

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Bakalářská práce

Olomouc 2015

Mariana Rýznarová

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra buněčné biologie a genetiky



**Úloha fytochromů v expresi genů
pro auxin-binding proteiny
u kukuřice *Zea mays L.***

Bakalářská práce

Mariana Rýznarová

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: prezenční

Olomouc 2015

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

Prohlášení

Prohlašuji, že tuto bakalářskou práci jsem vypracovala samostatně pod vedením doc. Martina Fellnera a všechna použitá literatura je uvedena v kapitole Seznam použité literatury.

V Olomouci dne 30. července 2015

.....
Podpis

Poděkování

Chtěla bych poděkovat doc. Martinu Fellnerovi za odborné vedení a možnost získání praxe v biologickém výzkumu. Dále bych poděkovala Renátě Plotzové, Janě Balarynové a ostatním členům Skupiny molekulární fyziologie za odborné rady a připomínky k mé bakalářské práci.

Shrnutí

Tato bakalářská práce se zabývá úlohou fytochromů na expresi auxin-binding proteinů *ABP1* a *ABP4* u kukuřice seté *Zea mays* L. Fytochromy jsou rostlinné fotoreceptory, které snímají především červené a daleko-červené spektrum světla. Podle toho, kterému světlu jsou vystaveny, se objevují v aktivní nebo neaktivní formě, které ovlivňují růst a vývoj rostliny. Různá spektra světla ovlivňují růst rostliny, světlo tedy funguje jako exogenní regulátor růstu. Auxin-binding proteiny jsou receptory pro auxin. Cílem mé bakalářské práce bylo vypracovat literární rešerši na dané téma. V experimentální části jsem zjišťovala, jak fytochromy zprostředkují vliv světla na růst rostlin kukuřice v podmínkách *in vitro* a na expresi genů kódujících kukuřičné proteiny *ABP1* a *ABP4*. Studovala jsem tedy, zda jsou ve vývoji a růstu rostlin kukuřice fytochromové a auxinové signální dráhy vzájemně propojeny. K experimentům byla použita semena mutanta kukuřice *elm-1* (*elongated mesocotyl 1*) a semena příslušné kontrolní izogenické linie B-73 (WT). *Eml-1* je mutant, který má omezenou schopnost vytvářet aktivní fytochromy. Ve fyziologických experimentech jsme potvrdili, že světlo prostřednictvím fytochromů inhibuje prodlužování mezokotylu. Ve druhé, molekulární části jsem zjistila, že přítomnost fytochromů je nutná k expresi genů *ABP1* a *ABP4*. Současně je však zřejmé, že modré a červené světlo hraje prostřednictvím fytochromů negativní úlohu v expresi těchto auxin-binding proteinů. Výsledky předkládané bakalářské práce podporují nejnovější literární údaje, které ukazují, že v rostlinách kukuřice jsou světelné signální dráhy a auxinová signalizace zprostředkovaná ABP vzájemně propojeny.

Summary

This thesis bachelor describes role of phytochromes in expression of auxin-binding proteins *ABP1* and *ABP4* in maize *Zea mays* L. Phytochromes are plant photoreceptors which primarily capture red and far-red light. Dependent on light exposure, phytochromes occur in active or inactive form, which differentially influence plant growth and development. Various parts of light spectrum influence plant growth, thus light functions as exogenous growth regulator. Auxin-binding proteins serve as auxin receptors. The aim of the thesis was to write a literary review on the topic of this bachelor thesis. In the experimental part of the thesis, I studied how phytochromes mediate the effect of light on maize growth in conditions *in vitro* and on the expression of genes encoding maize proteins *ABP1* and *ABP4*. I have studied whether phytochrome and auxin signalling pathways are connected in the process of maize growth and development. For experiments, seeds of corn mutant *elm-1* (*elongated mesocotyl 1*) and control isogenic line B-73 (WT) were used. *Elm-1* is mutant that has limited ability to synthesize active forms of phytochrome. In physiological experiments, we proved that light inhibits mesocotyl elongation via phytochromes. In the second molecular part of the thesis, I revealed that the presence of phytochromes is essential for expression of genes *ABP1* and *ABP4*. Concurrently, it is obvious that via phytochromes, blue and red light play a negative role in the expression of the auxin-binding proteins. Results presented in this bachelor thesis support the newest scientific data, which show that in maize light signalling and auxin signalling mediated by ABP are mutually connected.

Obsah

1. Úvod.....	8
2. Úvod do problematiky	9
2.1. Auxin	9
2.1.1. Objev auxinu	9
2.1.2. Chemická podstata	9
2.1.3. Biosyntéza auxinu	10
2.1.4. Transport auxinu	10
2.1.5. Auxin-binding protein 1 (ABP1).....	11
2.2. Světlo	12
2.2.1. Fotomorfogeneze.....	12
2.2.2. Receptory modrého světla.....	13
2.2.3. Receptory červeného světla.....	14
2.2.4. Struktura fytochromů	14
2.2.5. Interakce auxinu a světla	16
3. Materiál a metody	18
3.1. Rostlinný materiál.....	18
3.2. Růstové experimenty <i>in vitro</i>	18
3.3. Studium genové exprese	19
3.3.1. Izolace RNA	19
3.3.2. Syntéza cDNA.....	20
3.3.3. Genová exprese	21
3.3.4. Elektroforéza	22
4. Výsledky	23
4.1. Růstové pokusy.....	23
4.1.1. Vliv světla na růst koleoptile.....	23
4.1.2. Vliv světla na růst mezokotylu.....	24
4.1.3. Účinky světla na počet seminálních kořenů	25
4.1.4. Vliv světla na délku seminálních kořenů	26
4.1.5. Vliv světla na délku primárního kořene	27
4.2. Expresní experimenty	27
4.2.1. Vliv světla na expresi genu <i>ABP1</i>	27
4.2.2. Vliv světla na expresi genu <i>ABP4</i>	28

5. Diskuze	30
6. Závěr	32
7. Seznam použité literatury	33
8. Seznam použitých zkratek	39

1. Úvod

Moje bakalářská práce byla vypracována ve Skupině molekulární fyziologie, Laboratoř růstových regulátorů Univerzity Palackého v Olomouci a Ústav experimentálních botaniky Akademie věd České republiky. Experimenty byly finančně podpořeny Evropským sociálním fondem (projekt č. CZ.1.07/2.3.00/30.0004) a MŠMT (projekt č. LO1204).

Ve své bakalářské práci jsem se zabývala úlohou fytochromů na expresi auxin-binding proteinů. Světlo je hlavním exogenním faktorem, který ovlivňuje růst rostlin. Rostliny mají pro vnímání intenzity a kvality světla mnoho receptorů jedním z nich jsou fytochromy. Jedná se o rostlinné receptory, které vnímají kvalitu červeného a daleko-červeného světla a tím ovlivňují růst jednotlivých částí rostliny. Dalším důležitým faktorem, který ovlivňuje růst rostliny, jsou endogenní rostlinné hormony, mezi které patří auxiny, cytokininy, gibbereliny, a další. Vzájemný poměr jednotlivých hormonů zajišťuje správný vývoj a růst rostlin. Signální dráhy rostlinných hormonů a světla jsou vzájemně propojeny a byly již částečně prozkoumány. Nejvíce však víme o propojení drah auxinů a světla, i když zdaleka nebylo objasněno vše. Mezi takové dráhy patří i auxinová signalizace zprostředkovaná *auxin-binding proteinem 1* (*ABP1*), což je jeden z receptorů auxinu. Role *ABP1* byla již částečně objasněna u *Arabidopsis*, kukuřice a rajčete, kde víme, že je nezbytný pro správný embryonální vývoj semene a poté pro správný vývoj listů a stonku.

Cílem mé bakalářské práce bylo vypracovat literární rešerši na dané téma a dále provést experimenty, které by objasnily, jak fytochromy zprostředkují vliv světla na růst rostlin kukuřice v podmínkách *in vitro* a na expresi genů kódujících kukuřičné proteiny ABP1 a ABP4. K tomu jsem využila genetického přístupu, který spočíval ve využití mutantní rostliny *elm-1*, která se vyznačovala defektem ve vytváření aktivních fytochromů.

2. Úvod do problematiky

2.1. Auxin

2.1.1. Objev auxinu

Objev auxinu můžeme datovat to druhé polovině 19. století, kdy Charles Darwin a jeho syn studovali mechanismus, jakým se rostliny ohýbají směrem ke světlu. Tento jev se nazývá fototropismus. Pokusy byly prováděny na trávě *Phalaris canariensis*. Experiment byl prováděn tak, že jedna část rostliny byla nasvícena modrým světlem a druhá byla ve stínu. Při pozorování bylo zjištěno, že část koleoptile, která byla zastíněna byla o několik milimetrů delší, než část, která byla osvícena modrým světlem. Darwin však také vypožoroval, že pokud zakryjeme vrcholovou špičku koleoptile tak k prodlužování na zastíněné části nedojde. Z těchto výsledků usoudil, že oblast koleoptile, která je odpovědná za ohyb rostliny ke světlu je umístěna několik milimetrů pod vrcholovou špičkou. Tato část se nazývá růstová zóna. Darwin proto došel k závěrům, že ve vrcholové špičce vzniká nějaký druh signálu, který je transportován do růstové části a proto zastíněná část koleoptile roste rychleji než část osvětlená modrým světlem. Své poznatky poté popsal v knize *The Power of Movement in Plants* (Darwin *et* Darwin, 1881).

Dalším vědcem, který přispěl ke zkoumání auxinu, byl Fritz Went v roce 1926. Ten prováděl pokus na ovsu *Avena sativa*, kdy odřízl špičku koleoptile, kterou posléze přemístil na želatinový bloček. Auxin ze špičky koleoptile difundoval do želatinového bločku a po přiložení bločku na stonek opět začal růst. Tímto pokusem byla potvrzena hypotéza, že do bločku z koleoptile difundovala chemická substance, která je odpovědná za prodlužování a růst rostliny. Později se zjistilo, že touto látkou je auxin. Název je odvozen z řeckého „*auxein*“, což znamená růst (Zeiger *et* Taiz, 2006).

2.1.2. Chemická podstata

Auxin je rostlinný endogenní hormon, který podporuje růst a prodlužování rostlin. Hlavním auxinem u vyšších rostlin je indol-3-oxycetová kyselina (IAA). Dalšími endogenními auxiny jsou 4-chloro-indolyl-3-oxycetová kyselina, indolyl-3-máselná kyselina a kyselina fenylacetová. Rostlinné endogenní auxiny jsou chemicky velmi různorodé, jejich jediným společným znakem je molekulární vzdálenost, asi 0,5 nm, mezi kladným nábojem na aromatickém kruhu a záporně nabitou karboxylovou skupinou. Auxiny mají relativně

jednoduchou strukturu, díky které se mohou syntetizovat i uměle a to i se svou biologickou aktivitou (Korasick, Enders, *et Strader*, 2013)

2.1.3. Biosyntéza auxinu

Biosyntéza auxinu probíhá zejména v rychle se dělicích pletivech. Primárně je syntetizován ve stonkovém apikálním meristému a mladých listech, ale menší část IAA se syntetizuje i v ostatních pletivech (Ljung *et al.*, 2001). IAA se v rostlině syntetizuje z tryptofanu prostřednictvím Trp-dependentních drah, ale také z idolových prekurzorů tryptofanu přes Trp-independentní dráhy. Trp-dependentních drah je několik a většina je pojmenována podle meziproductů: kyselina indol-3-pyrohroznová (IPA) dráhy, indol-3-acetamidu (IAM) dráhu, tryptaminu dráhu, a indol-3 -acetaldoxime (IAOx) cesta. U IPA dráhy je tryptofan převáděn pomocí Trp-aminotransferázy na IPA, který je převáděn na indol-3-acetyldehyd, který je dále převáděn na IAA. Podrobné mechanismy nejsou zatím známy (Woodward *et Bartel*, 2005). IAA dráha byla nalezena i semenáčků *Arabidopsis* (Tam *et Normanly*, 1998).

Další dráha, která byla potvrzena u rostlin je IAM dráha. Při zkoumání IAM dráhy bylo objeveno, že hladina IAM u semenáčků *Arabidopsis* je stejná jako hladina volné IAA (Pollmann *et al.*, 2002). Tryptofan je přeměněn na IAM pomocí Trp-monooxidázou, IAM je poté převeden aminohydrolázou na IAA. Tato dráha se vyskytuje u *Arabidopsis* (Pollmann *et al.*, 2003)

2.1.4. Transport auxinu

Auxin je syntetizován v mnoha tkáních, nejvíce však ve vrcholových oblastech výhonků. IAA je akumulován ve stonkovém apexu a odtud je poté transportován do jiných oblastí rostliny, zejména do mladých listů (Ljung *et al*, 2001). Auxin je transportován dvěma různými cestami. První transport je na dlouhé vzdálenosti a jedná se o transport auxinu do mladých částí rostliny zásobních pletiv. Druhou cestou je pomalý transport zvaný polární transport auxinu, který zprostředkovává pomalý transport auxinu (Marchant, 2002). Polární transport auxinu vede k vytvoření podélného gradientu, který ovlivňuje prodlužování stonku, apikální dominanci, senescenci listů a hojení ran. Transport auxinu do buněk je zprostředkováván pomocí AUX1 proteinů, které jsou lokalizované v plazmatických membránách některých buněk (Swarup *et al.*, 2001, 2004).

Poté, co IAA vstoupí do buňky přes AUX1 protein je jeho tok regulován pomocí PIN proteinů. PIN proteiny byly objeveny u *Arabidopsis* v několika formách (Okada *et al.*, 1991), jedná se o proteiny, které regulují výtok auxinu z buňky (Zažímalová *et al.* 2007) a stejně jako AUX1 jsou lokalizovány v buňce asymetricky (Gälweiler *et al.*, 1998).

Transport auxinu je regulován více aspekty. Zdá se, že na regulaci polárního transportu auxinu se podílí samotný auxin. Byla navrhována teorie, kdy počáteční difúze auxinu od zdroje pozitivně ovlivňuje vlastní dopravu. Dalším faktorem, který ovlivňuje polární transport auxinu je počet přenašečů na membráně. Transkripci přenašečů zajišťuje signální dráha, kterou spouští auxin, a která zahrnuje i auxinové receptory TIR1 a *ABPI*. Dalším faktorem jsou ostatní fytohormony, jako jsou etylén a cytokinin, které kontrolují expresi PIN a AUX1 proteinů (Petrášek *et al.* Friml, 2009).

2.1.5. Auxin-binding protein 1 (ABPI)

Auxin-binding protein 1 (*ABPI*) byl jeden z prvních proteinů, které byly charakterizovány jako proteiny vázané na auxin. *ABPI* zprostředkovává mnoho odpovědí na auxin a reguluje buněčné odpovědi (Sauera et Kleine-Vehnb, 2011). Auxin-binding protein byl objeven v koleoptile kukuřice (*Zea mays L.*) a to v 70. letech minulého století a byl lokalizován na vnější membráně buněk koleptile (Hertel *et al.*, 1972). Následně byly charakterizovány jeho vazebné vlastnosti a na konci 80. let bylo prokázáno, že se váže na auxin (Jones et Venis, 1989). Přítomnost *ABPI* byla postupně potvrzena u kukuřice, *Arabidopsis*, tabáku, jahod a slunečnice. Fylogenetickou analýzou bylo zjištěno, že *ABPI* se poprvé objevil už u prvních řas (Tromas *et al.*, 2009). U *Arabidopsis* byl prokázán pouze *ABPI*, avšak u kukuřice bylo nalezeno další pět typů ABP a to včetně *ABPI* (Schwob E *et al.*, 1993).

Gen *ABPI* kóduje protein o velikosti 201 aminokyselin a konečný protein je tvořen dvěma podjednotkami (dimery), které dohromady mají velikost 22 kDa. Peptid obsahuje N-terminální signální peptid, jehož sekvence je různorodá u většiny ABP proteinů. Jako u prvního rostlinného peptidu zde byla objevena C-terminální KDEL sekvence, která zřejmě lokalizuje *ABPI* do endoplazmatického retikula. Dále peptid obsahuje několik konzervativních domén – Box A, B, C. Podle všech dostupných poznatků je Box A místem pro navázání auxinu (Davies, 2004).

Většina *ABPI* je lokalizovaná v lumenu endoplazmatického retikula, v Golgiho aparátu a na plazmatické membráně (Jones et Herman, 1993). Byly prokázány účinky na růst a vývoj buněk (Fellner *et al.*, 1996; David *et al.*, 2007). *ABPI* ovlivňuje buněčné dělení, po

ztrátě činnosti *ABPI* došlo ke snížení transkriptu kódující cyklin D, který je kontrolním bodem pro vstup buňky do další fáze dělení (David *et al.* 2007). Také bylo prokázáno, že *ABPI* se značně podílí na regulaci polárního transportu auxinu (Effendi *et al.* 2011). *ABPI* dokáže rozlišit mezi fyziologicky aktivním a neaktivním auxinem a tím aktivovat tok iontů do buňky, poté zprostředkovává buněčnou expanzi a také růst jednotlivých tkání rostliny. Proto zvýšená indukce exprese *ABPI* v buňce vede k vyšší citlivosti buněk na auxin (Effendi *et al.* 2011).

ABPI hraje zásadní roli v embryonálním vývoji rostlin, pokud je *ABPI* inaktivován je zásadně narušen vývoj rostliny (Chen *et al.*, 2001). V postembryonálním vývoji bylo prokázáno, že zablokováním exprese *ABPI* vedlo k rychlému potlačení růstu výhonů, dále byl změněn tvar a velikost listů (Braun *et al.*, 2008).

Malá část *ABPI* je lokalizována na plazmatické membráně, avšak nemůže se vázat na plazmatickou membránu přímo, ale přes další ukotvovací protein (Tomas *et al.*, 2010). Jedním z ukotvovacích proteinů pro *ABPI*, který byl objeven, je CBP1 (C-terminální peptid-vázající protein 1) (Shimomura, 2006). Navázání auxinu na *ABPI*, spojeném s ukotvovacím proteinem na plazmatické membrány, vede k různým molekulárním procesům, jako je aktivace protonové pumpy nebo aktivace draslíkových kanálů. Dále byl u *Arabidopsis* izolován mutant s vypnutým genem *ABPI*, který dokazuje, že vyřazení *ABPI* vede k zastavení embryonálního vývoje rostliny. Tímto pokusem bylo potvrzeno, že *ABPI* je důležitý po celou dobu vývoje rostliny (Tomas *et al.*, 2009).

Auxin kromě *ABPI* odpovědí iniciuje i odpovědi přes receptor TIR1. TIR1 zprostředkovává změny v genové expresi prostřednictvím odbourávání jeho transkripčních signálů. Hladina auxinu ovlivňuje zapojení *ABPI* nebo TIR1. Pokud je hladina auxinu relativně nízká, *ABPI* zprostředkovává expanzi buňky. Naproti tomu, vysoká hladina auxinu stimuluje dělení buňky, které je potenciálně zprostředkováváno pomocí TIR1. Avšak úlohu při buněčném dělení má i *ABPI*, což bylo identifikováno u tabáku. Bylo také prokázáno, že *ABPI* je určitou funkci i při kontrole buněčného cyklu (Scherer, 2011)

2.2. Světlo

2.2.1. Fotomorfogeneze

Světlo výrazně ovlivňuje vývoj rostliny, využívá světlo jako zdroj energie. U sazenic, které rostou ve tmě, je pozorován růst vrcholového háku, uzavření a pozastavení expanze

dělohy a prodlužovací růst hypokotylu, tento vývojový program je nezbytný pro sazenice, které jsou v zemi. Poté, co je rostlina vystavena světlu, tak se děloha otevírá, je potlačeno prodlužování hypokotylu, je zahájena diferenciací buněk ve vegetativním meristému, stimulován růst listů a tvorba chloroplastů. Tento stav se nazývá fotomorfogeneze (Schäfer *et* Nagy, 2006). Proces fotomorfogeneze je zprostředkován speciálními fotoreceptory.

Rostlinné fotoreceptory se dělí podle toho, kterou vlnovou délku světla vnímají (Zeiger *et* Taiz, 2006). Fotoreceptory modrého světla jsou kryptochromy, fototropiny a zeaxantiny. Odpovědi k modrému světlu zahrnují stimulaci rozvoje dělohy, regulaci doby kvetení, otvírání stomat aj. (Lin, 2002, Lin *et* Shalitin 2003). Druhým typem fotoreceptorů jsou fytochromy, což jsou primárně receptory pro červené spektrum světla. Odpovědi na červené světlo jsou regulace buněčného dělení, růst stonku a listů, regulace klíčení semene.

2.2.2. Receptory modrého světla

Fotoreceptorů modrého světla je více. Patří mezi ně kryptochromy, fototropiny a zeaxantiny, které mají významný vliv na spoustu aspektů života rostliny.

2.2.2.1. Kryptochromy

Jedná se o receptory kontrolující fotomorfogenezi v reakci na modré nebo ultrafialové (UV-A) záření. Evolučně se zřejmě jedná o potomky DNA fotolyázy. Kryptochromy a fotolyázy mají podobnou trojrozměrnou strukturu. Struktura obsahuje chromofor a flavin adenin dinukleotid (FAD). U *Arabidopsis* jsou CRY1 a CRY2 převážně jaderné proteiny. Hrají důležitou roli v rostlinné fotomorfogenezi. Modré světlo prostřednictvím kryptochromů stimuluje prodlužování stonku, expanzi listů a regulují kvetení. Je možné, že kryptochromy ovládají vývojové změny v rostlině díky změně genové exprese vyvolané světlem (Lin *et* Todo, 2005).

2.2.2.2. Fototropiny

Jedná se o další fotoreceptory modrého světla. Fototropiny se skládají z C-terminální oblasti, v jejím středu se nachází serin/threonin kináza, a z N-terminální oblasti, která je složena ze dvou LOV domén. Na LOV doménu se ve tmě nekovalentně váže flavinmononukleotid (FMN), až po ozáření modrým světlem vzniká kovalentní vazba mezi FMN a molekulou fototropinu (Schwartz *et* Zeiger., 1984). U *Arabidopsis* byly objeveny dva fototropiny PHOT1 a PHOT2.

Mutantní rostlina *phot1* postrádá fototropní reakci při ozáření nízkou intenzitou modrého světla. Mutant *phot2* vykazoval normální fototropní reakci, avšak mutantní rostlina *phot1/phot2* postrádala fototropní reakci, jak při ozáření nízkou intenzitou, tak vysokou intenzitou modrého světla. (Sakai *et al.*, 2001).

2.2.3. Receptory červeného světla

Fytochromy byly identifikovány jako receptory pro červené světlo. (Sullivan a Deng, 2003). Odpovědi těchto receptorů, které reagují na červené světlo a na dlouhovlnné červené světlo (far-red), zahrnují regulaci klíčení semen a deetiolizaci, regulaci velikosti stonků a listů. Mezi další patří reakce na zastínění (Schäfer *et Nagy*, 2006).

2.2.4. Struktura fytochromů

Fytochromy reagují na červené světlo intenzivněji než na modré světlo. Fytochromy jsou v rostlině regulační fotoreceptory, které zprostředkovávají účinky červeného světla na molekulární a fyziologické reakce. Absorbují světelné záření o délce 600 až 750 nm, což odpovídá červenému světlu. Fytochrom se vyskytuje jako dimer, který je tvořen ze dvou podjednotek. Jedna jednotka je apoprotein, což je polypeptidový řetězec o velikosti asi 125 kDa, druhá podjednotka je světlo absorbující pigmentová molekula chromofor – lineární tetrapyrrol. Fytochrom je tvořen N-terminálním koncem, který obsahuje chromofor vázající bilin lyase doménu a PHY doménu, která stabilizuje fytochrom v Pfr formě. C-terminální konec je tvořen histamin kinase related doménou, která hraje důležitou roli v autentické fytochromové odpovědi. Mezi terminálními konci se nachází PAS doména, ve které se nachází jaderné lokalizační sekvence (NLSs), které umožňují transport aktivní formy fytochromu Pfr k jádru (Sullivan *et Deng*, 2003).

Fytochrom je syntetizován ve tmě v biologicky neaktivní formě Pr – absorbující červené světlo. Po ozáření červeným světlem se forma Pr mění na formu Pfr – absorbující far-red – tato forma je biologicky aktivní. Jednotlivé formy fytochromu se mohou přeměňovat v závislosti na vlnové délce záření. Například denní světlo je obohaceno o červené spektrum, a proto jsou fytochromy převážně ve formě Pfr, která se v období tmy mění na formu Pr. (Zeiger *et Taiz* 2006)

Geny pro PHYA jsou nejvíce přepisovány u sazenic, které rostou ve tmě, avšak pokud je sazenice vystavena světlu, jsou degradovány. Tedy světlo potlačuje expresi genu pro PHYA (Sineshchekov, 2004). Geny pro PHYB-E jsou přepisovány v mnohem nižších

hodnotách, ale jejich hladina se při vystavení sazenic světlu nemění. Proto u sazenic rostoucích na světle jsou nejvíce přepisovány geny pro PHYB (Chen *et* Chory, 2011)

Z toho odvozujeme, že existuje více forem fytochromů. Jsou fytochromy typu I, které jsou fotonestabilní, což znamená, že pokud jsou ozářeny bílým nebo červeným světlem, tak rychle degradují; do této skupiny patří PHYA. Dále máme fytochromy typu II, které jsou fotostabilní, do této skupiny patří PHYB-E. Každý z fytochromů má svoji vlastní funkci. (Clough *et* Vierstra, 1997; Quail, 1997)

U *Arabidopsis* byly objeveny geny kódující pět fytochromů, PHYA-PHYE. (Li *et* Chinnappa, 2003). U většiny rostlin jsou fytochromy přítomny pouze v jedné kopii, avšak u kukuřice je každý fytochrom duplikován. Kukuřice má tři typy fytochromů ve dvou kopiích, PHYA1, PHYA2, PHYB1, PHYB2, PHYC1, PHYC2. A z toho je pouze fytochromy A1, B1 a C1, které jsou exprimovány ve všech tkáních. Z těchto fytochromů jsou jen fytochromy A1 a B1 ovlivňováni světlem (Nagatani, 2010).

2.2.4.1. Fytochrom B

Fytochrom B je v buňce rozdělen do cytoplazmy a jádra. Z poznatků je zřejmé, že biologicky neaktivní fytochrom B ve formě Pr je lokalizován v cytoplazmě, a to ve tmě. Pokud je však buňka vystavena světlu, tak se Pr mění na biologicky aktivní formu Pfr a je transportována do jádra. Ale i při těch neoptimálnějších světelných podmínkách, které vyvolávají translokaci PHYB do jádra, je pouze 30% PHYB transportováno do jádra (Nagy *et* Schafer, 2002). Mutanti, kteří mají vyřazený gen pro PHYB, byli izolováni už před mnoha lety. Bylo zjištěno, že PHYB hraje zásadní roli u sazenic, které rostly pouze na červeném světle, ale nemají zásadní roli u sazenic, které rostlina na světle FR nebo na modrém světle. Fytochrom B má také zásadní roli v reakci nazývané únik ze stínu (shade avoidance response) způsobeném jinou rostlinou. Pokud je rostlina zastíněna, snižuje se množství červeného světla a tím pádem se Pfr mění na Pr a hladina Pfr a fytochromů klesá. Efekt vyhýbání se stínu byl zkoumán u rostlin, které mají inaktivovaný PHYB a bylo zjištěno, že rostliny ukazují značné oslabení ve vyhýbání se stínu (Franklin, 2009).

Mutanti ve fytochrozech mají specifický znak ve dlouhém hypokotylu. Někteří mutanti, kteří mají defekt na odpovědi vyvolané R světlem (dlouhý hypokotyl), ale nemají souvislost s PHYB byli také izolováni. Například mutanti *pef2* a *pef3*, kteří se také vyznačují dlouhým hypokotylem. Proto je tu možnost, že *pef2* a *pef3* mohou kódovat proteiny, které mají vliv na signální dráhu PHYB (Nagy *et* Schafer, 2002). Další mutant, který se vyznačuje dlouhým hypokotylem je *red1*, tento mutant také nadměrně exprimuje PHYB a také je

hypersenzitivní na R světlo. Mutanti *red1* také špatně reagují na FR světelnou terapii. Toto naznačuje, že *RED1* kóduje protein, který působí jako meziprodukt v signálních drahách zprostředkovaných PHYB (Wagner, 1997).

Při výzkumu světelné signalizace byly objeveny tzv. PIF proteiny, které byly popsány jako ústřední hráči v transdukcii červeného a daleko červeného světla, které je detekováno fytochromy (Castillon *et al.*, 2007). PIF proteiny se váží na fytochromy a regulují tím buněčný růst (Leiver *et Monte*, 2014). Pokud je rostlina ve tmě a tedy nejsou přítomny aktivní fytochromy, dochází k akumulaci PIF proteinu v jádře, což má za následek dlouhý hypokotyl a uzavřené háčky. Jakmile se však rostlina dostane na světlo, jsou neaktivní fytochromy převáděny na aktivní fytochromy, které jsou translokovány do jádra, kde vytváří fyzickou vazbu s PIF proteiny. Toto spojení má za následek přeprogramování transkripčních faktorů v buňce a iniciuje fotomorfologické změny, což je například otevření háčeků, inhibice prodlužování hypokotyly (Leivar *et Quail*, 2011).

2.2.5. Interakce auxinu a světla

Rostlinný vývoj je závislý na světle nebo na střídání světla a tmy. Světlo přímo ovlivňuje růst mezokotyly, koleptile, hypokotyly, klíčení semen a mnoho dalších procesů v růstu a vývoji rostliny. Dalším významným faktorem ve vývoji rostlin jsou hormony, a to především auxiny. Auxiny ovlivňují mnoho morfogenetických odpovědí a je zde předpoklad, že hladina auxinu v různých částech rostliny je ovlivněna množstvím a typem světla. Například, pokud je zdravá rostlina ovsy vystavena přímému záření červeného světla, je její koleoptile delší, než u rostliny, která byla vystavena modrému světlu. Zdá se tedy, že červené světlo ovlivňuje signál, díky kterému se tvoří ve tkáních rostlin auxin-receptorový komplex, který je odpovědný za růst těch částí rostliny, které jsou regulovány auxinem (Liverman *et Bonner* 1953).

Zkoumání bylo prováděno například na slunečnici, kdy sledovanou částí rostliny byl hypokotyl. I zde se ukázalo, že světlo, a to zejména červené světlo, má vliv na hladiny auxinu v rostlině. Slunečnice byla vystavena tmě, červenému a modrému světlu. Podle očekávání délka hypokotyly a obsah auxinu ve tmě byl nejvyšší, avšak rozdíl mezi hladinami auxinu a délkou hypokotyly u červeného a modrého světla byl různý. Pokud byla rostlina vystavena po sedm dní červenému světlu, byl obsah auxinu a délka hypokotyly větší, než u rostlin, které byli vystaveny modrému světlu (Kurepin *et al.*, 2007).

Světlo rovněž snižuje intenzitu polárního transportu auxinu v koleoptilu rajčete (Liu,2011) a také bylo zjištěno, že světlo snižuje transport auxinu v mezokotylu kukuřice (Iino, 1985).

Vztah mezi endogenním auxinem a *ABPI* byl zkoumán Jones *et al.* (1998), který pozoroval růst koleoptile kukuřice na červeném světle. Rostliny, které byly pěstovány při kontinuálním červeném světle, měly hladinu endogenního auxinu podstatně nižší, než kontrolní rostliny. Z počátku nedocházelo ke změnám hladiny *ABPI*, až po dvanáctihodinovém intenzivním záření se hladina *ABPI* snížila o 60% z původní hodnoty a tím se snížila i možnost vazby auxinu.

Fellner *et al.* (2012) studovali interakci mezi expresí genů ABPs a expresí genů fytochromu B, a to pomocí mutantů s nefunkčními geny *ABPI* nebo *ABP4*. Autoři došli k závěrům, že ABP neovlivňuje expresi *PHYA*, ale byla potlačena exprese genu pro *PHYB*.

Vliv světla na expresi *ABPI* v mezokotylu nebyl nijak prokázán, protože exprese genů *ABPI* byla stejná u všech typů světla (tma, červené a far-red světlo). Avšak exprese *ABP4* v mezokotylu kukuřice byla výrazně vyšší u rostlin, které byly vystaveny červenému nebo far-red světle. Poté bylo prokázáno, že pokud je exprese *ABP4* potlačena je potlačen i prodlužovací růst, který je regulován červeným nebo fer-red světlem (Fellner et kol, 2012.)

Fotomorfogeneze a PAT jsou zřejmě spojeny přes protein BIG/DOC1/TIR3. Transkripce proteinu BIG/DOC1/TIR3 je regulována světlem. *Doc1* mutant poté způsobuje transkripci genů ovládané světlem i ve tmě, což naznačuje, že DOC1 protein hraje určitou úlohu ve fotomorfogenezi. Mutanti *tir3* jsou známí mnohočetnými fenotypy, což je zřejmě díky jeho význačné roli v transportu auxinu vně buňky (Schäfer a Nagy, 2006).

3. Materiál a metody

3.1. Rostlinný materiál

K experimentům byla použita semena mutanta *elm-1* (*elongated mezocotyl 1*) kukuřice seté *Zea mays L.* a semena příslušné kontrolní izogenické linie B-73 (WT). Mutant *elm1* je mutant s deficitem ve fytochromu. Tento typ mutanta nemá schopnost převést biliverdin IX α na 3Z-phytochromobilin a zabraňuje tedy syntéze aktivních fytochromů (Sawers *et al.*, 2002). Semena mutanta i kontrolní linie byla laskavě poskytnuta Thomasem P. Brutnellem (Cornell University, Ithaca, NY).

3.2. Růstové experimenty *in vitro*

Semena kontrolní rostliny (WT) a mutanta *elm1* byla sterilizována ve sterilní plastové zkumavce. Sterilizace probíhala v několika krocích. Nejprve byla semena sterilizována v 70% etanolu po dobu 3 minut intenzivního třepání. Poté byl etanol odstraněn a semena byla 6-krát promyta sterilní destilovanou vodou. Poté byla semena přemístěna do Erlenmayerovy baňky, zalita roztokem Savo (2,8% NaClO - 0,6 l savo, 0,4 l voda, Biochemie). Erlenmayerova baňka byla umístěna na třepačku, kde byla semena intenzivně třepána po dobu 35 minut. Po uplynutí dané doby byl roztok Sava odlit a semena byla promyta 6-10 krát sterilní destilovanou vodou. Poté se pracovalo ve sterilním prostředí. Semena byla vyseta pomocí pinzety do sterilních Magenta GA7 boxů (77x77x196mm, Sigma-Aldrich, Praha, Česká republika), na základní růstové médium Murashige and Skoog (Murashige a Skoog, 1962; Caisson-labs, USA, MSP01-50LT). V každém boxu bylo 80 ml média. Pro přípravu média bylo použito 2l destilované vody, 20 g sacharózy, 8,66 g MS média (Sigma-Aldrich, USA, M5524), 390,4 mg MES pufry (Caisson-labs, USA, MSP01-50LT). Do třílitrové Erlenmayerovy baňky byla nalita destilovaná voda a za stálého míchání byly přidávány jednotlivé složky média, dokud se úplně nerozpustily. Po rozpuštění jednotlivých složek bylo pH média upraveno pomocí 1M KOH na hodnotu pH 6,1. Médium bylo rozděleno po 400 ml do půllitrových termoláhví, do kterých byl před nalitím média nasypáno 2,8 g phytoagaru (Duchefa Biochemie, Nizozemsko, P1003). Médium bylo sterilizováno autoklávováním. Po vysetí semen byly Magenta boxy uzavřeny a vloženy do růstových komor s kontinuální červeným nebo modrým světlem. Magenta boxy se semeny, která měla klíčit ve tmě, byly zabaleny do hliníkové fólie a uloženy do jedné z růstových komor. Po 3-4 dnech byla na stěně boxu označena vyklíčená semena. Po sedmi dnech od vysetí byly rostlinky, které vyrostly ze semen klíčících ve stejnou dobu,

vyjmuty pinzetou a změřeny pravítkem s přesností na 1 mm. Na rostlině byla měřena délka koleoptile, mezokotylu, hlavního kořene, délka a počet seminálních kořenů.

3.3. Studium genové exprese

Pro vyhodnocení exprese genu *ABP1* a *ABP4* u mutanta *elm-1* a kontrolní rostliny byla použita metoda RT-PCR (Reverse- transcription PCR).

3.3.1. Izolace RNA

K izolaci celkové RNA byly použity mezokotylы rostlin mutanta *elm-1* a WT, které byly vypěstovány dle stejného postupu jako v předchozím bodě. Sedm dní po výsevu byly mezokotylы odříznuty a zmrazeny v tekutém dusíku. Sklizeň mezokotylů probíhala vždy za stejných světelných podmínek, při kterých byly rostliny pěstovány. V případě etiolovaných rostlin byly mezokotylы sklizeny pod slabým zeleným světlem. Izolace RNA byla provedena pomocí Isolate II RNA Plant Kit (Bioline, Velká Británie) dle postupu uvedeného v protokolu od výrobce. Mezokotylы byly rozdrceny ve třecí misce s tekutým dusíkem. Získaný prášek byl poté přenesen do mikrozkušavky a uložen do mražáků (-80°C). Pro izolaci RNA byly použity roztoky Lysis Buffer RLS a markaptoethanol. Na pročištění získané RNA byla použita DNaseI, směs byla inkubována v tepelné lázni po dobu 15 minut. Poté byla DNaseI inaktivována a izolovaná RNA byla rozpuštěna v RNase-free vodě. Poté byla změřena koncentrace celkové izolované RNA na spektrofotometru (SmartSpec Plus Spectrophotometer, Bio-Rad, Czech Republic) a čistota vzorků byla ověřena pomocí PCR a elektroforézy. Pro PCR byly použity primery ZmAct81:

F primer: 5' - ACACAGTGCCAATCT - 3'

R primer: 5' - ACTGAGCACAATGTTAC - 3'

Tabulka č. 1 Složení reakční směsi pro PCR

Položka	Objem
5x My Taq buffer	4ul
F primer 10uM	0,5ul
R primer 10uM	0,5ul
My Taq Polymerase	0,1ul
Nuclease free - water	13ul
RNA	2ul
Celkový objem	20ul

Tabulka č. 2 Časový rozpis kroků PCR

Teplota (°C)	Čas (min)	Počet cyklů
94°C	5min	1
94°C	30sec	45
45°C	30sec	
72°C	45sec	
72°C	5min	1
15°C	neomezeně	

kdy výsledný produkt by měl mít velikost 419 bp, pokud však byl gel čistý, vyextrahovali jsme čistou RNA bez DNA.

3.3.2. Syntéza cDNA

Komplementární DNA (cDNA) byla syntetizována z 1µg izolované RNA. Na spektrofotometru byla změřena koncentrace RNA, která byla uvedena v ng/µl. Z těchto hodnot byl vypočítán objem, ve kterém se nachází 1 µg RNA. Objem vzorku byl doplněn sterilní vodou na objem 8 µl. cDNA byla syntetizováno pomocí Prime Script 1st strand cDNA Synthesis kit (Takara-bio, Japonsko). Syntéza cDNA probíhala v několika krocích. V prvním kroku byla použita reakční směs pro denaturaci a mikrozkuhavka se vzorkem a reakční směsí byla vložena do termocykleru (MJ mini, Personal Thermal Cycler, Bio-Rad, Czech Republic) a zahřátá na 65°C na dobu 5 minut (Tab. 3). Po uplynutí času byla mikrozkuhavka s denaturovaným vzorkem vyjmuta z termocykleru a vložena na led. Ve druhém kroku byla do mikrozkuhavky s denaturovaným vzorkem a první reakční směsí přidána druhá reakční směs (Tab. 4). Mikrozkuhavka byla vložena termocykleru. Směs byla zahřátá na teplotu 42°C po dobu 60 min a po té na teplotu 70°C na dobu 15 min.

Tabulka č. 3 Rozpis reakční směsi pro denaturaci

Položka	Objem
Oligo dT primer (50uM)	1ul
dNTP (10mM)	1ul
RNA	8ul
Celkový objem	10ul

Tabulka č. 4 Rozpis reakční směsi pro syntézu cDNA

Položka	Objem
5x PrimeScript buffer	4ul
Rnase Inhibitor (40U/ul)	0,5ul
PrimeScript Rtase (200U/ul)	1ul
Rnase-free water	4,5ul
Celkový objem	10ul

3.3.3. Genová exprese

Ke studiu exprese genů pro *ABPI* a *ABP4* pomocí metody PCR bylo použito specifických primerů pro jednotlivé geny. V tabulce č. 5 jsou uvedeny jednotlivé roztoky (reakční směs), které byly použity při PCR a v tabulce č. 6 je uveden program v termocykleru (DNA Engine, Peltier ThermalCycler, Bio-rad, Velká Británie). Program pro PCR byl stejný pro oba geny, také jednotlivé roztoky byly totožné, ale byly použity různé primery.

Pro *ABPI* byly použity primery:

F primer: 5'-CCG CAA AGC TAT GGG ATT-3'

R primer: 5'-CGA AGG GGA TTT CAG TAC CGC G-3'

Pro *ABP4* byly použity primery:

F primer: 5'-CAG CAG CGC AAC TAC GGG AGG-3'

R primer: 5'- AGT AGG GGA ATT TCA GCT TTG CA-3'

Tabulka č. 5 Složení reakční směsi pro PCR

Položka	Objem
5x My Taq buffer	4ul

F primer 10uM	0,5ul
R primer 10uM	0,5ul
My Taq Polymerase	0,1ul
Nuclease free - water	13ul
cDNA 1/10	2ul
Celkový objem	20ul

Tabulka č. 6 Časový rozpis kroků PCR

Teplota (°C)	Čas (min)	Počet cyklů
94°C	3min	1
94°C	30sec	25
60°C	30sec	
72°C	45sec	
72°C	5min	1
15°C	neomezeně	

3.3.4. Elektroforéza

Elektroforéza byla prováděna ve všech případech v 1,5% agarózovém gelu. Na přípravu středního gelu jsem používala 80 ml 0,5xTBE pufru, ve kterém jsem rozpustila 1,2g agarosy a přidala jsem 5 μ l barviva GelRed (Biotium, CA, USA). Gel jsem nechala vychladnout cca 30 min. Do mikrozkuumavek s reakční směsí jsem přidala 1 μ l 6x loading Dye pro zviditelnění vzorku. Do jamek jsem napipetovala 21 μ l směsi a vložila do elektroforetické vany s 0,5x TBE puftrem. Elektroforéza probíhala při 80 voltech přibližně 60 minut. Po elektroforéze byl pořízen snímek gelu na GelDoc™ EZ Imager, Bio-Rad) a intenzita signálu byla určena pomocí algoritmu ImageJ (Abramoff et al. 2004). Normalizace hodnot exprese byla provedena pomocí expresních hodnot provozního genu GAPDG (accession no. Zm3765). V směsi PCR pro gen GAPDG byla použita cDNA 10 krát naředěná. Expese genů ABP1 a ABP4 v mutantu elml pak byla vztažena k hodnotám exprese zjištěným u kontrolního genotypu WT.

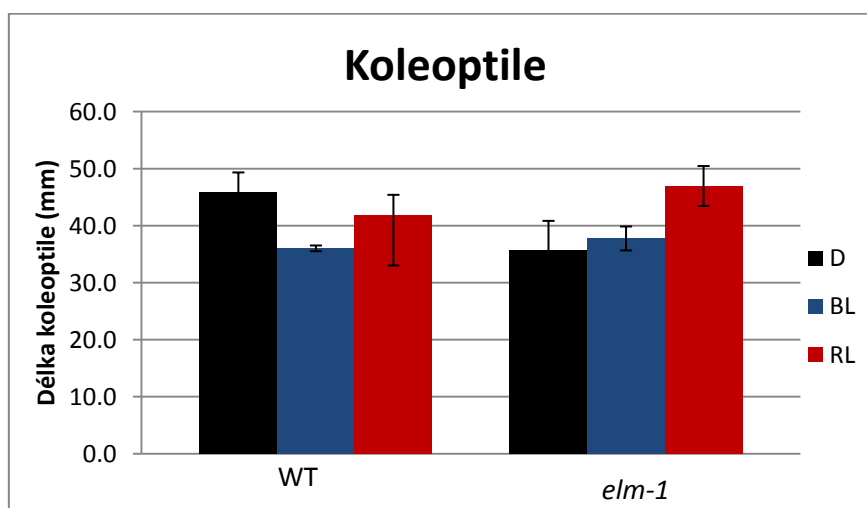
4. Výsledky

4.1. Růstové pokusy

Cílem růstových pokusů bylo zjistit, jak se fytochromy podílí na prodlužování jednotlivých částí rostliny, a to v závislosti na kvalitě světla. Cílem rovněž bylo potvrdit fenotypové znaky mutanta *elm-1*. Pro experimenty byla použita mutovaná rostlina kukuřice *elm-1*, která má mutaci v expresi genu pro syntézu chromoforu fytochromobilinu, které pohlcují červené světlo. V první části byly mutantní a kontrolní rostliny pěstovány při různé kvalitě světla, a to konkrétně na červeném a modrém světle, a ve tmě. Ze srovnání fenotypů kontrolní rostliny a mutanta by mělo být patrné, jak mutace v syntéze chromoforu ovlivňuje růst rostlin kukuřice. Pozorovala jsem rovněž, jak různé vlnové délky ovlivňují růst jednotlivých částí rostliny.

4.1.1. Vliv světla na růst koleoptile

V experimentech bylo zjištěno, že u kontrolní rostliny B73 (WT) modré světlo částečně inhibuje prodlužování koleptile, konkrétně asi o 21%. Na rozdíl od modrého světla, červené světlo nemělo na růst koleoptile žádný vliv (Obr.1). Mutovaná rostlina se vyznačovala tím, že ve tmě vytvářela mírně kratší koleoptili. Dále u mutantní rostliny nebyl dále pozorován vliv modrého světla na růst koleoptile, ale bylo zřejmé, že červené světlo růst koleoptile *elm-1* mírně stimulovalo (Obr.1).

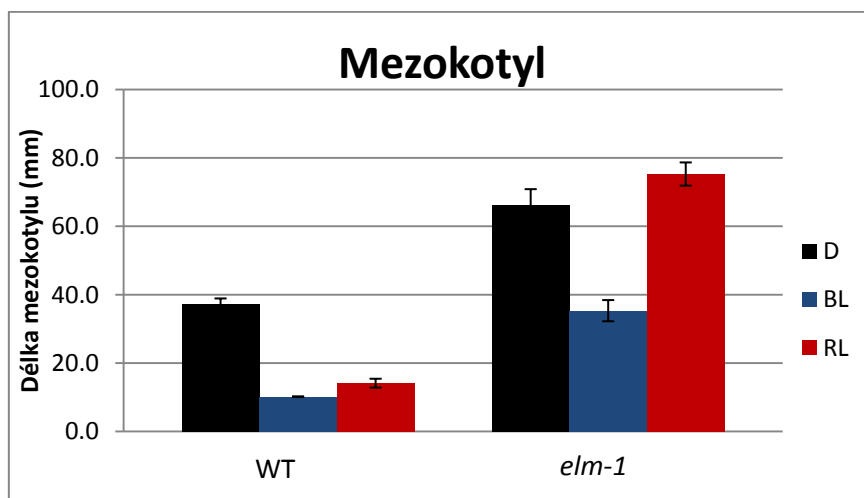


Obr. 1. Délka koleoptile *elm-1* a WT pěstovaných 7 dní při různé kvalitě světla.

Data ukazují průměrnou délku koleoptile + SE. Hodnoty byly vypočítány jako průměr z 5 na sobě nezávislých experimentů. V každém experimentu bylo na každé světelné podmínce změřeno průměrně 10 rostlin WT a 9 rostlin *elm-1*.

4.1.2. Vliv světla na růst mezokotyly

Je známo, že mezokotyl je velice citlivý na přísun světla. Pokud má světla dostatek, jeho prodlužování se výrazně zpomaluje, na rozdíl od rostlin rostoucích ve tmě, kdy je prodlužování výrazné. Na Obr. 2 je vidět, že v případě kontrolní rostliny má světlo, jak červené, tak modré, inhibiční vliv na růst mezokotyly. Červené světlo má asi 62% inhibiční účinek na růst mezokotyly, modré světlo mělo inhibiční účinek ještě větší, a to 73%. U mutantní rostliny *elm-1* nebyla inhibice růstu mezokotyly vlivem světla znatelná na červeném světle. V případě modrého světla byla inhibice růstu mezokotyly *elm-1* pozorována. Konkrétně, mezokotyl na modrém světle byl asi o 47% kratší než mezokotyl rostlin rostoucích ve tmě (Obr. 2). Je tedy zřejmé, že inhibice růstu mezokotyly vlivem světla je u mutantní rostliny nižší než u kontrolní rostliny. Na Obr. 2 lze rovněž vidět, že u rostlin rostoucích ve tmě je mezokotyl mutantu *elm-1* výrazně delší než mezokotyl WT.

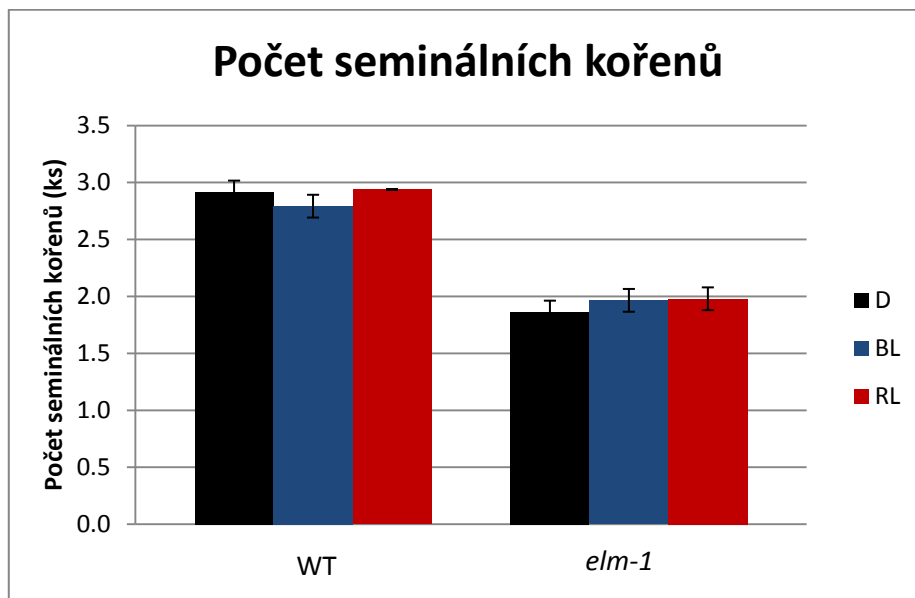


Obr. 2. Délka mezokotyly *elm-1* a WT pěstovaných 7 dní při různé kvalitě světla.

Data ukazují průměrné délky mezokotylů + SE, získané v 5 na sobě nezávislých experimentech. V každém experimentu bylo na každé světelné podmínce změřeno průměrně 10 rostlin WT a 9 rostlin *elm-1*.

4.1.3. Účinky světla na počet seminálních kořenů

U obou testovaných genotypů nemělo světlo zásadní vliv na počet seminálních kořenů (Obr.3). Zároveň je zřejmé, že u *elm-1* byl počet seminálních kořenů o třetinu nižší, oproti počtu pozorovanému u WT (Obr. 3).

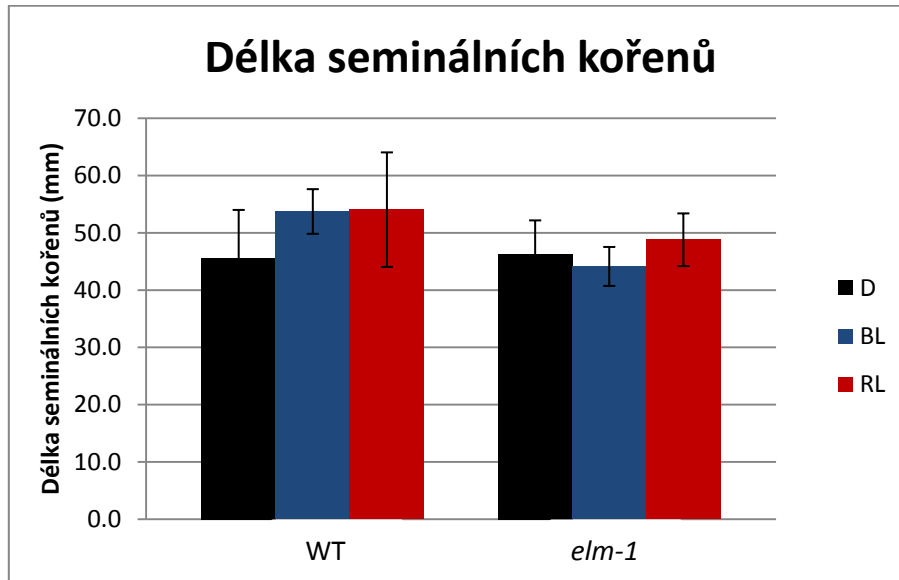


Obr. 3. Počet seminálních kořenů *elm-1* a WT pěstovaných 7 dní při různé kvalitě světla.

Data ukazují průměrný počet seminálních kořenů + SE. Hodnoty byly vypočítány jako průměr z 5 na sobě nezávislých experimentů. V každém experimentu bylo na každé světelné podmínce změřeno průměrně 10 rostlin WT a 9 rostlin *elm-1*.

4.1.4. Vliv světla na délku seminálních kořenů

Z grafu na Obr. 4 je zřejmé, že modré ani červené světlo nemělo výrazný vliv na délku seminálních kořenů, a to jak u kontrolní rostliny, tak u mutantní rostliny. Současně se ukázalo, že mutace *elm-1* nemá na délku seminálních kořenů vliv (Obr. 4).

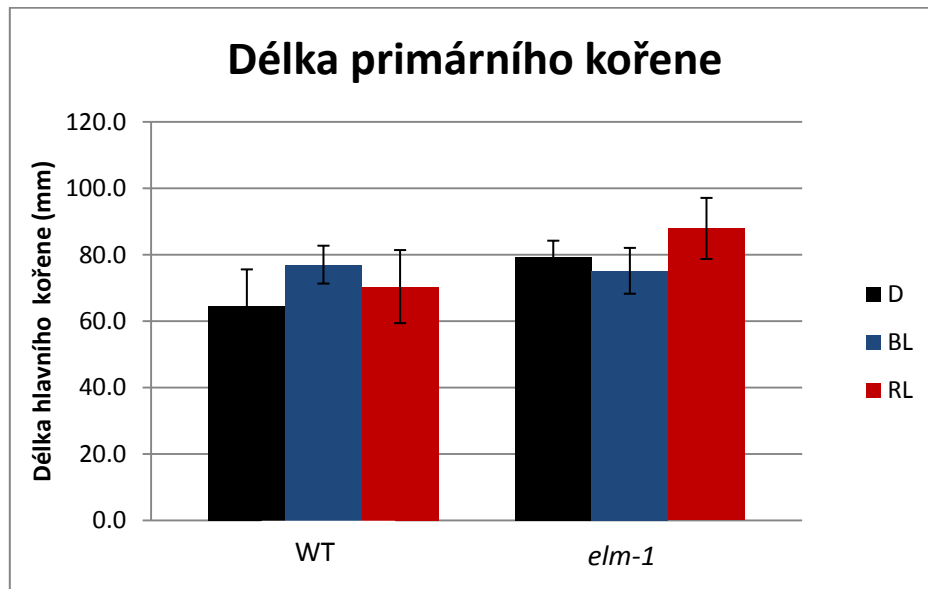


Obr. 4. Délka seminálních kořenů *elm-1* a WT pěstovaných 7 dní při různé kvalitě světla.

Data ukazují průměrnou délku seminálních kořenů + SE. Hodnoty byly vypočítány jako průměr z 5 na sobě nezávislých experimentů. V každém experimentu bylo na každé světelné podmínce změřeno průměrně 10 rostlin WT a 9 rostlin *elm-1*.

4.1.5. Vliv světla na délku primárního kořene

Na Obr. 5 je vidět, že WT i mutant *elm1* měly primární kořen podobné délky a dále je zřejmé, že kvalita světla neměla na délku hlavního kořene vliv, a to jak v případě kontrolní rostliny, tak mutanta *elm1*.



Obr. 5. Délka primárních kořenů *elm-1* a WT pěstovaných 7 dní při různé kvalitě světla.

Data ukazují průměrné délky primárních kořenů + SE, získané v 5 na sobě nezávislých experimentech. V každém experimentu bylo na každé světelné podmínce změřeno průměrně 10 rostlin WT a 9 rostlin *elm-1*.

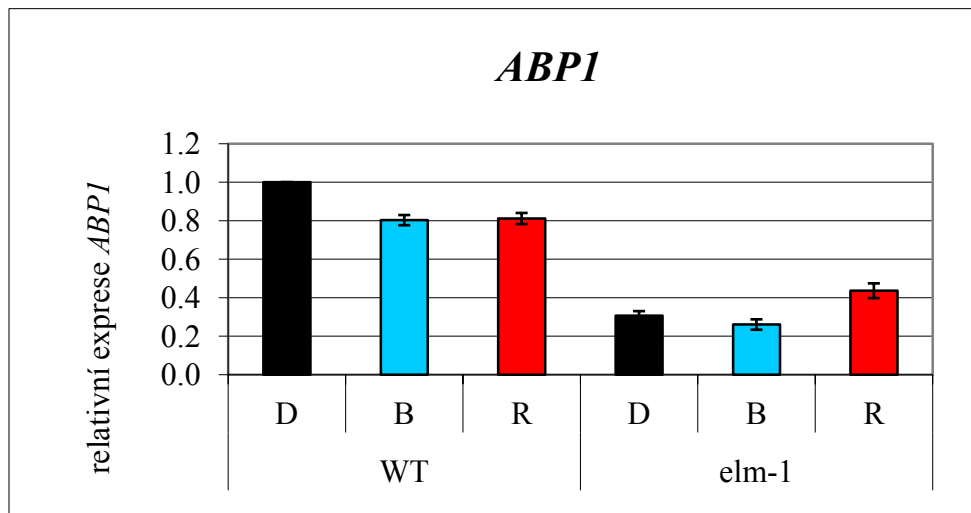
4.2. Expresní experimenty

Cílem expresních experimentů bylo zjistit, zda světelné signální dráhy zprostředkované chromofory ovlivňují auxinové signální dráhy zprostředkované auxin-binding proteiny. Prakticky bylo zjišťováno, zda mutace v syntéze chromoforu fytochromobilinu, tedy redukované množství funkčních fytochromů, má vliv na expresi genů *ABP1* a *ABP4*. K experimentu byl opět použit mutant kukuřice *elm-1*. Expres *ABP1* a *ABP4* byla studována v mezokotylech rostlin pěstovaných ve tmě, na modrém a červeném světle.

4.2.1. Vliv světla na expresi genu *ABP1*

Cílem tohoto experimentu bylo zjistit, zda světlo a fytochromy ovlivňují expresi genu *ABP1* v mezokotylu kukuřice. Na Obr. 6 je vidět, že mutace *elm-1* vedla k výraznému snížení

expresi genu *ABPI* (asi o 70% oproti kontrolní rostlině) v etiolovaných rostlinách. Dále je vidět, že u kontrolní rostliny, světlo (červené a modré) inhibuje expresi *ABPI*, a to o 20% u obou typů světla. U mutantní rostliny, byla exprese *ABPI* na modrém a červeném světle rovněž potlačena. Pokud však srovnáme citlivost WT a *elm1* ke světlu, co se týče exprese *ABPI*, je vidět, že modré světlo mělo u mutantu *elm1* na expresi *ABPI* jen nepatrný inhibiční vliv (oproti 20% u WT) a červené světlo naopak stimulovalo expresi (asi o 50%) (Obr. 6.)



Obr.6. Inhibice exprese *ABPI* v mezokotylu *elm-1* a WT pěstovaných 7 dní při různé kvalitě světla

Data ukazují relativní expresi *ABPI* v mezokotylu +SE. Hodnoty byly vypočítány jako průměr ze 3 nezávislých experimentů.

U kontrolní rostliny na modrém světle bylo použito 4-5 mezokotylů, u červeného světla bylo použito 3-4 mezokotylů a ve tmě byl použit jeden mezokotyl.

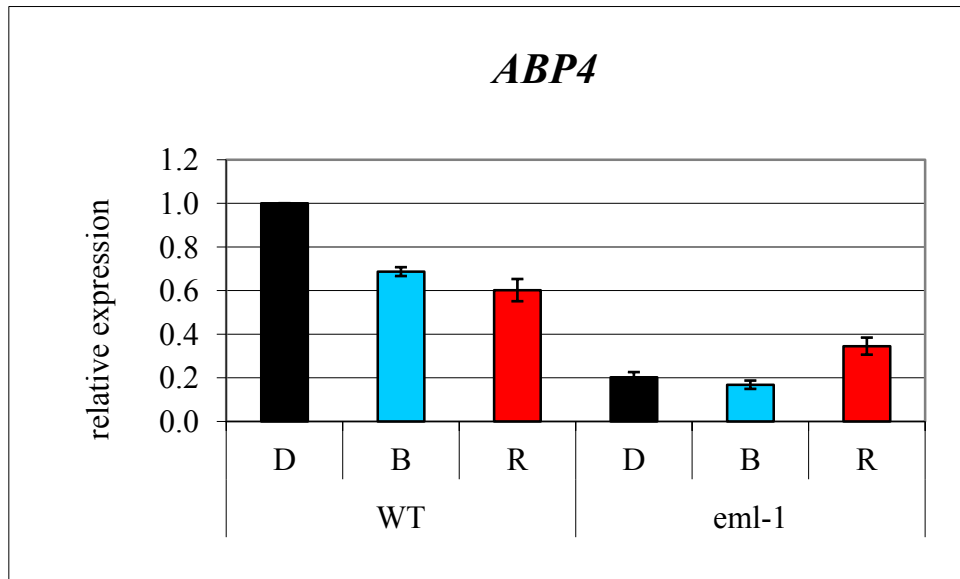
U mutantní rostliny na modrém světle bylo použito 4-5 mezokotylů, u červeného jeden mezokotyl a ve tmě byl také použit pouze jeden mezokotyl.

4.2.2. Vliv světla na expresi genu *ABP4*

Cílem experimentu bylo zjistit, zda světlo a fytochrom mají vliv na expresi genu *ABP4* v mezokotylu kukuřice. Z grafu na Obr. 7 je zřejmé, že, podobně jako v případě genu *ABPI*, byla exprese *ABP4* u mutantních rostlin *elm-1* rostoucích ve tmě asi o 80% nižší než u kontrolní rostliny WT. Je rovněž vidět, že v mezokotylech WT světlo redukovalo expresi *ABP4*. Modré světlo inhibovalo expresi asi o 32% a červené světlo o 40%. U mutantní

rostliny *elm-1* byla exprese *ABP4* na světle, podobně jako ve tmě, výrazně snížena oproti expresi pozorované u WT.

Avšak podobně jako v případě exprese genu *ABP1*, mutace *elm1* vedla k necitlivosti mezokotylu k inhibičnímu účinku modrého světla na expresi genu *ABP4*. Odlišně od WT, červené světlo neinhibovalo, ale naopak stimulovalo u *elm1* expresi *ABP4*, a to asi o 60% (Obr. 7).



Obr. 7 Inhibice exprese *ABP4* v mezokotylu *elm-1* a WT pěstovaných 7 dní při různé kvalitě světla

Data ukazují relativní expresi *ABP4* v mezokotylu +SE. Hodnoty byly vypočítány jako průměr ze 3 nezávislých experimentů.

U kontrolní rostliny na modrém světle bylo použito 4-5 mezokotylů, u červeného světla bylo použito 3-4 mezokotylů a ve tmě byl použit jeden mezokotyl.

U mutantní rostliny na modrém světle bylo použito 4-5 mezokotylů, u červeného jeden mezokotyl a ve tmě byl také použit pouze jeden mezokotyl.

5. Diskuze

V první experimentální části mé bakalářské práce jsem se zabývala tím, zda světlo a jeho percepce fytochromy mají vliv na růst jednotlivých částí mladých rostlin kukuřice. Použila jsem genetického přístupu, který spočíval v analýze mutantní rostliny kukuřice (*Zea mays L.*) *elm-1*. Tento typ mutanta nemá schopnost převést biliverdin IX α na 3Z-phytochromobilin a zabraňuje tedy syntéze aktivních fytochromů. Jako kontrolní rostlina byla použita semena kukuřice B-73. Cílem fyziologických experimentů bylo ověřit, jak světlo prostřednictvím fytochromů ovlivňuje prodlužování jednotlivých částí rostliny.

Pokusy byly prováděny ve tmě a na modrém a červeném světle. Z výsledků je patrné, že světlo inhibuje prodlužování nadzemní části rostliny B-73. Jednotlivé části rostlin jsou různě citlivé na světlo. Koleoptile je méně citlivé na světlo. Mezokotyl je část rostliny, která je nejvíce citlivá na světlo, proto pokud rostlina rostla na kontinuálním červeném nebo modrém světle, byl růst mezokotylu výrazně inhibován.

U mutantní rostliny byla inhibice koleoptile méně patrná než u WT. Růst mezokotylu byl u *elm-1* postižen mnohem více než růst koleoptile. Mutantní rostlina díky svému defektu ve vytváření aktivních fytochromů, nevnímá světlo v červeném a modrém spektru. Proto délka mezokotylu u mutantní rostliny na světle je stejná jako délka mezokotylu u kontrolních rostlin vzrostlých ve tmě. Inhibice růstu byla patrná u modrého světla, ale v porovnání s kontrolní rostlinou byla inhibice růstu vlivem modrého světla výrazně nižší. U modrého světla je přítomná inhibice růstu, přesto, že se nevytváří aktivní fytochromy, tento fakt je způsoben přítomností dalších fotoreceptorů, které vnímají modré světlo, jako je například kryptochromy, fototropiny či zeaxantiny. Proto jsem dospěla k názoru, že fytochromy mají vliv na délku mezokotylu a jejich nepřítomnost způsobuje růst.

Další hypotézou je samotný vliv světla na růst rostliny. Jak již bylo zmíněno, světlo inhibuje růst koleoptile i mezokotylu. Za prodlužování určitých částí rostliny je zodpovědný auxin, který je syntetizován ve špičce koleoptile a pomocí polárního transportu se dostává do dalších částí rostliny. Pokud se podíváme na růst kontrolní rostliny, zjistíme, že délka mezokotylu u rostlin vzrostlých ve tmě je větší, než u rostlin pěstovaných na světle. Což bylo potvrzeno na mutantní rostlině, kdy délka mezokotylu u rostliny pěstovaných na červené světle byla stejné délky jako u rostlin pěstovaných ve tmě. Což mě vede k závěru, že světlo má vliv na transport auxinu v rostlině.

V růstových experimentech nebyla měřena jen délka nadzemních částí rostlin, ale také délka kořenů a byl pozorován počet seminálních. Na délku hlavních a seminálních kořenů

nemělo světlo ani ztráta funkce fytochromu žádný vliv. Na počet seminálních kořenů světlo žádný vliv nemělo. Pokud však porovnáme kontrolní a mutantní rostlinu, dá se vyvodit závěr, že fytochrom stimuluje tvorbu (počet) seminálních kořenů.

na základě výsledků růstových experimentů jsem došla k závěru, že fytochromy negativně ovlivňují prodlužovací růst nadzemních částí rostlin, zejména prodlužování mezokotylu. Výsledky dále vedou k závěru, že na rozdíl od prodlužování nadzemních částí rostlin kukuřice, fytochrom není pravděpodobně zapojen v prodlužování kořenů (primárních i seminálních), ale je pravděpodobně zapojen v tvorbě seminálních kořenů, a to pozitivně.

Cílem mé bakalářské práce bylo zjistit, zda deficit ve vytváření aktivních fytochromů má vliv na expresi genů kódujících auxin-binding proteiny u kukuřice seté (*Zea mays L.*). V této práci jsem se zaměřila na expresi genů *ABP1* a *ABP4*. Výsledky experimentů ukázali, že u WT světlo inhibuje expresi genů *ABP1* i *ABP4*. U mutantní rostliny se exprese *ABP1* i *ABP4* snižovala v mezokotylech rostli pěstovaných jak ve tmě, tak na světle. Z těchto výsledků můžu vyvozovat, že mezi drahami, které vytváří aktivní fytochromy a dráhou, která řídí expresi *ABP1* a *ABP4* je určitý vzájemný vztah.

Z výsledků měření exprese genu *ABP1* a *ABP4*, které byli prováděni na kontrolní rostlině B-73 a mutantní rostlině *elm-1*, jsem došla k závěrům, že aktivní tvorba fytochromů má vliv na expresi genů *ABP1* i *ABP4*. Z toho tedy můžeme vyvozovat, že fytochromy hrají zásadní roli v míře exprese *ABP1* a *ABP4*. Jelikož exprese genů *ABP1* a *ABP4* nebyla zcela potlačena je pravděpodobné, že exprese auxin-binding proteinů je řízena i jinými cestami než přes aktivní fytochromy.

6. Závěr

Cílem mé bakalářské práce bylo zjistit, jak fytochromy a kvalita světla ovlivňují růst a vývoj rostliny a zda světlo prostřednictvím aktivních fytochromů má vliv na expresi auxin-binding proteinů. Experimenty byly prováděny na mutantní rostlině kukuřice seté (*Zea mays L.*) a kontrolní rostlině. Z výsledků mé experimentální části bakalářské práce je patrné, že u kontrolních rostlin B-73 světlo, a to jak modré tak i červené, značně inhibuje prodlužování nadzemní části rostliny, zejména mezokotylu. Fakt, že prodlužování mezokotylu mutantní rostliny *elm-1* nebylo inhibováno červeným světlem, vede k závěru, že červené světlo je prostřednictvím aktivních fytochromů zapojeno v inhibici prodlužování mezokotylu rostlin kukuřice.

Ve druhé části jsem měla za úkol zjistit, zda aktivní fytochromy mají vliv na expresi auxin-binding proteinů, a to konkrétně na *ABP1* a *ABP4*. Z výsledků je patrné, že pokud fytochromy chybí, tak se exprese *ABP1* i *ABP4* sníží, a to nezávisle na světle. To mě přivádí k závěru, že přítomnost fytochromů je nutná k expresi genů *ABP1* a *ABP4*. Výsledky však současně vedou k závěru, že u kukuřice modré a červené světlo hraje prostřednictvím fytochromů negativní úlohu v expresi auxin-binding proteinů u kukuřice. Výsledky mé bakalářské práce podporují jiná literární data, která ukazují, že v rostlinách kukuřice světelné signální dráhy a auxinová signalizace zprostředkovaná ABP jsou vzájemně propojeny.

7. Seznam použité literatury

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. *Plant cell* 20: 2746–2762

Castillon A., Shen H., Huq E. (2007) Phytochrome Interacting Factors: central players in phytochrome-mediated light signaling networks. *Trends in cell biology* 12: 514-21

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

Effendi Y., Rietz S., Fischer U., Scherer G.F. (2011) The heterozygous *abp1/ABP1* insertional mutant has defects in functions requiring polar auxin transport and in regulation of early auxin-regulated genes. *Plant journal* 65: 282-94

Effendi Y., Scherer G.F. (2011) Auxin binding-protein1 (ABP1), a receptor to regulate auxin transport and early auxin genes in an interlocking system with PIN proteins and the receptor TIR1. *Plant Signaling and Behaviour* 6: 1101-3

Fellner M., Borucka J. (2012) Auxin binding proteins ABP1 and ABP4 are involved in the lightand auxin-induced down-regulation of phytochrome gene PHYB in maize (*Zea mays* L.) mesocotyl. *Plant Growth Regul* 68: 503–509

Fellner, M., Ephritikhine, G., Barbier-Brygoo, H., and Guern, J. 1996. An antibody raised to a maize auxin-binding protein has inhibitory effects on cell division of tobacco mesophyll protoplasts. *Plant Physiology Biochemie* 34: 133–138.

Franklin K.A. (2009) Light and temperature signal crosstalk in plant development. *Current Opinion in Plant Biology* 12: 63-8

Gälweiler L., Guan C., Müller A., Wisman E., Mendgen K., Yephremov A., Palme K. (1998) Regulation of polar auxin transport by AtPIN1 in Arabidopsis vascular tissue. *Science* 282: 2226-30.

Hertel R., Thomson K.S., Russo V.E. (1972) In-vitro auxin binding to particulate cell fractions from corn coleoptiles. *Planta* 107: 325-40

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

Chen M., Chory J. (2011) Phytochrome signaling mechanisms and the control of plant development. *Trends in cell biology* 21: 664-71

Jones A.M., Lamerson P., Venis M.A. (1989) Comparison of Site I auxin binding and a 22-kilodalton auxin-binding protein in maize. *Planta* 179: 409-13.

Jones AM, Herman E (1993) KDEL-containing auxin-binding protein is secreted to the plasma membrane and cell wall. *Plant Physiology* 101:595–606

Jones AM, Im KH, Savka MA et al (1998) Auxin-dependent cell expansion mediated by overexpressed auxin-binding protein 1. *Science* 282:1114–1117

Jordan E.T., Marita J.M., Clough R.C., Vierstra R.D. (1997) Characterization of regions within the N-terminal 6-kilodalton domain of phytochrome A that modulate its biological activity. *Plant physiology* 115: 693-704

Korasick D. A., Enders T. A., and Strader L.C. (2013) Auxin biosynthesis and storage forms. *Journal of Experimental Botany* 64: 2541–2555.

Kurepin L.V., Emery R.J., Pharis R.P., Reid D.M. (2007) The interaction of light quality and irradiance with gibberellins, cytokinins and auxin in regulating growth of *Helianthus annuus* hypocotyls. *Plant, Cell and Environment* 30: 147-55

Leivar P., Quail P.H. (2011) PIFs: pivotal components in a cellular signaling hub. . *Trends in plant science* 16: 19-28

Li W.Z., Chinnappa C.C. (2004) Isolation and characterization of PHYC gene from *Stellaria longipes*: differential expression regulated by different red/far-red light ratios and photoperiods. *Planta* 220: 318-30

Lin Ch. (2002) Blue light receptors and signal transduction. *Plant cell* 14

Lin Ch., Shalitin D. (2003) Cryptochrome structure and signal transduction. *Annual Review Plant Biology* 54: 469-96

Lin Ch., Todo T., (2005) The cryptochromes. *Genome Biology* 6:220

Liu X, Cohen JD, Gardner G (2011) Low fluence red light increases the transport and biosynthesis of auxin. *Plant Physiology* 157:891–904

Liverman J.L., Bonner J. (1953) The Interaction of Auxin and Light in the Growth Responses of Plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 39: 905-16

Ljung K, Hull AK, Kowalczyk M, Marchant A, Celenza J, Cohen JD, Sandberg G. (2002) Biosynthesis, conjugation, catabolism and homeostasis of indole-3-acetic acid in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology* 50: 309–332

Ljung K., Bhalerao R. P., Sandberg G., (2001) Sites and homeostatic control of auxin biosynthesis in *Arabidopsis* during vegetative growth. *The Plant Journal* 28: 465-474

Nagatani A. (2010) Phytochrome: structural basis for its functions. *Current Opinion in Plant Biology* 13: 565-70

Nagy F., Schäfer E. (2002) Phytochromes control photomorphogenesis by differentially regulated, interacting signaling pathways in higher plants. *Annual Review of Plant Biology* 53: 329-55

Petrásek J., Friml J. (2009) Auxin transport routes in plant development. *Development* 136: 2675-88.

Pollmann S, Müller A, Piotrowski M, Weiler EW. (2002) Occurrence and formation of indole-3-acetamide in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 216: 155–161

Pollmann S, Neu D, Weiler EW. (2003) Molecular cloning and characterization of an amidase from *Arabidopsis thaliana* capable of converting indole-3-acetamide into the plant growth hormone, indole-3-acetic acid. *Phytochemistry* 62: 293–300

Publishers, USA

Quail P.H. (1997) The phytochromes: a biochemical mechanism of signaling in sight? *Bioessays* 19: 571-9

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

Sauer M., Kleine-Vehn J. (2011) AUXIN BINDING PROTEIN1: the outsider. *Plant cell* 23: 2033-43

Sawers R.J., Linley P.J., Farmer P.R., Hanley N.P., Costich D.E., Terry M.J., Brutnell T.P. (2002) Elongated *mesocotyl1*, a phytochrome-deficient mutant of maize. *Plant physiology* 130: 155-63

Shimomura S. (2006) Identification of a glycosylphosphatidylinositol-anchored plasma membrane protein interacting with the C-terminus of auxin-binding protein 1: a photoaffinity crosslinking study. *Plant molecular biology* 60: 663-77

Schäfer E., Nagy F., (2006) *Photomorphogenesis in Plants and Bacteria*, 3rd Edition, Springer, Netherlands

Scherer G.F. (2011) AUXIN-BINDING-PROTEIN1, the second auxin receptor: what is the significance of a two-receptor concept in plant signal transduction? *Journal of experimental botany* 62: 3339-57

Schwartz A., Zeiger E. (1984) Metabolic energy for stomatal opening. Roles of photophosphorylation and oxidative phosphorylation. *Planta* 161:129-136

Schwob E., Choi S.Y., Simmons C., Migliaccio F., Ilag L., Hesse T., Palme K., Söll D. (1993) Molecular analysis of three maize 22 kDa auxin-binding protein genes—transient promoter expression and regulatory regions. *Plant journal* 4: 423-32

Sineshchekov V.A. (2004) Phytochrome A: functional diversity and polymorphism. *Photochem Photobiol Science* 3: 596-607

Soy J., Leivar P., Monte E. (2014) PIF1 promotes phytochrome-regulated growth under photoperiodic conditions in Arabidopsis together with PIF3, PIF4, and PIF5. *Journal of experimental botany* 65: 2925-36

Sullivan J.A., Deng X.W. (2003) From seed to seed: the role of photoreceptors in Arabidopsis development. *Developmental biology* 260: 289-97

Swarup R., Friml J., Marchant A., Ljung K., Sandberg G., Palme K., Bennett M. (2001) Localization of the auxin permease AUX1 suggests two functionally distinct hormone transport pathways operate in the Arabidopsis root apex. *Genes and Development* 15: 2648-53.

Tomas A., Braun N., Muller P., Khodus T., Paponov I.A., Palme K., Ljung K., Lee J.Y., Benfey P., Murray J.A., Scheres B., Perrot-Rechenmann C. (2009) The AUXIN BINDING PROTEIN 1 is required for differential auxin responses mediating root growth. *PLoS One* 4: 6648

Tomas A., Paponov I., Perrot-Rechenmann C. (2010) AUXIN BINDING PROTEIN 1: functional and evolutionary aspects. *Trends in Plant science* 15: 436-46

Wagner D., Hoecker U., Quail P.H. (1997) RED1 is necessary for phytochrome B-mediated red light-specific signal transduction in Arabidopsis. *Plant cell* 9:731-43

Went, F. (1935). Auxin, the plant growth hormone. *Botany Review* 1: 162–182.

Woodward A. W. et Bartel B. (2005) Auxin: Regulation, Action, and Interaction. *Annals of Botany* 95: 707–735.

Zažímalová E., Krecek P., Skůpa P., Hoyerová K., Petrásek J. (2007) Polar transport of the plant hormone auxin - the role of PIN-FORMED (PIN) proteins. *Cellular and molecular life sciences* 64: 1621-37.

Zeiger E., Taiz L., (2006) Plant Physiology, 4th Edition, Sinauer Associates, Inc., Publishers, USA

Zeiger E., Taiz L., (2006) Plant Physiology, 4th Edition, Sinauer Associates, Inc.,

8. Seznam použitých zkratek

ABP1	auxin-binding protein 1
ABP4	auxin-binding protein 4
AUX1	Auxin transporter protein 1
BL	blue light (modré světlo)
cdna	komplementární DNA
CRY1	krytochrom 1
CRY2	krytochrom 2
D	tma
<i>Elm-1</i>	<i>elongated mezocotyl1</i>
FAD	flavin adenin dinukleotid
IAA	indol-3octová kyseliny
IAM	indol-3-acetamid
IPA	kyselina indol-3-pyrohroznová
MS medium	Murashige a Skoog médium
PCR	polymerázová řetězová reakce
Pfr forma	fytochromu absorbující far-red (aktivní)
phot1	blue-light receptor phototropin 1
PHOT1	fototropin 1
PHOT2	fototropin 2
PHY A-E	fytochrom A-E
PIN1	auxin efflux carrier component 1
Pr forma	fytochromu absorbující červené světlo (neaktivní)
RL	red light (červené světlo)
TIR1	protein TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE 1
WT	Wild type