalizačního experimentu (viz sekce 5.1.1) byly zvoleny tři testovací koncentrace IAA: 1 pmol·l⁻¹, 1 nmol·l⁻¹ a 500 nmol·l⁻¹ a byla zahrnuta kontrola bez ovlivnění. Tyto koncentrace byly vybrány za účelem současného popsání stimulačního i inhibičního efektu IAA na délku kořenů 10denních semenáčků ječmene. Data byla vynesena do krabicového grafu (angl. *box plot*) pro každé ovlivnění. Pro statistické hodnocení byl použit parametrický Aspin-Welchův test.

Při kontrolních podmínkách byla průměrná délka kořenů WT linie byla $48,6 \pm 9,9$ mm, mutantní linie *itpk1-2* dosahovala průměrné délky kořenů $41,1 \pm 15,2$ mm a pozorovaná průměrná délka kořenů v rámci mutantní linie *itpk1-33* byla $19,9 \pm 4,3$ mm (viz Graf 2a). Statisticky se významně liší průměrné délky kořenů WT a *itpk1-2* linií na hladině významnosti 0,005. Průměrné délky kořenů WT linie a mutantní linie *itpk1-33* se signifikantně liší na hladině významnosti 0,001. V rámci ovlivnění 1 pmol·l⁻¹ IAA byla u WT linie průměrná délka kořenů $52,5 \pm 8,7$ mm. V rámci *itpk1-2* dosáhla průměrná délka kořenů $61,6 \pm 12,9$ mm a u *itpk1-33* byla zjištěna průměrná délka kořenů $24,6 \pm 5,6$ mm (viz Graf 2b). Byl zaznamenán statisticky významný rozdíl mezi průměrnými délkami kořenů WT linie a mutanta *itpk1-2* při hladině významnosti 0,001. V průměrné délce kořenů se významně liší rovněž linie WT a *itpk1-33* opět na hladině významnosti 0,001. Při ovlivnění 1 nmol·l⁻¹ IAA byla u WT pozorována průměrná délka kořenů $40,9 \pm 4,8$ mm, mutant *itpk1-2* dosahoval průměrné délky kořenů $37,7 \pm 19$ mm a průměrná délka kořene mutanta *itpk1-33* byla $19,3 \pm 4,1$ mm (viz Graf 2c). Na hladině významnosti 0,05 nebyl zaznamenán významný rozdíl mezi WT a mutantem *itpk1-2* v průměrných délkách kořenů. Avšak WT se v průměrné délce kořenů signifikantně lišil od mutanta *itpk1-33* a to na hladině významnosti 0,001. V rámci ovlivnění inhibiční hladinou 500 nmol·l⁻¹ IAA byla naměřena průměrná délka kořenů WT linie ječmene $20,1 \pm 3,5$ mm, u mutanta *itpk1-2* byla pozorována průměrná délka kořene $20,2 \pm 6,8$ mm a v rámci *itpk1-33* byla zaznamenána průměrná délka kořene $13,7 \pm 3$ mm (viz Graf 2d). WT linie se od mutantní linie *itpk1-2* významně neliší v průměrné délce kořenů na hladině významnosti 0,05. Signifikantně se v průměrné délce kořenů liší WT linie a mutant *itpk1-33* na hladině významnosti 0,001. Při ovlivnění 500 nmol·l⁻¹ IAA byly pozorovány nejnižší průměrné délky kořenů ze všech ovlivnění. U *itpk1-33* byl pozorován snížený růst kořenů i při kontrolních podmínkách, zatímco

itpk1-2 dosahoval obecně podobných či mírně vyšších délek kořenů ve srovnání s WT při každém typu ovlivnění s IAA. Fotografie linií WT, *itpk1-2* a *itpk1-33* kultivovaných při kontrolních podmínkách bez ovlivnění a při ovlivnění 1 pmol·l⁻¹, 1 nmol·l⁻¹ a 500 nmol·l⁻¹ IAA viz obrázek 6.



Graf 2: Efekt IAA na délku kořene. U 10denních semenáčků ječmene kultivovaných **a.** bez ovlivnění, **b.** při ovlivnění stimulační hladinou 1 pM IAA, **c.** při ovlivnění mírně stimulační hladinou 1 nM IAA, **d.** při ovlivnění inhibiční hladinou 500 nM IAA, experiment proveden ve třech biologických opakováních, kde pro každé opakování n = 15–25 rostlin.



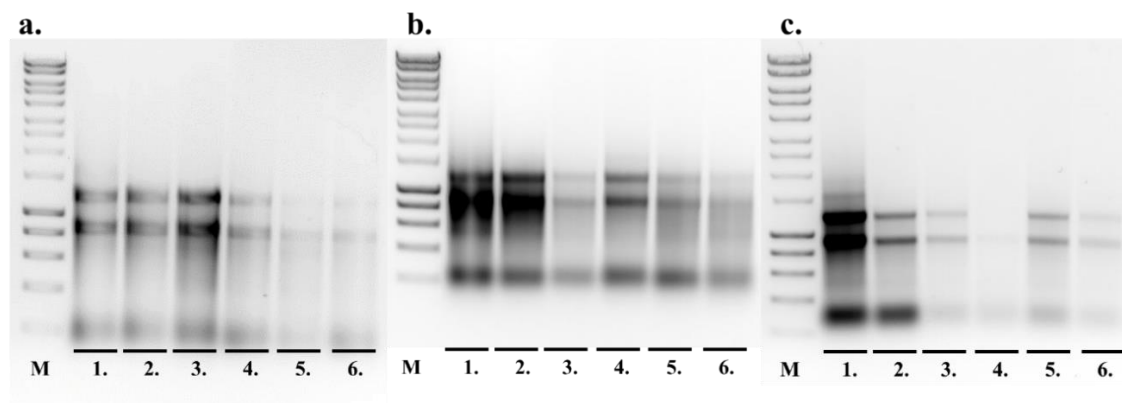
Obrázek 6: Rostliny WT linie a mutantů *itpk1-2* a *itpk1-33* jarního ječmene v kontrolních podmínkách a při ovlivnění IAA. Měřítka 5 cm.

5.2 Určení relativní změny exprese u vybraných genů

5.2.1 Izolace celkové RNA

Pro stanovení exprese vybraných genů musela být nejprve izolována celková RNA z kořenů 10denních semenáčků ječmene. RNA byla izolována metodou využívající TRI REAGENT. Kvalita a kvantita izolované celkové RNA byla zkontrolována pomocí horizontální elektroforézy v 1% agarosovém gelu

s následnou vizualizací UV-transiluminátorem. Elektroforetogramy izolované celkové RNA každého biologického opakování viz Obrázek 7.

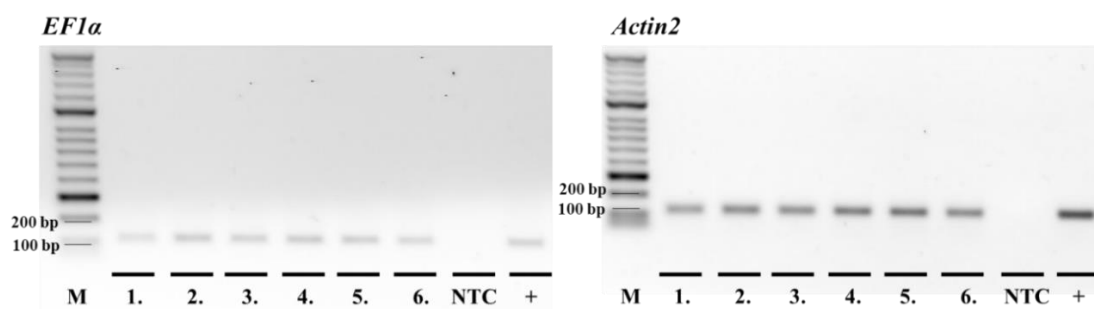


Obrázek 7: Kontrola kvality izolované celkové RNA. M: marker molekulových hmotností HyperLadder™ I 1 kb; 1. WT, bez ovlivnění; 2. WT, ovlivněno 500nM IAA; 3. *itpk1-2*, bez ovlivnění; 4. *itpk1-2*, ovlivněno 500nM IAA; 5. *itpk1-33*, bez ovlivnění; 6. *itpk1-33*, ovlivněno 500nM IAA, 1% agarosový gel.

Ze všech vzorků byla izolována celková RNA v dostatečném množství pro přepis do cDNA. Izolovaná RNA nebyla degradovaná, čehož jsou důkazem horní dva ostře ohraničené bandy představující rRNA velké a malé podjednotky ribozomu. Spektrofotometricky byla stanovena koncentrace celkové RNA. Rozmezí koncentrace RNA bylo u všech vzorků od 200 do 2000 ng/μl.

5.2.2 Reverzní transkripce z RNA do cDNA

Získaná celková RNA byla použita k reverzní transkripci do cDNA. V rámci všech tří opakování byla provedena kontrola reverzní transkripce cDNA prostřednictvím PCR s využitím oligomerů pro housekeepingové geny *Actin2* a *EF1a*. Následovala horizontální elektroforéza v 1,5% agarosovém gelu s vizualizací UV-transiluminátorem (viz Obrázek 8).



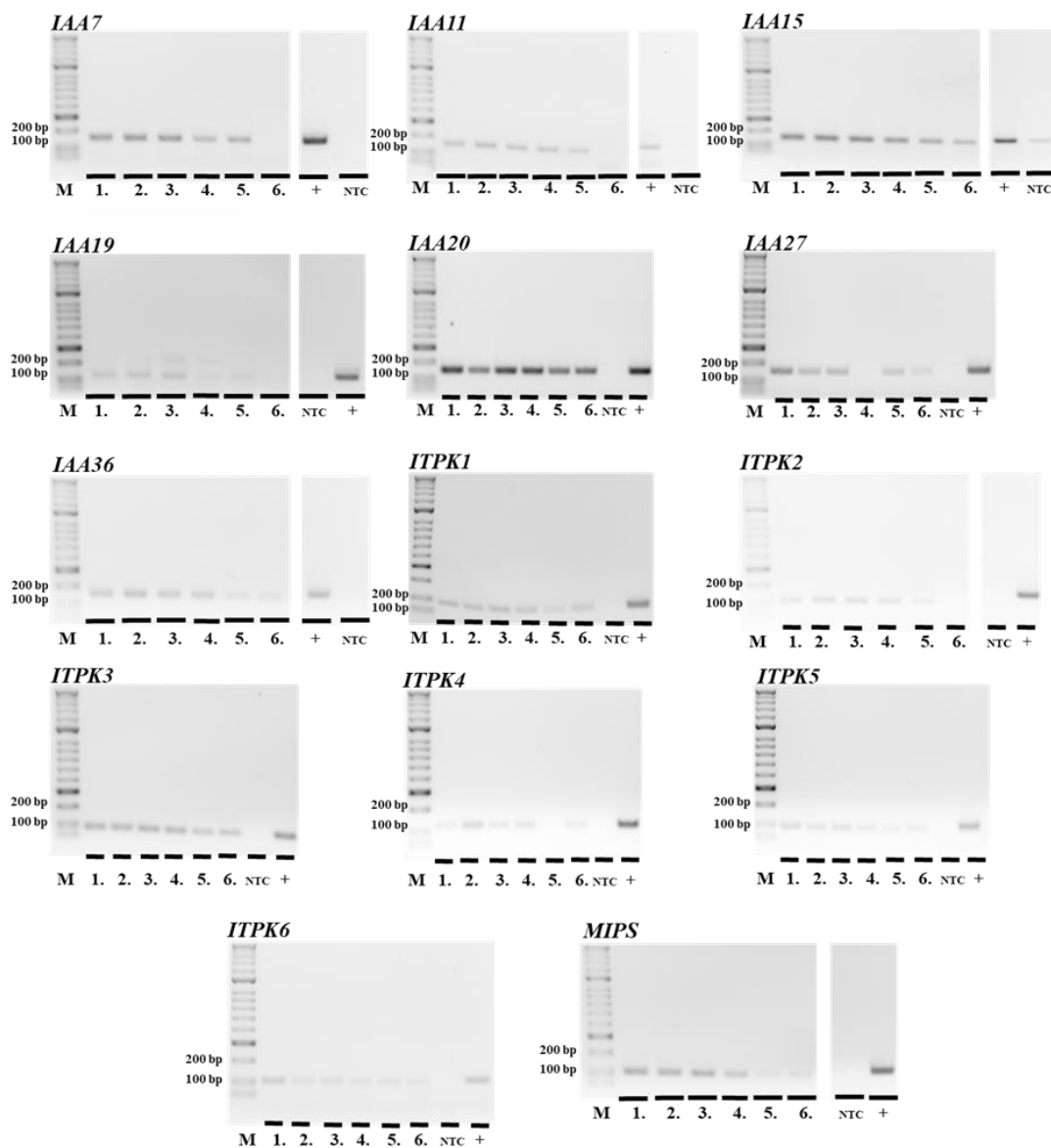
Obrázek 8: Kontrola množství cDNA pomocí PCR s oligomery pro *EF1a* a *Actin2*. M: marker molekulových hmotností HyperLadder™ II 50 bp s označenými délkami DNA fragmentů v jednotkách párů bází [bp]; 1. WT, bez ovlivnění; 2. WT, ovlivněno 500nM IAA; 3. *itpk1-2*, bez ovlivnění;

4. *itpk1-2*, ovlivněno 500nM IAA; 5. *itpk1-33*, bez ovlivnění; 6. *itpk1-33*, ovlivněno 500nM IAA; NTC: kontrola neobsahující cDNA templát; +: označení pozitivní kontroly pro daný gen, 1,5% agarosový gel.

V rámci všech biologických opakování došlo až na drobné fluktuace intenzit bandů v rámci PCR produktů pro *Actin2* k víceméně stejnoměrnému přepisu RNA do cDNA. Kontrola množství cDNA biologického opakování 1 je zobrazena na Obrázku 8.

5.2.3 Detekce cDNA transkriptů

Pro předběžnou kontrolu přítomnosti cDNA transkriptů byla provedena PCR s využitím oligomerů pro cílové geny. Proběhla horizontální gelová elektroforéza v 1,5% agarosovém gelu s následnou vizualizací UV-transiluminátorem (viz Obrázek 9).



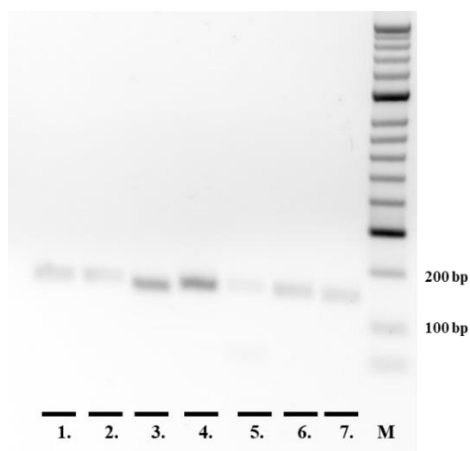
Obrázek 9: Detekování cDNA transkriptů u zájmových genů. M: marker molekulových hmotností HyperLadder™ II 50 bp s označenými délkami DNA fragmentů v jednotkách párů bází [bp]; 1. WT,

bez ovlivnění; 2. WT, ovlivněno 500nM IAA; 3. *itpk1-2*, bez ovlivnění; 4. *itpk1-2*, ovlivněno 500nM IAA; 5. *itpk1-33*, bez ovlivnění; 6. *itpk1-33*, ovlivněno 500nM IAA; NTC: kontrola neobsahující cDNA templát; +: označení pozitivní kontroly pro daný gen, 1,5% agarosový gel.

Cílovými geny byly *IAA7*, *IAA11*, *IAA15*, *IAA19*, *IAA20*, *IAA27*, *IAA36*, dále geny pro kinasy *ITPK1*–*ITPK6* a *MIPS*. Podařilo se detekovat většinu cDNA transkriptů u cílových genů. U vzorku 4 nebyl detekován cDNA transkript genu *IAA27*. V rámci vzorku 5 nebyl detekován cDNA transkript genu *ITPK4* a u vzorku 6 nebyly detekovány cDNA transkripty genů *IAA7*, *IAA11*, *IAA19*, *ITPK2*. Předpokladem je, že tato metoda neumožňuje detekovat cDNA transkripty u výše zmíněných vzorků, protože exprese těchto genů v rámci daného genotypu je velmi nízká, tzn. pod úrovní detekce, či žádná. Avšak rovněž mohlo dojít k chybě při samotné PCR reakci. V rámci detekování cDNA transkriptů u genu *IAA15* RT byla kontrola neobsahující cDNA templát (NTC) pozitivní. Vysvětlením může být kontaminace NTC vzorku, či špatná funkčnost oligomerů (např. tvorba oligomerových dimerů).

5.2.4 Stanovení exprese metodou qRT-PCR

Nejprve byly zhotoveny standardy pro *Aux/IAA* geny (viz Obrázek 10). Na základě rovnice kalibrační křivky byla stanovena účinnost oligomerů pro daný gen. Vytvořené kalibrační křivky jsou součástí příloh (viz Příloha 1).

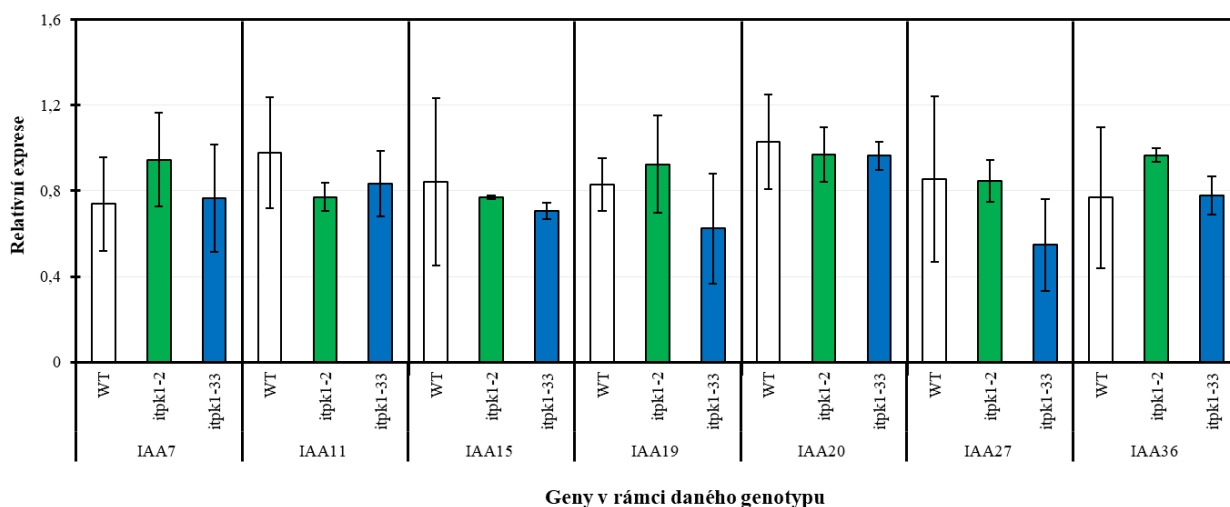


Obrázek 10: Detekce standardů pomocí horizontální elektroforézy. M: marker molekulových hmotností HyperLadder™ II 50 bp s označenými délkami DNA fragmentů v jednotkách párů bází [bp]; pod číselným označením standardy 1. *IAA7*; 2. *IAA11*; 3. *IAA15*; 4. *IAA20*; 5. *IAA19*; 6. *IAA27*; 7. *IAA36*. Templát cDNA z WT linie ječmene. 1,5% agarosový gel.

Zhotovení standardů proběhlo úspěšně. Každý standard byl detekován pomocí horizontální gelové elektroforézy s následnou vizualizací UV-transiluminátorem.

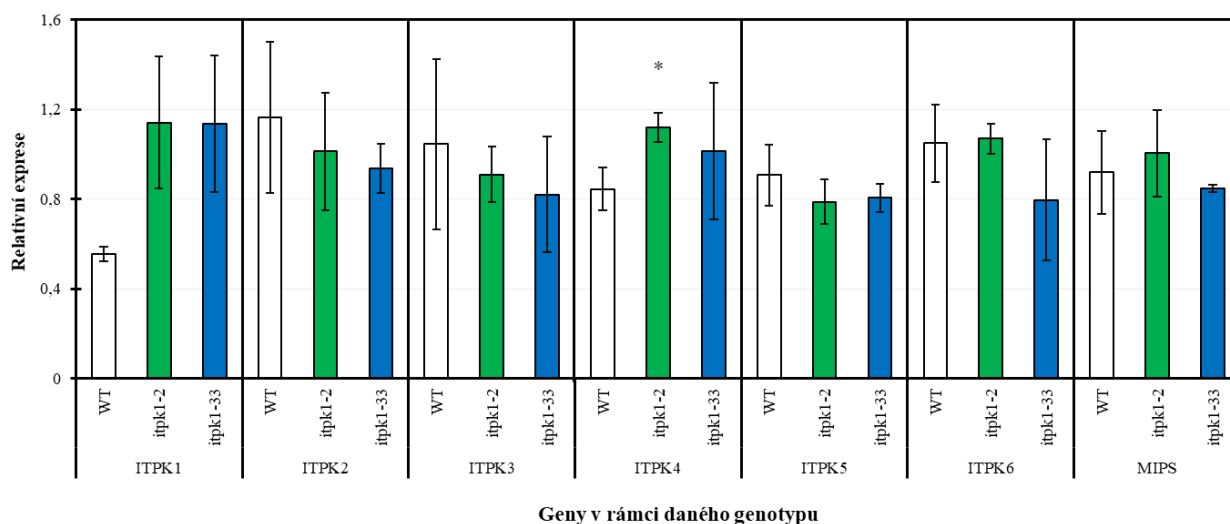
Expresní profily cílových genů byly zjištěny pomocí kvantitativní PCR v reálném čase (qRT-PCR). Dle Pfafflova vzorce s použitím hodnot *EF1 α* jako referenčního genu byla vypočtena relativní změna exprese pro *Aux/IAA* geny (viz Graf 3) a pro *ITPK* geny a *MIPS* (viz Graf 4) u daných genotypů při

ovlivnění 500nM IAA a hodnoty byly vyneseny do grafů společně se směrodatnými odchylkami. Relativní exprese cílových genů u mutantních linií *itpk1-2* a *itpk1-33* byly statisticky srovnány s WT linií pomocí Aspin-Welchova testu na hladinách významnosti 0,05 (*); 0,01 (**) a 0,001 (***)).



Graf 3: Relativní změna exprese *Aux/IAA* genů v kořenech jarního ječmene po ovlivnění 500 nM IAA. Hodnoty jsou průměrem nezávislých měření s vyjádřenou směrodatnou odchylkou, kde $n = 3$, pro statistické porovnání WT s *itpk1-2* a *itpk1-33* byl použit Aspin-Welchův test na hladinách významnosti 0,05 (*), 0,01 (**), a 0,001 (***)).

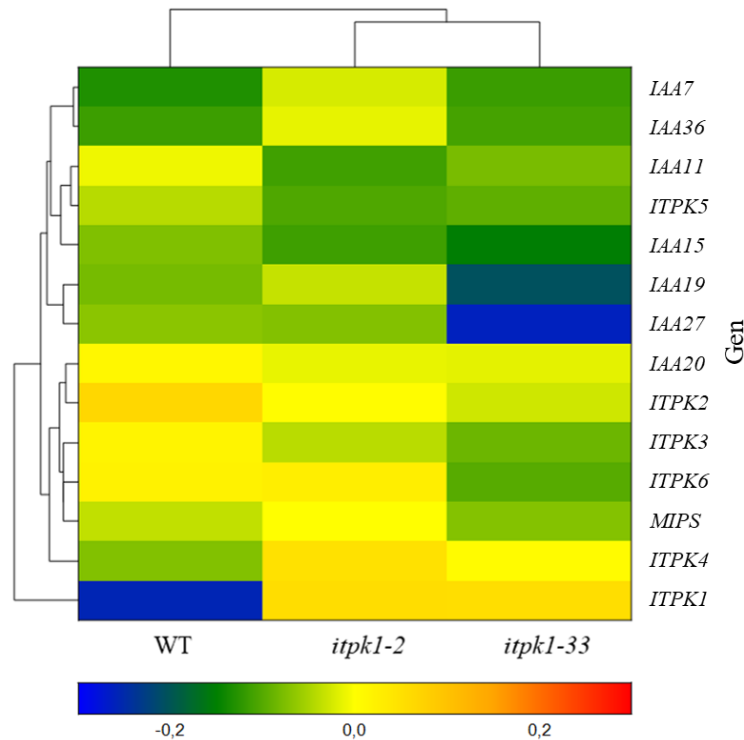
Po ovlivnění 500 nM IAA byla mírně zvýšena exprese genu *IAA7*, *IAA19* a *IAA36* u *itpk1-2* oproti WT a *itpk1-33*. U genu *IAA11* byla po ovlivnění zaznamenána nejvyšší exprese u WT, nižší u *itpk1-33* a nejnižší u *itpk1-2*. Relativní změna exprese u genů *IAA15* a *IAA20* byla po ovlivnění téměř srovnatelná napříč všemi genotypy. U mutantu *itpk1-33* exprese *IAA27* relativně poklesla po ovlivnění 500nM IAA přibližně na 50 % původní úrovně a v rámci *IAA19* exprese u téhož mutantu relativně poklesla na ~60 %. Z důvodu vysokých hodnot směrodatných odchylek u relativních expresí *Aux/IAA* genů, viz Graf 3, nebyl zaznamenán žádný statisticky signifikantní rozdíl exprese u mutantních linií *itpk1-2* a *itpk1-33* ve srovnání s WT linií ječmene.



Graf 4: Relativní změna exprese genů *ITPK1–ITPK6* a *MIPS* v kořenech jarního ječmene po ovlivnění 500 nM IAA. Hodnoty jsou průměrem nezávislých měření s vyjádřenou směrodatnou odchylkou, kde $n = 3$, pro statistické porovnání WT s *itpk1-2* a *itpk1-33* byl použit Aspin-Welchův test na hladinách významnosti 0,05 (*), 0,01 (**) a 0,001 (***)

Relativní exprese genu *ITPK1* po ovlivnění 500 nM IAA poklesla u WT, ale zůstala stabilní u obou mutantů. U genů *ITPK2* a *ITPK3* byla po tomto ovlivnění nejvyšší exprese u WT, nižší u *itpk1-2* a nejnižší u *itpk1-33*. Expres genů *ITPK4* a *MIPS* po ovlivnění 500 nM IAA byla ze všech genotypů nejvyšší u mutantu *itpk1-2*. WT vykazoval po ovlivnění téměř stabilní expresi genu *ITPK5*, ale u mutantů *itpk1-2* a *itpk1-33* došlo k srovnatelnému mírnému snížení exprese *ITPK5*. Stabilní exprese genu *ITPK6* byla pozorována u WT a *itpk1-2*, ale u *itpk1-33* došlo k mírnému snížení exprese *ITPK6*. Byla zaznamenána signifikantní změna exprese genu *ITPK4* u genotypu *itpk1-2* ve srovnání s WT. U *itpk1-2* exprese *ITPK4* mírně vzrostla, zatímco u WT exprese mírně poklesla. Tato signifikantní změna byla pozorována na hladině významnosti 0,05. V rámci ostatních genů nebyl objeven žádný signifikantně významný rozdíl relativní exprese u mutantních linií oproti WT.

Pro přehlednou vizualizaci dat byl vytvořen dvojitý dendrogram tzv. klastrovaná „heat“ mapa (viz Obrázek 11), jež představuje dvourozměrnou reprezentaci relativních změn expresí cílových genů v rámci jednotlivých genotypů na barevné paletě od modré (nejnižší exprese) po červenou (nejvyšší exprese). Hodnoty relativních změn exprese musely být za tímto účelem zlogaritmovány.



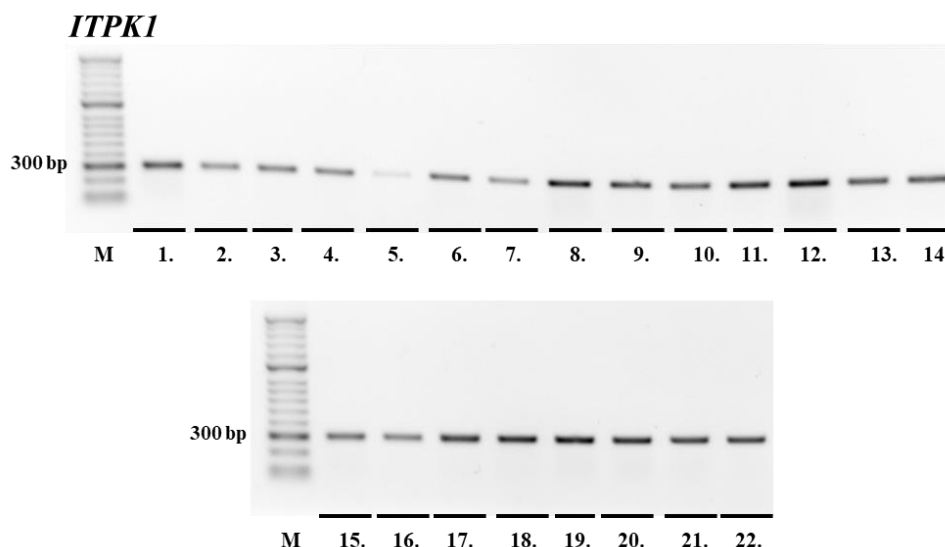
Obrázek 11: Klasterovaná „heat“ mapa exprese cílových genů v kořenech po ovlivnění 500nM IAA u ječmene jarního.

Ke snížení exprese došlo po ovlivnění 500nM IAA u genu *ITPK1* v rámci WT linie a u genu *IAA27* a *IAA19* u mutantu *itpk1-33*. (viz Obrázek 11). Naopak v rámci genu *ITPK1* u mutantů *itpk1-2* a *itpk1-33* ke snížení exprese nedošlo. U linie *itpk1-2* byla pozorována zvýšená exprese genu *ITPK4* a mírně zvýšená exprese genu *ITPK6*. U WT byla pozorována poměrně vysoká exprese genu *ITPK2*. Ostatní geny, především *Aux/IAA*, vykazovaly expresi konstantní nebo mírně sníženou napříč genotypy (viz Obrázek 11).

5.3 Zjištění vztahu +A a –G mutantní alely genu *ITPK1*

5.3.1 Izolace genomové DNA paramagnetickými částicemi a PCR

Byla izolována gDNA paramagnetickými částicemi z rostlin segregujících *itpk1-1*, *itpk1-4*, *itpk1-5*, *itpk1-6*, *itpk1-11*, *itpk1-21*, *itpk1-26* generace T2. Celkem bylo analyzováno 87 rostlin. Byla spektrofotometricky ověřena kvalita izolované gDNA. Izolovaná gDNA posloužila jako templát pro amplifikaci sekvence genu *ITPK1* prostřednictvím PCR. Vzniklé PCR produkty byly purifikovány paramagnetickými částicemi. Kontrola PCR produktů byla provedena použitím horizontální gelové elektroforézy separací v 1% agarosovém gelu s vizualizací UV-transiluminátorem. Elektroforetogram PCR produktů genu *ITPK1* určených k sekvenování u vzorků vybrané segregující mutantní linie *itpk1-21* viz Obrázek 12.



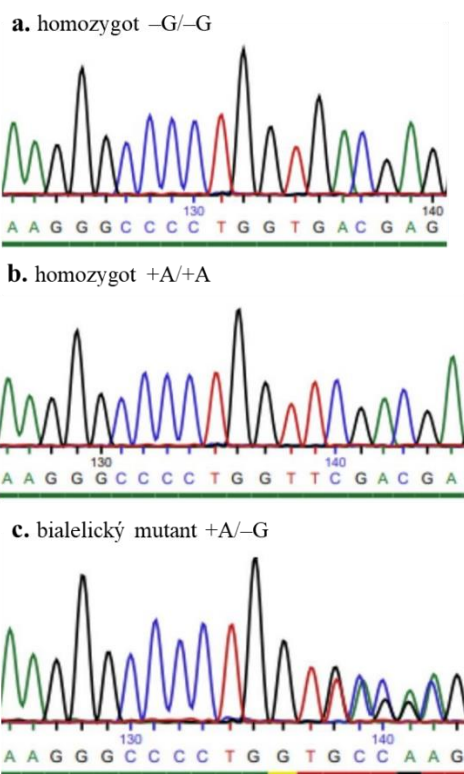
Obrázek 12: Kontrola purifikovaných PCR produktů genu *ITPK1* z linie *itpk1-21* jarního ječmene. M: marker molekulových hmotností HyperLadder™ II 50 bp s označenou délkou DNA fragmentu v jednotkách párů bází [bp]; 1.–22. vzorky PCR produktů, gDNA templát, 1% agarosový gel.

V rámci vybraných vzorků segregující linie *itpk1-21* proběhla izolace gDNA s následnou PCR a purifikací získaných PCR produktů genu *ITPK1* úspěšně. PCR produkt byl detekován u všech vzorků (1.–22.). Nižší výtěžnost byla zaznamenána pouze u vzorku pod označením 5. Obdobným způsobem bylo postupováno u všech použitých segregujících mutantních linií generace T2 ječmene jarního.

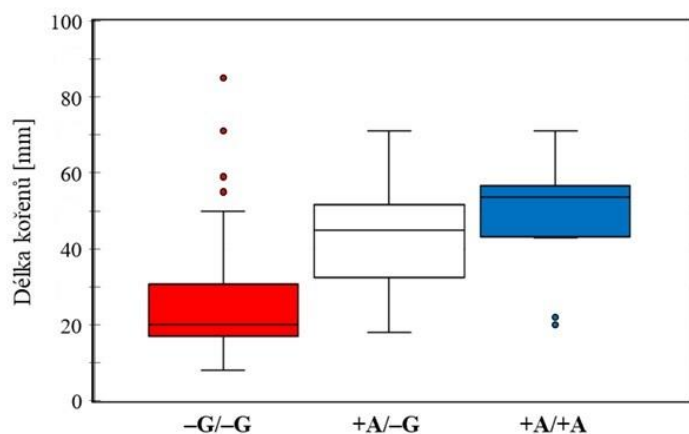
5.3.2 Genotypování pomocí Sangerova sekvenování

Vytvořené a purifikované PCR produkty genu *ITPK1* byly použity pro Sangerovo sekvenování s využitím reverse oligomeru za účelem zjištění genotypu jednotlivých rostlin vybraných segregujících mutantních linií T2 generace. Byla zjišťována přítomnost +A inserce a –G delece ve sledovaném lokusu genu *ITPK1*. Detekovány byly homozygotní linie +A/+A a –G/–G nebo bialeličtí mutanti +A/–G. Schematicky jsou sekvence homozygotů +A/+A a –G/–G a bialelického mutantu +A/–G porovnány mezi sebou na Obrázku 13. Distribuce fenotypů jednotlivých mutantů s danou konstitucí alel jsou vyjádřeny Grafem 5. Sledovaným fenotypovým znakem byla délka kořene a pro statistické porovnání průměrných délek kořenů jednotlivých genotypů sloužil Aspin-Welchův test. Důraz byl kladen na fenotyp bialelického mutantu +A/–G, který by mohl o vztahu těchto mutantních alel vypovědět nejvíce.

V případě homozygota –G/–G (viz Obrázek 13a) následuje po specifické sekvenci TGGT guanin, ale u homozygota +A/+A (viz Obrázek 13b) po této sekvenci následuje thymin. Rozeznat bialelického mutantu +A/–G od homozygotů lze na základě poklesu intenzit píků, které následují po sekvenci TGGT, na ½ předchozí úrovně intenzit (viz Obrázek 13c). Píky, jenž následují po sekvenci TGGT se navíc částečně překrývají. Důvodem je výskyt dvou odlišných alel daného genu.



Obrázek 13: Srovnání DNA sekvencí sledovaného lokusu genu *ITPK1* u jarního ječmene. **a.** homozygot $-G/-G$, **b.** homozygot $+A/+A$, **c.** bialelický mutant $+A/-G$, (-)DNA řetězec, použito Sangerovo sekvenování.



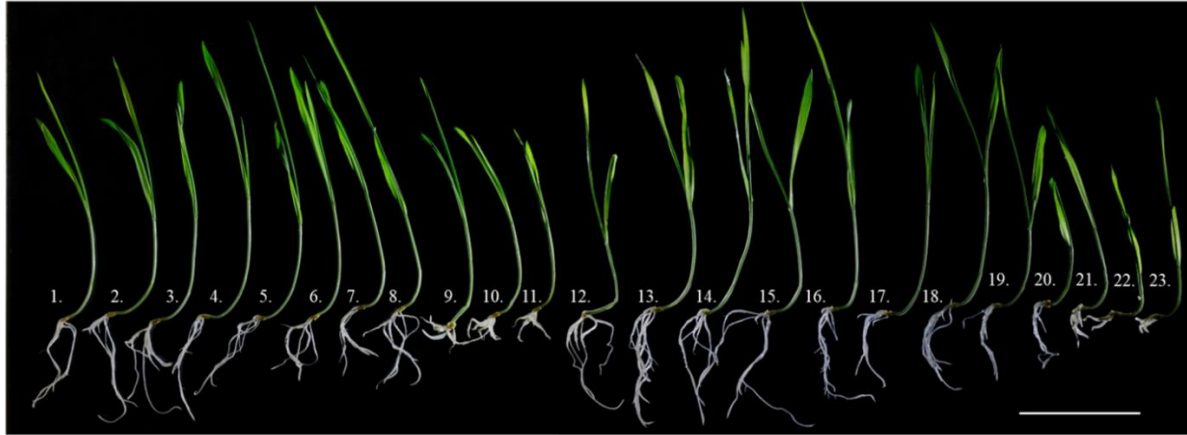
Graf 5: Délky kořenů homozygotů $+A/+A$ a $-G/-G$ a bialelického mutantu $+A/-G$.

Pro studium vztahu mutantních alel $+A$ a $-G$ bylo genotypováním z celkového počtu 87 rostlin objeveno 46 homozygotů $-G/-G$, 27 bialelických mutantů $+A/-G$ a 14 homozygotů $+A/+A$. Průměrná délka kořene u homozygota $-G/-G$ byla $26,7 \pm 17$ mm, průměrná délka kořene v rámci bialelického mutantu $+A/-G$ činila $42,3 \pm 15$ mm a průměrná délka kořene u homozygota $+A/+A$ dosáhla $47,3 \pm 15,9$ mm (viz Graf 5). Dle statistického hodnocení se průměrná délka kořene bialelického mutantu $+A/-G$ významně liší od průměrné délky kořene homozygota $-G/-G$ na hladině významnosti 0,001. Naopak

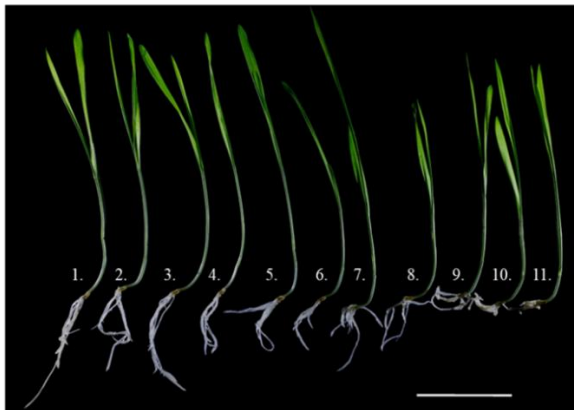
délka kořene bialelického mutantu +A/-G není signifikantně odlišná od průměrné délky kořene homozygota +A/+A při použité hladině významnosti 0,001. Je přiložen snímek rostlin daných genotypů u vybraných segregujících linií ječmene jarního (viz Obrázek 14), který je opatřen legendou.

a.

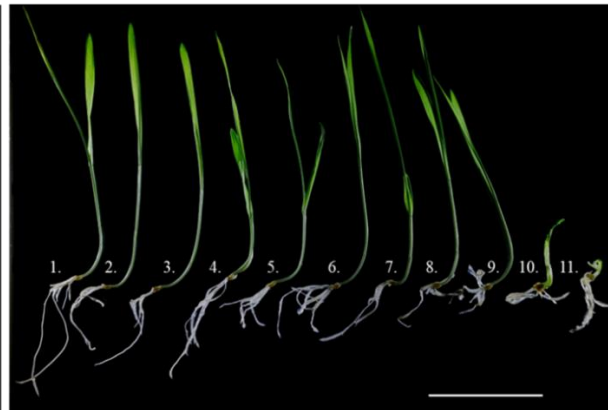
T2-3B-26



T2-3B-1



T2-3B-4



b.

T2-3B-26			T2-3B-1			T2-3B-4		
Oz.	Délka kořene [mm]	Genotyp	Oz.	Délka kořene [mm]	Genotyp	Oz.	Délka kořene [mm]	Genotyp
1.	52	+A/-G	1.	60	+A/-G	1.	71	-G/-G
2.	60	-G/-G	2.	54	+A/+A	2.	46	+A/-G
3.	55	+A/+A	3.	55	+A/+A	3.	50	+A/-G
4.	51	+A/-G	4.	35	?	4.	59	+A/-G
5.	51	+A/-G	5.	45	+A/-G	5.	35	+A/-G
6.	35	-G/-G	6.	31	?	6.	44	+A/-G
7.	36	+A/-G	7.	43	?	7.	44	+A/+A
8.	44	+A/+A	8.	30	+A/-G	8.	38	-G/-G
9.	30	-G/-G	9.	43	-G/-G	9.	20	+A/-G
10.	21	-G/-G	10.	24	-G/-G	10.	15	-G/-G
11.	18	+A/-G	11.	18	-G/-G	11.	35	+A/-G
12.	55	-G/-G						
13.	57	+A/+A						
14.	59	-G/-G						
15.	71	+A/-G						
16.	63	+A/+A						
17.	43	?						
18.	49	+A/-G						
19.	37	+A/-G						
20.	43	+A/+A						
21.	20	-G/-G						
22.	15	-G/-G						
23.	12	-G/-G						

Obrázek 14: Fenotypy rostlin ječmene jarního dané konstituce alel u segregujících linií generace T2. Měřítka 5 cm, **a.** snímek 10denních rostlin jarního ječmene, **b.** legenda označených genotypů rostlin.

6 DISKUZE

Auxiny představují skupinu fytohormonů podílejících se v mnoha vývojových procesech rostlin (Zenser *et al.*, 2001). Nejhojněji zastoupeným přírodním auxinem je IAA a má zásadní vliv na vývojové odpovědi spjaté s transdukcí auxinového signálu (Ljung *et al.*, 2005; Ma *et al.*, 2018). Za účelem optimalizace vlivu IAA na fyziologii rostlin ječmene jarního byl proveden experiment s koncentrační škálou exogenně dodaného IAA počínající hladinou $1 \text{ pmol}\cdot\text{l}^{-1}$ až po koncentraci $1 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. V rámci této studie byl pozorován stimulační vliv IAA na elongaci kořenů v rámci koncentrací IAA $1 \text{ pmol}\cdot\text{l}^{-1}$ a $10 \text{ pmol}\cdot\text{l}^{-1}$. Při koncentraci IAA $0,1 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ byl pozorován pouze mírný stimulační účinek, přičemž při koncentracích IAA vyšších než $50 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ byl již zaznamenán výrazný inhibiční efekt na růst kořenů. Tato zjištění víceméně souhlasí s výsledky studie, která byla provedena na kukuřici (Edelmann, 2022). Edelmann (2022) popisuje, že při koncentracích IAA vyšších než $50 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ dochází k signifikantnímu poklesu růstu kořenů u kukuřice. Při koncentraci $1 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a vyšší již dochází k poruchám růstu kořene, které jsou doprovázeny zvětšením obvodu buněk v elongační zóně kořene. IAA je fytohormon, který se běžně v rostlinách nachází ve velmi nízkých koncentracích, a proto může mít při exogenním dodání jeho vysoká hladina negativní důsledky na růst kořene (Thimann, 1939). Při dané koncentrační škále IAA nebyl pozorován jednoznačný vliv auxinu na délku prýtlů. To může být zapříčiněno faktem, že kořeny obilovin jsou senzitivnější vůči IAA než listy a reagují tedy již při nižších koncentracích. Tuto domněnku potvrzuje studie Breviario *et al.* (1992), ve které bylo zjištěno, že koncentrace $10 \text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ IAA má stimulační efekt na růst apikálních segmentů koleoptile u rýže. Z toho vyplývá, že pro sledování stimulačního vlivu IAA na růst prýtu by musela být zvolena koncentrační škála s vyššími koncentracemi tohoto fytohormonu.

Inhibiční efekt na růst kořene při hladině IAA $500 \text{ nmol}\cdot\text{l}^{-1}$ byl zaznamenán nejen u WT linie, ale u mutantů *itpk1-2* a *itpk1-33* (viz Graf 2d) což naznačuje, že schopnost obou *itpk1* mutantů vnímat exogenně aplikovaný auxin IAA nebyla narušena. Fenotyp mutantů *itpk1-2* a *itpk1-33* se značně lišil i při kontrolních podmínkách, což souhlasí se zjištěním studie Jiang, *et al.* (2019c), že různé typy mutací daného genu mohou vést k rozdílným fenotypům rostlin a ovlivňovat genovou funkci. Mutant *itpk1-33* vždy dosahoval v daných podmínkách experimentu nejnižších délek kořenů v porovnání s WT a *itpk1-2* a jednalo se o stabilní fenotypový znak této linie. Obecně mutant *itpk1-2* dosáhl obdobných průměrných délek kořenů ve srovnání s WT linií a v případě ovlivnění $1 \text{ pmol}\cdot\text{l}^{-1}$ IAA průměrnou délkou WT linie dokonce signifikantně převýšil (viz Graf 2b).

V této práci byla stanovena exprese vybraných *Aux/IAA* genů a genů pro kinasy ITPK1–ITPK6 a MIPS. Zjištěná účinnost oligomerů pro sledované geny pomocí kalibračních křivek nedosahovala požadovaných parametrů $E=100\pm 10 \%$, proto byl k výpočtu relativní změny exprese cílových genů použit vzorec dle Pfaffla (2001). Jako referenční gen byl zvolen *EF1a*. Hua *et al.* (2015) uvádí, že *EF1a* je optimální referenční gen se stabilním expresním profilem, a proto je vhodný ke stanovování exprese

cílových genů napříč různými typy vzorků. Gen *Actin2* se ukázal dle Hua *et al.* (2015) pro tento účel jako méně vhodný, a proto nebyl použit.

Aux/IAA geny náleží do skupiny primárních auxin-responzivních genů, které reagují na auxin jako první, a proto jsou podstatnou součástí auxinové signalizační kaskády (Luo *et al.*, 2018). ITPK jsou klíčové enzymy zapojené převážně v homeostáze fosforu, ale některé jejich funkce souvisí také s auxinovou signalizací (Laha *et al.*, 2020; Zong *et al.*, 2022). U genotypů WT, *itpk1-2* a *itpk1-33* byla zaznamenána konstantní či mírně snížená exprese *Aux/IAA* genů po ovlivnění 500nM IAA. K výraznému snížení exprese došlo v rámci genů *IAA27* a *IAA19* u genotypu *itpk1-33*. V této práci byl pozorován efekt, kdy delece (-G) ne však adice (+A) v genu *ITPK1* vedla k výraznému snížení exprese *IAA27* a *IAA19*. Toto zjištění může naznačovat, že se *HvITPK1* určitým způsobem účastní transdukce auxinového signálu. Souhrnně dosahoval mutant *itpk1-33* nejnižší exprese *Aux/IAA* genů v porovnání s ostatními genotypy. Jain *et al.* (2006), Li *et al.* (2020) a Ali *et al.* (2022) konstatují, že u rostlin je exprese daných *Aux/IAA* genů specifická pro konkrétní pletiva. Ve studii Jain *et al.* (2006) uskutečněné na rýži byla testována exprese *Aux/IAA* genů v segmentech koleoptile po aplikaci syntetického auxinu 2,4-D o koncentraci 30 μ M. U většiny *Aux/IAA* genů byla po ovlivnění 30 μ M 2,4-D zaznamenána konstantní exprese. Došlo zde však k výraznému zvýšení exprese několika málo *Aux/IAA* genů. V rámci této studie expresních profilů *Aux/IAA* genů provedené na kořenech ječmene po ovlivnění 500 nM IAA byla také exprese většiny těchto genů konstantní napříč genotypy. Nebyl však pozorován žádný případ intenzivního zvýšení exprese, ale spíše docházelo k jejímu poklesu. Možným důvodem, proč byla exprese *Aux/IAA* genů snížena po ovlivnění 500nM IAA by mohla být právě použitá vysoká koncentrace IAA, která měla pozorovatelné inhibiční účinky na růst kořenů. V rámci této práce byly stanovovány expresní profily pouze u 7 vybraných z celkových 36 *Aux/IAA* genů ječmene. Je možné, že jiné *Aux/IAA*, které nebyly zahrnuty v této studii, mohou mít pro kořeny specifickou signifikantně vyšší expresi po ovlivnění danou hladinou IAA.

V této práci byla pozorována stabilní míra exprese *HvITPK1* a *HvITPK4* po ovlivnění 500nM IAA u obou mutantů *itpk1-2* a *itpk1-33*. Naproti tomu u WT linie exprese *HvITPK1* po ovlivnění 500nM IAA dosahovala přibližně 50 % původní úrovně oproti oběma mutantům. U *HvITPK4* byla exprese u WT linie na přibližně 80 % původní úrovně. Vysvětlením stabilní exprese *HvITPK1* u obou mutantů může být reakce na změnu funkce tohoto genu v důsledku přítomnosti mutace. *HvITPK4* je nejbližším homologem *HvITPK1*, což může být částečné vysvětlení podobných expresních profilů. Není vyloučeno, že zvýšení exprese *HvITPK4* u obou mutantů bylo způsobeno parciálním výpadkem funkce *HvITPK1*. Laha *et al.* (2020) popsal expresi *AtITPK1* a *AtITPK2* v různých typech pletiv. Byla pozorována zvýšená exprese těchto genů v kořenech u WT linie *A. thaliana*. Vlčko *et al.* (2020) popsal vliv salinity na změnu exprese genů *HvITPK1-6* u kořenů a prýtlů ječmene. Autoři zde ukázali, že při ovlivnění 200mM NaCl se exprese *HvITPK1* u WT linie zvyšuje v kořenech. U mutantů *itpk1-2* a *itpk1-33* nedošlo při salinitě k signifikantnímu zvýšení exprese *ITPK1* v kořenech. Obdobně

tomu bylo u obou mutantů po ovlivnění 500 nM IAA. Zatímco u WT linie bylo zaznamenáno zvýšení exprese v reakci na salinitu tak v případě ovlivnění 500 nM IAA exprese mírně poklesla. Tato zjištění poskytla důkaz, že ani jeden typ mutace nevedl k supresi transkripce genu *HvITPK1* v kořenech ječmene po ovlivnění 500 nM IAA. Z genů pro *ITPK* kinasy vykazoval napříč všemi genotypy nejnižší expresi po ovlivnění 500nM IAA gen *HvITPK5*. Mírné zvýšení exprese genu *HvITPK2* po ovlivnění 500nM IAA bylo zaznamenáno pouze v rámci WT linie. Expresní profily *HvITPK* genů mohou do jisté míry souviset s jejich funkcí a účastní v auxinové signalizaci.

V této práci byl testován vztah mutantních alel +A a -G genu *ITPK1* srovnáním fenotypu bialelického mutantu +A/-G s homozygoty +A/+A a -G/-G. Ukázalo se, že bialelický mutant se významně liší v průměrné délce kořene od homozygota -G/-G a zároveň nebyl zaznamenán významný rozdíl v průměrné délce kořene u bialelického mutantu a homozygota +A/+A. Z toho vyplývá, že mutantní alela +A je dominantní nad mutantní alelou -G.

7 ZÁVĚR

Tato práce si kladla za cíl stanovit minimální inhibiční hladinu IAA a vyhodnotit účinek IAA ve vybraných koncentracích na růst WT rostlin ječmene. Dále popsat fenotypy mutantních linií *itpk1-2* a *itpk1-33* při ovlivnění IAA ve vybraných hladinách. Stanovit metodou qRT-PCR expresi *Aux/IAA* genů a genů pro kinasy ITPK1–ITPK6 a MIPS u WT i mutantních linií po ovlivnění 500nM IAA.

Na základě optimalizačního experimentu s koncentrační škálou IAA byl pozorován při hladinách 50 nM IAA a vyšších výraznější inhibiční efekt na elongaci kořene. Analýzou mutantních linií *itpk1-2* a *itpk1-33* bylo zjištěno, že odlišné mutace genu *ITPK1* vedou k rozdílným fenotypovým projevům.

Inhibiční hladina 500nM IAA podle očekávání zapříčinila snížení exprese *Aux/IAA* genů v kořenech napříč genotypy, přičemž nejnižší exprese *Aux/IAA* genů byla zaznamenána u linie *itpk1-33*. U mutantů *itpk1-2* a *itpk1-33* byla paradoxně pozorována stabilní exprese *HvITPK1* a *HvITPK4* na rozdíl od WT linie. Tato práce podala důkaz, že exprese některých genů ITPK kinas může být částečně ovlivněna IAA, což naznačuje zapojení těchto genů v regulaci auxinové signalizace v kořenech ječmene.

V této práci byla fenotypovou analýzou bialelického mutantu +A/–G stanovena dominance mutantní alely +A nad mutantní alelou –G.

Jsem přesvědčen, že tato práce podnítí další výzkum v této oblasti. Dalším možným trendem by byl výzkum vlivu jiných fytohormonů na fenotyp mutantních linií *itpk1-2* a *itpk1-33*. Expres sledovaných genů může být specifická pro různá pletiva a silně závisí na fyziologickém stavu rostliny. Proto by mohla být v budoucnosti stanovena exprese těchto genů i v jiných pletivech ječmene, při jiných koncentracích IAA či s použitím jiného fytohormonu (případně jejich kombinace).

8 LITERATURA

- Aggarwal, S., Shukla, V., Bhati, K. K., Kaur, M., Sharma, S., Singh, A., Mantri, S., Pandey, A. K. (2015). Hormonal Regulation and Expression Profiles of Wheat Genes Involved during Phytic Acid Biosynthesis Pathway. *Plants (Basel)* 4(2): 298–319. doi: 10.3390/plants4020298
- Ali, S., Wang, W., Zhang, Z., Xie, L., Boer, D. R., Khan, N. (2022). Genome-Wide Identification, Expression and Interaction Analysis of *ARF* and *AUX/IAA* Gene Family in Soybean. *Frontiers in Bioscience (Landmark Ed)* 27(8): 251. doi: 10.31083/j.fbl2708251
- Arase, F., Nishitani, H., Egusa, M., Nishimoto, N., Sakurai, S., Sakamoto, N., Kaminaka, H. (2012). IAA8 involved in lateral root formation interacts with the TIR1 auxin receptor and ARF transcription factors in Arabidopsis. *PLoS One* 7(8): e43414. doi: 10.1371/journal.pone.0043414
- Asif, R., Yasmin, R., Mustafa, M., Ambreen, A., Mazhar, M., Rehman, A., Umbreen, S., Ahmad, M. (2022). Phytohormones as Plant Growth Regulators and Safe Protectors against Biotic and Abiotic Stress. In: Hano, C., (ed.) *Plant Hormones – Recent Advances, New Perspectives and Applications*. doi: 10.5772/intechopen.102832
- Baik, B. K., Ullrich, S. E. (2008). Barley for food: Characteristics, improvement, and renewed interest. *Journal of Cereal Science* 48(2): 233–242. doi: 10.1016/j.jcs.2008.02.002
- Bajguz, A., Hayat, S. (2009). Effects of brassinosteroids on the plant responses to environmental stresses. *Plant Physiology and Biochemistry* 47: 1–8. doi: 10.1016/j.plaphy.2008.10.002
- Bajguz, A., Chmur, M., Gruszka, D. (2020). Comprehensive Overview of the Brassinosteroid Biosynthesis Pathways: Substrates, Products, Inhibitors, and Connections. *Frontiers in Plant Science* 11: 1034. doi: 10.3389/fpls.2020.01034
- Balzan, S., Johal, G. S., Carraro, N. (2014). The role of auxin transporters in monocots development. *Frontiers in Plant Science* 5: 393. doi: 10.3389/fpls.2014.00393
- Bari, R., Datt Pant, B., Stitt, M., Scheible, W. R. (2006). PHO2, microRNA399, and PHR1 define a phosphate-signaling pathway in plants. *Plant Physiology* 141(3): 988–99. doi: 10.1104/pp.106.079707
- Barrero, J. M., Downie, A. B., Xu, Q., Gubler, F. (2014). A Role for Barley CRYPTOCHROME1 in Light Regulation of Grain Dormancy and Germination. *The Plant Cell* 26(3): 1094–1104. doi: 10.1105/tpc.113.121830

- Baudry, A., Ito, S., Song, Y. H., Strait, A. A., Kiba, T., Lu, S., Kay, S. A. (2010). F-box proteins FKF1 and LKP2 act in concert with ZEITLUPE to control Arabidopsis clock progression. *The Plant Cell* 22: 606–622. doi: 10.1105/tpc.109.072843
- Belgaroui, N., Lacombe, B., Rouached, H., Hanin, M. (2018). Phytase overexpression in Arabidopsis improves plant growth under osmotic stress and in combination with phosphate deficiency. *Scientific Reports* 8(1): 1137. doi: 10.1038/s41598-018-19493-w
- Bhati, K. K., Aggarwal, S., Sharma, S., Mantri, S., Singh, S. P., Bhalla, S., Kaur, J., Tiwari, S., Roy, J. K., Tuli, R., Pandey, A. K. (2014). Differential expression of structural genes for the late phase of phytic acid biosynthesis in developing seeds of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Science* 224: 74–85. doi: 10.1016/j.plantsci.2014.04.009
- Bhosale, R., Giri, J., Pandey, B. K., Giehl, R. F. H., Hartmann, A., Traini, R., Truskina, J., Leftley, N., Hanlon, M., Swarup, K., Rashed, A., Voß, U., Alonso, J., Stepanova, A., Yun, J., Ljung, K., Brown, K. M., Lynch, J. P., Dolan, L., Vernoux, T., Bishopp, A., Wells, D., von Wirén, N., Bennett, M. J., Swarup, R. (2018). A mechanistic framework for auxin dependent Arabidopsis root hair elongation to low external phosphate. *Nature Communications* 9(1): 1818. doi: 10.1038/s41467-018-04281-x
- Biyashev, R. M., Ragab, R. A., Maughan, P. J., Maroof, M. A. S. (1997). Molecular Mapping, Chromosomal Assignment, and Genetic Diversity Analysis of Phytochrome Loci in Barley (*Hordeum vulgare*). *Journal of Heredity* 88: 21–26. doi: 10.1093/oxfordjournals.jhered.a023050
- Breitel, D. A., Chappell-Maor, L., Meir, S., Panizel, I., Puig, C. P., Hao, Y., Yifhar, T., Yasuor, H., Zouine, M., Bouzayen, M., Granell Richart, A., Rogachev, I., Aharoni, A. (2016). AUXIN RESPONSE FACTOR 2 Intersects Hormonal Signals in the Regulation of Tomato Fruit Ripening. *PLoS Genetics* 12(3): e1005903. doi: 10.1371/journal.pgen.1005903
- Breviario, D., Gianì, S., Di Vietri, P., Coraggio, I. (1992). Auxin and growth regulation of rice coleoptile segments: molecular analysis. *Plant Physiology* 98(2): 488–95. doi: 10.1104/pp.98.2.488.
- Calderón Villalobos, L. I., Lee, S., De Oliveira, C., Ivetac, A., Brandt, W., Armitage, L., Sheard, L. B., Tan, X., Parry, G., Mao, H., Zheng, N., Napier, R., Kepinski, S., Estelle, M. (2012). A combinatorial TIR1/AFB-Aux/IAA co-receptor system for differential sensing of auxin. *Nature Chemical Biology* 8(5): 477–85. doi: 10.1038/nchembio.926
- Campos, M. L., Yoshida, Y., Major, I. T., de Oliveira Ferreira, D., Weraduwege, S. M., Froehlich, J. E., Johnson, B. F., Kramer, D. M., Jander, G., Sharkey, T. D., Howe, G. A. (2016). Rewiring of jasmonate and phytochrome B signalling uncouples plant growth-defense tradeoffs. *Nature Communications* 7: 12570. doi: 10.1038/ncomms12570

- Cao, M., Chen, R., Li, P., Yu, Y., Zheng, R., Ge, D., Zheng, W., Wang, X., Gu, Y., Gelová, Z., Friml, J., Zhang, H., Liu, R., He, J., Xu, T. (2019). TMK1-mediated auxin signalling regulates differential growth of the apical hook. *Nature* 568: 240–243. doi: 10.1038/s41586-019-1069-7
- Colón-Carmona, A., Chen, D. L., Yeh, K. C., Abel, S. (2000). Aux/IAA proteins are phosphorylated by phytochrome in vitro. *Plant Physiology* 124(4): 1728–38. doi: 10.1104/pp.124.4.1728
- Cominelli, E., Pilu, R., Sparvoli, F. (2020). Phytic Acid and Mineral Biofortification Strategies: From Plant Science to Breeding and Biotechnological Approaches. *Plants (Basel)* 9(5): 553. doi: 10.3390/plants9050553
- Coulibaly, A., Kouakou, B., Chen, J. (2011). Phytic Acid in Cereal Grains: Structure, Healthy or Harmful Ways to Reduce Phytic Acid in Cereal Grains and Their Effects on Nutritional Quality. *American Journal of Plant Nutrition and Fertilization Technology* 1(1): 1–22. doi: 10.3923/ajpnft.2011.1.22
- Danquah, A., Colcombet, J., Hirt, H. (2013). The role of ABA and MAPK signaling pathways in plant abiotic stress responses. *Biotechnology Advances* 32: 6. doi: 10.1016/j.biotechadv.2013.09.006
- de Jong, M., Wolters-Arts, M., García-Martínez, J. L., Mariani, C., Vriezen, W. H. (2011). The *Solanum lycopersicum* AUXIN RESPONSE FACTOR 7 (SIARF7) mediates cross-talk between auxin and gibberellin signalling during tomato fruit set and development. *Journal of Experimental Botany* 62(2): 617–26. doi: 10.1093/jxb/erq293
- Depuydt, S., Hardtke, C. S. (2011). Hormone signalling crosstalk in plant growth regulation. *Current Biology* 21(9): R365–73. doi: 10.1016/j.cub.2011.03.013
- Di, D. W., Zhang, C., Guo, G. Q. (2015). Involvement of secondary messengers and small organic molecules in auxin perception and signaling. *Plant Cell Reports* 34(6): 895–904. doi: 10.1007/s00299-015-1767-z
- Dohmann, E. M., Kuhnle, C., Schwechheimer, C. (2005). Loss of the CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC9 signalosome subunit 5 is sufficient to cause the *cop/det/fus* mutant phenotype in Arabidopsis. *The Plant Cell* 17(7): 1967–78. doi: 10.1105/tpc.105.032870
- Dohmann, E. M., Levesque, M. P., De Veylder, L., Reichardt, I., Jürgens, G., Schmid, M., Schwechheimer, C. (2008b). The Arabidopsis COP9 signalosome is essential for G2 phase progression and genomic stability. *Development (Cambridge, England)* 135(11): 2013–22. doi: 10.1242/dev.020743
- Dohmann, E. M., Levesque, M. P., Isono, E., Schmid, M., Schwechheimer, C. (2008a). Auxin responses in mutants of the Arabidopsis CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC 9 signalosome. *Plant Physiology* 147(3): 1369–79. doi: 10.1104/pp.108.121061

- Dong, J., Ma, G., Sui, L., Wei, M., Satheesh, V., Zhang, R., Ge, S., Li, J., Zhang, T. E., Wittwer, C., Jessen, H. J., Zhang, H., An, G. Y., Chao, D. Y., Liu, D., Lei, M. (2019). Inositol Pyrophosphate InsP8 Acts as an Intracellular Phosphate Signal in Arabidopsis. *Molecular Plant* 12(11): 1463–1473. doi: 10.1016/j.molp.2019.08.002
- Doyle, S. M., Rigal, A., Grones, P., Karady, M., Barange, D. K., Majda, M., Pařízková, B., Karampelias, M., Zwiewka, M., Pěňčík, A., Almqvist, F., Ljung, K., Novák, O., Robert, S. (2019). A role for the auxin precursor anthranilic acid in root gravitropism via regulation of PIN-FORMED protein polarity and relocalisation in Arabidopsis. *New Phytologist* 223(3): 1420–1432. doi: 10.1111/nph.15877
- Du, H., Liu, L., You, L., Yang, M., He, Y., Li, X., Xiong, L. (2011). Characterization of an inositol 1,3,4-trisphosphate 5/6-kinase gene that is essential for drought and salt stress responses in rice. *Plant Molecular Biology* 7(6): 547–63. doi: 10.1007/s11103-011-9830-9
- Durbak, A., Yao, H., McSteen, P. (2012). Hormone signaling in plant development. *Current Opinion in Plant Biology* 15(1): 92–6. doi: 10.1016/j.pbi.2011.12.004
- Edelmann, H.G. (2022). Plant root development: is the classical theory for auxin-regulated root growth false? *Protoplasma* 259: 823–832. doi: 10.1007/s00709-021-01697-z
- Escobar-Bravo, R., Klinkhamer, P. G. L., Leiss, K. A. (2017). Interactive Effects of UV-B Light with Abiotic Factors on Plant Growth and Chemistry, and Their Consequences for Defense against Arthropod Herbivores. *Frontiers in Plant Science* 8. doi: 10.3389/fpls.2017.00278
- Farag, M. A., Xiao, J., Abdallah, H. M. (2022). Nutritional value of barley cereal and better opportunities for its processing as a value-added food: a comprehensive review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 62(4): 1092–1104. doi: 10.1080/10408398.2020.1835817
- Felizardo, M. P., Freire, J. T. (2018). Characterization of barley grains in different levels of pearling process. *Journal of Food Engineering* 232: 29–35. doi: 10.1016/j.jfoodeng.2018.03.017
- Feng, S., Ma, L., Wang, X., Xie, D., Dinesh-Kumar, S.P., Wei, N., Deng, X.W. (2003). The COP9 Signalosome Interacts Physically with SCFCO11 and Modulates Jasmonate Responses. *The Plant Cell* 15: 1083–1094. doi: 10.1105/tpc.010207
- Feng, S., Martinez, C., Gusmaroli, G., Wang, Y., Zhou, J., Wang, F., Chen, L., Yu, L., Iglesias-Pedraz, J. M., Kircher, S., Schäfer, E., Fu, X., Fan, L. M., Deng, X. W. (2008). Coordinated regulation of *Arabidopsis thaliana* development by light and gibberellins. *Nature* 451(7177): 475–9. doi: 10.1038/nature06448

- Fileppi, M., Galasso, I., Tagliabue, G., Daminati, M., Campion, B., Doria, E., Sparvoli, F. (2010). Characterisation of structural genes involved in phytic acid biosynthesis in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Molecular Breeding* 25: 453–470. doi: 10.1007/s11032-009-9344-1
- Freire-Rios, A., Tanaka, K., Crespo, I., van der Wijk, E., Sizentsova, Y., Levitsky, V., Lindhoud, S., Fontana, M., Hohlbein, J., Boer, D. R., Mironova, V., Weijers, D. (2020). Architecture of DNA elements mediating ARF transcription factor binding and auxin-responsive gene expression in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 117(39): 24557–24566. doi: 10.1073/pnas.2009554117
- Galli, M., Liu, Q., Moss, B. L., Malcomber, S., Li, W., Gaines, C., Federici, S., Roshkovan, J., Meeley, R., Nemhauser, J. L., Gallavotti, A. (2015). Auxin signaling modules regulate maize inflorescence architecture. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 112(43): 13372–7. doi: 10.1073/pnas.1516473112
- Gomes, G. L. B., Scortecci, K. C. (2021). Auxin and its role in plant development: structure, signalling, regulation and response mechanisms. *Plant Biology (Stuttgart, Germany)* 23(6): 894–904. doi: 10.1111/plb.13303
- Gulabani, H., Goswami, K., Walia, Y., Roy, A., Noor, J. J., Ingole, K. D., Kasera, M., Laha, D., Giehl, R. F. H., Schaaf, G., Bhattacharjee, S. (2022). *Arabidopsis* inositol polyphosphate kinases IPK1 and ITPK1 modulate crosstalk between SA-dependent immunity and phosphate-starvation responses. *Plant Cell Reports* 41(2): 347–363. doi: 10.1007/s00299-021-02812-3
- Guseman, J. M., Hellmuth, A., Lanctot, A., Feldman, T. P., Moss, B. L., Klavins, E., Calderón Villalobos, L. I., Nemhauser, J. L. (2015). Auxin-induced degradation dynamics set the pace for lateral root development. *Development* 142(5): 905–9. doi: 10.1242/dev.117234
- Gusmaroli, G., Figueroa, P., Serino, G., Deng, X. W. (2007). Role of the MPN subunits in COP9 signalosome assembly and activity, and their regulatory interaction with *Arabidopsis* Cullin3-based E3 ligases. *The Plant Cell* 19(2): 564–81. doi: 10.1105/tpc.106.047571
- Gyula, P., Schäfer, E., Nagy, F. (2003). Light perception and signalling in higher plants. *Current Opinion in Plant Biology* 6: 446–452. doi: 10.1016/S1369-5266(03)00082-7
- Halimi, Y., Dessau, M., Pollak, S., Ast, T., Erez, T., Livnat-Levanon, N., Karniol, B., Hirsch, J. A., Chamovitz, D. A. (2011). COP9 signalosome subunit 7 from *Arabidopsis* interacts with and regulates the small subunit of ribonucleotide reductase (RNR2). *Plant Molecular Biology* 77(1–2): 77–89. doi: 10.1007/s11103-011-9795-8
- Halliday, K. J., Martínez-García, J. F., Josse, E. M. (2009). Integration of light and auxin signaling. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 1(6): a001586. doi: 10.1101/cshperspect.a001586

- Hardtke, C. S., Berleth, T. (1998). The Arabidopsis gene MONOPTEROS encodes a transcription factor mediating embryo axis formation and vascular development. *EMBO Journal* 17(5): 1405–11. doi: 10.1093/emboj/17.5.1405
- Havens, K. A., Guseman, J. M., Jang, S. S., Pierre-Jerome, E., Bolten, N., Klavins, E., Nemhauser, J. L. (2012). A synthetic approach reveals extensive tunability of auxin signaling. *Plant Physiology* 160(1): 135–42. doi: 10.1104/pp.112.202184
- Hayashi, K. (2012). The interaction and integration of auxin signaling components. *Plant and Cell Physiology* 53(6): 965–75. doi: 10.1093/pcp/pcs035
- Hind, S. R., Pulliam, S. E., Veronese, P., Shantharaj, D., Nazir, A., Jacobs, N. S., Stratmann, J. W. (2011). The COP9 signalosome controls jasmonic acid synthesis and plant responses to herbivory and pathogens. *Plant Journal* 65(3): 480–91. doi: 10.1111/j.1365-313X.2010.04437.x
- Holme, I. B., Dionisio, G., Brinch-Pedersen, H., Wendt, T., Madsen, C. K., Vincze, E., Holm, P. B. (2012). Cisgenic barley with improved phytase activity. *Plant Biotechnology Journal* 10(2): 237–47. doi: 10.1111/j.1467-7652.2011.00660.x
- Horváth, E., Pál, M., Szalai, G., Páldi, E., Janda, T. (2007). Exogenous 4-hydroxybenzoic acid and salicylic acid modulate the effect of short-term drought and freezing stress on wheat plants. *Biologia Plantarum* 51: 480–487. doi: 10.1007/s10535-007-0101-1
- Hua, W., Zhu, J., Shang, Y., Wang, J., Jia, Q., Yang, J. (2015). Identification of Suitable Reference Genes for Barley Gene Expression Under Abiotic Stresses and Hormonal Treatments. *Plant Molecular Biology Reporter* 33: 1002–1012. doi: 10.1007/s11105-014-0807-0
- Huang, H., Quint, M., Gray, W. M. (2013). The *eta7/csn3-3* auxin response mutant of Arabidopsis defines a novel function for the CSN3 subunit of the COP9 signalosome. *PLoS One* 8(6): e66578. doi: 10.1371/journal.pone.0066578
- Chaves, I., Pokorny, R., Byrdin, M., Hoang, N., Ritz, T., Brettel, K., Essen, L. O., Horst, G. T. J. van der., Batschauer, A., Ahmad, M. (2011). The cryptochromes: blue light photoreceptors in plants and animals. *Annual Review of Plant Biology* 62: 335–364. doi: 10.1146/annurev-arplant-042110-103759
- Chen, H., Ma, B., Zhou, Y., He, S. J., Tang, S. Y., Lu, X., Xie, Q., Chen, S. Y., Zhang, J. S. (2018). E3 ubiquitin ligase SOR1 regulates ethylene response in rice root by modulating stability of Aux/IAA protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 115(17): 4513–4518. doi: 10.1073/pnas.1719387115
- Chen, H., Xiong, L. (2009). Localized auxin biosynthesis and postembryonic root development in Arabidopsis. *Plant Signaling & Behavior* 4(8): 752–4. doi: 10.1007/s00425-009-0

- Cheng, Z. J., Wang, L., Sun, W., Zhang, Y., Zhou, C., Su, Y. H., Li, W., Sun, T. T., Zhao, X. Y., Li, X. G., Cheng, Y., Zhao, Y., Xie, Q., Zhang, X. S. (2013). Pattern of auxin and cytokinin responses for shoot meristem induction results from the regulation of cytokinin biosynthesis by AUXIN RESPONSE FACTOR3. *Plant Physiology* 161(1): 240–51. doi: 10.1104/pp.112.203166
- Choi, H. S., Seo, M., Cho, H. T. (2018). Two TPL-Binding Motifs of ARF2 Are Involved in Repression of Auxin Responses. *Frontiers in Plant Science* 9: 372. doi: 10.3389/fpls.2018.00372
- Christians, M. J., Robles, L. M., Zeller, S. M., Larsen, P. B. (2008). The *eer5* mutation, which affects a novel proteasome-related subunit, indicates a prominent role for the COP9 signalosome in resetting the ethylene-signaling pathway in Arabidopsis. *Plant Journal* 55(3): 467–77. doi: 10.1111/j.1365-313X.2008.03521.x
- Jain, M., Kaur, N., Garg, R., Thakur, J. K., Tyagi, A. K., Khurana, J. P. (2006). Structure and expression analysis of early auxin-responsive *Aux/IAA* gene family in rice (*Oryza sativa*). *Functional and Integrative Genomics* 6(1): 47–59. doi: 10.1007/s10142-005-0005-0
- Jia, Q., Kong, D., Li, Q., Sun, S., Song, J., Zhu, Y., Liang, K., Ke, Q., Lin, W., Huang, J. (2019). The Function of Inositol Phosphatases in Plant Tolerance to Abiotic Stress. *International Journal of Molecular Sciences* 20(16): 3999. doi: 10.3390/ijms20163999
- Jiang, J., Xiao, Y., Chen, H., Hu, W., Zeng, L., Ke, H., Ditengou, F. A., Devisetty, U., Palme, K., Maloof, J., Dehesh, K. (2020). Retrograde Induction of phyB Orchestrates Ethylene-Auxin Hierarchy to Regulate Growth. *Plant Physiology* 183(3):1268–1280. doi: 10.1104/pp.20.00090
- Jiang, J., Zeng, L., Ke, H., Cruz, B. D. L., Dehesh, K. (2019a). Orthogonal regulation of phytochrome B abundance by stress-specific plastidial retrograde signaling metabolite. *Nature Communications* 10: 2904. doi: 10.1038/s41467-019-10867-w
- Jiang, M., Hu, H., Kai, J., Traw, M. B., Yang, S., Zhang, X. (2019c). Different knockout genotypes of *OsIAA23* in rice using CRISPR/Cas9 generating different phenotypes. *Plant Molecular Biology* 100(4–5): 467–479. doi: 10.1007/s11103-019-00871-5
- Jiang, M., Liu, Y., Liu, Y., Tan, Y., Huang, J., Shu, Q. (2019b). Mutation of Inositol 1,3,4-trisphosphate 5/6-kinase6 Impairs Plant Growth and Phytic Acid Synthesis in Rice. *Plants (Basel)* 8(5): 114. doi: 10.3390/plants8050114
- Jin, D., Wu, M., Li, B., Bücker, B., Keil, P., Zhang, S., Li, J., Kang, D., Liu, J., Dong, J., Deng, X. W., Irish, V., Wei, N. (2018). The COP9 Signalosome regulates seed germination by facilitating protein degradation of RGL2 and ABI5. *PLoS Genetics* 14: e1007237. doi: 10.1371/journal.pgen.1007237

- Ju Im, Y., Phillippy, B. Q., Perera, I. Y. (2009). InsP3 in plant cells. *Plant Cell Monographs* 16: 145–160. doi:10.1007/978-3-642-03873-0_10
- Jung, H., Lee, D. K., Choi, Y. D., Kim, J. K. (2015). *OsIAA6*, a member of the rice *Aux/IAA* gene family, is involved in drought tolerance and tiller outgrowth. *Plant Science* 236: 304–12. doi: 10.1016/j.plantsci.2015.04.018
- Kalluri, U. C., DiFazio, S. P., Brunner, A. M. & Tuskan, G. A. (2007). Genome-wide analysis of *Aux/IAA* and *ARF* gene families in *Populus trichocarpa*. *BMC Plant Biology* 7: 59. doi: 10.1186/1471-2229-7-59
- Karmakar, A., Bhattacharya, S., Sengupta, S., Ali, N., Sarkar, S. N., Datta, K., Datta, S. K. (2020). RNAi-Mediated Silencing of *ITPK* Gene Reduces Phytic Acid Content, Alters Transcripts of Phytic Acid Biosynthetic Genes, and Modulates Mineral Distribution in Rice Seeds. *Rice Science* 27(4): 315–328. doi: 10.1016/j.rsci.2020.05.007
- Kim, B. C., Soh, M. C., Kang, B. J., Furuya, M., Nam, H. G. (1996). Two dominant photomorphogenic mutations of *Arabidopsis thaliana* identified as suppressor mutations of *hy2*. *Plant Journal* 9(4): 441–56. doi: 10.1046/j.1365-313x.1996.09040441.x
- Kim, T. H., Kim, B. H., von Arnim, A. G. (2002). Repressors of photomorphogenesis. *International Review of Cytology* 220: 185-223. doi: 10.1016/s0074-7696(02)20006-6
- Kim, W. Y., Fujiwara, S., Suh, S. S., Kim, J., Kim, Y., Han, L., David, K., Putterill, J., Nam H. G., Somers, D. E. (2007). ZEITLUPE is a circadian photoreceptor stabilized by GIGANTEA in blue light. *Nature* 449(7160):356–60. doi: 10.1038/nature06132
- Klose, C., Viczián, A., Kircher, S., Schäfer, E., Nagy, F. (2015). Molecular mechanisms for mediating light-dependent nucleocytoplasmic partitioning of phytochrome photoreceptors. *New Phytologist* 206: 965–971. doi: 10.1111/nph.13207
- Kramer, E. M., Ackelsberg, E. M. (2015). Auxin metabolism rates and implications for plant development. *Frontiers in Plant Science* 6:150. doi: 10.3389/fpls.2015.00150
- Kuo, H. F., Hsu, Y. Y., Lin, W. C., Chen, K. Y., Munnik, T., Brearley, C. A., Chiou, T. J. (2018). *Arabidopsis* inositol phosphate kinases *IPK1* and *ITPK1* constitute a metabolic pathway in maintaining phosphate homeostasis. *Plant Journal* 95: 613–630. doi: 10.1111/tpj.13974
- Laha, D., Kamleitner, M., Johnen, P., Schaaf, G. (2021). Analyses of Inositol Phosphates and Phosphoinositides by Strong Anion Exchange (SAX)-HPLC. *Methods in Molecular Biology* 2295: 365–378. doi: 10.1007/978-1-0716-1362-7_20

- Laha, D., Parvin, N., Hofer, A., Giehl, R. F. H., Fernandez-Rebollo, N., von Wirén, N., Saiardi, A., Jessen, H. J., Schaaf, G. (2019). Arabidopsis ITPK1 and ITPK2 Have an Evolutionarily Conserved Phytic Acid Kinase Activity. *ACS Chemical Biology* 14(10): 2127–2133. doi: 10.1021/acscchembio.9b00423
- Laha, N. P., Dhir, Y. W., Giehl, R. F. H., Schäfer, E. M., Gaugler, P., Shishavan, Z. H., Gulabani, H., Mao, H., Zheng, N., von Wirén, N., Jessen, H. J., Saiardi, A., Bhattacharjee, S., Laha, D., Schaaf, G. (2020). ITPK1-Dependent Inositol Polyphosphates Regulate Auxin Responses in *Arabidopsis thaliana*. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* (bioRxiv)^[preprint] doi: 10.1101/2020.04.23.058487
- Lariguet, P., Schepens, I., Hodgson, D., Pedmale, U. V., Trevisan, M., Kami, C., Carbonnel, M. de, Alonso, J. M., Ecker, J. R., Liscum, E., Fankhauser, C. (2006). PHYTOCHROME KINASE SUBSTRATE 1 is a phototropin 1 binding protein required for phototropism. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 103 (26): 10134–10139. doi: 10.1073/pnas.060379910
- Larson, S., Young, K., Cook, A., Blake, T. K., Raboy, V. (1998). Linkage mapping of two mutations that reduce phytic acid content of barley grain. *Theoretical and Applied Genetics* 97: 141–146. doi: 10.1007/s001220050878
- Lavy, M., Estelle, M. (2016). Mechanisms of auxin signaling. *Development* 143(18): 3226–9. doi: 10.1242/dev.131870
- Leivar, P., Monte, E. (2014). PIFs: systems integrators in plant development. *The Plant Cell* 26: 56–78. doi: 10.1105/tpc.113.120857
- Leyser, O. (2018). Auxin Signaling. *Plant Physiology* 176(1): 465–479. doi: 10.1104/pp.17.00765
- Li, G., Ye, Y. X., Ren, X. Q., Qi, M. Y., Zhao, H. Y., Zhou, Q., Chen, X. H., Wang, J., Yuan, C. Y., Wang, F. B. (2020). The rice Aux/IAA transcription factor gene *OsIAA18* enhances salt and osmotic tolerance in *Arabidopsis*. *Biologia plantarum* 64: 454–464, 2020. doi: 10.32615/bp.2019.069
- Li, S. B., Xie, Z. Z., Hu, C. G., Zhang, J. Z. (2016). A Review of Auxin Response Factors (ARFs) in Plants. *Frontiers in Plant Science* 7:47. doi: 10.3389/fpls.2016.00047
- Liscum, E., Reed, J. W. (2002). Genetics of *Aux/IAA* and *ARF* action in plant growth and development. *Plant Molecular Biology* 49(3–4): 387–400. doi: 10.1023/A:1015255030047
- Liu, J., Rowe, J., Lindsey, K. (2014a). Hormonal crosstalk for root development: a combined experimental and modeling perspective. *Frontiers in Plant Science* 5: 116. doi: 10.3389/fpls.2014.00116

- Liu, X., Dinh, T. T., Li, D., Shi, B., Li, Y., Cao, X., Guo, L., Pan, Y., Jiao, Y., Chen, X. (2014b). AUXIN RESPONSE FACTOR 3 integrates the functions of AGAMOUS and APETALA2 in floral meristem determinacy. *Plant Journal* 80(4): 629–41. doi: 10.1111/tpj.12658
- Liu, Y., Jafari, F., Wang, H. (2021). Integration of light and hormone signaling pathways in the regulation of plant shade avoidance syndrome. *aBIOTECH* 2: 131–145. doi: 10.1007/s42994-021-00038-1
- Ljung, K., Hull, A. K., Celenza, J., Yamada, M., Estelle, M., Normanly, J., Sandberg, G. (2005). Sites and regulation of auxin biosynthesis in Arabidopsis roots. *The Plant Cell* 17(4): 1090–104. doi: 10.1105/tpc.104.029272.
- Llorente, F., Muskett, P., Sánchez-Vallet, A., López, G., Ramos, B., Sánchez-Rodríguez, C., Jordá, L., Parker, J., Molina, A. (2008). Repression of the auxin response pathway increases Arabidopsis susceptibility to necrotrophic fungi. *Molecular Plant* 1(3): 496–509. doi: 10.1093/mp/ssn025
- López-Bucio, J., Hernández-Abreu, E., Sánchez-Calderón, L., Nieto-Jacobo, M. F., Simpson, J., Herrera-Estrella, L. (2002). Phosphate availability alters architecture and causes changes in hormone sensitivity in the Arabidopsis root system. *Plant Physiology* 129(1): 244–56. doi: 10.1104/pp.010934
- Luo, J., Zhou, J. J., Zhang, J. Z. (2018). Aux/IAA Gene Family in Plants: Molecular Structure, Regulation, and Function. *International Journal of Molecular Sciences* 19(1): 259. doi: 10.3390/ijms19010259
- Lv, B., Yu, Q., Liu, J., Wen, X., Yan, Z., Hu, K., Li, H., Kong, X., Li, C., Tian, H., De Smet, I., Zhang, X. S., Ding, Z. (2020). Non-canonical AUX/IAA protein IAA33 competes with canonical AUX/IAA repressor IAA5 to negatively regulate auxin signaling. *EMBO Journal* 39(1): e101515. doi: 10.15252/embj.2019101515
- Ma, L., Gao, Y., Qu, L., Chen, Z., Li, J., Zhao, H., Deng, X. W. (2002). Genomic evidence for COP1 as a repressor of light-regulated gene expression and development in Arabidopsis. *The Plant Cell* 14(10): 2383–98. doi: 10.1105/tpc.004416
- Ma, Q., Grones, P., Robert, S. (2018). Auxin signaling: a big question to be addressed by small molecules. *Journal of Experimental Botany* 69(2): 313–328. doi: 10.1093/jxb/erx375
- Mai, Y. X., Wang, L., Yang, H. Q. (2011). A gain-of-function mutation in *IAA7/AXR2* confers late flowering under short-day light in Arabidopsis. *Journal of Integrative Plant Biology* 53(6): 480–92. doi: 10.1111/j.1744-7909.2011.01050.x

- Mir, R., León, J. (2014). Pathogen and Circadian Controlled 1 (PCC1) Protein Is Anchored to the Plasma Membrane and Interacts with Subunit 5 of COP9 Signalosome in Arabidopsis. *PLoS One* 9(1): e87216. doi: 10.1371/journal.pone.0087216
- Mishra, S., Upadhyay, S., Shukla, R. K. (2017). The Role of Strigolactones and Their Potential Cross-talk under Hostile Ecological Conditions in Plants. *Frontiers in Physiology* 7: 691. doi: 10.3389/fphys.2016.00691
- Mosblech, A., Thurow, C., Gatz, C., Feussner, I., Heilmann, I. (2011). Jasmonic acid perception by COI1 involves inositol polyphosphates in Arabidopsis thaliana. *Plant Journal* 65(6): 949–57. doi: 10.1111/j.1365-313X.2011.04480.x
- Nacry, P., Canivenc, G., Muller, B., Azmi, A., Van Onckelen, H., Rossignol, M., Doumas, P. (2005). A role for auxin redistribution in the responses of the root system architecture to phosphate starvation in Arabidopsis. *Plant Physiology* 138(4): 2061–74. doi: 10.1104/pp.105.060061
- Nelson, D. C., Lasswell, J., Rogg, L. E., Cohen, M. A., Bartel, B. (2000). FKF1, a clock-controlled gene that regulates the transition to flowering in Arabidopsis. *The Cell* 101: 331–340. doi: 10.1016/s0092-8674(00)80842-9
- Niu, X., Chen, Q., Wang, X. (2008). *OsITLI* gene encoding an inositol 1,3,4-trisphosphate 5/6-kinase is a negative regulator of osmotic stress signaling. *Biotechnology Letters* 30(9): 1687–92. doi: 10.1007/s10529-008-9730-5
- Ori, N. (2019). Dissecting the Biological Functions of ARF and Aux/IAA Genes. *Plant Cell* 31(6): 1210–1211. doi: 10.1105/tpc.19.00330
- Paciorek, T., Friml, J. (2006). Auxin signaling. *Journal of Cell Science* 119(Pt 7): 1199–202. doi: 10.1242/jcs.02910
- Pacurar, D. I., Pacurar, M. L., Lakehal, A., Pacurar, A. M., Ranjan, A., Bellini, C. (2017). The Arabidopsis Cop9 signalosome subunit 4 (CNS4) is involved in adventitious root formation. *Scientific Reports* 7(1): 628. doi: 10.1038/s41598-017-00744-1
- Paik, I., Huq, E. (2019). Plant photoreceptors: Multi-functional sensory proteins and their signaling networks. *Seminars in Cell and Developmental Biology* 92: 114–121. doi: 10.1016/j.semdb.2019.03.007
- Paik, I., Yang, S., Choi, G. (2012). Phytochrome regulates translation of mRNA in the cytosol. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 109: 1335–1340. doi: 10.1073/pnas.1109683109

- Paradiso, R., Proietti, S. (2022). Light-Quality Manipulation to Control Plant Growth and Photomorphogenesis in Greenhouse Horticulture: The State of the Art and the Opportunities of Modern LED Systems. *Journal of Plant Growth Regulation* 41:742–780. doi: 10.1007/s00344-021-10337-y
- Parry, G., Calderon-Villalobos, L. I., Prigge, M., Peret, B., Dharmasiri, S., Itoh, H., Lechner, E., Gray, W. M., Bennett, M., Estelle, M. (2009). Complex regulation of the TIR1/AFB family of auxin receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 106(52): 22540–5. doi: 10.1073/pnas.0911967106
- Pěňčík, A., Casanova-Sáez, R., Pilařová, V., Žukauskaitė, A., Pinto, R., Micol, J. L., Ljung, K., Novák, O. (2018). Ultra-rapid auxin metabolite profiling for high-throughput mutant screening in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany* 69(10): 2569–2579. doi: 10.1093/jxb/ery084
- Peng, Z., Serino, G., Deng, X. W. (2001). A role of *Arabidopsis* COP9 signalosome in multifaceted developmental processes revealed by the characterization of its subunit 3. *Development* 128(21): 4277–88. doi: 10.1242/dev.128.21.4277
- Pérez-Torres, C. A., López-Bucio, J., Cruz-Ramírez, A., Ibarra-Laclette, E., Dharmasiri, S., Estelle, M., Herrera-Estrella, L. (2008). Phosphate availability alters lateral root development in *Arabidopsis* by modulating auxin sensitivity via a mechanism involving the TIR1 auxin receptor. *Plant Cell* 20(12): 3258–72. doi: 10.1105/tpc.108.058719
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* 29(9): e45. doi: 10.1093/nar/29.9.e45.
- Pham, V. N., Kathare, P. K., Huq, E. (2018). Phytochromes and Phytochrome Interacting Factors. *Plant Physiology*, 176(2): 1025–1038. doi: 10.1104/pp.17.01384
- Ponnu, J., Hoecker, U. (2021). Illuminating the COP1/SPA Ubiquitin Ligase: Fresh Insights Into Its Structure and Functions During Plant Photomorphogenesis. *Frontiers in Plant Science* 12: 662793. doi: 10.3389/fpls.2021.662793
- Pudasaini, A., Shim, J. S., Song, Y. H., Shi, H., Kiba, T., Somers, D. E., Imaizumi, T., Zoltowski, B. D. (2017). Kinetics of the LOV domain of ZEITLUPE determine its circadian function in *Arabidopsis*. *eLife* 6: e21646. doi: 10.7554/eLife.21646
- Qin, Z. X., Chen, Q. J., Tong, Z., Wang, X. C. (2005). The *Arabidopsis* inositol 1,3,4-trisphosphate 5/6 kinase, AtItpk-1, is involved in plant photomorphogenesis under red light conditions, possibly via interaction with COP9 signalosome. *Plant Physiology and Biochemistry* 43(10–11): 947–54. doi: 10.1016/j.plaphy.2005.08.006

- Quint, M., Gray, W. M. (2006). Auxin signaling. *Current Opinion in Plant Biology* 9(5): 448–53. doi: 10.1016/j.pbi.2006.07.006
- Raboy, V. (2009). Approaches and challenges to engineering seed phytate and total phosphorus. *Plant Science* 177: 281–296. doi: 10.1016/j.plantsci.2009.06.012
- Raboy, V. (2020). Low phytic acid Crops: Observations Based On Four Decades of Research. *Plants* (Basel, Switzerland) 9(2): 140. doi: 10.3390/plants9020140.
- Raboy, V., Young, K. A., Dorsch, J. A., Cook, A. (2001). Genetics and breeding of seed phosphorus and phytic acid. *Journal of Plant Physiology* 158: 489–497. doi: 10.1078/0176-1617-00361.
- Rausenberger, J., Tscheuschler, A., Nordmeier, W., Wust, F., Timmer, J., Schafer, E., Fleck, C., Hiltbrunner, A. (2011). Photoconversion and nuclear trafficking cycles determine phytochrome A's response profile to far-red light. *The Cell* 146, 813–825. doi: 10.1016/j.cell.2011.07.023
- Ried, M. K., Wild, R., Zhu, J., Pipercevic, J., Sturm, K., Broger, L., Harmel, R. K., Abriata, L. A., Hothorn, L. A., Fiedler, D., Hiller, S., Hothorn, M. (2021). Inositol pyrophosphates promote the interaction of SPX domains with the coiled-coil motif of PHR transcription factors to regulate plant phosphate homeostasis. *Nature Communications* 12(1): 384. doi: 10.1038/s41467-020-20681-4
- Riemer, E., Pullagurla, N. J., Yadav, R., Rana, P., Jessen, H. J., Kamleitner, M., Schaaf, G., Laha, D. (2022). Regulation of plant biotic interactions and abiotic stress responses by inositol polyphosphates. *Frontiers in Plant Science* 13: 944515. doi: 10.3389/fpls.2022.944515
- Riemer, E., Qiu, D., Laha, D., Harmel, R. K., Gaugler, P., Gaugler, V., Frei, M., Hajirezaei, M. R., Laha, N. P., Krusenbaum, L., Schneider, R., Saiardi, A., Fiedler, D., Jessen, H. J., Schaaf, G., Giehl, R. F. H. (2021). ITPK1 is an InsP6/ADP phosphotransferase that controls phosphate signaling in *Arabidopsis*. *Molecular Plant* 14(11): 1864–1880. doi: 10.1016/j.molp.2021.07.011
- Rinaldi, M. A., Liu, J., Enders, T. A., Bartel, B., Strader, L. C. (2012). A gain-of-function mutation in IAA16 confers reduced responses to auxin and abscisic acid and impedes plant growth and fertility. *Plant Molecular Biology* 79(4–5): 359–73. doi: 10.1007/s11103-012-9917-y
- Rizzini, L., Favory, J. J., Cloix, C., Faggionato, D., O'hara, A., Kaiserli, E., Baumeister, R., Schäfer, E., Nagy, F., Jenkins, G. I., Ulm, R. (2011). Perception of UV-B by the *Arabidopsis* UVR8 Protein. *Science* 332 (6025): 103–106. doi: 10.1126/science.1200660
- Rockwell, N. C., Su, Y. S., Lagarias, J. C. (2006). Phytochrome structure and signaling mechanisms. *Annual Review of Plant Biology* 57: 837–58. doi: 10.1146/annurev.arplant.56.032604.144208

- Ruan, W., Guo, M., Wang, X., Guo, Z., Xu, Z., Xu, L., Zhao, H., Sun, H., Yan, C., Yi, K. (2019). Two RING-Finger Ubiquitin E3 Ligases Regulate the Degradation of SPX4, An Internal Phosphate Sensor, for Phosphate Homeostasis and Signaling in Rice. *Molecular Plant* 12(8): 1060–1074. doi: 10.1016/j.molp.2019.04.003
- Sabagh, A. E. L., Islam, M. S., Hossain, A., Iqbal, M. A., Mubeen, M., Waleed, M., Reginato, M., Battaglia, M., Ahmed, S., Rehman, A., Arif, M., Athar, H. U. R., Ratnasekera, D., Danish, S., Raza, M. A., Rajendran, K., Mushtaq, M., Skalicky, M., Brestic, M., Soufan, W., Fahad, S., Pandey, S., Kamran, M., Datta, R., Abdelhamid, M. T. (2022). Phytohormones as Growth Regulators During Abiotic Stress Tolerance in Plants. *Frontiers in Agronomy* 4: 2673–3218. doi: 10.3389/fagro.2022.765068
- Sachs, T. (2005). Auxins role as an example of the mechanisms of shoot/root relations. *Plant and Soil* 268: 13–19. doi: 10.1007/s11104-004-0173-z
- Saito, M., Konishi, N., Kanno, K., Yamaya, T., Kojima, S. (2017). Transcriptional repressor IAA17 is involved in nitrogen use by modulating cytosolic glutamine synthetase GLN1;2 in Arabidopsis roots. *Soil Science and Plant Nutrition* 63: 163–170. doi: 10.1080/00380768.2017.1314178
- Santner, A., Estelle, M. (2010). The ubiquitin-proteasome system regulates plant hormone signaling. *Plant Journal* 61(6): 1029–40. doi: 10.1111/j.1365-313X.2010.04112.x
- Sashidhar, N., Harloff, H. J., Potgieter, L., Jung, C. (2020). Gene editing of three *BnITPK* genes in tetraploid oilseed rape leads to significant reduction of phytic acid in seeds. *Plant Biotechnology Journal* 18(11): 2241–2250. doi: 10.1111/pbi.13380
- Sauer, M., Balla, J., Luschnig, C., Wisniewska, J., Reinöhl, V., Friml, J., Benková, E. (2006). Canalization of auxin flow by Aux/IAA-ARF-dependent feedback regulation of PIN polarity. *Genes and Development* 20(20): 2902–11. doi: 10.1101/gad.390806
- Sengupta, S., Bhattacharya, S., Karmakar, A., Ghosh, S., Sarkar, S. N., Gangopadhyay, G., Datta, K., Datta, S. K. (2021). RNAi-mediated down-regulation of *ITPK-2* enhanced inorganic phosphorus and minerals in the transgenic rice. *Journal of Biosciences* 46: 32. doi: 10.1007/s12038-021-00154-6
- Shears, S. B., Ganapathi, S. B., Gokhale, N. A., Schenk, T. M., Wang, H., Weaver, J. D., Zaremba, A., Zhou, Y. (2012). Defining signal transduction by inositol phosphates. *Subcellular Biochemistry* 59: 389–412. doi: 10.1007/978-94-007-3015-1_13
- Shen, C., Wang, S., Zhang, S., Xu, Y., Qian, Q., Qi, Y., Jiang de, A. (2013). OsARF16, a transcription factor, is required for auxin and phosphate starvation response in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant, Cell and Environment* 36(3): 607–20. doi: 10.1111/pce.12001

- Shi, J., Wang, H., Wu, Y., Hazebroek, J., Meeley, R., Ertl, D. (2003). The maize low-phytic acid mutant *Ipa2* is caused by mutation in an inositol phosphate kinase gene. *Plant Physiology* 131: 507–515. doi: 10.1104/pp.014258
- Shi, Q., Zhang, Y., To, V. T., Shi, J., Zhang, D., Cai, W. (2020). Genome-wide characterization and expression analyses of the auxin/indole-3-acetic acid (*Aux/IAA*) gene family in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Scientific Reports* 10(1):10242. doi: 10.1038/s41598-020-66860-7
- Schwechheimer, C., Isono, E. (2010). The COP9 signalosome and its role in plant development. *European Journal of Cell Biology* 89(2–3): 157–62. doi: 10.1016/j.ejcb.2009.11.021.
- Schwechheimer, C., Serino, G., Callis, J., Crosby, W. L., Lyapina, S., Deshaies, R. J., Gray, W. M., Estelle, M., Deng, X. W. (2001). Interactions of the COP9 signalosome with the E3 ubiquitin ligase SCFTIR1 in mediating auxin response. *Science* 292(5520): 1379–82. doi: 10.1126/science.1059776
- Singh, A. K., Chamovitz, D. A. (2019). Role of Cop9 Signalosome Subunits in the Environmental and Hormonal Balance of Plant. *Biomolecules* 9(6): 224. doi: 10.3390/biom9060224
- Song, Y., Xu, Z. F. (2013). Ectopic overexpression of an AUXIN/INDOLE-3-ACETIC ACID (*Aux/IAA*) gene *OsIAA4* in rice induces morphological changes and reduces responsiveness to Auxin. *International Journal of Molecular Sciences* 14(7): 13645–56. doi: 10.3390/ijms140713645
- Sparvoli, F., Cominelli, E. (2015). Seed Biofortification and Phytic Acid Reduction: A Conflict of Interest for the Plant? *Plants (Basel)* 4(4): 728–55. doi: 10.3390/plants4040728
- Stiles, A. R., Qian, X., Shears, S. B., Grabau, E. A. (2008). Metabolic and signaling properties of an Itpk gene family in Glycine max. *FEBS Letters* 582(13): 1853–8. doi: 10.1016/j.febslet.2008.04.054
- Stuttman, J., Lechner, E., Guérois, R., Parker, J. E., Nussaume, L., Genschik, P., Noël, L. D. (2009). COP9 signalosome- and 26S proteasome-dependent regulation of SCFTIR1 accumulation in Arabidopsis. *Journal of Biological Chemistry* 284(12): 7920–30. doi: 10.1074/jbc.M809069200
- Sun, W., Xu, X. H., Lu, X., Xie, L., Bai, B., Zheng, C., Sun, H., He, Y., Xie, X. Z. (2017). The rice phytochrome genes, *PHYA* and *PHYB*, have synergistic effects on anther development and pollen viability. *Scientific Reports*, 7: 6439. doi: 10.1038/s41598-017-06909-2
- Sun, Y., Wilson, M. P., Majerus, P. W. (2002). Inositol 1,3,4-trisphosphate 5/6-kinase associates with the COP9 signalosome by binding to CSN1. *Journal of Biological Chemistry* 277: 45759–45764. doi: 10.1074/jbc.M208709200

- Suzuki, G., Yanagawa, Y., Kwok, S. F., Matsui, M., Deng, X. W. (2002). Arabidopsis COP10 is a ubiquitin-conjugating enzyme variant that acts together with COP1 and the COP9 signalosome in repressing photomorphogenesis. *Genes and Development* 16(5): 554–9. doi: 10.1101/gad.964602
- Suzuki, M., Tanaka, K., Kuwano, M., Yoshida, K. T. (2007). Expression pattern of inositol phosphate-related enzymes in rice (*Oryza sativa* L.): implications for the phytic acid biosynthetic pathway. *Gene* 405(1–2): 55–64. doi: 10.1016/j.gene.2007.09.006
- Sweetman, D., Stavridou, I., Johnson, S., Green, P., Caddick, S. E., Brearley, C. A. (2007). *Arabidopsis thaliana* inositol 1,3,4-trisphosphate 5/6-kinase 4 (AtITPK4) is an outlier to a family of ATP-grasp fold proteins from Arabidopsis. *FEBS Letters* 581(22): 4165–71. doi: 10.1016/j.febslet.2007.07.046
- Tabata, R., Ikezaki, M., Fujibe, T., Aida, M., Tian, C. E., Ueno, Y., Yamamoto, K. T., Machida, Y., Nakamura, K., Ishiguro, S. (2010). Arabidopsis auxin response factor6 and 8 regulate jasmonic acid biosynthesis and floral organ development via repression of class 1 *KNOX* genes. *Plant and Cell Physiology* 51(1): 164–75. doi: 10.1093/pcp/pcp176
- Takemiya, A., Inoue, S., Doi, M., Kinoshita, T., Shimazaki, K. (2005). Phototropins Promote Plant Growth in Response to Blue Light in Low Light Environments. *The Plant Cell* 17(4): 1120–1127. doi: 10.1105/tpc.104.030049
- Tang, Y., Tan, S., Xue, H. (2013). Arabidopsis inositol 1,3,4-trisphosphate 5/6 kinase 2 is required for seed coat development. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica (Shanghai)* 45(7): 549–60. doi: 10.1093/abbs/gmt039
- Tepperman, J. M., Hudson, M. E., Khanna, R., Zhu, T., Chang, S. H., Wang, X., Quail, P. H. (2004). Expression profiling of phyB mutant demonstrates substantial contribution of other phytochromes to red-light-regulated gene expression during seedling de-etiolation. *Plant Journal* 38: 725–739. doi: 10.1111/j.1365-313X.2004.02084.x
- Thimann, K. V. (1939). Auxins and the inhibition of plant growth. *Biological Reviews* 14(3):314–337. doi: 10.1111/j.1469-185X.1939.tb00937.x
- Tian, Q., Reed, J. W. (1999). Control of auxin-regulated root development by the *Arabidopsis thaliana* *SHY2/IAA3* gene. *Development* 126(4): 711–21. doi: 10.1242/dev.126.4.711
- Tian, Q., Uhlir, N. J., Reed, J. W. (2002). Arabidopsis *SHY2/IAA3* inhibits auxin-regulated gene expression. *Plant Cell* 14(2): 301–19. doi: 10.1105/tpc.010283

- Tombuloglu, H. (2019). Genome-wide analysis of the auxin response factors (*ARF*) gene family in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology* 28, 14–24. doi: 10.1007/s13562-018-0458-6
- Tripathi, S., Hoang, Q. T. N., Han, Y. J., Kim, J. I. (2019). Regulation of Photomorphogenic Development by Plant Phytochromes. *International Journal of Molecular Sciences* 20(24): 6165. doi: 10.3390/ijms20246165
- Tuller, T., Diamant, A., Yahalom, A., Zemach, A., Atar, S., Chamovitz, D. A. (2019). The COP9 signalosome influences the epigenetic landscape of *Arabidopsis thaliana*. *Bioinformatics* 35(16): 2718–2723. doi: 10.1093/bioinformatics/bty1053
- Van Buskirk, E. K., Decker, P. V., Chen, M. (2012). Photobodies in light signaling. *Plant Physiology* 158: 52–60. doi: 10.1104/pp.111.186411
- Vlčko, T., Ohnoutková, L. (2020). Allelic Variants of CRISPR/Cas9 Induced Mutation in an Inositol Trisphosphate 5/6 Kinase Gene Manifest Different Phenotypes in Barley. *Plants (Basel, Switzerland)* 9(2): 195. doi: 10.3390/plants9020195
- Walia, Y., Kasera, M., Ingole, K. D., Peddiraju, S., Roy, A., Laha, D., Schaaf, G., Bhattacharjee, S. (2021). *Arabidopsis* inositol polyphosphate kinases regulate COP9 signalosome deneddylase functions in phosphate-homeostasis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* (bioRxiv)^[preprint] doi: 10.1101/2020.10.02.323584
- Wang, B., Chu, J., Yu, T., Xu, Q., Sun, X., Yuan, J., Xiong, G., Wang, G., Wang, Y., Li, J. (2015). Tryptophan-independent auxin biosynthesis contributes to early embryogenesis in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 112(15): 4821–6. doi: 10.1073/pnas.1503998112
- Wang, F., Zhu, D., Huang, X., Li, S., Gong, Y., Yao, Q., Fu, X., Fan, L. M., Deng, X. W. (2009b). Biochemical insights on degradation of *Arabidopsis* DELLA proteins gained from a cell-free assay system. *The Plant Cell* 21(8): 2378–90. doi: 10.1105/tpc.108.065433
- Wang, J., Yan, D. W., Yuan, T. T., Gao, X., Lu, Y. T. (2013a). A gain-of-function mutation in *IAA8* alters *Arabidopsis* floral organ development by change of jasmonic acid level. *Plant Molecular Biology* 82(1–2): 71–83. doi: 10.1007/s11103-013-0039-y
- Wang, S., Hagen, G., Guilfoyle, T. J. (2013b). ARF-Aux/IAA interactions through domain III/IV are not strictly required for auxin-responsive gene expression. *Plant Signaling and Behavior* 8(6): e24526. doi: 10.4161/psb.24526

- Wang, X., Li, W., Piqueras, R., Cao, K., Deng, X. W., Wei, N. (2009a). Regulation of COP1 nuclear localization by the COP9 signalosome via direct interaction with CSN1. *Plant Journal* 58(4): 655–67. doi: 10.1111/j.1365-313X.2009.03805.x
- Wasternack, C. (2014). Action of jasmonates in plant stress responses and development-applied aspects. *Biotechnology Advances* 32: 31–39. doi: 10.1016/j.biotechadv.2013.09.009
- Wei, N., Deng, X. W. (2003). The COP9 signalosome. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 19: 261–86. doi: 10.1146/annurev.cellbio.19.111301.112449
- Whitfield, H. L., He, S., Gu, Y., Sprigg, C., Kuo, H.-F., Chiou, T.-J., Riley, A. M., Potter, B. V. L., Hemmings, A. M., Brearley, C. A. (2023). Diversification in the inositol tris/tetrakisphosphate kinase (ITPK) family: crystal structure and enzymology of the outlier AtITPK4. *Biochemical Journal* 480 (6): 433–453. doi: 10.1042/BCJ20220579
- Whitfield, H., White, G., Sprigg, C., Riley, A. M., Potter, B. V. L., Hemmings, A. M., Brearley, C. A. (2020). An ATP-responsive metabolic cassette comprised of inositol tris/tetrakisphosphate kinase 1 (ITPK1) and inositol pentakisphosphate 2-kinase (IPK1) buffers diposphosphoinositol phosphate levels. *Biochemical Journal* 477 (14): 2621–2638. doi: 10.1042/BCJ20200423
- Wild, R., Gerasimaite, R., Jung, J. Y., Truffault, V., Pavlovic, I., Schmidt, A., Saiardi, A., Jessen, H. J., Poirier, Y., Hothorn, M., Mayer, A. (2016). Control of eukaryotic phosphate homeostasis by inositol polyphosphate sensor domains. *Science* 352(6288): 986–90. doi: 10.1126/science.aad9858
- Wu, D., Hu, Q., Yan, Z., Chen, W., Yan, C., Huang, X., Zhang, J., Yang, P., Deng, H., Wang, J., Deng, X., Shii, Y. (2012). Structural basis of ultravioletB perception by UVR8. *Nature* 484: 214–219. doi: 10.1038/nature10931
- Xi, W., Gong, X., Yang, Q., Yu, H., Liou, Y. C. (2016). Pin1At regulates PIN1 polar localization and root gravitropism. *Nature Communications* 7: 10430. doi: 10.1038/ncomms10430
- Xie, X., Cheng, H., Hou, C., Ren, M. (2022). Integration of Light and Auxin Signaling in Shade Plants: From Mechanisms to Opportunities in Urban Agriculture. *International Journal of Molecular Sciences* 23(7): 3422. doi: 10.3390/ijms23073422
- Xu, X., Paik, I., Zhu, L., Huq, E. (2015). Illuminating progress in phytochrome-mediated light signaling pathways. *Trends in Plant Science* 20: 641–650. doi: 10.1016/j.tplants.2015.06.010
- Yamauchi, T., Tanaka, A., Inahashi, H., Nishizawa, N. K., Tsutsumi, N., Inukai, Y., Nakazono, M. (2019). Fine control of aerenchyma and lateral root development through AUX/IAA- and ARF-

- dependent auxin signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 116(41): 20770–20775. doi: 10.1073/pnas.1907181116
- Yang, X., Lee, S., So, J. H., Dharmasiri, S., Dharmasiri, N., Ge, L., Jensen, C., Hangarter, R., Hobbie, L., Estelle, M. (2004). The IAA1 protein is encoded by *AXR5* and is a substrate of SCF(TIR1). *Plant Journal* 40(5): 772–82. doi: 10.1111/j.1365-313X.2004.02254.x
- Yu, H., Moss, B. L., Jang, S. S., Prigge, M., Klavins, E., Nemhauser, J. L., Estelle, M. (2013). Mutations in the TIR1 auxin receptor that increase affinity for auxin/indole-3-acetic acid proteins result in auxin hypersensitivity. *Plant Physiology* 162(1): 295–303. doi: 10.1104/pp.113.215582
- Zenser, N., Ellsmore, A., Leasure, C., Callis, J. (2001). Auxin modulates the degradation rate of Aux/IAA proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 98(20): 11795–800. doi: 10.1073/pnas.211312798
- Zhang, S., Wang, S., Xu, Y., Yu, C., Shen, C., Qian, Q., Geisler, M., Jiang de, A., Qi, Y. (2015b). The auxin response factor, OsARF19, controls rice leaf angles through positively regulating OsGH3-5 and OsBRI1. *Plant, Cell and Environment* 38(4): 638–54. doi: 10.1111/pce.12397
- Zhang, T., Li, W., Xie, R., Xu, L., Zhou, Y., Li, H., Yuan, C., Zheng, X., Xiao, L., Liu, K. (2020). CpARF2 and CpEIL1 interact to mediate auxin-ethylene interaction and regulate fruit ripening in papaya. *Plant Journal* 103(4): 1318–1337. doi: 10.1111/tbj.14803
- Zhang, W., Ito, H., Quint, M., Huang, H., Noël, L. D., Gray, W. M. (2008). Genetic analysis of CAND1-CUL1 interactions in Arabidopsis supports a role for CAND1-mediated cycling of the SCFTIR1 complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 105(24): 8470–5. doi: 10.1073/pnas.0804144105
- Zhang, X., Yan, F., Tang, Y., Yuan, Y., Deng, W., Li, Z. (2015a). Auxin Response Gene *SIARF3* Plays Multiple Roles in Tomato Development and is Involved in the Formation of Epidermal Cells and Trichomes. *Plant Cell Physiology* 56(11): 2110–24. doi: 10.1093/pcp/pcv136
- Zhao, F., Lyu, X., Ji, R., Liu, J., Zhao, T., Li, H., Liu, B., Pei, Y. (2022). CRISPR/Cas9-engineered mutation to identify the roles of phytochromes in regulating photomorphogenesis and flowering time in soybean. *The Crop Journal* 10 (6): 1654-1664. doi: 10.1016/j.cj.2022.03.008
- Zheng, X., Wu, S., Zhai, H., Zhou, P., Song, M., Su, L., Xi, Y., Li, Z., Cai, Y., Meng, F., Yang, L., Wang, H., Yang, J. (2013). Arabidopsis phytochrome B promotes SPA1 nuclear accumulation to repress photomorphogenesis under far-red light. *The Plant Cell* 25(1): 115–33. doi: 10.1105/tpc.112.107086
- Zhu, J., Lau, K., Puschmann, R., Harmel, R. K., Zhang, Y., Pries, V., Gaugler, P., Broger, L., Dutta, A. K., Jessen, H. J., Schaaf, G., Fernie, A. R., Hothorn, L. A., Fiedler, D., Hothorn, M. (2019). Two

bifunctional inositol pyrophosphate kinases/phosphatases control plant phosphate homeostasis. *Elife* 8: e43582. doi: 10.7554/eLife.43582

Zhu, Z. X., Liu, Y., Liu, S. J., Mao, C. Z., Wu, Y. R., Wu, P. (2012). A gain-of-function mutation in *OsIAA11* affects lateral root development in rice. *Molecular Plant* 5(1): 154–61. doi: 10.1093/mp/sss074

Zong, G., Shears, S. B., Wang, H. (2022). Structural and catalytic analyses of the InsP6 kinase activities of higher plant ITPKs. *FASEB Journal* 36(7): e22380. doi: 10.1096/fj.202200393R

Internetové zdroje

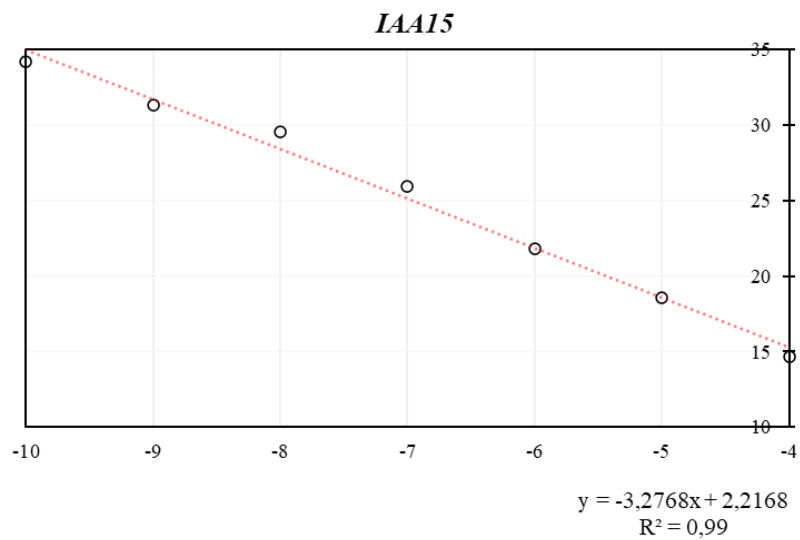
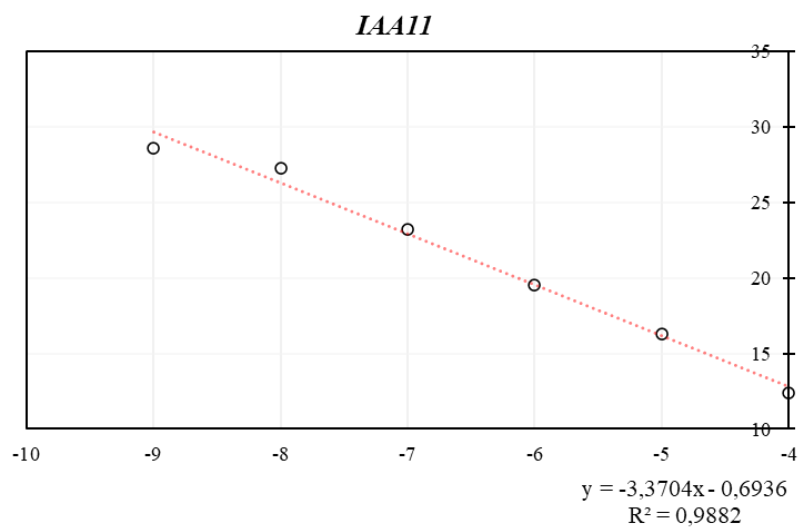
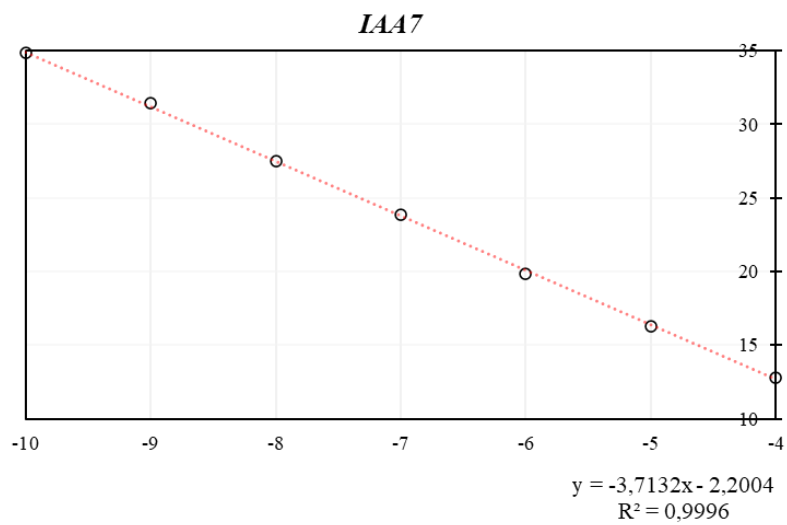
EnsemblPlant [online] [navštíveno 26.3.2023] Dostupné z

<https://plants.ensembl.org/index.html>

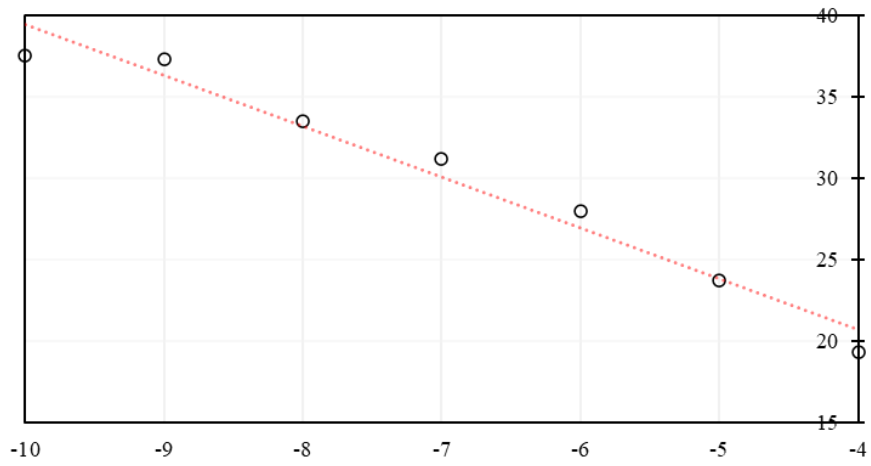
9 PŘÍLOHY

Příloha 1: Kalibrační křivky stanovené pomocí qRT-PCR pro *Aux/IAA* geny a gen *MIPS*

Příloha 1: Kalibrační křivky stanovené pomocí qRT-PCR pro *Aux/IAA* geny a gen *MIPS*

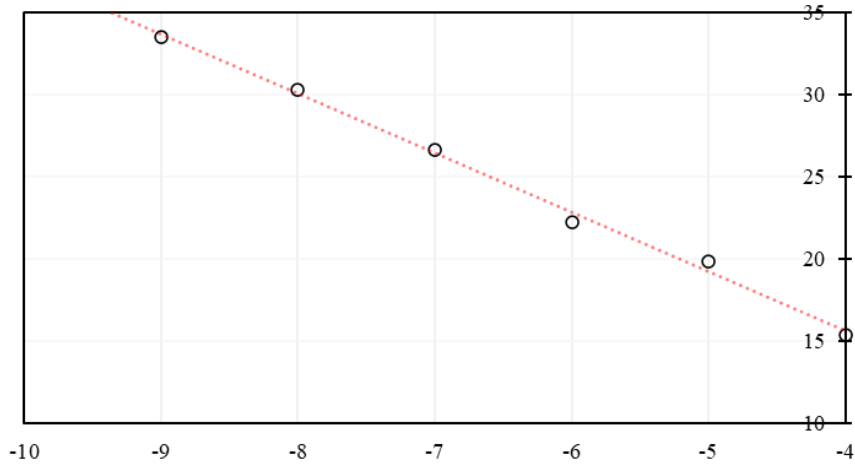


IAA19



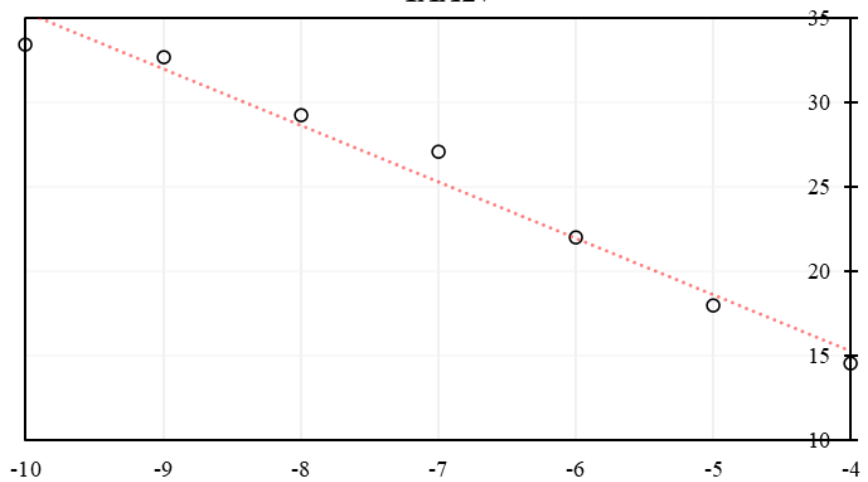
$y = -3,1196x + 8,2239$
 $R^2 = 0,9676$

IAA20



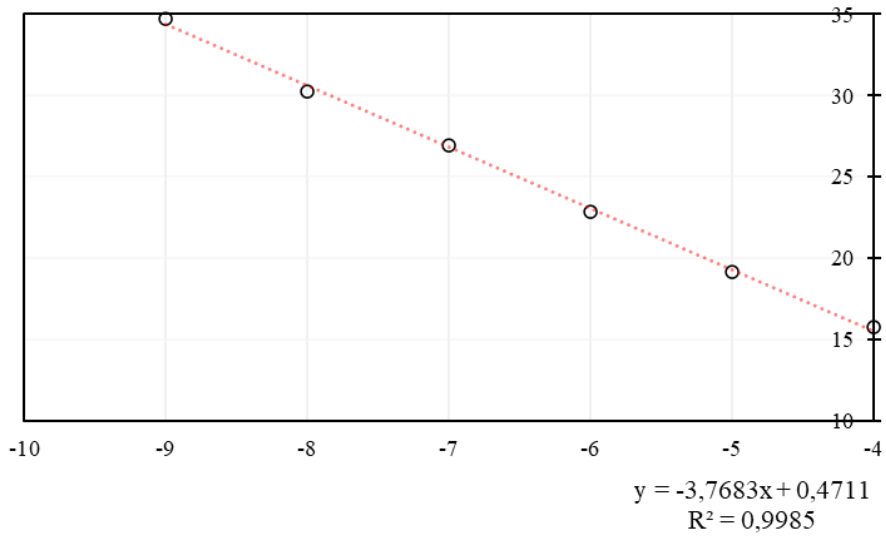
$y = -3,6136x + 1,1826$
 $R^2 = 0,9959$

IAA27



$y = -3,3414x + 1,9193$
 $R^2 = 0,9735$

IAA36



MIPS

