

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Bakalářská práce

Olomouc 2010

Martina Bednářová

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra buněčné biologie a genetiky



Expresse auxin-binding proteinů ve fotomorfogenních mutantech rajčete v závislosti na auxinu a světle

Bakalářská práce

Martina Bednářová

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: prezenční

Olomouc 2010

Vedoucí práce: **doc. RNDr. Martin Fellner, Ph.D**

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením doc. Martina Fellnera, a že jsem použila pouze literární zdroje uvedené v kapitole Literatura.

V Olomouci dne 5. května 2010

.....

Podpis

Poděkování

Tímto bych chtěla poděkovat doc. Martinu Fellnerovi za odborné vedení a příležitost získat praxi v biologickém výzkumu a ostatním členům Laboratoře molekulární fyziologie za rady a připomínky k mé práci.

Shrnutí

Předkládaná bakalářská práce je zaměřena na studium role auxinu ve fotomorfogenezi rostlin. Etiolizované rostliny jsou charakteristické tím, že jsou křehké, prodloužené a postrádají chlorofyl. Po kontaktu se světlem dochází ke změnám, souhrnně označovaným jako fotomorfogeneze, kdy rostliny zpomalují růst, začnou vytvářet chlorofyl a získají tak schopnost využít světlo jako zdroj energie. Tohoto procesu se účastní také rostlinné hormony, ale dosud se nepodařilo zcela odhalit, jak spolu dráhy světla a hormonů interagují. Ke studiu interakce auxinu a světla sloužili fotomorfogenní mutanti rajčete (*Solanum lycopersicum* L.), na kterých byl zkoumán vliv modrého a červeného světla na růstové odpovědi k auxinům IAA, NAA a 2,4-D a vliv světla a auxinu na expresi genu *ABPI*. Výsledkem pokusů bylo zjištění, že modré světlo snižuje citlivost hypokotylu k inhibičnímu účinku exogenního auxinu. Tyto výsledky také naznačují, že účinek modrého světla je zprostředkován genem *7B-1*. Dále bylo zjištěno, že funkční receptor CRY1 je nezbytný pro zachování normální odpovědi k NAA na modrém a červeném světle. Molekulární experimenty odhalily souvislost mezi sníženou reakcí mutantu *7B-1* k auxinu a sníženou expresí *ABPI* na modrém světle. Výsledky těchto experimentů potvrzují existenci interakce mezi světlem a auxinem v růstu a vývoji rostlin.

Summary

Submitted bachelor thesis is focused on study of role of auxin in plant photomorphogenesis. Etiolated plants are characterized by weak and elongated growth, and by the absence of chlorophyll. After light exposure plants dramatically change their growth - elongation is reduced, plants start to produce chlorophyll, and they gain competence to use light as a source of energy. This process is known as photomorphogenesis. In photomorphogenesis, plant hormones play important role, but very little is known about the mechanisms of interactions between light and hormone signaling. To investigate the crosstalk between auxin and light in plant development, I used photomorphogenic mutants of tomato (*Solanum lycopersicum* L.), and studied effect of blue and red light on growth responses to auxins IAA, NAA and 2,4-D, and influence of light and auxin on expression of *ABPI*. My experiments revealed that blue light can decrease responsiveness of hypocotyl growth to the inhibitory effect of exogenous auxin. The results also indicate that the effect of blue light could be mediated by *7B-1* gene. I further found that functional receptor CRY1 is required for maintenance of normal growth response of hypocotyl to NAA under blue and red light. Molecular experiments showed a correlation between decreased growth responses to auxin and decreased expression of *ABPI* in hypocotyl of *7B-1* mutant developed under blue light. These results confirm the existence of interaction between light and auxin in plant growth and development.

Obsah

1	Úvod	8
2	Úvod do řešené problematiky	9
2.1	Auxin	9
2.1.1	<i>Historie objevu</i>	9
2.1.2	<i>Chemická podstata</i>	9
2.1.3	<i>Biosyntéza</i>	10
2.1.4	<i>Transport auxinu</i>	11
2.1.5	<i>Auxin-binding proteiny</i>	12
2.1.6	<i>Auxin a buněčná expanze</i>	15
2.2	Světlo	16
2.2.1	<i>Receptory modrého světla, odpovědi na modré světlo</i>	16
2.2.1.1	Kryptochromy	17
2.2.1.2	Fototropiny	18
2.2.1.3	Zeaxantiny	19
2.2.2	<i>Receptory červeného světla, odpovědi na červené světlo</i>	20
2.2.2.1	Fytochromy	20
2.2.3	<i>Interakce auxinu a světla ve fotomorfogenezi</i>	22
3	Materiál a metody	24
3.1	Rostlinný materiál	24
3.2	Růstové experimenty <i>in vitro</i>	24
3.3	Studium genové exprese	25
3.3.1	<i>Izolace RNA</i>	25
3.3.2	<i>Syntéza cDNA a PCR</i>	25
3.3.3	<i>Elektroforéza</i>	25
4	Výsledky	27
4.1	Růstové pokusy - interakce světla a auxinu	27
4.1.1	<i>Vliv světla na citlivost růstových reakcí hypokotylu 7B-1 k auxinu</i>	27
4.1.2	<i>Vliv světla na citlivost růstových reakcí hypokotylu cry1-1 k auxinu</i>	32
4.1.3	<i>Vliv světla na citlivost růstových reakcí hypokotylu cry1-2 k auxinu</i>	34
4.2	Exprese ABP1	39
5	Diskuze	41
6	Závěr	44
7	Literatura	45
8	Seznam použitých zkratk	50

1 Úvod

Moje bakalářská práce byla řešena v Laboratoři molekulární fyziologie na Katedře buněčné biologie a genetiky v rámci Záměru řešeného na PřF UP a financovaného Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy (projekt č. MSM6198959215).

Vývoj rostlin je hluboce ovlivněn světlem. U etiolizovaných rostlin spouští světelný signál řadu složitých pochodů, které vedou k tomu, aby rostlina mohla světlo využívat jako zdroj energie. Důležitou roli hrají rostlinné hormony jako auxiny, cytokininy, gibbereliny a další, mezi nimiž se vytváří jemná rovnováha a prostřednictvím kterých rostlina uskutečňuje růst a vývoj a reakce k vnějším i vnitřním podnětům. Signální dráhy světla a rostlinných hormonů jsou vzájemně propojené, ale o konkrétních interakcích světla a hormonů je toho dosud známo pouze málo. Signální dráhy auxinů v rostlinách jsou relativně dobře prozkoumány, ale přesto zbývá řada prvků auxinových drah, jejichž úloha není zcela známa. Mezi ně patří například auxinový receptor auxin-binding protein (ABP). Úloha ABP1 jako receptoru je známa především u *Arabidopsis*, kde je nezbytný pro mnoho vývojových a růstových procesů, například v embryogenezi. Velice málo je však známo o funkci ABPs v rostlinách rajčete a ovlivnění jeho funkce či aktivity světlem.

Cílem práce bylo zpracovat nejnovější literární zdroje vztahující se k řešenému tématu. V praktické části jsem pak využila genetického přístupu, který spočívá v analýze fotomorfogenních mutantů a jejich reakcí ke světlu a auxinu. Pokusila jsem se zjistit, zda citlivost fotomorfogenních mutantů rajčete *7B-1*, *cry1-1* a *cry1-2* k auxinu je ovlivňována světlem, a zda auxin-binding protein 1 (ABP1) může fungovat jako společný element signální dráhy světla a auxinu. Účelem experimentů bylo studium růstových reakcí *in vitro* u mutovaných a kontrolních rostlin k auxinům v závislosti na kvalitě světla. Dále jsem prováděla molekulární experimenty, jejichž účelem bylo studium exprese genu *ABP1* v hypokotylech mutantů *7B-1* a příslušné kontrolní rostliny v závislosti na koncentraci exogenního auxinu a kvalitě světla.

2 Úvod do řešené problematiky

2.1 Auxin

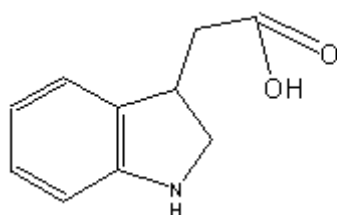
2.1.1 Historie objevu

Auxiny jsou rostlinné hormony, jejichž název vznikl z řeckého slova „*auxein*“, což znamená růst, zvětšovat se. Auxin byl objeven v druhé polovině 19. století Charlesem Darwinem a jeho synem. Darwina zajímalo, proč a jakým mechanismem se rostliny ohýbají za zdrojem světla. Experiment provedl s trávou *Phalaris canariensis*. Pokud rostlinu osvětlil z jedné strany tlumeným modrým světlem, rostlina se začala ohýbat směrem ke zdroji. Darwin si však všiml, že pokud zakryje vrcholovou špičku koleoptile, tak k ohýbání nedojde, přičemž růstová zóna koleoptile se nachází několik milimetrů od vrcholové špičky. Z toho usoudil, že ve vrcholové špičce vzniká nějaký druh signálu, který je transportován do růstové zóny, kde způsobuje rychlejší růst zastíněné strany oproti straně nezastíněné. Svá pozorování shrnul v knize *The Power of Movement in Plants* (Darwin a Darwin, 1881).

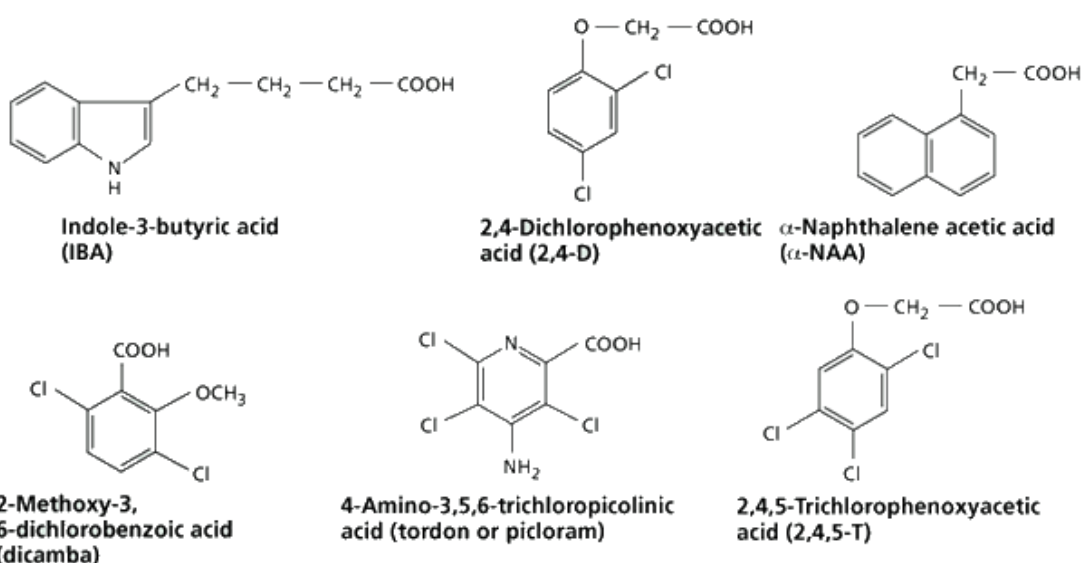
Další pokrok ve výzkumu přinesl vědec Fritz Went v roce 1926. Při pokusu odřízl vrcholovou špičku koleoptile ovsa (*Avena sativa*) a přenesl je na želatinový bloček. Auxin do něj difundoval ze špičky koleoptile a po přiložení bločku na stonek došlo k obnově růstu rostliny. Tímto byla potvrzena hypotéza, že prodlužovací růst je indukován chemickou substancí – auxinem (Zeiger a Taiz, 2006).

2.1.2 Chemická podstata

Endogenní auxin je ve své podstatě indolyl-3-octová kyselina (IAA) (obr. 1.) Dalšími endogenními auxiny jsou 4-chloro-indolyl-3-octová kyselina, indolyl-3-máselná kyselina a kyselina fenyl-octová (Chandler, 2009). Jelikož je struktura auxinu relativně jednoduchá, lze syntetizovat látky s touto aktivitou i uměle. Srovnáním různých auxinů se zjistilo, že jejich společnou vlastností je silný negativní náboj na karboxylové skupině postranního řetězce, který je separován od slabě pozitivního náboje aromatického kruhu vzdáleností asi 0,5 nm (Porter a Thimann, 1965; Farrimond *et al.* 1978). Struktury některých syntetických auxinů jsou znázorněny na obrázku 2.



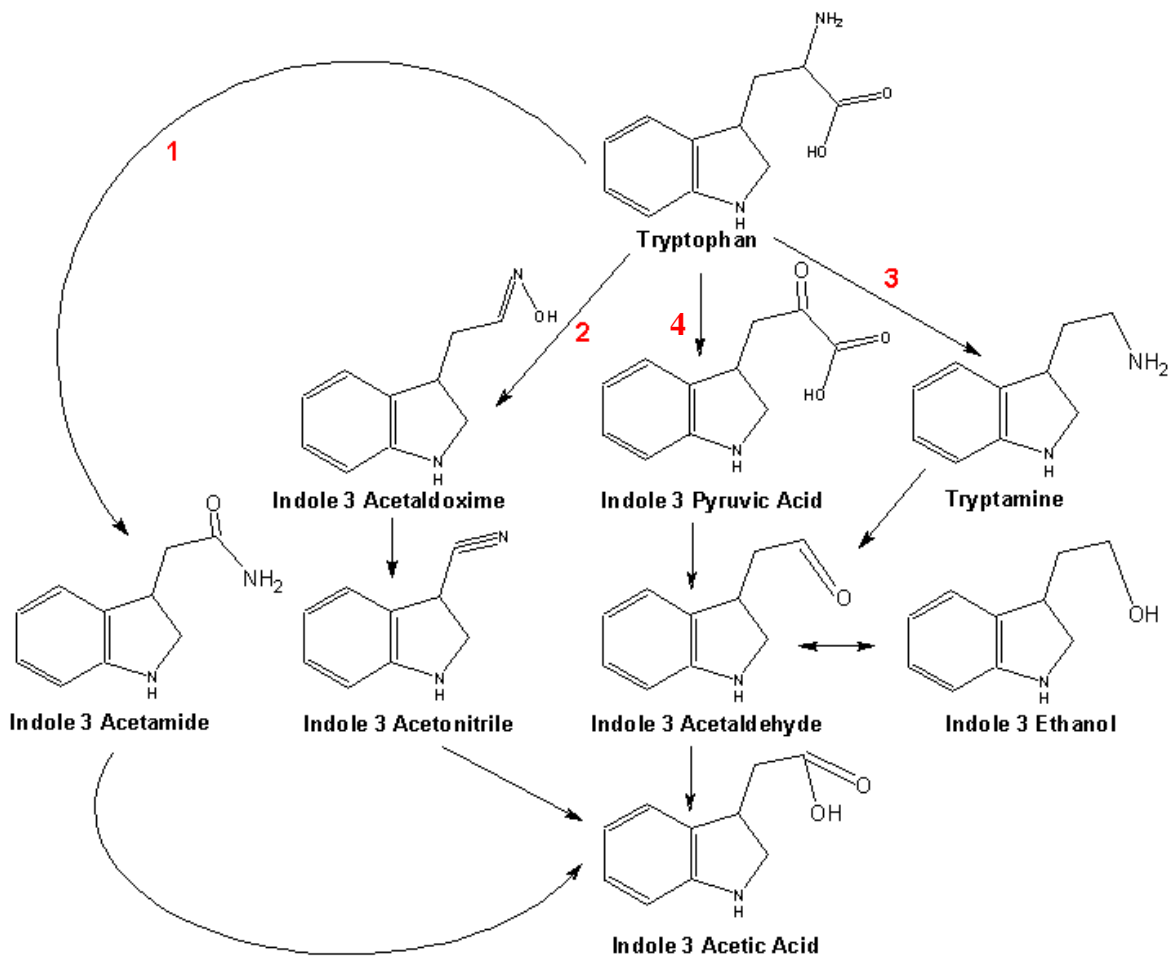
Obr. 1 – Struktura IAA (převzato z <http://www.biochem.arizona.edu>)



Obr. 2 – Struktury syntetických auxinů (převzato z <http://4e.plantphys.net>)

2.1.3 Biosyntéza

IAA je strukturně příbuzná tryptofanu. Biosyntéza probíhá především v rychle se dělicích a rostoucích pletivech. Primárně vzniká ve stonkovém apikálním meristému a mladých listech. Avšak také ostatní typy pletiv jsou schopny produkovat nízkou hladinu IAA (Ljung *et al.*, 2001). IAA vzniká drahou tryptofan dependentní nebo tryptofan independentní. Nejběžněji je IAA syntetizována tryptofan dependentní IPA drahou přes kyselinu indolyl-3-hroznovou (Woodward a Bartel, 2005). Na obrázku 3 je znázorněna IPA dráha syntézy a další tryptofan dependentní dráhy.



Obr. 3 – Biosyntéza IAA - tryptofan dependentní dráhy (převzato z <http://www.biochem.arizona.edu>)

- 1 – dráha IAM – syntéza přes indolyl-3-acetamid
- 2 – dráha IAN - syntéza přes indolyl-3-acetonitril
- 3 – dráha TAM – syntéza přes tryptamin
- 4 – dráha IPA – syntéza přes kyselinu indolyl-3-hroznovou

2.1.4 Transport auxinu

IAA je transportována především od apexu k bázi (bazipetálně), a to za spotřeby energie. Stonkový apex slouží jako hlavní zdroj IAA. Polární transport auxinu (PAT) přispívá k vytvoření podélného gradientu, který ovlivňuje různé vývojové procesy jako je prodlužování stonku, apikální dominance, hojení ran a senescence listů. PAT je specifický pro aktivní auxin a jeho analogy, inaktivní auxin takto transportován není (Zeiger a Taiz, 2006). Influx do buněk je zprostředkován AUX1 a LAX proteiny, eflux z buněk zajišťují PIN proteiny soustředěné především v bazální části buňky. U *Arabidopsis* byly popsány čtyři influxové přenašeče a osm různých PIN proteinů (Petrášek a Friml, 2009). Zdá se, že

PAT je regulován samotným auxinem, jelikož šíření auxinu směrem od zdroje posiluje jeho vlastní transport. PAT je také regulován přítomností přenašeče na membráně. Transkripce všech přenašečů je ovlivňována signální dráhou, kterou spouští auxin, a která zapojuje auxinový receptor TIR1. Transkripci ovlivňují i jiné hormony jako etylén a cytokininy. Roli hraje také specifické umístění přenašeče na membráně. U PIN proteinů je známé, že podléhají internalizaci a poté se vracejí zpět na povrch buňky. Auxin má na internalizaci PIN inhibiční efekt. Složení membrány je dalším faktorem ovlivňujícím PAT, protože vytváří vhodné prostředí pro interakce mezi proteiny. Sterolmetyltransferáza1 a cyklopropylizomeráza1 kontrolující skladbu membránových sterolů jsou rozhodujícími pro umístění PIN na membráně (Petrášek a Friml, 2009).

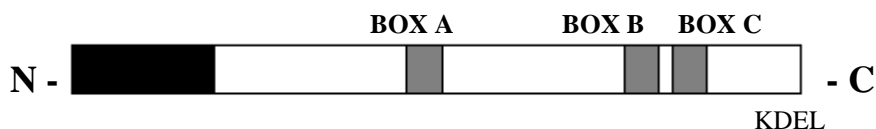
Kromě PAT může být IAA transportována pasivně floémem. Takto je transportována většina IAA tvořící se v mladých listech a květech. Rychlost pasivního transportu je mnohem vyšší než PAT. Pasivní transport auxinu floémem hraje zřejmě důležitou roli při kontrole dělení buněk v kambiu, při akumulaci kalózy a při větvení kořenů (Zeiger a Taiz, 2006). Bylo prokázáno, že PAT a floémový transport auxinu nejsou na sobě zcela nezávislé, a že auxin transportovaný floémem může přecházet do dráhy PAT (Cambridge a Morris, 1996).

2.1.5 Auxin-binding proteiny

Vědci si dlouho kladli otázku, jak auxin vlastně působí a jaké má receptory. Byl navržen model, kdy signální dráha auxinu je aktivována percepcí tohoto hormonu cílovými buňkami. Předpokládá se existence receptoru, který je přítomen na povrchu nebo uvnitř buněk a váže auxin s vysokou specifitou a afinitou. Tato vazba by poté mohla spustit biochemické a molekulární pochody, které by vedly k pozorovatelným růstovým odpovědím jako je buněčné dělení, růst a diferenciaci.

Auxin-binding protein 1 (ABP1) byl izolován z etiolizovaného koleoptile kukuřice (*Zea mays L.*) a byl identifikován jako auxinový receptor (Timpte, 2001) ABP1 je protein (dimer) tvořený dvěma podjednotkami o velikosti 22 kDa, který obsahuje N-terminální signální peptid, jehož sekvence je variabilní u všech ABP proteinů. Dále obsahuje několik konzervovaných domén sestávajících z 15-20 aminokyselin (Box A, B a C) a C-terminální část sloužící jako KDEL sekvence, tedy sekvence, která protein zadržuje v endoplazmatickém retikulu. Konzervovaná sekvence Box A je považována za hlavní místo vázající auxin (Davies, 2004). Schéma proteinu je znázorněno na obrázku 4. Z výzkumu vyplývá, že většina proteinu je asociována s endoplazmatickým retikulem.

Malá část proteinu je lokalizována v apoplastickém prostoru (Timppe, 2001). ABP1 byl detekován v mnoha rostlinných orgánech, exprimován je pouze v malé míře, s výjimkou koleoptile kukuřice (Davies, 2004).



Obr. 4 – Schéma ABP1 proteinu (upraveno dle Davies, 2004)

Doposud bylo prokázáno, že ABP1 se účastní mnoha procesů ve vývoji a růstu. ABP1 se ukázal být rozhodujícím proteinem v embryogenezi. U *Arabidopsis* byl identifikován jediný gen kódující ABP1. Ke studiu role ABP1 sloužily rostliny s narušenou funkcí genu. U homozygotních mutantů byla tato mutace letální. Přitom u jedinců s funkční kopií *ABP1* se letální fenotyp neobjevil, což nasvědčuje tomu, že pro normální vývoj embrya stačí jediná kopie *ABP1*. U heterozygotních jedinců byl pozorován změněný fenotyp – embrya byla bíle zbarvená a jejich vývoj se zastavil v globulárním stádiu. Výsledkem experimentu bylo zjištění, že ABP1 se účastní elongace a dělení buněk při vývoji embrya (Chen *et al.*, 2001).

Jiná studie se zabývala časovým a prostorovým rozložením ABP1 v embryu tabáku (*Nicotiana tabacum* L.). ABP1 byl nalezen *in vivo* rovnoměrně rozložený v zygotě a polárně rozložený v apikální části embrya a také v buňkách mezi embryem a suspenzorem ve stádiu srdce a torpéda. Po přidání TIBA (kyselina 2,3,5-trijodobenzoová), inhibitoru PAT, došlo k narušení normálního rozložení ABP1 v kultuře embryí. Rozdílná distribuce ABP1 v různých vývojových stádiích potvrzuje účast ABP1 na vývoji a diferenciaci embrya. Také bylo zjištěno, že by ABP1 mohl hrát roli při řízení buněčného dělení ve stonkovém apikálním a kořenovém meristému. Z pokusu s TIBA vědci vyvodili, že by se ABP1 mohl podílet na vývojových změnách embrya závislých na auxinu (Chen *et al.*, 2010).

ABP1 se uplatňuje při auxinem indukovaném zvětšování buněk. V pokusu byly použity opět rostliny tabáku transformované *ABP1* pod kontrolou inducibilního promotoru. V kontrolních rostlinách indukoval auxin růst pouze ve špičce listu, zatímco v overprodukcujících transgenních rostlinách byl růst indukován v celém listu. Oblasti listu, které nejsou za normálních podmínek citlivé na auxin nyní získaly schopnost

indukovaného růstu striktně závislého na přítomnosti auxinu. Strukturně identický neaktivní auxin však růst nestimuloval. U ABP1 overprodukcujícího mutantu tedy došlo k rozšíření citlivosti k auxinu v dospělém pletivu listu. Množství ABP1 v každé transgenní buňce korelovalo s rozsahem auxinem indukovaného zvětšování buněk a s velikostí buněk (Jones, 1998).

Další experiment provedl Bauly *et al.* (2000) s transgenními mutanty tabáku. Autoři použili rostliny overexprimující ABP1 protein s normální KDEL C-terminální sekvencí, nebo s mutovanými formami KEQL, KDELGL či HDEL. Zkoumala se citlivost k auxinu. Exogenní auxin ovlivňoval aktivitu draselných kanálů ve svěracích buňkách stomat v závislosti na jeho koncentraci. Právě změna v činnosti draselných kanálů je základem pro buněčnou expanzi a otvírání stomat. Citlivost draselných kanálů k auxinu byla značně zesílena v rostlinách overexprimujících ABP1, což naznačuje roli ABP1 při otvírání stomat. Nebyl pozorován žádný rozdíl mezi transgenními rostlinami overprodukcujícími protein s KDEL a ostatními mutanty, proto patrně únik z endoplazmatického retikula není nezbytný pro změněnou aktivitu ABP1 ve svěracích buňkách. U rostlin s mutovanou C-terminální sekvencí došlo ke zvýšení citlivosti k auxinu, nikoli však k detekovatelnému vzrůstu množství ABP1 na plazmatické membráně, což by mohlo naznačovat, že ABP1 by mohl být aktivní uvnitř buňky.

David *et al.* (2007) zkoumal zapojení ABP1 v buněčném cyklu. K experimentu použil buněčné kultury produkující protilátky anti-ABP1, které blokovaly funkci ABP1, a které byly zacílené buď do endoplazmatického retikula nebo na plazmatickou membránu. Produkce protilátek vedla k zastavení buněčného dělení na rozdíl od kultur, které protilátky neprodukovaly. Přitom nebyla pozorována žádná změna ve tvaru buněk. Dalším zkoumáním bylo zjištěno, že většina buněk byla zastavena v G1 fázi nebo na přechodu G1/S fáze. Toto zastavení buněčného cyklu se ukázalo být reverzibilním. Malé procento buněk bylo také zastaveno v G2 fázi nebo na přechodu G2/M. Tyto výsledky naznačují důležitou roli ABP1 při regulaci buněčného cyklu. ABP1 tedy pravděpodobně funguje jako receptor signálu auxinu při regulaci buněčného cyklu.

Braun *et al.* (2008) se zabýval úlohou ABP1 během vegetativního vývoje. Byli použiti mutanti produkující protilátky anti – ABP1 a metoda antisense mRNA. Represe funkce ABP1 vedla k potlačení růstu apikálního vrcholu. Snížená aktivita ABP1 vedla ke zpomalení růstu listů, což souviselo se změněnou frekvencí dělení a endoreduplikací, došlo také k poklesu expanze buněk a ke změnám v expresi auxin responzivních genů. Lokální represe ABP1 v apikálním vrcholu odhalila roli ABP1 při řízení uspořádání a tvaru buněk.

Buňky v předpokládaném místě vzniku listů byly více senzitivní k represi ABP1 než buňky z jiných míst meristému. Provedené experimenty potvrdily důležitost ABP1 ve vegetativním vývoji.

2.1.6 Auxin a buněčná expanze

Auxin syntetizovaný ve stonkovém vrcholu je bazipetálně transportován do ostatních částí rostliny. Takto je udržován koncentrační gradient, kterým je regulován růst buněk. Kořeny pro svůj růst potřebují minimální koncentraci auxinu, takže elongace kořene je silně inhibována koncentracemi, které podporují růst ve stonku či koleoptile (Zeiger a Taiz, 2006). Studium rostlin *Arabidopsis* naznačuje, že primárním cílem působení auxinu při elongaci buněk jsou epidermální buňky. Aby se auxin k těmto buňkám dostal, musí být při polárním transportu laterálně odkloněn k vnějším pletivům. Tento proces je patrně zprostředkován laterálně orientovanými komplexy pro eflux auxinu ve vaskulárních parenchymatických buňkách (Friml *et al.*, 2002).

Expanze buněk probíhá ve třech krocích. Nejdříve dochází k nasávání vody buňkou přes plazmatickou membránu, což je řízeno gradientem vodního potenciálu. Následuje vzrůst turgorového tlaku a poté dochází k rozvolnění buněčné stěny umožňující zvětšení buňky v reakci na zvýšený turgor. Auxin pravděpodobně zvyšuje roztažitelnost buněčné stěny. Podle hypotézy acidického růstu způsobuje auxin nejdříve exkreci protonů do apoplastu, kterou zajišťuje H^+ -ATPáza. Předpokládá se, že by to mohlo probíhat třemi způsoby. Prvním je možnost syntézy dalších H^+ -ATPáz indukované auxinem. Z pokusů s koleoptile kukuřice se zjistilo, že množství ATPáz začalo rychle vzrůstat asi po 5 minutách po přidání auxinu a po čtyřiceti minutách se téměř zdvojnásobilo. Druhou možností je auxinem indukované zvýšení aktivity ATPáz a tím transportu protonů. Třetí možností je auxinem nepřímo aktivovaná protonová exkrece. Po navázání auxinu na receptor by se podle teorie spustila řada událostí vedoucí k zesílení exkrece protonů. Tato kaskáda pravděpodobně zahrnuje L- α -fosfatidylinositol, G-proteiny, protein kinázy a fosfolipázy (Davies *et al.*, 2004). Po acidifikaci apoplastu dochází k aktivaci enzymů a jejich činností k rozvolnění buněčné stěny prostřednictvím rozštěpení vodíkových můstků. Předpokládala se existence proteinů, které štěpí vodíkové můstky hemicelulózy. Zatím byla *in vitro* identifikována jediná skupina proteinů, která způsobovala rozvolnění buněčné stěny pod tlakem a při nízkém pH – expansiny (Cosgrove *et al.*, 2002). Existují také náznaky, že roli při štěpení vodíkových můstků by mohly hrát i hydroxylové radikály. Schopfer (2001) dokázal, že hydroxylové radikály jsou schopny způsobit ireverzibilní

roztažení izolovaných buněčných stěn a elongaci segmentů koleoptile a hypokotylu, že tato aktivita je optimální při nízkém pH optimum. Tuto hypotézu podporuje fakt, že auxin také může způsobit tvorbu superoxidových radikálů, potenciálních prekurzorů hydroxylových radikálů.

Při dlouhodobém růstu indukovaném auxinem jsou zřejmě zapojeny další faktory způsobující rozvolňování buněčné stěny. pH optimum pro rozvolnění je v počátku nízké, ale později se pH optima zvyšuje. Dále je důležitá osmoregulace. Jakmile začnou buňky nasávat vodu, dojde ke zředění osmoticky aktivních látek, což sníží efektivní turgor, dokud nejsou tyto látky zase doplněny. To vyplývá z následujícího pokusu. Pokud byly části koleoptile ovsa (*Avena sativa L.*) inkubovány s auxinem, ale bez osmoticky aktivních látek, míra růstu začala po jedné hodině klesat s klesající osmotickou koncentrací. V přítomnosti absorbujících látek jako sacharóza nebo KCl zůstávala míra růstu i osmotická koncentrace konstantní po dobu několika hodin. Dalším faktorem pro dlouhodobý růst je schopnost buněčné stěny uchovat si schopnost rozvolnění. Koleoptile inkubovaná s auxinem si tuto schopnost zachovávala po několik hodin, zatímco koleoptile inkubovaná ve vodě ji pomalu ztrácela. To naznačuje, že auxin působí regeneračně na schopnost buněčné stěny rozvolnit se. Toto může zahrnovat i obnovu WLP proteinů (wall loosening proteins) nebo syntézu nových polymerů buněčné stěny (Davies *et al.*, 2004).

2.2 Světlo

Vývoj rostlin je výrazně ovlivňován světlem. Etiolizované rostliny jsou charakterizované dlouhým, tenkým a křehkým stonkem, malými listy a absencí chlorofylu. Fotomorfogeneze je proces, při kterém světlo jako signál vyvolá změnu genové exprese, což vede ke změně metabolismu. Rostlině je tímto umožněno využívat světlo jako zdroj energie. Světelný signál je vnímán prostřednictvím fotoreceptorů. Fotoreceptory jsou charakterizovány vlnovou délkou vnímaného světla (Zeiger a Taiz, 2006). V následující kapitole bude pojednáno o receptorech modrého a červeného světla a o procesech, které jsou prostřednictvím těchto receptorů v rostlině spuštěny jako odpověď na světelný signál.

2.2.1 Receptory modrého světla, odpovědi na modré světlo

Receptory modrého světla jsou kryptochromy, fototropiny a zeaxantiny. Modré světlo ovlivňuje mnoho aspektů vývoje a růstu rostlin. Odpovědi k modrému světlu zahrnují deetiologizaci, stimulaci rozvoje děloh, regulaci doby kvetení, fototropismus, otvírání stomat, cirkadiální rytmy a regulaci genové exprese. (Lin, 2002)

2.2.1.1 Kryptochromy

Kryptochromy vnímají modré světlo a UV-A o vlnové délce 320-500 nm. Kryptochromy vykazují silnou homologii s geny pro bakteriální fotolyázu. DNA fotolyázy jsou flavoproteiny nalezené v bakteriích katalyzující blue/UV-A dependentní opravy DNA. Fotolyázy obsahují 2 typy chromoforů: flavin adenin dinukleotidový (FAD) chromofor a deazaflavin nebo pterin (Lin a Todo, 2005). Přestože kryptochromy nevykazují žádnou detekovatelnou fotolyázovou aktivitu, CRY1 obsahuje FAD a pterin. Kryptochromy také obsahují rozšíření v C-terminální části, které nebylo nalezeno u DNA fotolyáz. N-konec je tvořen photolyase related doménou (PHR), která váže FAD a pterin, C-konec tvoří DAS motiv (Sullivan a Deng, 2003). Molekula kryptochromu je znázorněna na obr. 5.

CRY1 a CRY2 u *Arabidopsis* jsou především jaderné proteiny které zprostředkovávají regulaci genové exprese a řízení cirkadiálních rytmů v reakci na modré světlo (Lin a Todo, 2005). Změny v genové expresi způsobené CRY1 a CRY2 vlivem modrého světla se týkají až 10-20% genomu *Arabidopsis* (Ma *et al.*, 2001).

CRY1 je rozpustný protein. Stejná hladina CRY1 byla detekována u rostlin pěstovaných ve tmě i pod bílým světlem, v mladých sazenicích i ve všech orgánech dospělých rostlin, z čehož vyplývá, že je exprimován konstitutivně. Analýzou mutantů *Arabidopsis* overexprimujících CRY1 bylo zjištěno, že CRY1 způsobuje inhibici elongace hypokotylu v odpovědi na modré světlo (Lin *et al.*, 1996). U overexprimujících rostlin byla také zjištěna větší akumulace anthocyaninů v důsledku zvýšené genové exprese. Zvýšená buněčná koncentrace CRY1 měla celkový inhibiční efekt na růst rostliny řízený světlem (Lin *et al.*, 1996).

CRY2 je také rozpustný protein, který je exprimován ve všech pletivech. CRY2 je na rozdíl od CRY1 na světle nestabilní - je negativně regulován modrým světlem, ale také UV-A a zeleným světlem (Lin *et al.*, 1996). Exprese CRY1 a CRY2 je vzájemně nezávislá. CRY2 společně s CRY1 je receptorem pro deetiolizaci indukovanou modrým světlem nízké intenzity. Při vysoké intenzitě světla je odpověď zprostředkována CRY1 (Lin *et al.*, 1998).

Ze studie *Arabidopsis* také vyplývá, že CRY1 a CRY2 působí antagonisticky při regulaci růstu primárního kořene. CRY1 podporuje růst, zatímco CRY2 jej inhibuje. Toto je ojedinělý případ protichůdné interakce. Při inhibici růstu hypokotylu, indukci kvetení a regulaci cirkadiálních rytmů CRY1 a CRY2 působí synergicky. Tato studie zjistila, že transport auxinu slouží jako další komponenta signální dráhy kryptochromů, která přenáší signál z apexu do kořene. Podporuje to fakt, že NPA (1-naftylftalamová kyselina),

inhibitor efluxu auxinu, inhibovala stimulaci růstu kořene modrým světlem. Při absenci CRY1 i CRY2 byl růst primárního kořene vyšší u rostlin pěstovaných pod modrým světlem než u rostlin pěstovaných ve tmě, což svědčí o tom, že je zde nějaká další dráha zprostředkovávající reakci na modré světlo. Receptorem by mohl být fytochrom A, u něhož je známo absorpční maximum v modré oblasti spektra (Canamero *et al.*, 2006).

Krytochromy mají podíl na řízení cirkadiálních rytmů. Na rozdíl od savčích krytochromů však nejsou zapojeny přímo v mechanismu rytmicity. Slouží pouze jako místo vstupu světelného signálu do drah řídicích vlastní rytmicitu. U double mutanta *cry1cry2* byla zachována silná cirkadiální rytmicita. Byla zjištěna také role krytochromů při transdukci světelného signálu zachyceného fytochromy (Devlin a Kay, 2000).

Mutantní rostliny *Arabidopsis* postrádající receptory CRY1 a CRY2 vykazují defekt ve fototropní odpovědi. Naopak rostliny overexprimující CRY1 a CRY2 mají zesílenou fototropní reakci. Tato data naznačují, že krytochromy by mohly být fotoreceptory ovlivňující také fototropismus (Ahmad *et al.*, 1998).

Krytochromy jsou regulovány fosforylací. Byla prokázána interakce mezi CRY1, CRY2 a fytochromem A, kdy phyA způsoboval fosforylaci krytochromů. Toto se ukázalo jako důležitý krok v transdukci signálu modrého světla (Spalding a Folta, 2005).

2.2.1.2 Fototropiny

Fototropiny byly identifikovány jako receptory modrého světla. C-terminální oblast fototropinu je serin/threonin kináza. N-terminální oblast obsahuje dvě LOV domény, každá je tvořena asi 100 aminokyselinami. LOV domény vážou flavin a mají sekvenci podobnou proteinům bakterií a savců, které mají funkci kyslíkových a napěťových senzorů. N-terminální část váže flavinmononukleotid (FMN) a podléhá autofosforylaci závislé na modrém světle. Události signální dráhy následující po autofosforylaci fototropinů zatím zůstávají neznámé (Schäfer a Nagy, 2006). Studie ukázaly, že molekula FMN je ve tmě nekovalentně vázána ke každé LOV doméně. Po ozáření modrým světlem FMN vytváří kovalentní vazbu s cysteinovým zbytkem molekuly fototropinu (Schwartz a Zeiger., 1984). Molekula fototropinu je znázorněna na obrázku 5.

Fototropismus je schopnost rostliny růst směrem ke zdroji světla nebo směrem opačným (pozitivní a negativní fototropismus). Byl pozorován u hub, kapradin a vyšších rostlin (Zeiger a Taiz, 2006). U *Arabidopsis* byly objeveny fototropiny PHOT1 a PHOT2. Mutant *phot1* postrádá fototropní reakci na modré světlo o nízké intenzitě, ale je u něj zachována reakce na světlo o vysoké intenzitě. Mutant *phot2* má fototropní odpověď

normální, ale u mutantu *phot1/phot2* je odpověď na světlo o nízké i vysoké intenzitě silně narušena. Tato data naznačují, že geny *PHOT1* a *PHOT2* jsou zapojeny ve fototropní reakci, přičemž *PHOT2* se uplatňuje při odpovědi na světlo o vysoké intenzitě (Sakai *et al.*, 2001).

Modré světlo způsobuje rychlou inhibici elongace hypokotylu etiolizovaných rostlin. Na rozdíl od inhibice způsobené červeným světlem, která se projevuje po 8 až 90 minutách, se inhibice indukovaná modrým světlem projevuje už během 15 až 30 sekund. Počáteční fáze inhibice elongace je zprostředkována fototropinem (kódovaným genem *NPH1*), za inhibici po 30 minutách jsou zodpovědné receptory CRY1 a CRY2 (Folta a Spalding, 2001).

Při nízké světelné intenzitě se chloroplasty akumulují k povrchu palisádového parenchymu za účelem maximální fotosyntézy. Pokud je intenzita světla příliš vysoká, vykazují chloroplasty vyhýbavou reakci, aby nedošlo k jejich poškození. Tyto reakce jsou dalším příkladem odpovědi na modré světlo (Taiz a Zeiger, 2006). Analýzou mutantů *Arabidopsis*, kteří měli defekt v těchto reakcích, bylo zjištěno, že odpovědným receptorem je *PHOT1* i *PHOT2*. Mutant *phot1* měl základní akumulační reakci a nezměněnou vyhýbavou reakci na vysokou intenzitu modrého světla. U mutantu *phot1/phot2* nebyla přítomna reakce akumulační ani vyhýbavá. Oba receptory se tedy účastní chloroplastové reakce (Sakai *et al.*, 2001).

Fototropiny regulují také otvírání stomat. Ozáření modrým světlem způsobí aktivaci protonové pumpy, která čerpá protony do apoplastu. Vzápětí dojde k otevření iontových kanálů a buňka začne čerpat dovnitř ionty a vodu, což způsobí zvýšení turgoru svěřacích buněk a otevření stomat. Zatímco mutant *phot1* a *phot2* vykazují pouze malé změny v otvírání stomat indukovaném modrým světlem, double mutant *phot1phot2* tuto odpověď postrádá úplně (Kinoshita *et al.*, 2001).

2.2.1.3. Zeaxantiny

Absorpční spektrum zeaxantinů je velmi podobné absorpčnímu spektru pro otvírání stomat indukovaného modrým světlem. Obsah zeaxantinů ve svěřacích buňkách koreluje s jejich otvíráním během dne. Citlivost svěřacích buněk na modré světlo stoupá jako funkce koncentrace zeaxantinů v nich obsažených. Otvírání stomat lze inhibovat 3 mM dithiothreitem (DTT), stejně tak tvorbu zeaxantinů blokuje DTT. To jsou důkazy pro roli zeaxantinů při otvírání stomat indukovaném modrým světlem (Zeiger a Zhu, 1998).

2.2.2 Receptory červeného světla, odpovědi na červené světlo

Jako receptory červeného světla byly dosud identifikovány fytochromy (Sullivan a Deng, 2003). Odpovědi na červené světlo a dlouhovlnné červené světlo (far-red) zahrnují regulaci klíčení semen a deetiolizace, regulaci velikosti děloh, listů a stonku ovlivněním buněčného dělení a růstu. Dále mezi odpovědi patří reakce na zastínění, řízení cirkadiálních rytmů, načasování doby květu a senescence (Schäfer a Nagy, 2006)

Odpovědi k červenému světlu závisejí na ozáření, což je počet fotonů dopadajících na jednotku plochy (fluence rate), popř. počet fotonů dopadajících na jednotku plochy za jednotku času (irradiation). Podle toho lze dělit reakce ke světlu na odpovědi k velmi nízké (VLFRs), nízké (LFRs) a vysoké intenzitě ozáření (HIRs) (Mandoli a Briggs, 1981).

Odpověď k velmi nízké ozáření je například klíčení semen *Arabidopsis* zprostředkované fytochromem A (Shinomura *et al.*, 1996). Tyto odpovědi lze vyvolat červeným světlem i far-red. Při VLFR je konvertováno méně než 0,02% fytochromu na formu Pfr. Far-red dokáže konvertovat zpět na formu Pr pouze 97% Pfr, 3% vždy zůstávají ve formě Pr. Proto jsou tyto odpovědi nevratné (Mandoli a Briggs, 1981).

Odpovědi k nízké ozáření (LFRs) lze vyvolat pouze červeným světlem, nikoli far-red (Mandoli a Briggs, 1981). LFR je například klíčení semen *Arabidopsis* zprostředkované fytochromem B. Tento proces je možné zvrátit ozáření far-red (Shinomura *et al.*, 1996). LFRs i VLFRs mohou být indukovány krátkými silnými světelnými pulzy nebo déletrvajícím slabým zářením. Tento vztah mezi intenzitou ozáření a dobou trvání je znám jako zákon reciprocity (Schäfer a Nagy, 2006).

Odpovědi k vysoké ozáření (HIRs) vyžadují prodlouženou nebo kontinuální expozici světlu o vysoké intenzitě. HIRs jsou úměrné k intenzitě světla a k době trvání ozáření. Nesplňují zákon reciprocity a nejsou reverzibilní (Zeiger a Taiz, 2006). Mezi tyto odpovědi patří například produkce etylénu u etiolizovaného čiroku (Craker *et al.*, 1973).

2.2.2.1 Fytochromy

Fytochromy vnímají červené světlo a far-red o vlnové délce 600 až 750 nm. Fytochrom je tvořen apoproteinem o velikosti cca 125 kD, který se kovalentně váže ke chromoforu - lineárnímu tetrapyrrolo. Apoprotein je tvořen dvěma histidine kinase related doménami (HKRD1 a HKRD2) na C-konci a dvěma Per-Arnt-Sim doménami (PAS) uvnitř HKRD1 domény, která má funkci při interakci s dalšími proteiny. N-konec fytochromu obsahuje chromofor vázající bilin lyase doménu a PHY doménu, která stabilizuje

fytochrom v Pfr formě (Sullivan a Deng, 2003). Molekula fytochromu je znázorněna na obrázku 5. Fytochrom má aktivitu světlem regulované serin/theronin protein kinázy, která je schopna autofosforylace (Yeh a Lagarias, 1998).

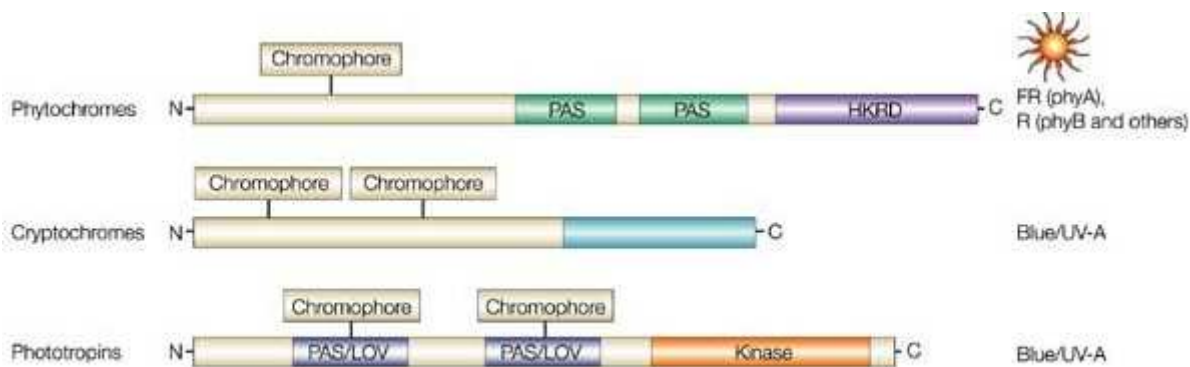
In vivo se vyskytuje ve dvou fotoreverzibilních formách. Ve tmě existuje ve formě absorbující červené světlo (Pr). Po ozáření červeným světlem konvertuje na formu absorbující far-red (Pfr). Forma Pfr je považována za biologicky aktivní. Je možné ji znovu konvertovat na formu Pr ozářením far-red (Schäfer a Nagy, 2006). Rozdíl mezi oběma formami spočívá v konformační změně a v odlišných absorpčních maximech. Absorpční maximum pro Pr je 666 nm, pro Pfr 730 nm (Quail, 1997).

Fytochromy mohou být rozděleny do dvou skupin podle jejich stability. Typ I (na světle nestabilní) je po ozáření červeným nebo bílým světlem rychle degradován. Typ II je na světle stabilní (Clough a Vierstra, 1997). U *Arabidopsis* bylo objeveno pět odlišných genů pro apoproteiny – *PHYA-E*, které mají odlišné, ale překrývající se funkce (Sharrock a Quail, 1989). *PHYA* patří do skupiny typu I, zatímco *PHYB-E* patří do skupiny typu II (Quail, 1997).

PhyA má zřejmě funkci během deetiolizace při odpovědi na far-red (HIR). Také, jak již bylo řečeno výše, působí jako receptor při klíčení semen *Arabidopsis* (VLFR). PhyB zprostředkovává odpovědi k červenému a bílému světlu při deetiolizaci (HIRs), reguluje také LFRs, jako je například fotoreverzibilita klíčení semen u *Arabidopsis*. PhyD a phyE jsou receptory pro elongaci petiol a internodií a kontrolují dobu kvetení. PhyC hraje roli při deetiolizaci, zvětšování děloh a potlačování kvetení (Schäfer a Nagy, 2006).

Fytochromy se uplatňují v řízení cirkadiálních rytmů. phyB, phyD a phyE zprostředkovávají vstup světelného signálu při vysoké ozářenosti červeným světlem. Percepci signálu při nízké ozářenosti červeným i modrým světlem umožňuje phyA (Devlin a Kay, 2000).

Důležitou funkcí fytochromů je to, že umožňují rostlině vnímat zastínění jinou rostlinou. Pokud dojde k zastínění, snižuje se poměr červeného světla a far-red, více Pfr je konvertováno na Pr, poměr Pfr a celkového množství fytochromu klesá. Rostlina reaguje prodlužovacím růstem, který jí umožní únik ze zastínění. Tato reakce je silná u rostlin obývajících slunná stanoviště, méně u stínomilných rostlin. Analýza *Arabidopsis* odhalila, že primární roli při reakci k zastínění hraje phyB, přispívají i phyD a phyE. Jako antagonistu působí phyA (Morelli a Ruberti, 2000)



Obr. 5 – Schéma molekuly fytochromů, kryptochromů a fototropinů (upraveno dle Yanovskí a Kay, 2003)

2.2.3 Interakce auxinu a světla ve fotomorfogenezi

Auxin ovlivňuje mnoho procesů v životním cyklu rostlin, jako je růst děloh/listů, růst hypokotylu/stonku, gravitropismus, fototropismus, apikální dominance, vývoj plodu, opad listů, tvorba postranních kořenů a inhibice prodlužování kořene. Mnoho z těchto odpovědí je stimulováno signály z vnějšího prostředí, tedy i světlem (Schäfer a Nagy, 2006).

Mnoho přenašečů auxinu a komponent zajišťujících odpověď k auxinu bylo identifikováno použitím inhibitoru efluxu auxinu – 1-naftylftalamovou kyselinou (NPA). U *Arabidopsis* bylo prokázáno, že NPA není schopna inhibovat elongaci hypokotylu ve tmě, zatímco ve světle k inhibici došlo. Tato inhibice vyžaduje zapojení phyA, phyB a CRY1, což naznačuje, že PAT je regulován v závislosti na světle (Jensen *et al.*, 1998).

Spojení mezi fotomorfogenezi a PAT by mohl zastávat protein BIG/DOC1/TIR3. Akumulace transkriptu tohoto proteinu je regulována světlem a *doc1* mutace způsobuje expresi světlem indukovaných genů ve tmě naznačující zapojení tohoto genu ve fotomorfogenezi. *Tir3* mutanti mají mnoho fenotypů, což je pravděpodobně důsledkem role tohoto genu v efluxu auxinu z buněk. Mají nedostatek postranních kořenů, redukovanou apikální dominanci a menší míru prodlužovacího růstu v mnoha orgánech. V přítomnosti NPA mají *tir3* mutanti změněnou lokalizaci PIN1 proteinů, což by mohlo být důkazem toho, že BIG/DOC1/TIR3 je NPA-vázající protein (Schäfer a Nagy, 2006).

Percepce a vedení světelného signálu je rozhodující pro PAT ve stonku rostliny, který následně vyvolává fototropní reakci. Molekulární spojení mezi dráhou světla a auxinu při fototropismu zajišťuje gen *NPH4*. Hypokotyl a kořen mutanta *nph4* postrádá

fototropní reakci (Liscum a Briggs, 1996). *NPH4* kóduje transkripční aktivátor ARF7 patřící do skupiny auxin-responsive factors (Harper et al., 2000).

Podle jiné studie, kdy k experimentu byl použit mechoreost *Physcomitrella*, bylo zjištěno, že porucha ve funkci kryptochromů vede ke změně odpovědi na auxin a také změně expresi auxinem indukovaných genů. Mutanti s narušenou funkcí kryptochromů byli pod modrým světlem mnohem více citliví na exogenní auxin než kontrolní rostliny. Tato data naznačují, že modré světlo za účelem kontroly vývoje rostliny prostřednictvím kryptochromů potlačuje odpovědi na auxin (Imaizumi *et al.*, 2002).

Důležitým spojovacím článkem mezi signální dráhou světla a auxinu je zřejmě protein HY5. Mutant *Arabidopsis hy5* postrádá gravitropní odpověď kořene, nedochází u něj ke světlem indukované inhibici růstu hypokotylu a k jeho zezelenání. HY5 byl identifikován jako pozitivní regulátor fotomorfogeneze, který v jádře přímo ovlivňuje transkripci světlem indukovaných genů. Není však zapojen pouze v odpovědích na světlo, ale i v odpovědích k auxinu, který ovlivňuje právě inhibici elongace hypokotylu a gravitropismus, a jehož signální dráha je propojena s fotomorfogenezí. HY5 se ukázal být negativním regulátorem signální dráhy auxinu (Cluis *et al.*, 2004).

Fellner *et al.* (2006) zjistil, že inhibice prodlužovacího růstu u kukuřice způsobená světlem je asociována se světlem indukovanou expresí *ABP4*. Hybrid, u kterého byla narušena exprese *ABP4* indukovaná červeným světlem a far-red, měl také narušenou inhibici prodlužovacího růstu v odpovědi na červené světlo a far-red. To naznačuje, že *ABP4* by mohl hrát roli při zprostředkování odpovědi na světlo a auxin.

Roli endogenní IAA a ABP1 při růstu koleoptile kukuřice v červeném světle zkoumal Jones *et al.* (1998). Při kontinuálním ozáření červeným světlem došlo k rapidnímu poklesu hladiny IAA. Rychlost polárního transportu zůstala na stejné úrovni, ale bylo pozorováno snížení kapacity transportu asi o polovinu. Hladina ABP1 se zpočátku výrazně neměnila, ale po dvanáctihodinovém ozáření poklesla asi na 60% původní hodnoty a s poklesem hladiny ABP1 se snížila i auxin-binding aktivita. Pokles hladiny ABP1 však nekoreloval s růstovými změnami, proto patrně není hladina ABP1 rozhodující při počáteční fázi růstu regulovaného červeným světlem.

3 Materiál a metody

3.1 Rostlinný materiál

Pro růstové experimenty byla použita semena *Lycopersicon esculentum* Mill. mutanta 7B-1 a příslušné kontrolní rostliny (cv. Rutgers), mutantů *cry1-1*, *cry1-2* a příslušné kontrolní rostliny (cv. Money Maker).

3.2 Růstové experimenty in vitro

Semena mutanta a kontrolní rostliny (WT) byla vložena do plastových zkumavek a sterilizována 3% roztokem Sava po dobu 25 minut, s občasným protřepáním. Další práce byla provedena sterilně ve sterilním boxu. Semena byla 5x důkladně propláchnuta sterilní destilovanou vodou a pomocí pinzety vyseta na Petriho misky obsahující 20 ml agarového základního média Murashige & Skoog (Murashige a Skoog, 1962). Poté byly misky oblepeny prodyšnou lepící páskou Urgopore. Pro přípravu 2 l média bylo použito 20g 1% sacharózy, 8,6g MS média (Sigma-Aldrich, USA, M5524) a 390,4 mg MES pufru. Za stálého míchání byly jednotlivé složky postupně přidávány do Erlenmeyerovy baňky s destilovanou vodou. Po rozpuštění bylo pH upraveno na 6,1 pomocí 1M KOH. Médium bylo rozlito do 400 ml lahví a do každé bylo přidáno 2,8 g fytoagaru. Poté byly lahve s médiem sterilizovány v autoklávu. Petriho misky byly uloženy do růstové komory Microclima 1000 (Snijders Scientific B.V., Netherlands), kde byla semena ponechána klíčit 5 až 7 dní ve tmě při teplotě 23°C. Klíčící semena byla sterilně přenesena na nové Petriho misky s MS médiem doplněným různými koncentracemi (0, 10^{-7} , $5 \cdot 10^{-7}$, 10^{-6} , $5 \cdot 10^{-6}$, 10^{-5} M) auxinu (NAA; 2,4-D nebo IAA). Misky byly opět zalepeny páskou a uloženy do růstových komor s nepřetržitým modrým a červeným světlem nebo do tmy. Zde byla klíčící semena ponechána 7 dní při teplotě 23°C. V experimentech s modrým světlem byla použita jako zdroj světla modrá zářivka Philips tubes TLD-36W/18-Blue s maximální zářivostí při 440 nm ($10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Zdrojem červeného světla byla zářivka TLD-36W/15-Red s maximální zářivostí při 660 nm ($10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$). Intenzita světla byla měřena pomocí přenosného spektrometru (model LI-1800; Li-Cor, Lincoln, Nebraska, USA) kalibrovaném na Katedře biofyziky na Univerzitě Palackého v Olomouci. Po 7 dnech kultivace na růstovém médiu a auxinem byly rostliny změřeny pomocí pravítka a zaznamenány délky hypokotylu a kořene u všech rostlin s přesností 1 mm.

3.3 Studium genové exprese

Pro porovnání exprese genu *ABPI* u mutantu *7B-1* a WT byla použita metoda RT – PCR (Reverse-transcription PCR).

3.3.1 Izolace RNA

K izolaci RNA byly použity hypokotyly mutantu *7B-1* a kontrolní rostliny (cv. Rutgers), které byly vypěstovány způsobem uvedeným v bodě 3.2. Použit byl auxin NAA o koncentraci 0 a $5 \cdot 10^{-6}$ M. Izolace byla provedena pomocí RNeasy Plant minikit (QIAGEN GmbH, Deutschland) podle postupu uvedeného výrobcem.

3.3.2 Syntéza cDNA a PCR

Syntéza cDNA a PCR byly provedeny pomocí sady Superskript III RT kit (Invitrogen, USA) podle postupu uvedeného výrobcem. V tabulkách 1-4 jsou uvedena složení použitých roztoků, v tabulce č.5 je uveden program RT-PCR. Byly použity tyto primery:

primer F: 5'-TTG CTG GTT CAG TCT TGC-3'

primer R: 5'-TCA ATT TGG CAG CTG TGT-3'

3.3.3 Elektroforéza

Pro elektroforézu byl použit 1% agarosový gel.

Položka	Objem
Oligo(dt) (50 mM)	1 μ l
RNA (1 μ g)	10 μ l
dNTP (10 mM)	2 μ l
Celk.objem	13 μ l

Položka	Objem
RT pufr 10x	2 μ l
MgCl ₂ (25 mM)	4 μ l
DTT (0,1 M)	2 μ l
Rnase out	1 μ l
Superscript III RT	1 μ l
Celk.objem	10 μ l

Položka	Objem
Primer F (10 μ M)	1 μ l
Primer R (10 μ M)	1 μ l
Go Taq polymerase buffer 5x	4 μ l
dNTP (1 mM)	2 μ l
Go Taq polymeráza	0,2 μ l
H ₂ O	10,8 μ l
cDNA	1 μ l
Celk.objem	20 μ l

	Teplota	Čas	Počet cyklů
Denaturace	65 °C	5 min	1
Syntéza cDNA	50 °C	1 hod	1
	85 °C	5 min	1
	15 °C	neomezeně	-
PCR	95 °C	3 min	1
	95 °C	30 s	35
	55 °C	30 s	
	72 °C	1 min	
	72 °C	5 min	1
	15 °C	neomezeně	1

4 Výsledky

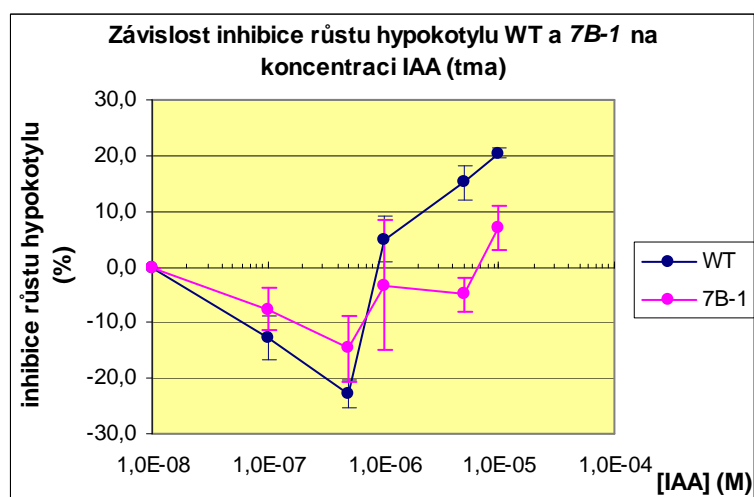
4.1 Růstové pokusy - interakce světla a auxinu

Cílem růstových pokusů bylo zjistit, jak je citlivost rostlin k auxinu ovlivňována kvalitou světla, a zda se fotoreceptor CRY1 podílí na auxinem vyvolaných růstových odpovědích. K pokusům byly použity mutantní rostliny *7B-1* s neznámým defektem v signální dráze modrého světla, a mutanti *cry1-1* a *cry1-2* s defektem v receptoru CRY1 pro modré světlo. Rostliny byly pěstovány na médiu s auxinem (NAA, 2,4-D, IAA) v různých světelných podmínkách (tma, červené a modré světlo). Vliv IAA na růst rostlin byl testován pouze ve tmě, jelikož IAA je na světle nestabilní. Ze srovnání reakcí mutantů s příslušnou kontrolní rostlinou (WT) by mělo být patrné, jak daná mutace ovlivňuje růst.

4.1.1 Vliv světla na citlivost růstových reakcí hypokotylu *7B-1* k auxinu

a) IAA

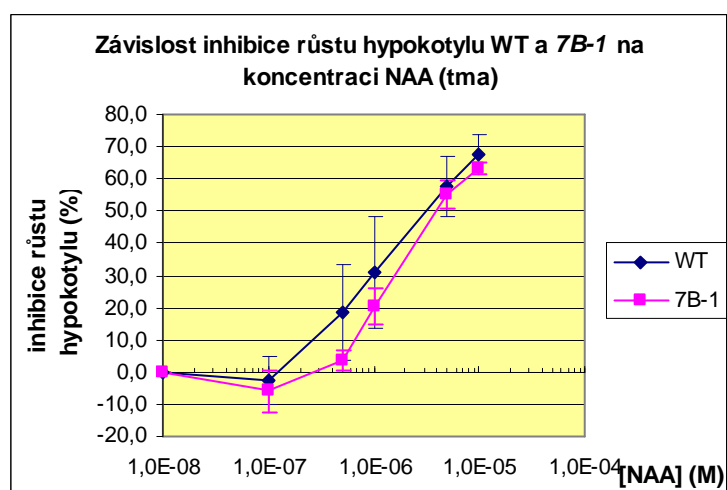
Exogenní auxin způsobuje inhibici růstu hypokotylu intaktních rostlin. IAA měla, jako jediný z použitých auxinů, ve tmě při nízkých koncentracích na růst hypokotylu WT i *7B-1* podpůrný účinek (Graf 1). Při koncentraci 10^{-6} , $5 \cdot 10^{-6}$ a 10^{-5} M již docházelo u WT k inhibici růstu, zatímco *7B-1* byl růst inhibován až při koncentrací 10^{-5} M. Při koncentraci 10^{-5} M dosahovala inhibice hypokotylu u WT 20%, zatímco u *7B-1* to bylo pouze 7%. Při nulové koncentraci IAA dosahovala délka hypokotylu u WT v průměru 102 mm, u *7B-1* 95 mm.



Graf 1: Inhibice růstu hypokotylu 7B-1 a WT pěstovaných 7 dní ve tmě v přítomnosti IAA. Data ukazují průměrnou inhibici růstu hypokotylu \pm SE získanou ze 3 nezávislých experimentů. Průměrný počet rostlin v experimentu = 10.

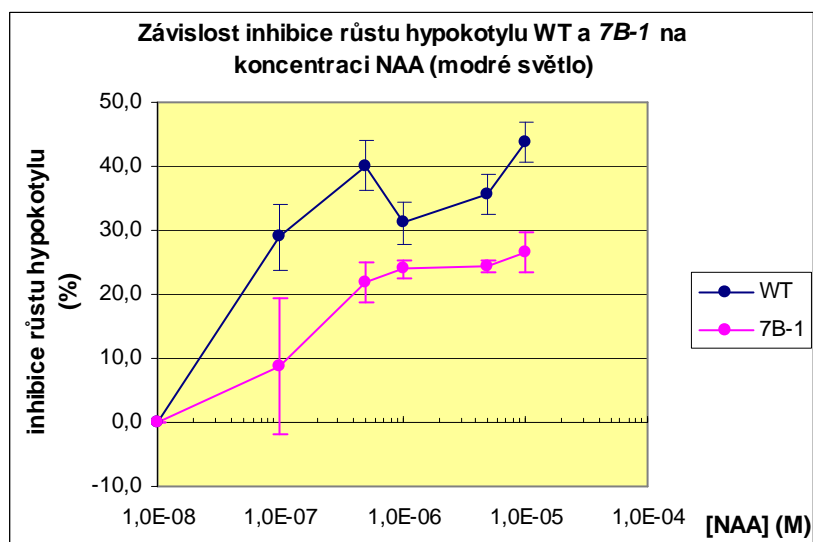
b) NAA

Graf 2 ukazuje, že 7B-1 a WT se od sebe významně neliší v citlivosti k NAA. Např. při koncentraci 10^{-5} M dosahovala inhibice u WT 67%, u 7B-1 63%. Při nulové koncentraci byla průměrná délka hypokotylu u rostlin WT 109 mm a 7B-1 108 mm.



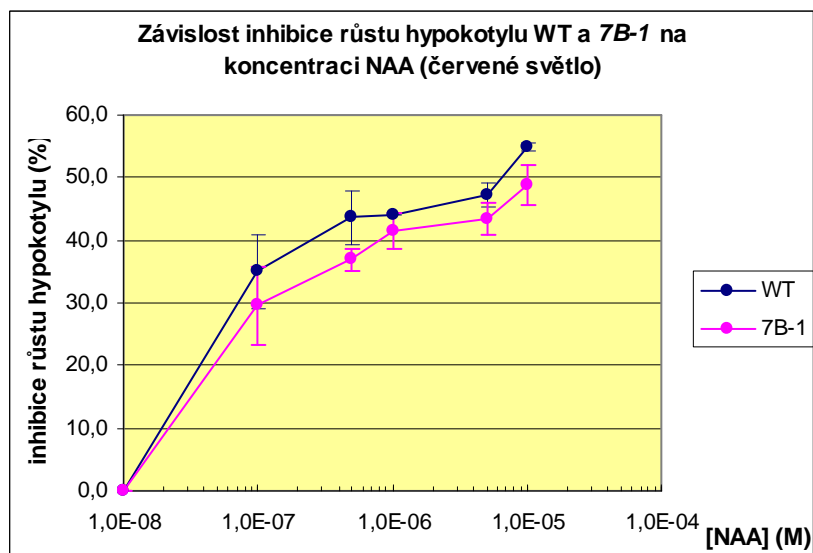
Graf 2: Inhibice růstu hypokotylu 7B-1 a WT pěstovaných 7 dní ve tmě v přítomnosti NAA. Data ukazují průměrnou inhibici růstu hypokotylu \pm SE získanou ze 3 nezávislých experimentů. Průměrný počet rostlin v experimentu = 10.

Na modrém světle byla inhibice *7B-1* výrazně nižší než inhibice WT (Graf 3). Při koncentraci 10^{-5} M dosahovala inhibice u kontrolních rostlin 44%, zatímco u *7B-1* pouze 27%. Při nulové koncentraci NAA dosahoval hypokotyl *7B-1* průměrně 33 mm, u WT 31 mm. Při porovnání grafů 2 a 3 je rovněž zřejmé, že inhibiční účinky auxinu na růst rostlin rajčat pěstovaných na modrém světle byly výrazně nižší než na růst rostlin pěstovaných ve tmě.

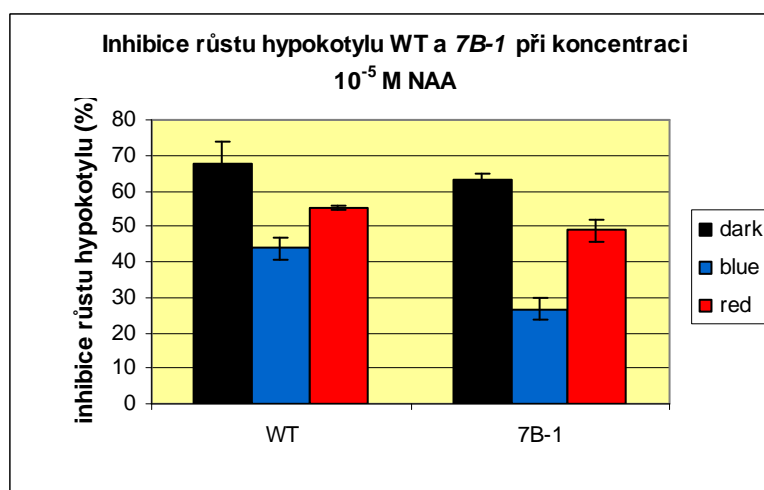


Graf 3: Inhibice růstu hypokotylu *7B-1* a WT pěstovaných 7 dní ve modrém světle v přítomnosti NAA. Data ukazují průměrnou inhibici růstu hypokotylu \pm SE získanou ze 3 nezávislých experimentů. Průměrný počet rostlin v experimentu = 10.

Mírné snížení citlivosti *7B-1* k NAA se objevilo také u rostlin rostoucích na červeném světle (Graf 4). Např. při koncentraci $5 \cdot 10^{-7}$ M dosahovala inhibice u WT 44%, zatímco u *7B-1* 37%. Na základním médiu dosahovala délka hypokotylu WT 71 mm a *7B-1* 64 mm. Graf 5 ukazuje inhibici růstu hypokotylu WT a *7B-1* ve všech světelných podmínkách při koncentraci 10^{-5} M NAA.



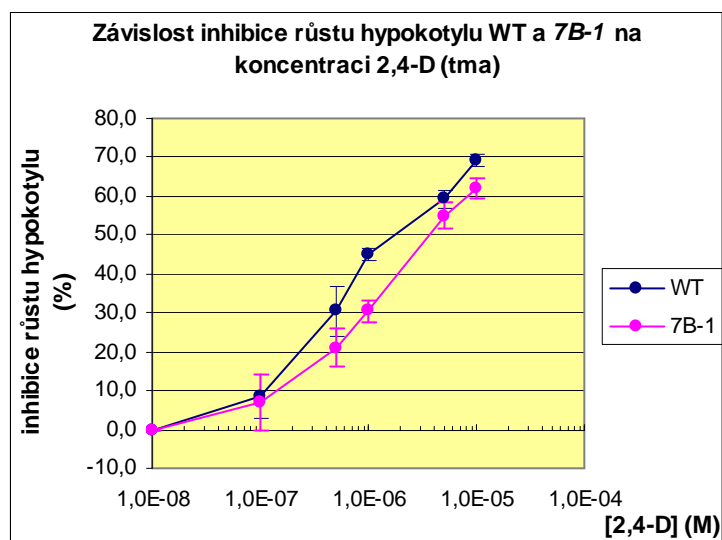
Graf 4: Inhibice růstu hypokotyly 7B-1 a WT pěstovaných 7 dní v červeném světle v přítomnosti NAA. Data ukazují průměrnou inhibici růstu hypokotyly ± SE získanou ze 3 nezávislých experimentů. Průměrný počet rostlin v experimentu = 10.



Graf 5: Inhibice růstu hypokotyly 7B-1 a WT pěstovaných 7 dní při koncentraci 10⁻⁵ M NAA. Data ukazují průměrnou inhibici růstu hypokotyly ± SE získanou ze 3 nezávislých experimentů. Průměrný počet rostlin v experimentu = 10.

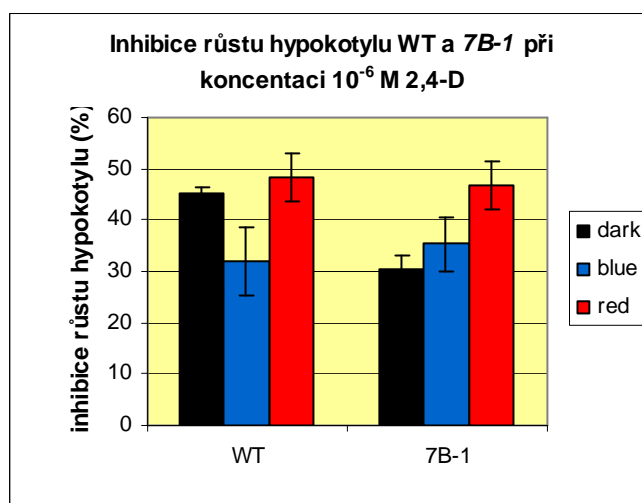
c) 2,4-D

Rostliny mutanta *7B-1* pěstované ve tmě ukázaly mírně nižší citlivost k auxínu 2,4-D než kontrolní rostliny cv. Rutgers (Graf 6). Při nulové koncentraci dosahovala délka hypokotyly 113 mm u WT a 122 mm u *7B-1*.



Graf 6: Inhibice růstu hypokotyly 7B-1 a WT pěstovaných 7 dní ve tmě v přítomnosti 2,4-D. Data ukazují průměrnou inhibici růstu hypokotyly \pm SE získanou ze 3 nezávislých experimentů. Průměrný počet rostlin v experimentu = 10.

Na modrém a červeném světle hypokotyly 7B-1 a WT reagovaly k 2,4-D podobně. Graf 7 ukazuje inhibici růstu hypokotyly WT a 7B-1 ve všech světelných podmínkách při koncentraci 10^{-6} M 2,4-D.

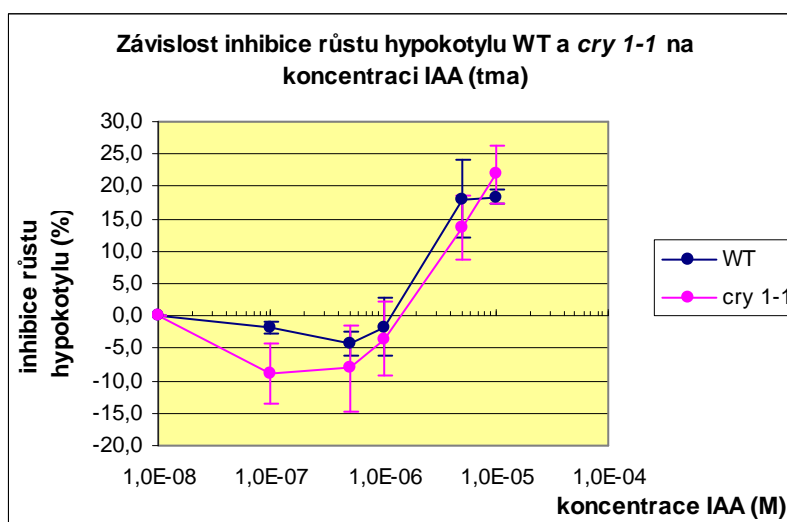


Graf 7: Inhibice růstu hypokotyly 7B-1 a WT pěstovaných 7 dní při koncentraci 10^{-6} M 2,4-D. Data ukazují průměrnou inhibici růstu hypokotyly \pm SE získanou ze 3 nezávislých experimentů. Průměrný počet rostlin v experimentu = 10.

4.1.2 Vliv světla na citlivost růstových reakcí hypokotylu *cry1-1* k auxinu

a) IAA

Při koncentracích 10^{-7} , $5 \cdot 10^{-7}$ a 10^{-6} M měla IAA ve tmě stimulační účinek na růst hypokotylu kontrolních rostlin kultivar Money Maker (cv. MM) i mutanta *cry1-1*. Vyšší koncentrace IAA způsobovaly inhibici růstu hypokotylů u obou genotypů. Jak při stimulaci, tak při inhibici ukazoval hypokotyl mutanta *cry1-1* podobnou citlivost k auxinu jako WT (Graf 8). Při nulové koncentraci auxinu dosahovala délka hypokotylu WT 113 mm, u *cry1-1* to bylo 124 mm.

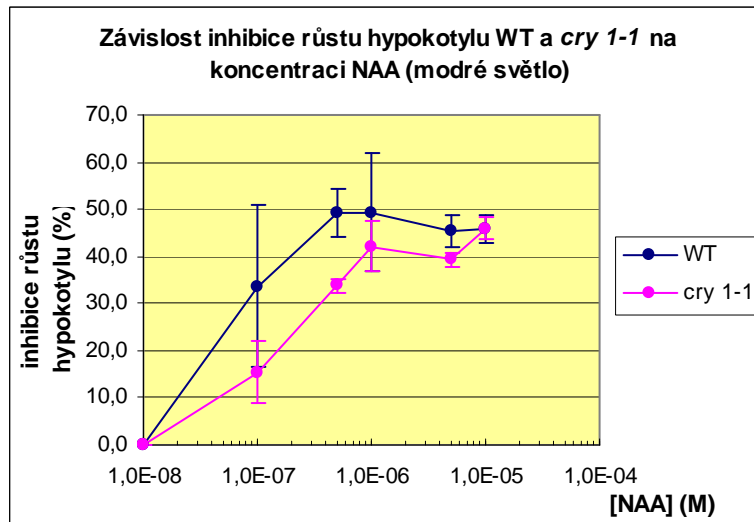


Graf 8: Inhibice růstu hypokotylu *cry1-1* a WT pěstovaného 7 dní v přítomnosti IAA. Data ukazují průměrnou inhibici růstu hypokotylu \pm SE získanou ze 3 nezávislých experimentů. Průměrný počet rostlin v experimentu = 9.

b) NAA

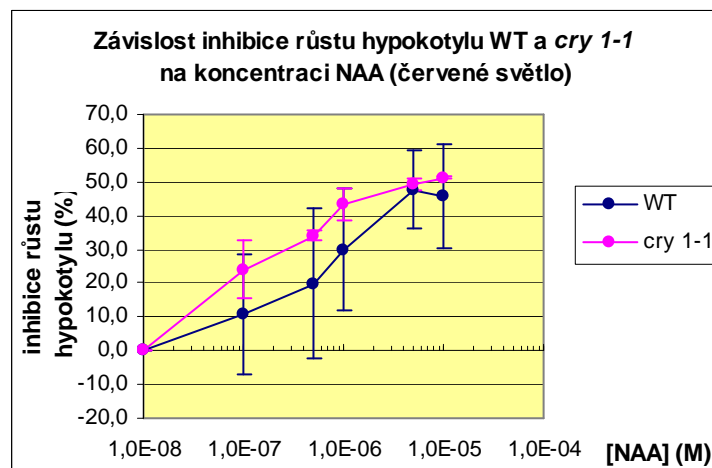
Hypokotily etiolizovaných rostlin WT and *cry1-1* ukazovaly shodnou citlivost k auxinu NAA (data neuvedena).

Na modrém světle dva nezávislé experimenty ukazují sníženou citlivost hypokotylů mutanta *cry1-1* k NAA (Graf 9). Při koncentraci 10^{-7} M dosahovala inhibice u WT 34%, zatímco u *cry1-1* pouze 15%. Délka hypokotylu při nulové koncentraci dosahovala 50 mm u WT a 68 mm u *cry 1-1*.



Graf 9: Inhibice růstu hypokotyly *cry1-1* a WT pěstovaného 7 dní v modrém světle v přítomnosti NAA. Data ukazují průměrnou inhibici růstu hypokotyly \pm SE získanou ze 2 nezávislých experimentů. Průměrný počet rostlin v experimentu = 9.

Na červeném světle však došlo k opačnému efektu. Mutant *cry1-1* ukazoval mírně zvýšenou citlivost k NAA ve srovnání s WT (Graf 10). Při koncentraci $5 \cdot 10^{-7}$ M dosahovala inhibice u *cry1-1* 34%, zatímco u WT pouze 20%. Délka hypokotyly při nulové koncentraci dosahovala 78 mm u WT a 90 mm u *cry 1-1*.



Graf 10: Inhibice růstu hypokotyly *cry1-1* a WT pěstovaného 7 dní v červeném světle v přítomnosti NAA. Data ukazují průměrnou inhibici růstu hypokotyly \pm SE získanou ze 2 nezávislých experimentů. Průměrný počet rostlin v experimentu = 9.

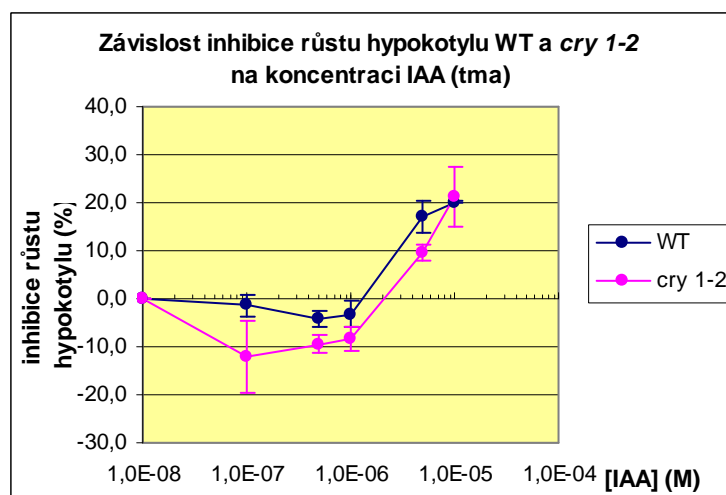
c) 2,4-D

Reakce hypokotyly k 2,4-D byla u *cry1-1* a WT podobná ve tmě, pod modrým i červeným světlem. Při koncentraci 10^{-5} M dosahovala inhibice hypokotyly ve tmě u obou genotypů 63%, pod modrým světlem se pohybovala okolo 50% a okolo 60% pod červeným světlem (data neuvedena).

4.1.3 Vliv světla na citlivost růstových reakcí hypokotyly *cry1-2* k auxinu

a) IAA

IAA v koncentracích 10^{-7} , $5 \cdot 10^{-7}$ a 10^{-6} M výrazně stimulovala růst etiolizovaných hypokotylů mutanta *cry1-2* (Graf 11). U *cry1-2* se rovněž objevila snížená citlivost hypokotyly k inhibičním účinkům vyšších koncentrací IAA. Délka hypokotyly WT při nulové koncentraci dosahovala 132 mm, u *cry1-2* 129 mm.

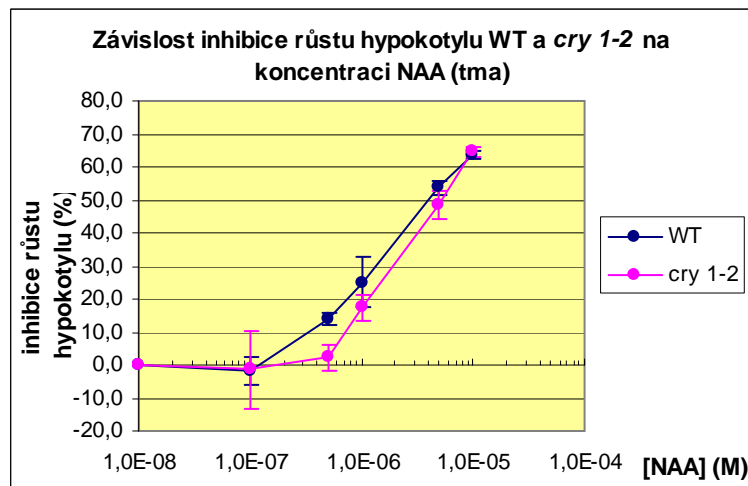


Graf 11: Inhibice růstu hypokotyly *cry1-2* a WT pěstovaného 7 dní ve tmě v přítomnosti IAA.

Data ukazují průměrnou inhibici růstu hypokotyly \pm SE získanou ze 3 nezávislých experimentů. Průměrný počet rostlin v experimentu = 9.

b) NAA

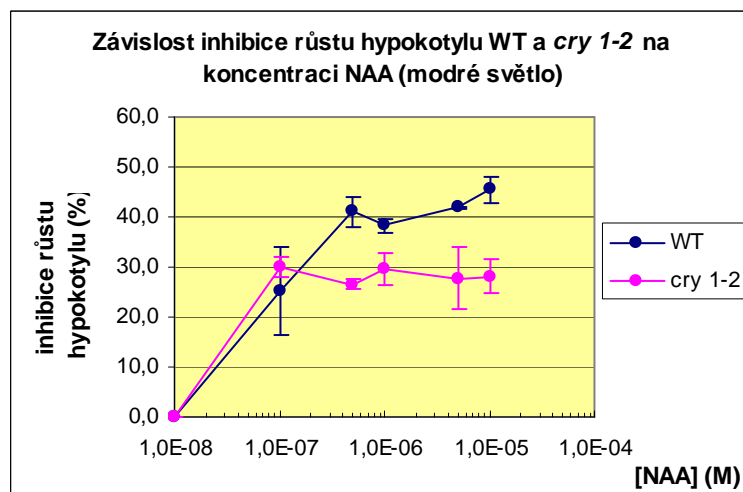
Hypokotyly etiolizovaných rostlin *cry1-2* ukazovaly podobnou citlivost k auxinu NAA jako hypokotyly kontrolního genotypu cv. MM. (Graf 12). Při nulové koncentraci auxinu dosahovala délka hypokotyly WT 137 mm, délka hypokotyly *cry1-2* 121 mm.



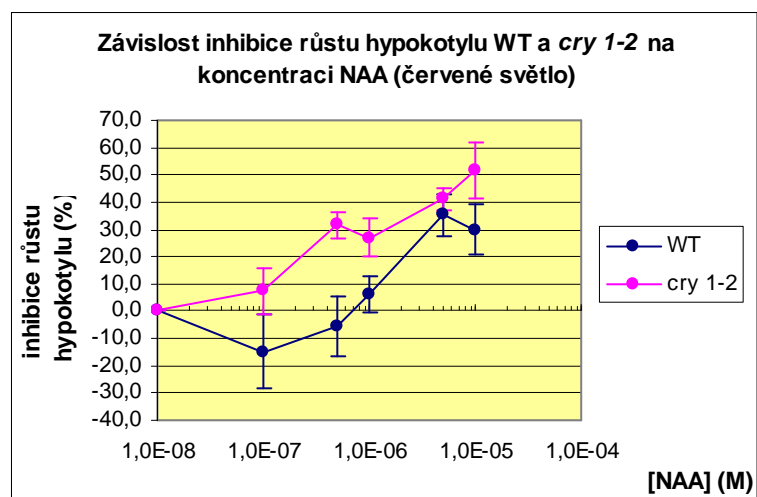
Graf 12: Inhibice růstu hypocotylu *cry1-2* a WT pěstovaného 7 dní ve tmě v přítomnosti NAA. Data ukazují průměrnou inhibici růstu hypocotylu \pm SE získanou ze 2 nezávislých experimentů. Průměrný počet rostlin v experimentu = 9.

Výrazný rozdíl v citlivosti hypocotylů *cry1-2* k NAA byl pozorován u rostlin pěstovaných na modrém světle (Graf 13 a 15). Při koncentraci 10^{-5} M dosahovala inhibice u *cry1-2* 28%, zatímco u WT to bylo 46%. Délka hypocotylu WT při nulové koncentraci auxinu dosahovala 51 mm, u *cry1-2* 47 mm.

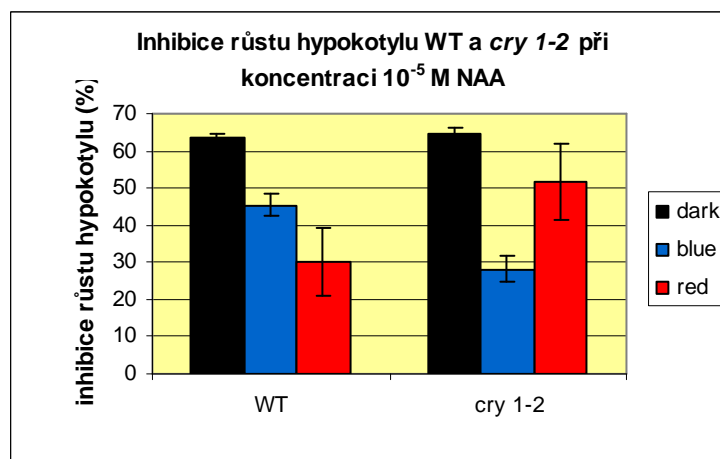
Naopak na červeném světle hypocotylu mutantu *cry1-2* ukazovaly výrazně zvýšenou citlivost k inhibičnímu účinku NAA ve srovnání s kontrolními rostlinami cv. MM (Graf 14 a 15). Např. při koncentraci 10^{-7} a $5 \cdot 10^{-7}$ M NAA stimulovala růst hypocotylu WT, ale nikoli růst hypocotylu *cry1-2*. Při koncentraci 10^{-5} M docházelo k inhibici růstu hypocotylu u obou genotypů. U *cry1-2* to bylo 52%, avšak pouze 30% u WT. Při nulové koncentraci dosahovala délka hypocotylu WT 70 mm, u *cry1-2* 71 mm.



Graf 13: Inhibice růstu hypokotylu *cry1-2* a WT pěstovaného 7 dní v modrém světle v přítomnosti NAA. Data ukazují průměrnou inhibici růstu hypokotylu \pm SE získanou ze 2 nezávislých experimentů. Průměrný počet rostlin v experimentu = 9.



Graf 14: Inhibice růstu hypokotylu *cry1-2* a WT pěstovaného 7 dní červeném světle v přítomnosti NAA. Data ukazují průměrnou inhibici růstu hypokotylu \pm SE získanou ze 2 nezávislých experimentů. Průměrný počet rostlin v experimentu = 9.

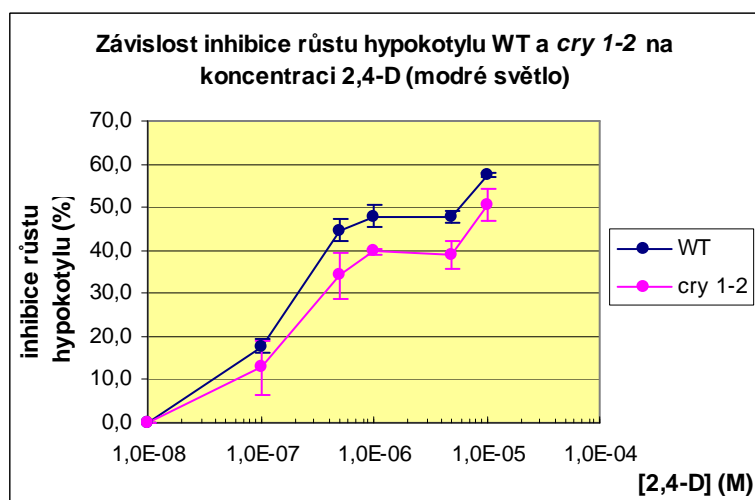


Graf 15: Inhibice růstu hypokotylu *cry1-2* a WT pěstovaného 7 dní při koncentraci 10⁻⁵ M NAA. Data ukazují průměrnou inhibici růstu hypokotylu ± SE získanou ze 2 nezávislých experimentů. Průměrný počet rostlin v experimentu = 9.

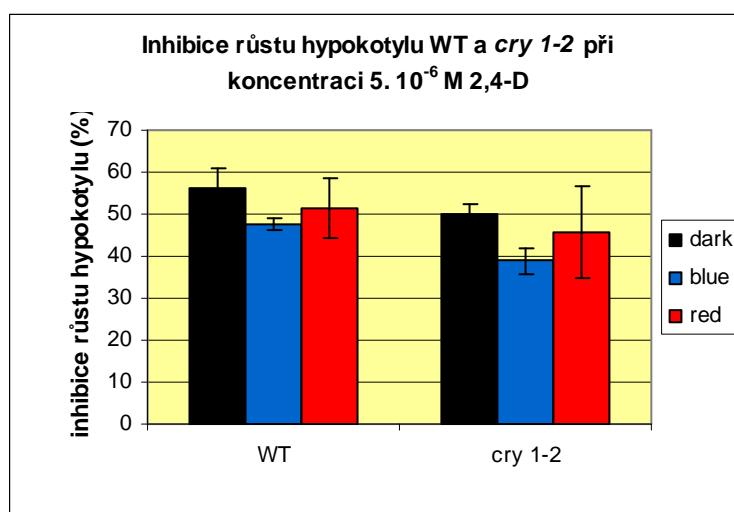
b) 2,4-D

Reakce k auxinu 2,4-D byla u *cry1-2* ve srovnání s WT mírně snížena na modrém světle, kdežto ve tmě a na červeném světle oba genotypy vykazovaly podobnou citlivost k inhibičním účinkům 2,4-D (Graf 17).

Na modrém světle inhibice růstu hypokotylu mutantu *cry1-2* auxinem 2,4-D o koncentraci 5.10⁻⁶ M dosahovala 39%, zatímco u WT to bylo 48% (Graf. 16). Při nulové koncentraci dosahovala délka hypokotylu 46 mm u WT a 50 mm u *cry1-2*.

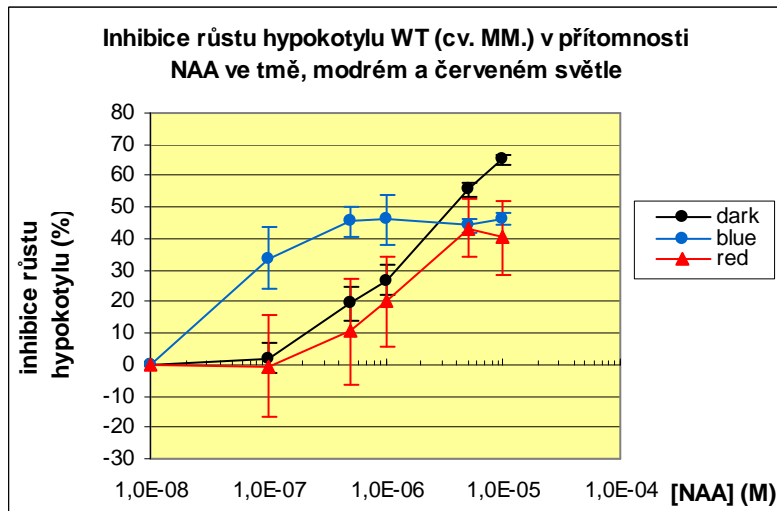


Graf 16: Inhibice růstu hypocotylu *cry1-2* a WT pěstovaného 7 dní v modrém světle v přítomnosti 2,4-D. Data ukazují průměrnou inhibici růstu hypocotylu ± SE získanou ze 2 nezávislých experimentů. Průměrný počet rostlin v experimentu = 9.



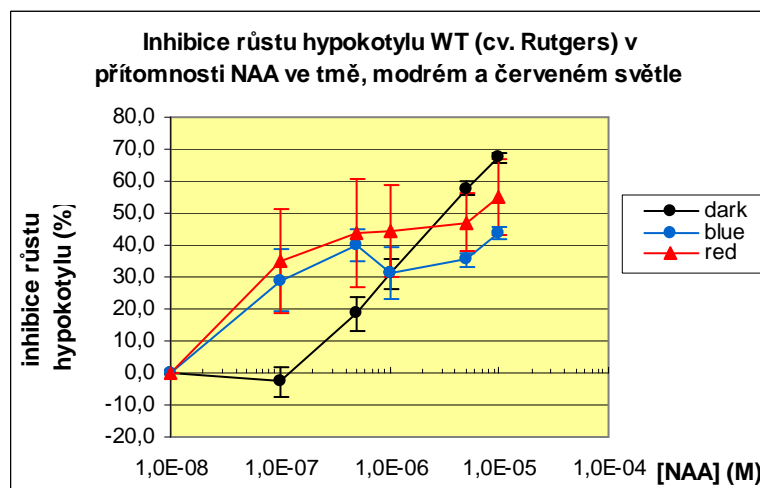
Graf 17: Inhibice růstu hypocotylu *cry1-2* a WT pěstovaného 7 dní při koncentraci 5. 10⁻⁶ M 2,4-D. Data ukazují průměrnou inhibici růstu hypocotylu ± SE získanou ze 2 nezávislých experimentů. Průměrný počet rostlin v experimentu = 9.

U WT byla na modrém světle pozorována vyšší citlivost k NAA při nižších koncentracích. Ve tmě a na červeném světle docházelo u WT při těchto koncentracích k mírné stimulaci růstu hypocotylu nebo k relativně nízké inhibici. Na modrém světle však docházelo k významné inhibici růstu (viz. graf 18).



Graf 18: Inhibice růstu hypokotylu cv. MM pěstovaného 7 dní v přítomnosti NAA. Data ukazují průměrnou inhibici růstu hypokotylu \pm SE získanou ze 3 nezávislých experimentů. Průměrný počet rostlin v experimentu = 9.

Graf 19 ukazuje reakci k NAA u kultivaru cv. Rutgers. V tomto případě byla reakce k auxinu při nižších koncentracích silnější pod modrým i červeným světlem, zatímco ve tmě docházelo pouze k nízké inhibici.

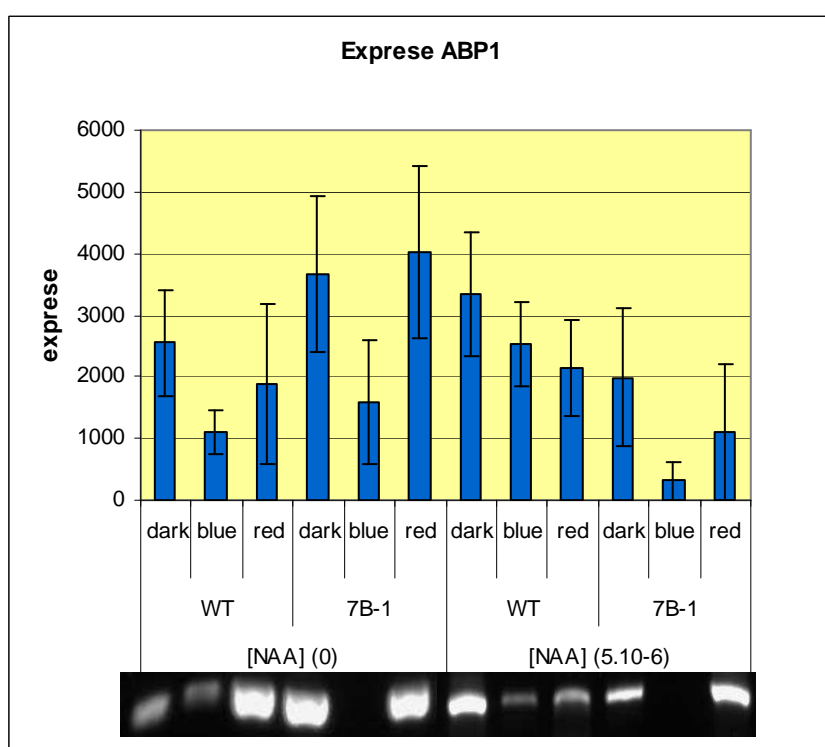


Graf 19: Inhibice růstu hypokotylu cv. Rutgers pěstovaného 7 dní v přítomnosti NAA. Data ukazují průměrnou inhibici růstu hypokotylu \pm SE získanou ze 3 nezávislých experimentů. Průměrný počet rostlin v experimentu = 10.

4.2 Expres ABP1

Cílem těchto experimentů bylo zjistit, zda světlo a auxin jsou schopny regulovat expresi genu *ABP1*, neboli zda *ABP1* může fungovat jako společný element signální dráhy

auxinu a světla. Expres *ABP1* byla zkoumána metodou RT-PCR u mutantu *7B-1* a kontrolní rostliny cv. Rutgers, které byly vypěstovány v přítomnosti NAA při koncentraci 0 a $5 \cdot 10^{-6}$ M. Jelikož výsledky byly relativně variabilní, bylo nutné zjištěná data zprůměrovat pomocí programu ImageJ. Graf 20 ukazuje průměrné hodnoty exprese *ABP1* ze dvou nezávislých experimentů (PCR provedená 4x). Bez přítomnosti auxinu docházelo k relativně vyšší expresi *ABP1* u *7B-1* i WT ve tmě a v červeném světle, zatímco modré světlo mělo na expresi *ABP1* inhibiční efekt. V přítomnosti auxinu byla expres *ABP1* u WT ve všech světelných podmínkách podobná, ale u *7B-1* došlo na modrém světle k výraznému snížení exprese vlivem auxinu.



Graf 20: Expres *ABP1*. Data ukazují průměrnou expresi *ABP1* v hypokotylu *7B-1* a cv. Rutgers \pm SE získanou ze 2 nezávislých experimentů (PCR provedena 4x). Rostliny byly pěstovány ve tmě, modrém a červeném světle při koncentraci 0 a $5 \cdot 10^{-6}$ M NAA.

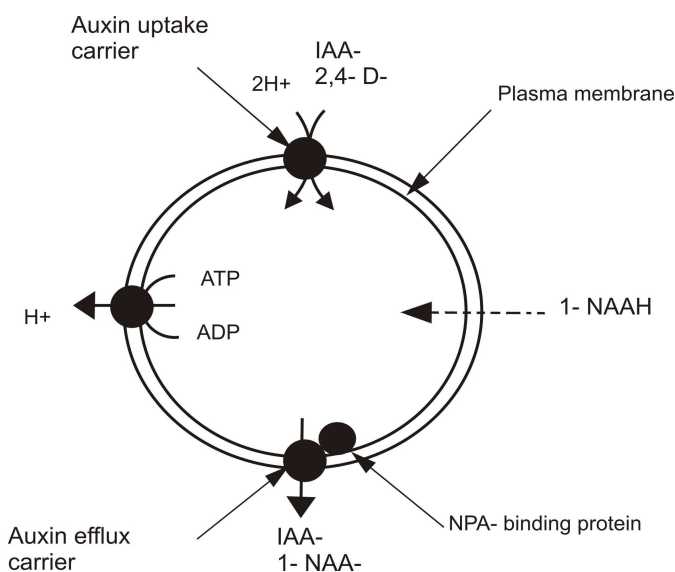
5 Diskuze

První část práce se zabývala růstovými pokusy, kdy byly zkoumány reakce rostlin k auxinu v různých světelných podmínkách. Pokusy byly provedeny s mutantními rostlinami rajčete (*Lycopersicon esculentum*, Mill.) *7B-1*, *cry 1-1* a *cry 1-2*. Kultivary Rutgers a Money Maker sloužily jako kontrolní rostliny. Cílem růstových pokusů bylo zjistit, jak je citlivost k auxinu ovlivňována světlem, a které fotoreceptory se podílejí na auxinem vyvolaných růstových odpovědích.

Pokusy se *7B-1* ukázaly, že se u mutantu vyskytla snížená odpověď hypokotyly k auxinu ve tmě, a to v případě přítomnosti IAA a 2,4-D. Reakce mutantu k NAA nebyla nijak změněna. Na modrém a červeném světle byla citlivost snížena u *7B-1* pouze v přítomnosti NAA, zatímco v přítomnosti 2,4-D nebyly pozorovány mezi WT a mutantem žádné rozdíly. To naznačuje, že gen *7B-1* je zapojen v odpovědi k auxinu v etiolizovaných hypokotylech, ale i v odpovědi k NAA v modrém a červeném světle. Výsledky naznačují, že modré světlo, prostřednictvím funkčního genu *7B-1*, snižuje citlivost hypokotyly rajčete k inhibičnímu účinku auxinu na prodlužování hypokotyly. Modré světlo zřejmě snižuje hladinu endogenního auxinu, což vysvětluje sníženou reakci WT k NAA v modrém světle oproti reakci WT ve tmě. U mutantu *7B-1* je tato odpověď ještě nižší než u WT, proto u *7B-1* musí existovat mechanismus, který snížení citlivosti zesiluje. Vysvětlením by mohlo být to, že funkční gen *7B-1* by mohl omezovat efflux NAA z buněk, čímž by zabraňoval drastickému snížení hladiny endogenního auxinu na modrém světle u WT. V případě mutantu defekt v genu *7B-1* způsobuje, že nedochází k inhibici effluxu NAA a mutant má proto výrazně sníženou reakci k NAA v modrém světle. Schéma transportu různých auxinů do buňky a z buňky je znázorněno na obrázku 6.

Při experimentech s hypokotyly WT a *cry1-1* nebyl u etiolizovaných rostlin pozorován rozdíl mezi WT a *cry1-1* v reakcích k testovaným auxinům. Na modrém světle došlo k výraznému snížení inhibice růstu hypokotyly *cry1-1* oproti WT. Naopak v červeném světle byla v přítomnosti NAA citlivost *cry1-1* oproti WT zvýšena. Žádné signifikantní rozdíly mezi WT a mutantem nebyly pozorovány při reakci k auxinu 2,4-D, jak ve tmě, tak na modrém a červeném světle. Podobné reakce k auxinu v závislosti na světle byly pozorovány i u hypokotyly mutantu *cry1-2*. Z toho usuzují, že protein CRY1 je nezbytný pro udržení normální odpovědi k NAA ve světle. Snížená reakce na modrém světle by mohla být způsobena ovlivněním funkce přenašečů a následně změnou

hladinou endogenního auxinu, což by také vysvětlovalo, proč docházelo ke snížené odpovědi pouze u NAA a ne v přítomnosti 2,4-D. NAA a 2,4-D jsou dovnitř a ven z buněk transportovány každý jiným způsobem (obr. 6). 2,4-D (a také IAA) se dovnitř dostávají skrze AUX proteiny, zatímco NAA prochází difúzí přes plazmatickou membránu (Delbarre *et al.* 1996). PIN transportery umožňují eflux IAA a NAA (Palme and Gälweiler 1999), avšak 2,4-D není schopen tuto cestu využívat a hromadí se v buňce (Delbarre *et al.* 1996). Zvýšená citlivost mutanta k NAA na červeném světle napovídá tomu, že CRY1 interaguje s dráhou červeného světla.



Obr. 6: Transport auxinu v buňce (převzato z Morris, 2000).

Druhá část práce se zabývala expresí genu *ABP1*. Cílem bylo zjistit, zda by *ABP1* mohl mít roli v signální dráze auxinu při interakci se světlem. K pokusům byl použit mutant *7B-1* a kontrolní kultivar Rutgers, kdy byla sledována exprese *ABP1* v závislosti na kvalitě světla a přítomnosti auxinu NAA při koncentraci 0 nebo $5 \cdot 10^{-6}$ M. Míra exprese byla zjišťována metodou RT-PCR.

ABP1 byl poprvé izolován z koleoptile kukuřice a bylo zjištěno, že je přítomen ve všech rostlinných pletivech. Později byl identifikován jako auxinový receptor (Timpte, 2001). Role *ABP1* byla potvrzena v průběhu embryogeneze (Chen *et al.*, 2001) a v dalších procesech jako je auxinem indukované prodlužování buněk (Jones *et al.*, 1998) nebo regulace buněčného dělení (David *et al.*, 2007). Interakci *ABP1* se světlem pozoroval Jones *et al.* (1991), kdy po několikahodinovém ozáření červeným světlem došlo k poklesu hladiny *ABP1* a auxin-binding aktivity.

Z mých výsledků vyplynulo, že modré světlo do jisté míry inhibuje expresi *ABPI* jak u cv. Rutgers, tak u *7B-1*, přičemž se zdá, že inhibice exprese *ABPI* modrým světlem byla slabší u *7B-1* než u kontrolní rostliny. V přítomnosti NAA byla v hypokotylech kontrolního genotypu cv. Rutgers zjištěna podobná exprese u rostlin rostoucích ve tmě, na modrém či červeném světle. Pokud však srovnáme expresi genu *ABPI* za přítomnosti auxinu s expresí při absenci auxinu, zdá se, že na modrém světle auxin u WT stimuloval expresi *ABPI*. U mutanta *7B-1* však na modrém světle docházelo k silné redukci expresi *ABPI* a zdá se, že auxin u mutanta inhiboval expresi *ABPI* v hypokotylech. Snížená hladina *ABPI* u *7B-1* na modrém světle tedy dobře koreluje se sníženou citlivostí hypokotylu mutanta k inhibičním účinkům NAA. To naznačuje, že *ABPI* se podílí na zprostředkování odpovědi k auxinu na modrém světle. Snížená reakce *7B-1* k auxinu na modrém světle je pravděpodobně způsobena sníženou expresí *ABPI*, gen *7B-1* tedy zřejmě hraje roli při expresi *ABPI* na modrém světle. Avšak vzhledem k tomu, že opakované experimenty dávaly dosti variabilní výsledky, bude nutné pro objasnění funkce *ABPI* v interakci auxinových a světelných drah provést více experimentů.

6 Závěr

V této bakalářské práci jsem studovala citlivost mutantů rajčete *7B-1*, *cry1-1* a *cry1-2* k auxinům IAA, NAA a 2,4-D a expresi genu *ABP1* v závislosti na přítomnosti auxinu a kvalitě světla. Cílem bylo odpovědět na otázky, které byly položeny na začátku této práce, tedy jak světlo ovlivňuje citlivost těchto mutantů k exogennímu auxinu, a zda se *ABP1* uplatňuje jako společný prvek signální dráhy auxinu a světla. Výsledky ukázaly, že u kontrolních rostlin modré světlo snižuje citlivost hypokotylů k inhibičním účinkům exogenního auxinu. Fakt, že ve tmě má mutant *7B-1* sníženou citlivost k IAA a 2,4-D a na modrém světle reaguje k 2,4-D podobně jako na modrém světle, vede k následujícím závěrům. Za první, funkční gen *7B-1* zvyšuje citlivost etiolizovaných hypokotylů k exogennímu auxinu. Za druhé, modré světlo prostřednictvím funkčního genu *7B-1* snižuje citlivost hypokotylu k inhibičním účinkům auxinu. Z experimentů na mutantech *cry1-1* a *cry1-2* dále usuzuji, že fotoreceptor CRY1 je nezbytný pro zachování normální reakce k auxinu u hypokotylů rostlin pěstovaných na modrém a červeném světle. Poslední část experimentů byla zaměřena na studium exprese *ABP1* v přítomnosti NAA v závislosti na kvalitě světla. Snížená exprese *ABP1* na modrém světle korespondovala se sníženou citlivostí hypokotylů *7B-1* k NAA na modrém světle. To naznačuje účast genu *ABP1* při zprostředkování odpovědi k auxinu na modrém světle a také to, že exprese *ABP1* je ovlivňována modrým světlem prostřednictvím genu *7B-1*. K pochopení mechanismů jak modré světlo ovlivňuje citlivost rostlin rajčete k exogennímu auxinu a k pochopení úlohy genu *7B-1* v tomto procesu bude nutné provést řadu dalších experimentů.

7 Literatura

- Ahmad M., Jarillo J. A., Smirnova O., Cashmore A. R., (1998) Cryptochrome blue-light photoreceptors of *Arabidopsis* implicated in phototropism. *Nature* 392(6677): 720-723
- Baulry J. M., Sealy I. M., Macdonald H., Brearley J., Dröge S., Hillmer S., Robinson D. G., Venis M. A., Blatt M. R., Lazarus C. M., Napier R. M., (2000) Overexpression of Auxin-Binding Protein Enhances the Sensitivity of Guard Cells to Auxin. *Plant Physiology* 124: 1229-1238
- Braun N., Wyrzykowska J., Muller P., David K., Couch D., Perrot-Rechenmann C., Fleming A. J., (2008) Conditional repression of AUXIN BINDING PROTEIN1 reveals that it coordinates cell division and cell expansion during postembryonic shoot development in *Arabidopsis* and tobacco. *The Plant Cell* 20: 2746–2762
- Cambridge A. P., Morris D. A. (1996) Transfer of exogenous auxin from the phloem to the polar auxin transport pathway in pea (*Pisum sativum*). *Planta* 199: 583-588
- Canamero R. C., Bakrim N., Bouly JP., Garay A., Dudkin E. E., Habricot Y., Ahmad M., (2006) Cryptochrome photoreceptors cry1 and cry2 antagonistically regulate primary root elongation in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 224: 995–1003
- Clough R.C., Vierstra R.D., (1997) Phytochrome degradation. *Plant, Cell and Environment* 20: 713–721
- Cluis C. P., Mouchel C. F., Hardtke C. S., (2004) The *Arabidopsis* transcription factor HY5 integrates light and hormone signalling pathway. *The plant journal* 38:332-347
- Cosgrove D. J., Li L. C., Cho HT., Hoffmann-Benning S., Moore R. C., Blecker D., (2002) The growing world of expansins. *Plant and Cell Physiology* 43(12): 1436-1444
- Cracker L. E., Abeles F. B., Shropshire W., (1973) Light-induced ethylene production in sorghum. *Plant Physiology* 51: 1082-1083
- Darwin C., Darwin F. (1881) Das Bewegungswermögen der Pflanzen (The Power of Movement in Plants). *Darwin Gesammelte Werke* 13; Schweizerbart'sche Verlagsbuchhandlung, Stuttgart
- David K. M., Couch D., Braun N., Brown S., Grosclaude J., Perrot-Rechenmann C., (2007) The auxin-binding protein 1 is essential for the control of cell cycle. *The Plant Journal* 50: 197–206
- Davies P. J., (2004) Plant hormones. Biosynthesis, Signal transduction, Action! Kluwer Academic Publishers, Netherlands

- Delbarre A., Muller P., Imhoff V., Guern J., (1996) Compare of the mechanism controlling uptake and accumulation of 2,4-dichlorophenoxy acetic acid, naphthalene-1-acetic acid and indole-3-acetic acid in suspension-cultured tobacco cells. *Planta* 198: 532–541
- Devlin P. F., Kay S. A., (2000) Cryptochromes are required for phytochrome signaling to the circadian clock but not for rhythmicity. *The Plant Cell* 12: 2499-2509
- Farrimond J. A., Elliott M.C., Clack D. W. (1978) Charge separation as a component of the structural requirements for hormone activity. *Nature* 274: 401-402
- Fellner M., Ford E. D., Van Volkenburgh E., (2006) Development of erect leaves in a modern maize hybrid is associated with reduced responsiveness to auxin and light of young seedlings *in vitro*. *Plant signaling and Behavior* 1(4): 201-211
- 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. *The Plant Journal* 26(5): 471-478
- Friml J., Wlčniewska J., Benková E., Mendgen K., Palme K., (2002) Lateral relocation of auxin efflux regulator PIN3 mediates tropism in *Arabidopsis*. *Nature* 415: 806-809
- Harper R. M., Stowe - Evans E. L., Luesse D. R., Muto H., Tatematsu K., Watahiki M. K., *et al.* (2000) The NPH4 locus encodes the auxin response factor ARF7, a conditional regulator of differential growth in aerial *Arabidopsis* tissue. *The Plant Cell* 12: 757-770
- Chandler J. W. (2009) Local auxin production: a small contribution to a big field. *BioEssays* 1: 60 – 70
- Chen D., Ren Y., Deng Y., Zhao J., (2010) Auxin polar transport is essential for the development of zygote and embryo in *Nicotiana tabacum* L. and correlated with ABP1 and PM H⁺-ATPase activities. *Journal of Experimental Botany* 61: 1853-1867
- Chen JG., Ullah H., Young J. C., Sussman M. R., Jones A. M., (2001) ABP1 is required for organized cell elongation and division in *Arabidopsis* embryogenesis. *Genes and Development* 15: 902-911
- Imaizumi T., Kadota K., Hasebe M., Wada M., (2002) Cryptochrome light signals control development to suppress auxin sensitivity in the moss *Physcomitrella patens*. *The Plant Cell* 14: 373-386
- Jensen P. J., Hangarter R. P., Estelle M., (1998) Auxin transport is required for hypocotyl elongation in light-grown but not in dark-grown *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 116: 455-462
- Jones A. M., Cochran D. S., Lamerson P. M., Evans M. L., Cohen J. D., (1991) Changes in the abundance of indoleacetic acid and a 22-kilodalton auxin-binding protein in the maize mesocotyl. *Plant Physiology* 97: 352-358

- Jones A. M., Im K. H., Savka M. A., Wu M. J., DeWitt N. G., Shillito R., Binns A. N., (1998) Auxin-dependent cell expansion mediated by overexpressed auxin-binding protein 1. *Science* 282 (5391):1114 - 1117
- Kinoshita T., Doi M., Suetsugu N., Kagawa T., Wada M., Shimazaki K., (2001) Phot1 and phot2 mediate blue light regulation of stomatal opening. *Nature* 414(6864): 656-660
- Lin Ch., (2002) Blue light receptors and signal transduction. *The Plant Cell* 14: 207-225
- Lin Ch., Ahmad M., Cashmore A. R., (1996) Arabidopsis cryptochrome 1 is a soluble protein mediating blue-light dependent regulation of plant growth and development. *The Plant Journal* 10(5): 893-902
- Lin Ch., Todo T., (2005) The cryptochromes. *Genome Biology* 6:220
- Lin Ch., Yang H., Guo H., Mockler T., Chen J., Cashmore A. R., (1998) Enhancement of blue-light sensitivity of *Arabidopsis* seedlings by a blue light receptor cryptochrome 2. *Plant Biology* 95: 2686–2690
- Liscum E., Briggs W. R. (1996) Mutations of *Arabidopsis* in potential transduction and response components of the phototropic signalling pathway. *Plant Physiology* 112: 291-296
- Ljung K., Bhalerao R. P., Sandberg G., (2001) Sites and homeostatic control of auxin biosynthesis in *Arabidopsis* during vegetative growth. *The Plant Journal* 28(4): 465-474
- Ma L., Li J., Qu L., Hager J., Chen Z., Zhao H., Deng X. W. (2001) Light control of *Arabidopsis* development entails coordinated regulation of genome expression and cellular pathways. *The Plant Cell* 13: 2589-2607
- Mandoli D. F., Briggs W. R. (1981) Phytochrome control of two low-irradiance responses in etiolated oat seedlings. *Plant Physiology* 67: 733-739
- Morelli G., Ruberti I. (2000) Shade avoidance responses. Driving auxin along lateral routes. *Plant Physiology* 122: 621–626
- Morris DA (2000) Transmembrane auxin carrier systems – dynamic regulators of polar auxin transport. *Plant Growth Regulation* 32: 161-172.
- Murashige T., Skoog A., (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473–497
- Palme K., Gälweiler L., (1999) PIN-pointing the molecular basis of auxin transport. *Current Opinion in Plant Biology* 2: 1335–1346
- Petrášek J., Friml J., (2009) Auxin transport routes in plant development. *Development* 136: 2675-2688

- Porter W. L., Thimann K. V. (1965) Molecular requirements for auxin action. Halogenated indols and indoleacetic acid. *Phytochemistry* 4: 229 – 243
- Quail P., (1997) An emerging molecular map of the phytochromes. *Plant, Cell and Environment* 20: 657–666
- Sakai T., Kagawa T., Kasahara M., Swartz T. E., Christie J. M., Briggs W. R., Wada M., Okada K., (2001) Arabidopsis nph1 and npl1: Blue light receptors that mediate both phototropism and chloroplast relocation. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America* 98(12): 6969–6974
- 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 and Development* 3: 1745–1757
- Shinomura T., Nagatani A., Hanzawa H., Kubota M., Watanabe M., Furuya M. (1996) Action spectra for phytochrome A- and B-specific photoinduction of seed germination in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Biology* 93: 8129-8133
- Schäfer E., Nagy F., (2006) Photomorphogenesis in Plants and Bacteria, 3rd Edition, Springer, Netherlands
- Schopfer P., (2001) Hydroxyl radical-induced cell-wall loosening in vitro and in vivo: implications for the control of elongation growth. *The Plant Journal* 28(6): 679-688
- Schwartz A., Zeiger E. (1984) Metabolic energy for stomatal opening. Roles of photophosphorylation and oxidative phosphorylation. *Planta* 161:129-136
- Spalding E. P., Folta K.M. (2005) Illuminating topics in plant photobiology. *Plant, Cell and Environment* 28: 39-53
- Sullivan J. A., Deng X. W. (2003) From seed to seed: the role of photoreceptors in *Arabidopsis* development. *Developmental Biology* 260(2): 289–297
- Timpte C., (2001) Auxin binding protein: curiouser and curiouser. *Trends in Plant Science* 6(12): 586-590
- Woodward A.W., Bartel B., (2005) Auxin: regulation, action and interaction. *Annals of Botany* 95: 707–735
- Yanovsky M. J., Kay S. A., (2003) Living by the calendar: how plants know when to flower. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 4: 265-276
- Yeh K.C., Lagarias J. C., (1998) Eukaryotic phytochromes: Light-regulated serine-threonine protein kinases with histidine kinase ancestry. *Plant Biology* 95(23): 13976–13981
- Zeiger E., Taiz L., (2006) Plant Physiology, 4th Edition, Sinauer Associates, Inc., Publishers, USA

Zeiger E., Zhu J., (1998) Role of zeaxanthin in blue light photoreception and the modulation of light – CO₂ interactions in guard cells. *Journal of Experimental Botany* 49: 433–442

Internetové zdroje:

<http://4e.plantphys.net>

<http://www.biochem.arizona.edu>

8 Seznam použitých zkratek

2,4-D	2,4-dichlorofenoxyoctová kyselina
ABP1	auxin binding protein 1
cDNA	komplementární DNA
CRY1	krytochrom 1
CRY2	krytochrom 2
cv. MM	kultivar Money Maker
cv. Rutgers	kultivar Rutgers
DTT	dithiothreitol
FAD	flavinadenindinukleotid
Far-red	dlohovlnné červené světlo
FMN	flavinadeninmononukleotid
HIR	reakce k vysoké intenzitě ozáření
IAA	kyselina indolyl-3-octová
IAN	indolyl-3-acetonitril
IPA	kyselina indolyl-3-hroznová
LFR	reakce k nízké intenzitě ozáření
MS medium	Murashige a Skoog médium
NAA	kyselina alfa-naftyloctová
NPA	1-naftyftalamová kyselina
PAT	polární transport auxinu
PCR	polymerázová řetězová reakce
Pfr	forma fytochromu absorbující far-red (aktivní)
PHOT1	fototropin 1
PHOT2	fototropin 2
PHR	doména příbuzná fotolyázám
PHY A-E	fytochrom A-E
Pr	forma fytochromu absorbující červené světlo (neaktivní)
SE	standardní chyba
TAM	tryptamin
TIBA	2,3,5 - trijodobenzoová kyselina
VLFR	reakce k velmi nízké intenzitě ozáření

WLP wall loosening proteins
WT wild type