

**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI**

**Přírodovědecká fakulta**

**Laboratoř růstových regulátorů UP a AV ČR**



**Interakce světelných signálních drah a auxinové signalizace  
prostřednictvím auxin-binding proteinů v růstu a vývoji rostlin  
kukuřice**

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

Autor:	<b>Barošová Kateřina</b>
Studijní program:	N1501 Fyziologie rostlin
Studijní obor:	Fyziologie rostlin
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	<b>prof. RNDr. Martin Fellner, Ph.D.</b>
Termín odevzdání práce:	2018

## Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Kateřina Barošová
Název práce	Interakce světelných signálních drah a auxinové signalizace prostřednictvím auxin-binding proteinů v růstu a vývoji rostlin kukuřice
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Laboratoř růstový regulátorů
Vedoucí práce	prof. RNDr. Martin Fellner, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2018
Abstrakt	<p>Teoretická část diplomové práce je věnována obecné charakteristice rostlinných hormonů auxinů a jejich interakce se světelnými signálními dráhami. Je zde shrnuta problematika Auxin-Binding Proteinů (ABP) a jejich možného zapojení do vývoje a růstu kukuřice (<i>Zea mays</i> L.). Praktická část je zaměřena na studium účinků NAA a 2,4-D auxinu v prodlužovacím růstu rostlin kukuřice v závislosti na odlišné kvalitě světla – tma, modré a červené světlo. Dále byla sledována exprese genů <i>ABP1</i> a <i>ABP4</i> v koleoptilech a mezokotylech rostlin ve tmě a na červeném světle v přítomnosti auxinu NAA.</p>
Klíčová slova	auxin, auxin-binding protein, růst, světlo, kukuřice, <i>Zea</i>
Počet stran	56
Počet příloh	0
Jazyk	Český

## **Bibliographical identification**

Author's first name and surname	Kateřina Barošová
Title of thesis	Interaction of light and auxin signaling via auxin-binding proteins in growth and development of maize
Type of thesis	Master
Department	Laboratory of Growth Regulators
Supervisor	prof. RNDr. Martin Fellner, Ph.D.
The year of presentation	2018
Abstract	<p>The theoretical part of the diploma thesis is focused on general characterization of plant hormones auxins and their interaction with light signaling. An issue of Auxin-Binding Proteins (ABPs) and their possible involvement in growth and development of corn (<i>Zea mays</i> L.) has been summarized.</p> <p>The experimental part is focused on study of NAA and 2,4-D auxin effects on elongation growth of the corn as a function of light quality – dark, blue and red light. Expression of <i>ABP1</i> and <i>ABP4</i> gene expression in plant coleoptiles and mesocotyls in the dark and the red light and in presence of auxin NAA was investigated.</p>
Keywords	auxin, auxin-binding protein, growth, light, maize, <i>Zea</i>
Number of pages	56
Number of appendices	0
Language	Czech

Prohlašuji, že jsem předloženou diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením prof. RNDr. Martina Fellnera, Ph.D. s použitím citované literatury.

V Olomouci dne

.....

podpis

Na tomto místě bych ráda poděkovala mému vedoucímu prof. RNDr. Martinu Fellnerovi, Ph.D. za odborné vedení, vstřícný přístup a věcné rady. Poděkování také patří Mgr. Marcele Žaludové za její čas, ochotu a pomoc při práci v laboratoři.

# OBSAH

<b>SEZNAM ZKRATEK .....</b>	<b>8</b>
<b>ÚVOD.....</b>	<b>9</b>
<b>TEORETICKÁ ČÁST .....</b>	<b>10</b>
1. Auxiny.....	10
1.1. Syntéza auxinu .....	11
1.2. Transport auxinu .....	12
1.3. Signální dráha auxinu.....	13
2. Auxin-binding proteiny .....	14
2.1. ABP1 .....	14
2.2. ABP4 .....	16
3. Světlo .....	17
3.1. Receptory modrého světla.....	17
3.1.1. Kryptochromy .....	17
3.1.2. Fototropiny.....	18
3.2. Receptory červeného světla .....	19
3.2.1. Fytochromy .....	19
3.3. Světelné a auxinové interakce.....	20
<b>EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....</b>	<b>22</b>
4. Rostlinný materiál .....	22
5. Růstové experimenty.....	22
5.1. Příprava živného média.....	22
5.2. Sterilizace a výsev semen .....	22
6. Studium genové exprese .....	23
6.1. Izolace RNA a syntéza cDNA .....	23
6.2. Genová exprese .....	24
<b>VÝSLEDKY .....</b>	<b>27</b>
7. Výsledky růstových experimentů.....	27
7.1. Vliv tmy a množství auxinu NAA na délku koleoptile.....	27
7.2. Vliv modrého světla a množství NAA na délku koleoptile .....	28
7.3. Vliv červeného světla a množství NAA na délku koleoptile .....	29
7.4. Vliv tmy a množství NAA na délku mezokotylu.....	30
7.5. Vliv modrého světla a množství NAA na délku mezokotylu .....	31

7.6.	Vliv červeného světla a množství NAA na délku mezokotylu .....	33
7.7.	Vliv tmy a množství 2,4-D na délku koleoptile .....	34
7.8.	Vliv modrého světla a množství 2,4-D na délku koleoptile.....	35
7.9.	Vliv červeného světla a množství 2,4-D na délku koleoptile .....	36
7.10.	Vliv tmy a množství 2,4-D na délku mezokotylu .....	37
7.11.	Vliv modrého světla a množství 2,4-D na délku mezokotylu.....	38
7.12.	Vliv červeného světla a množství 2,4-D na délku mezokotylu.....	39
8.	Výsledky exprese <i>ABP</i> genů .....	40
8.1.	Vliv světla a auxinu NAA na expresi <i>ABP1</i> a <i>ABP4</i> v koleoptilech kukuřice .....	40
8.2.	Vliv světla a auxinu NAA na expresi <i>ABP1</i> a <i>ABP4</i> v mezokotylech kukuřice.....	41
	<b>DISKUZE</b> .....	43
	<b>ZÁVĚR</b> .....	46
	<b>POUŽITÁ LITERATURA</b> .....	47

## SEZNAM ZKRATEK

2,4-D	2,4-D-dichlorfenoxyoctová kyselina ( <i>2,4-dichlorophenoxyacetic acid</i> )
ABP1	<i>Auxin-Binding Protein 1</i>
ABP4	<i>Auxin-Binding Protein 4</i>
cDNA	komplementární DNA ( <i>complementary DNA</i> )
CRY	krytochrom ( <i>cryptochrome</i> )
<i>elm-1</i>	<i>elongated mesocotyl 1</i>
FW	čerstvá váha ( <i>fresh weight</i> )
MS médium	Murashige and Skoog médium
NAA	kyselina 1-naftyloctová ( <i>1-Naphthaleneacetic acid</i> )
PAT	polární auxinový transport ( <i>polar auxin transport</i> )
PCR	polymerázová řetězová reakce ( <i>polymerase chain reaction</i> )
Pfr	fytochrom absorbující v dlouhovlnnou červenou oblast spektra ( <i>far-red-absorbing form</i> )
PHY	PHY doména chromoforu ( <i>phy-specific</i> )
PUB	3E-fytochromobilin
Pr	fytochrom absorbující červenou oblast spektra ( <i>red-absorbing form</i> )
UV-A	ultrafialové záření A ( <i>ultraviolet A</i> )
WT	kontrolní rostlina ( <i>wild type</i> )



## ÚVOD

Růst a vývoj rostlin je závislý na několika faktorech. Prvním z nich je světlo, které rostliny využívají jako zdroj energie, a také jako signál k fotomorfogenezi. Významný podíl mají hormony auxiny, které v rostlinách zastávají mnoho funkcí a jsou proto nepostradatelné. Jednou z těchto funkcí je například regulace prodlužovacího růstu rostlin, která je závislá na kvalitě světla. Právě světlo dokáže regulovat hladinu endogenního auxinu v buňkách, jeho transport a pravděpodobně množství auxinových receptorů. Na rozdíl od endogenních auxinů, které stimulují růst rostlin, exogenní auxiny růst intaktních rostlin inhibují. Významnou roli lze připsat i auxinovým receptorům (ABP, *auxin-binding protein*), které mohou být zapojeny v auxinové a světelné signalizaci u rostlin kukuřice. Doposud bylo u kukuřice identifikováno pět ABP, nicméně ne všechny jejich funkce a interakce byly objasněny.

Teoretická část této diplomové práce obsahuje doposud získané poznatky z oblasti problematiky světla a jeho interakcí s rostlinnými hormony auxiny. Stručně je zde rozebrána problematika ABP proteinů. Obecným cílem experimentální práce bylo zjistit, jak světlo prostřednictvím fytochromů ovlivňuje auxinem-regulovaný růst rostlin a zda v tomto procesu hrají úlohu auxinové receptory ABP1 a ABP4.

Diplomová práce byla vypracována na Přírodovědecké fakultě UP v Olomouci v Laboratoři růstových regulátorů a konkrétně ve Skupině molekulární fyziologie.

# TEORETICKÁ ČÁST

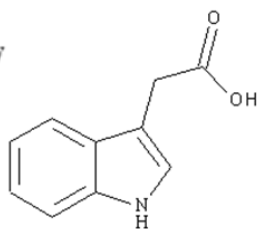
## 1. Auxiny

Auxin byl první rostlinný hormon, který byl kdy studován. K jeho objevu přispěl již samotný Darwin, jenž pozoroval efekt hypotetické substance transportující se rostlinou a podporující její růst za světlem (Darwin, 1880). Od té doby však uplynulo dalších 60 let výzkumu, než byla tato chemická látka izolována a analyzována jako indol-3-octová kyselina (IAA) (*Obr. 1*), neboli hlavní přirozeně se vyskytující auxin v rostlinách (Haagen-Smit a kol., 1946).

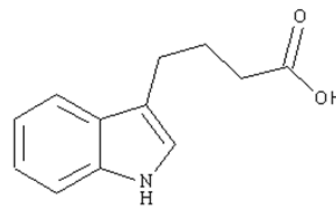
Auxin je klíčová signální molekula ovlivňující téměř všechny aspekty rostlinného vývoje od opylení a oplození, přes vegetativní vývoj až ke stádiu kvetení. Reguluje jak buněčné dělení, tak i prodlužování a diferenciaci pletiv v závislosti na jeho vyskytující se koncentraci (Jones a kol., 2013). Auxiny interagují i s ostatními rostlinnými hormony. Nejznámější je vztah mezi auxiny a cytokininy, který indukuje vývoj stonku a kořenového systému (Skoog a Miller, 1957).

V největší míře se v rostlinách vyskytuje IAA, ale jsou zde přítomny i další sloučeniny jako kyselina indol-3-máselná (IBA), kyselina 4-chlorindol-3-octová (4-Cl-IAA) a nebo kyselina fenylloctová (PAA), která na rozdíl od ostatních není indolového typu (*Obr. 1*). Kromě těchto přirozeně se vyskytujících auxinů, existují i auxiny syntetické. Ty jsou vzhledem k jednoduchosti své molekuly lehce připravitelné a dostupné. Jsou jimi kyselina 1-naftalenoctová (NAA) anebo kyselina 2,4-dichlorfenoxyoctová (2,4-D) (*Obr. 1*), která je používána jako herbicid (Taiz a Zeiger, 2010).

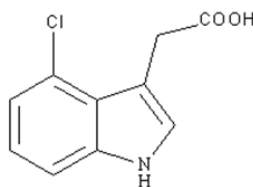
Přirozeně se vyskytující auxiny



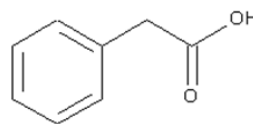
IAA



IBA

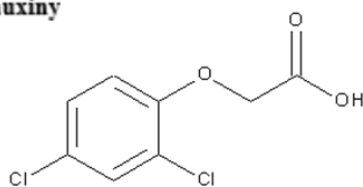


4-Cl-IAA

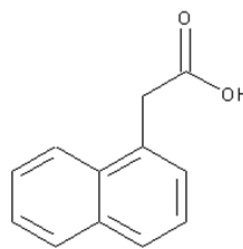


PAA

Syntetické auxiny



2,4-D



NAA

Obr. 1: Struktury molekul přirozeně se vyskytujících a syntetických auxinů.

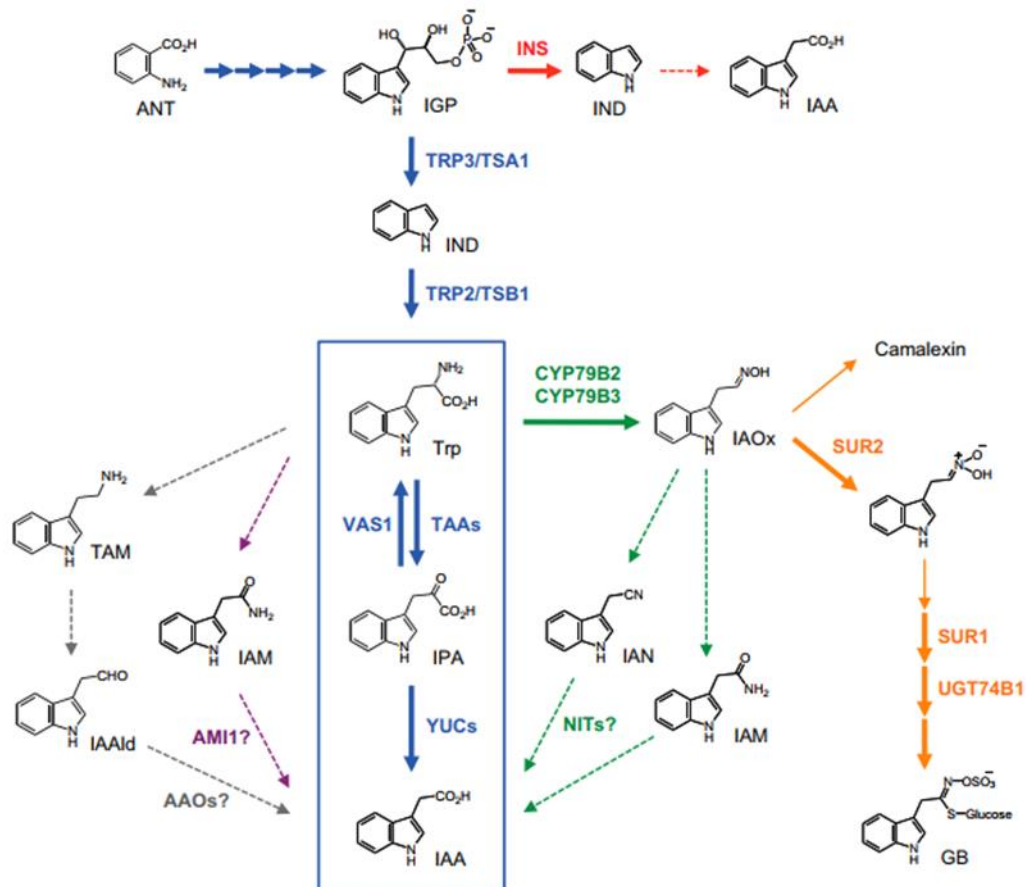
### 1.1. Syntéza auxinu

I přesto, že je IAA nejdůležitější přirozeně se vyskytující auxin, není jeho biosyntéza v rostlinách doposud zcela objasněná (Kasahara, 2016). Výzkum na rostlině *Arabidopsis thaliana* ukázal, že IAA může být syntetizována v listech, dělohách a kořenech, kdy nejmladší části rostliny mají největší biosyntetickou aktivitu (Ljung a kol., 2001).

Dlouhou dobu se předpokládalo, že IAA vzniká dvěma hlavními cestami: na tryptofanu (Trp) závislou a na tryptofanu nezávislou cestou (Woodward a Bartel 2005). Wang a kol. (2015) přišel s objevem, jenž naznačuje, že dráha trp-nezávislá není stěžejní pro syntézu IAA, ale je důležitá pro tvorbu cytozolické indol syntázy, která reguluje ranou embryogenezi u vyšších rostlin.

Jak již vyplývá z názvu dráhy, u trp-závislé dráhy je základním prekurzorem L-tryptofan, ze kterého může IAA vznikat čtyřmi možnými způsoby, a to indol-3-acetamidovou dráhou (IAM), dráhou kyseliny indol-3-pyrocetové (IPA), tryptaminovou dráhou (TAM), a indol-3-acetaldoximovou dráhou (IAOX) (Obr. 2) (Mano a Nemoto, 2012).

Většina syntetizované IAA vzniká především IPA dráhou ve dvou-krokové reakci. Trp je tryptofan aminotransferázou (TAA) převeden na kyselinu indol-3-pyrrohroznovou, ze které se za přítomnosti yucca (YUC) enzymů s monooxygenázovou aktivitou stává výchozí produkt IAA (Mashiguchi a kol., 2011). Nejnovější výzkumy rovněž naznačují, že TAA a YUC rodiny hrají zásadní roli v biosyntéze IAA napříč různými rostlinnými druhy jako je *Arabidopsis*, kukuřice, rýže či játrovky (Kasahara, 2016).



Obr. 2: Schéma syntézy IAA u *Arabidopsis* (převzato z Kasahara, 2016). IPA dráha je zvýrazněna modře, IAOx dráha zeleně, IAM dráha fialově a TAM dráha šedě. Trp-nezávislá dráha je naznačena červeně.

## 1.2. Transport auxinu

Transport auxinu je zprostředkován kombinací dvou drah. Jedná se o transport na dlouhé vzdálenosti, při kterém je auxin pomocí floému pasivně přepraven z místa svého vzniku, tedy z apikálních meristémů, skrz stonkové cévní svazky až ke kořenům (Rashotte a kol., 2003; Ljung a kol., 2005). Druhým typem je transport polární (PAT), který působí jen na krátké vzdálenosti. Auxin je přenášén z buňky do buňky skrze specifické přenašeče (Petrášek a kol., 2006). Auxinové přenašeče jsou u rostlin seskupeny do tří hlavních

proteinových rodin (Grones a Friml, 2015). Jako první lze označit PIN (PIN FORMED) proteiny společně s proteiny PILS (PIN-LIKES), které jsou přítomny v plasmatické membráně a zastávají funkci auxinových exportérů (Petrášek a kol., 2006; Wisniewska a kol., 2006). Obdobně fungují fosfoglykoproteiny (PGP), které taktéž transportují auxin z buňky ven (*efflux*). Zároveň ale u nich bylo prokázáno, že některé PGP mohou zprostředkovávat i reverzibilní transport auxinu (Yang a Murphy, 2009). Další rodinou přenašečů jsou AUX1/LAX (AUXIN1/LIKE AUX1) proteiny, které jsou především odpovědné za transport auxinu z apoplastu do cytoplazmy (*influx*) (Swarup a kol., 2001).

Rozdílně jsou dovnitř buněk a ven transportovány auxiny NAA, IAA a 2,4D. NAA pro transport do buňky využívá difuzi přes plasmatickou membránu, kdežto přesun 2,4D a IAA probíhá pomocí AUX proteinů (Delbarre a kol., 1996; Morris, 2000). Odlišně je tomu i při efluxu auxinů z buňky, kdy IAA a NAA používají PIN transportéry (Palme a Gälweiler, 1999), zatímco 2,4D se hromadí v buňce, neboť není schopen tuto cestu využít (Delbarre a kol., 1996).

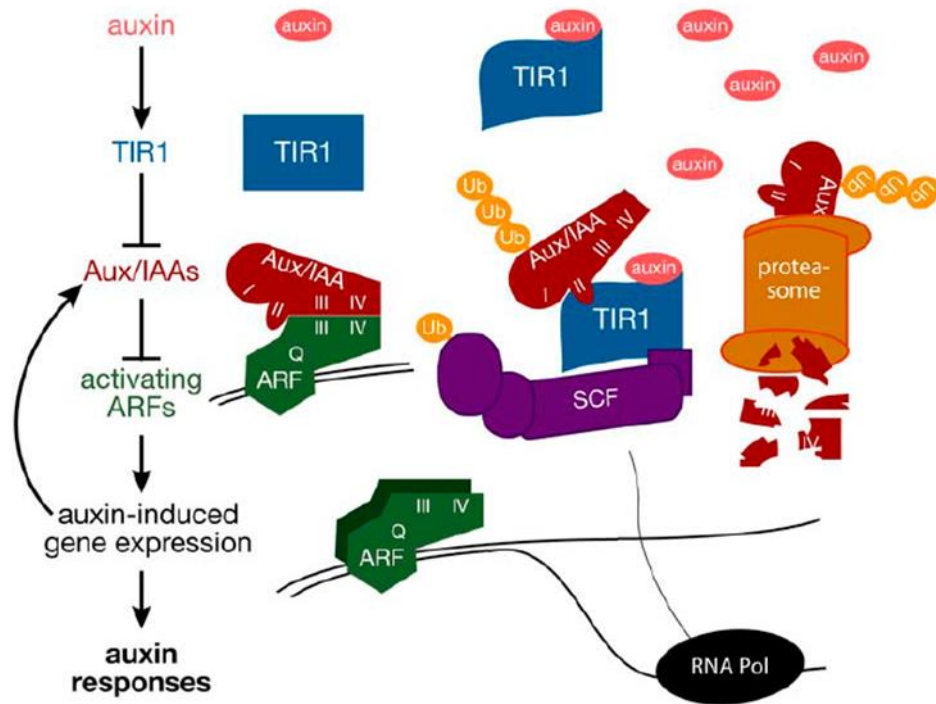
### 1.3. Signální dráha auxinu

V posledních 10 letech byly díky intenzivním studiím prováděným na rostlině *A. thaliana* a dalších rostlinných druzích identifikovány signální dráhy, které jsou zprostředkovány přes tři hlavní receptory vnímající auxin (Wang a Estelle, 2014). Lze je rozdělit na receptory genomické, vyskytující se v jádře, a negenomické, které jsou mimo jádro.

Receptory přítomné v jádře jsou TIR1/AFB (Transport Inhibitor Resistant1/Auxin Signaling F-Box (Dharmasiri a kol., 2005a; Kepinski a Leyser 2005; Calderón-Villalobosa a kol., 2012) a SKP2A (S-Phase Kinase-Associated Protein 2A) (Jurado a kol., 2010). Třetím receptorem je auxin-binding protein 1 (ABP1) (Hertel a kol., 1972), který se vyskytuje především v endoplasmatickém retikulu (ER) a v malém množství i v apoplastu (Grones a Friml, 2015).

Nejlépe popsaná signální dráha auxinu je prostřednictvím TIR1/AFB receptoru (*Obr. 3*), kdy se auxin váže na F-box doménu tohoto proteinu. Jestliže je auxinu v buňce málo, represor Aux/IAA společně s ko-represorem TOPLESS (TPL) jsou v pevné vazbě s transkripčními faktory ARF a potlačují jejich aktivitu (Szemenyei a kol., 2008). Zvýšená hladina auxinu podporuje ubikvitinizaci a degradaci Aux/IAA pomocí SCF<sup>TIR1/AFB</sup> ubikvitin E3-ligázového komplexu (Salehin a kol., 2015). Odstraněním represoru se uvolní ARF proteiny, které poté spolu dimerizují, a aktivuje se exprese cílových genů

(Korasick a kol., 2014; Nanao a kol., 2014). Míra degradace je závislá na hladině přítomného auxinu a je zcela klíčová v auxinové signalizaci (Zenser a kol., 2001).



Obr. 3: Model auxinové signální dráhy skrz TIR1-ARF receptor (převzato z Woodward a Bartel, 2005).

## 2. Auxin-binding proteiny

Auxin-binding proteiny neboli proteiny vázající auxin jsou stále považovány za receptory, i když to někteří vědci zpochybňují (viz níže). Doposud byla u kukuřice pozornost věnována především proteinu ABP1. Nicméně již byly objeveny minimálně další čtyři příbuzné ABP proteiny jejichž role v růstu a vývoji rostlin zatím zůstává neznámá (Hesse a kol., 1989).

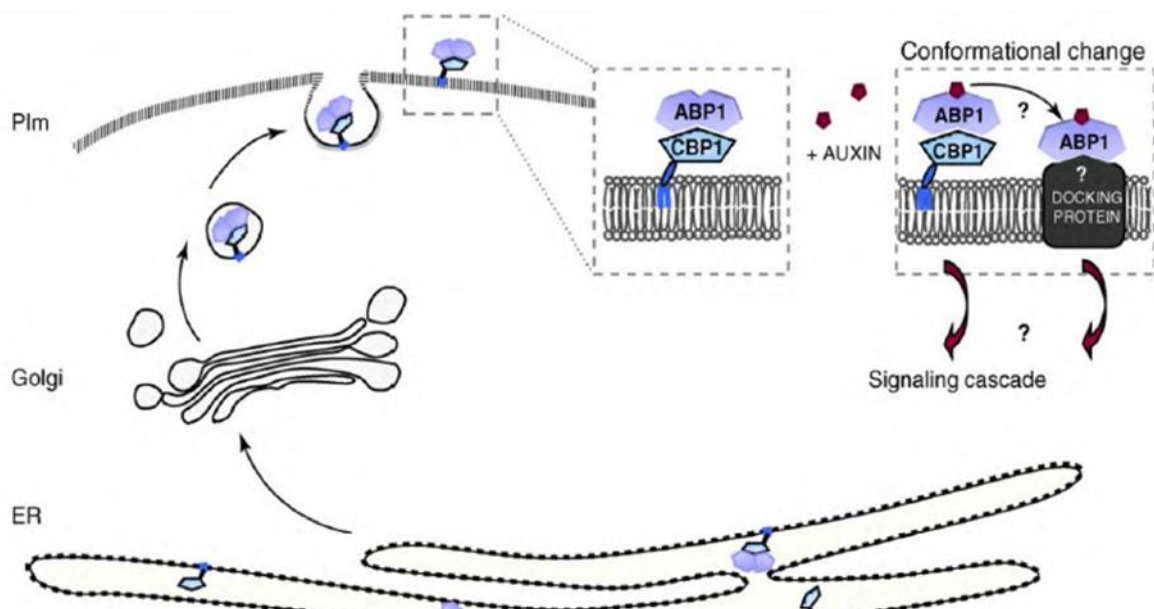
### 2.1. ABP1

Auxin-binding protein 1 (ABP1) je jedním z prvních charakterizovaných proteinů, který váže auxin (Hertel a kol., 1972). Byl detekován v membránových frakcích etiolovaných koleoptilí kukuřice (*Zea mays L.*) za pomoci radioizotopově značeného auxinu.

Jedná se o 22 kDa rozpustný glykoprotein vyskytující se v zelených rostlinách. V roztoku je přítomen jako dimer (Shimomura a kol., 1986) a vykazuje submikromolární afinitu k auxinu (Löbler a Klämbt, 1985). Strukturně je složen z dvou antiparalelních  $\beta$ -listů s jelly roll barelovým motivem. Uvnitř barelu se nachází hydrofobní kov-vazebné

místo proteinu, do kterého se auxin váže. Kovem může být zinek (Zn-II) či měď (Cu-II). Jakmile se do aktivního místa dostane auxin, dojde k vazbě jeho karboxylové skupiny na zinek a připojení aromatického kruhu k hydrofobním zbytkům uvnitř barelu. Poté dochází k vyvolání fyziologické odpovědi auxinu (Woo a kol., 2002).

ABP1 se skládá z N-terminálního signálního peptidu, jehož sekvence se liší mezi ostatními ABP, a C-terminálního konce, který nese tetrapeptidovou signální sekvenci KDEL (lysin, kyselina asparagová, kyselina glutamová, leucin). KDEL slouží jako retenční signál a udržuje ABP1 neustále v lumenu endoplasmatického retikula (ER). Nicméně i přesto je malé množství tohoto proteinu sekretováno do apoplastu a lokalizováno na vnější straně plasmatické membrány (plm) (Hess a kol., 1989; Jones a Herman, 1993). Jelikož ABP1 ve své struktuře neobsahuje transmembránovou doménu, kterou by se ukotvoval na membráně, dochází pravděpodobně k interakci jeho C-terminálního konce s dalším proteinem, jenž překrývá původní KDEL ER-retenční motiv. Očekává se, že tímto proteinem by mohl být již identifikovaný CBP1 (C-terminal Binding Protein 1), ale bohužel tento předpoklad stále nebyl plně potvrzen. Zároveň se nevyklučuje zapojení třetí komponenty umožňující vazbu na plm po navázání auxinu k ABP1 (*Obr. 4*) (Tomas a kol., 2010).



*Obr. 4:* Pravděpodobný mechanismus vazby ABP1 na plasmatickou membránu pomocí CBP1 proteinu (převzato z Tomas a kol., 2010).

Výzkum ABP1 započal přibližně před 40 lety, za tu dobu bylo publikováno mnoho článků ohledně jeho funkcí a zapojení do vývoje a růstu rostlin. Předpokládalo se, že je esenciální téměř pro všechny aspekty rostlinného růstu a vývoje, včetně buněčného dělení a embryogeneze (Chen a kol., 2001), postembryonálního vývoje stonku a kořene (Braun a kol., 2008), prodlužování hypokotylu (Effendi a kol., 2013), reorganizace cytoskeletu (Robert a kol., 2010), polární auxinového transportu (Chen a kol., 2014), kontroly doby kvetení (Effendi a kol., 2011) a vývoje květu (Braun a kol., 2008).

Analýzy ukázaly, že v genomu *A. thaliana* je pouze jediný gen kódující protein ABP1. Od roku 2000 bylo vytvořeno a používáno několik různých knock-outovaných linií a specifických mutantů u *A. thaliana* pro určení funkcí a mechanismu působení ABP1 v rostlinách. Jednalo se o T-DNA inzertní mutanty *abp1-1* a *abp1-1s*, mutanta *abp1-5* obsahující mutaci ve vazebném místě proteinu, tři knock-outované linie (*abp1-AS*, SS12K, SS12S) a over-exprimované linie ABP1 (Strader a Zhao, 2016). V roce 2015 Gao a kol. publikovali článek, jenž zpochybňuje veškeré doposud získané výsledky prováděné na výše zmíněných mutantních rostlinách. Za pomoci metody CRISPR/Cas9 (Clustered Regularly-Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR associated protein 9) vyrobili mutanta *abp1-c1* a prokázali, že ABP1 není potřebný pro auxinovou signalizaci ani pro vývoj *A. thaliana*.

Veškerý vytvořený genetický materiál byl proto re-analizován a jeho nepřesnosti objasněny. Například u *abp1-1* a *abp1-1s mutantů* došlo k chybě, kdy byla kromě genu ABP1 také narušena funkce vedlejšího genu BSM (Dai a kol., 2015). U *abp1-5* se při sekvenování genomu vyskytlo více než 8 000 polymorfizmů mezi ním a mateřskou linií *A. thaliana*. Tato různorodost naznačuje nepřesnosti v křížení rostlin (Xu a kol., 2010).

Vzhledem k těmto novým faktům, je potřeba se vrátit zpátky na začátek a znovu přezkoumat funkce a mechanismus působení ABP1 v rostlinách (Strader a Zhao, 2016).

## 2.2. ABP4

Auxin-binding protein 4 (ABP4) je další homolog z rodiny ER*abp* genů, které byly identifikovány v rostlinách kukuřice seté (*Zea mays* L.) (Hesse a kol., 1989). ABP4 je strukturně velmi podobný ABP1, liší pouze několika aminokyselinami. Rozdíl mezi těmito proteiny je ovšem v jejich afinitě k auxinu, která je u ABP1 výrazně vyšší. Odlišnosti jsou patrné taktéž v expresi jednotlivých genů, kdy je *ABP1* exprimován ve vysokých hladinách téměř ve všech pletivech, zatímco exprese *ABP4* je nižší a dochází k ní především v listech a koleoptilech rostlin, u kořenů je minimální (Schwob a kol., 1993).



Im a kol. (2000) prováděli výzkum na mutantní rostlině *abp4*, která měla defekt v *ABP4* genu. Etiolovaný *abp4* mutant vykazoval 7x vyšší hladinu *ABP1* než WT, z čehož vyplývá, že vyřazení *ABP4* genu aktivuje expresi *ABP1*. Zároveň byla exprese *ABP4* up-regulovaná světlem. Na předchozí výzkum navázali Fellner a kol., kteří došli k hypotéze, že *ABP4* může zastávat funkci negativního regulátoru prodlužovacího růstu u kukuřice (Fellner a kol., 2006; Jurišič-Knežev a kol., 2012).

### 3. Světlo

Světlo je pro rostliny životně důležitým faktorem. Nejen že pohání fotosyntézu, ze které rostliny získávají potřebnou energii, ale slouží i jako signál regulující jejich růst a vývoj. Rostliny vyvinuly sofistikované světlené receptory a signální dráhy, jež detekují světlo a následně reagují na změny intenzity, doby ozařování a spektrální kvality světla. Světlo je vnímáno různými typy receptorů v závislosti na vlnové délce světla (Tian a Reed, 2001).

#### 3.1. Receptory modrého světla

Receptory absorbující v oblasti modrého a ultrafialového světla jsou kryptochromy a fototropiny (Christie a kol., 2015). Příslušnými reakcemi ke světlu mohou být reakce velmi rychlé, například změny v potenciálu plazmatické membrány buněk, nebo pomalé, jako jsou inhibice prodlužování hypokotylu, fototropismus, otevírání průduchů a střídání cirkadiálních rytmů. Biochemické a molekulární odpovědi spouští změny v redoxních reakcích, elektronovém transportu a expresi genů. (Jones a kol., 2013).

##### 3.1.1. Kryptochromy

Kryptochromy (CRY) jsou fotosenzitivní receptory vnímající v oblasti 320–500 nm a UV-A. Nejlépe jsou prostudovány u rostliny *A. thaliana*, jejíž genom kóduje tři kryptochromové geny – *CRY1*, *CRY2* a *CRY3*. Fotoreceptory *CRY1* a *CRY2* působí primárně v jádře (Wu a Spalding, 2007), kdežto *CRY3* v chloroplastech a mitochondriích (Kleine a kol., 2003). Rovněž se liší jejich stabilita. *CRY1* protein je na modrém světle stabilní, kdežto *CRY2* na světle (modrém, zeleném a UV-A) podléhá rychlé proteolýze (Ahmad a kol., 1998).

*CRY* geny jsou tvořeny 70–80 kDa proteinem, který ve svém aktivním stavu dimerizuje. Skládá se ze dvou domén, N-terminální PHR (Photolyase-Homologous Region) a C-terminální CCE (Cryptochrome C-terminal Extension) domény. Na PHR se nekovalentně váže chromofor flavin adenin dinukleotid (FAD) a pravděpodobně i druhý

chromofor pterin metyltetrahydrofolát (MTHF) (Liu a kol., 2011). Název PHR domény je odvozen od bakteriálního reparačního enzymu DNA-fotolyázy, se kterým kryptochromy sice sdílí některé strukturní podobnosti, ale nevykazují žádnou fotolyázovou aktivitu (Thompson a Sancar, 2002).

Pro fotoaktivaci a dimerizaci kryptochromu je nutná fosforylace, na které se podílí některé protein kinázy (CK1.3 a CK1.4). Fosforylace CRY je intenzivně studována především na savčích buňkách, u kterých již bylo identifikováno pět protein kináz a minimálně devět serinových reziduí, která jsou fosforylována. I přestože byla fosforylace objevena jako první u CRY2 u *A. thaliana*, není doposud plně objasněna (Liu a kol., 2017).

### 3.1.2. Fototropiny

Fototropiny, stejně jako kryptochromy, absorbují v modré a ultrafialové oblasti světla. Jak již naznačuje jejich název, byly objeveny skrze studium fototropismu u rostliny *A. thaliana*. Pomocí analýzy mutantu *nph1* (*nonphototropic hypocotyl 1*), který nepodléhá fototropismu, byly identifikovány dva fototropické geny *PHOT1* a *PHOT2* (Christie a kol., 1999). Jak *Phot1*, tak *Phot2* jsou z větší části lokalizovány na plazmatické membráně (Sakamoto a Briggs, 2002), ale nejsou integrálními proteiny. Nedávný výzkum (Kong a kol., 2013b) naznačuje, že jsou umístěny na vnější straně membrány chloroplastu, což odpovídá jejich schopnosti regulovat pohyb chloroplastů v závislosti na světle.

Fototropinový protein tvoří serin/threonin kinázová doména na C-terminálním konci a dvě specializované LOV domény (LOV1 a LOV2) na N-terminálním konci. Funkcí těchto domén je vazba kofaktoru FMN (flavin mononukleotid), který slouží jako chromofor (Christie a kol., 2015). Ve tmě dochází k represí fototropinové kinázové aktivity interakcí s  $J\alpha$ -helixem. Jakmile FMN začne absorbovat modré světlo, dojde k uvolnění vazby  $J\alpha$ -helixu a aktivaci C-terminální kinázy. Spouští se proces autofosforylace a spuštění fototropinové signalizace (Nash a kol., 2008).

## 3.2. Receptory červeného světla

### 3.2.1. Fytochromy

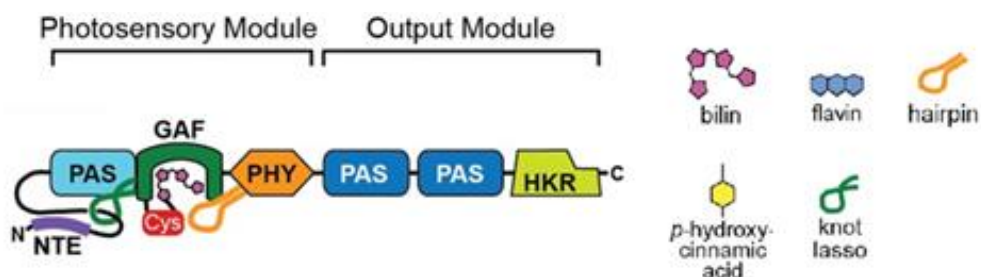
Fytochromy jsou rostlinné receptory, které existují ve dvou fotoreverzibilních formách. Pr neaktivní forma (phytochrome red light) absorbuje v červené oblasti spektra ( $\lambda=660$  nm) a Pfr aktivní forma (phytochrome far-red light), která absorbuje světlo v dlouhovlnné červené oblasti spektra ( $\lambda=730$  nm) (Jones a kol., 2013).

#### Molekulární struktura fytochromů

Fytochrom je homodimerický komplex o molekulové hmotnosti cca 250 kDa (Jones a kol., 2013). Každá jednotka komplexu je složena z apoproteinu, který kovalentně váže fotoreaktivní prostetickou skupinu 3E-fytochromobilin (PUB).

Strukturně je fytochromobilin lineární tetrapyrrol, jehož prekurzorem je hem. Syntéza začíná v chloroplastech, poté je exportován do cytosolu, kde se pomocí thioesterové vazby váže k cysteinovému reziduu apoproteinu (Taiz a Zeiger, 2010). Prostetická skupina fytochromu je vázaná k proteinu N-terminální fotosenzitivní doménou (PSM), která váže bilin a je spojena s C-terminální regulační oblastí (OPM). OPM podporuje dimerizaci komplexu a předpokládá se, že vede světelný signál (Rockwell a kol., 2006).

PSM obsahuje PAS (period/arnt/single-minded) doménu s doposud neznámou funkcí, GAF (cGMP phosphodiesterase/adenylyl cyclase/FhlA) doménu s bilin-lyázovou aktivitou, která váže bilin, a PHY (phy-specific) doménu, která stabilizuje fotoaktivovanou Pfr formu (Obr. 5). V protisměru od PAS domény je N-terminální prodloužení (NTE), které je specifické pro izoformy fytochromů různých rostlinných druhů. NTE je rovněž důležité pro stabilitu Pfr formy a signalizaci, a může být negativně ovlivněno fosforylací dané oblasti (Cherry a kol., 1992; Nito a kol., 2013).



Obr. 5: Struktura fytochromu (převzato a upraveno z Burgie a Vierstra, 2014).

PSM a OPM oblasti jsou od sebe odděleny pomocí pantu (Taiz a Zeiger, 2010). OPM zahrnuje dvě za sebou jdoucí PAS domény, zprostředkovávající dimerizaci fytochromu, ve kterých se nachází i dvě jaderné lokalizační sekvence (NLSs). C-terminální konec je zakončen HKR doménou (histidine kinase-related domain).

Rostlinné fytochromy jsou kódovány rodinou genů *PHY* a mají rozdílné biochemické vlastnosti. U kukuřice je rodina genů složena ze šesti fytochromů: *PHYA1*, *PHYA2*, *PHYB1*, *PHYB2*, *PHYC1* a *PHYC2*. Všech těchto šest typů fytochromů je exprimováno jen v několika rostlinných pletivech semen, zatímco fytochromy *PHYA1*, *PHYB1* a *PHYC1* jsou exprimovány ve všech. Rovněž bylo zjištěno, že u etiolovaných semen byla vyšší hladina exprese *PHYA* a *PHYB* než u rostlin vystavených světlu (Sheehan a kol., 2004). Do exprese *PHYB* u etiolovaných mezokotylů kukuřice jsou pozitivně zapojeny geny *ABP1* a *ABP4*. Tyto výsledky dokládají existenci auxinové a světelné komunikace (Bořucká a Fellner, 2012). Expese *PHYC* není světlem ovlivňována (Sheehan a kol., 2004).

### **Fotokonverze fytochromu**

Fytochrom lze charakterizovat jako světlem regulovanou serin/threonin protein kinázu schopnou autofosforylace (Shin a kol., 2016). Ve tmě nebo u etiolovaných rostlin se fytochrom vyskytuje jako holoprotein v cytosolu, kde dochází k dimerizaci, a tvoří se ve své neaktivní formě (Pr). Při ozáření červeným světlem, dochází ke změně izomerie v molekule fytochrombilinu, fotokonverzi z Pr formy do Pfr aktivní formy fytochromu (Nagatani, 2010). Fototransformace mezi těmito dvěma formami indukuje signální síť, kdy je za pomoci NLSs řízen transport fytochromu do jádra. V jádře Pfr interaguje s transkripčními faktory PIF1-7 (phytochrome-interacting factors 1-7), což vede k fosforylaci a následně i degradaci PIF prostřednictvím 26S proteazomu. Všechny tyto reakce umožňují rychlou regulaci genové exprese v odpovědi na změny světelných podmínek (Shin a kol., 2016).

### **3.3. Světelné a auxinové interakce**

Světlo ovlivňuje růst a vývoj rostlin v odpovědi na pravidelné změny vnějšího prostředí (Halliday a Fankhauser 2003). Světlo výrazně moduluje auxinový systém, kontroluje množství auxinu, jeho transport a reakce, stejně tak jako rozložení auxinu v rostlině (Salisbury a kol., 2007). Etiolované rostliny *Arabidopsis* auxin zcela postrádají, zatímco světlo u mladých vyvíjejících se listů aktivuje jeho syntézu (Bhalerao a kol., 2002). Auxin

je poté transportován do nižších částí rostliny a vzniká auxinový gradient (Grieneisen a kol., 2007).

Existuje několik hypotéz, které objasňují vztah auxinů ve světle indukované inhibici růstu. Jednou z nich je ovlivnění hladiny přítomných auxinů v buňkách. Bylo prokázáno, že červené světlo inhibuje biosyntézu IAA v kukuřičných koleoptilích (Iino, 1982a,b; Nishimura a kol., 2006). Taktéž se ukázalo, že toto světlo snižuje hladinu auxinu v koleoptilech a mezokotylech kukuřice, hrachových epikotylech a internodách (Jones a kol., 1991; Behringer a Davis 1992; Barker-Bridges a kol., 1998; Fellner a kol., 2006; Kurepin a kol., 2007a; Sorce a kol., 2008). Studie prováděné na *phyA* a *phyB* mutantních rostlinách rajčete poté potvrdily, že hladina IAA je regulována skrze fotoreceptory PHYA a PHYB (Kraepiel a Miginiac 1997). Nagashima a kol. (2008) publikoval výsledky ukazující, že CRY1 a CRY2 aktivované modrým světlem taktéž snižují hladinu IAA v semenáčcích. Výsledky genomických a fyziologických testů naznačují, že modré světlo prostřednictvím CRY1 ovlivňuje expresi genů, potlačujících prodlužování hypokotylu tím, že inhibují hladinu auxinu (Folta a kol., 2003).

Další hypotéza předpokládá, že světlo redukuje intenzitu polárního auxinového transportu (PAT) (Huisinga, 1967; Naqvi, 1975; Iino, 1982a,b; Fellner a kol., 2003), což alespoň částečně může mít za následek inhibici prodlužování hypokotylu (Jensen a Veierskov, 1998). Je známo, že PAT je závislý na polární lokalizaci PIN proteinů, jejichž umístění se mění v odpovědi na auxin (Paciorek a kol., 2005; Sauer a kol., 2006). Současně také víme, že množství transkriptů PIN3 a PIN7 proteinů je určitým způsobem regulováno skrze fytochromy (Devlin a kol., 2003). Fytochromy mohou řídit transport auxinu buď změnou jeho hladiny, nebo výše zmíněnou změnou buněčné lokalizace PIN proteinů. Regulace PAT skrze modré světlo může vést k ovlivnění exprese genu *LeEXT* (expanzinu), který hraje roli v procesech prodlužování hypokotylu (Pédron a kol., 2004).

Významnou roli ve světle regulovaném růstu by taktéž mohl zastávat ABP1 protein. Jones a kol. (1991) publikovali, že množství tohoto proteinu a také volného IAA v rostlinách pěstovaných na červeném světle, způsobilo výraznou inhibici prodlužování mezokotylu. V kontrastu s tímto tvrzením, jak již bylo zmíněno výše, exprese *ABP4* v mezokotylech kukuřice byla červeným světlem zvýšena (Fellner a kol., 2006).

## EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

### 4. Rostlinný materiál

K experimentům byla použita zrna inbrední linie kukuřice seté (*Zea mays* L.) B73 a od ní odvezená mutantní linie *elm-1* (*elongated mesocotyl 1*). Tento mutant má defekt v genu kódujícím fytochromobilin syntázu, obsahuje tak snížené množství chromoforu 3E-fytochromobilin a nevnímá světlo v červené oblasti spektra. Semena mutantů byla laskavě poskytnuta Thomasem P. Brutnellem (Cornell University, Ithaca, NY).

### 5. Růstové experimenty

#### 5.1. Příprava živného média

Všechny experimenty byly prováděny na pevném MS médiu (Murashige and Skoog, 1962). Do Erlenmayerovy baňky byly nality 3 l destilované vody a za stálého míchání bylo přidáno 40 g sacharózy (Lachner); 17,3 g MS média (Caisson Labs, MSP01-50LT) a 780,8 mg MES pufru (Sigma-Aldrich). Roztok byl doplněn destilovanou vodou na objem 4 l. Po rozpuštění všech složek média bylo upraveno pH pomocí 1M hydroxidu draselného na 6,1. Takto připravené médium bylo postupně rozlito do 10 zásobních lahví po 400 ml. Do každé lahve bylo přidáno 2,8 g (0,7%) fytoagaru (Duchefa Biochemie BV). Médium bylo sterilizováno v autoklávu, přičemž došlo k poklesu pH média na 5,7. Láhve se sterilním médiem byly uchovávány v lednici.

#### 5.2. Sterilizace a výsev semen

Zrna obou genotypů kukuřice byla povrchově sterilizována v laminárním boxu v plastových zkumavkách. Nejdříve byla ponořena 3 minuty v roztoku 70% ethanolu. Ten byl následně odlit a zrna propláchnuta sterilizovanou destilovanou vodou. Následně byla zrna ponechána po dobu 30 minut v roztoku 2,8% NaOCl s kapkou Tween20 (Sigma-Aldrich). Po uplynutí této doby byl roztok odlit a zrna 5–6× promyta sterilní destilovanou vodou.

Pomocí pinzety, sterilizované v 96% roztoku ethanolu a ožehnuté v plamenu, byla zrna vyseta na médium do růstových Magenta boxů (6 semen do každého boxu). Každý box obsahoval 60 ml média buď bez nebo s přísadkou syntetického auxinu NAA nebo 2,4-D v koncentracích 0,  $10^{-5}$ ,  $5 \cdot 10^{-5}$  a  $10^{-6}$  mol/l. Po vysetí semen byly boxy uzavřeny a vloženy do růstových komor (Microclima 1000, Snijders Scientific B.V., The Netherlands)

s kontinuálním modrým či červeným. Zdrojem modrého světla byla trubice Philips TLD-36W/18-Blue (Philips USA) s maximální ozářeností  $10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  při 440 nm. Zdrojem červeného světla byly trubice Philips TLD-36 W/15-Red (Philips, USA) s maximální ozářeností  $10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  při 660 nm. Pro kultivaci ve tmě byly misky s rostlinkami zabaleny do alobalu a umístěny do stejné růstové komory. Boxy pro experimenty ve tmě byly obaleny alobalem a taktéž vloženy do růstové komory. Po 4 dnech inkubace při 23 °C byla označena zrna, která vyklíčila. Inkubace pokračovala další 3 dny. Po 7 dnech byly boxy vytáhnuty z růstových komor a vyklíčené rostliny kukuřice změřeny pravítkem s přesností na 1 mm. Měřila se délka koleoptile, mezokotylu, počet a délka seminálních kořenů a délka primárního kořene.

Z naměřených hodnot délek koleoptilí, mezokotylů a kořenů byl rovněž počítán inhibiční účinek auxinů na růst těchto orgánů. Hodnoty procentuální inhibice byly vypočítány podle následujícího vzorce:

$$\% \text{ inhibice} = \frac{a-b}{a} \times 100\% ,$$

kde  $a$  = hodnota délky koleoptile při koncentraci auxinu 0 mol/l,  $b$  = hodnota délky koleoptile při určité koncentraci auxinu.

## 6. Studium genové exprese

Pro studium genové exprese genů *ABP1* a *ABP4* proteinů u koleoptile a mezokotylu kukuřice byly použity rostliny B73 a *elm-1*. Tyto rostliny byly pěstovány výše uvedenými způsoby (Kap. 5) ve tmě a na červeném světle bez a s přidavkem 100  $\mu\text{M}$  NAA. Jako metoda byla použita semi-kvantitativní PCR (polymerázová řetězová reakce). Vyhodnocení intenzity signálu se provádělo v programu ImageJ. Exprese každého vzorku byla vztažena ke kontrolnímu housekeeping genu *18S*, jehož exprese byla definována jako 1. Výsledky ze tří na sobě nezávislých experimentů byly zprůměrovány a byla stanovena standardní chyba. Výsledky byly vyneseny do grafu (Viz výsledky).

### 6.1. Izolace RNA a syntéza cDNA

Pět dnů po vysetí rostlin byly koleoptile a mezokotylы kukuřice za daných světelných podmínek (červené světlo; tma – zelené světlo) sklizeny. Rostlinné části byly zváženy (100–200 mg FW) a okamžitě zamrazeny v tekutém dusíku. Ve sterilní třecí misce s kapalným dusíkem byly důkladně rozdrceny tloučkem. Samotná extrakce RNA byla

provedena dle instrukcí výrobce Isolate II RNA Plant Kitu (Bioline). Čistota izolované RNA byla ověřena pomocí Nanodropu One C (Thermo Scientific). Po izolaci RNA byly vzorky vystaveny působení Dnasy I. Postup byl opět převzat od výrobce z Isolate II RNA Plant Kitu (Bioline). Výsledná koncentrace a čistota izolované RNA byly změřeny Nanodropem.

Syntéza cDNA byla prováděna pomocí sady Prime Script 1st strand cDNA synthesis kitu (Takara cat. no. 6110A, KRD). V *Tab. 1* je uvedeno složení jednotlivých použitých reakčních směsí.

*Tabulka. 1:* Složení jednotlivých reakčních směsí pro denaturaci a pro syntézu cDNA

Směs pro denaturaci		Směs pro syntézu cDNA	
Položka	Objem	Položka	Objem
Oligo dT primer (50 $\mu$ M)	1 $\mu$ l	5x PrimeScript buffer	4 $\mu$ l
dNTP (10 mM)	1 $\mu$ l	Rnase Inhibitor (40U/ $\mu$ l)	0,5 $\mu$ l
RNA	8 $\mu$ l	PrimeScript Rtase (200U/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
		H <sub>2</sub> O	4,5 $\mu$ l
Objem reakce	10 $\mu$ l	Objem reakce	10 $\mu$ l

## 6.2. Genová exprese

Pro stanovení intenzity exprese genů *ABP1* a *ABP4* byly použity specifické primery, jejichž sekvence je uvedena v tabulce 2. Pro pozitivní kontrolu byly použity primery pro gen *18S*. Složení PCR reakční směsi je uvedeno v tabulce 3. Celkový objem reakce byl 20  $\mu$ l. Připravené vzorky byly vloženy do termocykléru (Bio-Rad) a byl nastaven příslušný protokol pro jednotlivé primery (*Tab. 4 a 5*).



Tabulka 2: Sekvence použitých primerů.

Primer	Sekvence primeru	Velikost produktu
<i>ABP1-F</i>	5'-CCG CAA AGC AGC TAT GGG ATT-3'	430 bp
<i>ABP1-R</i>	5'-CGA AGG GGA TTT CAG TAC CGC G-3'	
<i>ABP4-F</i>	5'-CAG CAG CGC AAC TAC GGG AGG-3'	430 bp
<i>ABP4-R</i>	5'-AGT AGG GGA ATT TCA GCT TTG CA-3'	
<i>18S-F</i>	5'-ACG AAC AAC TGC GAA AGC-3'	100 bp
<i>18S-R</i>	5'-CGG CAT CGT TTA TGG TGG-3'	

Tabulka 3: Složení PCR reakční směsi pro 1 vzorek.

Položka	Objem
5x My Taq buffer	4 $\mu$ l
F primer 10 $\mu$ M	0,5 $\mu$ l
R primer 10 $\mu$ M	0,5 $\mu$ l
My Taq Polymerase	0,1 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	13 $\mu$ l
cDNA 1/5	2 $\mu$ l
Objem reakce	20,1 $\mu$ l

Tabulka 4: PCR protokol pro geny *ABP1* a *ABP4*.

Krok	Teplota [°C]	Čas	Počet cyklů
počáteční denaturace	94	3 min	-
denaturace	94	30 sec	25× pro <i>ABP1</i>
hybridizace	60	30 sec	
elongace	72	45 sec	28× pro <i>ABP4</i>
konečná elongace	72	5 min	-

Tabulka 5: PCR protokol pro 18S.

<b>Krok</b>	<b>Teplota [°C]</b>	<b>Čas</b>	<b>Počet cyklů</b>
počáteční denaturace	94	3 min	-
denaturace	94	30 sec	
hybridizace	55	45 sec	22×
elongace	72	30 sec	
konečná elongace	72	5 min	-

Vzorky byly obarveny 6x Loading Dye (1 $\mu$ l) a rozděleny na 1,5% agarózovém gelu (1,2 g agarózy rozpuštěno v 80 ml 0,5 $\times$  TBE pufri) obarveným 5 $\mu$ l GelRed. Elektroforéza probíhala přibližně 45 minut při 80 A a 300mV. Po dokončení byl pořízen snímek gelu (Syngene) a změřena intenzita signálu v programu ImageJ.

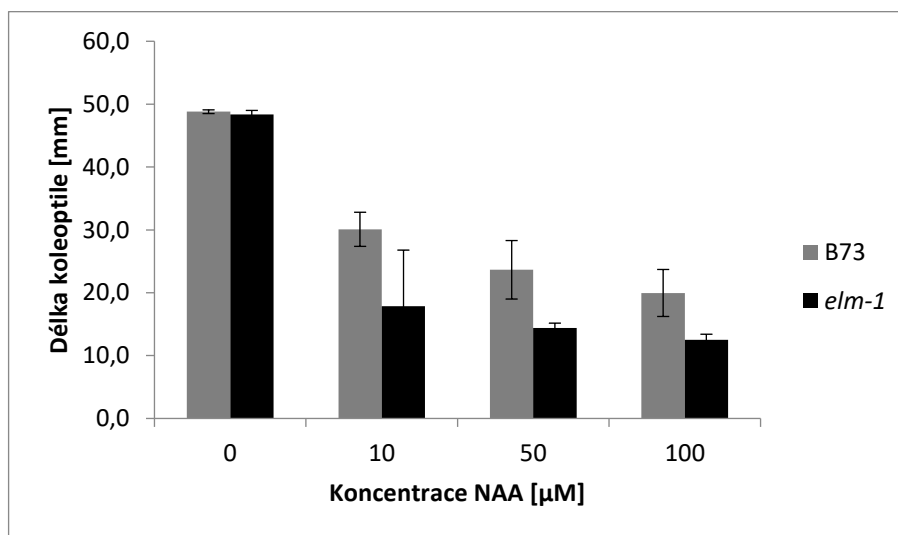
## VÝSLEDKY

### 7. Výsledky růstových experimentů

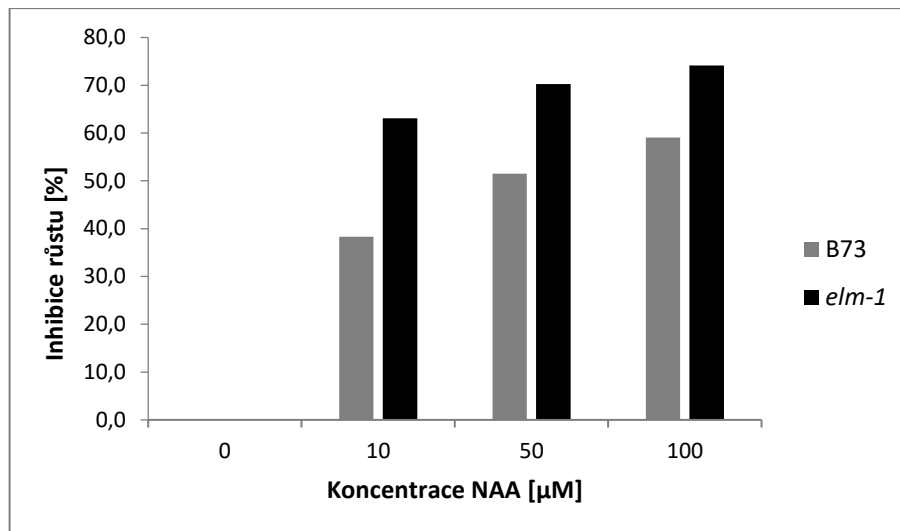
Dle výše zmíněných postupů byly provedeny tři na sobě nezávislé experimenty ve tmě, na modrém a červeném světle s koncentrací auxinu 0, 10, 50 a 100  $\mu\text{mol/l}$ . Sedm dní po výsevu byly rostliny sklizeny a změřeny délky jejich koleoptilí a mezokotylů. Výsledky z jednotlivých experimentů byly zprůměrovány a byla vypočtena standartní chyba. Hodnoty jsou zaznamenány v příslušných obrázcích (Kap. 7.1. – 7.12.).

#### 7.1. Vliv tmy a množství auxinu NAA na délku koleoptile

Koleoptile rostlin obou genotypů rostoucích ve tmě bez přítomnosti auxinu byly stejně dlouhé, a to v průměru asi 50 mm (Obr. 6). Obrázek dále ukazuje, že auxin NAA přidáný do média způsoboval redukci růstu koleoptile obou genotypů, přičemž inhibice růstu byla přímo úměrná koncentraci NAA. Obr. 7 ukazuje porovnání inhibice prodlužování koleoptilí u obou genotypů při jednotlivých koncentracích NAA. Lze vidět, že inhibice růstu koleoptile mutanta *elm-1* byla na všech testovaných koncentracích NAA větší než u kontrolního genotypu B73.



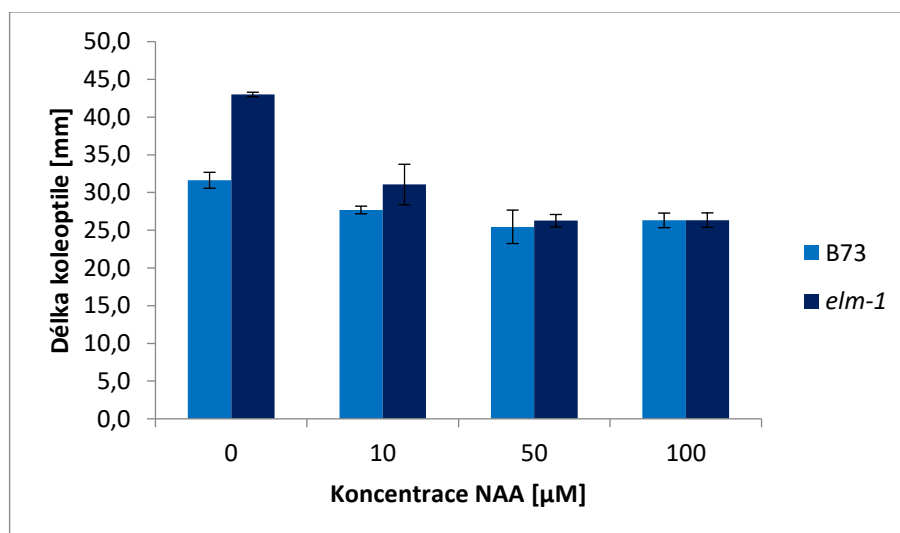
Obr. 6: Délka koleoptile u kontrolní rostliny kukuřice B73 a mutanta *elm-1* pěstovaných 7 dní ve tmě na médiu obsahujícím auxin NAA. Graf ukazuje průměrné délky koleoptilí  $\pm$  SE, které byly získány ze tří nezávislých experimentů. Průměrný počet měřených rostlin v experimentu byl 6.



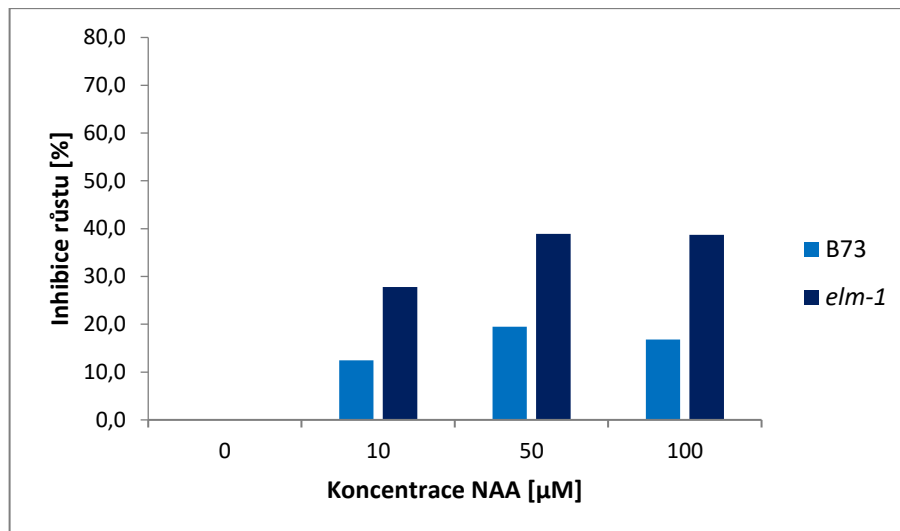
*Obr. 7:* Procentuální míra inhibice prodlužování koleoptile u kontrolní rostliny kukuřice B73 a jejího mutanta *elm-1* pěstovaných 7 dní ve tmě s jednotlivými koncentracemi NAA.

## 7.2. Vliv modrého světla a množství NAA na délku koleoptile

Na *Obr. 8* lze vidět, že koleoptile mutanta *elm-1* pěstovaného na modrém světle bez přítomnosti auxinu byla přibližně o 10 cm delší než u kontrolního genotypu B73. Auxin přítomný v živném médiu snížil prodlužování koleoptile u obou genotypů. Z grafu je patrné, že při koncentraci 50 a 100  $\mu\text{mol/l}$  NAA byla délka koleoptile u B73 i *elm-1* shodná, a to 26 mm. *Obr. 9* znázorňuje inhibici prodlužování koleoptilů u obou genotypů při jednotlivých koncentracích NAA. Z grafu vyplývá, že inhibice růstu koleoptile rostliny *elm-1* byla u všech koncentrací NAA výraznější než u rostliny B73.



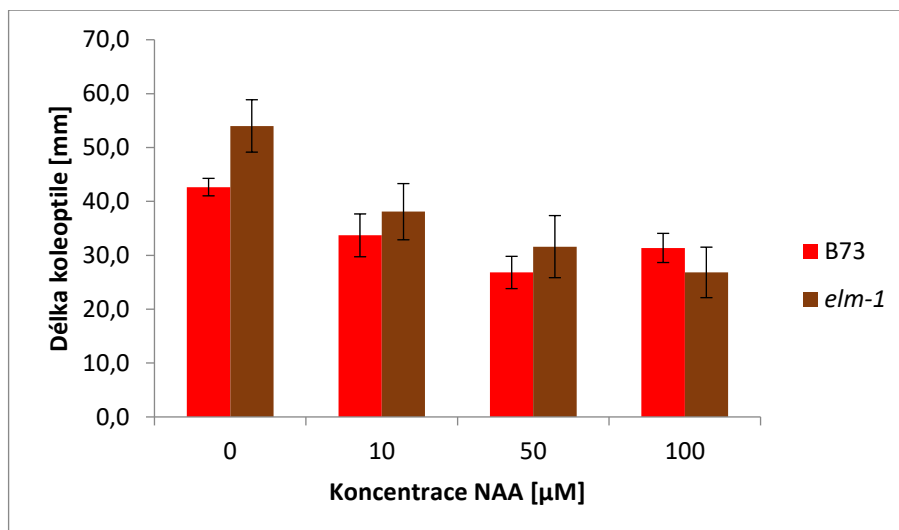
*Obr. 8:* Délka koleoptile u kontrolní rostliny kukuřice B73 a mutanta *elm-1* pěstovaných 7 dní na modrém světle na médiu obsahujícím auxin NAA. Graf ukazuje průměrné délky koleoptilů  $\pm$  SE, které byly získány ze tří nezávislých experimentů. Průměrný počet měřených rostlin v experimentu byl 6.



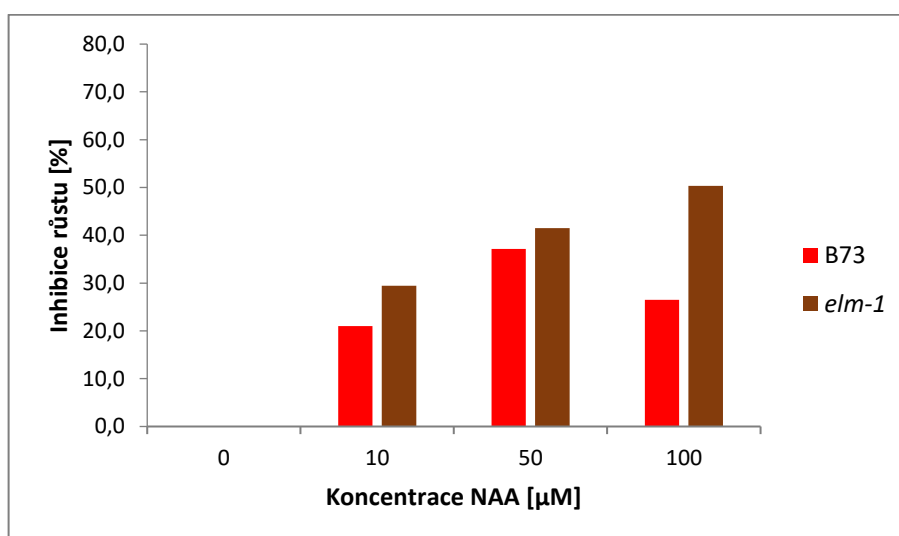
Obr. 9: Procentuální míra inhibice prodlužování koleoptile u kontrolní rostliny kukuřice B73 a jejího mutantu *elm-1* pěstovaných 7 dní na modrém světle s jednotlivými koncentracemi NAA.

### 7.3. Vliv červeného světla a množství NAA na délku koleoptile

Délka koleoptile mutantní rostliny *elm-1* pěstované na médiu bez přídavku auxinu a na červeném světle byla přibližně o 11 cm vyšší v porovnání s kontrolním genotypem B73 (Obr. 10). S rostoucí koncentrací auxinu NAA můžeme pozorovat redukci růstu koleoptile u obou genotypů v závislosti na jeho zvyšující se koncentraci. Obr. 11 zobrazuje inhibici prodlužování koleoptile v přítomnosti různých koncentrací NAA. Je z něj patrné, že ve všech testovaných koncentracích byla míra inhibice prodlužování vyšší u mutantu *elm-1* než u kontrolního genotypu B73, v závislosti na zvyšující se přítomnosti auxinu. Rovněž je také patrné, že největší rozdíl v inhibici růstu koleoptile mezi B73 a *elm-1* byl pozorován při koncentraci 100  $\mu\text{mol/l}$  NAA.



*Obr. 10:* Délka koleoptile u kontrolní rostliny kukuřice B73 a mutanta *elm-1* pěstovaných 7 dní na červeném světle na médiu obsahujícím auxin NAA. Graf ukazuje průměrné délky koleoptilí  $\pm$  SE, které byly získány ze tří nezávislých experimentů. Průměrný počet měřených rostlin v experimentu byl 6.

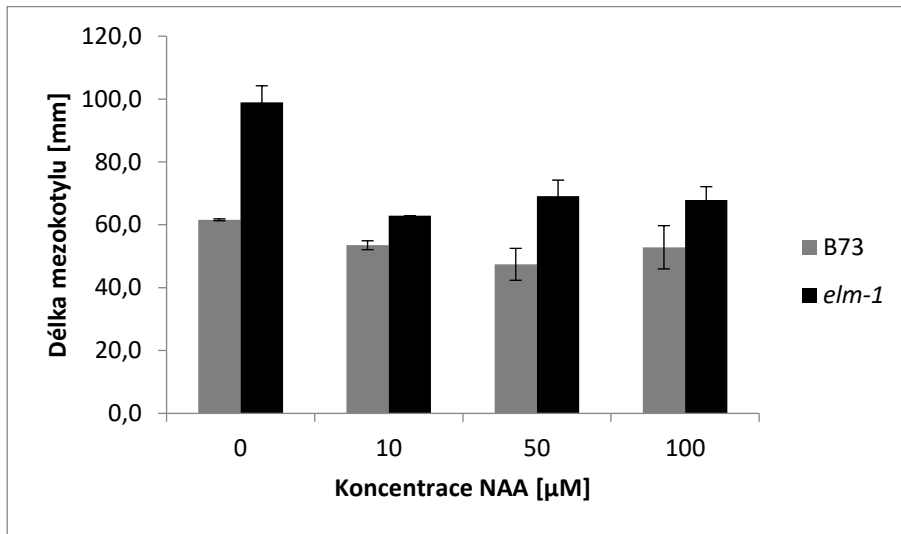


*Obr. 11:* Procentuální míra inhibice prodlužování koleoptile u kontrolní rostliny kukuřice B73 a jejího mutanta *elm-1* pěstovaných 7 dní na červeném světle s jednotlivými koncentracemi NAA.

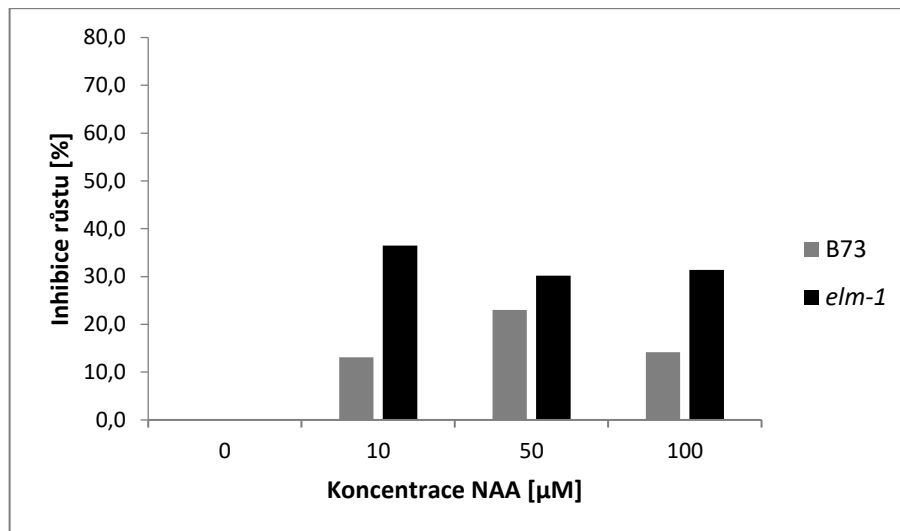
#### 7.4. Vliv tmy a množství NAA na délku mezokotylu

Délku mezokotylu u rostlin pěstovaných ve tmě a v přítomnosti auxinu NAA zobrazuje *Obr. 12*. U mutantní rostliny *elm-1*, pěstované v médiu bez přítomnosti auxinu, byl mezokotyl o 37 mm delší v porovnání s kontrolním genotypem B73. V přítomnosti auxinu došlo u obou sledovaných genotypů k redukci růstu mezokotylu. Na *Obr. 13* můžeme vidět porovnání inhibice prodlužování mezokotylu u obou rostlin v přítomnosti auxinu. Z *Obr. 13* je zřejmé, u všech koncentracích byl růst mezokotylu více inhibován u mutanta

*elm-1* než u B73. Nejvýraznější rozdíl v inhibicích růstu mezokotylu mezi B73 a *elm-1* byl pozorován při koncentraci 10  $\mu\text{mol/l}$  NAA.



Obr. 12: Délka mezokotylu u kontrolní rostliny kukuřice B73 a mutanta *elm-1* pěstovaných 7 dní ve tmě na médiu obsahujícím auxin NAA. Graf ukazuje průměrné délky mezokotylů  $\pm$  SE, které byly získány ze tří nezávislých experimentů. Průměrný počet měřených rostlin v experimentu byl 6.

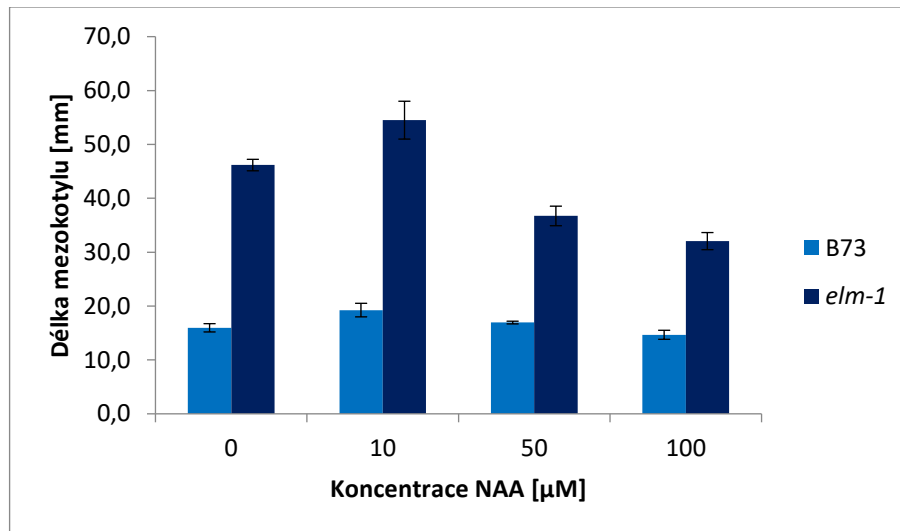


Obr. 13: Procentuální míra inhibice prodlužování mezokotylu u kontrolní rostliny kukuřice B73 a jejího mutanta *elm-1* pěstovaných 7 dní ve tmě s jednotlivými koncentracemi NAA.

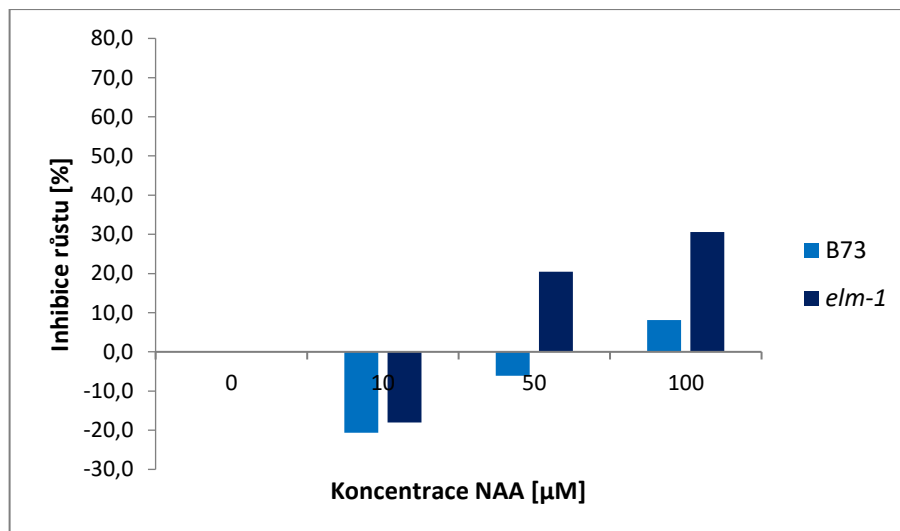
### 7.5. Vliv modrého světla a množství NAA na délku mezokotylu

Na Obr. 14 je znázorněn vliv modrého světla a auxinu na prodlužování mezokotylu. U kontrolního genotypu B73 byla délka mezokotylu pouze 16 mm, zatímco u mutanta *elm-1* dosahovala 46 mm. Při koncentraci 10  $\mu\text{mol/l}$  NAA v médiu, byl růst mezokotylu u obou genotypů mírně stimulován. Pro srovnání lze vidět míru inhibice růstu mezokotylu

v závislosti na množství auxinu na Obr. 15. Při koncentraci 50  $\mu\text{mol/l}$  NAA u B73 byla vidět stimulace růstu přibližně z 6 %, zatímco růst mezokotylu u mutanta *elm-1* byl redukován z 20 %. Množství 100  $\mu\text{mol/l}$  NAA v médiu růst inhibovalo u obou genotypů, výrazněji ovšem u *elm-1*, kdy inhibice dosáhla téměř 31 %.



Obr. 14: Délka mezokotylu u kontrolní rostliny kukuřice B73 a mutanta *elm-1* pěstovaných 7 dní na modrém světle na médiu obsahujícím auxin NAA. Graf ukazuje průměrné délky mezokotylů  $\pm$  SE, které byly získány ze tří nezávislých experimentů. Průměrný počet měřených rostlin v experimentu byl 6.

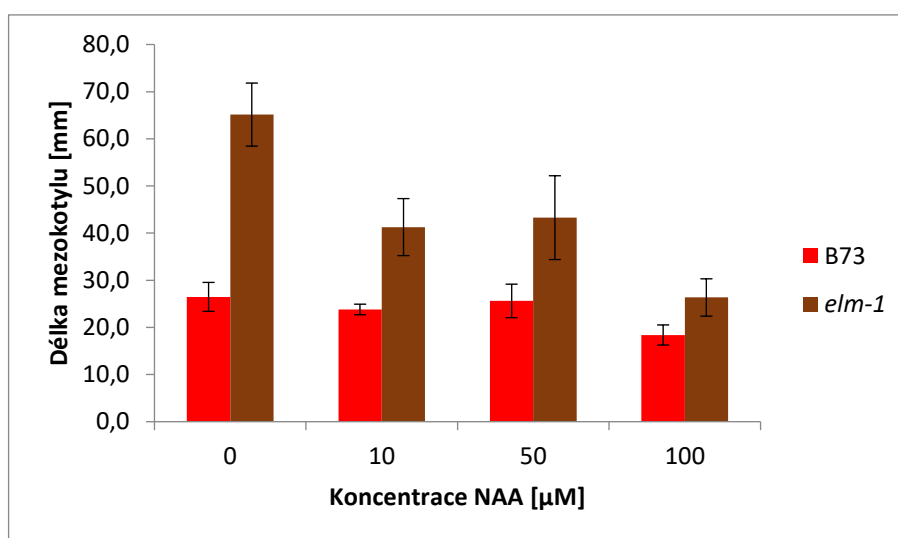


Obr. 15: Procentuální míra inhibice prodloužení mezokotylu u kontrolní rostliny kukuřice B73 a jejího mutanta *elm-1* pěstovaných 7 dní na modrém světle s jednotlivými koncentracemi NAA.

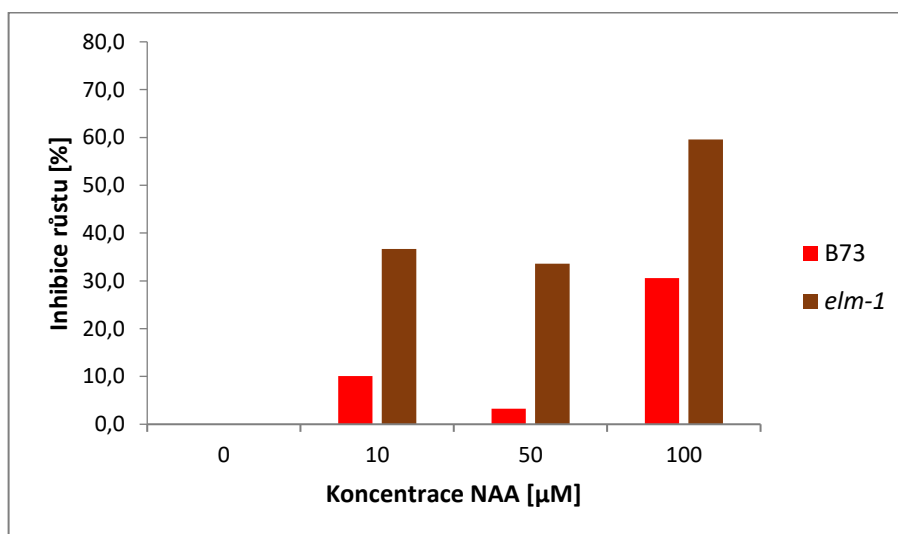


## 7.6. Vliv červeného světla a množství NAA na délku mezokotylu

Na *Obr. 16* můžeme vidět průměrnou délku mezokotylu u genotypů B73 a *elm-1* pěstovaných na červeném světle s a bez přítomnosti auxinu NAA. U mutantní rostliny, která nebyla vystavena auxinu, byla délka mezokotylu 65 mm, kdežto u kontrolní rostliny byla pouze 26 mm. Z obrázku 16 je taktéž patrné, že u všech použitých koncentrací bylo prodlužování vlivem auxinu potlačeno. Velikost inhibice u jednotlivých koncentrací u obou genotypů vystavených červenému světle je uvedena v *Obr 17*. Inhibice byla vždy vyšší u mutantu *elm-1* než u kontrolní rostliny B73.



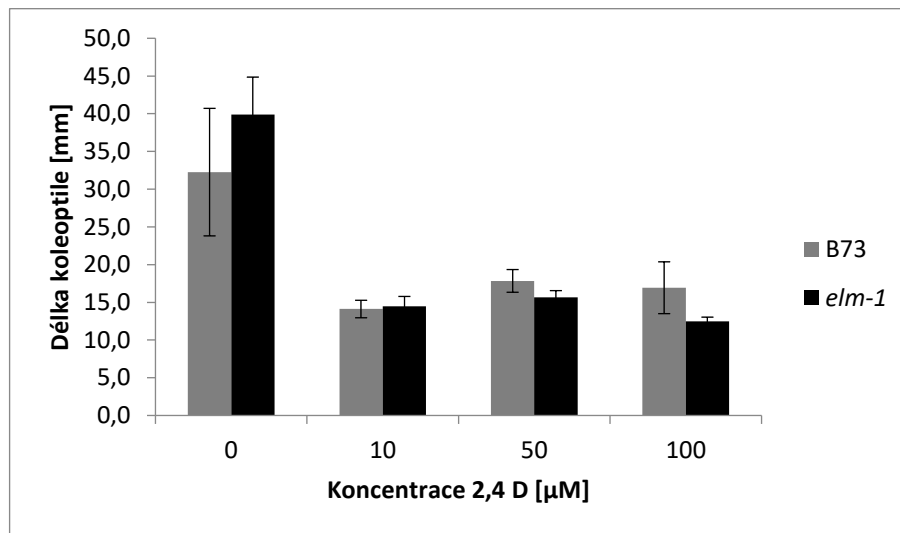
*Obr. 16:* Délka mezokotylu u kontrolní rostliny kukuřice B73 a mutantu *elm-1* pěstovaných 7 dní na červeném světle na médiu obsahujícím auxin NAA. Graf ukazuje průměrné délky mezokotylů  $\pm$  SE, které byly získány ze tří nezávislých experimentů. Průměrný počet měřených rostlin v experimentu byl 6.



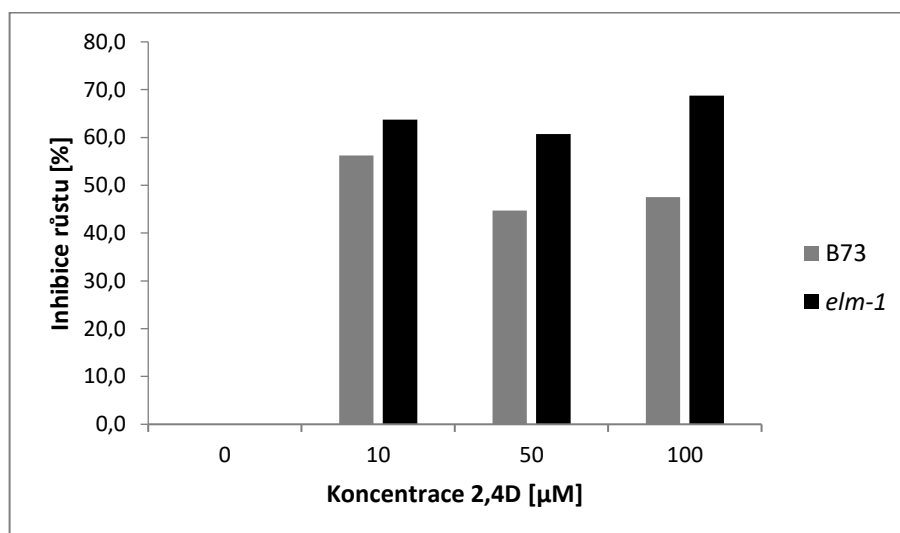
*Obr. 17:* Procentuální míra inhibice prodlužování mezokotylu u kontrolní rostliny kukuřice B73 a jejího mutantu *elm-1* pěstovaných 7 dní na červeném světle s jednotlivými koncentracemi NAA.

### 7.7. Vliv tmy a množství 2,4-D na délku koleoptile

Koleoptile rostlin obou genotypů rostoucích ve tmě bez přítomnosti auxinu, byly podobně dlouhé, a to 32 mm u B73 a 40 mm u mutanta *elm-1* (Obr. 18). Dále je z obrázku patrné, že auxin 2,4-D přidaný do média způsoboval redukci růstu koleoptile obou genotypů. Obr. 19 potom ukazuje porovnání inhibice prodlužování koleoptilí u obou genotypů v jednotlivých koncentracích auxinu. Je vidět, že inhibice růstu koleoptile mutanta *elm-1* byla u všech koncentrací 2,4-D vyšší než u kontrolního genotypu B73.



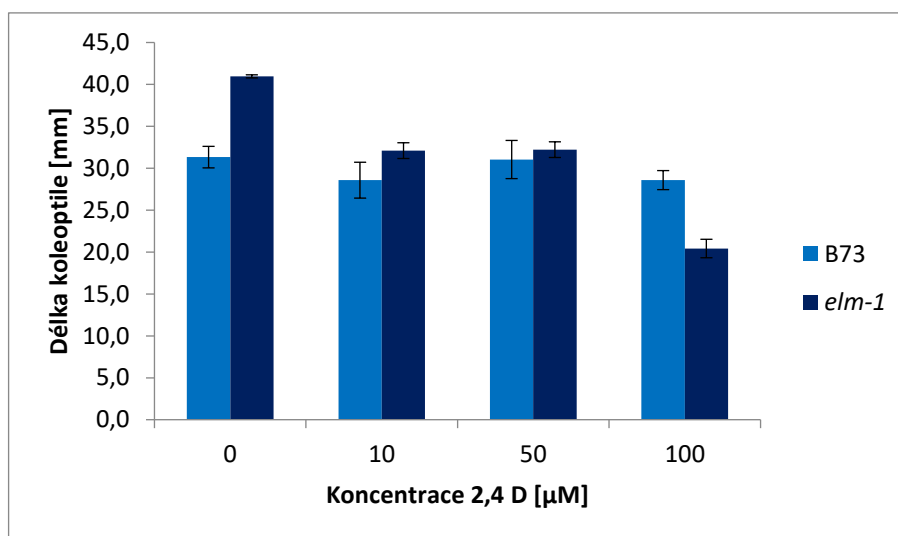
Obr. 18: Délka koleoptile u kontrolní rostliny kukuřice B73 a mutanta *elm-1* pěstovaných 7 dní ve tmě na médiu obsahujícím auxin 2,4-D. Graf ukazuje průměrné délky koleoptilí ± SE, které byly získány ze tří nezávislých experimentů. Průměrný počet měřených rostlin v experimentu byl 6.



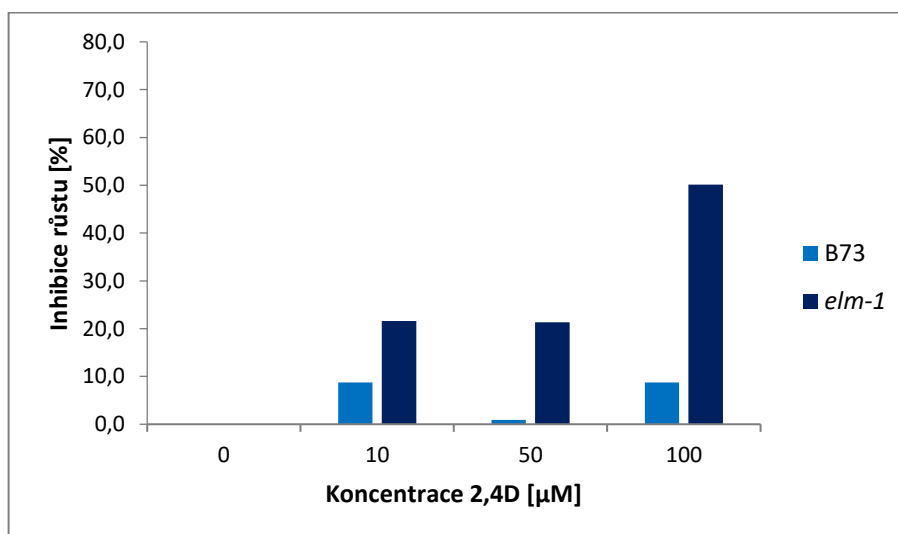
Obr. 19: Procentuální míra inhibice prodlužování koleoptile u kontrolní rostliny kukuřice B73 a jejího mutanta *elm-1* pěstovaných 7 dní ve tmě s jednotlivými koncentracemi 2,4-D.

## 7.8. Vliv modrého světla a množství 2,4-D na délku koleoptile

Obr. 20 zobrazuje porovnání délek koleoptilí kontrolní rostliny B73 a jejího mutanta *elm-1*, pěstovaných bez a s přidavkem auxinu 2,4-D na modrém světle. Můžeme vidět, že mutant *elm-1* pěstovaný na médiu bez auxinu měl o 10 mm delší koleoptile než B73, jejíž koleoptile měřila 31 mm. Graf také ukazuje, že po přidání auxinu 2,4-D došlo k redukci růstu koleoptile u obou genotypů. Na Obr. 21 vidíme, že k výraznější inhibici růstu docházelo u *elm-1*. Kontrolní rostlina byla nejméně inhibována při koncentraci 50  $\mu\text{mol/l}$ , zatímco u ostatních dvou koncentrací (10 a 100  $\mu\text{mol/l}$ ) byla inhibice stejná.



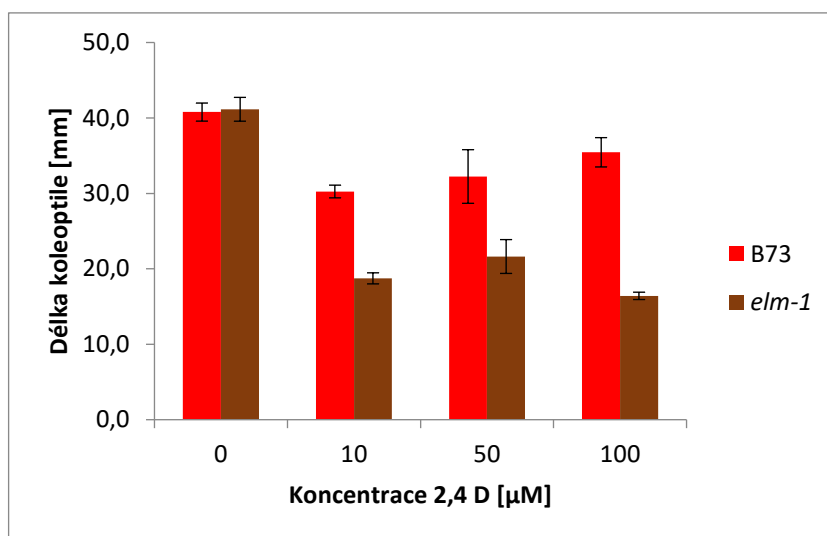
Obr. 20: Délka koleoptile u kontrolní rostliny kukuřice B73 a mutanta *elm-1* pěstovaných 7 dní na modrém světle na médiu obsahujícím auxin 2,4-D. Graf ukazuje průměrné délky koleoptilí  $\pm$  SE, které byly získány ze tří nezávislých experimentů. Průměrný počet měřených rostlin v experimentu byl 6.



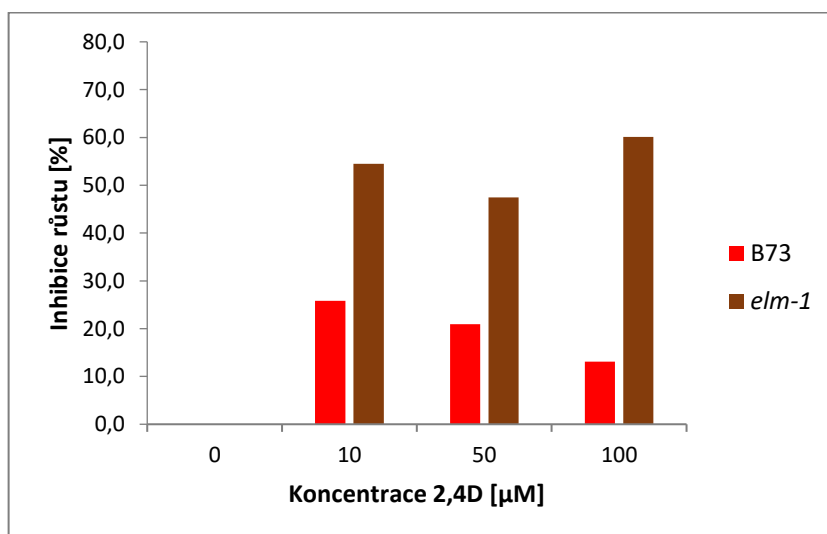
Obr. 21: Procentuální míra inhibice prodlužování koleoptile u kontrolní rostliny kukuřice B73 a jejího mutanta *elm-1* pěstovaných 7 dní na modrém světle s jednotlivými koncentracemi 2,4-D.

### 7.9. Vliv červeného světla a množství 2,4-D na délku koleoptile

Délka koleoptile byla u obou genotypů pěstovaných na červeném světle a bez přítomnosti auxinu shodná a dosahovala 41 mm (Obr. 22). Jak dále ukazuje graf, auxin přidaný do živného média redukoval růst koleoptile u obou genotypů. V Obr. 23 je uvedena procentuální míra inhibice při rozdílné koncentraci NAA. Z grafu je zjevné, že se redukce růstu koleoptile u kontrolního genotypu postupně snižovala s rostoucí koncentrací auxinu. U mutanta *elm-1* byla míra inhibice ve všech koncentracích podobná, v průměru okolo 54 %.



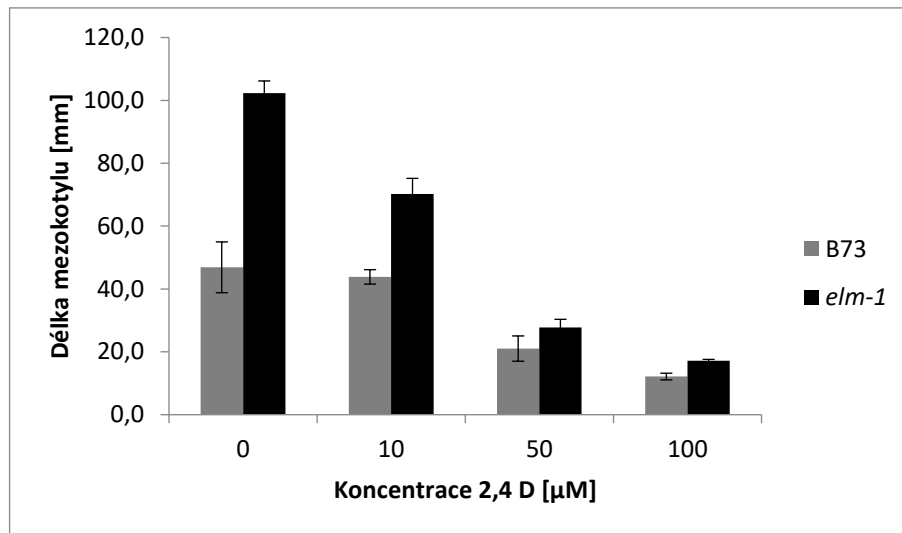
Obr. 22: Délka koleoptile u kontrolní rostliny kukuřice B73 a mutanta *elm-1* pěstovaných 7 dní na červeném světle na médiu obsahujícím auxin 2,4-D. Graf ukazuje průměrné délky koleoptilí  $\pm$  SE, které byly získány ze tří nezávislých experimentů. Průměrný počet měřených rostlin v experimentu byl 6.



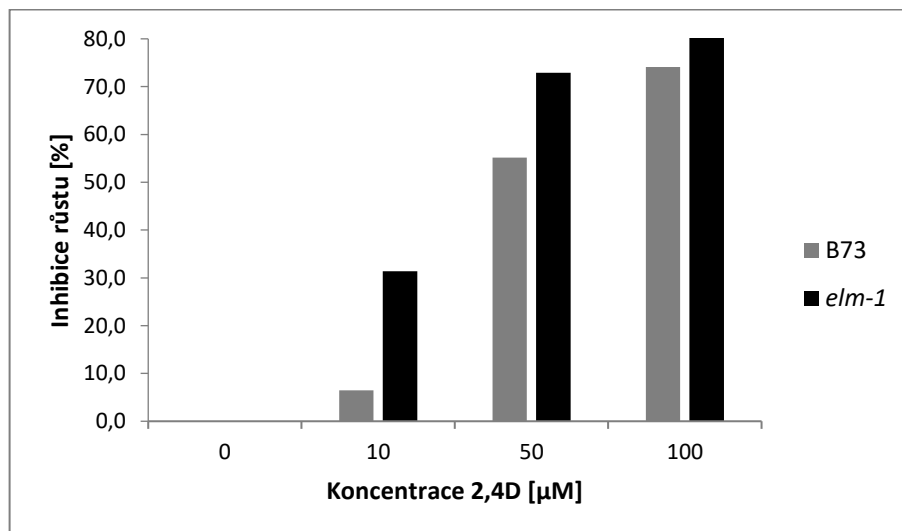
Obr. 23: Procentuální míra inhibice prodlužování koleoptile u kontrolní rostliny kukuřice B73 a jejího mutanta *elm-1* pěstovaných 7 dní na červeném světle s jednotlivými koncentracemi 2,4-D.

### 7.10. Vliv tmy a množství 2,4-D na délku mezokotylu

Délka mezokotylu u rostlin pěstovaných v médiu bez přídavku auxinu byla u obou genotypů odlišná (Obr. 24). Je vidět, že u kontrolní rostliny B73 dosahovala délka pouze 47 mm, zatímco u mutanta *elm-1* až 102 mm. Přídavek auxinu 2,4-D pak redukoval prodlužování mezokotylu u obou genotypů, a to přímo úměrně se zvyšující se koncentrací auxinu. Obr. 25 zobrazuje procentuální míru inhibice prodlužování mezokotylu při rozdílných koncentracích 2,4-D. U všech těchto koncentrací byla inhibice vyšší u mutanta *elm-1* v porovnání s kontrolní rostlinou B73.



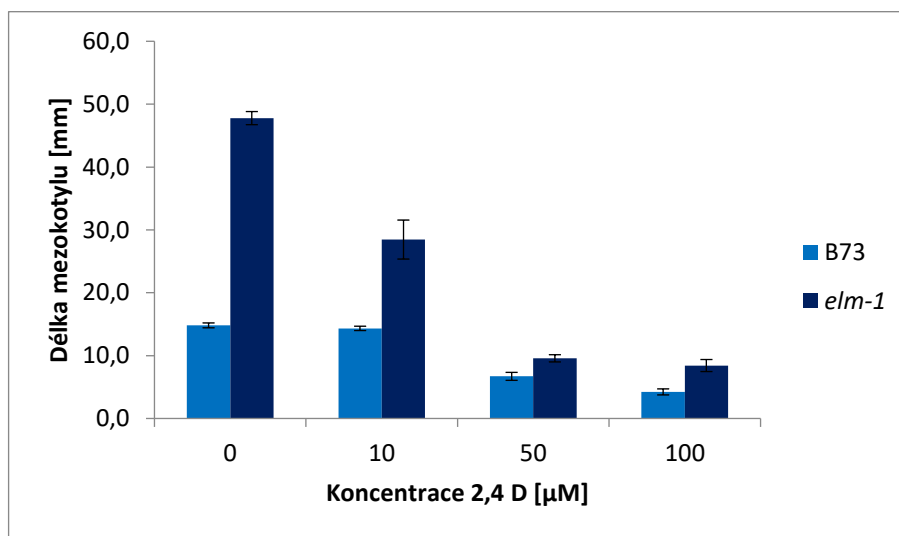
Obr. 24: Délka mezokotylu kontrolní rostliny kukuřice B73 a mutanta *elm-1* pěstovaných 7 dní na červeném světle na médiu obsahujícím auxin 2,4-D. Graf ukazuje průměrné délky mezokotylů  $\pm$  SE, které byly získány ze tří nezávislých experimentů. Průměrný počet měřených rostlin v experimentu byl 6.



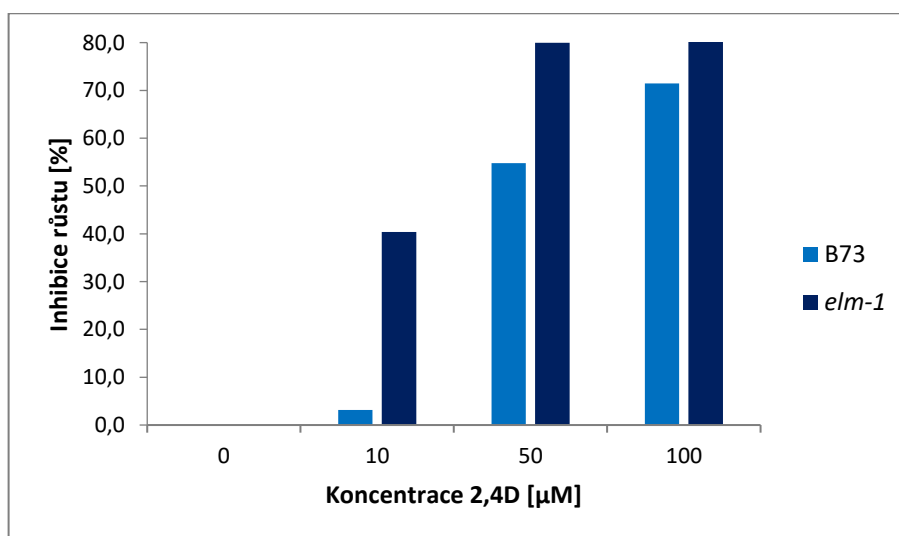
Obr. 25: Procentuální míra inhibice prodlužování mezokotylu u kontrolní rostliny kukuřice B73 a jejího mutanta *elm-1* pěstovaných 7 dní ve tmě s jednotlivými koncentracemi 2,4-D.

### 7.11. Vliv modrého světla a množství 2,4-D na délku mezokotylu

Délka mezokotylu u mutantní rostliny *elm-1* pěstované na modrém světle bez přídavku auxinu je přibližně o 34 mm větší než u kontroly B73 pěstované za stejných podmínek (Obr. 26). Dále lze vidět, že auxin 2,4-D redukoval růst mezokotylu u obou genotypů. Obr. 27 potom zobrazuje procentuální míru inhibice růstu mezokotylu při všech testovaných koncentracích, kdy jde vidět, že míra inhibice je přímo úměrná zvyšující se koncentrací 2,4-D.



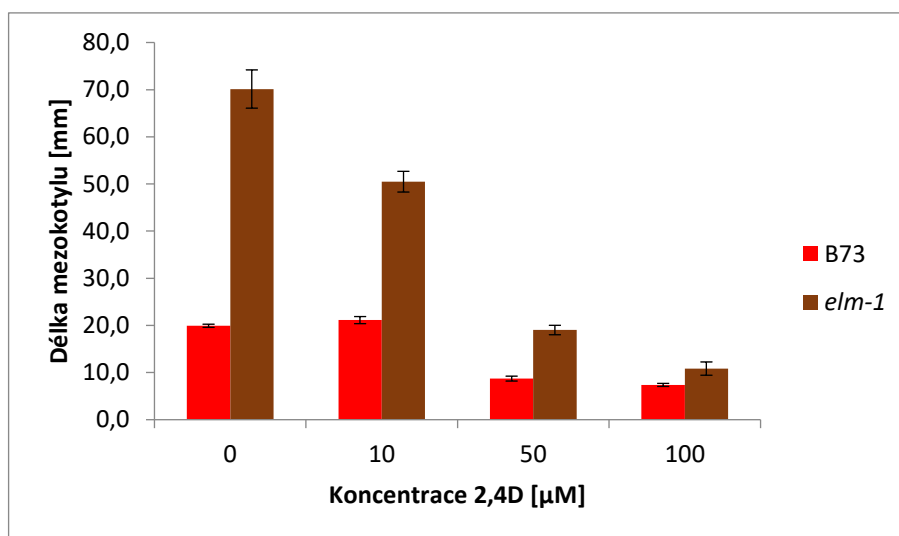
Obr. 26: Délka mezokotylu u kontrolní rostliny kukuřice B73 a mutantu *elm-1* pěstovaných 7 dní na modrém světle na médiu obsahujícím auxin 2,4-D. Graf ukazuje průměrné délky mezokotylů  $\pm$  SE, které byly získány ze tří nezávislých experimentů. Průměrný počet měřených rostlin v experimentu byl 6.



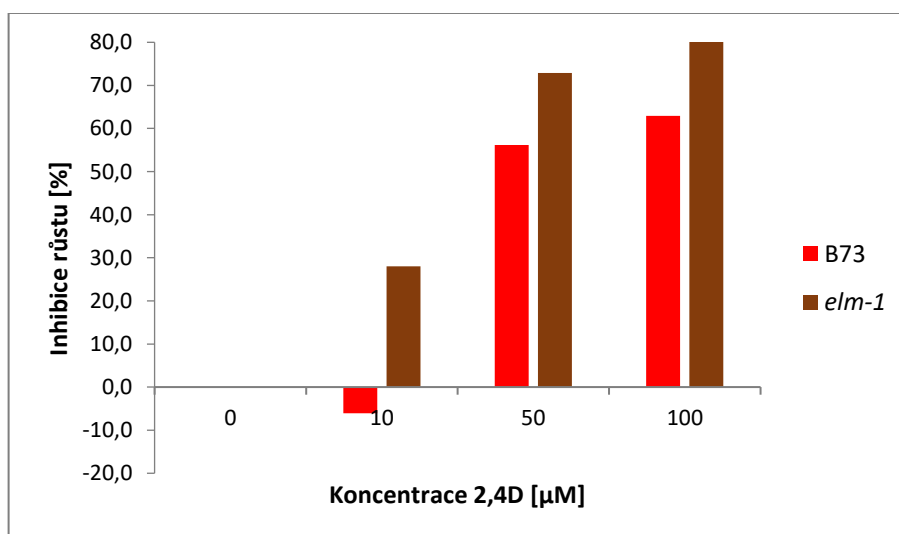
Obr. 27: Procentuální míra inhibice prodlužování mezokotylu u kontrolní rostliny kukuřice B73 a jejího mutantu *elm-1* pěstovaných 7 dní na modrém světle s jednotlivými koncentracemi 2,4-D.

### 7.12. Vliv červeného světla a množství 2,4-D na délku mezokotylu

Délka mezokotylu mutantní rostliny *elm-1*, pěstované na médiu bez přídavku auxinu a na konstantním červeném světle byla 70 mm, v porovnání s kontrolní rostlinou B73, která dosahovala délky 20 mm (Obr. 28). U obou genotypů lze vidět, že v přítomnosti auxinu 2,4-D, téměř ve všech koncentracích, došlo k redukci růstu mezokotylu. Výjimku představuje kontrolní rostlina B73, která při množství 10  $\mu\text{mol/l}$  2,4-D v médiu měla o 6 % delší mezokotyl v porovnání s rostlinou pěstovanou bez auxinu. To je patrné z Obr. 29, který znázorňuje míru inhibice růstu obou genotypů v jednotlivých koncentracích.



Obr. 28: Délka mezokotylu u kontrolní rostliny kukuřice B73 a mutantu *elm-1* pěstovaných 7 dní na červeném světle na médiu obsahujícím auxin 2,4-D. Graf ukazuje průměrné délky mezokotylů  $\pm$  SE, které byly získány ze tří nezávislých experimentů. Průměrný počet měřených rostlin v experimentu byl 6.



Obr. 29: Procentuální míra inhibice prodloužení mezokotylu u kontrolní rostliny kukuřice B73 a jejího mutantu *elm-1* pěstovaných 7 dní na červeném světle s jednotlivými koncentracemi 2,4-D.

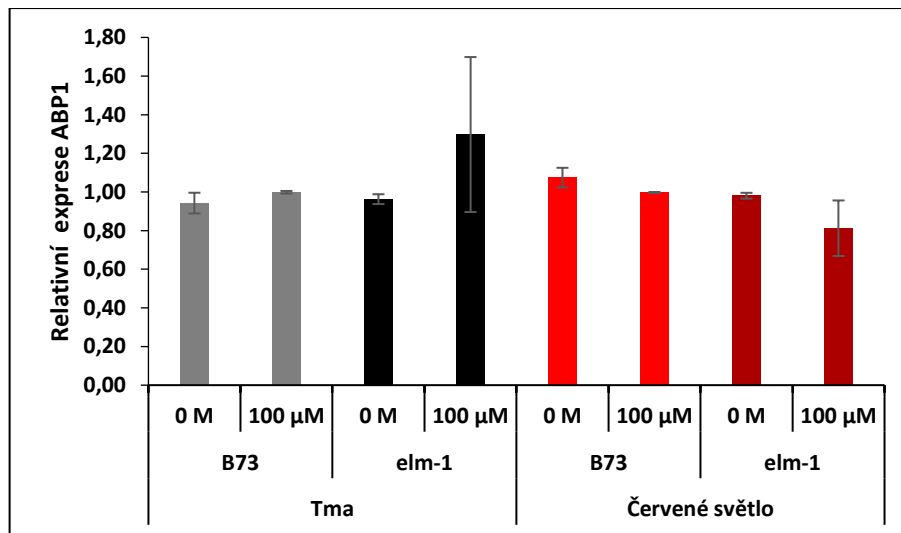
## 8. Výsledky exprese *ABP* genů

Růstové experimenty ukázaly, že defekt v genu *ELMI* kódujícím fytochromobilin syntázu způsobuje zvýšenou citlivost koleoptilí i mezokotylů k auxinu, a to ve tmě, na modrém i červeném světle. Cílem expresní analýzy bylo proto zjistit, zda je možné, že zvýšená citlivost mutantu *elm-1* k auxinům může být způsobena zvýšenou expresí genů *ABP1* a *ABP4*.

Experimenty byly prováděny na obou experimentálních rostlinách B73 a *elm-1* pěstovaných ve tmě nebo na červeném světle. Do média byl přidán NAA ve výsledné koncentraci 0 a 100  $\mu$ M. Pro určení míry exprese byla použita metoda semi-kvantitativní PCR. Jednotlivá data byla zprůměrována v programu ImageJ a hodnoty exprese genů *ABP* byly vztaženy ke kontrolnímu housekeeping genu *18S*, jehož exprese byla definována jako 1.

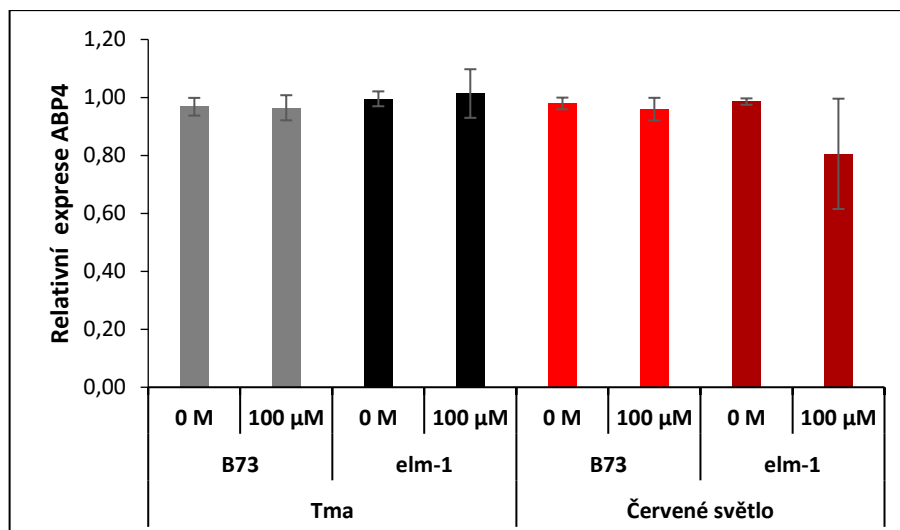
### 8.1. Vliv světla a auxinu NAA na expresi *ABP1* a *ABP4* v koleoptilech kukuřice

Obr. 30 ukazuje, že exprese genů *ABP1* v etiolizovaných koleoptilech obou genotypů pěstovaných na základním médiu bez přítomnosti auxinu byla podobná a výrazně se nezměnila ani v přítomnosti auxinu NAA. Jak obrázek dále ukazuje, na expresi genu *ABP1* nemělo zásadní vliv ani červené světlo. Zcela obdobné výsledky byly pozorovány u expresní analýzy genu *ABP4* (Obr. 31).



Obr. 30: Relativní hodnota exprese *ABP1* v koleoptilech kukuřice rostoucích ve tmě či červeném světle a při absenci či přítomnosti NAA. Hodnoty byly vypočítány jako průměr ze tří na sobě nezávislých experimentů  $\pm$  SE. Hodnota exprese je vztažena k expresi housekeeping genu *18S*, která byla definována jako 1.

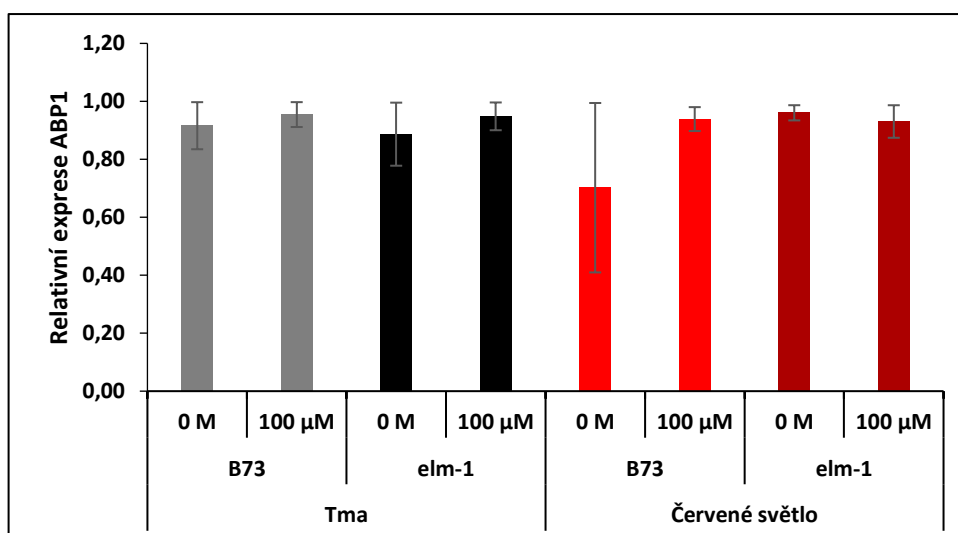




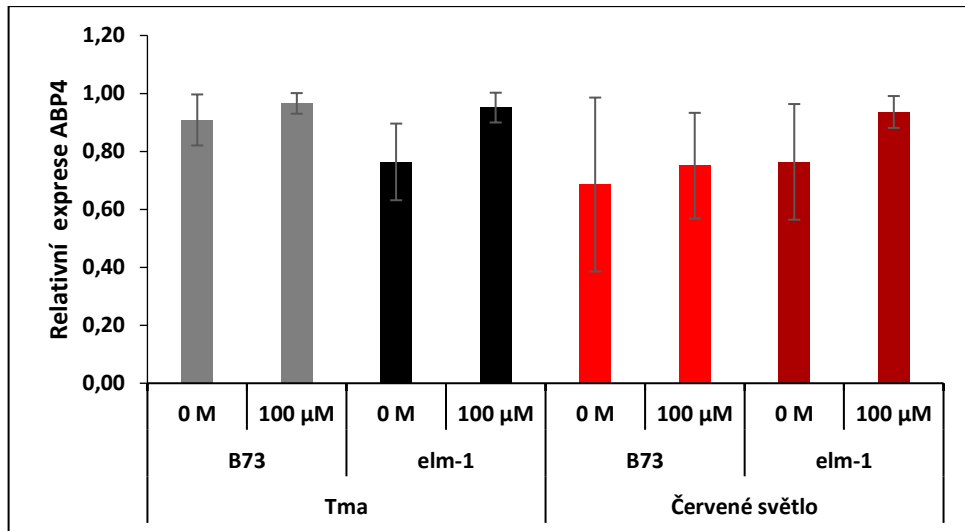
Obr. 31: Relativní hodnota exprese ABP4 v koleoptilech kukuřice rostoucích ve tmě či červeném světle a při absenci či přítomnosti NAA. Hodnoty byly vypočítány jako průměr ze tří na sobě nezávislých experimentů  $\pm$  SE. Hodnota exprese je vztažena k expresi housekeeping genu *18S*, která byla definována jako 1.

## 8.2. Vliv světla a auxinu NAA na expresi *ABP1* a *ABP4* v mezokotylech kukuřice

Obr. 32 ukazuje, že obdobně jako u koleoptile, byla exprese genu *ABP1* v etiolizovaných mezokotylech obou genotypů rostoucích na médiu bez přítomnosti auxinu podobná. Ke změně exprese nedošlo ani v přítomnosti auxinu NAA a rovněž červené světlo nemělo na expresi genu *ABP1* výrazný vliv. Obr. 33 ukazuje, že podobné výsledky byly pozorovány u exprese genu *ABA4*.



Obr. 32: Relativní hodnota exprese ABP1 v mezokotylech kukuřice rostoucích ve tmě či červeném světle a při absenci či přítomnosti NAA. Hodnoty byly vypočítány jako průměr  $\pm$  SE ze tří na sobě nezávislých experimentů. Hodnota exprese je vztažena k expresi housekeeping genu *18S*, která byla definována jako 1.



*Obr. 33:* Relativní hodnota exprese ABP4 v mezokotylech kukuřice rostoucích ve tmě či červeném světle a při absenci či přítomnosti NAA. Hodnoty byly vypočítány jako průměr  $\pm$  SE ze tří na sobě nezávislých experimentů  $\pm$  SE. Hodnota exprese je vztažena k expresi housekeeping genu *18S*, která byla definována jako 1.

## DISKUZE

První část práce byla zaměřena na růstové experimenty, ve kterých byl zkoumán růst a vývoj jednotlivých rostlinných částí kukuřice seté (*Zea mays* L.) v závislosti na kvalitě světla (tma, modré a červené světlo), druhu (NAA, 2,4D) a koncentraci auxinu (0, 10, 50, 100  $\mu\text{mol/l}$ ). Všechny pokusy byly prováděny na kontrolním genotypu B73 a od něho odvozeného mutanta *elm-1*, který měl defekt v genu kódujícím fytochromobilin syntázu. V další části bylo zjišťováno, zda jsou auxinové a světelné signální dráhy propojeny skrze ABP1 anebo ABP4.

### Vliv světla

Pokusy byly prováděny na kontrolní rostlině B73, která rostla ve tmě, na modrém a červeném světle bez přítomnosti auxinu. Ukázalo se, že každá z měřených částí rostlin reagovala na světlo jinak citlivě. Délka koleoptile i mezokotylu byla redukována červeným i modrým světlem, citlivěji na světlo však reagoval mezokotyl, jehož prodlužování bylo světlem výrazněji redukováno než prodlužování koleoptile.

Mutant *elm-1* pěstovaný za stejných podmínek reagoval na přítomnost světla odlišně. Růst koleoptile se na modrém a červeném světle příliš nelišil od etiolovaných rostlin. Mezokotyl byl červeným, a především modrým světlem redukován, ale výrazně méně než u B73. Tyto výsledky potvrzují, že mutant *elm-1* ve srovnání s B73 ukazuje opravdu redukovanou citlivost ke světlu. Na druhé straně je zřejmé, že přestože měl *elm-1* defekt ve tvorbě aktivních fytochromů (Sawers a kol., 2002), docházelo k inhibici prodlužování u mezokotylu. To lze zdůvodnit tím, že rostliny kromě fytochromů mají i další druhy fotoreceptorů, kterými světlo vnímají.

V dřívějších výzkumem bylo zjištěno, že červené i modré světlo redukuje hladinu endogenního auxinu IAA (Iino, 1982a,b; Nishimura a kol., 2006; Jurišič-Knežev a kol., 2012; Čudejková a kol., 2012), čímž dochází k redukcí prodlužovacího růstu. Světlo taktéž redukuje polární auxinový transport (Jones a kol., 1991). Na základě těchto literárních dat a výsledků této diplomové práce lze tedy předpokládat, že snížená citlivost mutanta *elm-1* k červenému i modrému světlu může vést u mutanta k menší redukcí množství endogenních auxinů než u B73. Tím se v koleoptile i mezokotylu mutanta *elm-1* akumuluje více endogenních auxinů než u B73, což u *elm-1* vede k menší redukcí prodlužování obou orgánů než u B73. Jones a kol. (1991) zjistili, že červené světlo redukuje i množství ABP1 v mezokotylu kukuřice, což, se současnou redukcí hladiny endogenních auxinů, může být příčinou inhibice prodlužovacího růstu mezokotylu světlem. Naproti tomu, Čudejková

a kol. (2012) zjistili, že modré a především červené světlo zvyšovalo množství ABP1 v koleoptilích a mezokotylech kukuřice. Výsledky expresních analýz genů *ABP1* a *ABP4* provedených v této diplomové práci však ukázaly, že červené ani modré světlo nemělo významný vliv na množství transkriptu genů *ABP1* a *ABP4* v koleoptile a mezokotylu. Je tedy pravděpodobné, že světlem redukovaný růst koleoptile a mezokotylu kukuřice je výsledkem redukce hladiny endogenních auxinů, zatímco nelze jednoznačně říci, jakou úlohu hrají v tomto procesu receptory ABP1 a ABP4.

### **Vliv auxinu a světla**

Výsledky experimentů diplomové práce ukázaly, že aplikace NAA a 2,4-D auxinu způsobuje výraznou inhibici prodlužování etiolovaných koleoptilí při všech koncentracích a u obou genotypů (*Obr. 6, 7 a 18, 19*). V případě mezokotylů došlo taktéž k inhibici růstu, nicméně v porovnání s koleoptilemi byla zřetelně nižší (*Obr. 12, 13 a 24, 25*). Doposud není zcela jasné, proč exogenní auxin, na rozdíl od endogenního, inhibuje prodlužovací růst intaktních rostlin (Ephritikhine a kol., 1999). Nicméně jeden z již dříve navržených mechanismů účinku je, že aplikace exogenního auxinu způsobí nárůst jeho koncentrace nad optimální hranici v pletivu, aktivují se aniontové kanály a dochází k depolarizaci plazmatické membrány, což vede k inhibici růstu (Hasenstein a Evans, 1988).

Výsledky dále ukázaly, že u rostlin B73 (tedy rostliny bez mutace v *ELM1*) byly na modrém a červeném světle méně citlivé na přítomnost obou exogenních auxinů než rostliny etiolované. To vede k závěru, že světlo nějakým způsobem snižuje reakci rostlin k exogennímu auxinu. Mutant *elm-1* (se sníženou citlivostí ke světlu) vykazoval vyšší citlivost k oběma auxinům než B73. Tato data tedy vedou k závěru, že světlem indukovaná redukce odpovědi koleoptilí a mezokotylů na exogenní auxin je alespoň částečně zprostředkovaná fytochromy.

Výjimku představovaly rostliny pěstované na modrém světle v přítomnosti NAA. Při koncentraci 10  $\mu\text{mol/l}$  NAA došlo u obou genotypů ke stimulaci růstu mezokotylů. Při koncentraci 50  $\mu\text{mol/l}$  byl růst mezokotylu stimulován již pouze u kontrolní rostliny B73. U *elm-1* už docházelo k inhibici růstu. Při nejvyšší koncentraci (100  $\mu\text{mol/l}$ ) bylo prodlužování mezokotylu u obou genotypů inhibováno, a to výrazněji u *elm-1*. Z těchto výsledků lze vyvodit, že modré světlo společně s auxiny mají určitým způsobem propojeny signální dráhy a vzájemně se ovlivňují. I přesto, že mutantní rostlina nevytváří aktivní fytochromy, obsahuje receptory, které alespoň částečně vnímají v oblasti modrého světla. Expresní analýzy provedené v této diplomové práci ukázaly, že u obou genotypů, B73

a *elm-1* byla exprese genů *ABP1* a *ABP4* podobná, a to za všech světelných podmínek, a aplikace exogenních auxinů expresi těchto genů výrazně neovlivňovala. Je tedy pravděpodobné, že zvýšená citlivost *elm-1* k exogenním auxinům bude způsobena především změnou hladiny auxinů a nebude pravděpodobně zprostředkována *ABP1* či *ABP4*.

Na základě výsledků lze navrhnout mechanismus, který vysvětluje zvýšenou citlivost *elm-1* k exogenním auxinům NAA a 2,4-D. Světlo prostřednictvím fytochromů snižuje biosyntézu auxinů. Jak bylo uvedeno výše, je tedy pravděpodobné, že rostliny mutanta *elm-1*, méně citlivé ke světlu, akumulují více endogenních auxinů než B73. Pokud na tyto rostliny aplikujeme exogenní auxin, u mutanta *elm-1* dochází dříve než u B73 k překročení optimální hladiny auxinů v buňkách a akumulaci inhibičního množství auxinu. Tím je prodlužovací růst mutanta *elm-1* inhibován při aplikaci exogenních auxinů více než u B73.

## ZÁVĚR

V diplomové práci byly studovány růstové reakce rostliny kukuřice B73 a od ní odvozeného fotomorfogenního mutanta *elm-1* k exogenním auxinům NAA a 2,4-D v závislosti na rozdílné kvalitě světla. Dále byla studována exprese genu *ABP1* a *ABP4* u obou genotypů v závislosti na přítomnosti NAA a světla. Cílem práce bylo zjistit, jak světlo prostřednictvím fytochromů ovlivňuje auxinem regulovaný růst a zda mohou tyto odpovědi zprostředkovány *Auxin-Binding Proteiny 1* a *4*. Výsledky experimentů ukázaly, že exogenní auxiny výrazně redukuje růst koleoptile intaktních rostlin obou genotypů a že modré i červené světlo snižuje citlivost rostlin k oběma exogenním auxinům. Analýza mutanta *elm-1* vedla k závěru, že toto snížení citlivosti rostlin k auxinům vlivem světla je zprostředkováno fytochromy. Expresní analýzy ukázaly, že světlo ani exogenní auxiny neovlivňují významně expresi genů *ABP1* a *ABP4*. To vede k závěru, že změny v citlivosti rostlin k exogennímu auxinu vlivem světla nejsou pravděpodobně způsobeny ovlivněním receptorů *ABP1* a *ABP4*, ale jinými mechanismy. Vlivem světla pravděpodobně dochází k redukcí hladiny endogenních auxinů. Je tedy možné, že rostliny mutanta *elm-1*, méně citlivé ke světlu, akumulují více endogenních auxinů než rostliny B73. Pokud na tyto rostliny aplikujeme exogenní auxin, u mutanta *elm-1* dochází dříve než u B73 k překročení optimální hladiny auxinů v buňkách a akumulaci inhibičního množství auxinu. Při aplikaci exogenního auxinu o stejné koncentraci je pak prodlužovací růst mutanta *elm-1* inhibován více než růst standardního genotypu B73.

## POUŽITÁ LITERATURA

1. Ahmad M, Jarillo J A, Cashmore A R (1998) Chimeric proteins between cry1 and cry2 Arabidopsis blue light photoreceptors indicate overlapping functions and varying protein stability. *Plant Cell*, 10:197–207.
2. Barker-Bridges M, Ribnicky D M, Cohen J D, Jones A M (1998) Red-light-regulated growth. Changes in the abundance of indoleacetic acid in the maize (*Zea mays* L.) mesocotyl. *Planta*, 204:207–211.
3. Behringer F J, Davies P J (1992) Indole-3-acetic acid levels after phytochrome-mediated changes in the stem elongation rate of dark- and light-grown *Pisum* seedlings. *Planta*, 188:85–92.
4. Bořucká J, Fellner M (2012) Auxin binding proteins ABP1 and ABP4 are involved in the light – and auxin-induced down-regulation of phytochrome gene PHYB in maize (*Zea mays* L.) mesocotyl. *Plant Growth Regulation*, 68:503–509.
5. Bhalerao R P, Eklöf J, Ljung K, Marchant A, Bennett M, Sandberg G (2002) Shoot-derived auxin is essential for early lateral root emergence in *Arabidopsis* seedlings. *Plant Journal*, 29:325–32.
6. Braun N, Wyrzykowska J, Muller P, David K, Couch D, Perrot-Rechenmann C, Fleming AJ. (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.
7. Burgie E S, Vierstra R D (2014) Phytochromes: an atomic perspective on photoactivation and signaling. *Plant Cell*, 26:4568–4583.
8. Calderón-Villalobosa L I, Lee S, De Oliveira C, Ivetac A, Brandt W, Armitage L, Sheard L B, Tan X, Parry G, Mao H, Zheng N, Napier R, Kepinski S, Estelle M. (2012) A combinatorial TIR1/AFB-Aux/IAA co-receptor system for differential sensing of auxin. *Nature Chemical Biology*, 8:477–485.
9. Čudejková M, Řehulka J, Pěňčí A, Bergougnoux V, Fellner M (2012) Selection of the maize hybrid tolerant to a high dense planting altered cross-talk between blue light and auxin signaling pathway. *Current Topics in Plant Biology*, 13:21–34.

10. Chen J G, 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.
11. Chen X, Grandont L, Li H, Hauschild R, Paque S, Abuzeineh A, Rakusova H, Benkova E, PerrotRechenmann C, Friml J (2014) Inhibition of cell expansion by rapid ABP1-mediated auxin effect on microtubules. *Nature*, 516:90–93.
12. Cherry J R, Hondred D, Walker J M, Vierstra R D (1992) Phytochrome requires the 6-kDa N-terminal domain for full biological activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89:5039–5043.
13. Christie J M, Salomon M, Nozue K, Wada M, Briggs W R (1999) LOV (light, oxygen, or voltage) domains of the blue-light photoreceptor phototropin (nph1): binding sites for the chromophore flavin mononucleotide. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96:8779–83.
14. Christie J M, Blackwood L, Petersen J, Sullivan S (2015) Plant flavoprotein photoreceptors. *Plant and Cell Physiology*, 56:401–413.
15. Dai X, Zhang Y, Zhang D, Chen J, Gao X, Estelle M, Zhao Y (2015) Embryonic lethality of Arabidopsis *abp1-1* is caused by deletion of the adjacent BSM gene. *Nature Plants*, 1:15183.
16. Darwin C (1880) *The Power of Movement in Plants*. London, 1st Edn. German edition, transl. V. Carus, *Bewegungsvermögen der Pflanzen*. Stuttgart.
17. 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.
18. Devlin P F, Yanovsky M J, Kay S A (2003) A genomic analysis of the shade avoidance response in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 133:1617–1629.
19. Dharmasiri N, Dharmasiri S, Estelle M (2005a) The F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature*, 435:441–445.
20. Effendi Y, Rietz S, Fischer U, Scherer G F E (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*, 65:282–294.



21. Effendi Y, Jones A M, Scherer G F (2013) Auxin-Binding-Protein1 (ABP1) in phytochrome-B controlled responses. *Journal of Experimental Botany*, 64:5065–5074.
22. Ephritikhine G, Fellner M, Vannini C, Lapous D, BarbierBrygoo H (1999) The sax1 dwarf mutant of *Arabidopsis thaliana* shows altered sensitivity of growth responses to abscisic acid, auxin, gibberellins and ethylene and is partially rescued by exogenous brassinosteroid. *Plant Journal*, 18:303–314.
23. Fellner M, Horton L A, Cocke A E, Stephens N R, Ford E D, Van Volkenburgh E (2003) Light interacts with auxin during leaf elongation and leaf angle development in young corn seedlings. *Planta*, 216:366–376.
24. 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, 1:201–211.
25. Folta K M, Pontin M A, Karlin-Neumann G, Bottini R, Spalding E P (2003) Genomic and physiological studies demonstrate roles for auxin and gibberellin in the early phase of cryptochrome 1 action in blue light. *Plant Journal*, 36:203–214.
26. Gao Y, Zhang Y, Zhang D, Dai X, Estelle M, Zhao Y (2015) Auxin binding protein 1 (ABP1) is not required for either auxin signaling or *Arabidopsis* development. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112:2275–2280.
27. Grieneisen V A, Xu J, Maree A F, Hogeweg P, Scheres B (2007) Auxin transport is sufficient to generate a maximum and gradient guiding root growth. *Nature*, 449:1008–1013.
28. Grones P, Friml J (2015) Auxin transporters and binding proteins at a glance. *Journal of Cell Science*, 128:1–7.
29. Haagen-Smit A J, Dandliker W B, Wittwer S H, Murneek A E (1946) Isolation of 3-indoleacetic acid from immature corn kernels. *American Journal of Botany*, 33:118-120.
30. Halliday K J, Fankhauser C (2003) Phytochrome-hormonal signalling networks. *New Phytologist*, 157:449–463.
31. Hasenstein K H, Evans M L (1988) Effects of cations on hormone transport in primary roots of *Zea mays*. *Plant Physiology*, 86:890–894.

32. Hertel R, Thomson K S, Russo V E (1972) In vitro auxin binding to particulate cell fractions from corn coleoptiles. *Planta*, 107:325–340.
33. Hesse T, Feldwisch J, Balshüsemann D, Bauw G, Puype M, Vandekerckhove J, Löbler M, Klämbt D, Schell J, Palme K (1989) Molecular cloning and structural analysis of a gene from *Zea mays* (L.) coding for a putative receptor for the plant hormone auxin. *The EMBO Journal*, 8:2453–2461.
34. Huisinga B (1967) Influence of irradiation on the distribution of growth in dark-grown *Avena* seedlings. *Acta Botanica Neerlandica*, 16:197–201.
35. Iino M (1982a) Action of red light on indole-3-acetic-acid status and growth in coleoptiles of etiolated maize seedlings. *Planta*, 156:21–32.
36. Iino M (1982b) Inhibitory action of red light on the growth of the maize mesocotyl: evaluation of the auxin hypothesis. *Planta*, 156:388–395.
37. Im K H, Chen J G, Meeley R B, Jones A M (2000) Auxin-binding protein mutants in maize. *Maydica*, 45:319–325.
38. Jensen E B, Veierskov B (1998) Interaction between photoperiod, photosynthesis and ethylene formation in tomato plant (*Lycopersicon esculentum* cv. ailsa craig and ACC-oxidase antisense pTOM13). *Physiologia Plantarum*, 103:363–368.
39. 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.
40. Jones A M, Herman E M (1993) KDEL-containing auxin-binding protein is secreted to the plasma membrane and cell wall. *Plant Physiology*, 101:595–606.
41. Jones R L, Ougham H, Thomas H, Waaland S (2013) *The molecular life of plants*. Hoboken, NJ:Wiley-Blackwell.
42. Jurado S, Abraham Z, Manzano C, López-Torrejón G, Pacios L F, Del Pozo J C (2010) The Arabidopsis cell cycle F-box protein SKP2A binds to auxin. *Plant Cell*, 22:3891–3904.
43. Jurišič-Knežev D, Čudejková M, Zalabák D, Hlobilová M, Rolčik J, Pěněčík A, Bergougnoux V, Fellner M (2012) Maize AUXIN-BINDING PROTEIN 1 and

- AUXIN-BINDING PROTEIN 4 impact on leaf growth, elongation, and seedling responsiveness to auxin and light. *Botany/Botanique*, 90:990–1006.
44. Kasahara H (2016) Current aspects of auxin biosynthesis in plants. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 80:34–42.
  45. Kepinski S, Leyser O (2005) The Arabidopsis F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature*, 435(7041):446–51.
  46. Kleine T, Lockhart P, Batschauer A (2003) An Arabidopsis protein closely related to *Synechocystis* cryptochrome is targeted to organelles. *The Plant Journal*, 35:93–103.
  47. Kong S G, Suetsugu N, Kikuchi S, Nakai M, Nagatani A, Wada M (2013b) Both phototropin 1 and 2 localize on the chloroplast outer membrane with distinct localization activity. *Plant and Cell Physiology*, 54:80–92.
  48. Korasick D A, Westfall C S, Lee S G, Nanao M H, Dumas R, Hagen G, Guilfoyle T J, Jez J M, Strader L C (2014) Molecular basis for AUXIN RESPONSE FACTOR protein interaction and the control of auxin response repression. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111:5427–5432.
  49. Kraepiel Y, Miginiac E (1997) Photomorphogenesis and phytohormones. *Plant, Cell and Environment*, 20: 807–812.
  50. Kurepin L V, Walton L J, Reid D M (2007a) Interaction of red to far red light ratio and ethylene in regulating stem elongation of *Helianthus annuus*. *Plant Growth Regulation*, 51:53–61.
  51. Ljung K, Bhalerao R P, Sandberg G (2001) Sites and homeostatic control of auxin biosynthesis in *Arabidopsis* during vegetative growth. *Plant Journal*, 28:465–474.
  52. Ljung K, Hull A K, Celenza J, Yamada M, Estelle M, Normanly J, Sandberg G (2005) Sites and regulation of auxin biosynthesis in *Arabidopsis* roots. *Plant Cell*, 17:1090-1104.
  53. Liu H, Liu B, Zhao C, Pepper M, Lin C (2011) The action mechanisms of plant cryptochromes. *Trends in Plant Science*, 16:684–691.
  54. Liu Q, Wang Q, Deng W, Wang X, Piao M, Cai D, Li Y, Barshop W D, Yu X, Zhou T, Liu B, Oka Y, Wohlschlegel J, Zuo Z, Lin C (2017) Molecular basis for blue

- light-dependent phosphorylation of Arabidopsis cryptochrome 2. *Nature Communications*, 8:15234.
55. Löbner M, Klämbt D (1985) Auxin-binding protein from coleoptile membranes of corn (*Zea mays* L.) I. Purification by immunological methods and characterisation. *The Journal of Biological Chemistry*, 260:9848–9853.
  56. Mano Y, Nemoto K (2012) The pathway of auxin biosynthesis in plants. *Journal of Experimental Botany*, 63:2853–2872.
  57. Mashiguchi K, Tanaka K, Sakai T, Sugawara S, Kawaide H, Natsume M, Kasahara H (2011) The main auxin biosynthesis pathway in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108:18512–18517.
  58. Morris D A (2000) Transmembrane auxin carrier systems – dynamic regulators of polar auxin transport. *Plant Growth Regulation*, 32:161–172.
  59. Nagashima A, Suzuki G, Uehara Y, Saji K, Furukawa T (2008) Phytochromes and cryptochromes regulate the differential growth of Arabidopsis hypocotyls in both a PGP19-dependent and -independent manner. *Plant Journal*, 53:516–529.
  60. Nagatani A (2010) Phytochrome: structural basis for its functions. *Current Opinion in Plant Biology*, 13:565–70.
  61. Nanao M H, Vinos-Poyo T, Brunoud G, Thévenon E, Mazzoleni M, Mast D, Lainé S, Wang S, Hagen G, Li H, Guilfoyle T, Parcy F, Vernoux T, Dumas R (2014) Structural basis for oligomerization of auxin transcriptional regulators. *Nature Communications*, 5:3617.
  62. Naqvi S M (1976) Influence of ultraviolet-radiation on auxin transport in *Zea mays* L. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*, 80:306–309.
  63. Nash A I, Ko W H, Harper S M, Gardner K H (2008) A conserved glutamine plays a central role in LOV domain signal transmission and its duration. *Biochemistry*, 47:13842–9.
  64. Nishimura T, Mori Y, Furukawa T, Kadota A, Koshiba T (2006) Red light causes a reduction in IAA levels at the apical tip by inhibiting de novo biosynthesis from tryptophan in maize coleoptiles. *Planta*, 224:1427–1435.

65. Nito K, Wong C C, Yates J R, Chory J (2013) Tyrosine phosphorylation regulates the activity of phytochrome photoreceptors. *Cell Reports*, 3:1970–1979.
66. Paciorek T, Zazimalova E, Ruthardt N, Petrasek J, Stierhof Y D, KleineVehn J, Morris D A, Emans N, Jurgens G, Geldner N, Friml J (2005) Auxin inhibits endocytosis and promotes its own efflux from cells. *Nature*, 435:1251–1256.
67. Palme K, Gälweiler L (1999) PIN-pointing the molecular basis of auxin transport. *Current Opinion in Plant Biology*, 2:1335–1346.
68. Pédrón J, Thiery L, Agnes C, Côte E S, Costa C, Lobstein E, Kraepiel Y (2004) Polar auxin transport is required for the inhibition by blue light of the elongation-related LeEXT tomato gene. *Plant Growth Regulation*, 42:113–123.
69. Petrášek J, Mravec J, Bouchard R, Blakeslee J J, Abas M, Seifertová D, Wisniewska J, Tadele Z, Kubes M, Covanová M, Dhonukshe P, Skupa P, Benková E, Perry L, Krecek P, Lee O R, Fink G R, Geisler M, Murphy A S, Luschnig C, Zazimalová E, Friml J (2006) PIN proteins perform a rate-limiting function in cellular auxin efflux. *Science*, 312:914–918.
70. Rashotte A M, Poupart J, Waddell C S, Muday G K (2003) Transport of the two natural auxins, indole-3-butyric acid and indole-3-acetic acid, in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 133:761–72.
71. Robert S, Kleine-Vehn J, Barbez E, Sauer M, Paciorek T, Baster P, Vanneste S, Zhang J, Simon S, Čovanová M, Hayashi K, Dhonukshe P, Yang Z, Bednarek S Y, Jones A M, Luschnig C, Aniento F, Zažímalová E, Friml J (2010) ABP1 mediates auxin inhibition of clathrin-dependent endocytosis in Arabidopsis. *Cell*, 143:111–121.
72. Rockwell N C, Su Y S, Lagarias J C (2006) Phytochrome structure and signaling mechanisms. *Annual Review of Plant Biology*, 57:837–858.
73. Sakamoto K, Briggs W R (2002) Cellular and subcellular localization of phototropin 1. *Plant Cell*, 14:1723–1735.
74. Salehin M, Bagchi R, Estelle M. (2015) SCFTIR1/AFB-based auxin perception: mechanism and role in plant growth and development. *Plant Cell*, 27:9–19.
75. Salisbury F J, Hall A, Grierson C S, Hallida K J (2007) Phytochrome coordinates Arabidopsis shoot and root development. *Plant Journal*, 50:429–438.

76. Sauer M, Balla J, Luschnig C, Wisniewska J, Reinohl V, Friml J, Benkova E (2006) Canalization of auxin flow by Aux/IAA-ARF-dependent feedback regulation of PIN polarity. *Genes and Development*, 20:2902–2911.
77. Sawers R J H, 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*, 130:155–163.
78. Schwob E, Choi S-Y, Simmons C, Migliaccio F, Ilag L, Hesse T, Palme K, Soll D (1993) Molecular analysis of three maize 22 KDa auxin-binding protein genes: transient promoter expression and regulatory regions. *Plant Journal*, 4:423–432.
79. Sheehan M J, Farmer P R, Brutnell T P (2004) Structure and expression of maize phytochrome family homeologs. *Genetics*, 167:1395–1405.
80. Shin A-Y, Han Y-J, Baek A, Ahn T, Kim S Y, Nguyen T S, Son M, Lee K W, Shen Y, Song P-S, Kim J-I (2016) Evidence that phytochrome functions as a protein kinase in plant light signalling. *Nature Communications*, 7:11545.
81. Shimomura S, Sotobayashi, T, Futai, M, Fukui, T (1986) Purification and properties of an auxin-binding protein from maize shoot membranes. *The Journal of Biochemistry*, 99:1513–1524.
82. Skoog F, Miller C O (1957) Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro. *Symposia of the Society for Experimental Biology*, 11:118–131.
83. Sorce C, Picciarelli P, Calistri G, Ceccarelli N (2008) The involvement of indole-3-acetic acid in the control of stem elongation in dark- and light-grown pea (*Pisum sativum*) seedlings. *Journal of Plant Physiology*, 165:482–489.
84. Strader L C, Zhao Y (2016) Auxin perception and downstream events. *Current Opinion in Plant Biology*, 33:8–14.
85. 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*, 15:2648–2653.
86. Szemenyei H, Hannon M, Long J A. (2008) TOPLESS mediates auxin-dependent transcriptional repression during Arabidopsis embryogenesis. *Science*, 319:1384–1386.

87. Taiz L, Zeiger E (2010) *Plant Physiology*, 5th. Ed. International ed. Sunderland, Mass:Sinauer.
88. Thompson C L, Sancar A (2002) Photolyase/cryptochrome blue-light photoreceptors use photon energy to repair DNA and reset the circadian clock. *Oncogene*, 21:9043-9056.
89. Tian Q, Reed J W (2001) Molecular links between light and auxin signaling. *Journal of Plant Growth Regulation*, 20:274–280.
90. Tromas A, Paponov I, Perrot-Rechenmann C (2010) *Auxin-binding protein 1*: functional and evolutionary aspects. *Trends in Plant Science*, 15:436–446.
91. Wang, R, Estelle M (2014) Diversity and specificity: auxin perception and signaling through the TIR1/AFB pathway. *Current Opinion in Plant Biology*, 0:51–58.
92. Wang B, Chu J, Yu T, Xu Q, Sun X, Yuan J, Xiong G, Wang G, Wang Y, Li J (2015) Tryptophan-independent auxin biosynthesis contributes to early embryogenesis in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112:4821–4826.
93. Wisniewska J, Xu J, Seifertová D, Brewer P B, Ruzicka K, Blilou I, Rouquié D, Benková E, Scheres B, Friml J (2006) Polar PIN localization directs auxin flow in plants. *Science*, 312:883.
94. Woo E-J, Marshall J, Baulcy J, Chen J-G, Venis M, Napier R M, Pickersgill R W (2002) Crystal structure of auxin-binding protein 1 in complex with auxin. *The EMBO Journal*, 21:2877–2885.
95. Woodward A W, Bartel B (2005) Auxin: Regulation, action, and interaction. *Annals of Botany*, 95:707–735.
96. Xu T, Wen M, Nagawa S, Fu Y, Chen J G, Wu M J, Perrot-Rechenmann C, Friml J, Jones A M, Yang Z (2010) Cell surface- and rho GTPase-based auxin signaling controls cellular interdigitation in *Arabidopsis*. *Cell*, 143:99–110.
97. Yang H, Murphy A S (2009) Functional expression and characterization of *Arabidopsis* ABCB, AUX 1 and PIN auxin transporters in *Schizosaccharomyces pombe*. *Plant Journal*, 59:179–191.

98. Zenser N, Ellsmore A, Leasure C, Callis J (2001) Auxin modulates the degradation rate of Aux/IAA proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98:11795–11800.
99. Wu G, Spalding E P (2007) Separate functions for nuclear and cytoplasmic cryptochrome 1 during photomorphogenesis of *Arabidopsis* seedlings. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104:18813–18818.