

**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI**

**Přírodovědecká fakulta**

**Laboratoř růstových regulátorů**



**Úloha kanálu kyseliny borité, NIP5;1, v růstových reakcích**

***Arabidopsis thaliana* k auxinu IAA**

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

Autor:	<b>Pavčina Floková</b>
Studijní program:	B1501 Experimentální biologie
Studijní obor:	Experimentální biologie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	<b>doc. RNDr. Martin Fellner, PhD.</b>
Termín odevzdání práce:	2014

## **Bibliografická identifikace**

Jméno a příjmení autora	Pavλίna Floková
Název práce	Úloha kanálu kyseliny borité, NIP5;1, v růstových reakcích <i>Arabidopsis thaliana</i> k auxinu IAA
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Laboratoř růstových regulátorů
Vedoucí práce	doc. RNDr. Martin Fellner, PhD.
Rok obhajoby práce	2014
Abstrakt	<p>Předložená bakalářská práce byla zaměřena na studium úlohy transportního kanálu pro kyselinu boritou, NIP5;1, v růstových reakcích <i>Arabidopsis thaliana</i> k boru a exogenně aplikovanému auxinu IAA. Kyselina boritá stimuluje růst hypokotylu rostlin v rozmezí koncentrací 1-3 mM a naopak při vyšších koncentracích (nad 5 mM) růst inhibuje. Bylo zjištěno, že na modrém je světle vliv exogenně aplikovaného auxinu IAA (<math>10^{-6}</math> a <math>5 \times 10^{-6}</math> M) na prodlužovací růst hypokotylu ovlivňován borem v koncentračním rozmezí 0,1 až 2 mM. Výsledky této práce rovněž naznačují, že účinek boru na regulaci růstu hypokotylu auxinem IAA je zprostředkován kanálem NIP5;1.</p>
Klíčová slova	NIP5;1, bor, auxin IAA, světlo
Počet stran	54
Jazyk	Český (anglický)

## **Bibliographical identification**

Author's first name and surname	Pavλίna Floková
Title of thesis	Role of boric acid channel, NIP5;1, in Arabidopsis growth responses to auxin IAA
Type of thesis	Bachelor
Department	Laboratory of Growth Regulators
Supervisor	doc. RNDr. Martin Fellner, PhD.
The year of presentation	2014
Abstract	<p>The presented bachelor thesis was focused on the study of the role of transport channel for boric acid, NIP5;1, in the growth responses to <i>Arabidopsis thaliana</i> to boron and exogenously applied auxin IAA. Boric acid stimulates growth of the hypocotyl of plants in the concentration range of 1-3 mM and conversely in the higher concentration (above 5 mM) it inhibits growth. It was found that under blue light, the effect of exogenous auxin IAA (<math>10^{-6}</math> a <math>5 \times 10^{-6}</math> M) on the hypocotyl growth is modified by boron in the concentration range from 0,1 to 2 mM. The results of this thesis also suggest that the effect of boron on the of auxin-induced regulation of hypocotyl growth is mediated by channel NIP5;1.</p>
Keywords	NIP5;1, boron, auxin IAA, light
Number of pages	54
Language	Czech (English)

### **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením doc. RNDr. Martina Fellnera, PhD. a uvedla jsem veškeré použité literární zdroje.

V Olomouci dne.....

.....

## **Poděkování**

Tímto bych chtěla poděkovat doc. RNDr. Martinu Fellnerovi, PhD., za odborné vedení, poskytnutí studijních materiálů, vstřícnost a trpělivost během vypracování této práce.

<b>Obsah .....</b>	<b>Chyba! Zázložka není definována.</b>
<b>1 Úvod a cíle práce.....</b>	<b>8</b>
<b>2 Bor.....</b>	<b>9</b>
2.1 Chemická podstata boru .....	9
2.2 Přítomnost boru v rostlinách .....	9
2.2.1 Funkce boru při syntéze buněčné stěny .....	10
2.2.2 Transport boru v rostlinách .....	11
2.2.3 Transportéry pro kyselinu boritou: BOR1 a NIP5;1 .....	12
2.2.4 Vliv B na prodlužování hypokotylu u <i>Arabidopsis</i> .....	14
<b>3 Rostlinné hormony .....</b>	<b>16</b>
3.1.1 Transport auxinů.....	17
3.1.2 IAA .....	18
<b>4 Světlo a fotoreceptory.....</b>	<b>20</b>
4.1 Receptory červeného světla: fytochromy .....	21
4.2 Receptory pro modré světlo: kryptochromy a fototropiny.....	22
<b>5 Interakce boru, auxinu a světla při prodlužování hypokotylu <i>Arabidopsis</i> .....</b>	<b>25</b>
<b>6 Materiál a metody.....</b>	<b>27</b>
6.1 Průběh experimentu .....	27
6.2 Rostlinný materiál .....	27
6.3 Příprava semen .....	27
6.4 Příprava kultivačního média .....	28
6.5 Výsev a kultivace semen a rostlin .....	29
6.6 Měření rostlin .....	29
<b>7 Výsledky .....</b>	<b>31</b>
7.1 Studium působení boru na růst hypokotylu a kořene <i>Arabidopsis</i> .....	31
7.1.1 Růstové reakce hypokotylu .....	31

7.1.2	Růstové reakce kořene.....	33
7.2	Studium působení boru na citlivost k auxinu IAA.....	36
7.2.1	Růstové reakce hypokotylu .....	36
7.2.2	Růstové reakce kořene.....	39
<b>8</b>	<b>Diskuze.....</b>	<b>41</b>
<b>9</b>	<b>Závěr .....</b>	<b>46</b>
	<b>Literatura .....</b>	<b>47</b>
	<b>Seznam zkratk .....</b>	<b>54</b>

## 1 Úvod a cíle práce

Bor je základní mikroelement nezbytný pro výživu rostlin. Optimální hladina boru v půdě významně ovlivňuje jejich růst a vývoj. Nedostatek nebo naopak nadbytek boru způsobuje značné deformace rostlin a znehodnocení úrody, což představuje zásadní problém v rámci celosvětového zemědělství. Množství boru v půdě se v různých oblastech světa liší a rozmezí mezi nedostatkem a toxicitou je velmi úzké, proto je obtížné zajistit příznivé podmínky pro růst rostlin. Přesný mechanismus a princip působení boru v rostlinách není dodnes známý. Studium reakcí boru v rostlinném organismu by mohlo přispět k odhalení tohoto mechanismu a zabránit tak výrazným ztrátám v zemědělství.

Cílem předkládané bakalářské práce bylo zpracovat literární rešerši na téma „Úloha kanálu kyseliny borité, NIP5;1, v růstových reakcích *Arabidopsis thaliana* k auxinu IAA“. V teoretické části jsem popsala funkci boru v rostlině, úlohu transportních proteinů a funkci auxinu IAA a světla ve vývoji a růstu rostlin. V experimentální části jsem studovala, jak koncentrace boru ovlivňuje citlivost kořene a hypokotylu *Arabidopsis* k exogenně aplikovanému auxinu IAA, jak je tento proces ovlivňován světlem, a zda vliv boru na citlivost rostlin k auxinu IAA může být zprostředkován kanálem pro transport boru NIP5;1. K těmto experimentům jsem použila mutantní rostlinu *Arabidopsis thaliana* s defektem v genu *NIP5;1* a odpovídající kontrolní rostlinu, genotyp Col-0. Růstové reakce těchto genotypů byly ovlivňovány různými koncentracemi kyseliny borité ( $H_3BO_3$ ), kyseliny indol-3-octové (IAA) a světelnými podmínkami.



## 2 Bor

### 2.1 Chemická podstata boru

Bor (B) patří mezi polokovy 13. skupiny periodické soustavy prvků. Svými specifickými vlastnostmi se však výrazně odlišuje od ostatních prvků 13. skupiny, jako je například hliník (Al) nebo galium (Ga), proto se někdy uvádí jako samostatný prvek periodické tabulky (Tanaka and Fujiwara, 2007). Studium funkce boru v biologických systémech vyžaduje znalost fyzikálně-chemických vlastností, jak prvku samotného, tak i jeho komplexů. Bor se v přírodě vyskytuje poměrně vzácně, přesto je jedním z významných mikrobiogenních prvků, který cévnaté rostliny potřebují pro svou výživu. Rostliny jsou schopny bor přijímat pouze ve formě kyseliny borité ( $H_3BO_3$ ). V pevném stavu je kyselina boritá bílá krystalická látka rozpustná ve vodě. V přírodě se vyskytuje ve formě minerálu (sassolin) a má široké průmyslové využití. Slouží jako prekurzor pro syntézu chemických látek, výrobu skelné vaty, využívá se jako antiseptikum, insekticid nebo zpomalovač hoření (Housecroft and Sharpe, 2005).

### 2.2 Přítomnost boru v rostlinách

Bor se v rostlinném organismu vyskytuje ve stopovém množství, přesto hraje důležitou roli v řadě biochemických procesů. Poprvé se o úloze boru v rostlinách začalo diskutovat na počátku 20. století, kdy se zjistilo, že je nezbytný pro normální růst a vývoj rostlin. Mezi hlavní funkce boru patří účast v syntéze buněčné stěny (Warington, 1923), regulace metabolismu cukrů, ribonukleových kyselin, auxinu IAA, fenolů a respirace (Parr and Loughman, 1983; Welch 1995; Ahmad *et al.*, 2009). Dostupnost boru je nezbytná ve všech fázích růstu, zejména však při vývoji semen a plodů.

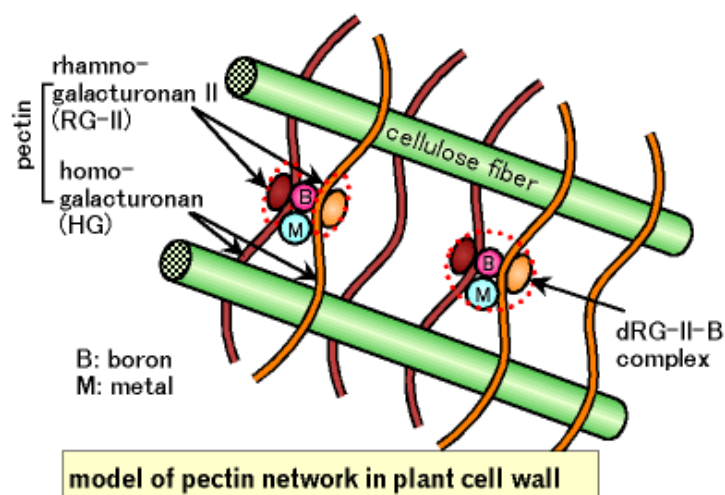
Na celém světě se nedostatek boru objevuje mnohem častěji než nedostatek jakéhokoliv jiného mikroelementu, potřebného pro rostliny (Gupta, 1979; Reisenauer *et al.*, 1973). Nedostatek boru způsobuje v rostlinném organismu řadu anatomických, fyziologických a biochemických změn s následkem poruch v syntéze struktury buněčné stěny, které se projevují jako rozsáhlé deformace. Primárně zasažena bývá oblast kořenového meristému, kdy dochází k odumírání růstového vrcholu a kořenové špičky

(Abreu *et al.*, 2014). Mladé listy postihuje chloróza, stonky jsou křehké a lámavé, tvorba květů je silně redukována a plody často opadávají ještě před dozráním (Gupta , 1979a; Dell and Huang , 1997; Goldbach *et al.*, 2001). Příkladem postižení rostliny nedostatkem boru může být například srdéčková hniloba u řepy cukrové nebo deformované plody jahod a hrušek. Nízké koncentrace boru se vyskytují zejména v lehkých písčitých a hlinitopísčitých půdách. Ve vodě rozpustný bor se snadno uvolňuje do spodních částí půdy a stává se tak pro rostliny nedostupný (Walsh and Golden, 1953). S rozsáhlým nedostatkem boru se potýká například oblast jižní a východní Číny, Spojených států, Brazílie nebo Skandinávie, kde je v důsledku častých srážek bor z půdy odplavován (Shorrocks, 1997).

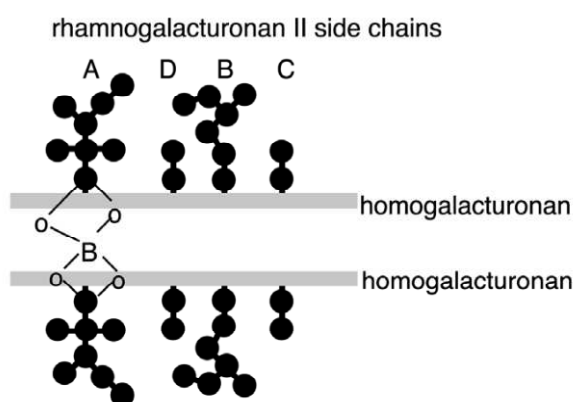
Rostliny poškozují nejen nedostatek boru, ale také jeho nadbytek, který je pro ně toxický. Hranice mezi deficitem a toxicitou je velice úzká, proto je obtížné zajistit optimální výživu. Vysoké koncentrace boru se mohou přirozeně vyskytovat v půdě nebo ve spodní vodě, anebo se do půdy dostávají vlivem povrchové těžby, s průmyslovými chemikáliemi, přidavkem hnojiv či závlahovou vodou. Hlavním příznakem toxicity je nápadné žloutnutí a předčasná senescence starších listů nebo poškození kořenového systému (Nable *et al.*, 1997). Nadbytek boru postihuje zejména sušší oblasti světa, například Peru, Chile, Egypt, Indii, Turecko nebo jižní Austrálii (Yau and Ryan, 2008), kde je bor v důsledku méně častých srážek zadržován v horních vrstvách půdy.

### **2.2.1 Funkce boru při syntéze buněčné stěny**

Základní fyziologickou funkcí boru je účast v syntéze buněčné stěny, jak již bylo zmíněno. Principem tvorby pevné konstrukce buněčné stěny rostlin je zesílení pektinového polysacharidu, rhamnogalakturonanu II (RG-II), (O'Neill *et al.*, 2001). Struktura RG-II byla poprvé popsána v roce 1978. Zjistilo se, že RG-II je přítomen v primární buněčné stěně dvouděložných, jednoděložných a pravděpodobně i nižších rostlin, například u kapradin, přesliček a plavuní (Darvill *et al.*, 1978).



**Obr. 1** Pektinová vlákna monomerů homogalakturonanu (HG) jsou částečně převedena na dimer (RG-II) při reakci s kyselinou boritou při pH 3,5 (O'Neill *et al.*, 1996; Ishii *et al.*, 1999). Mezi vlákny HG a atomem boru se vytvoří boritan-diol esterová vazba (Kobayashi *et al.*, 1996). Přítomnost boru zajistí křížové propojení vláken pektinu. V procesu zesíťování vláken HG se mimo jiné účastní některé ionty kovu například Ca, Sr, Ba nebo Pb, na obrázku uvedeny pod písmenem „M“ (Matsunaga, 2004).



**Obr. 2** Křížové propojení RG-II borem. A, B, C a D představují druhou stranu RG řetězce. Je známo, že bor se váže k postrannímu řetězci A (převzato z review Miwa *et al.*, 2010).

## 2.2.2 Transport boru v rostlinách

Rostliny bor přijímají z půdy pomocí kořenů, nejčastěji při neutrálním až mírně kyselém pH půdy. Bor se v půdním roztoku vyskytuje ve formě nedisociované kyseliny borité ( $H_3BO_3$ ), která nese neutrální náboj. Množství přijímaného boru závisí také na jeho obsahu

v rostlinách, na rozpustnosti v půdě a na rychlosti transpirace. Bor je transportován z kořenové tkáně do xylému a poté do rostoucích částí rostliny, jako jsou mladé listy a výhonky (Raven, 1980).

Dříve se usuzovalo, že bor se do rostlin dostává pouze pasivní difuzí ve formě  $H_3BO_3$ , poněvadž kyselina boritá relativně snadno prochází přes plazmatickou membránu ( $1 \cdot 10^{-7} \text{ cm s}^{-1}$ ). Vědci proto předpokládali, že jsou rostliny dobře zásobované borem a nepotřebují aktivní transport za podmínek nízkých koncentrací boru v půdě. Tato hypotéza však byla popřena s objevem transportních kanálů. Zjistilo se, že rostliny aktivně regulují hladinu boru pro zachování homeostázy, zejména při nedostatku boru v půdě. Fyziologické studie prokázaly přítomnost kanálu pro usnadněnou difuzi a energeticky závislý aktivní transport, který zprostředkovává dopravu boru proti koncentračnímu gradientu (Dannel *et al.*, 2000, 2001; Stangoulis *et al.*, 2001).

Bor je jediný prvek, který rostliny nepřijímají jako ion, ale jako nabitou molekulu. Molekuly kyseliny borité vstupují do rostliny v oblasti kořenové špičky. V tomto místě není zcela dozrálá hydrofobní vrstva mezi buňkami endodermis, tzv. Caspariho proužek, který brání volnému vstupu rozpuštěných látek do rostliny apoplastickou cestou (tj. pohyb rozpuštěných látek mezibuněčnými prostory), (White, 2001). Jakmile se bor dostane z půdy do kořenů, vstupuje apoplastickou cestou do xylému a poté je dopraven transpiračním proudem k výhonkům a rostoucím částem rostliny. Bor je v rostlině relativně nepohyblivý a jeho pohyb je závislý právě na transpiraci. Pomocí transpirace se bor dostane až do nejvyšších částí rostliny, což je důležité zejména při růstu a diferenciaci pletiv. V důsledku působení transpirace jsou koncentrace boru značně vyšší ve starších listech a při nedostatku boru jsou poškozeny nejprve rostoucí části kořenů a výhonků (Stangoulis *et al.*, 2001).

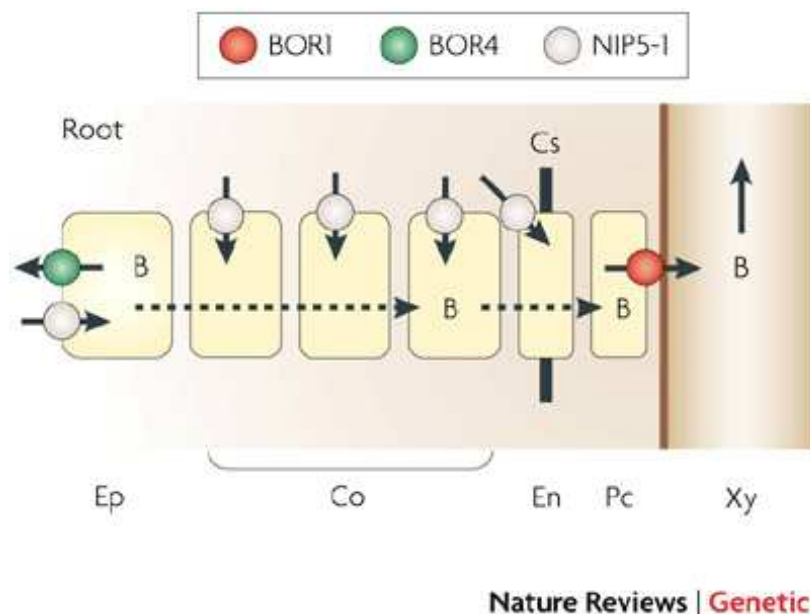
### **2.2.3 Transportéry pro kyselinu boritou: BOR1 a NIP5;1**

Na základě molekulárně genetických studií byly v kořenových buňkách *Arabidopsis thaliana* objeveny transportéry kyseliny borité. Jako první byly identifikovány dva transportní proteiny pro bor, BOR1 a NIP5;1, které se uplatňují v procesu dopravy boru přes plazmatickou membránu (Takano *et al.*, 2006). Kromě těchto dvou základních

transportních proteinů byly identifikovány další významné transportéry, například NIP6;1, který umožňuje velmi rychlý pohyb kyseliny borité přes membránu a je nepropustný pro vodu (Tanaka *et al.*, 2008), BOR4, který napomáhá snižovat toxické koncentrace boru v rostlině, a BOR2, 3, 5, 6 a 7 (Miwa *et al.*, 2007).

BOR1 je první proteinový transportér, který byl identifikován u *Arabidopsis thaliana*. Hlavní funkce tohoto transportního proteinu je efektivní přenos boru z kořenů do xylému proti koncentračnímu gradientu, tedy za spotřeby energie ve formě ATP. Ke zvýšené expresi a hromadění transportních proteinů BOR1 v plasmatické membráně dochází zejména za podmínek nízkých koncentrací boru v půdě (Takano *et al.*, 2002; Nakagawa *et al.*, 2007). BOR1 je exprimován převážně v pericyklu kořenových buněk. Naopak při vysokých, toxických koncentracích boru je BOR1 degradován endocytózou (Takano *et al.*, 2002, 2005).

Proteinový transportér NIP5;1 patří do velké proteinové rodiny kanálů MIP (major intrinsic protein), identifikovaný u *Arabidopsis*. Funkčně se podobá transportnímu kanálu aquaporinu, který usnadňuje transport molekul vody přes membránu. NIP5;1 zajišťuje efektivní přísun boru do rostlin při nedostatku boru v půdě, a proto představuje hlavní kanál pro kyselinu boritou. Exprese genu *NIP5;1* je stimulována při poklesu hladiny boru v rostlině. Transportní kanály NIP5;1 jsou lokalizovány především v plasmatické membráně pokožkových buněk kořene, konkrétně v prodlužující se části kořene a v kořenových vláscích (Takano *et al.*, 2006, 2008). Při vysokých koncentracích boru v rostlině dochází k posttranskripční regulaci s následkem snížení exprese *NIP5;1*. Tímto způsobem se zabrání nadměrnému vtoku kyseliny borité do rostliny a minimalizují se tak toxické účinky boru na výhonky (Miwa and Fujiwara, 2010). Kombinace kanálu NIP5;1, pro vychytávání boru z půdního roztoku, a BOR1 pro efluxní transport boru do xylému, je klíčem k účinnému transcelulárnímu transportu boru z půdy do xylému (Obr. 3).



**Obr. 3** Na obrázku je znázorněn model transportu boru do kořenů u *Arabidopsis thaliana* za podmínek nedostatku boru. Vrstva buněk napříč kořenem *Arabidopsis* je Caspariho proužek v endodermis (White, 2001), označen zkratkou Cs. Při nedostatku boru zvyšuje NIP5;1 propustnost membrány pro kyselinu boritou a usnadňuje vtok boru z půdy do kořenových buněk endodermis. BOR1 zajišťuje přesun boru z kořenových buněk směrem do xylému, proti koncentračnímu gradientu (Miwa and Fujiwara, 2010). Naopak při vysoké koncentraci boru v rostlině dochází ke zvýšené expresi genu *BOR4* a k poklesu genové exprese *NIP5;1* a *BOR1*. Transportér BOR4 pak zajišťuje odčerpávání přebytečného boru pro zachování homeostázy. Čárkovaná šipka znázorňuje symplastickou cestu boru přes plasmodesmata. **Ep** označuje oblast epidermis, **Co** primární kůru (cortex), **En** endodermis, **Pc** pericykl a **Xy** xylém (převzato z review Takeda and Matsuoka, 2008).

#### 2.2.4 Vliv B na prodlužování hypokotylu u *Arabidopsis*

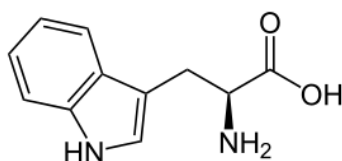
Rostlina *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. je důležitý modelový organismus v rostlinné fyziologii. Řada experimentů sleduje změny v morfogenezi hypokotylu, zejména účinky světla a rostlinných růstových faktorů na prodlužování buněk (Gendreau *et al.*, 1997). Hypokotyl je první článek stonku, který se nachází mezi kořínkem a dělohami. Je tvořen několika buňkami, které se obvykle nedělí, ale pouze prodlužují a zvětšují. Hypokotyl se zakládá již v klíčícím semeni.

Při experimentech *in vitro* prováděných na *Arabidopsis* bylo zjištěno, že růst hypokotylu ovlivňuje i kyselina boritá.  $H_3BO_3$  stimuluje prodlužování hypokotylu, zejména při koncentraci 1-3 mM, v porovnání s rostlinami pěstovanými při koncentraci

0,1 mM. Naopak při vysokých koncentracích (nad 5 mM) byl jasně prokázán toxický účinek boru na růst hypokotylu (Kocábek *et al.*, 2009). Tyto výsledky potvrzují, že rozmezí mezi nedostatkem a toxicitou boru je velmi úzké.

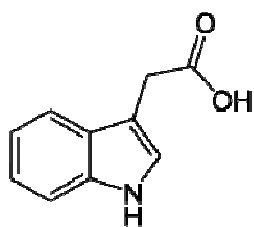
### 3 Rostlinné hormony

Auxiny patří do skupiny růstových hormonů, jejichž hlavní funkcí je schopnost indukovat prodlužování buněk ve stoncích a regulovat řadu fyziologických procesů v rostlině (Arteca, 1996), jako je například fototropismus, apikální dominance nebo zpomalení nástupu senescence listů (Davies, 1995; Mauseth, 1991; Raven, 1992, Salisbury and Ross, 1992). Jako auxiny jsou definovány všechny sloučeniny s biologickou aktivitou, které se svými vlastnostmi podobají nejvýznamnějšímu přírodnímu auxinu, kyselině indol-3-octové (IAA). Tato sloučenina byla prvním identifikovaným auxinem u rostlin (Kögl and Haagen-Smit, 1936). Později byly objeveny další přírodní auxiny: kyselina 4-chlorindolyl-octová (4-Cl-IAA) a kyselina indol-3-máselná (IBA) (Epstein *et al.*, 1989), (Obr. 5). Díky relativně jednoduché struktuře IAA bylo snadno nasyntetizováno několik molekul s auxinovou aktivitou, například kyselina naftyloctová (NAA), kyselina 2,4-dichlorofenoxyoctová (2,4-D) a kyselina 2-metoxy-3,6-dichlorbenzoová (dicamba), (Obr. 6). Většina syntetických auxinů se používá v zemědělství jako herbicidy (Taiz and Zeiger, 2010).

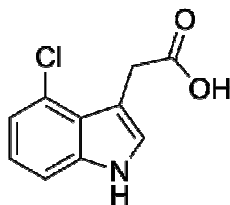


tryptofan

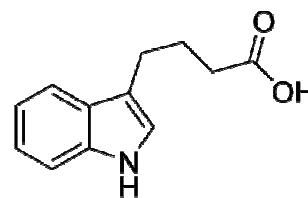
**Obr. 4** Strukturální vzorec aminokyseliny tryptofanu



kyselina indol-3-octová  
(IAA)



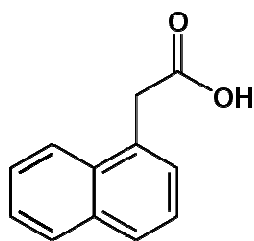
kyselina 4-chlorindolyl-octová  
(4-Cl-IAA)



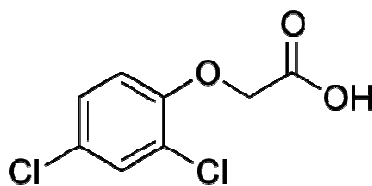
kyselina indol-3-máselná  
(IBA)

**Obr. 5** Chemická struktura přírodních auxinů je podobná aminokyselině tryptofanu

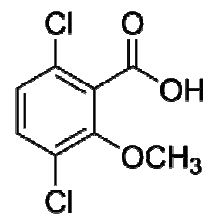




kyselina naftyloctová  
(NAA)



kyselina 2,4-dichlorofenoxyoctová  
(2,4-D)



kyselina 2-metoxy-3,6-dichlorbenzoová  
(dicamba)

**Obr. 6** Chemická struktura syntetických auxinů

### 3.1.1 Transport auxinů

Jak již bylo zmíněno, hladina auxinu v rostlině ovlivňuje řadu fyziologických procesů, například období embryonálního vývoje, prodlužování stonku, hojení ran nebo senescenci. Enzymy odpovědné za biosyntézu auxinů jsou aktivní zejména v mladých částech rostliny jako je apikální meristém stonku, mladé listy nebo kořeny (Davies, 1995; Salisbury and Ross, 1992). U cévnatých rostlin jsou auxiny dopraveny z místa syntézy do místa působení prostřednictvím cévního parenchymu. Pohyb auxinů může být buď bazipetální, tedy od vrcholu (apexu) k bázi rostliny, nebo akropetální, směrem k vrcholu. Tento způsob dopravy je označován jako polární transport (Ebert and Bangerth, 1982), vyžaduje energii ve formě ATP a je řízen chemiosmotickým potenciálem. Polární transport auxinů probíhá přes plazmatickou membránu. Auxin může do buňky vstupovat jako lipofilní protonovaná forma (IAAH) pasivní difuzí, nebo pomocí symportérového přenašeče AUX1/LAX1-3 v disociované formě (IAA<sup>-</sup>). Vtok auxinu do buňky se označuje jako *influx*, naopak transport auxinu ven z buňky se nazývá *efflux*. Jakmile IAA vstoupí do cytosolu (pH 7,2), disociuje se na formu aniontu. Pro anionty je membrána nepropustná, proto se uvnitř buňky hromadí, dokud nejsou dopraveny k effluxním přenašečům a jejich prostřednictvím pak ven z buňky (Taiz and Zeiger, 2010). Hlavní skupinou effluxních přenašečů identifikovaných u *Arabidopsis* jsou proteinové rodiny PIN (1,2,3,4 a 7) a ABCB (Noh *et al.*, 2001). V rámci polárního transportu hraje nejdůležitější roli PIN1, který řídí transport auxinů z apexu ke kořenům a díky své nestabilitě snadno reaguje na měnící se podmínky prostředí (Taiz and Zeiger, 2010).

### 3.1.2 IAA

Kyselina indol-3-octová (IAA) je hlavním auxinem vyšších rostlin. V porovnání s ostatními fytohormony se IAA vyskytuje v největším zastoupení a významně ovlivňuje růst rostlin a morfogenezi. Mezi hlavní funkce IAA patří stimulace buněčného dělení a prodlužování buněk, regulace diferenciací tkání, regulace odezvy na světlo či gravitaci (Taiz and Zeiger, 1998). Kromě stimulace růstu může IAA také působit inhibičně na prodlužování primárního kořene a postranních pupenů, a je tedy zodpovědná za apikální dominanci stonku a tvorbu adventivních kořenů (Davies, 1995).

Kyselina indol-3-octová funguje jako signální molekula pro zahájení buněčného dělení, prodlužování buněčné stěny nebo diferenciaci buněk. Umožňuje poměrně rychlé prodlužování buněčné stěny u koleoptyle (tj. první list zárodku jednoděložných rostlin), mladých, vyvíjejících se stonků a rostoucích pletiv. Principem stimulace růstu buněčné stěny auxinem je transport vodíkových iontů do vnějšího prostoru buňky (apoplastu) pomocí  $H^+$ -ATP-ázy. Se vzrůstající koncentrací  $H^+$  iontů klesá v apoplastu pH a dochází k aktivaci klíčových enzymů, které naruší vazby mezi vlákny celulózy a umožní tak rozvolnění buněčné stěny. Auxin se váže na ABP1 protein a kromě stimulace přenosu vodíkových iontů z buňky, spouští také signální kaskádu s následnou expresí genu pro tvorbu  $H^+$ ATP-ázy. V důsledku odčerpání velkého množství vodíkových protonů do apoplastu vzniká v cytosolu záporný náboj, který je kompenzován přítokem draselných iontů ( $K^+$ ). Uvnitř buňky se zvyšuje koncentrace iontů a vzrůstá osmotický gradient. Voda je nasávána do vnitřního prostoru buňky, který se zvětšuje – buňka roste (Pavlová and Fischer, 2011; Taiz and Zeiger, 2010).

Strukturní vzorec IAA se podobá aminokyselině tryptofanu a prekurzoru pro tryptofan (indol-3-glycerol fosfát). Obě sloučeniny slouží jako prekurzory pro biosyntézu IAA, která je primárně lokalizována v apikálním meristému stonku, mladých listech a plodech, resp. v rychle se dělících buňkách rostoucích tkání (Ljung *et al.*, 2001). Důležitým místem syntézy IAA je také apikální kořenový meristém, kde k tvorbě auxinu dochází zejména během prodlužování kořene. Přesto kořeny zůstávají závislé na hlavní dodávce auxinu ze stonků (Ljung *et al.*, 2005). Podle druhu rostliny může být IAA syntetizována několika drahami, které se liší typem výchozí sloučeniny, zastoupením enzymů a meziproductů. Byly navrženy dvě hlavní cesty biosyntézy IAA: tryptofan (Trp)-

závislé a Trp-nezávislé dráhy (Woodward and Bartel, 2005; Chandler, 2009; Normanly, 2010). Příkladem jedné z drah je desaminace L-tryptofanu fenolickými látkami, které po odštěpení aminoskupiny zabraňují degradaci IAA peroxidázami. Takto vytvořený auxin je určen k okamžité spotřebě v rostoucích částech rostliny. Pokud se nevyužije, je uložen ve formě neaktivního glykosidu, inhibujícího syntézu další IAA (Jensen and Bandurski, 1994). Stejně jako u syntézy může být při degradaci IAA zapojeno několik drah. Obecným principem všech rozkladných reakcí IAA je oxidace za účasti enzymu peroxidázy, kdy vzniká 3- metylenoxyindol. V jiném případě může být IAA oxidována na oxindol-3-acetát bez procesu dekarboxylace (Kowalczyk and Sandberg, 2001; Taiz and Zeiger, 2010).

Bylo zjištěno, že aplikací exogenního auxinu na intaktní experimentální rostliny lze regulovat růst některých rostlinných orgánů jako je kořen nebo hypokotyl. Zatímco krátkodobá aplikace exogenního auxinu má za následek stimulaci růstu, při dlouhodobém působení dochází k jeho potlačení. Výsledky experimentální studie na mutantní rostlině *Arabidopsis - sur1* (= *superroot1*, recesivní mutant s nadprodukcí endogenního auxinu), potvrdily inhibiční účinky zvýšeného množství auxinu na růst hypokotylu (Boerjan *et al.*, 1995; King *et al.*, 1995; Thomine *et al.*, 1997).

#### 4 Světlo a fotoreceptory

Rostliny jsou eukaryotní fotosyntetické organismy, pro jejichž existenci je světlo jedním z klíčových faktorů růstu a vývoje. Kvalita a intenzita světla zcela zásadně ovlivňuje fyziologické procesy, proto rostliny reagují na změnu osvětlení velice citlivě. Světlo slouží nejen jako zdroj energie v procesu fotosyntézy, ale také poskytuje rostlině informace o vnějším prostředí. Rostliny mohou na světelné podněty reagovat růstem a diferenciací pletiv, pohybem (ke světlu/od světla = fototropismus), sledováním denní doby nebo střídáním ročních období (= fotoperioda). Jsou to jediné živé organismy na Zemi, které jsou schopny přeměnit světelnou energii slunečního záření na chemickou energii vazeb organických sloučenin cukrů, proteinů a lipidů.

Kromě kvality a intenzity osvětlení je důležité také množství světla, které na rostlinu dopadá. Obecně platí, že čím více světla rostlina přijímá, tím více má energie na pohon fotosyntézy, a tedy na tvorbu energeticky bohatých látek. Proto se rostliny přizpůsobují svou fyziologickou stavbou (např. tvarem a uspořádáním listů) tak, aby zachytily co největší kvantum světelné energie. Rostliny mohou světlo absorbovat jednak pomocí fotosyntetických pigmentů, umístěných v plazmatické membráně plastidů, ale také pomocí pigmentů, které jsou součástí proteinů. Tyto komplexy se nazývají fotoreceptory a jsou schopné absorbovat elektromagnetické záření ve viditelné oblasti spektra a částečně i oblasti UV. Fotoreceptory, nebo-li fotosenzory, po absorpci světelného kvanta využívají energii fotonu pro změnu konformace proteinu a následně k aktivaci signální kaskády. V závislosti na vlnové délce světla, kterou pohlcují, se označují jako fytochromy – fotoreceptory pro vnímání červeného světla v blízké a vzdálené oblasti spektra (Butler *et al.*, 1960), kryptochromy a fototropiny – pro absorpci modrého světla a světla v UV oblasti spektra (Ahmad and Cashmore, 1993; Gallagher *et al.*, 1988).

Jak již bylo zmíněno, světlo je jedním z nejdůležitějších externích faktorů růstu rostlin. Ty jsou během svého života vystaveny různým světelným podmínkám, a proto musí být schopny flexibilně reagovat na změnu a intenzitu osvětlení. Pro řadu rostlin je stadium růstu ve tmě přirozenou součástí vývoje (tzv. skotomorfogeneze). Klíčící semena jsou pro existenci ve tmě vybavená řadou mechanismů, které jim zajišťují potřebnou výživu, dokud není rostlina sama schopna získávat chemickou energii fotosyntézou. Rostliny při dlouhodobé přítomnosti ve tmě získávají morfologické znaky, kterými se odlišují

od rostlin rostoucích na světle. Kvůli nedostatku chloroplastů jsou bledé, nemají dostatečně vyvinuté orgány a mechanická pletiva (jsou křehké, poléhavé) a jejich stonky jsou enormně prodloužené („hledají“ světlo). V případě skotomorfogeneze platí, že se rostliny snaží dostat ke světlu, které aktivuje morfologickou přeměnu, důležitou pro jejich přežití. Přechod rostliny ze stadia skotomorfogeneze, do fotomorfogeneze (dochází k tzv. de-etiolizaci) (Kendrick and Kronenberg, 1994), je proces velice rychlý, pro jehož aktivaci stačí i velice slabá intenzita osvětlení. Světlo stimuluje specifické fotoreceptory, které spouští signální dráhu a ta pak vede k expresi příslušných genů a změně morfologie rostliny. Hlavními projevy fotomorfogeneze je inhibice růstu hypokotylu, zvýšená syntéza chloroplastů, růst listů a zpevňovacích pletiv (Taiz and Zeiger, 2010).

#### **4.1 Receptory červeného světla: fytochromy**

Fytochromy tvoří nejdůležitější skupinu fotoreceptorů u rostlin, ovlivňujících řadu aspektů růstu a vývoje během všech fází životního cyklu. Z hlediska chemické struktury tvoří fytochromy dimer, tedy proteinový komplex, složený ze dvou stejných podjednotek, přičemž každá podjednotka obsahuje pigmentovou molekulu chromoforu (fytochromobilin), na kterou je kovalentně připojen řetězec polypeptidů (apoprotein). Dohromady vytváří apoprotein a jeho chromofor tzv. holoprotein. Struktura tetrapyrrolového kruhu umožňuje molekule chromoforu absorbovat červené světlo v blízké a vzdálené oblasti spektra a částečně také absorbovat světlo modré (Taiz and Zeiger, 2010).

U rostlin pěstovaných ve tmě se fytochromy vyskytují v neaktivní formě, která bývá označována zkratkou Pr. Tato modře zbarvená molekula fytochromu je schopna zachytit červené světlo v oblasti vlnových délek 650-680 nm. Při absorpci záření je energie fotonu využita na změnu konformace neaktivní molekuly ve formu fyziologicky aktivní (Pfr). Modrozeleně zbarvená aktivovaná molekula absorbuje dlouhovlnné červené záření (710-740 nm), způsobující konformační změnu a převedení molekuly zpět do inaktivní podoby (Kendrick and Kronenberg, 1994). Proces přeměny jedné formy molekuly na druhou, se nazývá fotoreverzibilita a díky této vlastnosti fotoreceptorů mohou rostliny rozpoznat kvalitu, intenzitu a délku působení světla v daném prostředí (Taiz and Zeiger, 2010).

Biochemické studie prováděné na modelové rostlině *Arabidopsis* prokázaly přítomnost pěti funkčně odlišných fytochromů vyšších rostlin (phyA, phyB, phyC, phyD, phyE), jejichž apoproteiny jsou kódovány různými geny (Sharrock and Quail, 1989). Fytochrom A je nejdůležitějším fytochromem, zapojeným ve vnímání infračerveného světla u rostlin. Největší koncentrace phyA se vyskytuje u klíčících semen a etiolizovaných sazenic, tedy u rostlin rostoucích ve tmě, kde aktivuje řadu enzymů pro zahájení morfogeneze. Fytochrom A je labilní protein, který změnou konformace citlivě reaguje už na velmi slabé osvětlení. Po absorpci světla přechází neaktivní molekula fytochromu na molekulu aktivní a slouží jako spouštěcí signál fotomorfogeneze. Aktivovaný fytochrom indukuje klíčení semen a výtrusů, řídí procesy závislé na fotoperiodě (podle délky dne a noci), inhibuje prodlužování stonku či hypokotylu etiolizovaných rostlin nebo naopak podporuje dlouhivý růst stonku a morfogenezi listů u rostlin rostoucích ve stínu (Smith and Whitelam, 1990). Ve své fyziologické funkci a mechanismu působení se phyB výrazně podobá phyA. Fytochrom B má vliv na fotoreverzibilitu klíčících semen, hraje důležitou roli v procesu de-etiolizace a při regulaci růstu rostlin ve stínu (urychluje kvetení, dlouhivý růst apod.) (Smith 1982; Taiz and Zeiger, 2010). Ačkoli u rostliny *Arabidopsis* převládají fytochromy typu A a B, fytochromy C, D a E také hrají důležitou roli při regulaci odezvy na červené a dlouhovlnné červené záření. Reakce na změny světelného režimu během dne a ročních období zprostředkovává PhyC, který se mimo jiné podílí na regulaci růstu rostlin a kvetení v chladnějších klimatických podmínkách (Balasubramanian *et al.*, 2006). Fytochrom D a E se strukturně podobají phyB, jejich hlavní funkcí je indukce prodlužování řapíků a internodií (Taiz and Zeiger, 2010).

#### **4.2 Receptory pro modré světlo: kryptochromy a fototropiny**

Již na konci 19. století se Charles Darwin a jeho syn Francis zabývali studiem vlivu světla na růst rostlin. Jejich experimenty odhalily, že během fototropismu špička koleoptile (tj. první list zárodku jednoděložných rostlin) vnímá modré světlo. O mnoho let později byly ve špičce koleoptile identifikovány receptory pro modré světlo – karotenoidy a flavonoidy, avšak další významné objevy přišly až po roce 1990 s izolací příslušných genů. Mezi fotoreceptory modrého světla patří: kryptochromy s primární funkcí inhibice prodlužování

stonku a kvetení; fototropiny, které hrají klíčovou roli při fototropismu; a zeaxanthin, zapojený v řízení pohybu průduchů modrým světlem.

Krytochromy byly poprvé identifikovány u rostliny *Arabidopsis*, později byla jejich přítomnost prokázána také u nižších rostlin a některých živočichů. Vykazují citlivost zejména k modrému, fialovému a částečně ultrafialovému záření v rozsahu vlnových délek od 320-500 nm (Taiz and Zeiger, 2010). Krytochromy *Arabidopsis* úzce spolupracují s receptory pro červené (fytochromy) a modré světlo (fototropiny). Ve spojení s nimi regulují některé fáze vývoje rostliny, například prodlužování hypokotylu, kvetení nebo otevírání průduchů, řízené modrým světlem (Li and Yang, 2007). Z hlediska struktury patří krytochromy mezi flavoproteiny, sekvenčně podobné enzymu fotolyáze (katalyzuje opravy DNA při poškození UV zářením) (Todo *et al.*, 1996). Na rozdíl od fotolyáz ale nejsou krytochromy při opravách aktivní (Ahmad and Cashmore, 1993). Ve své základní struktuře jsou krytochromy podobné fytochromům, liší se pouze typem chromoforu a vazby mezi chromoforem a apoproteinem (nekovalentní). První typ chromoforu krytochromů je flavin adenin dinukleotid (FAD) a druhým může být buď pterin methyltetrahydrofolát (MTHF), nebo deazaflavin (8-HDF) (Cashmore *et al.*, 1999).

Podobně jako u fytochromů, světlo poskytuje energii pro změnu konformace krytochromu a následně spouští signální kaskádu, která vede k expresi příslušných genů. Modrým světlem indukovaná aktivace fotoreceptoru CRY1 navozuje inhibici prodlužování hypokotylu (Ahmad *et al.*, 1998), reguluje cirkadiální rytmus, depolarizaci membrány nebo produkci antokyanů; CRY2 stimuluje rozvoj děloh. Oba krytochromy indukují kvetení a interagují s phyA. Třetím genem identifikovaným u *Arabidopsis* je CRY3. Jeho fyziologická funkce zatím zůstává neznámá, ale vzhledem k jeho biochemické aktivitě při opravách jednovláknové DNA je pravděpodobné, že se podílí na ochraně genomů organel proti poškození UV zářením (Yu *et al.*, 2010).

Do skupiny receptorů modrého světla patří kromě krytochromů také fototropiny, identifikované s izolací genu *PHOT1* u *Arabidopsis*. Fototropiny hrají důležitou roli při optimalizaci účinnosti fotosyntézy - zprostředkovávají fototropismus, pohyb chloroplastů, otevírání průduchů, rychlou inhibici růstu etiolizovaných rostlin, rozvoj listů nebo indukci kvetení. *Arabidopsis* obsahuje dva specifické fototropiny (phot1 a phot2), které se mimo jiné podílí na regulaci fototropismu u hypokotylu *Arabidopsis* v reakci na nízkou i vysokou intenzitu jednostranného působení modrého světla. Fototropiny jsou

světlem aktivované serin/treonin proteinové kinázy, které jsou tvořeny dvěma funkčními doménami: N-terminální (fotosenzorická) a C-terminální (regulační) (Briggs *et al.*, 2001). Vnímání modrého světla u fototropinů je zprostředkováno pomocí repetitivní sekvence v N-terminální oblasti proteinu, známého jako doména LOV. Při excitaci fotonem dochází k autofosforylaci domény LOV a zahájení signalizace (Christie, 2007).



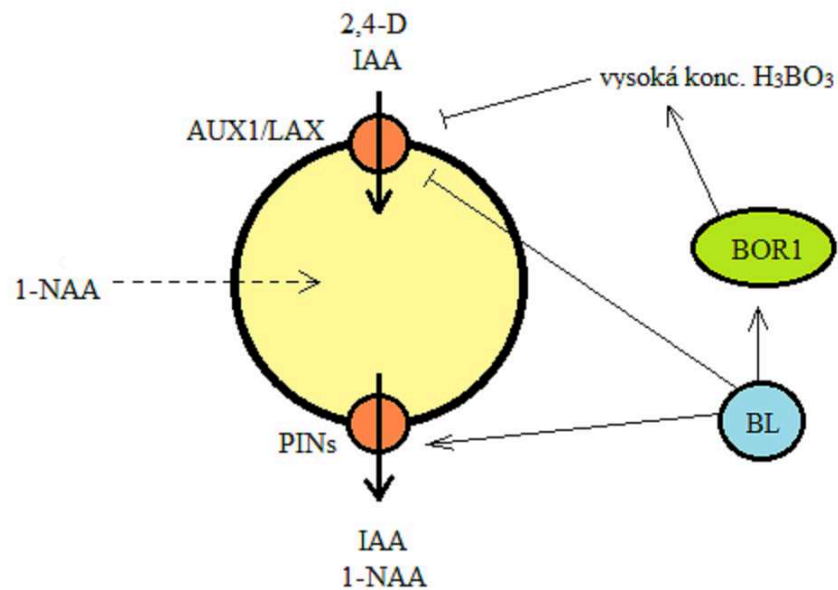
## 5 Interakce boru, auxinu a světla při prodlužování hypokotylu *Arabidopsis*

Bylo zjištěno, že bor stimuluje růst hypokotylu u několika ekotypů *Arabidopsis* a ovlivňuje transport a metabolismus auxinů. Výjimku tvoří mutantní rostlina *bor1-1*, která má defekt v genu kódujícím kanál pro transport kyseliny borité (BOR1), a proto ke svému růstu vyžaduje vyšší koncentrace boru než rostlina kontrolní (Takano *et al.*, 2002). Vědci studovali růstové reakce hypokotylu *Arabidopsis* k exogenně aplikovanému auxinu: 1-NAA; 2,4-D a IAA. Ukázalo se, že IAA inhibuje růst hypokotylu kontrolní rostliny (Col-0) ve tmě a na červeném světle. Naopak na modrém světle IAA stimuluje růst hypokotylu, ale tento stimulační účinek mizí při zvyšování koncentrace  $H_3BO_3$ . U mutantu *bor1-1* byl pozorován opačný trend – se zvyšující se koncentrací boru docházelo k výraznější stimulaci růstu hypokotylu vlivem IAA (Stočes *et al.* 2012).

Při stejných světelných podmínkách byla inhibice růstu hypokotylu auxinem 1-NAA podobná, jak u mutantní, tak kontrolní rostliny, zatímco u obou genotypů bor inhibici neovlivnil (Stočes *et al.* 2012). Bez ohledu na světelné podmínky, auxin 2,4-D v nepřítomnosti boru inhibuje prodlužování hypokotylu, avšak na modrém světle byla po přidavku boru inhibice potlačena. Na změnu světla a přidavek boru citlivě reagovala pouze kontrolní rostlina, mutant *bor1-1* zůstává k boru a světle inaktivní a podléhá inhibičnímu účinku 2,4-D. Výsledky studie naznačují, že za specifických světelných podmínek bor snižuje citlivost hypokotylu k auxinu IAA a 2,4-D (Stočes *et al.* 2012). Schéma (Obr. 7) naznačuje hypotézu, podle které bor při vyšší koncentraci (< 2 mM), a za specifických světelných podmínek (modré světlo), omezuje přísun auxinu do buňky.

Bor je do buňky dopravován pomocí transportního kanálu pro kyselinu boritou (BOR1). Experimenty ukázaly, že modré světlo indukuje expresi genu *BOR1* (Kocábek *et al.*, 2009). Zvýšené množství  $H_3BO_3$  (2 mM a vyšší) v buňce pak může pravděpodobně tlumit činnost auxinového influxního transportéru (AUX1/LAX), který zprostředkovává transport auxinu 2,4-D a IAA do cytosolu. Jediným auxinem, který se do buňky může dostat pasivní difuzí, je 1-NAA. Proto by se mohlo zdát, že jeho transport není limitován množstvím boru. Přesto se v buňce nehromadí, protože je odčerpáván effluxními přenašeči skupiny PIN, jejichž syntéza je podporována modrým světlem. V důsledku zablokování

přísunu auxinu dochází ke snížení inhibice růstu buněk hypokotylu (Stočes *et al.*, 2012).



**Obr. 7** Schéma naznačuje možný vliv modrého světla na transport auxinů dovnitř a ven z buňky. Podle hypotézy (viz výše) modré světlo stimuluje expresi genu *BOR1* a genu pro syntézu effluxního přenašeče PINs. V důsledku zvýšené koncentrace H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> v buňce, dochází k zablokování auxinového přenašeče AUX1/LAX a zastavení přísunu auxinu do buňky. Minimální přítok auxinu je zprostředkován pasivní difuzí 1-NAA přes plazmatickou membránu, ale ten je následně odčerpán pomocí PINs. Pokles koncentrace auxinu v buňce vede ke snížení inhibičního působení auxinu na růst buňky (zpracováno podle Stočes *et al.*, 2012 s využitím schématu podle Morris, 2000).

## 6 Materiál a metody

### 6.1 Průběh experimentu

Experimentální část práce se skládala ze dvou částí. V první části byly pozorovány růstové reakce mutantní rostliny *nip5;1* a odpovídající kontrolní rostliny Col-0 na zvolené koncentrace kyseliny borité ( $H_3BO_3$ : 0,1; 1; 2; 3; 5; 10 mM), přidané do základního MS média (Murashige and Skoog, 1962), za různých světelných podmínek (ve tmě, na modrém a na červeném světle). Ve druhé části byl pozorován vliv  $H_3BO_3$  (0; 0,1 a 2 mM) na citlivost růstových reakcí kontrolní a mutantní rostliny k exogenně aplikovanému auxinu IAA (0;  $1 \times 10^{-6}$ ;  $5 \times 10^{-6}$  M), a to pouze na modrém světle.

### 6.2 Rostlinný materiál

K experimentům byla použita modelová rostlina huseníček rolní (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.), ekotyp Columbia (Col-0) a T-DNA mutant *nip5;1* s defektem v genu *NIP5;1*. Gen *NIP5;1* kóduje kanál pro transport kyseliny borité (Takano *et al.*, 2006). Semena byla laskavě poskytnuta Prof. Toru Fujiwara (University of Tokyo, Japonsko).

### 6.3 Příprava semen

Od každého genotypu *Arabidopsis* bylo naváženo 8 mg semen (cca. 400 semen), která byla vložena do mikrozkušavek s destilovanou vodou (1 ml). Tyto zkumavky byly umístěny do lednice (4 °C, tma) na dobu pěti dnů ke stratifikaci, aby došlo k synchronizaci klíčení semen. Po uplynutí doby stratifikace byla pomocí pipety (1000  $\mu$ l) odstraněna voda a k semenům byl přidán 1,5 % roztok Sava (Bochemia), který působil asi 25 min. Během této doby byla mikrozkušavka se semeny několikrát protřepána, aby se zajistila rovnoměrná sterilizace všech semen. Poté bylo Savo odsáto pipetou a semena v mikrozkušavce byla alespoň šestkrát propláchnuta sterilní destilovanou vodou. Opět bylo nutné semena ve zkumavce několikrát protřepat. Sterilizace a následné proplachování

semen probíhalo v laminárním boxu s použitím sterilních nástrojů a sterilní destilované vody, aby se zabránilo případné kontaminaci semen a média mikroorganismy.

#### 6.4 Příprava kultivačního média

V první části experimentu bylo potřeba připravit základní médium Murashige-Skoog. Na přípravu 2 litrů MS média bylo použito 20 g sacharózy, 8,604 g MS média (Caisson, USA) a 390,4 mg pufru MES. Tyto chemikálie byly za stálého míchání na magnetické míchačce rozpuštěny přibližně v 1 litru destilované vody ve třílitrové Erlenmeyerově baňce. Poté byl roztok doplněn na objem 2 litry a pomocí 1 M roztoku KOH, který byl přidáván po kapkách a pH bylo upraveno na hodnotu 6,1. Do každé z pěti připravených lahví (500 ml, pro autoklávování) bylo naváženo 2,8 g fytoagaru (Duchefa Biochemie, ČR) a poté přidáno 400 ml připraveného základního média. Lahve s médiem byly uzavřeny, opatřeny autoklávovací páskou a vysterilizovány v autoklávu. V průběhu experimentu byly lahve s médiem uchovávány v lednici při teplotě 4 °C. Před zahájením každého experimentu bylo příslušné množství tuhého média rozeřháto v mikrovlnné troubě a naléváno do plastových Petriho misek o průměru 90 mm. Do každé Petriho misky bylo nalito 20 ml vlažného média, které po pár minutách ztuhlo. V první části experimentu bylo pro klíčení semen připraveno nejprve základní médium s koncentrací  $\text{H}_3\text{BO}_3$  0,1 mM. Poté byla koncentrace boru v médiu upravena přidavkem určeného množství kyseliny borité ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ ). Do 120 ml média byla přidána sterilní 1M  $\text{H}_3\text{BO}_3$  v tomto množství: pro koncentraci 1 mM, 240  $\mu\text{l}$   $\text{H}_3\text{BO}_3$ ; 2 mM, 480  $\mu\text{l}$   $\text{H}_3\text{BO}_3$ ; 3 mM, 720  $\mu\text{l}$   $\text{H}_3\text{BO}_3$ ; 5 mM, 1200  $\mu\text{l}$   $\text{H}_3\text{BO}_3$ ; 10 mM, 2400  $\mu\text{l}$   $\text{H}_3\text{BO}_3$ . Ve druhé části experimentu bylo MS médium připraveno ručně, a to bez  $\text{H}_3\text{BO}_3$ . Koncentrace kyseliny borité pak byla upravena pomocí 1M  $\text{H}_3\text{BO}_3$  na hodnoty 0; 0,1; 2 mM. Navíc bylo do média s borem přidáno i příslušné množství zásobního roztoku auxinu IAA o koncentraci  $10^{-2}$  M tak, aby výsledná koncentrace auxinu v médiu byla  $0, 1 \times 10^{-6}$  a/nebo  $5 \times 10^{-6}$  M.

## 6.5 Výsev a kultivace semen a rostlin

Výsev semen byl prováděn ve sterilním prostředí laminárního boxu s použitím sterilních nástrojů. Semena byla vyseta na MS médium do Petriho misek, v počtu přibližně 100 semen na jednu misku (tj. 10 semen do 10 řad). Při výsevu byla použita automatická pipeta (20  $\mu$ l), u které byla seříznuta špička pro snadnější průchodnost a manipulaci se semínky. Pro seříznutí špičky byl použit skalpel, který byl nejprve vysterilizován v 96 % etanolu a poté vyžhán v plameni lihového kahanu. Po výsevu byly misky po obvodu zalepeny dvěma vrstvami pásky z netkané textilie (Softpore, Batist s.r.o.), zabaleny do alobalu, opatřeny popiskem a umístěny do kultivační komory (Snijders Scientific B. V., Holandsko). V kultivační komoře byly misky umístěny do vertikální polohy na 2-3 dny a semena kultivována při teplotě 23 °C.

Po vyklíčení semen byly rostlinky přeneseny na MS médium, obohacené o zvolené koncentrace boru plus auxinu, jak bylo popsáno výše. Přenos rostlinek se opět prováděl za sterilních podmínek v laminárním boxu, s použitím sterilních nástrojů. Rostlinky byly přeneseny pomocí sterilní jehly, která byla, před zahájením a v průběhu práce, několikrát vysterilizována v 96 % etanolu a vyžháním v plameni kahanu. Na každou misku bylo přeneseno přibližně 10-15 rostlinek, které byly umístěny do jedné řady ve středu misky, aby měly sazenice dostatek prostoru pro růst. Poté byly misky zalepeny páskou, opatřeny popiskem a umístěny do kultivačních komor. Misky s rostlinkami byly umístěny do komory s modrým světlem, stejný počet misek byl umístěn do komory s červeným světlem a další byly zabaleny do alobalu (tmy) a umístěny do jedné z komor. Misky byly umístěny do stojanu ve vertikální poloze po dobu deseti dnů a rostlinky byly kultivovány při 23 °C. Zdrojem modrého světla byly zářivky Philips TLD-36W/18-Blue (Philips, USA; ozáření 10 mol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>), červeného Philips TLD-36W/15-Red (Philips, USA; ozáření 10 mol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>). Tyto hodnoty byly naměřeny pomocí přenosného spektrometru (model LI-1800; Li-Cor, Lincoln, NE).

## 6.6 Měření rostlin

Délka kořene a hypokotylu vzrostlých rostlinek byla měřena po deseti dnech kultivace v komoře. Pro manipulaci s rostlinkami byla použita již nesterilní pinzeta a pro samotné

měření fólie s milimetrovou stupnicí podložena černým papírem. Nejprve byly vizuálně zhodnoceny a zaznamenány fenotypové odlišnosti rostlin pěstovaných na jednotlivých koncentracích kyseliny borité a/nebo auxinu, poté byla změřena délka kořene a hypokotylu v milimetrech a hodnoty byly zapsány do tabulky. Vyhodnocení naměřených hodnot a vytvoření grafů bylo provedeno pomocí programu Microsoft Office Excel 2007.

## 7 Výsledky

### 7.1 Studium působení boru na růst hypokotylu a kořene *Arabidopsis*

V první části experimentu byl studován účinek kyseliny borité ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ ) na růst hypokotylu a kořene rostlin *Arabidopsis*. Semenáčky mutantní rostliny *nip5;1* a odpovídající kontrolní rostliny Col-0 byly kultivovány na MS médiu, které bylo doplněno o vybrané koncentrace  $\text{H}_3\text{BO}_3$ . Kultivace probíhala 10 dní ve speciálních kultivačních komorách, za stálé teploty 23 °C a při různých světelných podmínkách (tma, modré a červené světlo). Po deseti dnech byla změřena délka hypokotylu a kořene.

#### 7.1.1 Růstové reakce hypokotylu

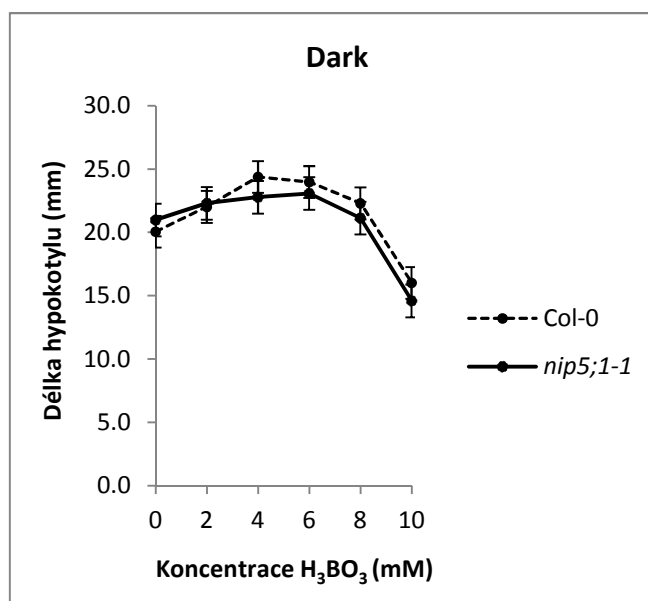
Rostliny rostoucí ve tmě vykazovaly podobné morfologické znaky u obou genotypů, lišily se pouze délkou hypokotylu, v závislosti na koncentraci kyseliny borité. Hypokotyl těchto rostlinek byl dlouhý, bledý, křehký; kotyledony byly žluté a velmi malé. Průměrná délka hypokotylu kontrolních rostlin (Col-0) rostoucích na médiu s koncentrací kyseliny borité 0,1 mM, byla 20 mm (Obr. 8a). U semenáčků, které rostly na médiu s obsahem 1 mM  $\text{H}_3\text{BO}_3$  byl zaznamenán stimulační účinek, průměrná délka hypokotylu byla 22 mm (tedy 10 % stimulace růstu). Nejvyšší stimulace růstu hypokotylu byla zaznamenána při koncentraci 2 mM  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , konkrétně 22 %. Poté, se vzrůstající koncentrací kyseliny borité, stimulační účinek klesal. Na médiu s koncentrací 3 mM  $\text{H}_3\text{BO}_3$  byla stimulace 20 %, při 5 mM 11 % a u koncentrace 10 mM byla zaznamenána 10 % inhibice (Obr. 8a). Mutantní rostlina *nip5;1* vykazovala za všech světelných podmínek menší citlivost ke kyselině borité, než rostlina kontrolní. Ve tmě byla na médiu bez bóru průměrná délka hypokotylu 21 mm. Při koncentraci 1 a 2 mM byl růst stimulován o 6 % a 9 %. K největší stimulaci došlo u koncentrace 3 mM, která byla 10 % a pak stimulace prudce poklesla na 1 % u 5 mM. Při 10 mM koncentraci  $\text{H}_3\text{BO}_3$  byl růst inhibován o 30 % (Obr. 8a).

Na modrém světle byl hypokotyl zelený, kratší, silnější; dělohy byly velké, silné, zelené, oproti rostlinám rostoucím ve tmě. Průměrná délka hypokotylu Col-0 na médiu s obsahem 0,1 mM  $\text{H}_3\text{BO}_3$  byla 7,2 mm. U rostlinek rostoucích na médiu s obsahem kyseliny borité o koncentraci 1 mM, byla zaznamenána 15 % stimulace, která při 2 mM

klesla na 11 %, a při 3 mM se zvýšila na 14 %. Následující vyšší koncentrace  $\text{H}_3\text{BO}_3$  měly na růst hypokotylu inhibiční účinek, u 5 mM koncentrace byla pozorována inhibice prodlužování o 13 % a při koncentraci 10 mM pak až 39 % (Obr. 8b). Mutant *nip5;1* měl na médiu bez boru, na modrém světle, průměrnou délku hypokotylu 7 mm. Po přidání kyseliny borité na koncentraci 1 mM byla zaznamenána 5 % stimulace růstu a při 2 mM byla ještě o něco vyšší, 8 %. U koncentrace 3 mM nebyl růst stimulován, ani inhibován, při 5 mM byla inhibice 17 % a při 10 mM 40 %.

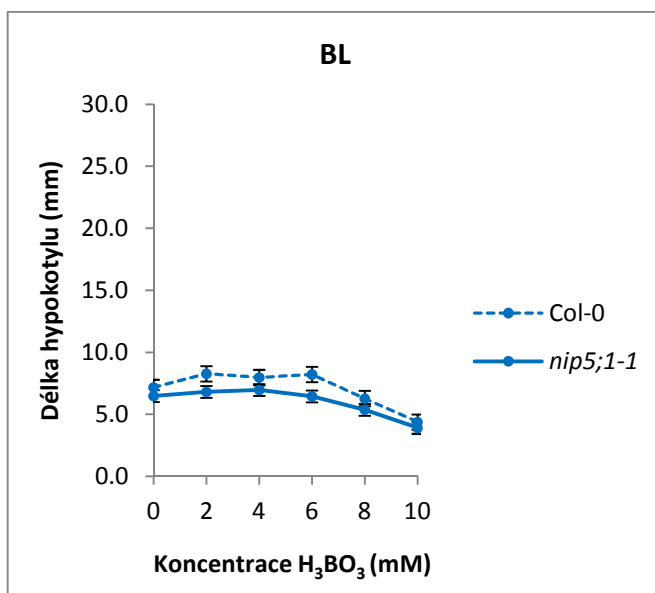
Rostlinky rostoucí na červeném světle měly hypokotyl zelený, dlouhý (kratší než rostlinky rostoucí ve tmě), silný; dělohy byly velké a zelené. Hypokotyl rostliny Col-0 rostoucí na médiu s obsahem kyseliny borité o koncentraci 0,1 mM měl průměrnou délku 17 mm. Kyselina boritá o koncentraci 1 mM stimulovala růst o 13 %, největší stimulace nastala při koncentraci 2 mM a byla 18 % (Obr. 8c). U následujících koncentrací  $\text{H}_3\text{BO}_3$  byl růst hypokotylu rovněž stimulován, avšak s postupným poklesem. Při koncentraci 3 mM o 16 %, při 5 mM 4 % a při 10 mM byl růst značně inhibován, o 29 %. Hypokotyl mutanta *nip5;1* vykazoval nižší stimulaci růstu než kontrolní rostlina. Průměrná délka hypokotylu na médiu s 0,1 mM  $\text{H}_3\text{BO}_3$  byla 18 mm. Po přidavku  $\text{H}_3\text{BO}_3$  na koncentraci 1 mM byla zaznamenána 6 % stimulace růstu, při 2 mM 2 % inhibice, u koncentrace 3 mM růst nebyl stimulován ani inhibován, při 5 mM byla inhibice 7 % a při 10 mM byla inhibice opět nejvyšší, 30 % (Obr. 8c).

(a)

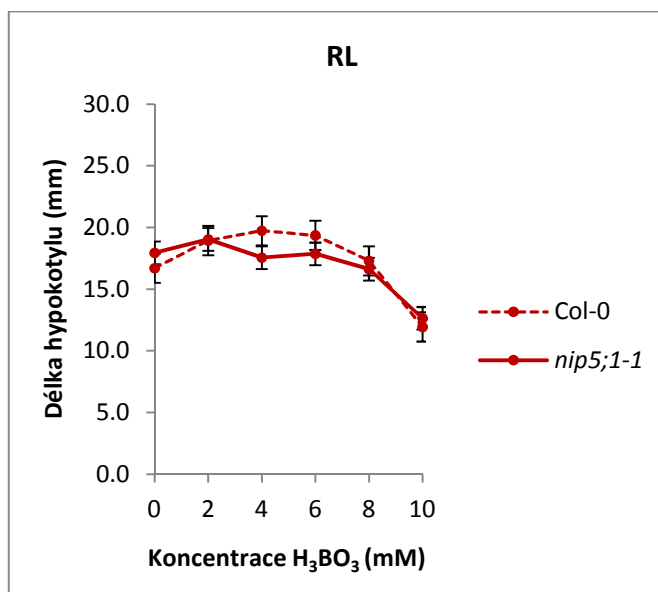




(b)



(c)



**Obr. 8** Účinek kyseliny borité ( $H_3BO_3$ ) na prodlužování hypocotylu kontrolní rostliny Col-0 a mutantní rostliny *nip5;1* ve tmě (a), na modrém (b) a na červeném světle (c). Výsledky ukazují průměrné hodnoty  $\pm$  SE, získané ve čtyřech nezávislých experimentech, pro každý genotyp a každé světlo zvlášť.

### 7.1.2 Růstové reakce kořene

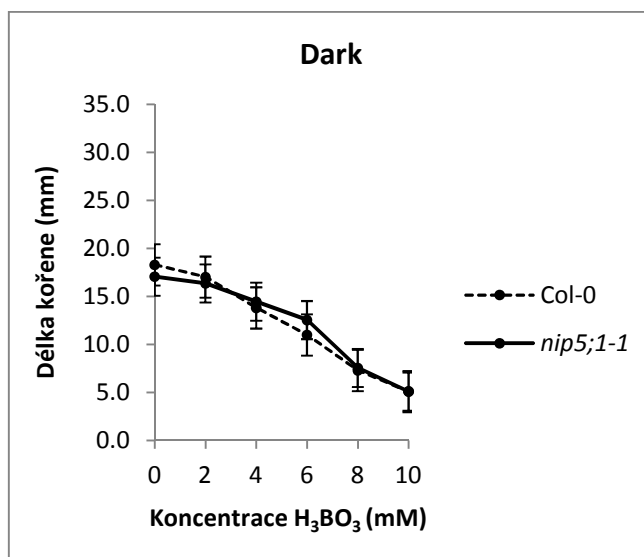
Kořeny rostlin, rostoucích ve tmě byly v porovnání s ostatními světelnými podmínkami nejkratší. Délka kořene kontrolní rostliny (Col-0) rostoucí na médiu s obsahem boru

o koncentraci 0,1 mM byla 18 mm. Po přidání kyseliny borité do média byl růst kořene inhibován o 7 % u koncentrace 1 mM, poté se inhibice přímo úměrně zvyšovala s rostoucí koncentrací  $H_3BO_3$ . Při koncentraci 2 mM byla 25 %, 3 mM 40 %, 5 mM 60 % a 10 mM 72 %. Mutant *nip5;1* dosahoval na médiu, s obsahem kyseliny borité o koncentraci 0,1 mM a ve tmě, průměrné délky kořene 17 mm. S přidavkem kyseliny borité byl růst kořene postupně inhibován, při koncentraci 1 mM o 4 %, 2 mM o 15 %, 3 mM o 27 %, při 5 mM o 56 % a 10 mM o 70 % (Obr. 9a).

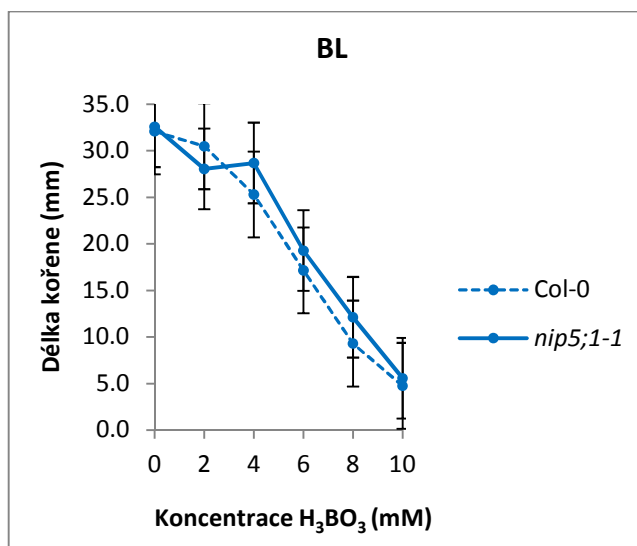
Průměrná délka kořene rostlinky rostoucí na modrém světle a při koncentraci 0,1 mM  $H_3BO_3$  byla 32 mm. Přidáním kyseliny borité na koncentraci 1 mM byla zaznamenána 5 % inhibice růstu, u 2 mM se inhibice zvýšila na 20 % a postupně se zvýšila až na 85 % při koncentraci 10 mM (Obr. 9b). Podobně byl inhibován také růst kořene mutanta *nip5;1*, jehož průměrná délka činila na médiu s 0,1 mM koncentrací  $H_3BO_3$  33 mm. Při koncentraci 1 mM  $H_3BO_3$  byla inhibice 14 % a postupně se zvyšovala až na hodnotu 83 % u koncentrace 10 mM.

Průměrná délka kořenů kontrolní rostliny Col-0, rostoucí na základním médiu a na červeném světle, byla 29 mm. Kyselina boritá o koncentraci 1 mM, způsobila 6 % inhibici růstu kořene, při 2 mM inhibice vzrostla na 25 % a postupně se zvyšovala až na hodnotu 81 % u 10 mM  $H_3BO_3$  (Obr. 9c). Mutantní rostlina *nip5;1* rostoucí na médiu s 0,1 mM koncentrací  $H_3BO_3$  měla průměrnou délku kořene 31 mm. Při koncentraci 1 mM byla inhibice 18 % a postupně zvyšovala, až dosáhla 81 % při koncentraci 10 mM (Obr. 9c).

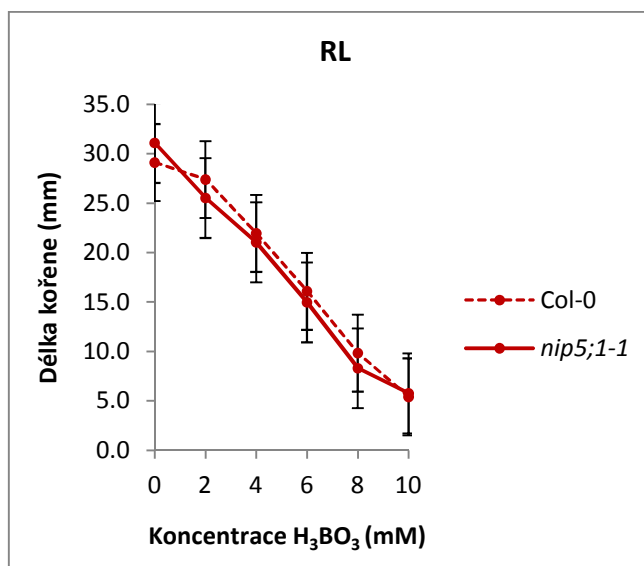
(a)



(b)



(c)



**Obr. 9** Účinek kyseliny borité ( $H_3BO_3$ ) na prodlužování kořene kontrolní rostliny Col-0 a mutantní rostliny *nip5;1* ve tmě (a), na modrém (b) a na červeném světle (c). Výsledky jsou průměrné hodnoty  $\pm$  SE získané ve čtyřech nezávislých experimentech, pro každý genotyp a každé světlo zvlášť.

## 7.2 Studium působení boru na citlivost k auxinu IAA

Druhá část experimentu zahrnovala studium účinku kyseliny borité na citlivost růstových reakcí rostlin k exogenně aplikovanému auxinu IAA. Semenáčky kontrolních (Col-0) a mutantních rostlin (*nip5;1*) byly kultivovány na MS médiu, které obsahovalo kyselinu boritou (koncentrace 0; 0,1 a 2 mM) a současně auxin IAA (konc. 0;  $1 \times 10^{-6}$ ;  $5 \times 10^{-6}$  M). Kultivace probíhala 10 dní ve speciálních kultivačních komorách, za stálé teploty 23 °C. Po deseti dnech byla změřena délka hypokotylu a kořene. Vzhledem k hypotéze vyslovené v práci Stočes *et al.* (2012) (viz teoretická část bakalářské práce, str. 26) byly experimenty v této části bakalářské práce prováděny pouze na modrém světle.

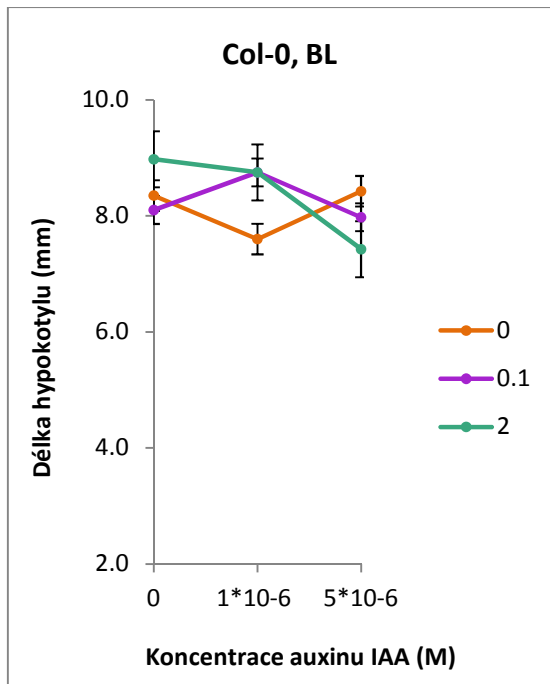
### 7.2.1 Růstové reakce hypokotylu

Růst hypokotylu rostlin kultivovaných na modrém světle se měnil vlivem auxinu v závislosti na koncentraci přidaného boru. Na médiu bez boru a bez auxinu byla průměrná délka hypokotylu kontrolní rostliny (Col-0) 8,4 mm. Při této nulové koncentraci boru došlo

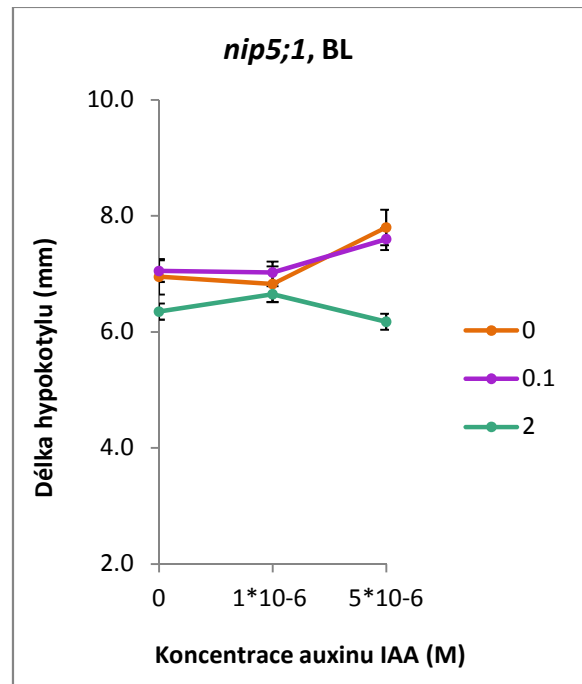
přidáním auxinu na koncentraci  $1 \times 10^{-6}$  M k 9 % inhibici růstu, avšak u koncentrace  $5 \times 10^{-6}$  M byl růst podobný jako na médiu bez auxinu (Obr. 10a). Na médiu s 0,1 mM koncentrací  $\text{H}_3\text{BO}_3$  a nulovou koncentrací auxinu byla průměrná délka hypokotylu Col-0 8,1 mm a přidáním auxinu o koncentraci  $1 \times 10^{-6}$  M se délka hypokotylu zvětšila o 9 %. Avšak zvýšením množství auxinu o koncentraci  $5 \times 10^{-6}$  M byla délka hypokotylu podobná jako bez přítomnosti auxinu, tedy asi 8 mm. Pouze na médiu s obsahem 2 mM  $\text{H}_3\text{BO}_3$  neměl přidáný auxin stimulační účinek na růst hypokotylu, nýbrž účinek pouze inhibiční. Při nulové koncentraci auxinu byla naměřena průměrná délka hypokotylu 9 mm. S přidáním auxinu o koncentraci  $1 \times 10^{-6}$  M délka hypokotylu nepatrně klesla a na médiu s obsahem auxinu o koncentraci  $5 \times 10^{-6}$  M dosáhla inhibice nejvyšší hodnoty, 18 % (Obr. 10a). Účinek IAA na růst hypokotylu Col-0 a v závislosti na koncentraci boru v médiu pak lépe znázorňuje obrázek 11a.

Mutantní rostlina *nip5;1* reagovala na přítomnost auxinu odlišněji, než rostlina kontrolní. Na médiu bez boru a bez auxinu byla průměrná délka hypokotylu 7 mm. Přidáním auxinu o koncentraci  $1 \times 10^{-6}$  M se růst prakticky neměnil, kdežto se zvýšením koncentrace na  $5 \times 10^{-6}$  M došlo k výrazné stimulaci růstu o 12 % (Obr. 10b). Na médiu s obsahem 0,1 mM kyseliny borité měl přidáný auxin podobný účinek na růst hypokotylu jako na médiu bez boru (Obr. 10b). Žádný nebo minimální stimulační účinek na prodloužení hypokotylu měl auxin na médiu s obsahem 2 mM  $\text{H}_3\text{BO}_3$ . Auxin v koncentraci  $1 \times 10^{-6}$  M měl pouze nepatrný stimulační účinek na růst hypokotylu mutantu *nip5;1*, kdežto auxin o koncentraci  $5 \times 10^{-6}$  M růst hypokotylu neovlivňoval (Obr. 10b). Účinek IAA na růst hypokotylu *nip5;1* a v závislosti na koncentraci boru v médiu pak lépe znázorňuje obrázek 11a.

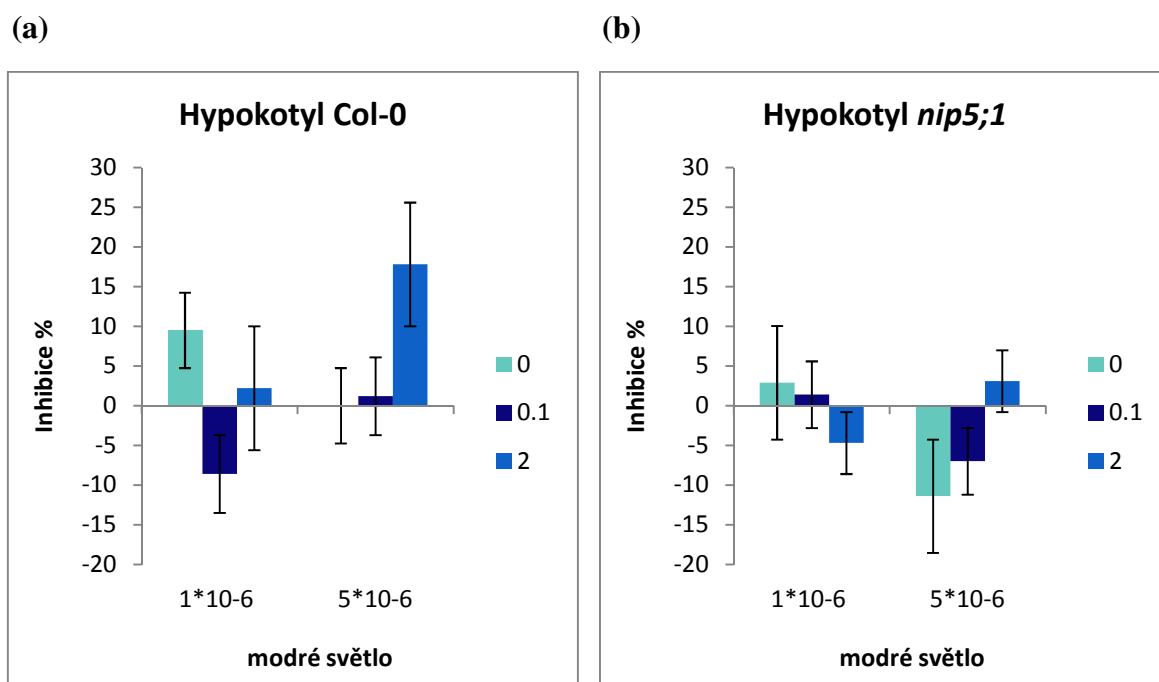
(a)



(b)



**Obr. 10** Účinek auxinu IAA na růst hypokotylu kontrolní rostliny Col-0 (a) a mutantní rostliny *nip5;1* (b) na modrém světle a na médiu s obsahem kyseliny borité (0; 0,1; 2 mM). Výsledky jsou průměrné hodnoty  $\pm$  SE získané ve čtyřech nezávislých experimentech, pro každý genotyp zvlášť.



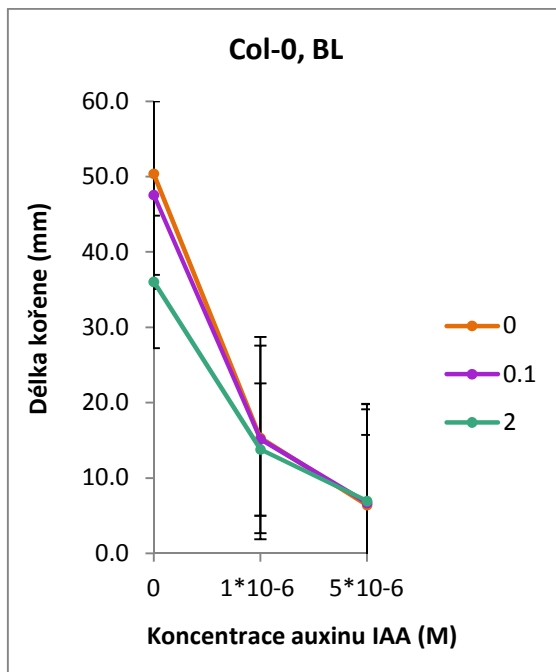
**Obr. 11** Inhibice nebo stimulace prodlužování hypokotyly Col-0 (a) a mutantu *nip5;1* (b) auxinem IAA o koncentraci  $1 \times 10^{-6}$  a  $5 \times 10^{-6}$  M v závislosti na koncentraci kyseliny borité (0; 0,1; 2 mM) v kultivačním médiu. Výsledky představují průměrné hodnoty inhibice  $\pm$  SE vypočtené ze čtyř nezávislých experimentech pro každý genotyp zvlášť, pro každou koncentraci  $H_3BO_3$  zvlášť a při všech světelných podmínkách.

### 7.2.2 Růstové reakce kořene

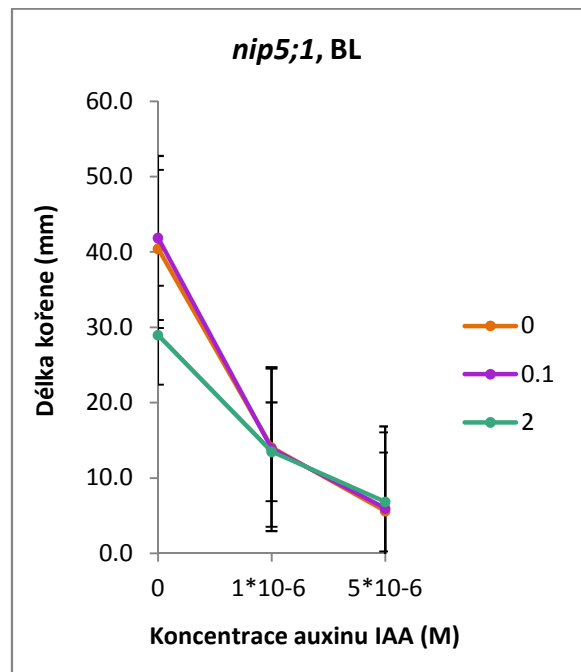
Kořeny rostlin rostoucích na modrém světle byly v porovnání s hypokotytem mnohem delší a na rozdíl od hypokotyly byla u růstu kořenů zaznamenána výrazná inhibice vlivem aplikovaného boru i auxinu. Průměrná délka kořene rostliny Col-0 rostoucí na médiu bez boru a bez auxinu byla 50 mm. Přidáním auxinu o koncentraci  $1 \times 10^{-6}$  M byla naměřena 70 % inhibice a při zvýšení množství auxinu na koncentraci  $5 \times 10^{-6}$  M, vzrostla na 87 %. Na médiu s obsahem kyseliny borité o koncentraci 0,1 mM byla situace podobná jako na médiu bez boru (Obr. 12a). Kořeny rostlin Col-0 rostoucích na médiu s obsahem  $H_3BO_3$  o koncentraci 2 mM byly výrazně kratší než kořeny rostlin na médiu bez boru.

Kořeny mutantních rostlin rostoucích na médiu bez auxinu a bez nebo s borem byly podstatně kratší než kořeny rostlin kontrolního ekotypu Col-0 (Obr. 12b) rostoucích ve stejných podmínkách.

(a)



(b)

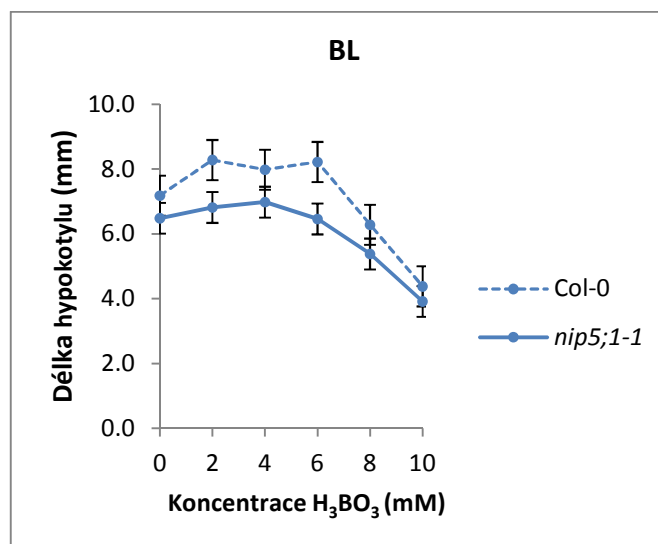


**Obr. 12** Účinek auxinu IAA na růst kořene kontrolní rostliny *Col-0* (a) a mutantní rostliny *nip5;1* (b) na modrém světle, na médiu s obsahem kyseliny borité (0; 0,1; 2 mM). Výsledky jsou průměrné hodnoty  $\pm$  SE, získané ve čtyřech nezávislých experimentech, pro každý genotyp zvlášť.



## 8 Diskuze

Hypokotyl *Arabidopsis* je poměrně jednoduchý orgán, který tvoří asi 20 epidermálních buněk. Většina buněk se vytváří v embryu, a proto hypokotyl roste v důsledku prodlužování těchto buněk (Gendreau *et al.*, 1997). V první části experimentu byl studován vliv boru na růst hypokotylu *Arabidopsis* a zapojení proteinu NIP5;1 v růstu rostlin *Arabidopsis* při různých koncentracích kyseliny borité. K tomu byl použit genetický přístup, který spočíval ve studiu vlivu světelných podmínek na borem-indukovanou stimulaci či inhibici růstu mutantu *nip5;1* a odpovídající kontrolní rostliny *Arabidopsis*, Col-0. Nejvyšší stimulace růstu hypokotylu obou genotypů byla naměřena ve tmě a na červeném světle. Prodlužování hypokotylu mutantní i kontrolní rostliny bylo nejvíce stimulováno na médiu s obsahem kyseliny borité o koncentraci 1-2 mM, naopak inhibice vzrůstala při koncentracích nad 5 mM. Růstové reakce hypokotylu obou genotypů byly ve tmě a na červeném světle srovnatelné. Ovšem na modrém světle, kde byla stimulace růstu hypokotylu borem méně výrazná, ukazoval mutant *nip5;1* menší citlivost k účinkům boru než kontrolní rostlina (Obr. 13). Zatímco u Col-0 byla zjištěna stimulace při 1 a 3 mM koncentraci  $H_3BO_3$ , u mutantní rostliny byl stimulační účinek výrazně nižší. Na základě těchto výsledků lze předpokládat, že na modrém světle je funkční kanál NIP5;1 zapojen v borem-indukovaném růstu hypokotylu.



**Obr. 13** Zvětšené schéma růstu hypokotylu kontrolní (Col-0) a mutantní rostliny (*nip5;1*) na modrém světle (viz také obr. 8b).

V porovnání s hypokotylem kořeny reagovaly citlivěji na změny koncentrace kyseliny borité. U kořenů mutantních i kontrolních rostlin byla inhibice patrná již od 0,1 mM koncentrace  $H_3BO_3$ . Nejmenší procento inhibice bylo naměřeno ve tmě (přibližně 70 %), zatímco na modrém a na červeném světle byla inhibice největší - při 10 mM koncentraci  $H_3BO_3$  dosahovala hodnot nad 80 %.

První část předložené bakalářské práce navazuje na výsledky experimentální studie (Kocábek *et al.*, 2009), která odhalila, že kyselina boritá prostřednictvím transportéru BOR1 stimuluje růst hypokotylu *Arabidopsis* při koncentraci 1-3 mM a inhibuje jej při koncentracích nad 5 mM. Dále bylo zjištěno, že v procesu stimulace či inhibice růstu hrají důležitou roli také světelné podmínky. Ukázalo se, že ve tmě je exprese genu *BOR1* potlačena, a naopak na modrém a červeném světle dochází k její stimulaci (Kocábek *et al.*, 2009). V důsledku zvýšené syntézy transportéru BOR1 je do rostliny dopraveno větší množství boru, které při koncentraci 1-3 mM růst stimuluje. Rozdíly ve stimulaci a inhibici růstu hypokotylu borem u Col-0 a mutantu *nip5;1* zjištěné v této bakalářské práci dále rozšířily znalosti o regulaci růstu hypokotylu borem a světlem, protože naznačují, že kromě transportéru BOR1 je do borem-indukovaného růstu hypokotylu zapojen i kanál NIP5;1, a to specificky na modrém světle. Výsledky rovněž naznačují, že transport boru do rostliny pomocí proteinových přenašečů BOR1 a NIP5;1 je regulován pravděpodobně odlišnými mechanismy. Toto tvrzení je mimo jiné podloženo výsledky bakalářské práce K. Slowikové (2013), která pozorovala výraznou inhibici růstu hypokotylu mutantu *nip5;1* oproti publikovaným výsledkům mutantu *bor1-1* (Kocábek *et al.*, 2009).

Růst rostlin je také významně regulován rostlinnými hormony. Ačkoliv je auxin hormon, který v přirozených podmínkách stimuluje růst, je známo, že u intaktních rostlin v podmínkách *in vitro* exogenní auxin v časovém horizontu několika dní inhibuje prodlužovací růst rostlin (hypokotylu i kořene) (Boerjan *et al.*, 1995; King *et al.*, 1995; Thomine *et al.*, 1997). Bylo ovšem rovněž pozorováno, že za těchto specifických podmínek může nativní auxin IAA růst hypokotylu často stimulovat. Bylo zjištěno, že hormonální a nutriční signální dráhy spolu při regulaci růstu rostlin interagují (Krouk *et al.*, 2011). Úloha rostlinných hormonů v procesu regulace růstu hypokotylu byla studována ve druhé části experimentu předložené bakalářské práce. Experimenty navazovaly na dříve publikovanou práci Stočes *et al.* (2012), kde autoři uvádějí, že stimulační účinek auxinu IAA ( $5 \times 10^{-6}$  M) na růst hypokotylu *Arabidopsis* na modrém světle je potlačen zvyšující se koncentrací boru, a to prostřednictvím transportéru BOR1.

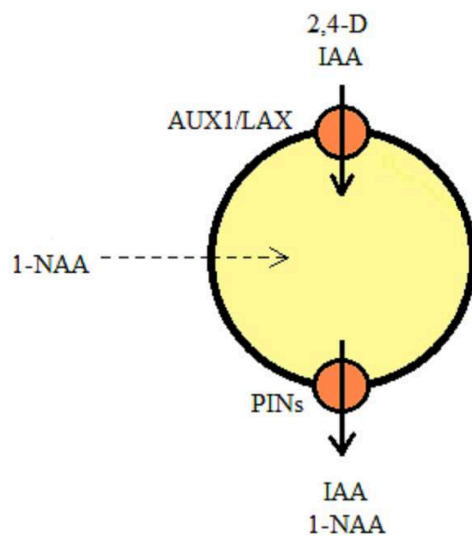
Na základě experimentů prováděných na mutantní rostlině *bor1-1* byla autory navržena hypotéza, že na modrém světle transportér BOR1 částečně zprostředkovává vliv boru na citlivost hypokotylu k auxinu (Stočes *et al.*, 2012; str. 26). Ve své bakalářské práci jsem na základě této hypotézy studovala růstové reakce mutantní (*nip5;1*) a kontrolní rostliny (Col-0) na modrém světle. Hlavním cílem experimentů bylo ověřit, že na modrém světle bor ovlivňuje citlivost hypokotylu *Arabidopsis* k exogenně aplikovanému IAA a zjistit, zda je tento účinek boru zprostředkován ještě jiným transportérem boru, konkrétně kanálem pro bor, NIP5;1. Ve své práci jsem na základě této hypotézy studovala růstové reakce mutantní (*nip5;1*) a kontrolní rostliny (Col-0) na modrém světle. Grafické znázornění na obrázcích 10 až 12 ukazuje citlivější reakce hypokotylu mutantní rostliny *nip5;1* na změny koncentrace boru a/nebo auxinu, oproti hypokotylu rostliny kontrolní.

Stočes *et al.* (2012) ve své práci uvádí, že na modrém světle auxin IAA v koncentraci  $5 \times 10^{-6}$  M a při absenci boru v médiu stimuluje růst hypokotylu Col-0. Moje experimenty však ukázaly, že na modrém světle a při absenci boru auxin IAA růst nestimuloval, ale naopak inhiboval ( $10^{-6}$  M) nebo neměl výrazný efekt ( $5 \times 10^{-6}$  M). Tyto nesrovnalosti v měření mohou mít různé příčiny, například nepřesnost v pipetování hormonů do média nebo v tom, že byl proveden nedostatečný počet pokusů, které by zvýšily pravděpodobnost a spolehlivost výsledků. Dalším důvodem odlišnosti výsledků může být skutečnost, že nativní auxin IAA je fotolabilní, a proto mohou být růstové reakce ovlivněny jeho obsahem v semenech, a to zejména v závislosti na roční době, ve které byla semena sklížena a kultivována. Přestože, na rozdíl od Stočese *et al.* (2012), nebyl na modrém světle a při absenci boru stimulační účinek IAA pozorován, experimenty provedeny v této bakalářské práci potvrdily, že na modrém světle bor se zvyšující se koncentrací eliminuje („obrací“) účinek auxinu pozorovaný při absenci boru (Obr. 11a).

Jak již bylo zmíněno, mutantní rostlina *nip5;1* má defekt v genu kódujícím proteinový kanál pro kyselinu boritou, NIP5;1. V první části experimentu jsem zjistila, že tento kanál by mohl být zapojen v borem-indukované stimulaci růstu hypokotylu. Proto předpokládám, že může zprostředkovávat také vliv boru na citlivost hypokotylu k auxinu IAA. Porovnáním inhibice kontrolní rostliny Col-0 a mutantní rostliny *nip5;1* je patrné, že mutant reaguje mnohem méně k borem-indukované změně citlivosti k auxinu IAA než WT (Obr. 11a, b).

Na základě těchto výsledků předpokládám, že specificky na modrém světle, je bor schopen ovlivňovat (resp. potlačovat) citlivost hypokotylu *Arabidopsis* k auxinu IAA rovněž prostřednictvím kanálu NIP5;1.

Ve srovnání se syntetickými auxiny 2,4-D a 1-NAA, které růst buněk vždy inhibují (Stočes *et al.*, 2012; bakalářská práce K. Slowiková, 2013 - nepublikované výsledky), přírodní auxin IAA je za určitých podmínek schopen růst stimulovat. Na základě modelu na obrázku 14 se uvažuje, že buňka rovnoměrně reguluje hospodaření s IAA, který je do cytosolu transportován membránovým přenašečem AUX1/LAX (Parry *et al.*, 2001) a odčerpáván pomocí PIN transportérů, avšak přesný mechanismus regulace není dodnes známý. Na tuto hypotézu navazuje Stočes *et al.* (2012), který ve své publikaci navrhl schéma působení modrého světla (Obr. 7 ze str. 26) v procesech transportu auxinů. Podle něj může modré světlo nepřímo ovlivňovat aktivitu auxinových transportérů a tím regulovat růstové reakce. Stočes *et al.* (2012) ve své studii uvažuje, že funkce přenašeče AUX1 je blokována modrým světlem. Mimo jiné bylo zjištěno, že funkce effluxního auxinového přenašeče PIN je na modrém světle rovněž inhibována (Blakeslee *et al.*, 2004). Proto lze předpokládat, že v důsledku blokování funkce obou auxinových přenašečů na modrém světle dochází ke snížení koncentrace auxinu v buňce. Na základě studie Stočes *et al.* (2012) a mnou zpracovaných výsledků vyplývá, že klíčovou roli ve stimulaci růstu hypokotylu hraje právě koncentrace auxinu IAA v buňce, a tato stimulace je potlačena zvýšeným množstvím boru. Domnívám se, že modré světlo indukuje expresi NIP5;1 a se vzrůstající koncentrací boru v buňce se zablokuje přítok auxinu, což má za následek inhibici růstu. Avšak ke správnému pochopení a odhalení mechanismu interakce boru a auxinu je potřeba provést řadu dalších experimentů.



**Obr. 14** Mechanismus transportu auxinů dovnitř a ven z buňky. Influxní přenašeč AUX1/LAX do buňky transportuje auxiny 2,4-D a IAA, naopak membránový effluxní protein PINs auxiny z buňky odčerpává. Auxin 1-NAA se do buňky dostává pasivní difuzí (zpracováno podle Stočes *et al.*, 2012 s využitím schématu podle Morris, 2000).

## 9 Závěr

Cílem předložené bakalářské práce bylo zjistit, zda je kanál NIP5;1 zapojen v borem-indukované stimulaci růstu hypokotylu *Arabidopsis* a zda NIP5;1 hraje úlohu i v regulaci citlivosti hypokotylu k auxinu IAA borem. Současně jsme sledovali, jakou úlohu v těchto růstových reakcích hrají světelné podmínky. Aplikace genetického přístupu spočívající v analýze mutanta *nip5;1* odhalily zapojení proteinového kanálu NIP5;1 v borem-indukované stimulaci růstu hypokotylu, specificky na modrém světle. Výsledky bakalářské práce vedou rovněž k závěru, že prostřednictvím kanálu NIP5;1 bor snižuje citlivost k účinkům exogenního auxinu IAA. Z výsledků také vyplývá, že funkce NIP5;1 je regulována světelnými podmínkami a závisí zejména na modrém světle. Výsledky bakalářské práce doplňují informace o komplexní interakci hormonálních, nutričních a světelných signálních drah v procesu prodlužování hypokotylu.

## Literatura

- Abreu I., Poza L., Bonilla I., Bolaños L.** (2014) Boron deficiency results in early repression of a cytokinin receptor gene and abnormal cell differentiation in the apical root meristem of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol Biochem.* 77:117-21.
- Ahmad M., Cashmore A. R.** (1993) *Nature* 366: 162–166.
- Ahmad M., Jarillo J. A., Cashmore A. R.** (1998) Chimeric proteins between cry1 and cry2 *Arabidopsis* blue light photoreceptors indicate overlapping functions and varying protein stability. *Plant Cell* 10:197–207.
- Ahmad W., Niaz A., Kanwal S., Rahmatullah and Rasheed M. K.** (2009) Role of boron in plant growth: A review. *Journal of Agricultural Research.* Vol. 47, pp. 329-338.
- Ahmad W., Zia M. H., Malhi S. S., Niaz A. and Saifullah** (2012) Boron Deficiency in Soils and Crops: A Review, *Crop Plant*, Dr Aakash Goyal (Ed.), ISBN: 978-953-51-0527-5.
- Arteca R.** (1996) *Plant Growth Substances: Principles and Applications.* New York: Chapman & Hall.
- Balasubramanian S., Sureshkumar S., Agrawal M., Michael T. P., Wessinger C., Maloof J. N., Clark R., Warthmann N., Chory J. and Weigel D.** (2006) The PHYTOCHROME C photoreceptor gene mediates natural variation in flowering and growth responses of *Arabidopsis thaliana*. *Nature Genetics* 38, 711-715.
- Bassil E., Hu H. and Brown P. H.** (2004) Use of Phenylboronic Acids to Investigate Boron Function in Plants. Possible Role of Boron in Transvacuolar Cytoplasmic Strands and Cell-to-Wall Adhesion. *Plant Physiology*: vol. 136. no. 2 3383-3395.
- Blakeslee J. J., Bandyopadhyay A., Peer W. A., Makam S. N., Murphy A. S.** (2004) Relocalization of the PIN1 auxin efflux facilitator plays a role in phototropic responses. *Plant Physiol.* 134: 28-31.
- Boerjan W., Cervera M. T., Delarue M., Beeckman T., Dewitte W., Bellini C., Caboche M., Van Onckelen H., Van Montagu M.** (1995) Inz6 D superroot, a recessive mutation in *Arabidopsis*, confers auxin overproduction. *Plant Cell* 7: 1405-1419.
- Briggs W. R., Beck C. F., Cashmore A. R., Christie J. M., Hughes J., Jarillo J. A., Kagawa T., Kanegae H., Liscum E., Nagatani A., Okada K., Salomon M., Rüdiger W., Sakai T., Takano M., Wada M., Watson J. C.** (2001) The phototropin family of photoreceptors. *Plant Cell.*;13:993–997.
- Butler W. L., Hendricks S. B., Siegelman H. A.** (1960) *Plant Physiol. Suppl.* 35: 32.
- Cashmore A. R., Jarillo J. A., Wu Y. J., Liu D.** (1999) Cryptochromes: blue light receptors for plants and animals. *Science* 284: 760–765.

- Dannel F., Pfeffer H., Romheld V.** (2000) Characterization of root boron pools, boron uptake and boron translocation in sunflower using the stable isotope  $^{10}\text{B}$  and  $^{11}\text{B}$ . *Australian Journal of Plant Physiology* Vol. 156, pp. 756–761.
- Dannel F., Pfeffer H., Walch-Liu P. and Romheld V.** (2001) Plant nutrition – food security and sustainability of agro-ecosystems. Dordrecht: Kluwer, 162–163.
- Darvill et al.** (1978) Structure of plant cell walls. VIII. A new pectic polysaccharide. *Plant Physiol.*, 62, 418-422.
- Darwin Ch.** (1881) *The Power of Movement in Plants*. Appleton, New York.
- Davies P. J.** (1995) in *Plant Hormones Physiology, Biochemistry and Molecular Biology* (ed. Davies, P.J.) 1–12. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Dell B. and Huang, L.** (1997) Physiological response of plants to low boron. *Plant and Soil*. Vol. 193, pp. 103–120.
- Ebert A. and Bangerth F.** (1982) Possible hormonal modes of action of three apple thinning agents. - *Sd. Hortic.* 16: 343-356.
- Epstein E., Chen K. H., Cohen J. D.** (1989) Identification of indole-3-butyric acid as an endogenous constituent of maize kernels and leaves. *Plant Growth Regul* 8: 215-223.
- Folta K. M., Spalding E. P.** (2001) Unexpected roles for cryptochrome 2 and phototropin revealed by high-resolution analysis of blue light-mediated hypocotyl growth inhibition. *Plant J.* 26:471–78.
- Gallagher S., Short T. W., Pratt L. H., Ray P. M., Briggs W. R.** (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 8003–8007.
- Gendreau E., Traas J., Desnos T., Grandjean O., Caboche M., Höfte H.** (1997) Cellular basis of hypocotyl growth in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* 114: 295–305.
- Goldbach H. E., Yu Q., Wingender R., et al.** (2001) Rapid response reactions of roots to boron deprivation. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science.*; 164:173–181.
- Gupta, U. C.** (1979a) Boron nutrition of crops. *Advances in Agronomy*. Vol. 31, pp. 273-307.
- Gupta U. C., Jame Y. W., Campbell C. A., Leyshon A. J. and Nicholaichuk W.** (1985) Boron toxicity and deficiency: A review. *Can. J. Soil Sci.* 65: 381-409.
- Housecroft, C. E. and Sharpe A. G.** (2005) *Inorganic Chemistry* (2nd ed.). Pearson Prentice-Hall. pp. 314–5.
- Chandler J. W.** (2009) Local auxin production: a small contribution to a big field. *Bioessays*; 31:60-70.



- Christie J. M.** (2007) Phototropin blue-light receptors. *Annu. Rev. Plant Biol.* 58: 21-45. Jensen P. J., Bandurski R. S. (1994). *Plant Physiol.*: 106, 343 – 351.
- Ishii T., Matsunaga T., Pellerin P., O'Neill M. A., Darvill A., Albersheim P.** (1999) The plant cell wall polysaccharide rhamnogalacturonan II self-assembles into a covalently cross-linked dimer. *J. Biol. Chem.* 274: 13098-13104.
- Jensen P. J. and Bandurski R. S.** (1994) Metabolism and Synthesis of Indole-3-Acetic Acid (IAA) in *Zea mays*. Levels of IAA during Kernel Development and the Use of *in vitro* Endosperm Systems for Studying IAA Biosynthesis. *Plant Physiol.* 106: 343-351
- Kato Y., Miwa K., Takano J., Wada M., Fujiwara T.** (2009) Highly boron deficiency-tolerant plants generated by enhanced expression of NIP5;1, a boric acid channel. *Plant Physiol.* 50(1):58-66.
- Kendrick R. E. and Kronenberg G. H. M.** (1994) Photomorphogenesis in Plants. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands. Kögl F., Haagen-Smit A. J. (1936). *Zeit Physiol Chem* 243, 209.
- King J. J., Stimart D. P., Fisher R. H., Blecker A. B.** (1995) A mutation altering auxin homeostasis and plant morphology in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 7: 2023-2037.
- Kobayashi M., Matoh T., Azuma J.** (1996) Two chains of rhamnogalacturonan II are cross-linked by borate-diol ester bonds in higher plant cell walls. *Plant Physiol* 110: 1017–1020.
- Kocábek T., Svoboda Z., Al-Zwi A. M., Rolfe S. A., Fellner M.** (2009) Boron-regulated hypocotyl elongation in *Arabidopsis* mutants with defects in light signaling pathways. *Environmental and Experimental Botany* 67: 101-111.
- Kögl F., Haagen-Smit A. J.** (1936) *Zeit Physiol Chem* 243,209.
- Kowalczyk M., Sandberg G.** (2001) Quantitative analysis of indole-3-acetic acid metabolites in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 127(4); 1845-53. PMID: 11743128.
- Krouk G., Ruffel S., Gutierrez R. A., Gojon A., Crawford N. M., Coruzzi G. M., Lacombe B.** (2011) A framework integrating plant growth with hormones and nutrients. *Trends Plant Sci* 16:178–182.
- Li Q. H., Yang H. Q.** (2007) Cryptochrome signaling in plants. *Photochem. Photobiol.* 83:94–101.
- Ljung K., Bhalerao R. P., and Sandberg G.** (2001) Sites and homeostatic control of auxin biosynthesis in *Arabidopsis* during vegetative growth. *Plant J.* 28: 465-474.
- Ljung, K., Ostin, A., Lioussanne, L. and Sandberg, G.** (2001) Developmental regulation of indole-3-acetic acid turnover in Scots pine seedlings. *Plant Physiol.* 125: 464–475.
- Ljung K., Hull A. K., Celenza J., Yamada M., Estelle M., Normanly J. and Sandberg G.** (2005) Sites and regulation of auxin biosynthesis in *Arabidopsis* roots. *Plant Cell* 17, 1090-1104.

- Loomis W. D., Durst R. W.** (1992) Chemistry and biology of boron. *Biofactors*. 3(4):229-39.
- Matsunaga T., and Ishii T.** (2004) Characterization of metal binding properties of rhamnogalacturonan II from plant cell walls by size-exclusion HPLC/ICP-MS, *Anal. Sci.*, 20, 1389-1393
- Mauseth, J. D.** (1991) *Botany: An Introduction to Plant Biology*. Philadelphia: Saunders. pp. 348-415.
- Miwa K., Takano J., Omori H., Seki M., Shinozaki K., Fujiwara T.** (2007) Plants tolerant of high boron levels. *Science* 318: 1417.
- Miwa K., Fujiwara T.** (2010) Boron transport in plants: co-ordinated regulation of transporters. *Annals of Botany* 105 (7): 1103-1108.
- Miwa K., Tanaka M., Kamiya T., Fujiwara T.** (2010) Molecular mechanisms of boron transport in plants: involvement of *Arabidopsis* NIP5;1 and NIP6;1. *Adv. Exp. Med. Biol.*; 679:83-96.
- Miwa K., Wakuta S., Takada S., Ide K., Takano J., Naito S., Omori H., Matsunaga T., Fujiwara T.** (2013) Roles of BOR2, a boron exporter, in cross linking of rhamnogalacturonan II and root elongation under boron limitation in *Arabidopsis*. 163(4):1699-709.
- Morris D. A.** (2000) Transmembrane auxin carrier systems – dynamic regulators of polar auxin transport. *Plant Growth Regul.* 32: 161-172.
- Murashige T., Skoog A.** (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plantarum* 15: 473–497.
- Nable R. O., Banuelos G. S. and Paull J. G.** (1997) Boron toxicity. *Plant and Soil*. Vol. 193, pp. 181–198.
- Nakagawa Y., Hanaoka H., Kobayashi M., Miyoshi K., Miwa K., Fujiwara T.** (2007) Cell-type specificity of the expression of Os BOR1, a rice efflux boron transporter gene, is regulated in response to boron availability for efficient boron uptake and xylem loading. *The Plant Cell* 19: 2624–2635.
- Noh B., Murphy A. S., Spalding E. P.** (2001) Multidrug Resistance-like genes of *Arabidopsis* required for auxin transport and auxin-mediated development. *Plant Cell* 13: 2441-2454.
- Normanly J.** (2010) Approaching cellular and molecular resolution of auxin biosynthesis and metabolism. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*; 2:a001594.
- Olsen S. R.** (1972) Micronutrient interactions. In: J.J. Mortvedt, P.M. Giordano and W.L. Lindsay (eds.), *Micronutrients in Agriculture*. Soil Science Society of America Inc., Madison, Wisconsin, USA, pp 243-264.
- O'Neill M. A., Warrenfeltz D., Kates K., Pellerin P., Doco T., Darvill A. G., Albersheim P.** (1996) Rhamnogalacturonan II, a pectic polysaccharide in the walls of growing plant cells, forms a dimer that is covalently cross-linked by borate ester. *J. Biol. Chem.* 271: 22923-22930, and Correction: 1997, *J. Biol. Chem.* 272: 3869.

- O'Neill M. A., Eberhard S., Albersheim P., Darvill A. G.** (2001) Requirement of Borate Cross-Linking of Cell Wall Rhamnogalacturonan II for *Arabidopsis* Growth. *Science*. Vol. 294 no. 5543 pp. 846-849.
- O'Neill M. A., Ishii T., Albersheim P., Darvill A. G.** (2004) Rhamnogalacturonan II: structure and function of a borate cross-linked cell wall pectic polysaccharide. *Annu Rev Plant Biol.* 55:109-39
- Parr, A. J. and Loughman, B. C.** (1983) Boron and membrane function in plants. In: *Metals and micronutrients: Uptake and utilization by plants*, 87-107, Robb D. A. and Pierpoint W. S. (Eds.), Academic Press, New York, NY, U.S.A.
- Parry G., Delbarre A., Marchant A., Swarup R., Napier R., Perrot-Rechenmann C., Bennett M. J.** (2001) Novel auxin transport inhibitors phenocopy the auxin influx carrier station aux1. *Plant J.* 25: 399-406
- Pavlová L., Fischer L.** (2011) *Růst a vývoj rostlin*, Karolinum, Praha.
- Raven J. A.** (1980) Short-and long-distance transport of boric acid in plants. *New Phyt.*, 84: 231-249.
- Raven P. H., Evert R. F. and Eichhorn S. E.** (1992) *Biology of Plants*. New York: Worth. pp. 545-572.
- Reisenauer, H. M., Walsh, L. M. and Hoefl, R. G.** (1973) Testing soils for sulphur, boron, molybdenum, and chlorine. Pages 173-200 in L. M. Walsh and J. D. Beaton, eds. *Soil testing and plant analysis*. Soil Sci. Soc. Am., Inc. Madison, Wis.
- Salisbury, F. B., and Ross, C. W.** (1992) *Plant Physiology*. Belmont, CA: Wadsworth. pp. 357-407, 531-548.
- Stangoulis J. C., Reid R. J., Brown P. H. and Graham R. D.** (2001) Kinetic analysis of boron transport in *Chara*. *Planta*. Vol. 213, pp. 142–146.
- Sakai T., Kagawa T., Kasahara M., Swartz T. E., Christie J. M., et al.** (2001) *Arabidopsis* nph1 and npl1: blue light receptors that mediate both phototropism and chloroplast relocation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:6969–74.
- Santner A., Irina L., Calderon-Villalobos and Estelle M.** (2009) Plant hormones are versatile chemical regulators of plant growth *Nature Chemical Biology* 5, 301 – 307.
- Sharrock R. A., Quail P. H.** (1989) Novel phytochrome sequences in *Arabidopsis thaliana*: structure, evolution, and differential expression of a plant regulatory photoreceptor family. *Genes. Dev.* 3: 1745-1757.
- Shorrocks, V. M.** (1997) The occurrence and correction of boron deficiency. *Plant and Soil*. Vol. 193, pp. 121-148.
- Slowiková K., bakalářská práce** (2013) Nепublikované výsledky.
- Smith H.** (1982) Light quality, photoperception and plant strategy. *Annual Review of Plant Physiology* 33: 481–518.

- Smith H., Whitelam G. C.** (1990) Phytochrome, a family of photoreceptors with multiple physiological roles. *Plant, Cell and Environment* 13: 695–707.
- Stoček Š., Karlická M., Fellner M.** (2012) Boron and blue light reduce responsiveness of *Arabidopsis* hypocotyls to exogenous auxins. *Plant Growth Regulation* 66:293-301.
- Taiz L. and Zeiger E.** (1998) *Plant Physiology*. 2nd ed. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Mass.
- Taiz L. and Zeiger E.** (2002) Auxin: the growth hormone. *Plant Physiology*, 423-558 pp.
- Taiz L. and Zeiger E.** (2009) Boron Functions in Plants: Looking Beyond the Cell Wall. *Plant Physiology* online, Chapter 5, Essay 5.1.
- Taiz L. and Zeiger E.** (2010) Auxin: The First Discovered Plant Growth Hormone. *Plant Physiology*, 545-582 pp.
- Taiz L. and Zeiger E.** (2010) Blue-Light Responses: Morphogenesis and Stomatal Movements. *Plant Physiology*, 521-543 pp.
- Taiz L. and Zeiger E.** (2010) Phytochrome and Light Control of Plant Development. *Plant Physiology*, 493-520 pp.
- Takano J., Noguchi K., Yasumori M., Kobayashi M., Gajdos Z., Miwa K., Hayashi H., Yoneyama T., Fujiwara T.** (2002) *Arabidopsis* boron transporter for xylem loading. *Nature* 420: 337-340.
- Takano J., Miwa K., Yuan L., von Wire'n N., Fujiwara T.** (2005) Endocytosis and degradation of BOR1, a boron transporter of *Arabidopsis thaliana*, regulated by boron availability. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 102: 12276–12281.
- Takano J., Wada M., Ludewig U., Schaaf G., Wirén von N., Fujiwara T.** (2006) The *Arabidopsis* Major intrinsic Protein NIP5;1 Is Essential for Efficient Boron Uptake and Plant Development under Boron Limitation. *The Plant Cell* 18: 1498-1509.
- Takano J., Miwa K., Fujiwara T.** (2008) Boron transport mechanism: collaboration of channels and transporters. *Trends in plant science* 13(8): 451-457.
- Takeda S. and Matsuoka M.** (2008) Genetic approaches to crop improvement: responding to environmental and population changes. *Nature Reviews Genetics* 9, 444-457.
- Tanaka M. and Fujiwara T.** (2007) Physiological roles and transport mechanism of boron: perspectives from plants: *Pflug. Arch.* **456**, 671–677.
- Tanaka M., and Fujiwara T.** (2008) Physiological roles and transport mechanisms of boron: Perspectives from plants. *Pflugers Arch.* 456 671–677.
- Tariq M. and Mott C. J. B.** (2007) The Significance of Boron in Plant Nutrition and Environment-A Review . *Journal of Agronomy*, 6: 1-10.

- Thomine S., Guern J., Barbier-Brygoo H.** (1997) Voltage- dependent anion channel of *Arabidopsis* hypocotyls: nucleotide regulation and pharmacological properties. *J. Membr. Biol.* 159: (in press).
- Todo T. et al.** (1996). *Science* 272, 109.
- Walsh T., Golden J. D.** (1953) The boron status of Irish soils in relation to the occurrence of boron deficiency in some crops in acid and alkaline soils. *Int. Soc. Soil Trans.*, 2: 167–71.
- Warington K.** (1923) The effect of boric acid and borax on the broad bean and certain other plants. *Ann Bot* 37:629–672.
- Welch, R. M.** (1995) Micronutrient nutrition of plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*. Vol. 14, pp. 49-82.
- White P. J.** (2001) The pathways of calcium movement to the xylem. *Journal of Experimental Botany* 52: 891–899.
- Woodward A. W., Bartel B.** (2005) Auxin: regulation, action, and interaction. *Annals of Botany*; 95:707-735.
- Yau S. K. and Ryan J.** (2008) Boron Toxicity Tolerance in Crops: A Viable Alternative to Soil Amelioration. Crop Science Society of America.
- Yu X., Liu H., Klejnot J., Lin C.** (2010) The cryptochrome blue light receptors. *Arabidopsis Book*; 8:e0135.

## Seznam zkratk

2,4-D	kyselina 2,4-dichlorfenoxyoctová
4-Cl-IAA	kyselina 4-chlorindolyl-3-octová
BL	modré světlo
CRY	krytochromy
Dark	tma
IAA	kyselina indol-3-octová
IBA	kyselina indol-3-máselná
NAA	kyselina naftyl-octová
Phy	fytochrom
RL	červené světlo
WT	wild type - kontrolní rostlina